

Tesis Doctoral

# Flujo de información en redes biomoleculares

Altszyler Lemcovich, Edgar Jaim

2015-03-16

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

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

Cita tipo APA:

Altszyler Lemcovich, Edgar Jaim. (2015-03-16). Flujo de información en redes biomoleculares. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Altszyler Lemcovich, Edgar Jaim. "Flujo de información en redes biomoleculares". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2015-03-16.



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Física

***Flujo de información en redes biomoleculares***

Tesis presentada para optar por el título de  
Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Ciencias Físicas

***Lic. Edgar Jaim Alsztyler Lemcovich***

Directores de Tesis: Dr. Ariel Chernomoretz y Dr. Alejandro Colman-Lerner  
Consejera de Estudios: Dra. Cristina Caputo

Lugar de Trabajo: Departamento de Física e IFIBYNE, UBA

Buenos Aires, 2015

Fecha de defensa: 16 de marzo de 2015



A Car y a mi familia



## Resumen

La célula cuenta con una red compleja de componentes biomoleculares capaz de detectar señales externas e internas y elaborar respuestas apropiadas que ayuden a responder frente a las dificultades que presenta el entorno. Estas respuestas implican tomar decisiones de destino celular, como la introducción o no a un programa de diferenciación, proliferación, arresto o apoptosis. La descripción de estos procesos desde una perspectiva modular propone la identificación de distintos módulos funcionales, de cuya interacción emergen las distintas propiedades de los sistemas de toma de decisión. Como objetivo general de esta tesis estudiamos, desde un enfoque de biología de sistemas, los mecanismos biomoleculares involucrados en la toma de decisión a nivel celular.

En primer lugar nos centramos en el estudio de módulos *ultrasensibles*, que cumplen un rol fundamental en varios contextos celulares. Estos módulos se caracterizan por presentar una curva dosis-respuesta sigmoidal, y proporcionan alinealidades que resultan necesarias para producir mecanismos más complejos tales como adaptación, biestabilidad, y oscilaciones. En este trabajo, estudiamos los factores que modulan el desempeño de un motivo ultrasensible (es decir, su ultrasensibilidad), al ser embebido dentro de una cascada de señalización. Primero, utilizamos una configuración sencilla para analizar en qué medida las limitaciones en los rangos barridos por los componentes río arriba y río abajo afectan a la ultrasensibilidad efectiva que distintos mecanismos ultrasensibles aportan al sistema. De esta manera, encontramos que las limitaciones en el rango de entrada disminuyen la ultrasensibilidad del sistema, mientras que las limitaciones en el rango de salida pueden producir tanto un aumento como una disminución de la ultrasensibilidad. En este caso, identificamos que el comportamiento está determinado por las asimetrías de la curva dosis-respuesta del módulo ultrasensible, y observamos que varios de los motivos ultrasensibles más estudiados pueden producir ultrasensibilidades efectivas mucho mayores cuando el componente río abajo limita su rango de lectura.

Por otra parte, hallamos una expresión analítica del aporte neto que realiza cada módulo en la construcción de la ultrasensibilidad de una cascada de señalización. Esto permite identificar los efectos del secuestro de componentes compartidos y del reposicionamiento de los rangos dinámicos sobre la ultrasensibilidad de la cascada. Luego, aplicamos la metodología desarrollada para estudiar 2 modelos de cascadas de MAP kinasas de interés biológico. Este estudio aporta herramientas relevantes tanto para entender el comportamiento de una unidad de procesamiento modular ultrasensible inmersa en su contexto fisiológico, como para el diseño de módulos funcionales en un contexto de biología sintética.

Finalmente estudiamos los mecanismos biomoleculares involucrados en la vía de respuesta a feromona del organismo modelo *Saccharomyces cerevisiae*. En este caso estudiamos el proceso de toma de decisión celular respecto a aparearse o no cuando la célula es estimulada con feromona. En particular nos centramos en el estudio de las bases moleculares que sustentan las respuestas celulares del tipo *switching*. En este contexto, analizamos matemáticamente el modelo biológico propuesto por biólogos de nuestro laboratorio. Testeamos si el modelo era capaz de reproducir los experimentos existentes y luego extrajimos del modelo nuevas hipótesis a ser contrastadas experimentalmente. La posterior falsificación del modelo dio lugar a la formulación de uno nuevo en el cual nos encontramos trabajando actualmente.

**Palabras clave: Biología de sistemas – Transducción de Señales – Modelado Matemático – Ultrasensibilidad - Vía de Respuesta a Feromona**

## Information Flow in Biomolecular Networks

### Abstract

The cell has a complex network of biomolecular components capable of detecting external and internal signals and develop appropriate responses that help them respond to the challenges presented by the environment. These responses involve cell fate decisions such as whether to initiate a program of differentiation, proliferation, arrest or apoptosis. The description of these processes from a modular perspective proposes the identification of different functional modules, from whose interactions emerge the different properties of decision making systems. The general objective of this thesis was to study, from a systems biology approach, the biomolecular mechanisms involved in decision making at the cellular level.

First, we focused on the study of *ultrasensitive* modules, which play a fundamental role in various cellular contexts. These modules are characterized by a sigmoidal dose-response curve, and provide the non-linearities that are necessary to produce more complex mechanisms such as adaptation, bistability and oscillations. In this work, we studied the factors that modulate the performance of an ultrasensitive motif (i.e. their *ultrasensitivity*), when it is embedded within a signaling cascade. To do that, we first used a simple configuration to analyze to what extent limitations in the range spanned by upstream and downstream components affects the effective ultrasensitivity that different mechanisms contribute to the system. With this analysis we found that limitations in the system's input range decrease ultrasensitivity, while limitations in the output range can cause both an increase and a decrease in ultrasensitivity. In this case, we identified that the behavior is determined by the asymmetry of the dose-response curve of the ultrasensitive module, and we observed that several of the most studied ultrasensitive motifs can produce effective ultrasensibilidades much greater when the downstream component limits its readout range.

Moreover, we found an analytical expression of the effective contribution made by each module in the construction of the ultrasensitivity of a signaling cascade. This allowed us to identify the effects of sequestration of shared components and repositioning of the dynamic ranges on the cascades ultrasensitivity. We applied the developed methodology to study two models of MAP kinase cascades of biological interest. This study provides important tools for both understanding the behavior of an ultrasensitive modular processing unit immersed in their physiological context, and for the design of functional modules in the context of synthetic biology.

Finally we studied the biomolecular mechanisms involved in the pheromone response pathway of the model organism *Saccharomyces cerevisiae*. In this case we studied the cell decision making process by which cells mate or not when stimulated with pheromone. In particular, we focused on the study of the molecular basis underlying the *switching* cellular response. In this context, we analyzed mathematically the biological model proposed by biologists of our laboratory. We tested whether the model was able to reproduce the existing experiments and then we extracted from the model new hypotheses to be tested experimentally. The subsequent falsification of the model led to the formulation of a new one in which we are currently working.

**Keywords: Systems Biology – Signal Transduction – Mathematical Modelling – Ultrasensitivity – Pheromone Response Pathway**

## Índice general

<b>1</b>	<b>Introducción.....</b>	<b>10</b>
1.1	Las células.....	10
1.2	Biología de sistemas .....	10
1.3	Decisiones de destino celular .....	12
1.4	Estudio de procesos de decisión de destino celular con un enfoque de biología de sistemas .....	12
1.5	Sobre esta tesis.....	13
1.6	Bibliografía .....	14
<b>2</b>	<b>Modelado Matemático de procesos biológicos.....</b>	<b>15</b>
2.1.1	Ley de acción de masas.....	15
2.1.2	Reacciones enzimáticas .....	16
2.2	Ciclos covalentes: Fosforilación - Desfosforilación .....	18
2.3	Sobre curvas de respuesta sigmoideal .....	22
2.4	Cascadas de señalización .....	24
2.5	Bibliografía .....	26
<b>3</b>	<b>Efectos de la restricción de los rangos dinámicos sobre la ultrasensibilidad de un módulo. ....</b>	<b>29</b>
3.1	Resumen.....	29
3.2	Ultrasensibilidad en curvas asimétricas .....	29
3.3	Restricción de los rangos dinámicos.....	32
3.3.1	Regímenes de restricción en un módulo de Hill .....	35
3.4	Efectos de la restricción de los rangos dinámicos sobre la ultrasensibilidad en módulos del tipo Hill	38
3.5	Análisis de los regímenes de alta restricción .....	41
3.5.1	Estudio en un módulo de Hill.....	41
3.5.2	Estudio del caso general .....	43
3.6	Análisis de módulos ultrasensibles de relevancia biológica .....	44
3.6.1	Módulos del tipo Goldbeter-Koshland.....	44
3.6.2	Módulos de activación de pasos múltiples .....	46
3.6.3	Módulo de inhibición estequiométrica o titulación.....	48
3.7	Cascada de dos ciclos covalentes.....	51

3.8	Conclusiones.....	54
3.9	Referencias.....	56
<b>4</b>	<b>La ultrasensibilidad en cascadas de señalización, hacia una descripción matemática general .58</b>	
4.1	Resumen.....	58
4.2	Relacionando la estimación local y global de la ultrasensibilidad.....	59
4.3	Ultrasensibilidad en la composición de funciones.....	61
4.4	El efecto del <i>Rango de Hill</i> en sistemas de múltiples capas.....	63
4.4.1	Ejemplificación: dos funciones de Hill acopladas.....	63
4.4.2	Ejemplificación: dos funciones de GK acopladas.....	66
4.5	Análisis de 3 pasos de la ultrasensibilidad en cascadas de señalización.....	68
4.6	Ultrasensibilidad en el modelo de Huang-Ferrell.....	69
4.7	Ultrasensibilidad en el modelo de O'Shaughnessy.....	72
4.7.1	Análisis de un modelo auxiliar (a): Reconsiderando la generación de ultrasensibilidad “de-novo”. 75	
4.7.2	Análisis de un modelo auxiliar (b): La relevancia en los detalles.....	77
4.8	Conclusiones.....	80
4.9	Referencias.....	81
4.10	Apéndice.....	82
<b>5</b>	<b>Iteración modelado-experimentación en biología de sistemas: Estudio de procesos de decisión de destino celular en la vía de respuesta a feromona en levadura de cerveza <i>S. cerevisiae</i> ..... 84</b>	
5.1	Resumen.....	84
5.2	Introducción.....	85
5.2.1	La Vía de Respuesta a Feromona.....	85
5.2.2	El ciclo celular.....	87
5.2.3	Interacción de la vía de respuesta a feromona con el ciclo celular.....	88
5.3	Observaciones experimentales, motivaciones del proyecto.....	89
5.4	Descripción cuantitativa de la interacción entre la vía de respuesta a feromona y el ciclo celular 91	
5.4.1	Sistemas de ecuaciones.....	92
5.4.2	Aproximación cuasi-estacionaria: separación de escalas temporales.....	94
5.5	Caracterización de la dinámica del sistema.....	97
5.5.1	Origen de la variabilidad fenotípica en pares madre-hija.....	98
5.5.2	Origen del “switching”.....	99

5.5.3	Dependencia del fenotipo con la concentración de feromona, bifurcación del tipo “Saddle”.	101
5.6	Mutantes Ste5-8A y Far1-S87A.....	103
5.7	Otros modelos .....	105
5.8	Conclusiones, resultados experimentales y nuevo modelo .....	107
5.9	Referencias.....	108
5.10	Apéndice: parámetros .....	109
<b>6</b>	<b>Agradecimientos.....</b>	<b>110</b>

# 1 INTRODUCCIÓN.

## 1.1 Las células

La célula puede ser pensada como un dispositivo que utiliza componentes moleculares específicos con el fin de detectar señales externas e internas y elaborar respuestas apropiadas que ayuden a hacer frente a las complejidades que presenta el entorno. Dentro de las células, hay una gran variedad y cantidad de proteínas, que son las moléculas que llevan a cabo las principales tareas celulares. Por ejemplo, la levadura de cerveza (*S. cerevisiae*) tiene del orden de  $10^9$  proteínas y es capaz de producir más de 6000 tipos distintos de estas [Alon 2006] frente a distintos estímulos (como daño celular, presencia de azúcar o shock osmótico) para generar la respuesta adecuada. El soporte molecular de todos estos procesos lo conforma una intrincada red de interacciones moleculares que puede ser pensada en términos de *vías de señalización*, *redes de regulación génica* y/o *redes de interacción proteína-proteína*.

En su versión más simple, una *vía de señalización* está conformada por procesos de detección, procesamiento, y respuesta frente a un estímulo dado.

- 1) *Detección de la señal*: Un primer tipo de red de reacciones bioquímicas es la encargada de transducir alguna señal externa -por ejemplo la presencia de feromona, la concentración de osmolito externo, etc- en una señal interna. Este proceso, por ejemplo, puede ser llevado a cabo por una proteína transmembrana que frente a la interacción con ligandos extracelulares (señal externa) produce un cambio conformacional que dispara algún tipo de regulación intracelular.
- 2) *Procesamiento*: La información ingresada se procesa integrándose con otras señales, internas y/o externas, para finalmente producir cambio en los niveles de activación de alguna proteína que será entonces la encargada de llevar la información transferida desde el exterior de la célula, al interior del núcleo celular.
- 3) *Respuesta*: Luego de ser activada, esta proteína, también llamada factor de transcripción, orquesta la síntesis (producción) de nuevas proteínas que permitan a la célula responder al estímulo externo.

## 1.2 Biología de sistemas

Las redes de interacciones biomoleculares que sustentan las vías de señalización pueden considerarse como sistemas complejos, en las que sus características no pueden ser conocidas únicamente a través del estudio de sus componentes individuales, como proteínas y genes. Esto se debe a que la gran cantidad y no linealidad de las interconexiones entre las especies involucradas dan lugar a propiedades y funcionalidades emergentes. En este contexto, gran parte del avance en el estudio de estos sistemas, junto con el desarrollo de nuevas áreas como la biología sintética, fue concebido bajo una perspectiva a nivel de *sistemas* en el que los mecanismos de censado,

detección, transducción y procesamiento de la información se analizan en términos de *módulos* que interactúan.

La descripción modular de redes bioquímicas moleculares se basa en la hipótesis de que las propiedades a nivel sistémico, de hecho, pueden ser derivadas del análisis de las interacciones entre subconjuntos de especies moleculares, es decir, *módulos funcionales* [Hartwell et al 2000, Kholodenko et al 2002, Sneppen et al 2010]. El estudio de sistemas biológicos desde un acercamiento *sistémico* se complementa al reduccionista, que se enfoca en la identificación de los elementos e interacciones que componen una cierta funcionalidad sin proponerse estudiar los mecanismos por los que estas funcionalidades emergen. Desde un acercamiento de biología de sistemas, Hartwell et al. definen módulo funcional como *una entidad discreta cuya función es separable de la de otros módulos*. Desde este punto de vista, la determinación de un módulo viene dada por un proceso de abstracción en el que se identifica un subconjunto de especies o agentes con una cierta funcionalidad. Esta noción está muy emparentada con el concepto ingenieril del *diseño modular*, en el que un cierto sistema se constituye a partir del acoplamiento de diversos módulos funcionales. Un clásico ejemplo de sistema modular es un automóvil, donde se pueden identificar distintas particiones con funciones autónomas, como pueden ser: el volante, el chasis, las ruedas, el motor, etc. En este ejemplo, el motor en un automóvil es una abstracción de un gran número de piezas mecánicas que lo componen. De esta manera, resulta evidente la necesidad de un estudio con orientación sistémica para entender el rol que cumple cada uno de los componentes del auto. Por ejemplo, resulta mucho más fácil interpretar el rol que cumple el motor dentro del auto, que el conjunto individual de piezas mecánicas que lo conforman.

Resulta interesante notar que el concepto de modularidad en la biología existe a distintas escalas. Puede identificarse como módulo a una cierta proteína, que está compuesta por varios átomos, a un conjunto de proteínas que llevan a cabo una cierta función, o a un conjunto de células dentro de un organismo pluricelular. En esta tesis, denotaremos *módulo* al conjunto de proteínas que tienen una determinada función en el sistema de reacciones biomoleculares que las embebe. En particular, se ha encontrado que ciertos módulos mínimos se encuentran sobrerrepresentados en las redes de interacción bioquímica, estos módulos fueron llamados *motivos* funcionales mínimos [Milo *et al* 2002 Tyson et al 2003, Benner y Sismour 2005, Alon 2006]. Cada *motivo* se caracteriza por tener una cierta funcionalidad mínima (como: oscilaciones, biestabilidades, homeostasis, etc), que a su vez puede acoplarse con otros motivos para generar funciones más complejas.

Es necesario tener en cuenta que si bien la modularidad es una abstracción útil para el entendimiento de un sistema complejo, tiene sus limitaciones a la hora de estudiar sistemas muy interconectados. En este sentido, no es inusual que un cierto *motivo* aislado tenga una dinámica distinta que la que tiene cuando está embebido en el sistema [Del Vecchio 2008].

### 1.3 Decisiones de destino celular

Las células detectan señales extracelulares y responden mediante la regulación de la actividad de los circuitos compuestos por genes interactuantes, proteínas y otras macromoléculas. Lo hacen, por ejemplo, por modificación directa de proteínas blanco, que a menudo conducen a la alteración de la expresión de genes. A veces, la respuesta implica cambios cualitativos en el comportamiento de la célula, tales como entrar o no a un programa de diferenciación, proliferación, arresto o apoptosis. A este tipo de cambios es a lo que llamaremos “toma de decisión”. Desde una visión puramente determinista, se esperaría que un estímulo inicial dado genere una única respuesta, la cual estaría completamente determinada por el estado de la célula en el momento de la estimulación. Sin embargo, se ha observado ampliamente que los sistemas biológicos están ineludiblemente sujetos a fluctuaciones aleatorias en la abundancia de proteínas reguladoras y/o en las tasas de las reacciones que involucran especies presentes en pequeñas cantidades (comúnmente conocidos como ruido). Estos factores hacen, por ejemplo, que frente a un mismo estímulo las distintas células de una colonia puedan tener respuestas diferentes.

### 1.4 Estudio de procesos de decisión de destino celular con un enfoque de biología de sistemas

Las respuestas a las señales extracelulares se integran dinámicamente con el estado interno de la célula para finalmente conducir al sistema a un estado y no a otro. Esta integración esta llevada a cabo por redes de interacciones moleculares complejas, donde la complejidad de la red suele estar dada no sólo por el número de especies involucradas sino por la cantidad y variedad de las interconexiones. Como veremos en el capítulo 2, se pueden describir las distintas especies y sus interacciones a través de un conjunto de ecuaciones diferenciales acopladas. El modelado matemático, entre otras cosas, nos permite simular el conjunto de interacciones existentes en la red biológica, y así caracterizar el destino celular que tendrá el sistema biológico para un conjunto de parámetros y una red de interacciones dada. En particular, el modelado con ODEs nos permite utilizar las herramientas matemáticas provenientes de la teoría de sistemas dinámicos, permitiéndonos así estudiar los diferentes comportamientos cualitativamente distintos que el sistema es capaz de generar, y a su vez, identificar las especies e interacciones más relevantes en la formación de estos comportamientos. Notar que esto último está fuertemente ligado a la identificación de *motivos* y *módulos funcionales* introducidos en la sección 1.2.

Por otro lado, el modelado matemático puede ser utilizado como una herramienta para el testeado de hipótesis. Si la dinámica del mecanismo modelado difiere de las observaciones experimentales, será necesario descartar las hipótesis propuestas. Por el contrario, si esta concuerda, entonces podremos tener una mayor confianza de que el mecanismo propuesto resulta útil para representar los aspectos biológicos testeados. Además, la capacidad de variar los parámetros del modelo nos permite identificar regiones de parámetros en las que se observan comportamientos particulares, a partir de los cuales se pueden proponer nuevas hipótesis a testear

experimentalmente. Es importante notar que en muchos casos el modelado matemático resultará más económico en tiempo, dinero y recursos que la experimentación en un laboratorio.

La identificación y caracterización de los *motivos funcionales mínimos* es un área de investigación en el que el modelado matemático cumple un eje central, especialmente en el diseño de módulos biológicos en un contexto de biología sintética.

Desde una perspectiva teórica, el modelado matemático nos permite estudiar las distintas características que presentan los diferentes módulos funcionales

En resumen, algunas de las aplicaciones del modelado matemático de sistemas biológico son:

- 1) Testear la validez de un modelo biológico, evaluando si las predicciones de las ecuaciones diferenciales reflejan los comportamientos biológicos observados experimentalmente.
- 2) Generar nuevas hipótesis, identificando condiciones experimentales en los que el modelo predice ciertos comportamientos particulares observables.
- 3) Identificar en el modelo cuáles son las especies e interacciones que más contribuyen a la formación de ciertos comportamientos de interés.
- 4) Identificar en la red los distintos *motivos y módulos funcionales* que dan lugar a mecanismos regulatorios más complejos.
- 5) Analizar de manera cuantitativa las distintas propiedades de un módulo funcional en particular.

En el capítulo 5 hemos utilizado este tipo de acercamiento para estudiar el sistema dado por la interacción entre la vía de respuesta a la feromona sexual y el ciclo celular en la levadura de cerveza *S. cerevisiae*.

## 1.5 Sobre esta tesis

En esta tesis usamos el abordaje de Biología de Sistemas para estudiar los mecanismos biomoleculares involucrados en la toma de decisión a nivel celular. El trabajo se organizó de la siguiente manera:

En el *capítulo 2* introducimos conceptos básicos de modelado de reacciones biomoleculares, los cuales serán utilizados a lo largo de toda la tesis.

En el *capítulo 3* nos centramos en el estudio de módulos *ultrasensibles*, que cumplen un rol fundamental en varios contextos celulares. Estos módulos se caracterizan por presentar una curva dosis-respuesta sigmoidal, y proporcionan alinealidades que resultan necesarias para producir mecanismos más complejos tales como adaptación, biestabilidad, y oscilaciones. En esta sección, estudiamos los factores que modulan el desempeño de un motivo ultrasensible (es decir, su ultrasensibilidad), al ser embebido dentro de una cascada de señalización. Para ello, utilizamos

una configuración sencilla para analizar en qué medida las limitaciones en los rangos barridos por los componentes río arriba y río abajo afectan a la ultrasensibilidad efectiva que distintos mecanismos ultrasensibles aportan al sistema.

En el *capítulo 4* estudiamos analíticamente el aporte neto que realiza cada módulo en la construcción de la ultrasensibilidad de una cascada de señalización. A su vez, nos focalizamos en la identificación de los distintos efectos que modulan la ultrasensibilidad de la cascada. Finalmente, en este capítulo aplicamos las herramientas matemáticas desarrolladas para estudiar la ultrasensibilidad presente en 2 modelos de cascadas de MAP kinasas de interés biológico.

En el *capítulo 5* estudiamos los mecanismos biomoleculares involucrados en la vía de respuesta a feromona del organismo modelo *Saccharomyces cerevisiae*. En este caso estudiamos el proceso de toma de decisión celular respecto a aparearse o no cuando la célula es estimulada con feromona. En este contexto, analizamos matemáticamente el modelo biológico propuesto por biólogos de nuestro laboratorio, llevando a cabo las iteraciones experimentación-modelado características de la biología de sistemas.

## 1.6 Bibliografía

Alon U 2006 An introduction to systems biology: design Principles of Biological Circuits. *Chapman & Hall*. ISBN 978-1-58488-642-6

Benner S A and Sismour A M 2005 Synthetic Biology, *Nat Rev Genet* **6** 7 533-543.

Del Vecchio D, Ninfa A and Sontag E 2008 Modular cell biology: retroactivity and insulation. *Mol Sys Biol* **4** 161 p161.

Hartwell L H, Hopfield J J, Stanislas Leibler S, and Murray A W 2000 From molecular to modular cell biology *Nature* **402** (6761 Suppl):C47-52.

Kholodenko B N, Kiyatkin A, Bruggeman F J, Sontag E, Westerhoff H V, and Hoek J B 2002 Untangling the wires: a strategy to trace functional interactions in signaling and gene networks. *Proc Natl Acad Sci* **99** (20):12841-6.

Milo R, Shen-Orr S, Itzkovitz S, Kashtan N, Chklovskii D and Alon U 2002 Network Motifs: Simple Building Bloks of Complex Networks, *Science* **298**, 824-827

Sneppen K, Krishna S and Semsey S 2010 Simplified Models of Biological Networks *Annu Rev Biophys* **39** 43-59.

Tyson J J, Chen K C and Novak B 2003 Sniffers, buzzers, toggles and blinkers: dynamics of regulatory and signalinpathways in the cell, *Curr Opin Cell Biol* **15** (2):221-31

## 2 MODELADO MATEMÁTICO DE PROCESOS BIOLÓGICOS

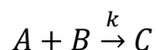
Existen varios acercamientos matemáticos para modelar las interacciones bioquímicas que se dan dentro de la célula, como ODEs (Ecuaciones Diferenciales ordinarias), PDEs (Ecuaciones Diferenciales Parciales), Redes Booleanas, Simulaciones Estocásticas, Ecuaciones Maestras, etc. Cada una de ellas trabaja en distintos niveles de aproximación, por lo que la elección del método a utilizar depende exclusivamente de las características particulares del problema y del tipo de análisis que se busca hacer. Para esta tesis, se eligió modelar las redes de interacción moleculares con ODEs, con el fin de estudiar la dinámica de las concentraciones de las proteínas interactuantes desde la teoría de los sistemas dinámicos. En este paradigma, plantearé un conjunto de ecuaciones diferenciales, donde la tasa de cambio de concentración de una determinada proteína  $X_i$ ,  $\dot{X}_i$ , estará dada por una función que puede depender de las concentraciones de las proteínas con las que interactúa:

$$\dot{X}_i = F_i(X_1, X_2, \dots, X_N)$$

La aplicación de ODEs ineludiblemente implica hacer dos aproximaciones (Szallasi *et al* 2006): 1) Que las proteínas interactuantes están distribuidas homogéneamente dentro del compartimiento donde ocurren las reacciones, por lo que las concentraciones no varían en el espacio y 2) Que las concentraciones varían de manera continua. Esta aproximación resulta válida en el régimen en el que el número de las proteínas interactuantes es suficientemente alto, tal que sean despreciables las fluctuaciones debidas al carácter discreto y probabilístico de las reacciones.

### 2.1.1 Ley de acción de masas

La cinética de las reacciones suele modelarse con la *ley de acción de masas*, según la cual la tasa de una reacción es proporcional a la probabilidad de colisión entre las moléculas interactuantes, y por lo tanto, es proporcional al producto de las concentraciones de éstas [Keener and Sneyd 2009]. Por ejemplo, supongamos que al colisionar las proteínas  $A$  y  $B$ , reaccionan con una cierta probabilidad formando una nueva especie  $C$ ,



La tasa de acumulación de  $C$ ,  $\dot{C}$ , resulta proporcional a las concentraciones de  $A$  y  $B$  con una constante de proporcionalidad  $k$ , donde  $k$  representa la probabilidad que dicha colisión sea productiva (que efectivamente forme  $C$ ). Asimismo, la tasa de cambio de  $A$  y  $B$  resultan iguales a la de  $C$  pero con el signo contrario:

$$\begin{aligned}
 \dot{C} &= k \cdot A \cdot B \\
 \dot{A} &= -k \cdot A \cdot B \\
 \dot{B} &= -k \cdot A \cdot B
 \end{aligned}
 \tag{2.1}$$

Notar que se pueden plantear dos leyes de conservación, donde las proteínas del tipo A, o bien están en su estado libre  $A$ , o en  $C$ , luego de haber reaccionado. Una aseveración equivalente puede hacerse para  $B$ , pudiendo expresarse así las siguientes ecuaciones de conservación:

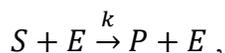
$$\begin{aligned}
 A_T &= A + C \\
 B_T &= B + C
 \end{aligned}$$

Donde  $A_T$  y  $B_T$  son las cantidades totales de  $A$  y  $B$  respectivamente. Finalmente, juntando las ecuaciones diferenciales [2.1] con sus leyes de conservación se obtiene una única ecuación diferencial que rige toda la dinámica de la reacción.

$$\dot{C} = k \cdot (C - A_T) \cdot (C - B_T)$$

### 2.1.2 Reacciones enzimáticas

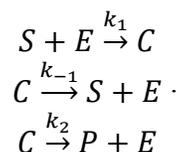
Las enzimas son proteínas capaces incrementar la probabilidad de una cierta reacción, es decir, son capaces de acelerar (catalizar) una reacción específica. En una primera aproximación, se puede suponer que la enzima convierte el sustrato en producto, siguiendo una ley de acción de masas,



lo que lleva a una velocidad de reacción lineal con respecto a las concentraciones de enzima y sustrato,

$$\dot{P} = k \cdot S \cdot E.$$

Experimentalmente se observa que la velocidad de reacción ( $\dot{P}$ ) crece linealmente con el sustrato para valores de  $S$  pequeños, mientras que para valores de sustrato más altos  $\dot{P}$  alcanza un máximo. Un modelo más realista de reacción enzimática que captura esta observación experimental, supone que ésta ocurre en dos pasos, en el que primero la enzima se une al sustrato formando un complejo, para luego, en una segunda reacción, generar el producto,



Siguiendo las leyes de acción de masas se obtiene el siguiente conjunto de ODEs,

$$\begin{aligned}\dot{S} &= k_{-1} C - k_1 S E \\ \dot{E} &= (k_{-1} + k_2)C + k_1 S E \\ \dot{C} &= k_1 S E - (k_{-1} + k_2)C \\ \dot{P} &= k_2 C\end{aligned}$$

con la ley de conservación de la enzima,

$$E_T = E + C.$$

Este conjunto de ecuaciones diferenciales no puede ser resuelto analíticamente, pero se pueden realizar aproximaciones para obtener expresiones validas en ciertas condiciones. Michaelis y Menten [Michaelis and Menten 1913] asumieron que el sustrato y el complejo alcanzan un equilibrio en una escala de tiempo mucho menor que la generación de producto. Bajo esta aproximación se obtiene la siguiente relación entre el complejo y el sustrato,

$$C = E_T \frac{S}{K_d + S},$$

donde  $K_d = \frac{k_{-1}}{k_1}$ , y reemplazando esta ecuación en la ecuación de la dinámica de  $P$  se obtiene una tasa de producción de  $P$ :

$$\dot{P} = k_2 E_T \frac{S}{K_d + S}$$

Resulta relevante notar que la forma funcional de la tasa de producción en función de  $S$  es hiperbólica. Este tipo de curvas es muy recurrente en el modelado de transducción de señales y en honor a este trabajo, se las suele denominar funciones de Michaelis-Menten (M-M).

Una característica muy relevante de las funciones M-M, es que presentan un comportamiento de orden uno (lineal) a valores de  $S$  suficientemente bajos,  $S \ll K_d$ , mientras que a valores suficientemente altos,  $S \gg K_d$ , tienen un comportamiento de orden cero (constante).

Un acercamiento más completo a la caracterización de las reacciones enzimáticas [Briggs and Haldane 1925] resulta de asumir que  $C$  alcanza un estado cuasi-estacionario (en vez de asumir que el sustrato y el complejo alcanzan un equilibrio), es decir, se pide  $\dot{C} \approx 0$  y se obtiene,

$$\dot{P} = k_2 E_T \frac{S}{K_m + S} \quad [2.2]$$

Con  $K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$ . Esta aproximación resulta válida siempre y cuando [Segel and Slemrod 1989],

$$\frac{E_T}{K_m + S_T} \ll 1$$

En particular [2.2] es válida si la cantidad total de sustrato es mucho mayor a la de la enzima,  $E_T \ll S_T$ .

## 2.2 Ciclos covalentes: Fosforilación - Desfosforilación

Las modificaciones covalentes de proteínas constituyen mecanismos clave para los sistemas de transmisión de señales intracelulares. Las proteínas kinasas son enzimas capaces de transferir un grupo fosfato del ATP a su proteína objetivo. En contraparte, las fosfatasas son las enzimas capaces de remover el grupo fosfato de éstas.

En una primera aproximación, suponiendo una actividad enzimática lineal tanto para la kinasa,  $K$ , como para la fosfatasa,  $P$ , (ver Figura 2.1) la dinámica del sistema estará dada por,

$$\dot{X}_P = k_1 K (X_T - X_P) - k_2 P X_P$$

En estado estacionario ( $\dot{X}_P = 0$ ) se obtiene la siguiente solución de  $X_P$ ,

$$X_{P,ss} = X_T \frac{K}{K_d P + K} \quad [2.3]$$

Con  $K_d = \frac{k_2}{k_1}$ . Se puede interpretar al ciclo covalente como un módulo de procesamiento de señales, al identificar a la concentración de kinasa como la señal de entrada y a la concentración de  $X_P$  como señal de salida. De esta manera, el ciclo covalente, bajo la aproximación de actividad enzimática lineal, tiene una función input-output del tipo Michaelis-Menten (ver Figura 2.3)

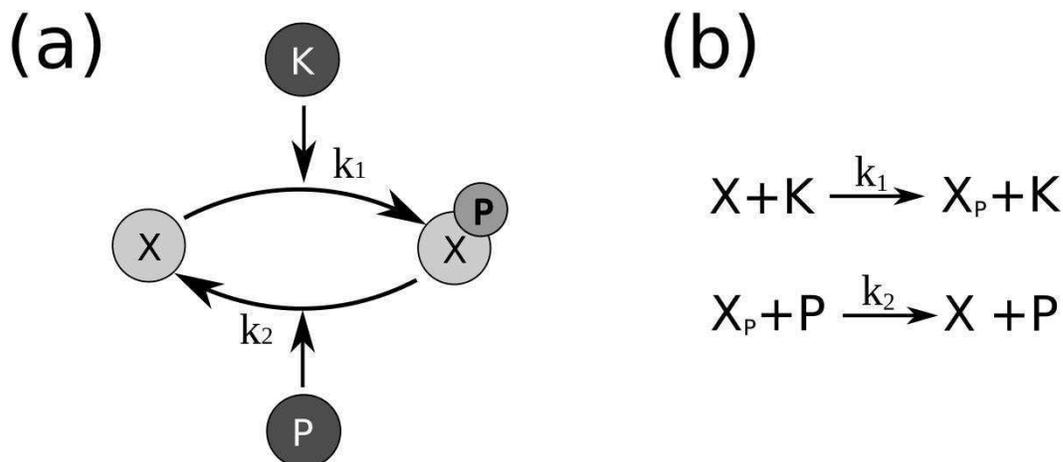


Figura 2.1 Ciclo covalente bajo la aproximación de actividad enzimática lineal tanto para la kinasa como para la fosfatasa. (a) Esquema, (b) reacciones bioquímicas.

En un reconocido trabajo, Goldbeter y Koshland estudiaron el ciclo covalente para el caso de procesos de fosforilación y desfosforilación sin despreciar el paso intermedio donde se forman los complejos enzima sustrato, tanto para la kinasa como para la fosfatasa (ver Figura 2.2).

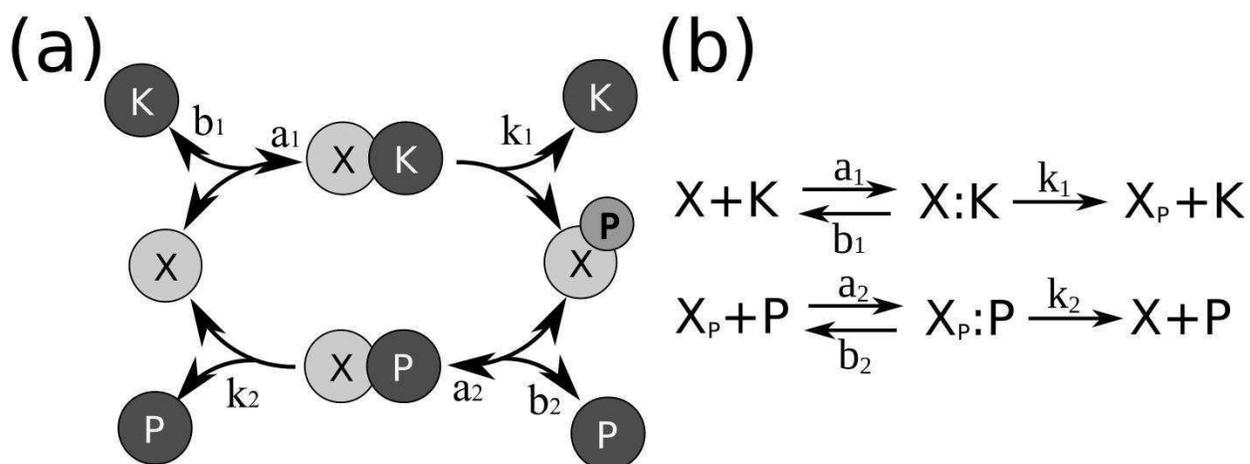


Figura 2.2 Ciclo covalente de Goldbeter y Koshland. (a) Esquema, (b) reacciones bioquímicas.

Goldbeter y Koshland [Goldbeter y Koshland 1981] modelaron tanto la actividad enzimática de la kinasa como la de la fosfatasa como funciones de Michaelis-Menten, obteniendo así la siguiente ecuación diferencial para el estado fosforilado,  $X_P$ ,

$$\dot{X}_P = \frac{k_1 K_T (X_T - X_P)}{K m_K + (X_T - X_P)} - \frac{k_2 P_T X_P}{K m_P + X_P} \quad [2.4]$$

Donde  $K_T$  y  $P_T$  son la concentración total de la kinasa y la fosfatasa respectivamente, y donde  $K m_K = (k_1 + b_1)/a_1$  y  $K m_P = (k_2 + b_2)/a_2$ .

El estado estacionario del sistema resulta de igualar a cero la ecuación [2.4],  $\dot{X}_P = 0$ ,

$$0 = \frac{I - 1 - K_1 + I K_2 + \sqrt{4 I K_2 (I - 1) + (I - 1 - K_1 - K_2 I)^2}}{2(I - 1)} \quad [2.5]$$

Con  $K_1 = \frac{K m_K}{X_T}$  y  $K_2 = \frac{K m_P}{X_T}$  y donde se toma como output del sistema la fracción de  $X$  fosforilado,  $O = \frac{X_{P,ss}}{X_T}$ , y como input la concentración total de la kinasa normalizada de la siguiente manera:  $I = k_1 K_T / k_2 P_T$ . Goldbeter y Koshland hallaron que cuando ambas, kinasas y fosfatasas, están saturadas ( $K_1, K_2 \ll 1$ ) la forma funcional de la relación input-output resulta sigmoideal (ver Figura 2.3).

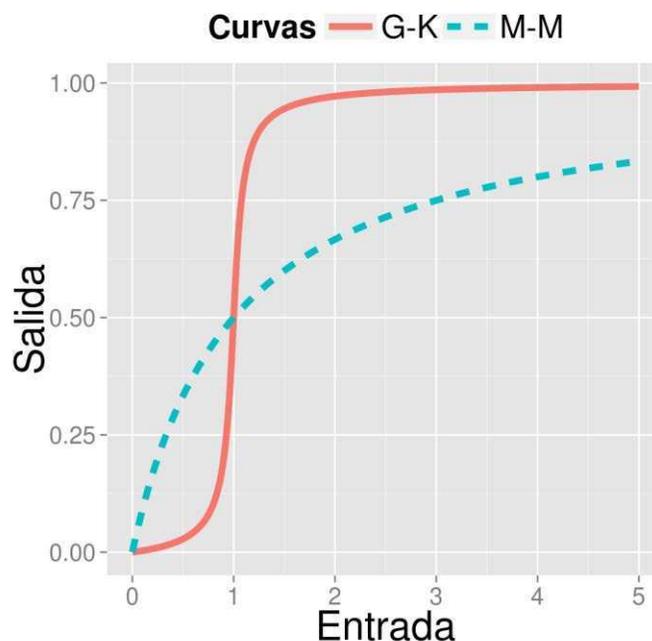


Figura 2.3 Función de Goldbeter-Koshland comparado con una Función de Michaelis-Menten. Decimos que la función de Goldbeter-Koshland es ultrasensible ya que su transición entre valores de respuesta bajos y altos resulta más pronunciada que la que se obtiene en una función respuesta hiperbólica (también llamada función de Michaelis-Menten), en el extremo, estos módulos se comportan como un “switch” binario.

