



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS  
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**UNIDAD MONTERREY  
INGENIERÍA Y FÍSICA BIOMÉDICAS**

Modelos dinámicos de redes de regulación para el  
control de la diferenciación en bacterias modelo

**Tesis que presenta**

MC César Quiñones Valles

**para obtener el Grado de**

**Doctor en Ciencias**

en

Ingeniería y Física Biomédicas

**Director de Tesis:** Dr Agustino Martínez Antonio

Apodaca, Nuevo León

, 2014



# Agradecimientos

Al CONACYT por los apoyos del proyecto N° 103686 y por la beca para la realización de estudios de posgrado.

Al CINVESTAV en especial a las Unidades Monterrey e Irapuato por brindarme la formación y el apoyo necesarios para el desarrollo y conclusión satisfactoria del programa de Doctorado.

Al Dr. Agustino Martínez Antonio por su apoyo y dirección en la planeación y ejecución de este proyecto. Además de las enseñanzas académicas y personales.

Así mismo a los Dres. Moisés Santillán Zerón, Jesús G. Rodríguez González, Daniel P. Sánchez Herrera y J. Rubén Morones Ramírez por sus observaciones, revisión de reportes y al presente texto. Además de la disposición y ayuda en la realización del trabajo.

Al Laboratorio de Biosistemas y Biología Sintética del CINVESTAV Irapuato por las facilidades, materiales e infraestructura brindadas para el desarrollo de esta tesis. Así como a los integrantes que han formado parte del grupo.

A la Lic. Diana L. Vargas Castillo por su gran ayuda y disposición en la realización de trámites académicos y administrativos en el programa doctoral.

# Índice general

Agradecimientos	I
Índice general	II
Lista de figuras	V
Lista de tablas	VI
Lista de abreviaturas	IX
Lista de ecuaciones	X
Resumen .....	1
Abstract .....	3
1. Introducción .....	5
1.1. División celular, división asimétrica y diferenciación celular .....	5
1.2. Estudio de redes de regulación .....	7
1.3. Modelos matemáticos y análisis sobre redes de diferenciación celular .....	8
1.4. <i>C. crescentus</i> , su ciclo y diferenciación celular, y los reguladores relevantes de ambos procesos .....	9
1.5. <i>B. subtilis</i> , diferenciación celular y formación de biofilm, y los reguladores implicados en el control del proceso .....	11
1.6. Planteamiento y justificación del problema .....	14

2. Objetivos .....	18
2.1. Objetivo General .....	18
2.2. Objetivos Particulares .....	18
3. Adquisición de datos y procesamiento .....	19
3.1. Adquisición de la información .....	20
3.2. Reconstrucción de las redes de regulación .....	21
3.3. Reducción de las redes a su red central .....	23
3.4. Formalismo lógico para el modelado de las redes centrales $G_2$ .....	30
3.5. Régimen dinámico de las redes $G_2$ .....	33
4. Resultados .....	35
4.1. Red de regulación para <i>C. crescentus</i> .....	27
4.1.1. Reducción de la red de regulación en <i>C. crescentus</i> .....	27
4.1.2. Descripción funcional de la red $G_2$ en <i>C. crescentus</i> .....	28
4.1.3. Descripción de la subred transcripcional $G_{2a}$ .....	28
4.1.4. Descripción de la subred de señalización fosfo-proteólisis $G_{2b}$ .....	28
4.1.5. Modelo lógico multi-valor para la descripción del ciclo celular y división asimétrica en <i>C. crescentus</i> .....	35
4.1.6. Dinámicas en el ciclo de vida de la célula anclada en <i>C. crescentus</i> .....	35
4.1.7. Dinámica del ciclo celular del tipo anclado y sus diferencias dinámicas con el ciclo celular flagelado en <i>C. crescentus</i> .....	39
4.1.8. Transición del tipo flagelado al anclado en <i>C. crescentus</i> .....	40
4.1.9. Simulación de las dinámicas de perturbaciones a la red de regulación en <i>C.</i> <i>crescentus</i> .....	40
4.1.10. Régimen dinámico de la red $G_2$ en <i>C. crescentus</i> .....	43
4.2. Red de regulación en <i>B. subtilis</i> .....	45
4.2.1. Reducción de la red de regulación en <i>B. subtilis</i> .....	44
4.2.2. Descripción funcional de la red $G_2$ en <i>B. subtilis</i> .....	29

4.2.3. Modelo lógico multi-valor para descripción de la diferenciación celular en <i>B. subtilis</i> .....	44
4.2.4. Dinámica de la $G_2$ para el control de la elección del destino celular en <i>B. subtilis</i> .....	44
4.2.5. Simulación de las dinámicas de perturbaciones a la $G_2$ en <i>B. subtilis</i> ....	47
4.2.6. Régimen dinámico para la $G_2$ en <i>B. subtilis</i> .....	49
5. Discusión .....	51
6. Conclusiones .....	57
7. Perspectivas .....	60
8. Bibliografía .....	63
Apéndice .....	73

# Lista de figuras

1.	<b>Figura 1.</b> Esquema de una red de regulación y la representación de su dinámica. . . .	8
2.	<b>Figura 2.</b> Esquema representativo del ciclo celular y división asimétrica en <i>C. crescentus</i> . . . . .	10
3.	<b>Figura 3.</b> Esquema representativo de la diferenciación en <i>B. subtilis</i> . . . . .	13
4.	<b>Figura 4.</b> Proyecto general del enfoque teórico seguido en este trabajo . . . . .	20
5.	<b>Figura 5.</b> Red de regulación del ciclo celular y diferenciación en <i>C. crescentus</i> . .	22
6.	<b>Figura 6.</b> Red de regulación mínima para el control del ciclo celular y división asimétrica en <i>C. crescentus</i> . . . . .	24
7.	<b>Figura 7.</b> Representación de la evolución o dinámica de los estados de una red dada . . . . .	32
8.	<b>Figura 8.</b> Puntos fijos de la red de regulación del ciclo celular en <i>C. crescentus</i> . . .	37
9.	<b>Figura 9.</b> Puntos fijos de la red de división asimétrica en <i>C. crescentus</i> . . . . .	38
10.	<b>Figura 10.</b> Mapa de Derrida para el análisis de sensibilidad de la subred de ciclo celular y división asimétrica en <i>C. crescentus</i> . . . . .	43
11.	<b>Figura 11.</b> Red de regulación para diferenciación en <i>B. subtilis</i> . . . . .	44
12.	<b>Figura 12.</b> Red de regulación genética reducida para el control de la diferenciación en <i>B. subtilis</i> . . . . .	45
13.	<b>Figura 13.</b> Paisaje de atractores exhibidos por la red de regulación de <i>B. subtilis</i> .	46
14.	<b>Figura 14.</b> Mapa de Derrida de la sensibilidad de la red de regulación de diferenciación en <i>B. subtilis</i> . . . . .	50

# Lista de tablas

1.	<b>Tabla 1.1</b> Componentes de la subred $G_2$ en <i>C. crescentus</i> .. . . . .	25
2.	<b>Tabla 2.1</b> Dinámicas de simulaciones de perturbaciones en nodos en la subred $G_{2a}$ en <i>C. crescentus</i> . . . . .	41
3.	<b>Tabla 3.1</b> Dinámicas de simulaciones de cepas constitutivas o sobre-expresantes de nodos en la subred $G_{2a}$ en <i>C. crescentus</i> . . . . .	41
4.	<b>Tabla 4.1</b> Dinámicas de simulaciones de perturbaciones en nodos en la subred $G_{2b}$ en <i>C. crescentus</i> . . . . .	42
5.	<b>Tabla 5.1</b> Dinámicas de simulaciones de cepas constitutivas o sobre-expresantes de nodos en la subred $G_{2b}$ en <i>C. crescentus</i> . . . . .	42
6.	<b>Tabla 6.1</b> Componentes de la subred $G_2$ para diferenciación en <i>B. subtilis</i> . . . . .	44
7.	<b>Tabla 7.1</b> Puntos fijos para la subred $G_2$ de diferenciación en <i>B. subtilis</i> . . . . .	45
8.	<b>Tabla 8.1</b> Cuencas de atracción para la subred $G_2$ de diferenciación en <i>B. Subtilis</i> .	47
9.	<b>Tabla 9.1</b> Dinámicas de simulaciones de perturbaciones en nodos en la subred $G_2$ en <i>B. subtilis</i> . . . . .	48
10.	<b>Tabla 10.1</b> Dinámicas de simulaciones de cepas constitutivas o sobre-expresantes de nodos en la subred $G_2$ en <i>B. subtilis</i> . . . . .	49
11.	<b>Tabla 1.2</b> Función lógica para la evolución temporal del estado del nodo CtrA de la subred $G_{2a}$ de <i>C. crescentus</i> . . . . .	73
12.	<b>Tabla 2.2</b> Función lógica para la evolución temporal del estado del nodo GcrA de la subred $G_{2a}$ de <i>C. crescentus</i> . . . . .	73
13.	<b>Tabla 3.2.</b> Función lógica para la evolución temporal del estado del nodo DnaA de la subred $G_{2a}$ de <i>C. crescentus</i> . . . . .	73
14.	<b>Tabla 4.2.</b> Función lógica para la evolución temporal del estado del nodo CcrM de la subred $G_{2a}$ de <i>C. crescentus</i> . . . . .	73



15.	<b>Tabla 5.2.</b> Función lógica para la evolución temporal del estado del nodo SciP de la subred $G_{2a}$ de <i>C. crescentus</i> . . . . .	73
16.	<b>Tabla 6.2.</b> Función lógica para la evolución temporal del estado del nodo CtrA de la subred $G_{2b}$ de <i>C. crescentus</i> . . . . .	74
17.	<b>Tabla 7.2.</b> Función lógica para la evolución temporal del estado del nodo DivK de la subred $G_{2b}$ de <i>C. crescentus</i> . . . . .	74
18.	<b>Tabla 8.2.</b> Función lógica para la evolución temporal del estado del nodo PleC de la subred $G_{2b}$ de <i>C. crescentus</i> . . . . .	74
19.	<b>Tabla 9.2.</b> Función lógica para la evolución temporal del estado del nodo DivJ de la subred $G_{2b}$ de <i>C. crescentus</i> . . . . .	74
20.	<b>Tabla 10.2.</b> Función lógica para la evolución temporal del estado del nodo DivL de la subred $G_{2b}$ de <i>C. crescentus</i> . . . . .	74
21.	<b>Tabla 11.2.</b> Función lógica para la evolución temporal del estado del nodo CckA de la subred $G_{2b}$ de <i>C. crescentus</i> . . . . .	74
22.	<b>Tabla 12.2.</b> Función lógica para la evolución temporal del estado del nodo ChpT de la subred $G_{2b}$ de <i>C. crescentus</i> . . . . .	75
23.	<b>Tabla 13.2.</b> Función lógica para la evolución temporal del estado del nodo CpdR de la subred $G_{2b}$ de <i>C. crescentus</i> . . . . .	75
24.	<b>Tabla 14.2.</b> Función lógica para la evolución temporal del estado del nodo ClpXP-RcdA de la subred $G_{2b}$ de <i>C. crescentus</i> . . . . .	75
25.	<b>Tabla 15.2.</b> Función lógica para la evolución temporal del estado del nodo Spo0A de la subred $G_2$ de <i>B. subtilis</i> . . . . .	75
26.	<b>Tabla 16.2.</b> Función lógica para la evolución temporal del estado del nodo ComK de la subred $G_2$ de <i>B. subtilis</i> . . . . .	75
27.	<b>Tabla 17.2.</b> Función lógica para la evolución temporal del estado del nodo DegU de la subred $G_2$ de <i>B. subtilis</i> . . . . .	75
28.	<b>Tabla 18.2.</b> Función lógica para la evolución temporal del estado del nodo AbrB de la subred $G_2$ de <i>B. subtilis</i> . . . . .	76
29.	<b>Tabla 19.2.</b> Función lógica para la evolución temporal del estado del nodo SigA de la subred $G_2$ de <i>B. subtilis</i> . . . . .	76

30. **Tabla 20.2.** Función lógica para la evolución temporal del estado del nodo SigH de la subred  $G_2$  de *B. subtilis*. . . . . 76

