



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PERUGIA
Dipartimento di Matematica e Informatica



CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN MATEMATICA

Tesi di Laurea

Un modello stocastico per lo studio del quorum sensing nel batterio *Burkholderia thailandensis*

Laureando
Michele Pantalla

Relatore
Prof.ssa Francesca Di Patti

Correlatore
Prof. Marco Fondi

Anno Accademico 2021 / 2022

*Ai miei nonni, ai miei genitori, a mio fratello
e a tutti i miei amici,
grazie ai quali tutto ciò è stato reso possibile.*

Indice

Prefazione	ii
1 La comunicazione tra batteri	1
1.1 Quorum Sensing	1
1.2 Quorum Sensing nella <i>Burkholderia thailandensis</i>	3
1.3 Il ruolo del rumore nell'espressione genica	12
2 I processi stocastici	15
2.1 Equazione di Chapman-Kolmogorov	15
2.2 Master equation	16
2.3 Algoritmo di Gillespie	18
3 Il modello stocastico del quorum sensing nella <i>B. thailandensis</i>	22
3.1 Le equazioni biochimiche del quorum sensing	22
3.2 Dalle probabilità di transizione alla master equation	29
3.3 Il sistema deterministico	32
3.3.1 Fit dei dati sperimentali	38
3.4 Derivazione dell'equazione di Fokker-Planck	44
4 Il ruolo delle fluttuazioni	52
4.1 Equazioni per i momenti secondi	52
4.2 Analisi del coefficiente di variazione	56
Conclusioni	61
Bibliografia	63

Prefazione

In questa tesi ci proponiamo di studiare il ruolo del rumore nel quorum sensing del batterio *Burkholderia thailandensis*, ossia le fluttuazioni stocastiche che caratterizzano questo meccanismo di comunicazione tra le cellule batteriche in cui, al variare della concentrazione di determinate molecole segnale rilasciate nell'ambiente extracellulare, si verifica una risposta coordinata attraverso la regolazione dell'espressione genica.

La tesi è organizzata in 4 capitoli. Nel capitolo 1 viene introdotto il modello biologico dei tre circuiti di segnalazione che costituiscono il quorum sensing di questo batterio, partendo da un riepilogo delle scoperte che hanno portato alla caratterizzazione biologica del quorum sensing come fenomeno comune nel mondo dei batteri e procedendo alla descrizione di tale complesso meccanismo nella *Burkholderia thailandensis*. Vengono evidenziate le principali interazioni tra le molecole dei tre circuiti, soffermandosi in particolare sulla loro attivazione sequenziale e sulla necessità di raggiungere una certa concentrazione soglia al fine di innescare la variazione dell'espressione genica mediata dalle proteine regolatrici, attivate dal legame con le molecole segnale.

Nel capitolo 2 sono riportati alcuni concetti fondamentali della teoria dei processi stocastici, che condurranno ad una formulazione probabilistica del modello biologico in esame. È importante sottolineare come la stocasticità sia, in questo caso, endogena al sistema: l'incontro tra singoli individui di specie distinte è casuale ed influenzato dalla concentrazione puntuale delle stesse. Dal punto di vista formale, l'evoluzione della probabilità di osservare il sistema in una data configurazione ad un tempo assegnato è governata dall'equazione maestra (la master equation), che è stata ricavata a partire dall'equazione di Chapman-Kolmogorov. Lo studio di tale equazione richiede l'utilizzo di raffinate tecniche d'indagine numerica, in quanto l'approccio stocastico standard, che si focalizza sulla master equation, risulta essere, in molti casi, intrattabile analiticamente. Per questo motivo, per simulare il sistema stocastico descritto, verrà utilizzato l'algoritmo di Gillespie, che consente di produrre traiettorie dinamiche stocastiche in accordo con l'equazione maestra. La formulazione di tale algoritmo è spiegata nel dettaglio nell'ultima sezione del capitolo.

I capitoli 3 e 4 costituiscono la parte originale della tesi. In particolare, nel capitolo 3, introduciamo il modello stocastico per la *Burkholderia thailandensis* partendo dalla modellizzazione delle reazioni biochimiche tra le componenti dei tre sistemi quorum sensing del batterio; si passa poi ad individuare i relativi rate di transizione da cui si ricava la master

equation. Per procedere con lo studio teorico vengono utilizzate tecniche perturbative che permettono di ricavare il sistema deterministico o di campo medio, al primo ordine perturbativo, e l'equazione di Fokker-Planck, all'ordine successivo. Tramite il sistema deterministico si procede con il fit dei dati sperimentali presentati nel primo capitolo, al fine di ottenere una stima dei parametri del modello che non sono noti in letteratura. L'equazione di Fokker-Planck risulta utile, invece, per studiare le fluttuazioni attorno all'equilibrio deterministico. A partire da questa, nel capitolo 4, si ricava l'equazione per i momenti secondi delle fluttuazioni, tramite la quale si può calcolare il coefficiente di variazione teorico e confrontarlo con quello ottenuto dalle simulazioni numeriche di Gillespie, al variare di alcuni parametri del modello.

Capitolo 1

La comunicazione tra batteri

In questo capitolo ci occuperemo della descrizione di una modalità di comunicazione tra batteri, il quorum sensing (QS). In particolare verranno esaminati nel dettaglio i circuiti QS della specie *Burkholderia thailandensis*, al fine di evidenziare le interazioni principali esistenti tra le loro componenti molecolari, fornendo le basi biologiche per la successiva trattazione matematica. Seguirà una breve presentazione dell'importante ruolo che le fluttuazioni stocastiche hanno nei processi biologici come, ad esempio, l'espressione genica.

1.1 Quorum Sensing

I batteri comunicano tra loro e con tutte le altre cellule dell'ambiente circostante in modo che il loro comportamento possa risultare coordinato come fossero un gruppo di cellule di un organismo multicellulare.

Fino agli anni '60/'70 si pensava che i batteri non comunicassero affatto, finché fu scoperto quello che oggi viene definito **quorum sensing** [1], un meccanismo di comunicazione cellula-cellula tramite il quale essi sono in grado di rilevare il numero di individui che li circonda, in base all'accumulo di determinate molecole segnale da loro rilasciate nell'ambiente.

Al 1965 risale la prima scoperta del fenomeno della comunicazione intercellulare da parte di Tomasz [1], il quale, studiando lo *Streptococcus pneumoniae*, osservò che un fattore extracellulare prodotto dal batterio stesso gli permetteva di acquisire lo stato competente, ossia quella condizione fisiologica in cui i batteri hanno la capacità di scambiarsi molecole di DNA in un processo chiamato trasformazione genetica. In seguito, nel 1970, Hastings [1] studiò due specie di batteri marini bioluminescenti *Vibrio fischeri* e *Vibrio harveyi*, in grado di produrre luce in condizioni di elevata densità cellulare ma non in sospensioni diluite; inoltre osservò che era possibile stimolare la produzione di luce aggiungendo fluidi esogeni che, come sarebbe stato scoperto in seguito, contenevano una molecola segnale detta autoinduttore. La combinazione delle scoperte di Tomasz e Hastings suggeriva che alcuni batteri si scambiano segnali chimici per misurare la propria densità di popolazione e per controllare il proprio comportamento in risposta a variazioni della stessa. Per quasi 20 anni questo fenomeno del-

la segnalazione intercellulare venne considerato come un'anomalia ristretta a pochi batteri specializzati, ma oggi è chiaro che questa comunicazione rappresenta la normalità nel mondo dei batteri [1].

Il meccanismo del QS è un fenomeno complesso che può verificarsi in diversi modi. Alla crescita di una data popolazione batterica, ad esempio, può corrispondere un aumento proporzionale della concentrazione extracellulare della molecola segnale, rappresentata in figura 1.1a dalle sfere verdi. Solo quando viene raggiunta una certa concentrazione soglia (un quorum), il gruppo rileva il segnale e risponde con un'alterazione dell'espressione genica estesa a tutta la popolazione. Con i vari esempi di molecole segnale si potrebbe comporre un vocabolario chimico in cui ogni molecola veicola un messaggio che si traduce in una espressione genica ben definita da parte dei singoli individui. Esempi di processi vitali per i batteri controllati dal quorum sensing sono la secrezione di fattori di virulenza, la formazione di biofilm e la sporulazione, oltre alla competenza e alla bioluminescenza appena citate. Queste molecole segnale si possono ricondurre a due principali classi: le AHL (Acyl homoserine lactone), osservate nel batterio *Vibrio fischeri*, e i peptidi, presenti ad esempio nel *Bacillus subtilis*; tuttavia nuove famiglie di molecole sono state scoperte, ad esempio quelle denominate autoinduttori 2 (AI-2), che potrebbero rappresentare un linguaggio universalmente riconosciuto dalle specie batteriche. Queste molecole controllano una varietà di caratteristiche, dalla bioluminescenza alla virulenza, dalla crescita alla patogenicità.

Oltre che con il quorum sensing classico i batteri possono comunicare tramite messaggi misti contenenti il segnale per reclutare batteri della stessa specie unitamente all'antibiotico per uccidere batteri estranei, come osservato nello *Pseudomonas aeruginosa*. Questa modalità di comunicazione si definisce *Pseudomonas* Quinolone Signal (PQS), dal nome della particolare struttura chimica (chinolonica) di questa molecola segnale, dotata di proprietà antibiotiche, utile al batterio per eliminare gli antagonisti. Nella figura 1.1b viene mostrato l'invio di questo messaggio misto tramite l'utilizzo di vescicole che permettono a tali molecole idrofobiche di transitare verso altri batteri, attraverso un ambiente acquoso. Recentemente è stato scoperto che alcuni meccanismi chiamati quorum quenching spengono il segnale dovuto al quorum sensing. Si tratta di strategie che i batteri impiegano per eliminare la competizione di altre specie. Nella figura 1.1c vediamo due esempi di spegnimento di quenching: la produzione di antagonisti, molecole con strutture simili agli autoinduttori e quindi in grado di legarli, inattivandoli, e la produzione di enzimi in grado di degradarli. Nuove evidenze suggeriscono che i batteri rilevano anche la presenza delle cellule eucariote, come nel caso dell'*Enterococcus faecalis*, un patogeno opportunistico coinvolto ad esempio nell'infezione del tratto urinario. La patogenesi dipende da una citolisina formata da due subunità, di cui la minore agisce come un autoinduttore controllando la presenza nell'ambiente di altre cellule di Enterococco, mentre la maggiore monitora la vicinanza di cellule eucariote. In assenza di eucarioti le due subunità formano un complesso inattivo e la loro produzione è mantenuta a un livello basale; in caso contrario la subunità grande si lega alla superficie delle cellule

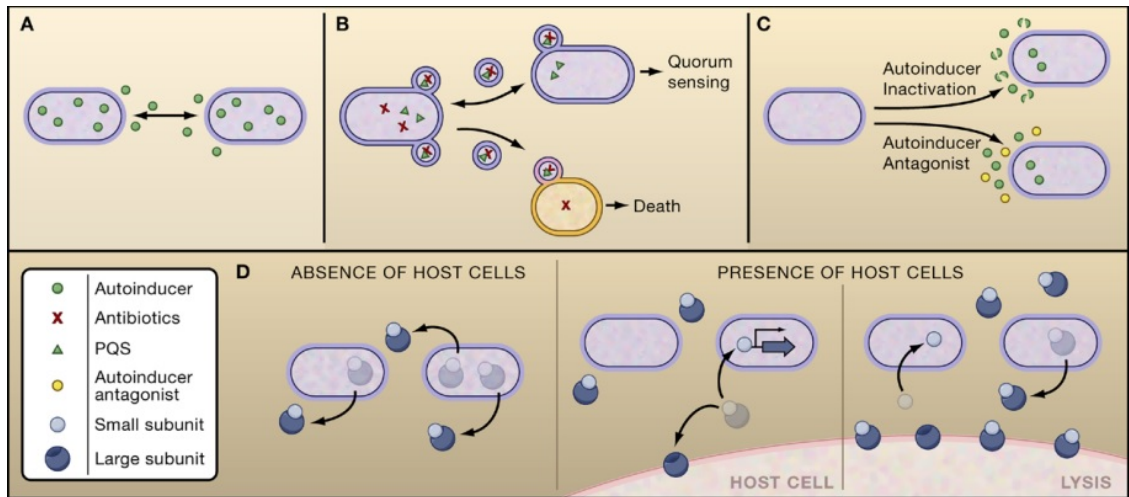


Figura 1.1: quadro delle modalità di comunicazione tra batteri. Figura presa da [1].

eucariote lasciando la subunità piccola libera di indurre alti livelli di produzione di entrambe le unità, che insieme si legano alle cellule bersaglio causandone la lisi, come si vede in figura 1.1d.

Rispetto a quanto osservato da Tomasz e Hastings, lo studio della comunicazione intercellulare dei batteri ha portato alla consapevolezza della enorme complessità dell'ambiente chimico extracellulare a cui le cellule devono rispondere al fine di cogliere tutte le informazioni necessarie alla loro sopravvivenza: il numero dei membri del gruppo e il loro livello di crescita, il numero dei vicini o l'eventuale presenza di eucarioti, sia innocui che nocivi. Tuttavia la nostra comprensione del lessico dei batteri è ancora primitiva e la ricerca futura si focalizzerà sull'identificazione di sempre nuove molecole segnale anche in relazione agli innumerevoli batteri ancora ignoti, avvalendosi soprattutto di approcci innovativi come la metagenomica: la clonazione diretta di DNA proveniente da vari ambienti in ospiti surrogati per la produzione di tali molecole in quantitativi sufficienti alla loro identificazione.

1.2 Quorum Sensing nella *Burkholderia thailandensis*

Un esempio di batterio in cui è stato approfondito lo studio del quorum sensing è la *Burkholderia thailandensis*, che è considerata la versione avirulenta dei patogeni umani *Burkholderia pseudomallei* e *Burkholderia mallei*, responsabili, rispettivamente, della melioidosi e della morva; a causa della loro pericolosità, la prima viene comunemente usata come modello surrogato per il loro studio, anche perchè la loro manipolazione richiederebbe laboratori con standard di sicurezza elevati.

Hastings aveva caratterizzato per la prima volta un sistema QS del tipo LuxI/LuxR nel batterio marino bioluminescente *Vibrio fischeri* [2], in cui LuxI è l'enzima (sintasi) responsabile della sintesi di molecole segnale AHL che si accumulano nell'ambiente durante la crescita batterica. Queste AHL attivano i regolatori trascrizionali LuxR che modulano l'espressione

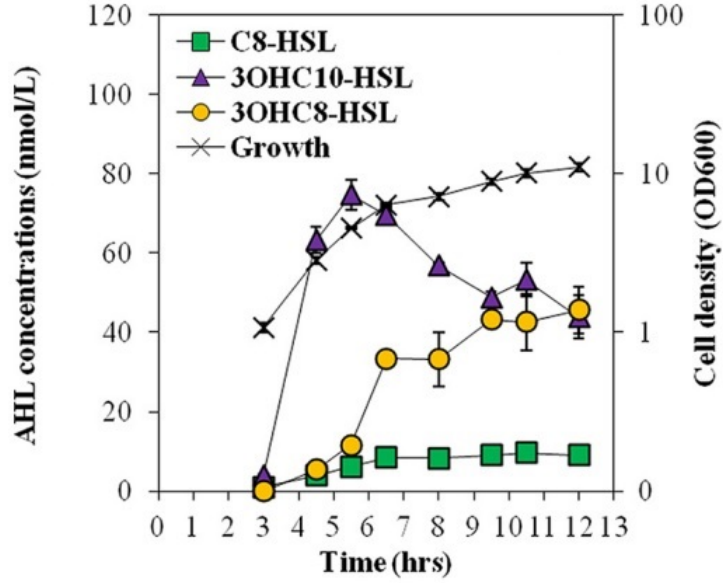


Figura 1.2: profilo di produzione delle AHL al variare del numero dei batteri (curva contrassegnata dalle X). L'immagine sottolinea l'attivazione sequenziale dei 3 sistemi: prima QS-2, poi QS-3 ed infine QS-1. Figura presa da [3].

dei loro geni target, generalmente collocati in stretta vicinanza tra loro: *luxI* che codifica per la sintasi LuxI e *luxR* che codifica per il regolatore LuxR, risultando in un tipico circuito autoinduttore di AHL.

Nello specifico, il batterio *Burkholderia thailandensis* possiede tre sistemi quorum sensing omologhi al tipo LuxI/LuxR [3, 10]: BtaI1/BtaR1 (QS-1), BtaI2/BtaR2 (QS-2) e BtaI3/BtaR3 (QS-3). Il funzionamento di questi tre è del tutto analogo al circuito appena descritto e include tre AHL primarie: l'enzima BtaI1 catalizza la sintesi di C₈-HSL, BtaI2 quella di 3OHC₁₀-HSL e 3OHC₈-HSL, infine BtaI3 quella di 3OHC₈-HSL. Per snellire la nomenclatura, d'ora in poi ci riferiremo a C₈-HSL, 3OHC₁₀-HSL e 3OHC₈-HSL con, rispettivamente, C8, HC10 e HC8.

In figura 1.2 sono mostrati i profili di produzione delle tre molecole segnale in vari istanti temporali della crescita batterica [3]. Si nota che i tre sistemi QS sono attivati in modo consequenziale: la HC10 raggiunge rapidamente il picco della sua concentrazione, per poi decrescere durante la fase stazionaria della crescita batterica, pur rimanendo superiore alle altre ad ogni istante; la HC8 cresce più lentamente fino a raggiungere una concentrazione simile alla prima in fase stazionaria; infine la C8 comincia ad accumularsi in ritardo rispetto alle altre due, rimanendo poi stabile a concentrazioni molto minori.

Al fine di verificare se i tre circuiti QS interagiscano tra loro per modulare la biosintesi di AHL, sono state studiate le cinetiche di produzione delle AHL durante la crescita di colture di mutanti $\Delta btaR1$, $\Delta btaR2$ e $\Delta btaR3$ (batteri dal cui codice genetico sono stati rimossi i geni *btaR1*, *btaR2* e *btaR3*, rispettivamente) in comparazione con il ceppo wild-type di *B.thailandensis*.

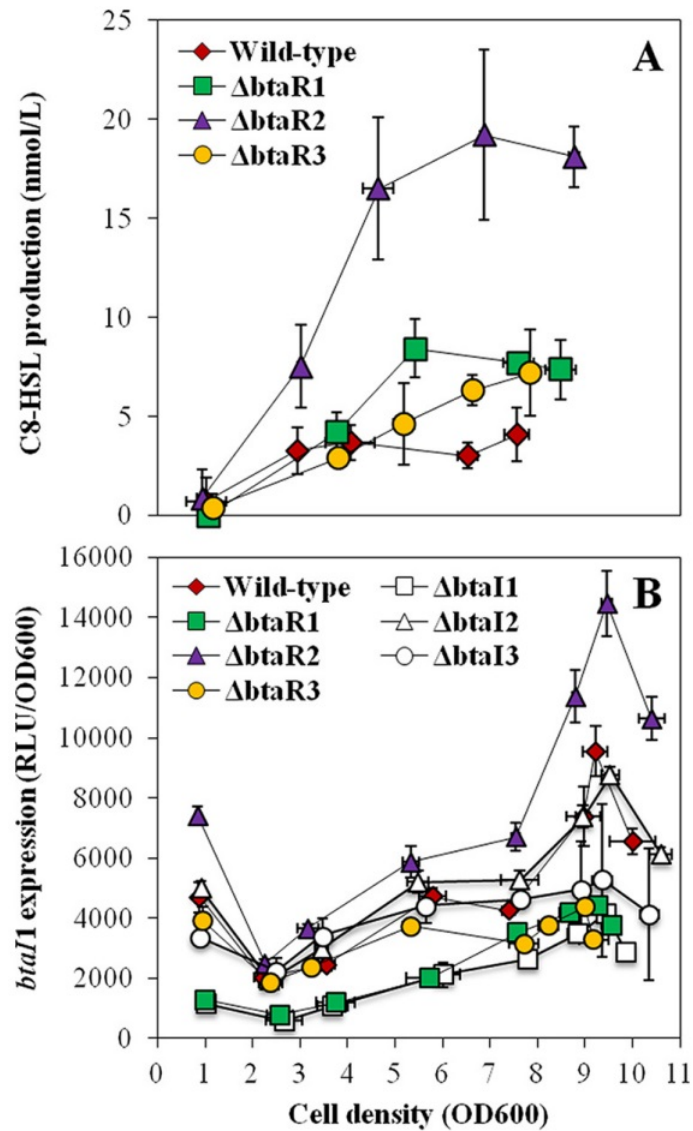


Figura 1.3: effetto dei regolatori BtaR sulla produzione di C8 e sull'espressione di *btaI1*. Figura presa da [3].

Dalla figura 1.3a, relativa alla molecola segnale C8, emerge che i tre geni analizzati reprimono la produzione della AHL, infatti si nota una sua sovrapproduzione rispetto al ceppo naturale in tutti e tre i mutanti. E' sorprendente soprattutto osservare che questo si verifica anche nel mutante privo del gene *btaR1*, che è considerato il principale regolatore dell'espressione di *btaI1*, responsabile della biosintesi di C8.

Dal profilo di espressione del gene *btaI1*, in figura 1.3b, risulta che solamente nel mutante $\Delta btaR2$ l'espressione aumenta rispetto al ceppo wild-type, suggerendo che solo *btaR2* reprime in modo diretto la produzione di C8. Invece negli altri due casi la produzione dell'enzima risulta diminuita a fronte di una sovrapproduzione di C8, quindi la biosintesi di C8 è indirettamente dipendente sia da *btaR1* che da *btaR3*.

Per quanto riguarda invece la biosintesi di HC10 la figura 1.4 rivela una regolazione negativa da parte dei geni *btaR1* e *btaR3*, che risulta essere indiretta in quanto l'espressione

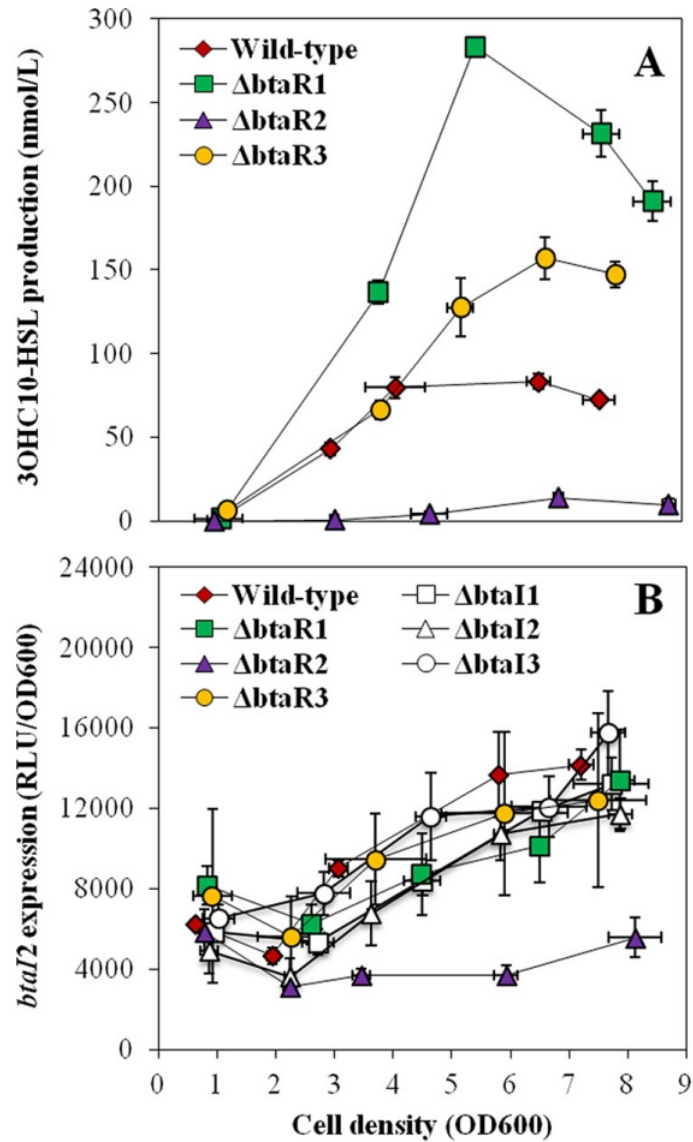


Figura 1.4: effetto dei regolatori BtaR sulla produzione di HC10 e sull'espressione di *btaI2*. Figura presa da [3].

di *btaI2* risulta diminuita nei mutanti $\Delta btaR1$ e $\Delta btaR3$. Tuttavia l'effetto repressore dovuto a *btaR3* avviene soltanto nella fase stazionaria della crescita batterica. D'altra parte nel mutante $\Delta btaR2$ si osserva che sia la produzione di HC10 che la trascrizione di *btaI2* sono quasi completamente sopresse, confermando che *btaR2* è il loro principale attivatore.

Infine la biosintesi della HC8 e l'espressione della relativa sintasi *btaI3* sono influenzate da *btaR1* e *btaR2* come osserviamo in figura 1.5: anche qui l'effetto è repressivo in modo indiretto, non essendoci alcun impatto positivo sulla trascrizione di *btaI3* nei mutanti privi dei due geni. Viene confermato inoltre il ruolo di *btaR3* come regolatore del sistema QS-3.

L'impatto delle AHL sulla trascrizione dei 3 geni *btaI* è stato stimato monitorando l'attività dei rispettivi promotori fusi con il gene codificante la luciferasi (*btaI-lux*), rispettivamente in colture di mutanti $\Delta btaI1$, $\Delta btaI2$ e $\Delta btaI3$, rispetto al ceppo wild-type nel corso

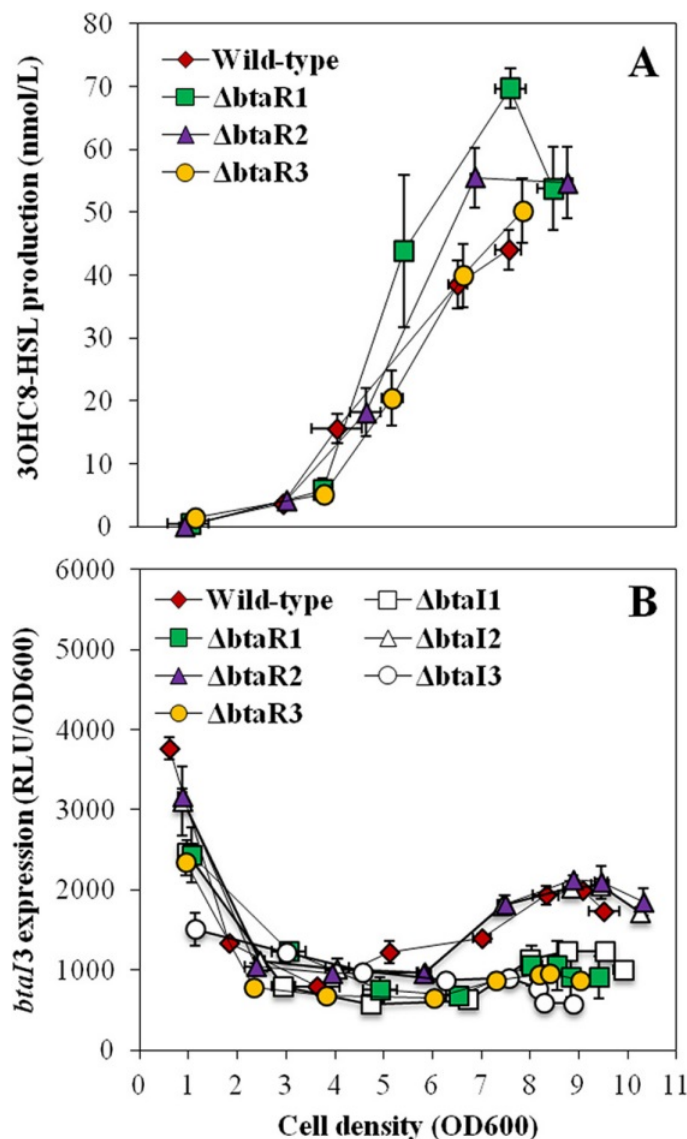


Figura 1.5: effetto dei regolatori BtaR sulla produzione di HC8 e sull'espressione di *btaI3*. Figura presa da [3].

della crescita batterica. Tutte e tre si rivelano attivatori della trascrizione, in quanto in loro assenza l'attività dei promotori risulta diminuita, come si vede nelle figure 1.3b, 1.4b e 1.5b.