Dentro de la gran cantidad de unidades funcionales biológicamente plausibles, los módulos con dosis-respuesta sigmoidales constituyen un motivo fundamental en varios contextos celulares [Zhang et al 2013, Ferrell y Ha 2014]. Las respuestas sigmoidales se caracterizan por tener un valor de input umbral tal que señales de entrada menores a este producen respuestas pequeñas, mientras que señales mayores que el umbral producen altos niveles de respuesta. Así es posible definir la *ultrasensibilidad* de una curva, que indica qué tan abrupta es la transición entre niveles de respuestas bajos y altos. A su vez, se definen como *módulos ultrasensibles* [Goldbeter y Koshland 1981], a los módulos bioquímicos con transición más pronunciada que la que se obtiene en una función con una curva dosis-respuesta hiperbólica (que como vimos suele ser llamada función de Michaelis-Menten). En el caso límite, estos módulos se comportan como un “switch” binario (ver ejemplificación en Figura 2.3).

En una primera aproximación, las respuestas ultrasensibles pueden ser descriptas por una función de Hill:

$$F(x) = Omax \frac{x^{n_H}}{EC50^{n_H} + x^{n_H}} \quad [2.6]$$

Donde el parámetro EC50 está asociado al nivel de entrada para el que se consigue la mitad de la máxima salida ( $O_{max}$ ), mientras que  $n_H$  se conoce como el coeficiente de Hill, y nos da información sobre la ultrasensibilidad global de la función de transferencia correspondiente. En particular, la función de Hill fue introducida para describir la unión de un ligando a una macromolécula en los casos en que la tasa de unión se incrementa si ya hay otros ligandos presentes en la misma macromolécula (este proceso es conocido como cooperatividad). Sin embargo, la función de Hill es ampliamente utilizada como una descripción matemática fenomenológica de procesos ultrasensibles en general. Además de la cooperatividad existen varios mecanismos, a nivel molecular, capaces de producir respuestas ultrasensibles, como por ejemplo: los inhibidores por competencia estequiométrica [Buchler y Louis 2008], la translocación regulada de proteínas [Ferrell 1998], la ultrasensibilidad de orden cero en ciclos covalentes [Goldbeter y Koshland 1981] y los procesos de activación múltiple, como la fosforilación de varios sitios [Ferrell 1996, Markevich et al 2004, Gunawardena 2005] o la unión de ligando a receptores multiméricos [Rippe 1997].

A nivel sistémico, los módulos sigmoidales son capaces de proporcionar alinealidades que resultan necesarias en ciertos módulos para producir fenomenología más compleja, como adaptación [Srividhya et al 2011], bistabilidad [Angeli et al 2004, Ferrell y Xiong 2001], y oscilaciones [Kholodenko 2000].

### 2.3 Sobre curvas de respuesta sigmoidal

Una gran variedad de mecanismos moleculares son capaces de producir respuestas ultrasensibles. A pesar de que la forma funcional de cada curva dosis-respuesta difiera de mecanismo en mecanismo, todos ellos están asociados a procesos en los que, en las proximidades de cierto valor de umbral, pequeñas variaciones relativas en el estímulo pueden producir grandes cambios relativos en la respuesta.

Como ya hemos mencionado, las respuestas ultrasensibles pueden ser descritas por una ecuación de Hill e incluso en ausencia de todo fundamento mecanístico, esta función se utiliza ampliamente como una descripción matemática fenomenológica de los procesos ultrasensibles. En general, la siguiente definición operativa del coeficiente de Hill puede ser utilizada para calcular la ultrasensibilidad de módulos sigmoidales:

$$n_H = \frac{\log(81)}{\log(EC90/EC10)} \quad [2.7]$$

Donde EC10 y EC90 son los valores de la señal que producen el %10 y el %90 de la respuesta máxima.

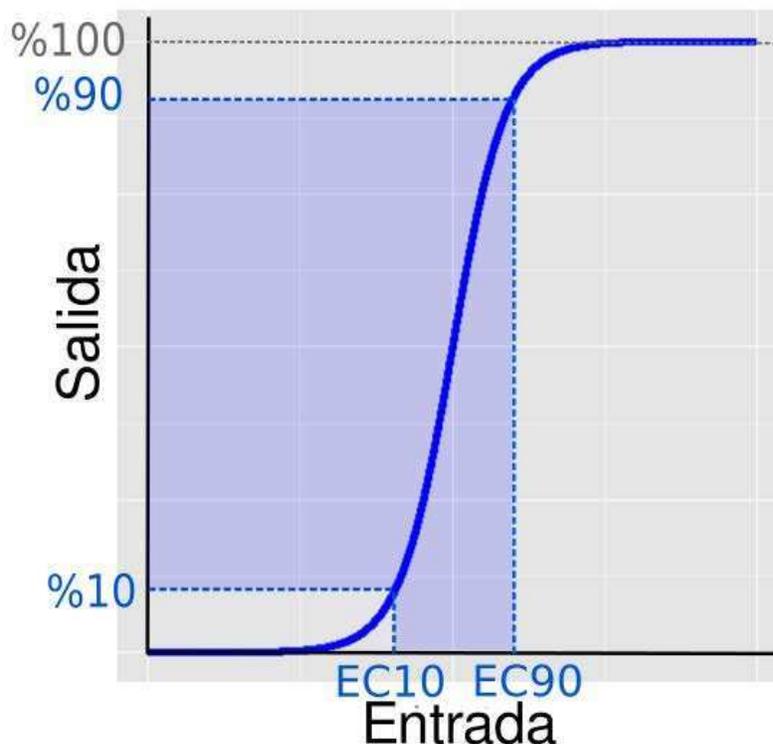


Figura 2.4 Función de Hill, donde el EC10 y el EC90 son los valores del Input que producen el 10% y el 90% del máximo Output.

Funciones de respuesta hiperbólicas (tales como las obtenidos con las reacciones bioquímicas simples que siguen la aproximación de Michaelis-Menten) tienen  $n_H = 1$ , lo que significa que es necesario un cambio de 81 veces en la señal de entrada para llevar al output desde el 10% al 90% de la respuesta máxima. Funciones de respuesta con  $n_H$  superiores a 1 se denominan *ultrasensibles*. Ellas producen la misma variación en el nivel de salida del sistema, con un cambio mucho más pequeño en la señal de entrada (por ejemplo, en un caso  $n_H = 2$ , sólo se necesita incrementar el input 9 veces para lograr en el output el cambio mencionado).

La cuantificación de la ultrasensibilidad global (ecuación [2.7]) no logra captar completamente las características de la forma funcional de las curvas sigmoideas. A raíz de estas limitaciones se utiliza de forma complementaria el coeficiente de respuesta [Kacser y Burns 1973, Savageau 1976, Kholodenko et al 1997]:

$$R(x) = \frac{x}{y} \frac{dy}{dx} = \frac{d \log y}{d \log x} \quad [2.8]$$

El cual estima localmente el orden polinomial de la curva, proporcionando una descripción local de los cambios relativos entre el input ( $x$ ) y el output ( $y$ ). De esta manera, la forma funcional

del coeficiente de respuesta (ecuación [2.8]) se puede usar para cuantificar las diferencias entre distintas respuestas ultrasensibles.

Muy ligado al concepto de la ultrasensibilidad, se define el *Rango dinámico* de entrada, como el rango de entrada en el que la curva resulta *sensible*, usualmente este se toma como rango de entrada delimitado por el EC10 y el EC90

Como veremos en el Capítulo 3, estas diferencias en las características locales de la ultrasensibilidad resultan extremadamente relevantes y pueden tener consecuencias no despreciables cuando el modulo ultrasensible en cuestión es embebido dentro de una cascada de señalización.

## 2.4 Cascadas de señalización

Muchos de los conceptos teóricos y herramientas operativas para el análisis de las características de la ultrasensibilidad de los módulos funcionales se han desarrollado para el análisis de propagación de la señal a través de cascadas moleculares. Por ejemplo, en una serie de contribuciones influyentes, Goldbeter y Koshland (GK) describen las capacidades de amplificación de la ultrasensibilidad de los ciclos de modificación covalente, y proporcionaron herramientas analíticas para cuantificar la amplificación total de cascadas multicíclicas [Goldbeter y Koshland 1981, Goldbeter y Koshland 1982]. Arraigado en la obra de GK, un marco similar fue presentado por Kholodenko et al. [Kholodenko et al 1997] para cuantificar la transferencia de información en las vías de transducción de señales. Usando conceptos tomados de análisis de control metabólico, utilizaron el coeficiente de respuesta,  $R(x)$ , (ecuación [2.8]) para la caracterización de la ultrasensibilidad, el cual describe los cambios fraccionales en el output en relación a los cambios fraccionales en el input. Ellos mostraron que en un arreglo de módulos consecutivos (ver Figura 2.5) el coeficiente de respuesta del sistema es igual al producto de los coeficientes de respuesta de cada nivel de la cascada [Kholodenko et al 1997, Brown et al 1997].

$$R_T(I_1) = R_1(I_1) R_2(F_1(I_1))$$

Donde  $R_i(I_i) = \frac{d \log O_i}{d \log I_i}$  y  $R_T(I_1) = \frac{d \log O_2}{d \log I_1}$ . La notación está definida en la Figura 2.5.

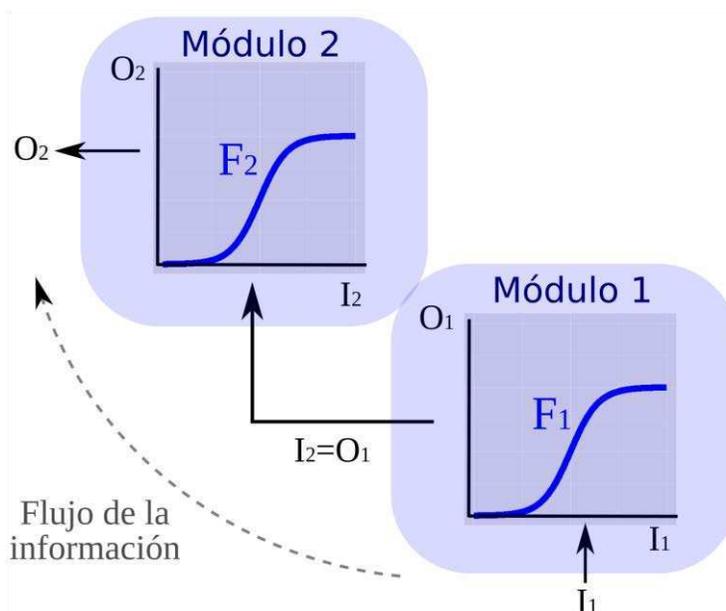


Figura 2.5 Arreglo de módulos ultrasensibles consecutivos formando una cascada lineal. En estado estacionario, el output del primer módulo ( $O_1$ ) es el input del segundo ( $I_2$ )

En la misma línea, Ferrell señaló, en una contribución complementaria [Ferrell 1997], que la ultrasensibilidad global de una cascada lineal, evaluada mediante el respectivo coeficiente de Hill, es como máximo la multiplicación de la ultrasensibilidad global de cada nivel en la cascada (es decir,  $n_H \leq n_{H,1} n_{H,2}$  siguiendo la numeración definida en la Figura 2.5). Tanto los estudios basados en módulos como los que surgen de un enfoque mecanístico apoyan la idea de que el valor biológico de la disposición en cascada puede deberse a su capacidad para convertir las respuestas graduales o modestamente ultrasensibles en respuestas fuertemente ultrasensibles. Sin embargo, es de esperar algunas limitaciones en la descripción modular, especialmente en los casos en que las concentraciones de las enzimas involucradas no resulten despreciables. Por ejemplo, Blüthgen et al. [Bluthgen *et al* 2006] mostraron que debido a los efectos de secuestro (es decir, acumulación de quinasa activa acoplada con su sustrato), la ultrasensibilidad global en el modelo de Huang-Ferrell [Huang y Ferrell 1996] resulta menor que lo esperado a partir de una descripción modular de la misma cascada. En relación con este comportamiento, De Racz y Slepchenko analizaron cascadas de varios niveles de ciclos de activación/desactivación, y encontraron que no se produce una pérdida en la ultrasensibilidad debido al secuestro en la condición en que las fosfatasa trabajan en saturación, y las kinasas no [Racz y Slepchenko 2008].

Más allá de los efectos de secuestro, Ferrell observó que al acoplar dos módulos de tipo Hill (como los mostrados en la Figura 2.5), la ultrasensibilidad se combina submultiplicativa o multiplicativamente, dependiendo de la relación entre el nivel de salida del primer módulo y la concentración necesaria para lograr la activación máxima del segundo [Ferrell 1997]. Además, Slepchenko y colaboradores comentaron brevemente el efecto de "desalineamiento" entre dos ciclos covalentes acoplados [Racz y Slepchenko 2008]. En el mismo sentido, Blüthgen y Herzl

[Blüthgen y Herzel 2001, Blüthgen y Herzel 2003] también identificaron estos efectos en el caso de las cascadas de MAP Kinasas. A continuación, presentaremos un marco general que se ajusta a estas observaciones y que permite un análisis sistemático de la ultrasensibilidad efectiva aportada por un cierto módulo al ser integrado a una cascada lineal.

## 2.5 Bibliografía

Angeli D, Ferrell J E and Sontag E D 2004 Detection of multistability, bifurcations, and hysteresis in a large class of biological positive-feedback systems. *PNAS* **101** (7) 1822-7

Bluthgen N and Herzel H 2001 Map-kinase-cascade: switch, amplifier or feedback controller. *In 2<sup>nd</sup> Workshop on Computation of Biochemical Pathways and Genetic Networks*, pp. 55–62 Berlin: Logos Verlag.

Bluthgen N and Herzel H 2003 How robust are switches in intracellular signaling cascades *Journal of theoretical Biology* **225** 293-300

Bluthgen N, Bruggeman F J, Legewie S, Herzel H, Westerhoff H V and Kholodenko B N 2006 Effects of sequestration on signal transduction cascades. *FEBS Journal* **273** 895-906

Briggs G E and Sanderson-Haldane J B 1925 A note on the kinetics of enzyme action, *Biochem J.* **19** (338-0)

Brown GC, Hoek J B, Kholodenko B N 1997 , Why do protein kinase cascades have more than one level?, *Trends Biochem Sci.* **22** (8):288.

Buchler N E and Louis M. 2008, Molecular titration and ultrasensitivity in regulatory networks. *J.Mol.Biol.* **384** 1106-19.

Ferrell J E 1996 Tripping the switch fantastic: how a protein kinase cascade can convert graded inputs into switch-like outputs *Trends Biochem. Sci.* 21 460–466

Ferrell J E 1997 How responses get more switch-like as you move down a protein kinase cascade *Trends Biochem Sci.* **22** (8):288-9.

Ferrell J E 1998 How regulated protein translocation can produce switch-like responses *Trends in Biomedical Sciences* **23** (11) 461-5

Ferrell J E and Xiong W 2001 Bistability in cell signaling: How to make continuous processes discontinuous, and reversible processes irreversible *Chaos* **11** (1) 227-36

Ferrell J E and Ha S H 2014 Ultrasensitivity part I: Michaelian responses and zero-order ultrasensitivity, *Trends in Biochemical Science* **39** 10

Goldbeter A and Koshland D E 1981 An amplified sensitivity arising from covalent modification in biological systems *PNAS* **78** 11 6840-6844

Goldbeter A and Koshland D E 1982 Sensitivity amplification in biochemical systems *Q Rev Biophys* **15** (3):555-91

Gunawardena J 2005 Multisite protein phosphorylation makes a good threshold but can be a poor switch. *PNAS* **102** 41 14617–14622

Huang C-Y F and Ferrell J E 1996 Ultrasensitivity in the mitogen-activated protein kinase cascade *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93** 10078-10083

Kacser H and Burns JA 1973 The control of flux, *Symp Soc Exp Biol* **27**:65-104

Keener J and Sneyd J 2009 Mathematical Physiology, second edition, *Springer* ISBN 978-0-387-75846-6

Kholodenko B N, Hoek J B, Westerhoff H V and Brown G C 1997 Quantification of information transfer via cellular signal transduction pathways, *FEBS Letters* **414** 430-4

Kholodenko B N 2000 Negative feedback and ultrasensitivity can bring about oscillations in the mitogen-activated protein kinase cascades. *Eur J Biochem* **267** 1583–1588.

Markevich N I, Hoek J B, and Kholodenko B N 2004 Signaling switches and bistability arising from multisite phosphorylation in protein kinase cascades *Journal Cell Biology* **164** (3): 353

Michaelis L and Menten M L 1913 Die Kinetik der Invertinwirkung, *Biochem Z*, **49** 333-69

Racz E and Slepchenko B M 2008 On sensitivity amplification in intracellular signaling cascades *Phys. Biol.* **5** 036004-12

Rippe K 1997, Analysis of protein-DNA binding in equilibrium, *B.I.F. Futura* **12** 20-26

Savageau 1976, Biochemical systems analysis, ed. Addison-Wesley Pub. Co

Segel L A and Slemrod M 1989 The quasi-steady-state assumption: A case study in perturbation, *SIAM Rev*, **31** 3 336-377

Srividhya J, Li Y, and Pomerening JR 2011 Open Cascades as Simple Solutions to Providing Ultrasensitivity and Adaptation in Cellular Signaling *Phys Biol.* **8**(4):046005

Szallasi Z, Stelling J and Periwal V 2006 System Modeling in Cellular Biology, *MIT Press*

Zhang Q, Sudin Bhattacharya and Melvin E. Andersen 2013 Ultrasensitive response motifs: basic amplifiers in molecular signalling networks *Open Biol.* **3** 130031

### 3 EFECTOS DE LA RESTRICCIÓN DE LOS RANGOS DINÁMICOS SOBRE LA ULTRASENSIBILIDAD DE UN MÓDULO.

#### 3.1 Resumen

En los últimos años se han estudiado exhaustivamente distintos mecanismos bioquímicos simples capaces de producir respuestas ultrasensibles. Sin embargo, en una célula viva, estos estarán embebidos en una red bioquímica más grande, con componentes río arriba y río abajo capaces de limitar tanto el rango de entrada que este recibirá como el rango de salida que la red será capaz de detectar. En este capítulo, nos proponemos analizar el desempeño de varios mecanismos ultrasensibles al ser embebidos en el medio de una cascada de señalización lineal (componentes acoplados en serie). En cada caso, utilizaremos una configuración sencilla para estudiar en qué medida las limitaciones en los rangos barridos por los componentes río arriba y río abajo afectan a la ultrasensibilidad efectiva que distintos mecanismos ultrasensibles aportan al sistema. De esta manera, encontramos que las limitaciones en el rango de entrada disminuyen la ultrasensibilidad del sistema, mientras que las limitaciones en el rango de salida pueden producir tanto un aumento como una disminución de la ultrasensibilidad. En este caso, identificamos que el comportamiento está determinado por las asimetrías de la curva dosis-respuesta del módulo ultrasensible, y observamos que varios de los motivos ultrasensibles más estudiados pueden producir ultrasensibilidades efectivas mucho mayores cuando el componente río abajo limita su rango de lectura. En particular encontramos que en ciertos mecanismos de activaciones múltiples donde los distintos pasos no son cooperativos, es posible extraer una ultrasensibilidad equivalente al caso cooperativo bajo un régimen de restricción del rango de salida.

Los resultados obtenidos en este capítulo han sido publicados [Altszyler *et al.* 2014]

#### 3.2 Ultrasensibilidad en curvas asimétricas

Los módulos con función de transferencia ultrasensible son capaces de transformar señales de entrada graduales en respuestas del tipo-switch. Pese a que todos los módulos ultrasensibles tienen esta característica en común, la función de transferencia asociada a cada módulo puede tener una forma funcional matemática particular. Las principales diferencias entre ellas pueden ser reveladas tanto a nivel global como local. Una caracterización global de la ultrasensibilidad puede conseguirse comúnmente a través del coeficiente de Hill,  $n_H$  (ecuación [2.7]), mientras que el coeficiente de respuesta,  $R(x)$  (ecuación [2.8]), que estima localmente el orden polinómico de la función analizada, puede ser utilizado para estudiar la ultrasensibilidad local de la curva.

Ambos tipos de cuantificaciones son importantes para comprender las características de un módulo ultrasensible dado. Para ilustrar este punto, consideramos dos ejemplos paradigmáticos de unidades sigmoidales: una función de respuesta del tipo-Hill, y una función de transferencia del tipo Goldbeter-Koshland, ambos presentando la misma ultrasensibilidad global  $n_H = 3$  (ver Figura

3.1). Como hemos expuesto en la sección 2.2, la función de Goldbeter-Koshland proviene de un módulo formado por un ciclo covalente trabajando en el régimen de *ultrasensibilidad de orden cero* [Goldbeter y Koshland 1981].

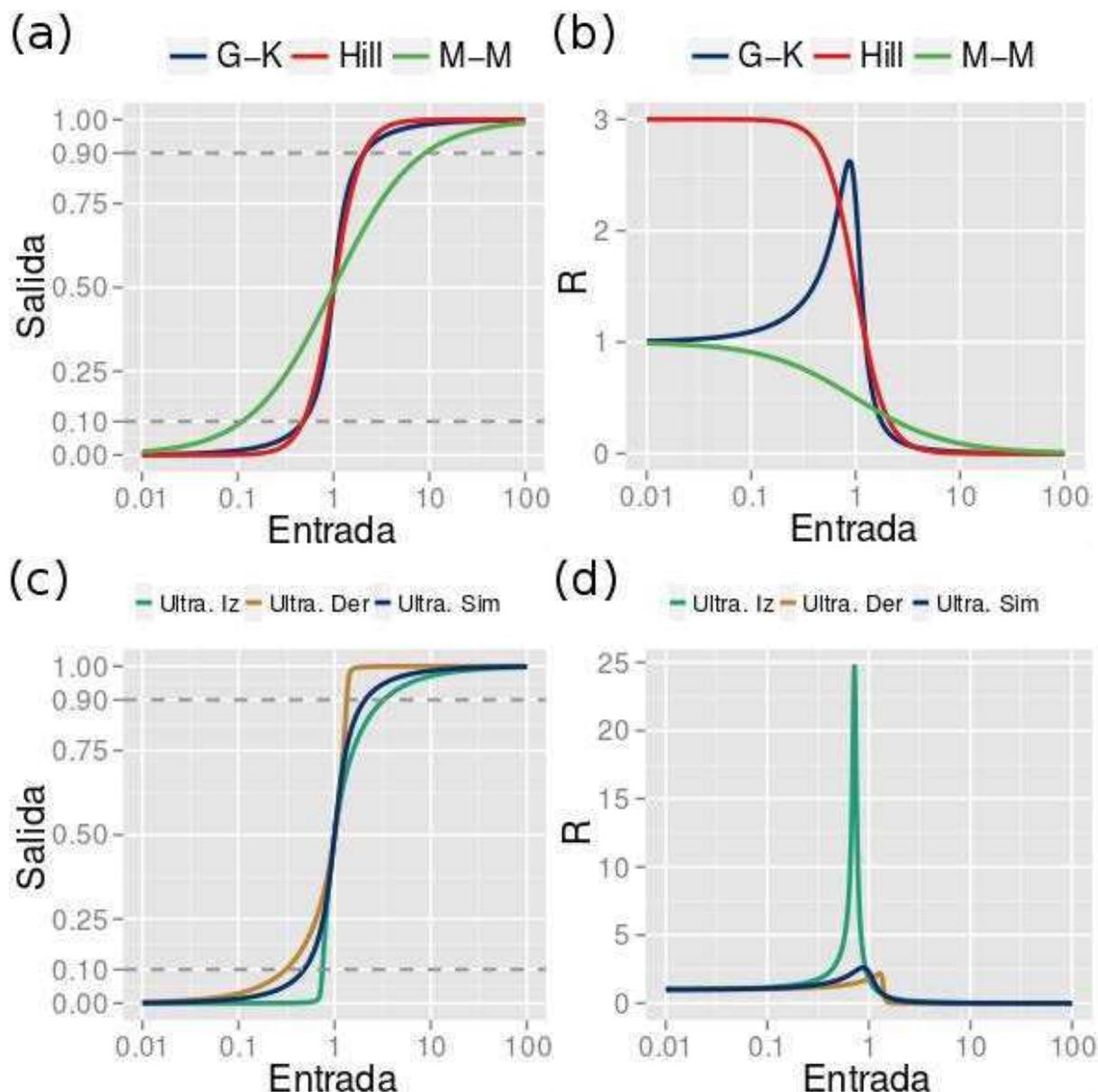


Figura 3.1 (a) curvas dosis-respuesta centradas y normalizadas del tipo Goldbeter-Koshland (GK), Hill y Michaelis-Menten (M-M), se muestran en colores azul, rojo y verde respectivamente. (b) los coeficientes de respuesta para las funciones consideradas en el panel (a). (c) Curvas dosis-respuesta centradas y normalizadas del tipo GK con ultrasensibilidad por izquierda, por derecha, y simétrica, se muestran en turquesa, marrón y azul respectivamente. (d) Coeficiente de respuesta de las funciones que aparecen en el panel (c). Con la excepción de la función de Michaelis-Menten, todas las demás curvas presentan una ultrasensibilidad global de  $n_H = 3$ . Las funciones de GK con ultrasensibilidad izquierda, derecha y simétrica tienen los parámetros  $(K_1, K_2)$  igual a  $(0.63, 0.001)$ ,  $(0.001, 0.63)$  y  $(0.14, 0.14)$ , respectivamente.

En la Figura 3.1.a se muestra la forma funcional en escala log-lineal de las funciones de M-M, Hill y G-K, donde estas últimas dos presentan un  $n_H = 3$ . En el panel (b) de esta figura se muestra sus respectivos coeficientes de respuesta. Aquí se puede apreciar las características de cada función en particular. Por ejemplo, se observa que la respuesta de M-M es de orden uno (lineal) para inputs pequeños, y de orden cero para inputs grandes. Por otra parte, como es de esperarse, las respuestas ultrasensibles presentan un orden polinómico mayor que uno, para los valores de inputs donde la mayor tasa de cambio tenga lugar. Para la función de Hill esto se da en inputs pequeños, donde una dependencia polinómica bien definida de orden  $n_H$  se puede observar. Por otra parte, la curva de GK es de primer orden para señales pequeñas y presenta grandes valores del coeficiente de respuesta cerca de su EC50 (curva azul en la Figura 3.1b). De esta manera, se ve claramente en los paneles (a) y (b) de la Figura 3.1, que debido a las diferencias del carácter polinomial de cada curva, las funciones de Hill y G-K muestran ultrasensibilidades locales cualitativamente diferentes, a pesar de que comparten idénticos niveles de ultrasensibilidad global.

Podemos extender nuestro análisis a un conjunto más amplio de funciones de respuesta teniendo en cuenta el caso de las funciones de GK asimétricas [Gómez-Uribe et al. 2007]. Esto correspondería a situaciones en las que la kinasa está en saturación, pero no la fosfatasa, o viceversa, cuando la fosfatasa está trabajando en saturación, pero no la kinasa. Las asimetrías en los niveles de saturación de las enzimas inducen asimetrías entre el empujamiento de la curva antes y después del EC50. Con el fin de cuantificar esta asimetría hemos definido los coeficientes de Hill por izquierda,  $n_H^L$ , y por derecha,  $n_H^R$ , como:

$$n_H^L = \frac{\log(9)}{\log(x_{0.5}/x_{0.1})}, \quad n_H^R = \frac{\log(9)}{\log(x_{0.9}/x_{0.5})}, \quad [3.1]$$

Usando estos coeficientes, los comportamientos de ultrasensibilidad por izquierda, simétrica o por derecha puede distinguirse y asociarse a valores de  $n_H^L/n_H^R$  mayores, iguales o menores que uno, respectivamente.

En la Tabla 3.1 se resumen los parámetros y los coeficientes de Hill asociados a las funciones simétricas y asimétricas que se muestran en la Figura 3.1.c. Las diferentes curvas corresponden a diferentes valores de  $K_1$  y  $K_2$ . Se puede apreciar que como el  $n_H$  es igual a la media armónica de los coeficientes de Hill izquierdo y derecho, esta magnitud está sesgada hacia el mínimo entre estas dos cantidades.

$$\frac{2}{n_H} = \frac{1}{n_H^L} + \frac{1}{n_H^R}$$

Función de G-K	Curva	$(K_1, K_2)$	$n_H$	$n_H^L$	$n_H^R$
simétrica	Azul	(0.14, 0.14)	3	3	3
Ultrasensible por izquierd	Turquesa	(0.63, 0.001)	3	7.5	1.87
Ultrasensible por derecha	Marron	(0.001, 0.63)	3	1.87	7.5

Tabla 3.1 Parámetros y coeficientes de Hill de las funciones de Goldbeter-Koshland mostradas en la Figura 3.1.c-d.

Resulta interesante notar que pese a que las tres funciones de GK de la Figura 3.1c tienen la misma ultrasensibilidad global, la curva ultrasensible por izquierda presenta un coeficiente de respuesta máximo mucho más alto (ver la Figura 3.1d). Esto se debe al hecho de que, para la curva ultrasensible por izquierda, se observan grandes cambios absolutos del output para niveles de output más bajas que en la curva ultrasensible por derecha, dando lugar a mayores cambios fraccionarios. Es importante señalar que el coeficiente de Hill por izquierda (y por derecha) también es una medida global, y por lo tanto puede no reflejar la existencia de niveles mucho más altos en la ultrasensibilidad local dentro del rango de señales de entrada menores que el EC50.

En las próximas secciones veremos que estas asimetrías, que usualmente en la literatura no son debidamente tenidas en cuenta, pueden originar comportamientos no-triviales cuando el módulo en cuestión se encuentra embebido en una red de señalización de manera tal que se le restringe su rango efectivo de trabajo.

### 3.3 Restricción de los rangos dinámicos

Los módulos con respuesta sigmoidal pueden encontrarse en una gran variedad de contextos celulares, integrados con diversos componentes río arriba y río abajo. Estos componentes, pueden imponer restricciones tanto en el rango de valores (concentraciones) de entrada que el módulo recibe como en el de valores de salida en el que este es leído. Es a este fenómeno lo que denominamos como *restricción de los rangos dinámicos*. En esta sección presentaremos una configuración sencilla diseñada para estudiar la ultrasensibilidad aportada por un módulo a un sistema en presencia de restricciones en sus rangos dinámicos de entrada y salida (ver Figura 3.2). La idea central de este trabajo es mostrar de qué manera la ultrasensibilidad global que tiene un módulo ultrasensible aislado puede diferir de la ultrasensibilidad efectiva que este presenta al ser embebido en su contexto. Con el fin de estudiar exclusivamente los efectos debidos a las restricciones de rango dinámico de la unidad ultrasensible analizada, se seleccionaron módulos de respuesta hiperbólica como componentes río arriba y río abajo, obteniendo así el sistema de tres módulos a estudiar.

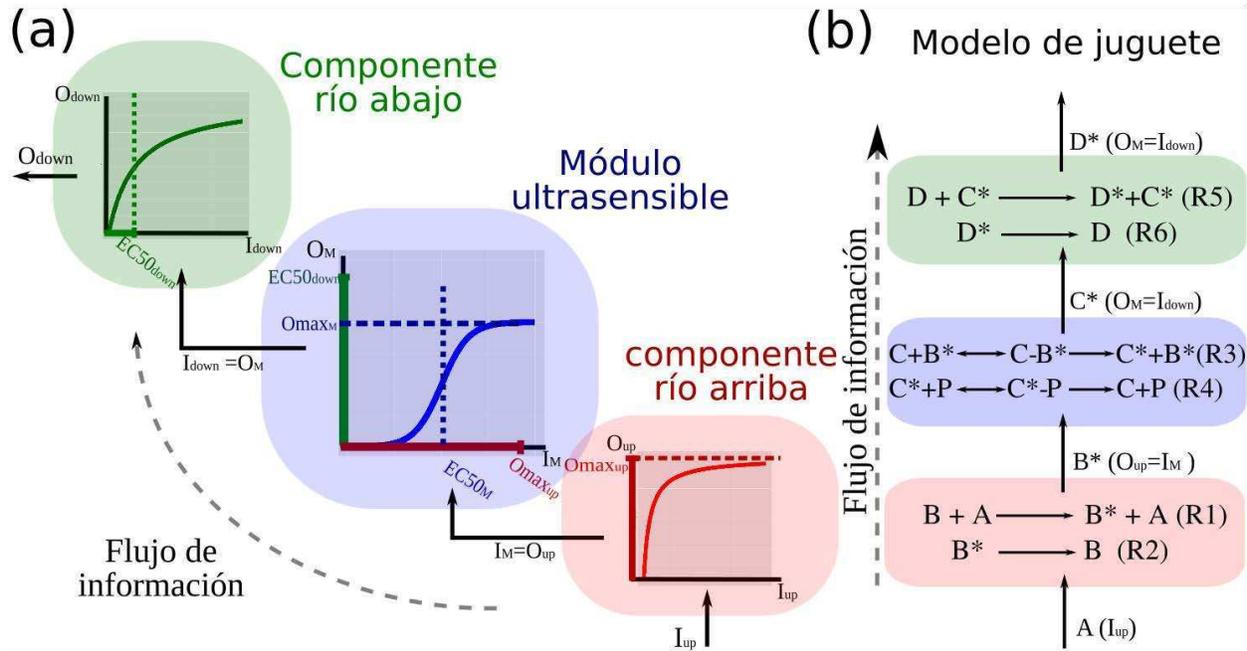


Figura 3.2 Panel A) Configuración del sistema extendido utilizado para analizar los efectos de las limitaciones en los rangos dinámicos impuestas por los componentes río arriba (rojo) y río abajo (verde) sobre un módulo ultrasensible (azul). El nivel máximo de salida de la unidad río arriba,  $O_{max_{up}}$ , determina el rango de valores de inputs que **ingresan** al módulo ultrasensible (línea horizontal roja del panel azul). Por otro lado, los valores de entrada,  $I_{down}$ , de la región sensible del componente río abajo (es decir  $I_{down} < EC50_{down}$ ) determinan el rango de **lectura** efectivo del módulo ultrasensible (línea vertical verde del módulo azul). Panel B) Modelo de juguete representativo del esquema en el panel A que involucra un ciclo covalente ultrasensible (reacciones bioquímicas R3 y R4), al que se le conecta río arriba (R1, R2) y río abajo (R5, R6) unidades de activación hiperbólicas. Para este ejemplo  $I_{up} = [A]$ ,  $O_{up} = I_m = [B^*]$ ,  $O_M = I_{down} = [C^*]$  y  $O_{down} = [D^*]$ . Cuando el proceso de secuestro entre el módulo ultrasensible y el componente de río arriba resulta despreciable ( $[C - B^*] \ll [B] + [B^*]$ ) [Ventura et al. 2008 y Del Vecchio 2008] una descripción basada en módulos puede ser adoptado. La función de transferencia de los componentes río arriba y río abajo sigue una curva de Michaelis-Menten, mientras que la función de transferencia del módulo ultrasensible sigue una función del tipo GK.

Las funciones de transferencia como las consideradas en nuestro análisis presentan dos escalas de concentración: una asociada a su  $EC50$  y la otra a su nivel máximo de respuesta,  $O_{max}$ . Como se puede fácilmente apreciar en la Figura 3.3a, ambas cantidades proporcionan escalas naturales que pueden determinar el comportamiento final que surge de la interacción entre el módulo ultrasensible a analizar y sus componentes río abajo y río arriba. La relación entre estas escalas de concentración en componentes consecutivos puede ser descrita por los *coeficientes de restricción río arriba*,  $Q_{up}$ , y *río abajo*  $Q_{down}$  definidos de la siguiente manera:

$$Q_{up} = \frac{EC50_M}{O_{max_{up}}} \quad Q_{down} = \frac{O_{max_M}}{EC50_{down}} \quad [3.2]$$

Donde  $O_{max}$  representa el valor de salida máximo y los subíndices  $M$ ,  $up$  and  $down$  refieren a parámetros asociados al módulo ultrasensible, al componente río arriba o al componente río abajo, respectivamente.

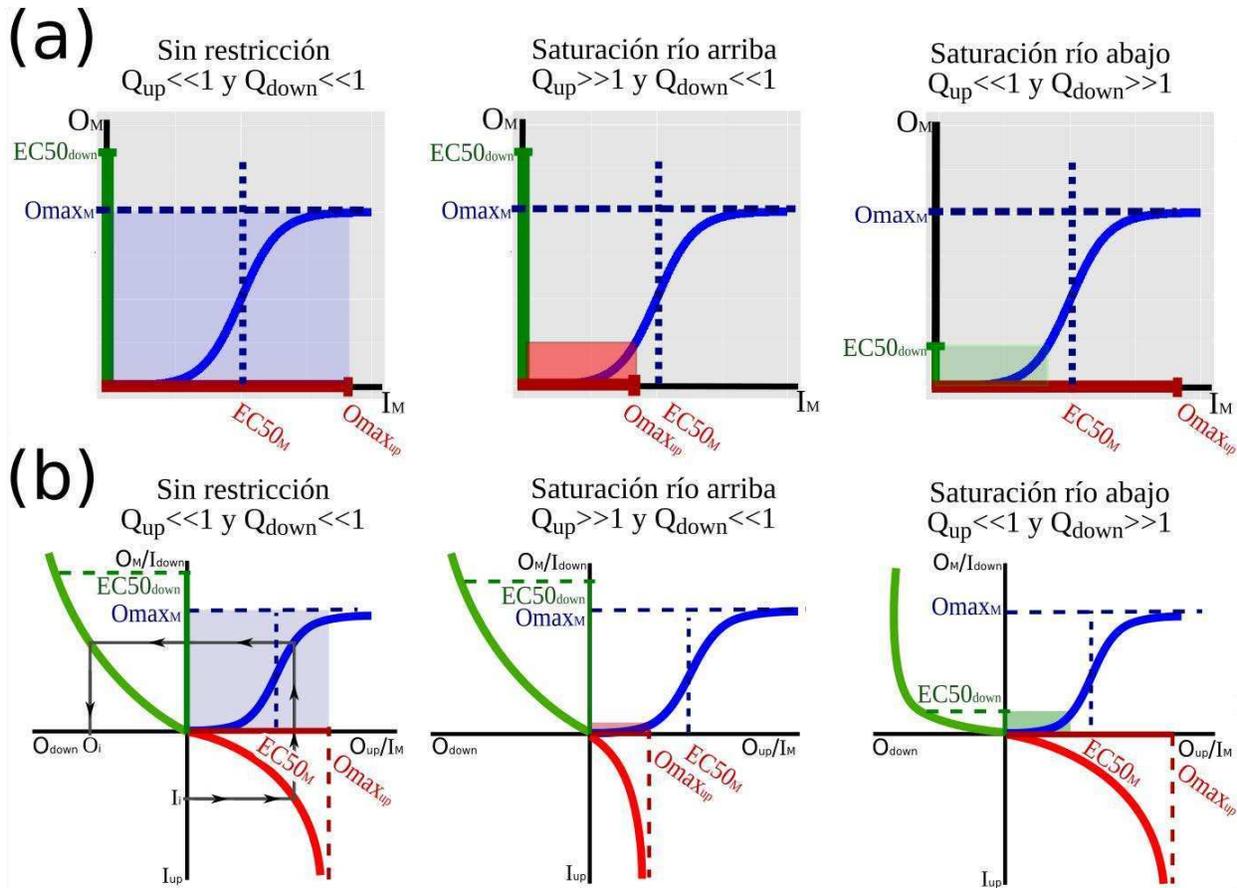


Figura 3.3 (a) Diagrama de funciones de respuesta esquemáticas para los regímenes de no-restricción, de saturación río arriba y de saturación río abajo. En cada caso, una línea roja horizontal y una línea verde vertical, alineadas con los ejes del panel, representan los rangos operativos de entrada y de salida impuestos en el módulo ultrasensible por los componentes río arriba y río abajo, respectivamente. **Panel izquierdo.** Dado que  $Q_{up}$ ,  $Q_{down} \ll 1$  ( $O_{max_{up}} \gg EC50_M$  y  $EC50_{down} \gg O_{max_M}$ ), la saturación de los módulos de entrada y de lectura no juegan un papel en la respuesta del sistema. **Panel central.** Para valores grandes de  $Q_{up}$  y valores pequeños de  $Q_{down}$  ( $O_{max_{up}} \ll EC50_M$  y  $EC50_{down} \gg O_{max_M}$ ), un régimen de saturación río arriba puede ser definido, en el que el nivel de salida máximo del módulo río arriba limita el rango de inputs recibidos por el módulo ultrasensible. **Panel derecho.** Valores grandes de  $Q_{down}$  y valores pequeños de  $Q_{up}$  ( $EC50_{down} \ll O_{max_M}$  y  $EC50_M \ll O_{max_{up}}$ ) corresponden a situaciones de saturación río abajo, donde el módulo río abajo limita el rango de salida en el que el módulo ultrasensible es efectivamente leído. (b) Un diagrama para ilustrar, a través de la composición gráfica, cómo las señales de entrada se transmiten a lo largo de todo el sistema. A modo de ejemplo, en el panel izquierdo, se muestra el camino seguido por una señal con input  $I_{up} = I_i$ . Las funciones de transferencia del componente río arriba, del módulo ultrasensible, y de la unidad río abajo se muestran en los cuadrantes inferior derecho, superior derecho, y superior izquierdo respectivamente. Se utilizaron los mismos colores y las etiquetas que en el panel (a). Diagrama izquierdo, central y derecho representan los casos de no-limitación, de saturación río arriba y saturación río abajo, respectivamente. Por motivos didácticos, los casos de  $Q_{up} \ll 1$  o/y  $Q_{down} \ll 1$  fueron esquematizados en (b) como restricciones leves ( $O_{max_{up}} \approx EC50_M$  y  $O_{max_M} \approx EC50_{down}$ ), caso contrario las curvas deberían haber sido graficadas como rectas.