31. **Tabla 21.2.** Función lógica para la evolución temporal del estado del nodo ScoC de la subred  $G_2$  de *B. subtilis*. . . . . 76

32. **Tabla 22.2.** Función lógica para la evolución temporal del estado del nodo CodY de la subred  $G_2$  de *B. subtilis*. . . . . 76

33. **Tabla 23.2.** Función lógica para la evolución temporal del estado del nodo Med de la subred  $G_2$  de *B. subtilis*. . . . . 76

34. **Tabla 24.2.** Función lógica para la evolución temporal del estado del nodo SinI de la subred  $G_2$  de *B. subtilis*. . . . . 77

35. **Tabla 25.2.** Función lógica para la evolución temporal del estado del nodo SinR de la subred  $G_2$  de *B. subtilis*. . . . . 77

# Lista de abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
RNAm	Ácido ribonucleico mensajero

# Lista de ecuaciones

Ecuación 1:  $\sigma_i(t+1) = f_i(\sigma_{i_1}(t), \sigma_{i_2}(t), \dots, \sigma_{i_k}(t))$

Ecuación para la evolución de estados en la dinámica de la subred  $G_2$

Ecuación 2:  $h(t) = |S_1(t) - S_2(t)|$

Distancia Hamming entre dos estados en la dinámica de la red

Ecuación 3:  $h(t+1) = M(h(t))$

Media del tamaño de las perturbaciones entre dos pasos de tiempo consecutivos

Ecuación 4:  $m = dM(h)/dh$

Derivada de las distancias Hamming entre estados dinámicos en una red



# Resumen

La división celular es el proceso que permite a los organismos sobrevivir y aumentar el número poblacional. Algunas especies bacterianas han desarrollado procesos para responder a condiciones ambientales adversas como es el caso de la diferenciación celular. Entre los organismos que presentan estos fenómenos están *Caulobacter crescentus* y *Bacillus subtilis*.

A pesar del avance en el entendimiento de la división asimétrica en bacterias, sobre todo en los microorganismos anteriormente mencionados, existen interrogantes sin resolver. Algunas de estas interrogantes son: ¿Cómo se decide que tipo celular formar?, ¿A qué obedece la expresión oscilatoria de reguladores del ciclo celular y división asimétrica?, ¿Cuál es el mínimo número de reguladores necesarios para definir los procesos de formación de tipos celulares?

El objetivo principal de este proyecto fue reconstruir y modelar la dinámica de la red que controla el ciclo y diferenciación celular en dos bacterias modelo; *C. crescentus* y *B. subtilis*. Para conseguir dicho objetivo, se reconstruyeron las redes de regulación asociadas a la división celular. Posteriormente se redujeron las redes para incluir solo a los reguladores. Finalmente, se realizó el formalismo matemático tipo lógico multi-valor para modelar la dinámica de estas redes reducidas.

Como resultado del modelado se obtuvieron los atractores en el modelo dinámico. Dichos atractores contienen a los elementos cuya actividad hace sentido en el contexto biológico en el desarrollo de cada fenotipo o etapa del ciclo celular. Posteriormente se realizaron simulaciones de la dinámica al eliminar un nodo de la red a la vez. Los resultados de estas simulaciones de deleciones de genes fueron parecidos con la evidencia experimental existente.

Además se analizó la sensibilidad dinámica de las redes ante perturbaciones, esto mediante el mapa de Derrida. En dicho mapa, se grafica la evolución temporal de la distancia Hamming entre dos vectores de estados, y nos arroja un valor que puede interpretarse como la sensibilidad de la red ante cambios en sus componentes. Las redes analizadas resulta que operan en el régimen ordenado, muy cercanas el crítico, esto podría explicar porque dichas redes sean robustas y adaptables a cambios en las condiciones del medio ambiente.

El presente trabajo, pretende aportar una visión general integrada y cualitativa del control del ciclo celular en *C. crescentus* y del proceso de generación de múltiples fenotipos en *B. subtilis*.

# Abstract

Cellular division is the process that allows organisms to survive and increase their population number. Some bacterial species develop differentiation processes to overcome some adverse conditions, like the case of asymmetric cell division. Among organisms that show these processes are the bacteria *Caulobacter crescentus* and *Bacillus subtilis*.

Despite progress on the understanding of differentiation mechanisms in bacteria, particularly on the above microorganisms, there are unresolved questions, some of these are: How is decided each cell type? What controls the oscillatory pattern of regulators of the cell cycle and asymmetric cell division? What is the minimum number of regulators needed to define the differentiation processes?

The main purpose of this work was to reconstruct and analyze the dynamical model of regulatory networks that control the cell cycle and differentiation in two bacterial models; *C. crescentus* y *B. subtilis*. To achieve this objective, first, the regulatory networks were reconstructed. Later, the networks were reduced until their minimal regulatory elements. Finally, the mathematical formalism of multi-value logic type was performed to model the network dynamics.

As a result of the modeling, we could obtain the attractor states o limit cycles. The configurations of regulatory elements on these attractors agree with what is known by experimental evidences; i.e. the states of the proteins that are found in each phenotype or cell cycle stage. Subsequently, some dynamical simulations were done performing node deletions in the network. Results of these simulations were in agreement with available experimental evidence.



The dynamical sensitivity of networks to perturbation was also analyzed, this by using the Derrida map. In this map, the temporal evolution of the Hamming distance between two given state vectors is plotted, and shows the sensitivity value. It result the analyzed networks operate in the ordered regime very close to the critic, indicating that these networks are robust but adaptable to dynamical perturbations.

This work might contributes to give an integrated and qualitative overview on the control of the cell cycle in *C. crescentus*, and on the processes for generation of multiple phenotypes in *B. subtilis*.

# 1. Introducción

El proceso de división celular es un tema ampliamente estudiado en múltiples aspectos. Mediante este proceso los organismos incrementan su número poblacional y subsisten. Por otro lado, al dividirse ciertos organismos pueden generar dos tipos de células distintos en un proceso que se caracteriza por una división polar, llamada división asimétrica. Esta difiere de la división simétrica, ya que genera dos células hijas diferentes a partir de un solo tipo celular.

La división celular no es el único mecanismo de diferenciación, algunas células también pueden dar lugar a algunos fenotipos o a linajes celulares concretos, dependiendo del grado de potencialidad que tengan. La diferenciación permite a las células adquirir diferentes morfologías y, en algunos casos, funciones específicas y diferentes del resto de las células. Varios de estos fenotipos diferenciados son células que le confieren ventajas a la población ante condiciones ambientales desfavorables.

Para estudiar y analizar los ciclos de vida de los organismos estos se clasifican y dividen en etapas definidas por distintos eventos. Durante las etapas que conforman este ciclo de vida los organismos sufren cambios en los patrones de expresión de ciertos factores de transcripción específicos mismos que desencadenan cascadas de expresión genética que darán lugar a la formación de cierto tipo celular.

## 1.1 División asimétrica y diferenciación celular

La división celular es el proceso mediante el cual las células parentales se dividen y generan dos o más células hijas. En procariontes (bacterias) la segregación del material genético replicado se da de manera equitativa a cada nueva célula formada. Esto incluye que los nucleoides replicados sean segregados a cada polo de la nueva célula previo a la

citocinesis, la formación del septo de división y finalmente la separación física de cada célula [1]. Un proceso particular de la división celular es la división asimétrica, donde al dividirse las células generan dos células diferentes; funcional y morfológicamente. La división asimétrica aparentemente es producto de heterogeneidades espaciales intracelulares que tendrán un efecto sobre los perfiles de expresión génica y en la formación y localización del septo de división [2].

Por otro lado, un fenómeno particular de la división asimétrica es la generación de dos células hijas con diferentes tipos celulares. A este proceso se le conoce como diferenciación celular, donde una célula madre origina a dos tipos de células diferenciadas [3]. Además algunas células sin dividirse asimétricamente se pueden diferenciar en células más especializadas. Este proceso de desarrollo se induce por un cambio o *switch* en los patrones o perfiles de expresión genéticos particulares, principalmente como producto de la actividad de las redes de regulación genética [4].

Muchos procesos celulares influyen o son influidos durante este cambio de identidad celular, entre ellos hay cascadas de señalización; ej. ante un cambio celular o señal ambiental que desencadena el proceso [5], controles epigenéticos; ej. cambios en metilación de nucleótidos [6], entre otros.

En este respecto, Waddington propuso que la diferenciación celular podría ser visualizada por medio de una metáfora, donde una célula madre se encontraría en la parte superior de una colina, y entra en diferenciación conforme desciende, luego toma ciertos caminos que serían los destinos celulares, por último llegaría a un determinado valle que correspondería al fenotipo o tipo celular terminal [7]. Por otra parte, también propuso que ciertas condiciones celulares le permitían a los organismos formar estos fenotipos de una forma robusta y adaptable, en un proceso que llamó canalización [8].

## 1.2 Estudio de redes de regulación

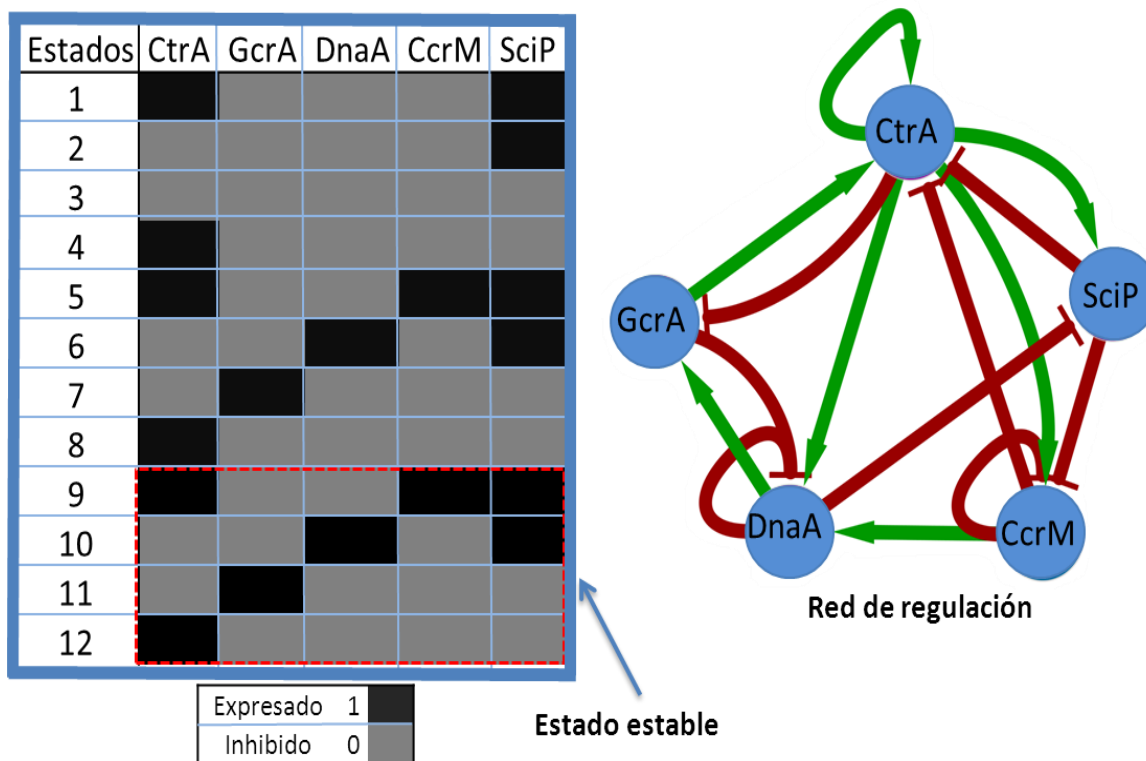
Las redes son estructuras que presentan interconexiones entre sus elementos, formalmente se pueden describir como un grafo ( $G$ ). Dicho  $G$ , está constituido de vértices ( $V$ ) y aristas ( $E$ );  $G = (V,E)$ . El conjunto de vértices o nodos son los actores o entes de conexión y el conjunto de aristas corresponderían a los vínculos entre ellos. Los grafos pueden ser dirigidos cuando las aristas tienen direccionalidad, representada por una flecha en el sentido de la dirección, lo cual indica que para una interacción dada existe un nodo de inicio y uno de término [9].