Al fine di valutare se esista una regolazione incrociata anche tra i fattori trascrizionali BtaR, è stato necessario studiare come varia l'espressione dei geni *btaR1*, *btaR2* e *btaR3* nel mutante $\Delta btaI1 \Delta btaI2 \Delta btaI3$ (privo di tutte e tre le sintasi, quindi non in grado di produrre AHL) rispetto al ceppo wild-type. In figura 1.6 sono riportati i livelli di espressione dei tre geni in percentuale rispetto al ceppo naturale, quantificati in 4 diverse condizioni: colture addizionate di solo solvente (Acetonitrile) come riferimento, altre con aggiunta di solo C8, altre con HC10 e le ultime con HC8 (molecole esogene). Emerge che *btaR1* risulta aumentato in assenza delle tre AHL, sottolineando la loro regolazione negativa su questo gene; al contrario *btaR2* e *btaR3* risultano entrambi repressi, rivelando il ruolo delle AHL come attivatori. Un altro aspetto interessante è che i livelli di espressione dei tre geni sono

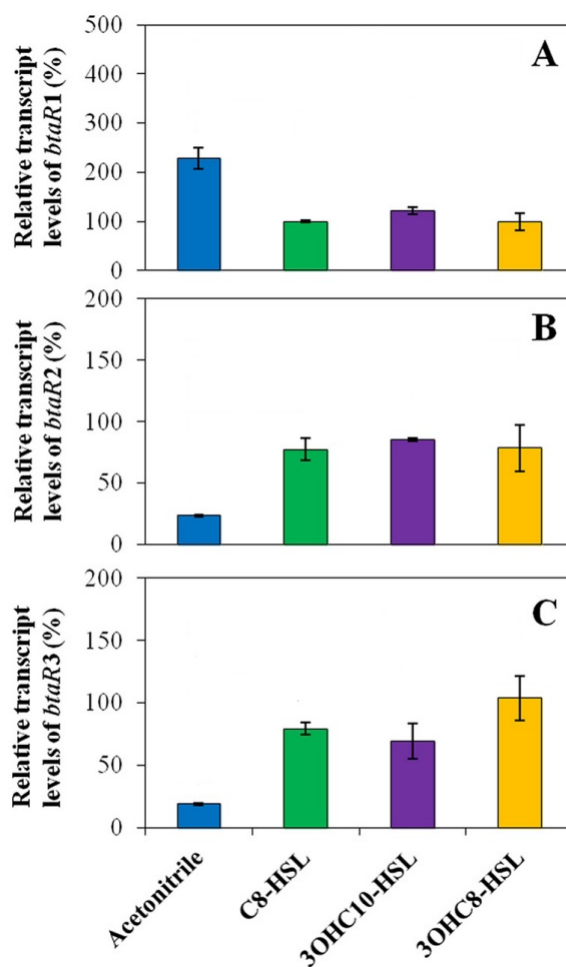


Figura 1.6: effetto delle 3 AHL sull'espressione dei 3 geni *btaR*. Figura presa da [3].

stati ripristinati ai livelli wild-type a seguito delle aggiunte sia delle AHL prodotte dalle rispettive sintasi che delle altre, suggerendo che la loro regolazione dipende da loro stessi e dagli altri QS.

Infine, in figura 1.7, è stata analizzata l'influenza delle AHL sull'espressione dei geni *btaI1*, *btaI2* e *btaI3*, servendosi del mutante privo dei tre. E' interessante notare che viene attivata la trascrizione anche in presenza delle AHL non congiunte, in particolare nel caso del *btaI3* la cui espressione risulta almeno raddoppiata aggiungendo qualsiasi delle tre.

Tra *btaI1* e *btaR1* è stata scoperta la presenza di un gene codificante per una proteina regolatrice chiamata RsaM1, dal nome della sua omologa BcRsaM, scoperta nel batterio *B. cenocepacia*, identica ad essa per il 63% [5, 7]. Lo studio dell'effetto di questa proteina sulla biosintesi delle AHL ha mostrato una sovrapproduzione di C8 in un mutante *rsaM1* rispetto al ceppo wild-type [6], da cui si deduce il ruolo della proteina come repressore del sistema QS-1: la riduzione di C8 potrebbe avvenire sia direttamente reprimendo la trascrizione di *btaI1* e *btaR1*, sia indirettamente modulando l'attività e/o stabilità di BtaI1 oppure controllando la funzionalità di BtaR1. Inoltre essa è responsabile della repressione di HC8, mediando un'ulteriore interazione tra QS-1 e QS-3 [10].

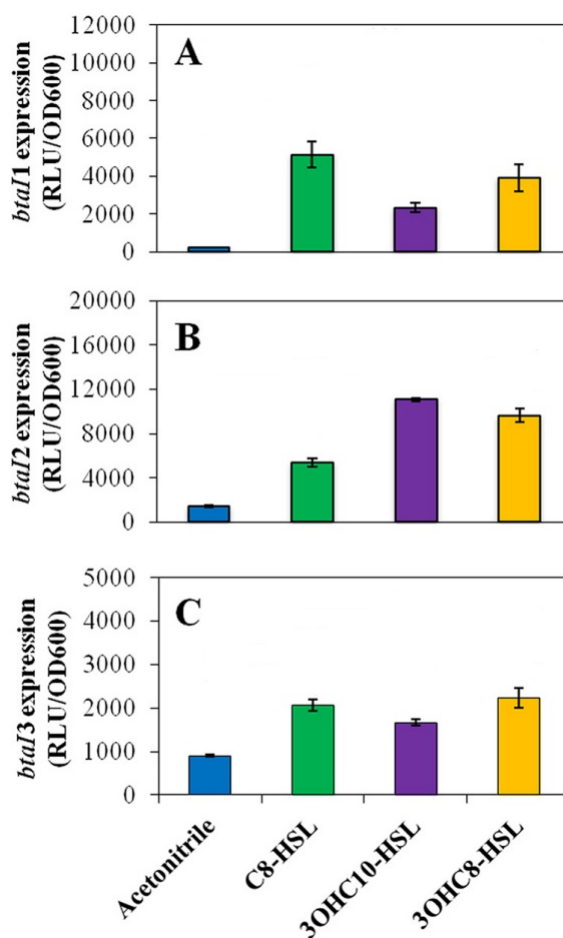


Figura 1.7: effetto delle 3 AHL sull'espressione dei 3 geni *btaI*. Figura presa da [3].

Analogamente, il sistema QS-2 contiene un gene aggiuntivo tra *btaI2* e *btaR2*, conservato nel genere *Burkholderia*, che codifica per una proteina identica per il 37% alla BcRsaM dello stesso batterio, da cui il nome RsaM2 [4, 5]; in questo caso è stato osservato un aumento delle concentrazioni di tutte e tre in un mutante *rsaM2* rispetto al ceppo naturale [6], indicando che RsaM2 interviene probabilmente nella regolazione di tutti i sistemi QS di *B. thailandensis*. Essa reprime principalmente la produzione di HC10, così come la trascrizione di *btaI2*, ma non la trascrizione di *btaR2*; inoltre è stato osservato un controllo negativo sulla biosintesi di C8, attraverso elementi regolatori non ancora identificati [10].

I geni *rsaM1* e *rsaM2* sono negativamente autoregolati e sono attivati dai rispettivi regolatori, mostrando un'importante modulazione omeostatica della biosintesi delle AHL.

In [8] e in [9] è mostrato che BpsI3 e BmaI3 (sintasi rispettivamente dei batteri *B. pseudomallei* e *B. mallei*) producono HC10 in aggiunta ad HC8, quindi è possibile che BtaI3 intervenga anche nella biosintesi di HC10, come notiamo in figura 1.8. Inoltre i sistemi QS-2 e QS-3 sono tra loro coordinati in quanto HC10 e HC8 regolano positivamente tramite BtaR2 e BtaR3 entrambi i geni *btaI2* e *btaI3*, rispettivamente nella prima fase e in fase stazionaria della crescita batterica, in accordo con il profilo di espressione dei due geni. Infine è stato osservato che BtaI1 potrebbe intervenire nella produzione di HC8 in aggiunta

a C8, contribuendo al funzionamento del circuito QS-3, oltre che del circuito QS-1 [10], come in figura 1.8.

Complessivamente lo studio descritto evidenzia l'interconnessione e interdipendenza tra i tre circuiti, suggerendo che essi cooperano dinamicamente e funzionano in modo concertato nella modulazione dell'espressione dei geni target QS, attraverso una rete regolatoria sequenziale, come già notato in figura 1.2. La figura 1.8 riassume tutte le interazioni validate sperimentalmente e che riportiamo qui di seguito in modo che il lettore le possa poi facilmente ricondurre al modello matematico che descriveremo nel capitolo 3:

1. Tra QS-1 e QS-2:

- **BtaR2** inibisce la trascrizione di **btaI1**, riducendo la produzione di C8 (figura 1.3);
- **BtaR1** inibisce la produzione di **HC10**, prodotta da BtaI2 (figura 1.4).
- **RsaM2** inibisce la produzione di **C8**.

2. Tra QS-1 e QS-3:

- **BtaR1**, attivata da C8, **promuove** la trascrizione di **btaI3**, ma reprime HC8 (figura 1.5);
- **BtaR3**, attivata in fase stazionaria da HC10 e HC8, **promuove** la trascrizione di **btaI1**, ma reprime C8 (figura 1.3).
- **RsaM1** inibisce la produzione di **HC8**.

3. Tra QS-2 e QS-3:

- **BtaR3** inibisce la produzione di **HC10**, in fase stazionaria (figura 1.4).

Da questo schema si evince che nella *Burkholderia thailandensis* cooperano tre circuiti per gestire in modo efficace il QS. La motivazione per la presenza di tre circuiti, apparentemente superflui, è un problema aperto che genera un fervido interesse in campo biologico. Quello che ci proponiamo di fare in questa tesi è di proporre una possibile spiegazione tramite lo studio della dinamica delle fluttuazioni del numero delle molecole segnale.

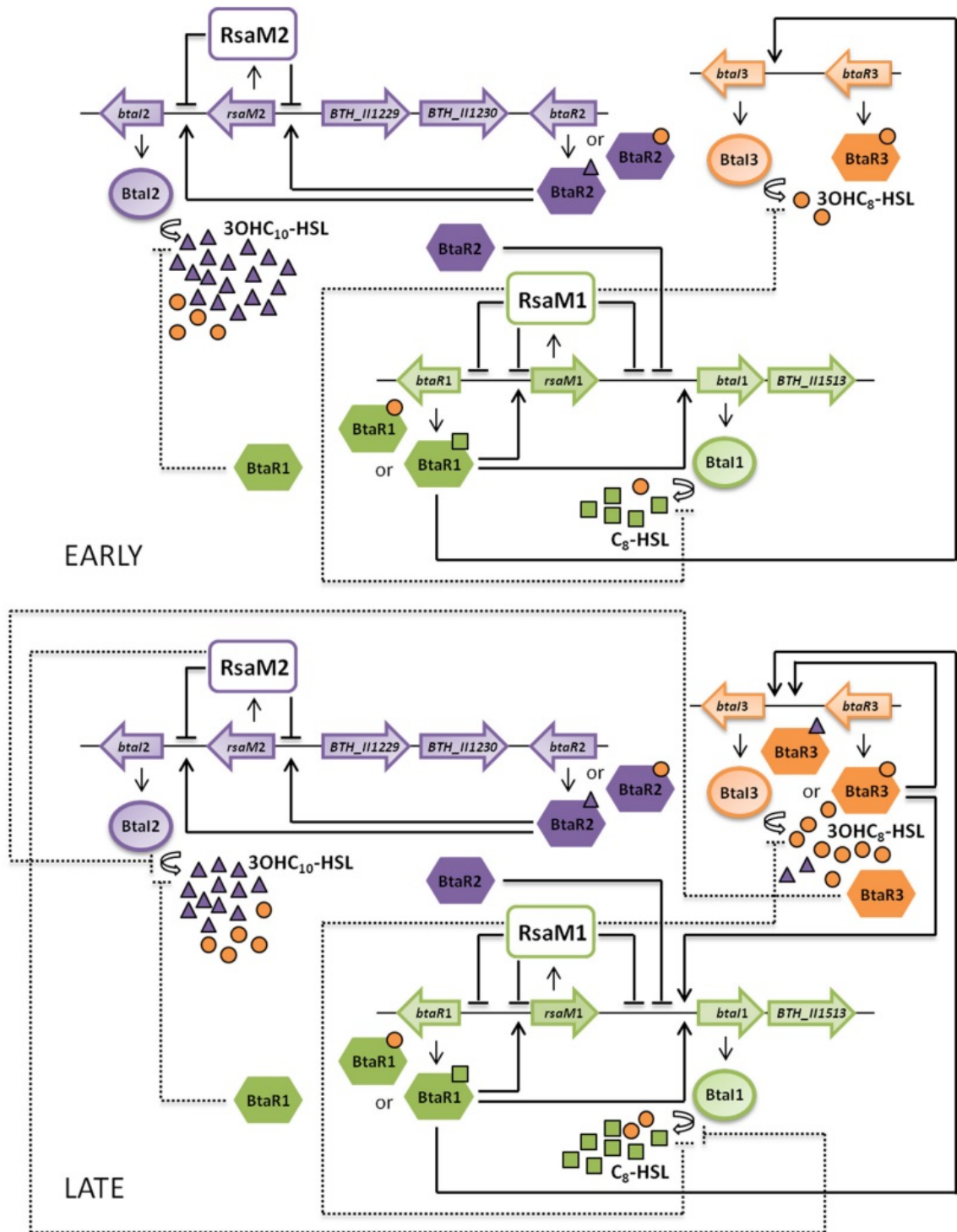


Figura 1.8: illustrazione schematica delle interazioni tra i tre circuiti, in cui le repressioni indirette sono state indicate con una linea tratteggiata. L'immagine è ripartita in due fasi di crescita batterica: soltanto in fase stazionaria BtaI3 produce sia HC8 sia HC10 ed entrano in gioco i regolatori BtaR3. Figura presa da [10].

1.3 Il ruolo del rumore nell'espressione genica

I circuiti genetici che regolano le funzioni cellulari, come quelli appena trattati, sono soggetti a fluttuazioni stocastiche, o rumore [11]. Il rumore agisce sia nelle cellule microbiche sia in quelle eucariote, permettendo la coordinazione dell'espressione genica all'interno di grandi regoloni, ossia sistemi di controllo genico per i quali molti geni sono sotto controllo primario di un'unica proteina di regolazione.

Negli ultimi decenni studi sperimentali hanno stabilito che le componenti molecolari più critiche di questi circuiti mostrano fluttuazioni stocastiche sostanziali e inevitabili nelle loro attività. Come risultato, anche cellule geneticamente identiche in un ambiente omogeneo possono comportarsi in modo abbastanza differente l'una dall'altra. Il rumore non può essere descritto come un semplice disturbo, in quanto svolge funzioni fondamentali nell'attività cellulare che sarebbe difficile o impossibile realizzare tramite circuiti deterministici.

Molte reazioni biochimiche nella cellula coinvolgono un piccolo numero di molecole o interazioni che si verificano solo in determinate condizioni, dando origine a fluttuazioni che influenzano diversi processi come la dinamica del citoscheletro, la polarizzazione cellulare, la trasduzione del segnale e l'attività neurale. L'espressione genica, quindi, è indubbiamente l'esempio meglio studiato e particolarmente suscettibile al rumore, a causa del basso numero di copie (una o due per cellula) della maggior parte dei geni [16, 17, 18].

Secondo recenti studi sperimentali [12, 13, 14, 15], il rumore nell'espressione genica può essere descritto tramite tre concetti chiave, come mostrato in figura 1.9. Il primo è quello dei **burst** (letteralmente "esplosioni"): le proteine non vengono prodotte a velocità uniforme, ma piuttosto secondo picchi stocastici. Questo sia perché ogni singolo RNA messaggero è tipicamente tradotto molte volte per produrre molte proteine, sia perché il promotore del gene può variare in modo stocastico tra gli stati on e off, risultando in picchi di mRNA che generano corrispondenti picchi amplificati di proteine. Il secondo è quello del **time averaging**, ossia "media temporale": quando il tempo di vita di una proteina è più lungo dell'intervallo tra i *burst* (come spesso accade), le proteine si accumulano e l'andamento che si osserva nel tempo è una funzione molto più regolare rispetto a quella a intermittenza caratteristica dei burst. Il terzo è la **propagazione**: le velocità dell'espressione genica sono influenzate direttamente dai livelli e stati dei fattori di trascrizione e altri componenti a monte, che sono soggetti essi stessi al *bursting* e al *time averaging*; come risultato le fluttuazioni nell'espressione del singolo gene si propagano per generare fluttuazioni nei geni a valle.

Mentre è chiaro come il rumore possa disturbare la precisione dei circuiti genetici, è meno ovvio se esso possa controintuitivamente migliorare la regolazione cellulare. Recentemente Cai *et al.* [19] hanno studiato come il lievito *Saccharomyces cerevisiae* regola insieme un grande set di geni target in risposta al calcio usando la dinamica della localizzazione nucleare stocastica del fattore di trascrizione Crz1, come si vede in figura 1.10a. Sorpren-

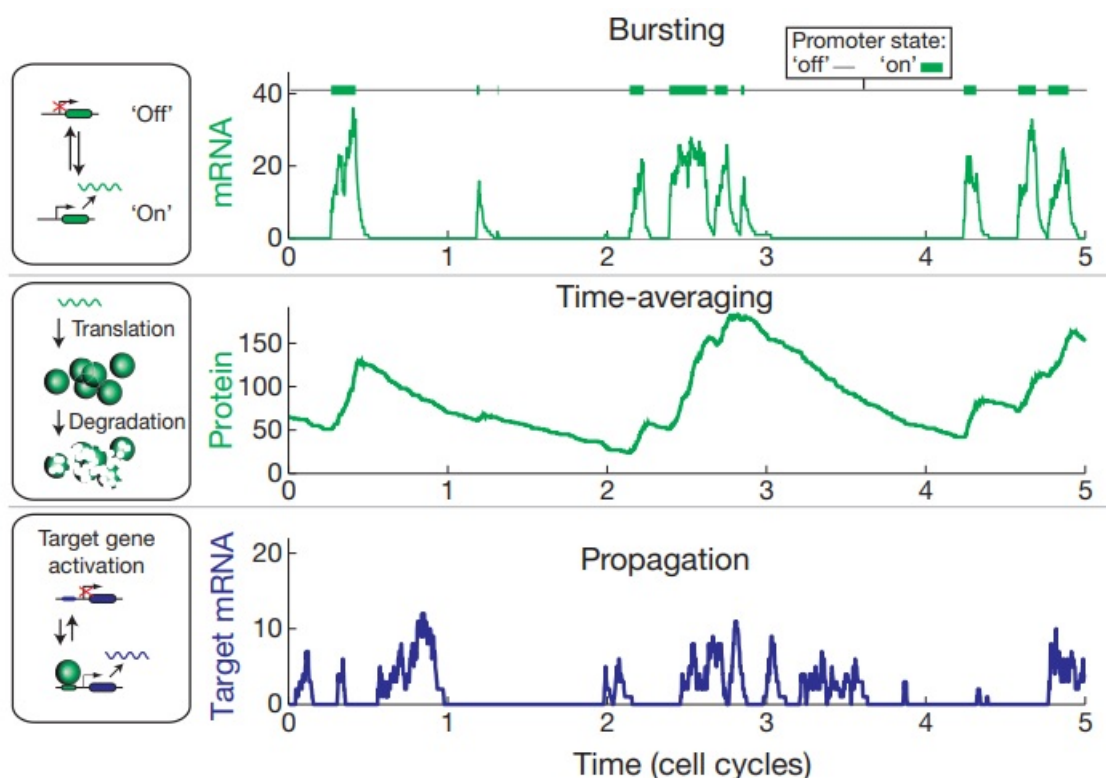


Figura 1.9: modello dei meccanismi generanti il rumore nell'espressione genica. Il rumore è caratterizzato da un'espressione esplosiva di mRNA (in alto); le proteine hanno tipicamente tempi di vita più lunghi rispetto ai *burst*, portando a una media temporale delle fluttuazioni (al centro); infine il rumore in un singolo gene può propagarsi per generare ulteriore rumore nell'espressione dei geni target delle proteine prodotte (in basso). Figura presa da [11].

dentemente Crz1 si localizza nel nucleo in brevi *burst* stocastici della durata di 1-2 minuti. Queste “esplosioni” corrispondono alla simultanea traslocazione di molte molecole di Crz1 nel nucleo. I livelli del calcio, che sono l'innesco di questo sistema, influenzano la frequenza media ma non la durata media o ampiezza di questi *burst*. Questa regolazione modulata dalla frequenza può portare un vantaggio funzionale alle cellule, permettendo il controllo coordinato di un grande regulone.

Per comprenderne il motivo possiamo considerare uno schema alternativo modulato dall'ampiezza, in cui un aumento del calcio porta a un corrispondente aumento della frazione di molecole Crz1 localizzate nel nucleo. In questo ipotetico sistema, che corrisponde al comportamento medio della popolazione cellulare, due promotori che rispondono in modo differente (con differenti affinità o cooperatività) al Crz1 nucleare 1.10b avranno diversi rapporti di espressione a seconda del livello del calcio; quindi la loro espressione risulta scoordinata 1.10c. Al contrario, la regolazione modulata dalla frequenza mantiene i prodotti di questi geni in proporzioni fisse per un ampio intervallo di tempo, come spiegato schematicamente in figura 1.10d: ogni *burst* ha le stesse caratteristiche (in media) e la loro frequenza aumenta con il livello del calcio, senza alterare il livello di espressione relativo dei diversi geni, che risultano così coordinati dal rumore, a differenza di quanto otterremmo utilizzando un

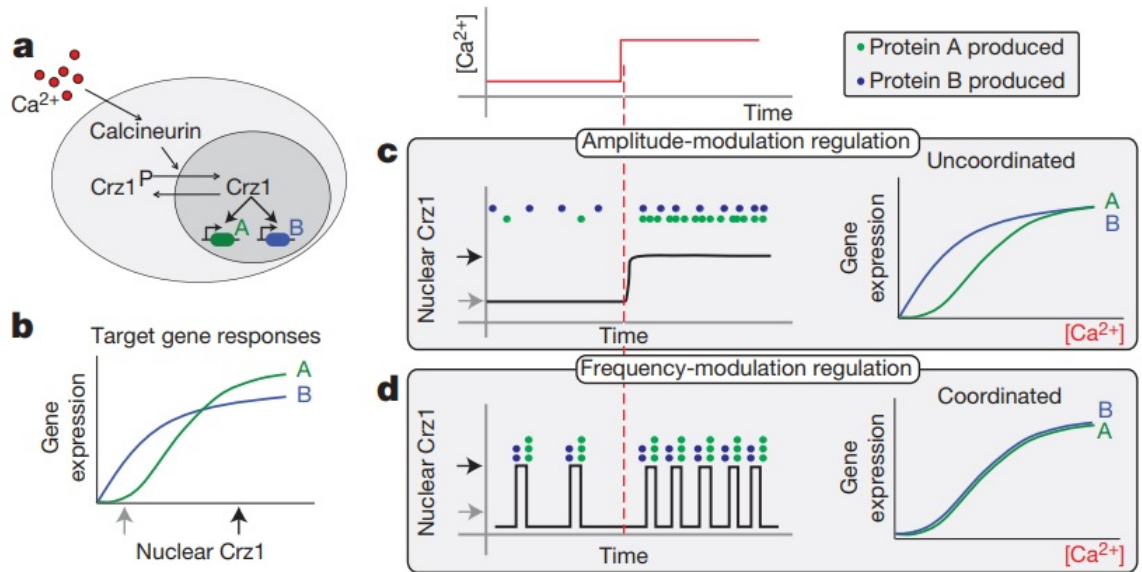


Figura 1.10: la modulazione basata sulla frequenza dei *burst* di localizzazione nucleare stocastica permette la coordinazione genica. **a)** Nel lievito la calcineurina, attivata dal calcio, defosforila $Crz1^P$, che altrimenti non potrebbe passare la membrana nucleare, al fine di attivare i suoi oltre 100 geni target (solo due sono indicati nello schema); **b)** curve di risposta dei due ipotetici geni target *A* e *B* in funzione del livello di Crz1; **c)** regolazione modulata dall'ampiezza che non permette profili di espressione coordinati; **d)** regolazione modulata dalla frequenza che porta alla coordinazione genica. Figura presa da [11].

modello deterministico.

Risulta quindi chiaro come il rumore a livello dell'espressione genica si ripercuota anche a livello della popolazione, influenzando sui processi di differenziazione degli organismi unicellulari e multicellulari, così come a livello evolutivo, espandendo la gamma di fenotipi che risulta da un dato genotipo.

Capitolo 2

I processi stocastici

In questo capitolo riportiamo alcuni concetti fondamentali della teoria dei processi stocastici che saranno poi utili al lettore per seguire il capitolo 3. Partendo dalla definizione di processo stocastico markoviano, si andrà a ricavare l'equazione di Chapman-Kolmogorov, che permetterà di ottenere la master equation. Lo studio di tale equazione, che governa la dinamica del sistema in esame, richiede l'utilizzo di raffinate tecniche d'indagine numerica: fra queste, l'algoritmo di Gillespie, che descriveremo alla fine del capitolo.

2.1 Equazione di Chapman-Kolmogorov

Lo scopo di questo paragrafo è ricavare l'equazione di Chapman-Kolmogorov, partendo da alcune nozioni basilari di probabilità. Proponiamo uno stile non troppo formale seguendo quello adottato in [23].

Definizione 2.1. Si chiama **processo stocastico** $X(t)$ una famiglia di variabili aleatorie definite su uno stesso spazio di probabilità, dove $t \in R^+$ è il tempo.

Definizione 2.2. Il processo $X(t)$ si definisce **processo markoviano** se soddisfa la seguente uguaglianza:

$$f_X(x(t_n)|x(t_{n-1}), \dots, x(t_1)) = f_X(x(t_n)|x(t_{n-1})), \quad (2.1)$$

ove $f_X(x(t_n)|x(t_{n-1}), \dots, x(t_1))$ è la densità di probabilità condizionata, ovvero la densità di probabilità che il processo assuma il valore $x(t_n)$ al tempo t_n , dato che ha già assunto i valori $x(t_{n-1}), \dots, x(t_1)$, con $t_1 \leq t_2 \leq \dots \leq t_n$.

Si tratta di un processo senza memoria, dove lo stato corrente determina quello immediatamente successivo.

Usando la definizione di probabilità condizionata si ottiene

$$f(x(t_3)|x(t_2), x(t_1)) = \frac{f(x(t_3), x(t_2), x(t_1))}{f(x(t_2), x(t_1))}, \quad (2.2)$$

dove, per alleggerire la notazione, si è omissso il pedice X .