Para valores pequeños de  $Q_{up}$  el rango dinámico de entrada del módulo ultrasensible es completamente explorado por la salida del componente río arriba. Del mismo modo, para valores pequeños de  $Q_{down}$ , la saturación del componente río abajo se produce a concentraciones de salida mucho mayores a la salida máxima del módulo central. Por lo tanto, cuando ambos  $Q_{up}$  y  $Q_{down}$  presentan valores mucho menores que la unidad, las curvas de ambos componentes se barren en su zona lineal, por lo que la ultrasensibilidad del sistema total es la misma que la del módulo central en aislamiento (panel izquierdo de la Figura 3.3).

Por otra parte, valores altos del coeficiente de restricción río arriba,  $Q_{up}$ , implican que el  $EC50$  del módulo central es mucho mayor que la concentración máxima de salida producida por el componente río arriba. Como puede verse en el ejemplo representado en el panel central de la Figura 3.3, una severa reducción en el rango de trabajo efectivo del módulo central (es decir, el rango de entradas que en realidad lo estimula) podría tener lugar cuando  $Q_{up} \gg 1$  y  $Q_{down} \ll 1$ . En este caso, diremos que el módulo está en un *régimen de saturación río arriba* o en un *régimen de limitación río arriba*. Teniendo en cuenta el modelo de juguete introducido en la Figura 3.2b, esto correspondería a una situación en la que la respuesta máxima del módulo río arriba ( $Omax_{up} = [B_T]$ ) activa sólo una pequeña fracción de  $[C]$ . En este caso,  $Omax_{up}$  resulta mucho menor que la entrada que necesita el módulo de ultrasensible para lograr su respuesta máxima media (es decir,  $Omax_{up} \ll EC50_M$ ).

Finalmente, grandes valores del coeficiente de restricción río abajo,  $Q_{down}$ , corresponden a configuraciones donde la producción máxima del módulo central es mucho más grande que el  $EC50$  del componente río abajo. Así en el panel derecho de la Figura 3.2, donde  $Q_{down} \gg 1$  y  $Q_{up} \ll 1$ , el rango de salida del módulo central no pueden ser completamente *leído* por la unidad río abajo. En este caso diremos que el módulo está en un *régimen de saturación río abajo* o en un *régimen limitado río abajo*. En el modelo de juguete presentado esto ocurriría cuando una pequeña cantidad de  $[C^*]$  sea suficiente para activar completamente  $[D]$ . Este escenario corresponde al caso en el que la salida máxima del módulo es mucho mayor que la entrada del módulo ultrasensible necesario para lograr la respuesta media máxima ( $Omax_M \gg EC50_{down}$ ) y por lo tanto  $Q_{down} \gg 1$ .

### 3.3.1 Regímenes de restricción en un módulo de Hill

Habiendo introducido los coeficientes  $Q_{down}$  y  $Q_{up}$ , a continuación se analizarán las condiciones en las que el componente río arriba y/o río abajo restringe el rango de trabajo efectivo de un módulo de Hill.

### Restricción Río Abajo

La función de respuesta de un módulo de Hill ultrasensible es:

$$O_M = Omax_M \frac{I_M^{n_H}}{EC50_M^{n_H} + I_M^{n_H}}.$$

Vamos a decir que la unidad de lectura restringe el rango efectivo de trabajo del módulo si:

$$max(O_M) \gg EC50_{down} \quad \text{(Inecuación I)}$$

Donde  $max(O_M)$  es el nivel de salida máximo alcanzado por la unidad de Hill, el cual corresponde al valor de  $O_M$  cuando el modulo río arriba satura (este no debe confundirse con  $Omax_M$ : el nivel máximo de respuesta del módulo de Hill en el aislamiento),

$$max(O_M) = Omax_M \frac{Omax_{up}^{n_H}}{EC50_M^{n_H} + Omax_{up}^{n_H}}$$

De esta manera la Inecuación I puede reescribirse como:

$$Q_{down} \gg 1 + Q_{up}^{n_H}$$

Se puede ver que la inecuación corrobora que para valores pequeños de  $Q_{up}$  (por ejemplo, cuando la unidad río arriba está trabajando en su régimen lineal) obtenemos un régimen de restricción río abajo si  $Q_{down} \gg 1$ .

### Restricción Río Arriba

Por otro lado, vamos a decir que el componente río arriba restringe el rango de trabajo efectivo del módulo a analizar cuando

$$Omax_{up} \ll I_{M,50} \quad \text{(Inecuación II)}$$

Donde  $I_{M,50}$  es la señal de entrada del módulo,  $I_M$ , tal que el modulo río abajo alcance la mitad de su máximo valor  $max(O_{down}) = O_{down}(O_M(I_{M,50}))$

Combinando la inecuación II con esta última se obtiene:

$$Q_{up} \gg \sqrt[n_H]{Q_{down} + 1}$$

En particular, se puede observar que para valores pequeños de  $Q_{down}$ , la condición del régimen de restricción se cumple cuando  $Q_{up} \gg 1$ . Teniendo en cuenta a las desigualdades I y II y con el fin de visualizar los pares de valores  $Q_{up}$ ,  $Q_{down}$  para los que las restricciones río arriba y río abajo ocurren, definimos

$$P_{down} \stackrel{\text{def}}{=} \frac{Q_{down}}{1+Q_{up}^{n_H}}, \text{ and } P_{up} \stackrel{\text{def}}{=} \frac{Q_{up}}{n_H \sqrt{Q_{down}+1}} \quad [3.3]$$

Cuando  $P_{down}$  ( o  $P_{up}$ ) es mucho mayor que uno, la inecuación I (o inecuación II) se cumple, por lo que estaremos en un régimen de restricción río abajo (o río arriba). En la Figura 3.4 mostramos los *heat-maps* de  $P_{down}$  (panel izquierdo) y  $P_{up}$  (panel derecho) al variar  $Q_{up}$  y  $Q_{down}$ .

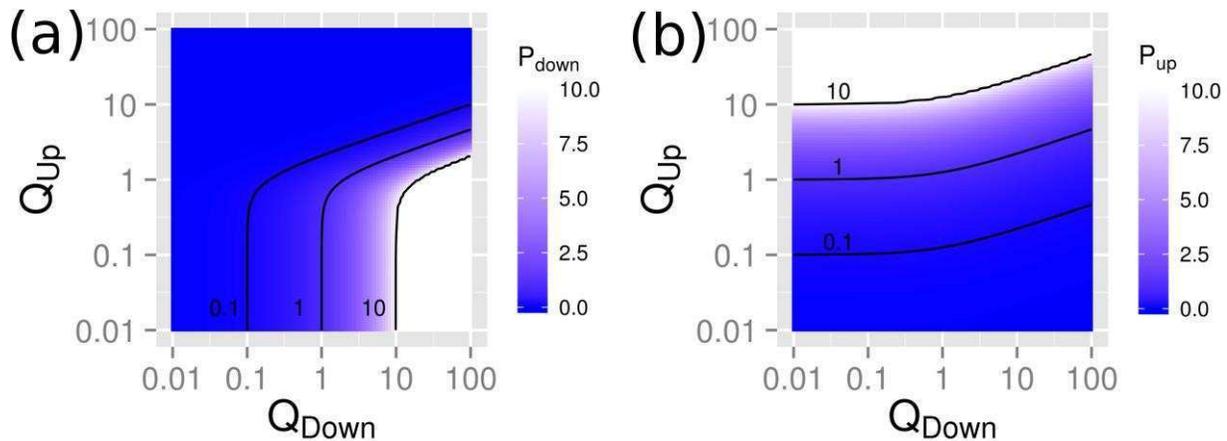


Figura 3.4 *Heat-maps* de  $P_{down}$  y  $P_{up}$  como una función de  $Q_{up}$  y  $Q_{down}$  se muestran en los paneles (a) y (b), respectivamente. Con el fin de mejorar la visualización saturamos el código de color de  $P_{down}$  y  $P_{up}$  a 10, esto significa que las regiones blancas tienen valores de  $P_{down}$  o  $P_{up}$  igual o mayor que 10, resaltando así las regiones donde las restricciones río abajo (a) y río arriba (b) ocurren. Resulta interesante notar que no hay superposición entre las regiones de restricción río arriba y río abajo. Para ambos paneles se utilizó un  $n_H = 3$ .

Resulta interesante notar que las inecuaciones I y II no pueden sostenerse al mismo tiempo, es decir que no hay superposición entre las regiones de restricción río arriba y río abajo. La determinación de las regiones del espacio  $(Q_{down}, Q_{up})$  en donde existe restricción nos resultará de especial interés a la hora de analizar el efecto de estos sobre la ultrasensibilidad del sistema de 3 módulos.

Relaciones equivalentes a las inecuaciones I y II pueden establecerse para estudiar las condiciones en las que las unidades río arriba y río abajo trabajan en sus regímenes lineales. Podemos decir que el componente de río arriba trabaja en su régimen lineal cuando

$$\max(O_M) < EC50_{down} \quad (\text{Inecuación III})$$

Que resulta en la siguiente condición:

$$Q_{down} < 1 + Q_{up}^{n_H}$$

Por otro lado, para el componente de río abajo para trabajar en un régimen lineal debe cumplirse la siguiente expresión:

$$\frac{O_{max_{up}}}{2} > I_{M,50} \quad (\text{Inecuación IV})$$

Que resulta en:

$$Q_{up} < \frac{1}{2}^{n_H} \sqrt{Q_{down} + 1}$$

### 3.4 Efectos de la restricción de los rangos dinámicos sobre la ultrasensibilidad en módulos del tipo Hill

Tanto en los escenarios de *saturación río arriba* como *saturación río abajo*, los procesos de entrada y de salida pueden limitar el rango dinámico efectivamente explorado por el módulo sigmoidal. Por esta razón las características de la ultrasensibilidad local de la función de transferencia resultan relevantes para entender el comportamiento global del sistema. Para ilustrar este punto, realizaremos un análisis sistemático de la ultrasensibilidad de diversos módulos de respuesta sigmoidal, acoplados a la entrada y salida de módulos hiperbólicos bajo diferentes condiciones de restricción de los rangos dinámicos. Comenzamos analizando en esta sección el caso en el que la función de la respuesta del módulo central ultrasensible se describe por una función de Hill. En las próximas secciones extenderemos el análisis para el caso general y luego aplicaremos este procedimiento a varios motivos ultrasensibles, cuyas funciones de transferencia se pueden derivar de sus correspondientes modelos mecanísticos.

El uso de funciones de Hill para ajustar los datos experimentales es una práctica bastante común. Por ello, como primer caso de estudio, analizaremos el impacto de las restricciones del rango dinámico de entrada y salida para este sistema. Sin pérdida de generalidad, cuando sea necesario consideraremos un módulo de Hill con  $n_H = 3$ .

Comenzamos nuestro análisis escribiendo la expresión de la señal de salida del sistema como función de la señal de entrada,  $O_{down}(I_{up})$  calculado a través de una composición matemática de la función de transferencia del módulo de Hill ( $F_{Hill}(x) = O_{max} \frac{x^{n_H}}{EC50^{n_H} + x^{n_H}}$ ) con las funciones de transferencia hiperbólicas ( $F_{hip,i}(x) = O_{max_i} \frac{x}{EC50_i + x}$ , donde el subíndice  $i$  denota si el módulo es el de río abajo o río arriba)

$$\begin{aligned}
O_{down} &= F_{hip,down}(F_{Hill}(F_{hip,up}(I_{up}))) \\
O_{down} &= \underbrace{O_{max_{down}} \frac{Q_{down}}{Q_{down} + 1}}_{\dots} \frac{y^{n_H}}{(1+y)^{n_H} \frac{Q_{up}^{n_H}}{1+Q_{down}} + y^{n_H}} \quad [3.4] \\
&= \tilde{O}_{max_{down}} \frac{y^{n_H}}{(1+y)^{n_H} \kappa^{n_H} + y^{n_H}}
\end{aligned}$$

Donde  $\tilde{O}_{max_{down}} = O_{max_{down}} \frac{Q_{down}}{Q_{down} + 1}$ ,  $\kappa = \frac{Q_{up}}{\sqrt[n_H]{1 + Q_{down}}}$  e  $y = \frac{I_{up}}{EC50_{up}}$

De las ecuaciones [2.7] y [3.4], obtenemos la siguiente expresión analítica para el coeficiente de Hill del sistema,  $\eta$ :

$$\eta(q_{down}, Q_{up}, n_H) = \frac{\log 81}{\log \left( \frac{y_{90}}{y_{10}} \right)} = \frac{\log 81}{\log \frac{(10 + 9\kappa^{-n_H})^{1/n_H} - 1}{\left( \frac{10}{9} + \frac{1}{9}\kappa^{-n_H} \right)^{1/n_H} - 1}}, \quad [3.5]$$

donde  $y_{10}$  e  $y_{90}$  son los valores de  $y$  que producen un 10% y 90% de  $\tilde{O}_{max_{down}}$  en la ecuación [3.5].

Vale la pena señalar que  $\kappa = P_{up}$  (definida en [3.3]). Esto significa que para el caso de la función de Hill, las restricciones del rango dinámico río arriba están directamente relacionadas con la disminución de la ultrasensibilidad global observada.

La Figura 3.5a muestra la dependencia de la sensibilidad global del sistema,  $\eta$ , con el parámetro  $\kappa$  dado por la ecuación [3.5]. Se puede observar que el aumento  $\kappa$  resulta en una pérdida de la sensibilidad del sistema, hasta un punto en el que para  $\kappa \gtrsim 1$ , el efecto de restricción del rango dinámico está completamente desarrollado y el sistema global alcanza su sensibilidad mínima. Notablemente, para  $\kappa \ll 1$  la sensibilidad del sistema es igual a la del módulo central del tipo Hill.

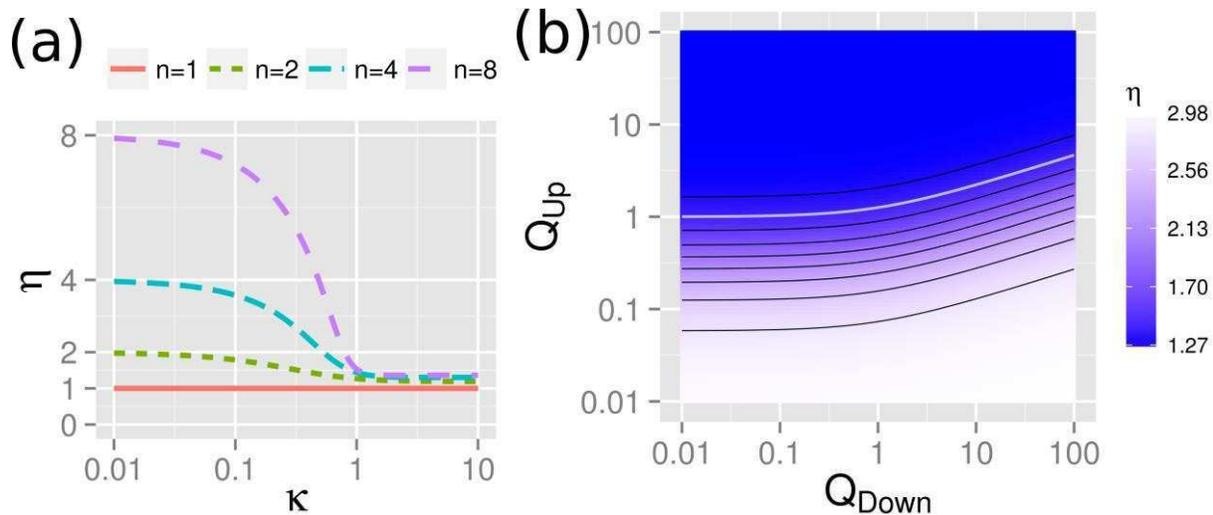


Figura 3.5 (a) Dependencia del coeficiente de Hill del Sistema,  $\eta$ , con el parámetro  $\kappa$  (ver ecuación [3.5]) estimada para varios valores del coeficiente de Hill.  $n_H = 1, 2, 4$  y  $8$  se muestran en rojo, verde, cian y violeta respectivamente. Se puede observar que, para  $\kappa > 1$  la sensibilidad del sistema está fuertemente atenuada, mientras que para  $\kappa \ll 1$  esta reducción de la sensibilidad no se observa. (b) *Heat-maps* del coeficiente de Hill de sistema,  $\eta$ , en función de  $Q_{up}$  y  $Q_{down}$ , para una función de Hill con  $n_H = 3$ .

La ecuación [3.5] revela que para este sistema en particular y para un dado valor de  $n_H$ , el efecto de las restricciones río arriba y río abajo sobre la sensibilidad del sistema es de hecho una función de un solo parámetro,  $\kappa$ . Notablemente, este parámetro es proporcional al coeficiente de restricción  $Q_{up}$ , pero disminuye al incrementar  $Q_{down}$ . De esta manera, se puede observar que para este tipo de módulos, las restricciones río arriba reducen el nivel de sensibilidad del sistema, mientras que las restricciones posteriores tienden a preservarla. Con el fin de analizar más a fondo este resultado vale la pena describir el comportamiento del sistema en función de los coeficientes  $Q_{up}$  y  $Q_{down}$ . Además, esto nos permitirá establecer comparaciones significativas con el análisis de otros motivos ultrasensibles, para los que una expresión analítica no se puede desarrollar fácilmente.

En la Figura 3.5b se presenta una caracterización sistemática en código de color de la ultrasensibilidad efectiva del módulo de Hill, calculada numéricamente mediante la ecuación [3.5] como función de los coeficientes  $Q_{up}$  y  $Q_{down}$ . Una línea de  $\kappa(Q_{down}, Q_{up}) = 1$  se incluyó en el panel (línea gris) para delimitar la zona (superior) de notoria reducción de la ultrasensibilidad.

Se puede observar que, en ausencia de restricciones en los rangos dinámicos ( $Q_{down}, Q_{up} \ll 1$ , región inferior izquierda de la figura 2.6b) la sensibilidad estimada del sistema es igual a la del módulo central en aislamiento ( $n_H=3$ ). Este comportamiento es consistente con lo obtenido en las curvas de la Figura 3.5a en la región  $\kappa \ll 1$ .

Por otra parte, como se esperaba, de la ecuación [3.5] y de la dependencia de  $\kappa$  con  $Q_{up}$  y  $Q_{down}$ , se puede reconocer en la Figura 3.5b que las limitaciones río arriba y río abajo tienen diferentes efectos sobre el comportamiento del sistema. Para un nivel de  $Q_{down}$  dado, se observa una clara disminución de la ultrasensibilidad del sistema para valores crecientes del coeficiente de restricción río arriba,  $Q_{up}$ . Por el contrario, para un valor de  $Q_{up}$  dado, un aumento en el valor del coeficiente de restricción río abajo  $Q_{down}$ , corresponde a una disminución del parámetro  $\kappa$ , y resulta en un incremento de la ultrasensibilidad del sistema.

### 3.5 Análisis de los regímenes de alta restricción

#### 3.5.1 Estudio en un módulo de Hill

En las situaciones cuando  $Q_{up} \gg 1$  y/o  $Q_{down} \gg 1$  diremos que estamos en un régimen de alta restricción. En este régimen el rango de inputs efectivamente barrido por el módulo de Hill se limita a la región de inputs pequeños (ver Figura 3.3). En cualquiera de estos escenarios de restricción, la función de respuesta del módulo central puede ser aproximado por:

$$O_M = Omax_M \frac{I_M^{n_H}}{EC50_M^{n_H} + I_M^{n_H}} \sim \frac{Omax_M}{EC50_M^{n_H}} I_M^{n_H} \quad [3.6]$$

Donde  $I_M$  es la señal de entrada del módulo central,  $M$ , a analizar.

Siguiendo la misma línea de trabajo que en la sección 3.3.1, a partir de la Inecuación I se obtiene que la unidad río abajo restringe el rango efectivo de trabajo del módulo siempre que  $Q_{down} \gg Q_{up}^{n_H}$ . En este caso la condición  $\kappa \ll 1$  se satisface y por ende no se espera una reducción en la ultrasensibilidad del sistema. Por consiguiente, para situaciones en las que la salida del componente río abajo alcanza la saturación, y el módulo río arriba funciona en su régimen lineal (es decir,  $I_{up}$  trabaja en la región lineal de la función de transferencia de la unidad río arriba) la función de respuesta de la unidad de entrada puede ser aproximada por  $O_{up}(I_{up}) \sim Omax_{up} I_{up} / EC50_{up}$ , y la función de transferencia del sistema completo resulta en:

$$O_{down}(O_M(O_{up}(I_{up}))) \sim O_{down}^{max} \frac{y^{n_H}}{\sigma^{n_H} + y^{n_H}} \quad [3.7]$$

Donde  $y = \frac{I_{up}}{EC50_{up}}$  y  $\sigma = \frac{Q_{up}}{n_H \sqrt{Q_{down}}}$ . La ecuación [3.7] muestra que bajo este régimen y cuando es el módulo de lectura el que satura, el sistema responde como una función de Hill con  $\eta = n_H$ . La situación analizada corresponde a la región inferior derecha de la Figura 3.5b, donde, como era de esperar, los valores de  $\eta$  hallados numéricamente resultan cercanos a  $n_H$ .

Por otro lado, a partir de la Inecuación II se obtiene que la saturación tiene lugar en la unidad río arriba cuando  $Q_{up} \gg \sqrt[n_H]{Q_{down}}$ . Esto corresponde a  $\kappa \gg 1$ , por lo que se espera que el sistema alcance niveles de ultrasensibilidad mínimos (ver Figura 3.5a). En este caso el componente río arriba satura y, por el contrario, el componente de lectura opera casi en el régimen lineal, por lo que podemos hablar de un *régimen de saturación río arriba*. La función de respuesta del componente río abajo se puede aproximar por  $O_{down}(I_{down}) \sim Omax_{down}I_{down}/EC50_{down}$ , y a su vez la función de transferencia del sistema se puede expresar como

$$O_{down}(O_M(O_{up}(I_{up}))) \sim \frac{Omax_{down}}{\sigma^{n_H}} \left[ \frac{y}{1+y} \right]^{n_H} \quad [3.8]$$

Se puede observar ahora, que la ecuación no tiene una forma funcional del tipo Hill. En la Figura 3.6 se muestra la ultrasensibilidad del sistema,  $\eta$ , en función  $n_H$  para la curva de la ecuación [3.8]. Aquí se puede observar que en un régimen de saturación río arriba, para  $n_H > 1$ , la ultrasensibilidad del sistema resulta mucho menor que la del módulo en aislamiento. Esto último se encuentra en concordancia con el comportamiento que se observa en la Figura 3.5a. Este régimen de trabajo corresponde a toda la zona superior en la Figura 3.5b, donde se cumple  $Q_{up}^{n_H} \gg Q_{down}$ .

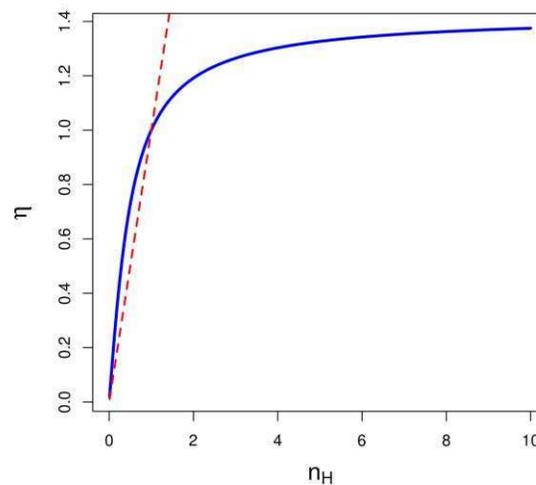


Figura 3.6 Ultrasensibilidad del sistema,  $\eta$ , en función  $n_H$  para la aproximación de ley de potencias en el régimen de saturación río arriba. En línea roja punteada se muestra la recta identidad. Se puede observar que en un régimen de saturación río arriba, para  $n_H > 1$ , la ultrasensibilidad del sistema resulta mucho menor que la del módulo en aislamiento

### 3.5.2 Estudio del caso general

El análisis presentado anteriormente puede generalizarse fácilmente para funciones sigmoideas que, como en el caso de las funciones de Hill, pueden aproximarse en el rango de inputs pequeños (es decir, el rango de inputs en el que realmente trabaja en situaciones de restricción río arriba y río abajo) por:

$$O_M \sim A I_M^n \quad [3.9]$$

Donde  $n$  es una constante positiva que refleja el orden polinomial promedio de la función de transferencia en valores de inputs pequeños, y  $A$  es una constante de proporcionalidad.

Siempre que se cumpla la ecuación [3.9], las ecuaciones [3.7] y [3.8], que resultan válidas para los casos de saturación río abajo y río arriba respectivamente, se pueden reescribir en las siguientes expresiones:

$$O_{down}(O_M(O_{up}(I_{up}))) \sim O_{max_{down}} \frac{y^n}{\frac{O_{max_M} Q_{up}^n}{A EC50_M^n Q_{down}} + y^n} \quad [3.10]$$

$$O_{down}(O_M(O_{up}(I_{up}))) \sim \frac{O_{max_{down}}}{\frac{O_{max_M} Q_{up}^n}{A EC50_M^n Q_{down}}} \left[ \frac{y}{1+y} \right]^n \quad [3.11]$$

Resulta importante remarcar que para un dado modulo ultrasensible a analizar, es el orden polinomial medio para valores de entrada pequeños,  $n$ , que aparece en [3.9], y no el coeficiente de Hill,  $n_H$ , lo que determina el valor de la sensibilidad efectiva del sistema.

La ecuación [3.10] indica que la curva dosis-respuesta del sistema es del tipo Hill, y más importante aún se obtiene un exponente de Hill de  $\eta = n$  (y no  $n_H$ ). Es importante destacar que esto significa que la saturación río abajo podría producir un comportamiento supra-multiplicativo en las funciones de transferencia que tengan un orden polinómico en inputs pequeños, mayor que la ultrasensibilidad global de la curva,  $n_H$  (es decir, que satisfacen  $n > n_H$ ).

Dado que el coeficiente de Hill  $n_H$  es la media armónica de los coeficientes de Hill por izquierda y derecha, este tenderá hacia valores cercanos al mínimo entre  $n_H^L$  and  $n_H^R$ . Por lo tanto, para las funciones de transferencia ultrasensible por izquierda (para las que  $n_H^L > n_H^R$ ), se espera que se cumpla  $n \sim n_H^L > n_H$ . Por lo tanto, las unidades ultrasensibles por izquierda son, en principio, capaces de mostrar un comportamiento supra-multiplicativo bajo situaciones de restricción río abajo. Como se estudiará con más detalle en las siguientes secciones, esta última

observación es particularmente relevante para varios motivos bioquímicos con ultrasensibilidad por izquierda, como por ejemplo: módulos de Goldbeter-Koshland asimétricos, unidades ultrasensibles basadas en titulación y en pasos de activación múltiple.

### 3.6 Análisis de módulos ultrasensibles de relevancia biológica

#### 3.6.1 Módulos del tipo Goldbeter-Koshland

Como hemos comentado en la introducción, el término ultrasensibilidad fue, de hecho, acuñado originalmente por Goldbeter y Koshland (GK) para describir las capacidades de amplificación de los ciclos de modificación covalente, como la fosforilación-desfosforilación [Goldbeter y Koshland 1981]. Para estos sistemas, GK derivaron una expresión analítica de la función de respuesta correspondiente válida cuando las enzimas están en concentración mucho más baja que la de sus sustratos (ecuación [2.5]). Más aun, mostraron que un aumento sustancial de la ultrasensibilidad del sistema puede ser observado cuando ambas especies, quinasas y fosfatasa, están saturadas ( $K_1 < 1$  y  $K_2 < 1$ ). Este motivo en particular ha recibido mucha atención en la literatura, ya que cumple el rol de bloque elemental en las cascadas de señalización.

A la función de GK se le puede calcular analíticamente su coeficiente de Hill (ecuación [2.7]), obteniéndose

$$n_H = \frac{\log(81)}{\log\left(\frac{(9 + 90K_1)(9 + 90K_2)}{(9 + 10K_1)(9 + 10K_2)}\right)} \quad [3.12]$$

Con el fin de analizar el efecto de las limitaciones del rango dinámico en este importante motivo, hemos considerado un módulo ultrasensible del tipo GK donde ambas, kinasa y fosfatasa, se encuentran saturadas al mismo nivel (sin pérdida de generalidad fijamos los parámetros del sistema para obtener un  $n_H = 3$ ). Para este módulo ultrasensible se procedió a estimar numéricamente la ultrasensibilidad utilizando la ecuación [3.12] del sistema general,  $\eta$ , en diferentes escenarios de restricción río arriba y río abajo (ver Figura 3.7).

El resultado del análisis realizado en la sección 3.5.2, nos planteaba que cuando el sistema presenta efectos de saturación en las unidades de entrada y/o de lectura, el rango de trabajo efectivo del módulo se limita a la región de Inputs pequeños. Sin embargo, a diferencia de la función de Hill, en este caso el orden polinomial de la función GK tiende a  $n = 1$  para inputs suficientemente bajos. Como consecuencia, para este módulo hay una pérdida de ultrasensibilidad, no sólo para los *regímenes de limitación río arriba* ( $Q_{up} \gg 1$ ), sino también en los *regímenes de limitación río abajo* ( $Q_{down} \gg 1$ , ver región inferior derecha en los distintos paneles de la Figura 3.7).

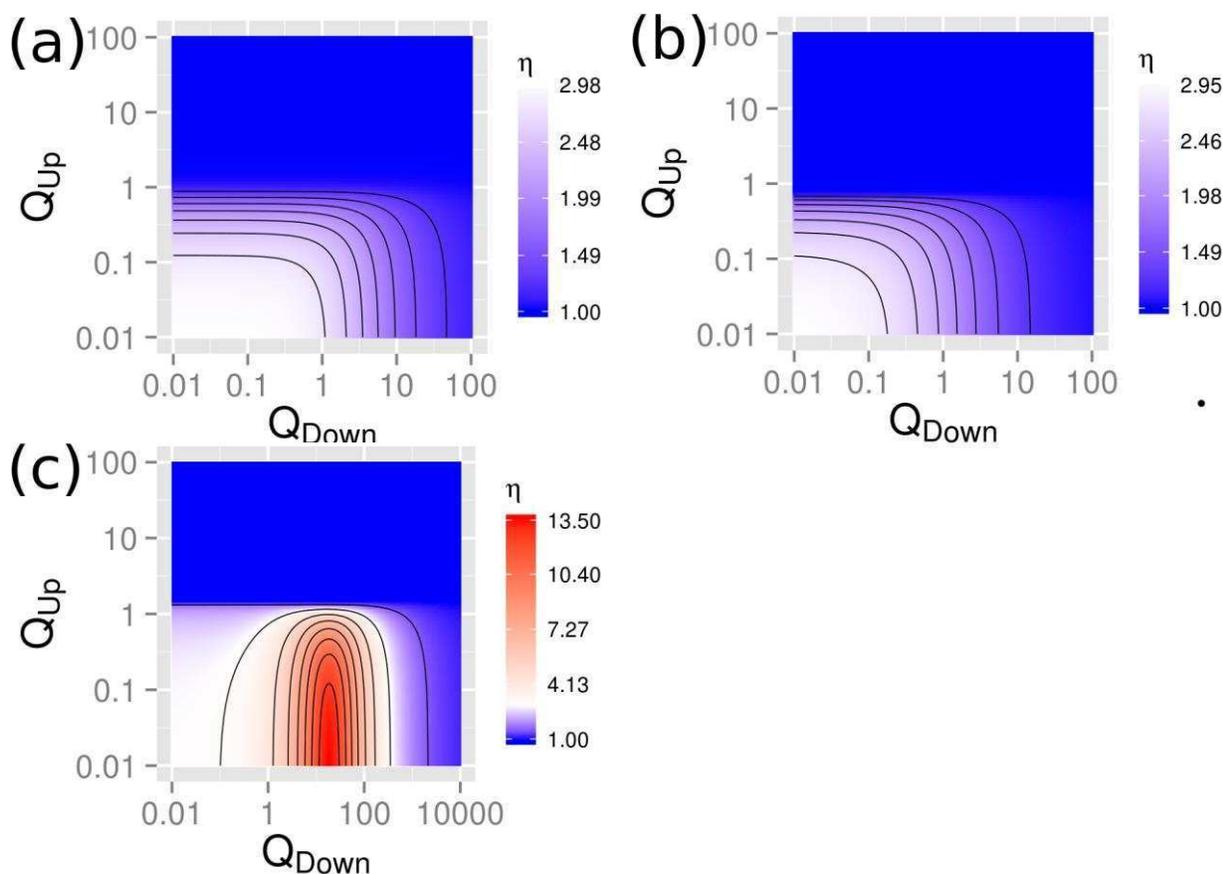


Figura 3.7 Heat-maps del coeficiente de Hill del sistema ( $\eta$ ) de módulos ultrasensibles de GK acoplados a componentes de entrada y salida hiperbólicos calculados para diferentes parámetros y barriendo en  $Q_{up}$  y  $Q_{down}$ . (a) Módulo de GK simétrico con  $K_1 = K_2 = 0.14$ . (b) Módulo de GK ultrasensible por derecha, con  $K_1 = 0.001$  y con  $K_2 = 0.63$ . (c) Módulo de GK ultrasensible por izquierda, con  $K_1 = 0.63$  y con  $K_2 = 0.001$ . Las funciones de transferencia y los coeficientes de respuesta de estos módulos en aislamiento están mostrados en la Figura 3.1c. Todos los paneles tienen el mismo código de color y las curvas de nivel de (a) y (b) tienen representados los mismos valores de  $\eta$ , mientras que en (c) se utilizaron otros valores.

Es interesante analizar las funciones de GK asimétricas, donde sólo una de las enzimas está saturada (es decir, ya sea que la fosfatasa esté saturada y no la kinasa, o que la kinasa esté saturado y no la fosfatasa). Como ya mencionamos, en estos casos las curvas dosis-respuesta resultan *ultrasensibles por izquierda* o *por derecha* (ver sección 3.2). Los casos de *ultrasensibilidad por derecha* y *simétricos* no presentan diferencias cualitativas en su comportamiento (Figura 3.7a-b). Sin embargo, surgen diferencias notables en el efecto de las restricciones impuestas sobre el rango dinámico del módulo central para el caso de una función de GK ultrasensible por izquierda (Figura 3.7c). Una pérdida de ultrasensibilidad se puede observar para los regímenes de *limitación río arriba*, al igual que para el caso simétrico (zona superior de la Figura 3.7c). Sin embargo, para niveles intermedios de *saturación río abajo* y en ausencia de *saturación río arriba* (parte inferior central de la Figura 3.7c) se puede observar un fuerte aumento en la ultrasensibilidad del sistema. En este régimen, el rango de lectura se localiza en la parte más sensible de la curva ultrasensible

por izquierda, aumentando la sensibilidad efectiva del sistema. Para mayores valores del coeficiente de *restricción río abajo*, el rango de lectura se reduce aún más, localizándose en la región en la cual la curva presenta un comportamiento lineal ( $n = 1$ ), por lo que la ultrasensibilidad del sistema resulta del orden de la unidad  $\eta = 1$  (parte inferior derecha de la Figura 3.7c).

### 3.6.2 Módulos de activación de pasos múltiples

En un módulo de activación de pasos múltiples, una señal de entrada regula simultáneamente más de un proceso bioquímico, produciendo así una respuesta sinérgica a la salida [Zhang et al 2013]. Estos motivos son relevantes en muchas situaciones biológicas, por ejemplo, para procesos de fosforilaciones múltiples distributivas [Gunawardena 2005] o en un contexto de regulación génica, cuando la región promotora del gen objetivo de un cierto factor de transcripción tiene múltiples sitios de unión [Rippe 1997]. Aquí analizamos una instancia de este último escenario, pero se pueden obtener conclusiones equivalentes en sistemas de fosforilación múltiple cuando las reacciones no se encuentran saturadas [Gunawardena 2005].

Consideremos el módulo transcripcional esquematizado en la Figura 3.8, Aquí A es el factor de transcripción, y B, el ARNm inducido por el promotor al que el factor de transcripción se une.

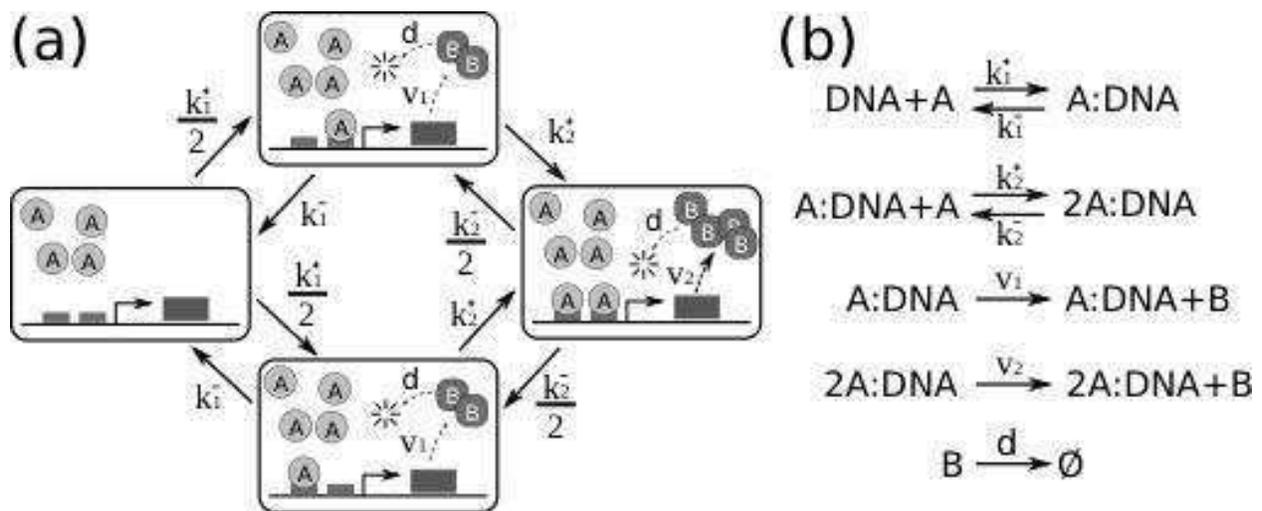


Figura 3.8 Modelo simplificado de un factor de transcripción A, el cual se puede unir a un promotor con múltiples sitios de unión. (a) Esquema, (b) reacciones bioquímicas.

