



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Fisica e Astronomia “Galileo Galilei”

Dipartimento di Matematica “Tullio Levi-Civita”

Corso di Laurea in Fisica

Tesi di Laurea

Il fenomeno del ciclo limite in un modello di orologio circadiano

Relatore

Prof. Giancarlo Benettin

Laureanda

Sofia Sacco

Anno Accademico 2017/2018

Introduzione

Obiettivo di questo lavoro è presentare una possibile descrizione matematica del meccanismo biologico che regola gli orologi circadiani negli esseri viventi. Ogni essere vivente, dal batterio al mammifero, ha sviluppato nel corso di milioni di anni, come risposta adattiva alle variazioni luminose e climatiche, un sistema biochimico che detta il tempo all'organismo, ne scandisce le giornate regolando il ciclo sonno/veglia, la pressione sanguigna, la fame, le attività. E' noto fin dal '700 che non si tratta di una semplice risposta a stimoli ambientali: questi "metronomi endogeni" esistono e funzionano autonomamente, pur venendo sincronizzati, all'occasione, da stimoli esterni. Tuttavia, la ricerca di un modello di equazioni differenziali che descriva correttamente la dinamica del sistema non è affatto semplice: i primi studi matematici su questo argomento risalgono agli anni '50 del secolo scorso. In questo lavoro esamineremo il modello a 5 variabili proposto da Goldbeter nel 1995, (*modello di Goldbeter*) che descrive il funzionamento dell'orologio circadiano nel moscerino della frutta, la *Drosophila Melanogaster*. Non abbiamo un modello altrettanto dettagliato per gli orologi biologici nei mammiferi, quello che però sappiamo è che le oscillazioni nell'orologio circadiano umano, così come sono osservate, presentano somiglianze con l'oscillatore di Van der Pol. Da un lato quindi, abbiamo equazioni a 5 variabili di difficile risoluzione e comprensione, dall'altro abbiamo un sistema di equazioni più semplice, che però non ha un immediato supporto biologico. Nel corso del nostro lavoro analizzeremo dunque il modello di Goldbeter con l'obiettivo di approssimare il sistema a un oscillatore bi-dimensionale e vedremo quanto questo sia matematicamente compatibile con l'oscillatore di Van der Pol, dimostrando in ultima analisi una forte analogia tra gli orologi biologici nei diversi esseri viventi.

Ringrazio Ilaria Prosepe per il gentile aiuto fornito nell'utilizzo di *Mathematica* e nell'elaborazione dei grafici. Ringrazio, inoltre, il mio relatore di tesi, prof. Giancarlo Benettin, per il tempo che mi ha generosamente concesso per portare a termine questo lavoro, per la sua disponibilità e dedizione.

Indice

- 1 Il fenomeno del ciclo limite** **5**
- 1.1 Equazioni mediate 7

- 2 Orologi biologici** **11**
- 2.1 Fisiologia 12
- 2.2 Funzionamento 14

- 3 Modello biochimico per la proteina PER** **17**
- 3.1 Analisi 19
- 3.1.1 Analisi degli autovalori 20
- 3.1.2 Modello a due variabili 22

- 4 Conclusioni** **29**

- A** **31**

Capitolo 1

Il fenomeno del ciclo limite

Il primo passo nello studio dei sistemi di equazioni non lineari in \mathbb{R}^2 è lo studio dei punti di equilibrio; dall'analisi della stabilità è infatti possibile capire la dinamica del sistema in prossimità di questo e il comportamento delle traiettorie sufficientemente vicine al punto di equilibrio. Allo stesso modo, può esistere una traiettoria chiusa e isolata chiamata *ciclo limite*, in grado di influenzare nello spazio delle fasi la dinamica dei moti vicini ad essa.

Definizione 1 *Un ciclo limite è una traiettoria chiusa del sistema asintoticamente stabile per tempi positivi (se attrattivo) o negativi (se repulsivo).*

Si intuisce facilmente che, se un sistema bidimensionale ammette un ciclo limite (ad esempio attrattivo), nel ritratto in fase si avrà un'orbita periodica che dividerà il piano in due regioni: una interna e una esterna. In entrambe si avranno traiettorie che spiraleggiano, rispettivamente, verso l'esterno e verso l'interno, avvicinandosi asintoticamente alla traiettoria periodica.

Una delle più note equazioni differenziali del secondo ordine che dà luogo a un ciclo limite attrattivo fu introdotta negli anni '20 del secolo scorso dal fisico olandese Balthasar Van der Pol, per costruire un modello matematico che spiegasse le auto-oscillazioni in un circuito non lineare amplificato.¹ L'equazione di Van der Pol è la seguente:

$$\ddot{x} + \epsilon(x^2 - 1)\dot{x} + x = 0; \quad \epsilon > 0, \quad x \in \mathbb{R}^2 \quad (1.1)$$

¹L'equazione di Van der Pol, oltre ad aver avuto una grande importanza concettuale in fisica-matematica, è stata utilizzata in una serie di applicazioni pratiche tra le quali il pace-maker cardiaco.

Quando $\epsilon = 0$ si riconosce subito l'equazione di un oscillatore armonico di pulsazione 1 percorso a velocità costante in un periodo $T_0 = 2\pi$; se invece $\epsilon > 0$ siamo in presenza di un oscillatore armonico smorzato dove però il coefficiente di smorzamento $\epsilon(x^2 - 1)$ se $|x| < 1$ non sottrae energia al sistema ma la fornisce.

Proposizione 1 *Per ogni $\epsilon > 0$ l'equazione di Van der Pol ha un ciclo limite attrattivo per ogni dato iniziale dell'intero piano xv , meno l'origine.*

La dimostrazione è poco istruttiva ed esula dagli obiettivi di questa tesi, è quindi riportata in appendice. Più interessante è invece osservare come varia la forma dell'orbita chiusa al variare del parametro ϵ : al crescere di ϵ la traiettoria chiusa si deforma.

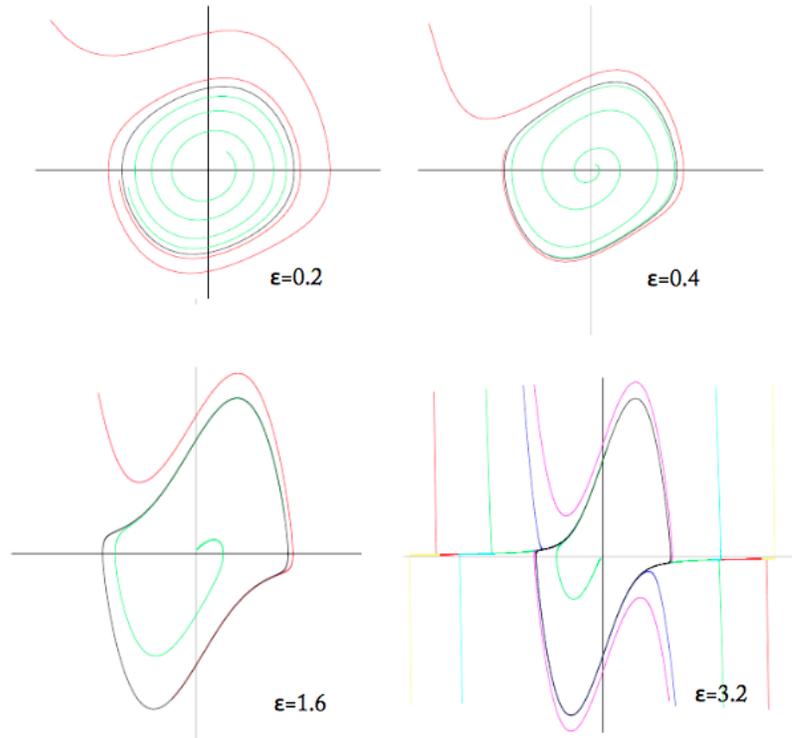


Figura 1: cicli limite al variare del parametro ϵ nello spazio delle fasi

Il piano continua ad essere diviso in due regioni distinte, ma il moto è fortemente disuniforme e il tempo impiegato dalle traiettorie per avvicinarsi al ciclo limite cresce al crescere di ϵ .