Ipotizzando che il processo sia markoviano, cioè usando la (2.1), possiamo riscrivere la (2.2) come segue:

$$f(x(t_3)|x(t_2)) = \frac{f(x(t_3), x(t_2), x(t_1))}{f(x(t_2), x(t_1))}. \quad (2.3)$$

Moltiplicando entrambi i membri della (2.3) per $f(x(t_2)|x(t_1))$ e usando la definizione di probabilità condizionata si ottiene

$$f(x(t_2)|x(t_1))f(x(t_3)|x(t_2)) = f(x(t_3), x(t_2)|x(t_1)). \quad (2.4)$$

Integrando infine su $\mathbb{R}$ l'equazione (2.4) in $x(t_2)$ si ricava la seguente equazione di **Chapman-Kolmogorov**:

$$f(x(t_3)|x(t_1)) = \int_{-\infty}^{+\infty} f(x(t_3)|x(t_2))f(x(t_2)|x(t_1))dx(t_2). \quad (2.5)$$

Tale equazione permette di caratterizzare la probabilità di evolvere verso lo stato finale $x(t_3)$ partendo dalla condizione iniziale $x(t_1)$. Come risulta chiaro dall'analisi della (2.5), il processo tiene conto di tutte le possibili tappe intermedie $x(t_2)$: in prima istanza avviene la transizione $x(t_1) \rightarrow x(t_2)$, seguita dalla transizione $x(t_2) \rightarrow x(t_3)$.

2.2 Master equation

Si vuole ora mostrare come l'equazione di Chapman-Kolmogorov si traduca in un'equazione cosiddetta “maestra”, che caratterizzi la probabilità di osservare il sistema in una data configurazione. Partiamo da alcune utili definizioni.

Definizione 2.3. *Il processo stocastico $X(t)$ si dice **stazionario** se la sua statistica non cambia operando una traslazione nel tempo.*

Definizione 2.4. *Si definisce densità di transizione di un processo stazionario $X(t)$ la probabilità di transizione dallo stato iniziale $x_i = x(t_i)$ allo stato finale $x_j = x(t_j)$ nell'intervallo di tempo $\tau = t_j - t_i$, e si indica con*

$$T_\tau(x_j|x_i) = f(x(t_j)|x(t_i)).$$

Tale probabilità si può definire anche per $\tau = 0$ ponendo

$$T_0(x_j|x_i) = \delta(x_j - x_i),$$

in cui δ è la funzione delta di Dirac.

Torniamo ora ad occuparci della probabilità di transizione $x(t_1) \rightarrow x(t_3)$, già caratterizzata dall'equazione di Chapman-Kolmogorov. Andiamo a sviluppare $T_\tau(x_2|x_1)$ per τ piccolo, tenendo conto della definizione di $T_0(x_2|x_1)$:

$$T_\tau(x_2|x_1) = \delta(x_2 - x_1)A + \frac{\partial T_\tau(x_2|x_1)}{\partial \tau} \tau + o(\tau),$$

dove la funzione A è stata introdotta in modo che sia rispettata la condizione di normalizzazione

$$1 = \int T_\tau(x_2|x_1) dx_2$$

e

$$\frac{\partial T_\tau(x_2|x_1)}{\partial \tau} = W(x_2|x_1)$$

è la probabilità di transizione per unità di tempo.

Imponiamo ora la condizione di normalizzazione per determinare A :

$$1 = \int T_\tau(x_2|x_1) dx_2 = \int A \delta(x_2 - x_1) dx_2 + \int \tau W(x_2|x_1) dx_2 = A + a(x_1)\tau,$$

dove

$$a(x_1) = \int W(x_2|x_1) dx_2$$

e dove abbiamo usato che l'integrale della delta di Dirac è uguale a 1.

Si ricava

$$A = 1 - a(x_1)\tau,$$

da cui

$$T_\tau(x_2|x_1) = (1 - \tau a(x_1))\delta(x_2 - x_1) + \tau W(x_2|x_1) + o(\tau). \quad (2.6)$$

Notiamo che il termine $(1 - \tau a(x_1))\delta(x_2 - x_1)$ rappresenta la probabilità che il sistema non cambi stato nell'intervallo di tempo considerato, mentre il secondo termine $\tau W(x_2|x_1)$ descrive la probabilità di evolvere verso uno stato differente da quello iniziale.

Riscriviamo ora la (2.5) per $T_{\tau+\tau'}(x_3|x_1)$, omettendo gli estremi di integrazione, dove con τ si indica il tempo necessario per la transizione $x_1 \rightarrow x_2$ e con τ' quello relativo alla transizione $x_2 \rightarrow x_3$:

$$T_{\tau+\tau'}(x_3|x_1) = \int T_\tau(x_2|x_1) T_{\tau'}(x_3|x_2) dx_2,$$

da cui, esplicitando $T_{\tau'}(x_3|x_2)$ per mezzo della relazione (2.6) e trascurando i termini di ordine superiore, si ottiene:

$$T_{\tau+\tau'}(x_3|x_1) = \int T_\tau(x_2|x_1) \left[(1 - \tau' a(x_2))\delta(x_3 - x_2) + \tau' W(x_3|x_2) \right] dx_2.$$

Usando la definizione di delta di Dirac, si ha

$$T_{\tau+\tau'}(x_3|x_1) = T_\tau(x_3|x_1)(1 - \tau' a(x_3)) + \tau' \int W(x_3|x_2) T_\tau(x_2|x_1) dx_2.$$

Dividendo ambo i membri di quest'ultima per τ' , calcolando il limite per $\tau' \rightarrow 0$ e usando la definizione di derivata, si ricava:

$$\frac{\partial}{\partial \tau} T_\tau(x_3|x_1) = -a(x_3)T_\tau(x_3|x_1) + \int W(x_3|x_2)T_\tau(x_2|x_1)dx_2,$$

da cui, ricordando che $a(x_3) = \int W(x_2|x_3)dx_2$, si ha

$$\frac{\partial}{\partial \tau} T_\tau(x_3|x_1) = \int W(x_3|x_2)T_\tau(x_2|x_1)dx_2 - \int W(x_2|x_3)T_\tau(x_3|x_1)dx_2.$$

Abbiamo ottenuto un'equazione integro-differenziale che descrive la variazione nel tempo della probabilità di transizione $T_\tau(x_3|x_1)$. Prendendo $x_1 = x(t_1)$ come il dato iniziale e rinominando $x_2 = x'$ e $x_3 = x$, possiamo riscrivere l'equazione maestra nella forma più ricorrente in letteratura:

$$\frac{\partial}{\partial t} P(x, t) = \int \left[W(x|x')P(x', t) - W(x'|x)P(x, t) \right] dx', \quad (2.7)$$

dove $P(x, t)$ rappresenta la probabilità che il sistema si trovi nello stato finale x al tempo $t = t_3$, data la condizione iniziale x_1 . L'equazione descrive l'evoluzione temporale della distribuzione della probabilità attraverso due contributi: il primo integrando si riferisce alla probabilità che il sistema evolva da uno stato x' verso uno stato compatibile x , mentre il secondo rappresenta la probabilità di uscire dallo stesso stato.

Se consideriamo un processo stocastico markoviano continuo nel tempo e che assume valori discreti, l'equazione (2.7) diventa

$$\frac{d}{dt} P_n(t) = \sum_{n' \neq n} \left(W_{n,n'} P_{n'}(t) - W_{n',n} P_n(t) \right),$$

dove $P_n(t)$ indica la probabilità che il sistema si trovi in un determinato stato n al tempo t .

Per simulare il sistema stocastico e markoviano appena descritto si utilizza il celebre algoritmo di Gillespie, che consente di produrre traiettorie dinamiche stocastiche in accordo con l'equazione maestra che governa il processo immaginato.

2.3 Algoritmo di Gillespie

In questo paragrafo viene illustrato l'algoritmo di Gillespie [20, 21], spesso utilizzato per lo studio numerico di sistemi stocastici. Come vedremo nel seguito, tale tecnica permette di generare serie temporali, le cui funzioni di densità di probabilità siano soluzioni esatte della master equation.

Per descrivere questo metodo, consideriamo un volume V che contiene una miscela di molecole di N specie differenti S_i , per $i = 1, \dots, N$, e denotiamo con X_i il numero corrente di molecole della specie S_i in V . Supponiamo che le molecole interagiscano in M reazioni chimiche R_μ , $\forall \mu = 1, \dots, M$, ognuna caratterizzata da un parametro di reazione c_μ . L'ipotesi

fondamentale è che il tempo di durata della singola reazione sia molto più breve del tempo che intercorre tra due reazioni consecutive: ciò permette di affermare che le reazioni avvengono una alla volta.

Lo scopo del metodo è simulare l'evoluzione temporale delle N variabili X_i conoscendo i loro valori iniziali $X_i(0)$, le M reazioni R_μ e i parametri di reazione associati c_μ . L'approccio stocastico standard si focalizza sulla master equation, vale a dire l'evoluzione nel tempo della probabilità $P(X_1, \dots, X_N; t)$ di avere X_i molecole della specie S_i al tempo t . In molti casi però questo approccio risulta essere intrattabile, sia analiticamente che numericamente, pertanto Gillespie propose un metodo basato su quella che lui chiamò la funzione di densità di probabilità di reazione $P(\tau, \mu)$, definita come la probabilità al tempo t che avvenga la reazione R_μ in V nell'intervallo di tempo $(t + \tau, t + \tau + d\tau)$.

Al fine di ricavare l'espressione analitica di $P(\tau, \mu)$, definiamo con h_μ il numero di possibili e differenti combinazioni di reagenti per cui avviene la reazione R_μ in V al tempo t . Possiamo quindi decomporre $P(\tau, \mu)$ come segue:

$$P(\tau, \mu)d\tau = P_0(\tau)h_\mu c_\mu d\tau, \quad (2.8)$$

dove $P_0(\tau)$ è la probabilità al tempo t che nell'intervallo $(t, t + \tau)$ non avvenga alcuna reazione chimica e $h_\mu c_\mu d\tau$ è la probabilità che la reazione R_μ avvenga nel successivo intervallo temporale $(t + \tau, t + \tau + d\tau)$.

Per calcolare $P_0(\tau)$ suddividiamo il suddetto intervallo in K sotto-intervalli di uguale lunghezza $\epsilon = \frac{\tau}{K}$. La probabilità che nell'intervallo $(t, t + \epsilon)$ non avvenga alcuna reazione chimica è data da:

$$\prod_{\nu=1}^M (1 - h_\nu c_\nu \epsilon + o(\epsilon)) = 1 - \sum_{\nu=1}^M h_\nu c_\nu \epsilon + o(\epsilon),$$

da cui

$$P_0(\tau) = \left[1 - \frac{\sum_{\nu=1}^M h_\nu c_\nu \tau + o(K^{-1})K}{K} \right]^K.$$

Usando il limite notevole di Nepero per $K \rightarrow +\infty$ si ottiene

$$P_0(\tau) = e^{-\sum_{\nu=1}^M h_\nu c_\nu \tau}.$$

Inserendo quest'ultima relazione nella (2.8) otteniamo l'esatta espressione per la densità di probabilità

$$P(\tau, \mu) = h_\mu c_\mu e^{-\sum_{\nu=1}^M h_\nu c_\nu \tau}, \quad (2.9)$$

dove $0 \leq \tau < +\infty$ e $1 \leq \mu \leq M$, con $\tau \in \mathbb{R}$ e $\mu \in \mathbb{N}$.

Un sistema così costruito è di fatto controllato interamente dagli indici τ e μ . Conoscendo i due parametri si determina in senso probabilistico la reazione che guida l'evoluzione e l'istante temporale in cui essa avviene. Queste considerazioni costituiscono un punto di partenza per la formulazione dell'algoritmo di Gillespie.

L'algoritmo di Gillespie è una procedura di simulazione di tipo Monte Carlo [22]. Supponiamo che sia noto lo stato del sistema al tempo t . Dobbiamo selezionare la reazione chimica R_μ che avverrà nel successivo intervallo temporale $(t + \tau, t + \tau + d\tau)$, come affermato in precedenza. L'algoritmo procede con l'estrazione di due numeri casuali, in base ai quali calcoleremo le due quantità τ e μ .

In generale è possibile separare la funzione $P(\tau, \mu)$, caratterizzata in precedenza, nel prodotto di due funzioni di una variabile, ottenendo

$$P(\tau, \mu) = P_1(\tau) \cdot P_2(\mu|\tau), \quad (2.10)$$

dove $P_1(\tau)d\tau$ è la probabilità che la successiva reazione avvenga tra $t + \tau$ e $t + \tau + d\tau$, e $P_2(\mu|\tau)$ è la probabilità che la successiva reazione sia quella indicata dall'indice μ al tempo $t + \tau$. Ricordando il teorema di addizione per le probabilità, $P_1(\tau)d\tau$ si ottiene andando a sommare $P(\tau, \mu)d\tau$ su tutto μ :

$$P_1(\tau) = \sum_{\mu=1}^M P(\tau, \mu).$$

Sostituendo quest'ultima nella (2.10) e risolvendo per $P_2(\mu|\tau)$ si ricava

$$P_2(\mu|\tau) = \frac{P(\tau, \mu)}{\sum_{\nu=1}^M P(\tau, \nu)}.$$

Sostituendo nelle precedenti due equazioni $P(\tau, \mu)$ con l'espressione ricavata nella (2.9) si ottengono

$$P_1(\tau) = \begin{cases} ae^{-a\tau}, & 0 \leq \tau < +\infty \\ 0, & \text{altrimenti} \end{cases} \quad (2.11)$$

e

$$P_2(\mu|\tau) = \begin{cases} a_\mu / \sum_{\nu=1}^M a_\nu, & 1 \leq \mu \leq M \\ 0, & \text{altrimenti} \end{cases} \quad (2.12)$$

dove

$$a = \sum_{\mu=1}^M a_\mu,$$

con

$$a_\mu = h_\mu c_\mu, \quad \mu = 1, \dots, M.$$

In questo modo il problema di trovare due numeri casuali in accordo con $P(\tau, \mu)$ può essere ricondotto al problema di generare un numero casuale reale τ per la probabilità $P_1(\tau)$ e un intero μ per $P_2(\mu|\tau)$.

Al fine di generare τ in accordo con $P_1(\tau)$ andiamo a definire la corrispondente funzione di ripartizione

$$F(\tau) = \int_{-\infty}^{\tau} P_1(\eta) d\eta.$$

La procedura che si usa è nota come *metodo di inversione* e consiste nell'estrarre un numero casuale r_1 da una distribuzione uniforme dell'intervallo unitario e poi calcolare la quantità

desiderata come $\tau = F^{-1}(r_1)$.

Usando la (2.11) si ottiene:

$$F(\tau) = \int_0^\tau a e^{-a\eta} d\eta = 1 - e^{-a\tau}.$$

Ponendo $F(\tau) = r_1$ si ha

$$\tau = \frac{1}{a} \ln \left(\frac{1}{r_1} \right)$$

dove per semplicità abbiamo rimpiazzato la variabile $1 - r_1$ con la variabile r_1 statisticamente equivalente.

Finora abbiamo visto come generare un numero casuale dipendente da una distribuzione continua, ora presentiamo il caso discreto per ottenere un intero casuale μ in accordo con la funzione densità di probabilità P_2 , ricavata nella (2.12). In analogia al caso continuo si introduce la funzione di ripartizione F associata a P_2 , definita come:

$$F(\mu) = \sum_{\nu=-\infty}^{\mu} P_2(\nu|\tau).$$

In questo caso il metodo di inversione consiste nell'estrazione di un numero casuale r_2 dalla distribuzione di probabilità uniforme unitaria e poi selezionare il valore dell'intero μ che soddisfa la seguente relazione:

$$F(\mu - 1) < r_2 \leq F(\mu),$$

da cui, ricordando l'espressione esplicita di P_2 ottenuta nella (2.12), si ricava:

$$\sum_{\nu=1}^{\mu-1} a_\nu < r_2 \sum_{\nu=1}^M a_\nu \leq \sum_{\nu=1}^{\mu} a_\nu.$$

In sostanza si considera la somma degli a_ν fino a che non viene superato il valore $r_2 a = r_2 \sum_{\nu=1}^M a_\nu$ e si seleziona l'ultimo termine della serie.

Adesso siamo in grado di descrivere i passi dell'algoritmo di Gillespie:

1. Assegnare i valori alle M costanti di reazione c_μ e inizializzare i valori di popolazione molecolare $X_1, \dots, X_N$, impostando il tempo $t = 0$ e specificando il tempo a cui fermarsi t_{stop} .
2. Calcolare le quantità $a_\nu = h_\nu c_\nu$, per $\nu = 1, \dots, M$, in riferimento al numero corrente di molecole, e la quantità $a = \sum_{\nu=1}^M a_\nu$.
3. Usare il metodo Monte Carlo per generare due numeri casuali τ e μ secondo le funzioni $P_1(\tau)$ e $P_2(\mu|\tau)$, rispettivamente.
4. Incrementare la variabile tempo t del valore τ generato nel passo precedente ($t = t + \tau$) e aggiornare i valori X_i per ogni specie coinvolta nella reazione R_μ .
5. Se $t < t_{stop}$ torna al passo 2, altrimenti termina il calcolo.

Capitolo 3

Il modello stocastico del quorum sensing nella *B. thailandensis*

In questo capitolo ci occuperemo di modellizzare le reazioni biochimiche tra le componenti dei tre sistemi QS del batterio *B. thailandensis*, evidenziati nel primo capitolo. Ci serviremo di alcune tecniche presentate nel precedente capitolo per ottenere l'equazione che governa la dinamica del sistema in esame, la master equation. Tale equazione è esatta ma difficile da risolvere per via analitica, quindi, per procedere con lo studio formale, ricorreremo a tecniche approssimate come lo sviluppo di van Kampen. Al primo ordine perturbativo otterremo le equazioni deterministiche o di campo medio, mentre all'ordine successivo si otterrà l'equazione di Fokker-Planck che descrive il comportamento delle fluttuazioni stocastiche attorno al campo medio.

3.1 Le equazioni biochimiche del quorum sensing

Nel primo capitolo abbiamo riassunto le principali interazioni fra le molecole che regolano il QS attraverso i tre circuiti della *B. thailandensis*. Per permettere al lettore di visualizzare il significato biologico dei vari termini che comporranno il modello matematico, riassumiamo le varie interazioni nella figura 3.11. In ogni circuito compaiono molecole simili che si distinguono tra un circuito e l'altro attraverso il numero posto accanto ad ogni simbolo. Queste molecole sono i Bta**R**, regolatori della trascrizione dei geni *btaI*, i Bta**R**^{*}, regolatori attivati dalle molecole segnale HC8, HC10 e C8, i Bta**I**, enzimi responsabili della produzione delle stesse molecole segnale, e gli Rsa**M**, ulteriori proteine regolatrici responsabili della repressione dei circuiti. Indicando le molecole appena descritte con i simboli R, R^{*}, I e M, le principali interazioni rappresentate in figura sono:

1. M1 e M2 si auto-inibiscono;
2. M1 reprime la produzione di I1, R1 e HC8;
3. M2 reprime la produzione di I2 e C8;

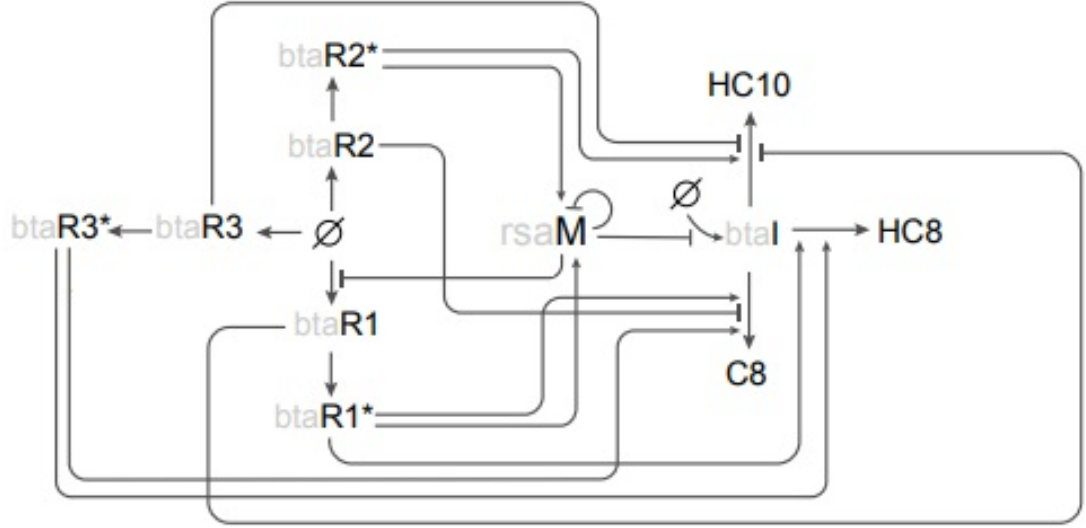
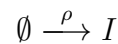
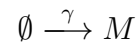
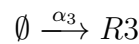
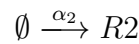
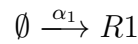


Figura 3.12: Schema semplificato adottato per la modellizzazione.

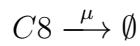
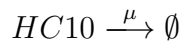
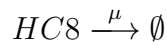
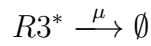
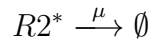
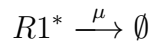
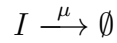
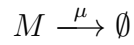
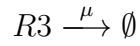
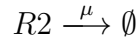
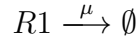
Si può facilmente comprendere come il dettagliato schema proposto possa dare origine ad un modello con un elevato numero di variabili e di termini, la cui analisi potrebbe risultare particolarmente complessa, se non addirittura inconclusiva. Per ovviare a questo problema, supportati anche dal fatto che i dati sperimentali che utilizzeremo in seguito non riflettono il dettaglio della descrizione biochimica, sostituiamo lo schema della figura 3.11 con quello della 3.12, in cui vengono accorpate alcune delle molecole omonime dei 3 circuiti. In particolare, indicheremo con M una generica molecola di tipo $M1$ o $M2$, e con I le proteine $I1$, $I2$ e $I3$.

In accordo con lo schema semplificato, possiamo quindi rappresentare ogni interazione sotto forma di equazione chimica. Questo tipo di approccio consente di trattare il fenomeno come un processo stocastico, passaggio fondamentale per il tipo di analisi che ci accingiamo a fare. Iniziamo con le prime cinque reazioni che riguardano, rispettivamente, la formazione dei tre regolatori $R1$, $R2$ e $R3$ e delle proteine M ed I :



dove α_2 e α_3 saranno supposte costanti, mentre α_1 , γ e ρ sono rate di transizione non lineari che descriveremo a breve.

Le seguenti reazioni riguardano, invece, il decadimento di tutte le componenti dei tre circuiti, con tasso μ costante:



Le seguenti due reazioni riguardano la formazione di $R1^*$. Dal momento che la sintasi I1 produce sia C8 sia HC8, il relativo regolatore R1 si può legare con entrambe le molecole per formare $R1^*$:



Analogamente la sintasi I2, producendo sia HC10 che HC8, fa sì che il relativo regolatore R2 si lega con entrambe per formare R2*:

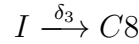
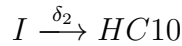
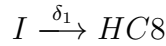


Anche la formazione di R3* è data dal legame di R3 con HC8 e HC10, entrambe prodotte dalla sintasi I3:



Si noti la reversibilità delle ultime sei reazioni, indicata dalla freccia bidirezionale: il pedice *on* dei rate costanti $k_{1_{on}^{C8}}$, $k_{1_{on}^{HC8}}$, $k_{2_{on}^{HC10}}$, $k_{2_{on}^{HC8}}$, $k_{3_{on}^{HC8}}$ e $k_{3_{on}^{HC10}}$ indica che il prodotto di reazione è a destra; viceversa, il pedice *off* degli stessi rate indica che il prodotto è a sinistra.

Infine, riportiamo le ultime tre reazioni riguardanti la formazione delle tre molecole segnale HC8, HC10 e C8, a partire dalla molecola I:



dove δ_1 , δ_2 e δ_3 sono i rispettivi rate, modellizzati come vedremo di seguito.

I rate di transizione non lineari, dipendenti dalle concentrazioni indicate in parentesi quadra, sono stati modellizzati come segue:

$$\alpha_1 = \beta_{max} \frac{1}{1 + \frac{[M]}{k_1}} \quad (3.19)$$

$$\gamma = \beta_{max} \frac{1}{1 + \frac{[M]}{k_2}} \left(\frac{[R1]^*}{k_3 + [R1]^*} + \frac{[R2]^*}{k_4 + [R2]^*} \right) \quad (3.20)$$

$$\begin{aligned}
\rho &= \beta_{max} \frac{1}{1 + \frac{[M]}{k_5}} \\
\delta_1 &= \beta_{max} \left(\frac{[R1]^*}{k_6 + [R1]^*} + \frac{[R3]^*}{k_7 + [R3]^*} \right) \\
\delta_2 &= \beta_{max} \frac{1}{1 + \frac{[R3]}{k_8}} \frac{1}{1 + \frac{[R1]}{k_9}} \frac{[R2]^*}{k_{10} + [R2]^*} \\
\delta_3 &= \beta_{max} \frac{1}{1 + \frac{[R2]}{k_{11}}} \left(\frac{[R1]^*}{k_{12} + [R1]^*} + \frac{[R3]^*}{k_{13} + [R3]^*} \right)
\end{aligned}$$

Queste equazioni mettono in evidenza la dipendenza delle velocità di reazione dalle concentrazioni degli inibitori e degli attivatori, che compaiono rispettivamente nei seguenti fattori generici:

$$\frac{1}{1 + \frac{[R]}{k_R}}, \quad \frac{[A]}{k_A + [A]},$$

dove R rappresenta un generico repressore e k_R la relativa costante di inibizione, mentre A rappresenta un generico attivatore e k_A la relativa costante di attivazione.

Si può notare che quando la concentrazione di R , $[R]$, tende a 0, il relativo fattore diventa irrilevante in quanto tende a 1, quindi il rate si avvicina al suo valore massimo. Invece quando $[R]$ tende a infinito, il fattore e quindi l'intera espressione del rate tende ad annullarsi, in accordo con ciò che ci aspetteremmo considerando il ruolo del repressore.

In maniera analoga si può descrivere il fattore relativo all'attivatore: quando $[A]$ tende a 0, la frazione tende a 0 e quindi il rate tende a diminuire. Al contrario quando $[A]$ tende a infinito, il fattore tende a 1, portando a saturazione il valore del rate: se la velocità di produzione tendesse a infinito il modello non descriverebbe adeguatamente il fenomeno, in quanto i siti attivi degli enzimi e le sequenze di legame dei regolatori possono interagire con un numero limitato di substrati e quindi la velocità di produzione risulta necessariamente limitata.

In accordo con le interazioni riepilogate a inizio paragrafo, risulta ad esempio dalla (3.19) che la velocità α_1 , relativa alla produzione di $R1$, viene repressa da M ; invece nella (3.20) il rate γ relativo alla produzione di M presenta $R1^*$ e $R2^*$ come attivatori ed M stesso come inibitore. In maniera analoga si possono descrivere tutti gli altri tassi di produzione non costanti, verificando ogni volta quali siano i relativi repressori e attivatori.

In tabella 3.1 riassumiamo i parametri del modello insieme ad una descrizione sintetica e diamo i valori di quelli noti in letteratura. Degli altri parametri stimeremo i valori utilizzando il modello matematico proposto per fittare i dati sperimentali presentati nel capitolo 1 (si veda sezione 1.2).