Asumiendo una cinética según la ley de acción de masas, la función de transferencia del módulo en estado estacionario resulta:

$$O_M(A) = \frac{1}{d} \frac{v_1 K_2 A + v_2 A^2}{K_1 K_2 + K_2 A + A^2} \quad [3.13]$$

Donde  $K_i = k_i^- / k_i^+$  es la constante de disociación en equilibrio para el sitio de unión  $i$ -ésimo. En el caso donde  $v_i \sim 0$  (es decir, cuando la transcripción de ARNm puede asumirse despreciable cuando hay un único sitio ocupado), el módulo puede alcanzar una ultrasensibilidad máxima,  $n_H = 2$ , en el límite de  $K_1 \gg K_2$ , que corresponde a un escenario de alta cooperatividad entre sitios de unión [Rippe1997]. Por otro lado, para  $K_1 \ll 1$  la respuesta tiende hacia una forma funcional hiperbólica, presentando así un  $n_H = 1$ .

Vale la pena señalar que el orden polinomial (es decir, el *coeficiente de respuesta*) de la función de transferencia en la región de inputs pequeños es cuadrático. Como hemos descrito anteriormente (subsección 3.5.2, ecuación [3.10]), esto implica que en un régimen de restricción río abajo, este módulo podría lograr una sensibilidad efectiva de  $\eta \sim n = 2$ . Cabe destacar que esto surge directamente de una propiedad estructural del módulo, independientemente de la elección particular de los valores de los parámetros. Esto significa que incluso en el caso de no-cooperatividad (por ejemplo, si  $K_1 \sim K_2$  se puede obtener la ultrasensibilidad máxima de  $\eta \sim 2$  en el régimen en el que satura el módulo de lectura. En la Figura 3.9a mostramos la función de transferencia correspondiente a la ecuación [3.13], para una elección de valores de los parámetros internos compatibles con una sensibilidad del módulo de  $n_H = 1,36$ . La función de respuesta presenta una ultrasensibilidad por izquierda (con  $n_H^L = 1.55$  y  $n_H^R = 1.21$ ), y como hemos señalado, la sensibilidad del sistema global podría aumentar bajo un régimen de saturación río abajo. Para ilustrar este punto, en la Figura 3.9b se muestra el análisis de la sensibilidad del sistema de tres módulos. Como era de esperar, se puede apreciar que para valores grandes del coeficiente de restricción río abajo, se puede lograr un nivel de sensibilidad de  $\eta = 2$ , de manera similar a lo que podría haber sido obtenido a partir de un módulo aislado que presente altos niveles de cooperatividad.

Este resultado es de especial interés en el diseño de sistemas sintéticos, ya que los procesos de pasos múltiples son muy usados en la biología sintética para generar las no-linealidades necesarias para producir otros comportamientos más complejos [Ferrell y Ha 2015, Gardner 2000, Hooshangi 2005]

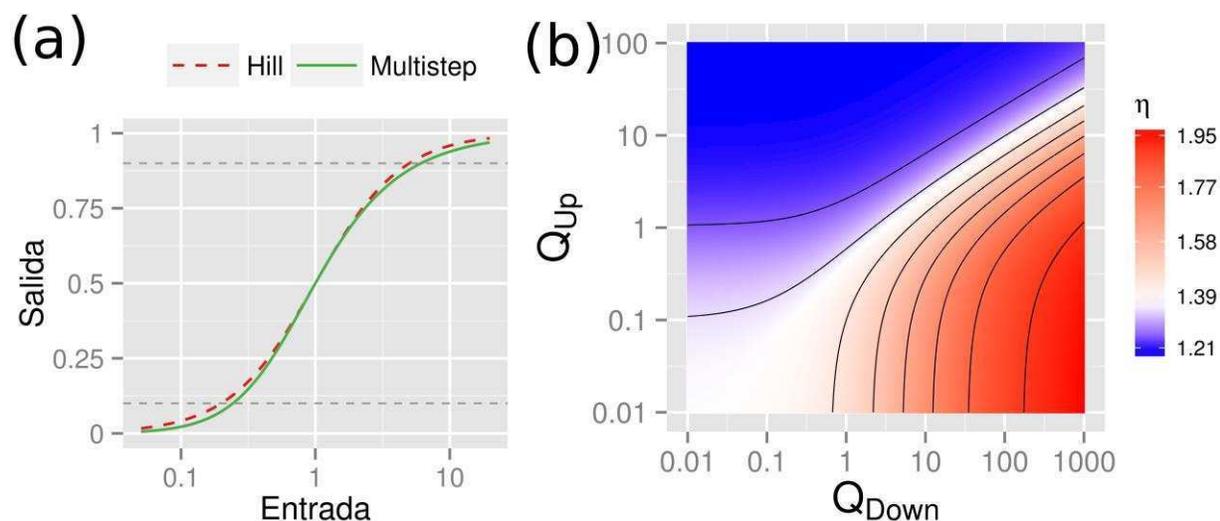


Figura 3.9 (a) Función de transferencia de un módulo de activación de pasos múltiples (ecuación [3.13], con  $v_1=0$  y  $v_2=K_1=K_2=\delta=1$ ) comparada con una función de Hill con el mismo coeficiente de Hill,  $n_{Hill}=1.36$ . Estas curvas se muestran graficadas con un trazo verde continuo, y rojo punteado, respectivamente. A pesar de que ambas curvas presenten el mismo  $n_H$ , la curva de activación de pasos múltiples tiene un coeficiente de Hill izquierdo mayor, y un coeficiente de Hill derecho menor (con  $n_H^L = 1.55$  y  $n_H^R = 1.21$ ). (b) *Heat-map* de coeficiente de Hill del sistema para el mismo módulo de activación de pasos múltiples representado en el panel (a). Se puede observar que, en presencia de saturación río abajo ( $Q_{down} \gg 1$  y  $Q_{up} \ll 1$ ), el sistema muestra un valor de sensibilidad efectiva  $\eta \sim 2$ , lo que era esperado debido a que la función de transferencia presenta un comportamiento cuadrático a inputs pequeños.

### 3.6.3 Módulo de inhibición estequiométrica o titulación

La titulación molecular, o procesos de inhibición estequiométricos, pueden conducir a un comportamiento ultrasensible (ver Figura 3.10) si un inhibidor  $B$  es abundante y tiene una alta afinidad por una especie de señalización  $A$  [Ferrell 1996, Buchler y Louis 2008]. A concentraciones bajas de  $A$  total ( $A_T$ ), se encontrará toda en su forma inactiva acomplejada a  $B$ ,  $B:A$ . Esto será cierto hasta el punto en el que  $B$  libre se agote en favor de la forma acomplejada con  $A$ . En este punto umbral  $B$  pierde su capacidad de “buffering” por lo que un pequeño incremento de la señal,  $A_T$ , resultará en incremento de  $A$  disponible para la activación de su objetivo río abajo, dando lugar a un aumento considerable de la función de respuesta. Como ejemplo de este motivo ultrasensible, estudiamos un modelo simple de titulación y respuesta transcripcional propuesto por Buchler y Cross [Buchler y Cross 2009] (ver Figura 3.10).

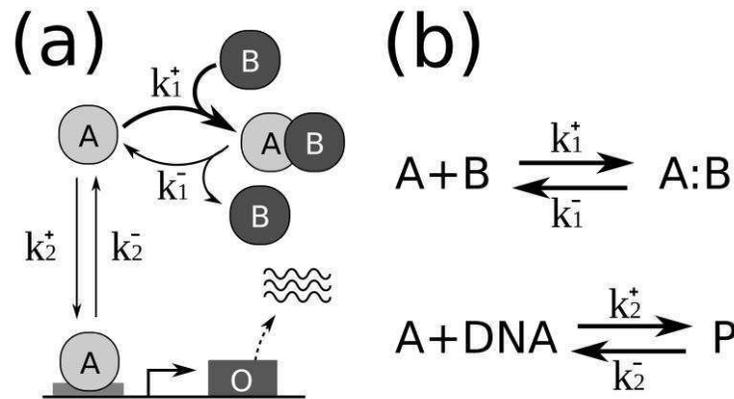


Figura 3.10 Modelo simple de titulación y respuesta transcripcional. El factor de transcripción activo A es secuestrado por el inhibidor estequiométrico B en un estado acomplejado A:B que no puede unirse al ADN. (a) Esquema, (b) reacciones bioquímicas.

Consideremos el modelo presentado por Buchler y Cross [Buchler y Cross 2009], donde un inhibidor  $B$  tiene una alta afinidad por un factor de transcripción  $A$  para formar un complejo inactivo  $B:A$ . Estamos interesados en la caracterización de la respuesta transcripcional del sistema, es decir, la concentración de un reportero de ARNm,  $O$ , como función de la concentración total del factor de transcripción  $A$ ,  $A_T$ .

Utilizando la ley de acción de masas, la dinámica de pegado y despegado se puede expresar con una ecuación diferencial y dos leyes de conservación:

$$\frac{d(B:A)}{dt} = A \cdot B \cdot k_1^+ - k_1^- \cdot B:A$$

$$A_T = A + B:A$$

$$B_T = B + B:A$$

La concentración de equilibrio de  $A$  se obtiene de combinar las tres ecuaciones y plantear

$$\frac{d(B:A)}{dt} = 0$$

Obteniéndose,

$$A = \frac{A_T - B_T - K_d + \sqrt{(A_T - B_T - K_d)^2 + 4 A_T K_d}}{2} \quad [3.14]$$

Donde  $K_d = k_1^- / k_1^+$  es la constante de disociación de la reacción. Además,  $A$  también puede unirse a un sitio de unión al ADN, por ello se define  $P_0$  y  $P_1$  como la probabilidad fracción de tiempo en la cual el promotor está en su estado desocupado y ocupado, respectivamente. La evolución

temporal de ambos estados está dado por

$$\begin{aligned}\frac{dP_0}{dt} &= k_2^- P_1 - k_2^+ A P_0 \\ \frac{dP_1}{dt} &= k_2^+ A P_0 - k_2^- P_1\end{aligned}\quad [3.15]$$

y sus correspondientes equilibrios resultan:

$$\begin{aligned}P_0 &= \frac{\epsilon}{\epsilon + A} \\ P_1 &= \frac{A}{\epsilon + A}\end{aligned}\quad [3.16]$$

Donde  $\epsilon = k_2^- / k_2^+$ . Consideremos también, que cuando el promotor se encuentra en el estado  $i$ -ésimo la tasa de producción del ARNm es  $a_i$ , resultando la tasa de síntesis de ARNm,  $O$  en:

$$O = a_0 P_0 + a_1 P_1 = \frac{a_0}{1 + A/\epsilon} + a_1 \frac{A}{\epsilon + A}\quad [3.17]$$

Finalmente, cuando la actividad de transcripción basal resulta despreciable (es decir, ningún mensajero se produce cuando el promotor está en su estado libre,  $P_0$ ,  $a_0=0$ ) la tasa transcripcional inducida viene dada por la siguiente expresión

$$O = O_{max} \frac{A}{\epsilon + A}\quad [3.18]$$

Donde  $O_{max}$  es la tasa máxima de transcripción del ARNm y viene dada por la tasa de transcripción del promotor unido a  $A$  ( $O_{max} = a_1$ ).

En la Figura 3.11 se muestra la función de respuesta del módulo,  $O = O(A_T)$ , para un caso en el que el efecto de “buffering” de B resulta considerable ( $\frac{K_d}{B_T} \ll 1$ ). Como se puede observar, la curva dosis-respuesta tiene un umbral dado por  $A_T \sim B_T$  (en valores cercanos a 100 en la Figura 3.11a). Además, la función de transferencia del módulo resulta fuertemente asimétrica ( $n_H=2$ ,  $n_H^L=3.7$ ,  $n_H^R=1.4$ ). Esto implica que si el módulo de lectura impone limitaciones en el rango dinámico efectivo, la ultrasensibilidad por izquierda de la función de respuesta del módulo puede ser explotada para producir una mayor sensibilidad en el sistema.

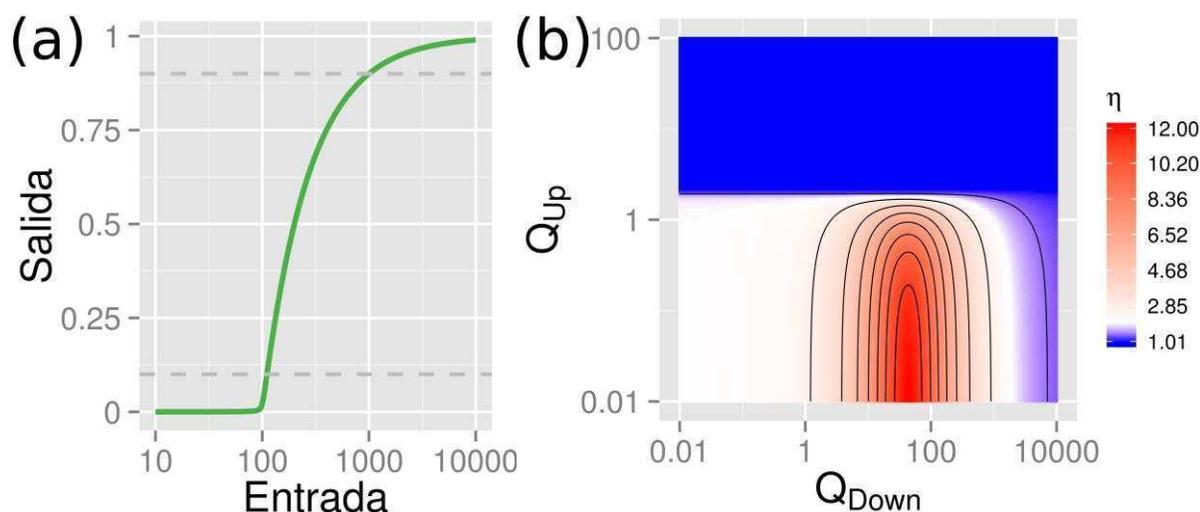


Figura 3.11 (a) Función de transferencia del módulo de titulación,  $O = O(A_T)$  (ecuaciones [3.17] y [3.18]), con  $O_{max}=1$ ,  $B_T=100$ ,  $K_d = k_1^- / k_1^+ = 0.05$  y  $\epsilon = k_2^- / k_2^+ = 100$ . Se observa que la curva presenta una marcada ultrasensibilidad por izquierda. (b) Heat-map del coeficientes de Hill del sistema,  $\eta$ , para un módulo titulación con los mismos parámetros que en el panel (a). Como fue el caso para otras funciones de respuesta ultrasensibles por izquierda (por ejemplo, el caso de funciones de GK asimétricas mostradas en la Figura 3.7c) un marcado aumento en la sensibilidad global surge para restricciones río abajo moderadas. Debido al carácter lineal mostrado por la función de transferencia para niveles de inputs pequeños, la sensibilidad del sistema tiende a  $\eta = 1$  para situaciones de restricción río abajo extremas ( $Q_{down} \gg 1$  y  $Q_{up} \ll 1$ ).

Como hemos explicado, el coeficiente de Hill por izquierda,  $n_H^l$ , es también una medida global, y por lo tanto puede no reflejar la existencia de niveles mucho más altos de ultrasensibilidad local. Se puede observar que este es el caso, donde a pesar de que se tiene una ultrasensibilidad por izquierda de solamente  $n_H^l = 3.7$ , se puede obtener una ultrasensibilidad global efectiva de alrededor de 12 en un régimen de restricción río abajo. En la Figura 3.11b, se obtiene un aumento de hasta seis veces de la sensibilidad global en regímenes de restricción río abajo moderada (región inferior central de la Figura 3.11c).

### 3.7 Cascada de dos ciclos covalentes

Hasta este punto, hemos analizado una configuración muy simplificada para ejemplificar el efecto de la integración de un módulo en una cascada de señalización más compleja. Con el fin de mostrar que este acercamiento puede extenderse a sistemas más complejos, analizaremos el sistema estudiado por Racz y Slepchenko [Racz y Slepchenko 2008] que está dado por dos ciclos covalentes acoplados (ver Figura 3.12)

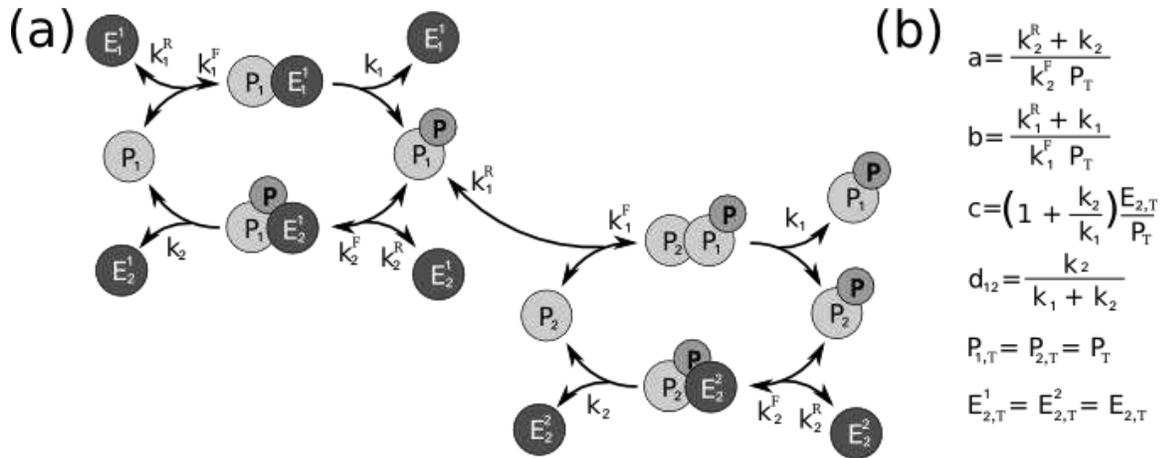


Figura 3.12 (a) Representación esquemática de la cascada de bi-cíclica de Racz-Slepchenko. (b) Parámetros adimensionales relevantes en el estado estacionario, para el caso en el que los dos ciclos son idénticos.

Este sistema puede ser totalmente especificado mediante cuatro parámetros: tres parámetros de cada ciclo único ( $a$ ,  $b$ ,  $c$ ) y uno adicional,  $d_{12}$ , que tiene en cuenta el acoplamiento entre ciclos. Los parámetros  $a$  y  $b$  representan las constante de Michaelis-Menten normalizadas para las reacciones de fosforilación y desfosforilación respectivamente. Por otra parte,  $c$  es la concentración normalizada de la fosfatasa (ver Figura 3.12)

Racz y Slepchenko analizaron un conjunto de estas cascadas de dos ciclos (con:  $\log(a)$  en  $[-1,5, -0,5]$ ,  $b = k.a$ ,  $\log(c)$  en  $[-2, -1,2]$ , y  $d_{12} = 1$ .) mediante un procedimiento de muestreo uniforme para explorar la ultrasensibilidad del sistema. En este muestreo, el parámetro  $k$  regula la asimetría de cada ciclo covalente. En su trabajo (figura 10b de [Racz y Slepchenko 2008]) informaron que el coeficiente de Hill de la cascada es mayor que el cuadrado del coeficiente de Hill de un solo ciclo (condición de supramultiplicatividad) para los casos cuando la fosfatasa, y no la kinasa, actúa en saturación en cada ciclo ( $a \ll b = 100.a$ ). En este régimen, los efectos de secuestro son insignificantes, y por lo tanto, podemos utilizar nuestro marco, basado en una descripción modular, para analizar el comportamiento supra-multiplicativo del sistema. Por otra parte, vale la pena señalar que en estas configuraciones asimétricas, las funciones de transferencia correspondientes presentan una marcada ultrasensibilidad por izquierda, lo que sugiere que la supramultiplicatividad pueda ser explicada en términos de restricciones en el rango dinámico de lectura.

Para evaluar esta posibilidad, generamos numéricamente un conjunto de 1000 cascadas covalentes asimétricas tomados uniformemente en el mismo rango de parámetros utilizado por Slepchenko y Racz (con:  $\log(a)$  en  $[-1,5, -0,5]$ ,  $b = k.a$ ,  $\log(c)$  en  $[-2, -1,2]$ , y  $d_{12} = 1$ .) Para cada cascada se puede considerar al segundo módulo como unidad de lectura de la primera, y así estimamos los correspondientes valores de los coeficientes de restricción río abajo,  $Q_{down}$  como,

$$Q_{down} \stackrel{\text{def}}{=} \frac{O_M^{max}}{EC50_{down}} = \frac{y_{max}/c d_{12}}{EC50} \quad [3.19]$$

Donde  $y_{max}$  es la fracción máxima de  $P_2$  fosforilado y el  $EC50$  es la mitad de la respuesta máxima que puede alcanzar un ciclo.

Para evaluar el carácter supra-multiplicativo observado en el sistema, definimos el coeficiente de sobresensibilidad:  $\pi = n_H^{cascade} / (n_H^{cycle})^2$ , que es mayor, menor o igual a 1 cuando los dos ciclos se combinan supra-multiplicativamente, sub-multiplicativamente o multiplicativamente respectivamente. Se puede observar (puntos verdes de la Figura 3.13) que el comportamiento supra-multiplicativo ( $\pi > 1$ ) se produce para casi toda realización de la cascada cuando nos limitamos a estudiar el sistema en la región de parámetros explorada por Racz y Slepchenko [Racz y Slepchenko 2008], región consistente con una saturación río abajo “leve”. Con el fin de estudiar el comportamiento del sistema en un intervalo de  $Q_{down}$  más amplio, generamos otro conjunto de 1000 cascadas en un rango de parámetros extendido (con:  $\log(a)$  en  $[-1,5, -0,5]$ ,  $b = k.a$ ,  $\log(c)$  en  $[-3,-1.2]$ , y  $d_{12} = 1$ ). En la Figura 2.13 en triángulos celestes se muestra la sobresensibilidad como función de  $Q_{down}$  para las 1000 realizaciones con los parámetros extendidos, en el que se puede observar un comportamiento no monótono en  $\pi = \pi(Q_{down})$ . El pico observado en la sobresensibilidad resulta compatible con el comportamiento que presenta el módulo de GK ultrasensible por izquierda (Figura 3.7c), por lo que podemos interpretar que la sobresensibilidad observada resulta de una restricción río abajo moderada sobre curvas ultrasensibles por izquierda.

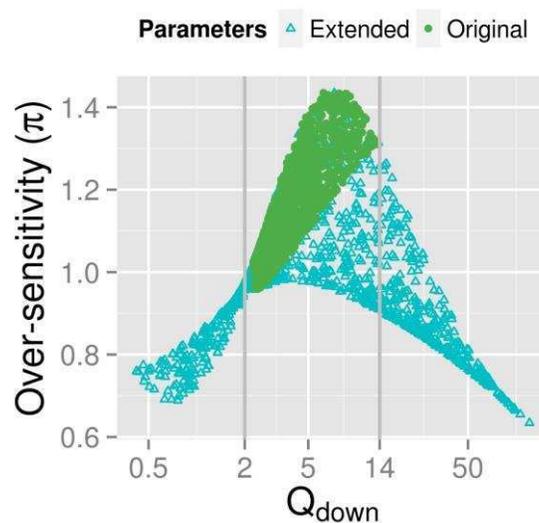


Figura 3.13 Sobresensibilidad,  $\pi$ , como función de  $Q_{down}$  calculada para un ensamble de 2000 cascadas. Los puntos verdes corresponden a 1.000 realizaciones con el procedimiento de muestreo originalmente utilizado por Slepchenko y Racz (con:  $\log(a)$  en  $[-1,5, -0,5]$ ,  $b = k.a$ ,  $\log(c)$  en  $[-2, -1,2]$ , y  $d_{12} = 1$ ). Los triángulos celestes corresponden a puntos obtenidos un rango  $c$  extendido, con  $\log(c)$  en  $[-3, -1,2]$  y ninguna restricción en el valor de  $y_{max}$ . Las líneas verticales marcan límites  $Q_{down}$  para las que se observa supramultiplicatividad en el muestreo original de Slepchenko. Un comportamiento no monótono de  $\pi = \pi(Q_{down})$  se observa para el caso de muestreo extendido.

### 3.8 Conclusiones.

A pesar del éxito de los enfoques basados en módulos utilizados para desentrañar la complejidad de las redes bioquímicas, resulta importante tener en cuenta, cuando se analizan sistemas realistas e integrados, si las propiedades de los componentes individuales cambian debido a la interconexión de los mismos.

En el presente capítulo nos propusimos estudiar cómo las limitaciones de los rangos dinámicos en la entrada y/o salida de un módulo dado, impuestas por los componentes de río arriba y río abajo, pueden producir cambios sustanciales en el carácter ultrasensible de un módulo sigmoidal. Para ello, estudiamos la ultrasensibilidad producida por diferentes módulos ultrasensibles de interés cuando se le acoplan río arriba y río abajo módulos del tipo Michaelis-Menten. Se calculó la ultrasensibilidad del sistema, considerando para cada caso analizado, las diferentes situaciones de restricción en el rango de trabajo, las cuales fueron evaluadas en términos de los coeficientes de restricción río arriba y río abajo,  $Q_{up}$  y  $Q_{down}$ .

Hemos encontrado que, independientemente del mecanismo bioquímico implicado, siempre que el módulo río arriba actúa como el componente limitante (es decir, valores grandes  $Q_{up}$  y valores pequeños  $Q_{down}$ ), la ultrasensibilidad global del sistema se ve severamente reducida. Por otro lado, se encontró una dependencia mucho más rica de la ultrasensibilidad del sistema en función del coeficiente de restricción río abajo,  $Q_{down}$ . Siempre que la unidad río abajo sea el

módulo limitante de la cascada (es decir, para valores grandes  $Q_{down}$ , y valores pequeños  $Q_{up}$ ) surgen diferentes comportamientos dependiendo de las no-linealidades específicas mostradas por el módulo ultrasensible analizado (GK vs Hill, por ejemplo).

Nuestro marco de estudio nos permitió analizar los rasgos distintivos mostrados por distintos motivos bioquímicos específicos. Por ejemplo encontramos que, independientemente del grado específico de cooperatividad en un módulo de activación transcripcional con  $n$  sitios de unión (como el descrito en la Figura 3.8) se puede incrementar los niveles de sensibilidad hasta  $\eta \sim n$  bajo regímenes de restricción río abajo.

De manera más general, hemos mostrado que en los módulos con las funciones de transferencia fuertemente ultrasensibles por izquierda, la ultrasensibilidad del sistema se puede incrementar significativamente para situaciones de saturación río abajo (restricciones leves o extremas según sea necesario). En particular mostramos que dado un módulo ultrasensible, al agregar río abajo una unidad con dosis-respuesta hiperbólica que trabaje en saturación, el coeficiente de Hill del sistema compuesto estará dado por el orden polinomial,  $n$ , de la curva dosis-respuesta del módulo a inputs pequeños ( $\eta \sim n$ ).

En un estudio analítico, Gunawardena [Gunawardena 2005]) realizó una descripción matemática simplificada de los sistemas de fosforilaciones distributivas múltiples,

$$F(X) = \frac{(\lambda x)^n}{1 + \lambda x + (\lambda x)^2 + \dots + (\lambda x)^n}$$

y encontró que estas funciones respuesta resultan muy abruptas inicialmente pero luego presentan un crecimiento mucho más gradual (lo que nosotros definiríamos como una función ultrasensible por izquierda). Gunawardena acotó que este tipo de funciones de transferencia crean un umbral eficiente, es decir, que la respuesta del sistema se mantiene cerca de 0 para señales de entrada por debajo de un umbral. Pero como el cambio por encima del umbral no resulta tan brusco, determinó que la curva no es un “*buen switch*”. En este contexto, nuestro trabajo puede agregar que, a pesar de que este módulo aislado podría ser considerado un “*mal switch*”, una unidad de lectura río abajo trabajando en saturación fácilmente podría convertirlo en un “*buen switch*” al explotar las no-linealidades locales de la curva de respuesta del módulo a inputs pequeños. En particular, dado que el orden polinomial de  $F(X)$  a inputs pequeños es de  $n$ , en un régimen de restricción río abajo podría obtenerse un coeficiente de Hill global de  $\eta = n$ .

De manera general, en presencia de módulos con funciones de transferencia ultrasensibles por izquierda, uno puede imaginarse que el valor del EC50 del componente río abajo puede seleccionarse de tal manera que sólo la parte más sensible de la salida del módulo sigmoidal sea leído. De esta manera, la saturación río abajo podría ser considerado como un nuevo mecanismo en sí mismo, el cual es capaz de extraer la mayor ultrasensibilidad posible de la curva dosis-respuesta de un cierto módulo asimétrico.

### 3.9 Referencias

Altszyler E, Ventura A, Colman-Lerner A, Chernomoretz A 2014 Impact of upstream and downstream constraints on a signaling module's ultrasensitivity *Physical Biology*. **11** 066003

Buchler N E and Louis M. 2008, Molecular titration and ultrasensitivity in regulatory networks. *J.Mol.Biol.* **384** 1106-19.

Buchler N E and Cross F R. 2009, Protein sequestration generates a flexible ultrasensitive response in a genetic network. *Mol Syst Biol.* **5** 272

Del Vecchio D, Ninfa A and Sontag E 2008 Modular cell biology: retroactivity and insulation. *Mol Sys Biol* **4** 161 p161.

Ferrell J E 1996 Tripping the switch fantastic: how a protein kinase cascade can convert graded inputs into switch-like outputs *Trends Biochem. Sci.* 21 460–466

Ferrell J E and Ha S H 2015 Ultrasensitivity part III: cascades, bistable switches, and oscillators *Trends in Biochemical Sciences* **39** 12 612-618

Gardner TS, Cantor C R and Collins J J, 2000 Construction of a genetic toggle switch in *Escherichia coli* *Nature* **403** 339-342

Goldbeter A and Koshland D E 1981 An amplified sensitivity arising from covalent modification in biological systems *PNAS* **78** 11 6840-6844

Gomez-Uribe C, Verghese G C and Mirny L A 2007 Operating regimes of signaling cycles: statics, dynamics, and noise filtering. *PLoS Comput Biol.* **3** (12):e246

Gunawardena J 2005 Multisite protein phosphorylation makes a good threshold but can be a poor switch. *PNAS* **102** 41 14617–14622

Hooshangi S, Thiberge S and Weiss R 2005 Ultrasensitivity and noise propagation in a synthetic transcriptional cascade *PNAS* **102** 10 3581-3586

Racz E and Slepchenko B M 2008 On sensitivity amplification in intracellular signaling cascades *Phys. Biol.* **5** 036004-12

Rippe K 1997, Analysis of protein-DNA binding in equilibrium, *B.I.F. Futura* **12** 20-26

Zhang Q, Sudin Bhattacharya and Melvin E. Andersen 2013 Ultrasensitive response motifs: basic amplifiers in molecular signalling networks *Open Biol.* **3** 130031

Ventura A C, Sepulchre J A and Merajver S D 2008 A hidden feedback in signaling cascades is revealed, *PLoS Comput Biol.* 4(3):e1000041

## 4 LA ULTRASENSIBILIDAD EN CASCADAS DE SEÑALIZACIÓN, HACIA UNA DESCRIPCIÓN MATEMÁTICA GENERAL

### 4.1 Resumen

Hasta ahora hemos estudiado las diferencias existentes entre la ultrasensibilidad de un módulo en aislamiento y la ultrasensibilidad aportada por este módulo al estar inmerso en una cascada de señalización básica [Altszyler *et al.* 2014]. En este Capítulo estudiaremos desde una perspectiva más general el fenómeno de la ultrasensibilidad en cascadas de señalización. En particular hallaremos analíticamente el aporte neto que realiza cada módulo en la construcción de la ultrasensibilidad de una cascada lineal monoestable. Esto nos permitirá identificar los efectos del secuestro de componentes compartidos [Ventura *et al.* 2008, Del Vecchio *et al.* 2008] y del reposicionamiento de los rangos dinámicos sobre la ultrasensibilidad de la cascada [Bluthgen y Herzel 2001, Bluthgen y Herzel 2003]. Luego, aplicaremos la metodología desarrollada para estudiar 2 modelos de cascadas de MAP kinasas de interés biológico: el modelo de Huang-Ferrell [Huang y Ferrell 1996] de la cascada de MAPKinasas de ovocitos en *Xenopus* y el modelo implementado por Sarkar y colaboradores [O'Shaughnessy *et al.* 2011] para describir una cascada de señalización presente en mamíferos que lograron introducir de manera sintética en levaduras. El modelo de Huang-Ferrell, por su relevancia biológica e histórica, ha sido tomado en la literatura como cascada prototípica para testear hipótesis de funcionamiento de estos tipos de arreglos moleculares [Qiao *et al.* 2007, Bluthgen and Herzel 2003, Bluthgen *et al.* 2006]. Por otro lado, el sistema de O'Shaughnessy *et al.* resulta de interés no solo por su impacto en el área de ingeniería genética sino por la proposición de un nuevo mecanismo capaz de generar ultrasensibilidad a partir del acoplamiento de módulos no ultrasensibles. En un estudio detallado de esta cascada, mostraremos que la ultrasensibilidad observada se produce por un mecanismo de *ultrasensibilidad de primer orden* oculto en la tercer capa de la cascada y no por el mecanismo propuesto por O'Shaughnessy *et al.*

Este estudio aporta herramientas relevantes tanto para entender el comportamiento de una unidad de procesamiento modular ultrasensible inmersa en su contexto fisiológico, como para el diseño de módulos funcionales en un contexto de biología sintética. El manuscrito que reporta los resultados descritos en este capítulo será enviado próximamente a una revista internacional con referato para su publicación.

## 4.2 Relacionando la estimación local y global de la ultrasensibilidad

Conceptualmente, la ultrasensibilidad describe la capacidad de un módulo para amplificar pequeños cambios en la señal de entrada en cambios más grandes en la señal de salida. Es habitual cuantificar y caracterizar la amplificación tanto a nivel global, utilizando el coeficiente de Hill,  $n_H$ , definido en la ecuación [2.7], como a nivel local, utilizando el coeficiente de respuesta,  $R(I)$ , introducido en la ecuación [2.8].

Una relación simple entre ambas descripciones se puede establecer considerando el *coeficiente de amplificación logarítmico*  $A_{a,b}^f$ , que hemos definido en este trabajo como:

$$A_{a,b}^f = \frac{\log(f(b)) - \log(f(a))}{\log(b) - \log(a)} \quad [4.1]$$

$A_{a,b}^f$  describe (en escala logarítmica) el cambio producido en la salida cuando la entrada varía desde el valor  $a$  hasta  $b$ . Por ejemplo,  $A_{EC10,EC90}^{hyp} = 0.5$  para una función hiperbólica evaluada entre los valores que generan un 10% y un 90% de la salida máxima. Los dos niveles de entrada considerados delimitan el rango de entrada pertinentes para el cálculo del coeficiente de Hill  $n_H$ , ecuación [2.7], el cual llamaremos: *rango de Hill* (ver Figura 4.1 a-b)

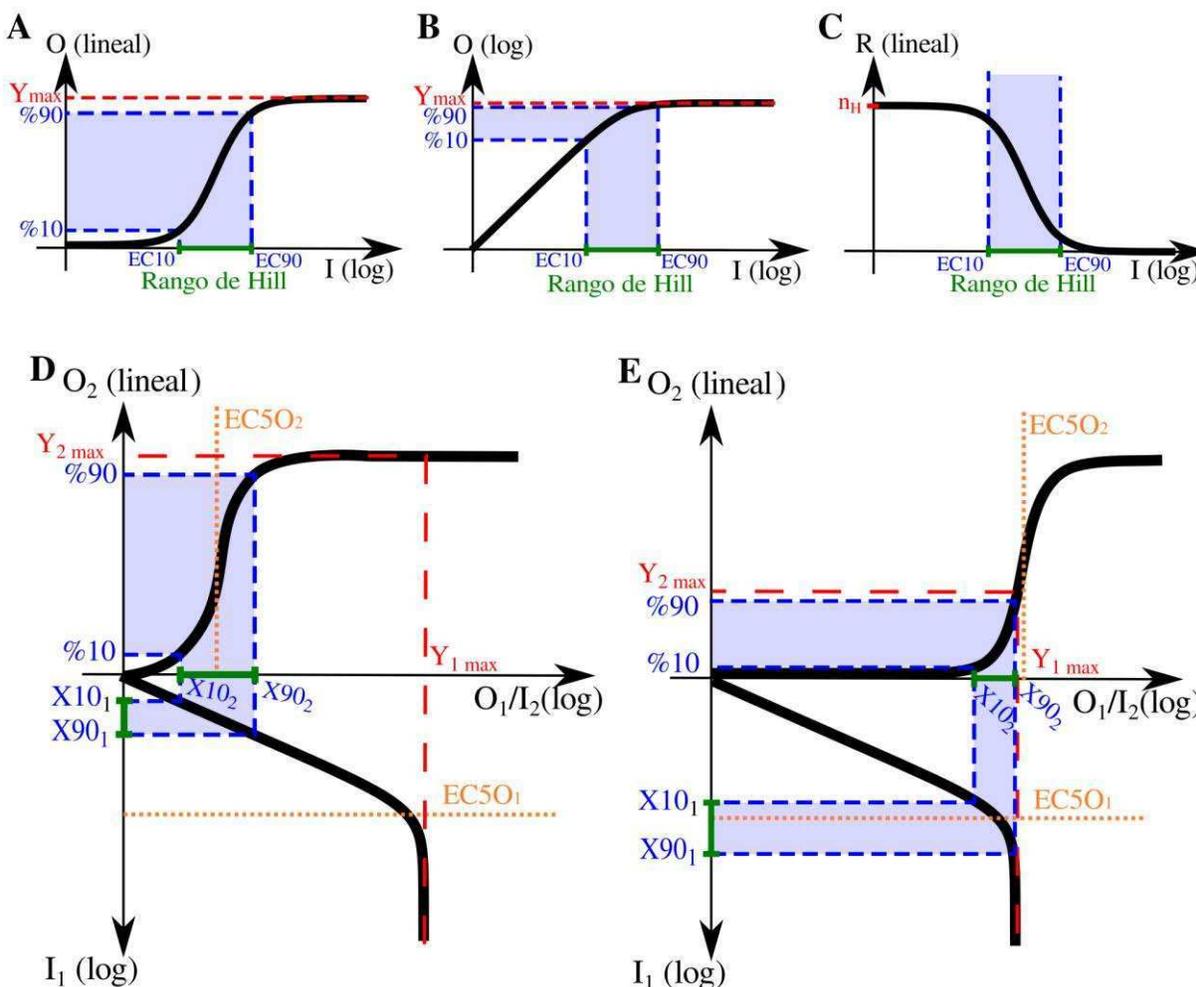


Figura 4.1 Representación esquemática de una curva dosis-respuesta del tipo Hill en (A) escala log-lineal y (B) escala log-log, y (C) su respectiva ultrasensibilidad local dada por el coeficiente de respuesta ( $R(I)$ ). El  $EC10$  y el  $EC90$  son los valores de señal necesarios para producir un output del 10% y 90% de la respuesta máxima ( $O_{max}$ ) en un cierto módulo. El *rango de Hill* es el rango de entrada pertinente para el cálculo del  $n_H$  del sistema. En las funciones de Hill, valores de inputs mucho menores al  $EC50$  producen sensibilidades locales del orden de su coeficiente de Hill. (D-E) Esquema de funciones respuesta para la composición de dos módulos ultrasensibles tipo Hill. El  $Y_{i,max}$  es el máximo output que toma el módulo "i" (no confundir con el máximo output que tiene un módulo al estar en aislamiento,  $O_{max}$ ) y el  $X10_i$  y el  $X90_i$  son los valores de input que toma el módulo "i" cuando el último módulo (el segundo) alcanza el 10% y el 90% de su salida máxima ( $Y_{2,max}$ ). (D) Cuando  $Y_{1,max} \gg EC50_2$ ,  $Y_{2,max}$  resulta ser igual al output máximo del módulo 2 en aislamiento, por lo tanto,  $X10_2$  y  $X90_2$  coinciden con la  $EC10$  y  $EC90$  del módulo 2 en aislamiento. Además, el *rango de Hill* del módulo 1 se encuentra en la región de inputs menores que el  $EC50_1$ . (E) Cuando  $Y_{1,max} \lesssim EC50_2$ ,  $O_{2,max}$  resulta menor que la salida máxima del módulo 2 en aislamiento, por lo tanto,  $X10_2$  y  $X90_2$  difieren del  $EC10$  y el  $EC90$  del módulo 2 en aislamiento. En este caso el *rango de Hill* del módulo 1 tiende a estar centrado en valores superiores al  $EC50_1$ .

