



Centro de Investigación y Estudios
Avanzados del Instituto Politécnico
Nacional

UNIDAD MONTERREY

“Modelo matemático de la dinámica de la interacción entre el reloj
circadiano y la vía de mTORC1”

Tesis que presenta

José Guadalupe Guerrero Morín

Para obtener el grado de

Doctor en Ciencias en
Ingeniería y Física Biomédicas

Director de la Tesis

Dr. Moisés Santillán Zerón

Apodaca, Nuevo León

Octubre, 2020

Agradecimientos

Mi tiempo tanto en la maestría como en doctorado ha sido de los momentos más valiosos en mi vida, y que llevaré siempre en mis recuerdos. No solo por haber descubierto mi lugar en el vasto mundo de la ciencia, sino también por todas esas personas que conocí en el camino y de alguna forma dejaron huella en mi vida.

Nunca habría podido llegar a este nivel de estudios sin el apoyo constante de mis padres, quienes desde niño alimentaron mi gusto por la ciencia, y que a lo largo de mi vida estuvieron conmigo tanto en los buenos momentos como en los malos, ayudándome muchas veces a encontrar las respuestas correctas cuando no eran evidentes.

Agradezco la oportunidad que me brindó mi asesor, el Dr. Moisés Santillán, para realizar un proyecto de doctorado cien por ciento teórico, cuando mi experiencia hasta el momento era absolutamente experimental. Considero que fue un gran paso en mi carrera el entender que en el fondo, a pesar de mi formación en biotecnología, las matemáticas siempre fueron mi área favorita del conocimiento. Y significa mucho para mi que mi asesor me otorgara la confianza para llevar mi proyecto a cabo.

Mi estancia en el CINVESTAV definitivamente no habría sido la misma sin los grandes amigos que hice desde la maestría. Con ellos he compartido y sigo compartiendo mis ideas y proyectos, mis sueños, mis éxitos y fracasos. Muchas veces sus consejos, técnicos o existenciales, fueron de gran ayuda para avanzar en mis metas y por eso siempre les estaré agradecido.

Mi novia Sarahí entró a mi vida al final de mi doctorado, y desde el inicio siempre me apoyó e impulsó para terminarlo. Agradezco por su amor y comprensión en la recta final de la elaboración de esta tesis.

Agradezco además las observaciones de mi comité tutorial, las cuales permitieron que esta tesis elevara su calidad y representara adecuadamente el trabajo que realicé durante los pasados cuatro años.

Y por último, agradezco al CONACYT, ya que sin el apoyo económico de la beca, la realización de este proyecto no habría sido posible.

Índice

1. Resumen	1
2. Abstract	1
3. Introducción	3
3.1. Definición del ritmo circadiano	4
3.2. Organización del ritmo circadiano en mamíferos	5
3.3. Vía de mTORC1	9
3.4. Interacción entre la vía de mTORC1 y el reloj circadiano.....	13
4. Planteamiento del problema	16
5. Hipótesis.....	17
6. Objetivos.....	17
6.1. Objetivo general	17
6.2. Objetivos particulares	17
7. Metodología.....	18
7.1. Subsistema del reloj circadiano	18
7.2. Subsistema de la vía de mTORC1.....	19
7.3. Acoplamiento de los subsistemas de mTORC1 y el reloj circadiano.....	21
7.4. Métodos numéricos	23
7.5. Estimación de parámetros	23
8. Resultados y Discusión.....	31
8.1. Comportamiento del sistema en condiciones constantes de activación de mTORC1.....	31
8.2. La regulación de la vía de mTORC1 sobre el reloj circadiano tiene diferentes efectos en el periodo y la amplitud.	32
8.3. El control de mTORC1 sobre el reloj circadiano afecta la robustez de las oscilaciones.....	38
8.4. Comportamiento del sistema en condiciones de activación periódica de mTORC1.....	40
8.5. La estimulación periódica de la vía de mTORC1 es capaz de incrementar la amplitud de las oscilaciones circadianas	43
8.6. El control de mTORC1 sobre la localización nuclear de Bmal1 facilita la sincronización por nutrientes del reloj circadiano	44
9. Conclusiones	46
10. Referencias.....	47

Índice de figuras

Figura 1. El núcleo supraquiasmático (SCN), se encuentra en el hipotálamo y recibe información directa de la luz captada por la retina y en consecuencia, controla los patrones circadianos del organismo.	6
Figura 2. Las oscilaciones circadianas a nivel celular son controladas por una red de procesos transcripcionales, traduccionales y post-traduccionales controlados por 6 familias principales de genes: BMAL, Clock, PER, CRY, Ror y Rev—erb.....	8
Figura 3. La vía de mTORC1	10
Figura 4. Representación esquemática del modelo de activación de mTORC1.	20
Figura 5. Gráfico de la proporción de mTORC1 activo en función del tiempo.	25
Figura 6. Gráfica de mTOR lisosomal $VL + WLM * 100$ en función del tiempo.....	26
Figura 7. Gráfica de mTORC1 activo ($W + WL$) en función del tiempo.	27
Figura 8. Gráfica de mTORC1 activo (WT) como función de mTOR total (M).	30
Figura 9. Efecto del control de mTORC1 en traducción de Bmal1 sobre las propiedades del reloj circadiano.....	34
Figura 10. Efecto del control de la localización nuclear de Bmal1 mediado por mTORC1 en las propiedades del reloj circadiano.	35
Figura 11. Efecto del control que mTORC1 ejerce sobre la traducción y la localización nuclear de Bmal1 en las propiedades del reloj circadiano.....	37
Figura 12. Área de oscilaciones sostenidas en el espacio de parámetros r_0 vs a	39
Figura 13. Gráfico de r_0 en función del tiempo. La curva toma la forma de una función exponencial periódica decreciente, oscilando en el rango $1 < r_0 < 10$	41
Figura 14. Dinámica temporal de Z (curva azul) y r_0 (curva roja).	42
Figura 15. Cambios en la amplitud en función del periodo de estimulación.	44
Figura 16. Modos complejos de sincronización en la forma m:n (m ciclos del estímulo por cada n ciclos del reloj circadiano) en función del periodo de r_0 (normalizado al periodo natural de oscilación del ritmo circadiano), así como de combinaciones de valores de r_1 y r_2	45

Índice de tablas

Tabla 1. Sets de parámetros para las cuatro diferentes combinaciones de factores de crecimiento y aminoácidos.....	28
Tabla 2. Sets de parámetros utilizados para simular las condiciones de activación de mTORC1 utilizando la Ecuación 7.....	30

Abreviaturas

4E-BP: Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E Binding Protein 1

AA: aminoácidos

Akt: RAC-Alpha Serine/Threonine-Protein Kinase

AMPK: AMP-activated protein kinase

Atg13: Autophagy-related protein 13

Bmal1: brain and muscle ARNT-Like 1

Clock: circadian locomotor output cycles kaput

CRY: cryptochrome

Dbp: D site of albumin promoter (albumin D-box) binding protein

DNA: deoxyribonucleic acid

eIF4E: Eukaryotic translation initiation factor 4E

Fbxw7: F-Box and WD repeat domain containing 7

GDP: guanosine diphosphate

GF: factores de crecimiento (growth factors)

GTP: guanosine triphosphate

IRS-1: Insulin receptor substrate 1

mLST8: mammalian Lethal With SEC13 Protein 8

mTOR: mammalian/mechanistic target of rapamycin

ODE: ecuación diferencial ordinaria (Ordinary Differential Equation)

PDK1: phosphoinositide-dependent kinase-1

PER: period

PI3K: phosphatidylinositol 3-kinase

PPAR: Peroxisome proliferator- activated receptors

Raptor: Regulatory Associated Protein Of MTOR Complex 1

Reb-erv: V-ErbA-Related Protein

Rheb: Ras homolog enriched in brain

RNA: ribonucleic acid

Ror: receptor tyrosine kinase-like orphan receptor

S6K: S6 kinase

SCN: suprachiasmatic nucleus

TBC1D7: TBC1 Domain Family Member 7

TSC: tuberous sclerosis complex

ULK: Unc-51 like autophagy activating kinase

ZNRF1: zinc and ring finger 1

1. Resumen

La coordinación entre el ritmo circadiano y el metabolismo es crucial para asegurar la respuesta adecuada de un organismo ante las variaciones ambientales del día y la noche. mTOR es un regulador maestro del crecimiento y sensor de nutrientes como parte del complejo 1 de mTOR (mTORC1). Mientras el ritmo circadiano confiere ritmicidad en la concentración de la proteína mTOR, mediante la regulación de su tasa de degradación, la actividad de mTORC1 tiene el efecto de disminuir el periodo y aumentar la amplitud de las oscilaciones circadianas a nivel celular, mediante un mecanismo que aún no ha sido detallado. En este trabajo desarrollamos un modelo matemático con ecuaciones diferenciales ordinarias (ODEs) para explorar las posibles interacciones que permiten que mTORC1 sea capaz de regular el reloj circadiano. Nuestros resultados sugieren que mTORC1 regula la amplitud mediante el control de la proteína Bmal1 a nivel traduccional, mientras que la regulación del periodo es llevada a cabo principalmente al controlar la localización nuclear de Bmal1. Nuestro modelo indica además que ambos niveles de regulación deben estar presentes para asegurar que la robustez de las oscilaciones no se vea comprometida, dado que la intervención de mTORC1 en el control de la localización de Bmal1 disminuye considerablemente la capacidad de oscilación del reloj circadiano, en tanto que la regulación de la traducción de Bmal1 reduce este efecto. En conjunto, estos resultados enfatizan las interacciones necesarias para el control adecuado de las oscilaciones del reloj circadiano celular por parte de mTORC1, las cuales podrían ser extrapoladas a otras rutas metabólicas.

2. Abstract

Crosstalk between the circadian Clock Clockwork and cellular metabolic regulatory networks is crucial to ensure an adequate response of an organism to the day/night cycle. mTOR is a master growth regulator and sensor of nutrient status, which is part of the mTOR complex 1 (mTORC1). While the circadian Clock confers rhythmicity to the mTOR protein by regulating its degradation rate, mTORC1 activity diminishes period and augments amplitude of circadian oscillations at the cellular level by a

currently unknown mechanism. Here, we develop a mathematical deterministic ODE (ordinary differential equation) model, to explore the possible interactions that allow mTORC1 to display such regulation of the core circadian Clock. Our results suggest that mTORC1 is capable of regulating amplitude by exerting translational control on core the Clock protein Bmal1, and that period-tuning is achieved by controlling post-translational localization of Bmal1. Since, in our model, mTORC1 control of Bmal1 localization greatly diminishes the ability of the Clock to oscillate, and regulation of Bmal1 translation reduces this effect, our results also suggest that both levels of regulation must be present to ensure the robustness of oscillations. Together, the above results emphasize the importance of the influence of mTORC1 on the circadian rhythms.

3. Introducción

Las células son las estructuras mínimas capaces de mostrar las características de un organismo vivo, como son: metabolismo, crecimiento, reproducción, interacción con el entorno y adaptación a éste. Para llevar a cabo estas funciones, las células poseen una enorme cantidad de entidades químicas orgánicas e inorgánicas, que forman parte de extensas redes de reacciones bioquímicas de alta complejidad. El intento por entender el papel de estas reacciones y moléculas en las diversas funciones celulares constituye la base de la biología celular y molecular; entre otras áreas de las ciencias biológicas.

Las metodologías disponibles no son suficientes para evaluar directamente la complejidad tanto química como espacial del entorno intracelular de manera simultánea. En estos casos, el uso de herramientas matemáticas y computacionales ofrece la posibilidad de encontrar patrones y generar modelos que nos permitan acercarnos más al entendimiento de estos fenómenos.

La cronobiología, rama encargada del estudio de los osciladores biológicos, desde sus inicios ha hecho uso de modelos matemáticos para entender las condiciones básicas necesarias para la generación de los patrones periódicos presentes en muchos fenómenos biológicos. En particular, el estudio de los ritmos circadianos (aquellos que tienen un periodo de aproximadamente 24 horas), ha permitido entender los mecanismos fundamentales a nivel fisiológico y celular, necesarios para que un organismo sea capaz de sincronizarse ante estímulos externos, como la variación en la cantidad de luz debida a la rotación de la Tierra y la disponibilidad de nutrientes (Marcheva et al., 2013). En el proceso de elucidación de los procesos circadianos, los modelos matemáticos han sido capaces de predecir la existencia de moléculas cruciales involucradas en la generación de dichos patrones, y han ayudado a comprender cómo diversas modificaciones genéticas y ambientales son capaces de regular o alterar la regulación circadiana (Podkolodnaya et al., 2017).

Recientemente, se ha descubierto que proteínas involucradas en otros procesos celulares, como el control del crecimiento y el metabolismo celular, interactúan con

las moléculas efectoras de las oscilaciones circadianas, modificando su abundancia y/o actividad. Sin embargo, poco se sabe acerca del impacto y el efecto de estas interacciones en la regulación celular del ritmo circadiano (Ribas-Latre and Eckel-Mahan, 2016). Una de estas proteínas es mTOR (*mammalian/mechanistic target of rapamycin*), que es una proteína serina/treonina cinasa considerada como uno de los reguladores maestros del crecimiento celular, metabolismo y síntesis de proteínas como parte del complejo 1 de mTOR (mTORC1) (Saxton and Sabatini, 2017).

Diversos estudios han resaltado la importancia de la vía de señalización de mTORC1 en el mantenimiento de la función circadiana, tanto a nivel de organismo completo como en células individuales (Lipton et al., 2017; Okazaki et al., 2014; Ramanathan et al., 2018).

En este proyecto de tesis, se hace uso de un modelo matemático, construido de acuerdo con la información experimental disponible (la cual será abordada con detalle en las secciones siguientes), para dilucidar el efecto ocasionado por los diferentes niveles de regulación entre la vía de mTORC1 y el oscilador circadiano. En especial, se estudian las consecuencias del control de la vía de mTORC1 sobre el periodo y la amplitud de tales oscilaciones. El modelo sugiere que los cambios experimentales observados en periodo y amplitud podrían ser explicados por los dos niveles de regulación, hasta ahora descritos, mediante los que mTORC1 afecta al reloj circadiano (Dang et al., 2016; Lipton et al., 2017; Okazaki et al., 2014). Esto es, la regulación positiva de la traducción y la regulación negativa de la localización nuclear de Bmal1 (una proteína de la maquinaria del oscilador circadiano).

3.1. Definición del ritmo circadiano

Muchos organismos tienen un reloj molecular interno que dirige cambios circadianos en su comportamiento y metabolismo. Por ejemplo, los humanos y otros organismos diurnos poseen una mayor temperatura corporal, actividad metabólica, estado de alerta y presión sanguínea durante el día, y tienden a dormir durante la noche, en donde estas características se ven disminuidas. En general, los ritmos circadianos proveen a los organismos de un mecanismo que les permite anticipar y adaptarse

a los cambios ambientales debidos al ciclo del día y la noche del planeta (Thurley et al., 2017).

La presencia de ritmos circadianos ha sido demostrada en organismos tanto procariotes (específicamente en cianobacterias), como en eucariotes (Saini et al., 2019). A pesar de que las proteínas y metabolitos involucrados varían dependiendo del organismo en cuestión, se ha observado que todos comparten un mecanismo de acción específico: los ritmos circadianos suelen ser generados por redes de regulación transcripcional, traduccional y post-traduccional, en las que los genes y proteínas involucrados participan de complejos lazos de retroalimentación positiva y negativa(Saini et al., 2019). El resultado es un comportamiento oscilatorio en la expresión de proteínas, la concentración de metabolitos y las actividades celulares y fisiológicas asociados a éstos. A continuación se abordará con más detalle el funcionamiento del ritmo circadiano en el caso de los mamíferos.

3.2. Organización del ritmo circadiano en mamíferos

En los mamíferos, una pequeña región ubicada en el hipotálamo llamada el núcleo supraquiasmático (SCN) es el responsable de la sincronización del organismo completo(Buhr and Takahashi, 2013). Tiene como principales funciones adaptarse a los cambios del día y la noche y comunicar esta información al resto del cuerpo. El SCN se encuentra situado directamente sobre una región cerebral llamada el quiasma óptico, en la cual los nervios ópticos que provienen de la retina de ambos ojos se cruzan parcialmente. El SCN recibe entonces señales directas de estos nervios, lo que permite una conexión estrecha entre la actividad del SCN y la entrada de luz desde la retina, facilitando la respuesta circadiana en este grupo neuronal. En respuesta, las neuronas del SCN presentan una liberación circadiana de neurotransmisores y péptidos, que viajan por el torrente sanguíneo y aseguran la sincronización del resto de las células del cuerpo.

