

Tesis de Grado

# Generación de oscilaciones biológicas combinando compartimentalización y secuestro en señalización celular

Givre, Alan

2017

Este documento forma parte de las colecciones digitales de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [bibliotecadigital.exactas.uba.ar](http://bibliotecadigital.exactas.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the digital collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [bibliotecadigital.exactas.uba.ar](http://bibliotecadigital.exactas.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Givre, Alan. (2017). Generación de oscilaciones biológicas combinando compartimentalización y secuestro en señalización celular. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. [https://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario\\_nFIS000018\\_Givre](https://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario_nFIS000018_Givre)

Cita tipo Chicago:

Givre, Alan. "Generación de oscilaciones biológicas combinando compartimentalización y secuestro en señalización celular". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2017. [https://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario\\_nFIS000018\\_Givre](https://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario_nFIS000018_Givre)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

# **Generación de oscilaciones biológicas combinando compartimentalización y secuestro en señalización celular.**

Alan Givré

Febrero 2016

**Título:** Generación de oscilaciones biológicas combinando compartimentalización y secuestro en señalización celular.

**Alumno:** Alan Givré

**L.U. N°:** 218/11

**Lugar de Trabajo:** Instituto de Fisiología, Biología Molecular y Neurociencias. IFyBINE (UBA-CONICET) y Departamento de Física (DF-UBA)

**Director:** Dra. Alejandra Ventura

**Co-director:** Dr. Hernán Grecco

**Fecha de Inicio:** Abril 2016

**Fecha de Finalización:** Febrero 2017

**Fecha del Examen:** 2 de Marzo de 2017

**Informe Final Aprobado Por:**

---

**Autor**

---

**Jurado**

---

**Director**

---

**Jurado**

---

**Co-director**

---

**Jurado**

---

**Profesor**

## Resumen

**Introducción.** El procesamiento de información es un elemento clave en la vida desde el punto de vista biológico, para poder actuar en forma distinta según las circunstancias externas e internas. Una estructura recurrente en las redes bioquímicas involucradas en el procesamiento de información es un ciclo de modificación reversible, que involucra dos estados de una misma proteína: la proteína es activada por la incorporación de un grupo químico y desactivada por su remoción, donde “activo” significa que la proteína puede realizar alguna tarea específica. Las redes bioquímicas involucran cascadas de estas estructuras, donde cada una de estas proteínas activadas actúa como activadora de otro ciclo similar.

Las células no son homogéneas, están compartimentalizadas. Recientemente, fue mostrado que la compartimentalización de un ciclo de activación-inactivación puede generar biestabilidad, un comportamiento emergente que no es posible sin el agregado de un *feedback positivo* regulatorio al ciclo. La presencia de un compartimiento genera en manera no trivial este *feedback*, dando lugar al comportamiento mencionado.

En este trabajo se consideró un ciclo, en el cual diferentes componentes entran y salen de un compartimiento celular (por ejemplo, el núcleo), en el cual se encuentran nuevamente y realizan el mismo ciclo de activación e inactivación. La proteína activada dentro del compartimiento actúa sobre un objetivo celular, de tal manera que es secuestrado por este sustrato en una reacción simple de pegado. Este circuito simple y genérico de señalización es una estructura recurrente en muchos caminos de señalización.

También fue mostrado que el secuestro por una reacción de pegado genera un efecto de *feedback negativo* sobre un ciclo de activación-desactivación, algo que fue llamado *feedback negativo implícito* o *feedback oculto*.

**Resultados.** En el circuito de señalización mencionado, formado por un ciclo cuyos componentes se trasladan dentro y fuera de un compartimiento donde activa un objetivo recibiendo, así, un (implícito) *feedback negativo* debido a esta activación, coexisten los fenómenos de biestabilidad y de *feedback negativo*. Desde un punto de vista de sistemas dinámicos con la elección correcta de las escalas temporales involucradas esta combinación podría generar oscilaciones. Un régimen oscilatorio podría ser guiado por un oscilador de *Van der Pol*, el cual está basado en la combinación de un sistema biestable rápido y una variable lenta que alterna al sistema entre las dos ramas estables.

Probamos esta hipótesis a través de herramientas teórico-computacionales. Se caracterizaron los distintos regímenes de señalización que el circuito mencionado puede exhibir, utilizando un análisis de Fourier, y se exploraron las ocurrencias de estos distintos regímenes en el espacio de parámetros. Estos resultados resaltan un nuevo mecanismo para explicar la emergencia de oscilaciones que no requiere de otros mecanismos que suelen ser invocados (retardo temporal, *feedback negativo* explícito).

Se encontró que estas oscilaciones son generalizables a otras topologías de señalización biestables, a partir de la correcta elección de algunos parámetros claves.

**Conclusiones.** La estructura de señalización que fue caracterizada es ubicua entre los caminos de señalización celular, por lo que un régimen oscilatorio es accesible para ellos con los parámetros adecuados. Este mecanismo podría ser el mecanismo subyacente de muchos relojes biológicos, y también es generalizable para otros sistemas.

# Índice general

<b>1. Introducción</b>	<b>4</b>
1.1. Osciladores en biología. . . . .	4
1.2. Topologías de señalización que generan oscilaciones . . . . .	5
1.3. Osciladores de relajación. . . . .	8
1.4. Compartimentalización en biología. . . . .	11
1.5. Biestabilidad en biología. . . . .	11
1.6. Secuestro. . . . .	12
1.7. Esquema de la tesis. . . . .	13
<b>2. Antecedentes</b>	<b>14</b>
2.1. Biestabilidad por compartimentalización . . . . .	14
2.2. Oscilador de relajación por secuestro . . . . .	18
2.3. Balance de los antecedentes . . . . .	22
<b>3. Métodos</b>	<b>23</b>
3.1. Estudio de Nulclinas . . . . .	23
3.2. Ciclo de doble con enzimas compartidas . . . . .	23
3.3. Chemical Reaction Network Toolbox . . . . .	24
3.4. MatCont . . . . .	25
3.5. Muestreo de parámetros . . . . .	26
3.6. Búsqueda de oscilaciones . . . . .	27
<b>4. Modelo que combina compartimentalización y secuestro</b>	<b>30</b>
4.1. Un análisis detallado del sistema biestable con secuestro de Liu et al. . . . .	30
4.2. Modelo completo estudiado en esta tesis. . . . .	31
4.3. Procedimiento para generar oscilaciones. . . . .	33
4.4. Intersecciones de las nulclinas. . . . .	36
4.5. Interpretación de parámetros. . . . .	37
<b>5. Exploración numérica</b>	<b>38</b>
5.1. Comparación entre resultados analíticos y resultados numéricos . . . . .	38
5.2. Más allá de los resultados analíticos. . . . .	40
<b>6. Generalización</b>	<b>42</b>
6.1. Otras topologías que dan biestabilidad . . . . .	42
6.2. Generalización del procedimiento para generar oscilaciones. . . . .	43
<b>7. Conclusiones</b>	<b>47</b>
<b>A. Tiempo característico del oscilador aperiódico.</b>	<b>51</b>
A.1. Memoria en el modelo central de la tesis. . . . .	51
A.2. Espectro de Fourier de un pulso y de una señal periódica. . . . .	52
A.3. Análisis de un modelo simplificado. . . . .	52

A.4. Cálculo de la desviación estándar del espectro de Fourier. . . . .	53
A.4.1. Régimen de fondo. . . . .	53
A.4.2. Régimen de resonancia. . . . .	53
A.4.3. Puesta a prueba del modelo. . . . .	54
A.4.4. Perturbación del modelo ideal. . . . .	56
A.4.5. Composición de la amplitud debido a los dos tipos de ciclos. . . . .	57
A.5. Implicancia en la selección del método. . . . .	57
A.6. Selección del tiempo característico. . . . .	58

# Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a mi directora, Alejandra Ventura. Lo que hace disfrutable una tesis es tener una buena directora. Y este fue el caso, en este trayecto, aprendí muchísimo y con una sonrisa en el rostro. El apoyo y acompañamiento que me dio fue indispensable para que hoy haya terminado. No puedo terminar de describir toda la gratitud que le tengo. También quiero agradecer a Hernán Grecco, quien me otorgó la perspectiva y el contexto de un trabajo científico, algo que venía años debiendo.

Quiero agradecer en segundo lugar, a mi familia. A mis padres, sin su apoyo no habría llegado acá, dándome todas sus herramientas, los andamios que uno necesita para salir a la vida. Y más recientemente escuchándome tantas veces hablar de mi tesis aún ya estando cansados de ella. Y a mi hermana Mai, en quien encontré una confidente y un apoyo en toda la vida, y más recientemente fue la asesora estética de muchos trabajos. Pero también quiero agradecer a mis abuelas, tíos y primas que me apoyaron en todo el camino.

También quiero agradecer a mis compañeros de viaje en este trayecto. A mis compañeros de física, con quienes compartí la belleza de la física, y a mis compañeros de IBMC con quienes conocí por primera vez lo que es la biología. A los expedicionarios, con quienes conocí qué era la Ciencia por primera vez, y entre los cuales sigo guardando grandes amigos. Y también a mis compañeros del bachi, con quienes compartí aprender cómo se puede transformar el mundo.

Quiero agradecer a dos de quienes fueron probablemente quienes más hicieron de mí lo que soy ahora, pero hoy ya no están más porque siguieron su propio camino.

Por último, pero en absoluto menos importante quiero agradecer a algunos de mis mejores amigos, porque sin el cariño de Ludmila, el apoyo de Sol, la comprensión de Fran, las charlas con Diego (vas a ver cómo cierra) y las noches de relax con Fede este camino no habría tenido la riqueza que tuvo.

# Capítulo 1

## Introducción

### 1.1. Osciladores en biología.

Las variables que caracterizan el estado de los seres vivos frecuentemente varían en forma cíclica. Un ejemplo sencillo de esto es el ciclo circadiano, en el cual los seres vivos acoplan su ritmo al del ciclo diario del día y la noche. Aquellos ciclos suelen ser autónomamente generados[1]. En el caso anterior, por ejemplo, este “reloj biológico” es generado por una red donde una proteína “reloj” inhibe su propia transcripción, o redes más complejas[2]. Aquellas variables pueden ser desde la concentración de sustancias hasta la expresión de genes, o incluso el comportamiento de un ser vivo.

El foco en este trabajo está centrado en la dinámica cíclica de la concentración de moléculas, es decir, osciladores bioquímicos. Estrictamente, en este trabajo las moléculas -que son proteínas- no cambiarán su cantidad, sino su estado.

Las oscilaciones bioquímicas son disipativas [3] (es decir, el espacio de fases disminuye a lo largo de la trayectoria). Esto significa que el sistema tiende a un ciclo límite sin importar el estado inicial (si hay un único atractor en el sistema, que es el caso de todos los sistemas que vamos a estudiar). Es decir, la amplitud, el período y la forma de las oscilaciones no dependen del estado inicial, sólo la fase. Esto se muestra en la fig. 1.1.

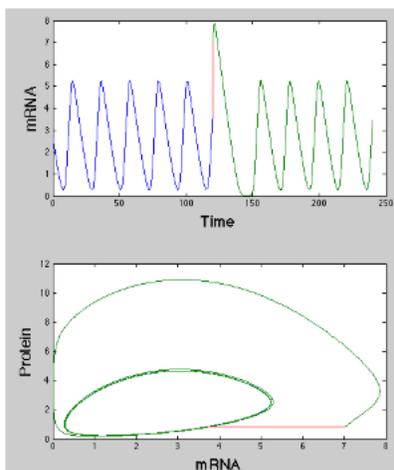


Figura 1.1: Trayectoria del sistema que modela un oscilador circadiano. En la figura de arriba se muestra el curso temporal, y en la de abajo, la trayectoria en el espacio de fases. Se muestran dos condiciones iniciales, cada una representada por un diferente color. Éstas no influyen en la amplitud del oscilador generado.

Hay muchos otros ejemplos de osciladores en los seres vivos, que tienen períodos que van desde segundos hasta horas. Por ejemplo, existen oscilaciones glicolíticas, es decir, oscilaciones en el metabolismo de la

glucosa, que tienen un período de unos 2 minutos. Y para ciclos más largos, la somitogénesis (conformación de los segmentos de los vertebrados) es generada por un oscilador que tiene un período de alrededor de una hora (aunque varía de organismo a organismo); o también hay oscilaciones en los sistemas de señalización de la inflamación, de período de unas dos horas [3] [4] [5]. Cuando las células están en un proceso de división celular, éstas alternan entre el estado de la interfase, donde las células crecen y juntan los nutrientes para dividirse, y la mitosis propiamente dicha. En ésta, la célula se divide por un proceso complejo. Este ciclo celular está regulado también por un oscilador bioquímico a partir de distintas proteínas de señalización, como las ciclinas[6].

## 1.2. Topologías de señalización que generan oscilaciones

Los organismos vivos requieren de un sensado de sí mismos, para actuar en forma coordinada. Un ejemplo de esto es la homeostasis, donde la comprobación de un alejamiento de condiciones ideales para la vida activa los mecanismos para la corrección de este alejamiento, como por ejemplo, una temperatura estable. Este fenómeno, es llamado “retroalimentación” o *feedback*[7]. Para comprender este concepto, es necesario resaltar que los distintos componentes de los procesos de señalización interactúan activándose o inhibiéndose mutuamente. Estos sistemas se representan por distintos diagramas, como se muestra en la fig. 1.2.



Figura 1.2: Diagramas de reacciones. 1.2a X activa a Y. 1.2b X inhibe a Y.

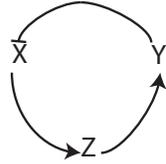
Cuando un componente se activa a sí mismo o activa a un segundo componente que activa al primero (y diversas otras combinaciones), se dice que existe un *feedback positivo* involucrado. Cuando un componente se inhibe a sí mismo o inhibe a un segundo componente que activa al primero, se dice que está presente un *feedback negativo*. Esto se muestra en la fig. 1.3.



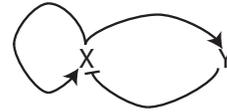
Figura 1.3: Feedbacks. 1.3a Ejemplo de *feedback* positivo. 1.3b Ejemplo de *feedback* negativo.

Existen dos únicas topologías que generan oscilaciones persistentes[4]. Siempre es necesario un *feedback*

*negativo* y cierta no linealidad en el sistema. La primer topología involucra un retardo (explícito o por componentes intermedios involucrados). Esta topología genera oscilaciones suaves, como las sinusoidales. La otra topología involucra un *feedback positivo* rápido además del *feedback negativo*. Este tipo de oscilaciones genera oscilaciones de tipo pulso o *spike* y se llaman osciladores de relajación. Estas dos topologías se muestran en la fig. 1.4.



(a)



(b)

Figura 1.4: Topologías para generar oscilaciones. 1.4a Topología de *feedback negativo* con retardo. 1.4b Topología de *feedbacks* incoherentes.

Se muestra la diferencia en la forma de las oscilaciones suaves y las de tipo *spike* en la fig. 1.5.

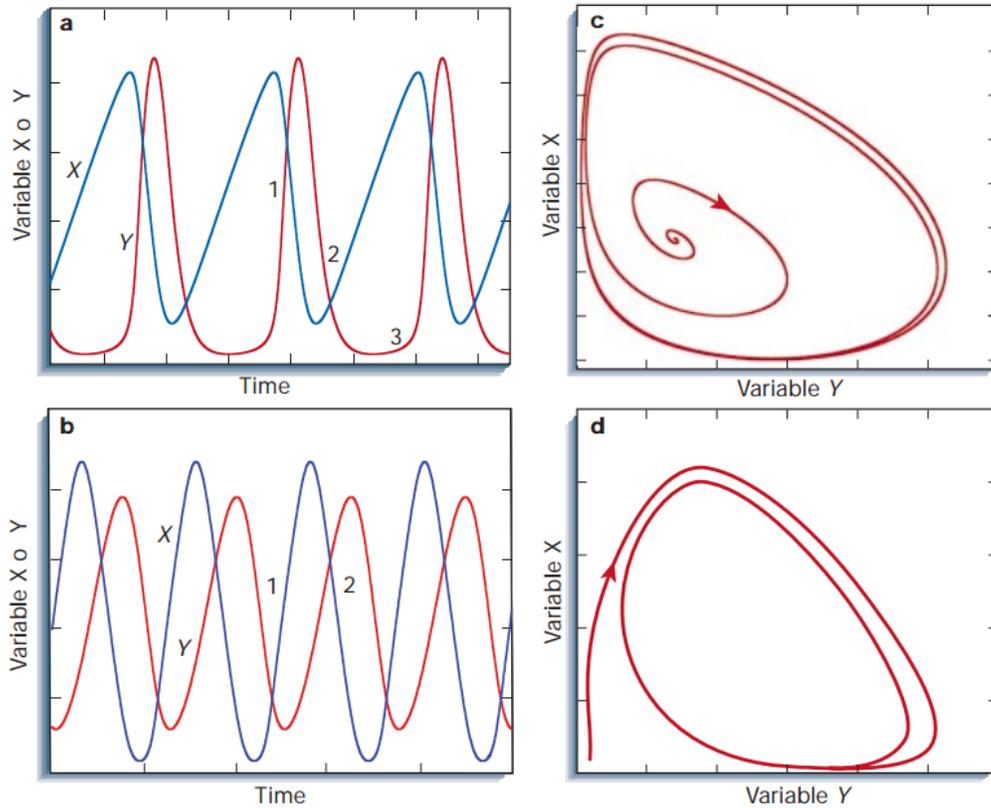


Figura 1.5: Oscilaciones tipo “spike” vs Oscilaciones por retardo: en la figura a y b se observan oscilaciones de tipo spike (en función del tiempo y su trayectoria respectivamente). En la figura c y d se observan oscilaciones generadas por *feedbacks negativos* con retardo (en función del tiempo y su trayectoria respectivamente). Figura adaptada de Goldbeter[8].

En realidad, muchas oscilaciones complejas que involucran una gran cantidad de componentes, poseen varios *feedbacks positivos* (aunque siempre tienen un *feedback negativo*), con la función de generar transiciones más abruptas, como se muestra en la fig. 1.6.

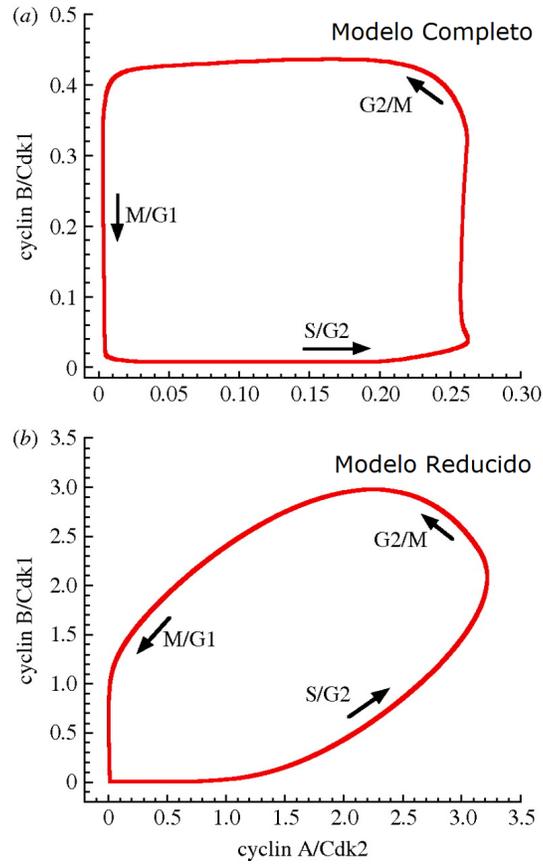


Figura 1.6: Rol de *feedbacks positivos*. Oscilación de proteínas efectoras del ciclo celular de los mamíferos -las ciclinas *Cdk1* y *Cdk2*- a lo largo de aquel. En el modelo reducido sólo se involucran *feedbacks negativos* retardados. Al agregar *feedbacks positivos*, generando el modelo completo, el sistema adquiere transiciones más abruptas. Figura adaptada de [9].

### 1.3. Osciladores de relajación.

Los osciladores de relajación involucran un *feedback positivo* rápido y un *feedback negativo* lento (es decir, hay una separación de escalas temporales). A lo largo de este trabajo se eligen subsistemas rápidos que no sólo involucren *feedbacks positivos* sino que también sean biestables.

Un sistema biestable es un sistema tal que dado un set de parámetros, posee dos estados estacionarios estables (a los cuales se accede por diferentes condiciones iniciales) [15]. En general, estos sistemas tienden a tener histéresis (es decir, mantienen una memoria ante la retirada de su estímulo), como se puede ver en el diagrama de bifurcaciones de la fig. 1.7.

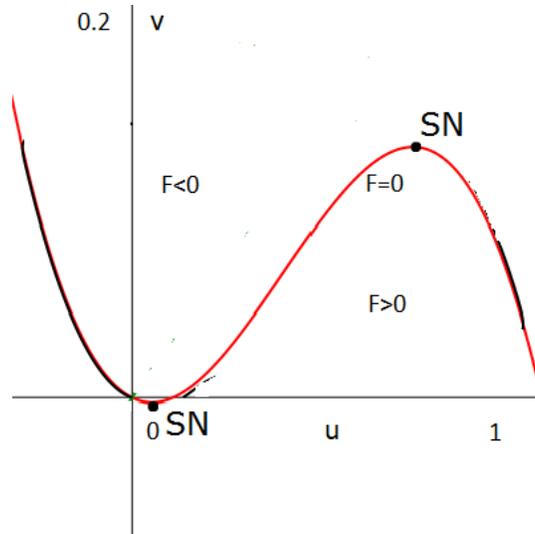


Figura 1.7: Diagrama de bifurcaciones para un sistema biestable descrito por las ecuaciones 1.1. Se destacan las bifurcaciones *saddle nodes*. En la imagen se muestra la nulclina de la variable  $u$ . Se muestra en cada sección el signo de  $F = \dot{u}$ .

Para comprender las oscilaciones de relajación, por primera vez teorizadas por Van der Pol [10], se puede utilizar un diagrama de nulclinas, mostrado en la fig. 1.8. Las ecuaciones son ecuaciones no lineales de dos dimensiones 1.1 con una separación de escalas temporales dada por  $\mu \gg 1$  ( $\mu$  es el único parámetro del sistema).

$$\begin{aligned}\dot{u} &= \mu\left(u - \frac{1}{3}u^3 - v\right) \\ \dot{v} &= \frac{1}{\mu}v\end{aligned}\tag{1.1}$$

La nulclina del subsistema biestable consiste en los puntos en los cuales la velocidad no tiene componentes en aquel subsistema. Como este subsistema es rápido, en líneas generales, el sistema no se aleja por mucho tiempo de esta nulclina. Sin embargo, la otra nulclina, que marca el *feedback negativo*, muestra una dinámica restitutiva. Esto es, a la derecha de la nulclina el sistema se mueve hacia la izquierda, y a la izquierda de la nulclina, el sistema se mueve hacia la derecha. De esta manera, el sistema se mueve en el sentido contrario de las agujas del reloj, y, al acceder a las bifurcaciones punto silla (generalmente llamados en inglés, *saddle nodes*) de la nulclina del sistema rápido, rápidamente se desplaza hacia la otra rama de la nulclina. Esto se puede ver en la fig. 1.8.

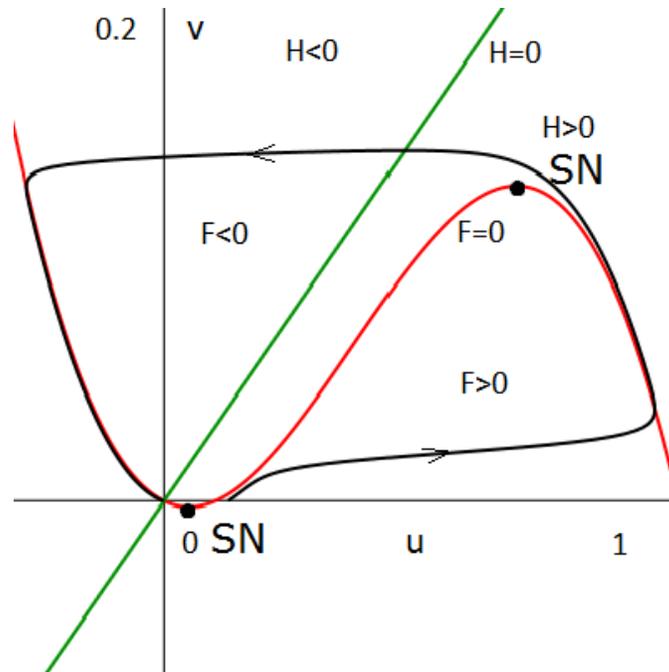


Figura 1.8: Diagrama de nulclinas para el oscilador de relajación señalado en las ecuaciones 1.1, incluyendo la trayectoria del sistema. Se muestra en cada sección el signo de  $F = \dot{u}$  y de  $H = \dot{v}$ . Figura adaptada de [11].