1.1 Equazioni mediate

Studieremo ora le equazioni di Van der Pol con il *metodo della media*: un approccio perturbativo al sistema adattato al caso di ϵ piccolo, che ci fornisce informazioni riguardo al comportamento medio delle traiettorie in avvicinamento al ciclo limite. Partiremo dall'equazione di Van der Pol, per passare alla sua forma in coordinate polari e, da questa, ricaveremo le equazioni mediate.

Riscriviamo l'equazione (1.1) nella forma:

$$\ddot{x} + x = \epsilon F(x, \dot{x}) \quad (1.2)$$

con $F(x, \dot{x}) = -(x^2 - 1)\dot{x}$. Passiamo alle coordinate polari "corotanti" introducendo il cambio di coordinate:

$$x = r \cos(t + \phi) \quad (1.3)$$

$$\dot{x} = -r \sin(t + \phi). \quad (1.4)$$

Differenziamo l'equazione (1.3) e sostituiamola nella (1.4):

$$\dot{r} \cos(t + \phi) - r \dot{\phi} \sin(t + \phi) = 0 \quad (1.5)$$

Ora differenziando l'equazione (1.4) si può riscrivere facilmente l'equazione (1.2) in coordinate polari:

$$-\dot{r} \sin(t + \phi) - r \dot{\phi} \cos(t + \phi) = \epsilon F(r \cos(t + \phi), -r \sin(t + \phi)) \quad (1.6)$$

E dalle equazioni (1.5) e (1.6) si ottiene:

$$\dot{r} = -\epsilon F(r \cos(t + \phi), -r \sin(t + \phi)) \sin(t + \phi) \quad (1.7)$$

$$\dot{\phi} = -\frac{\epsilon}{r} F(r \cos(t + \phi), -r \sin(t + \phi)) \cos(t + \phi) \quad (1.8)$$

con $F(r \cos(t + \phi), -r \sin(t + \phi)) = r(r^2 \cos^2(t + \phi) - 1) \sin(t + \phi)$.

Facciamo ora alcune considerazioni: dal momento che ϵ è piccola, anche \dot{r} , $\dot{\phi}$ saranno piccole

quanto ϵ . Di conseguenza le funzioni $r(t)$ e $\phi(t)$ variano lentamente con t che cresce, e posso considerarle approssimativamente costanti lungo un giro di oscillazione. Posso applicare dunque il metodo della media e le equazioni (1.7) e (1.8) diventano:

$$\dot{r} = -\epsilon \frac{1}{2\pi} \int_0^{2\pi} r(r^2 \cos^2(\tau) - 1) \sin^2(\tau) d\tau \quad (1.9)$$

$$\dot{\phi} = -\epsilon \frac{1}{2\pi} \int_0^{2\pi} (r^2 \cos^2(\tau) - 1) \sin(\tau) \cos(\tau) d\tau \quad (1.10)$$

con $\tau = \phi + t$. Dal calcolo integrale risulta immediatamente

$$\dot{r} = \frac{\epsilon}{8} r(4 - r^2) \quad (1.11)$$

$$\dot{\phi} = 0 \quad (1.12)$$

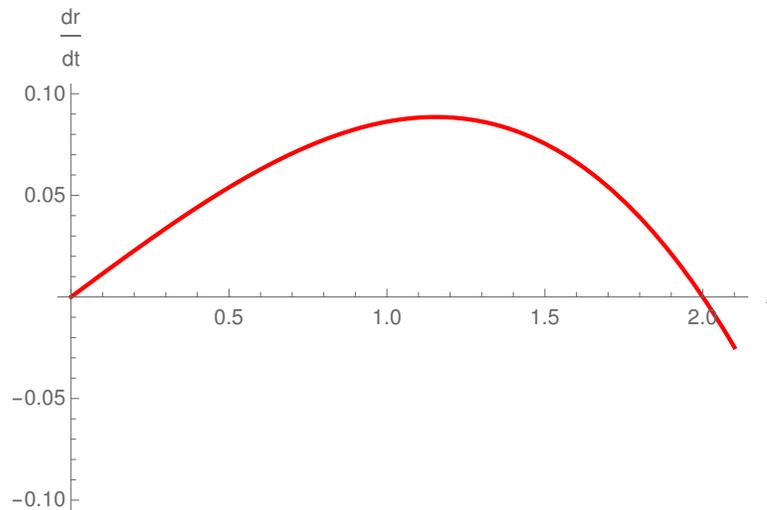


Figura 1.1: andamento di $\dot{r}(r)$ per l'equazione di Van der Pol

Si osserva dal grafico che la velocità di espansione diminuisce progressivamente fino ad annullarsi per $r = 2$. Per questo valore del raggio, il sistema ammette una traiettoria periodica che, per $\epsilon = 0$, si riduce a un circolo di raggio 2.

L'equazione di Van der Pol appena vista è quella cosiddetta in forma adimensionale (x e t sono variabili adimensionali). La corrispondente equazione dimensionale è:

$$\ddot{x} = -w^2x - \epsilon w \left(\frac{x^2}{a^2} - 1 \right) \dot{x}; \quad (1.13)$$

ci si riporta all'equazione adimensionale con il riscalamento $t = \tilde{t}/w$, $x = a\tilde{x}$.

Nel caso specifico dell'orologio biologico, \tilde{x} sarà, ad esempio, la concentrazione di una proteina nel nucleo, e w sarà tale che il ciclo avrà periodo di 24 ore ($w = 2\pi/24h$).

In modo del tutto analogo si possono ricavare le equazioni mediate identiche a quelle precedenti a meno di un riscalamento in cui le traiettorie convergono al ciclo limite che, per $\epsilon = 0$, è l'orbita periodica di raggio 1.

$$\dot{r} = \frac{\epsilon}{2}(r - r^3) \quad (1.14)$$

$$\dot{\phi} = 0. \quad (1.15)$$

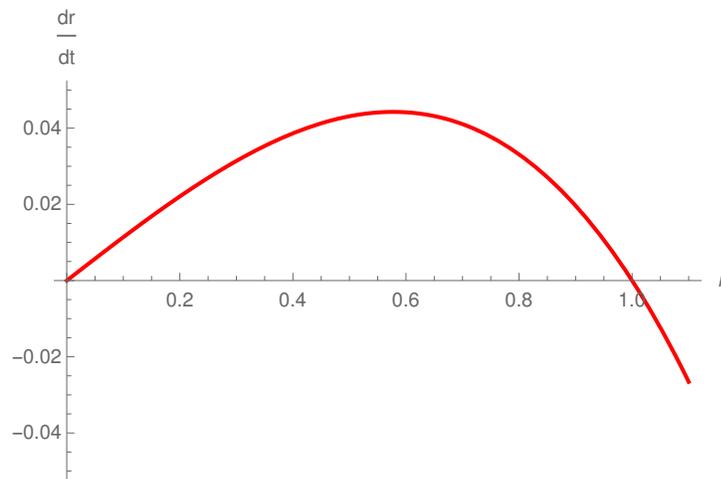


Figura 1.2: andamento di $\dot{r}(r)$ per l'equazione di Van der Pol riscalata

Il valore di ϵ utilizzato in entrambi casi è 0.23.

Capitolo 2

Orologi biologici

La vita si è evoluta sulla terra nel corso di miliardi di anni all'interno di un ambiente da sempre governato da una forte periodicità che -nel suo susseguirsi ciclico delle stagioni e nell'alternanza giornaliera di luce e oscurità- ha sicuramente dato un imprinting ritmico di estrema importanza all'evoluzione biologica degli organismi viventi. Come risposta adattiva alle variazioni luminose e climatiche si sono sviluppati in ogni essere vivente (dai batteri ai mammiferi) degli orologi biologici: meccanismi endogeni regolati da geni, proteine e interazioni molecolari che dettano il tempo all'organismo. Questi scandiscono la nostra giornata, controllando svariati comportamenti e variabili fisiologiche quali la pressione sanguigna, la temperatura corporea, il ciclo sonno/veglia, gli stimoli della fame, l'attività fisica. L'endogenicità degli orologi biologici non è affatto scontata ed è stata oggetto di acceso dibattito nella comunità scientifica. Si è difatti pensato per lungo tempo che fossero soltanto gli stimoli ambientali (luce, variazione di temperatura...) a regolare la periodicità dei nostri comportamenti, mentre l'esistenza di un orologio autonomo è stata provata e studiata in modo approfondito solo a partire dal secolo scorso. Le prime evidenze e riflessioni in merito risalgono ai primi anni del '700. L'astronomo J. J. De Mairain osservò che, mantenendo una piantina di mimosa "sensitiva" in una condizione di *free-running* in cui l'organismo viene privato di ogni stimolo esterno, questa continuava ugualmente ad aprire e chiudere le foglie quasi alla stessa ora ogni giorno. Un esperimento più recente che ha dimostrato la natura endogena degli orologi biologici nell'essere umano è stato quello di J. Ashoff nel 1963, cronobiologo tedesco. Ashoff studiò il comportamento di alcuni suoi studenti rinchiusi in un bunker sempre in condizione di *free-running*, osservando la permanenza di una ritmicità biologica senza alcun tipo di stimolo esterno. Il periodo non era di 24 ore esatte,