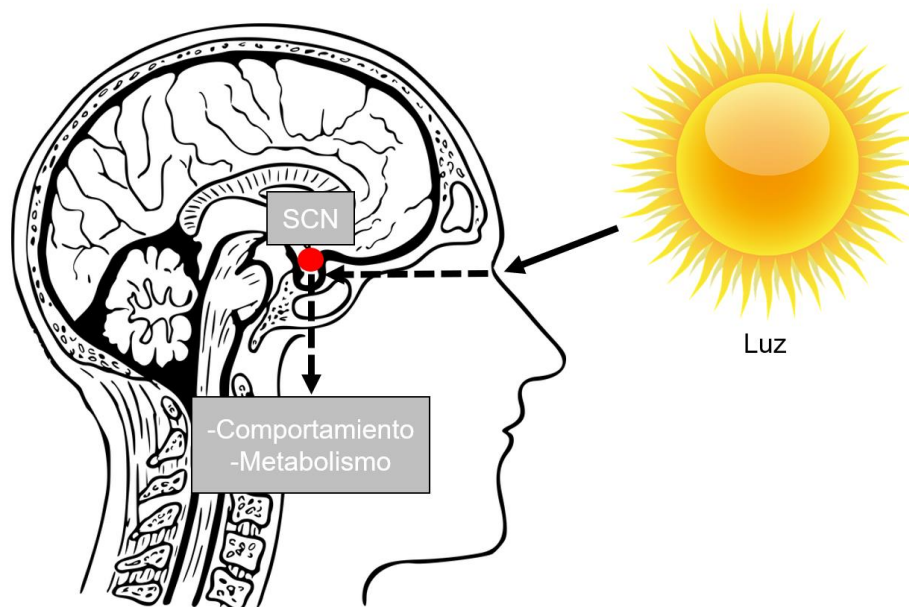


Figura 1. El núcleo supraquiasmático (SCN), se encuentra en el hipotálamo y recibe información directa de la luz captada por la retina y en consecuencia, controla los patrones circadianos del organismo.

Es por esto por lo que el SCN es considerado el marcapasos maestro del ritmo circadiano en el cuerpo, y su disrupción anula los patrones circadianos en las funciones fisiológicas y de comportamiento en el organismo completo (Cao et al., 2013). A pesar de esto, cada célula individual es capaz de mantener su propio ritmo circadiano, es decir, las células poseen un oscilador circadiano autónomo, de manera que la pérdida de los patrones circadianos en el organismo completo ocurre por una falta de sincronización de los tejidos, y no por la ausencia de control circadiano en los diferentes tipos celulares que los conforman (Nagoshi et al., 2004; Pulimeno et al., 2013). A las oscilaciones circadianas presentes en tejidos distintos al SCN se les denomina relojes periféricos, mientras al SCN se le conoce como el reloj central (Buhr et al., 2006).

Además de la regulación por parte del SCN, se ha demostrado que el comportamiento circadiano de un organismo puede ser modificado en respuesta a la disponibilidad de alimento durante el día (Oosterman et al., 2014). En algunos casos (por ejemplo, patrones de alimentación restringida a una sola hora del día),

esta sincronización debida a nutrientes puede desacoplar los relojes periféricos del reloj central e incluso, controlar las oscilaciones en éste.

Las oscilaciones circadianas están presentes no solo en el nivel de organismo completo, sino que son una propiedad de las células individuales. De forma que para que un organismo multicelular desarrolle comportamientos circadianos, todas las células deben actuar en sincronía unas con las otras.

El acoplamiento apropiado de los relojes periféricos y el reloj central es relevante para la salud de un individuo, y su disrupción ha sido asociada con una gran variedad de enfermedades metabólicas, desórdenes del sueño y algunos tipos de cáncer (Martino et al., 2008; Ribas-Latre and Eckel-Mahan, 2016). Debido a esto, muchos estudios se han realizado para dilucidar las complejas interacciones entre los componentes del reloj circadiano y el metabolismo a distintos niveles: desde el organismo completo hasta el nivel celular y molecular.

La maquinaria molecular de las oscilaciones circadianas a nivel celular forma parte de una serie de procesos transcripcionales, traduccionales y post-traduccionales entrelazados por una multitud de retroalimentaciones positivas y negativas. En mamíferos, los componentes centrales de los ritmos circadianos se encuentran representados por seis familias de genes reloj: *Clock*, *Bmal*, *Period (Per)*, *Cryptochrome (Cry)*, *Rev-erb* y *Ror*, las cuales son esenciales para mantener una correcta fase, periodo, amplitud y adaptabilidad del oscilador (Buhr and Takahashi, 2013).

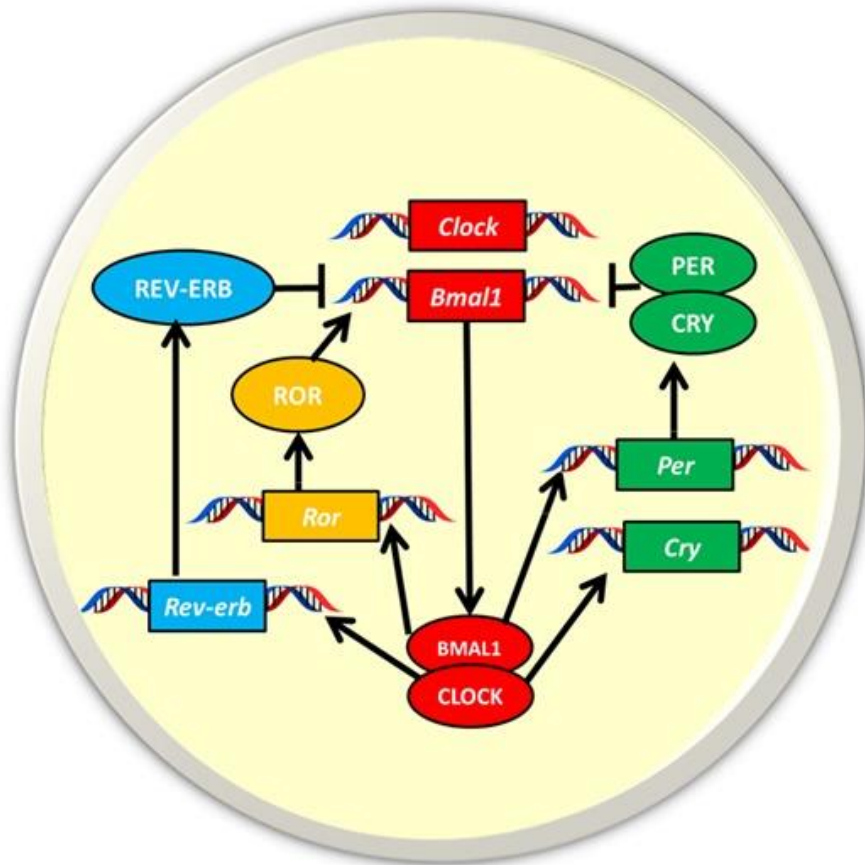


Figura 2. Las oscilaciones circadianas a nivel celular son controladas por una red de procesos transcripcionales, traduccionales y post-traduccionales controlados por 6 familias principales de genes: *Bmal*, *Clock*, *PER*, *CRY*, *Ror* y *Rev—erb*.

Las proteínas Clock y Bmal1 forman un heterodímero que actúa como un factor de transcripción para los otros genes en la red. De entre estos genes, Per y Cry codifican para proteínas que son capaces de formar heterodímeros que inhiben la actividad del factor de transcripción conformado por Clock y Bmal1, creando entonces un lazo de retroalimentación negativa (Marcheva et al., 2013).

Clock/Bmal1 promueve además la transcripción de los genes *Rev-erb* y *Ror*, que tienen efectos opuestos en la transcripción de *Bmal1*: mientras *Rev-erb* es un inhibidor de esta reacción, *Ror* se encarga de promoverla. Estos lazos de

retroalimentación son considerados como las interacciones más básicas que permiten la aparición de oscilaciones circadianas (Tao et al., 2015).

Las proteínas del reloj circadiano no solo modulan su propia expresión, sino que además modifican la expresión y actividades de diversos genes y proteínas de la célula, induciendo un comportamiento periódico en la actividad de estos blancos, involucrados en diversas funciones celulares como vías de señalización y procesos metabólicos. Es por esta razón que una gran parte de los procesos celulares exhiben comportamiento circadiano (Thurley et al., 2017).

La regulación circadiana puede ser llevada a cabo a diferentes niveles, que incluyen regulaciones en la transcripción y traducción, así como modificaciones post traduccionales tales como degradación vía proteosoma por medio de marcaje con ubiquitina. Zhang. *et al.*, estimó que, en el genoma de ratón, el 43% de los genes codificantes para proteínas oscilan en al menos un tipo de tejido (Zhang et al., 2014). Además, Duffield *et al.*, mostró que, en fibroblastos de ratón, la función de los genes regulados de forma circadiana pertenecía a múltiples procesos como la regulación de la transcripción, reciclaje de proteínas, señalización celular y motilidad (Duffield, 2003).

3.3. Vía de mTORC1

Todas las células tienen la habilidad de crecer y duplicarse a través de la división celular cuando las condiciones ambientales son favorables. Para asegurar que estos procesos puedan ser llevados a término las células han desarrollado redes de señalización que detectan estas condiciones y comunican el resultado al resto de la célula, estableciendo un control integrado de las diferentes vías que constituyen el metabolismo celular.

La proteína mTOR es considerada uno de los reguladores maestros del metabolismo celular (Gingras et al., 2001). En las células, mTOR puede ser encontrado en dos complejos con funciones diferentes, mTORC1 y mTORC2. mTORC1 se encarga de integrar diversas señales como disponibilidad de aminoácidos, glucosa y factores de crecimiento, estrés celular y daño al DNA, y en

respuesta, mantiene un balance adecuado entre procesos anabólicos y catabólicos. Es un complejo multiproteico que posee otros dos componentes esenciales además de mTOR: Raptor y mLST8, que participan en la localización celular del complejo, su activación y el reclutamiento de proteínas blanco (Saxton and Sabatini, 2017).

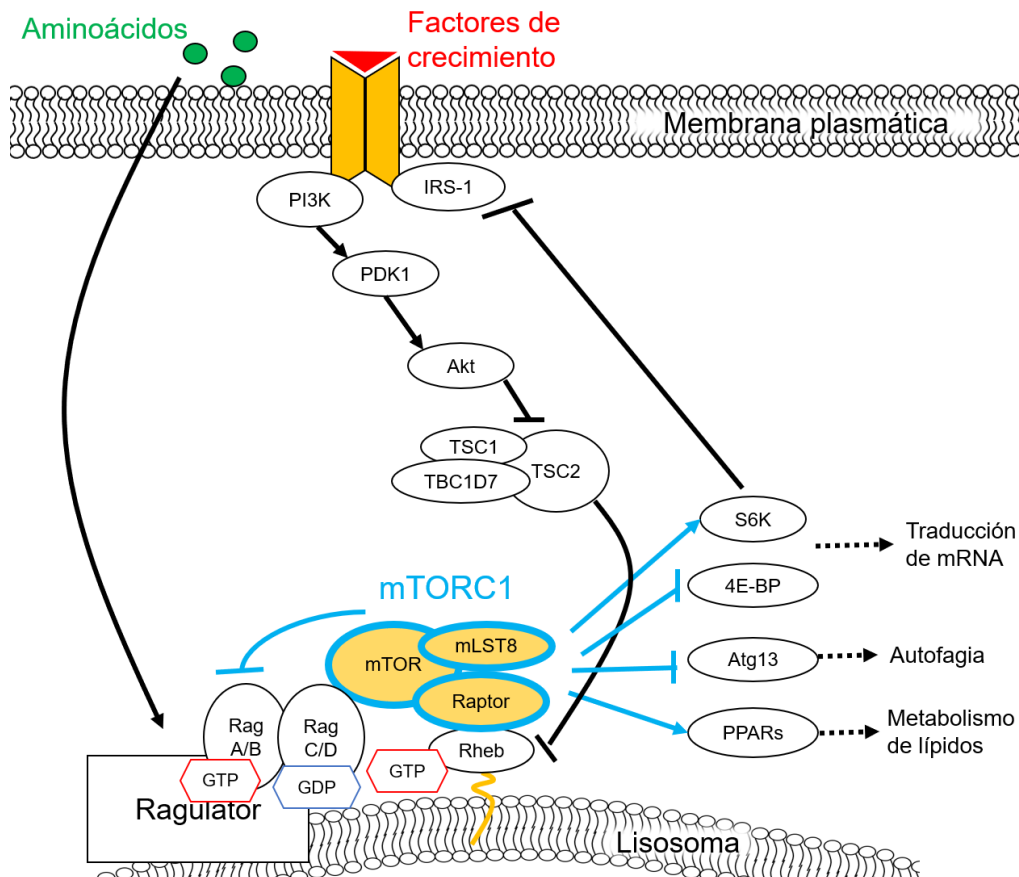


Figura 3. La vía de mTORC1

Este complejo media la activación de muchos procesos metabólicos, principalmente promoviendo la síntesis de proteínas. Sus principales blancos, son las cinasas de S6 (S6K1 y S6K2) y las proteínas de unión al factor de iniciación de la traducción eucariótico eIF4E (4E-BP1, 4E-BP2 and 4E-BP3) (Choo et al., 2008).

Las proteínas 4E-BP son represores traduccionales que actúan mediante la interacción directa con el factor de iniciación eIF4E, que está involucrado en el reclutamiento de la subunidad ribosomal 40s durante el proceso de traducción dependiente del cap -5' en el mRNA. La fosforilación de las 4E-BPs por parte de

mTORC1 promueve la disociación de estas proteínas del factor eIF4E, permitiendo que la traducción se lleve a cabo (Müller et al., 2013).

Por otro lado, las S6Ks actúan principalmente fosforilando proteínas en la subunidad ribosomal 40S, promoviendo de esta forma la traducción del mRNA. Específicamente, incrementa la traducción de mRNAs que contienen un tracto de oligopirimidinas cerca del sitio de iniciación de la traducción (Jefferies et al., 1997). Esta familia de mRNAs, conocida como 5'-TOP mRNAs, a pesar de ser pequeña, constituye aproximadamente el 20% de las moléculas de mRNA en la célula y codifica para muchas proteínas involucradas en procesos relacionados con la traducción, como son proteínas ribosomales, factores de iniciación y de elongación de la traducción (Avni et al., 1996).

mTORC1 inhibe además el proceso de autofagia, el cual involucra el reciclaje de estructuras celulares dañadas, como organelos y proteínas mal plegadas. Además, esta vía puede ser activada en respuesta a falta de nutrientes y otros tipos de estrés celular, funcionando como una fuente alternativa de energía. Cuando hay suficientes nutrientes en el medio, mTORC1 se encuentra activo e inhibe mediante fosforilación a algunas proteínas involucradas en la formación del autofagosoma tales como Atg13, ULK-1 y ULK-2 (Rabanal-Ruiz et al., 2017).

La activación de mTORC1 es llevada a cabo mediante dos pasos principales (Menon et al., 2014): inicialmente, el complejo debe localizarse en la superficie del lisosoma, donde después puede interactuar con una GTPasa pequeña denominada Rheb, que es capaz de activar a mTORC1 por un proceso actualmente desconocido (Sancak et al., 2010).

El primer paso, la localización lisosomal, es altamente dependiente de la concentración intracelular de aminoácidos y es mediado por la presencia de un conjunto de GTPasas pequeñas llamadas Rags (RagA, RagB, RagC y RagD) (Efeyan et al., 2012). Estas proteínas se encuentran ancladas a la superficie de los lisosomas y forman heterodímeros que consisten en una proteína RagA o RagB más una de RagC o RagD. Cuando los aminoácidos se encuentran en

concentraciones adecuadas, RagA y RagB se unen a una molécula de GTP y RagC y RagD a una de GDP. En este estado, los heterodímeros de Rag pueden reclutar a mTORC1 al lisosoma. Por otra parte, en la carencia de aminoácidos, RagA y RagB se unen a GDP para formar un complejo inactivo incapaz de unirse a mTORC1, lo cual hace que permanezca citoplásmico e inactivo (Manifava et al., 2016).

En la superficie del lisosoma, mTORC1 se encuentra en proximidad a Rheb, de forma que el complejo puede ser activado. Rheb, como las proteínas Rag, se encuentra en su estado activo cuando está unido a GTP, y permanece inactivo en su unión con GDP. La relación Rheb GTP/GDP es controlada entre otras señales de entrada por la presencia de factores de crecimiento (GFs) en el espacio extracelular. Cuando estos factores están presentes, Rheb se encuentra mayormente unido a GTP y la actividad de mTORC1 se ve incrementada (Buerger et al., 2006).