Nótese que para que el sistema pueda contener oscilaciones de relajación, es necesario que el subsistema biestable tenga un diagrama particular de bifurcaciones tomando como parámetro de bifurcación la variable lenta, además de ser biestable. Así, es necesario que el sistema recorra dos *saddle nodes* y en determinado orden. Se muestran dos sistemas cuyos diagramas de nulclinas muestran que el sistema no posee oscilaciones (para esos parámetros), en la fig. 1.9.

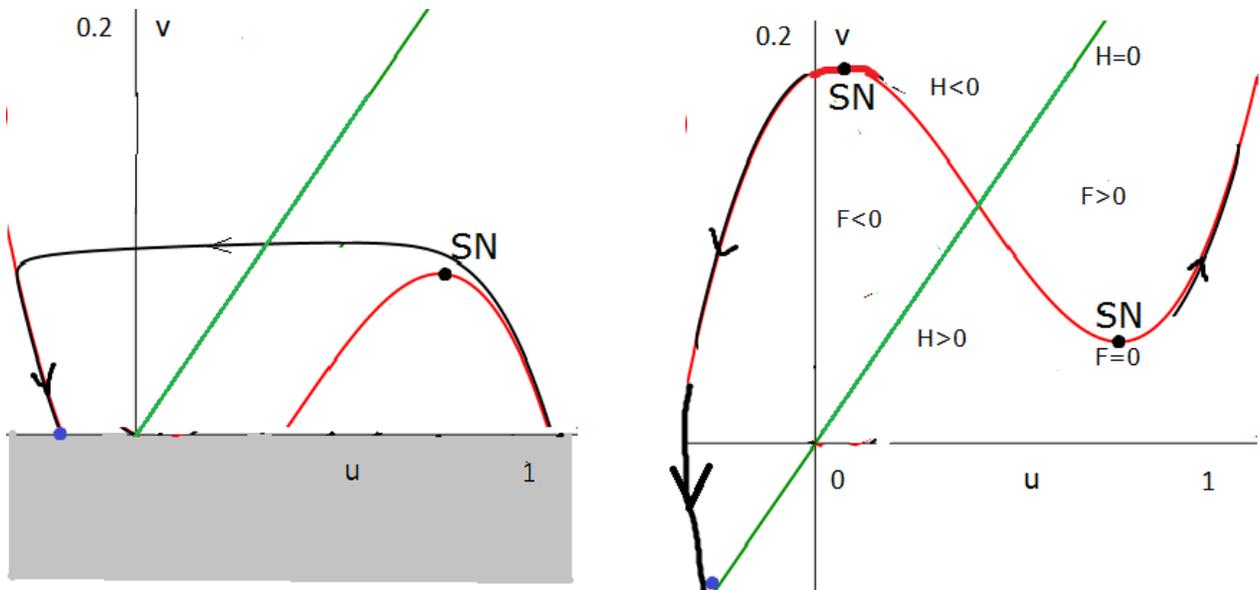


Figura 1.9: Diagramas de nulclinas de sistemas que no tienen oscilaciones. En la figura de la derecha, se invierte la nulclina del subsistema rápido. En la figura de la izquierda se muestra, en grisado, el sector del espacio de fases que no es accesible al sistema. Ambos sistemas terminan en un punto fijo marcado en azul.

En otras palabras, para generar un oscilador de relajación es necesario tanto un subsistema biestable como un *feedback negativo*. Esta tesis trata sobre cómo generar cada uno de éstos para realizar una oscilación de relajación. La biestabilidad se generará a través de la compartimentalización y el *feedback negativo* a través de un proceso llamado secuestro. A continuación se menciona muy brevemente cada uno de los procesos, que serán descritos en detalle en los capítulos que siguen.

## 1.4. Compartimentalización en biología.

Muchas veces la dinámica usada para describir las redes de señalización asume un sistema espacialmente homogéneo, pero los sistemas biológicos no lo son. En particular hay un aspecto que se destaca y es la existencia de compartimientos membranosos semipermeables. Esto genera tres sistemas más bien homogéneos: el exterior del compartimiento, la membrana en sí misma y el interior del compartimiento (en este trabajo nos concentramos en el exterior y el interior del compartimiento). Las células mismas son compartimientos membranosos. Y en particular, todas las células eucariotas tienen compartimientos, de los cuáles el más destacable es el núcleo, que aloja el material genético de la célula. Pero las células eucariotas también poseen otros compartimientos como las organelas (por ejemplo, la mitocondria y los retículos endoplasmáticos liso y rugoso).

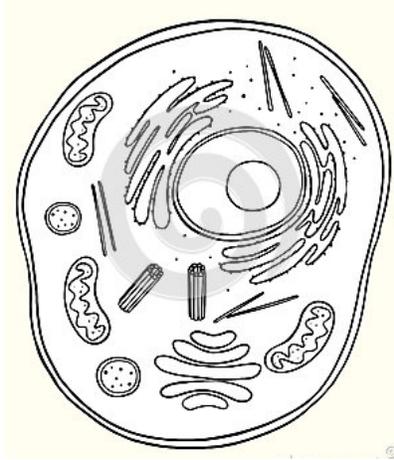


Figura 1.10: Diagrama de una célula animal. Se puede observar el núcleo y la membrana exterior. También se pueden observar organelas (mitocondrias y retículo endoplasmático). Figura adaptada de [12].

## 1.5. Biestabilidad en biología.

Un proceso biológico que involucra un *feedback positivos* y biestabilidad es la mitosis. Ésta se encuentra entre los eventos más dramáticos en la biología celular[6]. Al comienzo de la mitosis, una célula mamífera se redondea y condensa sus cromosomas, la membrana nuclear se rompe y el citoesqueleto se reorganiza para formar el huso acromático. La transición de la interfase a la mitosis es temporalmente abrupta, de carácter todo-nada e irreversible. El proceso de mitosis es disparado por la activación y translocación nuclear del complejo Cdk1-ciclina B1[6]. A priori, no se espera que ninguno de los procesos bioquímicos que culminan en la acumulación de Cdk1-ciclina B1 en forma activa en el núcleo sean de carácter todo o nada, ni tampoco irreversibles. ¿Cómo hacen entonces estas proteínas de señalización cuya actividad es gradual y reversible para producir, de manera colectiva, una respuesta de tipo todo o nada irreversible?

Es que existen procesos (*feedbacks positivos*) que transforman esta actividad gradual en un sistema *todo o nada* (biestable). En general, para encontrar la causa de la biestabilidad suelen buscarse circuitos de retroalimentación positiva explícitos. El grupo de Markevich demostró [13] que basta un ciclo de doble fosforilación-defosforilación (con kinasas y fosfatasas compartidas) para generar biestabilidad. En general,

la múltiple fosforilación es un mecanismo alternativo frecuente de biestabilidad, aunque no tanto como los *feedbacks positivos* explícitos.

Sin embargo, Santos *et al* [14] argumentan que la actividad de la proteína Cdk1-ciclina B1 es regulada no solo al nivel de su actividad bioquímica, sino también en su localización: el complejo debe translocar hacia el núcleo para dar lugar a la ruptura de la membrana nuclear. Sostienen, entonces, que la combinación de heterogeneidad espacial y regulación de la localización de las proteínas tiene el potencial para dar lugar a comportamientos complejos a nivel colectivo, tales como la biestabilidad.

Recientemente se ha demostrado que la compartimentalización también genera biestabilidad. Existe una multiplicidad de *feedbacks positivos* escondidos en la compartimentalización. Esto fue analizado en profundidad por Harrington y Feliú [15] y por D. Tenenbaum [17], y como se detalla en la sección 1.4, estos mecanismos son ubicuos. Estos resultados constituyen un pilar fundamental para esta tesis y se detallan en el Capítulo Antecedentes, sección 2.1.

## 1.6. Secuestro.

Es comunmente aceptado que un sistema biestable requiere un feedback positivo subyacente y que un sistema oscilatorio requiere un *feedback negativo* (sumado a cierto “delay temporal” explícito o implícito y a no linealidades). Dos trabajos centrales dentro de los antecedentes de esta tesis indican que:

1) puede haber biestabilidad aún cuando no es evidente la existencia del *feedback positivo* dado que éste surge de una combinación entre activación/inactivación proteína/proteína y traslocaciones desde y hacia compartimientos;

2) puede generarse un feedback negativo implícito simplemente por el secuestro transitorio que sufre una proteína al unirse a otra para formar los complejos típicos en reacciones enzimáticas. Este efecto se ha llamado “retroactividad” e implica que en una cascada de señalización sin feedbacks explícitos, en la que podría suponerse que la información viaja en una sola dirección (desde río arriba hacia río abajo), una perturbación en cualquier nivel de la cascada viaja en ambas direcciones [22][23].

Por ejemplo, en el paper de Kim *et al.* [18] se muestra que si una enzima determinada (una MAPKinasa, en particular) requiere estar fosforilada para modificar a un sustrato, entonces, la mayor presencia del sustrato competiría con la fosfatasa. De esta manera, una mayor parte de la enzima pasa a estar fosforilada (contando la libre enzima y la que está formando complejo con el sustrato). Y por lo tanto, la presencia de un sustrato (algo que es extremadamente ubicuo) implica un *feedback negativo*. Esto se muestra en la fig. 1.11.

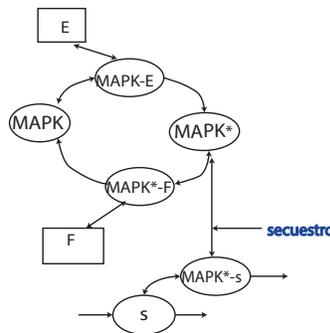


Figura 1.11: Secuestro: sistema propuesto por Kim *et al.* El sustrato  $s$  secuestra la MAPK activa (MAPK\*).

Este módulo es utilizado durante la tesis, para otorgar el *feedback negativo* que necesita el oscilador de relajación. Estos resultados son el segundo pilar de la tesis y se detallan en el capítulo Antecedentes, sección 2.2.

## 1.7. Esquema de la tesis.

El objetivo de esta tesis es construir un oscilador de relajación utilizando componentes de rutas de señalización celular, en particular, combinando un módulo de compartimentalización, que otorgará biestabilidad, y un módulo de secuestro, más lento, que otorgará el *feedback negativo*. Es por esto que los dos antecedentes principales corresponden fundamentalmente uno a cada uno de estos dos módulos.

En el Capítulo 2, se detallan distintas publicaciones que son los antecedentes de esta tesis. En el capítulo 3 se describen las distintas herramientas utilizados. En el Capítulo 4 se realiza un estudio analítico para buscar entender y algoritmizar la generación de oscilaciones a partir de estos módulos. En el Capítulo 5 se desarrollará un método numérico para poner a prueba este análisis, y para ir más allá de los límites del método analítico en la búsqueda de oscilaciones. Finalmente, en el Capítulo 6 se generalizan estos métodos para otros módulos biestables.

# Capítulo 2

## Antecedentes

A continuación se mencionan dos pilares de esta tesis, que son los trabajos de Harrington, Feliú *et al* [15] y el paper de Liu *et al* [19]. En el primero, se menciona un sistema biestable por compartimentalización. En el segundo, un sistema de oscilación por biestabilidad junto con el secuestro. En esta tesis, se combinan la compartimentalización y al secuestro, dos situaciones que coexisten en las rutas de señalización celular.

### 2.1. Biestabilidad por compartimentalización

Como se describe en el capítulo anterior, lo que se descubre en el trabajo de Liu *et al* [19], es que un ciclo de fosforilación (y en general, un ciclo de modificación covalente), que se sabe que tiene comportamiento estrictamente monoestable, al permitirse que ciertas componentes trasloquen al núcleo, adquiere biestabilidad, aún sin *feedbacks* explícitos. Al duplicarse la cantidad de componentes, la dimensionalidad se duplica, lo cual permite una mayor riqueza de comportamientos. Estos sistemas se muestran en la fig. 2.1.

Gran parte de las moléculas involucradas en la transcripción de señales deben traslocar constantemente desde el citoplasma al núcleo celular para cumplir sus funciones específicas. La función final de la proteína de señalización MAP Kinasa en humanos Erk, por ejemplo, consiste en iniciar una variedad de respuestas transcripcionales para lo cual, una vez activa, debe traslocar al núcleo celular[16].

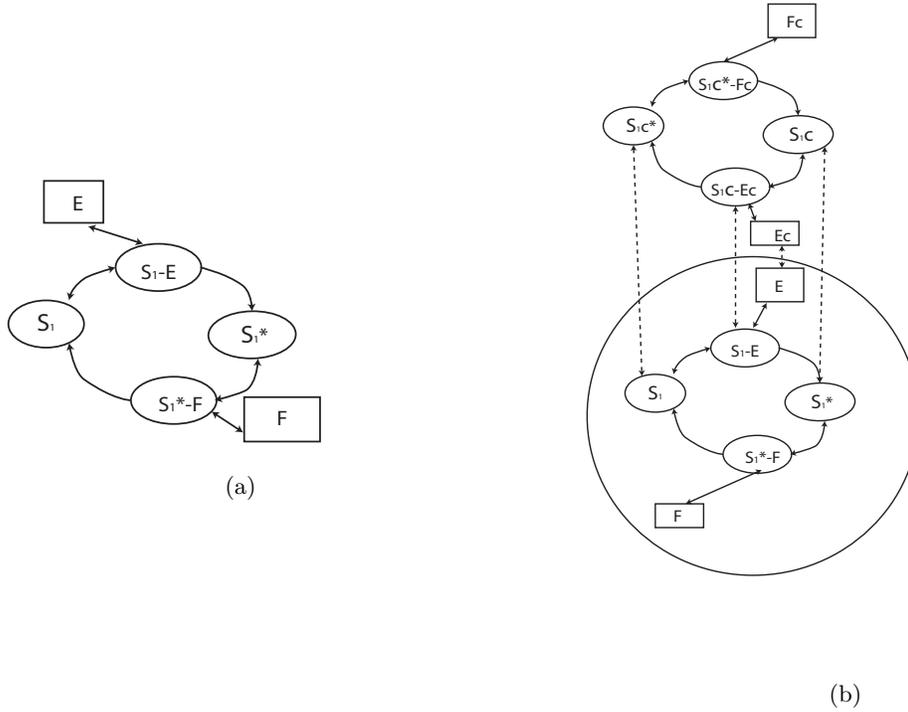
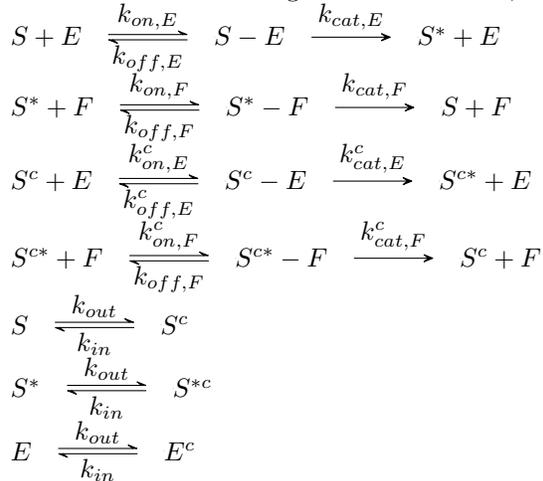
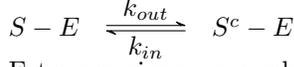


Figura 2.1: Rol de la compartimentalización en la biestabilidad: (2.1a) Ciclo de fosforilación simple. (2.1b) Modelo con biestabilidad, que incluye la compartimentalización. Las flechas señalan las reacciones. Hay dos tipos de flechas: las que representan reacciones reversibles (doble flecha) y las irreversibles (flecha en una dirección). La proteína S es fosforilada por la kinasa E ( $S^*$  es la proteína fosforilada) y defosforilada por la fosfatasa F. Todos los componentes excepto la fosfatasa y su complejo pueden trasladarse entre el citoplasma y el núcleo (en el citoplasma tienen un subíndice “c”). Las proteínas unidas por guiones representan complejos. El círculo simboliza el compartimiento.

A nivel matemático, la compartimentalización, además de implicar la duplicación de las variables, puede poseer constantes de reacción en el sistema exterior al compartimiento distintas de las del interior a aquel. Es decir, los ámbitos son distintos, las reacciones no suceden de la misma manera en distintos compartimientos. Esta riqueza le permite al sistema explorar en plenitud su alta dimensionalidad.

Este sistema tiene las siguientes ecuaciones, bajo la aproximación de la ley de acción de masas:





Estas reacciones se pueden modelar con ecuaciones diferenciales. Estas ecuaciones diferenciales implican, además, que existen cantidades conservadas, que reducen la dimensionalidad del sistema.

$$\begin{aligned}
[\dot{E}] &= (k_{off,E} + k_{cat,E})[X] - k_{on,E}[E][S] - k_{out,E}[E] + k_{in,E}[E^c], \\
[\dot{X}] &= -(k_{off,E} + k_{cat,E})[X] + k_{on,E}[E][S] - k_{out,X}[X] + k_{in,X}[X^c], \\
[\dot{S}] &= k_{off,E}[X] - k_{on,E}[E][S] + k_{cat,F}[Y] - k_{out,S}[S] + k_{in,S}[S^c], \\
[\dot{S}^*] &= k_{cat,E}[X] - k_{on,F}[S^*][F] + k_{off,F}[Y] - k_{out,S^*}[S^*] + k_{in,S}[S^{*c}], \\
[\dot{F}] &= -k_{on,F}[S^*][F] + k_{off,F}[Y] + k_{cat,F}[Y], \\
[\dot{Y}] &= k_{on,F}[S^*][F] - k_{off,F}[Y] - k_{cat,F}[Y], \\
[\dot{E}^c] &= (k_{off,E}^c + k_{cat,E}^c)[X^c] - k_{on,E}^c[E^c][S^c] + k_{out,E}[E] - k_{in,E}[E^c], \\
[\dot{X}^c] &= -(k_{off,E}^c + k_{cat,E}^c)[X^c] + k_{on,E}^c[E^c][S^c] + k_{out,X}[X] - k_{in,X}[X^c], \\
[\dot{S}^c] &= k_{off,E}^c[X^c] - k_{on,E}^c[E^c][S^c] + k_{cat,F}^c[Y^c] + k_{out,S}[S] - k_{in,S}[S^c], \\
[\dot{S}^{*c}] &= k_{cat,E}^c[X^c] - k_{on,F}^c[S^{*c}][F^c] + k_{off,F}^c[Y^c] + k_{out,S^*}[S^*] - k_{in,S^*}[S^{*c}], \\
[\dot{F}^c] &= -k_{on,F}^c[S^{*c}][F^c] + k_{off,F}^c[Y^c] + k_{cat,F}^c[Y^c], \\
[\dot{Y}^c] &= k_{on,F}^c[S^{*c}][F^c] - k_{off,F}^c[Y^c] - k_{cat,F}^c[Y^c]
\end{aligned} \tag{2.1}$$

$$\begin{aligned}
E_{tot} &= [E] + [X] + [E^c] + [X^c] \\
F_{tot} &= [F] + [Y] \\
S_{tot} &= [S] + [S^*] + [X] + [Y] + [S^c] + [S^{*c}] + [X^c] + [Y^c] \\
F_{tot}^c &= [F^c] + [Y^c]
\end{aligned} \tag{2.2}$$

Por último, tanto las variables como los parámetros se pueden adimensionalizar. El parámetro “est” tiene ese nombre porque en general, el estímulo más corriente para modificar el sistema es  $est = \frac{E_{tot}^c}{S_{tot}^c}$ . El tiempo está adimensionalizado como  $\tau = tk_{off,E}$

$$y_1 = -(a_1 + a_3 + 1)y_1 + a_2(1 - y_1 - y_4 - y_5)(1 - y_2 - y_6 - y_7 - y_1 est - y_3b_2 - y_5 est - y_8b_3) + a_4y_5 \tag{2.3a}$$

$$y_2 = y_1 est - a_5b_2y_2(1 - y_3) + a_6b_2y_3 - a_7y_2 + a_8y_7 \tag{2.3b}$$

$$y_3 = a_5y_2(1 - y_3) - (a_6 + a_9)y_3 \tag{2.3c}$$

$$y_4 = (a_{10} + a_{11})y_5 - a_{12}y_4y_6 + a_{13}(1 - y_1 - y_4 - y_5) - a_{14}y_4 \tag{2.3d}$$

$$y_5 = -(a_{10} + a_{11} + a_4)y_5 + a_{12}y_4y_6 + a_3y_1 \tag{2.3e}$$

$$y_6 = est a_{10}y_5 - a_{12} est y_4y_6 + a_{15}b_3y_8 + a_{16}(1 - y_2 - y_6 - y_7 - y_1 est - y_3b_2 - y_5 est - y_8b_3) - a_{17}y_6 \tag{2.3f}$$

$$y_7 = a_{11}esty_5 - a_{18}b_3y_7(1 - y_8) + a_{19}b_3y_8 + a_7y_2 - a_8y_7 \tag{2.3g}$$

$$y_8 = a_{18}y_7(1 - y_8) - (a_{15} + a_{19})y_8 \tag{2.3h}$$

$$\begin{array}{l}
y_1 = \frac{[X]}{[S_{tot}]} \\
y_2 = \frac{[S^*]}{[S_{tot}]} \\
y_3 = \frac{[Y]}{[S_{tot}]} \\
y_4 = \frac{[E^c]}{[S_{tot}]} \\
y_5 = \frac{[X^c]}{[S_{tot}]} \\
y_6 = \frac{[S^c]}{[S_{tot}]} \\
y_7 = \frac{[S^{c*}]}{[S_{tot}]} \\
y_8 = \frac{[Y^c]}{[S_{tot}]}
\end{array}
\quad
\begin{array}{l}
a_1 = \frac{k_{cat,E}}{k_{off,E}} \\
a_2 = \frac{k_{on,E}[S_{tot}]}{k_{off,E}} \\
a_3 = \frac{k_{out,E}}{k_{off,E}} \\
a_4 = \frac{k_{in,E}}{k_{off,E}} \\
a_5 = \frac{k_{on,F}[S_{tot}]}{k_{off,E}} \\
a_6 = \frac{k_{off,F}}{k_{off,E}} \\
a_7 = \frac{k_{out,S^*}}{k_{off,E}} \\
a_8 = \frac{k_{in,S^*}}{k_{off,E}} \\
a_9 = \frac{k_{cat,F}}{k_{off,E}} \\
a_{10} = \frac{k_{off,E}^c}{k_{off,E}} \\
a_{11} = \frac{k_{cat,E}^c}{k_{off,E}}
\end{array}
\quad
\begin{array}{l}
a_{12} = \frac{k_{on,E}^c[S_{tot}]}{k_{off,E}} \\
a_{13} = \frac{k_{out,E}}{k_{off,E}} \\
a_{14} = \frac{k_{in,E}}{k_{off,E}} \\
a_{15} = \frac{k_{cat,F}^c}{k_{off,E}} \\
a_{16} = \frac{k_{out,S}}{k_{off,E}} \\
a_{17} = \frac{k_{in,S}}{k_{off,E}} \\
a_{18} = \frac{k_{on,F}^c[S_{tot}]}{k_{off,E}} \\
a_{19} = \frac{k_{off,F}^c}{k_{off,E}} \\
est = \frac{E_{tot}}{[S_{tot}]} \\
b_2 = \frac{F_{tot}}{[S_{tot}]} \\
b_3 = \frac{F_{tot}^c}{[S_{tot}]}
\end{array}$$

El sistema entero se puede ver en la fig. 2.1b.

Este sistema de 22 parámetros y 8 variables tiene la posibilidad de tener biestabilidad. Sin embargo, para lograr biestabilidad se necesitan valores muy precisos de parámetros. Es decir, sólo existe en una pequeña parte del espacio de parámetros en el cual el sistema es biestable.

Esto fue estudiado a fondo por D. Tenenbaum [17] y va a ser un fuerte punto de apoyo en esta tesis. En aquel trabajo, se caracterizó el espacio de parámetros de este tipo de sistemas para comprender qué tan probable es encontrar comportamiento biestable, y qué tan robusta es esta multiestabilidad ante variaciones de los distintos parámetros. Además, se identificaron los parámetros y mecanismos que tienen mayor control sobre la aparición de estos comportamientos. Por último, se obtuvo un modelo que mantuviera la capacidad de exhibir biestabilidad a través de la compartimentalización, pero que involucrara un menor número de variables y parámetros de control.