Se puede ver fácilmente que el  $n_H$  puede ser reescrito como,

$$n_H = \frac{2 \log(0.9/0.1)}{\log(EC90/EC10)} = 2A_{EC10,EC90}^f = \frac{A_{EC10,EC90}^f}{A_{EC10,EC90}^{hyp}} \quad [4.2]$$

En consecuencia, el coeficiente de Hill puede interpretarse como el cociente de los *coeficientes de amplificación logarítmicos* de la función de interés y una función hiperbólica, evaluados en sus correspondientes EC10 y EC90.

Vale la pena señalar que la expresión del coeficiente de amplificación logarítmica que se muestra en la ecuación [4.1] puede ser interpretada como la pendiente de la línea que pasa por los puntos (EC10,  $f(EC10)$ ) y (EC90,  $f(EC90)$ ) en una escala log-log. Por lo tanto, resulta ser igual al coeficiente de respuesta promedio calculado en el intervalo [EC10, EC90] en escala logarítmica (ver Figura 4.1c). De esta manera,

$$\begin{aligned} n_H = 2A_{EC10,EC90}^f &= 2 \frac{\int_{\log(EC10)}^{\log(EC90)} R_f(I) d(\log I)}{\log(EC90) - \log(EC10)} \\ &= 2 \langle R_f \rangle_{EC10,EC90} = \frac{\langle R_f \rangle_{EC10,EC90}}{\langle R_{hyp} \rangle_{EC10,EC90}} \end{aligned} \quad [4.3]$$

Esta última ecuación vincula explícitamente la descripción de la ultrasensibilidad local y global. En particular, se puede observar que para un módulo aislado el coeficiente de Hill del mismo se relaciona con la *ganancia media logarítmica* de la función de respuesta ( $R_f$ ) sobre el *rango de Hill* del módulo, en unidades de una curva hiperbólica de referencia.

### 4.3 Ultrasensibilidad en la composición de funciones

Los resultados obtenidos podrían ser generalizados para el cálculo de la ultrasensibilidad global de una cascada de varios niveles, en términos de los *coeficientes de amplificación logarítmica*. Para ello, se procede considerando primero dos módulos ultrasensibles acoplados que no presentan efectos de secuestro de los componentes moleculares entre capas. En este caso, la expresión de la curva dosis-respuesta del sistema,  $F$ , resulta de la composición matemática de las funciones,  $f_i$ , que describen la relación de entrada y salida de los módulos ( $i = 1,2$ ) aislados:

$$F(I_1) = f_2(f_1(I_1)) \quad [4.4]$$

Usando la ecuación [4.2] , el coeficiente de Hill del sistema  $n_H$  puede reescribirse como:

$$\begin{aligned}
 n_H &= \frac{\log(81)}{\log(X90_1/X10_1)} = \frac{\overbrace{2 \log(0.9/0.1)}^{v_2} \overbrace{\log(X90_2/X10_2)}^{v_1}}{\log(X90_2/X10_2) \log(X90_1/X10_1)} \\
 &= \overbrace{2A_{X10_2, X90_2}^{f_2}}^{v_2} \overbrace{A_{X10_1, X90_1}^{f_1}}^{v_1} \\
 &= \overbrace{2\langle R_2 \rangle_{X10_2, X90_2}}^{v_2} \overbrace{\langle R_1 \rangle_{X10_1, X90_1}}^{v_1} = v_1 \cdot v_2
 \end{aligned} \tag{4.5}$$

Donde  $X10_i$  y  $X90_i$  delimitan el *rango de Hill* del sistema compuesto, es decir, los inputs de la capa  $i$  tal que el output de la última capa (correspondiente a  $i = 2$  en este caso) alcance un 10% y 90% del máximo output posible ( $Y_{2 \max}$ ), respectivamente (ver paneles  $D$  y  $E$  de la Figura 4.1).

Se deduce de la ecuación [4.5] que el coeficiente de Hill  $n_H$  del sistema se puede escribir como el producto de dos factores,  $v_1$  y  $v_2$ , que caracterizan a la ultrasensibilidad local media de cada capa en los rangos:  $[X10_i, X90_i]$ , con  $i = 1, 2$  (ver paneles  $D$  y  $E$  de la Figura 4.1).

El factor  $v_2$  en la ecuación [4.5] es formalmente equivalente al coeficiente de Hill de la capa 2, pero calculado usando los límites del *rango de Hill* de la capa 2,  $X10_2$  y  $X90_2$ , en vez de los límites del rango de Hill de la capa 2 en el aislamiento,  $EC10_2$  y  $EC90_2$ . Por otro lado,  $v_1$  es el factor de amplificación  $A_{X10_1, X90_1}^{f_1}$  que reescala logarítmicamente el rango  $[X10_1, X90_1]$  en  $[X10_2, X90_2]$ . En este contexto, nombramos al coeficiente  $v_i$ : *coeficiente de ultrasensibilidad efectiva* de la capa  $i$ , ya que está asociada a la contribución efectiva de la capa  $i$  a la ultrasensibilidad general del sistema.

Es fácil extrapolar este último resultado para el caso de una cascada de  $n$  módulos, para los cuales:

$$\begin{aligned}
 n_H &= \overbrace{2\langle R_n \rangle_{X10_n, X90_n}}^{v_n} \overbrace{\langle R_{n-1} \rangle_{X10_{n-1}, X90_{n-1}}}^{v_{n-1}} \dots \overbrace{\langle R_2 \rangle_{X10_2, X90_2}}^{v_2} \overbrace{\langle R_1 \rangle_{X10_1, X90_1}}^{v_1} \\
 &= v_n \cdot v_{n-1} \dots v_2 \cdot v_1
 \end{aligned} \tag{4.6}$$

Esta última ecuación nos muestra un resultado general: el  $n_H$  de una cascada puede ser entendido como una combinación multiplicativa de los  $v_i$  de cada módulo. Como será evidente en las próximas secciones, la conexión entre los descriptores globales y locales de la ultrasensibilidad proporcionados por la ecuación [4.1], resulta ser una herramienta útil para analizar la ultrasensibilidad de cascadas, ya que permite evaluar la contribución efectiva de cada módulo en la ultrasensibilidad general del sistema.

#### 4.4 El efecto del *Rango de Hill* en sistemas de múltiples capas

El *rango de Hill* resulta ser un parámetro relevante para la construcción de la ultrasensibilidad en estructuras multicapa dado que, de acuerdo con la definición de  $v_i$  (ecuación [4.6]), el *rango de Hill* delimita la región de señales de entrada relevante sobre la que se calcula el valor medio de la ultrasensibilidad local. En esta sección, mostraremos cómo la ubicación de este intervalo depende de la manera en la que las capas se acoplan en la cascada.

Comencemos considerando dos módulos ultrasensibles acoplados. En este caso, dos regímenes diferentes podrían ser identificados en función de si la salida máxima del módulo río arriba es o no es lo suficientemente grande como para activar totalmente la unidad río abajo:

**a)  $Y_{1,max} \gg EC50_2$ :**

En este caso resulta que  $X10_2 = EC10_2$  y  $X90_2 = EC90_2$  (ver la Figura 4.1d). Por lo tanto, cuando se combina con el módulo 1, el *rango de Hill* del módulo 2 no diferirá del caso aislado, y consecuentemente,  $v_2$  será igual al coeficiente de Hill de este módulo en aislamiento ( $v_2 = n_2^{is}$ ). Además, se puede observar que el *rango de Hill* del módulo 1 tiende a ubicarse en la región de inputs pequeños al aumentar el cociente  $Y_{1,max}/EC50_2$ . Esta región sería el dominio en el que  $R_1$  se integraría para el cálculo de  $v_1$ .

**b)  $Y_{1,max} \lesssim EC50_2$ :**

En este caso  $X10_2$  y  $X90_2$  resultan menores que  $EC10_2$  y  $EC90_2$  respectivamente (ver Figura 4.1e) y por lo tanto no se da necesariamente la igualdad entre  $v_2$  y  $n_2^{is}$ . Además, en este régimen el *rango de Hill* tendería a estar centrado en valores superiores al  $EC50_1$  (en la próxima subsección mostraremos que esto último depende fuertemente de si el módulo 2 es ultrasensible o no)

De esta manera, la relación entre  $Y_{1,max}$  y  $EC50_2$  establece el *rango de Hill* de ambas curvas de respuesta, determinando la contribución efectiva de cada módulo a la ultrasensibilidad de la cascada, y en consecuencia, afectando directamente a la ultrasensibilidad general de la cascada.

##### 4.4.1 Ejemplificación: dos funciones de Hill acopladas

**a)  $Y_{1,max} \gg EC50_2$**

Por ejemplo, para un sistema compuesto por dos módulos de Hill que operan en el régimen  $Y_{1,\max} \gg EC50_2$  (a), el *rango de Hill* del módulo 1 quedaría por debajo del  $EC50_1$  (ver la figura Figura 4.1d). En esta región, el coeficiente de respuesta alcanza sus valores más altos, cuando  $R_1 \sim n_1^{is}$  (ver Figura 4.1c), obteniéndose así un *coeficiente de Hill efectivo* de  $v_1 = \langle R_1 \rangle_{X_{10_1}, X_{90_1}} = n_1^{is}$ . Teniendo en cuenta que en este régimen  $v_2 = n_2^{is}$ , la ecuación [4.5] se puede reescribir en:

$$n_H = v_1 v_2 = n_1^{is} n_2^{is}$$

Se puede observar que en este régimen la cascada se comporta multiplicativamente, lo que resulta consistente con los resultados de Ferrell [Ferrell 1997].

**b)  $Y_{1,\max} \ll EC50_2$**

Intuitivamente uno puede interpretar que si el módulo 2 es ultrasensible, cuando se opera en el régimen  $Y_{1,\max} \ll EC50_2$  el *rango de Hill* del Módulo 1 va a estar centrado en valores de entrada mayores que el  $EC50_1$  (ver Figura 4.1e). Dado que en esta región el módulo 1 tiene valores pequeños de ultrasensibilidad local, se obtiene un comportamiento submultiplicativo ( $n_H < n_1^{is} n_2^{is}$ ). Para mostrar esto último, comenzaremos estudiando el caso en el que el módulo 2 tiene  $n_2^{is} = 1$ , para luego pasar al caso  $n_2^{is} > 1$ .

Caso  $n_2^{is} = 1$ :

En el régimen  $Y_{1,\max} \ll EC50_2$ , el *rango de Hill* del módulo 2 se centrará en la región de señales de entrada pequeñas ( $I_2 \ll EC50_2$ ), donde el módulo 2 tendrá un comportamiento lineal (ver Figura 4.2)

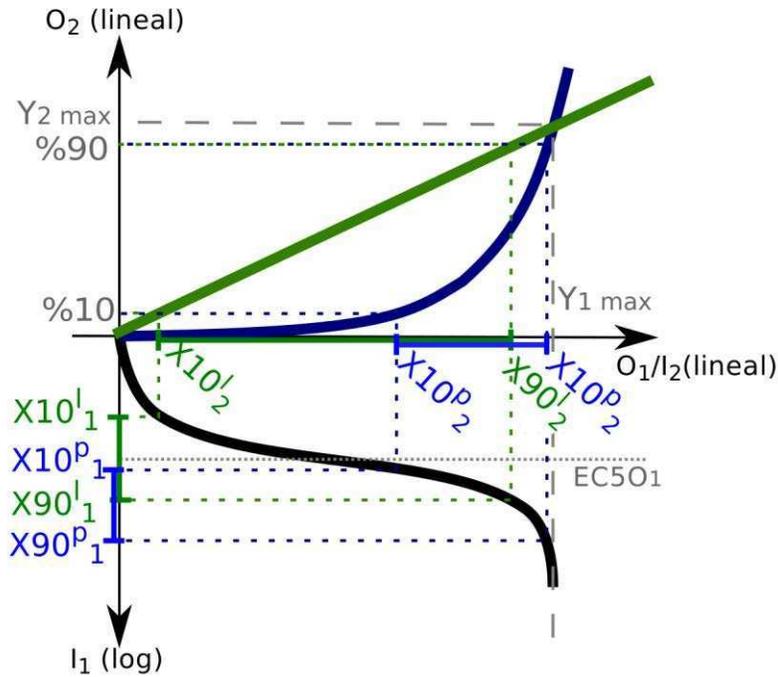


Figura 4.2 Diagramas de funciones respuesta para la composición de una función ultrasensible, como módulo 1, con una función lineal (en verde) o de ley de potencia (en azul) como módulo 2. En el régimen  $Y_{1,max} \ll EC50_2$ , el *rango de Hill* del módulo 2 se centrará en la región de señales de entrada pequeñas ( $I_2 \ll EC50_2$ ), donde el módulo 2 tiene un comportamiento del tipo ley de potencia con exponente  $n_2^{is}$ .

El comportamiento lineal del módulo 1 produce que el  $X10_2^l$  y el  $X90_2^l$  ( $X10_2$  y  $X90_2$  de la curva lineal) coincidan con el 10% y el 90% del  $Y_{1,max}$ , por lo que  $X10_1^l$  y  $X90_1^l$  resultan ser el  $EC10_1$  y  $EC90_1$ , quedando así el rango de Hill centrado en el  $EC50_1$ . Además, como resultado de aplicar la ecuación [4.5], el comportamiento del sistema se recae sobre la ultrasensibilidad del módulo 1, dada la linealidad de módulo 2.

$$n_H = \overbrace{2\langle R_2 \rangle_{X10_2, X90_2}}^{v_2} \overbrace{\langle R_1 \rangle_{X10_1, X90_1}}^{v_1} = \overbrace{2}^{v_2} \overbrace{n_1^{is} / 2}^{v_1} = n_1^{is}$$

Finalmente obtenemos que en este caso en particular ( $n_2^{is} = 1$ ) la cascada resulta multiplicativa, ya que  $n_H = n_1^{is} n_2^{is}$ .

Caso  $n_2^{is} > 1$ :

Por otro lado, cuando  $n_2^{is} > 1$ , la curva dosis-respuesta del módulo-2 tiene un comportamiento de ley de potencia para valores de entrada dentro del *rango de Hill* (Figura 4.2). En este caso, la no linealidad produce un corrimiento del *rango de Hill* del módulo 2 hacia valores más altos que en el caso de la recta, lo que a su vez centra el *rango de Hill* del módulo 1 en valores de entrada más alto que su  $EC50_1$ . Además, teniendo en cuenta que  $R_1$  disminuye con el  $I_1$ , el corrimiento del *rango de Hill* del módulo 1 producirá que  $v_1 = \langle R_1 \rangle_{X_{10_1}, X_{90_1}} < n_1^{is}/2$ , obteniéndose que,

$$n_H = \overbrace{2\langle R_2 \rangle_{X_{10_2}, X_{90_2}}}^{v_2} \overbrace{\langle R_1 \rangle_{X_{10_1}, X_{90_1}}}^{v_1} < \overbrace{2n_2^{is}}^{v_2} \overbrace{n_1^{is}/2}^{v_1} = n_2^{is} n_1^{is}$$

Finalmente, si  $Y_{1max} \ll EC50_2$  y  $n_2^{is} > 1$ , el sistema muestra un comportamiento submultiplicativo, que surge de un corrimiento del *rango de Hill* del Módulo 1 a una región con menor ultrasensibilidad local. Aunque se muestra que la submultiplicatividad se produce en el límite de  $Y_{1max} \ll EC50_2$ , el mismo argumento puede ser usado para interpretar el caso de  $Y_{1max} \approx EC50_2$ .

#### 4.4.2 Ejemplificación: dos funciones de GK acopladas

Por supuesto, las consecuencias finales del acoplamiento entre dos funciones ultrasensibles dependerán de las formas funcionales particulares de las curvas dosis-respuesta. Para ejemplificar esto, estudiemos ahora el sistema compuesto por dos módulos caracterizados por funciones de respuesta del tipo GK, (Goldbeter y Koshland 1981). Como hemos visto, en los casos en que las fosfatasas, pero no las kinasas, trabajan en saturación, las funciones GK se caracterizan por tener regiones de inputs con ultrasensibilidad local (dada por el  $R(I)$ ) mayor a su ultrasensibilidad global (ver Figura 4.3a-c). Por lo tanto, si su *rango de Hill* se encuentra en la región de mayor ultrasensibilidad local, estas funciones son capaces de contribuir con ultrasensibilidades mayores que su coeficiente de Hill. De esta manera, es de esperar que las cascadas que involucran funciones de GK puedan mostrar un comportamiento supra-multiplicativo. En la Figura 4.3e se ejemplifica esto último, mostrando que el  $EC50_2$  puede ser ajustado con respecto a  $Y_{1max}$  de forma tal que el *rango de Hill* del módulo 1 se localice en su región de mayor ultrasensibilidad produciendo así que  $v_2 \gtrsim n_2^{is}$ , lo que finalmente resulta en un comportamiento supra-multiplicativo ( $n_H = v_1 v_2 > n_1^{is} n_2^{is}$ ).

Por otro lado, en el régimen en que  $EC50_2 \ll Y_{1max}$  (régimen (a)) el *rango de Hill* del módulo 1 se localiza en la región de inputs pequeños (ver Figura 4.3d), generando así que este módulo trabaje en su régimen lineal,  $R_1 = 1$ . En consecuencia la función de GK del módulo 1 no contribuye a la ultrasensibilidad del sistema,  $v_1 = \langle R_1 \rangle_{X_{10_1}, X_{90_1}} \sim 1$ , produciendo así en la cascada un comportamiento submultiplicativo ( $n_H = v_1 v_2 > n_1^{is} n_2^{is}$ )

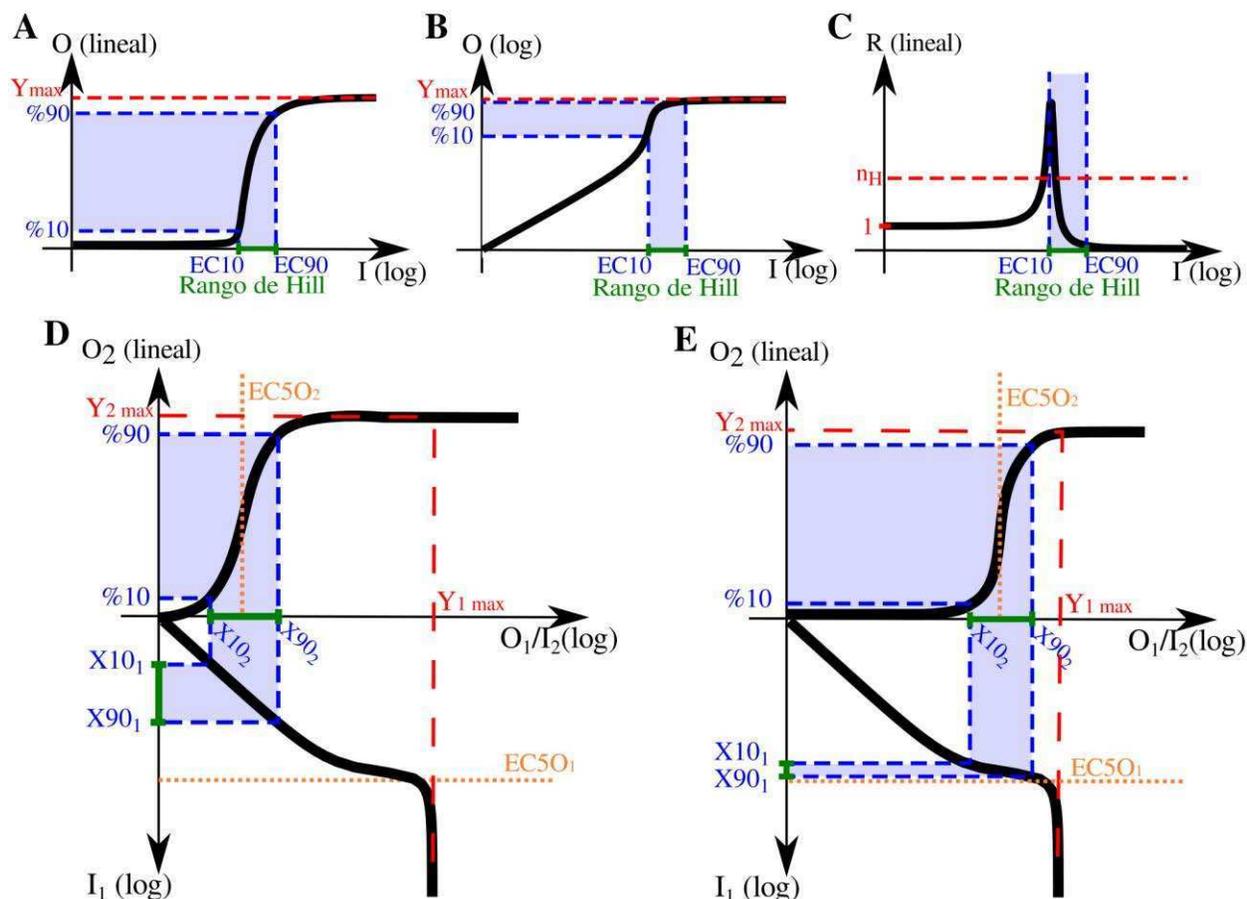


Figura 4.3 Representación esquemática de la curva dosis-respuesta de un ciclo covalente con su kinasa trabajando en saturación en (A) en escala log-lineal, (B) en escala log-log, y (C) su respectiva ultrasensibilidad local dada por el coeficiente de respuesta ( $R(I)$ ). El coeficiente de respuesta graficado en (C) muestra un comportamiento no ultrasensible en valores de inputs pequeños, pero presenta regiones de inputs con sensibilidad local incluso mayor que su  $n_H$ . Comportamientos como los mostrados en los paneles de A-C se pueden obtener con las funciones de GK [Goldbeter y Koshland 1981] con  $K_1 \gtrsim 1$  y  $K_2 \ll 1$ . (D-E) Esquema de funciones respuesta para la composición de dos módulos ultrasensibles de tipo GK como los mostrados en A-B. (D) Cuando  $O_{1,max} \gg EC50_2$ , el *rango de Hill* del módulo 1 tiende a localizarse en las regiones de inputs menores a  $EC50_1$ , donde la curva no presenta ultrasensibilidad local ( $R_1 \sim 1$ ). (E) En este panel se muestra que la relación  $O_{2,max}$ ,  $EC50_2$  puede ser ajustada de forma tal que el *rango de Hill* del módulo 1 se localice en su región de mayor ultrasensibilidad.

Así, este análisis pone en manifiesto el impacto de la forma funcional de la curva de respuesta de un módulo sobre la ultrasensibilidad global del sistema en las arquitecturas de capas múltiples. Las características de la ultrasensibilidad local de las funciones de transferencia involucradas resultan ser de máxima importancia en este contexto, y podrían cumplir un rol central en de la fenomenologías no triviales.

## 4.5 Análisis de 3 pasos de la ultrasensibilidad en cascadas de señalización

Con el fin de separar los diferentes factores que contribuyen a la ultrasensibilidad general de una cascada, consideramos tres aproximaciones para el sistema en estudio (ver Figura 4.4).

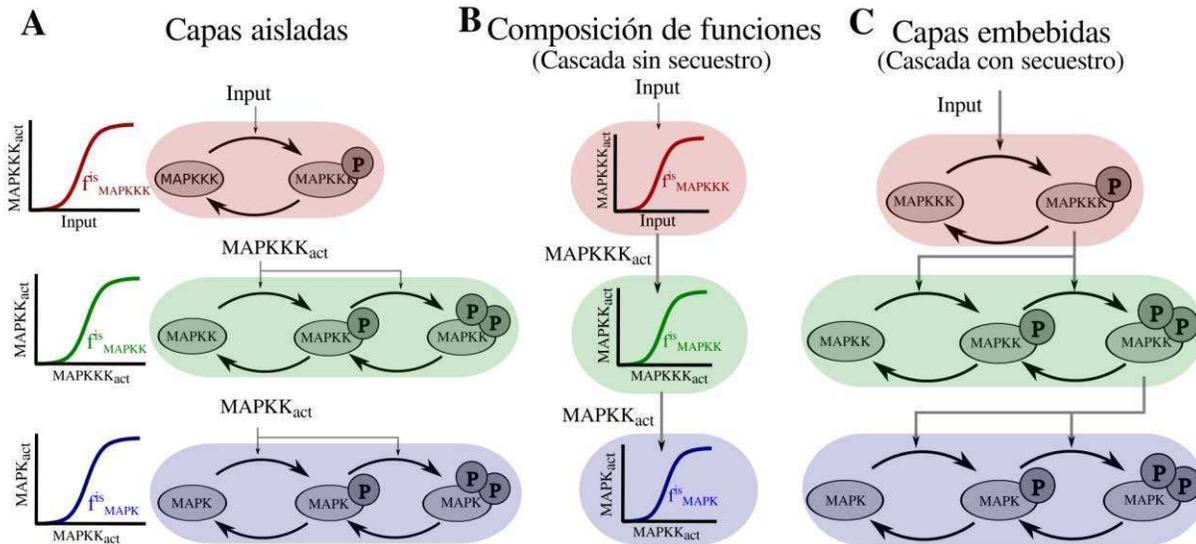


Figura 4.4 Representación modular y sistema de una cascada de MAP Kinasas lineal. (A) Cada capa en aislamiento está compuesta por ciclos covalentes simples o múltiples, cuyas curvas dosis-respuesta pueden ser ultrasensibles ya sea por mecanismos de orden cero y/o procesos de activación múltiple. (B) En un escenario en el que no se toma en cuenta el secuestro ( $F^{non-seq}$ ), la función de transferencia de la cascada, puede ser calculada a partir de la composición matemática de las funciones de transferencia  $f^{is}$ , de cada uno de los módulos en aislamiento. (C) Cuando se toma en cuenta el efecto de secuestro, las capas al estar embebidas en la cascada de MAP kinasas pueden tener una curva dosis-respuesta diferente del caso sin secuestro (B).

- 1) En un primer paso calculamos numéricamente la función de transferencia,  $f^{is}$ , de cada módulo en aislamiento y a partir de estas hallamos sus respectivos coeficientes de Hill  $n_i^{is}$ . (Figura 4.4a).
- 2) En un segundo paso, estudiamos la composición matemática,  $F^{non-seq}$ , de las funciones de respuesta aisladas (ver Figura 4.4b):

$$F^{non-seq}(x) = f_{MAPK}^{is} \left( f_{MAPKK}^{is} \left( f_{MAPKKK}^{is}(x) \right) \right) \quad [4.7]$$

$F^{non-seq}$  representa la función de transferencia de la cascada de kinasas cuando los efectos de secuestro son despreciados (ver Figura 4.4b). Este segundo paso tiene como objetivo analizar cómo incide el acoplamiento entre los distintos módulos (que involucra efectos de reposicionamiento de *los rangos de Hill*) en la construcción de la ultrasensibilidad total. Aquí se tiene en cuenta que cada módulo podría aportar una ultrasensibilidad efectiva  $v_i^{non-seq}$  distinta a su ultrasensibilidad en aislamiento  $n_i^{is}$ .

- 3) Por último, en una tercera etapa, las funciones de respuesta se obtienen considerando un modelo mecanístico de la cascada (que parte de leyes de acción de masas) con el fin de incluir en la descripción los efectos derivados de la presencia del secuestro. En particular, podremos calcular aquí el aporte de ultrasensibilidad efectivo de cada módulo  $v_i^{seq}$  en el modelo con secuestro (Figura 4.4c).

En las siguientes secciones nos propondremos aplicar este método para estudiar 2 modelos de cascadas de MAPKinasas de interés biológico: El modelo de Huang-Ferrell [Huang y Ferrell 1996] de la cascada de MAPKinasas de ovocitos en *Xenopus* y el modelo implementado por Sarkar y colaboradores [O'Shaughnessy *et al.* 2011] para describir la cascada de mamíferos que lograron introducir sintéticamente en levaduras. El modelo de Huang-Ferrell, por su relevancia biológica e histórica, ha sido tomado en la literatura como cascada prototípica para testear hipótesis [Qiao *et al.* 2007, Bluthgen y Herzl 2003, Bluthgen *et al.* 2006]. Por otro lado, el sistema de Sarkar y colaboradores resulta de interés no solo por su fuerte impacto en el área de biología sintética sino por la proposición de un nuevo mecanismo capaz de generar ultrasensibilidad (el que discutiremos a fondo en la sección 4.7.1)

#### 4.6 Ultrasensibilidad en el modelo de Huang-Ferrell

En su reconocido artículo, Huang y Ferrell estudiaron la cascada de MAP kinasa que opera en el proceso de maduración de los ovocitos de *Xenopus* y propusieron un modelo matemático de acción de masas para describir y analizar el funcionamiento del sistema, en particular el origen de su comportamiento ultrasensible [Huang y Ferrell 1996]. A diferencia de las descripciones basadas estrictamente en módulos, el modelo mecanístico de Ferrell tiene en cuenta los efectos de secuestro, ya que considera explícitamente las especies intermedias. En este caso, las posibles modificaciones de las formas funcionales de las curvas dosis-respuesta que pudieran surgir como consecuencia de la captura de los componentes moleculares pueden ser identificadas y analizadas. Por lo tanto, decidimos volver a estudiar el modelo del Ferrell teniendo en cuenta el análisis de 3 pasos propuesto con el fin de cuantificar el impacto del secuestro en la ultrasensibilidad de cada paso y del sistema en su conjunto, e identificar el papel que desempeña cada capa en la ultrasensibilidad general de la cascada.

Un esquema de la cascada de MAPK del *Xenopus* se muestra en la Figura 4.4c. En nuestro análisis, definimos la salida de un módulo y la entrada del siguiente como la forma activa total de una especie, incluyendo complejos con sustratos de la siguiente capa. Sin embargo, se excluyeron de la definición de entrada y salida los complejos formados con componentes de la misma capa (tales como el complejo entre la kinasa en su estado activado y su fosfatasa), ya que estas especies son "internas" a cada módulo. De esta manera, somos capaces de pensar las distintas capas en función de módulos interdependientes (la misma definición de entrada/salida fue utilizada en [Ventura *et al.* 2008]).

Con el fin de estudiar la contribución de cada capa en la ultrasensibilidad de la cascada, en el primer paso se procedió a calcular numéricamente la función de transferencia de cada módulo de forma aislada (curvas grises de línea continua, Figura 4.5 A-C) y luego a calcular sus respectivos  $n_i^{is}$  (ver columna 2 en la Tabla 4.1). En concordancia con el trabajo original, encontramos que la cascada muestra un comportamiento sub-multiplicativo, ya que el coeficiente global de Hill,  $n_H = 4,87$ , es menor que el producto de los coeficientes de Hill de cada capa en el aislamiento ( $n_1^{is} n_2^{is} n_3^{is} = 10.4$ ).

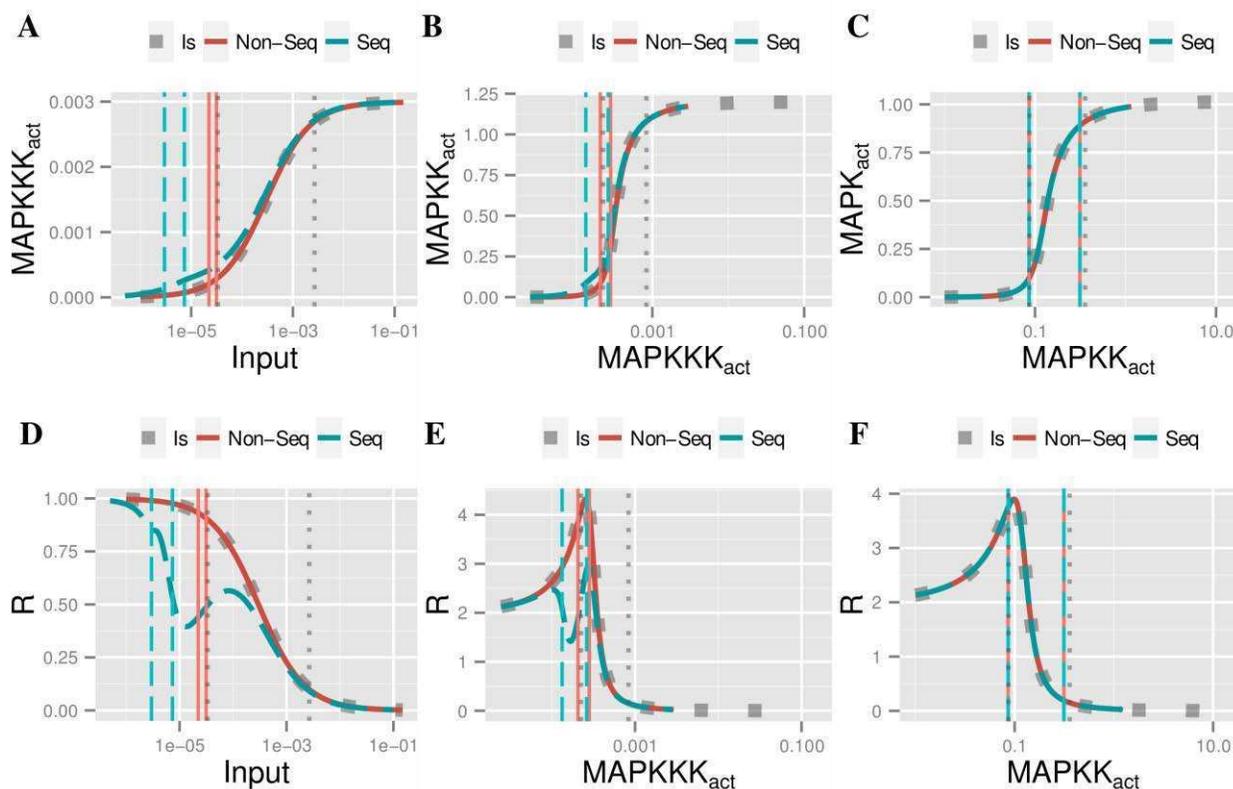


Figura 4.5 Curvas dosis-respuestas del análisis de 3 pasos del modelo de Huang-Ferrell. (A-C) En línea punteada gris está graficada la función de transferencia de cada capa aislada (paso 1), en línea continua roja la función de transferencia que este módulo sustenta al componerse los 3 módulos aislados (paso 2) y en línea discontinua azul la función de transferencia que este módulo sustenta en la cascada (paso 3). (D-F) Curvas de coeficiente de respuesta. En líneas discontinuas verticales rojas se muestran los  $X_{10}$  y el  $X_{90}$  de cada capa de la cascada original, mientras que en líneas verticales continuas rojas se muestran los  $X_{10}$  y los  $X_{90}$  de cada uno de las capas en el sistema dado por la composición de los módulos aislados ( $F^{non-seq}$ , ver ecuación [4.7]). Vale la pena señalar que las curvas de respuesta que cada módulo sustenta en el escenario sin secuestro (figura 1B) coincidirán con las curvas aisladas, con la excepción de los casos en los que el componente río arriba sature y se vea restringido el rango de inputs barridos. Esto último se puede observar en las capas MAPKK y MAPK (se puede ver que este resulta ser el mismo rango barrido por la cascada de la original

	$n_H$	$n^{is}$	$\nu^{non-seq}$	$\nu^{seq}$
MAPKKK	0.8	1	0.92	0.75
MAPKK	1.52	3.35	4.16	1.9
MAPK	4.87	3.1	3.4	3.4
Multiplicación	–	10.4	13	4.87

Tabla 4.1 Ultrasensibilidad en el modelo de Huang-Ferrell. Columna 1: Coeficientes de Hill de las curvas dosis-respuesta de las especies activas respecto al input del sistema. Columna 2: Coeficientes de Hill  $n^{is}$  de los módulos en aislamiento (línea punteada gris de la figura 3.4). Columna 3: ultrasensibilidades efectivas  $\nu^{non-seq}$  en el sistema dado por la composición de los módulos en el aislamiento, (línea continua roja de la Figura 4.5), por lo que no se tuvo en cuenta los efectos del secuestro. Estos valores ( $\nu_i^{non-seq}$ ) corresponden al valor medio del coeficiente de respuesta en el *rango de Hill* (curvas continuas rojas, figura 6 D-F). Columna 4: Ultrasensibilidades efectivas  $\nu^{seq}$  en la cascada de original. Estos valores ( $\nu_i^{seq}$ ) corresponden al valor medio del coeficiente de respuesta en el *rango de Hill* (curvas discontinuas celestes, figura 6 D-F).

El análisis de la composición matemática de las tres funciones de transferencia aisladas (paso 2) nos permitió evaluar los efectos de acoplar los módulos en cascada. La simple unión de estos, induce el cambio de *rangos de Hill* no triviales que no fueron capturados en la estimación del paso 1. En este caso, el coeficiente de Hill de  $F^{non-seq}$  dio lugar a un  $n_H^{non-seq} = 13$  (Tabla 4.1, columna 3). Notablemente, este valor es mayor que el producto de los coeficientes de Hill de los módulos en aislamiento obtenidos en la etapa 1 ( $n_1^{is} n_2^{is} n_3^{is} = 10,4$ ). Por lo tanto, la mera composición de los  $f_i^{is}$  predice que el sistema debe exhibir supramultiplicatividad (en particular, también implica que al menos un  $f_i^{is}$  contribuye con más ultrasensibilidad que su propio  $n^{is}$ ). Es importante destacar que la ultrasensibilidad de la cascada, de hecho, presenta un carácter submultiplicativo, este resultado implica que el secuestro está produciendo un fuerte efecto atenuante en esta cascada en particular (esto se explorará a continuación).

En la tabla 1 comparamos el coeficiente de Hill de cada capa en aislamiento,  $n_i^{is}$ , con su respectivo coeficiente de ultrasensibilidad efectiva  $\nu_i^{is}$  (columnas 2 vs 3). Se puede observar que la primer capa (MAPKKK) en realidad contribuye menos que su ultrasensibilidad global,  $n_1^{is}$ , pero las capas posteriores (MAPKK y MAPK) contribuyen más de lo esperado por su  $n^{is}$ . Como se puede ver en la Figura 4.5, estas diferencias se deben a la relocalización de los *rango de Hill* de cada capa al acoplarse, ya que para  $f_{MAPKK}^{is}$  y  $f_{MAPK}^{is}$  sus correspondientes *rangos de Hill* se encuentran en una región de ultrasensibilidad local mayor, mientras que lo contrario es cierto para  $f_{MAPKKK}^{is}$ .