En el estudio de redes, se pueden analizar aspectos tanto topológicos como dinámicos. Dentro de los estudios topológicos de las redes, destacan la descripción de grados de salida y de entrada, coeficientes de agrupamiento, distribución de los grados, entre otros [10]. Al analizar las redes, también se observó que los nodos se podían agrupar en módulos y motivos. Los motivos son subestructuras de las redes que están sobre-representadas con respecto a arreglos aleatorios y tienen peculiaridades, como la retroalimentación [11]. De los análisis dinámicos que se pueden realizar a los  $G$ , existen modelos que describen cambios temporales en los estados de los nodos de dichas redes [12].

Por otro lado, debido a la disponibilidad de un buen número de datos de regulación celular, resulta necesario un marco de referencia y metodológico para poder estudiar dichos datos. La representación de dichos datos por medio de redes resulta una herramienta muy prolífica, a partir de la cual se han reconstruido redes de regulación a distintos niveles, principalmente; las redes de regulación transcripcional, redes metabólicas, entre otras [13].

A partir de esta representación de red se puede analizar, como se mencionó anteriormente, la dinámica que podría exhibir dicha red. La Figura 1 muestra un esquema representativo de una red de regulación, en este caso es una red a nivel transcripcional. En esta red se esquematiza la representación de un modelo dinámico aplicado al estudio de dicha red, donde al usar variables binarias podemos analizar la sucesión temporal en los estados que podrían adquirir los nodos (1–activo– o 0–inactivo–). De estos análisis se obtienen los

estados estables, en este caso es periódico también llamado “ciclo límite”. Los estados estables son estados a los que el sistema llegará y una vez alcanzado no pasará de dicho estado o estados [14].



**Figura 1.** Esquema de una red de regulación y la representación de su dinámica. Se muestra el esquema de una red de regulación entre los genes/proteínas y las interconexiones entre ellos, además a la izquierda se muestra la representación de la dinámica donde se puede apreciar el estado que puede tener algún gen en un momento dado (1 o 0), y como en pasos de tiempo o transiciones de estados discretos, esa condición inicial alcanza un estado estable periódico (en este caso) llamado “ciclo límite”, que se puede apreciar en el recuadro rojo. Más adelante en el texto esta misma red se describirá a detalle.

### 1.3 Modelos matemáticos y análisis de redes de diferenciación celular

Un enfoque de análisis de los sistemas biológicos es por medio de los modelos matemáticos. Esta perspectiva teórica provee de ciertas ventajas al análisis, una de ellas es la integración de la información existente sobre moléculas que controlan cierto proceso; que son producto de experimentos individuales realizados en los laboratorios. Al analizar la

dinámica espacio-temporal, se pueden apreciar ciertos fenómenos que no son evidentes al examinar por separado las moléculas que integran el sistema de control.

Desde la década de los 70s, Kauffman propuso que por medio de redes booleanas aleatorias los puntos fijos de una red pudieran reflejar los fenotipos que experimenta cierto organismo al diferenciarse [15]. Posteriormente, se aplicaron exitosamente estos modelos en redes biológicas reales para describir la emergencia de tipos celulares [16], [17], [18]. Los ejemplos incluyen al fago lambda, en donde la dinámica de la red presenta dos puntos fijos que corresponden a las fases de lisis y lisogenia [16]. También la red de regulación del desarrollo floral en *Arabidopsis thaliana* misma que en su dinámica mostró diez estados atractores los cuales corresponderían a los estados de los reguladores de la red en los diez destinos celulares florales [17]. El modelo de formación de las células linfocitos Th que exhiben dos fenotipos [18] y existe evidencia experimental que dichos puntos fijos de los modelos teóricos y sus trayectorias corresponden con los patrones en los perfiles de expresión génica que toman dichos factores de transcripción al diferenciarse los linfocitos en neutrófilos [19].

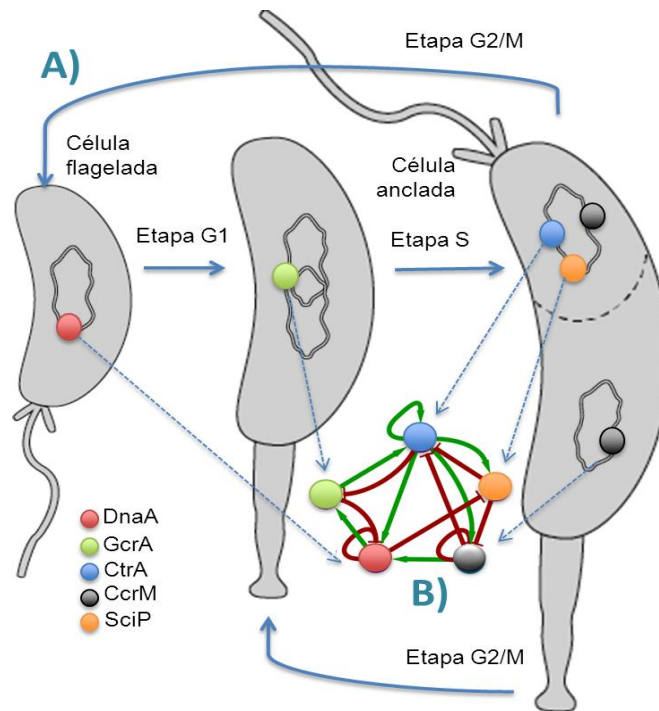
#### **1.4 *Caulobacter crescentus*, su ciclo de vida, diferenciación celular y los reguladores relevantes de ambos procesos**

*Caulobacter crescentus* es un organismo modelo para el estudio del ciclo celular y diferenciación en bacterias [20]. Es bien sabido que este organismo se diferencia y divide asimétricamente y genera dos fenotipos: el tipo celular anclado y el flagelado [21], [22]. Su ciclo celular comparte algunas similitudes operacionales con el ciclo celular de organismos eucariontes [23]. Una visión en conjunto del ciclo celular en *C. crescentus* se ilustra en la Figura 2.

Para propósitos de su estudio, el ciclo celular en esta bacteria se divide en tres etapas: G1, S y la G2/M [24]. La etapa G1 es caracterizada por diferenciación de la célula flagelada a la célula anclada. Durante esta fase, la bacteria libera el flagelo, retracta el pili, se inicia la síntesis del ancla y la replicación de su material genética [25]. En la siguiente etapa, S,

también conocida como etapa de pre-división, el ADN es completamente replicado y los nucleoides son segregados a cada polo celular [26]. Esta pre-división produce compartimentalización y polos celulares diferenciados [27]. En cada uno de estos microdominios espaciales, como también son llamados los polos diferenciales, un tipo celular será formado, sin embargo todavía no se conocen bien los detalles de cómo ocurre este proceso.

En la siguiente etapa, G2/M, la bacteria se divide asimétricamente y se completa la metilación de ambas cadenas de ADN [28]. Como producto de este evento se generan dos tipos celulares que difieren morfológica y bioquímicamente [29]. El tipo celular anclado presenta un apéndice y las estructuras del ancla, que le confieren la habilidad de permanecer adherido a superficies sólidas y es el único capaz de replicar su material genético [30].



**Figura 2.** Esquema representativo del ciclo celular y división asimétrica en *C. crescentus*. A) Distintas etapas del ciclo celular, la descripción comienza con la etapa G1 donde se da la diferenciación de la célula flagelada a la anclada, posteriormente se da la etapa S o pre-división en la que se termina la replicación y translocación de los cromosomas, por último sucede la etapa G2/M en la que se concluye la división asimétrica y por ende la formación de los dos tipos celulares. B) Red de regulación esquemática que señala las interacciones de las proteínas reguladoras y en qué etapa del ciclo celular actúan.

Un regulador clave identificado en el control del ciclo celular en *C. crescentus* es CtrA [20]. Este factor de transcripción regula aproximadamente a 100 genes, la mayoría de ellos dedicados al desarrollo del flagelo, pili y quimiotaxis. CtrA se une a la región *oriC*; que es el origen de replicación del ADN donde bloquea el acceso de DnaA a dicha región del cromosoma, esto provoca que se inhiba el inicio de la replicación del material genético [30].

El regulador transcripcional e iniciador de la replicación del cromosoma, DnaA, regula la expresión de proteínas necesarias para el inicio de la replicación del ADN, entre otros a DnaB, DnaQ, SSB y HdaA [31]. Además es responsable del control de genes necesarios para la citocinesis entre las que destacan FtsZ y MipZ [32], junto con algunas proteínas involucradas en la morfogénesis polar [31].

Una vez que CtrA disminuye su concentración intracelular, es liberado del *oriC* y DnaA se puede unir a esta región. Esto promueve que se abran las dos cadenas de ADN y se pueda formar el complejo replicativo [30]. Por otro lado el factor de transcripción GcrA, regula la expresión de genes necesarios para el término de la replicación del material genético [32] y del control de proteínas relevantes para el proceso de morfogénesis polar; entre las que destaca la proteína PodJ [33].

Como se mencionó anteriormente, en la etapa del ciclo celular G2/M, se completa el estado de metilación de ambas cadenas de ADN, este proceso es mediado por la metilasa CcrM [28], la cuál es expresada sólo en esta etapa y su expresión es promovida por CtrA [34]. Algunas de las diferencias morfológicas entre los tipos celulares son dadas porque en un polo celular se forma el flagelo, mientras que en el contrario se forman el ancla y el pedúnculo. Dichas estructuras celulares son formadas por productos de genes que en muchos casos son controlados por la co-regulación entre CtrA y SciP. Esta última proteína es expresada sólo en el tipo celular flagelado y en la etapa de división asimétrica, lo que provoca algunas de las diferencias morfológicas entre ambos tipos celulares [35].



CtrA y las otras proteínas reguladoras GcrA y DnaA constituyen una red de regulación cuyo nivel de expresión es dependiente del estado del ciclo celular y a la vez controlan al ciclo celular. Como consecuencia, en las diferentes etapas del ciclo los patrones de estas proteínas tienen un comportamiento oscilatorio a nivel de RNAm o proteínas [36], [37]. Otros actores moleculares importantes en esta red son la metiltransferasa CcrM y la proteína inhibitoria de CtrA, SciP [34], [35].

### **1.5 *Bacillus subtilis*: su diferenciación celular, formación de biofilm y los reguladores implicados en el control de estos procesos**

*Bacillus subtilis*, es una bacteria de vida libre que se encuentra generalmente en el suelo. Presenta diferenciación celular, que da lugar a la endoespora, el cual es el proceso biológico más estudiado en esta bacteria [38].

Al entrar en algún tipo de estrés, principalmente de nutrientes, fracciones de la población de esta bacteria adquieren habilidades especiales entre los cuales se distinguen: esporulantes, formadoras de matriz extracelular, secretoras de exoproteasas y las competentes [39].

La célula que ha entrado en proceso de estrés y se diferencia en un tipo esporulante, genera en un polo celular a la endoespora [40]. Este fenómeno es promovido por el factor de transcripción Spo0A, el cual regula transcripcionalmente a más de 120 genes, la mayoría de ellos implicados en la formación de las estructuras de la espora [41]. La espora es una estructura de latencia celular, que le permite a la endoespora resistir cambios ambientales muy severos, como desecación y temperaturas por encima de los 80°C [42].

Otro fenotipo que se presenta es el de fenotipo competente, mismo que se caracteriza por la factibilidad de la célula bacteriana para tomar material genético exógeno (de alto peso molecular). Esta acción le puede proveer a la bacteria de ventajas competitivas ante cambios en las condiciones del medio, ya que dicho ADN exógeno pudiera contener genes de resistencia a fármacos como antibióticos o proporcione alguna otra ventaja competitiva [43]. Este tipo celular es promovido por la acción del regulador transcripcional ComK, al

desencadenar una cascada de expresión génica principalmente por los genes *comC*, *comE*, *comF*, *comG* y *nucA*; mismos que son regulados positivamente por ComK [44].

Un tercer tipo celular, se caracteriza por la producción y liberación de exoproteasas entre ellas la subtilisina, al medio externo. Este fenotipo es conocido como minero debido a que dichas proteasas, liberadas al medio externo, degradan proteínas exógenas y polisacáridos a moléculas más pequeñas que pueden ser fácilmente asimiladas por las células [45]. Este destino celular es controlado por el factor de transcripción DegUS –un sistema de dos componentes–, el cual regula a los genes que codifican para las exoproteasas (subtilisina que es codificada por el gen *aprE*, la bacillopeptidasa por *bpr* y la levansacarasa por *sacB*) [46].