Para encontrar los parámetros, en el trabajo [17], se utilizó la herramienta *Chemical Reaction Network Toolbox* (también se utilizó en el paper de Feliú et al). En esta herramienta, se colocan todas las reacciones involucradas, y el sistema realiza un análisis para encontrar los parámetros en los cuales el sistema es biestable (ver Capítulo 3). El set de parámetros elegido a lo largo de esta tesis fue el siguiente:

$$\begin{array}{ll}
a_1 = 0,0344 & a_{12} = 1,47 \\
a_2 = 6,55 & a_{13} = 0,611 \\
a_3 = 0,534 & a_{14} = 0,00229 \\
a_4 = 1,26 & a_{15} = 1,180 \\
a_5 = 47,6 & a_{16} = 0,00382 \\
a_6 = 0,00763 & a_{17} = 0,179 \\
a_7 = 0,634 & a_{18} = 27,7 \\
a_8 = 0,156 & a_{19} = 0,0840 \\
a_9 = 0,168 & b_2 = 0,314 \\
a_{10} = 0,550 & b_3 = 0,0857 \\
a_{11} = 0,347 &
\end{array}$$

Se resalta que el parámetro *est* no está entre los parámetros listados. Originalmente, *est* fue definido como el parámetro de control. Así, en la tesis [17] no tenía un valor fijo sino que se utilizaba como parámetro de bifurcación, tal como se muestra en la fig. 2.2. Este parámetro va a ser usado como parámetro de control para generar oscilaciones. Eventualmente se elegirá el valor de  $est = 1$  (que está fuera del rango en el cual el sistema es biestable). En la sección 4.3 se detalla la razón por la que se elige este valor del parámetro.

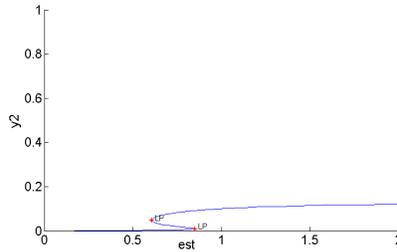


Figura 2.2: Diagrama de bifurcaciones del sistema con respecto al parámetro *est*. Se muestra el rango del parámetro *est* en el cual el sistema es biestable.

Para que exista biestabilidad, es necesario un *feedback positivo*, y en el trabajo de Feliú et al se dan las herramientas para encontrar el *feedback positivo* relevante [24]. Esto fue estudiado en el trabajo de D. Tenenbaum [17].

## 2.2. Oscilador de relajación por secuestro

El sistema que estudian Liu *et al* [19], consiste en dos módulos, uno de doble fosforilación, y otro de degradación de un sustrato. De esta manera, se genera un oscilador de relajación donde el módulo de biestabilidad es una doble fosforilación, y el *feedback negativo* está dado por el secuestro. Este artículo fue la inspiración principal para realizar esta tesis, con la idea de sustituir el módulo biestable por la compartimentalización.

Esta idea de generar oscilaciones de relajación añadiendo un módulo biestable y un *feedback negativo*, fue estudiado también en otros trabajos [20] [21]. En este en particular, se utilizó el secuestro como *feedback negativo*.

El modelo completo se ve en la fig. 2.3.

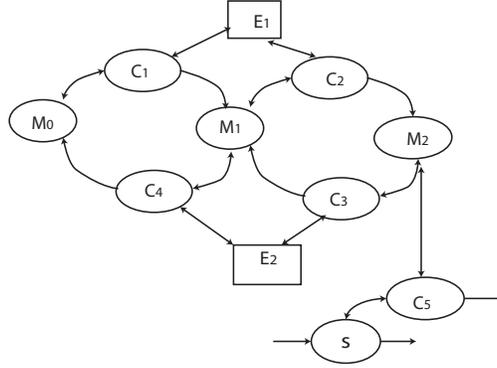
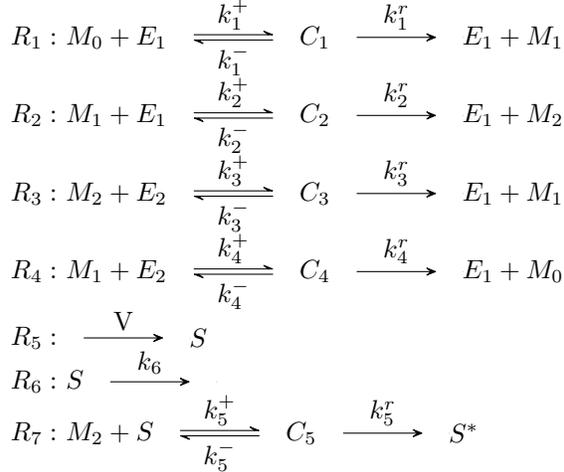


Figura 2.3: Sistema completo: diagrama entero para el sistema de Liu *et al* [19]. Modelo de red bioquímica: una enzima M es regulada por la kiansa  $E_1$  y la fosfatasa  $E_2$ . La actividad enzimática requiere una doble fosforilación. Los mecanismos de fosforilación y defosforilación son distributivos. La enzima activa  $M_2$  fosforila un sustrato s, aumentando su tasa de degradación. El sustrato es sintetizado a una tasa constante y, en ausencia de actividad enzimática, es degradado por una vía de degradación constitutiva. Las variables  $C_i$  con i de 1 a 5 son complejos proteína-proteína. El modelo completo consiste en dos subsistemas: el módulo de regulación enzimática y el módulo de degradación del sustrato.

Las reacciones químicas que corresponden se muestran a continuación:



A continuación se muestran las ecuaciones diferenciales que modelan estas reacciones, así como las cantidades conservadas que se encuentran en este sistema.

$$\begin{aligned}
 [\dot{M}_0] &= -k_1^+[M_0][E_1] + k_1^-[C_1] + k_4^r[C_4], \\
 [\dot{M}_1] &= -k_2^+[M_1][E_1] + k_2^-[C_2] + k_1^r[C_1] - k_4^+[M_1][E_2] + k_4^-[C_4] + k_3^r[C_3], \\
 [\dot{M}_2] &= -k_3^+[M_2][E_2] + k_3^-[C_3] + k_2^r[C_2] - k_5^+[S][M_2] + (k_5^r + k_5^-)[C_5], \\
 [\dot{S}] &= V - k_6[S] - k_5^+[S][M_2] + k_5^-[C_5], \\
 [\dot{C}_5] &= k_5^+[S][M_2] - (k_5^r + k_5^-)[C_5], \\
 [\dot{C}_1] &= k_1^+[M_0][E_1] - (k_1^r + k_1^-)[C_1], \\
 [\dot{C}_2] &= k_2^+[M_1][E_1] - (k_2^r + k_2^-)[C_2], \\
 [\dot{C}_3] &= k_3^+[M_2][E_2] - (k_3^r + k_3^-)[C_3], \\
 [\dot{C}_4] &= k_4^+[M_1][E_2] - (k_4^r + k_4^-)[C_4]
 \end{aligned} \tag{2.4}$$

$$\begin{aligned}
E_1^{tot} &= [E_1] + [C_1] + [C_2], \\
E_2^{tot} &= [E_2] + [C_3] + [C_4], \\
M^{tot} &= [M_0] + [M_1] + [M_2] + [C_1] + [C_2] + [C_3] + [C_4] + [C_5]
\end{aligned} \tag{2.5}$$

La adimensionalización se muestra a continuación. También se muestran el valor de los parámetros usado en las simulaciones que utilizaron Liu et al.

$$\begin{aligned}
\tau &= tk_3^+ E_2^{tot} & c_1 &= \frac{[C_1]}{E_1^{tot}} & c_4 &= \frac{[C_4]}{E_1^{tot}} \\
m_0 &= \frac{[M_0]}{M^{tot}} & c_2 &= \frac{[C_2]}{E_1^{tot}} & c_5 &= \frac{[C_5]}{E_1^{tot}} \\
m_2 &= \frac{[M_2]}{M^{tot}} & c_3 &= \frac{[C_3]}{E_1^{tot}} & s &= \frac{[S]}{\frac{V}{k_6}}
\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
p_1 &= \frac{E_1^{tot}}{E_2^{tot}} = 1,4 & p_{10} &= \frac{k_4^r}{k_3^+ M^{tot}} = 0,004, \\
p_2 &= \frac{E_2^{tot}}{M^{tot}} = 0,05 & p_{11} &= \frac{k_4^+}{k_3^+} = 0,1, \\
p_3 &= \frac{k_1^+}{k_3^+} = 0,004 & p_{12} &= \frac{k_4^r + k_4^-}{k_3^+ M^{tot}} = 0,008, \\
p_4 &= \frac{k_1^- + k_1^r}{k_3^+ M^{tot}} = 0,00032 & p_{13} &= \frac{k_3^r}{k_3^+ M^{tot}} = 0,04, \\
p_5 &= \frac{k_3^-}{k_3^+ M^{tot}} = 0,04 & p_{14} &= \frac{V}{k_6 M^{tot}} = 15, \\
p_6 &= \frac{k_2^r}{k_3^+ M^{tot}} = 0,32 & p_{15} &= \frac{k_6}{k_3^+ E_{tot}} = 0,000056, \\
p_7 &= \frac{k_1^-}{k_3^+ M^{tot}} = 0,00016 & p_{16} &= \frac{k_5^+ M^{tot}}{k_6} = 157,1, \\
p_8 &= \frac{k_2^+}{k_3^+} = 8 & p_{17} &= \frac{k_5^r + k_5^-}{k_6} = 15,71, \\
p_9 &= \frac{k_2^- + k_2^r}{k_3^+ M^{tot}} = 0,64 & p_{18} &= \frac{k_5^-}{k_6} = 1,429
\end{aligned}$$

Con las consideraciones anteriores, queda el sistema de ecuaciones:

$$\begin{aligned}
\dot{m}_0 &= -p_1 p_3 m_0 (1 - c_1 - c_2) + p_1 p_7 c_1 + p_{10} c_4 \\
\dot{m}_2 &= -m_2 (1 - c_3 - c_4) + p_5 c_3 + p_6 p_1 c_2 - p_{15} p_{16} p_{14} m_2 s + p_{15} p_{17} c_5 \\
p_2 \dot{c}_1 &= p_3 m_0 (1 - c_1 - c_2) - p_4 c_1 \\
p_2 \dot{c}_2 &= p_8 (1 - m_0 - m_2 - p_1 p_2 c_1 - p_1 p_2 c_2 - p_2 c_3 - p_2 c_4 - c_5) (1 - c_1 - c_2) - p_9 c_2 \\
p_2 \dot{c}_3 &= m_2 (1 - c_3 - c_4) - (p_{13} + p_5) c_3 \\
p_2 \dot{c}_4 &= p_{11} (1 - m_0 - m_2 - p_1 p_2 c_1 - p_1 p_2 c_2 - p_2 c_3 - p_2 c_4 - c_5) (1 - c_3 - c_4) - p_{12} c_4 \\
\dot{c}_5 &= p_{15} (p_{16} p_{14} m_2 s - p_{17} c_5) \\
\dot{s} &= p_{15} (1 - s - p_{16} m_2 s + \frac{p_{18}}{p_{14}} c_5)
\end{aligned} \tag{2.6}$$

El valor de la variable  $m_1$  se puede despejar de las conservaciones.

Teniendo en cuenta el límite en que M está en mucha mayor cantidad que su kinasa (límite que vale, según la proporción  $p_2 = 0,05$ ), las ecuaciones anteriores se reducen a:

$$\begin{aligned}
\dot{m}_0 &= \frac{(p_{17} - p_4)p_1 m_0}{m_0 + \frac{p_4}{p_3} + \frac{p_4 p_8}{p_3 p_9} (1 - m_0 - m_2 - c_5)} + \frac{p_{10}(1 - m_0 - m_2 - c_5)}{\frac{p_{12}}{p_{11}(p_{13} + p_5)} m_2 + \frac{p_{12}}{p_{11}} + (1 - m_0 - m_2 - c_5)}, \\
\dot{m}_2 &= -\frac{p_{13} m_2}{m_2 + (p_{13} + p_5) + \frac{p_{11}}{p_{12}}(p_{13} + p_5)(1 - m_0 - m_2 - c_5)} + \frac{p_6 p_1 (1 - m_0 - m_2 - c_5)}{\frac{p_3 p_9}{p_4 p_8} m_0 + \frac{p_9}{p_8} + (1 - m_0 - m_2 - c_5)} - \\
&\quad p_{15} p_{16} p_{14} m_2 s + p_{15} p_{17} c_5, \\
\dot{c}_5 &= p_{15} (p_{16} p_{14} m_2 s - p_{17} c_5), \\
\dot{s} &= p_{15} (1 - s - p_{16} m_2 s + \frac{p_{18}}{p_{14}} c_5)
\end{aligned} \tag{2.7}$$

En primer lugar, se describe el módulo de modificación irreversible de sustrato. El sustrato S se crea y degrada en forma constitutiva y lenta. Existe, además, una kinasa que lo fosforila con una velocidad mucho mayor (dado  $p_{16} \gg 1$ ). Esta kinasa ( $M_2$ ) es un elemento relevante para comprender la acción de los feedbacks. Se da aquí un fenómeno llamado *feedback negativo* por secuestro que ya hemos presentado en la introducción. En este fenómeno, la kinasa  $M_2$ , al ligarse al sustrato para formar el complejo intermedio ( $c_5$ ), no está disponible para desfosforilarse (reacción  $R_3$ ). Por lo tanto, el hecho de tener una gran cantidad de sustrato implica una acumulación de kinasa activa total, que a su vez implica una transformación rápida irreversible del sustrato, que disminuye. De esta manera, se crea un *feedback negativo*. El fenómeno de secuestro sucede siempre que la kinasa está involucrada en otras reacciones que compiten con la reacción en cuestión [22] [23] [37].

Por otro lado, está presente el módulo de doble fosforilación. Este módulo es en sí biestable para algunos valores de los parámetros como muestra Markevich et al [13]. Conceptualmente, esto se debe a que si uno acumulara una gran cantidad de la kinasa fosforilada una sola vez ( $M_1$ ), esta tiende a desfosforilarse (convirtiéndose en  $M_0$ ) o a fosforilarse nuevamente (convirtiéndose en  $M_2$ ). De esta manera, el sistema se vuelve biestable, con un estado de  $M_2$  elevado y valor de  $M_0$  pequeño y otro estado con características opuestas. Esta biestabilidad -permitida por el *feedback positivo*- no sucede siempre. Por ejemplo, pasado un umbral de la actividad de la fosforilación, solamente el compuesto  $M_2$  va a estar presente. En cambio, si la desfosforilación está más activa, solamente el compuesto  $M_0$  va a estar presente. Esta propiedad está regulada por el parámetro  $p_1$ , de tal manera que a bajos valores es monoestable, a valores medios (entre 1 y 3, en el ejemplo del paper) es biestable, y a valores altos vuelve a ser monoestable.

Violviendo al sistema completo, el sustrato  $s$  compite con la fosfatasa (pero no tiene el mismo efecto). Un *feedback positivo* rápido acoplado con un *feedback negativo* lento tiene como efecto un oscilador de relajación, tal como se explicó en la sección anterior. De esta manera, el modelo desarrollado por Liu *et al*, crea dos escalas temporales distintas (en realidad, tres -la de las reacciones de fosforilación, la dinámica de los complejos intermedios y la reacción de secuestro-), disminuyendo el valor de  $p_{15}$ . El parámetro  $p_{15}$  compara el ritmo autónomo de síntesis de  $s$  en el módulo lento con el ritmo de fosforilación del módulo rápido, es decir  $\frac{k_6}{k_3^+ M^{tot}}$ . Por otro lado, el parámetro  $p_2$ , al ser también pequeño permite una aproximación cuasi-estacionaria en el módulo rápido. Al reducir el parámetro  $p_{15}$ , la variable  $c_5$  -el complejo intermedio-, que trae toda la información de la dinámica lenta (si  $p_{15} = 0$ ) está esencialmente congelado. El efecto sería el mismo que reducir la cantidad total ( $M_{tot}$ ), en el modelo completo. Éste es un fenómeno completamente distinto al de aumentar la fosfatasa en relación a la kinasa. Por lo tanto, a  $1 \gg p_2 \gg p_{15}$ , que es lo que sugiere el artículo que estamos describiendo, la variable relevante para verificar biestabilidad es  $M_{tot}$  o, con el objetivo de simplificar las cuentas,  $c_5$ .

Este sistema, con los parámetros elegidos por los autores, tiene oscilaciones. Esto se muestra en la fig. 2.4. Se muestra la simulación numérica de las ecuaciones del paper en la fig. 2.4. Se utilizan los parámetros seleccionados en el paper. Dentro de estas ecuaciones,  $m_2^{tot} = m_2 + p_2 c_3 + c_5$  (es decir, la enzima fosforilada total) y  $tk_6 = p_{15} \tau$  (un tiempo normalizado).

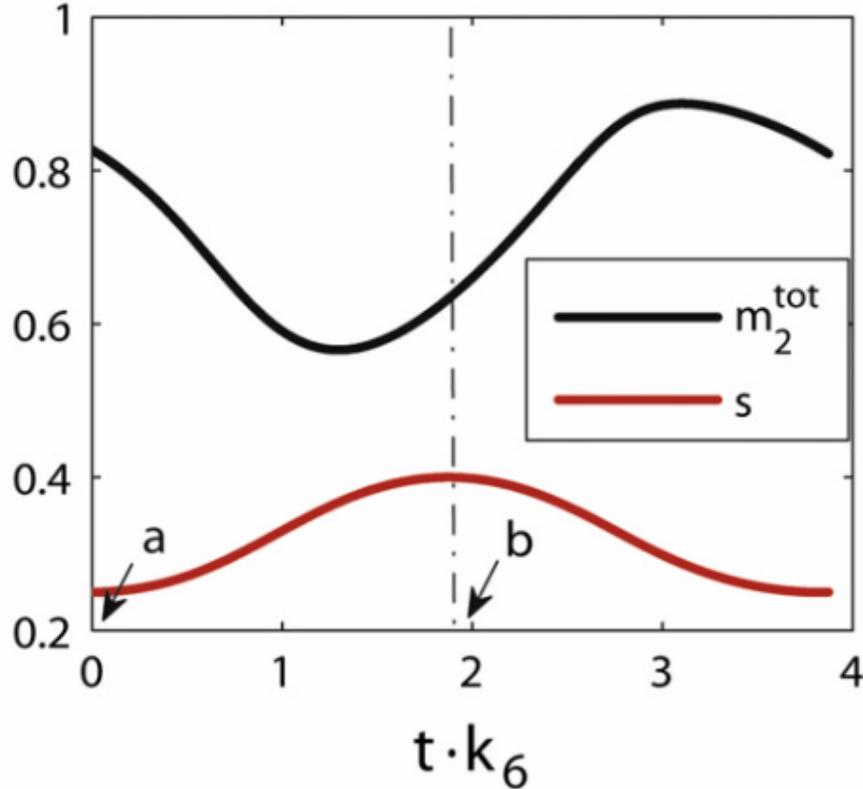


Figura 2.4: Presencia de oscilaciones: oscilaciones en el sistema propuesto por Liu *et al.*  $tk_6$  se elige como variable independiente ya que es adimensional. La figura está adaptada de su trabajo [19]. La dinámica que se muestra es de  $m_2^{tot}$  y de  $s$ .

Este sistema se analiza con aún más profundidad en la sección 4.1.

### 2.3. Balance de los antecedentes

Estos dos trabajos son los dos pilares de esta tesis, y en particular, son complementarios. En resumen, en el primer trabajo aparece la presencia de compartimientos. Pero los elementos que entran y salen del compartimiento (como el núcleo) no interactúan con el resto de los componentes de la célula. En cambio, en el segundo trabajo, se resalta el hecho de que la información de toda red de señalización necesariamente tiene que circular, por lo que los componentes de la red interactúan con otros sistemas, y por lo tanto, son secuestrados. En las células eucariotas, muy frecuentemente las proteínas de señalización tienen que entrar o salir del núcleo para efectuar sus tareas. De esta manera, las componentes esenciales de las rutas de señalización en cada uno de los trabajos descriptos suelen aparecer combinadas en rutas de señalización celular. Es por esto que las oscilaciones de relajación que se estudian en esta tesis, que resultan de combinar compartimentalización y secuestro, tienen grandes posibilidades de encontrarse en los seres vivos.

# Capítulo 3

## Métodos

### 3.1. Estudio de Nulclinas

Uno de los métodos más sencillos para hallar la cantidad de puntos fijos en un sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias en función de sus parámetros consiste en estudiar las *nulclinas* del mismo.

Para un sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias

$$\begin{aligned}\dot{x}_1 &= f_1(x_1, \dots, x_n) \\ \dot{x}_2 &= f_2(x_1, \dots, x_n) \\ &\vdots \\ \dot{x}_n &= f_n(x_1, \dots, x_n),\end{aligned}$$

la  $i$ -ésima nulclina es la forma geométrica para la cual  $\dot{x}_i = 0$ . Es fácil ver que los puntos fijos del sistema se encuentran en la intersección de todas las nulclinas.

### 3.2. Ciclo de doble con enzimas compartidas

En esta sección se considera el ciclo de doble fosforilación que utiliza Liu *et al* (sección 2.2). Se utilizará para ejemplificar los distintos métodos usados. En la Figura 3.1 se muestra un esquema simplificado del sistema.

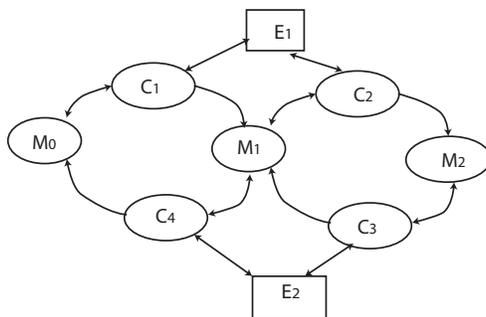
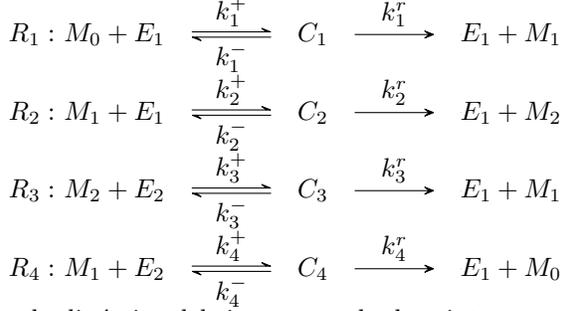


Figura 3.1: Esquema del subsistema biestable del modelo de Liu *et al*.  $M_0$ ,  $M_1$  y  $M_2$  representan al sustrato sin fosforilar, simplemente fosforilado y doblemente fosforilado, respectivamente.  $C_1$  y  $C_2$  son los complejos intermedios de fosforilación, mientras que  $C_3$  y  $C_4$  son los complejos intermedios de desfosforilación.

Si consideramos a las fosforilaciones y desfosforilaciones como procesos de Michaelis-Menten, la red de reacciones bioquímicas toma la forma



y la dinámica del sistema queda descrita por

$$\begin{aligned}
\dot{M}_0 &= -k_1^+[M_0][E_1] + k_1^-[C_1] + k_3^r[C_4], \\
\dot{M}_1 &= -k_2^+[M_1][E_1] - k_3^+[M_1][E_2] + k_1^r[C_1] + k_2^-[C_2] + k_3^-[C_4] + k_3^r[C_3], \\
\dot{M}_2 &= -k_4^+[M_2][E_2] + k_2^r[C_2] + k_4^-[C_3], \\
\dot{C}_1 &= k_1^+[M_0][E_1] - (k_1^- + k_1^r)[C_1], \\
\dot{C}_2 &= k_2^+[M_1][E_1] - (k_2^- + k_2^r)[C_2], \\
\dot{C}_4 &= k_3^+[M_1][E_2] - (k_3^- + k_3^r)[C_4], \\
\dot{C}_3 &= k_4^+[M_2][E_2] - (k_4^- + k_4^r)[C_3], \\
\dot{E}_1 &= -k_1^+[M_0][E_1] - k_2^+[M_1][E_1] + (k_1^- + k_1^r)[C_1] + (k_2^- + k_2^r)[C_2], \\
\dot{E}_2 &= -k_3^+[M_1][E_2] - k_4^+[M_2][E_2] + (k_3^- + k_3^r)[C_4] + (k_4^- + k_4^r)[C_3],
\end{aligned} \tag{3.1}$$

con las leyes de conservación

$$\begin{aligned}
E_1^{tot} &= [E_1] + [C_1] + [C_2], \\
E_2^{tot} &= [E_2] + [C_4] + [C_3], \\
M^{tot} &= [M_0] + [M_1] + [M_2] + [C_1] + [C_2] + [C_3] + [C_4].
\end{aligned} \tag{3.2}$$

Este módulo es el que actúa como módulo biestable en la sección 2.2. Markevich *et al* [13] fueron los primeros en demostrar que este módulo puede presentar comportamiento biestable. En este punto vale la pena destacar que si se consideraran distintas kinasas  $E_1$  y  $E_2$  para las sucesivas fosforilaciones, y distintas fosfatasas  $F_1$  y  $F_2$  para cada desfosforilación, el sistema exhibiría necesariamente comportamiento monoestable para cualquier elección de constantes de velocidad y cantidades conservadas [25]. Por otro lado, si se consideraran diferentes kinasas pero la misma fosfatasa (o alternativamente, la misma kinasa y diferentes fosfatasas), el sistema se comportará de manera biestable en algún sector del espacio de parámetros.