En el tercer paso de nuestro análisis, nos centramos en el modelo de H-F que incluye el mecanismo de secuestro entre capas. En la Figura 4.5 las funciones de transferencia de cada capa embebida en la cascada se comparan con sus respectivas curvas respuesta en aislamiento. Se puede apreciar que al considerar el secuestro entre capas se altera cualitativamente la forma funcional de algunas funciones de transferencia (curvas rojas vs. Celestes, Figura 4.5A-C), y que estas alteraciones se producen sólo en algunas regiones de la función respuesta. En particular, la diferencia entre las curvas sólo se presenta en las capas MAPKKK y MAPKK (Figura 4.5A,B), ya que la capa de MAPK no tiene sustratos río abajo que la secuestren). En el apéndice 4.10 mostramos cómo, en las capas MAPKKK y MAPKK, la diferencia entre las curvas disminuye progresivamente al ir reduciendo la afinidad de la kinasa con sus sustratos (Figura 4.10)

Es interesante notar que el secuestro tiene un doble efecto sobre las curvas dosis-respuesta de las capas MAPKKK y MAPKK: I) altera los *rangos de Hill* (líneas verticales de la figura 3.4), y II) disminuye en ciertas regiones de input el coeficiente de respuesta  $R$  (figura 3.4 D-E). Basándonos en la ecuación [4.6], dado que disminuyen los valores del  $R$  dentro del *rango de Hill*, se espera que las ultrasensibilidades efectivas disminuyan también. La tabla 1 muestra el impacto del secuestro en los coeficientes de ultrasensibilidad efectiva  $v_i$  (diferencia entre las columnas 3 y 4). El mayor impacto se ve en la capa MAPKK, pero un pequeño efecto es también evidente en la capa superior.

De este análisis se concluye que el modelo de H-F de la cascada de MAP kinasas en *Xenopus*, y tal vez en la cascada real, tiene la posibilidad de ser supramultiplicativo debido a la ubicación de los *rangos de Hill*, pero sin embargo resulta submultiplicativo en gran parte debido a los efectos de secuestro.

#### 4.7 Ultrasensibilidad en el modelo de O’Shaughnessy

Sarkar y colaboradores introdujeron una cascada de MAPKinasas de mamíferos (Raf-MEK-ERK) en la levadura *S. cerevisiae* con el fin de analizar sus capacidades de procesamiento de información aisladas de su entorno normal [O’Shaughnessy *et al* 2011]. Además, hicieron uso de una descripción matemática mecanística para explicar las observaciones experimentales. Su modelo era muy similar en espíritu a Huang-Ferrell, pero con dos diferencias importantes: a) No se incluyeron las fosfatasa, y b) la creación y la degradación de todas las especies fue tomada en cuenta explícitamente. Curiosamente, informaron que la estructura en capas-múltiples era en sí misma un mecanismo capaz de generar ultrasensibilidad y llamaron a este proceso *generación de ultrasensibilidad de “novo”*. Además, sugirieron que este mecanismo daba origen a una acumulación de ultrasensibilidad supramultiplicativa.

Notablemente, analizando el modelo propuesto por Sarkar y colaboradores encontramos algunas discrepancias con respecto a carácter supramultiplicativo del sistema a describir. Pese a que el valor del trabajo va más allá que análisis detallado de su modelo matemático, creemos que la metodología y los conceptos introducidos en la presente sección son especialmente adecuados

para revisar algunas de las reivindicaciones de los autores, y demostrar la utilidad de nuestro enfoque en la comprensión de los mecanismos involucrados en la construcción de la ultrasensibilidad.

Comenzamos nuestro análisis aplicando el procedimiento de 3 pasos sobre la cascada de O'Shaughnessy *et al*, hallando así las distintas ultrasensibilidades que se muestran en la Tabla 4.2. Se puede observar que la cascada tiene un comportamiento submultiplicativo, dado que el coeficiente de Hill de la cascada ( $n_H = 3,91$ ) es menor que el producto del coeficiente de Hill de cada capa en el aislamiento ( $n_{Raf}^{is} n_{MEK}^{is} n_{ERK}^{is} = 5.02$ ). Por otro lado, se observa que el coeficiente de Hill del sistema dado por la composición matemática (acoplamiento sin secuestro) de las funciones en aislamiento ( $n_H^{non-seq} = 3.91$ ) es menor que el producto de los  $n_i^{is}$ . Esto indica un comportamiento submultiplicativo en la composición de la  $f^s$ . Curiosamente, podemos ver que los coeficientes de ultrasensibilidad efectiva en la cascada sin efectos de secuestro  $v_i^{non-seq}$  son los mismos que los coeficientes de ultrasensibilidad efectiva de la cascada mecánica,  $v_i^{seq}$ . En consecuencia, y contrariamente a lo que determinamos para el modelo de Ferrell, en este modelo el secuestro no afecta a la ultrasensibilidad del sistema. De hecho, en la Figura 4.6 se puede apreciar que para la capa de MAPKK el efecto de secuestro es insignificante, dado que las curvas del sistema con y sin secuestro coinciden. Por otro lado, en la capa de MAPKKK, el secuestro produce únicamente un corrimiento horizontal entre las curvas (Figura 4.6a) que está acompañado de un corrimiento del *rango de Hill*, produciendo que la ultrasensibilidad efectiva de esa capa no se vea afectada en absoluto. Finalmente podemos concluir que en este sistema en particular el comportamiento sub-multiplicativo general es sólo debido a una re-configuración de los *rangos de Hill* de las capas MAPKKK y MAPKK (ver Tabla 4.2 y Figura 4.6a-b)

	$n_H$	$n^{is}$	$v^{non-seq}$	$v^{seq}$
MAPKKK (Raf)	0.97	1	0.87	0.87
MAPKK (MEK)	1.14	2.04	1.82	1.82
MAPK (ERK)	<b>3.91</b>	2.46	2.47	2.47
Multiplicación	–	<b>5.02</b>	<b>3.91</b>	<b>3.91</b>

Tabla 4.2 Ultrasensibilidad en el modelo de O'Shaughnessy *et al*. de la cascada de paso doble. Columna 1: Coeficientes de Hill de las curvas dosis-respuesta de las especies activas respecto al input del sistema (Estradiol). Columna 2: Coeficientes de Hill  $n^{is}$  de los módulos en aislamiento (línea punteada gris de la Figura 4.6). Columna 3: ultrasensibilidades efectivas  $v^{non-seq}$  en el sistema dado por la composición de los módulos en el aislamiento, (línea continua roja de la Figura 4.6), por lo que no se tuvo en cuenta los efectos del secuestro. Estos valores ( $v_i^{non-seq}$ ) corresponden al valor medio del coeficiente de respuesta en el *rango de Hill* (curvas continuas rojas, Figura 4.6 D-F).

Columna 4: Ultrasensibilidades efectivas  $v_i^{seq}$  en la cascada de original. Estos valores ( $v_i^{seq}$ ) corresponden al valor medio del coeficiente de respuesta en el *rango de Hill* (curvas discontinuas celestes, Figura 4.6D-F).

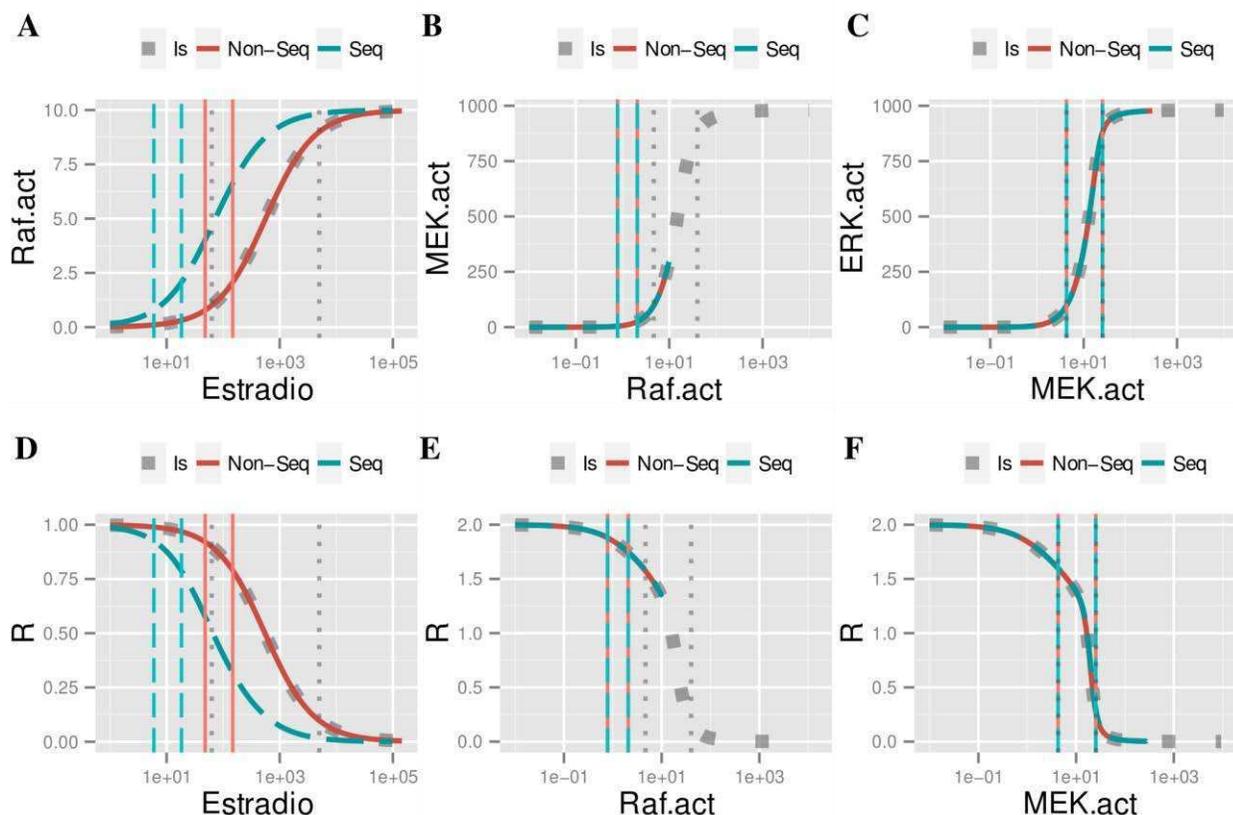


Figura 4.6 (A-C) Curvas dosis-respuestas del análisis de 3 pasos del modelo de fosforilación doble de O'Shaughnessy *et al.* En línea punteada gris está graficada la función de transferencia de cada capa aislada (paso 1), en línea continua roja la función de transferencia que este módulo sustenta al componerse los 3 módulos aislados (paso 2) y en línea discontinua azul la función de transferencia que este módulo sustenta en la cascada (paso 3). (D-F) Curvas de coeficiente de respuesta. En líneas discontinuas verticales rojas se muestran los  $X10_i$  y el  $X90_i$  de cada capa de la cascada original, mientras que en líneas verticales continuas rojas se muestran los  $X10_i$  y los  $X90_i$  de cada uno de las capas en el sistema dado por la composición de los módulos aislados ( $F^{non-seq}$ , ver ecuación [4.7]). Se puede ver que la presencia de secuestro produce únicamente un corrimiento horizontal en la capa de Raf (corrimiento entre las curvas *non-seq* y *seq* del panel A). Este corrimiento está acompañado de un corrimiento del *rango de Hill*, produciendo que la ultrasensibilidad efectiva de esa capa no se vea afectada.

Con el fin de estudiar el origen de la ultrasensibilidad observada en la cascada original (esbozada en la Figura 4.7a), O'Shaughnessy *et al.* analizaron un par de modelos computacionales alternativos. En un modelo auxiliar (a) se reemplazaron las capas de doble fosforilación por capas de fosforilación simple (ver Figura 4.7b). En un segundo modelo auxiliar (b) se unificaron las capas Raf y MEK como un único módulo (módulo Raf-MEK) y se lo pasó a describir con una única ecuación de Hill con la misma relación dosis-respuesta del total de MEK activo en función del estradiol (ver Figura 4.7c). Estos modelos se utilizaron para analizar los efectos de las fosforilaciones múltiples y los efectos de la formación de complejos en la ultrasensibilidad del

sistema, respectivamente.

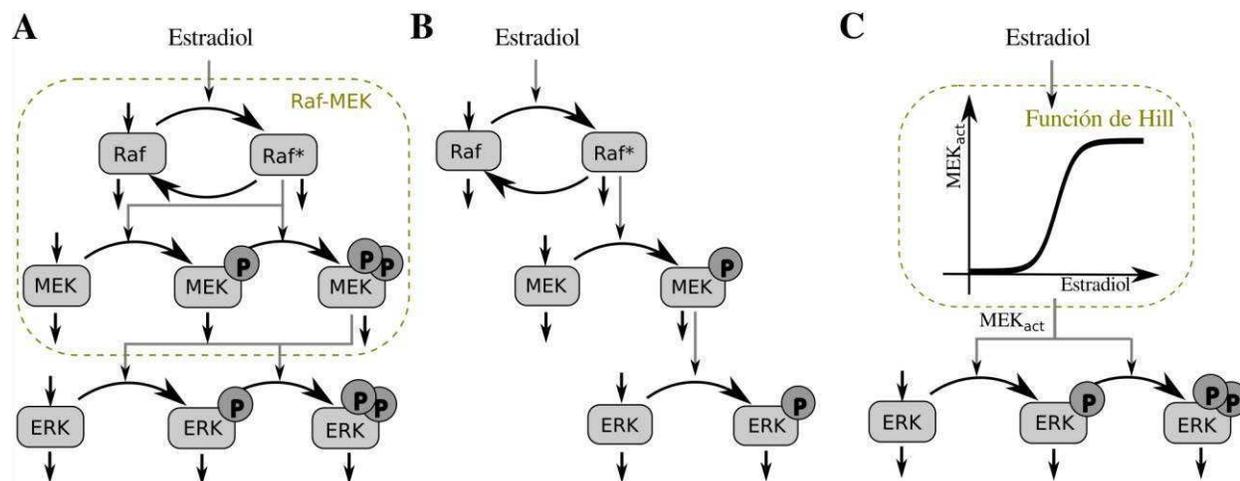


Figura 4.7 Modelos de O'Shaughnessy et al. de (a) la cascada completa, (b) la cascada de fosforilación simple y (c) el módulo Raf-MEK descrito como una función de Hill.

#### 4.7.1 Análisis de un modelo auxiliar (a): Reconsiderando la generación de ultrasensibilidad “de-novo”.

O'Shaughnessy *et al.* estudiaron una cascada con fosforilaciones simples y sin fosfatasas como se muestra en la Figura 4.7b. Debido a que la cascada no está sujeta a procesos de activación múltiple, inhibición competitiva o ultrasensibilidad de orden cero (debido a la falta de fosfatasas) afirmaron que no existe otra fuente de ultrasensibilidad además de la arquitectura en capas múltiples que tiene la cascada. Este es el punto clave en el que se basaron para considerar la existencia de una *generación de ultrasensibilidad de “novo”*. Con el fin de profundizar esto, calculamos los distintos valores de ultrasensibilidad, relativos al análisis de 3 pasos, que se muestran en la Tabla 4.3. Se puede observar que el secuestro no es un factor significativo en esta cascada. Por otra parte, los valores de  $\nu^{non-seq}$  hallados sugieren que la ultrasensibilidad del sistema está principalmente proporcionada por la del módulo de ERK.

	$n_H$	$n^{is}$	$v^{non-seq}$	$v^{seq}$
MAPKKK (Raf)	0.86	1	0.99	0.99
MAPKK (MEK)	0.91	1.54	1	1
MAPK (ERK)	1.75	1.76	1.76	1.76
Multiplicación	-	2.7	1.75	1.75

Tabla 4.3 Ultrasensibilidad en el modelo de O'Shaughnessy et al. de fosforilación simple. Columna 1: Coeficientes de Hill de las curvas dosis-respuesta de las especies activas respecto al input del sistema (Estradiol). Columna 2: Coeficientes de Hill  $n^{is}$  de los módulos en aislamiento. Columna 3: ultrasensibilidades efectivas  $v^{non-seq}$  en el sistema dado por la composición de los módulos en el aislamiento, por lo que no se tuvo en cuenta los efectos del secuestro. Estos valores ( $v_i^{non-seq}$ ) corresponden al valor medio del coeficiente de respuesta en el *rango de Hill*. Columna 4: Ultrasensibilidades efectivas  $v^{seq}$  en la cascada de original. Estos valores ( $v_i^{seq}$ ) corresponden al valor medio del coeficiente de respuesta en el *rango de Hill*.

A partir de estos resultados, estudiamos el mecanismo por el cual se genera la ultrasensibilidad en esta la capa de ERK. Se puede ver que la descripción del estado estacionario de esta capa (esquema en la Figura 4.8a) resulta matemáticamente análoga a la de un ciclo covalente (esquema de la Figura 4.8b). Esto se debe a que en el estado estacionario existe un flujo implícito de proteínas desde su estado activo hasta su estado inactivo, a través de la degradación de las proteínas activas y la generación de estas en su forma inactiva.

Dado que la degradación es una reacción lineal con respecto a la cantidad de proteína activada, su descripción matemática resulta equivalente a la de una reacción de desfosforilación que opera en un régimen de primer orden (Figura 4.8b). Así, la capa de ERK de la cascada de fosforilación simple representada en la Figura 4.8b puede ser descrita por una función de Goldbeter-Koshland (GK) con

$$K_1 = \frac{k_{deg} + b_1 + k_1}{X_T a_1} \text{ y } K_2 \gg 1$$

En la Figura 4.8c graficamos la función de transferencia del módulo de ERK en el aislamiento junto a una función G-K con  $K_1 = \frac{k_{deg} + b_1 + k_1}{X_T a_1}$ ,  $K_2 = 1000$  y centrada en el mismo valor de inputs

tal que los EC50 coincidan. El centrado se realizó multiplicando la variable independiente por un factor de escala. Se puede apreciar que ambas funciones coinciden por lo que ambas presentan la misma ultrasensibilidad de  $n_H = 1,76$ , que es la contribución de ultrasensibilidad a toda la cascada.

A la luz de estos resultados concluimos que la ultrasensibilidad del sistema de fosforilación simple no proviene de una *generación de "novo"*, sino de un proceso ultrasensibilidad de primer orden "oculto" en la capa de ERK.

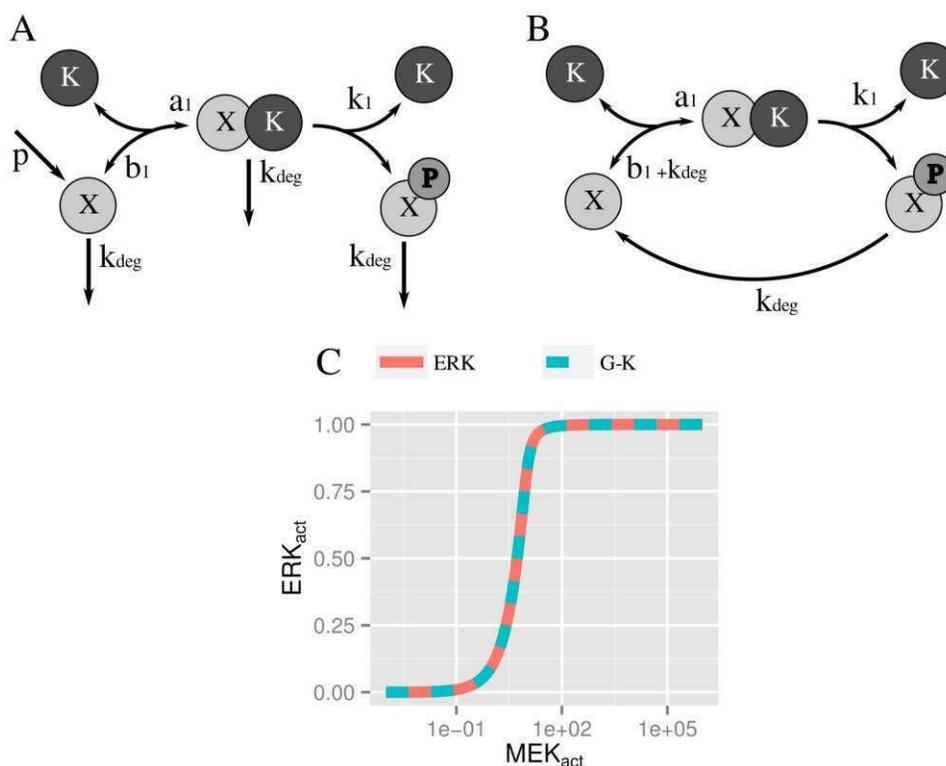


Figura 4.8 Equivalencia entre la descripción de (A) una capa de fosforilación simple de O'Shaughnessy et al. con la de (B) un ciclo covalente. (C) En línea roja se muestra la función de transferencia de ERK activo en la cascada de fosforilación simple de O'Shaughnessy *et al.* comparada con una función de G-K con parámetros equivalentes ( $K_1=0.04$  y  $K_2=1000$ ) y centrada de forma tal que los EC50 coincidan (en línea celeste)

#### 4.7.2 Análisis de un modelo auxiliar (b): La relevancia en los detalles

En la Figura 4.7c, representamos el sistema analizado por O'Shaughnessy *et al.* que está dado por la composición de una función de Hill con la capa de ERK. Los parámetros de la función de Hill se hallaron mediante el ajuste de la curva dosis-respuesta de MEK activo por una función de Hill (Figura 4.8c). Este sistema presenta un coeficiente de Hill general de 2.7, que resulta menor que el valor encontrado en el sistema original ( $n_H = 3.91$ ). A partir de este resultado, O'Shaughnessy *et al.* interpretaron que esta diferencia en la ultrasensibilidad se debe a que en el

sistema completo MEK activo forma especies intermedias al unirse con sus sustratos (esto mismo es lo que nosotros llamamos secuestro) mientras que en el sistema con la función de Hill esto no sucede. A raíz de este análisis, propusieron que el solo hecho de acoplar las capas de una cascada de kinasas, se genera ultrasensibilidad y que este efecto explicaba la diferencias de ultrasensibilidades entre el sistema completo y al que reemplazaron el modulo Raf-MEK por una función de Hill. Cabe destacar que este sería un resultado novedoso, ya que en la literatura estaba reportado [Bluthgen *et al.* 2006] que el secuestro, por el contrario, disminuye la ultrasensibilidad.

Con el fin de identificar el origen de esta diferencia en la ultrasensibilidad de los dos sistemas, se aplicó el análisis de 3 pasos, hallando así las ultrasensibilidades mostradas en la Tabla 3.4 y las curvas de la Figura 4.9

	$n_H$	$n^{is}$	$\nu^{non-seq}$
Hill function	1.14	1.14	1.09
MAPK (ERK)	2.70	2.47	2.47
Multiplicación	–	2.82	2.70

Tabla 3.4: Ultrasensibilidades en el modelo de O’Shaughnessy et al. de la cascada cuando el módulo Raf-ERK es reemplazado por una función de Hill: Columna 1: Coeficientes de Hill de las curvas dosis-respuesta de las especies activas respecto al input del sistema (Estradiol). Columna 2: Coeficientes de Hill  $n^{is}$  de los módulos en aislamiento. Columna 3: ultrasensibilidades efectivas  $\nu^{non-seq}$  en el sistema dado por la composición de los módulos en el aislamiento, por lo que no se tuvo en cuenta los efectos del secuestro. Notar que en esta cascada no se presentan efectos de secuestro, es por esto que no se aplica el último paso del análisis (es decir, no corresponde calcular los  $\nu_1^{seq}$ )

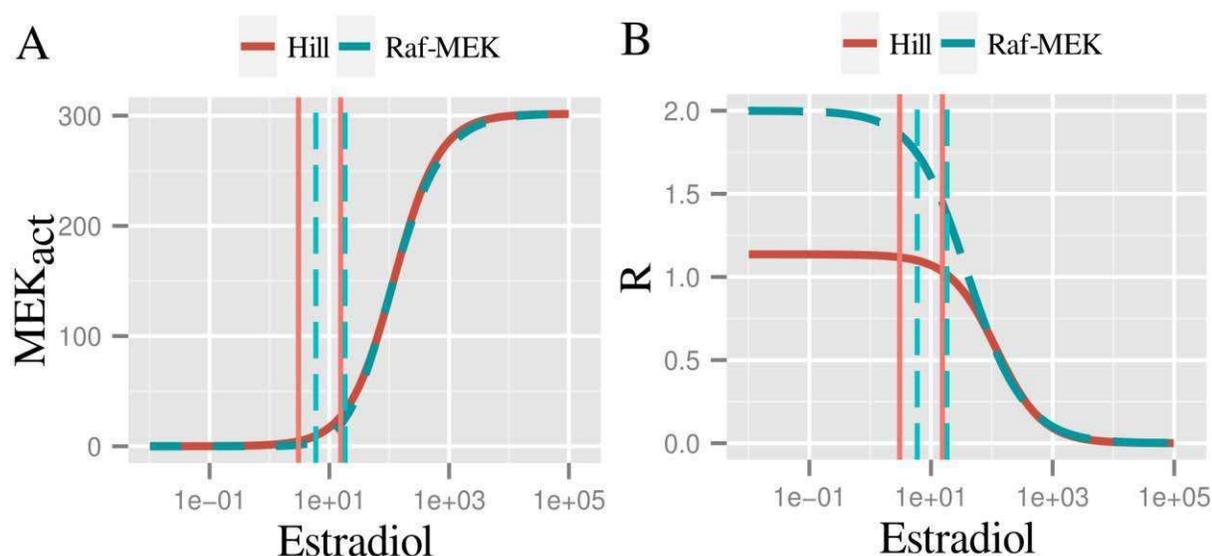


Figura 4.9 (A) Curva dosis-respuesta de MEK activo en el modelo O'Shaughnessy en comparación con su ajuste por una función de Hill. (B) Coeficiente de respuesta correspondiente. Se puede observar que a pesar de que la curva dosis-respuesta de MEK activo y la función de Hill parecen ser similares, hay fuertes discrepancias en su ultrasensibilidad y local. En consecuencia, el ajuste por una función de Hill puede despreciar comportamientos relevantes

Aquí se observa que, de hecho, la función de Hill está contribuyendo una ultrasensibilidad menor ( $v_{\text{Hill Func}}^{\text{non-seq}} = 1.14$ ) que la del módulo Raf-MEK del sistema original ( $v_{\text{Raf-MEK}}^{\text{seq}} = v_{\text{Raf}}^{\text{seq}} v_{\text{MEK}}^{\text{seq}} = 0.87 \cdot 1.82 = 1.58$ ). Se puede ver en la Figura 4.9 que pese a que la dosis-respuesta de MEK activa y la función de Hill parecen ser similares, hay fuertes diferencias en el comportamiento de la ultrasensibilidad local. Esto es particularmente cierto para los valores de inputs pequeños, para los cuales la curva de MEK activa presenta valores de ultrasensibilidad local mayores que la función de Hill. Finalmente podemos concluir que la discrepancia en la ultrasensibilidad global de ambas cascadas se debe a que el ajuste por una función de Hill no logra capturar las ultrasensibilidades locales de la curva original en la región en la que están localizados los *rangos de Hill*. Esto último se encuentra exacerbado por el hecho de que la curva dosis respuesta de Raf-MEK presenta valores de ultrasensibilidad local mayores que el coeficiente de Hill de la curva. En particular, esta curva entra dentro de la categoría de *ultrasensibles por izquierda*.

Finalmente, concluimos que la diferencia en la ultrasensibilidad entre ambas cascadas no se debe a la formación de especies intermedias, sino que se debe a que la aproximación por una función de Hill no reproduce adecuadamente la ultrasensibilidad local de la curva dosis-respuesta. Cabe señalar que en este sistema la formación de especies intermedias no influye en la ultrasensibilidad del sistema, ya que como hemos mostrado, los coeficientes de ultrasensibilidad efectivos, con y sin secuestro, resultaron ser iguales ( $v^{\text{non-seq}} = v^{\text{seq}}$ ).

## 4.8 Conclusiones

El estudio de la transmisión de señales y el procesamiento de la información dentro de la célula ha sido, y sigue siendo, un campo activo de investigación. En particular, el análisis de cascadas de módulos sigmoidales ha recibido mucha atención, ya que son motivos muy *conservados* que se pueden encontrar en muchos sistemas de toma de decisión de destino celular. En esta sección nos hemos centrado en el análisis del carácter ultrasensible de este tipo de sistemas moleculares.

En particular, hemos hallado una relación matemática entre la caracterización de la ultrasensibilidad global (Coeficiente de Hill definido en la ecuación [2.7]) y local (Coeficiente de respuesta definido en la ecuación [2.8]) de unidades sigmoidales, mostrando que el coeficiente de Hill se relaciona con el valor medio del coeficiente de respuesta en una cierta región que llamamos *rango de Hill*. Además, hemos generalizado este resultado para manejar el caso de una disposición lineal de dichos módulos, encontrando que la ultrasensibilidad global de un sistema puede definirse en términos de la contribución efectiva de cada nivel de la cascada. Análogamente, la contribución efectiva ( $v_i$ ) de cada capa sobre la ultrasensibilidad de la cascada está determinada por el valor medio de la ultrasensibilidad local en su *rango de Hill*. En esta misma línea, hemos observado que la manera en que se acoplan las distintas capas de una cascada, determina los *rangos de Hill* de estos, y consecuentemente, determina la ultrasensibilidad efectiva aportada.

Sobre la base de nuestros resultados, propusimos un procedimiento metodológico para analizar sistemas modulares en cascada, en particular, las cascadas de MAPKinasas. En este contexto hemos estudiado con este método 2 modelos de cascadas de MAPKinasas de interés biológico: El modelo de Huang-Ferrell [Huang y Ferrell 1996] de la cascada de MAPKinasas de ovocitos en *Xenopus* y el modelo implementado por Sarkar y colaboradores [O'Shaughnessy *et al.* 2011] para describir la cascada de mamíferos que lograron introducir sintéticamente en levaduras.

El modelo de Huang-Ferrell, por su relevancia biológica e histórica, ha sido tomado en la literatura como cascada prototípica para testear hipótesis [Qiao *et al.* 2007, Bluthgen and Herzl 2003, Bluthgen *et al.* 2006]. Sobre este modelo, hemos aplicado nuestro método para identificar los diferentes factores que contribuyen a la ultrasensibilidad general de una cascada. De este análisis se concluyó que el modelo de H-F de la cascada de MAP kinasas en *Xenopus*, tiene la posibilidad de ser supramultiplicativo debido a la ubicación de los *rangos de Hill*, pero en realidad resulta submultiplicativo debido a los efectos de secuestro principalmente entre el estado activo de la MAPKK y sus sustratos (de la capa de MAPK).

Por otro lado, el sistema de Sarkar y colaboradores resulta de interés porque propusieron que el acoplamiento de capas múltiples es un mecanismo en sí mismo capaz generar ultrasensibilidad. Este mecanismo, que denominaron generación de ultrasensibilidad de “*novo*”, lo sustentaron principalmente con dos observaciones: (a) identificaron la presencia de ultrasensibilidad en una cascada formada por capas que no presentaban los mecanismos habituales capaces de generar

ultrasensibilidad. (b) Observaron una disminución de la ultrasensibilidad de la cascada al reemplazar, en el modelo, las primeras dos capas por una función de Hill (de igual ultrasensibilidad global). Ellos interpretaron que esta diferencia en la ultrasensibilidad se debía a que, en el sistema completo, MEK activo forma especies intermedias al unirse con sus sustratos (esto mismo es lo que nosotros llamamos secuestro) mientras que en el sistema con la función de Hill esto no sucede. En este contexto, nuestro análisis de 3 pasos resultó ser un método idóneo para estudiar los distintos efectos que tiene el acoplamiento de las capas sobre la ultrasensibilidad del sistema. Así, hallamos que en la observación (a) la ultrasensibilidad se producía por un mecanismo de *ultrasensibilidad de primer orden* oculto en la tercer capa, mientras que en la observación (b) la diferencia de ultrasensibilidad no se debía a la presencia de especies intermedias, sino a que la función de Hill no reproducía adecuadamente la sensibilidad local de la curva dosis-respuesta en la región donde se localizaba el *rango de Hill*.

Desde una perspectiva general, nuestro marco sirve para entender el origen de la ultrasensibilidad en estructuras multicapa, lo que podría ser una herramienta poderosa en el diseño de sistemas sintéticos. En particular, en el diseño de módulos ultrasensibles, nuestro método se puede utilizar para entender los parámetros a ajustar, ya sean del propio módulo o del acoplamiento con el sistema, con el fin de localizar el rango de trabajo de la unidad en la región de ultrasensibilidad local máxima.

## 4.9 Referencias

Altszyler E, Ventura A, Colman-Lerner A, Chernomoretz A 2014 Impact of upstream and downstream constraints on a signaling module's ultrasensitivity *Physical Biology*. **11** 066003

Bluthgen N and Herzel H 2001 Map-kinase-cascade: switch, amplifier or feedback controller. *In 2<sup>nd</sup> Workshop on Computation of Biochemical Pathways and Genetic Networks*, pp. 55–62 Berlin: Logos Verlag.

Bluthgen N and Herzel H 2003 How robust are switches in intracellular signaling cascades *Journal of theoretical Biology* **225** 293-300

Bluthgen N, Bruggeman F J, Legewie S, Herzel H, Westerhoff H V and Kholodenko B N 2006 Effects of sequestration on signal transduction cascades. *FEBS Journal* **273** 895-906

Del Vecchio D, Ninfa A and Sontag E 2008 Modular cell biology: retroactivity and insulation. *Mol Sys Biol* **4** 161 p161.

Ferrell J E 1997 How responses get more switch-like as you move down a protein kinase cascade *Trends Biochem Sci*. **22** (8):288-9.

Goldbeter A and Koshland D E 1981 An amplified sensitivity arising from covalent modification in biological systems *PNAS* **78** 11 6840-6844

Huang C-Y F and Ferrell J E 1996 Ultrasensitivity in the mitogen-activated protein kinase cascade *Proc. Proc. Natl. Acad. Sci.* **93** 10078-10083

O'Shaughnessy E C, Palani S, Collins J J, Sarkar C A 2011 Tunable signal processing in synthetic MAP kinase cascades *Cell* **7** 144(1):119-31

Qiao L, Nachbar R B, Kevrekidis I G, Shvartsman S Y 2007 Bistability and oscillations in the Huang-Ferrell model of MAPK signaling. *PLoS Comp. Biol.* **3**:1819-1826

Ventura A C, Sepulchre J A and Merajver S D 2008 A hidden feedback in signaling cascades is revealed, *PLoS Comput Biol.* **4**(3):e1000041

## 4.10 Apéndice

Con el fin de mostrar que el secuestro es el origen de las diferencias entre las curvas “seq” y “non-seq” en la Figura 4.6, disminuimos secuencialmente la afinidad de las kinasas con sus proteínas blancas. Se puede observar que cuando la afinidad es suficientemente débil ( $K_m$  altos) las curvas dosis-respuesta de las capas embebidas en la cascada coinciden con las curvas de la capa en aislamiento

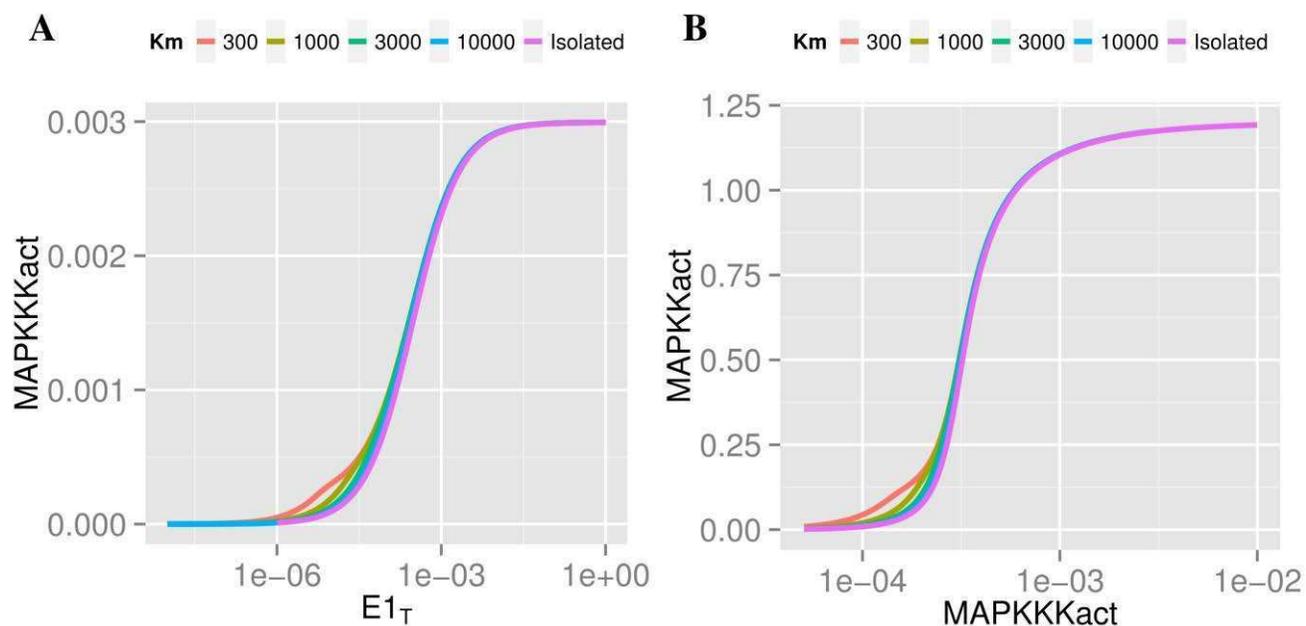


Figura 4.10 Función de transferencia de las capas de MAPKkact (A) y MAPKkact (B) para los valores de la constante de Michaelis-Menten,  $K_m$ , indicados, los cuales reflejan la afinidad entre la kinasa activa y su blanco, para el modelo de MAP kinasas de H-F. Se puede observar que cuando  $K_m$  tiende a valores altos (la afinidad tiende a cero), la curva tiende a la del caso en aislamiento, en el que no se observan “hombros”.  $K_m=300$  en el modelo de H-F. Los valores de  $K_m$  están en unidades de nM.

## 5 ITERACIÓN MODELADO-EXPERIMENTACIÓN EN BIOLOGÍA DE SISTEMAS: ESTUDIO DE PROCESOS DE DECISIÓN DE DESTINO CELULAR EN LA VÍA DE RESPUESTA A FEROMONA EN LEVADURA DE CERVEZA *S. CEREVISIAE*

### 5.1 Resumen

Frente a un estímulo dado, un grupo específico de moléculas actúa en conjunto para llevar a cabo las acciones que dan lugar a la respuesta celular. Gran parte de los esfuerzos de la biología molecular están puestos en encontrar las proteínas y las interacciones involucradas en las distintas vías de señalización celular e identificar el rol que juegan en dichos procesos. En nuestro grupo utilizamos como modelo *Saccharomyces cerevisiae* (levadura de cerveza) y estudiamos el proceso de toma de decisión celular respecto a aparearse o no cuando ésta es estimulada con feromona. En particular, estamos interesados en identificar y estudiar el mecanismo bioquímico que sustenta las respuestas celulares tipo “*switching*”. Creemos que este fenotipo emerge a partir de la interacción entre la vía de respuesta a feromona y el ciclo celular y para mostrar esto utilizamos un acercamiento de *biología de sistemas*. Como hemos introducido en la sección 1.4, este acercamiento se basa en iteraciones experimentación-modelado, Biólogo-Físico. En cada iteración se analiza matemáticamente el sistema biológico, se prueba si el modelo es capaz de reproducir los experimentos existentes y luego se propone nuevas hipótesis que el biólogo debe contrastar experimentalmente. Si el experimento no contradice las hipótesis el modelo gana credibilidad, en caso contrario, se descarta el modelo refutado, se genera un nuevo modelo y se comienza nuevamente con la iteración. En todo caso, como resultado de cada ciclo se adquiere intuición acerca de la biología relevante al problema.