La inactivación de Rheb es controlada por el complejo TSC, que consiste en las proteínas TSC1, TSC2 y TBC1D7. TSC2 es una proteína con actividad de GTPasa que al unirse a Rheb, promueve la conversión de GTP a GDP (Inoki et al., 2003) .

En condiciones favorables para la célula, como son la presencia de nutrientes y factores de crecimiento en el medio extracelular, concentración adecuada de oxígeno y ausencia de daño al DNA, por mencionar algunos ejemplos, el complejo TSC permanece citoplásmico (Menon et al., 2014). Pero cuando la célula se encuentra en condiciones de estrés y falta de nutrientes, este complejo se localiza rápidamente en la superficie del lisosoma. Se ha demostrado que estas señales de estrés no afectan la actividad de GTPasa del complejo, sino su localización, y que la presencia de únicamente una de ellas es suficiente para lograr la localización completa del complejo al lisosoma (Demetriades et al., 2016; Menon et al., 2014; Smith et al., 2005).

El complejo TSC no solo inhibe la actividad de mTORC1 mediante la inactivación de Rheb, sino que además puede afectar su localización. Anteriormente se pensaba que la regulación de la localización de mTORC1 por aminoácidos era independiente

de TSC, pues este evento puede ser observado en células en las que la expresión de *TSC2* ha sido eliminada (Smith et al., 2005). Pero recientemente, Demetriades et al., demostraron que el complejo TSC es capaz de unirse a las formas inactivas de las proteínas Rag. Esto no afecta al reclutamiento de mTORC1 en presencia de aminoácidos cuando el complejo TSC se encuentra citoplásmico, sino a su liberación en ausencia de éstos (Demetriades et al., 2016, 2014).

La regulación de mTORC1 ha sido asociada con desórdenes metabólicos, envejecimiento y cáncer. Debido a la importancia de esta vía, múltiples mecanismos de control existen para asegurar que la actividad de mTORC1 se encuentre en los niveles adecuados. Por ejemplo, uno de sus blancos, S6K1, fosforila al sustrato 1 del receptor de insulina (IRS-1), bloqueando su señalización y la subsecuente activación de mTORC1 (Efeyan et al., 2012; Saxton and Sabatini, 2017).

La activación de la vía por aminoácidos también está regulada por lazos de retroalimentación negativa. mTORC1 promueve la ubiquitinación dependiente de Skp2 de la proteína RagA, lo que a su vez causa el reclutamiento de GATOR1, un complejo que posee actividad GTPasa hacia RagA-GTP. Esta interacción reduce la relación RagA GTP/GDP y consecuentemente la localización lisosomal de mTORC1 (Jin et al., 2015).

ZNRF2 es una E3 ubiquitina ligasa que cuando está presente en la superficie lisosomal promueve la localización de mTORC1 a este organelo. A su vez, la fosforilación de ZNRF2 mediada por mTORC1 ocasiona su liberación hacia el espacio citoplásmico, estableciendo así otro mecanismo de retroalimentación negativa en la localización de mTORC1 (Hoxhaj et al., 2016).

3.4. Interacción entre la vía de mTORC1 y el reloj circadiano

mTOR es una de las muchas proteínas que exhiben regulación circadiana. Okazaki et al. mostraron que en células de carcinoma renal (RenCa), la concentración de la proteína mTOR, así como su actividad, mostraban oscilaciones circadianas. Además, demostraron que la degradación de la proteína mTOR se encuentra mediada por la ubiquitina ligasa Fbxw7, que a su vez tiene oscilaciones circadianas

y está directamente regulada por el factor de transcripción Dbp, una proteína cuya expresión está controlada por el complejo Bmal1/Clock (Okazaki et al., 2014). Con esto se demostró que el reloj circadiano es un regulador directo de la actividad de la vía de mTORC1, mediante la regulación de la concentración de mTOR.

Muchos experimentos han demostrado que, además, la vía de mTORC1 es capaz de regular algunas propiedades del reloj circadiano mediante diferentes interacciones con los elementos que lo componen. Primeramente, se ha observado que durante la activación constitutiva de la vía de mTORC1 mediante el *knock-out* del gen *TSC2* en células de fibroblasto embrionario de ratón (MEF), la expresión de la proteína Bmal1 se encuentra incrementada (Lipton et al., 2017). En contraste, si la actividad de mTORC1 es bloqueada por rapamicina en estas mismas células, la concentración de Bmal1 se ve reducida.

En segundo lugar, la vía de mTORC1 modifica la localización de Bmal1. En células de hígado de ratón, el tratamiento con insulina reduce la acumulación nuclear de Bmal1, e incrementa la concentración total de la proteína Bmal1 en la célula (Dang et al., 2016). Además, Bmal1 es blanco de S6K, y su fosforilación en el aminoácido S42 promueve el reclutamiento de Bmal1 a la maquinaria traduccional en el ribosoma, donde ayuda a promover la síntesis de proteínas (Dang et al., 2016).

Estas interacciones podrían estar ocasionando un efecto en las propiedades del reloj circadiano. Se ha observado que en células de mamífero de diversas líneas (HeLa, HEK-293, fibroblastos, etc.), las oscilaciones circadianas tienen un incremento en amplitud a la vez de una disminución en el periodo cuando la actividad de mTORC1 es inducida (Ramanathan et al., 2018). El efecto opuesto también se observa: la inhibición de mTORC1 se relaciona con una disminución en la amplitud y un incremento en el periodo de las oscilaciones circadianas.

El uso de modelos matemáticos y computacionales ha sido relevante en el entendimiento de las dinámicas complejas que surgen de la interacción entre las moléculas tanto para la vía de mTORC1 (Sulaimanov et al., 2017), como para el reloj circadiano (Gonze, 2011). Hasta ahora, estos modelos se han enfocado

principalmente en entender el papel que cada una de las moléculas participantes tiene en el funcionamiento general de la vía, el tipo de respuesta que se espera de estos procesos ante diversos estímulos, así como la importancia de las características topológicas complejas presentes, tales como los diversos lazos de retroalimentación positiva y negativa (Gonze, 2011; Sulaimanov et al., 2017).

Gran parte de los modelos utilizados para estudiar las vías de señalización intracelulares están compuestos por ecuaciones diferenciales ordinarias (ODEs), donde las diferentes interacciones entre las moléculas están representadas por los principios básicos de cinética química y enzimática como por ejemplo, ley de acción de masas, dinámicas tipo Michaelis-Menten y funciones tipo Hill (Klipp and Liebermeister, 2006). Esto hace que en algunos casos sea posible integrar modelos de diferentes fenómenos con el fin de analizar sus interacciones. Tal es el caso, por ejemplo, de la interacción entre dos de los osciladores más importantes en la célula: el ciclo celular y el ritmo circadiano (Clairambault et al., 2007; Gérard and Goldbeter, 2012).

La información experimental disponible sobre los efectos que surgen de la interacción entre la vía de mTORC1 y el reloj circadiano es cada vez mayor, como se ha expuesto previamente en esta sección. Pero el análisis detallado de estas interacciones no ha sido estudiado con detalle desde el punto de vista dinámico. En 2016, se desarrolló un modelo que relaciona la función circadiana en el hígado con la actividad de la enzima AMPK (*AMP-activated protein kinase*), la cual está estrechamente relacionada con la vía de mTORC1 (Woller et al., 2016). Hasta la fecha, éste ha sido el único trabajo que ha explorado los efectos celulares que surgen de la interacción entre la maquinaria de regulación del balance energético de la célula y el ritmo circadiano. Sin embargo, aún no existen estudios que consideren directamente la influencia de mTORC1 en las propiedades dinámicas de las oscilaciones circadianas, como son la regulación de su amplitud y periodo, ni las implicaciones funcionales que derivan de ellas.

4. Planteamiento del problema

Tanto la vía de mTORC1, como el reloj circadiano, han sido estudiados minuciosamente y se ha llegado a un entendimiento bastante completo de los mecanismos bioquímicos y las interacciones moleculares en cada uno de estos procesos, así como el efecto de éstos en las funciones celulares. Sin embargo, dada la complejidad de cada vía individual, poco se conoce sobre los efectos que surgen de la interacción entre ambas.

La información disponible sobre los cambios en el comportamiento celular debidos a la acción conjunta del reloj circadiano y la regulación de mTORC1 es bastante limitada, a diferencia del conocimiento que se tiene del funcionamiento de estos mecanismos por separado. Es por esto, que es necesario realizar estudios que tomen en cuenta la estrecha conexión que existe entre la administración celular de los nutrientes, guiada por mTORC1 y la regulación global del comportamiento celular en respuesta al día y la noche, representada por el reloj circadiano.

El control exhaustivo de ambas vías en un contexto experimental puede resultar prohibitivo en términos metodológicos, dada la limitada cantidad de variables que es posible manipular en un solo experimento. Es por esto, que el uso de modelos matemáticos, que permitan organizar la información experimental disponible y que arrojen conclusiones concretas que puedan ser demostradas experimentalmente, es determinante en el entendimiento completo de la función celular.

Por lo tanto, en este proyecto de tesis, dada la información experimental previamente discutida en la Introducción, se aborda mediante modelaje matemático, el problema de entender de forma más detallada, el efecto que la vía de mTORC1 tiene sobre el reloj circadiano, con el entendimiento de que la vía de mTORC1 en sí misma, se encuentra bajo regulación circadiana.

5. Hipótesis

La vía de mTORC1 regula la amplitud y el periodo de las oscilaciones circadianas a nivel celular y es capaz de sincronizar tales oscilaciones de acuerdo con la disponibilidad de nutrientes en la célula.

6. Objetivos

6.1. *Objetivo general*

Entender el comportamiento dinámico de la interacción entre el reloj circadiano y la vía de mTORC1 utilizando modelaje matemático.

6.2. *Objetivos particulares*

- Estudiar la dinámica de la vía de mTORC1.
- Desarrollar un modelo matemático de la vía de mTORC1 y validarlo con datos experimentales.
- Analizar la influencia mutua entre la vía de mTORC1 y el reloj circadiano a nivel celular, utilizando el modelo antes mencionado y un modelo que capture las propiedades del reloj circadiano.
- Determinar el efecto que los diferentes estados de activación de la vía de mTORC1 tiene sobre las propiedades del ritmo circadiano, como son periodo, amplitud y patrones de sincronización.

7. Metodología

7.1. *Subsistema del reloj circadiano*

En 1965, Goodwin propuso un oscilador bioquímico mínimo, el cual consiste en tres ecuaciones diferenciales de primer orden, cada una con una tasa de producción y degradación, las cuales están acopladas de forma que dan lugar a un lazo de retroalimentación negativa (Goodwin, 1965). En este modelo, las reacciones de producción y degradación son lineales y la represión está representada como una función decreciente tipo Hill.

Las propiedades del modelo de Goodwin han sido estudiadas ampliamente y a pesar de su simplicidad, el modelo ha sido capaz de reproducir múltiples características de los osciladores circadianos, tales como sincronización por luz, robustez ante el ruido y compensación por temperatura (Ruoff et al., 1999; Tang, 2008; Woller et al., 2014).

El oscilador de Goodwin es modelado mediante el siguiente conjunto de ecuaciones diferenciales:

$$\frac{dX}{dt} = k_1 \frac{K_i^n}{K_i^n + Z^n} - k_2 X, \quad (1a)$$

$$\frac{dY}{dt} = k_3 X - k_4 Y, \quad (1b)$$

$$\frac{dZ}{dt} = k_5 Y - k_6 Z. \quad (1c)$$

El sistema de ecuaciones diferenciales reúne las características mínimas necesarias para generar oscilaciones en sistemas biológicos:

- 1.-Un lazo de retroalimentación negativa, que, en este caso, consta de la inhibición en la producción de la variable X por parte de Z.
- 2.-Un retardo en la comunicación entre las moléculas participantes, denotado de forma explícita por la presencia del intermediario Y.

3.-Presencia de no linealidad, aportada por la función tipo Hill decreciente.

Bajo las suposiciones de que la proteína Clock no es un factor limitante para la formación del complejo, y que el complejo Bmal1/Clock inhibe directamente la transcripción de Bmal1, el modelo de Goodwin puede ser utilizado para representar el reloj circadiano. En este caso, las variables X, Y y Z representan las concentraciones del mRNA de *Bmal1*, la proteína Bmal1 y el factor de transcripción Bmal1/Clock respectivamente.

7.2. Subsistema de la vía de mTORC1

A continuación, se desarrolla un modelo para la vía de mTORC1, diseñado de forma que sea suficientemente simple para ser acoplado al modelo de Goodwin. El modelo toma en consideración que la activación de mTORC1 es llevada a cabo en dos pasos: el primero, el reclutamiento del complejo mTORC1 al lisosoma y segundo, su activación mediada por la proteína Rheb. El modelo toma en cuenta además su retroalimentación negativa de mTORC1. Utilizando esta información, se construyó un modelo de cuatro variables (representado en la figura 1), el cual considera que mTORC1 puede encontrarse tanto en el lisosoma como fuera de éste, en su forma activa o inactiva.

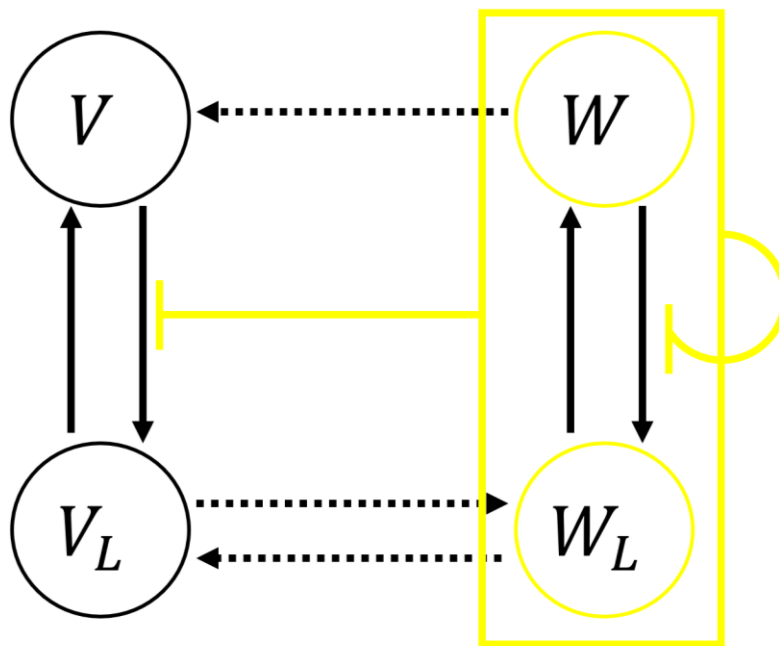


Figura 4. Representación esquemática del modelo de activación de mTORC1. V y V_L representan las formas inactivas de mTORC1, W y W_L representan las formas activas, y el subíndice L denota la localización lisosomal. Las flechas continuas describen la localización lisosomal reversible, mientras las flechas punteadas representan los procesos de activación e inactivación. Nótese que la activación de mTORC1 ocurre solamente en la superficie del lisosoma. Las líneas amarillas representan la retroalimentación negativa de mTORC1 en su propia localización.

Las ecuaciones que conforman el modelo son las siguientes:

$$\frac{dV}{dt} = c_4W + c_2V_L - f(W_T)c_1V, \quad (2a)$$

$$\frac{dV_L}{dt} = f(W_T)c_1V + c_4W_L - (c_2 + c_3)V_L, \quad (2b)$$

$$\frac{dW_L}{dt} = f(W_T)c_1W + c_3V_L - (c_2 + c_4)W_L, \quad (2c)$$

$$\frac{dW}{dt} = c_2W_L - f(W_T)c_1W - c_4W, \quad (2d)$$

$$M = V + V_L + W + W_L, \quad (2e)$$

$$W_T = W_L + W. \quad (2f)$$

En las ecuaciones anteriores, las variables V y V_L representan las formas inactivas de mTORC1, W y W_L son las formas activas, y el subíndice L denota la localización lisosomal. Se asume que la activación de mTORC1 ocurre solamente en la superficie del lisosoma. Además, se considera que ambas formas activas de mTORC1 (citoplásmica y lisosómica), tienen el mismo efecto en el lazo de retroalimentación negativa.

Los parámetros c_1 y c_2 corresponden a las tasas de asociación y disociación del lisosoma, mientras c_3 y c_4 son las tasas de activación e inactivación de mTORC1.