### 3.3. Chemical Reaction Network Toolbox

La aplicación *Chemical Reaction Network Theory* (CRNT), desarrollada por Horn, Jackson y el grupo de M. Feinberg [28], permite sistematizar el estudio de redes de reacciones químicas descritas por la ley de acción de masas.

La clave de esta teoría es entender que la no-linealidad aparente de las ecuaciones oculta un gran nivel de linealidad: las redes de reacciones químicas subyacentes definen grafos dirigidos sobre los complejos, y es la existencia de esta *estructura* la que limita la no-linealidad que puede aparecer, permitiendo obtener resultados fuertes que se aplican a grandes clases de sistemas.

La CRNT traza entonces relaciones entre la estructura de la red y propiedades cualitativas de las mismas, tales como la existencia, unicidad, multiplicidad y estabilidad de sus puntos fijos. Es importante entender que el objeto básico de estudio de la teoría es la red de reacciones por sí sola, independientemente de asignaciones particulares de las constantes de velocidad o cantidades totales. Por lo tanto, una pregunta típica que CRNT

intenta contestar es, por ejemplo, si dada una red de reacciones existe alguna combinación de valores para los parámetros tal que el sistema de ecuaciones diferenciales correspondiente pueda admitir múltiples soluciones estacionarias positivas diferentes.

Para contestar esta pregunta, la teoría clasifica a las redes en función de un número entero no-negativo, que recibe el nombre de *deficiencia*. El cálculo y las definiciones involucradas en esta definición se detallan en [26]. Se puede demostrar (*zero deficiency theorem*) que si una red tiene deficiencia nula, nunca podrá admitir múltiples estados estacionarios positivos, sin importar lo compleja que parezca ni qué valores específicos se asignen a las constantes de velocidad de la misma. Se ha desarrollado además una teoría de multiestacionariedad para redes de deficiencia uno, que se detalla en [27]. Esta teoría permite decidir si existe por lo menos una elección de constantes de velocidad tal que una cierta red de reacciones de deficiencia uno exhiba comportamiento multiestacionario. Además, provee de un algoritmo para construir constantes de velocidad para las cuales el sistema en cuestión se comporta de manera multiestacionaria.

Finalmente, para redes de deficiencia mayor que uno, se cuenta con la *Higher-deficiency theory*, que funciona de manera similar a la *deficiency one theory*, pero que no siempre es capaz de decidir si la red bajo estudio exhibe o no multiestacionariedad para al menos una elección de parámetros (pero no hubo problemas a lo largo de la tesis).

La *Chemical Reaction Network Toolbox* (CRNToolbox) [28] fue desarrollada por M. Feinberg y sus estudiantes con el objetivo de implementar estos y otros resultados obtenidos en el contexto de CRNT. Dada una red de reacciones, CRNToolbox permite calcular su deficiencia y aplicar el *zero deficiency theorem* y las *Deficiency One Theory* y *Higher Deficiency Theory* según sea necesario. De esta forma, si la red bajo análisis efectivamente exhibe multiestacionariedad, la herramienta devuelve algún conjunto de parámetros para el cual lo hace. Es importante aclarar que CRNToolbox admite únicamente reacciones elementales en términos de Ley de Acción de Masas, por lo que no permite trabajar con modelos fenomenológicos simplificados.

Utilizando CRNToolbox obtenemos que la red del *ciclo doble con enzimas compartidas* tiene deficiencia dos. Aplicando entonces el *Higher Deficiency Analysis* nos dice que si

$$\begin{aligned}
 k_1^+ &= 690,76949, & k_1^- &= 23,807419, & k_1^r &= 23,807419, \\
 k_2^+ &= 8,1688587, & k_2^- &= 4,7109178, & k_1^r &= 4,7109178, \\
 k_3^+ &= 4,3744827, & k_3^- &= 47,614838, & k_3^r &= 47,614838, \\
 k_4^+ &= 5,9675546, & k_4^- &= 1, & k_4^r &= 1,
 \end{aligned}
 \tag{3.3}$$

el sistema admite más de una solución estacionaria positiva.

Para cada red ingresada, CRNToolbox entrega en principio un único conjunto de parámetros que da lugar a comportamiento multiestacionario. Sin embargo, el algoritmo utilizado para la construcción del mismo es sensible al orden en que son ingresadas las reacciones. Esto implica que, modificando el orden de ingreso, es posible obtener otro conjunto de constantes de velocidad que generan multiestacionariedad:

$$\begin{aligned}
 k_1^+ &= 62,385749, & k_1^- &= 677,8077, & k_1^r &= 677,8077, \\
 k_2^+ &= 2, & k_2^- &= 134,1219, & k_1^r &= 134,1219, \\
 k_3^+ &= 1,9872232, & k_3^- &= 1355,6154, & k_3^r &= 1355,6154, \\
 k_4^+ &= 1, & k_4^- &= 44,707301, & k_4^r &= 44,707301.
 \end{aligned}
 \tag{3.4}$$

A continuación se detallará el funcionamiento de una herramienta computacional que nos permitirá visualizar fácilmente el comportamiento del sistema para las distintas asignaciones de parámetros.

### 3.4. MatCont

*MatCont* [29] es un paquete gráfico de *MATLAB* [30] para el análisis numérico interactivo de sistemas dinámicos. Permite realizar continuaciones del equilibrio y ciclos límites de sistemas de ecuaciones diferenciales ordinarias y de sus bifurcaciones en función de los parámetros del sistema.

Para realizar una continuación del equilibrio en *MatCont*, es necesario introducir primero el sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias cuya dinámica se quiere estudiar, e ingresar valores para los parámetros del sistema. Luego, es necesario simular el sistema hasta llegar a un estado estacionario mediante el uso de los integradores implementados en el paquete. A continuación se debe utilizar el estado estacionario alcanzado como punto inicial y seleccionar el parámetro del sistema que se quiere variar durante la continuación.

En la Figura 3.2 se muestran dos continuaciones realizadas para el modelo del *Ciclo Doble con Enzimas Compartidas* en función de la cantidad de kinasa total  $E_{tot}$ . Para el gráfico de la izquierda, consideramos las constantes de velocidad arrojadas por la *Chemical Reaction Network Toolbox* que se muestra en la Ec. (3.4). Efectivamente, se ve que para esa elección de parámetros el sistema exhibe biestabilidad en la zona sombreada.

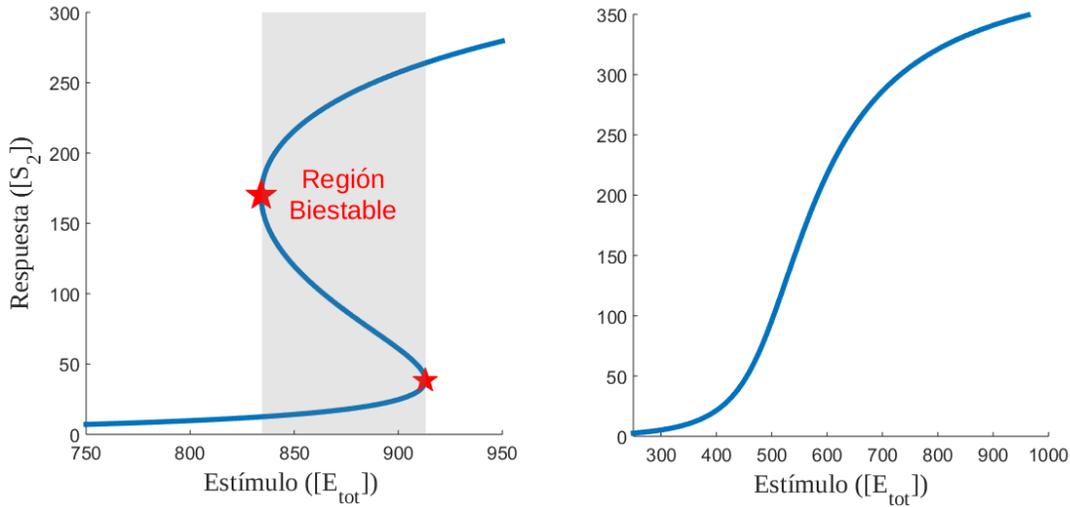


Figura 3.2: Continuaciones del equilibrio en función de la concentración total de kinasa para el modelo del *Ciclo Doble con Enzimas Compartidas* (Ec. (3.1)) realizadas mediante el paquete *MatCont* de *Matlab*. El gráfico de la izquierda se obtuvo considerando valores arrojados por *CRNToolbox* para las constantes de velocidad de la Ec.(3.4) , mientras que para el de la derecha los valores fueron elegidos al azar. Figura tomada de la tesis de D. Tenenbaum [17]

### 3.5. Muestreo de parámetros

El sistema dinámico que se analizó, está caracterizado por un conjunto de parámetros, se estudió efecto de sólo 4 de ellos. Si bien 4 parámetros no son una cantidad inmanejable, la resolución del barrido de parámetros va como  $N^4$ , donde  $N$  es la resolución en cada eje, y esto tiene un costo computacional importante. Para garantizar un muestreo homogéneo del espacio de parámetros, se utilizó el método *Latin Hypercube Sampling* (LHS), desarrollado por W. J. Conover para mejorar la eficiencia del algoritmo *Monte Carlo*. El método LHS utiliza un esquema de sampleo para abarcar mejor el espacio [31], seleccionando  $n$  valores diferentes para cada parámetro independiente ( $k_1, \dots, k_m$ ) de la siguiente manera. El rango de cada parámetro es dividido en  $n$  intervalos equiprobables y no superpuestos y, de cada intervalo, se elige un valor aleatorio respecto a la densidad de probabilidad del intervalo. Los  $n$  valores obtenidos para  $k_1$  se combinan luego de forma aleatoria con los  $n$  valores asignados a  $k_2$ . Estos  $n$  pares son finalmente combinados de forma aleatoria con los  $n$  valores de  $k_3$  formando  $n$  tripletes y así siguiendo, hasta formar  $n$   $m$ -tupletes [32]. Se compara el método de Montecarlo con el LHS en la imagen 3.3

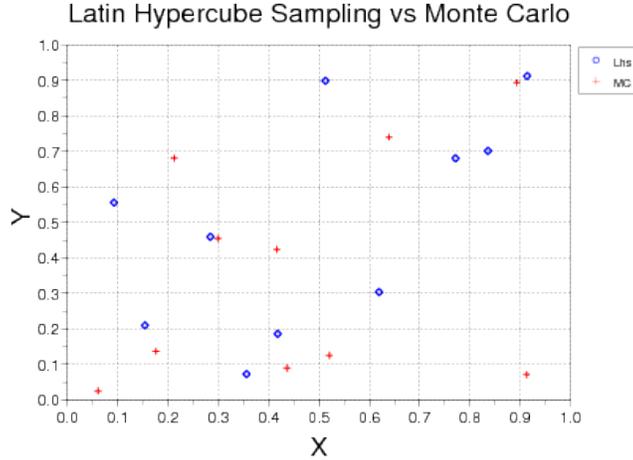


Figura 3.3: Método de barrido LHS. Notar que en el método Montecarlo la muestra representada en rojo se concentra en los valores de Y entre 0 y 0.2, debido a una fluctuación estadística.

Para resolver las ecuaciones diferenciales se utilizó el programa *MATLAB* R2014a [30]. Para resolver las ecuaciones diferenciales se utilizó la rutina *ode32t*.

### 3.6. Búsqueda de oscilaciones

Como el objetivo principal de esta tesis es encontrar oscilaciones, una manera simple de realizarlo es a partir de un análisis de Fourier. En efecto, si se recorta la respuesta transitoria, la componente de Fourier de un sistema con punto fijo sólo tiene componente a frecuencia 0. En cambio, un sistema oscilatorio, tiene picos en su frecuencia fundamental y los distintos armónicos.

Por supuesto, existen otras maneras de reconocer oscilaciones. Muchas de ellas [33] se focalizan en distinguir una señal detrás de un ruido de alta frecuencia. Sin embargo a este sistema no se le ha agregado ruido (lo cual es posible porque es un sistema simulado). Existe otro método, que es la autocorrelación. Pero como la transformada de Fourier de la autocorrelación es el cuadrado del módulo de la transformada de Fourier original [34], se consideró que contenía una información similar.

Por otro lado, existe un fenómeno a tener en cuenta, llamado *windowing*. Este se desarrolla para eliminar el efecto de borde. El *windowing* consiste en calcular la transformada de Fourier de la función original multiplicada por una función ventana. Las funciones ventana son funciones suaves que valen 0 en los bordes del intervalo de barrido. La principal ventaja del *windowing* es que aumenta el factor de ganancia, al eliminar las frecuencias espurias debidas al empalme entre el final y el principio de la señal. Es decir, los picos del espectro de Fourier son más angostos y de mayor amplitud. Sin embargo, esto sucede cuando la ventana de la señal incorpora poca cantidad de períodos. El *windowing* introduce frecuencias espurias, que son necesarias para equilibrar el empalme, pero que resultan contraproducentes cuando la señal es larga, como sucede a lo largo de esta tesis [35]. Por esta razón, se elige una ventana rectangular.

La normalización elegida en este trabajo es tal que los pulsos de frecuencia definida, tienen una componente de Fourier de  $O(1)$ . Es decir, se elige la normalización  $F(\nu) = \frac{\Delta T}{T} \sum_{-\infty}^{\infty} f(x)e^{-2\pi x\nu}$ . Bajo esta normalización, todo componente del espectro de una función aperiódica (exceptuando el correspondiente a  $\nu = 0$ ) tiende a 0 con  $T \rightarrow \infty$ .

Como  $f(-\nu) = f^*(\nu)$ , las “frecuencias negativas” guardan la misma información que las frecuencias positivas. Por esta razón, sólo se guarda en este trabajo la información sobre las frecuencias positivas.

Para distinguir si el sistema es oscilatorio o de punto fijo, se toma un umbral para los picos de frecuencia distinta de 0. Si este umbral es cruzado por lo menos por un pico, se considera que el sistema es oscilatorio, y si no, de punto fijo. Esto se puede ver en la fig. 3.4. Así, hay una presencia de picos para el sistema oscilatorio que están ausentes en el sistema de punto fijo.

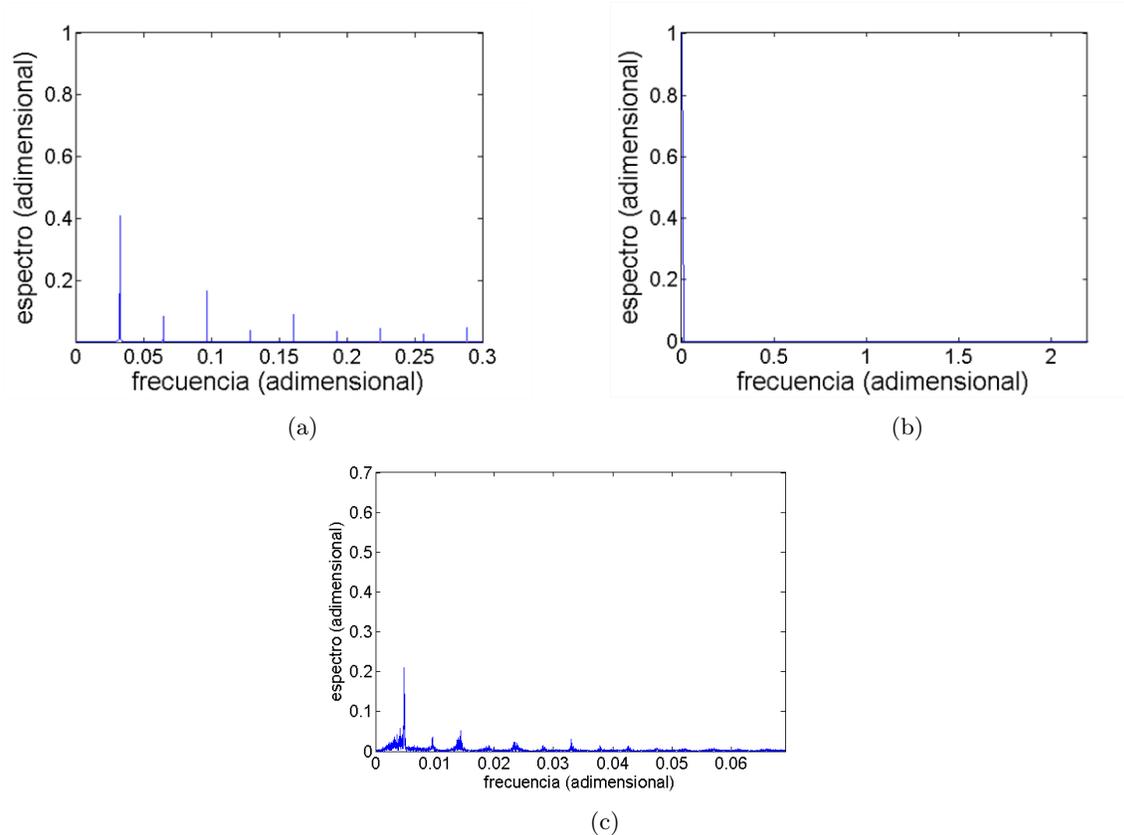


Figura 3.4: Espectro de Fourier para el modelo principal de la tesis en los distintos regímenes. 3.4a Espectro de Fourier del sistema en un régimen oscilatorio. 3.4b Espectro de Fourier del sistema en un régimen de punto fijo. 3.4c Espectro de Fourier del sistema en un régimen irregular.

Si la clasificación a realizar fuera solamente entre sistemas oscilatorios y sistemas con punto fijo, el problema estaría resuelto. Sin embargo, en los modelos estudiados encontramos también oscilaciones irregulares. Estas ocurren en el borde entre las regiones oscilatorias y las regiones de punto fijo, cuando la aproximación de separación de escalas temporales se pierde y el sistema enriquece su comportamiento (ver sección 4.4). Esto incluye oscilaciones aperiódicas, como se muestran en la fig. 3.5. Las oscilaciones aperiódicas tienen un espectro de Fourier que es similar al de un sistema oscilatorio a corto plazo y similar a un sistema de punto fijo a largo plazo.

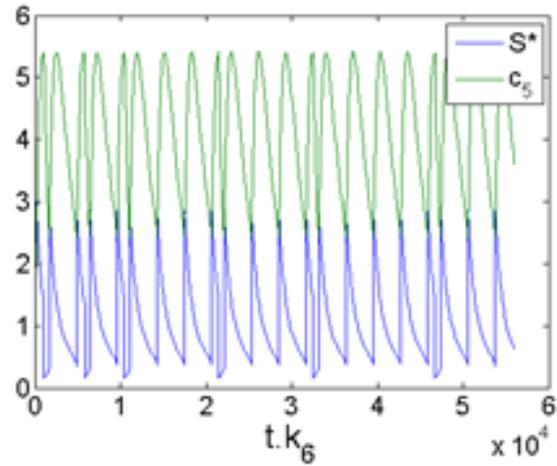


Figura 3.5: Oscilaciones aperiódicas del modelo central de la tesis.

Como se observa en el análisis que se realiza en el Apéndice A, el régimen de oscilaciones aperiódicas tiene un tiempo característico muy definido, antes del cual es extremadamente probable que el espectro de Fourier posea picos destacados, y después del cual es extremadamente improbable que posea picos (la probabilidad tiene la estructura de una curva de Gompertz). El tiempo característico tiene distintos parámetros a ajustar. El tiempo que se eligió, por razones que se detallan en el Apéndice, fue el equivalente a 1500 oscilaciones para distinguir si el sistema era oscilatorio y 75 oscilaciones (la veinteva parte) para distinguir si el sistema tiene un régimen de punto fijo.

## Capítulo 4

# Modelo que combina compartimentalización y secuestro

### 4.1. Un análisis detallado del sistema biestable con secuestro de Liu et al.

Para comprender el procedimiento que será utilizado para encontrar oscilaciones en este trabajo, es necesario analizar con detalle el modelo descrito por Liu et al.[19], descrito previamente en la sección 2.2.

El sistema mencionado describe una oscilación de relajación. Un oscilador de relajación tiene tres elementos, un subsistema biestable, un *feedback negativo* (en este caso dado por el secuestro) y una separación de escalas temporales. En el límite de la separación de escalas temporales, es decir, cuando la dinámica del subsistema biestable es mucho más rápida que la dinámica del *feedback negativo*, el sistema entero recorre, excepto por un tiempo despreciable, la nulclina del subsistema rápido.

En el trabajo citado, la separación de escalas temporales se genera a partir de un parámetro, que en el artículo mencionado se llama  $p_{15}$  (ver sección 2.2). Y en efecto,  $p_{15}$  es muy pequeño (comparado con 1), ya que  $p_{15} = 5,6 \times 10^{-5}$ . Los autores pretenden elegir como módulo lento al subconjunto de componentes  $C_5$  y  $s$ . Sin embargo, como se puede ver en las ecuaciones con los parámetros reemplazados 4.1c (se seleccionan las coordenadas  $m_2$ ,  $c_5$  y  $s$ ), este parámetro separa las escalas de la dinámica de la molécula  $s$  con respecto al subsistema rápido. La dinámica de  $c_5$ , en cambio, está regulada principalmente por  $p_{15}p_{16}p_{14} = 0,14$ , que no es tan chica (con respecto a 1).

$$\dot{m}_2 = -\frac{0,04m_2}{m_2 + 0,08 + 1 - m_0 - m_2 - c_5} + \frac{0,448(1 - m_0 - m_2 - c_5)}{m_0 + 0,08 + 1 - m_0 - m_2 - c_5} - 0,14sm_2 + 0,00088c_5 \quad (4.1a)$$

$$\dot{c}_5 = 0,14sm_2 - 0,00088c_5 \quad (4.1b)$$

$$\dot{s} = 5,6 \times 10^{-5}(1 - s) - 0,0088sm_2 + 5,33 \times 10^{-6}c_5 \quad (4.1c)$$

Así, se puede observar que la ecuación para  $\dot{c}_5$  está en el mismo orden de magnitud que  $\dot{m}_2$ . Y que en cambio, en este sistema, la principal separación de escalas temporales no se encuentra entre el módulo de la doble fosforilación y el secuestro ( $c_5$  y  $s$ ), sino entre el sistema entero y la degradación autónoma del sustrato específicamente (es decir, la dinámica de la coordenada  $s$ ).

El módulo original (de la doble fosforilación) es biestable. Esto significa que es biestable en ausencia de secuestro. La ausencia de secuestro se da cuando  $c_5 = 0$ . En la fig. 4.1 se muestra que con respecto a  $c_5$  el sistema no tiene oscilaciones de relajación (a  $p_{15} \sim 0$ ) debido a que las ramas del diagrama de bifurcaciones teniendo como parámetro de control  $c_5$  son inconexas. Esto es un problema. Si el sistema es originalmente biestable, el diagrama de bifurcaciones con respecto a  $c_5$  necesariamente tiene que ser inconexo, dado que el sistema no puede alcanzar las dos *saddle nodes*, sino sólo una. Por lo tanto, el sistema no puede ser biestable para  $c_5 = 0$  si se pretenden oscilaciones de relajación que utilicen la separación de escalas dada por  $p_{15}$ .

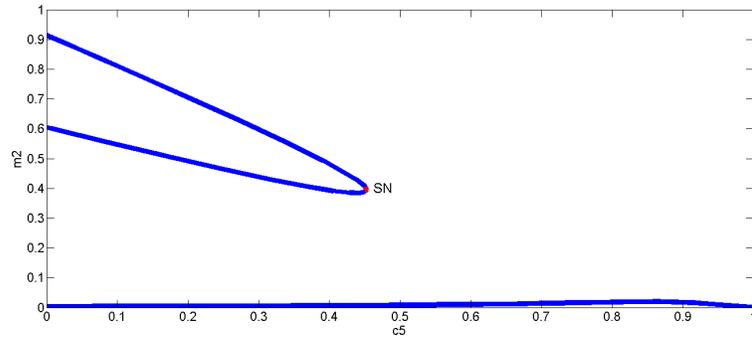


Figura 4.1: Diagrama de bifurcación del sistema definido por las ecuaciones 2.7 con respecto a  $c_5$ . Tiene dos ramas inconexas.