Parameter	Description	Value	Unit	Reference
β_{max}	Basic transcription rate for models M1 and M2	1/80	nM min ⁻¹	[26]
μ	Combined protein and metabolite dilution rate	0.001	min ⁻¹	[25]
α_2, α_3	R2 and R3 production rate	-	-	-
$k1_{on}^{C8}$	R1 C8 association constant	0.1	min ⁻¹ nM ⁻¹	[25]
$k1_{off}^{C8}$	R1 C8 dissociation constant	10	min ⁻¹	[25]
$k1_{on}^{HC8}$	R1 HC8 association constant	-	-	-
$k1_{off}^{HC8}$	R1 HC8 dissociation constant	-	-	-
$k2_{on}^{HC10}$	R2 HC10 association constant	0.1	min ⁻¹ nM ⁻¹	[25]
$k2_{off}^{HC10}$	R2 HC10 dissociation constant	10	min ⁻¹	[25]
$k2_{on}^{HC8}$	R2 HC8 association constant	-	-	-
$k2_{off}^{HC8}$	R2 HC8 dissociation constant	-	-	-
$k3_{on}^{HC8}$	R3 HC8 association constant	0.1	min ⁻¹ nM ⁻¹	[25]
$k3_{off}^{HC8}$	R3 HC8 dissociation constant	10	min ⁻¹	[25]
$k3_{on}^{HC10}$	R3 HC10 association constant	-	-	-
$k3_{off}^{HC10}$	R3 HC10 dissociation constant	-	-	-
k_1	M - R1 inhibition constant	-	-	-
k_2	M self-inhibition constant	-	-	-
k_3	R1* - M activation constant	-	-	-
k_4	M - R2* activation constant	-	-	-
k_5	M - I inhibition constant	-	-	-
k_6	R1*- HC8 activation constant	-	-	-
k_7	R3*- HC8 activation constant	-	-	-
k_8	R3- HC10 inhibition constant	-	-	-
k_9	R1- HC10 inhibition constant	-	-	-
k_{10}	R2- HC10 activation constant	-	-	-
k_{11}	R2 - C8 inhibition constant	-	-	-
k_{12}	R1* - C8 activation constant	-	-	-
k_{13}	R3* - C8 activation constant	-	-	-

Tabella 3.1: descrizione dei parametri usati nel modello.

3.2 Dalle probabilità di transizione alla master equation

A partire dal modello stocastico appena descritto, è possibile scrivere l'equazione maestra che governa l'evoluzione della probabilità di osservare il sistema nello stato $\mathbf{x}$ al tempo t , dove $\mathbf{x} = (n_{R1}, n_{R2}, n_{R3}, n_M, n_I, n_{R1*}, n_{R2*}, n_{R3*}, n_{HC8}, n_{HC10}, n_{C8})$ rappresenta il vettore del numero di molecole di ogni tipo al tempo t . Come primo passo è necessario scrivere la probabilità di transizione $T(\mathbf{y}|\mathbf{x})$ di passare dallo stato $\mathbf{x}$ allo stato $\mathbf{y}$, dove $\mathbf{y}$ è uno stato compatibile con le reazioni chimiche descritte precedentemente. Nelle seguenti transizioni sono indicate con n_i/V , $i = 1, \dots, 11$, le concentrazioni delle varie molecole coinvolte, dove V è un parametro che codifica il volume (nel senso di capienza) del sistema:

$$\begin{aligned}
T_1(n_{R1} + 1 | n_{R1}) &= \alpha_1, \\
T_2(n_{R2} + 1 | n_{R2}) &= \alpha_2, \\
T_3(n_{R3} + 1 | n_{R3}) &= \alpha_3, \\
T_4(n_M + 1 | n_M) &= \gamma, \\
T_5(n_I + 1 | n_I) &= \rho, \\
T_6(n_{R1} - 1 | n_{R1}) &= \mu \frac{n_{R1}}{V}, \\
T_7(n_{R2} - 1 | n_{R2}) &= \mu \frac{n_{R2}}{V}, \\
T_8(n_{R3} - 1 | n_{R3}) &= \mu \frac{n_{R3}}{V}, \\
T_9(n_M - 1 | n_M) &= \mu \frac{n_M}{V}, \\
T_{10}(n_I - 1 | n_I) &= \mu \frac{n_I}{V}, \\
T_{11}(n_{R1*} - 1 | n_{R1*}) &= \mu \frac{n_{R1*}}{V}, \\
T_{12}(n_{R2*} - 1 | n_{R2*}) &= \mu \frac{n_{R2*}}{V}, \\
T_{13}(n_{R3*} - 1 | n_{R3*}) &= \mu \frac{n_{R3*}}{V}, \\
T_{14}(n_{HC8} - 1 | n_{HC8}) &= \mu \frac{n_{HC8}}{V}, \\
T_{15}(n_{HC10} - 1 | n_{HC10}) &= \mu \frac{n_{HC10}}{V}, \\
T_{16}(n_{C8} - 1 | n_{C8}) &= \mu \frac{n_{C8}}{V}, \\
T_{17}(n_{C8} - 1, n_{R1} - 1, n_{R1*} + 1 | n_{C8}, n_{R1}, n_{R1*}) &= k1_{on}^{C8} \frac{n_{C8}}{V} \frac{n_{R1}}{V}, \\
T_{18}(n_{C8} + 1, n_{R1} + 1, n_{R1*} - 1 | n_{C8}, n_{R1}, n_{R1*}) &= k1_{off}^{C8} \frac{n_{R1*}}{V},
\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
T_{19}(n_{HC8} - 1, n_{R1} - 1, n_{R1^*} + 1 | n_{HC8}, n_{R1}, n_{R1^*}) &= k1_{on}^{HC8} \frac{n_{HC8}}{V} \frac{n_{R1}}{V}, \\
T_{20}(n_{HC8} + 1, n_{R1} + 1, n_{R1^*} - 1 | n_{HC8}, n_{R1}, n_{R1^*}) &= k1_{off}^{HC8} \frac{n_{R1^*}}{V}, \\
T_{21}(n_{HC10} - 1, n_{R2} - 1, n_{R2^*} + 1 | n_{HC10}, n_{R2}, n_{R2^*}) &= k2_{on}^{HC10} \frac{n_{HC10}}{V} \frac{n_{R2}}{V}, \\
T_{22}(n_{HC10} + 1, n_{R2} + 1, n_{R2^*} - 1 | n_{HC10}, n_{R2}, n_{R2^*}) &= k2_{off}^{HC10} \frac{n_{R2^*}}{V}, \\
T_{23}(n_{HC8} - 1, n_{R2} - 1, n_{R2^*} + 1 | n_{HC8}, n_{R2}, n_{R2^*}) &= k2_{on}^{HC8} \frac{n_{HC8}}{V} \frac{n_{R2}}{V}, \\
T_{24}(n_{HC8} + 1, n_{R2} + 1, n_{R2^*} - 1 | n_{HC8}, n_{R2}, n_{R2^*}) &= k2_{off}^{HC8} \frac{n_{R2^*}}{V}, \\
T_{25}(n_{HC8} - 1, n_{R3} - 1, n_{R3^*} + 1 | n_{HC8}, n_{R3}, n_{R3^*}) &= k3_{on}^{HC8} \frac{n_{HC8}}{V} \frac{n_{R3}}{V}, \\
T_{26}(n_{HC8} + 1, n_{R3} + 1, n_{R3^*} - 1 | n_{HC8}, n_{R3}, n_{R3^*}) &= k3_{off}^{HC8} \frac{n_{R3^*}}{V}, \\
T_{27}(n_{HC10} - 1, n_{R3} - 1, n_{R3^*} + 1 | n_{HC10}, n_{R3}, n_{R3^*}) &= k3_{on}^{HC10} \frac{n_{HC10}}{V} \frac{n_{R3}}{V}, \\
T_{28}(n_{HC10} + 1, n_{R3} + 1, n_{R3^*} - 1 | n_{HC10}, n_{R3}, n_{R3^*}) &= k3_{off}^{HC10} \frac{n_{R3^*}}{V}, \\
T_{29}(n_I - 1, n_{HC8} + 1 | n_I, n_{HC8}) &= \delta_1 \frac{n_I}{V}, \\
T_{30}(n_I - 1, n_{HC10} + 1 | n_I, n_{HC10}) &= \delta_2 \frac{n_I}{V}, \\
T_{31}(n_I - 1, n_{C8} + 1 | n_I, n_{C8}) &= \delta_3 \frac{n_I}{V}, \tag{3.21}
\end{aligned}$$

dove abbiamo messo in evidenza nella definizione di $T(\mathbf{y}|\mathbf{x})$ le sole quantità che cambiano in seguito alla reazione chimica considerata. Come già osservato nel capitolo precedente, la dinamica è markoviana e quindi le probabilità di transizione dipendono esclusivamente dallo stato immediatamente precedente e non si deve tener conto degli effetti di memoria.

La probabilità $P(\mathbf{x}, t)$ che il sistema si trovi nello stato $\mathbf{x}$ al tempo t soddisfa quindi la seguente master equation:

$$\frac{d}{dt}P(\mathbf{x}, t) = \sum_{\mathbf{y} \neq \mathbf{x}} T(\mathbf{x}|\mathbf{y})P(\mathbf{y}, t) - T(\mathbf{y}|\mathbf{x})P(\mathbf{x}, t), \tag{3.22}$$

sul cui significato abbiamo già discusso nel precedente capitolo. In estrema sintesi, si tratta di un'equazione di bilanciamento che dà conto delle transizioni tra stati adiacenti resi compatibili dalle reazioni chimiche ipotizzate.

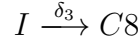
Per scrivere l'equazione maestra in forma più compatta si è soliti introdurre gli operatori passo ϵ così definiti:

$$\begin{aligned}
\epsilon_{R1}^{\pm} f(\mathbf{x}) &= f(n_{R1} \pm 1, x_2, \dots, x_{11}), \\
\epsilon_{R2}^{\pm} f(\mathbf{x}) &= f(x_1, n_{R2} \pm 1, x_3, \dots, x_{11}),
\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
\epsilon_{R3}^{\pm} f(\mathbf{x}) &= f(x_1, x_2, n_{R3} \pm 1, \dots, x_{11}), \\
\epsilon_M^{\pm} f(\mathbf{x}) &= f(x_1, x_2, x_3, n_M \pm 1, \dots, x_{11}), \\
\epsilon_I^{\pm} f(\mathbf{x}) &= f(x_1, \dots, n_I \pm 1, \dots, x_{11}), \\
\epsilon_{R1*}^{\pm} f(\mathbf{x}) &= f(x_1, \dots, n_{R1*} \pm 1, \dots, x_{11}), \\
\epsilon_{R2*}^{\pm} f(\mathbf{x}) &= f(x_1, \dots, n_{R2*} \pm 1, \dots, x_{11}), \\
\epsilon_{R3*}^{\pm} f(\mathbf{x}) &= f(x_1, \dots, n_{R3*} \pm 1, \dots, x_{11}), \\
\epsilon_{HC8}^{\pm} f(\mathbf{x}) &= f(x_1, \dots, n_{HC8} \pm 1, \dots, x_{11}), \\
\epsilon_{HC10}^{\pm} f(\mathbf{x}) &= f(x_1, \dots, n_{HC10} \pm 1, x_{11}), \\
\epsilon_{C8}^{\pm} f(\mathbf{x}) &= f(x_1, \dots, x_{10}, n_{C8} \pm 1),
\end{aligned}$$

dove f è un'arbitraria funzione che dipende dallo stato $\mathbf{x}$. I pedici inseriti negli operatori passo consentono di capire quale molecola aumenta o diminuisce a seguito della corrispondente reazione chimica.

Per meglio comprendere come si applicano gli operatori passo alla master equation, consideriamo a titolo di esempio una delle reazioni chimiche del modello:



Abbiamo già scritto la corrispondente probabilità di transizione $T_{31} = T(n_I - 1, n_{C8} + 1 | n_I, n_{C8})$; ora andiamo a scrivere il relativo termine nella master equation usando la (3.22):

$$\begin{aligned}
&T(n_I, n_{C8} | n_I + 1, n_{C8} - 1)P(n_I + 1, n_{C8} - 1) - T_{31}P(n_I, n_{C8}, t) = \\
&= (\epsilon_I^+ \epsilon_{C8}^-)T_{31}P(n_I, n_{C8}, t) - T_{31}P(n_I, n_{C8}, t) = (\epsilon_I^+ \epsilon_{C8}^- - 1)T_{31}P(n_I, n_{C8}, t).
\end{aligned}$$

In maniera analoga si possono ricavare tutti gli altri termini della master equation, ottenendo:

$$\begin{aligned}
\frac{d}{dt}P(\mathbf{x}, t) &= \left[(\epsilon_{R1}^- - 1)T_1(n_{R1} + 1 | n_{R1}) + (\epsilon_{R2}^- - 1)T_2(n_{R2} + 1 | n_{R2}) \right. \\
&\quad + (\epsilon_{R3}^- - 1)T_3(n_{R3} + 1 | n_{R3}) + (\epsilon_M^- - 1)T_4(n_M + 1 | n_M) \\
&\quad + (\epsilon_I^- - 1)T_5(n_I + 1 | n_I) + (\epsilon_{R1}^+ - 1)T_6(n_{R1} - 1 | n_{R1}) \\
&\quad + (\epsilon_{R2}^+ - 1)T_7(n_{R2} - 1 | n_{R2}) + (\epsilon_{R3}^+ - 1)T_8(n_{R3} - 1 | n_{R3}) \\
&\quad + (\epsilon_M^+ - 1)T_9(n_M - 1 | n_M) + (\epsilon_I^+ - 1)T_{10}(n_I - 1 | n_I) \\
&\quad + (\epsilon_{R1*}^+ - 1)T_{11}(n_{R1*} - 1 | n_{R1*}) + (\epsilon_{R2*}^+ - 1)T_{12}(n_{R2*} - 1 | n_{R2*}) \\
&\quad + (\epsilon_{R3*}^+ - 1)T_{13}(n_{R3*} - 1 | n_{R3*}) + (\epsilon_{HC8}^+ - 1)T_{14}(n_{HC8} - 1 | n_{HC8}) \\
&\quad \left. + (\epsilon_{HC10}^+ - 1)T_{15}(n_{HC10} - 1 | n_{HC10}) + (\epsilon_{C8}^+ - 1)T_{16}(n_{C8} - 1 | n_{C8}) \right]
\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
& +(\epsilon_{C8}^+ \epsilon_{R1}^+ \epsilon_{R1^*}^- - 1)T_{17}(n_{C8} - 1, n_{R1} - 1, n_{R1^*} + 1 | n_{C8}, n_{R1}, n_{R1^*}) \\
& +(\epsilon_{C8}^- \epsilon_{R1}^- \epsilon_{R1^*}^+ - 1)T_{18}(n_{C8} + 1, n_{R1} + 1, n_{R1^*} - 1 | n_{C8}, n_{R1}, n_{R1^*}) \\
& +(\epsilon_{HC8}^+ \epsilon_{R1}^+ \epsilon_{R1^*}^- - 1)T_{19}(n_{HC8} - 1, n_{R1} - 1, n_{R1^*} + 1 | n_{HC8}, n_{R1}, n_{R1^*}) \\
& +(\epsilon_{HC8}^- \epsilon_{R1}^- \epsilon_{R1^*}^+ - 1)T_{20}(n_{HC8} + 1, n_{R1} + 1, n_{R1^*} - 1 | n_{HC8}, n_{R1}, n_{R1^*}) \\
& +(\epsilon_{HC10}^+ \epsilon_{R2}^+ \epsilon_{R2^*}^- - 1)T_{21}(n_{HC10} - 1, n_{R2} - 1, n_{R2^*} + 1 | n_{HC10}, n_{R2}, n_{R2^*}) \\
& +(\epsilon_{HC10}^- \epsilon_{R2}^- \epsilon_{R2^*}^+ - 1)T_{22}(n_{HC10} + 1, n_{R2} + 1, n_{R2^*} - 1 | n_{HC10}, n_{R2}, n_{R2^*}) \\
& +(\epsilon_{HC8}^+ \epsilon_{R2}^+ \epsilon_{R2^*}^- - 1)T_{23}(n_{HC8} - 1, n_{R2} - 1, n_{R2^*} + 1 | n_{HC8}, n_{R2}, n_{R2^*}) \\
& +(\epsilon_{HC8}^- \epsilon_{R2}^- \epsilon_{R2^*}^+ - 1)T_{24}(n_{HC8} + 1, n_{R2} + 1, n_{R2^*} - 1 | n_{HC8}, n_{R2}, n_{R2^*}) \\
& +(\epsilon_{HC8}^+ \epsilon_{R3}^+ \epsilon_{R3^*}^- - 1)T_{25}(n_{HC8} - 1, n_{R3} - 1, n_{R3^*} + 1 | n_{HC8}, n_{R3}, n_{R3^*}) \\
& +(\epsilon_{HC8}^- \epsilon_{R3}^- \epsilon_{R3^*}^+ - 1)T_{26}(n_{HC8} + 1, n_{R3} + 1, n_{R3^*} - 1 | n_{HC8}, n_{R3}, n_{R3^*}) \\
& +(\epsilon_{HC10}^+ \epsilon_{R3}^+ \epsilon_{R3^*}^- - 1)T_{27}(n_{HC10} - 1, n_{R3} - 1, n_{R3^*} + 1 | n_{HC10}, n_{R3}, n_{R3^*}) \\
& +(\epsilon_{HC10}^- \epsilon_{R3}^- \epsilon_{R3^*}^+ - 1)T_{28}(n_{HC10} + 1, n_{R3} + 1, n_{R3^*} - 1 | n_{HC10}, n_{R3}, n_{R3^*}) \\
& +(\epsilon_I^+ \epsilon_{HC8}^- - 1)T_{29}(n_I - 1, n_{HC8} + 1 | n_I, n_{HC8}) \\
& +(\epsilon_I^+ \epsilon_{HC10}^- - 1)T_{30}(n_I - 1, n_{HC10} + 1 | n_I, n_{HC10}) \\
& +(\epsilon_I^+ \epsilon_{C8}^- - 1)T_{31}(n_I - 1, n_{C8} + 1 | n_I, n_{C8}) \Big] P(\mathbf{x}, t). \tag{3.23}
\end{aligned}$$

3.3 Il sistema deterministico

Come accennato in precedenza, l'equazione maestra è esatta ma difficile da risolvere analiticamente. Per procedere con l'analisi possiamo dunque operare con metodi di approssimazione, come lo **sviluppo di van Kampen** [23], che prevede di espandere tutti i termini della master equation (3.23) in $1/\sqrt{V}$, dove V , essendo un parametro che codifica per il volume, si può supporre grande. Come vedremo, questa tecnica ci consentirà di analizzare il ruolo del rumore nel QS, ovvero di monitorare le fluttuazioni attorno al comportamento deterministico. Uno dei passaggi chiave dello sviluppo di van Kampen, infatti, prevede la seguente ipotesi di lavoro:

$$\begin{aligned}
\frac{n_{R1}}{V} &= \phi_{R1} + \frac{\xi_{R1}}{\sqrt{V}}, \\
\frac{n_{R2}}{V} &= \phi_{R2} + \frac{\xi_{R2}}{\sqrt{V}}, \\
\frac{n_{R3}}{V} &= \phi_{R3} + \frac{\xi_{R3}}{\sqrt{V}}, \\
\frac{n_M}{V} &= \phi_M + \frac{\xi_M}{\sqrt{V}},
\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
\frac{n_I}{V} &= \phi_I + \frac{\xi_I}{\sqrt{V}}, \\
\frac{n_{R1*}}{V} &= \phi_{R1*} + \frac{\xi_{R1*}}{\sqrt{V}}, \\
\frac{n_{R2*}}{V} &= \phi_{R2*} + \frac{\xi_{R2*}}{\sqrt{V}}, \\
\frac{n_{R3*}}{V} &= \phi_{R3*} + \frac{\xi_{R3*}}{\sqrt{V}}, \\
\frac{n_{HC8}}{V} &= \phi_{HC8} + \frac{\xi_{HC8}}{\sqrt{V}}, \\
\frac{n_{HC10}}{V} &= \phi_{HC10} + \frac{\xi_{HC10}}{\sqrt{V}}, \\
\frac{n_{C8}}{V} &= \phi_{C8} + \frac{\xi_{C8}}{\sqrt{V}},
\end{aligned} \tag{3.24}$$

dove $\boldsymbol{\phi} = (\phi_{R1}, \phi_{R2}, \phi_{R3}, \phi_M, \phi_I, \phi_{R1*}, \phi_{R2*}, \phi_{R3*}, \phi_{HC8}, \phi_{HC10}, \phi_{C8})$ è il vettore delle variabili deterministiche (o variabili del campo medio) e $\boldsymbol{\xi} = (\xi_{R1}, \xi_{R2}, \xi_{R3}, \xi_M, \xi_I, \xi_{R1*}, \xi_{R2*}, \xi_{R3*}, \xi_{HC8}, \xi_{HC10}, \xi_{C8})$ è il vettore delle variabili stocastiche riscalate di un fattore $1/\sqrt{V}$. Le variabili deterministiche ϕ_i sono legate alle variabili discrete n_i tramite il limite termodinamico, ovvero

$$\lim_{V \rightarrow +\infty} \frac{\langle n_i \rangle}{V} = \phi_i \quad \forall i = 1, \dots, 11 \tag{3.25}$$

dove il simbolo $\langle \cdot \rangle$ indica il valore medio.

L'obiettivo è quindi quello di sostituire nella (3.23) le variabili n_i con i due contributi, quello deterministico e quello stocastico. A tal fine è necessario introdurre una nuova distribuzione di probabilità

$$P(\mathbf{x}, t) \longrightarrow \Pi(\boldsymbol{\xi}, t)$$

e di riscrivere gli operatori passo esplicitando la dipendenza dalle nuove variabili.

A titolo d'esempio, presenteremo lo sviluppo degli operatori passo in 3 casi, quello in cui si ha un unico operatore passo, quello in cui ne agiscono due e quello in cui ne agiscono tre, con l'ovvia estensione a tutti gli altri casi.

Applicando l'operatore passo ϵ_{R1} su una generica funzione $f(n_{R1})$, secondo l'ipotesi di van Kampen (3.24), si ottiene:

$$\epsilon_{R1}^{\pm} f(n_{R1}) = f(n_{R1} \pm 1) = f(V\phi_{R1} + \sqrt{V}\xi_{R1} \pm 1) = f\left[V\phi_{R1} + \sqrt{V}\left(\xi_{R1} \pm \frac{1}{\sqrt{V}}\right)\right],$$

da cui, valutando la f nella nuova variabile, si ottiene:

$$\epsilon_{R1}^{\pm} f(\xi_{R1}) = f\left(\xi_{R1} \pm \frac{1}{\sqrt{V}}\right).$$

Sviluppiamo la funzione f per $\frac{1}{\sqrt{V}}$ piccolo fino al secondo ordine:

$$f\left(\xi_{R1} \pm \frac{1}{\sqrt{V}}\right) \simeq f(\xi_{R1}) \pm \frac{1}{\sqrt{V}} \frac{\partial f(\xi_{R1})}{\partial \xi_{R1}} + \frac{1}{2V} \frac{\partial^2 f(\xi_{R1})}{\partial \xi_{R1}^2}.$$

Tale sviluppo ci consente di riscrivere l'operatore passo esplicitando la dipendenza dalla nuova variabile:

$$\epsilon_{R1}^{\pm} \simeq 1 \pm \frac{1}{\sqrt{V}} \frac{\partial}{\partial \xi_{R1}} + \frac{1}{2V} \frac{\partial^2}{\partial \xi_{R1}^2}. \quad (3.26)$$

In maniera analoga si scrivono gli operatori passo relativi a tutte le altre nuove variabili.

Nel caso, invece, di due operatori passo, come ad esempio $\epsilon_I^+ \epsilon_{C8}^-$, svolgendo un semplice calcolo algebrico e arrestando lo sviluppo all'ordine $\frac{1}{V}$, otteniamo:

$$\epsilon_I^+ \epsilon_{C8}^- \simeq \left(1 + \frac{1}{\sqrt{V}} \frac{\partial}{\partial \xi_I} + \frac{1}{2V} \frac{\partial^2}{\partial \xi_I^2}\right) \left(1 - \frac{1}{\sqrt{V}} \frac{\partial}{\partial \xi_{C8}} + \frac{1}{2V} \frac{\partial^2}{\partial \xi_{C8}^2}\right)$$

da cui si evince

$$\epsilon_I^+ \epsilon_{C8}^- - 1 \simeq \frac{1}{\sqrt{V}} \left(\frac{\partial}{\partial \xi_I} - \frac{\partial}{\partial \xi_{C8}} \right) + \frac{1}{2V} \left(\frac{\partial^2}{\partial \xi_I^2} + \frac{\partial^2}{\partial \xi_{C8}^2} - 2 \frac{\partial}{\partial \xi_I} \frac{\partial}{\partial \xi_{C8}} \right).$$

Nel caso di tre operatori passo, come ad esempio $\epsilon_{C8}^+ \epsilon_{R1}^+ \epsilon_{R1*}^-$, otteniamo:

$$\begin{aligned} & \epsilon_{C8}^+ \epsilon_{R1}^+ \epsilon_{R1*}^- \\ & \simeq \left(1 + \frac{1}{\sqrt{V}} \frac{\partial}{\partial \xi_{C8}} + \frac{1}{2V} \frac{\partial^2}{\partial \xi_{C8}^2}\right) \left(1 + \frac{1}{\sqrt{V}} \frac{\partial}{\partial \xi_{R1}} + \frac{1}{2V} \frac{\partial^2}{\partial \xi_{R1}^2}\right) \left(1 - \frac{1}{\sqrt{V}} \frac{\partial}{\partial \xi_{R1*}} + \frac{1}{2V} \frac{\partial^2}{\partial \xi_{R1*}^2}\right) \end{aligned}$$

da cui

$$\begin{aligned} & \epsilon_{C8}^+ \epsilon_{R1}^+ \epsilon_{R1*}^- - 1 \simeq \frac{1}{\sqrt{V}} \left(\frac{\partial}{\partial \xi_{C8}} + \frac{\partial}{\partial \xi_{R1}} - \frac{\partial}{\partial \xi_{R1*}} \right) + \\ & + \frac{1}{2V} \left(\frac{\partial^2}{\partial \xi_{C8}^2} + \frac{\partial^2}{\partial \xi_{R1}^2} + \frac{\partial^2}{\partial \xi_{R1*}^2} + 2 \frac{\partial}{\partial \xi_{C8}} \frac{\partial}{\partial \xi_{R1}} - 2 \frac{\partial}{\partial \xi_{C8}} \frac{\partial}{\partial \xi_{R1*}} - 2 \frac{\partial}{\partial \xi_{R1}} \frac{\partial}{\partial \xi_{R1*}} \right). \end{aligned}$$

Lavoriamo ora allo sviluppo in serie per $\frac{1}{\sqrt{V}}$ piccolo, fino al primo ordine, dei termini non lineari che compongono l'espressione dei rate α_1 , γ , ρ , δ_1 , δ_2 e δ_3 , usando l'ipotesi (3.24). Per la specie M , e analogamente per tutte le altre, si individuano i seguenti termini ricorrenti:

$$\frac{k_{in}}{k_{in} + \frac{n_M}{V}} = \frac{k_{in}}{k_{in} + \phi_M + \frac{\xi_M}{\sqrt{V}}} \simeq f_{in}^M - \frac{1}{\sqrt{V}} f_{in}^M g_{in}^M \quad (3.27)$$

$$\frac{\frac{n_M}{V}}{k_{att} + \frac{n_M}{V}} = \left(\phi_M + \frac{\xi_M}{\sqrt{V}} \right) \frac{1}{k_{att} + \phi_M + \frac{\xi_M}{\sqrt{V}}} \simeq f_{att}^M + \frac{1}{\sqrt{V}} g_{att}^M (1 - f_{att}^M) \quad (3.28)$$

dove

$$\begin{aligned} f_{in}^M &= \frac{k_{in}}{k_{in} + \phi_M} \\ f_{att}^M &= \frac{\phi_M}{k_{att} + \phi_M} \\ g_{in}^M &= \frac{\xi_M}{k_{in} + \phi_M} \end{aligned}$$

$$g_{att}^M = \frac{\xi_M}{k_{att} + \phi_M}$$

e dove con k_{in} e k_{att} sono state indicate, rispettivamente, le costanti di inibizione e di attivazione denominate con k_i , $i = 1, \dots, 13$, nella tabella 3.1. Poichè i loro valori non sono noti, d'ora in poi assumeremo che tutte le costanti di attivazione ($k_3, k_4, k_6, k_7, k_{10}, k_{12}$ e k_{13}) siano uguali al valore k_{att} e che tutte le costanti di inibizione (k_1, k_2, k_5, k_8, k_9 e k_{11}) abbiano lo stesso valore k_{in} .