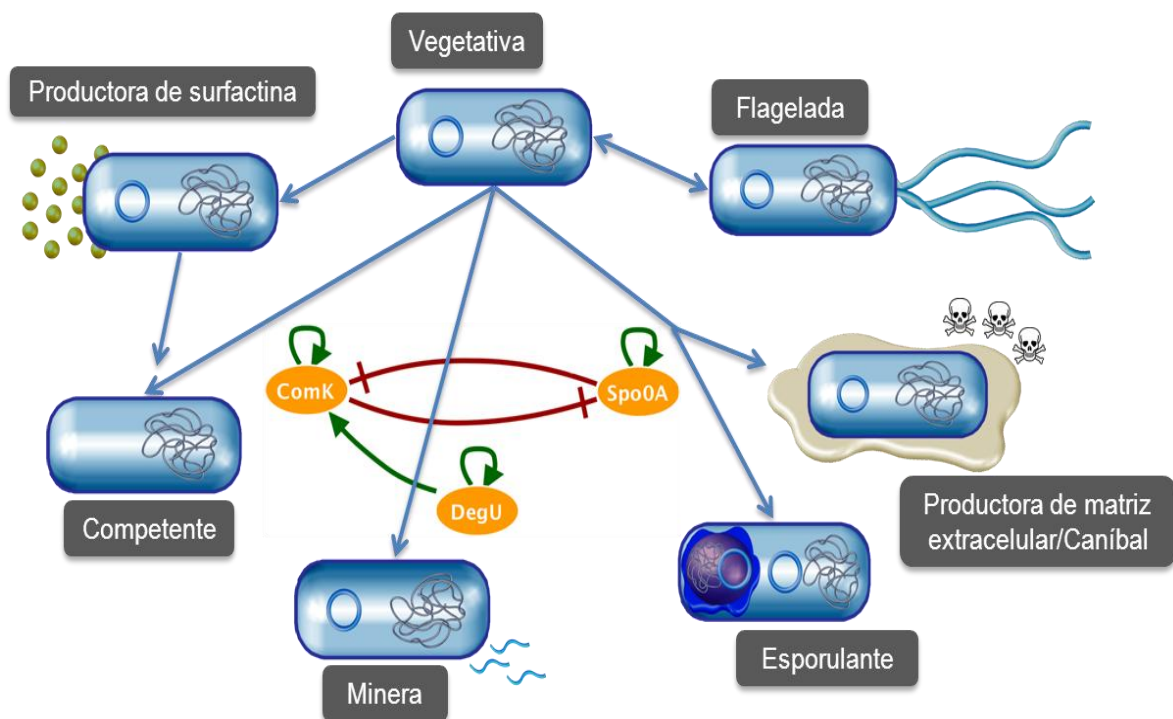
Otro fenotipo importante es el que genera a los componentes de la matriz extracelular, compuesta mayormente por exopolisacáridos. La formación de este fenotipo es mediado por los factores de transcripción Spo0A y el regulador DegU que co-regulan principalmente a las proteínas Eps, TasA y YqxM, las cuales dan lugar a los exopolisacáridos [47]. Esta matriz, les permite a los organismos poder permanecer adheridos entre sí y de esta forma formar una comunidad bacteriana llamada biofilm. Dicha estructura le ayuda a los organismos a resistir a condiciones ambientales adversas [48].

Este tipo celular libera además toxinas peptídicas; Skf y Sdp. Al igual que las proteínas encargadas de la formación de la matriz extracelular la expresión de las toxinas es promovida por el factor de transcripción Spo0A [49]. Debido al mecanismo de acción de las toxinas y a que dicho fenotipo; formadora de matriz extracelular, es resistente a la acción de las toxinas a este se le conoce como fenotipo caníbal. Al liberar las toxinas, estas lisan a otras bacterias y a las mismas de *Bacillus* que no han entrado a diferenciación celular de resistencia como es la spora o el mismo tipo caníbal, y de esta forma al lisan células no resistentes se pueden aprovechar los nutrientes de estas [50].

Un hecho interesante que se ha observado es que estos tipos celulares mencionados integran la comunidad bacteriana y coexisten en un biofilm. Una vez que una célula entra a

diferenciación en cierto fenotipo, se compromete y ya no puede iniciarse en otro fenotipo celular. Sin embargo, una vez que ya se ha diferenciado la célula en un tipo definido estos pueden volver a generar la célula con división vegetativa, ej. la espora al germinar regenera la célula vegetativa [51].

Por otro lado, los factores de transcripción mencionados que controlan mayoritariamente la formación de los destinos celulares entre ellos se regulan a nivel transcripcional y pueden ser tomados como integrantes de una red de regulación genética, misma que se puede apreciar en la Figura 3. En esta red se indica el fenotipo principal asociado a cada regulador, y en forma esquemática la diferenciación de la célula que se divide vegetativamente en cada tipo celular. También se resalta alguna característica de cada uno de ellos.



**Figura 3.** Esquema representativo de la diferenciación en *B. subtilis*. Se muestra cada fenotipo generado y el factor de transcripción clave en la generación de dichos tipos celulares. El fenotipo esporulante presenta la espora en un polo (estructura azul oscuro) y en el otro polo a la célula madre, el fenotipo minero libera exoproteasas, el fenotipo competente puede recibir material genético exógeno, el fenotipo productor de matriz extracelular y canibal libera toxinas que resultan tóxicas para un buen número de organismos externos o fenotipos que no sean resistentes como la espora.

## 1.6 Planteamiento y justificación del problema

Dado los fenotipos producto de la diferenciación mostrados en *C. crescentus* y *B. subtilis* y la naturaleza de las redes de regulación asociadas a estos procesos, es interesante investigar cómo suceden las dinámicas de las redes de regulación para entender cómo se dan los tipos celulares observados. Al mismo tiempo es interesante conocer quiénes son los componentes de las redes y como están estructuradas sus interacciones.

En cuanto a *C. crescentus*, algunos modelos matemáticos basados en ecuaciones diferenciales ordinarias se han usado para reproducir las oscilaciones de los reguladores (de la red regulación) asociados a su ciclo celular [52], [53], [54]. Como producto de estos estudios se ha postulado la existencia de un *switch* biológico que opera en la división celular asimétrica [55]. Sin embargo, hasta ahora no se ha considerado el acoplamiento de fenómenos conocidos que suceden en el proceso como son la regulación transcripcional, la metilación del ADN y las cascadas de señalización por fosforilación, todas involucradas en la generación de los dos tipos celulares. Además, dichos modelos no toman en cuenta la influencia del complejo proteolítico que degrada CtrA; ClpXP-RcdA, y el papel del factor de transcripción SciP en la dinámica de las redes.

Por otro lado, en *B. subtilis* se han usado modelos matemáticos continuos, tanto deterministas como estocásticos, para estudiar la emergencia de un determinado fenotipo. Como producto de estos modelos se ha postulado que la decisión de la elección del destino celular es meramente probabilista y que depende en buena medida de las condiciones iniciales de la célula que entra a diferenciación [56], [57]. Además, un modelo reveló que la formación de los fenotipos son posiblemente excluyentes como resultado de un *switch* estocástico [58].

En todos los casos de modelos de la red de *B. subtilis*, se ha analizado la generación de un destino celular de forma aislada, en un contexto de diferenciación entre célula con división vegetativa y un fenotipo de resistencia. Estos modelos han mostrado; por el enfoque usado, que la red exhibe un *switch* bi-estable en la generación de los fenotipos, es decir, que al

partir de alguna condición dada se puede alcanzar uno de dos posibles estados estacionarios en el sistema [56]. No se ha trabajado la red de forma integrada y tampoco se ha profundizado el análisis en un contexto de comunidad donde haya bacterias con diferentes habilidades y por ende, no se ha explorado la posibilidad de que la red pueda tener una dinámica multi-estable.

Lo que se propone en este trabajo es explorar la coherencia entre la arquitectura de las redes, sus dinámicas y la multi-estabilidad que pudieran exhibir. Esta conexión –arquitectura y dinámica– será mostrada mediante un modelo lógico discreto de una red mínima para el control de la división celular asimétrica y los fenotipos observados en *C. crescentus*. A la par, analizaremos cómo la arquitectura puede dar cuenta de la emergencia de los tipos celulares en *B. subtilis*.

Para alcanzar nuestro objetivo, primero revisamos la literatura relevante para reunir a todos los elementos reguladores conocidos que participan en los eventos del ciclo celular y la división de *C. crescentus* y la diferenciación en *B. subtilis*. Con esta información se reconstruyeron las redes de regulación y se modelaron las dinámicas de las redes resultantes al utilizar un modelado de tipo discreto basado en una generalización del formalismo booleano para las redes de regulación genética [59].

La elección de este formalismo se deriva del hecho de que carecemos de información cuantitativa precisa de los componentes y sus interacciones y por lo tanto nos interesamos en un acercamiento cualitativo de las interacciones y como su dinámica pudieran generar los fenotipos observados. Estos modelos cualitativos ya se han utilizado en el estudio de la multi-estabilidad en redes de regulación genéticas y la generación de destinos celulares o múltiples fenotipos.

En particular, las preguntas que exploramos en este trabajo son: ¿las interconexiones de la red de regulación y una descripción simple (lógico discreta) de su dinámica pueden producir el comportamiento oscilatorio de los factores de transcripción durante las etapas del ciclo celular en *C. crescentus*?, ¿cómo las interacciones de la red de regulación pueden

generar los dos micro-dominios y por ende, los dos tipos celulares en *C. crescentus*?, ¿la dinámica producto de la arquitectura y reglas lógicas de la red por sí solas pueden generar los fenotipos en *B. subtilis*?, ¿tiene relación el tamaño de la cuenca –todos los estados que transitan a un estado o estados atractores– de cada atractor con las proporciones de cada fenotipo en un biofilm de *B. subtilis*?, ¿cómo responden estas redes (la de *C. crescentus* y la de *B. subtilis*) a cambios ambientales y a re-arreglos en las arquitecturas de las redes; es decir en simulaciones de perturbaciones?

Además, si se entienden los principios de la diferenciación bacteriana tendría implicaciones en otras áreas; por ejemplo, en investigaciones sobre el origen de la multicelularidad, en donde la división asimétrica de *C. crescentus* y la generación de múltiples fenotipos en *B. subtilis* pueden aportar conocimiento en diferenciación y generación de destinos celulares. Y el análisis del ciclo celular en *C. crescentus*, se puede extrapolar a estudios de ciclo celular en organismos eucariontes dadas algunas similitudes operacionales.

## 2. Objetivos

### 2.1 Objetivo General

Conocer la dinámica de las redes de regulación involucradas en el control de los procesos de diferenciación celular en bacterias modelo.

### 2.2 Objetivos Particulares

1. Compilar la información existente sobre los reguladores involucrados en procesos de diferenciación en *C. crescentus* y *B. subtilis*.
2. Obtener la topología de las redes y los módulos de regulación que gobiernan estos fenómenos.
3. Hacer un modelado lógico discreto de las redes de regulación para extraer información cualitativa sobre su desempeño.