spesso di 25, in alcuni casi di meno. L'orologio biologico endogeno non è infatti perfetto nella sua periodicità intrinseca ma occorrono fattori esterni quali luce e temperatura a regolarlo giornalmente e sincronizzarlo con il periodo di rotazione terrestre. Se si pensa poi che quest'ultimo non è sempre stato di 24 ore -le prime cellule procariotiche si sono evolute 3 miliardi e 800 milioni di anni fa, quando la Terra ruotava intorno al proprio asse in poco più di 16 ore- è facile immaginare che gli orologi biologici si siano evoluti adattandosi alla variazione del tempo di rotazione terrestre. Gli orologi con ritmo giornaliero sono detti *circadiani*. Sono certamente i più comuni ma non sono i soli: gli orologi possono infatti avere i domini temporali più differenti ma tutti strettamente correlati a una periodicità ambientale. E' nota l'esistenza di orologi circannuali, stagionali, lunari, semilunari, e persino tidali, legati alla ricorrenza delle maree. Della biologia di questi ultimi si conosce molto poco rispetto a quello che è noto riguardo agli orologi circadiani nei vari esseri viventi. Studieremo il meccanismo biochimico che governa l'orologio circadiano degli organismi superiori e lo confronteremo con quello del moscerino della frutta, la *Drosophila melanogaster*, perchè oggetto della maggior parte degli studi in questo ambito. Osserveremo poi come gli orologi appartenenti a organismi di specie diversa abbiano in realtà delle profonde somiglianze.

2.1 Fisiologia

Ogni essere vivente pluricellulare possiede un orologio biologico principale (*master clock*) gerarchicamente più importante di tutti gli altri orologi periferici (*slave clocks*). Negli animali superiori questo è localizzato in una regione profonda del cervello, in due strutture simmetriche di piccole dimensioni chiamate nuclei soprachiasmatici dell'ipotalamo (SCN), collocati sopra il chiasma ottico. I nuclei contengono circa 20000 neuroni, chiamati "neuroni orologio", dove viene prodotta l'oscillazione molecolare, metronomo del nostro organismo.

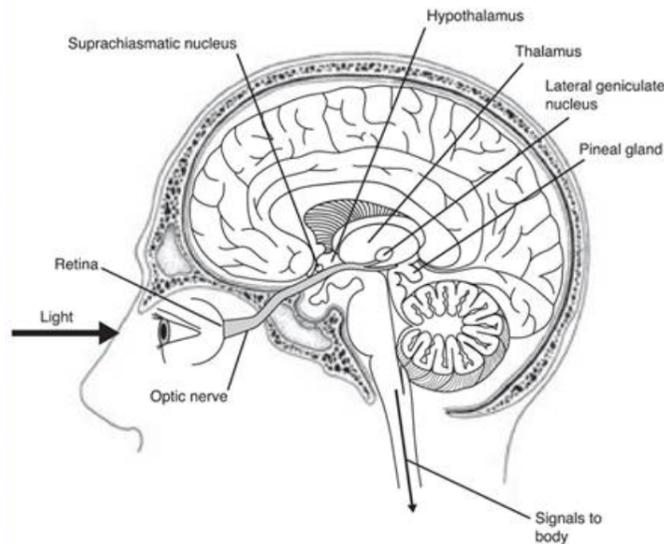


Figura 2.1: localizzazione dell' SCN

I due nuclei soprachiasmatici mandano informazioni a molte altre parti del cervello: la secrezione ormonale ad esempio avviene trasmettendo segnali ai nuclei para ventricolari (da qui partono gli impulsi per la secrezione della melatonina, fondamentale per il ritmo del sonno). Il collegamento con il mondo esterno è mediato dal tratto retino-ipotalamico: un collegamento monosinaptico tra alcune cellule della retina fotosensibili (cellule gangliari profonde) e i neuroni orologio più esterni dei due nuclei soprachiasmatici. Il *master clock* non è però l'unico orologio circadiano del nostro organismo. In ogni organo, in ogni tessuto, virtualmente in ogni cellula, sono presenti degli orologi periferici, che oscillano con un periodo di circa 24 ore in condizione di *free-running*, dettando il tempo ai vari organi periferici. Questi sono controllati direttamente dal *master clock*. Il *master clock* tiene in sincronia gli orologi periferici, ma in realtà anche questi ultimi possono, a loro volta, influenzare in minima parte il *master clock*. Questo insieme di oscillatori costituisce dunque un sistema molto complesso, ma di tale complessità qui non terremo conto e ci limiteremo all'analisi di un singolo orologio. Quando gli oscillatori periferici sono desincronizzati rispetto al *master clock* la sensazione è quella di malessere generale. Il famoso *jet lag* quindi non è dovuto solo al fatto che il *master clock* non è sincronizzato con i ritmi luce-buio del luogo in cui si

arriva attraversando i meridiani ma è anche causato da una aritmia tra gli orologi periferici e il *master clock*, che impiegano del tempo per ritornare in sincronia.

2.2 Funzionamento

Il funzionamento dell'orologio nel mammifero è basato sulla compresenza di due *loops* che hanno entrambi luogo all'interno delle cellule neuronali dell' SCN con periodo di 24h. Il primo processo, a feedback negativo, ha inizio nel nucleo della cellula: i fattori di trascrizione¹ detti BMAL1 e CLOCK si legano nel DNA ai promotori di specifici geni chiamati *per* e *cry* attivando la trascrizione delle relative proteine chiamate corrispondentemente PER1, PER2, CRY1, CRY2. Parte di queste vengono degradate, una parte invece si accumula nel citoplasma e rientra nel nucleo inibendo la sua stessa trascrizione. La reazione ricomincerà nuovamente quando anche queste proteine si saranno degradate. Il secondo loop è a feedback positivo: BMAL1 e CLOCK legandosi al DNA attivano la trascrizione delle proteine REV-ERB α e REV-ERB β e ROR α che rientrando nel nucleo trascrivono a loro volta BMAL1. La luce viene catturata da un fotorecettore, la melanopsina, che attiva la trascrizione delle proteine PER e permette la sincronizzazione con l'ambiente esterno.

L'orologio circadiano della *Drosophila* ha un funzionamento analogo a quello del mammifero. Il primo ciclo inizia con la trascrizione proteica di PER e TIMELESS mediante i fattori di trascrizione CYCLE e CLOCK. PER viene quindi fosforilato² e indirizzato alla degradazione nella cosiddetta via del proteasoma, qui tuttavia alcune fosfatasi si oppongono alla fosforilazione e tendono dopo un certo tempo a prevalere causando un accumulo di PER.

¹i fattori di trascrizione sono particolari proteine che si legano con specifiche sequenze di DNA regolando la trascrizione dei geni

²La fosforilazione è una reazione chimica consistente nell'aggiunta di un gruppo fosfato (PO_4^{3-}) ad una proteina.