Utilizzando gli sviluppi (3.27) e (3.28) si ricavano facilmente i contributi d'interesse per i suddetti rate:

$$\begin{aligned} \alpha_1 &= \rho = \beta_{max} f_{in}^M - \frac{1}{\sqrt{V}} \beta_{max} f_{in}^M g_{in}^M \\ \gamma &= \beta_{max} f_{in}^M (f_{att}^{R1*} + f_{att}^{R2*}) + \frac{1}{\sqrt{V}} \beta_{max} f_{in}^M \left[\left(g_{att}^{R1*} (1 - f_{att}^{R1*}) + g_{att}^{R2*} (1 - f_{att}^{R2*}) \right) - g_{in}^M (f_{att}^{R1*} + f_{att}^{R2*}) \right] \\ \delta_1 &= \beta_{max} (f_{att}^{R1*} + f_{att}^{R3*}) + \frac{1}{\sqrt{V}} \beta_{max} \left[g_{att}^{R1*} (1 - f_{att}^{R1*}) + g_{att}^{R3*} (1 - f_{att}^{R3*}) \right] \\ \delta_2 &= \beta_{max} f_{in}^{R3} f_{in}^{R1} f_{att}^{R2*} + \frac{1}{\sqrt{V}} \beta_{max} \left[f_{in}^{R3} f_{in}^{R1} g_{att}^{R2*} (1 - f_{att}^{R2*}) - f_{in}^{R3} f_{in}^{R1} f_{att}^{R2*} (g_{in}^{R1} + g_{in}^{R3}) \right] \\ \delta_3 &= \beta_{max} f_{in}^{R2} (f_{att}^{R1*} + f_{att}^{R3*}) + \frac{1}{\sqrt{V}} \beta_{max} f_{in}^{R2} \left[\left(g_{att}^{R1*} (1 - f_{att}^{R1*}) + g_{att}^{R3*} (1 - f_{att}^{R3*}) \right) - g_{in}^{R2} (f_{att}^{R1*} + f_{att}^{R3*}) \right]. \end{aligned} \quad (3.29)$$

Per riscrivere la master equation separando i contributi ai vari ordini dobbiamo sviluppare anche il suo membro sinistro. Supponiamo, per fissare le idee, che la nostra funzione di probabilità P dipenda da un'unica specie $n = \phi(t)V + \xi\sqrt{V}$, oltre che dal tempo. Calcoliamo le derivate della nuova funzione di probabilità $\Pi(\xi, t) = P(n(\phi(t), \xi), t)$ rispetto alle due variabili t e ξ :

$$\frac{\partial \Pi}{\partial t} = \frac{\partial P}{\partial t} + \frac{\partial P}{\partial n} \dot{\phi} V,$$

da cui

$$\frac{\partial P}{\partial t} = \frac{\partial \Pi}{\partial t} - \frac{\partial P}{\partial n} \dot{\phi} V. \quad (3.30)$$

D'altra parte

$$\frac{\partial \Pi}{\partial \xi} = \frac{\partial P}{\partial n} \sqrt{V},$$

da cui, moltiplicando ambo i membri per $\dot{\phi} V$, si ricava

$$\frac{\partial P}{\partial n} \dot{\phi} V = \frac{1}{\sqrt{V}} \frac{\partial \Pi}{\partial \xi} \dot{\phi} V.$$

Sostituendo quest'ultima equazione nella (3.30) si perviene al risultato cercato:

$$\frac{\partial P}{\partial t} = \frac{\partial \Pi}{\partial t} - \frac{\partial \Pi}{\partial \xi} \sqrt{V} \dot{\phi}. \quad (3.31)$$

Riprendiamo ora la funzione di probabilità per il modello studiato $P(\mathbf{x}(\phi(t), \boldsymbol{\xi}), t)$ (dove $\mathbf{x}, \phi, \boldsymbol{\xi}$ rappresentavano i vettori relativi alle undici specie del modello) e scriviamo la sua derivata temporale nelle nuove variabili, ricordando l'analisi che ha condotto alla (3.31):

$$\frac{d}{dt}P(\mathbf{x}, t) = \frac{\partial \Pi}{\partial t} - \sum_{i=1}^{11} \frac{\partial \Pi}{\partial \xi_i} \sqrt{V} \dot{\phi}_i.$$

Riscalando il tempo t di un fattore $1/V$, introducendo cioè una nuova variabile tempo $\tau = \frac{t}{V}$, otteniamo l'espressione per il membro sinistro della (3.23), con i contributi opportunamente raggruppati:

$$\begin{aligned} \frac{1}{V} \frac{\partial \Pi}{\partial \tau} - \frac{1}{\sqrt{V}} & \left(\frac{\partial \Pi}{\partial \xi_{R1}} \dot{\phi}_{R1} + \frac{\partial \Pi}{\partial \xi_{R2}} \dot{\phi}_{R2} + \frac{\partial \Pi}{\partial \xi_{R3}} \dot{\phi}_{R3} + \frac{\partial \Pi}{\partial \xi_M} \dot{\phi}_M + \frac{\partial \Pi}{\partial \xi_I} \dot{\phi}_I + \frac{\partial \Pi}{\partial \xi_{R1*}} \dot{\phi}_{R1*} \right. \\ & \left. + \frac{\partial \Pi}{\partial \xi_{R2*}} \dot{\phi}_{R2*} + \frac{\partial \Pi}{\partial \xi_{R3*}} \dot{\phi}_{R3*} + \frac{\partial \Pi}{\partial \xi_{HC8}} \dot{\phi}_{HC8} + \frac{\partial \Pi}{\partial \xi_{HC10}} \dot{\phi}_{HC10} + \frac{\partial \Pi}{\partial \xi_{C8}} \dot{\phi}_{C8} \right). \end{aligned} \quad (3.32)$$

Ricordando l'espressione della master equation (3.23), siamo ora in grado di uguagliare tutti i termini di ordine $1/\sqrt{V}$ appena trovati, al fine di ottenere il sistema deterministico per l'evoluzione accoppiata delle concentrazioni $\phi_i, \forall i = 1, \dots, 11$:

$$\begin{aligned} - \sum_{i=1}^{11} \frac{\partial \Pi}{\partial \xi_i} \dot{\phi}_i = & \left[\frac{\partial}{\partial \xi_{R1}} \left(-\tilde{\alpha}_1 + \mu \phi_{R1} + k1_{on}^{C8} \phi_{C8} \phi_{R1} - k1_{off}^{C8} \phi_{R1*} + k1_{on}^{HC8} \phi_{HC8} \phi_{R1} - k1_{off}^{HC8} \phi_{R1*} \right) \right. \\ & + \frac{\partial}{\partial \xi_{R2}} \left(-\alpha_2 + \mu \phi_{R2} + k2_{on}^{HC10} \phi_{HC10} \phi_{R2} - k2_{off}^{HC10} \phi_{R2*} + k2_{on}^{HC8} \phi_{HC8} \phi_{R2} - k2_{off}^{HC8} \phi_{R2*} \right) \\ & + \frac{\partial}{\partial \xi_{R3}} \left(-\alpha_3 + \mu \phi_{R3} + k3_{on}^{HC8} \phi_{HC8} \phi_{R3} - k3_{off}^{HC8} \phi_{R3*} + k3_{on}^{HC10} \phi_{HC10} \phi_{R3} - k3_{off}^{HC10} \phi_{R3*} \right) \\ & + \frac{\partial}{\partial \xi_M} \left(-\tilde{\gamma} + \mu \phi_M \right) + \frac{\partial}{\partial \xi_I} \left(-\tilde{\rho} + \mu \phi_I + (\tilde{\delta}_1 + \tilde{\delta}_2 + \tilde{\delta}_3) \phi_I \right) \\ & + \frac{\partial}{\partial \xi_{R1*}} \left(\mu \phi_{R1*} - k1_{on}^{C8} \phi_{C8} \phi_{R1} + k1_{off}^{C8} \phi_{R1*} - k1_{on}^{HC8} \phi_{HC8} \phi_{R1} + k1_{off}^{HC8} \phi_{R1*} \right) \\ & + \frac{\partial}{\partial \xi_{R2*}} \left(\mu \phi_{R2*} - k2_{on}^{HC10} \phi_{HC10} \phi_{R2} + k2_{off}^{HC10} \phi_{R2*} - k2_{on}^{HC8} \phi_{HC8} \phi_{R2} + k2_{off}^{HC8} \phi_{R2*} \right) \\ & + \frac{\partial}{\partial \xi_{R3*}} \left(\mu \phi_{R3*} - k3_{on}^{HC8} \phi_{HC8} \phi_{R3} + k3_{off}^{HC8} \phi_{R3*} - k3_{on}^{HC10} \phi_{HC10} \phi_{R3} + k3_{off}^{HC10} \phi_{R3*} \right) \\ & + \frac{\partial}{\partial \xi_{HC8}} \left(\mu \phi_{HC8} + k1_{on}^{HC8} \phi_{HC8} \phi_{R1} - k1_{off}^{HC8} \phi_{R1*} + k2_{on}^{HC8} \phi_{HC8} \phi_{R2} - k2_{off}^{HC8} \phi_{R2*} \right. \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
& + k3_{on}^{HC8} \phi_{HC8} \phi_{R3} - k3_{off}^{HC8} \phi_{R3*} - \tilde{\delta}_1 \phi_I \Big) \\
& + \frac{\partial}{\partial \xi_{HC10}} \left(\mu \phi_{HC10} + k2_{on}^{HC10} \phi_{HC10} \phi_{R2} - k2_{off}^{HC10} \phi_{R2*} + k3_{on}^{HC10} \phi_{HC10} \phi_{R3} - k3_{off}^{HC10} \phi_{R3*} - \tilde{\delta}_2 \phi_I \right) \\
& + \frac{\partial}{\partial \xi_{C8}} \left(\mu \phi_{C8} + k1_{on}^{C8} \phi_{C8} \phi_{R1} - k1_{off}^{C8} \phi_{R1*} - \tilde{\delta}_3 \phi_I \right) \Big] \Pi(\xi, t),
\end{aligned}$$

dove

$$\begin{aligned}
\tilde{\alpha}_1 &= \tilde{\rho} = \frac{\beta_{max} k_{in}}{k_{in} + \phi_M} \\
\tilde{\gamma} &= \beta_{max} \frac{k_{in}}{k_{in} + \phi_M} \left(\frac{\phi_{R1*}}{k_{att} + \phi_{R1*}} + \frac{\phi_{R2*}}{k_{att} + \phi_{R2*}} \right) \\
\tilde{\delta}_1 &= \beta_{max} \left(\frac{\phi_{R1*}}{k_{att} + \phi_{R1*}} + \frac{\phi_{R3*}}{k_{att} + \phi_{R3*}} \right) \\
\tilde{\delta}_2 &= \beta_{max} \frac{k_{in}}{k_{in} + \phi_{R3}} \frac{k_{in}}{k_{in} + \phi_{R1}} \frac{\phi_{R2*}}{k_{att} + \phi_{R2*}} \\
\tilde{\delta}_3 &= \beta_{max} \frac{k_{in}}{k_{in} + \phi_{R2}} \left(\frac{\phi_{R1*}}{k_{att} + \phi_{R1*}} + \frac{\phi_{R3*}}{k_{att} + \phi_{R3*}} \right).
\end{aligned}$$

Separando i contributi associati ad ogni specie otteniamo il seguente **sistema deterministico**:

$$\left\{ \begin{aligned}
\dot{\phi}_{R1} &= \tilde{\alpha}_1 - \mu \phi_{R1} - k1_{on}^{C8} \phi_{C8} \phi_{R1} + k1_{off}^{C8} \phi_{R1*} - k1_{on}^{HC8} \phi_{HC8} \phi_{R1} + k1_{off}^{HC8} \phi_{R1*} \\
\dot{\phi}_{R2} &= \alpha_2 - \mu \phi_{R2} - k2_{on}^{HC10} \phi_{HC10} \phi_{R2} + k2_{off}^{HC10} \phi_{R2*} - k2_{on}^{HC8} \phi_{HC8} \phi_{R2} + k2_{off}^{HC8} \phi_{R2*} \\
\dot{\phi}_{R3} &= \alpha_3 - \mu \phi_{R3} - k3_{on}^{HC8} \phi_{HC8} \phi_{R3} + k3_{off}^{HC8} \phi_{R3*} - k3_{on}^{HC10} \phi_{HC10} \phi_{R3} + k3_{off}^{HC10} \phi_{R3*} \\
\dot{\phi}_M &= \tilde{\gamma} - \mu \phi_M \\
\dot{\phi}_I &= \tilde{\rho} - \mu \phi_I - (\tilde{\delta}_1 + \tilde{\delta}_2 + \tilde{\delta}_3) \phi_I \\
\dot{\phi}_{R1*} &= -\mu \phi_{R1*} + k1_{on}^{C8} \phi_{C8} \phi_{R1} - k1_{off}^{C8} \phi_{R1*} + k1_{on}^{HC8} \phi_{HC8} \phi_{R1} - k1_{off}^{HC8} \phi_{R1*} \\
\dot{\phi}_{R2*} &= -\mu \phi_{R2*} + k2_{on}^{HC10} \phi_{HC10} \phi_{R2} - k2_{off}^{HC10} \phi_{R2*} + k2_{on}^{HC8} \phi_{HC8} \phi_{R2} - k2_{off}^{HC8} \phi_{R2*} \\
\dot{\phi}_{R3*} &= -\mu \phi_{R3*} + k3_{on}^{HC8} \phi_{HC8} \phi_{R3} - k3_{off}^{HC8} \phi_{R3*} + k3_{on}^{HC10} \phi_{HC10} \phi_{R3} - k3_{off}^{HC10} \phi_{R3*} \\
\dot{\phi}_{HC8} &= -\mu \phi_{HC8} - k1_{on}^{HC8} \phi_{HC8} \phi_{R1} + k1_{off}^{HC8} \phi_{R1*} - k2_{on}^{HC8} \phi_{HC8} \phi_{R2} + k2_{off}^{HC8} \phi_{R2*} \\
&\quad - k3_{on}^{HC8} \phi_{HC8} \phi_{R3} + k3_{off}^{HC8} \phi_{R3*} + \tilde{\delta}_1 \phi_I \\
\dot{\phi}_{HC10} &= -\mu \phi_{HC10} - k2_{on}^{HC10} \phi_{HC10} \phi_{R2} + k2_{off}^{HC10} \phi_{R2*} - k3_{on}^{HC10} \phi_{HC10} \phi_{R3} + k3_{off}^{HC10} \phi_{R3*} \\
&\quad + \tilde{\delta}_2 \phi_I \\
\dot{\phi}_{C8} &= -\mu \phi_{C8} - k1_{on}^{C8} \phi_{C8} \phi_{R1} + k1_{off}^{C8} \phi_{R1*} + \tilde{\delta}_3 \phi_I
\end{aligned} \right. \quad (3.33)$$

Si tratta di un sistema di undici equazioni differenziali del primo ordine che permette di

monitorare l'evoluzione delle concentrazioni ϕ_i del modello, $\forall i = 1, \dots, 11$, in ogni istante di tempo.

3.3.1 Fit dei dati sperimentali

Abbiamo usato il sistema deterministico (3.33) per ottenere il fit dei dati sperimentali presentati nella figura 1.2, relativi alle serie temporali delle tre molecole segnale HC8, HC10 e C8.

Per ridurre il numero dei parametri da determinare, oltre ad assegnare alle costanti di attivazione e di inibizione lo stesso valore k_{att} e k_{in} (si veda sezione 3.3), abbiamo fatto un'ulteriore ipotesi. Poichè ognuno dei tre circuiti produce sia molecole segnale primarie che secondarie, abbiamo assegnato alle costanti di associazione e dissociazione primarie i valori noti in letteratura (si veda tabella 3.1), mentre per tutte le altre abbiamo supposto che potessero essere accorpate in due gruppi. In un gruppo abbiamo le costanti di associazione secondarie $k1_{on}^{HC8}$, $k2_{on}^{HC8}$ e $k3_{on}^{HC10}$, mentre nell'altro le costanti di dissociazione secondarie $k1_{off}^{HC8}$, $k2_{off}^{HC8}$ e $k3_{off}^{HC10}$. Riassumendo, per riprodurre i dati sperimentali con il modello deterministico, abbiamo fatto il fit di sei parametri, riassunti in tabella 3.2 insieme ai valori medi ottenuti e alle relative deviazioni standard.

Per eseguire il fit dei sei parametri abbiamo utilizzato un programma in *Matlab* che si basa sul metodo del *Simulated annealing* [24] e in particolare abbiamo preso come funzione obiettivo l'errore quadratico medio e per ciascuna delle tre molecole segnale, definito come

$$e = \frac{\|\mathbf{y}_{\text{num}} - \mathbf{y}_{\text{sper}}\|}{m}$$

dove $\|\mathbf{y}_{\text{num}} - \mathbf{y}_{\text{sper}}\|$ rappresenta la norma euclidea del vettore dato dalla differenza tra i valori numerici $\mathbf{y}_{\text{num}}$ e i valori sperimentali $\mathbf{y}_{\text{sper}}$ delle concentrazioni di ciascuna delle tre molecole segnale e m è il numero degli istanti di tempo in cui esse vengono rilevate. L'errore globale sarà quindi dato dalla media degli errori delle tre molecole.

Si noti che i punti sperimentali sono troppo pochi soprattutto nella prima fase della crescita e quindi è stato necessario interpolare le curve sperimentali in modo da aumentare i punti a disposizione per la stima dell'errore quadratico medio. Per l'interpolazione abbiamo utilizzato la funzione *interp1.m* di *Matlab*.

In figura 3.14 abbiamo infine riportato l'esito del fit per ognuna delle tre molecole segnale. Si può notare un'ottima sovrapposizione tra le simulazioni deterministiche relative a ϕ_{C8} , ϕ_{HC10} e ϕ_{HC8} e le concentrazioni medie rilevate, che abbiamo riportato in figura 3.13 insieme ai tre valori misurati a diversi istanti di tempo.

Una volta determinati i parametri ottimali tramite la procedura di fit appena descritta, abbiamo simulato il sistema deterministico (3.33): le figure 3.15, 3.16, 3.17 e 3.18 mostrano le soluzioni per ciascuna specie del modello deterministico. Sono state accorpate su ciascuna figura quelle soluzioni i cui valori raggiunti dalle concentrazioni hanno un ordine simile, per

Tempo (ore)	[C8] (nmol/L)	[C8] media	[HC10] (nmol/L)	[HC10] media	[HC8] (nmol/L)	[HC8] media
3	1,455274933	0,998548271	3,456206893	3,213793304	0	0
	1,540369881		3,379954078		0	
	0		2,805218943		0	
4,5	2,918183636	3,94659902	51,27571248	52,98544388	4,384276084	4,988025356
	3,222597517		51,45308275		5,547567821	
	5,699015907		56,22753641		5,032232163	
5,5	5,556402568	6,212952167	65,323611	62,55498351	11,10137221	10,78695414
	6,656955675		63,28382704		11,22419395	
	6,425498258		59,05751248		10,03529624	
6,5	8,71075955	8,466162358	59,88859973	58,32861241	33,26501979	31,27360571
	8,976352631		59,17228909		30,60315717	
	7,711374893		55,92494839		29,95264017	
8	9,207541816	8,322073114	48,17161346	47,65066381	26,24901987	31,04971778
	8,335514581		47,10961075		28,53931355	
	7,423162947		47,67076722		38,36081992	
9,5	8,712293764	9,04963088	41,44572137	40,8724243	40,09818153	40,42349544
	9,549275683		41,63371264		41,99845793	
	8,887323193		39,53783888		39,17384686	
10,5	8,17995162	9,590635156	42,3291535	44,65421107	32,19981664	39,82509547
	10,60212066		48,80055419		43,16024682	
	9,98983319		42,83292552		44,11522296	
12	10,92261846	9,052444678	31,618574	36,79676621	48,98076894	42,64154109
	7,303547921		38,02057161		40,1020551	
	8,931167654		40,75115301		38,84179923	

Figura 3.13: dati sperimentali rilevati per le tre molecole segnale a diversi istanti di tempo. Per ciascun tempo sono stati misurati tre valori di concentrazione di cui è stata riportata la media. Tabella presa da [3].

poterle visualizzare bene. Da queste si vede subito che il sistema converge ad un punto di equilibrio stabile

$$\begin{aligned}\phi^* &= (\phi_{R1}^*, \phi_{R2}^*, \phi_{R3}^*, \phi_M^*, \phi_I^*, \phi_{R1*}^*, \phi_{R2*}^*, \phi_{R3*}^*, \phi_{HC8}^*, \phi_{HC10}^*, \phi_{C8}^*) \\ &\simeq (1.77; 6.06; 0.15; 1.21; 0.42; 0.01; 0.02; 0.001; 0.66; 0.38; 0.30).\end{aligned}$$

Dal momento che è stato introdotto anche il modello stocastico è interessante vedere il suo comportamento con i parametri ottenuti tramite il fit dei dati sperimentali. In figura 3.19 è riportato il confronto tra le simulazioni deterministiche e le simulazioni stocastiche ottenute tramite l'algoritmo di Gillespie (si veda sezione 2.3), relative alle tre molecole segnale. Si osservi che le simulazioni di Gillespie oscillano intorno a quelle deterministiche e ovviamente sono rumorose in quanto stocastiche.

Parametri	Media	Deviazione standard
$k_{on}^{HC8}, k_{on}^{HC8}, k_{on}^{HC10}$	0.0553	0.0070
$k_{off}^{HC8}, k_{off}^{HC8}, k_{off}^{HC10}$	9.9418	0.3088
k_{in}	0.2155	0.0186
k_{att}	0.0273	0.0050
α_2	0.3368	0.0407
α_3	0.0105	0.0027

Tabella 3.2: elenco dei parametri del modello ottenuti tramite il fit dei dati sperimentali, con la relativa media e deviazione standard.

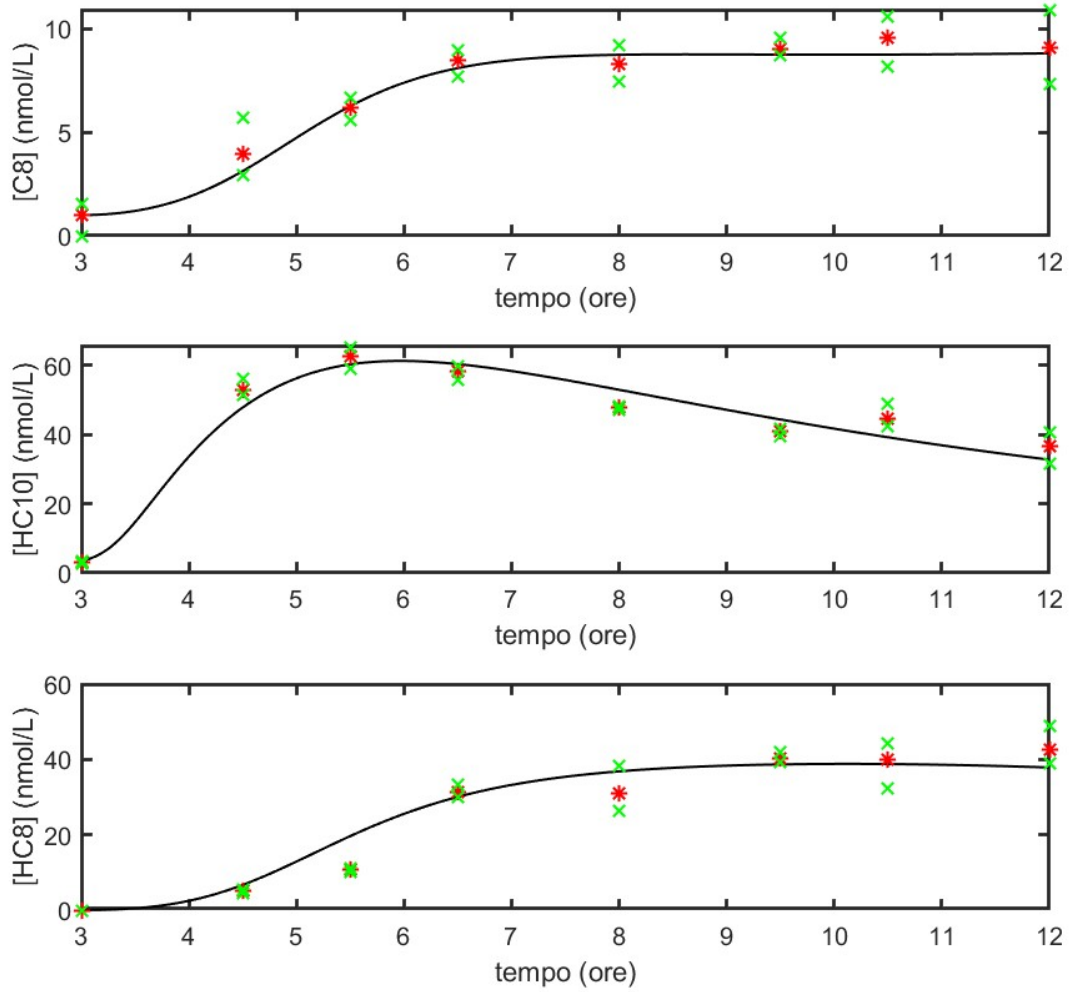


Figura 3.14: risultati dei fit dei dati sperimentali relativi alle tre molecole segnale. Sull'asse delle ordinate [HC8], [HC10] e [C8] indicano le rispettive concentrazioni espresse come molarità, in funzione del tempo. Nei grafici sono stati contrassegnati in rosso le medie e in verde i valori minimi e massimi delle tre misurazioni indipendenti riportate in figura 3.13 e relative alle concentrazioni delle tre molecole segnale in vari istanti temporali. Si noti come le soluzioni deterministiche ϕ_{C8} , ϕ_{HC10} e ϕ_{HC8} (curve nere) si sovrappongano ottimamente alle medie dei dati sperimentali.