En nuestro caso particular se procedió de la siguiente manera:

- A partir de observaciones experimentales se determinó el objeto de estudio y las preguntas a responder (sección 5.3).
- Se propuso un modelo biológico en el que se seleccionó, partiendo de todas las proteínas e interacciones conocidas, las que creíamos más relevantes y que podrían originar las respuestas tipo *switching* (sección 5.2).
- Con el fin de estudiar el modelo biológico propuesto, se construyó un modelo matemático basado en ecuaciones diferenciales ordinarias. (sección 5.4).
- Se estudiaron las características fundamentales del sistema usando la teoría de *sistemas dinámicos*. (sección 5.5).
- Se exploró si el modelo matemático era capaz de reproducir el comportamiento tipo *switching* (subsección 5.5.2).
- Se contrastó el modelo con otras observaciones experimentales realizadas en el laboratorio (subsección 5.5.1) y experimentos relevantes de la literatura (sección 5.6).

- Se identificaron los mecanismos y las condiciones que dan lugar, *en el modelo*, al comportamiento tipo *switching* y se propusieron nuevos experimentos capaces de poner a prueba el modelo (sección 5.8).
- Se realizaron los experimentos señalados por el modelo y se refutó el modelo. En consecuencia se propuso un nuevo modelo biológico, comenzando así una nueva iteración (sección 5.8).

## 5.2 Introducción

### 5.2.1 La Vía de Respuesta a Feromona

La levadura *S. cerevisiae* es un organismo eucariota, como el hombre, pero unicelular. En su vida haploide existe en dos tipos sexuales (como las gametas sexuales humanas) que se denominan tipo sexual **a** y  **$\alpha$** . En una población de un tipo dado y en condiciones nutricionales favorables, las células crecen y se dividen de acuerdo a un programa conocido como *ciclo de división celular*. Este tipo de crecimiento se denomina crecimiento vegetativo. Dicho ciclo celular es en realidad una sucesión de eventos a lo largo de los cuales una célula crece y luego se divide en dos células hijas, que contienen la información y maquinarias necesarias para repetir el proceso.

A su vez, dos células haploides de tipo diferente pueden aparearse dando lugar a una progenie diploide MATa/MAT $\alpha$ . Cuando células haploides de levadura de tipo sexual **a** detectan en su entorno factor- $\alpha$  (un péptido secretado por las células del tipo complementario  **$\alpha$** ), se gatillan una serie de eventos que conducen a la detención del crecimiento vegetativo normal y el inicio de los procesos moleculares necesarios para el apareamiento. Estos cambios incluyen: detención del ciclo de división celular en la fase G1 (START) del ciclo, la expresión de alrededor de 200 genes, que codifican para proteínas necesarias para aparearse y cambios en la morfología de la célula (shmooing), entre otros. El sistema de transducción de señales que detecta la presencia de feromona extracelular y coordina la respuesta molecular para iniciar el proceso de apareamiento antedicho se conoce como la *Vía de Respuesta a Feromona* (VRF). Esta vía de señalización constituye un sistema de transducción de señales prototípico en células eucariotas y es un ejemplo paradigmático de los mecanismos que pone en juego una célula para responder a su entorno.

En la actualidad se dispone de un amplio conocimiento sobre los detalles moleculares y se tiene una imagen más o menos completa de la secuencia de eventos involucrados en la dinámica de la VRF [Bardwell 2004]. En la figura 1 se observa un esquema simplificado de la misma. Brevemente, cuando el péptido factor- $\alpha$  se liga al receptor Ste2, que se encuentra en la membrana plasmática en la superficie celular, se separa la subunidad  $\alpha$  del dímero  $\beta\gamma$  de la proteína G trimérica de membrana. Esto a su vez, permite que la proteína de andamiaje Ste5 se reclute a la membrana, y ponga en funcionamiento una cascada de fosforilación de tres niveles que tiene como resultado la activación de dos proteínas MAP kinasas (*mitogen activated proteína kinases*) llamadas Fus3 y Kss1. Estas kinasas activan a su vez diferentes ramas moleculares que controlan

no sólo procesos preparatorios para el cruzamiento, sino también mecanismos de retroalimentación positiva y negativa que actúan sobre la VRF misma y que son fundamentales para determinar la dinámica y características de la propagación de la información hacia el interior de la célula. Finalmente, la activación de la VRF inducirá la expresión de una gran cantidad de genes que codifican para proteínas necesarias para aparearse y para cambios en la morfología de la célula

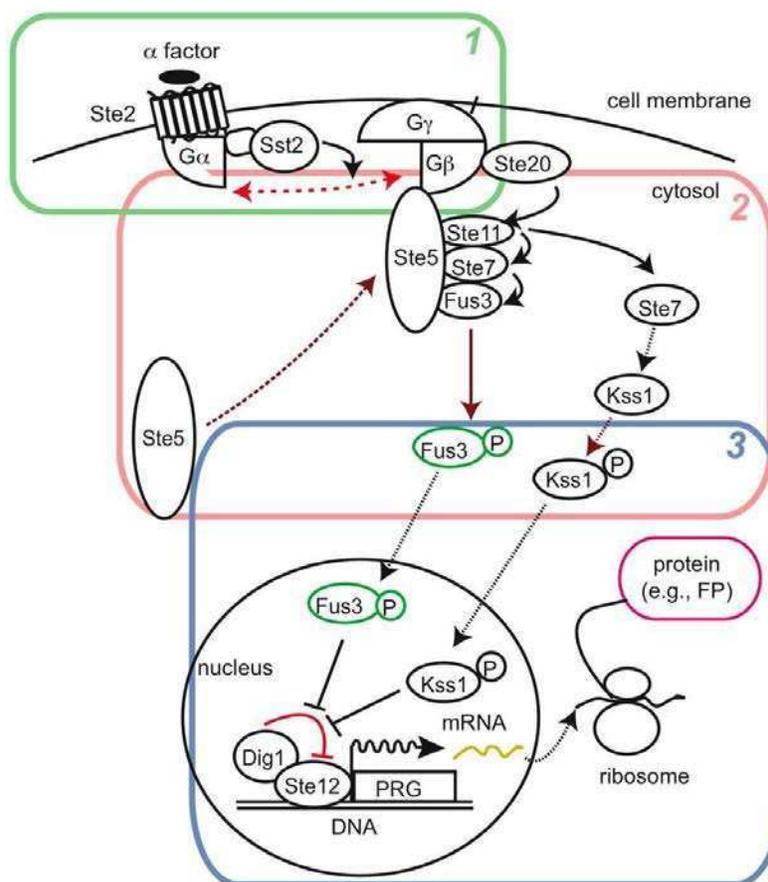


Figura 5.1 Esquema de la vía de respuesta al factor  $\alpha$ . La información de los niveles de factor  $\alpha$  se transmite desde la membrana celular (esquematizada con una línea arriba) hasta el núcleo (un círculo abajo) a través de una serie de proteínas (óvalos) que se activan (flechas) en una determinada secuencia. Los módulos de la proteína G (1), cascada de MAPK (2) y activación de la transcripción (3) están resaltados con un rectángulo de color.

El fenotipo morfológico característico en las células que responden a feromona es el *shmoo* y se presenta como una proyección ahusada en la dirección de la fuente de feromona (ver Figura 5.2), la cual resulta necesaria para generar el contacto directo que va a dar lugar al apareamiento.



Figura 5.2 Célula presentando el fenotipo de “shmoo”, característico en células que se encuentran respondiendo a feromona

### 5.2.2 El ciclo celular

El Ciclo celular de la levadura ha sido ampliamente estudiado por más de 30 años y es, en su esencia, una versión más simple de su contraparte homóloga de células de mamíferos. El ciclo celular se puede entender como una oscilación periódica en la actividad de las kinasas ciclina-dependientes [Zhang *et al.* 2011]. Esta oscilación implica transiciones ordenadas a través de varios estados metaestables en el sistema. Los dos principales estados metaestables en el ciclo celular se caracterizan por una baja (fase G1) y de alta actividad de CDK dependiente de ciclina de tipo B (fases S G2 y M). En la levadura estos estados son causados, y se mantienen en gran parte, por la inhibición mutua entre el Cdc28 unido a una ciclina de tipo B (en levaduras, la subunidad catalítica de la CDK que impulsa el ciclo celular es Cdc28) y el inhibidor de CDK Sic1. Con el fin de iniciar la transición de un estado metaestable al siguiente, el sistema emplea moléculas que funcionan de "iniciadoras". En G1, altos niveles de Sic1 mantienen el Cdc28/Clb5,6 (representante de la fase S) en baja actividad. La fase S se activa cuando las concentraciones de las ciclinas iniciadoras de G1 Cln1 y Cln2, insensibles a la inhibición por Sic1, suben y modifican a Sic1 de tal forma que es atacado por la maquinaria de degradación en el proteasoma. Esto libera la inhibición sobre la actividad Cdc28/Clb5,6, que también actúa de manera similar sobre Sic1. Este tipo de retroalimentación positiva impulsa una transición abrupta en el ciclo celular.

El fenotipo característico en las células que se encuentran ciclando es el *budding*, y se presenta con la aparición a su lado de una gema (crecimiento que corresponde a la futura célula hija, ver Figura 5.3)

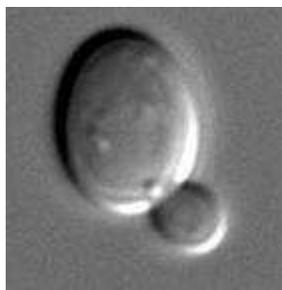


Figura 5.3 Célula presentando el fenotipo de *budding*, característico en células que se encuentran atravesando su ciclo celular con normalidad, llevando adelante así el proceso de división celular (panel derecho).

### 5.2.3 Interacción de la vía de respuesta a feromona con el ciclo celular

Cdc28 es una quinasa ciclina-dependiente esencial para el normal desarrollo del ciclo celular. Esta proteína, además, al estar unida a las ciclinas Cln1 o Cln2 interactúa directamente con la vía de respuesta a feromona. A continuación detallaremos 3 interacciones que creemos esenciales para la constitución del comportamiento estudiado:

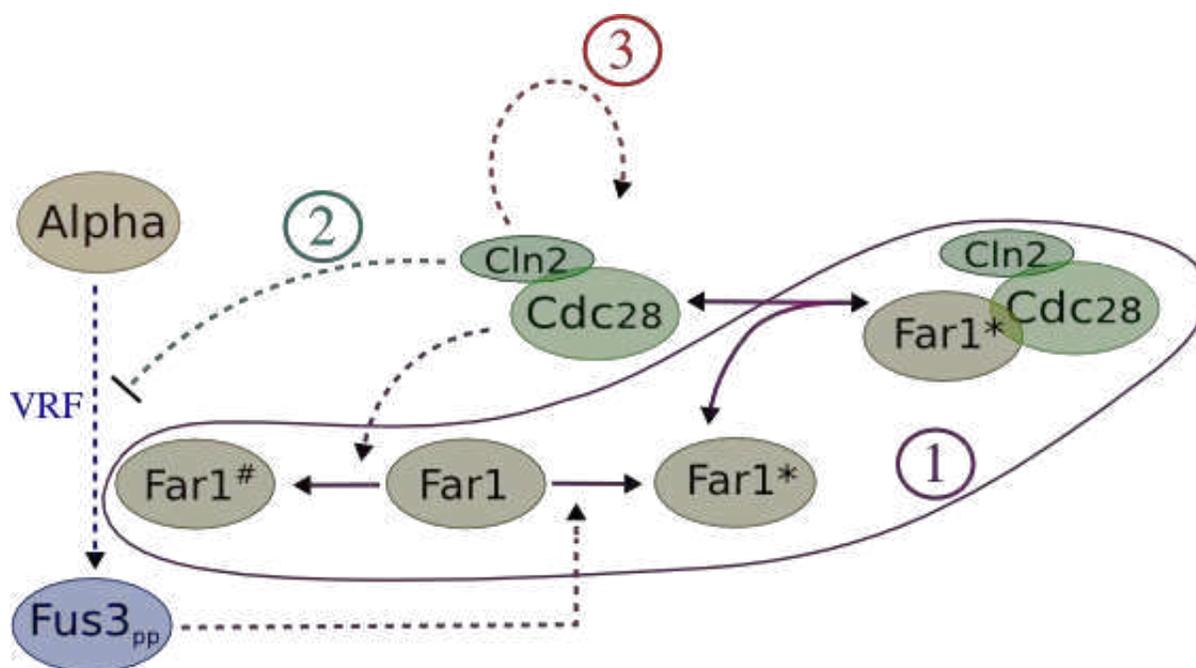


Figura 5.4 Esquema de las especies e interacciones más relevantes de la VRF y el ciclo celular. (1) Arresto del ciclo celular dependiente de la VRF. (2) Bloqueo de la VRF debido al ciclo celular. (3) Retroalimentación positiva del Ciclo celular.

1. *Arresto del ciclo celular dependiente de la VRF*: Fus3<sub>pp</sub> arresta al ciclo celular en G1 al inhibir a Cdc28. Esto lo logra por medio de la fosforilación de Far1 y éste en su estado fosforilado (Far1<sup>\*</sup>) inactiva a Cdc28 secuestrándolo (es decir, ligándose a él formando un complejo inactivo). Por otro lado, Cdc28 puede fosforilar a Far1 en un sitio tal que este pasa a un estado inactivo (Far1<sup>#</sup>), estado que a su vez tiene una tasa de degradación mayor. De esta manera Fus3<sub>pp</sub> inhibe a Cdc28 y éste, a su vez, suprime a su propio inhibidor.

2. *Bloqueo de la VRF debido al ciclo celular*: Cdc28-Cln1/2 despegga a Ste5 de la membrana celular, interrumpiendo la cascada de señalización iniciada por la feromona. Hay indicios de que el despegue de Ste5 dependiente de Cdc28-Cln2 podría ser ultrasensible [Serber y Ferrell 2007].

3. *Retroalimentación positiva del Ciclo celular*: Hay fuertes evidencias experimentales que muestran que Cln1/2 promueve la activación de su propia síntesis, al sacar del núcleo al represor de su factor de transcripción, Whi5. Este feedback positivo resulta sumamente relevante ya que se ha mostrado que le confiere la capacidad de ser biestable al sistema [Charvin et al. 2010].

Podemos visualizar al ciclo celular y a la VRF como dos procesos en competencia que son modulados según la presencia o ausencia de feromona. En presencia de altas concentraciones de feromona, la VRF se encontrará activa, y se arrestará el ciclo celular debido a la inhibición de Cdc28-Cln1/2. En contraposición, si el ciclo celular se encuentra activo (altas concentraciones de Cdc28-Cln1/2), este interrumpirá la VRF, haciendo que la célula no responda frente a la presencia de feromona y que prosiga su ciclo de división celular con normalidad.

### 5.3 Observaciones experimentales, motivaciones del proyecto

Con el fin de estudiar cuantitativamente la actividad de la VRF, en nuestro laboratorio, se introdujo un reportero fluorescente a uno de los genes inducidos por la VRF. De esta manera, por medio de herramientas de microscopía se observa la acumulación de reportero fluorescente cuando la VRF se encuentre activa, mientras que en caso contrario, no se observan variaciones de la cantidad total del reportero. En la Figura 5.5 se graficó la cantidad de reportero acumulada en función del tiempo para 4 pares de células madre-hija expuestas a feromona. En la misma, se puede observar que las células presentan 2 tipos de comportamientos cualitativamente distintos, donde cada comportamiento se identifica con un destino celular particular. Las células que cuentan con su VRF en actividad acumulan reportero a lo largo del tiempo y, como es de esperar, resultan ser células que hacen *shmooing*. Por otro lado, las células que cuentan con su VRF inactivo no acumulan reportero (y mantienen constante la concentración de reportero) y, como es de esperar, resultan ser células que hacen *budding*.

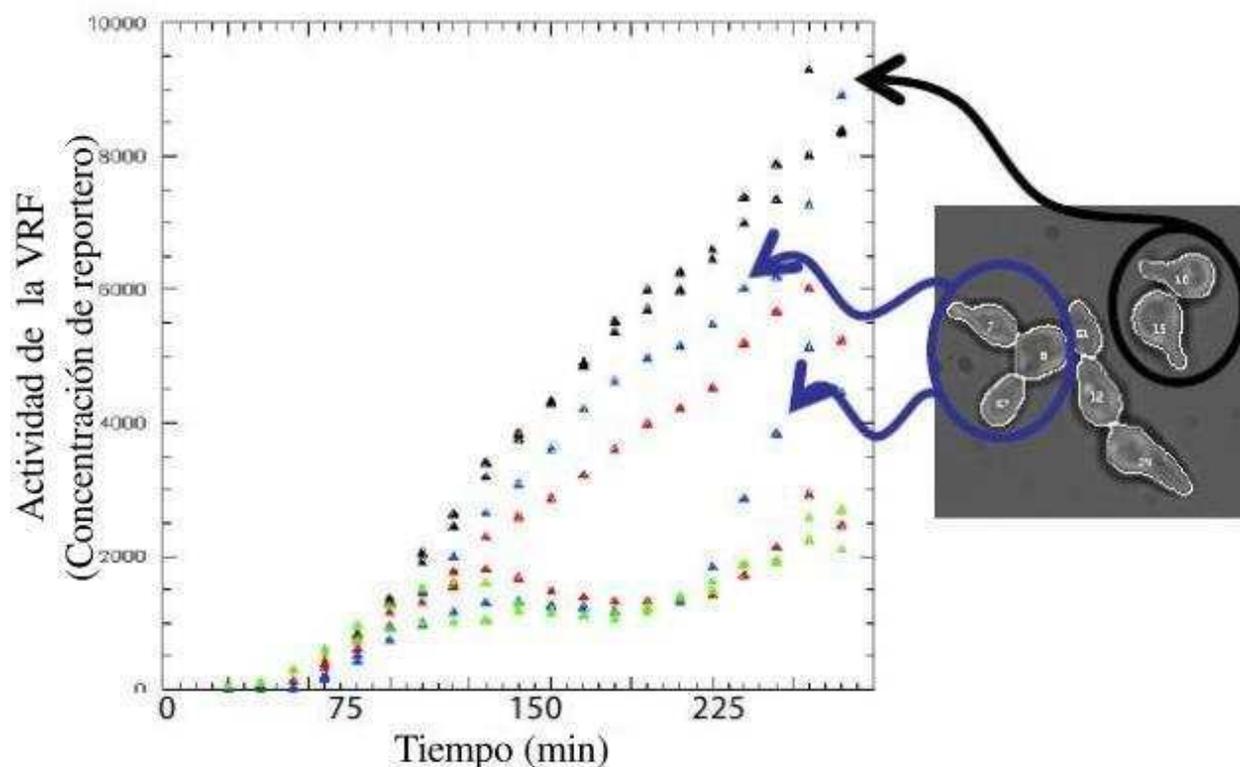


Figura 5.5 Concentración acumulada de reportero en función del tiempo para 4 pares de células madre-hija expuestas a feromona. Se puede observar que las células presentan 2 tipos de comportamientos cualitativamente distintos, donde cada comportamiento se identifica con un destino celular particular. Las células que cuentan con su VRF en actividad acumulan reportero a lo largo del tiempo y presentan un fenotipo del tipo *shmooing*. Por otro lado, las células que cuentan con su VRF inactiva no acumulan reportero (y mantienen constante la concentración de reportero) y presentan un fenotipo del tipo *budding*. Cabe aclarar que el segundo incremento de la concentración del marcador que se da al minuto 225 en las células arrestadas, no se debe a la actividad de la VRF sino que se debe a una disminución del volumen debido a la división celular.

En la Figura 5.5 se muestra en triángulos negros un par madre-hija con un destino celular del tipo *shmooing*, esto es debido a que sus VRF se encuentran en actividad. En contraposición, las células comprometidas con el ciclo celular (en triángulos verdes) no acumulan reportero ya que sus VRF se encuentran apagadas.

Es sabido que las células de una colonia están sujetas a variabilidad célula a célula (ver sección 1.3), la cual hace que cada célula de la colonia tenga características ligeramente distintas. Sin embargo, debido a la similitud en los estados iniciales entre madre e hija, se espera que ambas se comporten casi de la misma manera, como es el caso de los pares negro y verde de la Figura 5.5. Pero para nuestra sorpresa, encontramos pares como el azul y el rojo, en el que madre e hija tienen diferentes destinos celulares.

Otro resultado contraintuitivo es la existencia de células que están comprometidas con el ciclo celular pero parecieran estar respondiendo a feromona a lo largo de un cierto intervalo de tiempo. Este comportamiento celular lo denominamos *switching*, y se caracteriza a escala celular por inicialmente producir un *shmoo* y luego cambiar de destino celular y producir un *bud*.

De esta manera, este experimento nos provee dos tópicos a investigar:

- Los orígenes de la variabilidad fenotípica.
- Los mecanismos moleculares que dan origen al *switching*

Bajo estas motivaciones, en el laboratorio nos propusimos estudiar, utilizando un enfoque de la biología de sistemas, las bases moleculares que dan origen a la variabilidad fenotípica y al comportamiento tipo *switching*. En particular, esta tesis nos centraremos en el estudio de este último tópico

#### **5.4 Descripción cuantitativa de la interacción entre la vía de respuesta a feromona y el ciclo celular**

Como hemos introducido en el capítulo 2, la vía de respuesta a feromona y su interacción con el ciclo celular pueden ser descritos como una red compleja de interacciones entre distintas especies. Estas pueden ser modeladas cuantitativamente mediante un sistema dinámico que describe matemáticamente a las interacciones entre las distintas proteínas. En la Figura 5.6 mostramos en un diagrama de flechas las especies e interacciones que hemos seleccionado para nuestro modelo biológico.

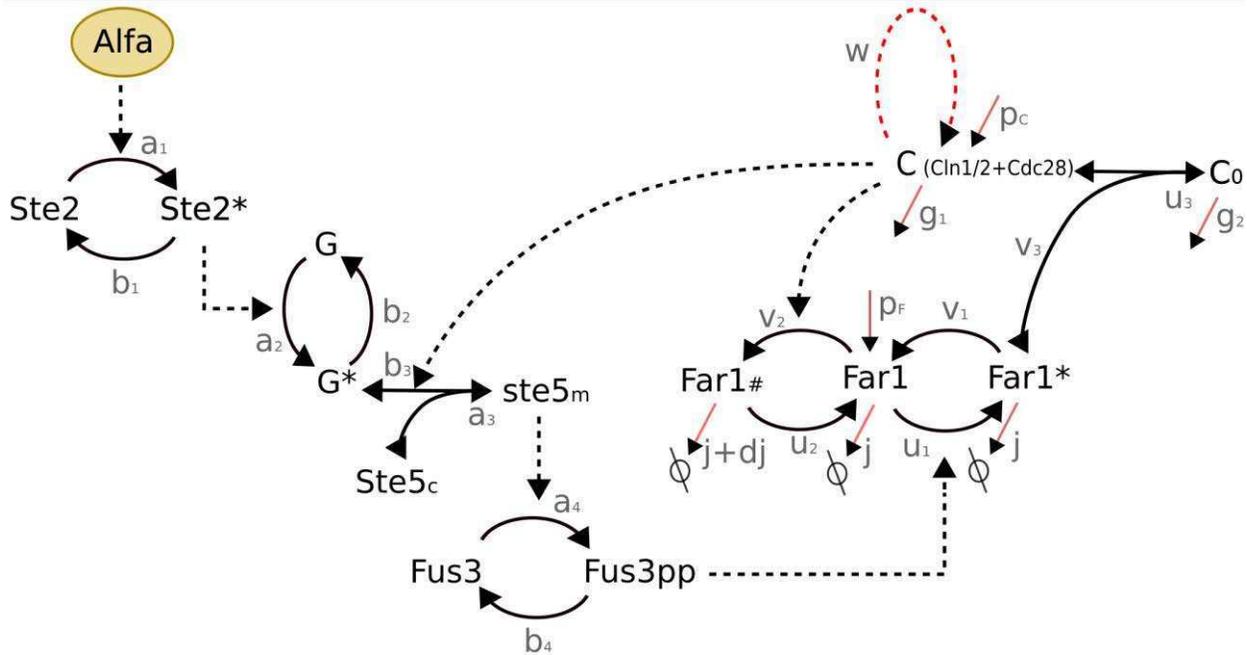


Figura 5.6 Diagrama de las especies e interacciones seleccionadas para el modelo matemático. Notar que este diagrama es una versión extendida de la Figura 5.4 en la que se ha detallado las reacciones de la VRF que se consideraron más relevantes (ver Figura 5.1). Para facilitar la notación se llamó C al complejo Cln1/2+Cdc28 y C<sub>0</sub> al complejo Cln1/2+Cdc28+Far1\*.

### 5.4.1 Sistemas de ecuaciones

Modelando las reacciones bioquímicas según la ley de acción de masas obtenemos el siguiente sistema de ecuaciones diferenciales de la vía de respuesta a feromona:

$$\begin{aligned}
 \dot{Ste2} &= b_1 Ste2^* - \alpha a_1 Ste2 \\
 \dot{Ste2}^* &= \alpha a_1 Ste2 - b_1 Ste2^* \\
 \dot{G} &= b_2 G^* - a_2 G Ste2^* \\
 \dot{G}^* &= a_2 G Ste2^* - b_2 G^* \\
 \dot{Ste5}_c &= b_3(C) Ste5_m - a_3 G^* Ste5_m \\
 \dot{Ste5}_m &= a_3 G^* Ste5_m - b_3(C) Ste5_m \\
 \dot{Fus3} &= b_4 Fus3_{pp} - a_4 Ste5_m Fus3 \\
 \dot{Fus3}_{pp} &= a_4 Ste5_m Fus3 - b_4 Fus3_{pp}
 \end{aligned}$$

Donde la tasa de despegado de Ste5 de la membrana,  $b_3(C)$ , tiene una dependencia funcional con C (Cln2-Cdc28). Dado que asumimos que el complejo Cln2-Cdc28 despega a Ste5 de la membrana de manera ultrasensible [Serber y Ferrell 2007], describimos la dependencia de la tasa de

despegado de Ste5 según una ley de potencia, que es la expresión más sencilla para describir un despegado de pasos múltiples:

$$b_3(C) = b_3^{basal} \left( 1 + \left( \frac{C}{Q_3} \right)^n \right)$$

Bajo la suposición de que las concentraciones totales de estas proteínas no varían en el tiempo, plantearemos una ley de conservación para G, Ste2, Ste5 y Fus3:

$$\begin{aligned} Ste2_T &= Ste2 + Ste2^* \\ G_T &= G + G^* + Ste5_m \\ Ste5_T &= Ste5_c + Ste5_m \frac{Sup}{Vol} \\ Fus3_T &= Fus3 + Fus3_{pp} \end{aligned}$$

Por otro lado, el sistema de ecuaciones diferenciales de las reacciones relacionadas con ciclo celular y su inhibición resulta:

$$\begin{aligned} \dot{Far1}^\# &= v_2 h(C, Q_2) Far1 - (u_2 + j + dj) Far1^\# \\ \dot{Far1} &= v_1 Far1^* - (u_1 h(F, Q_1) + v_2 h(C, Q_2) + j) Far1 + u_2 Far1^\# + P_f \\ \dot{Far1}^* &= -(v_1 + u_3 C + j) Far1^* + u_1 h(F, Q_1) Far1 + v_3 C_0 \\ \dot{C}_0 &= u_3 C Far1^* - (v_3 + g_2) C_0 \\ \dot{C} &= P_c - u_3 C Far1^* + v_3 C_0 - g_1 C + w \frac{C^m}{Q_w^m + C^m} \end{aligned}$$

Donde  $h(x, K)$  es la función de Michaelis-Menten,

$$h(x, K) = \frac{x}{K + x}$$

En este sistema no se conservan las concentraciones totales, obteniendo para ellas la siguiente expresión

$$\begin{aligned} \dot{Far1}_T &= P_f - j Far1_T - dj Far1^\# - (g_2 - j) C_0 \\ \dot{C}_T &= P_c - g_1 C - g_2 C_0 + w \frac{C^m}{Q_w^m + C^m} \end{aligned}$$

Donde,

$$\begin{aligned}Far1_T &= Far1^\# + Far1 + Far1^* + C_0 \\C_T &= C + C_0\end{aligned}$$

Teniendo en cuenta las conservaciones, el sistema de ecuaciones reducido resulta

$$\begin{aligned}Ste2^* &= \alpha a_1(Ste2_T - Ste2^*) - b_1 Ste2^* \\ \dot{G}^* &= a_2(G_T - G^* - Ste5_m)Ste2^* - b_2 G^* \\ Ste5_m &= a_3 G^* (Ste5_T - Ste5_m \frac{Sup}{Vol}) - b_3(C)Ste5_m \\ Fus3_{pp} &= a_4 Ste5_m (Fus3_T - Fus3_{pp}) - b_4 Fus3_{pp} \\ Far1^\# &= v_2 h(C, Q_2) Far1 - (u_2 + j + dj) Far1^\# \\ Far1^* &= -(v_1 + u_3 C + j) Far1^* + u_1 h(F, Q_1) Far1 + v_3 C_0 \\ \dot{C}_0 &= u_3 C Far1^* - (v_3 + g_2) C_0 \\ Far1_T &= P_f - j Far1_T - dj Far1^\# - (g_2 - j) C_0 \\ \dot{C}_T &= P_c - g_1(C_T - C_0) - g_2 C_0 + w \frac{(C_T - C_0)^m}{Q_w^m + (C_T - C_0)^m}\end{aligned} \quad [5.1]$$

## 5.4.2 Aproximación cuasi-estacionaria: separación de escalas temporales

Dado que las reacciones entre especies (fosforilaciones, bindings/unbindings, secuestros, etc.) suceden en una escala de tiempo mucho menor a la creación y degradación de proteínas, vamos a proponer una aproximación cuasi-estacionaria. Bajo esta aproximación consideraremos que en escalas temporales rápidas,  $C_T$  y  $Far1_T$  se mantienen constantes y resolveremos las otras ecuaciones en estado estacionario.

$$Ste2^* = \dot{G}^* = Ste5_m = Fus3_{pp} = Far1^\# = Far1^* = \dot{C}_0 = 0 \quad [5.2]$$

Luego analizaremos la dinámica de las  $C_T$  y  $Far1_T$ , expresando las concentraciones de las otras especies como función de  $C_T$  y  $Far1_T$  según las soluciones de la ecuación [5.2]. Esta separación de escalas temporales también es consistente con el hecho de que los procesos de la translocación a la membrana de Ste5 y la señalización a través de la cascada de MAPK, por lo general se producen en una escala de tiempo rápida ( $\sim 5$  minutos) [Yu et al, Nature 2008].

### Dinámica rápida: vía de respuesta a feromona

De acuerdo a la aproximación cuasi-estacionaria (ecuación [5.2]), obtenemos el siguiente conjunto de ecuaciones para la dinámica rápida de la Vía de Respuesta a Feromona,

$$\begin{aligned}
0 &= \alpha a_1(Ste2_T - Ste2^*) - b_1 Ste2^* \\
0 &= a_2(G_T - G^* - Ste5_m)Ste2^* - b_2 G^* \\
0 &= a_3 G^* (Ste5_T - Ste5_m \frac{Sup}{Vol}) - b_3(C)Ste5_m \\
0 &= a_4 Ste5_m (Fus3_T - Fus3_{pp}) - b_4 Fus3_{pp}
\end{aligned} \tag{5.3}$$

Resolviendo estas ecuaciones llegamos a la siguiente ecuación cuadrática para  $Ste5_m$ :

$$(Ste5_m)^2 - \left( G_T + Ste5_T \frac{Vol}{Sup} + K_{d3}(C) \left( 1 + K_{d2} \frac{K_{d1} + \alpha}{\alpha} \right) \right) Ste5_m + G_T Ste5_T \frac{Vol}{Sup} = 0$$

Donde

$$K_{d1} = \frac{b_1}{a_1}, \quad K_{d2} = \frac{b_2}{a_2 Ste2_T} \quad y \quad K_{d3}(C) = \frac{b_3(C)Vol}{a_3 Sup}$$

Finalmente, de componer las ecuaciones obtenemos la dependencia de  $Fus3_{pp}$  con el complejo  $Cln2-Cdc28$ .

$$\begin{aligned}
\beta(C, \alpha) &= K_{d3}^{basal} \left( 1 + \left( \frac{C}{Q_3} \right)^n \right) \left( 1 + K_{d2} \frac{K_{d1} + \alpha}{\alpha} \right) \\
Ste5_{mf}(C, \alpha) &= \frac{G_f + 1 + \beta(C, \alpha) - \sqrt{(G_f + 1 + \beta(C, \alpha))^2 - 4G_f}}{2} \\
Fus3_{ppf}(C, \alpha) &= \frac{Ste5_{mf}(C, \alpha)}{K_{d4f} + Ste5_{mf}(C, \alpha)}
\end{aligned} \tag{5.4}$$

Con

$$Ste5_{mf}(C, \alpha) = \frac{Ste5_m(C, \alpha)}{Ste5_T \frac{Vol}{Sup}} \quad ; \quad Fus3_{ppf}(C, \alpha) = \frac{Fus3_{pp}(C, \alpha)}{Fus3_T} \quad ; \quad G_f = \frac{G_T}{Ste5_T \frac{Vol}{Sup}}$$

$$K_{d3f}^{basal} = \frac{b_3^{basal}}{a_3 Ste5_T \frac{Vol}{Sup}} \quad ; \quad K_{d4f} = \frac{b_4}{a_4 Ste5_T \frac{Vol}{Sup}}$$

### Dinámica rápida: regulación de Far1

De igual manera, de acuerdo a la aproximación cuasi-estacionaria (ecuación [5.2]), obtenemos el siguiente conjunto de ecuaciones para la dinámica rápida de Far1 y C,

$$\begin{aligned} 0 &= v_2 h(C_T - C_0, Q_2)(Far1_T - Far1^\# - Far1^* - C_0) - (u_2 + j + dj)Far1^\# \\ 0 &= -(v_1 + u_3(C_T - C_0) + j)Far1^* + u_1 h(Fus3_{pp}(C, \alpha), Q_1)(Far1_T - Far1^\# - Far1^* - C_0) + v_3 C_0 \\ 0 &= u_3(C_T - C_0)Far1^* - (v_3 + g_2)C_0 \end{aligned}$$

Finalmente la solución del sistema en función de  $C_0$  puede obtenerse a partir de la siguiente expresión:

$$\begin{aligned} 0 &= -(v_1 + u_3(C_T - C_0) + j) \frac{v_3 + g_2}{u_3} \frac{C_0}{C_T - C_0} \\ &+ \frac{u_2 + j + dj}{u_2 + j + dj + v_2 h(C_T - C_0, Q_2)} u_1 h(Fus3_{pp}(C_T \\ &- C_0, \alpha), Q_1) \left( Far1_T - C_0 - \frac{v_3 + g_2}{u_3} \frac{C_0}{C_T - C_0} \right) + v_3 C_0 \end{aligned} \quad [5.5]$$

O en su versión para C

$$\begin{aligned} 0 &= -(v_1 + u_3 C + j) \frac{v_3 + g_2}{u_3} \frac{C_T - C}{C} \\ &+ u_1 h(Fus3_{pp}(C, \alpha), Q_1) \frac{u_2 + j + dj}{u_2 + j + dj + v_2 h(C, Q_2)} \left( Far1_T - C_T + C \right. \\ &\left. - \frac{v_3 + g_2}{u_3} \frac{C_T - C}{C} \right) + v_3 C_0 \end{aligned} \quad [5.6]$$

### Dinámica Lenta: Far1<sub>T</sub> y C<sub>T</sub>

Como aclaramos anteriormente, analizaremos la dinámica de Far1<sub>T</sub> y C<sub>T</sub>, suponiendo que para cada par (Far1<sub>T</sub>, C<sub>T</sub>) todas las especies llegan instantáneamente a su correspondiente estado estacionario, en concordancia con las ecuaciones [5.5] y [5.6]. Finalmente llegamos al siguiente sistema de ecuaciones diferenciales, que puede ser analizado en un diagrama de fases bidimensional para las especies de dinámica lenta:

$$\begin{aligned} \dot{Far1}_T &= P_f - j Far1_T - dj Far1_T^\#(C_T, Far1_T) - (g_2 - j)(C_T - C(C_T, Far1_T)) \quad [5.7] \\ \dot{C}_T &= P_c - g_1 C(C_T, Far1_T) - g_2(C_T - C(C_T, Far1_T)) + w \frac{C(C_T, Far1_T)^m}{Q_w^m + C(C_T, Far1_T)^m} \end{aligned}$$

## 5.5 Caracterización de la dinámica del sistema

Nuestro modelo de baja dimensión fija un escenario de inhibición mutua entre  $C_T$  y  $Far1_T$ . Está bien establecido que un circuito de retroalimentación positiva o una retroalimentación inhibitoria doble es capaz de producir biestabilidades que pueden proveer los mecanismos moleculares subyacentes a escenarios de elección del destino celular [Thomas 1995, Clarke, Cinquin 2002, Kaufman 2007, Ferrell 2001]. En particular, para este sistema se ha mostrado teórica y experimentalmente que la retroalimentación positiva que actúa sobre  $Cln2$  resulta esencial para la formación de una biestabilidad que involucre un estado con el ciclo celular activado y otro con el ciclo celular arrestado [Charvin et al. 2010]. Consistentemente, de acuerdo a nuestro modelo (ecuaciones [5.7]) es posible encontrar un conjunto de parámetros (ver parámetros en apéndice 5.10) y un rango de niveles de feromonas para los que dos soluciones de equilibrio coexisten: una solución con concentraciones bajas de  $C_T$  y altas de  $Far1_T$  y la otra con concentraciones altas de  $C_T$  y bajas de  $Far1_T$ . Además existe una tercera solución de equilibrio no estable que corresponde a un punto de silla (*Saddle*).

El diagrama de fase asociado a las ecuaciones [5.7] y dos trayectorias diferentes a partir de distintos valores iniciales para  $C_T$  y  $Far1_T$  se muestra en el panel izquierdo de la Figura 5.7. Los puntos fijos estables atraen a las trayectorias cercanas, mientras que el punto silla las defleca. La estructura del diagrama de fases obtenido nos está exponiendo el carácter biestable del proceso de decisión celular, donde la célula puede o bien activar los mecanismos de la VRF o comprometerse con otro ciclo de división celular. El punto fijo inferior derecho tiene altos niveles de  $C_T$  y consecuentemente la VRF se encuentra inhibida. Por ende, las trayectorias que vayan a este punto fijo representarán células comprometidas a una nueva ronda del ciclo celular (panel central de la Figura 5.7). En cambio, el punto fijo izquierdo tiene bajos niveles de  $C_T$  permitiendo así la activación de la VRF. De esta manera, las trayectorias que vayan allí representarán células en las que la vía de feromona tiene éxito en detener el ciclo celular. La separación entre los dos tipos de trayectorias (o conductas) está dada por la curva separatriz (línea naranja).