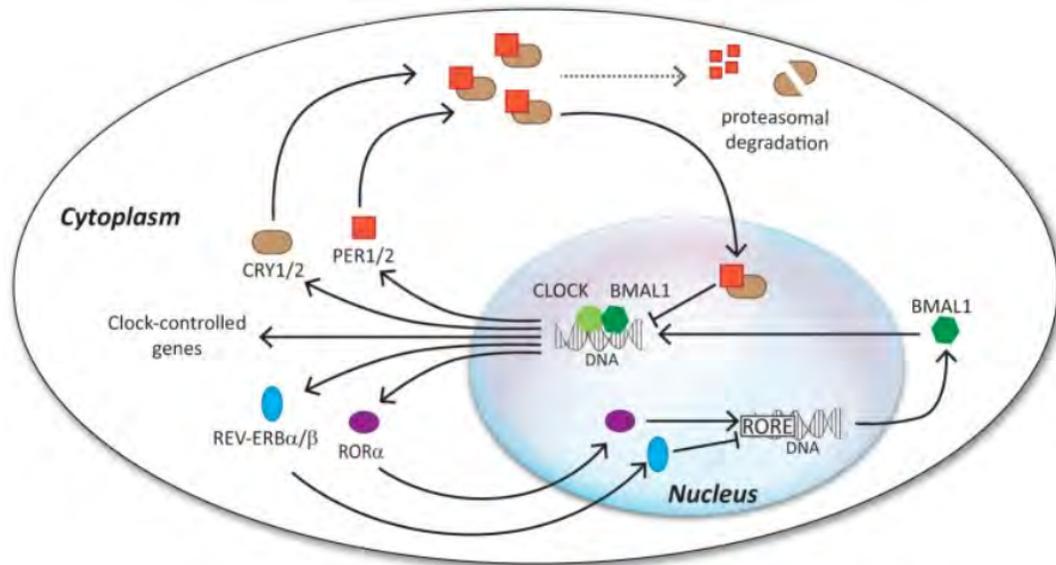


Figura 2.2: funzionamento del masterclock

PER può quindi legarsi con TIME nel citoplasma e, quando raggiunge una certa concentrazione, può essere trasportato nel nucleo dove PER media la fosforilazione di CLOCK alterandone il riconoscimento del promotore e causando un ritardo nella trascrizione. Il secondo loop avviene invece quando CYCLE e CLOCK trascrivono (oltre a PER e TIMELESS) anche *Vrille* e *Pdp1*. *Vrille* inibisce la trascrizione di CLOCK mentre *Pdp1* svolge il ruolo di fattore di trascrizione di CLOCK e CRY. L'orologio viene sincronizzato ogni giorno perchè un fotorecettore (il criptocromo CRY) cattura la luce blu nei neuroni orologio e si attiva, si lega a TIMELESS e lo degrada. Di giorno TIMELESS quindi non è presente, così il moscerino riesce a sincronizzarsi con il ciclo luce-buio.

Le corrispondenze tra orologi circadiani in specie diverse sono evidenti: gli orologi presentano più di un ciclo e, nei mammiferi come negli insetti, molti geni sono gli stessi (CLOCK, PER, CRY). Inoltre, con l'evoluzione, molti geni si sono duplicati, come accade per PERIOD 1 e PERIOD 2.

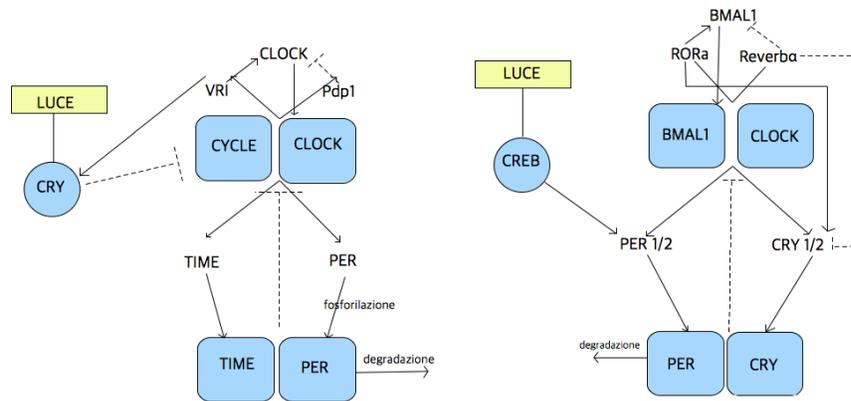


Figura 2.3: meccanismo proteico nel mammifero e nel moscerino della frutta

Il nostro orologio è quindi fatto con gli stessi ingranaggi duplicati o triplicati i quali hanno talvolta modificato il loro ruolo durante l'evoluzione (CRY per noi, legandosi a PER, ha lo stesso ruolo di TIMELESS nel moscerino). L'omologia è in alcuni casi così marcata che, se si prendono alcuni geni orologi di topo e li si fanno esprimere nel moscerino al posto di geni mutati, l'orologio del moscerino continua a funzionare.

Capitolo 3

Modello biochimico per la proteina PER

Studieremo nel dettaglio il meccanismo biochimico che governa la fosforilazione della proteina PER nella *Drosophila*, per darne poi una descrizione matematica attraverso un sistema di equazioni differenziali.

Il modello considera 5 variabili indipendenti: M denota la concentrazione del gene *per* mRNA; P_0, P_1, P_2 rappresentano le concentrazioni ($[\mu M]^1$) della proteina PER in tre differenti stati (rispettivamente non fosforilato, mono-fosforilato, bi-fosforilato); P_N è la concentrazione di PER nel nucleo. Uno schema del modello è presentato in figura (3.1).

¹sono abitualmente chiamate concentrazioni, ma sono quantità assolute, è il numero di moli per nucleo cellulare

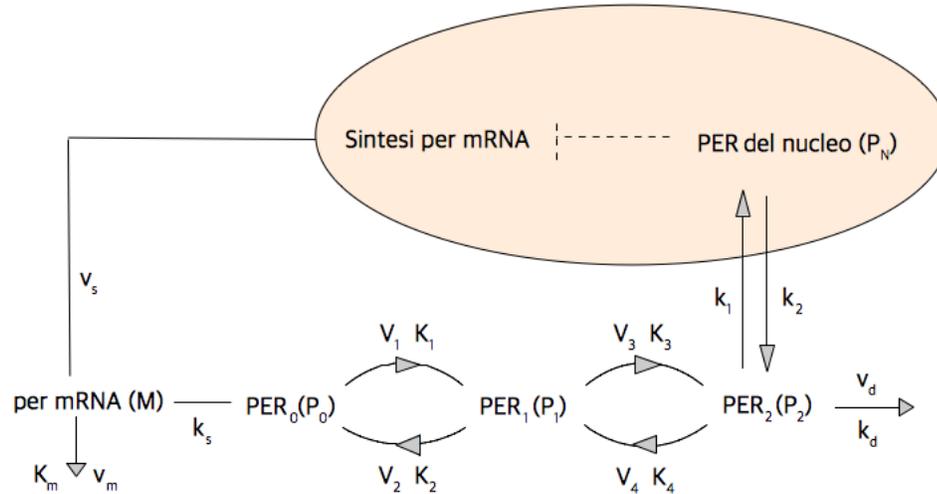


Figura 3.1: Ciclo di PER nella Drosophila

Il *per* mRNA viene sintetizzato nel nucleo e trasferito nel citosol, dove viene accumulato con velocità di reazione massima v_s . La velocità di reazione si misura in $\mu M \setminus h$. Parte di questo viene degradato da un enzima con costante di Michaelis² K_m e velocità di reazione massima v_m . Viene quindi sintetizzata la proteina PER non fosforilata (P_0) a partire dal *per* mRNA con una costante cinetica k_s ³. PER_0 viene quindi fosforilata attraverso una trasformazione reversibile in PER_1 e PER_2 . Le costanti V_i, K_i ; ($i = 1, \dots, 4$) indicano rispettivamente la velocità di reazione massima e la costante di Michaelis delle chinasi e delle fosfatasi coinvolte nella reazione. La proteina PER_2 completamente fosforilata viene in parte degradata da un enzima con velocità di reazione massima v_d e costante di Michaelis K_d e in parte viene trasportata nel nucleo con costante cinetica data da k_1 . Solo il PER completamente fosforilato riesce a rientrare nel nucleo. Questo sicuramente introduce un ritardo nel sistema, consistente con le osservazioni sperimentali. Anche il PER_N , la protei-

²L'enzima catalizza una reazione chimica legandosi al substrato S, che verrà poi trasformato in prodotto P. La velocità di una reazione chimica è definita come: $\frac{d[P]}{dt} = \frac{v[S]}{[S] + K_M}$. v è la velocità massima di reazione che il sistema può raggiungere portando la concentrazione di substrato in saturazione, K_M è la costante di Michaelis-Menten ($[\mu M]$), ovvero la concentrazione di substrato per la quale la velocità di reazione è $\frac{v}{2}$.