La oscilación de relajación se da exclusivamente en la rama de baja concentración de  $m_2$ , lo cual se puede observar tomando  $s$  como parámetro de control. Esto se muestra en la fig. 4.2. Con respecto a  $s$ , el sistema tiene bifurcaciones *saddle node* en forma conexas. Así que el sistema puede tener oscilaciones, con respecto a esta coordenada.

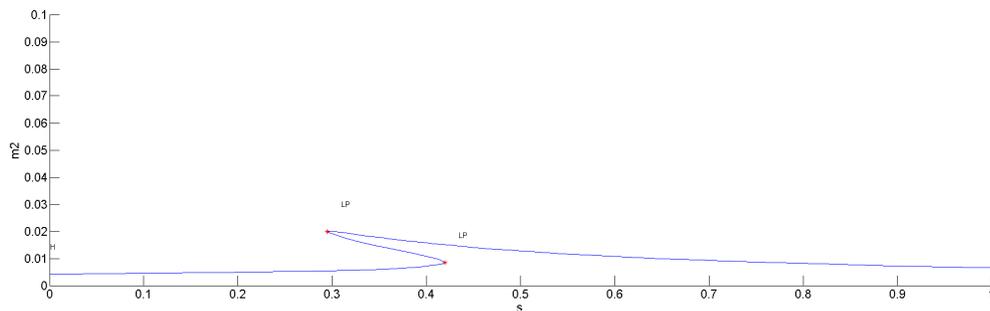


Figura 4.2: Diagrama de bifurcaciones del sistema definido por las ecuaciones 2.7 con respecto a  $s$ . El sistema tiene bifurcaciones *saddle node* en forma conexas.

Por lo tanto, para obtener oscilaciones de relajación, será necesario tener cuidado al elegir los parámetros para encontrar el módulo biestable pero de tal manera que con respecto a  $c_5$  se obtenga un diagrama conexo. Y por otro lado, será necesario tener cuidado con que el sistema entero sea lento, y no sólo  $p_{15} \ll 0$ .

## 4.2. Modelo completo estudiado en esta tesis.

El modelo completo que se tomó en esta tesis, fue el del sistema de Harrington, Feliu *et al* [15] añadiéndole un módulo de secuestro tal como el que se utiliza en el paper de Shvartsman o, dicho de otra manera, reemplazando el módulo biestable de Liu et al. por el sistema de Feliú et al. Este sistema se muestra en la fig. 4.3.



Lo primero que se puede observar en estas ecuaciones es que  $S^{tot}$  (ver 2.2) se sustituye por  $S^{tot}(1 - c_5)$ . En segundo lugar, aparece un término en  $y_2$  proporcional a  $p_{15}$ , que va a ser despreciable cuando  $p_{15} \rightarrow 0$ . Y en tercer lugar, aparecen 5 parámetros nuevos y 2 variables nuevas, que tendrán una dinámica más lenta que las 8 otras variables, debido a la separación de escalas.

La normalización para  $s$  está elegida de tal manera que su valor cuando está presente en exceso es 1. El valor de esta constante de normalización es  $\frac{V}{k_6}$ .  $p_{15} \sim 0$ . Aunque, como se mencionó antes,  $p_{15}a_v \sim 0$  y  $p_{15}a_v a_m \sim 0$  también son condiciones necesarias para obtener la separación de escalas temporales (porque controlan el lado derecho de las ecuaciones 2.4). Las condiciones para los parámetros son que  $a_v$ ,  $a_m$ ,  $a_p$  y  $a_s$  son positivos. En particular,  $0 < a_p < 1$ .

### 4.3. Procedimiento para generar oscilaciones.

Ya teniendo todo este sistema, se espera que el sistema descrito presente oscilaciones sostenidas en algún sector del espacio de los parámetros, por lo tanto, se propone un método para encontrar dicho sector.

En primer lugar, es necesario trabajar con el subsistema biestable y para eso se utiliza la herramienta *CRNT* [28] y obtener parámetros que generan biestabilidad. Como ya se explicó, se pueden obtener varios conjuntos de parámetros, lo cuál se logra intercambiando el orden en que se colocan las ecuaciones.

Luego se utiliza la herramienta *Matcont* [29], colocando el subsistema biestable como sistema a analizar. Sin embargo, en lugar de tomar  $S^{tot}$  como parámetro, éste se intercambia por  $S^{tot}(1 - c_5)$  (debido a que el secuestro reduce la cantidad total efectiva de enzima S). Por ejemplo, en este caso, se reemplaza  $1 - y_2 - y_6 - y_7 - y_1 est - y_3 b_2 - y_5 est - y_8 b_3$  por  $1 - y_2 - y_6 - y_7 - y_1 est - y_3 b_2 - y_5 est - y_8 b_3 - c_5$  cuando corresponde (en  $y_1$  y en  $y_6$ ). Este sistema va a tener una variable de salida, que en este caso es  $y_2 = \frac{[S^*]}{S^{tot}}$ . Esta variable es importante, porque es la única variable del subsistema rápido que entra como argumento en el subsistema lento. Representa la concentración del compuesto que en el modelo completo es secuestrado. Por otra parte,  $s$  sólo interactúa en forma indirecta con el sistema rápido, a través de  $c_5$ , esto simplifica mucho el sistema.

Este sistema es biestable. Sin embargo, para obtener un régimen oscilatorio, no se debe buscar un sistema biestable a  $c_5 = 0$ , sino un sistema que acceda a las dos bifurcaciones *saddle nodes* al variar  $c_5$  de 0 a 1. De esta manera, es necesario conocer el diagrama de bifurcaciones bidimensional tomando como parámetros de control a  $c_5$  y a un parámetro de control más. En esta tesis se elige *est* como el otro parámetro de control, pero podría haber sido cualquier otro. Nótese que tomar como parámetro de control  $c_5$  es equivalente a hacerlo con  $S^{tot}$ . Para el sistema rápido, la enzima que está secuestrada puede tomarse como si no existiera, lo cual disminuye la cantidad de enzima libre.

Para eso, es necesario buscar el diagrama de bifurcaciones para el parámetro *est* a  $c_5 = 0$ . Una vez ubicado en una *saddle node* con respecto al parámetro *est*, se puede buscar el diagrama de bifurcaciones bidimensional. Todo esto se muestra en la fig. 4.4. En esta sección se muestra otra isla de biestabilidad del subsistema rápido que el que se utiliza a lo largo de esta tesis (del mismo modelo).

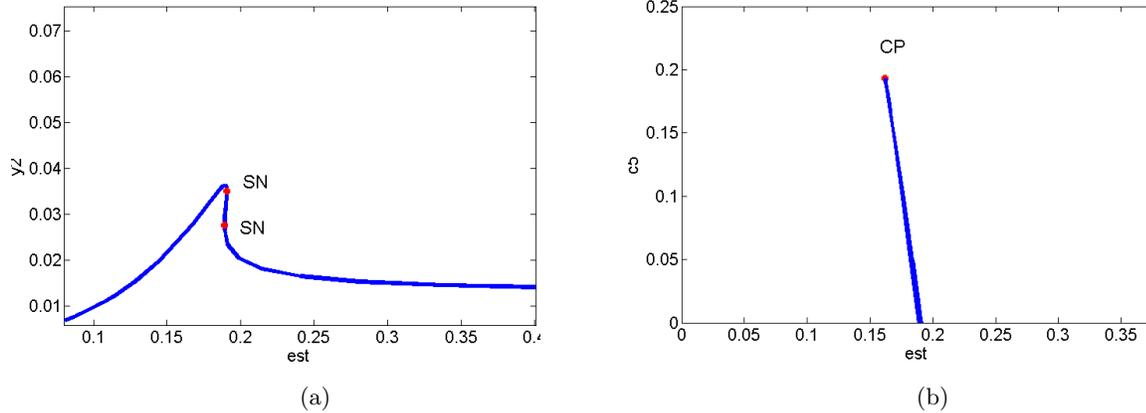


Figura 4.4: Búsqueda de oscilaciones. 4.4a En la primera etapa, se analiza el diagrama de bifurcaciones con respecto a  $est$ . 4.4b En segundo lugar, se analiza el diagrama bidimensional con respecto a  $c_5$  y  $est$ . CP señala la bifurcación cúspide.

En siguiente lugar es necesario observar el diagrama de bifurcaciones y cambiar el valor del parámetro  $est$ . El parámetro se debe elegir de tal manera que al variar (aumentar)  $c_5$  el sistema transicione entre dos *saddle nodes*. Por ejemplo, para este sistema podría elegirse un valor entre 0.162 y 0.174. Nótese que para ninguno de estos valores el sistema es biestable para  $c_5 = 0$ . Esto sucedería para  $est$  entre 0.174 y 0.175.

Una vez que se elige el conjunto entero de parámetros, queda definido el subsistema rápido que poseerá oscilaciones. Sin embargo, es necesario obtener aún el subconjunto de los parámetros del sistema lento que generan oscilaciones en el sistema. Para ello, es necesario extraer información relevante del subsistema rápido.

Lo necesario para lograr esto es volver a obtener el diagrama de bifurcaciones, pero con respecto a  $c_5$ , y tomando como variable de salida  $y_2$ . En este diagrama es necesario registrar los dos pares de coordenadas  $(c_5, S^*)$  para las dos *saddle nodes*. Todo esto se muestra en la fig. 4.5 En este caso, los valores serían de:

$$\begin{array}{ll}
 c_5^1 = 0,1406 & c_5^2 = 0,1423 \\
 y_2^1 = 0,0225 & y_2^2 = 0,0255
 \end{array}$$

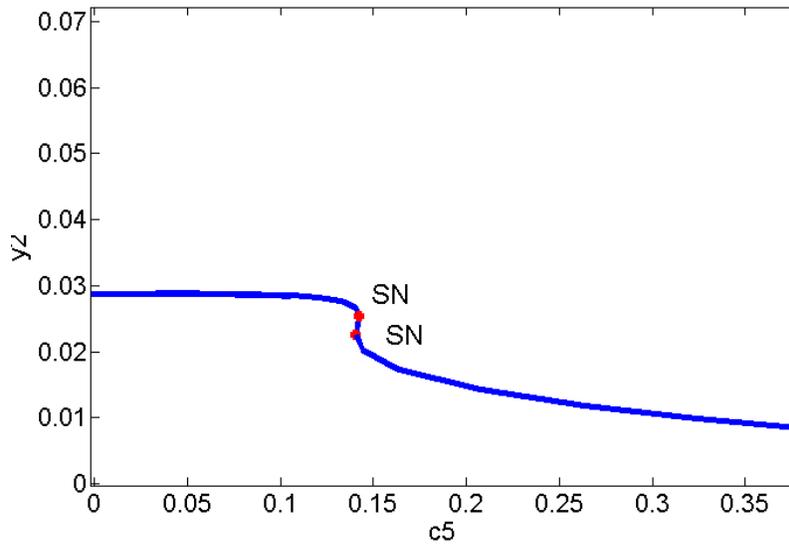


Figura 4.5: Búsqueda de oscilaciones. Diagrama de bifurcaciones con respecto a  $c_5$  con el nuevo valor de  $est$ .

Este sistema así tiene oscilaciones, como se muestra en la fig. 4.6.

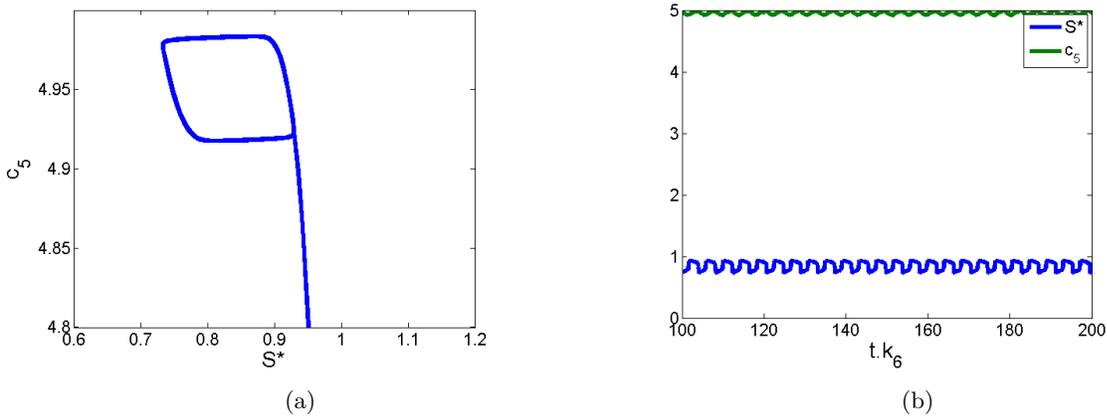


Figura 4.6: Presencia de oscilaciones en el sistema. Esto se expresa en 4.6a la trayectoria en el espacio de fases y 4.6b los perfiles temporales. En este gráfico, las variables  $c_5$  y  $S^*$  no están normalizadas.

Para que el sistema tenga oscilaciones, son necesarios dos elementos. Por un lado, el diagrama de bifurcaciones con respecto a  $c_5$  tiene que tener forma de “z” y no de “s” (estas estructuras se profundizarán en el Capítulo 6). Se muestran dos diagramas comparados de estos tipos en la fig. 4.7. Este es un elemento importante y más adelante se analizará en profundidad. Por otro lado,  $\frac{y_2}{c_5}$  tiene que ser mayor para el punto de alto  $c_5$  y alto  $y_2$  (el de arriba a la derecha) que el de bajo  $c_5$  y bajo  $y_2$  (abajo y a la izquierda). En caso de que esto no se dé, es necesario reelegir otro valor de  $est$ .

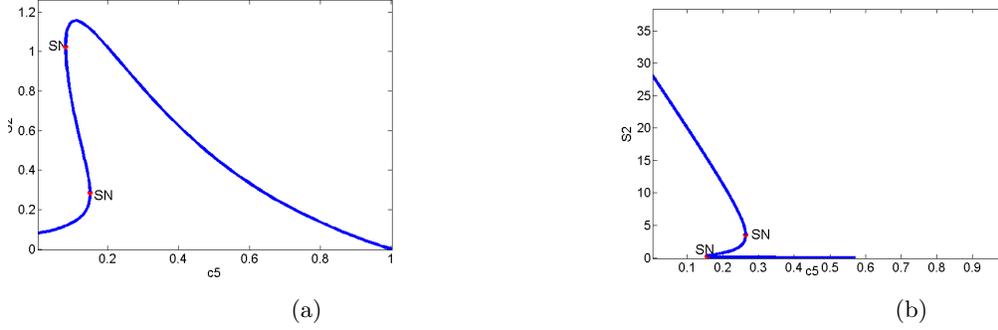


Figura 4.7: Comparación de diagramas. 4.7a Diagrama “tipo” S. 4.7b Diagrama “tipo” Z, correspondientes a distintos módulos biestables (ver cap. 6).

#### 4.4. Intersecciones de las nulclinas.

Para obtener el régimen oscilatorio, una vez fijados los parámetros del subsistema rápido, primero se calcula la nulclina del sistema lento (es decir,  $\dot{c}_5 = 0$  y  $\dot{s} = 0$ ), que corresponde a las siguientes ecuaciones:

$$0 = p_{15}a_v(a_m S^* s - c_5) \quad (4.3a)$$

$$0 = p_{15}\left(1 - s - \frac{a_s}{a_m}c_5 - \frac{a_s}{a_m(1 - a_p)}(a_m S^* s - c_5)\right) \quad (4.3b)$$

La variable  $y_2 = \frac{[S^*]}{[S^{tot}]}$  fue renombrada como  $S^*$ .

Estas ecuaciones se pueden reescribir de esta manera

$$c_5 = a_m S^* - a_s S^* c_5 \quad (4.4a)$$

$$s = 1 - \frac{a_s}{a_m} c_5 \quad (4.4b)$$

En resumen, las nulclinas del subsistema rápido resultan en una superficie bidimensional sigmoidea  $S^*(c_5)$  que no depende de la tercera variable. La nulclina del subsistema lento es una hipérbola (oblicua en el eje  $c_5 - s$ ). Este diagrama de nulclinas de 3 dimensiones descripto, es análogo a un sistema de tipo Van der Pol (aunque este tiene 2 dimensiones).

La ecuación 4.4a es equivalente a la ecuación

$$a_m = \frac{c_5}{S^*(c_5)} + a_s c_5 \quad (4.5)$$

Ésta es una ecuación algebraica que da una relación cerrada entre la variable  $c_5$  en su estado estacionario, la función  $S^*(c_5)$  y los parámetros  $a_m$  y  $a_s$ . Pero el corte de nulclinas no puede estar en cualquier lado para obtener un oscilador de relajación. En otras palabras,  $c_5$  en el estado estacionario del sistema tiene que estar en la rama inestable de la nulclina del subsistema biestable. Así, el corte de nulclinas tiene que estar entre las dos bifurcaciones para que esté sobre esa rama inestable. Si el corte de nulclinas estuviera en la rama estable del subsistema estable, este punto sería un punto estacionario estable. Para obtener oscilaciones, es necesario que este punto estacionario sea inestable.

Cada *saddle node* tiene coordenadas  $(c_5, S^*)$ , por lo que se puede numerar como  $(c_5^1, S^{*1})$  y  $(c_5^2, S^{*2})$  a las coordenadas de los dos puntos de la bifurcación. Debido a que si  $c_5^1 < c_5^2$ ,  $\frac{S^{*1}}{c_5^1} < \frac{S^{*2}}{c_5^2}$ , se cumple que el borde en el que la nulclina alcanza la bifurcación *saddle node* de la esquina superior derecha,  $c_5$  es máximo y  $\frac{c_5}{S^*}$  es mínimo. Lo inverso sucede en la esquina inferior izquierda.

Así, a partir de 4.5 se cumple la inecuación:

$$\min\left(\frac{c_5}{S^*}\right) + a_s \max(c_5) < a_m < \max\left(\frac{c_5}{S^*}\right) + a_s \min(c_5) \quad (4.6)$$

que, en el sistema elegido, vale (sustituyendo por las coordenadas de las dos *saddle nodes*):

$$3,86 + a_s 0,155 < a_m < 6,88 + a_s 0,0695 \quad (4.7)$$

Estas ecuaciones implican que el sistema es oscilatorio dentro de un triángulo en el espacio de parámetros, y que los parámetros  $a_p$  y  $a_v$  no son relevantes para obtener oscilaciones. Este triángulo está delimitado por las dos rectas  $a_m = 3,86 + \tilde{a}_s 0,155$  y  $a_m = 6,88 + \tilde{a}_s 0,0695$ . Estas condiciones se muestran en la fig. 4.8. El parámetro  $a_v$  resulta afectar para valores  $a_v \gtrsim 1$ . No se descubrió en esta tesis la razón, pero se sospecha que está relacionado a un quiebre de la condición de separación de escalas temporales.

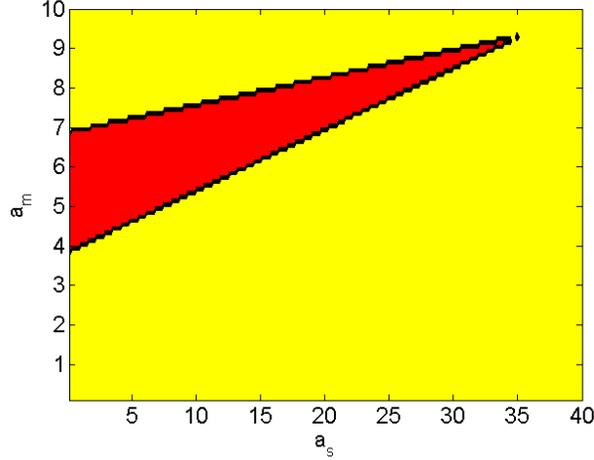


Figura 4.8: Resultado analítico: Rango en que el que se predice que el sistema es oscilatorio (color rojo).

Es necesaria una característica más para que el sistema actúe como un oscilador de relajación, y es que la nulclina del subsistema lento sea estable (en el sentido de restitutiva). A diferencia del sistema *Van der Pol* original, el subsistema lento es no lineal y es bidimensional, lo cual hace que el sistema no pueda resolverse analíticamente. Es más, no se puede asegurar que el sistema sea siempre restitutivo. Al analizar en el siguiente capítulo el sistema de forma numérica, se explora la posibilidad de que esta propiedad restitutiva sea válida para valores bajos del parámetro  $a_v$ .

## 4.5. Interpretación de parámetros.

La interpretación que se le da a los parámetros es la siguiente:

$a_v$  es la velocidad de degradación del complejo intermedio  $c_5$  comparada con la de  $s$ .  $a_v > 0$ . Se elige el nombre  $a_v$  porque este parámetro va a estar relacionado a la frecuencia de las oscilaciones (v de velocidad).

$a_m$  es el valor que toma  $\frac{c_5}{S^*}$  para la nulclina  $\dot{c}_5 = 0$  y cuando  $s$  está en exceso. Se elige el nombre  $a_m$  porque este parámetro va a estar relacionado a la inversa de la pendiente de aquella nulclina (m por pendiente).

$a_p$  compara la tasa de transición del complejo intermedio en su producto y su tasa de descomposición en sus reactivos. Es decir, si  $a_p \sim 0$ , la reacción es más irreversible. Se elige el nombre  $a_p$  porque este parámetro representa la irreversibilidad de la reacción que produce  $c_5$  (p por producción).

$a_s$  compara -en situación de sustrato en exceso y para la nulclina  $\dot{c}_5 = 0$ - la tasa de degradación de sustrato por la vía independiente y la tasa de degradación por la vía que involucra  $S^*$ . El valor de la primera es  $k_6$ . El valor de la segunda es  $k_5^r [c_5] = k_5^r \frac{k_5^+ S_{tot}}{k_5^- + k_5^r}$ . Se elige el nombre  $a_s$  porque este parámetro está relacionado a cuán limitante es el sustrato (s por sustrato).

De esta manera, se le puede dar un sentido biofísico a las condiciones para obtener oscilaciones.

## Capítulo 5

# Exploración numérica

### 5.1. Comparación entre resultados analíticos y resultados numéricos

En el Capítulo anterior se mostró que el sistema tiene oscilaciones. Una manera de buscarlas es con un barrido de parámetros. En toda esta sección, los valores de los parámetros del subsistema rápido se fijarán a los encontrados en la sección 4.3. Dado que  $p_{15}$  se fijó a 0.0056 (fue un valor que se consideró lo suficientemente chico), quedaron 4 parámetros libres ( $a_m$ ,  $a_s$ ,  $a_v$  y  $a_p$  -ver sección 4.5-) para analizar de las ecuaciones diferenciales. Cada set de valores para estos cuatro parámetros da un sistema de ecuaciones diferenciales distinto, de los cuales algunos van a tener un régimen oscilatorio y otros van a tener de régimen punto fijo. Las ODEs se simularon con la rutina de *MATLAB* Ode45. Cada ecuación diferencial tiene como *output* una serie temporal; se analiza si este output es oscilatorio o converge a un punto fijo a través de un análisis de Fourier (ver sección 3.6).

Se puede ver el resultado en este sentido en la fig. 5.1, donde se muestran los valores de parámetros para los que el sistema es oscilatorio. Se analizaron suficientes conjuntos de parámetros para mostrar una imagen clara de la forma del subconjunto del espacio de parámetros para cada régimen. Para este ejemplo se analizaron 10000 conjuntos de parámetros.