M es la concentración total de mTORC1. Se asume que el estado de activación de mTORC1 no afecta al proceso de localización. La función $f(W_T)$, que representa la regulación negativa, es modelada como una función monótonica decreciente de la concentración total de mTORC1 activo y tiene la siguiente forma:

$$f(W_T) = \frac{K_{i2}^{n_2}}{K_{i2}^{n_2} + W_T^{n_2}}. \quad (2g)$$

Finalmente, bajo la suposición de que las reacciones de activación e inactivación de mTORC1 son rápidas, comparadas con los procesos transcripcionales y traduccionales del oscilador circadiano, se realizó una aproximación de estado cuasi estacionario al subsistema de mTOR para obtener la siguiente expresión para la concentración de mTORC1 activo (W_T), en términos de mTORC1 total (M).

$$W_T = r_0 k_a * \frac{(r_0 k_b)^{n_2}}{(r_0 k_b)^{n_2} + W_T^{n_2}} M, \quad (3)$$

donde los parámetros k_a y k_b están relacionados con c_1, c_2, c_3, c_4 y K_{i2} , mientras r_0 es un parámetro que permite el ajuste simultáneo de k_a y k_b . La derivación de esta última expresión se discute más adelante en la sección Estimación de Parámetros.

7.3. Acoplamiento de los subsistemas de mTORC1 y el reloj circadiano

Para tomar en consideración la interacción que existe entre la vía de mTORC1 y la maquinaria de las oscilaciones circadianas, se agrega la siguiente ecuación al modelo de Goodwin:

$$\frac{dM}{dt} = k_p - (k_d + k_{d2}Z)M. \quad (4a)$$

En esta ecuación, M representa la concentración total de mTORC1 y el término $k_{d2}Z$ es incluido para representar la contribución del reloj circadiano a la degradación de la proteína mTOR. Por cuestiones de simplicidad, supondremos que $k_d = k_2$.

Tomando en cuenta el efecto observado de mTORC1 sobre la traducción de la proteína Bmal1 (Dang et al., 2016; Lipton et al., 2017), una tasa de traducción dependiente de mTORC1 es agregada a la ecuación 1b (que representa la dinámica de la proteína Bmal1):

$$\frac{dY}{dt} = (k_3 + k_{3.2}W_T)X - k_4Y. \quad (4b)$$

Recordando que la variable W_T corresponde a la proporción de mTORC1 activo, para modelar el efecto negativo que mTORC1 tiene sobre la localización de Bmal1, un término adicional es agregado a la ecuación 1c (que representa la dinámica del factor de transcripción Bmal1/CLOCK):

$$\frac{dZ}{dt} = k_5Y - (k_6 + k_{6.2}W_T)Z. \quad (4c)$$

Así, después de un proceso de normalización *ad hoc*, el modelo adimensional resultante del acoplamiento entre mTORC1 y el ritmo circadiano queda como sigue:

$$x' = \frac{a}{1 + z^n} - x, \quad (5a)$$

$$y' = (1 + r_1w_T)x - y, \quad (5b)$$

$$z' = y - (1 + r_2w_T)z, \quad (5c)$$

$$m' = 1 - (1 + cz)m, \quad (5d)$$

$$w_T = (r_0k_a) \frac{\left(r_0 \frac{k_b k_p}{k_2}\right)^{n_2}}{\left(r_0 \frac{k_b k_p}{k_2}\right)^{n_2} + w_T^{n_2}} m, \quad (5e)$$

donde:

$$x = \frac{k_3 k_5}{k_2^2 K_i} X, \quad y = \frac{k_5}{k_2 K_i} Y, \quad z = \frac{1}{K_i} Z, \quad m = \frac{k_p}{k_2} M, \quad t' = k_2 t, \quad w_T = \frac{k_p}{k_2} W_T,$$

$$a = \frac{k_1 k_3 k_5}{k_2^3 K_i}, r_1 = \frac{k_{3.2} k_d}{k_3 k_p}, r_2 = \frac{k_{6.2} k_d}{k_2 k_p}, c = \frac{k_{d2}}{k_2 K_i}.$$

El parámetro adimensional a engloba los parámetros del subsistema del ritmo circadiano y por tanto, representa las propiedades intrínsecas del mismo.

El parámetro adimensional c relaciona la tasa de degradación basal de mTOR (k_2) y la tasa de degradación de mTOR dependiente del ritmo circadiano (k_{d2}). Por lo tanto, este parámetro representa la influencia del ritmo circadiano sobre la degradación de la proteína mTOR.

El parámetro adimensional r_1 relaciona la tasa de traducción basal de Bmal1 (k_3) y la tasa de traducción de Bmal1 dependiente de mTORC1 ($k_{3.2}$) por lo tanto, este parámetro es utilizado para representar el efecto de mTORC1 sobre la traducción de Bmal1.

El parámetro adimensional r_2 relaciona la tasa de localización citoplásmica del complejo Bmal1/Clock (k_6) y la tasa de localización citoplásmica del complejo Bmal1/Clock dependiente de mTORC1 ($k_{6.2}$) por lo tanto, este parámetro es utilizado para representar el efecto negativo de mTORC1 sobre la localización nuclear del complejo Bmal1/Clock.

7.4. Métodos numéricos

El sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias (ODE) dado por las ecuaciones 5a-5d, fue resuelto numéricamente utilizando la función **odeint**, de la librería **scipy.integrate** de Python (Python.org).

7.5. Estimación de parámetros

Primeramente, se estimaron los parámetros asociados al subsistema de mTORC1 (Eqs. (2a)-(2f)). En específico, se buscaron determinar combinaciones de parámetros que reprodujeran adecuadamente la dinámica del sistema ante las diferentes combinaciones de presencia/ausencia de aminoácidos y factores de crecimiento. No se encontraron reportes de experimentos que ayudaran a estimar directamente dichos parámetros. Sin embargo, existen publicaciones en las que la

actividad de mTORC1 fue medida en cultivos celulares bajo diferentes condiciones de disponibilidad de nutrientes. Con base en esta información, se encontraron heurísticamente sets de parámetros que permitieran al modelo reproducir los niveles de actividad de mTORC1 bajo las condiciones apropiadas acordes con los resultados experimentales, y entonces se compararon estos sets de parámetros para encontrar un patrón que permitiera obtener estimaciones empíricas de los parámetros consistentes con los resultados analizados.

Menon *et. al.*, determinaron el porcentaje de colocación de mTOR y Rheb bajo condiciones óptimas de factores de crecimiento y aminoácidos (AA+/GF+), y encontraron que éste es de alrededor de 60% en células HeLa. Por lo tanto, para el modelo suponemos que el 60% del mTORC1 total se encuentra en su forma activa en estas condiciones (Menon et al., 2014).

Hara *et al.* mostraron que en células de la línea HEK-293 cultivadas en ausencia de suero y privadas de aminoácidos por 2 horas (AA-/GF-), la actividad de S6K es de alrededor de un 20% de la actividad mostrada después de la adición de suero y aminoácidos durante 60 minutos (Hara et al., 1998). Para comparar esta información experimental con el modelo, supondremos que la actividad de S6K es proporcional a la activación de mTORC1, de forma que el nivel de activación de mTORC1 sea el 20% de la actividad máxima bajo estas condiciones. Dado que el porcentaje de mTORC1 activo no está reportado para la línea celular HEK-293, suponemos que es igual al reportado previamente para células HeLa.

Tomando en cuenta la información previamente discutida, se determinó el siguiente set de parámetros, el cual permite al modelo reproducir los datos experimentales en ausencia de factores de crecimiento y aminoácidos (AA-/GF-):

$$c_1 = c_2 = c_3 = 0.1 \text{ min}^{-1}, c_4 = 0.01 \text{ min}^{-1}, K_{i2} = 0.0225 \mu\text{M}, n_2 = 5 \quad (P1).$$

mientras que el siguiente set de parámetros es consistente con la condición óptima de nutrientes (AA+/GF+):

$$c_1 = c_3 = 1 \text{ min}^{-1}, c_2 = 0.1 \text{ min}^{-1}, c_4 = 0.01 \text{ min}^{-1}, K_{i2} = 0.0744 \mu\text{M}, n_2 = 5 \quad (P2).$$

En la figura 2 se muestran los resultados de las simulaciones realizadas utilizando cada uno de los sets de parámetros anteriores.

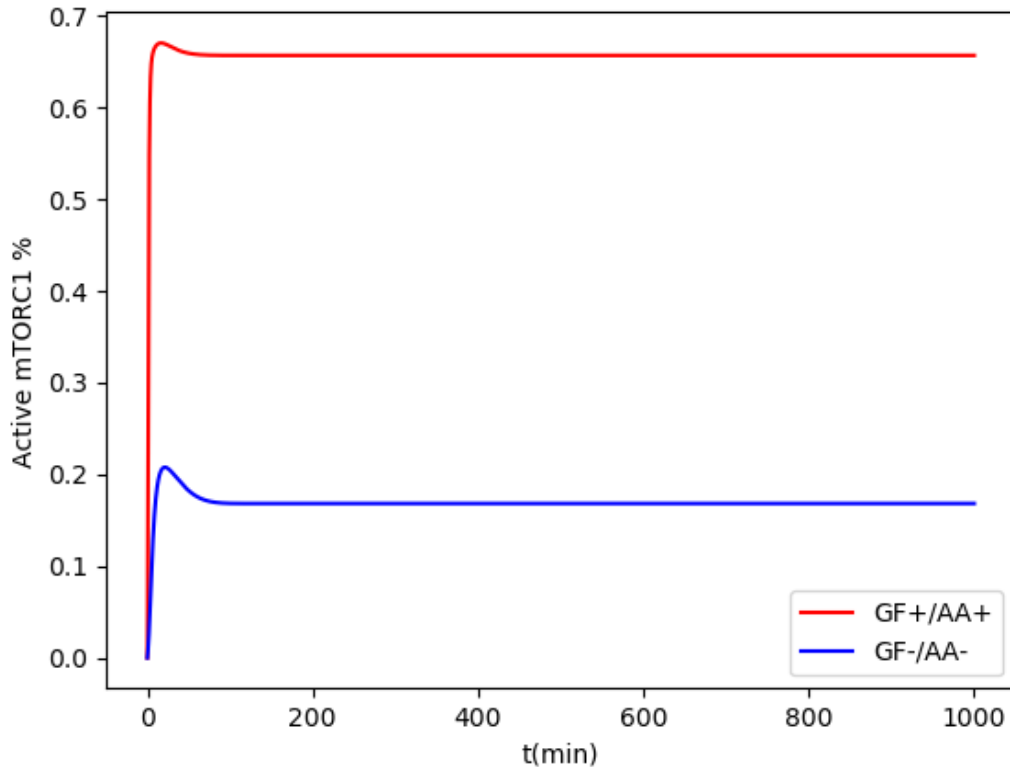


Figura 5. Gráfico de la proporción de mTORC1 activo en función del tiempo. Para simular el estado estacionario del subsistema de mTORC1 en las distintas condiciones de nutrientes, las ecuaciones 2a-2f, fueron resueltas numéricamente con un tiempo de simulación de 1000 min con los sets de parámetros P1 (curva roja) o P2 (curva azul).

Manifava et al. determinaron la dinámica de colocación de mTOR con la proteína lisosomal de superficie LAMP-1 (Manifava et al., 2016). Para lograr esto, tomaron cultivos celulares de células HEK-293 privados de aminoácidos y factores de crecimiento, los cuales fueron re-estimulados con aminoácidos por 30 minutos. El resultado del experimento mostró que la colocación de mTOR con LAMP-1 alcanza su máximo en alrededor de 5 minutos, siendo este de alrededor del 50%.

Para simular este experimento, se utilizó el estado estacionario del sistema bajo el set de parámetros P1 como la condición inicial. Posteriormente se llevó a cabo la simulación bajo el siguiente set de parámetros:

$$c_1 = 1 \text{ min}^{-1}, c_2 = c_3 = 0.1 \text{ min}^{-1}, c_4 = 0.01 \text{ min}^{-1}, K_{i2} = 0.0409 \mu\text{M}, n_2 = 5 \quad (P3).$$

La comparación entre el resultado de la simulación y los datos experimentales discutidos anteriormente se muestra en la figura 3.

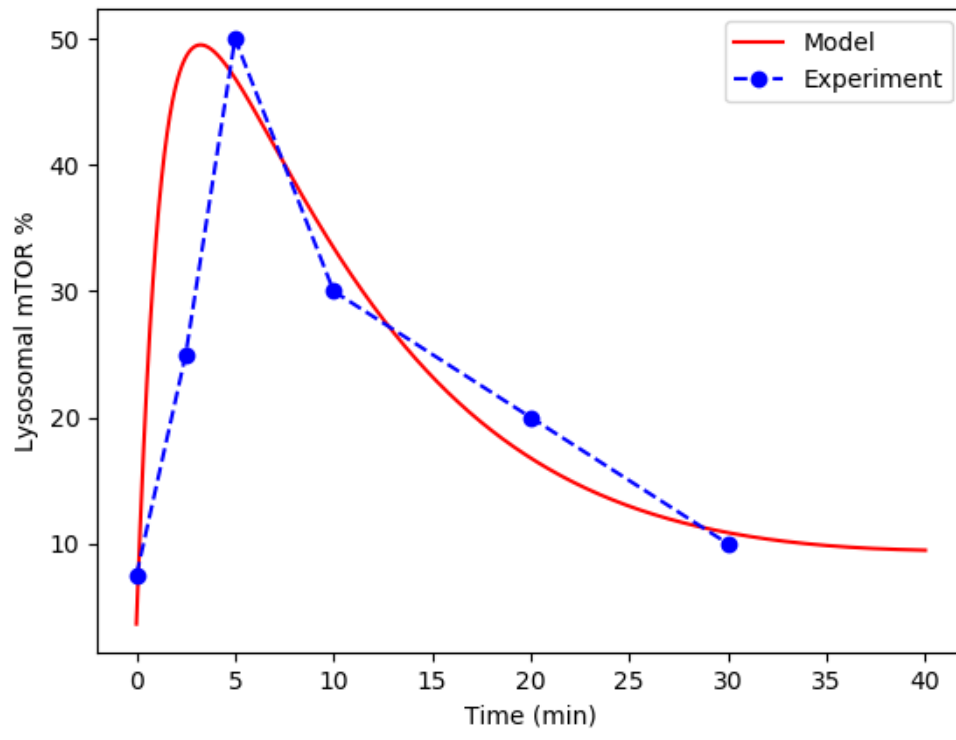


Figura 6. Gráfica de mTOR lisosomal $\left(\frac{V_L+W_L}{M} * 100\right)$ en función del tiempo. Para simular la rápida localización de mTORC1 debido a la estimulación con aminoácidos, las ecuaciones 2a-2f fueron resueltas numéricamente utilizando el set de parámetros P3 con un tiempo de simulación de 40 min. El resultado de esta simulación (curva roja continua) es contrastado con la información experimental obtenida de Manifava et al. (curva punteada azul).

Choo *et al.* midieron el efecto de la privación de suero sobre la actividad de S6K en células HEK-293 durante 24 horas (Choo et al., 2008). Para simular este

experimento, el estado estacionario del Sistema bajo el set de parámetros P1 fue tomado como condición inicial y posteriormente las ecuaciones del modelo fueron resueltas por 1440 minutos (24 h) utilizando el siguiente set de parámetros (AA-/GF+):

$$c_1 = c_2 = 0.1 \text{ min}^{-1}, c_3 = 1 \text{ min}^{-1}, c_4 = 0.01 \text{ min}^{-1}, K_{i2} = 0.0409 \mu\text{M}, n_2 = 5 \quad (P4).$$

Los resultados de esta simulación se muestran en la figura 4.