### 3. Adquisición de datos y procesamiento

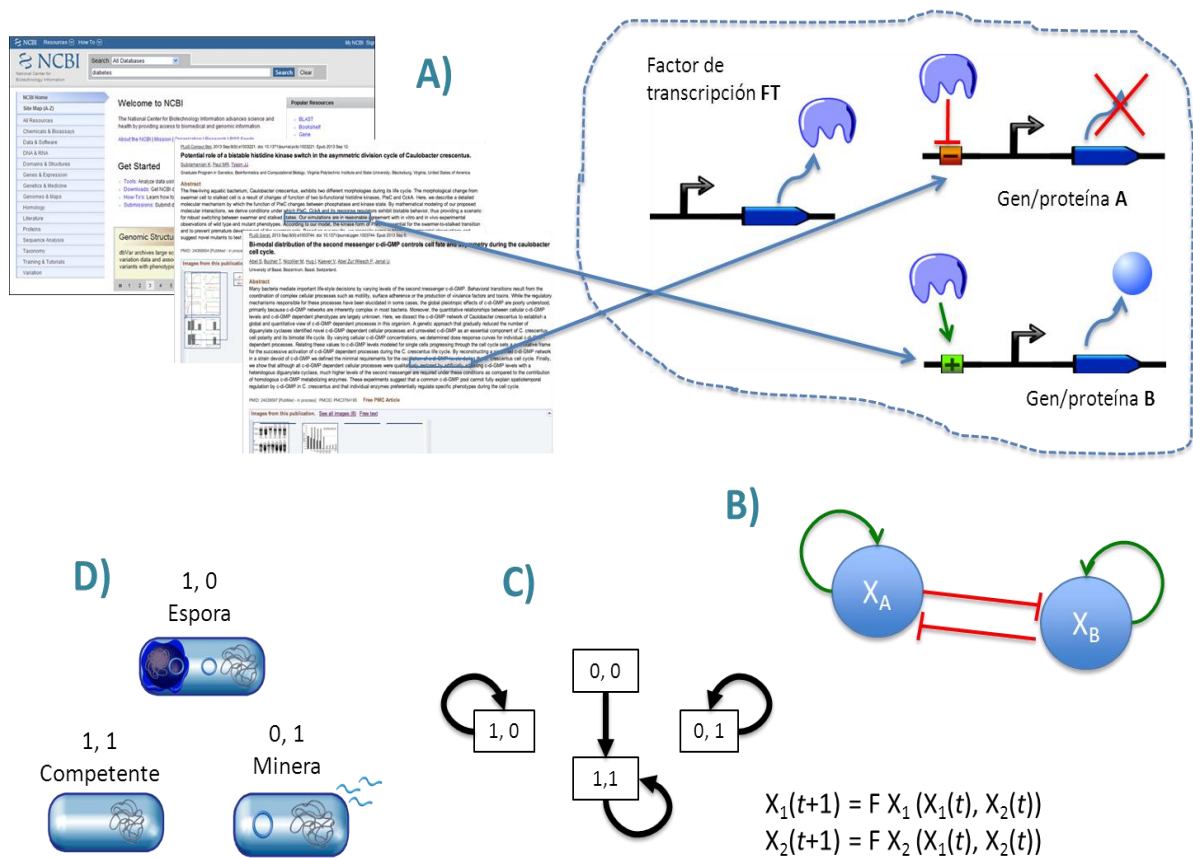
El presente trabajo se aborda mediante un acercamiento de biología computacional. Se decidió realizar un modelo dinámico para obtener los cambios de estado de los reguladores que controlan los procesos de diferenciación en los organismos en estudio. Además de un análisis sobre la sensibilidad y robustez, se generaron simulaciones y predicciones sobre la dinámica de la red ante deleciones de sus componentes.

Estos métodos teórico-matemáticos ofrecen ventajas; entre algunas están la integración de la información disponible, examinar cambios del sistema de una forma rápida, poder hacer predicciones y simulaciones, y realizar algunos análisis dinámicos que por métodos experimentales sería muy complicado. En particular el análisis cualitativo seleccionado en este trabajo provee de ventajas al no necesitar parámetros cinéticos específicos.

En la Figura 4, se muestra una proyección metodológica seguida en este trabajo. De manera general se recaba la información de las interacciones uno a uno; del regulador y el blanco, y se reconstruye la red con la totalidad de las interconexiones obtenidas. Con la red e información sobre la regulación se arman las funciones matemáticas; ecuaciones lógicas en este caso, se procede a simular la dinámica temporal por medio de cambios de estados discretos del sistema y se analizan las trayectorias de estos estados al llegar a un estado estacionario, si es el caso que presenten estados atractores.

La dinámica resultante se evalúa en un contexto biológico y si coincide con lo que se conoce experimentalmente se pueden hacer predicciones y simulaciones específicas. Por último se analizan propiedades dinámicas de la red ante perturbaciones en los componentes de la red; como son la eliminación de nodos.





**Figura 4.** Resumen general del enfoque seguido en este trabajo. A) Recabar la información de las interacciones de la literatura y de bases de datos especializadas, B) Reconstrucción de las redes con las interacciones y los componentes recabados, C) Realización del modelado; se asignan las funciones lógicas conforme las arquitecturas de las redes y guiándose con la evidencia experimental, posteriormente se examina la dinámica del sistema de forma discreta, D) Por último se analiza la dinámica resultante en el contexto de operación de la red y como este funcionamiento pudiera explicar la generación de los fenotipos celulares.

### 3.1 Adquisición de la información

Las interacciones del regulador y sus genes blancos fueron obtenidas revisando la literatura original y bases de datos especializadas [60], [61]. Se inició realizando una búsqueda en la base de datos PubMed [62] con los siguientes términos: factor de transcripción, ciclo celular, diferenciación, *C. crescentus*, *B. subtilis*. Luego se leyeron los resúmenes para seleccionar los artículos que pudieran tener información relevante, se descargaron los artículos completos y se estudiaron para obtener información sobre la regulación de los

genes o proteínas a nivel de regulación transcripcional o post-traducciona, y su contribución en el desarrollo del ciclo celular y división asimétrica en *C. crescentus*. Para el caso de *B. subtilis* se buscaron principalmente reguladores transcripcionales que estuvieran implicados en la generación de fenotipos para hacer frente a condiciones adversas. Se tuvo cuidado de verificar que cada interacción reguladora tuviera evidencia experimental directa, tal como ensayos de inmunoprecipitación de la proteína reguladora y la región reguladora de su gen blanco o ensayos de retardo con anticuerpos específicos.

Además se tomó información sobre el tipo de regulación; positiva o negativa, para cada interacción. Cuando una proteína promueve la transcripción de un gen o activa a otra proteína, esta fue considerada una interacción positiva. En caso contrario, cuando una proteína actúa como represor; bloquea el sitio de regulación y no puede ser transcrito dicho gen, fue considerada como una interacción negativa. En algunos casos, el regulador puede actuar dualmente; en una condición actúa como activador y en otra como represor.

Para *C. crescentus*, las interacciones regulatorias incluyeron procesos de regulación transcripcional, metilación, fosforilación/defosforilación, proteólisis y formación de complejos multi-proteicos. En cuanto a *B. subtilis*, se incluyeron mecanismos de regulación transcripcional y fosforilación. Esto debido a que los procesos mencionados están involucrados en el control de la diferenciación aunque en cada organismo de manera específica.

### **3.2 Reconstrucción de las redes de regulación**

Para ambos organismos un grafo dirigido,  $G$ , fue dibujado como producto de las interacciones uno a uno obtenidas de la literatura y bases de datos especializadas. Los procesos biológicos en los cuales las proteínas están involucradas fueron incluidos. Los grafos fueron dibujados con el uso del programa libre Cytoscape [63]. En esta estructura abstracta, los vértices o nodos representan genes o proteínas y las aristas sus interacciones reguladoras. Las aristas verdes terminadas en flecha indican interacciones positivas, las

aristas rojas terminadas en línea a interacciones negativas, y las artistas azules representan interacciones duales.

### 3.3 Formalismo lógico para el modelado de las redes centrales $G_2$

Como se mencionó anteriormente, la idea central es estudiar como las interconexiones y una descripción simple del sistema dinámico, embebida en las reacciones de las subredes, puede dar cuenta de los fenotipos observados en las bacterias sujetas de estudio. Para simular las dinámicas de las redes, usamos un formalismo discreto lógico multi-valor, el cual es una generalización del marco lógico Booleano [59].

Seleccionamos este formalismo matemático debido a que es adecuado para describir estados adicionales de los nodos. Valores discretos distintos del estado binario e.g., fosforilación de CtrA, más allá de los cuales son posibles por modelos simples Booleanos, los cuales solo pueden presentar variables binarias 0 y 1; que denotan la ausencia o presencia del regulador—.

En el formalismo multi-valor, los estados de los nodos de la red pueden asumir valores numéricos discretos; por ejemplo:  $0, 1, \dots, n$  ( $n \in \mathbb{Z}$ ) y depende del estado de otros nodos, esta dependencia es descrita por una función regulatoria que marca, en cada paso de tiempo ( $t+1$ ), las entradas o los estados de un grupo de nodos que condicionan la salida de un nodo en particular. Especialmente, los vértices en la  $G_{2a}$  (Figura 8.I) toman dos valores, 0 y 1, que corresponden al caso de inactivo o activo, ausencia o presencia de una molécula. En la  $G_{2b}$  (Figura 9.I) los valores numéricos 0, 1 y 2 son usados para representar los estados de los vértices y corresponden a ausencia, presencia y fosforilación, respectivamente. Para la  $G_2$  (Figura 12) de *B. subtilis*, los nodos solo toman valores de 0 y 1, representando inactivación o activación, respectivamente.

Las reglas lógicas fueron definidas con el uso de los operadores, OR (O), AND (Y) y NOT (NO) [13]. Todas las funciones y reglas lógicas para el modelo de las subredes de *C. crescentus* como para la subred en *B. subtilis* se encuentran en las Tablas 1.2 a la 25.2 al

final de la tesis (apéndice). Por ejemplo, en el caso de *dnaA* su transcripción requiere metilación por CcrM antes de ser transcrita por el regulador CtrA, asignamos la función lógica (CtrA) AND (CcrM). Por otro lado, GcrA inhibe la transcripción de *dnaA*, su función correspondiente será NOT sobre el valor lógico de GcrA. En el caso de la auto-represión de DnaA, se asignó la función NOT (DnaA) [64],[65]. Basado en este criterio, definimos la siguiente función lógica para el valor de DnaA en el siguiente paso de tiempo:

$$\text{DnaA}^{t+1} = (\text{CtrA}_a^t \text{ AND CcrM}^t) \text{ AND (NOT GcrA}^t) \text{ AND (NOT DnaA}^t).$$

Las dinámicas de las subredes estudiadas son descritas por un vector de  $n$  variables discretas  $[\sigma_1(t), \sigma_2(t), \dots, \sigma_n(t)]$ , donde la variable  $\sigma_i(t)$  representa el estado de un nodo en particular  $i$  al tiempo  $t$ , y dicho estado depende del estado de las entradas  $k$ ; representado por las variables, provenientes de otros nodos  $[\sigma_{i_1}(t), \sigma_{i_2}(t), \dots, \sigma_{i_k}(t)]$ . La evolución de la dinámica de cada nodo en el sistema la presentamos por la siguiente ecuación:

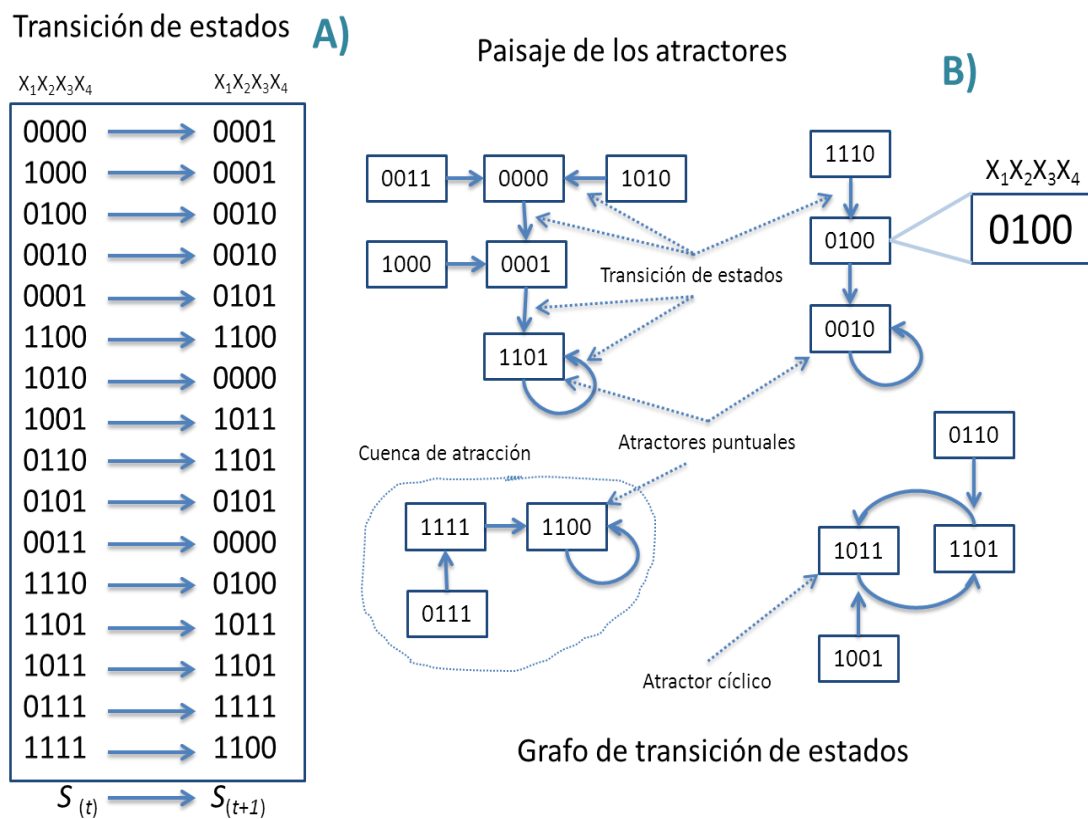
$$\sigma_i(t+1) = f_i(\sigma_{i_1}(t), \sigma_{i_2}(t), \dots, \sigma_{i_k}(t)) \quad \text{Eq (1)}$$

Donde  $f_i$  es una función definida por revisión en la literatura y que especifica el valor para cada posible combinación de las entradas al nodo.