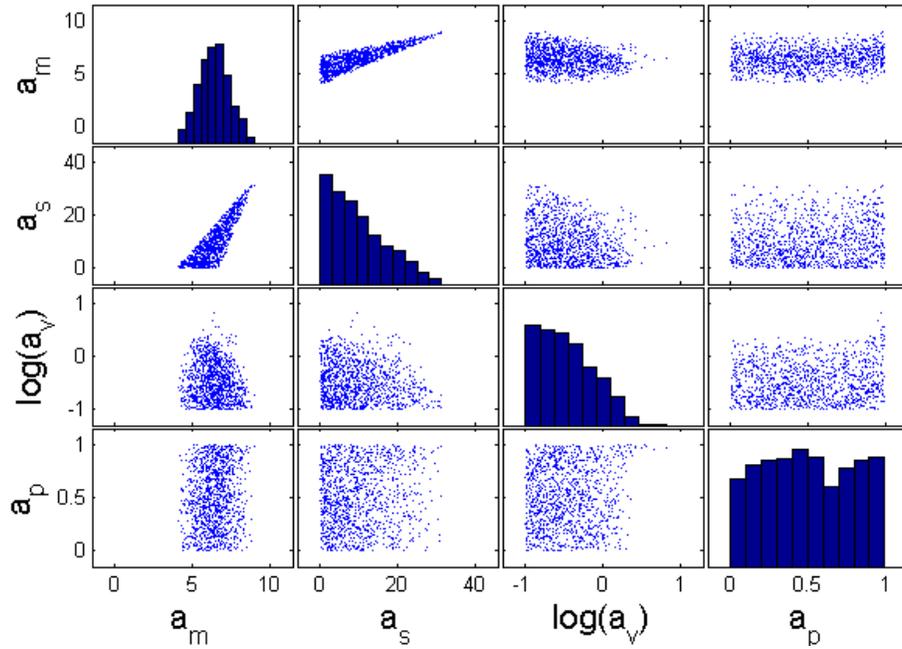


Figura 5.1: Zona del régimen periódico para todos los pares de parámetros, obtenidos con el barrido de parámetros en el modelo principal de la tesis. Los rangos que se grafican son los siguientes:  $0 < a_m < 10$ ,  $0 < a_s < 40$ ,  $0 < a_p < 1$  y  $a_v$  barrido en forma logarítmica, entre  $10^{-1}$  y 10. Cada punto señala una corrida de las ecuaciones diferenciales correspondiente a un conjunto de parámetros. En la diagonal, se muestra el histograma de frecuencias de ocurrencia del régimen oscilatorio en función de un parámetro. Fuera de la diagonal se muestra la distribución de sistemas en régimen oscilatorio de los sistemas para cada par de parámetros. Los espacios en blanco y dentro del rango barrido de los parámetros son sistemas que no están en régimen oscilatorio. Consultar la sección 4.5 para ver el significado biofísico de cada parámetro.

Lo primero que se puede observar es que, en efecto, el parámetro  $a_p$  no es un parámetro relevante (la distribución del histograma de los sistemas en régimen oscilatorio es uniforme). El parámetro  $a_v$  sí resulta serlo, lo cual no se esperaba analíticamente. Es decir, las oscilaciones se pierden al crecer  $a_v$  (es decir, para grandes valores de  $a_v$  no se observan puntos correspondientes al régimen oscilatorio). Esto se analizará en profundidad en la próxima sección.

En esta sección, se pretenderá destacar el rol de los parámetros  $a_m$  y  $a_s$ . Así, si se amplía el sistema a  $a_v$  pequeño y fijo ( $a_v = 0,01$ ), se puede analizar este sistema en profundidad. El barrido de  $a_p$  se mantiene entre 0 y 1. Esto se puede observar en la fig. 5.2.

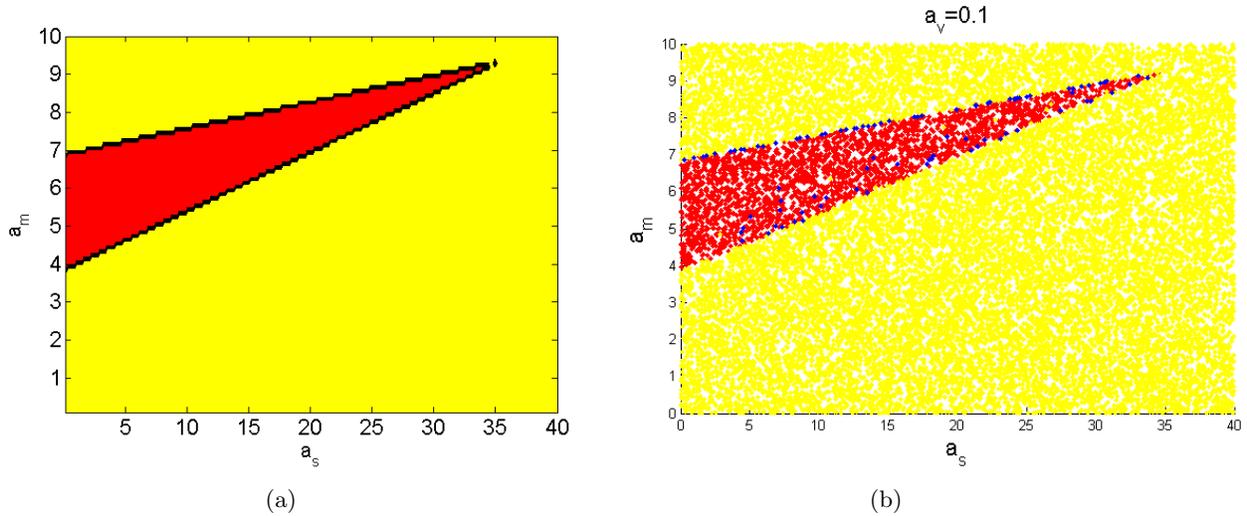


Figura 5.2: Comparación de los resultados analítico y numérico. Se repite la figura 5.2 para poder comparar. El barrido de  $a_p$  se mantiene entre 0 y 1. Los resultados son coincidentes. Rojo representa oscilatorio, amarillo, punto fijo, y azul oscilaciones irregulares. 5.2a Resultado analítico. 5.2a Resultado numérico.

Se pueden comparar las dos imágenes y observar que en ambos casos el régimen oscilatorio está en un sector triangular en el plano  $a_m - a_s$  cuyo borde inferior es una recta que tiene como ordenada al origen 6,9, cuyo borde superior tiene como ordenada al origen 3,9 y tal que el punto de intersección es  $(35,3,9,3)$ . De esta manera se ponen a prueba tanto los resultados analíticos como el método numérico. Y en particular, se ponen a prueba las aproximaciones utilizadas en el Capítulo 4, es decir la separación de escalas temporales y la hipótesis de la estabilidad de la nulclina del subsistema lento.

Cerca de los bordes, el cruce de las nulclinas se encuentra cercano a alguna de las *saddle nodes*. Esto tiene como implicancia que el sistema queda cerca de un punto crítico y que la velocidad del subsistema rápido decrece alcanzando la velocidad del subsistema lento. En estas circunstancias, la separación de escalas se pierde y aparece una riqueza dinámica relacionada a una dimensionalidad mayor (comportamientos irregulares).

## 5.2. Más allá de los resultados analíticos.

El sistema pierde las oscilaciones al aumentar el valor de  $a_v$ . Esto se puede ver claramente en la fig. 5.3. Se puede observar que el rango oscilatorio se reduce en los bordes hasta casi desaparecer al valor  $a_v = 2,7$ . En los bordes del régimen oscilatorio en este sistema se encuentran siempre oscilaciones irregulares, por las razones mencionadas previamente.

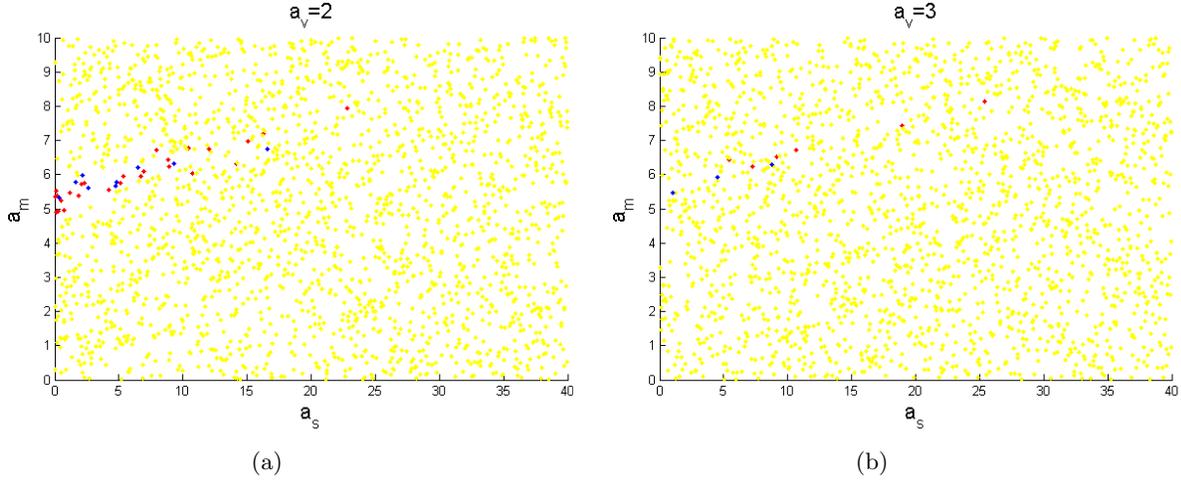


Figura 5.3: Comparación del rango de valores de los parámetros para los cuales el sistema es oscilatorio a distintos valores del parámetro  $a_v$ . El barrido de  $a_p$  se mantiene entre 0 y 1. Rojo representa oscilatorio, amarillo, punto fijo y azul oscilaciones irregulares.

Sin embargo, se puede observar que el régimen oscilatorio no desaparece completamente, y se puede observar que a valores de  $a_p$  cercanos a 1 el sistema se mantiene oscilatorio. Esto se puede ver en la fig. 5.4.

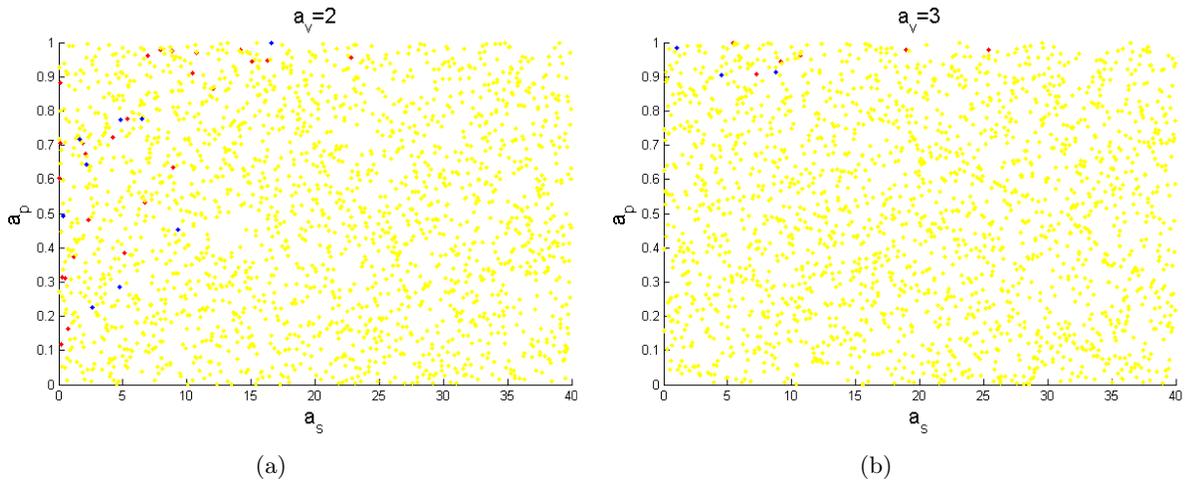


Figura 5.4: Comparación del efecto del parámetro  $a_p$  a distintos valores del parámetro  $a_v$ . El barrido de  $a_p$  se mantiene entre 0 y 1. Rojo representa oscilatorio, amarillo, punto fijo y azul oscilaciones irregulares.

Existe una bifurcación (en el sentido de que el sistema pasa a ser de régimen oscilatorio a un sistema de punto fijo) para el parámetro  $a_v$  (o incluso para el parámetro  $a_v(1 - a_p)$ ), que es el borde entre el régimen de punto fijo y el régimen oscilatorio. Las razones por las cuales existe una bifurcación para el parámetro  $a_v$  (o incluso para el parámetro  $a_v(1 - a_p)$ ) se pueden conjeturar. Por empezar, al aumentar  $a_v$ , aumenta  $p_{15}a_v$ , de tal manera que la separación de escalas se rompe. Por otro lado, hay indicios según los cuales el parámetro  $a_v$  podría cambiar la dinámica transversal a la nulclina del subsistema lento. Es decir, puede pasar de ser restitutiva a ser inestable. No se obtuvo una justificación concluyente, por lo que se deja abierto a una investigación más profunda.

Al analizar esta zona no analítica de la solución, se pudo poner en juego la ventaja de una caracterización numérica del sistema, es decir, el método numérico para la búsqueda de oscilaciones.

## Capítulo 6

# Generalización

### 6.1. Otras topologías que dan biestabilidad

En los sistemas biológicos, los ciclos de fosforilación son extremadamente comunes. Sin embargo, las kinasas y las fosforilaciones no son específicas. Es decir, hay más de una kinasa que fosforila un sustrato, y hay más de un sustrato fosforilado por una única kinasa. Equivalentemente, las fosfatasas y las defosforilaciones no son específicas. Por ejemplo, hay 500 kinasas distintas en el ser humano, pero sólo 200 fosfatasas [36]. De esta manera, es claro que existe cierta repetición del uso de fosfatasas para distintos ciclos de fosforilación.

En el paper de Feliú y Wiuf [25], se encuentra en distintas topologías que el fenómeno de compartir kinasas o fosfatasas, para distintos ciclos de fosforilación, genera regímenes biestables. Así, se muestran en la fig. 6.1 las distintas topologías en las que se presenta la biestabilidad. Todas ellas comparten kinasas y/o fosfatasas.

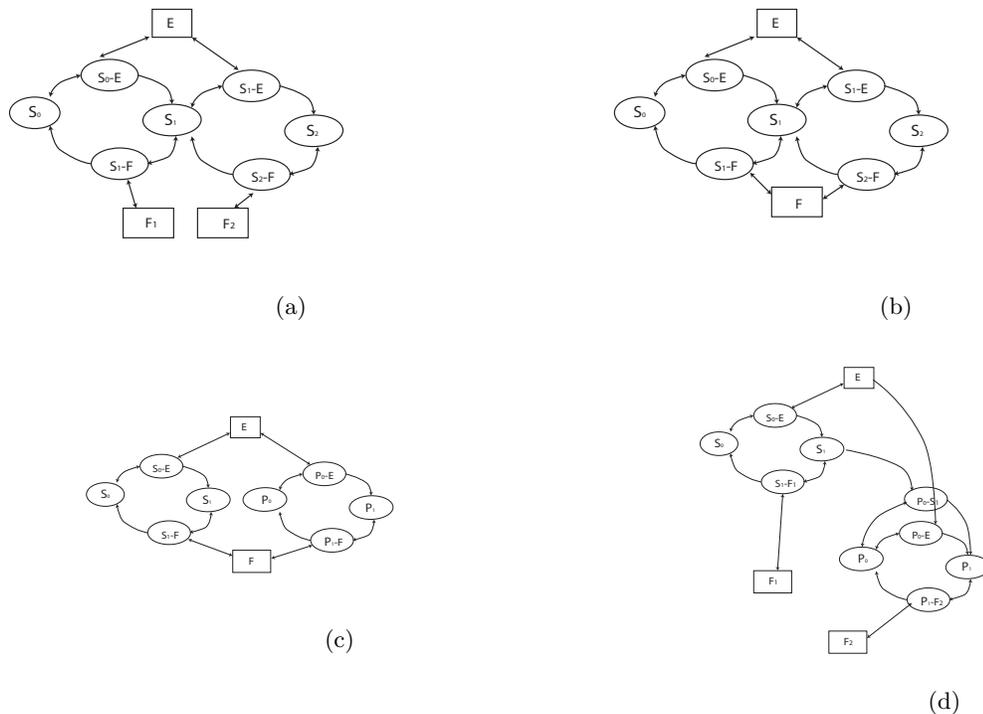


Figura 6.1: Distintas topologías estudiadas en el paper [25] y analizadas en esta tesis. Todas poseen biestabilidad. Se numeran las topologías según el paper del que se toman. 6.1a Topología f. La kinasa es compartida en una doble fosforilación. 6.1b Topología g. La kinasa y la fosfatasa son compartidas en una doble fosforilación. 6.1c Topología i. La kinasa y la fosfatasa son compartidas en dos ciclos distintos de fosforilación. 6.1d Topología l. Una cadena de señalización con kinasas compartidas.

## 6.2. Generalización del procedimiento para generar oscilaciones.

En toda esta tesis se trabajó sobre un modelo específico, que es el de compartimentalización con secuestro. Sin embargo, el método que se sugirió para encontrar oscilaciones es generalizable para todo subsistema biestable al que se le agrega secuestro. La posibilidad de sustituir el módulo lento reconstitutivo, no se investigará en esta tesis, aunque en líneas generales debería tener la misma función (pero con un diagrama de bifurcaciones mucho más complejo).

De esta manera, se toman las topologías mencionadas en 6.1 como insumo. Para generar oscilaciones, se le agrega a cada uno de estas topologías el secuestro. Esto se muestra en la figura 6.2.

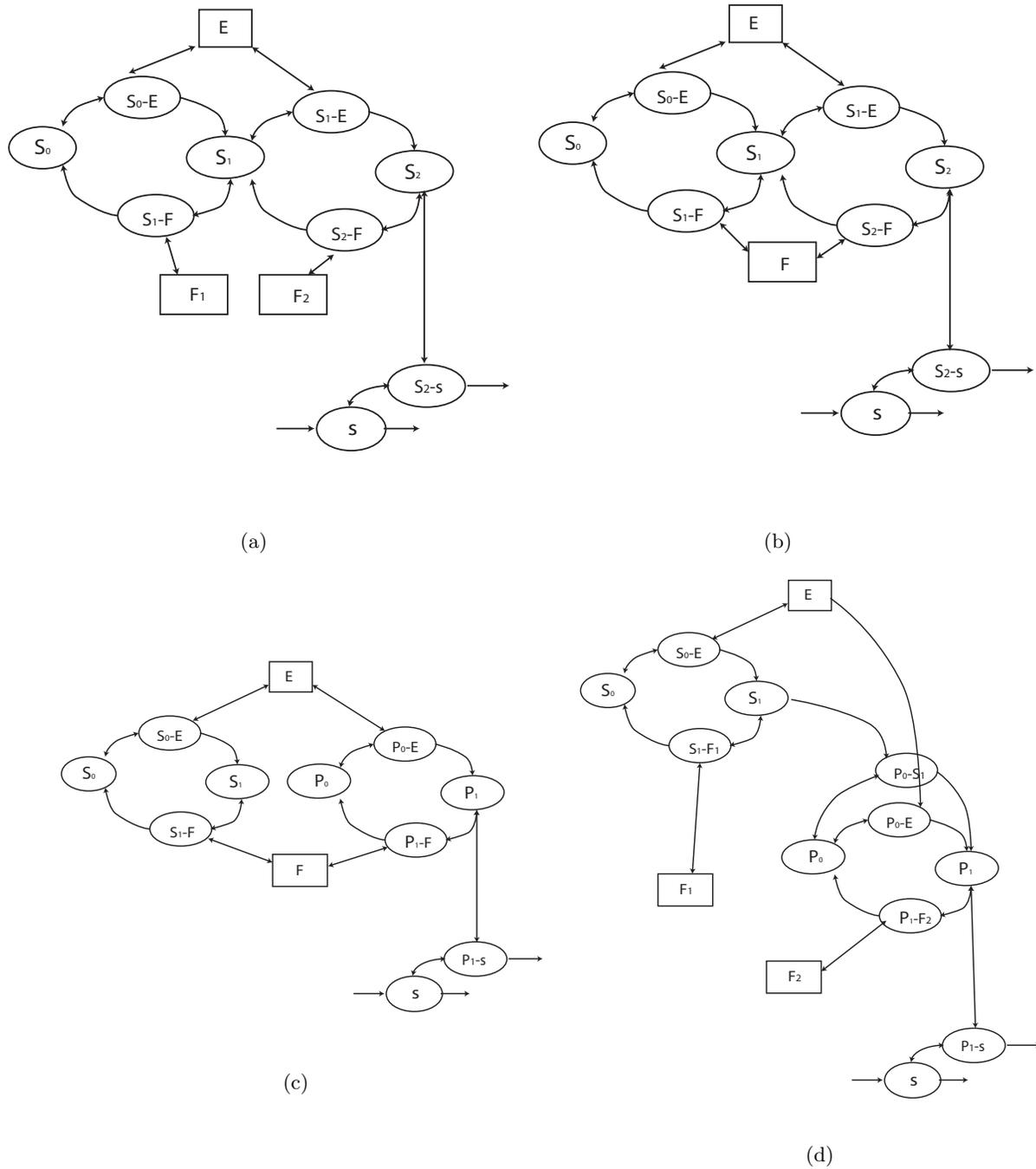


Figura 6.2: Topologías con secuestro analizadas en este capítulo. 6.2a Topología f con secuestro. 6.2b Topología g con secuestro. 6.2c Topología i con secuestro. 6.2d Topología l con secuestro.

Estas topologías mencionados poseen biestabilidad. Este fenómeno puede ser sacado a la luz por medio de un diagrama de bifurcación. Como se mencionó anteriormente, el método para obtener oscilaciones requiere el diagrama de bifurcación con respecto a  $c_5$  (que es una reescritura del parámetro  $S^{tot}$  para las topologías f y g, y de  $P^{tot}$  para el diagrama i y l). El diagrama de bifurcaciones se presenta en la fig. 6.3. Es decir, lo que se grafica es la proyección de la nulclina del subsistema rápido en la variable de salida. En estos gráficos, las variables (exceptuando  $c_5$ ) no están normalizadas.

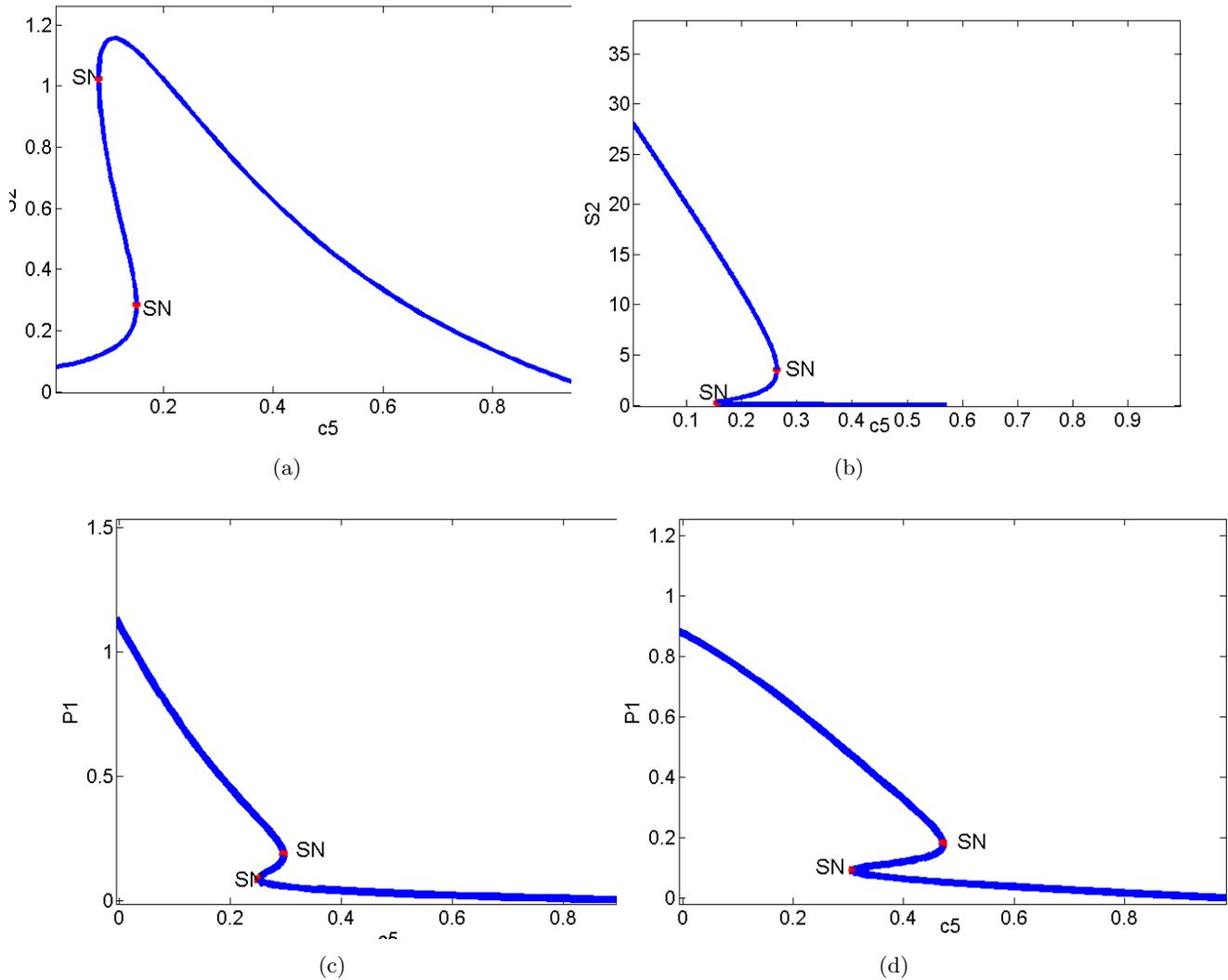


Figura 6.3: Los diagramas de bifurcación de las topologías analizadas en este capítulo. 6.3a Diagrama de bifurcaciones para el topología  $f$  (tipo S). 6.3b Diagrama de bifurcaciones para el topología  $g$  (tipo Z). 6.3c Diagrama de bifurcaciones para la topología  $i$  (tipo Z). 6.3d Diagrama de bifurcaciones para la topología  $l$  (tipo Z).