³In una reazione del primo ordine, la velocità di reazione è definita come $v = \frac{d[A]}{dt} = k[A]$ con $[A]$ concentrazione del reagente e k costante cinetica ($[h^{-1}]$)

na bifosforilata presente nel nucleo viene parzialmente trasportata nel citosol con costante cinetica k_2 , mentre la rimanente agisce come repressore per la trascrizione di *per* all'interno del nucleo.

L'evoluzione temporale delle 5 variabili è ben approssimata dalle equazioni differenziali:

$$\begin{aligned}\frac{dM}{dt} &= v_s \frac{K_I^4}{K_I^4 + P_N^4} - v_m \frac{M}{K_m + M} \\ \frac{dP_0}{dt} &= k_s M - V_1 \frac{P_0}{K_1 + P_0} + V_2 \frac{P_1}{K_2 + P_1} \\ \frac{dP_1}{dt} &= V_1 \frac{P_0}{K_1 + P_0} - V_2 \frac{P_1}{K_2 + P_1} - V_3 \frac{P_1}{K_3 + P_1} + V_4 \frac{P_2}{K_4 + P_2} \\ \frac{dP_2}{dt} &= V_3 \frac{P_1}{K_3 + P_1} - V_4 \frac{P_2}{K_4 + P_2} - k_1 P_2 + k_2 P_N - v_d \frac{P_2}{K_d + P_2} \\ \frac{dP_N}{dt} &= k_1 P_2 - k_2 P_N\end{aligned}$$

Dove i valori numerici dei coefficienti sono: $v_s = 0.76 \frac{\mu M}{h}$; $v_m = 0.65 \frac{\mu M}{h}$; $v_d = 0.95 \frac{\mu M}{h}$; $K_m = 0.5 \mu M$; $K_1 = 1 \mu M$; $K_d = 0.2 \mu M$; $K_1 = K_2 = K_3 = K_4 = 2 \mu M$; $k_s = 0.38 h^{-1}$; $k_1 = 1.9 h^{-1}$; $k_2 = 1.3 h^{-1}$; $V_1 = 3.2 \frac{\mu M}{h}$; $V_2 = 1.58 \frac{\mu M}{h}$; $V_3 = 5 \frac{\mu M}{h}$; $V_4 = 2.5 \frac{\mu M}{h}$.

3.1 Analisi

Il sistema può essere pensato come un sistema dinamico 5-dimensionale descrivibile in modo compatto dall'equazione autonoma:

$$\frac{dx}{dt} = f(x)$$

con $x = (M, P_0, P_1, P_2, P_N) \in \mathbb{R}^5$. Come prima cosa cerchiamo i punti \bar{x}_i di equilibrio del sistema, tali che $f(\bar{x}_i) = 0$. Il sistema di equazioni algebriche così ottenuto di grado elevato si può risolvere numericamente; delle soluzioni che si trovano una sola, precisamente

$$\bar{x} \simeq (1.85, 1.05, 0.67, 0.57, 0.83),$$

è accettabile. Le variabili in gioco devono infatti essere reali e positive poichè rappresentano concentrazioni chimiche.

Il sistema è regolare, è possibile quindi approssimare $f(x)$ con la serie di Taylor intorno a qualsiasi punto di equilibrio. In particolare:

$$f(x) = A(x - \bar{x}) + \mathcal{O}_2 + \dots \quad (3.1)$$

In cui $A(x - \bar{x})$ rappresenta il termine lineare. La matrice $A = (\frac{df_i}{dx_j})$ intorno a \bar{x} a conti fatti vale:

$$A = \begin{bmatrix} -0.059 & 0 & 0 & 0 & -0.80 \\ 0.38 & -0.69 & -0.44 & 0 & 0 \\ 0 & 0.69 & -1.84 & 0.76 & 0 \\ 0 & 0 & 1.40 & -2.98 & 1.3 \\ 0 & 0 & 0 & 1.9 & -1.3 \end{bmatrix} \quad (3.2)$$

I termini $\mathcal{O}_2, \mathcal{O}_3..$ dell'espansione di Taylor non saranno trascurati in quanto, senza non linearità, non è possibile ottenere il ciclo limite. Si verifica però, mediante una simulazione numerica, che questi hanno poca rilevanza rispetto al termine lineare nel dominio dove si trova il ciclo limite; quest'ultimo si svolge dunque in regime quasi lineare e per questo sarà utile un'analisi più approfondita del sistema linearizzato intorno a \bar{x} .

3.1.1 Analisi degli autovalori

In questa sezione analizzeremo gli autovalori della matrice della linearizzazione del sistema. Come vedremo, tre di questi (quelli con $\text{Re}\lambda < 0$) daranno luogo a un sottospazio stabile, i due rimanenti ($\text{Re}\lambda > 0$) a un sottospazio instabile chiamato *piano delle oscillazioni*. Osserveremo che le traiettorie che hanno origine nel sottospazio instabile lì vi restano, quelle che invece hanno dato iniziale nel sottospazio instabile collassano rapidamente al piano invariante delle oscillazioni.

Ricaviamo gli autovalori λ del sistema linearizzato di matrice A:

$$\lambda_1 = -4.3; \quad \lambda_2 = -1.8; \quad \lambda_3 = -0.8; \quad \lambda_{4,5} = 0.03 \pm 0.30i$$

a cui corrispondono gli autovettori:

$$u_1 = \begin{pmatrix} 0.098 \\ -0.04 \\ 0.26 \\ -0.81 \\ 0.52 \end{pmatrix} \quad u_2 = \begin{pmatrix} -0.27 \\ -0.18 \\ 0.70 \\ -0.17 \\ -0.61 \end{pmatrix} \quad u_3 = \begin{pmatrix} -0.55 \\ 0.57 \\ 0.29 \\ -0.13 \\ -0.52 \end{pmatrix} \quad u_{4,5} = \begin{pmatrix} 0.78 \\ 0.36 \pm 0.27i \\ 0.09 \pm 0.20i \\ -0.02 \pm 0.22i \\ -0.09 \pm 0.29i \end{pmatrix}$$

I due autovalori complessi $\lambda_{4,5} = \alpha \pm \beta i$ hanno parte reale molto piccola e positiva: gli autovettori corrispondenti determineranno un sottospazio instabile Π (piano delle oscillazioni linearizzate) in cui le soluzioni spiraleggiano verso l'esterno per $t > 0$, con velocità radiale molto più lenta della velocità angolare. I primi tre autovalori sono invece reali e negativi, e i tre corrispondenti autovettori generano il sottospazio stabile nel quale le traiettorie convergono al piano delle oscillazioni. Preso un qualsiasi dato iniziale è quindi presente un moto di schiacciamento sul sottospazio bi-dimensionale instabile, riconducendosi, in tempi relativamente brevi, dallo spazio 5-dimensionale a un sottospazio di dimensione 2. Il moto di compressione avviene su una scala di tempo molto più breve rispetto a quella con cui si svolge il moto di espansione radiale sul piano stesso perchè $|\operatorname{Re}\lambda_{1,2,3}| \gg |\operatorname{Re}\lambda_{4,5}|$. Inoltre, la velocità di rotazione sul piano (determinata dalla parte immaginaria della coppia di autovalori $\lambda_{4,5}$) è confrontabile con la velocità di schiacciamento sul piano stesso, determinata dal modulo degli autovalori reali ($\lambda_{1,2,3}$); il modulo del più piccolo tra questi autovalori invece è circa 30 volte più grande della parte reale della coppia di autovalori complessi ($|\operatorname{Re}\lambda_{4,5}|$), che rappresenta il raggio dell'espansione. La figura 3.2 vuole dare un'idea di quello che avviene nel sistema linearizzato.

Veniamo ora al sistema non lineare. L'equilibrio che stiamo trattando è un *equilibrio iperbolico*: gli autovalori del sistema linearizzato hanno tutti $\operatorname{Re}\lambda \neq 0$. Per questo tipo di sistemi vale un teorema importantissimo detto *teorema della varietà stabile* che garantisce l'esistenza di due sottovarietà invarianti, quella stabile e quella instabile, della stessa dimensionalità dei corrispondenti autospazi lineari e ad essi tangenti, con analoghe proprietà di contrazione e di dilatazione.

