



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PERUGIA
FACOLTÀ DI INGEGNERIA

Tesi di Laurea Magistrale in
INGEGNERIA INFORMATICA E DELL'AUTOMAZIONE
Anno Accademico 2011/2012

**Modellazione dinamica e strumenti per la
valutazione sperimentale del comportamento
della via EGFR-IGF1R per la linea cellulare
H1650**

Relatore

Prof. Paolo Valigi

Candidato

Dr. Giulio Spinozzi

Correlatore

Ing. Fortunato Bianconi

*Dedicato ai miei genitori
e a Laura*

Indice

1	Introduzione	8
2	La Systems Biology	10
2.1	Introduzione [52]	10
2.2	Il central dogma	11
2.2.1	Basi chimiche dell'ereditarietà: il DNA [10]	12
2.2.2	Sintesi delle proteine e malattie di natura enzimatica [10]	14
2.2.3	Geni, virus e cancro [10] [13]	16
2.3	L'approccio della Systems Biology [52] [5] [21]	18
2.4	Chimica della cellula [52]	19
2.5	Segnalazione cellulare [52]	21
2.6	Modellazione di una reazione biochimica [52] [28]	24
2.6.1	Grandezze fondamentali e definizioni	25
2.6.2	Reazioni elementari	25
2.7	Modellazione dinamica di reti biochimiche [52]	32
2.7.1	Modellazione Michaelis-Menten	35
2.7.2	Feedback e oscillazioni nei pathway di segnalazione	36
3	Il Modello: I Pathway EGFR e IGF1R [4]	43
3.1	Introduzione	43
3.2	Il Pathway	44
3.2.1	EGFR e IGF1R	44
3.2.2	Cascata MAPK	44
3.2.3	PIK3	45
3.3	Il Modello matematico	47
3.4	Simulazione del modello	50
4	Validazione sperimentale: Il Western Blot	52
4.1	Introduzione [52]	52
4.1.1	Il Western Blot	52
4.2	Quantificazione del Western Blot	55
4.3	Un nuovo algoritmo	59
4.3.1	Acquisizione delle immagini	61
4.3.2	Ottimizzazione immagini	63
4.3.3	Scarto delle immagini prive di informazione	64
4.3.4	Integrazione dei blot	67
4.3.5	Ordinamento delle proteine	70
4.3.6	Analisi dei risultati della quantificazione	70

5	Modello dinamico e Western Blot per la linea cellulare H1650	79
5.1	Introduzione	79
5.2	delE746-A750 su EGFR	79
5.3	Mancanza di PTEN	81
5.4	Il modello del pathway EGFR-IGF1R per le H1650	84
5.5	Confronto dei dati <i>in vitro</i> con quelli <i>in silico</i>	89
5.5.1	Il metodo dei minimi quadrati	89
6	Conclusioni e sviluppi futuri	99
6.1	Conclusioni	99
6.2	Sviluppi futuri	100
A	Codice MATLAB	106
A.1	Quantificazione automatica di WB	106
A.1.1	Setup	106
A.1.2	Analisi di WB	110
A.1.3	Script di verifica immagini	121
A.2	Modello del pathway EGRF-IGF1R per la linea cellulare H1650	124
A.2.1	Function per l'integrazione del modello tramite ode15s	124
A.2.2	Script del modello	126
A.2.3	Metodo dei minimi quadrati	128