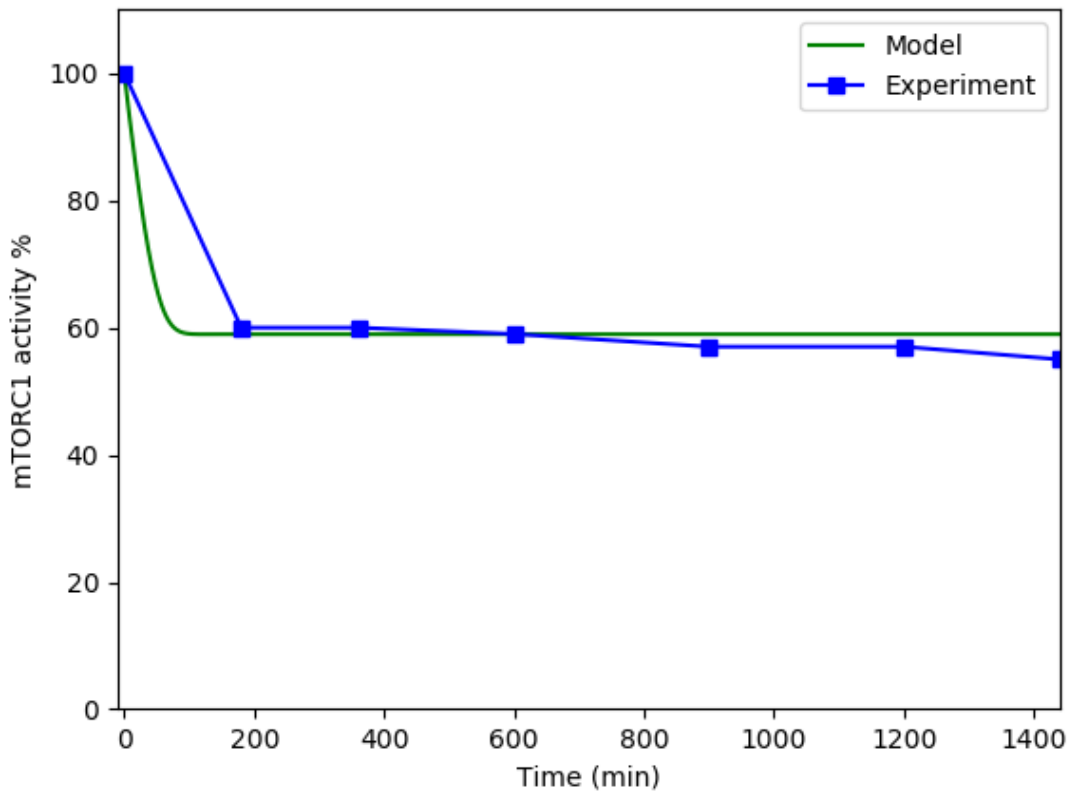


Figura 7. Gráfica de mTORC1 activo ($W + W_L$) en función del tiempo. Para simular la disminución en la actividad de mTORC1 debida a la privación de factores de crecimiento, las ecuaciones (2a)-(2f) fueron resueltas usando el set de parámetros P4 por 1440 min. La proporción de mTORC1 activo fue normalizada con el estado estacionario del sistema bajo el set de parámetros P2. El resultado de la simulación (curva verde) es comparado con la información experimental de Choo et al. (curva azul).

En la Tabla 1 se recopilan los diferentes sets de parámetros utilizados para representar las diferentes combinaciones de condiciones de aminoácidos y factores de crecimiento evaluadas previamente.

Tabla 1. Sets de parámetros para las cuatro diferentes combinaciones de factores de crecimiento y aminoácidos.

Parámetro	AA- / GF-	AA + / GF -	AA - / GF +	AA + / GF +
c_1	0.1 min^{-1}	1 min^{-1}	0.1 min^{-1}	1 min^{-1}
c_2	0.1 min^{-1}	0.1 min^{-1}	0.1 min^{-1}	0.1 min^{-1}
c_3	0.1 min^{-1}	0.1 min^{-1}	1 min^{-1}	1 min^{-1}
c_4	0.01 min^{-1}	0.01 min^{-1}	0.01 min^{-1}	0.01 min^{-1}
K_{i2}	$0.0225 \mu\text{M}$	$0.0409 \mu\text{M}$	$0.0409 \mu\text{M}$	$0.0744 \mu\text{M}$
n_2	5	5	5	5

Analizando los valores de los parámetros, podemos concluir que, en el modelo, la concentración de aminoácidos impacta tanto la tasa de localización c_1 como el parámetro K_{i2} , mientras que la presencia de factores de crecimiento incrementa el valor del parámetro de activación c_3 , así como también el parámetro K_{i2} . Estas observaciones van acordes con la información experimental reportada, discutida previamente en la sección de Introducción. La presencia de aminoácidos se ha visto que tiene el efecto de incrementar la localización de mTOR en el lisosoma. Además, la presencia de factores de crecimiento incrementa la proporción RhebGTP/RhebGDP, y por lo tanto la tasa de activación de mTORC1 en la superficie lisosomal.

A continuación, se realizó una aproximación de estado cuasi estacionario para el subsistema de mTORC1, igualando las ecuaciones 2a-2d a cero, y despejando para W_T , que representa la concentración de mTORC1 activo, con el objetivo de obtener una expresión que relacione dicha variable en términos de la concentración total de mTOR (M).

$$W_T = \frac{(c_1 f(W_T) + c_2 + c_4)}{\left(c_1 f(W_T) + c_2 + c_4 + \frac{c_2 c_4}{c_1 f(W_T)} \right)} \frac{c_3}{c_4 \frac{c_1 f(W_T) + c_2 + c_4}{c_1 f(W_T) + c_4} + c_3} M \quad (6)$$

Podemos ver en la figura 6 que las curvas de W_T vs. M obtenidas utilizando la ecuación 6 y los diferentes sets de parámetros de la Tabla 1 son curvas sigmoidales monotónicas crecientes. Así que, para aproximar la ecuación 6 se propone la siguiente función tipo Hill:

$$W_T = k_a * \frac{k_b^n}{k_b^n + W_T^n} M, \quad (7)$$

donde k_a y k_b son parámetros relacionados con c_1, c_2, c_3, c_4 y K_{i2} . Nótese de la figura 6 que esta función resulta en una muy buena aproximación para todos los casos analizados. Los valores de k_a y k_b empleados para cada condición son tabulados en la Tabla 2.

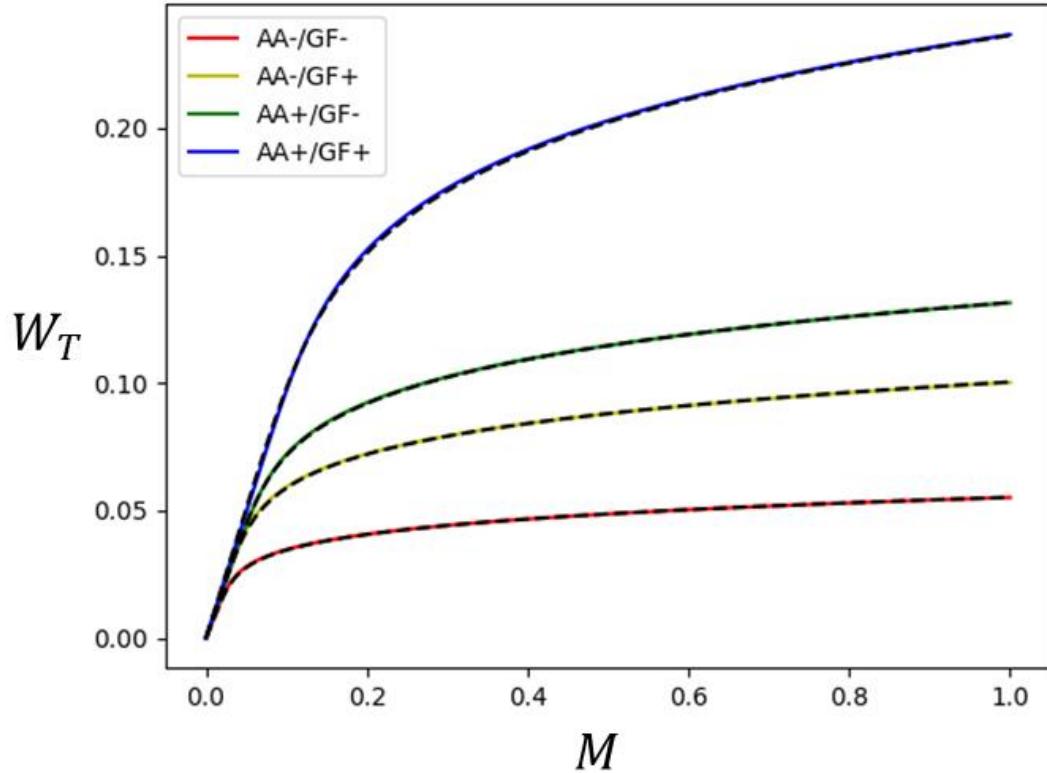


Figura 8. Gráfica de mTORC1 activo (W_T) como función de mTOR total (M). Los resultados obtenidos del estado estacionario del subsistema de mTORC1, utilizando los sets de parámetros de la Tabla 1, son comparados con los resultados obtenidos de la Ecuación 7 y los sets de parámetros de la Tabla 2.

Tabla 2. Sets de parámetros utilizados para simular las condiciones de activación de mTORC1 utilizando la Ecuación 7.

Parámetro	AA- / GF-	AA - / GF +	AA + / GF -	AA + / GF +
k_a	0.78	0.92	0.92	1.02
k_b	$0.033 \mu M$	$0.066 \mu M$	$0.092 \mu M$	$0.186 \mu M$
n_2	5	5	5	5

De los parámetros tabulados en la Tabla 2 podemos observar que, para simular aumento en la actividad de mTORC1, los parámetros k_a y k_b deben incrementarse

simultáneamente, de modo que introducimos un nuevo parámetro, r_0 que multiplica tanto a k_a como a k_b y es proporcional al nivel de activación de mTORC1. Finalmente, tomando los siguientes valores de parámetros: $k_a = 0.5$, $k_b = 0.02$, $n_2 = 5$, y variando el parámetro r_0 entre 0 y 10, tenemos un set de parámetros para el subsistema de mTORC1 que es compatible con todos los resultados experimentales analizados previamente.

Para los parámetros asociados al subsistema del reloj circadiano, se exploraron estudios previos en los que fue utilizado en modelo de Goodwin para simular oscilaciones circadianas con el fin de estimar los valores de a y n . Para el parámetro a , se encontraron reportes donde se obtuvieron oscilaciones sostenidas con periodos cercanos a 24 h en los siguientes rangos: 11.54 – 93.9 (Tang, 2008), 250 – 500 (Ruoff et al., 1999) and 25 – 250000 (Ruoff et al., 1996). Todos estos estudios utilizaron además el valor de $n = 9$, dado que un requisito para obtener oscilaciones sostenidas en este modelo es que el parámetro n tenga un valor mayor a 8 (Woller et al., 2014). Teniendo esta información en cuenta, a y n fueron variados en los rangos 0-60 y 9-20. Finalmente, los parámetros r_1 , r_2 y c tomaron valores entre 0 y 10 para explorar las interacciones entre mTORC1 y el reloj circadiano.

8. Resultados y Discusión

8.1. *Comportamiento del sistema en condiciones constantes de activación de mTORC1.*

Algunos trabajos experimentales previos han demostrado que la vía de mTORC1 afecta el periodo y la amplitud de las oscilaciones circadianas en distintos tipos celulares de mamíferos: un nivel alto de actividad de la vía conlleva un incremento en la amplitud y una disminución en el periodo de las oscilaciones en la concentración de diversas proteínas directamente relacionadas al ritmo circadiano (Cao et al., 2013; Lipton et al., 2017; Ramanathan et al., 2018). Por lo tanto, iniciamos investigando si las interacciones conocidas entre la vía de mTORC1 y el reloj circadiano (esto es, control de la traducción y localización nuclear de Bmal1),

son individualmente o en conjunto, suficientes para explicar estas observaciones experimentales.

En el modelo, el parámetro r_1 está relacionado a la tasa de traducción de Bmal1 mediada por mTORC1, normalizada con la tasa de traducción basal. De forma similar, el parámetro r_2 está relacionado a la tasa de localización nuclear de Bmal1, normalizada con la tasa de localización basal. Esto nos permite modelar la contribución individual de cada uno de los mecanismos regulatorios igualando alguno de los parámetros antes mencionados a cero y variando el otro. Además, el nivel de activación de mTORC1 puede ser modulado modificando el valor del parámetro r_0 .

El comportamiento dinámico del modelo fue analizado numéricamente resolviendo el sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias dado por las ecuaciones 5a-5e. En todos los casos se utilizó la variable z como reportero del comportamiento oscilatorio del sistema. Se utilizaron los siguientes valores de parámetros $a = 10, c = 10, n = 10$, para todas las simulaciones mostradas a continuación. Sin embargo, resultados similares pueden ser obtenidos en los rangos. $6 \leq a \leq 60$, $0.1 \leq c \leq 10$ y $9 \leq n \leq 20$. Los cambios ocasionados debido a las variaciones en estos parámetros serán discutidos más adelante cuando sea necesario.

8.2. *La regulación de la vía de mTORC1 sobre el reloj circadiano tiene diferentes efectos en el periodo y la amplitud.*

Tomando el parámetro $r_2 = 0$ mientras r_1 toma valores en el rango $1 \leq r_1 \leq 10$, podemos analizar el efecto individual que el incremento en la traducción de la proteína Bmal1 mediado por mTORC1 tiene sobre la amplitud y el periodo de las oscilaciones circadianas. Se realizaron las simulaciones correspondientes y se obtuvieron los valores del periodo y la amplitud de las oscilaciones de la variable z para cada uno de los casos. Los resultados de estos análisis se muestran en la figura 7.

El efecto que mTORC1 tiene sobre la amplitud de las oscilaciones depende del valor del parámetro a . En el rango $6 \leq a < 40$, incrementos en el valor del parámetro r_0 ocasionan valores mayores de amplitud para cualquier valor de r_1 entre 1 y 10. Para valores de a mayores a 40, se observa el efecto opuesto. Esto es, la amplitud de las oscilaciones disminuye con incrementos en r_0 .

Podemos concluir que, en todas las situaciones analizadas, cuando el único efecto de mTORC1 corresponde a la regulación del reloj circadiano a nivel traduccional, se observa un cambio en la amplitud de las oscilaciones, a la vez que el periodo se mantiene igual o bien, disminuye ligeramente.

Para estudiar el efecto que tiene mTORC1 sobre el periodo y la amplitud de las oscilaciones, cuando únicamente afecta a la localización nuclear de Bmal1, tomamos el parámetro $r_1 = 0$, mientras variamos r_2 en el rango $1 \leq r_2 \leq 10$. Después de realizar las simulaciones correspondientes, el periodo y la amplitud de las oscilaciones de la variable z fueron calculados y los resultados fueron graficados en la Figura 8.

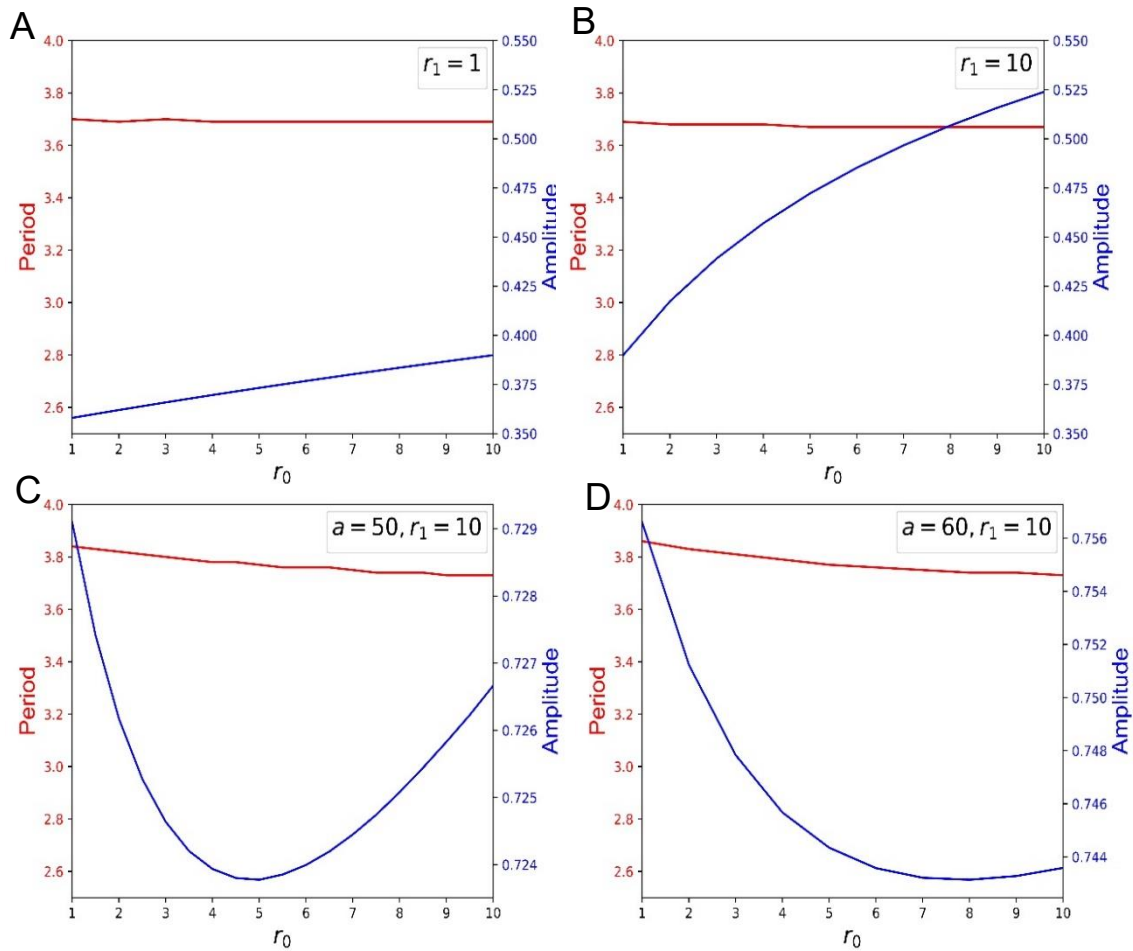


Figura 9. Efecto del control de mTORC1 en traducción de Bmal1 sobre las propiedades del reloj circadiano. Las ecuaciones 5a-5e fueron resueltas utilizando diferentes valores de r_1 con $r_2 = 0$, luego el periodo (curva roja) y la amplitud (curva azul) de las oscilaciones de la variable z fueron obtenidas y graficadas para diferentes valores del parámetro r_0 . (A,B) Un incremento en la amplitud proporcional a r_0 y r_1 es observado cuando $a=10$. (C,D) Para $a > 40$, el comportamiento se ve invertido, y un ligero incremento en el periodo es observado cuando $r_1 = 10$.