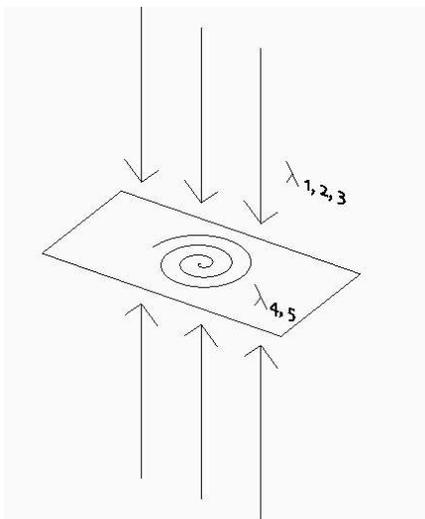


Figura 3.2: rappresentazione schematica del moto di schiacciamento sul piano delle oscillazioni

Nel nostro caso dunque, al sottospazio stabile corrisponderà una varietà stabile a 3 dimensioni, in cui le soluzioni, per $t \rightarrow +\infty$, si schiacciano rapidamente sulla varietà instabile di dimensione 2. Presa una qualsiasi condizione iniziale dunque, le traiettorie si muoveranno lungo la varietà stabile, terminando in un breve lasso di tempo a spiraleggiare sulla varietà invariante tendendo asintoticamente al ciclo limite.

Vogliamo allora ricavare un sistema di due equazioni non lineari sulla varietà stabile, con l'intento di mostrare che esse ammettono un ciclo limite. Nel farlo tuttavia introdurremo qualche approssimazione: le equazioni saranno nonlineari, ma nel dedurle confonderemo geometricamente la varietà stabile col suo piano tangente, ovvero con il sottospazio lineare instabile.

3.1.2 Modello a due variabili

Ora che abbiamo capito che la dinamica del sistema 5-dimensionale collassa rapidamente su una varietà bi-dimensionale, è possibile in qualche modo confrontare il ciclo limite che il sistema genera sulla varietà con le traiettorie descritte delle equazioni di Van der Pol.

Dedurremo qui due equazioni tenendo, oltre ai termini lineari, anche i primi termini non lineari. Il risultato sarà una coppia di equazioni simili all'equazione di Van der Pol. Più precisamente sarà una coppia di equazioni cui è possibile applicare il metodo della media che abbiamo utilizzato nel Capitolo 1.

Come prima cosa dunque, trasformeremo il nostro sistema con la matrice complessa degli autovettori E , passando al sistema nelle nuove coordinate $\dot{z} = g(z)$. Ignorando le prime 3 componenti, riscriveremo le ultime 2 in coordinate polari, restringendoci in questo modo sul piano delle oscillazioni. Concettualmente sarebbe corretto ricavare le equazioni sulla varietà, ma di fatto le approssimiamo con le equazioni sul piano tangente di cui sappiamo, a posteriori, essere una buona approssimazione. Usando il medesimo procedimento utilizzato nel Capitolo 1, medieremo anche queste equazioni e le confronteremo con quelle di Van der Pol.

Come prima cosa, scegliamo opportunamente le coordinate in modo tale da restringerci al piano delle oscillazioni. Possiamo pensare questa restrizione come una proiezione sul piano delle oscillazioni, e per farlo chiediamo che le prime tre coordinate del vettore z siano nulle, mentre esprimo le ultime due in coordinate polari.

Per ricavare il vettore z nella base di autovettori di matrice E partendo dal modello di Goldbeter, consideriamo la matrice E e il cambio di coordinate:

$$x = Ez + \bar{x} \tag{3.3}$$

Da questo esprimiamo $z(x)$ e deriviamo rispetto al tempo ottenendo:

$$\dot{z} = E^{-1}\dot{x} = E^{-1}f(x) = E^{-1}f(Ez + \bar{x}) = g(z) \tag{3.4}$$

Introduco coordinate reali di tipo polare

$$\dot{z} = g(z) = \begin{pmatrix} g_1(r, \phi, t) \\ g_2(r, \phi, t) \\ g_3(r, \phi, t) \\ g_4(r, \phi, t) \\ g_5(r, \phi, t) \end{pmatrix} \tag{3.5}$$

Le componenti g_i del vettore funzioni di r , ϕ e t , hanno espressione complicata, ma possono essere determinate con l'uso di *Mathematica*. Le $g_{1,2,3}$ vengono ignorate perchè stiamo lavorando sulla restrizione al piano delle oscillazioni:

$$\dot{z} = g(z) = \begin{pmatrix} g_4(r, \phi, t) \\ g_5(r, \phi, t) \end{pmatrix} \tag{3.6}$$

Ora esprimo il vettore z appartenente al piano delle oscillazioni in coordinate polari:

$$z = \begin{pmatrix} re^{i(wt+\phi)} \\ re^{-i(wt+\phi)} \end{pmatrix} \quad (3.7)$$

e derivando rispetto al tempo otteniamo:

$$\dot{z} \approx \begin{pmatrix} \dot{r}e^{i(wt+\phi)} + ir(w + \dot{\phi}e^{i(wt+\phi)}) \\ \dot{r}e^{-i(wt+\phi)} - ir(w + \dot{\phi}e^{-i(wt+\phi)}) \end{pmatrix} \quad (3.8)$$

Per ricavare le espressioni di $\dot{r}(r, \phi, t)$ e di $\dot{\phi}(r, \phi, t)$ imponiamo l'uguaglianza tra i vettori (3.6) e (3.8):

$$\dot{r} \approx \frac{1}{2}(g_4(r, \phi, t)e^{-i(wt+\phi)} + g_5(r, \phi, t)e^{i(wt+\phi)}); \quad (3.9)$$

$$\dot{\phi} \approx \frac{1}{2ir}(g_4(r, \phi, t)e^{-i(wt+\phi)} - g_5(r, \phi, t)e^{i(wt+\phi)}). \quad (3.10)$$

Utilizzando lo stesso metodo usato in precedenza per le equazioni di Van der Pol, considero $r(t)$ e $\phi(t)$ costanti e integriamo sul ciclo:

$$\dot{r} \approx \frac{w}{2\pi} \int_0^{\frac{2\pi}{w}} \frac{1}{2}(g_4(r, \phi, t)e^{-i(wt+\phi)} + g_5(r, \phi, t)e^{i(wt+\phi)}) \quad (3.11)$$

$$\dot{\phi} \approx \frac{w}{2\pi} \int_0^{\frac{2\pi}{w}} \frac{1}{2ir}(g_4(r, \phi, t)e^{-i(wt+\phi)} - g_5(r, \phi, t)e^{i(wt+\phi)}) \quad (3.12)$$

Confronteremo allora graficamente l'andamento di $\dot{r}(r)$ e $w(r)$ per il modello di Goldbeter con le equazioni mediate di Van der Pol riscalate opportunamente.

Tra le due, l'equazione più importante per l'esistenza del ciclo limite è quella radiale. Riprendiamo dunque le equazioni mediate di Van der Pol:

$$\dot{r} = \frac{\epsilon}{2}(r - r^3) \quad (3.13)$$

$$\dot{\phi} = 0. \quad (3.14)$$

Attraverso un riscaldamento riportiamo l'ampiezza del ciclo limite a quella trovata per il modello di Goldbeter (0.85) e, allo stesso modo, riscaldiamo il tempo per far combaciare i periodi. Le equazioni mediate diventano così:

$$\dot{r} = \frac{0.85w\epsilon}{2}\left(\frac{r}{0.85} - \left(\frac{r}{0.85}\right)^3\right) \quad (3.15)$$

$$\dot{\phi} = 0 \quad (3.16)$$

L'analisi con Mathematica dà luogo alla rossa per il modello di Goldbeter e alla curva nera per Van der Pol.