Elenco delle figure

1.1	Schema a blocchi concettuale del progetto	8
2.1	Il Central Dogma	11
2.2	Chimica del DNA e dell'RNA	12
2.3	Replicazione del DNA [49]	13
2.4	Sintesi proteica: traduzione	15
2.5	La sequenza di DNA di un gene codifica la sequenza di amminoacidi di una proteina	16
2.6	La modellazione matematica è un processo attraverso il quale si stabilisce una rappresentazione astratta di un sistema naturale. Un modello, per essere una valida rappresentazione, è necessario metterlo in relazione con caratteristiche osservabili di un sistema biologico.	18
2.7	Illustrazione del campo di applicazione e competenze della biologia dei sistemi: genomica e bioinformatica per comprendere le attività funzionali.	19
2.8	Semplificazione della segnalazione cellulare	21
2.9	Sinistra: molto spesso i recettori sono legati alla trans-membrana, dove si agganciano ad un ligando. Destra: piccole molecole di segnalazione possono entrare nella cellula in cui si attivano i recettori interni.	22
2.10	Componenti molecolari base coinvolti nella segnalazione cellulare	23
2.11	Fosforilazione e de-fosforilazione del pathway MAPK	23
2.12	Evoluzione di una reazione reversibile	29
2.13	Andamento di una reazione consecutiva	30
2.14	Andamento di una reazione auto-catalitica	31
2.15	Rappresentazione grafica della reazione (2.11)	33
2.16	Trasduzione del segnale tramite fosforilazione sequenziale e defosforilazione. La fosforilazione è facilitata per mezzo di una chinasi mentre la defosforilazione è realizzata da una fosfatasi. Lo stato fosforilato è indicato con l'aggiunta di un -P al nome della proteina, oppure con un *.	34
2.17	Schema a blocchi, (de-) fosforilazione	37
2.18	Schema a blocchi semplificato del 2.17	37
2.19	Mappa del pathway MAP chinasi	37
2.20	Il pathway MAP chinasi	38
2.21	Schema a blocchi, doppia fosforilazione	39
2.22	Schema a blocchi, semplificazione della doppia fosforilazione	40
2.23	Schema a blocchi semplificato del 2.19	40
2.24	Cicli di feedback	40
2.25	Le due tipologie di feedback	41

2.26	Fosforilazione della proteina X per mezzo della chinasi E	42
3.1	Il pathway EGFR-IGF1R	46
3.2	Andamenti di $EGFR^*$, $IGF1R^*$, ERK^* e Akt^* , modello base EGFR-IGF1R	51
4.1	Blotting tramite azione capillare	53
4.2	Elettroblotting, blotting per mezzo di un campo elettrico	53
4.3	L'uso di anticorpi nel separare le proteine e come la presenza di proteine è resa visibile.	54
4.4	Un esempio di WB	56
4.5	Calcolo dei contorni per 4.4 (b)	56
4.6	WB da integrare	58
4.7	Integrazione di 4.6 tramite ImageJ 1.47b	58
4.8	Diagramma di flusso dell'algoritmo	60
4.9	Esempio di una lastra scannerizzata e salvata in formato TIFF	61
4.10	Inserimento dei parametri in MATLAB	62
4.11	Un'immagine in scala di grigi e il suo istogramma	63
4.12	Immagine 4.11 ottimizzata e il suo istogramma	64
4.13	Immagini prese a campione, non ottimizzate	65
4.14	Immagini 4.13 in bianco e nero, non ottimizzate	65
4.15	Immagini 4.13 prese a campione, ottimizzate tramite CLAHE	66
4.16	Immagini 4.13 ottimizzate in bianco e nero	66
4.17	Istogramma delle immagini 4.13 ottimizzate con CLAHE	67
4.18	Istogramma dei rapporti BN	67
4.19	Integrazione dei blot, un caso particolare	69
4.20	Andamenti della $\beta Actina$ (WT, L1, L2 e L1+L2), esposizione 5 secondi	72
4.21	Andamenti della $\beta Actina$ (WT, L1, L2 e L1+L2), esposizione 30 secondi	72
4.22	Andamenti della $\beta Actina$ (WT, L1, L2 e L1+L2), esposizione 1 minuto	73
4.23	Andamenti della $\beta Actina$ (WT, L1, L2 e L1+L2), esposizione 2 minuti	73
4.24	Andamenti ERK^* , esposizione 2 ore	74
4.25	Andamenti $ERK^*/\beta Actina$, esposizione 2 ore	74
4.26	Andamenti Akt^* , esposizione 2 ore	75
4.27	Andamenti $Akt^*/\beta Actina$, esposizione 2 ore	75
4.28	Andamenti $EGFR^*$, esposizione 2 ore	76
4.29	Andamenti $EGFR^*/\beta Actina$, esposizione 2 ore	76
4.30	Andamenti $IGFR^*$, esposizione 2 ore	77
4.31	Andamenti $IGFR^*/\beta Actina$, esposizione 2 ore	77
4.32	Andamento $(ERK+ERK^*)/\beta Actina$	78
5.1	I recettori per EGF e IGF	80
5.2	EGFR mutato, PTEN ed Erlotinib nelle H1650 [43]. A , EGFR mutato, PTEN e mancanza di Erlotinib: diminuzione della produzione di PIP3. B , EGFR mutato, PTEN e somministrazione Erlotinib: inibizione della produzione di PIP3. C , EGFR mutato, mancanza di PTEN e somministrazione di Erlotinib: nessun effetto su PIP3.	82
5.3	Il pathway semplificato di PTEN	83
5.4	Il pathway EGFR-IGF1R, con l'aggiunta del modello dei recettori e PTEN	85
5.5	Andamenti $EGFR^*$, $IGF1R^*$, ERK^* e Akt^* (WT), modello (H1650)	86