Nótese que el incremento en el valor del parámetro r_2 ocasiona una disminución en el periodo y la amplitud de las oscilaciones. Para $r_2 > 5$ el sistema pierde la capacidad de generar oscilaciones sostenidas para un valor del parámetro $a = 10$. Esto quiere decir, que el parámetro r_2 , además de tener un efecto en la reducción

del periodo de las oscilaciones, compromete el comportamiento oscilatorio del sistema. Esta pérdida de oscilaciones sostenidas es más pronunciada cuando el parámetro a toma valores pequeños. Por ejemplo, con $a = 6$, no es posible obtener oscilaciones sostenidas aún con los valores $r_2 = 2$ y $r_0 = 6$. Para valores mayores del parámetro a , el sistema puede alcanzar oscilaciones sostenidas en un rango mayor de valores del parámetro r_2 .

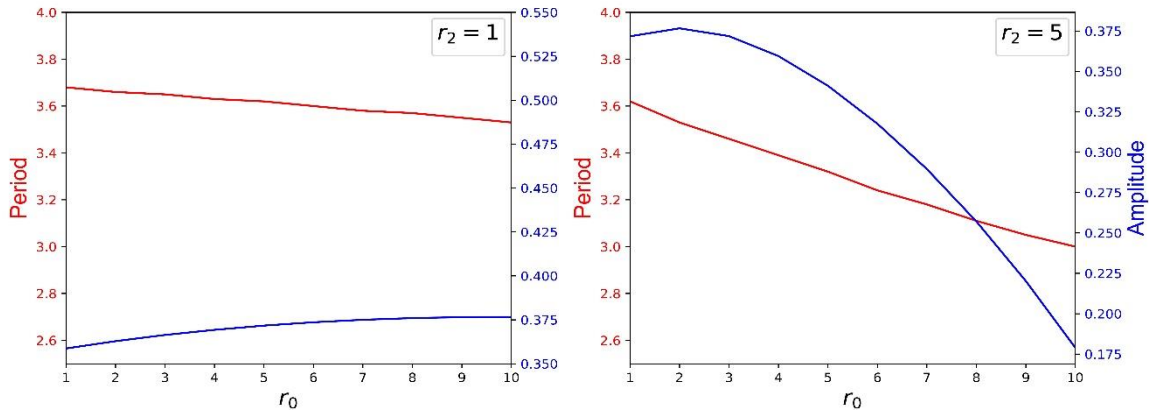


Figura 10. Efecto del control de la localización nuclear de Bmal1 mediado por mTORC1 en las propiedades del reloj circadiano. Las ecuaciones 5a-5e fueron resueltas utilizando diferentes valores de r_2 con $r_1 = 0$, luego el periodo (curva roja) y la amplitud (curva azul) de las oscilaciones de la variable z fueron obtenidas y graficadas para diferentes valores del parámetro r_0 . Una disminución del periodo es observada para $r_2 \geq 1$. Además, para $r_2 \geq 5$, las oscilaciones sostenidas se pierden para algunos valores de r_0 .

Los resultados discutidos anteriormente revelan que tanto el control de mTORC1 sobre la traducción como sobre la localización de Bmal1 son incapaces individualmente de explicar el efecto observado experimentalmente que la vía de mTORC1 tiene sobre las oscilaciones del reloj circadiano, esto es, un incremento en la amplitud acompañado de una disminución en el periodo con niveles crecientes de activación de mTORC1. De forma que a continuación, analizamos el caso en el que ambos niveles de regulación están presentes. Para lograr esto, se realizaron simulaciones con diferentes combinaciones de valores para los parámetros r_1 y r_2 . Los resultados se muestran en la Figura 9,

Estos resultados muestran que el incrementar el valor del parámetro r_0 tiene el efecto de aumentar la amplitud y disminuir el periodo de las oscilaciones circadianas, para cualquier combinación de valores de los parámetros r_1 y r_2 en los rangos $1 \leq r_1 \leq 10$ y $1 \leq r_2 \leq 5$.

Es importante notar que para valores menores del parámetro a , es posible obtener oscilaciones sostenidas aún cuando $r_2 = 5$. Además, la capacidad de incrementar la amplitud se mantiene sin importar el valor que tome el parámetro a . Dado que estos resultados coinciden con las observaciones experimentales analizadas anteriormente, concluimos que ambos niveles de interacción entre la vía de mTORC1 y el ritmo circadiano, esto es, control de la traducción y localización nuclear de Bmal1, son necesarios para mantener una regulación correcta de la amplitud y el periodo de las oscilaciones.

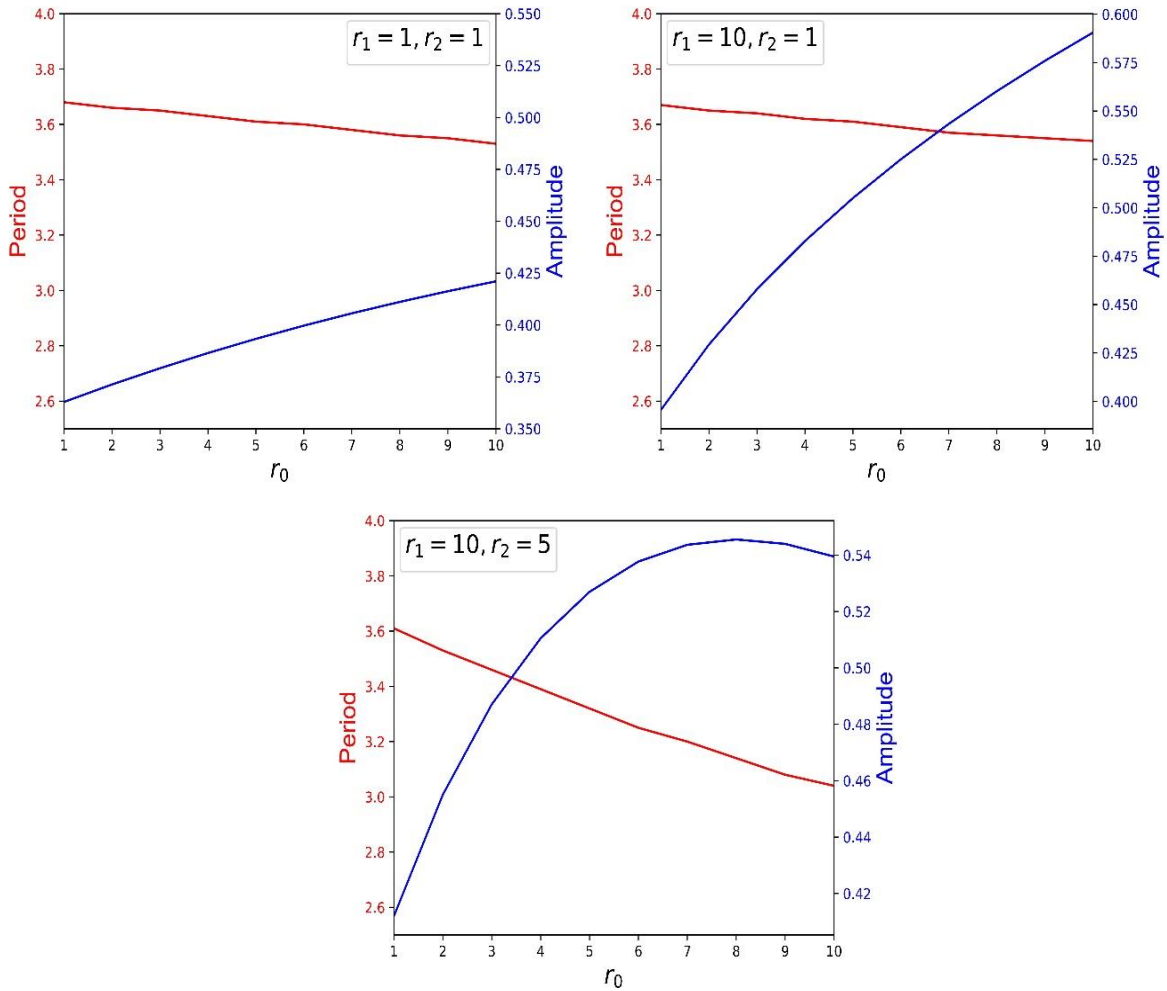


Figura 11. Efecto del control que mTORC1 ejerce sobre la traducción y la localización nuclear de Bmal1 en las propiedades del reloj circadiano. Las ecuaciones 5a-5e fueron resueltas utilizando diferentes valores de r_1 y r_2 , luego el periodo (curva roja) y la amplitud (curva azul) de las oscilaciones de la variable z fueron obtenidas y graficadas para diferentes valores del parámetro r_0 . Se observa una disminución en el periodo acompañada de incremento en la amplitud al variar r_0 entre 1 y 10 para $r_1 \neq 0$ y $r_2 \neq 0$.

8.3. El control de mTORC1 sobre el reloj circadiano afecta la robustez de las oscilaciones.

Estudios previos han mostrado que el modelo de Goodwin original siempre es capaz de presentar oscilaciones sostenidas cuando el coeficiente de Hill es mayor a 8, y un valor suficientemente alto del parámetro α (Woller et al., 2014). Para obtener soluciones periódicas, el punto de equilibrio estable del sistema debe atravesar una bifurcación de Hopf supercrítica, en la que el punto de equilibrio se vuelve inestable y aparece un ciclo límite estable.

En contraste, el modelo desarrollado anteriormente de la interacción de mTORC1 y el reloj circadiano es incapaz de generar oscilaciones sostenidas en algunos casos en los que el modelo de Goodwin básico si es capaz. Para entender mejor este fenómeno, estudiamos cómo los dos niveles de regulación que mTORC1 ejerce sobre el ritmo circadiano afectan al comportamiento oscilatorio de éste. Para esto, se determinó la presencia de oscilaciones en el espacio de parámetros r_0 vs α para todas las combinaciones de valores de los parámetros r_1 y r_2 previamente analizadas. Se consideró la presencia de oscilaciones sostenidas si la amplitud de las oscilaciones era mayor a 0.01 unidades adimensionales cuando $t=2000$. Los resultados se muestran en la figura 10.

Los resultados muestran que incrementos en el valor del parámetro r_1 aumentan el área en el espacio de parámetros en la que es posible observar un comportamiento oscilatorio. Por otro lado, incrementos en el parámetro r_2 reducen drásticamente, y en algunos casos completamente, la habilidad del sistema de obtener oscilaciones sostenidas. Por lo tanto, nuestro modelo sugiere que el control de la traducción de Bmal1 no solo impacta en la amplitud de las oscilaciones, sino que además contribuye a incrementar la robustez de estas ante cambios paramétricos en la dinámica oscilatoria del reloj.

El modelo predice oscilaciones estables en un rango mayor de parámetros cuando el control de la traducción de Bmal1 mediado por mTORC1 está presente, y este comportamiento es más pronunciado cuanto mayor es la tasa de traducción

dependiente de mTORC1 comparada con la tasa de traducción basal. Además, la regulación del periodo ocasionada por el control de mTORC1 sobre la localización nuclear de Bmal1 es acompañada por una drástica reducción de la robustez de las oscilaciones. Esto sugiere que, en condiciones de actividad constante de mTORC1, la regulación de la amplitud puede ser necesaria además para balancear este efecto y asegurar que mTORC1 sea capaz de modificar tanto el periodo como la amplitud de las oscilaciones, sin comprometer la capacidad del reloj circadiano de producir oscilaciones sostenidas.

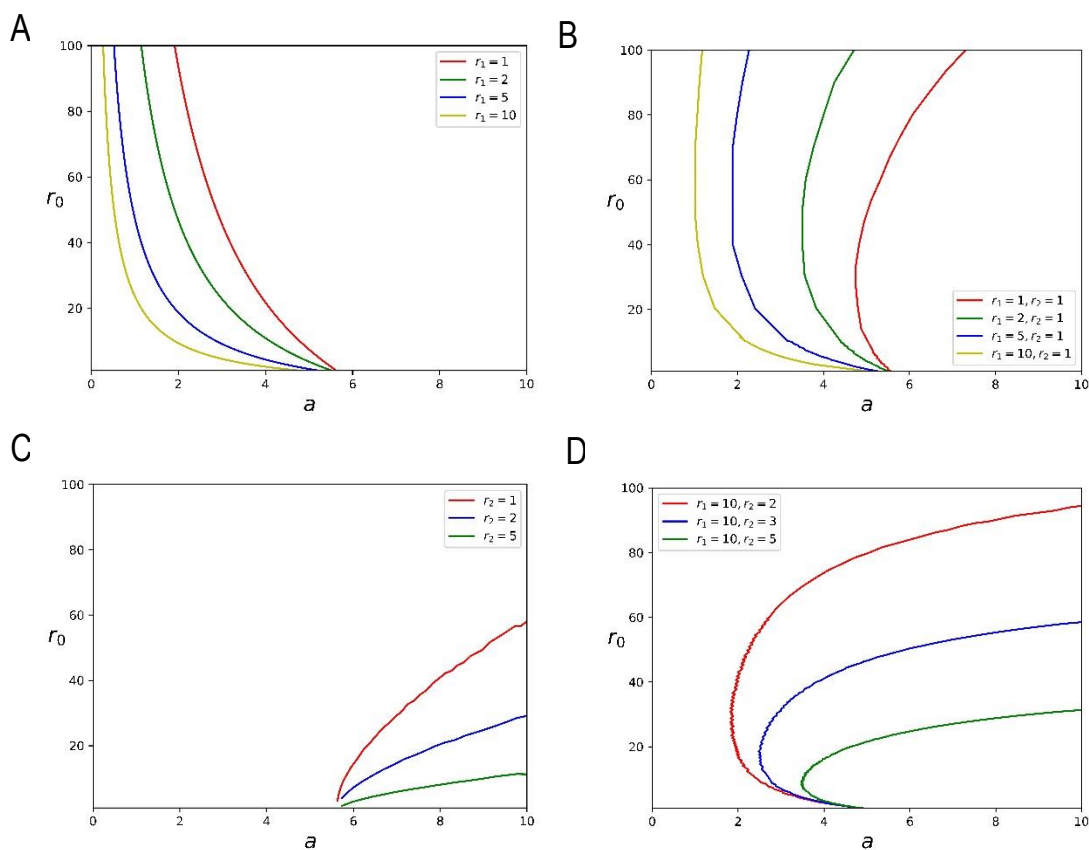


Figura 12. Área de oscilaciones sostenidas en el espacio de parámetros r_0 vs a . A la derecha de cada curva, las oscilaciones tienen una amplitud >0.01 cuando $t=2000$. Incrementos en el valor del parámetro r_1 aumentan el área del plano r_0 vs a en la que se presentan oscilaciones sostenidas, tanto cuando $r_2 = 0$ (A) como cuando $r_2 = 1$ (B). Incrementos en el parámetro r_2 disminuyen

el área de oscilaciones sostenidas en el plano r_0 vs α , tanto cuando $r_1 = 0$ (C) como cuando $r_1 = 10$ (D).

En conjunto, los resultados obtenidos hasta ahora ofrecen evidencia de una conexión directa entre el comportamiento de la amplitud y el periodo del reloj circadiano ante niveles constantes de activación de la vía de mTORC1 (Ramanathan et al., 2018) y la regulación que mTORC1 ejerce sobre este, a través del control de la dinámica de Bmal1 (Dang et al., 2016; Lipton et al., 2017). Esta información permite proponer una explicación mecanicista de los cambios en las oscilaciones circadianas asociados a la vía de mTORC1, la cual se resume en los siguientes puntos:

-El control de mTORC1 sobre la traducción de Bmal1, permite que la vía de mTORC1 sea capaz de regular la amplitud de las oscilaciones circadianas. Dicha amplitud es proporcional a la activación de mTORC1, esto es, a mayor activación de la vía, la amplitud de las oscilaciones circadianas se ve incrementada.