Utilizamos el programa GINsim para simular las dinámicas de las subredes [66]. Se usó la estrategia síncrona para la actualización de los estados de la red. Todos los posibles valores que el vector  $[\sigma_1(t), \sigma_2(t), \dots, \sigma_n(t)]$  puede tomar son los que definen el espacio de estados de la dinámica de la red. También se realizó la estrategia asíncrona y resultó en lo mismo que el síncrono, es por ello que los datos de esto último no son mostrados en el presente trabajo.

El grafo de transición de estados es una herramienta útil para representar las trayectorias en el espacio de estados experimentadas en la red a lo largo del tiempo, para esto se parte de una condición inicial dada al tiempo  $t=0$ . Éste grafo permite describir el estado llamado atractor, que representa patrones dinámicos estables que el sistema alcanza a partir de un estado inicial en particular.

Los atractores principalmente pueden dividirse en dos clases: atractores puntuales o puntos fijos, los cuales no tienen estados sucesivos, y los atractores periódicos o ciclos límite, en los cuales sus estados se repiten después de un periodo de tiempo y resultan en un patrón de estados cíclicos [13]. A partir del grafo de transiciones de estado, se pueden hacer ciertos análisis como es cuantificar el tamaño de la cuenca de atracción –totalidad de estados que convergen en un atractor–, además de analizar el tamaño de las transiciones de estados para llegar a un atractor se pueden analizar los estados con mayor número de trayectorias, etc. En la Figura 5, se encuentra un esquema del proceso seguido para visualizar las transiciones de estados y su dinámica; así como todas las representaciones que tiene el modelo.



**Figura 5.** Representación de la evolución o dinámica de los estados de una red dada. A) Se señala la tabla de verdad que muestra la transición de estados del sistema compuesto por el estado de cada nodo de la red  $X_1, \dots, X_n$ , B). Y como se transforma esta tabla de estado en el grafo de transición de estados, mismo que corresponde al paisaje de atractores. Además, se pueden apreciar los atractores (puntuales o cíclicos) y la cuenca de atracción de cada atractor.

Aparte de las simulaciones de la dinámica de los estados, realizamos perturbaciones a los vértices de las subredes; uno a la vez, mediante la eliminación de un vértice se simula la eliminación de un gen y fue denotado por  $\Delta$ , o a un vértice dado fijamos su estado a un valor específico que simule la expresión constitutiva de un gen o una sobreexpresión y es denotado por  $*$ , y analizamos como la dinámica de la subred perturbada cambia bajo estos escenarios.

### 3.4 Régimen dinámico de las redes $G_2$

En general, el comportamiento global de las redes puede ser clasificado en tres regímenes: caótico, ordenado y crítico [67]. En redes que operan en el régimen ordenado, dos estados iniciales  $S_1(0)$  y  $S_2(0)$  seleccionados de forma aleatoria normalmente están separados por una distancia de Hamming pequeña:

$$h(t) = |S_1(t) - S_2(t)| \quad \text{Eq (2)}$$

Esto significa que los estados seguirán trayectorias que rápidamente convergirán, i.e.,  $h(t)$ , se acercarán a cero a medida que el tiempo tienda a infinito. Ambas trayectorias  $S_1(t)$  y  $S_2(t)$  finalmente alcanzaran un atractor. En este sentido, la red mostrará un comportamiento dinámico muy estable.

En el régimen caótico, dos estados iniciales seleccionados aleatoriamente producirán trayectorias que en promedio se desviarán uno del otro a través del tiempo o bien terminaran con alta probabilidad en dos atractores diferentes. Redes en el régimen caótico no producen comportamientos estables dado que las perturbaciones se propagan rápidamente desde los estados iniciales.

El régimen crítico por otro lado, se encuentra entre el régimen ordenado y el caótico y le confiere a la red la propiedad de ser robusta ante perturbaciones, pero a la vez lo suficientemente sensible para modificar su dinámica de acuerdo a cambios en algunos de

los estados. Un método común para estudiar y analizar la propagación de las perturbaciones en redes genéticas es basado en el mapa de Derrida [68]. En este enfoque el grado de sensibilidad a perturbaciones en la red es cuantificado por la pendiente  $m$  de la curva  $M(h(t))$  que mapea la evolución de la distancia de Hamming promedio sobre un número grande de estados iniciales seleccionados aleatoriamente en cada paso de tiempo.

De esta manera el mapa de Derrida provee de una medida para la dimensión de las perturbaciones entre dos pasos de tiempo consecutivos:

$$h(t+1) = M(h(t)) \quad \text{Eq (3)}$$

El régimen dinámico en el cuál la red opera puede ser determinado al calcular la derivada:

$$m = dM(h)/dh \quad \text{Eq (4)}$$

en  $h=0$

Como puede ser esperado intuitivamente al observar las propiedades de  $M$ : si  $m < 1$ , las perturbaciones son absorbidas (régimen ordenado); al tener  $m > 1$ , las perturbaciones son exacerbadas (régimen caóticos); y en el caso de  $m = 1$ , la red es parcialmente sensible a perturbaciones (régimen crítico). El mapa de Derrida fue generado para las redes  $G_2$ , y también fueron analizadas algunas perturbaciones y que efecto tienen en el cambio de régimen dinámico.

## 4. Resultados

En el presente trabajo se obtuvieron las redes de regulación para el control del ciclo celular, donde se incluye tanto diferenciación, división asimétrica y formación de los tipos celulares en *C. crescentus*. Así como la red de regulación genética encargada del control de diferenciación celular en *B. subtilis*.

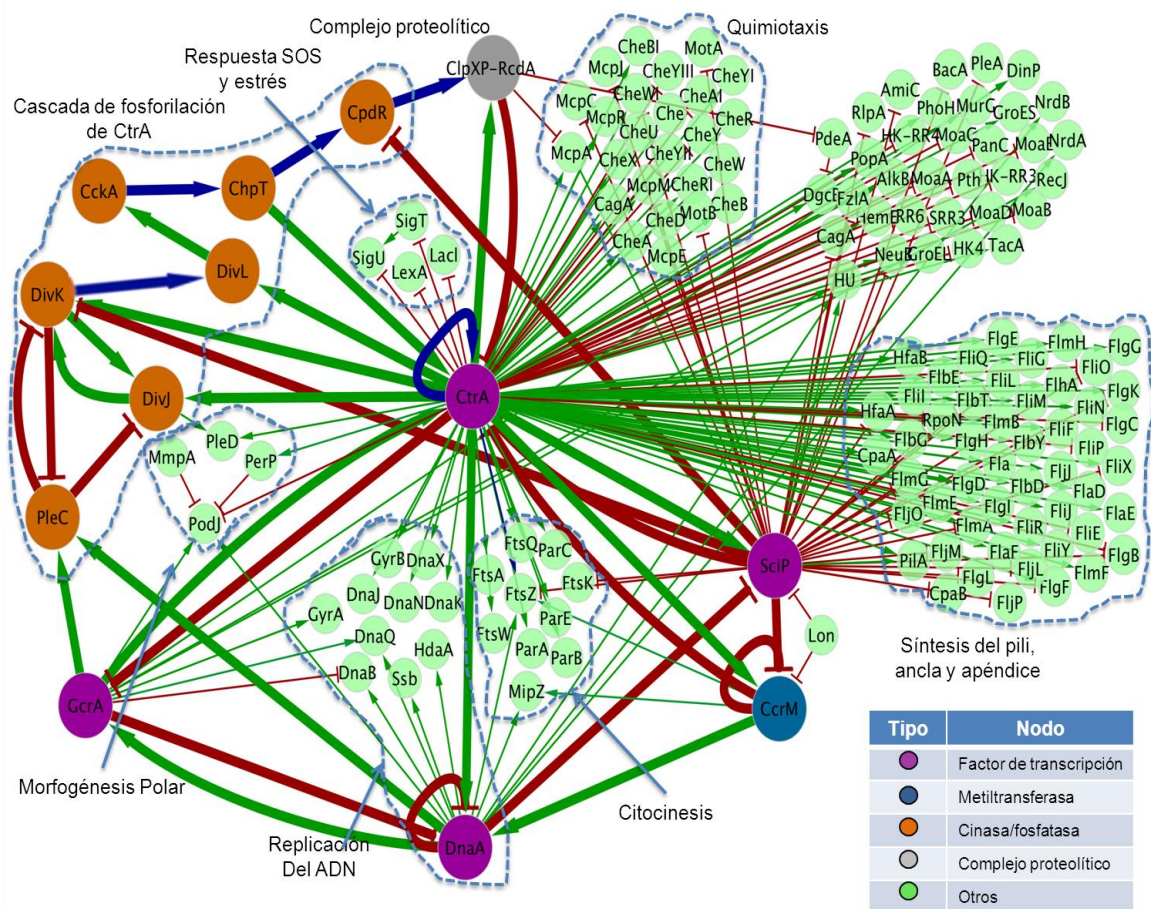
De las redes reconstruidas se logró encontrar los estados estacionarios dinámicos, que corresponden al estado de los nodos en cada fenotipo o en alguna etapa del ciclo celular para ambos organismos en estudio. Se analizaron perturbaciones sobre la red y si esta es capaz de responder de manera equivalente a su estado no perturbado.

Las simulaciones computacionales coincidieron con algunas evidencias experimentales y en algunos casos que no se cuenta con evidencia de su mutación o expresión constitutiva estos resultados pudieran servir para hacer predicciones al respecto. Los análisis de sensibilidad mostraron que las redes son robustas y operan muy cercanamente en el régimen crítico.

### 4.1 Red de regulación reconstruida para *C. crescentus* y modelo de su dinámica temporal

En *C. crescentus* la red grande  $G_I$ , contienen todas las proteínas asociadas a los principales factores de transcripción que controlan los sucesos de replicación del cromosoma. Así como de división celular y procesos ligados al ciclo celular, como morfogénesis polar. Muchas de estas proteínas están involucradas en el desarrollo del ancla y del flagelo. La red reconstruida completa  $G_I$  hasta el año 2013 está compuesta de 153 vértices ( $V_I=153$ ) y 212 aristas ( $E_I=212$ ). En la Figura 6 se muestra dicha red.