5.6	Andamenti EGFR*, IGF1R*, ERK* e Akt* (L1), modello (H1650)	86
5.7	Andamenti EGFR*, IGF1R*, ERK* e Akt* (L2), modello (H1650)	87
5.8	Andamenti EGFR*, IGF1R*, ERK* e Akt* (L1+L2), modello (H1650)	87
5.9	Andamenti EGFR*, IGF1R*, ERK* e Akt* (WT), modello (H1650) per $k_{mutation} = 0.2$	88
5.10	Andamento EGFR*, IGF1R*, ERK* e Akt* (WT), modello (H1650) per $k_{mutation} = 0.05$	89
5.11	Andamento ERK* (WT), modello/WB, EGFR-IGF1R (H1650)	90
5.12	Andamento ERK* (L1), modello/WB, EGFR-IGF1R (H1650)	91
5.13	Andamento ERK* (L2), modello/WB, EGFR-IGF1R (H1650)	91
5.14	Andamento ERK* (L1+L2), modello/WB, EGFR-IGF1R (H1650)	92
5.15	Andamento Akt* (WT), modello/WB, EGFR-IGF1R (H1650)	92
5.16	Andamento Akt* (L1), modello/WB, EGFR-IGF1R (H1650)	93
5.17	Andamento Akt* (L2), modello/WB, EGFR-IGF1R (H1650)	93
5.18	Andamento Akt* (L1+L2), modello/WB, EGFR-IGF1R (H1650)	94
5.19	Andamento EGFR* (WT), modello/WB, EGFR-IGF1R (H1650)	94
5.20	Andamento EGFR* (L1), modello/WB, EGFR-IGF1R (H1650)	95
5.21	Andamento EGFR* (L2), modello/WB, EGFR-IGF1R (H1650)	95
5.22	Andamento EGFR* (L1+L2), modello/WB, EGFR-IGF1R (H1650)	96
5.23	Andamento IGFR* (WT), modello/WB, EGFR-IGF1R (H1650)	96
5.24	Andamento IGFR* (L1), modello/WB, EGFR-IGF1R (H1650)	97
5.25	Andamento IGFR* (L2), modello/WB, EGFR-IGF1R (H1650)	97
5.26	Andamento IGFR* (L1+L2), modello/WB, EGFR-IGF1R (H1650)	98

Elenco delle tabelle

3.1	Reazioni e leggi cinetiche del modello [4]	48
3.2	Costanti del modello [4]	49
3.3	Concentrazioni iniziali del modello [4]	50
4.1	Struttura lucidi WB	62
5.1	Costanti delle reazioni per il recettore di EGF modellate dalle equazioni 5.1	81
5.2	Concentrazioni iniziali per il modello del recettore di EGF	81