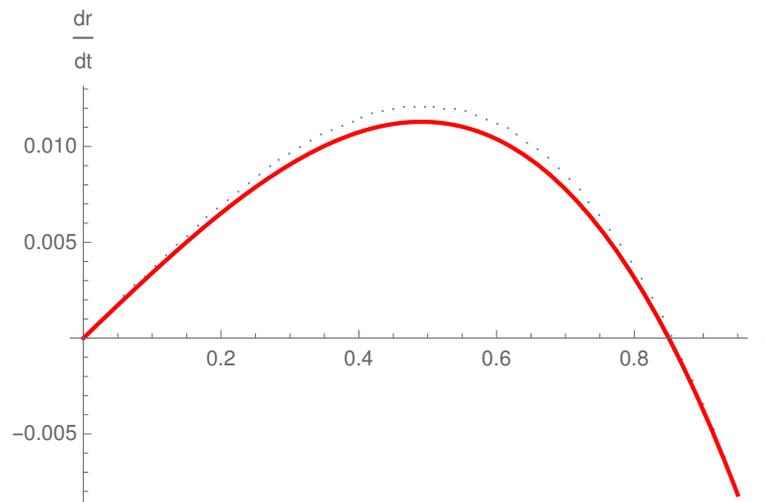


Figura 3.1: in rosso è mostrato il grafico $\dot{r}(r)$ per il modello di Goldbeter in nero per l'equazione di Van der Pol.

E' immediato osservare che la velocità media di espansione radiale del ciclo varia in maniera quasi identica e che in entrambi i casi ho la convergenza a un traiettoria circolare di raggio 0.85. Il grafico è sufficiente a dimostrare l'esistenza di un ciclo limite per il modello di Goldbeter.

Per completezza, confrontiamo l'andamento della frequenza per Goldbeter e per l'oscillatore di Van der Pol.

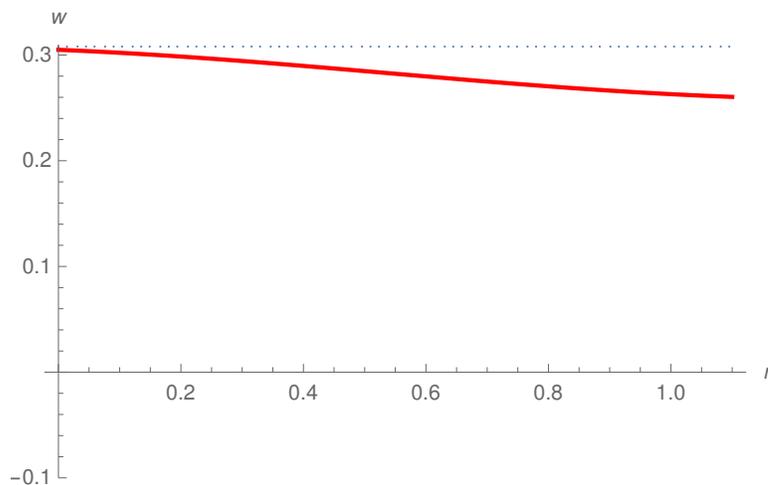


Figura 3.2: in rosso è mostrato il grafico $w(r)$ per il modello di Goldbeter, in nero è tratteggiata la retta relativa all'oscillatore di Van der Pol.

Osserviamo che, mentre la frequenza d'oscillazione per Van der Pol rimane imperturbata al variare del raggio, abbiamo una perturbazione sulla frequenza w del modello di Goldbeter data dal termine 3.12. Posso pensare la funzione che esprime la variazione di w come $w = w_0 + \langle \dot{\phi} \rangle$. Questa leggera differenza tra le due curve può essere ridotta introducendo un termine correttivo nell'equazione dell'oscillatore Van der Pol.

Riconduciamo l'equazione 1.13 a un sistema di due equazioni:

$$\begin{cases} \dot{x} = -wy - \epsilon w \left(\frac{x^3}{3a^2} - x \right) \\ \dot{y} = wx \end{cases} \quad (3.17)$$

Introducendo il termine vy^3 con v piccola nella prima equazione:

$$\begin{cases} \dot{x} = w(y - vy^3) - \epsilon w \left(\frac{x^3}{3a^2} - x \right) \\ \dot{y} = -wx \end{cases} \quad (3.18)$$

La correzione apportata introduce una perturbazione nella frequenza mostrata in figura 3.3:

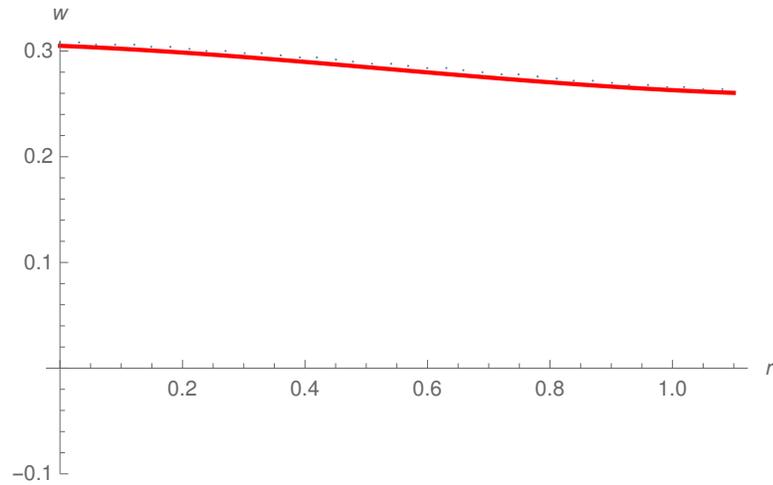


Figura 3.3: in rosso è riportato il grafico di $w(r)$ per il modello di Goldbeter, in nero quello per l'equazione di Van der Pol che tiene conto del termine correttivo.

Quello che ora possiamo osservare è che i grafici ottenuti sono essenzialmente identici anche per la frequenza.

Capitolo 4

Conclusioni

Abbiamo visto che, presa una qualsiasi condizione iniziale per il modello di Goldbeter, le traiettorie si schiacciano rapidamente sulla varietà instabile bi-dimensionale. Quindi, dopo un transiente iniziale di schiacciamento sulla varietà, il sistema si comporta sostanzialmente allo stesso modo di un oscillatore di Van der Pol. Il fatto che esista una così forte similarità tra le equazioni di Van der Pol e il modello di Goldbeter può essere spiegato dalla quasi-linearità di quest'ultimo. Sfruttando il metodo della media infatti, si osserva che il modello di Goldbeter è mediato con gli stessi meccanismi matematici funzionanti per l'oscillatore di Van der Pol: l'espansione radiale è essenzialmente la medesima, e lo stesso si può dire per la frequenza non appena si inserisce un termine correttivo all'equazione di Van der Pol. Abbiamo visto che le variabili che compaiono nell'equazione di Van der Pol, -anche se tengono conto in qualche modo del meccanismo di *feedback* presente nel meccanismo proteico all'interno del nucleo-, non trovano una diretta interpretazione biochimica, ma sono variabili di comodo. D'altro canto il modello di Goldbeter è ottenuto partendo concretamente da un modello biochimico, ma nella sua formalizzazione matematica, si presenta come un sistema a 5 equazioni ben più complesso e meno maneggevole delle equazioni di Van der Pol. La riduzione a un opportuno sottospazio bidimensionale in uno spazio ambiente a 5 dimensioni e la somiglianza riscontrata nell'analisi dell'espansione radiale, ci ha permesso di dimostrare che anche il modello di Goldbeter, come l'equazione di Van der Pol ammette un ciclo limite. L'equazione di Van der Pol ha perciò un analogo biochimico, e questa analogia, attribuendo validità sia al modello di Goldbeter che alle equazioni di Van der Pol nella descrizione degli orologi biologici, evidenzia, più in generale, una forte somiglianza nel funzionamento degli orologi circadiani nei vari esseri viventi.

Appendice A

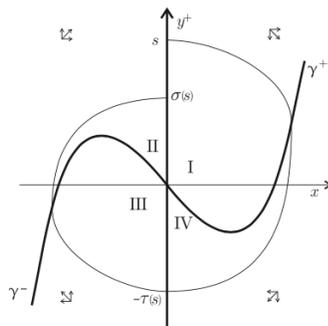
Dimostrazione. Scriviamo l'equazione di Van der Pol come il sistema:

$$\begin{cases} \dot{x} = v \\ \dot{v} = -x - \epsilon(x^2 - 1)v \end{cases} \quad (\text{A.1})$$

e sostituiamo v con una nuova coordinata y tale che $\epsilon y = v + \epsilon \gamma(x)$ dove usiamo $\gamma(x) = \frac{x^3}{3} - x$ per alleggerire la notazione. Otteniamo quindi il sistema:

$$\begin{cases} \dot{x} = \epsilon[y - \gamma(x)] \\ \dot{y} = \epsilon^{-1}\dot{v} + (x^2 - 1)\dot{x} = -\epsilon^{-1}x \end{cases} \quad (\text{A.2})$$

Consideriamo la curva $\gamma(x)$ nel piano xy per dividerlo in 4 regioni.