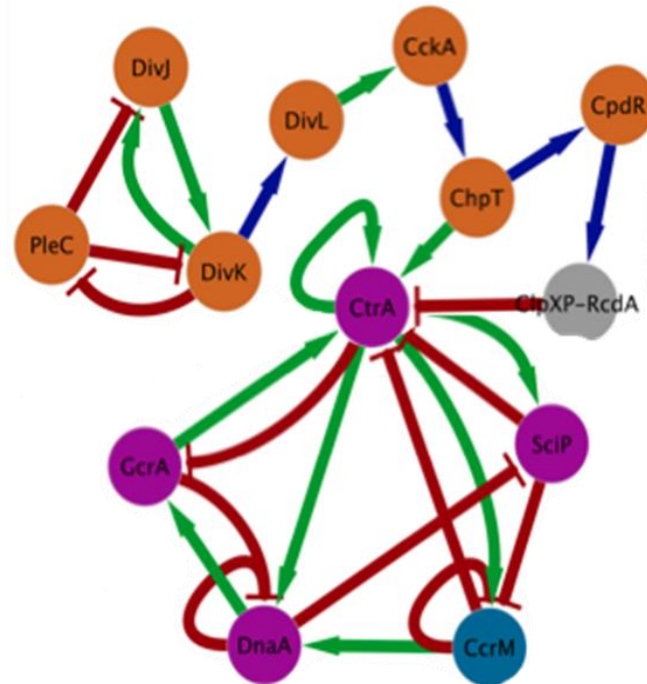
**Figura 6.** Red de regulación del ciclo celular y diferenciación en *C. crescentus*. Los nodos corresponden a los reguladores y sus blancos; los colores de la referencia indican el tipo de proteína, las aristas refieren a las interacciones entre ellos; en base al color y terminación que tienen indican el tipo de interacción; aristas verdes son positivas, rojas corresponden a negativas y azules a duales. Además están agrupados los nodos y se señala en el proceso celular en el que están involucrados.

#### 4.1.1 Reducción de la red de regulación en *C. crescentus*

Simplificamos la topología y el número de las interacciones en las redes  $G_1$  al remover nodos no regulatorios, i.e., aquellos que no regulan a algún otro nodo (nodos verdes en la Figura 5). Este criterio fue escogido porque los nodos no regulatorios son irrelevantes en la dinámica de la red [69]. Como resultado se obtuvo la red central  $G_2$  (Figura 7).

La red  $G_2$  tiene el núcleo central de elementos reguladores que controlan los procesos de

diferenciación en esta bacteria. Todas las proteínas y genes que constituyen las  $G_2$  en *C. crescentus* se enumeran en la Tabla 1.1. La  $G_2$  (Figura 7) para *C. crescentus* está constituida de trece nodos ( $V_2=13$ ) y veintisiete aristas ( $E_2=27$ ).



**Figura 7.** Red de regulación reducida para el control del ciclo celular y división asimétrica en *C. crescentus*. Los nodos en color morado corresponden a factores de transcripción, el nodo azul es la metiltransferasa, nodos naranjas corresponden a las cinasas/fosfatasa y el nodo gris al complejo proteolítico de CtrA. Las aristas verdes representan interacciones positivas, las rojas negativas y azules a duales.

Para los siguientes análisis a la red en *C. crescentus* la red  $G_2$  fue dividida en dos subredes:  $G_{2a}$  y  $G_{2b}$ , cuyos nodos participan en diferentes eventos fisiológicos y escalas temporales. La  $G_{2a}$  está formada por procesos de regulación transcripcional y metilación y la  $G_{2b}$  constituye una cascada de fosfo-proteólisis (Figura 7). En cuanto a las escalas de tiempo, éstas pueden estimarse en el orden de  $\sim 1-3$  minutos para las transiciones entre nodos en  $G_{2b}$  y  $\sim 1-100$  microsegundos para la  $G_{2a}$  [70]. Las interacciones cruzadas entre los elementos de las subredes fueron removidas de tal manera que se obtuvieran dos subredes separadas. Dado que el nodo común de las dos subredes es CtrA, esta fue asignada como  $CtrA_a$  y  $CtrA_b$  en cada subred.

**Tabla 1.1** Componentes de la  $G_2$  en *C. crescentus*. Se indica el nombre del regulador, su actuación en el ciclo celular, las interacciones con otros genes (+ positiva, - negativa, +,- dual) y la referencia

Proteína	Acción en el ciclo celular	Interacciones en la $G_2$	Referencia
CtrA	Regulador maestro del ciclo celular. Al unirse a la región <i>oriC</i> , inhibe la replicación. Promueve la división asimétrica y se encuentra en altas concentraciones en la célula flagelada. Controla la transcripción de genes para la morfogénesis del ancla, el pili ,el flagelo y quimiotaxis	Factor de transcripción: GcrA (-), DnaA (+), CcrM (+), SciP(+) y su propio promotor (+)	[34]
GcrA	Regulador transcripcional del ciclo celular. Regula la transcripción de genes para la morfogénesis polar y la replicación del cromosoma.	Factor de transcripción: DnaA (-) and CtrA (+)	[74]
DnaA	Proteína iniciadora de la replicación del cromosoma. Regula la transcripción de genes para la replicación y la citocinesis	Factor de transcripción: GcrA (+), SciP (-) y su propio promotor (-)	[54]
CcrM	Metiltransferasa específica de adeninas. Metila el promotor de genes para el control del ciclo celular.	Metiltransferasa del promotor: <i>dnaA</i> (+), <i>ctrA</i> (-) y su propio promotor (-)	[64]
SciP	Proteína pequeña inhibidora de CtrA. A través de interacción proteína-proteína, inhibe a CtrA. Regula transcripcionalmente genes (co-regula junto con CtrA) para la síntesis del ancla, el pili y el flagelo así como la quimiotaxis.	Factor de transcripción: CtrA (-) and CcrM (-)	[35]
DivK	Cinasa reguladora de la división celular. Por interacción proteína-proteína, inhibe a DivL cuando se encuentra fosforilada. En el estado no fosforilado, promueve la unión de DivL con CckA	Fosforila a DivJ (+), defosforila a PleC (-) e interactúa con DivL (+,-)	[73]
DivJ	Cinasa censora de histidinas. Implicada en la morfogénesis polar y diferenciación celular (en un proceso no del todo conocido)	Fosforila a DivK (+)	[77]
PleC	Cinasa censora. Implicada en la morfogénesis polar y en la formación de los tipos celulares (en un fenómeno no del todo entendido)	Defosforila a DivK y DivJ (-)	[77]
DivL	Cinasa de tirosina. Promueve la auto-fosforilación de CckA	Se une a CckA y promueve su autofosforilación (+)	[78]
CckA	Cinasa reguladora del ciclo celular. Fosforila y defosforila a ChpT	Fosforila/defosforila a ChpT (+,-)	[22]
ChpT	Cinasa y fosfatasa. Fosforila a CtrA y actúa dual con CpdR	Fosforila a CtrA (+), fosforila/defosforila a CpdR (+,-)	[80]
CpdR	Proteína reguladora de un sistema de dos componentes. Inhibe la formación del complejo proteolítico.	Promueve/inhibe la formación del complejo ClpXP (+,-)	[81]
ClpXP- RcdA	Complejo de proteasas dependiente de ATP y de la proteína presentadora de CtrA (RcdA). Al estar formado el complejo, CtrA es degradada.	Degrada a CtrA (-)	[82], [83]

## **4.1.2 Descripción funcional de la red $G_2$ en *C. crescentus***

### **4.1.2.1 Descripción de la subred transcripcional $G_{2a}$**

Como se mencionó anteriormente, la red  $G_2$  está compuesta por dos subredes acopladas, ambas vinculadas por el vértice CtrA. En la  $G_{2a}$ , el regulador CtrA tiene auto-regulación dual de tipo transcripcional. Su transcripción es inhibida al momento que la metiltransferasa, CcrM, metila la región de ADN en su promotor [71]. Otro represor de CtrA es la proteína SciP, la cual se une a CtrA y previene que se pueda unir CtrA a los promotores de los genes que regula, incluyendo el propio promotor de CtrA [72]. El factor de transcripción GcrA promueve su propia expresión a través de un lazo de retroalimentación positivo [73], [74]. Por otro lado CtrA inhibe la transcripción de GcrA [73], y DnaA promueve su expresión [75].

La proteína iniciadora de la replicación DnaA es sujeta a otro tipo de regulación; por ejemplo, al momento que CcrM metila el promotor del gen *dnaA*, CtrA se une a esta región y promueve su transcripción [76]. Al aumentar las concentraciones de DnaA, se une a su propia región regulatoria y reprime su transcripción [77].

Adicionalmente, CtrA promueve la transcripción del gen *ccrM* [34]. La transcripción de CtrA solo puede ocurrir después de la generación del estado hemi-metilado del ADN; este estado ocurre después del proceso de replicación donde la cadena templado en la doble hélice ya este metilada mientras que la cadena recién sintetizada aún no ha sido metilada. En el momento en que las concentraciones de CcrM aumentan, esta proteína metila a la cadena recién sintetizada, y esta acción bloquea la transcripción de CtrA y CcrM [78]. Relacionado a esto CtrA promueve la transcripción de SciP y DnaA la inhibe [34].

### **4.1.2.2 Descripción de la subred de señalización fosfo-proteólisis $G_{2b}$**

En el caso de la subred  $G_{2b}$ , CtrA activa la transcripción del regulador de respuesta DivK [73]. Una vez producida, DivK no está fosforilada y no puede secuestrar a DivL, la cual se

une a CckA y promueve la auto-fosforilación de esta cinasa. Se sabe que DivK es fosforilada, por la acción de las cinasas DivJ o PleC; las cuales pueden actuar además como fosfatasas [77]. DivK fosforilada se une a DivL e inhibe su actividad [78]; y en consecuencia, CckA no puede auto-fosforilarse. En su estado fosforilado CckA fosforila a la cinasa ChpT [22].

Sin embargo, al estar CckA no fosforilada, actúa como fosfatasa y defosforila a ChpT [79]. En el estado fosforilado, ChpT transfiere el grupo fosfato a CtrA y lo activa. Dependiendo del estado de fosforilación, ChpT actúa como cinasa o fosfatasa de CpdR [80]. Cuando CpdR no está fosforilada, media la formación del complejo proteolítico ClpXP, compuesto por las proteasas ClpX y ClpP. Estas proteasas junto con la proteína RcdA degradan a CtrA [81], [82], [83].

#### **4.1.3 Modelo lógico multi-valor para la descripción del ciclo celular y división asimétrica en *C. crescentus***

##### **4.1.3.1 Dinámicas en el ciclo de vida de la célula flagelada en *C. crescentus***

En la Figura 8 se muestra una visión general de las dinámicas del ciclo celular y los eventos celulares asociados. También se muestra el grafo de transición de estados o el paisaje del atractor resultante de la simulación de la dinámica de la red de regulación.

Encontramos que cualquier configuración inicial del grafo de transición de estados alcanza algún punto fijo. Para la  $G_{2a}$ , la evolución de estados termina en un atractor cíclico de cuatro estados o en un atractor de periodo cuatro. Los elementos de este atractor periódico tienen su correspondencia con la evidencia experimental de las proteínas que actúan en esta fase. Además reproduce el comportamiento oscilatorio de las proteínas regulatorias CtrA, GcrA y DnaA durante el ciclo celular, descritos experimentalmente a nivel de RNAm y proteínas [84], [85].

En el estado donde sólo están activas DnaA y SciP (Figura 8.II.a), DnaA se encuentra en altas concentraciones y promueve el inicio de la replicación del ADN [86]. SciP por su

parte reprime la transcripción de los genes involucrados en la quimiotaxis y el desarrollo del pili y del flagelo [36], [72]. En esta etapa, ocurre la eliminación del flagelo, y la síntesis del pedúnculo y el comienzo de la formación de las estructuras del ancla; finalmente, comienza la diferenciación del tipo celular flagelado al anclado.