Resulta relevante aclarar que nuestro modelo matemático no incluye la dinámica del ciclo celular más allá de la decisión de arrestarse o proseguir con el ciclo celular, por ello, la descripción termina cuando  $C_T$  está por encima de cierto valor máximo arbitrario. Esto no debe considerarse un problema, ya que el objetivo de este modelo es el de describir el momento en que una célula en particular *escoge* el camino a seguir (ya sea seguir respondiendo a las feromonas o no). En otras palabras, con el fin de interpretar nuestras observaciones experimentales, no estamos interesados específicamente en la imagen dinámica completa de la coexistencia de múltiples soluciones

estables, sino más bien en la aparición de la separatriz que divide el espacio de fases en conjuntos disjuntos de condiciones iniciales que determinan los resultados del destino celular.

En nuestra descripción, el destino celular queda determinado según la posición de la condición inicial respecto a la separatriz (línea naranja en el panel izquierdo de la Figura 5.7). Esta construcción geométrica corresponde matemáticamente a la variedad estable del punto *Saddle* y está en el núcleo del sistema de toma de decisión del destino celular. De esta manera, las células con condiciones iniciales a la izquierda de la separatriz arrestarán su ciclo celular y responderán a feromona (trayectoria verde, Figura 5.7), mientras que las que tengan condiciones iniciales a la derecha proseguirán otra ronda de división celular (trayectoria roja, Figura 5.7). En el panel central se muestra la evolución temporal de la actividad de la VRF para las trayectorias expuestas en el diagrama de fases. En este, se observa que la célula que está comprometida con el ciclo celular inicialmente aparenta responder a feromona. El carácter ultrasensible de la inhibición de la VRF por el ciclo celular hace que la actividad de la VRF comience a reducirse únicamente cuando  $C$  supera cierto valor umbral.

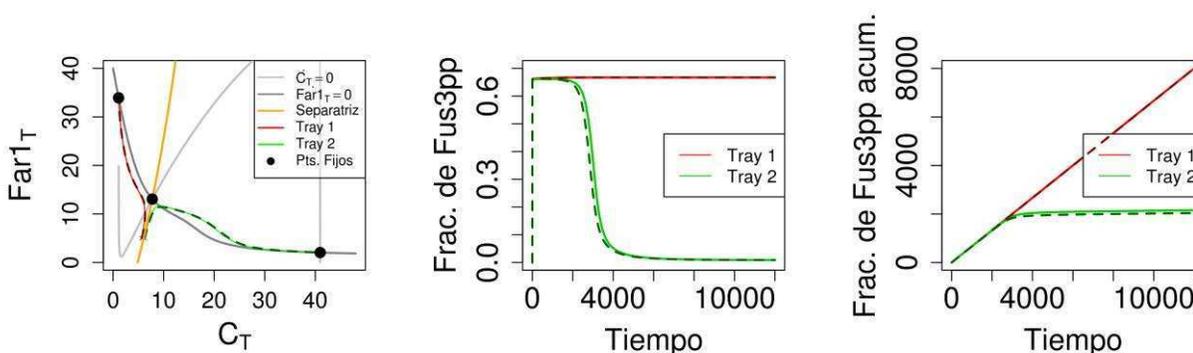


Figura 5.7 Diagrama de fases (panel izquierdo), dinámica de Fus3<sub>pp</sub> (panel central) y Fus3<sub>pp</sub> acumulado (panel derecho) para dos trayectorias con distinto destino celular. En colores oscuros y línea punteada se encuentran graficadas sobre sus respectivas trayectorias la solución numérica de las ecuaciones sin aproximación cuasiestacionaria. Se observa que estas son muy similares a las halladas con la aproximación.

### 5.5.1 Origen de la variabilidad fenotípica en pares madre-hija

Nuestro modelo nos ofrece una primera interpretación de los resultados del experimento de pares madre-hijas, en el que un par con características ligeramente distintas pero con condiciones iniciales en distinto lado de la separatriz tendrán destinos celulares diferentes. De hecho se puede observar en el panel derecho de la Figura 5.7, que nuestro modelo reproduce el comportamiento mostrado en la Figura 5.5, de la actividad acumulada de la VRF de un par madre-hija con distinto destino celular. El escenario de un nodo silla proporciona un basamento determinista sobre el cual diferentes fuentes de variabilidad célula-a-célula podrían actuar. En el ejemplo de la Figura 5.7, la variabilidad está explicitada en las condiciones iniciales, pero se pueden obtener resultados cualitativamente similares cualquiera sea la fuente de variabilidad.

Desde el punto de vista del modelado identificamos tres orígenes de variabilidad. El primero de ellos está relacionado con la variabilidad en las capacidades individuales de la VRF. Esto es, las diferentes células de una población pueden responder de manera diferente a los mismos estímulos por ejemplo por tener diferente número de moléculas de especies clave, como los receptores Ste2, o Ste5. Pequeñas diferencias de estos valores se traducirán en ligeros corrimientos de los puntos fijos estables, del punto fijo inestable, y de la curva separatriz. De esta manera, dos células con concentraciones diferentes de alguna proteína de la VRF, pero expuestas a la misma dosis de feromona, y partiendo de exactamente la misma condición inicial ( $Far1_T(t=0)$ ,  $C_T(t=0)$ ), pueden evolucionar siguiendo diferentes trayectorias en el espacio de fase. Más aún, estas dos células pueden eventualmente mostrar destinos celulares completamente diferentes si la variabilidad pasa a hacer que los puntos iniciales de las trayectorias se encuentran en lados opuestos de la curva separatriz.

Una segunda fuente de variabilidad está relacionada con la variabilidad en los niveles de especies moleculares que impactan directamente en los niveles de  $Far1_T$  y/o  $C_T$  en el momento de entrar a pre-Start (momento en el cual se toma la decisión del destino celular). De esta manera, una población de células "idénticas" (es decir, células asociadas con las mismas constantes cinéticas) podrían estar asociada a una distribución estrecha de las condiciones iniciales en el espacio  $Far1_T$ ,  $C_T$  (este es el caso representado en la Figura 5.7). Una vez más, dos células pueden tener condiciones iniciales muy similares pero en lados opuestos de la separatriz, dando lugar a diferentes destinos celulares. Finalmente, una tercera fuente de variabilidad está relacionada con el ruido bioquímico. Las fluctuaciones aleatorias en las velocidades de reacción asociados con ambas especies podrían causar que una trayectoria dada pueda saltar hacia el lado opuesto de la curva separatriz, y por lo tanto cambiar dinámicamente de un destino de la célula a la otra. Este comportamiento de conmutación podría ser especialmente importante en los casos en que las condiciones iniciales se acercan del separatriz, y en las primeras etapas de la evolución dinámica donde las trayectorias se encuentran cerca de esta [Trotta 2012], en este caso el sistema deja de ser determinista y debe ser simulado teniendo en cuenta la estocasticidad de las reacciones. Finalmente concluimos que independientemente de su origen, la variabilidad junto a la presencia de una separatriz en el espacio de fases son elementos suficientes como para explicar la variabilidad fenotípica en pares madre-hija.

### 5.5.2 Origen del “switching”

Una observación experimental inesperada que ya hemos mencionado, es la existencia de células que responden a la estimulación de feromonas por un cierto intervalo de tiempo, pero finalmente reanudan el ciclo celular de una manera natural. Nuestro modelo provee una posible explicación de este comportamiento en términos de la dinámica observada para trayectorias que evolucionan asintóticamente cerca de la separatriz. Cuanto más cerca de la separatriz se ubique la condición inicial de una célula, esta tardará más tiempo en incrementar el valor de  $C$ , por lo que tardará más en inhibir a la Vía de Respuesta a Feromona y así parecerá que responde a feromona

por más tiempo. Otro factor que aporta a este mismo efecto, es el carácter ultrasensible de la inhibición de la VRF por el ciclo celular. Esta inhibición solo aparecerá para valores de  $C$  mayores que el de las condiciones iniciales (ver Figura 5.8. En esta simulación el umbral de la inhibición es  $Q_3=8$  y las trayectorias comienzan aproximadamente con  $C_T=6$ ). De esta manera, en presencia de feromona, esta célula rápidamente activa su VRF (dado que  $C < Q_3$ ), a la vez que comienza a recorrer su trayectoria en el diagrama de fases. Recién cuando su trayectoria se acerque a valores cercanos a  $C = Q_3$  comenzará a decrecer la actividad de la VRF (notar que  $C$  resulta mucho menor que  $C_T$ , especialmente para valores de  $Far1_T$  altos).

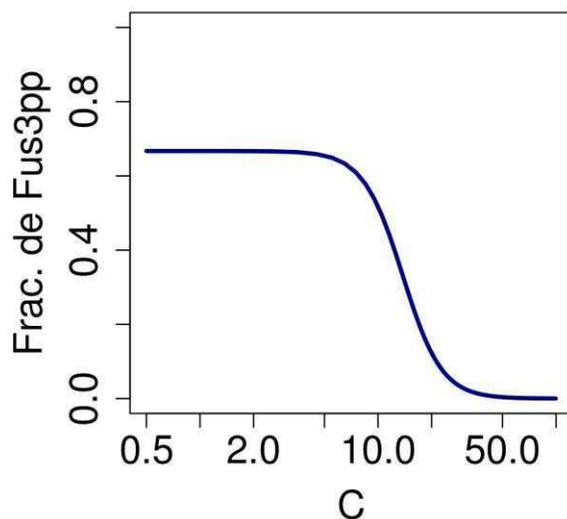


Figura 5.8 Fus3 fosforilado en función de  $C$ , con feromona saturante. Se observa que la inhibición de la VRF  $Cln2$ -dependiente comienza a partir de un cierto valor umbral.

En este modelo, el tiempo que tarda en inhibirse la actividad de la VRF va a estar directamente relacionado con el tiempo que tarda en cruzar el umbral en  $C$ . Dado que las trayectorias se ralentizan en las cercanías de la separatriz, cuanto más cerca de esta se ubique la posición inicial, tardará más tiempo en apagar su VRF y a su vez tendrá un ciclo celular más largo (ver Figura 5.9).

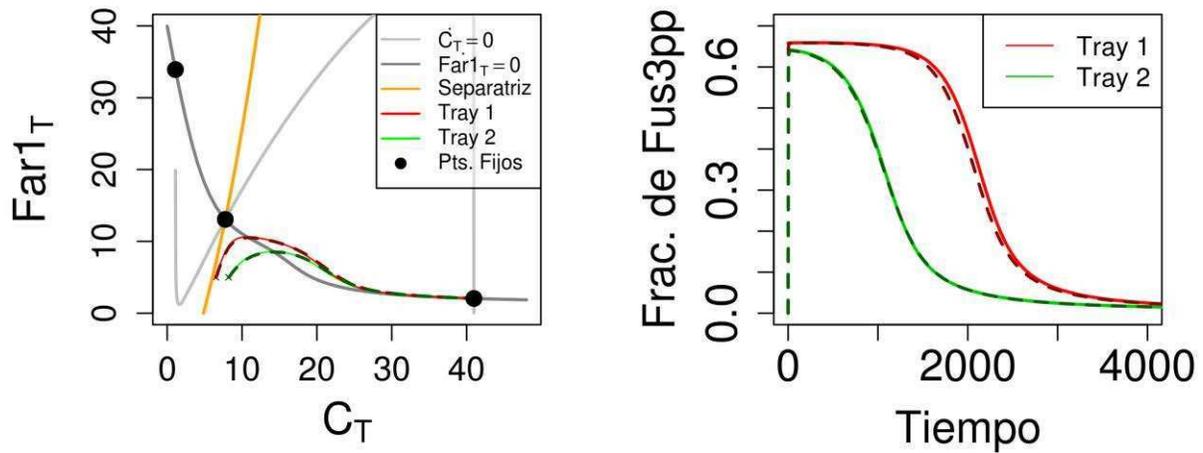


Figura 5.9 Diagrama de fases (panel izquierdo) y dinámica de Fus3pp (panel derecho) para dos trayectorias cuyo destino celular es arrestarse. Aquí se observa que cuanto más cerca se ubique la posición inicial de la separatriz, la célula tardará más tiempo en apagar su VRF. En colores oscuros y línea punteada se encuentran graficadas sobre sus respectivas trayectorias la solución numérica de las ecuaciones sin aproximación cuasiestacionaria. Se observa que estas son muy similares a las halladas con la aproximación cuasiestacionaria.

Finalmente nuestro modelo predice que el fenotipo “switching” resulta consistente con células que se encontraban comprometidas con el ciclo celular desde el comienzo, pero que aparentan responder a feromona durante un cierto tiempo.

### 5.5.3 Dependencia del fenotipo con la concentración de feromona, bifurcación del tipo “Saddle”.

Estamos interesados en ver si el modelo es capaz de reproducir el comportamiento de las células en presencia de feromona. En la Figura 5.10 se muestra como varía el diagrama de fases al incrementar la concentración de feromona.

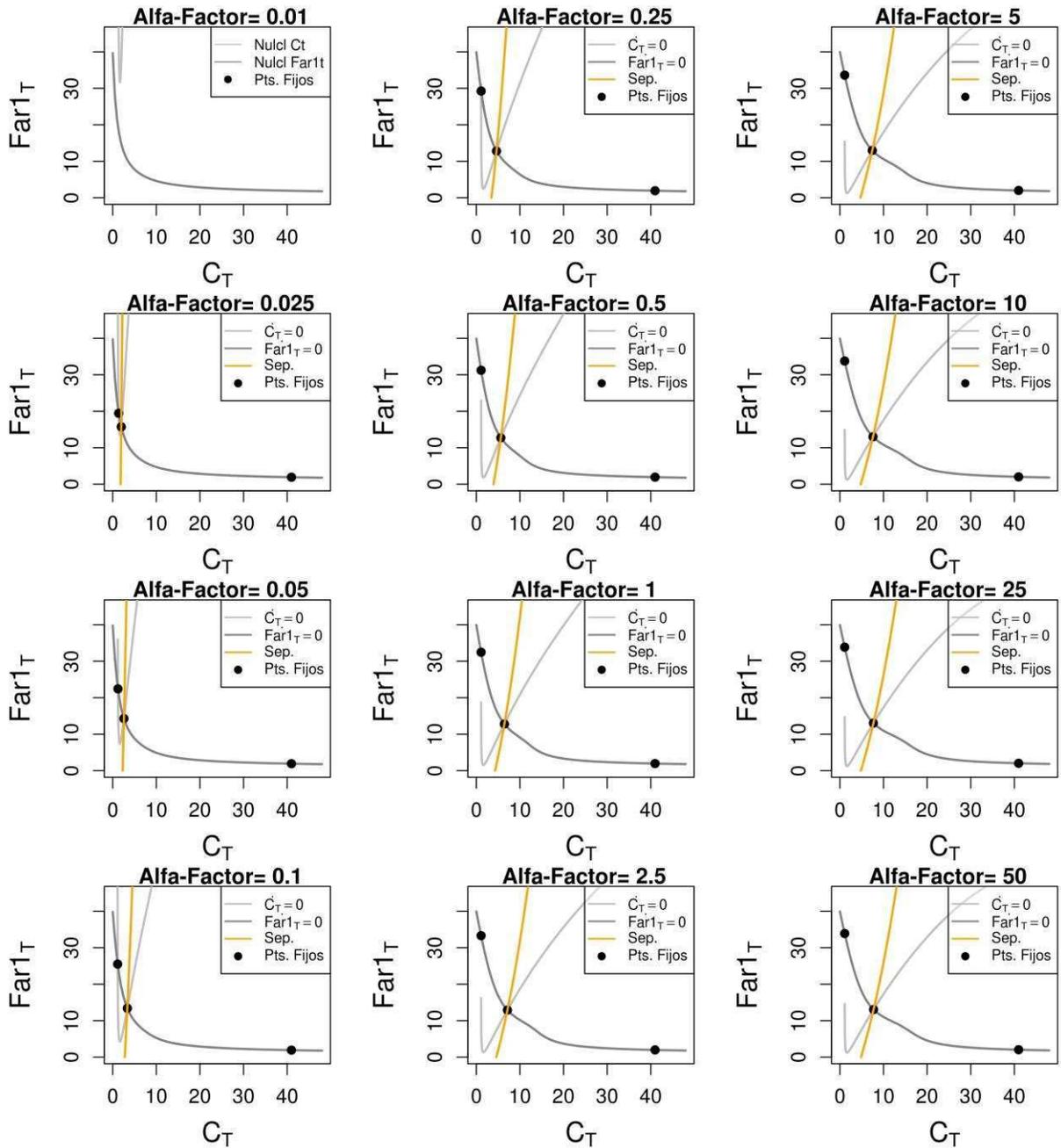


Figura 5.10 Diagramas de fases para distintos valores de Alfa Factor (AF).

Esta figura nos muestra que en ausencia de feromona, el sistema tiene como único punto estable el estado de alto  $C_T$  y bajo  $Far1_T$ , consistente con el hecho de que en ausencia de feromona, la célula siempre se compromete con el ciclo celular. Al incrementar el nivel de feromona, el sistema presenta una bifurcación del tipo silla, y además se observa que el aumento de feromona produce un corrimiento de la separatriz hacia la derecha. Esto hace que al aumentar la feromona se incremente la región de condiciones iniciales que tienen como destino arrear su ciclo celular y activar su VRF, por lo que más células tendrán este destino. Complementariamente, en la Figura

5.11 se muestra para distintos valores de feromona, el valor de  $C_T$  para el cual la separatriz tiene un cierto valor dado ( $Far1_T=5$ ).

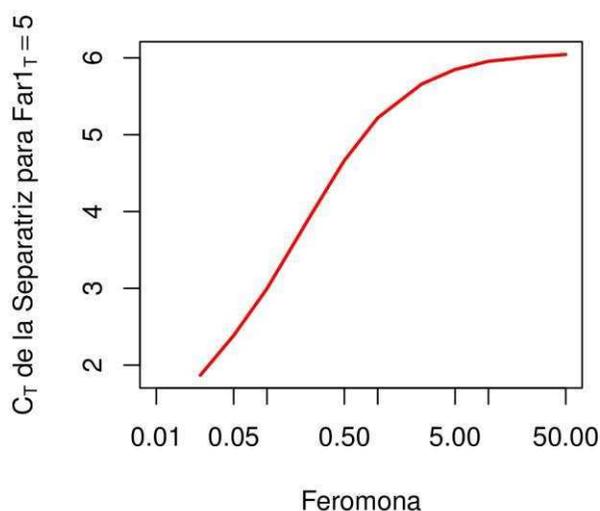


Figura 5.11 Valor de  $C_T$  para el cual la separatriz tiene  $Far1_T=5$ , para distintos valores de feromona. Aquí queremos mostrar como varía el treshold de decisión en  $C_T$  al variar la concentración de feromona. Como era de esperar, el treshold se corre a la derecha al aumentar la feromona, por lo que incrementa la región de condiciones iniciales que van a responder.

Dado que para todo  $Far1_T$  la separatriz tiene una cota superior en el valor de  $C$ , las células en *post-Start*, que poseen altos niveles de  $C$ , tenderán siempre a seguir su ciclo celular. Pese a que el modelo está construido para modelar el proceso de decisión en *pre-Start*, se puede ver que este es capaz de interpretar, desde un punto de vista sistémico, el hecho de que las células que se encuentran en *Post-Start* (con altos valores de  $C$ ) sean insensibles a feromona.

## 5.6 Mutantes Ste5-8A y Far1-S87A

Doncic et al. [Doncic et al. 2011] estudiaron el comportamiento de los mutantes Ste5-8A y Far1-S87A, los cuales arruinan las dos formas de inhibición de Far1 dependiente de Cln2. En el mutante Ste5-8A, Cln2 no puede despegar a Ste5 de la membrana por lo que Fus3 sigue activando a Far1, mientras que en el mutante Far1-S87A, Cln2 no puede fosforilar a Far1 y llevarlo al estado  $Far1^{\#}$ . Mostraremos que nuestro modelo es capaz de reproducir las características generales de cada cepa.

Doncic et al. hallaron que en el mutante Ste5-8A el umbral de actividad del ciclo celular para el cual la célula se arresta o no, es el mismo que para el WT (la actividad del ciclo celular la identificaron con la concentración nuclear de Whi5). Además, observaron que hay células que

deciden proseguir con su ciclo celular, pero a la vez activan su VRF. En el gráfico derecho de la Figura 5.12 mostramos el diagrama de fases y la dinámica de dos trayectorias para el sistema sin inhibición de la VRF dependiente de  $C_{ln2}$ . Allí se observa que no sólo el umbral se mantiene respecto del caso “wild type”, sino que el diagrama de fases resulta casi inalterado en la región de valores de  $C_T$  pequeños (identificamos la actividad del ciclo celular con  $C_T$  y al umbral con la separatriz). Esto se lo puede entender a la luz de que la interacción de  $C_{ln2}$  con  $Ste5$  solo está presente para altos valores de  $C_{ln2}$  (ver que  $b_3(C)$  se incrementa sensiblemente para valores de  $C$  mayores a  $Q_3$ ) y por lo tanto afecta al diagrama de fases únicamente en esa región. Respecto a la VRF, dado que en el  $Ste5-8A$  no hay regulación de ésta dependiente del ciclo celular, en presencia de feromona se activa la VRF haciendo caso omiso del estado del ciclo celular (gráfico izquierdo de la figura 7).

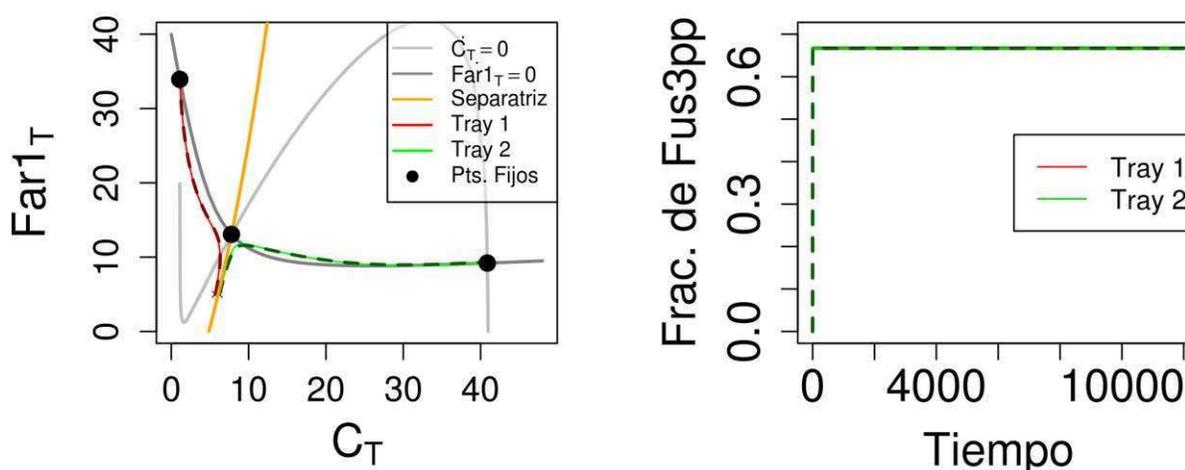


Figura 5.12 Diagrama de fases (panel izquierdo) y dinámica de Fus3pp (panel derecho) para 2 trayectorias en el sistema dinámico correspondiente a la Cepa  $Ste5-8A$ . Aquí se observa que no solo el umbral se mantiene respecto del caso *wild type*, sino que el diagrama de fases resulta casi inalterado en la región de valores de  $C_T$  pequeños. Dado que en la cepa  $Ste5-8A$  la VRF no está regulada por el ciclo celular, en presencia de feromona se activa la VRF haciendo caso omiso del estado del ciclo celular

Por otro lado, Doncic et al. hallaron que en el mutante  $Far1-S87A$  el umbral de actividad del ciclo celular aumenta, haciendo que sea necesario más actividad del ciclo celular para poder prender el feedback positivo. Como era de esperar, en el gráfico derecho de la Figura 5.13 se observa que al eliminar la inactivación de  $Far1$  dependiente del ciclo celular, la nulclina de  $Far1_T$  se vuelve insensible a  $C_T$ . Esto a su vez produce un corrimiento en la separatriz hacia la derecha consistente con los resultados experimentales de Doncic et al. En este caso, pese a que el punto fijo que corresponde al ciclo celular tiene altas cantidades  $Far1_T$ , estas no alcanzan para capturar suficiente  $C_T$  como para que la VRF no se inactive.

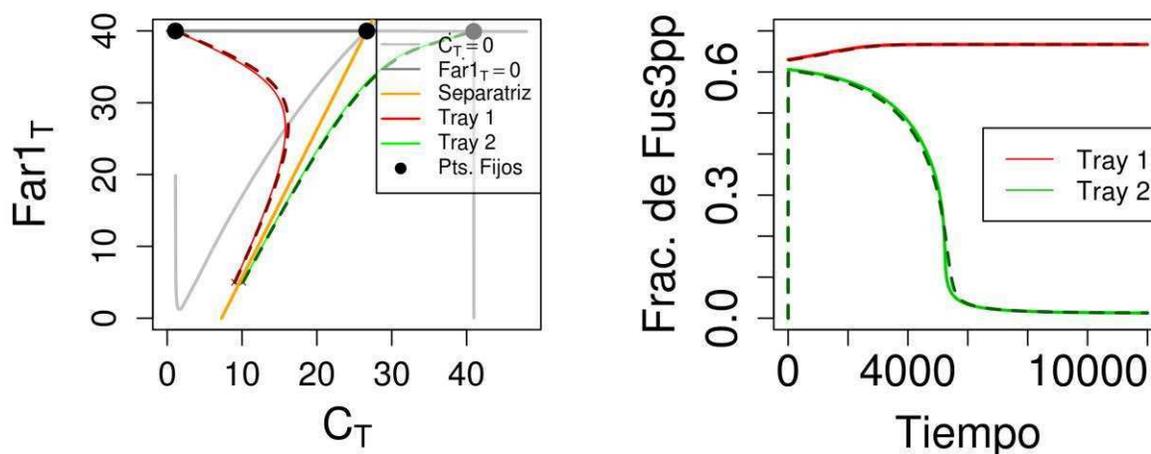


Figura 5.13 Diagrama de fases (panel izquierdo) y dinámica de Fus3pp (panel derecho) para 2 trayectorias en el sistema de la Cepa Far1-S87. Al eliminar el estado inactivo de far1 ( $Far1^{\#}$ ), la nulclina de  $Far1_T$  se vuelve insensible a  $C_T$ . Esto a su vez, produce un corrimiento en la separatriz hacia la derecha ( $C_{T\text{Sep}}(Far1_T=5)=9.7$ ) consistente con los resultados experimentales de Doncic et al. [Doncic *et al.* 2011].

Nuevamente por motivos pedagógicos, explicamos la variabilidad fenotípica a partir de la variabilidad en las concentraciones iniciales totales ( $C_T$ ,  $Far1_T$ ). Como hemos explicado, no estamos teniendo en cuenta la existencia de variabilidad en alguna otra especie, en las cuales cualquier variación en sus concentraciones traería consigo un corrimiento de la separatriz. Igualmente, tanto si el motivo de la variabilidad se origina en alguna condición inicial como si se origina en la posición de la separatriz, el fenómeno es cualitativamente idéntico. Habrá células que tienen su condición inicial de un lado de la separatriz y otras del otro.

## 5.7 Otros modelos

A lo largo de la realización del presente proyecto surgieron dos trabajos que implementaban modelos basados en ODEs para estudiar la interacción entre el ciclo celular y la vía de respuesta a feromona:

- I. El primero de ellos es el de Doncic *et al.* [Doncic *et al.* 2011] que estudiaron el comportamiento de los mutantes Ste5-8A y Far1-S87A, y crearon un modelo muy simple para estudiar el comportamiento del sistema al variar la intensidad de los parámetros que regulan la inhibición de Cln1/2 por Far1 y el despegado de Ste5 de la membrana por Cln1/2.

Las principales diferencias con nuestro modelo se encuentran en el grado de simplificación de las interacciones que ellos plantean. Por ejemplo, utilizaron una única especie para modelar Cln1/2 y una única especie para Far1, por lo que la inhibición de Cln1/2 mediada por Far1 la modelan como una degradación de Cln1/2 que depende linealmente con la

concentración de Far1, mientras que nosotros lo modelamos como una inhibición estequiométrica [Bardwell 2004]. A su vez, modelan que Cln1/2 degrada a Far1 de manera lineal, mientras Ste5 en membrana induce la síntesis de Far1<sup>1</sup>, omitiendo así la existencia del estado intermedio de Far1 fosforilado por Cln1/2 (denotado en nuestro modelo como Far1<sup>#</sup>) y el estado de Far1 fosforilado en su estado activo (denotado en nuestro modelo como Far1<sup>\*</sup>). A pesar de que estas simplificaciones disminuyen notablemente el número de parámetros involucrados y facilitan el tratamiento matemático del sistema, se pierde parte del significado biológico de las interacciones que se quieren modelar. En nuestro caso, el hecho de haber introducido un mayor detalle en el modelo nos permitió identificar la existencia de distintas escalas temporales y disminuir la dimensionalidad del problema.

Cabe destacar que siempre que se desea modelar un sistema biológico, va a tener que elegirse el grado de detalle con el que se quiere capturar la dinámica del sistema. En esta elección existe una contraposición entre la construcción de modelos complejos que capturen la biología con más detalle y modelos simplificados que capturen los elementos esenciales del sistema biológico, facilitando así la comprensión del sistema.

- II. El segundo trabajo es el de Zhang *et al.* [Zhang *et al.* 2011], en el que expandieron el modelo de Chen *et al.* [Chen *et al.* 2000] del ciclo celular en levaduras agregando la interacción con la vía de respuesta a feromona. Este trabajo se caracteriza por modelar detalladamente el ciclo celular en toda su extensión, logrando así capturar las oscilaciones características del ciclo. Dado que se proponen modelar más allá de la transición START de G1, incluyen una gran cantidad de especies e interacciones extra, las cuales agregan una mayor complejidad a la hora de analizar los resultados. Por otro lado, a la hora de analizar el fenómeno de decisión celular, Zhang *et al.* dejan de lado el modelo completo y toman únicamente las interacciones existentes entre Far1, Ste5 y Cln2. A nivel del modelado, la principal diferencia de su modelo con el nuestro, es el planteo de la activación de Far1 por la VRF como una síntesis de Far1 inducida por Ste5<sup>1</sup>. A nivel del análisis, como cuentan con un sistema de ecuaciones con dimensión mayor a 2 utilizan pseudo planos de fases para estudiar las bifurcaciones. En los pseudo planos de fases, se analiza el plano de fases de dos especies asumiendo que todas las otras tienen una dinámica más rápida, asumiéndose que llegan a su estado estacionario. A pesar de que el análisis se basa en una asunción (o aproximación) sin sustento biológico, este método de análisis resulta útil para ganar intuición sobre el sistema.

---

<sup>1</sup> Pese a que existe evidencia experimental de que la actividad de la vía de respuesta a feromona incrementa la síntesis de Far1, esta interacción cumple un rol secundario ya que estaría funcionando como un refuerzo del arresto celular llevado a cabo por la inhibición estequiométrica de Cln2 debido a Far1 fosforilado [Doncic *et al.* 2013].

## 5.8 Conclusiones, resultados experimentales y nuevo modelo

Nuestro modelo predice que el fenotipo *switching* resulta consistente con células que se encontraban comprometidas con el ciclo celular desde el comienzo, pero que aparentan responder a feromona durante un cierto tiempo. Este comportamiento surge de un enlentecimiento que sufren las trayectorias en las cercanías de la separatriz, por lo que se retrasa la inhibición de la vía de respuesta a feromona dependiente del ciclo celular. En este contexto, nuestro modelo identifica al feedback positivo de *C* como un elemento clave del sistema, ya que da origen a la biestabilidad y su correspondiente separatriz. Prosiguiendo con las iteraciones experimentación-modelado características en *Biología de sistemas*, se buscó testear experimentalmente si el feedback positivo resulta necesario para la existencia del fenotipo *switching*. Para ello se estudió una cepa mutante *knock out* de los genes *Cln1* y *Cln2* y con un gen de *Cln2* regulable exógenamente. Estas células carecen del feedback positivo de la especie *C*, por lo que esperábamos que no haya células con el fenotipo *switching*. Contrariamente a lo esperado, el experimento muestra la existencia de células con el fenotipo *switching*. Esto indica que hemos falseado el modelo, dado que la predicción central del mismo no se cumplió, conduciéndonos a replantear el modelo biológico del cual partimos e iniciar un nuevo ciclo de experimentación-modelado.

En el nuevo modelo, centramos nuestra atención en el rol de la tercera ciclina de G1, *Cln3*, la única presente en la cepa mutante, que no había sido tenida en cuenta originalmente en forma explícita. La transcripción de *Cln3* es constante durante el ciclo celular, por lo que en células arrestadas se acumula. Por otro lado, se sabe que la feromona induce la transcripción de *Cln3* vía *Kar4* [Nash 1988, Cross 1988, Lahav 2007], un factor de transcripción inducido por la feromona (en las citas [Nash 1988] y [Cross 1988] *Cln3* no se llama *Cln3*, sino *Whi1* y *Daf1*). Esto nos sugirió la posibilidad de que sea la misma VRF la que cause el *switching*, aumentando los niveles de *Cln3* de forma tal de sobrepasar el arresto impuesto por la propia VRF. Para testear esta idea, determinamos la capacidad de una cepa *knock out* de *Kar4* de generar el fenotipo de *switching*. Nuestros resultados experimentales muestran que en esta cepa ninguna célula hace *switching*. Por lo tanto, ahora nos proponemos desarrollar esta nueva hipótesis donde es la feromona quién activa la VRF pero también, con un tiempo de retraso, activa al ciclo celular vía *Cln3*.

Si bien el trabajo presentado en esta tesis condujo finalmente a un modelo que fue eventualmente falseado, nos pareció relevante consignar el trabajo realizado ya que constituye un ejemplo de como funciona el ciclo iterativo que combina experimentación y modelado. En este proceso, en definitiva, no tiene sentido hablar de modelos correctos o incorrectos (todo modelo, en tanto elipsis, es por definición incorrecto en algún sentido) sino más bien en modelos útiles o no para ganar intuición y conocimiento sobre la biología relevante que se pretende estudiar.

## 5.9 Referencias

- Bardwell L 2004, A walk-through of the yeast mating pheromone response pathway *Peptides* **26** 339-350
- Colman-Lerner A, Gordon A, Serra E, Chin T, Resnekov, Endy D, Pesce C G and Brent 2005 Regulated cell-to-cell variation in a cell-fate decision system. *Nature* **437**, 699-706
- Charvin G, Oikonomou C, Siggia ED and Cross FR 2010, Origin of irreversibility of cell cycle start in budding yeast, *PLOS Biology*, **8** 1 e1000284
- Chen K C, Csikasz-Nagy, Gyorffy B Val J Novak B and Tyson J J 2000 Kinetic Analysis of a Molecular Model of the Budding Yeast Cell Cycle. *Molecular Biology of the Cell* **11** 369-391
- Cross FR 1988 DAF1, a mutant gene affecting size control, pheromone arrest, and cell cycle kinetics of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **8** 11 4675-4684
- Doncic A, Falleur-Fettig M and Skotheim, J M 2011 Distinct Interactions Select and Maintain a Specific Cell Fate. *Molecular Cell*. **43** 529-539
- Nash R, Tokiwa G, Anand S, Erickson K, Futcher AB 1988 The WHI1+ gene of *Saccharomyces cerevisiae* tethers cell division to cell size and is a cyclin homolog. *The EMBO journal* **7** (13), 4335
- Lahav R, Gammie A, Tavazoie S and Rose MD 2007 Role of transcription factor Kar4 in regulating downstream events in the *Saccharomyces cerevisiae* pheromone response pathway *Mol. Cell. Biol.* **27** 3 818-829
- Serber Z y Ferrel JE Jr. 1997 Tuning Bulk Electrostatics to Regulate Protein Function. *Cell* (128) 3; 519-531
- Trotta L Bullinger and E Sepulchre R 2012 Global analysis of dynamical decision-making models through local computation around the hidden saddle, *Plos ONE* **7** 3 e33110
- Zhang T, Schmierer B and Novak B 2011 Cell cycle commitment in budding yeast emerges from the cooperation of multiple bistable switches. *Open Biology* 1:110009

## 5.10 Apéndice: parámetros

Para todos los gráficos se utilizaron los siguientes parámetros

$$Vol = 1; Sup = 1; Ste2_T = 6000; G_T = 2000; Ste5_T = 500; Fus3_T = 20000;$$

$$K_{d1} = 5 \left( con a_1 = K_{d1}^{-\frac{1}{2}} = 0.45 \text{ y } b_1 = K_{d1}^{\frac{1}{2}} = 2.24 \right);$$

$$K_{d2} = 1.25 \left( con a_2 = (K_{d2} Ste2_T)^{-\frac{1}{2}} = 0.012 \text{ y } b_2 = (K_{d2} Ste2_T)^{\frac{1}{2}} = 86.6 \right)$$

$$K_{d3f}^{basal} = 1 \left( con a_3 (K_{d3f}^{basal} Ste5_T)^{-\frac{1}{2}} = 0.045 \text{ y } b_3^{basal} = (K_{d3f}^{basal} Ste5_T)^{\frac{1}{2}} = 22.4 \right)$$

$$K_{d4f} = 0.3 \left( con a_4 (K_{d4f} Ste5_T)^{-\frac{1}{2}} = 0.082 \text{ y } b_4 = (K_{d4f} Ste5_T)^{\frac{1}{2}} = 12.25 \right)$$

$$n = 4; v_3 = 1; u_3 = 5; v_2 = 1; u_2 = 4; v_1 = 3; u_1 = 4; P_f = 0.02; j = g_1 = g_2 = 0.0005;$$

$$dj = 0.1; P_c = 0.00055; w = 0.02; Q_w = 6; m = 3; Q_1 = 600000; Q_2 = 50; Q_3 = 8$$

Para la simulación de la cepa mutante Ste5-8A fijamos  $Q_3 = 10^7$  y para la cepa mutante Far1-S87A fijamos  $Q_2 = 10^7$ .

Resulta importante destacar que las interpretaciones extraídas del modelo son de carácter cualitativo. Por lo que no nos interesamos particularmente en ajustar los parámetros del sistema ni en realizar un estudio de la sensibilidad de estos mismos.

## 6 AGRADECIMIENTOS

A mis directores Ariel y Alejandro, dos investigadores ejemplares, por apoyarme en este proyecto, por su dedicación y su tiempo, por introducirme en la investigación y en el mundo de la biología de sistemas, por enseñarme a trabajar de forma responsable y rigurosa.

A mis compañeros del laboratorio ACL (presente y pasado), Ali, Mati, Ale V, Gus, Juan, Pau, Vicky, Alan, Chiny, Andreas, Manu, Inés, Laila, Rodri y Lu. Agradezco haber tenido la suerte de compartir con gente tan espectacular como ellos, de los que aprendí mucho e hicieron tan agradable el día a día. En particular a Ali, mi bióloga amiga, por ser tan excelente compañera.

A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la UBA por brindarme un espacio donde trabajar, y al CONICET por otorgarme las becas que me permitieron realizar el doctorado.

A mis amigos de la vida, Ari, Eze, Andy, Mica, Pau, Santi, Maurito, Marian, Juan, Facu, Santi, Guille, Sebitas, Ivan, Mati, Dieguito, Tito, Eze, por estar siempre y por todos los buenos momentos compartidos. En particular a Ari, que la casualidad nos hizo transitar caminos paralelos. Todos los mates y charlas compartidas fueron esenciales para llevar adelante el doctorado.

A mi papá, mi mamá, Moni (mi otra mamá), mi hermana y mi cuñado, que son incondicionales, me dan fuerzas, me acompañan y tienen mucho que ver con que yo este hoy acá.

A mi nueva familia Cecilia, Carlos, Cloé y Michelle, que son todos excelentes personas y soy muy afortunado de tenerlos cerca.

En especial a Car, por ser una compañera fantástica. Gracias por estar siempre a mi lado dandome fuerzas, claridad, alegría, paz y sueños. Me haces feliz.