Definiamo la mappa $\sigma : y^+ \rightarrow y^+$ per la quale, preso s sulla parte positiva dell'asse y (y^+) restituisce il valore $\sigma(s) = s'$ dove $(0, s')$ è il punto in cui la traiettoria $\Phi^t(s)$ interseca per la prima volta y^+ . Le possibili intersezioni danno:

$$\begin{cases} \sigma(s) = s, & \text{la traiettoria non può che essere chiusa} \\ \sigma(s) > s, & \text{la traiettoria spiraleggia verso l'esterno} \\ \sigma(s) < s, & \text{la traiettoria spiraleggia verso l'interno} \end{cases} \quad (\text{A.3})$$

Considero la mappa corrispondente al mezzo giro $\tau : y^+ \rightarrow y^+$. Se $s \in y^+$ e $(0, -s') \in y^-$ è il punto in cui $\phi^t(s)$ interseca per la prima volta y^- , avremo $\tau(s) = s' \in y^+$. Componendo τ due volte è evidente che $\sigma(s) = \tau(\tau(s))$, e posso riscrivere i tre casi precedenti riferendomi a $\tau(s)$ così:

$$\begin{cases} \tau(s) = s, & \text{la traiettoria non può che essere chiusa} \\ \tau(s) > s, & \text{la traiettoria spiraleggia verso l'esterno} \\ \tau(s) < s, & \text{la traiettoria spiraleggia verso l'interno} \end{cases} \quad (\text{A.4})$$

Per dimostrare l'esistenza di un'unica orbita periodica, bisogna mostrare che la funzione

$$\delta(s) = \frac{1}{2}(\tau(s)^2 - s^2) \quad (\text{A.5})$$

ammette un unico zero $s^* \in \mathbb{R}^2$. Dimostriamo quindi il seguente lemma:

Lemma 1 *Esiste un valore \bar{s} tale che*

1. $\delta(s) > s$ per $0 < s \leq \bar{s}$;
2. $\delta(s)$ è strettamente decrescente per $s \leq \bar{s}$;
3. il limite per $s \rightarrow +\infty$ di $\delta(s)$ è $-\infty$.

Dimostrazione. Per ogni $s > 0$, sia t_s l'istante in cui la traiettoria che parte da $(0, s)$ interseca per la prima volta il semiasse y^- . Consideriamo ora la funzione $W(x, y) = \frac{1}{2}(\epsilon^{-2}x^2 + y^2)$ Dall' equazione (A.5) segue:

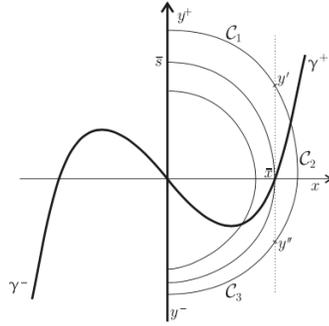
$$\delta(s) = W(0, y_s(t_s)) - W(0, s) = \int_0^{t_s} \dot{W}(x_s(t), y_s(t)) dt \quad (\text{A.6})$$

Dalle equazioni del moto segue che $\dot{W} = \epsilon^{-2}x\dot{x} + y\dot{y} = -\epsilon^{-1}x\gamma(x)$, dunque vale:

$$\delta(s) = -\epsilon^{-1} \int_0^{t_s} \dot{x}_s(t)\gamma(x_s(t))dt \quad (\text{A.7})$$

Sia ora $\bar{s} > 0$ il punto di y^+ tale che la traiettoria uscente da $(0, \bar{s})$ tagli l'asse x nel suo punto di intersezione tra γ e l'asse stesso $(\bar{x}, 0) \in \gamma^+$ (avendo $\gamma(x) = \frac{x^3}{3} - x = 0$, risulta $\bar{x} = \sqrt{3}$). Ora, se $s < \bar{s}$ allora $\gamma(x_s(t)) \leq 0$ per ogni $0 \leq t \leq t_s$ e in tali condizioni l'integrale nell'equazione (A.6) risulta positivo, quindi $\delta(s) > 0$; il punto 1 è verificato.

Per verificare il secondo punto, consideriamo una traiettoria uscente da $(0, s)$ con $s > \bar{s}$ e la dividiamo in tre curve C_1, C_2, C_3 , a seconda che sia $x_s(t) < \bar{x}, x_s(t) \geq \bar{x}, x_s(t) < \bar{x}$, con l'ultima condizione nel semipiano $y < 0$ come in disegno:



e scriviamo quindi:

$$\delta(s) = \int_{C_1} \dot{W}dt + \int_{C_2} \dot{W}dt + \int_{C_3} \dot{W}dt \quad (\text{A.8})$$

Considero il primo integrale:

$$\int_{C_1} \dot{W}dt = \int_{C_1} \dot{W}(x_s(t), y_s(t))dt = -\epsilon^{-2} \int_0^{\bar{x}} \frac{x\gamma(x)}{y_s(x) - \gamma(x)}dx \quad (\text{A.9})$$

L'integrale è positivo e decrescente al crescere di s . Analogamente si vede che l'integrale $\int_{C_3} \dot{W}dt$ è decrescente in s e positivo. Ora, per studiare il contributo della seconda curva

C_2 considero y come variabile indipendente e chiamo $\chi(y)$ la curva definita implicitamente dalla traiettoria considerata:

$$\int_{C_2} \dot{W} dt = - \int_{y'}^{y''} \gamma(\chi_s(y)) dy, \quad (\text{A.10})$$

gli estremi di integrazione sono ordinati in modo tale che sia $y'_s < y''_s$, cioè in ordine opposto rispetto al verso di percorrenza. L'integrale considerato è negativo e di modulo crescente in s . Infatti, fissato y , $\chi_s(y)$ cresce, e allo stesso modo cresce anche γ e il dominio di integrazione si allarga in y . Questo è sufficiente per concludere che $\delta(s) = -\epsilon^{-1} \int_0^{t_s} \dot{x}_s(t) \gamma(x_s(t)) dt$ è strettamente decrescente per $s \geq \bar{s}$ dimostrando così anche il punto 2. del lemma. Infine, poichè la traiettoria, al crescere di s si sposta sempre più verso destra, abbiamo $\lim_{s \rightarrow \infty} \delta(s) = -\infty$.

Dal lemma si deduce quindi che esiste un unico zero $s^* \in \mathbb{R}^+$ e quindi una e una sola orbita periodica. Per $0 < s < s^*$ si ha $\delta(s) > 0$, e dunque la successione $\sigma^k(s)$ è crescente e il suo limite coincide con s^* , analogamente se $s > s^*$ si avrà $\delta(s) < 0$ con la successione $\sigma^k(s)$ decrescente con limite coincidente con s^* . L'orbita è quindi attrattiva.

Bibliografia

- [1] G. BENETTIN *Una passeggiata tra i Sistemi Dinamici*, Dispensa del docente per la Scuola Galileiana; Padova, 2011.
- [2] R. COSTA, *Circadian rhythms and human health*, Presentazione per 20th Annual Meeting, Poiano, Lago di Garda, 14-16 Ottobre 2016.
- [3] D. B. FORGER, M. E. JEWETT, R. E. KRONAUER *A simpler model of the Human Circadian Pacemaker* , J. Biolog. Rhythms, 14 (1999), pp. 532-537.
- [4] D. B. FORGER, R. E. KRONAUER *Reconciling mathematical models of biological clocks by averaging on approximate manifolds*, SIAM J. Appl. Math, 2002, Vol. 62, No. 4, pp. 1281-1296.
- [5] A. GOLDBETER, *A model for circadian oscillations in the Drosophila period protein PER*, Proc. R. Soc. Lond. B (1995) 261, pp. 319-324.
- [6] M. GLOBIG *A world without day or night* , M. Planck research magazine 2/2007.
- [7] R. E. KRONAUER *Commentary on the mathematical model of the human circadian system* American Physiological Society (1982) R17, R20.
- [8] J. A. SANDERS, F. VERNHULST, J. MURDOCK *Averaging methods in nonlinear dynamical systems* , Springer 2007.