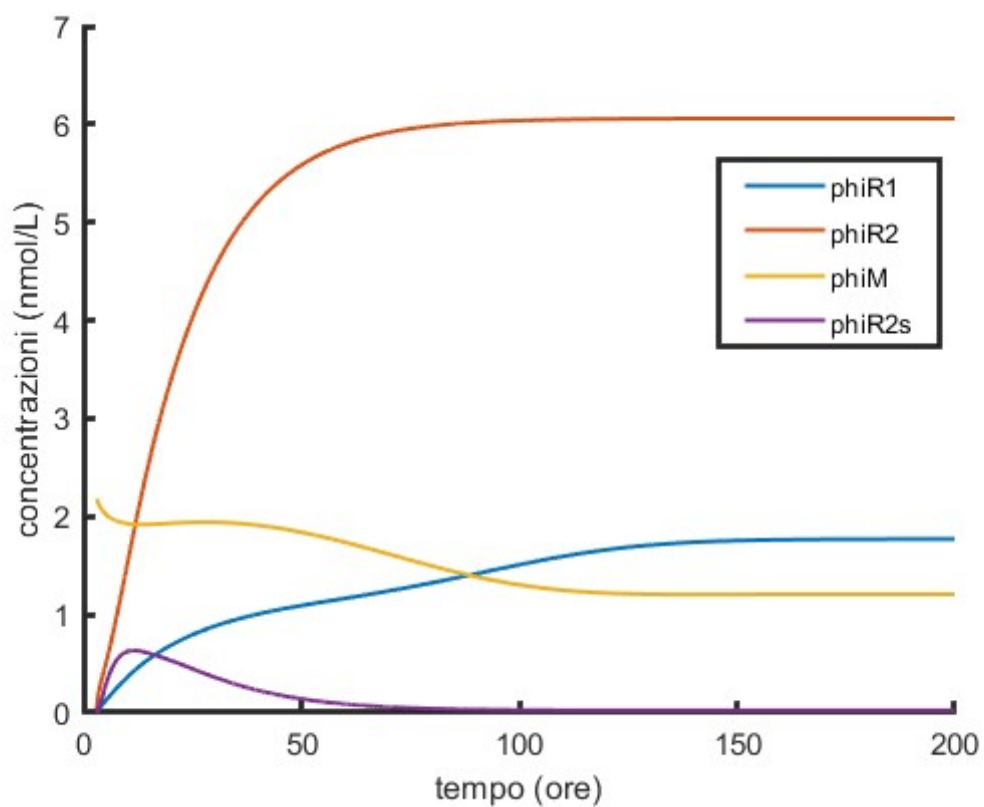


Figura 3.15: simulazioni deterministiche relative a ϕ_{R1} , ϕ_{R2} , ϕ_M e ϕ_{R2s} .

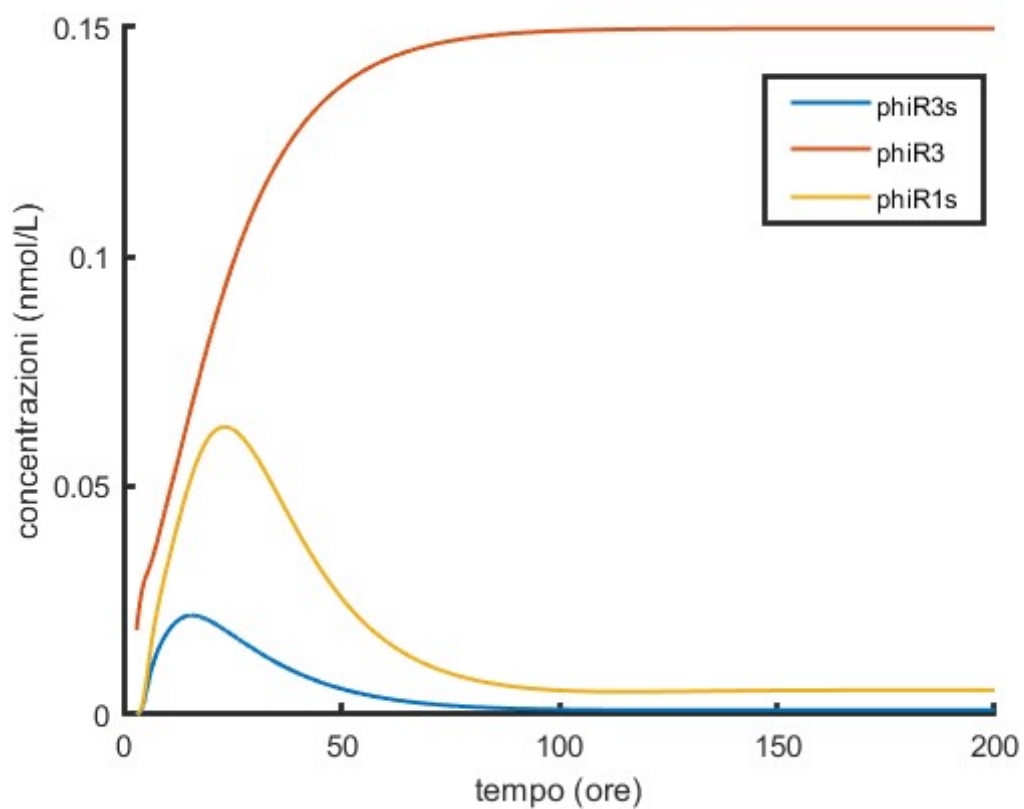


Figura 3.16: simulazioni deterministiche relative a ϕ_{R3s} , ϕ_{R3} e ϕ_{R1s} .

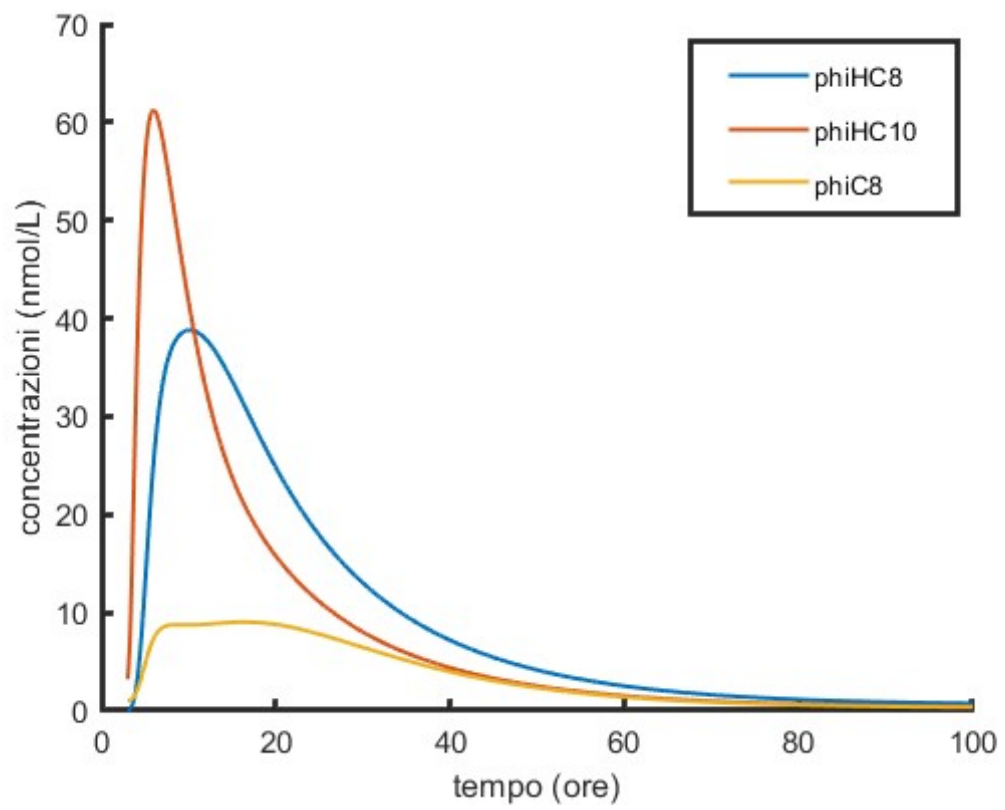


Figura 3.17: simulazioni deterministiche relative a ϕ_{HC8} , ϕ_{HC10} e ϕ_{C8} .

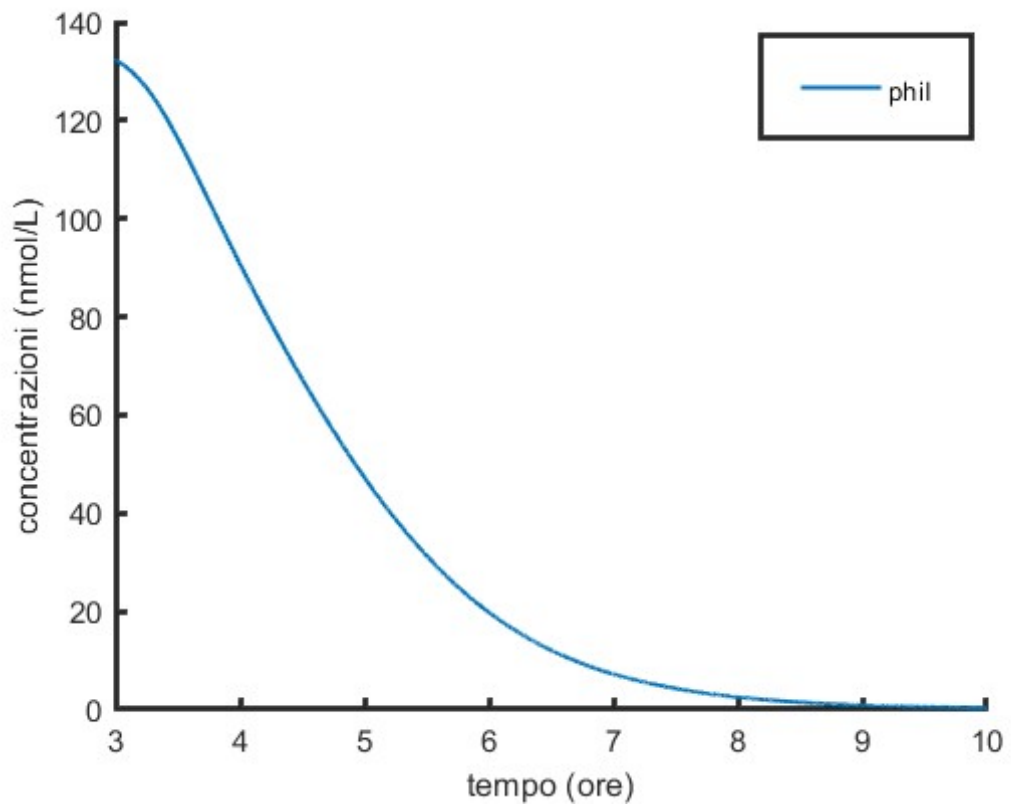


Figura 3.18: simulazioni deterministiche relative a ϕ_I .

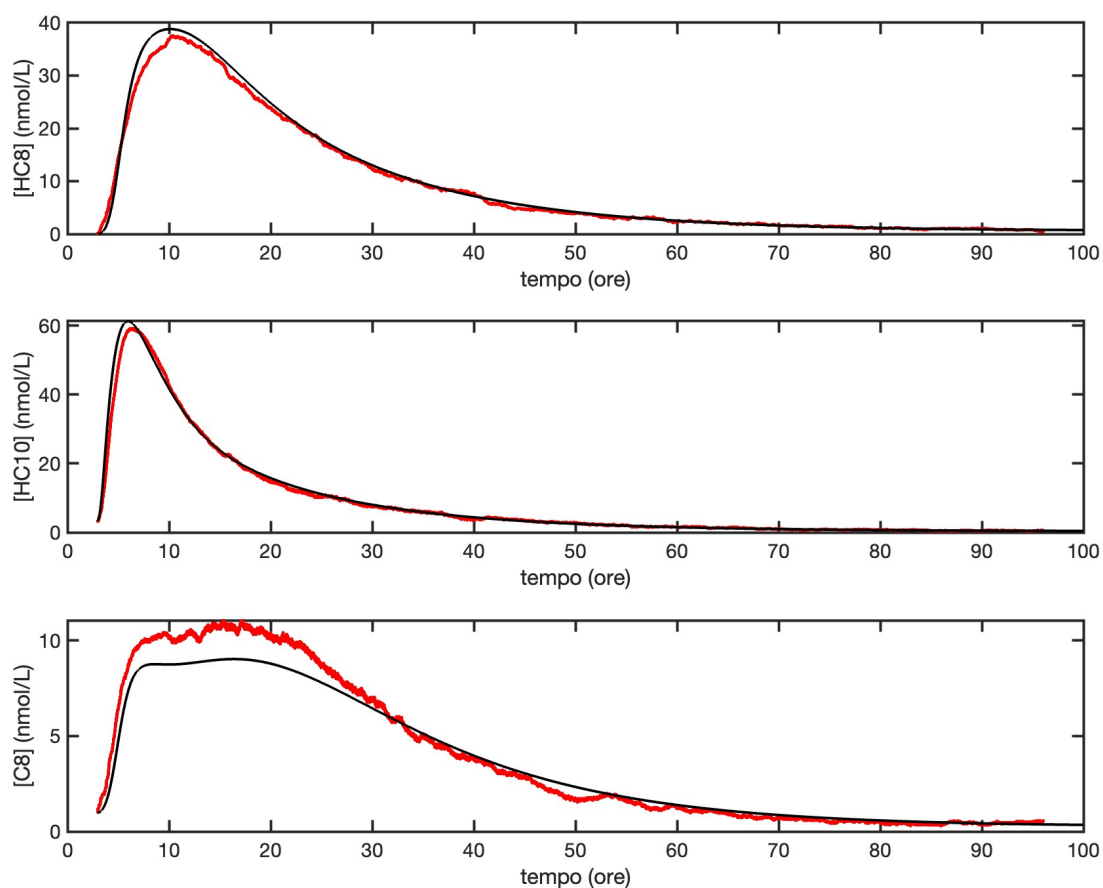


Figura 3.19: grafici relativi alle concentrazioni delle tre molecole segnale al variare del tempo. Essi mostrano l'andamento delle simulazioni stocastiche (quelle in rosso) intorno al campo medio (curve nere). Le simulazioni sono state fatte fissando $V = 50$ e usando come parametri quelli ottenuti dal fit.

3.4 Derivazione dell'equazione di Fokker-Planck

Come abbiamo fatto vedere nel paragrafo precedente, il sistema deterministico per i parametri fissati dai dati sperimentali evolve verso uno stato stazionario ϕ^* . Ci proponiamo in questo paragrafo di derivare le equazioni per studiare le fluttuazioni intorno a tale punto fisso.

A tal fine andiamo a raccogliere nella master equation (3.23) tutti i contributi dell'ordine perturbativo $1/V$ già ricavati nel precedente paragrafo per mezzo dello sviluppo di van Kampen, ricordando per il primo membro la (3.32) e per il secondo membro le relazioni (3.26) e (3.29):

$$\begin{aligned}
\frac{\partial \Pi}{\partial \tau} = & \left[\frac{\partial^2}{\partial \xi_{R1}^2} \frac{1}{2} \left(\tilde{\alpha}_1 + \mu \phi_{R1} + k1_{on}^{C8} \phi_{C8} \phi_{R1} + k1_{off}^{C8} \phi_{R1*} + k1_{on}^{HC8} \phi_{HC8} \phi_{R1} + k1_{off}^{HC8} \phi_{R1*} \right) \right. \\
& + \frac{\partial^2}{\partial \xi_{R2}^2} \frac{1}{2} \left(\alpha_2 + \mu \phi_{R2} + k2_{on}^{HC10} \phi_{HC10} \phi_{R2} + k2_{off}^{HC10} \phi_{R2*} + k2_{on}^{HC8} \phi_{HC8} \phi_{R2} + k2_{off}^{HC8} \phi_{R2*} \right) \\
& + \frac{\partial^2}{\partial \xi_{R3}^2} \frac{1}{2} \left(\alpha_3 + \mu \phi_{R3} + k3_{on}^{HC8} \phi_{HC8} \phi_{R3} + k3_{off}^{HC8} \phi_{R3*} + k3_{on}^{HC10} \phi_{HC10} \phi_{R3} + k3_{off}^{HC10} \phi_{R3*} \right) \\
& + \frac{\partial^2}{\partial \xi_M^2} \frac{1}{2} \left(\tilde{\gamma} + \mu \phi_M \right) + \frac{\partial^2}{\partial \xi_I^2} \frac{1}{2} \left(\tilde{\rho} + \mu \phi_I + (\tilde{\delta}_1 + \tilde{\delta}_2 + \tilde{\delta}_3) \phi_I \right) \\
& + \frac{\partial^2}{\partial \xi_{R1*}^2} \frac{1}{2} \left(\mu \phi_{R1*} + k1_{on}^{C8} \phi_{C8} \phi_{R1} + k1_{off}^{C8} \phi_{R1*} + k1_{on}^{HC8} \phi_{HC8} \phi_{R1} + k1_{off}^{HC8} \phi_{R1*} \right) \\
& + \frac{\partial^2}{\partial \xi_{R2*}^2} \frac{1}{2} \left(\mu \phi_{R2*} + k2_{on}^{HC10} \phi_{HC10} \phi_{R2} + k2_{off}^{HC10} \phi_{R2*} + k2_{on}^{HC8} \phi_{HC8} \phi_{R2} + k2_{off}^{HC8} \phi_{R2*} \right) \\
& + \frac{\partial^2}{\partial \xi_{R3*}^2} \frac{1}{2} \left(\mu \phi_{R3*} + k3_{on}^{HC8} \phi_{HC8} \phi_{R3} + k3_{off}^{HC8} \phi_{R3*} + k3_{on}^{HC10} \phi_{HC10} \phi_{R3} + k3_{off}^{HC10} \phi_{R3*} \right) \\
& + \frac{\partial^2}{\partial \xi_{HC8}^2} \frac{1}{2} \left(\mu \phi_{HC8} + k1_{on}^{HC8} \phi_{HC8} \phi_{R1} + k1_{off}^{HC8} \phi_{R1*} + k2_{on}^{HC8} \phi_{HC8} \phi_{R2} + k2_{off}^{HC8} \phi_{R2*} \right. \\
& \quad \left. + k3_{on}^{HC8} \phi_{HC8} \phi_{R3} + k3_{off}^{HC8} \phi_{R3*} + \tilde{\delta}_1 \phi_I \right) \\
& + \frac{\partial^2}{\partial \xi_{HC10}^2} \frac{1}{2} \left(\mu \phi_{HC10} + k2_{on}^{HC10} \phi_{HC10} \phi_{R2} + k2_{off}^{HC10} \phi_{R2*} + k3_{on}^{HC10} \phi_{HC10} \phi_{R3} + k3_{off}^{HC10} \phi_{R3*} + \tilde{\delta}_2 \phi_I \right) \\
& + \frac{\partial^2}{\partial \xi_{C8}^2} \frac{1}{2} \left(\mu \phi_{C8} + k1_{on}^{C8} \phi_{C8} \phi_{R1} + k1_{off}^{C8} \phi_{R1*} + \tilde{\delta}_3 \phi_I \right) \\
& + \frac{\partial}{\partial \xi_{R1}} \left(\beta_{max} f_{in}^M g_{in}^M + \mu \xi_{R1} + k1_{on}^{C8} (\phi_{C8} \xi_{R1} + \phi_{R1} \xi_{C8}) - k1_{off}^{C8} \xi_{R1*} \right)
\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
& +k1_{on}^{HC8}(\phi_{HC8}\xi_{R1} + \phi_{R1}\xi_{HC8}) - k1_{off}^{HC8}\xi_{R1*}) \\
& + \frac{\partial}{\partial \xi_{R2}} \left(\mu\xi_{R2} + k2_{on}^{HC10}(\phi_{HC10}\xi_{R2} + \phi_{R2}\xi_{HC10}) - k2_{off}^{HC10}\xi_{R2*} \right. \\
& \quad \left. + k2_{on}^{HC8}(\phi_{HC8}\xi_{R2} + \phi_{R2}\xi_{HC8}) - k2_{off}^{HC8}\xi_{R2*} \right) \\
& + \frac{\partial}{\partial \xi_{R3}} \left(\mu\xi_{R3} + k3_{on}^{HC8}(\phi_{HC8}\xi_{R3} + \phi_{R3}\xi_{HC8}) - k3_{off}^{HC8}\xi_{R3*} \right. \\
& \quad \left. + k3_{on}^{HC10}(\phi_{HC10}\xi_{R3} + \phi_{R3}\xi_{HC10}) - k3_{off}^{HC10}\xi_{R3*} \right) \\
& + \frac{\partial}{\partial \xi_M} \left(-\beta_{max}f_{in}^M \left(g_{att}^{R1*}(1 - f_{att}^{R1*}) + g_{att}^{R2*}(1 - f_{att}^{R2*}) - g_{in}^M(f_{att}^{R1*} + f_{att}^{R2*}) \right) + \mu\xi_M \right) \\
& + \frac{\partial}{\partial \xi_I} \left(\beta_{max}f_{in}^M g_{in}^M + \mu\xi_I + \beta_{max}\xi_I(\tilde{\delta}_1 + \tilde{\delta}_2 + \tilde{\delta}_3) + \beta_{max}\phi_I \left(g_{att}^{R1*}(1 - f_{att}^{R1*}) + g_{att}^{R3*}(1 - f_{att}^{R3*}) \right. \right. \\
& \quad \left. \left. + f_{in}^{R3}f_{in}^{R1}g_{att}^{R2*}(1 - f_{att}^{R2*}) - f_{in}^{R3}f_{in}^{R1}f_{att}^{R2*}(g_{in}^{R1} + g_{in}^{R3}) \right. \right. \\
& \quad \left. \left. + f_{in}^{R2}g_{att}^{R1*}(1 - f_{att}^{R1*}) + f_{in}^{R2}g_{att}^{R3*}(1 - f_{att}^{R3*}) - f_{in}^{R2}g_{in}^{R2}(f_{att}^{R1*} + f_{att}^{R3*}) \right) \right) \\
& + \frac{\partial}{\partial \xi_{R1*}} \left(\mu\xi_{R1*} - k1_{on}^{C8}(\phi_{C8}\xi_{R1} + \phi_{R1}\xi_{C8}) + k1_{off}^{C8}\xi_{R1*} - k1_{on}^{HC8}(\phi_{HC8}\xi_{R1} + \phi_{R1}\xi_{HC8}) + k1_{off}^{HC8}\xi_{R1*} \right) \\
& + \frac{\partial}{\partial \xi_{R2*}} \left(\mu\xi_{R2*} - k2_{on}^{HC10}(\phi_{HC10}\xi_{R2} + \phi_{R2}\xi_{HC10}) + k2_{off}^{HC10}\xi_{R2*} \right. \\
& \quad \left. - k2_{on}^{HC8}(\phi_{HC8}\xi_{R2} + \phi_{R2}\xi_{HC8}) + k2_{off}^{HC8}\xi_{R2*} \right) \\
& + \frac{\partial}{\partial \xi_{R3*}} \left(\mu\xi_{R3*} - k3_{on}^{HC8}(\phi_{HC8}\xi_{R3} + \phi_{R3}\xi_{HC8}) + k3_{off}^{HC8}\xi_{R3*} \right. \\
& \quad \left. - k3_{on}^{HC10}(\phi_{HC10}\xi_{R3} + \phi_{R3}\xi_{HC10}) + k3_{off}^{HC10}\xi_{R3*} \right) \\
& + \frac{\partial}{\partial \xi_{HC8}} \left(\mu\xi_{HC8} + k1_{on}^{HC8}(\phi_{HC8}\xi_{R1} + \phi_{R1}\xi_{HC8}) - k1_{off}^{HC8}\xi_{R1*} + k2_{on}^{HC8}(\phi_{HC8}\xi_{R2} + \phi_{R2}\xi_{HC8}) \right. \\
& \quad \left. - k2_{off}^{HC8}\xi_{R2*} + k3_{on}^{HC8}(\phi_{HC8}\xi_{R3} + \phi_{R3}\xi_{HC8}) - k3_{off}^{HC8}\xi_{R3*} - \beta_{max}\xi_I\tilde{\delta}_1 \right. \\
& \quad \left. - \beta_{max}\phi_I \left(g_{att}^{R1*}(1 - f_{att}^{R1*}) + g_{att}^{R3*}(1 - f_{att}^{R3*}) \right) \right)
\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
& + \frac{\partial}{\partial \xi_{HC10}} \left(\mu \xi_{HC10} + k 2_{on}^{HC10} (\phi_{HC10} \xi_{R2} + \phi_{R2} \xi_{HC10}) - k 2_{off}^{HC10} \xi_{R2^*} + k 3_{on}^{HC10} (\phi_{HC10} \xi_{R3} + \phi_{R3} \xi_{HC10}) \right. \\
& \quad \left. - k 3_{off}^{HC10} \xi_{R3^*} - \beta_{max} \xi_I \tilde{\delta}_2 - \beta_{max} \phi_I \left(f_{in}^{R3} f_{in}^{R1} g_{att}^{R2^*} (1 - f_{att}^{R2^*}) - f_{in}^{R3} f_{in}^{R1} f_{att}^{R2^*} (g_{in}^{R1} + g_{in}^{R3}) \right) \right) \\
& + \frac{\partial}{\partial \xi_{C8}} \left(\mu \xi_{C8} + k 1_{on}^{C8} (\phi_{C8} \xi_{R1} + \phi_{R1} \xi_{C8}) - k 1_{off}^{C8} \xi_{R1^*} - \beta_{max} \xi_I \tilde{\delta}_3 - \beta_{max} \phi_I \left(f_{in}^{R2} g_{att}^{R1^*} (1 - f_{att}^{R1^*}) \right. \right. \\
& \quad \left. \left. + f_{in}^{R2} g_{att}^{R3^*} (1 - f_{att}^{R3^*}) - f_{in}^{R2} g_{in}^{R2} (f_{att}^{R1^*} + f_{att}^{R3^*}) \right) \right) \\
& + \left(\frac{\partial}{\partial \xi_{C8}} \frac{\partial}{\partial \xi_{R1}} - \frac{\partial}{\partial \xi_{C8}} \frac{\partial}{\partial \xi_{R1^*}} - \frac{\partial}{\partial \xi_{R1}} \frac{\partial}{\partial \xi_{R1^*}} \right) k 1_{on}^{C8} \phi_{C8} \phi_{R1} \\
& + \left(\frac{\partial}{\partial \xi_{C8}} \frac{\partial}{\partial \xi_{R1}} - \frac{\partial}{\partial \xi_{C8}} \frac{\partial}{\partial \xi_{R1^*}} - \frac{\partial}{\partial \xi_{R1}} \frac{\partial}{\partial \xi_{R1^*}} \right) k 1_{off}^{C8} \phi_{R1^*} \\
& + \left(\frac{\partial}{\partial \xi_{HC8}} \frac{\partial}{\partial \xi_{R1}} - \frac{\partial}{\partial \xi_{HC8}} \frac{\partial}{\partial \xi_{R1^*}} - \frac{\partial}{\partial \xi_{R1}} \frac{\partial}{\partial \xi_{R1^*}} \right) k 1_{on}^{HC8} \phi_{HC8} \phi_{R1} \\
& + \left(\frac{\partial}{\partial \xi_{HC8}} \frac{\partial}{\partial \xi_{R1}} - \frac{\partial}{\partial \xi_{HC8}} \frac{\partial}{\partial \xi_{R1^*}} - \frac{\partial}{\partial \xi_{R1}} \frac{\partial}{\partial \xi_{R1^*}} \right) k 1_{off}^{HC8} \phi_{R1^*} \\
& + \left(\frac{\partial}{\partial \xi_{HC10}} \frac{\partial}{\partial \xi_{R2}} - \frac{\partial}{\partial \xi_{HC10}} \frac{\partial}{\partial \xi_{R2^*}} - \frac{\partial}{\partial \xi_{R2}} \frac{\partial}{\partial \xi_{R2^*}} \right) k 2_{on}^{HC10} \phi_{HC10} \phi_{R2} \\
& + \left(\frac{\partial}{\partial \xi_{HC10}} \frac{\partial}{\partial \xi_{R2}} - \frac{\partial}{\partial \xi_{HC10}} \frac{\partial}{\partial \xi_{R2^*}} - \frac{\partial}{\partial \xi_{R2}} \frac{\partial}{\partial \xi_{R2^*}} \right) k 2_{off}^{HC10} \phi_{R2^*} \\
& + \left(\frac{\partial}{\partial \xi_{HC8}} \frac{\partial}{\partial \xi_{R2}} - \frac{\partial}{\partial \xi_{HC8}} \frac{\partial}{\partial \xi_{R2^*}} - \frac{\partial}{\partial \xi_{R2}} \frac{\partial}{\partial \xi_{R2^*}} \right) k 2_{on}^{HC8} \phi_{HC8} \phi_{R2} \\
& + \left(\frac{\partial}{\partial \xi_{HC8}} \frac{\partial}{\partial \xi_{R2}} - \frac{\partial}{\partial \xi_{HC8}} \frac{\partial}{\partial \xi_{R2^*}} - \frac{\partial}{\partial \xi_{R2}} \frac{\partial}{\partial \xi_{R2^*}} \right) k 2_{off}^{HC8} \phi_{R2^*} \\
& + \left(\frac{\partial}{\partial \xi_{HC8}} \frac{\partial}{\partial \xi_{R3}} - \frac{\partial}{\partial \xi_{HC8}} \frac{\partial}{\partial \xi_{R3^*}} - \frac{\partial}{\partial \xi_{R3}} \frac{\partial}{\partial \xi_{R3^*}} \right) k 3_{on}^{HC8} \phi_{HC8} \phi_{R3} \\
& + \left(\frac{\partial}{\partial \xi_{HC8}} \frac{\partial}{\partial \xi_{R3}} - \frac{\partial}{\partial \xi_{HC8}} \frac{\partial}{\partial \xi_{R3^*}} - \frac{\partial}{\partial \xi_{R3}} \frac{\partial}{\partial \xi_{R3^*}} \right) k 3_{off}^{HC8} \phi_{R3^*} \\
& + \left(\frac{\partial}{\partial \xi_{HC10}} \frac{\partial}{\partial \xi_{R3}} - \frac{\partial}{\partial \xi_{HC10}} \frac{\partial}{\partial \xi_{R3^*}} - \frac{\partial}{\partial \xi_{R3}} \frac{\partial}{\partial \xi_{R3^*}} \right) k 3_{on}^{HC10} \phi_{HC10} \phi_{R3} \\
& + \left(\frac{\partial}{\partial \xi_{HC10}} \frac{\partial}{\partial \xi_{R3}} - \frac{\partial}{\partial \xi_{HC10}} \frac{\partial}{\partial \xi_{R3^*}} - \frac{\partial}{\partial \xi_{R3}} \frac{\partial}{\partial \xi_{R3^*}} \right) k 3_{off}^{HC10} \phi_{R3^*} \\
& - \left(\frac{\partial}{\partial \xi_I} \frac{\partial}{\partial \xi_{HC8}} \right) \tilde{\delta}_1 \phi_I - \left(\frac{\partial}{\partial \xi_I} \frac{\partial}{\partial \xi_{HC10}} \right) \tilde{\delta}_2 \phi_I \\
& - \left(\frac{\partial}{\partial \xi_I} \frac{\partial}{\partial \xi_{C8}} \right) \tilde{\delta}_3 \phi_I \Big] \Pi(\boldsymbol{\xi}, t), \tag{3.34}
\end{aligned}$$

dove valgono le stesse denominazioni utilizzate nel paragrafo precedente.