-El control de mTORC1 sobre la localización del complejo Bmal1/Clock permite a la vía de mTORC1 controlar el periodo de las oscilaciones circadianas. El periodo de oscilación es inversamente proporcional al nivel de activación de mTORC1.

-El control de mTORC1 sobre la localización del complejo Bmal1/Clock por sí solo compromete la capacidad del reloj circadiano de mantener oscilaciones sostenidas. Sin embargo, la acción conjunta de ambos niveles de regulación balancea este efecto y permite oscilaciones sostenidas en un mayor rango de escenarios, a la vez que permite a la vía de mTORC1 el control del periodo y amplitud de las oscilaciones circadianas.

8.4. Comportamiento del sistema en condiciones de activación periódica de mTORC1.

La actividad de mTORC1 se encuentra constantemente regulada por la disponibilidad de nutrientes y factores de crecimiento en el medio extracelular, los cuales están directamente relacionados con los patrones de alimentación en un

organismo completo. Por lo tanto, resulta interesante investigar el efecto que esta regulación tiene sobre el sistema mTORC1-reloj circadiano. En concreto, se investigó la capacidad de sincronización del reloj circadiano ante un comportamiento periódico en el patrón de alimentación, mediado por la actividad de mTORC1. En el modelo, esto puede ser llevado a cabo definiendo el parámetro r_0 como una función periódica. Específicamente, se hizo la suposición de que r_0 cambia cada periodo de acuerdo con la siguiente expresión:

$$r_0 = 10e^{-bt} \quad (8),$$

y cada periodo es completado cuando $r_0 = 1$, de forma que el periodo de las oscilaciones de r_0 se encuentra determinado por el valor de b (Figura 11).

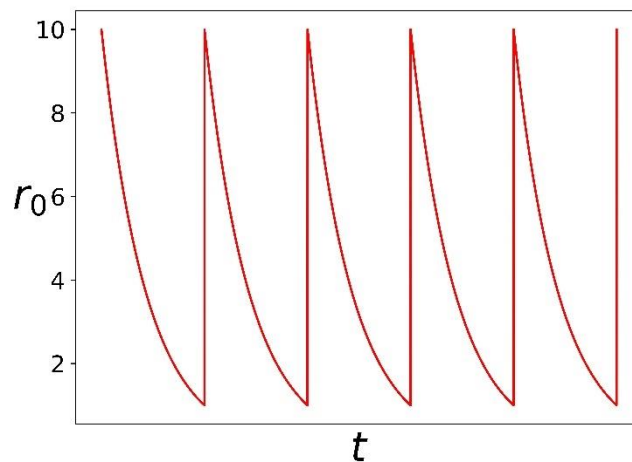


Figura 13. Gráfico de r_0 en función del tiempo. La curva toma la forma de una función exponencial periódica decreciente, oscilando en el rango $1 < r_0 < 10$.

A continuación, se examinó la capacidad del reloj circadiano de sincronizarse con las oscilaciones de r_0 a diferentes periodos, para diversos valores de r_1 y r_2 . Para realizar esto, se determinó el periodo natural de oscilación del sistema ($a = 10, c = 10, n = 10, k_a = 0.5, k_b = 0.02$) con un valor constante de $r_0 = 1$. Después, se realizaron simulaciones donde r_0 tiene un comportamiento periódico de acuerdo con la ecuación 8, donde los periodos analizados se definen como porcentajes del

periodo natural de oscilación del sistema obtenido anteriormente. En la figura 12 se observan algunos ejemplos de la dinámica temporal de este tipo de simulaciones.

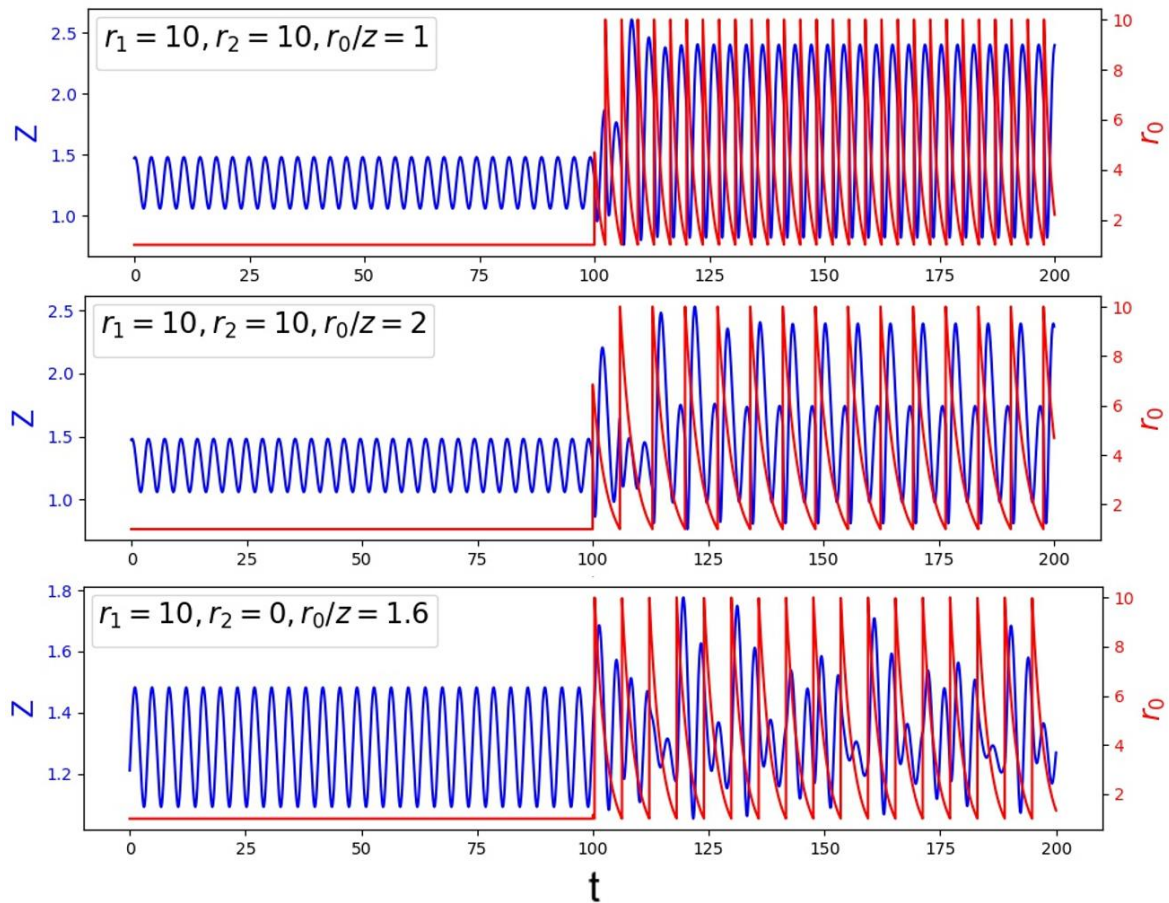


Figura 14. Dinámica temporal de Z (curva azul) y r_0 (curva roja). Las ecuaciones 5a-5e se resolvieron para cada combinación de parámetros r_1 y r_2 , con un valor constante de $r_0 = 1$ hasta $t=100$, con el fin de obtener el periodo natural de oscilación del sistema. Después de eso, se dejó oscilar a r_0 de acuerdo con la ecuación 8 y con un periodo correspondiente a una fracción del periodo natural del sistema. En las figuras, la razón entre el periodo de r_0 y z se muestra como el valor r_0/z .

Un análisis rápido del comportamiento dinámico del sistema para diferentes combinaciones de valores de r_1 y r_2 ante diferentes periodos de estimulación, arrojó dos observaciones importantes:

-La amplitud de las oscilaciones de Z parece incrementarse considerablemente con un estímulo periódico, en comparación con el escenario donde r_0 es constante.

-Diferentes combinaciones de r_1, r_2 y periodos de r_0 , generan modos de sincronización distintos, y en algunos escenarios existe pérdida de sincronización.

A continuación, se aborda con más detalle cada una de estas observaciones.

8.5. *La estimulación periódica de la vía de mTORC1 es capaz de incrementar la amplitud de las oscilaciones circadianas*

La figura 13 muestra algunas gráficas representativas en las que se observa la amplitud de las oscilaciones a diferentes valores de periodo de estimulación (parámetro r_0). En ellas se puede observar que existe una tendencia de la amplitud a incrementarse alrededor de valores de periodos de estímulo que sean múltiplos del periodo natural de oscilación (esto es, $r_0/z = 1, 2, \text{etc.}$).

Además, es importante notar que las amplitudes alcanzadas en estas regiones son considerablemente mayores a las que pueden alcanzarse en condiciones donde r_0 es constante.

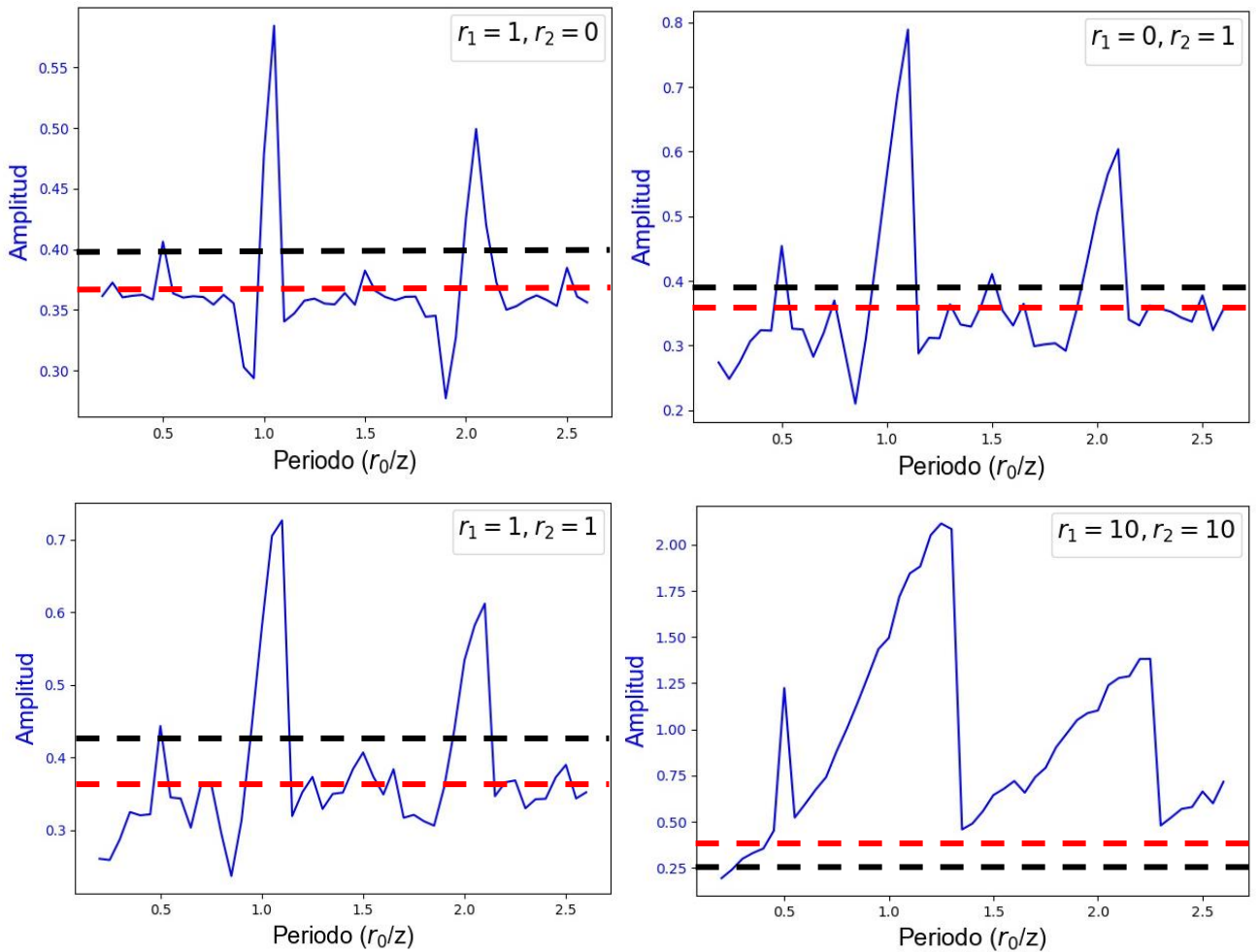


Figura 15. Cambios en la amplitud en función del periodo de estimulación. La amplitud de las oscilaciones de Z se determinó para cada valor del periodo de r_0 . Las líneas punteadas representan el valor de la amplitud del sistema con un valor constante de $r_0 = 1$ (rojo) o $r_0 = 10$ (negro).

8.6. El control de mTORC1 sobre la localización nuclear de Bmal1 facilita la sincronización por nutrientes del reloj circadiano

Para estudiar la habilidad de mTORC1 de sincronizar al reloj circadiano bajo distintos periodos de estimulación por nutrientes, se realizaron simulaciones con diferentes valores del periodo de r_0 , así como distintas combinaciones de r_1 y r_2 . Se encontró que el estímulo de nutrientes, representado por el parámetro r_0 , es capaz

de sincronizar el reloj circadiano en ritmos complejos de la forma $m:n$, en los que cuando el estímulo completa m ciclos, el reloj circadiano completa n ciclos. Los resultados de estas simulaciones se resumen en la figura 14.

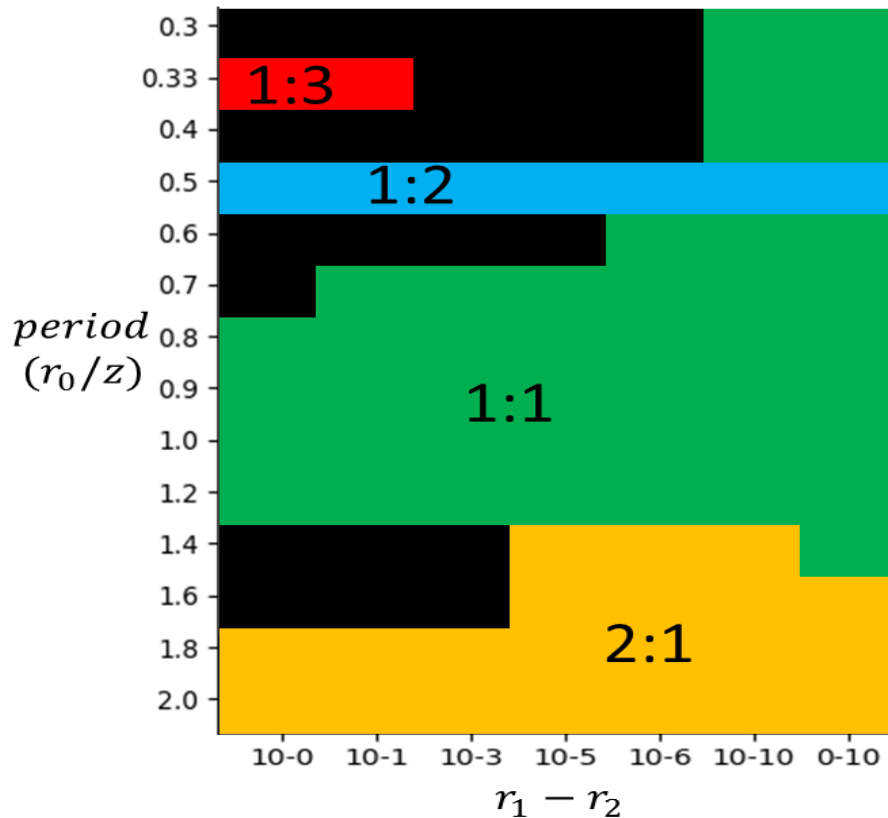


Figura 16. Modos complejos de sincronización en la forma $m:n$ (m ciclos del estímulo por cada n ciclos del reloj circadiano) en función del periodo de r_0 (normalizado al periodo natural de oscilación del ritmo circadiano), así como de combinaciones de valores de r_1 y r_2 . Los modos de sincronización encontrados se identifican con distintos colores, y las regiones negras denotan ausencia de sincronización.

Nótese que a mayores valores del parámetro r_2 , el rango de periodos en los que es posible obtener una sincronización del sistema es más grande. Este resultado resulta contraintuitivo, dado que previamente se mostró que el comportamiento oscilatorio del sistema se ve comprometido al incrementar el valor de este parámetro. Sin embargo, el fenómeno puede ser explicado por el hecho de que los

osciladores amortiguados tienen un mayor rango de sincronización ante estímulos externos periódicos (Gu et al., 2016; Hasegawa and Arita, 2013).