Los diagramas de las topologías  $g$ ,  $i$  y  $l$  son diagramas de “tipo” Z que tienen el cociente de las coordenadas de las bifurcaciones *saddle node* en el orden correcto para encontrar oscilaciones por secuestro (ver sección 4.3). Sin embargo, el diagrama de la topología  $f$  es de “tipo” S. En la fig. 6.4 se puede ver por qué es necesario que el sistema tenga un diagrama de “tipo” Z. Se puede observar que si el diagrama es de “tipo” S, el sistema tiene un punto fijo estable, dado que allí se cortan las nulclinas. En cambio, si el sistema tiene un diagrama de “tipo” Z, las nulclinas sólo se juntan en un punto fijo inestable (para los parámetros adecuados, ver sección 4.4), permitiendo así las oscilaciones, enmarcadas por el esqueleto que da la nulclina del subsistema rápido. No es claro qué hace a una estructura tener un diagrama de “tipo” S o uno de “tipo” Z. De hecho, la topología  $f$  y  $g$  son extremadamente similares entre sí.

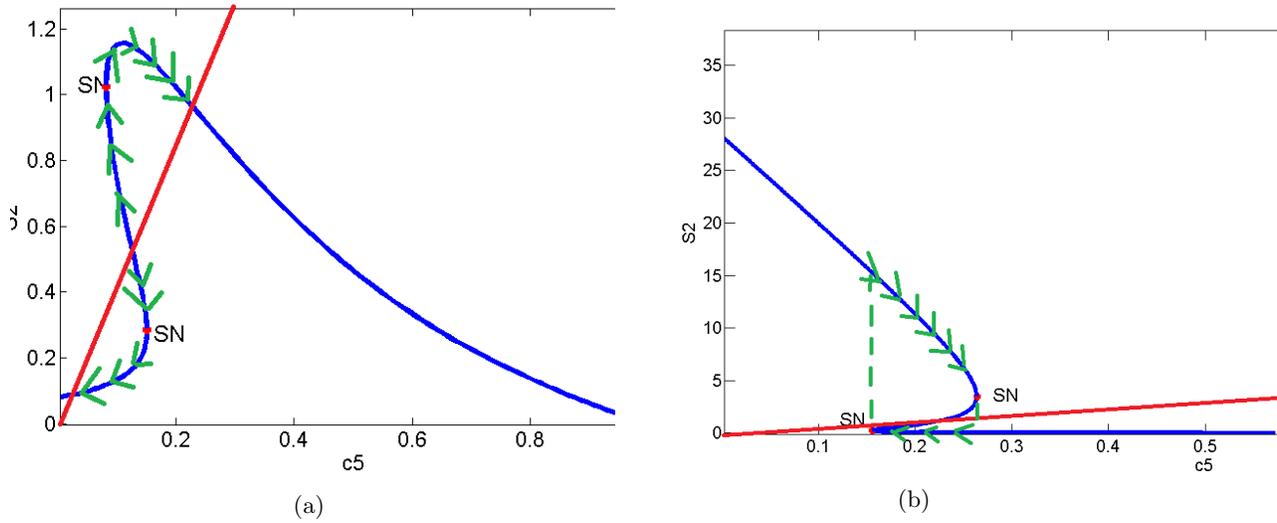


Figura 6.4: Comparación entre los diagramas de “tipo” S y Z. 6.4a La topología f tiene un diagrama de “tipo” S. 6.4b La topología g tiene un diagrama de “tipo” Z.

De esta manera, en las topologías g, i y l, se presentan oscilaciones. Esto se muestra en la fig. 6.5.

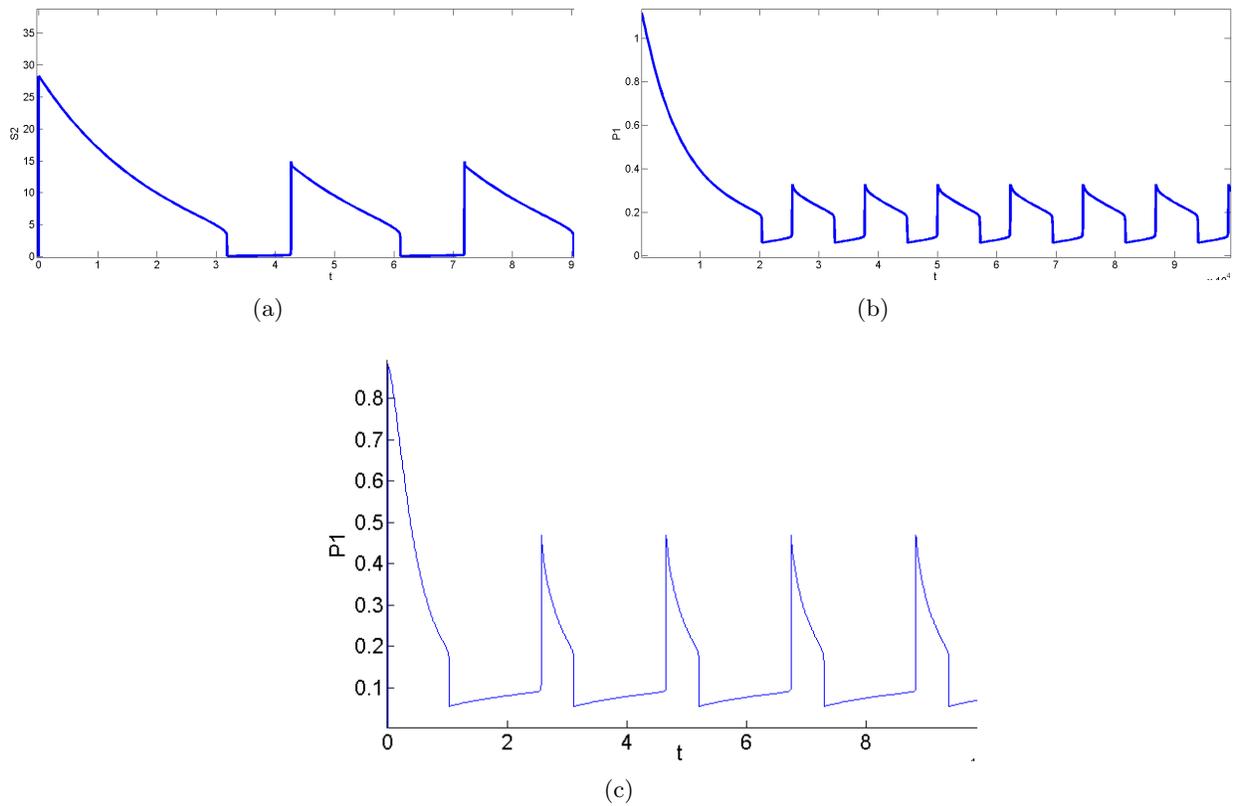


Figura 6.5: Presencia de oscilaciones en los sistemas descritos. 6.5a Presencia de oscilaciones en la topología g con secuestro. 6.5b Presencia de oscilaciones en la topología i con secuestro. 6.5c Presencia de oscilaciones en la topología l con secuestro.

# Capítulo 7

## Conclusiones

Como objetivo de esta tesis se propuso generar un oscilador de relajación combinando biestabilidad y *feedback negativo*, ambos obtenidos en una forma no tradicional. En particular, la biestabilidad se generó por un módulo de compartimentalización, y el *feedback negativo*, por un módulo de secuestro, más lento.

Para ello, se utilizó un módulo que poseía un ciclo de fosforilación, y que incluía un compartimiento, de tal manera que los componentes de aquel ciclo fluyen entre el interior y el exterior del compartimiento. Este módulo está tomado del trabajo de Feliú y colaboradores [15]. Tiene la característica de ser biestable en sectores específicos del espacio de parámetros.

En segundo lugar, se utilizó un módulo de secuestro en el cual uno de los componentes del sistema anterior actúa como catalizador de una reacción. El sustrato de esta reacción secuestra a aquel componente, de tal modo que actúa como un *feedback negativo*, habilitando la posibilidad de oscilaciones, como muestra el trabajo de Liu et al [19]. El fenómeno del *feedback negativo oculto* fue planteado por primera vez por Ventura y colaboradores [22].

En tercer lugar, se requirió la separación de escalas temporales, es decir, que el módulo del secuestro fuera órdenes de magnitud más lento que el módulo biestable.

Con estos dos módulos se armó un sistema que fue el que se utilizó a lo largo de esta tesis. Se fijaron los parámetros del módulo biestable (aunque se hicieron controles estudiando distintas islas de biestabilidad) y se dejó libre el módulo del secuestro, de tal manera que el sistema quedó con 4 parámetros libres. Se logró encontrar un método para hallar oscilaciones de este sistema. Este método utilizó las herramientas MatCont [29] y CNRT [28]. A partir de este método, se observó que bajo ciertas aproximaciones, existe una solución analítica para encontrar el régimen oscilatorio.

Se desarrolló un método numérico de detección de oscilaciones. Con este método se detectó el sector del espacio de parámetros donde el sistema es oscilatorio, y donde el sistema tiene un punto fijo. Se encontró que la aproximación usada valía para cierto valor de los parámetros, y se descubrió la forma en que el sistema abandona el régimen oscilatorio por fuera de estas aproximaciones.

Finalmente, se encontró que este método para encontrar oscilaciones dado un subsistema biestable, el secuestro y la separación de escalas, generalizable a otros módulos biestables. Se analizaron varios ejemplos, y los requerimientos que deben poseer para que el sistema pueda poseer oscilaciones. Una vez que se ajustan las propiedades del sistema biestable, las propiedades que debe tener el subsistema de secuestro son siempre las mismas.

Se mencionan algunos de los rasgos del subsistema de secuestro que permiten la presencia de oscilaciones, tal como se detalla en esta tesis. Por empezar, si hay muy poco sustrato (es decir, si es degradado demasiado rápido por otras vías), no hay oscilaciones. Esto tiene sentido, ya que si hay muy poco sustrato, no puede influir éste demasiado. En segundo lugar, se observa que el complejo intermedio tiene que tomar un valor medio (ni muy grande ni muy bajo) en relación al componente secuestrado. Y en tercer lugar, se observa que el ritmo de degradación del complejo intermedio no puede ser demasiado rápido. No se exploró esto en forma detallada y no se sabe si este rasgo es generalizable a otros módulos biestables.

Hay algunos puntos que son propuestos para mayor análisis. En primer lugar, se propone investigar el cambio del módulo del secuestro por otros módulos que ejerzan un *feedback negativo*. En segundo lugar, se propone investigar con mayor profundidad el rol del parámetro  $a_v$ . Por último, se propone analizar y

clasificar las oscilaciones irregulares que se encontraron entre los dos regímenes estudiados con detalle.

Existen sistemas reales, experimentalmente encontrados, que poseen la estructura que fue descrita en esta tesis, Kim et al [37] y Shankaran et al [38]. Queda planteada, entonces, la pregunta sobre la posibilidad de estos sistemas de presentar comportamiento oscilatorio en algún sector del espacio de parámetros.

# Bibliografía

- [1] W. Bechtel et A. Abrahamsen, *Complex Biological Mechanisms: Cyclic, Oscillatory, and Autonomous*, Philosophy of Complex Systems. Handbook of the Philosophy of Science, Volume 10., p. 257-285 Elsevier, 2011
- [2] J. Leloup et A. Goldbeter, *Toward a detailed computational model for the mammalian circadian clock*. PNAS, vol. 100 no. 12, 7051–7056, 2003
- [3] A. Goldbeter, *Biochemical Oscillations and Cellular Rhythms*, Cambridge Univ. Pr., 1997
- [4] B. Novak et J. Tyson *Design principles of biochemical oscillators.*, Nature review, 9:981-991., 2008
- [5] A. Goldbeter Computational approaches to cellular rhythms., Nature, 420:238-45, 2001
- [6] B. Alberts et al., *Introducción a la Biología molecular.*, Médica Panamericana, 3ª Ed, 2011
- [7] K. Astrom et R. Murray, *Feedback Systems.*, Princeton U. Press, 2008
- [8] C. Goldbeter, *Computational approaches to cellular rhythms*, Nature, Vol 420, p. 238-245, 2002
- [9] C. Gérard et C. Goldbeter, *A skeleton model for the network of cyclin-dependent kinases driving the mammalian cell cycle*, Interface Focus, 1;1(1):24-35, 2010
- [10] B. van der Pol, *A theory of the amplitude of free and forced triode vibrations.*, Radio Review, 1:701-10 1920.
- [11] <https://www.ibiblio.org/e-notes/html5/fhn.html>, visto en 13/02/17
- [12] [http://es.123rf.com/imagenes-de-archivo/animal\\_cell.html](http://es.123rf.com/imagenes-de-archivo/animal_cell.html) visto el 16/02/17
- [13] Markevich et al., *Signaling switches and bistability arising from multisite phosphorylation in protein kinase cascades.*, The Journal of Cell Biology, Volume 164, Number 3:353-9, 2004.
- [14] S.D.M. Santos et al., *Spatial Positive Feedback at the Onset of Mitosis Cell*, 149.7 1500-1513, 2012
- [15] H. Harrington, E. Feliu et al., *Cellular Compartments Cause Multistability and Allow Cells to Process More Information.*, Biophysical Journal, Volume 104, Issue 8:1824-31, 2013
- [16] E. Klipp et al., *Systems Biology in Practice.*, Wiley-Blackwell, 1 ed., 2005.
- [17] D. Tenenbaum, tesis, *Modulación de Procesos de Señalización Celular mediante Regulación Espacial.*, FCEN, UBA 2016
- [18] Y. Kim et al., *Substrate-dependent control of MAPK phosphorylation in vivo.*, Molecular Systems Biology, 7:467, 2010
- [19] P. Liu et al., *Substrate-Dependent Control of ERK Phosphorylation Can Lead to Oscillations.*, Biophysical Journal, Volume 101, Issue 11:2572-81, 2011
- [20] L. Qiao et al., *Bistability and Oscillations in the Huang-Ferrell Model of MAPK Signaling.*, PLOS Computational Biology, 3(9):1819-26, 2007

- [21] J. Sepulchre et A. Ventura, *Intrinsic Feedbacks in MAPK Signaling Cascades Lead to Bistability and Oscillations.*, Acta Biotheoretica, Volume 61, Issue 1, pp 59–78, 2013
- [22] AC Ventura, JA Sepulchre, SD Merajver., *A hidden feedback in signaling cascades is revealed.*, PLoS Computational Biology, 4(3):e1000041, 2008.
- [23] AC Ventura et al., *Signaling properties of a covalent modification cycle are altered by a downstream target.*, Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 107:10032-10037, 2010.
- [24] C. Wiuf et E. Feliú, *Finding the positive feedback loops underlying multi-stationarity*, BMC Systems Biology, 9:22, 2015
- [25] E. Feliu y C. Wiuf, *Enzyme sharing as a cause of multistationarity in signaling systems.*, Journal of The Royal Society Interface 9(71):1224-32 2011
- [26] E. Feliu y C. Wiuf, *Chemical Oscillations, Multiple Equilibria, and Reaction Network Structure.*, Dynamics of Reactive Systems, Vol. 65, No. 5, pp. 1526-1546 1980
- [27] Feinberg, *Chemical reaction network structure and the stability of complex isothermal reactors-I. The deficiency zero and deficiency one theorems.*, Chemical Engineering Science, pages. 2229-2268, 1987
- [28] M. Feinberg Group., *Chemical Reaction Network Toolbox.*, Ver. 2.3. Columbus, Ohio., url:<https://crnt.osu.edu/CRNTWin>.
- [29] W. Govaerts y Yu.A. Kuznetsov, *Matcont*, MatCont. Ver. 6.1., url:<http://www.matcont.ugent.be/>
- [30] MathWorks.MATLAB. Ver. 2015a., url:<http://www.mathworks.com/products/matlab/>, 2015
- [31] R. L. Iman., *Appendix A : Latin Hypercube Sampling 1*, Encyclopedia of Statistical Sciences, Update Volume 3, pages. 408-411, 2001
- [32] M. Skatari, *Fold change detection in 3-node enzymatic networks*, Rutgers University, xi, 133 p. : ill, 2011
- [33] R. Shumway et D. Stoffer, *Time series analysis and its applications.*, Springer, Third Edition, 2011
- [34] <http://mathworld.wolfram.com/Wiener-KhinchinTheorem.html> visto el 16/02/17
- [35] F. Harris, *On the use of windows for harmonic analysis with the discrete Fourier transform.*, Proceedings of the IEEE, Volume: 66 Issue: 1, pp. 51 - 83, 2011
- [36] P. Cohen, *The structure and regulation of protein phosphatases*, Annu. Rev. Biochem., 58, p. 453-508., 1989
- [37] Kim et al., *Substrate-dependent control of MAPK phosphorylation in vivo*. Mol Syst Biol., 1;7:467, 2011
- [38] Shankaran et al., *Rapid and sustained nuclear-cytoplasmic ERK oscillations induced by epidermal growth factor.*, Mol Syst Biol., 5:332, 2009
- [39] T. Cover et J.A. Thomas, *Elements of Information Theory*, Wiley ed., 1991

## Apéndice A

# Tiempo característico del oscilador aperiódico.

El contenido de este apéndice es utilizado en el capítulo Métodos (sección 3.6), los resultados aquí presentados permiten refinar el método. Dentro de la literatura, se utilizan distintos métodos para la detección de oscilaciones, como en *Time series analysis and its applications*. [33], que tienen como principal función, la detección de una señal contaminada por ruido blanco. Este no es el caso aquí, por lo que estos métodos no son útiles.

### A.1. Memoria en el modelo central de la tesis.

Se tomaron dos parámetros para los cuales el sistema es aperiódico. Las oscilaciones se pueden clasificar fácilmente en dos de distinta amplitud. Esto se observa en la fig. A.1. Se indican las oscilaciones de mayor amplitud como un “1” y las de menor amplitud como un “0”. Se desea descubrir si el sistema tiene memoria, es decir, si el tipo de una oscilación influye en el tipo de la siguiente.

Los parámetros usados son de  $a_m = 5,0$ ,  $p_{15} = 0,00056$ ,  $a_v = 0,002$  y  $a_p = 0,5$ . Se tomaron dos valores para  $a_s$ , 0.745 y 0.7425.

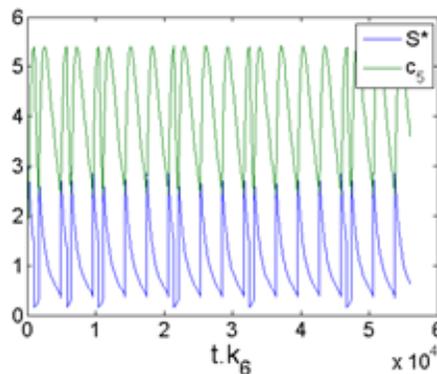


Figura A.1: Trayectorias aperiódicas. Los parámetros usados son  $a_m = 5,0$ ,  $p_{15} = 0,00056$ ,  $a_v = 0,002$  y  $a_p = 0,5$ . Se tomaron dos valores para  $a_s$ , 0.745 y 0.7425.

Para  $a_s = 0,745$ , la secuencia de pulsos es de la siguiente forma (durante alrededor de  $T = 10 \times 10^5$  (adimensional))

```
10000111100010111000110001000011100001000001010001000010  
10000011000011111100101100100001010010000000010011001001
```

00000111100011000000110001011100010001000000010000001100  
1011000011011001001000100110001000000000001111010

Se muestra en la tabla A.2a la cantidad de ocurrencias de cada oscilación y de cada par. De esta manera, hay un 35 % de unos y un 65 % de ceros. Se pueden calcular cuántas ocurrencias de cada par habría si el sistema no tuviera memoria, lo cual se muestra en la tabla A.2b. Esto se calcula por el producto de las probabilidades de una oscilación y de su siguiente.

1	76
0	140
10	45
11	31
00	95
01	44

(a)

1	76
0	140
10	49.0
11	26.6
00	90.3
01	49.0

(b)

Figura A.2: Cantidad de cuentas para cada oscilación y el par. A.2a Cantidad de cuentas medidas. A.2b Para la cantidad de pares se toma la aproximación de sin memoria.

Como se puede ver en la tabla, el sistema tiene una memoria, pero pequeña (se repite el tipo de oscilación más de lo que sucedería al azar). En efecto, se puede descartar con  $p = 0,046$  (p valor) que el proceso no tenga memoria. Sin embargo, la información mutua normalizada es de sólo un 0,7 %. La información mutua es  $\sum_{x,y} p(x,y) \log(\frac{p(x,y)}{p(x)p(y)})$  [39], donde x es el tipo de oscilación de un pulso, y el tipo del siguiente. Los factores que resultan entrar en el error relativo de la amplitud del espectro de Fourier de este proceso “ruidoso” son  $\epsilon = \frac{p(11)_{num}-p(11)_{teo}}{p(0)}$  y  $\epsilon' = \frac{p(00)_{num}-p(00)_{teo}}{p(1)}$  (ver sección A.4.4), que valen solamente un 9 % cada uno (no son distinguibles).

Lo mismo se puede encontrar para  $a_s = 0,7425$ . Hay un 20 % de unos y un 80 % de ceros. Se puede descartar con  $p = 0,081$  que el proceso no tenga memoria. Sin embargo, la información mutua normalizada es de 1,1 % y  $\epsilon \sim \epsilon' = 11\%$ . Ambos son valores muy pequeños, por lo cual se observa que si bien existe memoria entre los procesos, esta es pequeña. Es por esto que se toma la decisión de usar la aproximación de independencia entre eventos consecutivos.

## A.2. Espectro de Fourier de un pulso y de una señal periódica.

El espectro de Fourier del proceso entero se basa en el espectro de Fourier de un pulso. Un pulso, equivale a  $rect(\frac{x}{\tau})f(x)$ , donde  $rect(x)$  es la función rectangular. La transformada de Fourier de un pulso así es  $F(\nu) = \frac{1}{T} \int_{-\frac{\tau}{2}}^{\frac{\tau}{2}} f(x)e^{-2\pi x\nu} dx$ . Se toma  $\langle f(x) \rangle = 0$ , retirando la componente constante ( $\nu = 0$ ). T es el tiempo total del muestreo.

Para el caso particular  $f(x) = \cos(x)$ , la transformada de Fourier es  $\frac{\tau}{T} \frac{\text{sinc}(\pi(\nu-1)\tau) + \text{sinc}(\pi(\nu+1)\tau)}{2}$ , cuyo valor absoluto está acotado por  $0,517 \frac{\tau}{T}$  (calculado por una simulación de la función).

En general,  $\frac{\tau}{T} a(\nu) = |F(\nu)| \leq \frac{1}{T} \int_{-\frac{\tau}{2}}^{\frac{\tau}{2}} |f(x)| dx \leq \frac{\tau}{T} A$ . A representa la amplitud, es decir,  $\max(|f(x)|)$ , a  $\langle f(x) \rangle = 0$ .

En cambio, cuando la señal es periódica, el término principal de la serie de Fourier puede tener distintas relaciones con la amplitud de la serie. Sin embargo, existe una serie en la cual el término principal es un factor  $\frac{1}{\pi} < \frac{1}{3}$ , que es la serie de Fourier de una señal de sierra.

De esta manera, ante la necesidad de elegir un umbral para el espectro de Fourier, se eligió el valor de  $\frac{1}{4}A$ , con la intención de que el espectro de Fourier de toda serie periódica supere este umbral.

## A.3. Análisis de un modelo simplificado.

Se utilizó un modelo simplificado que consiste en un par de pulsos con forma sinusoidal, de períodos distintos, que se alternan estocásticamente y en forma independiente, con probabilidad  $\alpha$  y  $1 - \alpha$ , respecti-

vamente. El objetivo es calcular el espectro de Fourier de este proceso aperiódico, para comprender en qué forma sus componentes de frecuencia no nula tienden a 0, y así seleccionar un tiempo característico que permite diferenciar una señal aperiódica de las características mencionadas de una periódica.