Per favorire l'analisi delle fluttuazioni stocastiche è possibile organizzare tutti i termini della (3.34) nella seguente **equazione di Fokker-Planck**:

$$\frac{\partial \Pi}{\partial \tau} = - \sum_{i=1}^{11} \frac{\partial}{\partial \xi_i} (A_i \Pi) + \frac{1}{2} \sum_{i,j=1}^{11} \frac{\partial^2}{\partial \xi_i \partial \xi_j} (B_{i,j} \Pi) \quad (3.35)$$

dove A è un vettore e B è una matrice simmetrica. Le componenti del vettore A assumono la seguente forma:

$$A_i = \sum_{j=1}^{11} M_{i,j} \xi_j, \quad \forall i = 1, \dots, 11 \quad (3.36)$$

dove la matrice M , di dimensioni 11×11 , ha le seguenti componenti non nulle:

$$\begin{aligned} M_{1,1} &= -\mu - k1_{on}^{C8} \phi_{C8}^* - k1_{on}^{HC8} \phi_{HC8}^* \\ M_{1,4} &= -\beta_{max} f_{in}^M \frac{1}{k_{in} + \phi_M^*} \\ M_{1,6} &= k1_{off}^{C8} + k1_{off}^{HC8} \\ M_{1,9} &= -k1_{on}^{HC8} \phi_{R1}^* \\ M_{1,11} &= -k1_{on}^{C8} \phi_{R1}^* \\ \\ M_{2,2} &= -\mu - k2_{on}^{HC10} \phi_{HC10}^* - k2_{on}^{HC8} \phi_{HC8}^* \\ M_{2,7} &= k2_{off}^{HC10} + k2_{off}^{HC8} \\ M_{2,9} &= -k2_{on}^{HC8} \phi_{R2}^* \\ M_{2,10} &= -k2_{on}^{HC10} \phi_{R2}^* \\ \\ M_{3,3} &= -\mu - k3_{on}^{HC8} \phi_{HC8}^* - k3_{on}^{HC10} \phi_{HC10}^* \\ M_{3,8} &= k3_{off}^{HC8} + k3_{off}^{HC10} \\ M_{3,9} &= -k3_{on}^{HC8} \phi_{R3}^* \\ M_{3,10} &= -k3_{on}^{HC10} \phi_{R3}^* \end{aligned}$$

$$M_{4,4} = -\beta_{max} \frac{f_{in}^M}{k_{in} + \phi_M^*} (f_{att}^{R1*} + f_{att}^{R2*}) - \mu$$

$$M_{4,6} = \beta_{max} \frac{f_{in}^M}{k_{att} + \phi_{R1*}^*} (1 - f_{att}^{R1*})$$

$$M_{4,7} = \beta_{max} \frac{f_{in}^M}{k_{att} + \phi_{R2*}^*} (1 - f_{att}^{R2*})$$

$$M_{5,1} = \beta_{max} \phi_I^* f_{in}^{R3} f_{in}^{R1} \frac{f_{att}^{R2*}}{k_{in} + \phi_{R1}^*}$$

$$M_{5,2} = \beta_{max} \phi_I^* \frac{f_{in}^{R2}}{k_{in} + \phi_{R2}^*} (f_{att}^{R1*} + f_{att}^{R3*})$$

$$M_{5,3} = \beta_{max} \phi_I^* f_{in}^{R3} f_{in}^{R1} \frac{f_{att}^{R2*}}{k_{in} + \phi_{R3}^*}$$

$$M_{5,4} = -\beta_{max} \frac{f_{in}^M}{k_{in} + \phi_M^*}$$

$$M_{5,5} = -\mu - \beta_{max} (\tilde{\delta}_1 + \tilde{\delta}_2 + \tilde{\delta}_3)$$

$$M_{5,6} = -\beta_{max} \frac{\phi_I^*}{k_{att} + \phi_{R1*}^*} (1 - f_{att}^{R1*}) - \beta_{max} \phi_I^* \frac{f_{in}^{R2}}{k_{att} + \phi_{R1*}^*} (1 - f_{att}^{R1*})$$

$$M_{5,7} = -\beta_{max} \phi_I^* f_{in}^{R3} \frac{f_{in}^{R1}}{k_{att} + \phi_{R2*}^*} (1 - f_{att}^{R2*})$$

$$M_{5,8} = -\beta_{max} \frac{\phi_I^*}{k_{att} + \phi_{R3*}^*} (1 - f_{att}^{R3*}) - \beta_{max} \phi_I^* \frac{f_{in}^{R2}}{k_{att} + \phi_{R3*}^*} (1 - f_{att}^{R3*})$$

$$M_{6,1} = k1_{on}^{C8} \phi_{C8}^* + k1_{on}^{HC8} \phi_{HC8}^*$$

$$M_{6,6} = -\mu - k1_{off}^{C8} - k1_{off}^{HC8}$$

$$M_{6,9} = k1_{on}^{HC8} \phi_{R1}^*$$

$$M_{6,11} = k1_{on}^{C8} \phi_{R1}^*$$

$$M_{7,2} = k2_{on}^{HC10} \phi_{HC10}^* + k2_{on}^{HC8} \phi_{HC8}^*$$

$$M_{7,7} = -\mu - k2_{off}^{HC10} - k2_{off}^{HC8}$$

$$M_{7,9} = k2_{on}^{HC8} \phi_{R2}^*$$

$$M_{7,10} = k2_{on}^{HC10} \phi_{R2}^*$$

$$M_{8,3} = k3_{on}^{HC8} \phi_{HC8}^* + k3_{on}^{HC10} \phi_{HC10}^*$$

$$M_{8,8} = -\mu - k3_{off}^{HC8} - k3_{off}^{HC10}$$

$$M_{8,9} = k3_{on}^{HC8} \phi_{R3}^*$$

$$M_{8,10} = k3_{on}^{HC10} \phi_{R3}^*$$

$$M_{9,1} = -k1_{on}^{HC8} \phi_{HC8}^*$$

$$M_{9,2} = -k2_{on}^{HC8} \phi_{HC8}^*$$

$$M_{9,3} = -k3_{on}^{HC8} \phi_{HC8}^*$$

$$M_{9,5} = \beta_{max} \tilde{\delta}_1$$

$$M_{9,6} = k1_{off}^{HC8} + \beta_{max} \frac{\phi_I^*}{k_{att} + \phi_{R1}^*} (1 - f_{att}^{R1*})$$

$$M_{9,7} = k2_{off}^{HC8}$$

$$M_{9,8} = k3_{off}^{HC8} + \beta_{max} \frac{\phi_I^*}{k_{att} + \phi_{R3}^*} (1 - f_{att}^{R3*})$$

$$M_{9,9} = -\mu - k1_{on}^{HC8} \phi_{R1}^* - k2_{on}^{HC8} \phi_{R2}^* - k3_{on}^{HC8} \phi_{R3}^*$$

$$M_{10,1} = -\beta_{max} \phi_I^* f_{in}^{R3} f_{in}^{R1} \frac{f_{att}^{R2*}}{k_{in} + \phi_{R1}^*}$$

$$M_{10,2} = -k2_{on}^{HC10} \phi_{HC10}^*$$

$$M_{10,3} = -k3_{on}^{HC10} \phi_{HC10}^* - \beta_{max} \phi_I^* f_{in}^{R3} f_{in}^{R1} \frac{f_{att}^{R2*}}{k_{in} + \phi_{R3}^*}$$

$$M_{10,5} = \beta_{max} \tilde{\delta}_2$$

$$M_{10,7} = k2_{off}^{HC10} + \beta_{max} \phi_I^* f_{in}^{R3} \frac{f_{in}^{R1}}{k_{att} + \phi_{R2}^*} (1 - f_{att}^{R2*})$$

$$M_{10,8} = k3_{off}^{HC10}$$

$$M_{10,10} = -\mu - k2_{on}^{HC10} \phi_{R2}^* - k3_{on}^{HC10} \phi_{R3}^*$$

$$M_{11,1} = -k1_{on}^{C8} \phi_{C8}^*$$

$$M_{11,2} = -\beta_{max} \phi_I^* \frac{f_{in}^{R2}}{k_{in} + \phi_{R2}^*} (f_{att}^{R1*} + f_{att}^{R3*})$$

$$M_{11,5} = \beta_{max} \tilde{\delta}_3$$

$$M_{11,6} = k1_{off}^{C8} + \beta_{max} \phi_I^* \frac{f_{in}^{R2}}{k_{att} + \phi_{R1}^*} (1 - f_{att}^{R1*})$$

$$M_{11,8} = \beta_{max} \phi_I^* \frac{f_{in}^{R2}}{k_{att} + \phi_{R3}^*} (1 - f_{att}^{R3*})$$

$$M_{11,11} = -\mu - k1_{on}^{C8} \phi_{R1}^*$$

Ora andiamo a scrivere le componenti non nulle della matrice B , tenendo conto che $B_{i,j} = B_{j,i} \forall i, j = 1, \dots, 11, i \neq j$:

$$B_{1,1} = \tilde{\alpha}_1 + \mu\phi_{R1}^* + k1_{on}^{C8}\phi_{C8}^*\phi_{R1}^* + k1_{off}^{C8}\phi_{R1}^* + k1_{on}^{HC8}\phi_{HC8}^*\phi_{R1}^* + k1_{off}^{HC8}\phi_{R1}^*$$

$$B_{1,6} = -k1_{on}^{C8}\phi_{C8}^*\phi_{R1}^* - k1_{off}^{C8}\phi_{R1}^* - k1_{on}^{HC8}\phi_{HC8}^*\phi_{R1}^* - k1_{off}^{HC8}\phi_{R1}^*$$

$$B_{1,9} = k1_{on}^{HC8}\phi_{HC8}^*\phi_{R1}^* + k1_{off}^{HC8}\phi_{R1}^*$$

$$B_{1,11} = k1_{on}^{C8}\phi_{C8}^*\phi_{R1}^* + k1_{off}^{C8}\phi_{R1}^*$$

$$B_{2,2} = \alpha_2 + \mu\phi_{R2}^* + k2_{on}^{HC10}\phi_{HC10}^*\phi_{R2}^* + k2_{off}^{HC10}\phi_{R2}^* + k2_{on}^{HC8}\phi_{HC8}^*\phi_{R2}^* + k2_{off}^{HC8}\phi_{R2}^*$$

$$B_{2,7} = -k2_{on}^{HC10}\phi_{HC10}^*\phi_{R2}^* - k2_{off}^{HC10}\phi_{R2}^* - k2_{on}^{HC8}\phi_{HC8}^*\phi_{R2}^* - k2_{off}^{HC8}\phi_{R2}^*$$

$$B_{2,9} = k2_{on}^{HC8}\phi_{HC8}^*\phi_{R2}^* + k2_{off}^{HC8}\phi_{R2}^*$$

$$B_{2,10} = k2_{on}^{HC10}\phi_{HC10}^*\phi_{R2}^* + k2_{off}^{HC10}\phi_{R2}^*$$

$$B_{3,3} = \alpha_3 + \mu\phi_{R3}^* + k3_{on}^{HC8}\phi_{HC8}^*\phi_{R3}^* + k3_{off}^{HC8}\phi_{R3}^* + k3_{on}^{HC10}\phi_{HC10}^*\phi_{R3}^* + k3_{off}^{HC10}\phi_{R3}^*$$

$$B_{3,8} = -k3_{on}^{HC8}\phi_{HC8}^*\phi_{R3}^* - k3_{off}^{HC8}\phi_{R3}^* - k3_{on}^{HC10}\phi_{HC10}^*\phi_{R3}^* - k3_{off}^{HC10}\phi_{R3}^*$$

$$B_{3,9} = k3_{on}^{HC8}\phi_{HC8}^*\phi_{R3}^* + k3_{off}^{HC8}\phi_{R3}^*$$

$$B_{3,10} = k3_{on}^{HC10}\phi_{HC10}^*\phi_{R3}^* + k3_{off}^{HC10}\phi_{R3}^*$$

$$B_{4,4} = \tilde{\gamma} + \mu\phi_M^*$$

$$B_{5,5} = \tilde{\rho} + \mu\phi_I^* + (\tilde{\delta}_1 + \tilde{\delta}_2 + \tilde{\delta}_3)\phi_I^*$$

$$B_{5,9} = -\tilde{\delta}_1\phi_I^*$$

$$B_{5,10} = -\tilde{\delta}_2\phi_I^*$$

$$B_{5,11} = -\tilde{\delta}_3\phi_I^*$$

$$B_{6,6} = \mu\phi_{R1}^* + k1_{on}^{C8}\phi_{C8}^*\phi_{R1}^* + k1_{off}^{C8}\phi_{R1}^* + k1_{on}^{HC8}\phi_{HC8}^*\phi_{R1}^* + k1_{off}^{HC8}\phi_{R1}^*$$

$$B_{6,9} = -k1_{on}^{HC8}\phi_{HC8}^*\phi_{R1}^* - k1_{off}^{HC8}\phi_{R1}^*$$

$$B_{6,11} = -k1_{on}^{C8}\phi_{C8}^*\phi_{R1}^* - k1_{off}^{C8}\phi_{R1}^*$$

$$B_{7,7} = \mu\phi_{R2}^* + k2_{on}^{HC10}\phi_{HC10}^*\phi_{R2}^* + k2_{off}^{HC10}\phi_{R2}^* + k2_{on}^{HC8}\phi_{HC8}^*\phi_{R2}^* + k2_{off}^{HC8}\phi_{R2}^*$$

$$B_{7,9} = -k2_{on}^{HC8}\phi_{HC8}^*\phi_{R2}^* - k2_{off}^{HC8}\phi_{R2}^*$$

$$B_{7,10} = -k2_{on}^{HC10}\phi_{HC10}^*\phi_{R2}^* - k2_{off}^{HC10}\phi_{R2}^*$$

$$B_{8,8} = \mu\phi_{R3}^* + k3_{on}^{HC8}\phi_{HC8}^*\phi_{R3}^* + k3_{off}^{HC8}\phi_{R3}^* + k3_{on}^{HC10}\phi_{HC10}^*\phi_{R3}^* + k3_{off}^{HC10}\phi_{R3}^*$$

$$B_{8,9} = -k3_{on}^{HC8}\phi_{HC8}^*\phi_{R3}^* - k3_{off}^{HC8}\phi_{R3}^*$$

$$B_{8,10} = -k3_{on}^{HC10}\phi_{HC10}^*\phi_{R3}^* - k3_{off}^{HC10}\phi_{R3}^*$$

$$B_{9,9} = \mu\phi_{HC8}^* + k1_{on}^{HC8}\phi_{HC8}^*\phi_{R1}^* + k1_{off}^{HC8}\phi_{R1}^* + k2_{on}^{HC8}\phi_{HC8}^*\phi_{R2}^* + k2_{off}^{HC8}\phi_{R2}^* \\ + k3_{on}^{HC8}\phi_{HC8}^*\phi_{R3}^* + k3_{off}^{HC8}\phi_{R3}^* + \tilde{\delta}_1\phi_I^*$$

$$B_{10,10} = \mu\phi_{HC10}^* + k2_{on}^{HC10}\phi_{HC10}^*\phi_{R2}^* + k2_{off}^{HC10}\phi_{R2}^* + k3_{on}^{HC10}\phi_{HC10}^*\phi_{R3}^* + k3_{off}^{HC10}\phi_{R3}^* + \tilde{\delta}_2\phi_I^*$$

$$B_{11,11} = \mu\phi_{C8}^* + k1_{on}^{C8}\phi_{C8}^*\phi_{R1}^* + k1_{off}^{C8}\phi_{R1}^* + \tilde{\delta}_3\phi_I^*$$

Nel prossimo capitolo utilizzeremo l'equazione di Fokker-Planck (3.35) per studiare il ruolo delle fluttuazioni nella regolazione delle molecole segnale HC8, HC10 e C8.

Capitolo 4

Il ruolo delle fluttuazioni

In quest'ultimo capitolo ci proponiamo di analizzare il ruolo delle fluttuazioni nei tre circuiti QS del batterio *Burkholderia thailandensis*. A tal fine, partendo dall'equazione di Fokker-Planck ricavata nel precedente capitolo, andremo a scrivere l'equazione per i momenti secondi della distribuzione di probabilità Π . Andremo poi a calcolare il coefficiente di variazione teorico, andando a risolvere lo stato stazionario dei momenti secondi delle fluttuazioni. Basandoci sulle simulazioni numeriche dell'algoritmo di Gillespie presentato nel secondo capitolo, confronteremo infine il coefficiente di variazione teorico con quello calcolato con le simulazioni. Lo scopo è quello di investigare il coefficiente di variazione in relazione ai parametri ottenuti con la procedura di fit.

4.1 Equazioni per i momenti secondi

L'equazione (3.35) può essere risolta esplicitamente ottenendo come distribuzione di probabilità $\Pi(\boldsymbol{\xi}, t)$ una curva gaussiana, definita completamente dai suoi momenti primi e secondi. Si osservi che dall'ipotesi di van Kampen (3.24) e dalla definizione di limite termodinamico (3.25) segue immediatamente che, in fase stazionaria, tutti i momenti primi delle fluttuazioni $\langle \xi_i \rangle$, con $i = 1, \dots, 11$, sono nulli.

Per caratterizzare i momenti secondi della distribuzione, invece, moltiplichiamo ambo i membri della (3.35) per $\xi_k \xi_l$, $\forall k, l = 1, \dots, 11$, e integriamo rispetto a $\boldsymbol{\xi}$:

$$\int_{\mathbb{R}^n} \xi_k \xi_l \frac{\partial \Pi}{\partial \tau} d\boldsymbol{\xi} = - \int_{\mathbb{R}^n} \xi_k \xi_l \sum_{i=1}^{11} \frac{\partial}{\partial \xi_i} (A_i \Pi) d\boldsymbol{\xi} + \frac{1}{2} \int_{\mathbb{R}^n} \xi_k \xi_l \sum_{i,j=1}^{11} \frac{\partial^2}{\partial \xi_i \partial \xi_j} (B_{i,j} \Pi) d\boldsymbol{\xi} \quad (4.37)$$

Analizziamo separatamente i tre integrali della (4.37).

Ricordando la definizione di momento secondo

$$\int_{\mathbb{R}^n} \xi_k \xi_l \Pi d\boldsymbol{\xi} = \langle \xi_k \xi_l \rangle, \quad (4.38)$$

dove $\langle \xi_k \xi_l \rangle$ è il valore medio delle fluttuazioni $\xi_k \xi_l$, il primo integrale diventa

$$\int_{\mathbb{R}^n} \xi_k \xi_l \frac{\partial \Pi}{\partial \tau} d\boldsymbol{\xi} = \frac{d}{d\tau} \int_{\mathbb{R}^n} \xi_k \xi_l \Pi d\boldsymbol{\xi} = \frac{d}{d\tau} \langle \xi_k \xi_l \rangle.$$

Per quanto riguarda il secondo integrale si noti che, integrando per parti, sopravvivono solo i termini della somma corrispondenti a $i = k$ e $i = l$:

$$\begin{aligned} \int_{\mathbb{R}^n} \xi_k \xi_l \sum_{i=1}^{11} \frac{\partial}{\partial \xi_i} (A_i \Pi) d\boldsymbol{\xi} &= \int_{\mathbb{R}^n} \xi_k \xi_l \left(\frac{\partial}{\partial \xi_k} (A_k \Pi) + \frac{\partial}{\partial \xi_l} (A_l \Pi) \right) d\boldsymbol{\xi} \\ &= \xi_k \xi_l A_k \Pi \Big|_{\mathbb{R}^n} - \int_{\mathbb{R}^n} \xi_l A_k \Pi d\boldsymbol{\xi} + \xi_k \xi_l A_l \Pi \Big|_{\mathbb{R}^n} - \int_{\mathbb{R}^n} \xi_k A_l \Pi d\boldsymbol{\xi}. \end{aligned}$$

Per come è fatta Π , i termini valutati in $\mathbb{R}^n$ sono nulli; ricordando inoltre le definizioni (3.36) e (4.38), si ottiene l'espressione per il secondo integrale:

$$\int_{\mathbb{R}^n} \xi_k \xi_l \sum_{i=1}^{11} \frac{\partial}{\partial \xi_i} (A_i \Pi) d\boldsymbol{\xi} = - \sum_{j=1}^{11} M_{k,j} \langle \xi_l \xi_j \rangle - \sum_{j=1}^{11} M_{l,j} \langle \xi_k \xi_j \rangle.$$

Integrando due volte per parti e sfruttando la simmetria della matrice B , si ottiene, in maniera analoga, l'espressione per il terzo integrale della (4.37):

$$\frac{1}{2} \int_{\mathbb{R}^n} \xi_k \xi_l \sum_{i,j=1}^{11} \frac{\partial^2}{\partial \xi_i \partial \xi_j} (B_{i,j} \Pi) d\boldsymbol{\xi} = B_{k,l}.$$

Unendo i tre contributi, l'equazione (4.37) diventa

$$\frac{d}{d\tau} \langle \xi_k \xi_l \rangle = \sum_{j=1}^{11} M_{k,j} \langle \xi_l \xi_j \rangle + \sum_{j=1}^{11} M_{l,j} \langle \xi_k \xi_j \rangle + B_{k,l} \quad \forall k, l = 1, \dots, 11 \quad (4.39)$$

L'equazione (4.39) rappresenta l'evoluzione temporale dei momenti secondi della distribuzione di probabilità Π . Si osservi che $\langle \xi_k \xi_l \rangle = \langle \xi_l \xi_k \rangle$ e, quindi, otteniamo un sistema differenziale costituito da 66 equazioni nelle incognite $\langle \xi_k \xi_l \rangle \forall k, l = 1, \dots, 11$ con $k \leq l$ e con coefficienti dati dalle componenti delle matrici M e B ricavate nel capitolo precedente.

Ordinando i momenti secondi nel vettore

$$\boldsymbol{\psi} = \left(\langle \xi_1 \xi_1 \rangle, \langle \xi_1 \xi_2 \rangle, \dots, \langle \xi_1 \xi_{11} \rangle, \langle \xi_2 \xi_2 \rangle, \langle \xi_2 \xi_3 \rangle, \dots, \langle \xi_2 \xi_{11} \rangle, \dots, \langle \xi_{11} \xi_{11} \rangle \right) \quad (4.40)$$

L'equazione (4.39) può essere riscritta in forma matriciale nel seguente modo:

$$\dot{\boldsymbol{\psi}} = \widetilde{M} \boldsymbol{\psi} + \widetilde{B} \quad (4.41)$$

dove $\widetilde{M}$ è una matrice 66×66 e $\widetilde{B}$ è un vettore 66×1 , che possono essere scritti mediante la seguente forma algoritmica, la stessa utilizzata per implementare il codice in *Matlab*:

```

for  $k = 1:n$ 
  for  $l = k:n$ 
     $r = n \cdot (k-1) + 1 - (k-2)(k-1)/2 + l - k;$ 
    for  $j = 1:n$ 
      if  $j \geq l$ 
         $c_1 = n \cdot (l-1) + 1 - (l-2)(l-1)/2 + j - l;$ 
      else
         $c_1 = n \cdot (j-1) + 1 - (j-2)(j-1)/2 + l - j;$ 
      end
       $\widetilde{M}(r, c_1) = \widetilde{M}(r, c_1) + M(k, j);$ 
      if  $j \geq k$ 
         $c_2 = n \cdot (k-1) + 1 - (k-2)(k-1)/2 + j - k;$ 
      else
         $c_2 = n \cdot (j-1) + 1 - (j-2)(j-1)/2 + k - j;$ 
      end
       $\widetilde{M}(r, c_2) = \widetilde{M}(r, c_2) + M(l, j);$ 
    end
     $\widetilde{B}(r) = B(k, l);$ 
  end
end

```

dove k , l e j sono gli indici caratterizzati nella (4.39) e dove abbiamo indicato con n il numero delle variabili in gioco (nel nostro caso $n = 11$), con r l'indice di riga delle matrici $\widetilde{M}$ e $\widetilde{B}$ e con c_1 o c_2 l'indice di colonna di $\widetilde{M}$ a seconda se stiamo considerando, rispettivamente, i coefficienti $M_{k,j}$ o $M_{l,j}$ dell'equazione (4.39).