Los resultados de las secciones 8.4, 8.5 y 8.6 predicen el comportamiento de las oscilaciones circadianas en el contexto de una variación periódica en la actividad de la vía de mTORC1. Tales resultados mostraron características dinámicas interesantes: el incremento drástico en la amplitud de las oscilaciones circadianas ante frecuencias de estimulación específicas y la presencia de modos complejos de sincronización en función de dichas frecuencias. En especial, es importante destacar que la aparición de los diferentes modos de sincronización depende de la intensidad con la que mTORC1 es capaz de controlar la dinámica de Bmal1 a través de los dos niveles de regulación descritos anteriormente (Dang et al., 2016; Lipton et al., 2017). Hasta el momento, no existen estudios experimentales ni teóricos que hayan explorado la dinámica de las oscilaciones circadianas ante cambios periódicos de la activación de mTORC1.

La capacidad de la vía de mTORC1 de generar diferentes modos de sincronización entre los patrones de alimentación y las oscilaciones circadianas, podría tener repercusiones en la salud. La disrupción del ritmo circadiano ha sido asociada con enfermedades cardiovasculares, diabetes, cáncer, obesidad, displasia y desórdenes del sueño (Xie et al., 2019). Además, se ha visto que el control sobre la disponibilidad de nutrientes durante el día es capaz de modificar tanto la síntesis y liberación de hormonas como la insulina, así como el metabolismo de grasas y carbohidratos (Ribas-Latre and Eckel-Mahan, 2016). Por lo tanto, es probable que los diferentes modos de sincronización encontrados tengan efectos diferentes en el control de estos procesos.

9. Conclusiones

En este proyecto de tesis se desarrolló un modelo mínimo de la interacción entre el reloj circadiano y la vía de regulación de mTORC1 a nivel celular.

El modelo sugiere que el control que mTORC1 ejerce sobre la traducción y la localización nuclear de Bmal1 es suficiente para explicar los cambios observados

experimentalmente en el periodo y la amplitud del ritmo circadiano. De acuerdo con el modelo, mTORC1 controla el periodo y la amplitud mediante dos mecanismos separados: mientras la regulación de la traducción de Bmal1 afecta la amplitud de las oscilaciones, el periodo correspondiente es afectado por la regulación de la localización nuclear. Dado que el control de la localización de Bmal1 es acompañado de una reducción drástica en la robustez de las oscilaciones ante cambios en los parámetros r_0 y a , ilustrada por la disminución en el área en la que se obtienen oscilaciones sostenidas en el plano r_0 vs a , la regulación de la traducción de Bmal1 podría ser importante para balancear este efecto y asegurar que mTORC1 sea capaz de controlar tanto el periodo como la amplitud de las oscilaciones de Bmal1, sin comprometer la estabilidad del comportamiento oscilatorio, en condiciones de actividad constante de mTORC1.

Por otra parte, cuando las células se encuentran sujetas a activación periódica de la vía de mTORC1 debida a disponibilidad periódica de nutrientes, la amplitud en las oscilaciones circadianas puede alcanzar niveles mucho mayores que aquellos observados en condiciones de activación constante, lo cual es relevante pues a mayores niveles de amplitud en las oscilaciones, las diferencias en el comportamiento celular en cada fase del ciclo se ven incrementadas. Además, en este escenario, el control de mTORC1 sobre la localización nuclear de Bmal1 puede ser relevante para incrementar el rango de sincronización del reloj circadiano con respecto a la estimulación por nutrientes.

10. Referencias

Avni, D., Biberman, Y., Meyuhas, O., 1996. The 5' Terminal Oligopyrimidine Tract Confers Translational Control on Top Mrnas in a Cell Type-and Sequence Context-Dependent Manner. *Nucleic Acids Res.*

<https://doi.org/10.1093/nar/25.5.995>

Buerger, C., DeVries, B., Stambolic, V., 2006. Localization of Rheb to the endomembrane is critical for its signaling function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*

<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.03.220>

- Buhr, E., Takahashi, J., Ko, C.H., 2006. Molecular components of the mammalian circadian clock. *Hum. Mol. Genet.* <https://doi.org/10.1093/hmg/ddl207>
- Buhr, E.D., Takahashi, J.S., 2013. Molecular components of the mammalian circadian clock. *Handb. Exp. Pharmacol.* <https://doi.org/10.1007/978-3-642-25950-0-1>
- Cao, R., Robinson, B., Xu, H., Gkogkas, C., Khoutorsky, A., Alain, T., Yanagiya, A., Nevarko, T., Liu, A.C., Amir, S., Sonenberg, N., 2013. Translational control of entrainment and synchrony of the suprachiasmatic circadian clock by mTOR/4E-BP1 signaling. *Neuron.* <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.06.026>
- Choo, A.Y., Yoon, S.-O., Kim, S.G., Roux, P.P., Blenis, J., 2008. Rapamycin differentially inhibits S6Ks and 4E-BP1 to mediate cell-type-specific repression of mRNA translation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* <https://doi.org/10.1073/pnas.0809136105>
- Clairambault, J., Michel, P., Perthame, B., 2007. A mathematical model of the cell cycle and its circadian control, in: *Modeling and Simulation in Science, Engineering and Technology.* https://doi.org/10.1007/978-0-8176-4558-8_21
- Dang, F., Sun, X., Ma, X., Wu, R., Zhang, D., Chen, Y., Xu, Q., Wu, Y., Liu, Y., 2016. Insulin post-transcriptionally modulates Bmal1 protein to affect the hepatic circadian clock. *Nat. Commun.* <https://doi.org/10.1038/ncomms12696>
- Demetriades, C., Doumpas, N., Teleman, A.A., 2014. Regulation of TORC1 in response to amino acid starvation via lysosomal recruitment of TSC2. *Cell.* <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.01.024>
- Demetriades, C., Plescher, M., Teleman, A.A., 2016. Lysosomal recruitment of TSC2 is a universal response to cellular stress. *Nat. Commun.* <https://doi.org/10.1038/ncomms10662>
- Duffield, G.E., 2003. DNA microarray analyses of circadian timing: The genomic

basis of biological time. *J. Neuroendocrinol.* <https://doi.org/10.1046/j.1365-2826.2003.01082.x>

- Efeyan, A., Zoncu, R., Sabatini, D.M., 2012. Amino acids and mTORC1: From lysosomes to disease. *Trends Mol. Med.* <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2012.05.007>
- Gérard, C., Goldbeter, A., 2012. Entrainment of the mammalian cell cycle by the circadian clock: Modeling two coupled cellular rhythms. *PLoS Comput. Biol.* <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002516>
- Gingras, A.C., Raught, B., Sonenberg, N., 2001. Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR. *Genes Dev.* <https://doi.org/10.1101/gad.887201>
- Gonze, D., 2011. Modeling circadian clocks: Roles, advantages, and limitations. *Cent. Eur. J. Biol.* <https://doi.org/10.2478/s11535-011-0062-4>
- Goodwin, B.C., 1965. Oscillatory behavior in enzymatic control processes. *Adv. Enzyme Regul.* [https://doi.org/10.1016/0065-2571\(65\)90067-1](https://doi.org/10.1016/0065-2571(65)90067-1)
- Gu, C., Tang, M., Rohling, J.H.T., Yang, H., 2016. The effects of non-self-sustained oscillators on the en-trainment ability of the suprachiasmatic nucleus. *Sci. Rep.* <https://doi.org/10.1038/srep37661>
- Hara, K., Yonezawa, K., Weng, Q.P., Kozlowski, M.T., Belham, C., Avruch, J., 1998. Amino acid sufficiency and mTOR regulate p70 S6 kinase and eIF-4E BP1 through a common effector mechanism. *J. Biol. Chem.* <https://doi.org/10.1074/jbc.273.23.14484>
- Hasegawa, Y., Arita, M., 2013. Enhanced entrainability of genetic oscillators by period mismatch. *J. R. Soc. Interface.* <https://doi.org/10.1098/rsif.2012.1020>
- Hoxhaj, G., Caddy, E., Najafov, A., Houde, V.P., Johnson, C., Dissanayake, K., Toth, R., Campbell, D.G., Prescott, A.R., MacKintosh, C., 2016. The E3 ubiquitin ligase ZNRF2 is a substrate of mTORC1 and regulates its activation by amino acids. *Elife.* <https://doi.org/10.7554/elife.12278>

- Inoki, K., Li, Y., Xu, T., Guan, K.L., 2003. Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. *Genes Dev.*
<https://doi.org/10.1101/gad.1110003>
- Jefferies, H.B.J., Fumagalli, S., Dennis, P.B., Reinhard, C., Pearson, R.B., Thomas, G., 1997. Rapamycin suppresses 5'TOP mRNA translation through inhibition of p70(s6k). *EMBO J.* <https://doi.org/10.1093/emboj/16.12.3693>
- Jin, G., Lee, S.W., Zhang, X., Cai, Z., Gao, Y., Chou, P.C., Rezaeian, A.H., Han, F., Wang, C.Y., Yao, J.C., Gong, Z., Chan, C.H., Huang, C.Y., Tsai, F.J., Tsai, C.H., Tu, S.H., Wu, C.H., Sarbassov, D.D., Ho, Y.S., Lin, H.K., 2015. Skp2-Mediated RagA Ubiquitination Elicits a Negative Feedback to Prevent Amino-Acid-Dependent mTORC1 Hyperactivation by Recruiting GATOR1. *Mol. Cell.*
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.05.010>
- Klipp, E., Liebermeister, W., 2006. Mathematical modeling of intracellular signaling pathways. *BMC Neurosci.* <https://doi.org/10.1186/1471-2202-7-S1-S10>
- Lipton, J.O., Boyle, L.M., Yuan, E.D., Hochstrasser, K.J., Chifamba, F.F., Nathan, A., Tsai, P.T., Davis, F., Sahin, M., 2017. Aberrant Proteostasis of BMAL1 Underlies Circadian Abnormalities in a Paradigmatic mTOR-opathy. *Cell Rep.* <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.07.008>
- Manifava, M., Smith, M., Rotondo, S., Walker, S., Niewczas, I., Zoncu, R., Clark, J., Ktistakis, N.T., 2016. Dynamics of mTORC1 activation in response to amino acids. *Elife.* <https://doi.org/10.7554/elife.19960>
- Marcheva, B., Ramsey, K.M., Peek, C.B., Affinati, A., Maury, E., Bass, J., 2013. Circadian clocks and metabolism. *Handb. Exp. Pharmacol.*
<https://doi.org/10.1007/978-3-642-25950-0-6>
- Martino, T.A., Oudit, G.Y., Herzenberg, A.M., Tata, N., Koletar, M.M., Kabir, G.M., Belsham, D.D., Backx, P.H., Ralph, M.R., Sole, M.J., 2008. Circadian rhythm disorganization produces profound cardiovascular and renal disease in hamsters. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.*

- Menon, S., Dibble, C.C., Talbott, G., Hoxhaj, G., Valvezan, A.J., Takahashi, H., Cantley, L.C., Manning, B.D., 2014. Spatial control of the TSC complex integrates insulin and nutrient regulation of mTORC1 at the lysosome. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.11.049>
- Müller, D., Lasfargues, C., El Khawand, S., Alard, A., Schneider, R.J., Bousquet, C., Pyronnet, S., Martineau, Y., 2013. 4E-BP restrains eIF4E phosphorylation. *Translation*. <https://doi.org/10.4161/trla.25819>
- Nagoshi, E., Saini, C., Bauer, C., Laroche, T., Naef, F., Schibler, U., 2004. Circadian gene expression in individual fibroblasts: cell-autonomous and self-sustained oscillators pass time to daughter cells. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.11.015>
- Okazaki, H., Matsunaga, N., Fujioka, T., Okazaki, F., Akagawa, Y., Tsurudome, Y., Ono, M., Kuwano, M., Koyanagi, S., Ohdo, S., 2014. Circadian regulation of mTOR by the ubiquitin pathway in renal cell carcinoma. *Cancer Res*. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-3241>
- Oosterman, J.E., Kalsbeek, A., la Fleur, S.E., Belsham, D.D., 2014. Impact of nutrients on circadian rhythmicity. *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol*. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00322.2014>
- Podkolodnaya, O.A., Tverdokhle, N.N., Podkolodnyy, N.L., 2017. Computational modeling of the cell-autonomous mammalian circadian oscillator. *BMC Syst. Biol*. <https://doi.org/10.1186/s12918-016-0379-8>
- Pulimeno, P., Mannic, T., Sage, D., Giovannoni, L., Salmon, P., Lemeille, S., Giry-Laterriere, M., Unser, M., Bosco, D., Bauer, C., Morf, J., Halban, P., Philippe, J., Dibner, C., 2013. Autonomous and self-sustained circadian oscillators displayed in human islet cells. *Diabetologia*. <https://doi.org/10.1007/s00125-012-2779-7>
- Rabanal-Ruiz, Y., Otten, E.G., Korolchuk, V.I., 2017. mTORC1 as the main gateway to autophagy. *Essays Biochem*.

<https://doi.org/10.1042/EBC20170027>

Ramanathan, C., Kathale, N.D., Liu, D., Lee, C., Freeman, D.A., Hogenesch, J.B., Cao, R., Liu, A.C., 2018. mTOR signaling regulates central and peripheral circadian clock function. *PLoS Genet.*

<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007369>

Ribas-Latre, A., Eckel-Mahan, K., 2016. Interdependence of nutrient metabolism and the circadian clock system: Importance for metabolic health. *Mol. Metab.*

<https://doi.org/10.1016/j.molmet.2015.12.006>

Ruoff, P., Mohsenzadeh, S., Rensing, L., 1996. Circadian rhythms and protein turnover: The effect of temperature on the period lengths of clock mutants simulated by the Goodwin oscillator. *Naturwissenschaften.*

<https://doi.org/10.1007/BF01141953>

Ruoff, P., Vinsjevik, M., Monnerjahn, C., Rensing, L., 1999. The Goodwin oscillator: On the importance of degradation reactions in the circadian clock, in: *Journal of Biological Rhythms.*

<https://doi.org/10.1177/074873099129001037>

Saini, R., Jaskolski, M., Davis, S.J., 2019. Circadian oscillator proteins across the kingdoms of life: Structural aspects. *BMC Biol.* <https://doi.org/10.1186/s12915-018-0623-3>

Sancak, Y., Bar-Peled, L., Zoncu, R., Markhard, A.L., Nada, S., Sabatini, D.M., 2010. Ragulator-rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids. *Cell.*

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.02.024>

Saxton, R.A., Sabatini, D.M., 2017. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell.* <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.02.004>

Smith, E.M., Finn, S.G., Tee, A.R., Brownei, G.J., Proud, C.G., 2005. The tuberous sclerosis protein TSC2 is not required for the regulation of the mammalian

- target of rapamycin by amino acids and certain cellular stresses. *J. Biol. Chem.* <https://doi.org/10.1074/jbc.M414499200>
- Sulaimanov, N., Klose, M., Busch, H., Boerries, M., 2017. Understanding the mTOR signaling pathway via mathematical modeling. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* <https://doi.org/10.1002/wsbm.1379>
- Tang, S., 2008. A comparison investigation of the simplest models of circadian rhythms. *Int. J. Biomath.* <https://doi.org/10.1142/S1793524508000096>
- Tao, W., Wu, J., Zhang, Q., Lai, S.S., Jiang, S., Jiang, C., Xu, Y., Xue, B., Du, J., Li, C.J., 2015. EGR1 regulates hepatic clock gene amplitude by activating Per1 transcription. *Sci. Rep.* <https://doi.org/10.1038/srep15212>
- Thurley, K., Herbst, C., Wesener, F., Koller, B., Wallach, T., Maier, B., Kramer, A., Westermark, P.O., 2017. Principles for circadian orchestration of metabolic pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci.* <https://doi.org/10.1073/pnas.1613103114>
- Woller, A., Duez, H., Staels, B., Lefranc, M., 2016. A Mathematical Model of the Liver Circadian Clock Linking Feeding and Fasting Cycles to Clock Function. *Cell Rep.* <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.09.060>
- Woller, A., Gonze, D., Erneux, T., 2014. The Goodwin model revisited: Hopf bifurcation, limit-cycle, and periodic entrainment. *Phys. Biol.* <https://doi.org/10.1088/1478-3975/11/4/045002>
- Xie, Y., Tang, Q., Chen, G., Xie, M., Yu, S., Zhao, J., Chen, L., 2019. New insights into the circadian rhythm and its related diseases. *Front. Physiol.* <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00682>
- Zhang, R., Lahens, N.F., Ballance, H.I., Hughes, M.E., Hogenesch, J.B., 2014. A circadian gene expression atlas in mammals: Implications for biology and medicine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* <https://doi.org/10.1073/pnas.1408886111>