Se cumple la ecuación  $F(f(x - a)) = e^{i2\pi a\nu} F(f(x))$  para cualquier valor arbitrario “a”. Por lo tanto, la transformada de Fourier del proceso mencionado es  $\sum_i e^{i2\pi t_i\nu} F(f_i(x))$ .  $t_i$  es el tiempo que tarda en comenzar el ciclo  $i$ , y  $f_i(x)$  es la forma que toma el ciclo  $i$ .

Si se considera la sucesión  $n_i$ , donde  $n_i = 0$  si el ciclo  $i$  toma el período  $\tau_0$  y  $n_i = 1$  si el ciclo toma el período  $\tau_1$ , entonces se tiene que el proceso entero tiene la transformada de Fourier  $(\sum_i e^{i2\pi t_i\nu} \delta_{n_i 0} F(f_0(x)))(\nu) + (\sum_i e^{i2\pi t_i\nu} \delta_{n_i 1} F(f_1(x)))(\nu)$ , donde aquí,  $f_0(x)$  se refiere a la forma que toma el ciclo de período  $\tau_0$ , y análogamente para  $f_1(x)$ .

Por lo tanto, se puede separar el espectro de Fourier debido a los ciclos de tipo 0, y el espectro de Fourier de los ciclos de tipo 1. Para entender el problema, una forma de pensarlo es considerar que el proceso recorre una trayectoria en el plano complejo (isomorfo a  $\mathbb{R}^2$ ). La trayectoria relevante tiene dos parámetros,  $\nu$ , y el tipo de trayectoria 0 o 1.

Se puede utilizar inducción para observar en qué influye cada nueva oscilación en la transformada de Fourier. De esta manera, cada sumando (para la trayectoria de tipo 0) es de  $F(f_0(x))(\nu) e^{i2\pi t_i\nu}$ . Esto significa que cada sumando rota una fase de  $2\pi t_i\nu$  con respecto al sumando anterior, y un avance de  $F(f_0(x))(\nu)$ .

Es decir, la trayectoria de tipo 0, en los ciclos de tipo 1, el sistema rota  $\tau_1\nu$ , mientras que en los ciclos de tipo 0, el sistema rota  $\tau_0\nu$  y avanza  $F(f_0(x))(\nu)$ . Análogamente sucede con la trayectoria de tipo 1.

El resultado es que existe una “resonancia”. Se lo llama resonancia, dado que es la situación donde el período de la oscilación coincide con la frecuencia de muestreo, y esto aumenta la amplitud de esta componente de Fourier. Por ejemplo, para  $\nu = \frac{1}{\tau_0}$  para el caso de la trayectoria de tipo 0. Pero sea en esta resonancia o fuera de ella, se podría tomar la aproximación de que los ángulos de rotación son azarosos, y por lo tanto, que el sistema recorrería un *random walk* de dos dimensiones. Esto no es correcto, con lo cual debe de ser tomado con cuidado.

Hay dos regímenes relevantes para modelar. Un régimen es el de resonancia, y el otro es el fondo. En la resonancia, la amplitud de la señal va a resultar ser mayor que para el fondo. Se analizará la trayectoria de tipo 0, para la trayectoria de tipo 1, el análisis es equivalente.

## A.4. Cálculo de la desviación estándar del espectro de Fourier.

### A.4.1. Régimen de fondo.

Para modelar este régimen, se considera que posterior a cada ciclo existe una rotación azarosa. En realidad, la rotación no es completamente azarosa, sin embargo, es una rotación muy compleja, por lo que se realiza esa aproximación, y se analiza con más detalles en la sección A.4.3. Por lo tanto, este sistema es un *random walk* en 2 dimensiones tradicional. Si  $z = \sum_{j=1}^N e^{i\theta_j}$ ,  $|z|^2 = N + \sum_{j \neq k} e^{i(\theta_j - \theta_k)}$ . El último término promedia 0, de tal manera que  $\langle |z|^2 \rangle = N$ .

La trayectoria total realizada es, sin embargo,  $|F(f(x))|(\nu) \sqrt{\langle |z|^2 \rangle} = a(\nu) \frac{\tau_0}{T} \sqrt{\langle |z|^2 \rangle}$ . A esto se lo va a llamar la amplitud media de la señal (es la desviación estándar con respecto al origen del ruido). Por lo que la amplitud media de la señal en el régimen de fondo es  $\frac{\tau_0 \sqrt{N}}{T}$ , donde N es la cantidad total de ciclos de tipo 0.

La cantidad total de ciclos se puede calcular como  $\frac{T}{\alpha\tau_0 + (1-\alpha)\tau_1}$ . La proporción de ciclos de tipo 0 es  $\alpha$ . Por lo tanto, la cantidad total de ciclos de tipo 0 es  $\frac{T\alpha}{\alpha\tau_0 + (1-\alpha)\tau_1}$ . Por lo tanto, la amplitud de la señal de fondo es  $a(\nu) \frac{\tau_0 \sqrt{N}}{T} = a(\nu) \sqrt{\frac{\tau_0}{T}} \sqrt{\frac{\alpha}{\alpha + (1-\alpha)\frac{\tau_1}{\tau_0}}}$ . Lo importante de esta amplitud es que disminuye como  $\sqrt{\frac{T}{\tau_0}}$ . Esto es consecuencia de que el sistema se comporta como un *random walk*. Por otro lado, el factor  $\sqrt{\frac{\alpha}{\alpha + (1-\alpha)\frac{\tau_1}{\tau_0}}}$  es un factor acotado entre 0 y 1.  $|a(\nu)| < A$ .

### A.4.2. Régimen de resonancia.

Este régimen es más relevante que el de fondo, ya que es el que es necesario distinguir del régimen oscilatorio

Para este caso, se considerará que cada uno de los pasos del *random walk* es una secuencia entera de ciclos de tipo 0. Así, existe una probabilidad  $1 - \alpha$  de que la secuencia tenga 1 ciclo,  $(1 - \alpha)\alpha$  de que la secuencia tenga 2 ciclos,  $(1 - \alpha)\alpha^2$  de que tenga 3 ciclos, y  $(1 - \alpha)\alpha^{n-1}$  de que tenga  $n$  ciclos. Si se llama el tamaño de cada paso  $R_j$ , este mide  $L$  si la secuencia consistió en 1 ciclo,  $2L$ , si consistió en 2 ciclos, etc), donde  $L$  es el paso que recorre en un ciclo  $F(f(x))(\frac{1}{\tau_0})$ .

De esta manera, la trayectoria total,  $z$ , va a ser  $z = \sum_{j=1}^N A_j e^{i\theta_j}$ , de tal manera que  $|z|^2 = \sum_{j=1}^N A_j^2 + \sum_{j \neq k} A_j A_k e^{i(\theta_j - \theta_k)}$ . Este último término promedia 0 (bajo la aproximación de ángulos azarosos), por lo que  $|z|^2 = \sum_{j=1}^N A_j^2$ .

Por otro lado,  $\sum_{j=1}^N A_j^2 = N \langle A_j^2 \rangle$ . En este caso,  $N$  es la cantidad de secuencias de ciclos consecutivos.  $\langle A_j^2 \rangle = L^2 \sum_{n=1}^{\infty} n^2 p(n) = L^2 \sum_{n=1}^{\infty} n^2 (1 - \alpha) \alpha^{n-1} = L^2 \frac{\alpha+1}{(1-\alpha)^2}$ .

Por otro lado, la cantidad esperada de ciclos por secuencia es la cantidad de ciclos de tipo 0 seguidos, sumada a la cantidad de ciclos de tipo 1 seguidos. La cantidad de ciclos de tipo 0 seguidos es  $(1 - \alpha) \sum_{n=1}^{\infty} n \alpha^{n-1} = \frac{1}{1-\alpha}$ . Análogamente, la cantidad de ciclos de tipo 1 seguidos es  $\frac{1}{\alpha}$ . Por lo tanto, la cantidad de ciclos esperada por secuencia es  $\frac{1}{\alpha} + \frac{1}{1-\alpha} = \frac{1}{\alpha(1-\alpha)}$ . Por esto,  $N$  es aproximadamente la cantidad de ciclos multiplicado por  $\alpha(1 - \alpha)$ . De la subsección anterior, se toma la cantidad de ciclos  $\frac{T}{\alpha\tau_0 + (1-\alpha)\tau_1}$ . Por lo tanto,  $N$  vale  $\frac{T\alpha(1-\alpha)}{\alpha\tau_0 + (1-\alpha)\tau_1}$ .

Colocando los dos factores juntos,  $\langle |z|^2 \rangle = L^2 \frac{\alpha+1}{(1-\alpha)^2} \frac{T\alpha(1-\alpha)}{\alpha\tau_0 + (1-\alpha)\tau_1} = \frac{\tau_0^2}{T^2} a(\frac{1}{\tau_0})^2 \frac{\alpha+1}{(1-\alpha)^2} \frac{T\alpha(1-\alpha)}{\alpha\tau_0 + (1-\alpha)\tau_1} = \frac{\tau_0}{T} a(\frac{1}{\tau_0})^2 \frac{(\alpha+1)}{(1-\alpha)} \frac{\alpha}{\alpha + (1-\alpha)\frac{\tau_1}{\tau_0}}$

Por lo tanto, la amplitud media de la señal en el régimen de resonancia es de  $a(\frac{1}{\tau_0}) \sqrt{\frac{\tau_0}{T}} \sqrt{\frac{\alpha}{\alpha + (1-\alpha)\frac{\tau_1}{\tau_0}}} \sqrt{\frac{\alpha+1}{1-\alpha}}$ .  $\sqrt{\frac{\alpha+1}{1-\alpha}}$  es el factor de ganancia.

El factor de ganancia diverge con  $\alpha \rightarrow 1$ . Esto tiene sentido, porque cuando  $\alpha$  se acerca a 1, el sistema tiende a tener sólo ciclos de tipo 0. De esta manera, en este límite el sistema se parece a un sistema oscilatorio.

Este modelo no es exacto, debido a que el hecho que los ángulos no son azarosos.

### A.4.3. Puesta a prueba del modelo.

Este modelo tiene tres parámetros:  $0 < \frac{\tau_0}{T} < 1$ ,  $0 < \alpha < 1$ ,  $0 < \frac{\tau_1}{\tau_0}$ .

Para poner a prueba el modelo, se fijó  $\frac{\tau_0}{T} = \frac{1}{2000}$ ,  $\alpha = 0,5$  y se varió  $\frac{\tau_1}{\tau_0}$ . Luego, se fijó  $\frac{\tau_0}{T} = \frac{1}{2000}$ ,  $\frac{\tau_0}{\tau_1} = 1,32$  y se varió  $\alpha$ . Por último, se dejó fijo  $\alpha = 0,5$  y  $\frac{\tau_0}{\tau_1} = 1,32$ , y se varió  $\frac{\tau_0}{T}$ .

El cálculo de la amplitud se realizó en el régimen de resonancia, y se anuló la componente de los ciclos de tipo 1. Se realizó una muestra de 100 puntos, de cuya componente de Fourier en la frecuencia  $\frac{1}{\tau_0}$  -en módulo- se tomó la media cuadrática.

En la fig. A.3 se muestra la comparación del cálculo teórico de la amplitud de la señal, al cálculo numérico. Para  $\tau_0 = \tau_1$  el resultado de la componente numérica es 0 (debería dar 1) porque se cometió el error de tomar la componente 500 en lugar de la 501 (es un pequeño error que no afecta el resto).

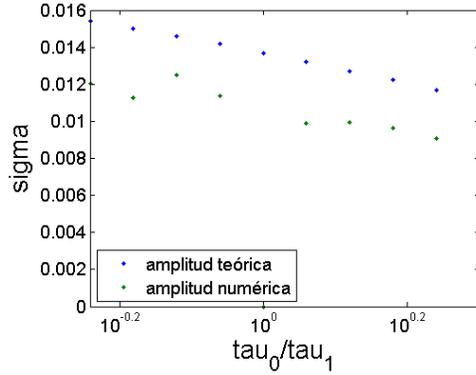


Figura A.3: Amplitud de la señal teórica en comparación a la numérica.

Como se puede ver en el gráfico, la predicción realizada coincide en el orden de magnitud, pero no en su valor numérico. Sin embargo, la proporción errada es constante, lo cual se puede ver en la fig. A.4 -exceptuando para los casos resonantes  $\tau_0 = \tau_1$  y  $2\tau_0 = \tau_1$ -.

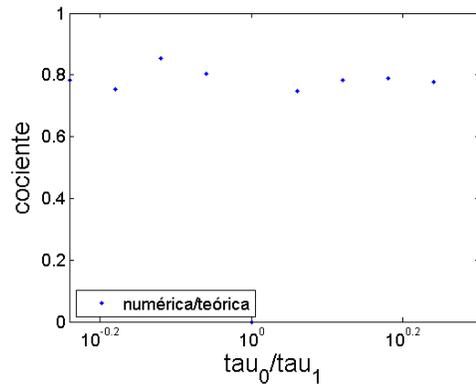


Figura A.4: Cociente entre la amplitud numérica y la teórica.

Este cociente promedia 0.79. Y esto es similar a  $\sqrt{\frac{1}{\alpha+1}} = \sqrt{\frac{2}{3}} = 0,82$ . Esto implicaría una amplitud de  $a(\frac{1}{\tau_0})\sqrt{\frac{\tau_0}{T}}\sqrt{\frac{\alpha}{\alpha+(1-\alpha)\frac{\tau_1}{\tau_0}}}\sqrt{\frac{1}{1-\alpha}}$ . La causa que se conjetura es que este factor se debe al hecho de que los ángulos no son azarosos. La puse a prueba numéricamente al variar  $\alpha$ , como se muestra en la fig. A.5. Como se puede ver, los valores coinciden. En particular, el promedio del cociente entre el valor teórico y el numérico resulta ser  $(1,025 \pm 0,021)$ , compatible con el valor 1.

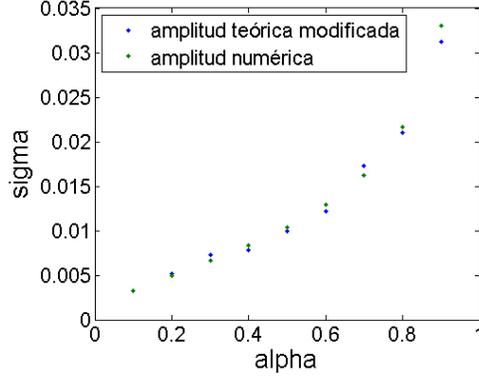


Figura A.5: Comparación entre la amplitud teórica *modificada* y la amplitud numérica, al variar el parámetro  $\alpha$ . La coincidencia es notable.

Por último, con este valor modificado de la amplitud teórica, se realizó la comparación variando  $\frac{\tau_0}{T}$ . Este resultado se muestra en la fig. A.6. Esta relación  $amplitud\alpha\sqrt{\frac{\tau_0}{T}}$  es la relevante para mostrar que el sistema funciona como un *random walk*.

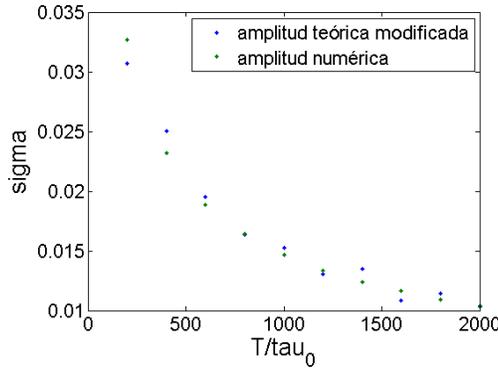


Figura A.6: Comparación entre la amplitud teórica *modificada* y la amplitud numérica, al variar  $\frac{T}{\tau_0}$ .

A partir de aquí, se tomará el valor modificado como valor de la desviación estándar del espectro de Fourier en resonancia.

#### A.4.4. Perturbación del modelo ideal.

Si se tiene en cuenta que hay un pequeño proceso de memoria, se puede calcular en cuánto afecta a la amplitud de la señal a primer orden. Así, se coloca  $\alpha \rightarrow \alpha + \epsilon(1 - \alpha)$  cuando proviene de un ciclo de tipo 0, y  $1 - \alpha \rightarrow 1 - \alpha + \epsilon'\alpha$ .

Así, la proporción de ciclos de tipo 0 y de tipo 1 no cambia. Sí cambia la cantidad de ciclos por secuencia (aumenta). Así, la cantidad de ciclos de tipo 0 seguidos pasa a ser  $\frac{1}{1 - \alpha - \epsilon(1 - \alpha)} = \frac{1}{(1 - \epsilon)(1 - \alpha)}$ , y la cantidad de ciclos de tipo 1 seguidos pasa a ser  $\frac{1}{(1 - \epsilon')\alpha}$ . Así, a primer orden, la cantidad de ciclos por secuencia es  $\frac{1 + \epsilon}{1 - \alpha} + \frac{1 + \epsilon'}{\alpha} = \frac{1 + \epsilon' + (\epsilon - \epsilon')\alpha}{\alpha(1 - \alpha)} \sim \frac{1 + \epsilon}{\alpha(1 - \alpha)}$ . En el último término, se realizó la aproximación  $\epsilon \sim \epsilon'$  (lo cual se daba para los dos valores de los parámetros calculados).

Por otro lado,  $\langle A_j^2 \rangle$  cambia de similar manera a  $L^2 \frac{\alpha + 1 + \epsilon(1 - \alpha)}{(1 - \alpha)^2(1 - \epsilon)^2} \sim L^2 \frac{\alpha + 1}{(1 - \alpha)^2} (1 + 2\epsilon + \epsilon \frac{1 - \alpha}{1 + \alpha})$ .

Colocando todos los factores juntos,  $\langle |z|^2 \rangle \sim \frac{\tau_0}{T} a(\nu)^2 \frac{(\alpha + 1)}{(1 - \alpha)} \frac{\alpha}{\alpha + (1 - \alpha) \frac{\tau_1}{\tau_0}} (1 + \epsilon + \epsilon \frac{1 - \alpha}{1 + \alpha}) = |z|_0^2 (1 + \epsilon \frac{2}{1 + \alpha})$ .

Por lo tanto, la amplitud de la señal aumenta en un factor  $1 + \epsilon \frac{1}{1 + \alpha}$  a primer orden.  $0,5 < \frac{1}{1 + \alpha} < 1$ , por lo que un  $\epsilon \sim 10\%$  implica una perturbación de un entre 5% y 10%. Y para  $\alpha \sim 1$ , la perturbación es de

un 5 %

#### A.4.5. Composición de la amplitud debido a los dos tipos de ciclos.

La suma de dos variables de distribución gaussiana tiene distribución gaussiana. Además,  $\sigma(x + y) = \sqrt{\sigma(x)^2 + \sigma(y)^2}$

Luego se acota  $|a(\nu)| < A$ , se tiene en cuenta que si el espectro de los ciclos de tipo 0 está en resonancia, el otro no, y viceversa, y se simetriza el período.

El resultado es que la amplitud total es:

$$\text{Amplitud} \sim \sqrt{\frac{\alpha\tau_0 + (1-\alpha)\tau_1}{T}} \sqrt{\frac{A_0^2\tau_0^2 \frac{\alpha}{1-\alpha} + A_1^2\tau_1^2(1-\alpha)}{(\alpha\tau_0 + (1-\alpha)\tau_1)^2}} \text{ para la resonancia de tipo 0.}$$

Y

$$\text{Amplitud} \sim \sqrt{\frac{\alpha\tau_0 + (1-\alpha)\tau_1}{T}} \sqrt{\frac{A_0^2\tau_0^2\alpha + A_1^2\tau_1^2 \frac{(1-\alpha)}{\alpha}}{(\alpha\tau_0 + (1-\alpha)\tau_1)^2}} \text{ para la resonancia de tipo 1.}$$

En general, se escribirá  $\text{Amplitud} \sim \sqrt{\frac{\tilde{\tau}}{T}} \tilde{\sigma}$ , donde  $\tilde{\tau} = \alpha\tau_0 + (1-\alpha)\tau_1$ . Es difícil dar un orden de magnitud.

Pero, por ejemplo, cuando  $\alpha \sim 1$ , en el primer caso,  $\tilde{\sigma} \sim A_0 \sqrt{\frac{1}{1-\alpha}}$

El  $\tilde{\sigma}$  se lo puede modificar teniendo en cuenta la memoria.

### A.5. Implicancia en la selección del método.

Debido a que el sistema se comporta como un *random walk* en dos dimensiones con simetría de rotación, es esperable que la distribución sea gaussiana simétrica en dos dimensiones ( $e^{-\left(\frac{x^2}{2\sigma_x^2} + \frac{y^2}{2\sigma_y^2}\right)} = e^{-\frac{r^2}{\sigma^2}}$ ). Se llama  $R$  al umbral que se toma para definir si un sistema es oscilatorio o no. Como se mencionó previamente A.2, se toma  $R = \frac{A}{4}$ . Si se calcula la probabilidad de  $r < R$  esta es gaussiana  $N \int_0^R r e^{-\frac{r^2}{\sigma^2}} dr = 1 - e^{-\frac{R^2}{\sigma^2}}$ . Por lo tanto, la probabilidad de  $r > R$  es  $e^{-\frac{R^2}{\sigma^2}}$ .

Si se toma un umbral fijo  $R$  (tiene las mismas unidades que  $A$ , pero no se dimensionaliza por si  $A_0 \neq A_1$ ),  $p(r > R) = e^{-\frac{R^2}{\sigma^2} \frac{T}{\tilde{\tau}}}$ . Hay que tener en cuenta que, debido a la memoria, más precisamente resulta:  $p(r > R) = e^{-\frac{R^2}{\sigma^2} \frac{T}{\tilde{\tau}}}$ . Se puede ver que el efecto de memoria aumenta el tiempo característico entre un 10 % y un 20 % (a primer orden). Se realiza la aproximación de 10 % teniendo en cuenta  $\alpha \sim 1$ .

Esa es la probabilidad de que 1 pico supere el umbral, haciendo parecer que el sistema es oscilatorio. Pero no es la probabilidad de que *algún* pico supere el umbral.

Para corroborar que esta es la distribución correcta, se calcula  $p(R > \sigma) = e^{-1} = 36,7$ . La simulación se realiza en el régimen de resonancia, y se obtiene que la proporción de eventos que superan ese umbral es de 378 de 1000, lo cual es un valor muy cercano.

La densidad del espectro de Fourier crece como  $T$ . Se puede aproximar la cantidad de valores del espectro de Fourier por  $\frac{T}{\tilde{\tau}}$  (lo cual supone buscar un pico en un rango del armónico fundamental). Es una aproximación que sobreestima el valor real, ya que el pico de frecuencias se afina al acercarse  $\alpha$  a 0 o a 1. Pero no depende de  $T$ .

Por lo tanto,  $p(\exists i/r_i > R) \sim \frac{T}{\tilde{\tau}} e^{-\frac{R^2}{\sigma^2} \frac{T}{\tilde{\tau}}}$ . Este es el valor  $p$  de Fisher. La función inversa en la función  $W$  de Lambert  $\frac{T}{\tilde{\tau}} - \frac{\sigma^2}{R^2} W_{-1}\left(-\frac{R^2}{\sigma^2} p\right)$ .

Este es el resultado fundamental. Si se selecciona un valor  $p$  y una proporción de ciclos de tipo 0 o de tipo 1, más allá de los cuales se considera que el sistema es oscilatorio, aquella es la ecuación que permite calcular el tiempo necesario para correr la simulación, que permite distinguir el régimen aperiódico del oscilatorio.

Esto sugiere un método para distinguir el régimen. Calcular el espectro de Fourier para un tiempo de unos pocos períodos permite diferenciar el sistema estacionario del aperiódico+oscilatorio. El cálculo realizado permite diferenciar entre los dos últimos.

## A.6. Selección del tiempo característico.

Se observa que para el valor elegido de  $p_{15}$ , el período es de  $\frac{400}{a_v}$  (en el régimen oscilatorio). Se decidió tomar a la probabilidad que se tomó como límite de 0.1, el límite que se elige para  $\alpha$  es de 0.9. Para estos valores,  $N = 1380$ , es decir,  $T = \frac{6 \times 10^5}{a_v}$ . Este es el valor que se toma. Para separar el régimen oscilatorio del estacionario, se elige la veinteava parte de este valor, ya que es mucho menor al tiempo característico que regula la amplitud del régimen aperiódico.

Este tipo de oscilaciones aperiódicas es sólo un tipo de oscilaciones irregulares que se encontraron en el sistema. Sin embargo, la generación de un tiempo característico en este caso da un punto de apoyo para la estimación del tiempo necesario.