Per aiutare il lettore a visualizzare la struttura della matrice $\widetilde{M}$ riportiamo alcuni elementi delle prime righe, da cui si può evincere il formalismo a blocchi (si noti, in particolare, che i blocchi lungo la diagonale principale hanno la stessa struttura):

$$\begin{pmatrix}
2M_{1,1} & 2M_{1,2} & \cdots & 2M_{1,11} & 0 & \cdots & 0 & \cdots & \cdots & 2M_{1,10} & M_{1,11} \\
M_{2,1} & M_{1,1} + M_{2,2} & \cdots & M_{2,11} & M_{1,2} & \cdots & 0 & \cdots & \cdots & M_{1,10} & M_{1,11} \\
M_{3,1} & M_{3,2} & \ddots & M_{3,11} & 0 & \ddots & M_{1,3} & \cdots & M_{1,11} & & \\
\vdots & \vdots & & \vdots & \vdots & & \ddots & & & & \\
M_{11,1} & M_{11,2} & \cdots & M_{11,11} & 0 & & M_{1,3} & \cdots & & M_{1,10} & M_{1,11} \\
0 & 2M_{2,1} & 0 & 0 & 2M_{2,2} & \cdots & 0 & \cdots & & & \\
0 & M_{3,1} & \ddots & 0 & M_{3,2} & \ddots & M_{2,3} & \cdots & M_{2,11} & & \\
\vdots & \vdots & & & \vdots & & \ddots & & & & \\
0 & M_{11,1} & & M_{2,1} & M_{11,2} & \cdots & M_{2,2} + M_{11,11} & & M_{2,3} & \cdots & M_{2,10} & M_{2,11} \\
& & & & & & & \ddots & & & & \\
& & & & & & & \ddots & & & & \\
& & & & & & & & \ddots & & & \\
& & & & & & & & & 2M_{10,10} & 2M_{10,11} & \\
& & & & & & & & & M_{11,10} & M_{10,10} + M_{11,11} & M_{10,11} \\
& & & & & & & & & M_{11,10} & & 2M_{11,11}
\end{pmatrix}$$

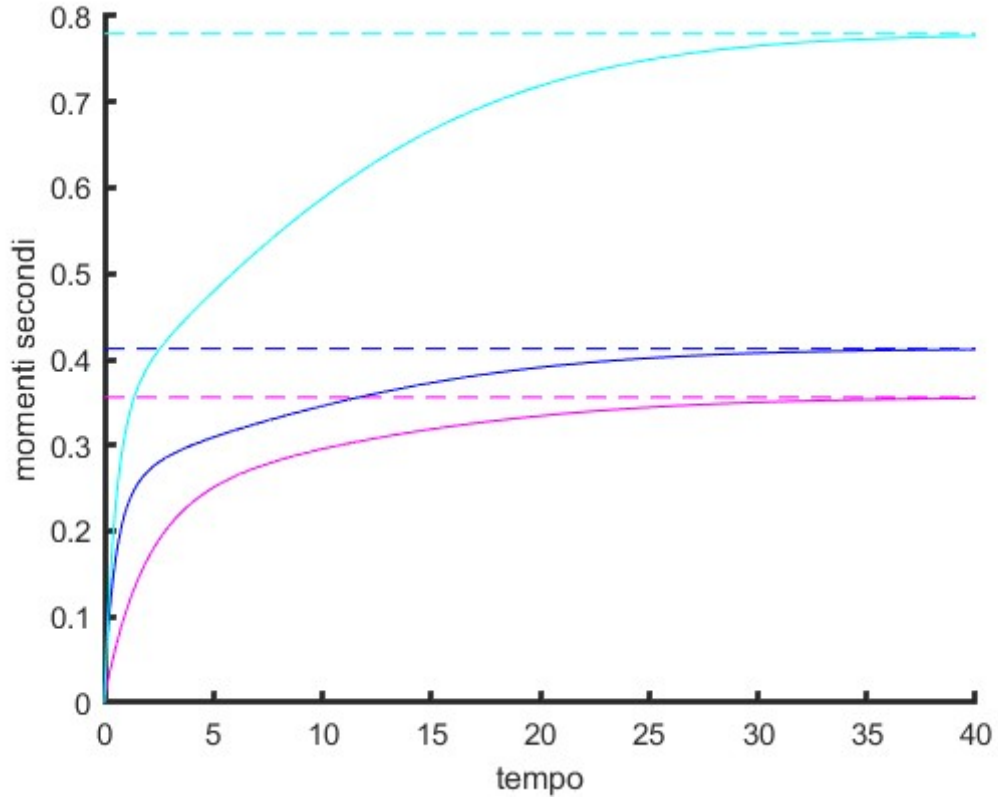


Figura 4.20: simulazioni dei momenti secondi delle fluttuazioni $\langle \xi_{HC8}^2 \rangle$, $\langle \xi_{HC10}^2 \rangle$ e $\langle \xi_{C8}^2 \rangle$ relative alle tre molecole segnale. La curva color ciano è relativa a $\langle \xi_{HC8}^2 \rangle$, quella blu a $\langle \xi_{HC10}^2 \rangle$ e quella magenta a $\langle \xi_{C8}^2 \rangle$. I rispettivi stati stazionari sono rappresentati dalle rette tratteggiate dello stesso colore.

L'equazione (4.41) ci consente di ricavare lo stato stazionario dei momenti secondi ψ^* , imponendo $\dot{\psi} = 0$. Si ottiene quindi

$$\psi^* = -\widetilde{M}^{-1}\widetilde{B} \quad (4.42)$$

dove $\widetilde{M}^{-1}$ è l'inversa della matrice $\widetilde{M}$.

In figura 4.20 abbiamo riportato le simulazioni del sistema dei momenti secondi (4.41) relative a $\langle \xi_{HC8}^2 \rangle$, $\langle \xi_{HC10}^2 \rangle$ e $\langle \xi_{C8}^2 \rangle$ e le abbiamo confrontate con i rispettivi stati stazionari ricavati in *Matlab* per mezzo della (4.42), che ci saranno utili per il proseguo. Quello che si osserva è che effettivamente il sistema converge allo stato stazionario ricavato.

4.2 Analisi del coefficiente di variazione

L'espressione (4.42) ci consente di ricavare una stima per il coefficiente di variazione (CV) per una generica specie x allo stato stazionario. Questo coefficiente permette di monitorare le fluttuazioni in relazione alla media, misurando in modo oggettivo quanto sia grande il valore della deviazione standard rispetto ad essa. Il CV rappresenta in pratica una misura della dispersione di una distribuzione di probabilità e dà quindi delle informazioni quantitative

sull'intensità delle fluttuazioni in relazione alla media. Per una serie di valori n_x relativi ad una data specie x , la definizione standard di CV è:

$$CV_x = \frac{\sigma_x}{\langle n_x \rangle} \quad (4.43)$$

dove σ_x è la deviazione standard data da

$$\sigma_x = \sqrt{\langle n_x^2 \rangle - \langle n_x \rangle^2}$$

e $\langle n_x \rangle$ è il numero medio di molecole della specie x .

Per ottenere una stima del coefficiente di variazione si può operare in due modi. Il primo è quello di utilizzare le simulazioni di Gillespie (vedi sezione 2.3) e quindi fare una stima numerica del CV. Questo metodo, essendo di tipo stocastico, deve essere mediato per ottenere delle stime accurate, comportando ovviamente un maggior dispendio di tempo. Preferiamo quindi seguire il secondo approccio, di tipo teorico, sviluppato con l'approssimazione di van Kampen. Dalla (3.24), infatti si ha

$$n_x = V\phi_x + \sqrt{V}\xi_x \quad (4.44)$$

e, applicando la media ad ambo i membri della (4.44), e ricordando che allo stato stazionario $\langle \xi_x \rangle = 0$, si ha

$$\langle n_x \rangle = V\phi_x + \sqrt{V}\langle \xi_x \rangle = V\phi_x. \quad (4.45)$$

Elevando al quadrato la (4.44) ed applicando poi la media ad ambo i membri si ottiene

$$\langle n_x^2 \rangle = V^2\phi_x^2 + V\langle \xi_x^2 \rangle. \quad (4.46)$$

Tenendo conto delle espressioni (4.45) e (4.46), il coefficiente di variazione assume la seguente forma

$$CV_x = \frac{\sqrt{\langle \xi_x^2 \rangle}}{\sqrt{V}\phi_x}.$$

Per le nostre analisi ci interessa monitorare lo stato stazionario dei coefficienti di variazione teorici CV^* relativi alle tre molecole segnale HC8, HC10 e C8:

$$CV_{HC8}^* \simeq \frac{\sqrt{\langle \xi_{HC8}^2 \rangle^*}}{\sqrt{V}\phi_{HC8}^*} \quad (4.47)$$

$$CV_{HC10}^* \simeq \frac{\sqrt{\langle \xi_{HC10}^2 \rangle^*}}{\sqrt{V}\phi_{HC10}^*} \quad (4.48)$$

$$CV_{C8}^* \simeq \frac{\sqrt{\langle \xi_{C8}^2 \rangle^*}}{\sqrt{V}\phi_{C8}^*} \quad (4.49)$$

in cui $\langle \xi_{HC8}^2 \rangle^*$, $\langle \xi_{HC10}^2 \rangle^*$ e $\langle \xi_{C8}^2 \rangle^*$ corrispondono, rispettivamente, agli stati stazionari dei momenti secondi $\langle \xi_9 \xi_9 \rangle$, $\langle \xi_{10} \xi_{10} \rangle$ e $\langle \xi_{11} \xi_{11} \rangle$ del vettore $\boldsymbol{\psi}$ (vedi equazione (4.40)), che si ricavano invertendo la matrice $\widetilde{M}$ (vedi equazione (4.42)). A denominatore abbiamo invece i

punti di equilibrio del sistema deterministico relativi alle tre molecole, ricavati nella sezione 3.3.1.

Si osservi che i valori dati dalle relazioni (4.47), (4.48) e (4.49) sono solo delle stime e non dei risultati analitici esatti. Si ricordi, infatti, che l'equazione dei momenti secondi (4.39) è stata ricavata dalla Fokker-Planck (equazione (3.35)), ottenuta tramite uno sviluppo in $1/\sqrt{V}$. Le stime, quindi, che dipendono esplicitamente da V (che compare al denominatore), sono da ritenersi valide per valori di V moderatamente grandi in modo che la teoria perturbativa possa essere applicata ma, al tempo stesso, in modo che i CV non tendano a zero.

Per far vedere l'accordo tra i due approcci, quello numerico di Gillespie e quello teorico, abbiamo fatto delle simulazioni scegliendo arbitrariamente di far variare il parametro α_2 e tenendo fissi tutti gli altri. Come si può vedere dalla figura 4.21, c'è un ottimo accordo tra i coefficienti di variazione numerici e teorici delle tre molecole. Per questo motivo abbiamo deciso di utilizzare semplicemente la stima teorica, abbandonando la più laboriosa stima numerica tramite l'algoritmo di Gillespie.

Tramite le stime teoriche date dalle relazioni (4.47), (4.48) e (4.49) abbiamo ottenuto gli scatter-plot, variando arbitrariamente i parametri α_2 e α_3 . I risultati sono riportati nella figura 4.22 e in esse si può notare come i CV assumano dei valori relativamente bassi. In figura sono stati anche marcati i valori dei parametri stimati tramite il fit, contrassegnati con un asterisco rosso. Il fatto che i valori assunti dai vari coefficienti di variazione siano così bassi potrebbe suggerire che il ruolo della cooperazione di tre circuiti molto simili tra loro sia quello di minimizzare le fluttuazioni delle molecole segnale. Come abbiamo già osservato nel primo capitolo, infatti, non è chiaro il motivo per il quale durante l'evoluzione si siano stabilizzati tre circuiti che, non solo per il tipo di regolazione, ma anche per il tipo di proteine coinvolte, potrebbero apparire ridondanti. Sulla base della nostra analisi preliminare, è ragionevole ipotizzare che al circuito ancestrale si siano aggiunti, nel corso dei millenni, anche gli altri due conferendo al batterio una maggiore stabilità del numero medio di molecole segnale. Questa ipotesi è chiaramente compatibile con lo scopo del QS: in situazioni fisiologiche le molecole segnale devono assumere dei valori sufficientemente prossimi ad un valore medio costante in modo da far percepire ai batteri che le condizioni sono stabili. In caso di necessità, invece, una brusca variazione (grandi fluttuazioni) delle molecole segnale permette ai batteri di recepire il messaggio velocemente e di mettere prontamente in atto la risposta. Naturalmente il modello allo stato attuale rappresenta un punto di partenza per uno studio più approfondito della *Burkholderia thailandensis*. Il prossimo passo sarà un'indagine genetica che permetta di definire quale dei tre circuiti sia quello ancestrale e, successivamente, dovranno essere fatti ulteriori studi numerici. In particolare, una volta individuato il circuito ancestrale, verrà usato il modello per calcolare i valori teorici dei coefficienti di variazione relativi ad esso, che verranno poi confrontati con quelli del sistema completo.

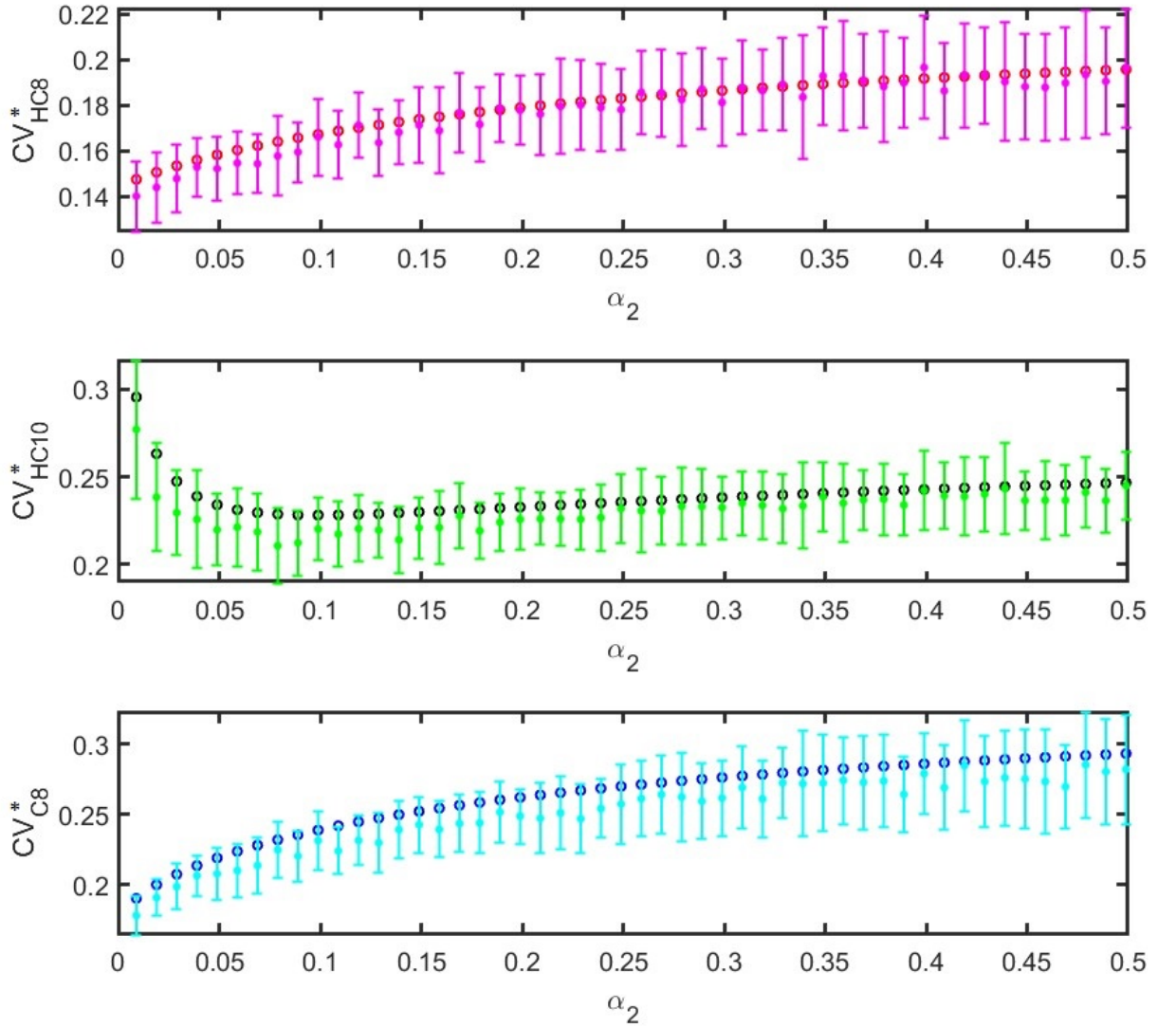


Figura 4.21: confronto tra i coefficienti di variazione simulati con Gillespie e quelli dati dalle stime teoriche (4.47), (4.48) e (4.49), al variare di α_2 . Le simulazioni sono state fatte fissando $V = 50$ e mediate su 50 realizzazioni. Nei grafici i cerchi vuoti rappresentano i CV teorici delle tre molecole segnale, mentre i cerchi pieni (più in basso) corrispondono ai valori medi dei CV numerici. Infine le barre d'errore corrispondono alle deviazioni standard.

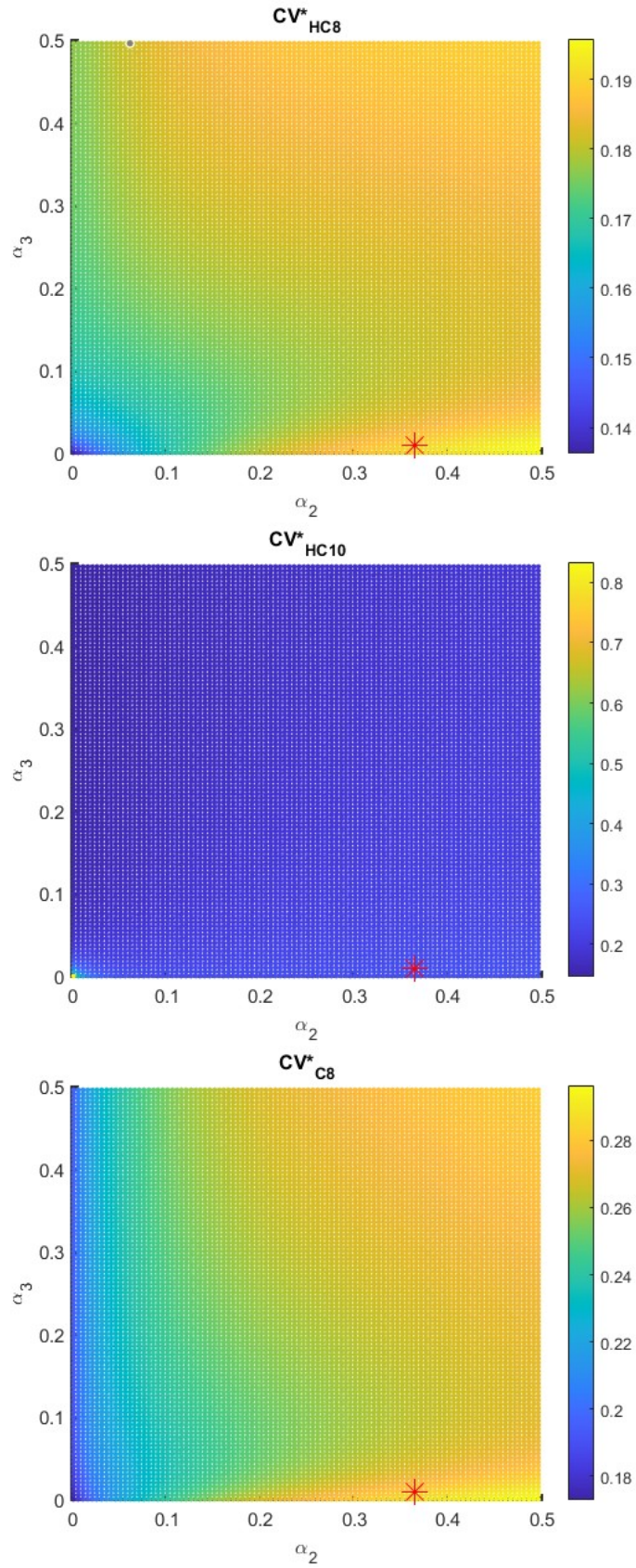


Figura 4.22: scatter-plot nel piano (α_2, α_3) dei coefficienti di variazione delle tre molecole segnale, stimati teoricamente. La color bar indica il valore del coefficiente di variazione. L'asterisco rosso mostra la regione in cui si trovano i valori ottimali dei due parametri stimati con il fit.

Conclusioni

In questa tesi ci siamo occupati dello studio di un sistema complesso, ovvero il processo di quorum sensing nel batterio *Burkholderia thailandensis* e della dinamica delle fluttuazioni stocastiche attorno al numero medio delle molecole segnale. In particolare è stato sviluppato un modello stocastico a partire dalle reazioni chimiche che sottendono al processo biologico presentato. La dinamica, governata dalla così detta master equation, può essere simulata tramite il celebre algoritmo di Gillespie, oppure può essere analizzata dal punto di vista teorico tramite una tecnica perturbativa. Quest'ultima è lo sviluppo di van Kampen, che ci ha consentito, a partire dalla master equation, di ricavare il sistema deterministico e l'equazione di Fokker-Planck. Tramite le simulazioni deterministiche si è eseguito il fit dei dati sperimentali presentati nel primo capitolo, che ci ha permesso di ottenere una stima dei parametri del modello che non sono noti in letteratura. A partire dall'equazione di Fokker-Planck si è ricavata l'equazione per i momenti secondi delle fluttuazioni, che ci ha consentito di fare una stima dei coefficienti di variazione relativi alle tre molecole segnale. Questi coefficienti teorici sono stati confrontati con quelli ottenuti dalle simulazioni di Gillespie, al fine di evidenziare il perfetto accordo tra i due approcci e giustificare quindi l'utilizzo della stima teorica. Essa ci ha permesso di ottenere gli scatter-plot dei coefficienti di variazione delle tre molecole segnale al variare di α_2 e α_3 , cioè dei due parametri del modello che rappresentano le velocità di produzione dei rispettivi regolatori R2 e R3, responsabili dell'attivazione dei circuiti due e tre. Ispezionando il piano (α_2, α_3) si è evidenziato come i coefficienti di variazione delle tre molecole segnale rimangano bassi, osservazione che ci consente di ipotizzare che la presenza dei tre circuiti permetta di minimizzare le fluttuazioni fisiologiche della concentrazione delle molecole segnale rispetto al valore medio, conferendo al batterio una maggiore stabilità. Questa ipotesi è chiaramente compatibile con lo scopo del quorum sensing: in situazioni fisiologiche i batteri devono percepire una condizione di stabilità, corrispondente a concentrazioni delle molecole segnale prossime ad un valore medio costante, mentre, in caso di necessità, grandi fluttuazioni devono essere recepite come un'anomalia, così che i batteri possano mettere prontamente in atto un'adeguata risposta allo stimolo ambientale. Naturalmente il modello allo stato attuale rappresenta un punto di partenza per uno studio più approfondito della *Burkholderia thailandensis*. Il prossimo passo sarà un'indagine genetica che permetta di definire quale dei tre circuiti sia quello ancestrale, in modo da utilizzare il modello per calcolare i valori teorici dei coefficienti di variazione relativi

ad esso, che verranno poi confrontati con quelli del sistema completo.

Bibliografia

- [1] B. L. Bassler e R. Losick, *Bacterially Speaking*, Cell **125**, 237-246 (2006).
- [2] K. H. Nealson, T. Platt e J. W. Hastings, *Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system*, J. Bacteriol. **104**, 313–322 (1970).
- [3] S. Le Guillouzer, M. C. Groleau e E. Déziel, *The complex quorum sensing circuitry of Burkholderia thailandensis is both hierarchically and homeostatically organized*, mBio **8**, e01861-17 (2017).
- [4] K. S. Choudhary, S. Hudaiberdiev, Z. Gelencsér, B. Gonçalves Coutinho, V. Venturi e S. Pongor, *The organization of the quorum sensing luxI/R family genes in Burkholderia*, Int. J. Mol. Sci. **14**, 13727–13747 (2013).
- [5] K. Michalska, G. Chhor, S. Clancy, R. Jedrzejczak, G. Babnigg, S. C. Winans e A. Joachimiak, *RsaM: a transcriptional regulator of Burkholderia spp. with novel fold*, FEBS J. **281**, 4293–4306 (2014).
- [6] S. Le Guillouzer, M. C. Groleau e E. Déziel, *Two rsaM homologues encode central regulatory elements modulating quorum sensing expression in Burkholderia thailandensis*, bioRxiv (2017).
- [7] S. Inhülsen, *Investigations on the quorum sensing circuitry in Burkholderia cenocepacia H111*, PhD dissertation, University of Zurich, Switzerland (2011).
- [8] B. A. Duerkop, J. P. Herman, R. L. Ulrich, M. E. Churchill e E. P. Greenberg, *The Burkholderia mallei BmaR3-BmaI3 quorum-sensing system produces and responds to N-3-hydroxy-octanoyl homoserine lactone*, J. Bacteriol. **190**, 5137–5141 (2008).
- [9] A. M. Gamage, G. Shui, M. R. Wenk e K. L. Chua, *N-octanoylhomoserine lactone signalling mediated by the BpsI-BpsR quorum sensing system plays a major role in biofilm formation of Burkholderia pseudomallei*, Microbiology **157**, 1176–1186 (2011).
- [10] S. Le Guillouzer, M. C. Groleau e E. Déziel, *Two rsaM homologues encode central regulatory elements modulating quorum sensing in Burkholderia thailandensis*, J. Bacteriol. **200**, e00727-17 (2018).

- [11] A. Eldar e M. B. Elowitz, *Functional roles for noise in genetic circuits*, Nature **467**, 167-173 (2010).
- [12] H. H. McAdams e A. Arkin, *Stochastic mechanisms in gene expression*, Proc. Natl Acad. Sci. USA **94**, 814–819 (1997).
- [13] N. Friedman, L. Cai e X. Xie, *Linking stochastic dynamics to population distribution: an analytical framework of gene expression*, Phys. Rev. Lett. **97**, 168302 (2006).
- [14] J. Paulsson, *Summing up the noise in gene networks*, Nature **427**, 415–418 (2004).
- [15] J. Paulsson, O. Berg e M. Ehrenberg, *Stochastic focusing: fluctuation-enhanced sensitivity of intracellular regulation*, Proc. Natl Acad. Sci. USA **97**, 7148 (2000).
- [16] N. Maheshri e E. K. O’Shea, *Living with noisy genes: how cells function reliably with inherent variability in gene expression*, Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. **36**, 413–434 (2007).
- [17] A. Raj e A. van Oudenaarden, *Nature, nurture, or chance: stochastic gene expression and its consequences*, Cell **135**, 216–226 (2008).
- [18] J. Locke e M. Elowitz, *Using movies to analyse gene circuit dynamics in single cells*, Nature Rev. Microbiol. **7**, 383–392 (2009).
- [19] L. Cai, C. K. Dalal e M. B. Elowitz, *Frequency-modulated nuclear localization bursts coordinate gene regulation*, Nature **455**, 485–490 (2008).
- [20] D. T. Gillespie, *A general method for numerically simulating the stochastic time evolution of coupled chemical reactions*, J. Comput. Phys. **22**, 403-434 (1976).
- [21] D. T. Gillespie, *Exact stochastic simulation of coupled chemical reactions*, J. Chem. Phys. **81**, 2340-2361 (1977).
- [22] Y. Rubinstein, *Simulation and the Monte Carlo method*, J.Wiley, New York (1981).
- [23] N. G. van Kampen, *Stochastic processes in Physics and Chemistry*, North Holland Pubs., Amsterdam (1992).
- [24] R. V. Vidal, *Applied simulated annealing*, Springer **396** (1993).
- [25] M. Weber e J. Buceta, *Dynamics of the quorum sensing switch: stochastic and non-stationary effects*, BMC Systems Biology **7** (2013).
- [26] S. Semsey, L. Jauffred, Z. Csiszovszki, J. Erdossy, V. Stéger, S. Hansen e S. Krishna, *The effect of LacI autoregulation on the performance of the lactose utilization system in Escherichia coli*, Nucleic Acids Research **41**, 6381–6390 (2013).

Ringraziamenti

Ringrazio Mirko per avermi supportato e sopportato in questi splendidi anni di università trascorsi insieme.

Ringrazio tutti i miei amici e la mia famiglia per l'affetto e la vicinanza dimostrati in tutti questi anni.

Ringrazio la Prof.ssa Francesca Di Patti e il Prof. Marco Fondi per il loro supporto scientifico.