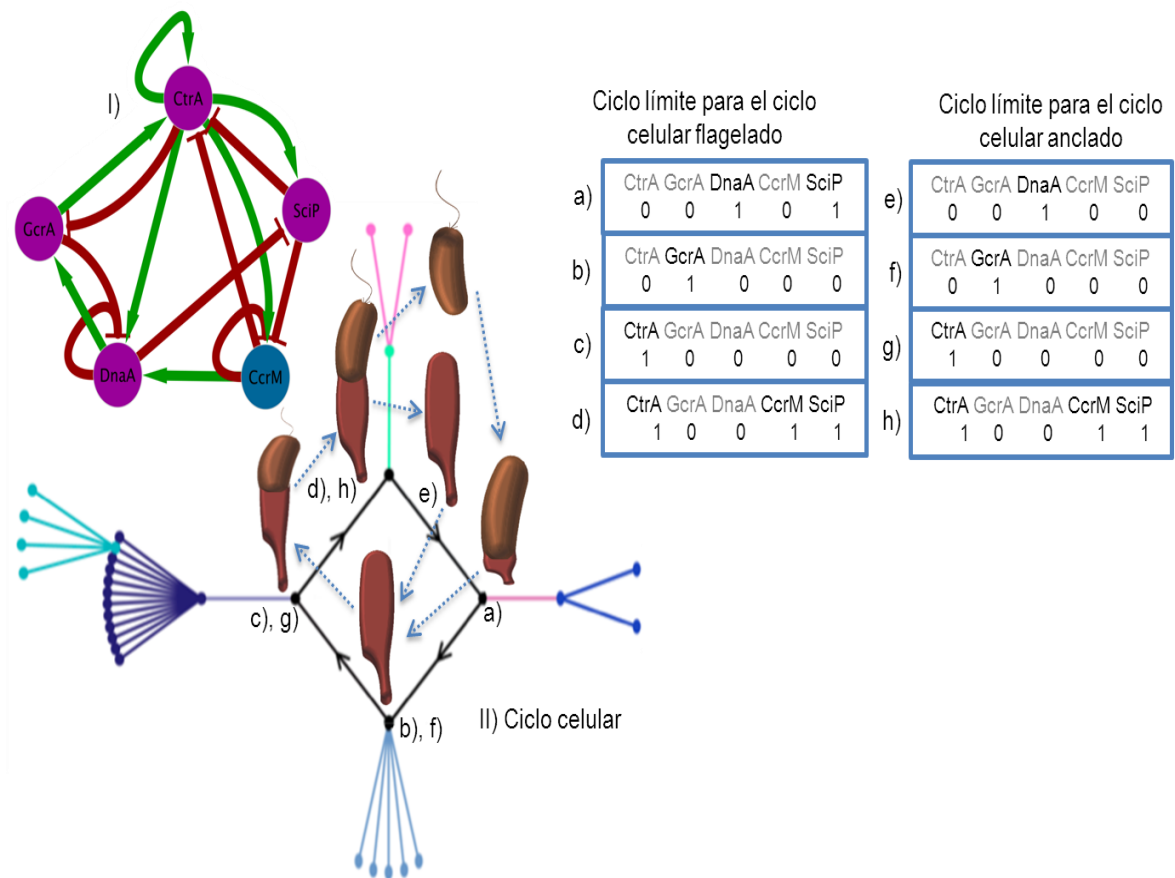
En la siguiente etapa del ciclo celular y su correspondiente estado en el atractor del circuito sólo se expresa GcrA (Figura 8.II.b). Esta proteína promueve la expresión de genes asociados a la replicación del ADN. Esto corresponde con que la replicación del material genético continúa con la etapa de elongación de las nuevas cadenas y se inicia la segregación de los cromosomas a cada polo celular. En la siguiente fase CtrA es la única proteína expresada y promueve la expresión de genes para preparar la división celular (Figura 8.II.c).

Los procesos de replicación y segregación de cromosomas concluyen, y una nueva ronda de replicación es inhibida por el estado hemi-metilado del ADN [27]. Esta etapa se caracteriza por el inicio de la división celular asimétrica [87]. CtrA, continua activa y se da la expresión de CcrM y SciP (Figura 8.II.d). En esta etapa también se completa la metilación del cromosoma mediada por CcrM [25]. La división asimétrica coincide con que los reguladores CtrA, CcrM y SciP alcanzan su máxima expresión (Figura 8.II.c y 8.II.d). Esta etapa es caracterizada por la formación del septo de división cercano a un polo celular, el cual eventualmente dará lugar a los dos tipos de células. En este estado del ciclo, CtrA promueve la síntesis de proteínas involucradas en las cascadas de fosforilación y proteólisis [73].

Se sabe que la generación de heterogeneidades espaciales dentro de la célula son mediadas principalmente por gradientes de iones y otras moléculas; especialmente proteínas, los cuales contribuyen a la generación de los llamados micro-dominios [88]. En *C. crescentus*, este fenómeno se observa en la pre-división celular, y es producto de un evento de compartimentalización y la generación de gradientes de iones de fosfato.

Los micro-dominios espaciales son observados en cada uno de los dos polos celulares, el

dominio cercano del polo donde se desarrollará el tipo celular flagelado es caracterizado por altas concentraciones de fosfato, por el contrario en el otro micro-dominio correspondiente a donde se formara la célula anclada presenta bajos niveles de fosfato. Otra fuente de heterogeneidad celular es producida por localización polar diferencial de las cinasas PleC y DivJ. PleC es acarreada por PodJ al polo que dará origen a la célula flagelada y con esto DivJ predomina en el polo que dará lugar al tipo anclada [89], [90].

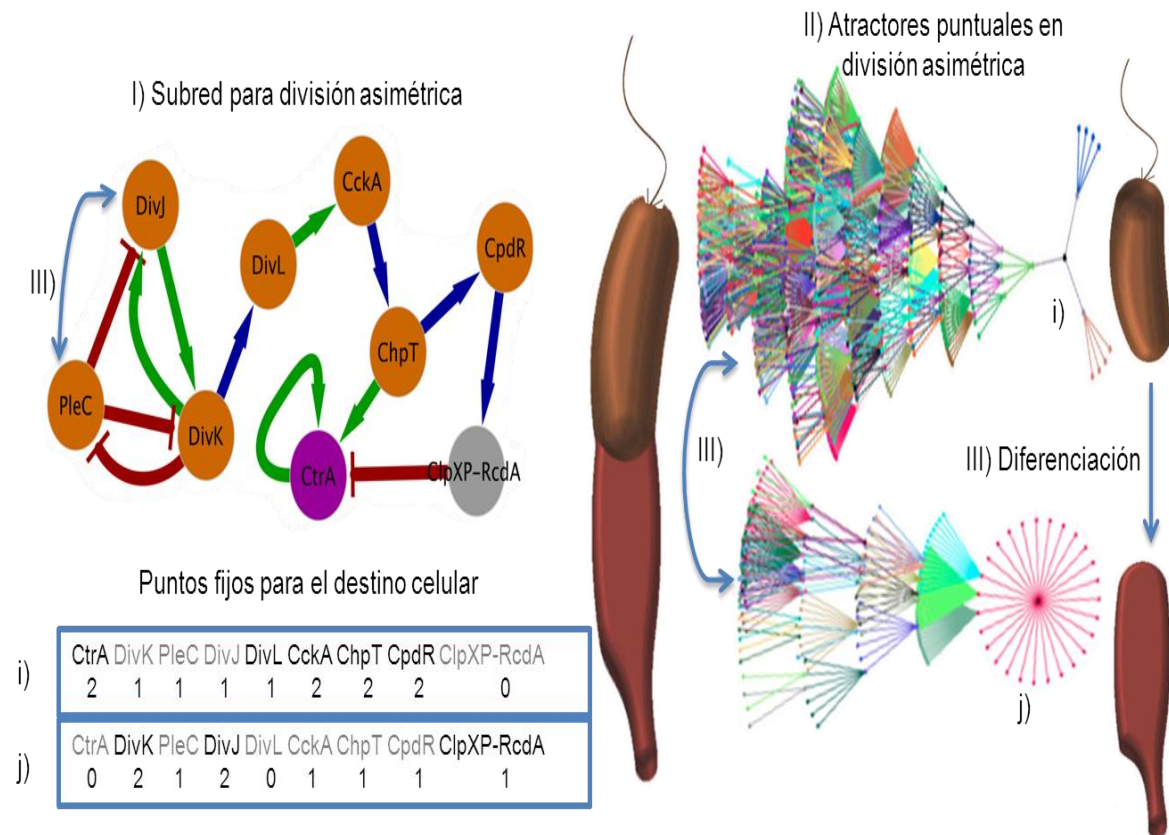


**Figura 8.** Ciclo límite de la  $G_{2a}$  de regulación del ciclo celular en *C. crescentus*. I) Subred para el control del ciclo celular, principalmente regulación transcripcional. II) Estados de los reguladores de la subred y los estados cíclicos en los atractores: a), b), c), d) estados periódicos en el atractor correspondiente al ciclo celular del tipo celular flagelado, e), f), g), h) estados sucesivos en el atractor relacionado el ciclo celular del fenotipo anclado.

Otro elemento clave en la generación de estas heterogeneidades, es el estado de CtrA en el micro-dominio asociado al fenotipo flagelado. En este micro-dominio CtrA esta



principalmente fosforilado y en altas concentraciones, mientras que en el otro microdominio CtrA está prácticamente ausente y mayormente no fosforilado. Esta condición de CtrA es relevante, dado que en su estado activo (fosforilado) se une a la región *oriC* del cromosoma y se bloquea el inicio de la replicación y al mismo tiempo se promueve la expresión de genes que codifican para proteínas involucradas en la formación de gradientes de concentración en cada polo celular [27].



**Figura 9.** Puntos fijos de la  $G_{2b}$  de división asimétrica en *C. crescentus*. I) Subred de regulación de la división asimétrica y la generación de los tipos celulares. II) Paisaje de atractores puntuales en la división asimétrica, los cuales son alcanzados a partir de alguna condición dada de la subred  $G_{2b}$ , i) atractor correspondiente al tipo flagelado, j) atractor referente al fenotipo anclado. III) Diferenciación celular; algunos cambios celulares, como el intercambio espacial en un polo de la cinasa PleC por DivJ provoca la diferenciación, mismo que puede verse en términos de una transición entre atractores.

Después de simular la dinámica de la subred  $G_{2b}$ , encontramos que a partir de cualquiera de los estados iniciales se alcanza siempre alguno de los dos atractores puntuales (Figura 9.i, j). Estos dos atractores punto fijo, como también se conocen a los atractores puntuales, corresponden con los estados de las proteínas reguladores en cada uno de los dos micro-



dominios celulares descrito anteriormente. Esto podría explicar la participación funcional de la subred regulatoria  $G_{2b}$ , que depende de las condiciones intracelulares –concentración de fosfato y localización espacial de algunas proteínas–.

El atractor donde CtrA, CckA, ChpT y CpdR son fosforiladas, pero DivK y DivJ no estarían fosforiladas, correspondería al micro-dominio asociado al fenotipo flagelado (Figura 9.i). El atractor donde están fosforiladas DivK y DivJ, pero CckA, ChpT y CpdR no fosforiladas y el complejo proteolítico ClpXP-RcdA es formado, correspondería al micro-dominio que dará lugar a células con el fenotipo anclado (Figura 9.j).

#### **4.1.3.2 El ciclo celular del fenotipo anclado y sus diferencias dinámicas con el ciclo celular del fenotipo flagelado en *C. crescentus***

Como se mencionó anteriormente, la dinámica de la subred  $G_{2b}$  genera dos puntos fijos. Uno correspondiente al tipo celular flagelado y el otro al fenotipo anclado. En la célula anclada, la proteólisis de CtrA cambia el atractor cíclico de la subred  $G_{2a}$ . El estado en el atractor correspondiente al fenotipo anclado sólo DnaA es expresada (Figura 9.II.e); en consecuencia GcrA es activada en la siguiente etapa del ciclo (Figura 9.II.f). El siguiente estado en el atractor es caracterizado por la expresión de CtrA (Figura 9.II.g). En el siguiente estado, CtrA continúa activada mientras que son expresadas CcrM y SciP (Figura 9.II.h).

Las diferencias entre el atractor cíclico del tipo flagelado y el correspondiente al fenotipo anclado están directamente relacionadas con el estado donde son expresadas SciP y DnaA. En el último fenotipo mencionado solo DnaA es expresada mientras que en el otro fenotipo DnaA y SciP son activadas. Esto pudiera explicar porque SciP es expresada específicamente en el tipo celular de la célula flagelada [72].

#### **4.1.3.3 Transición del tipo celular flagelado al anclado en *C. crescentus***

En la diferenciación de la célula flagelada a la anclada varios eventos morfogénicos ocurren. La eliminación del flagelo y el pili, y la síntesis del ancla. Un hecho importante que promueve el paso de célula flagelada a la anclada es el remplazo espacial de PleC por DivJ. Este cambio produce un cambio en el estado de las cinasas DivK en la célula flagelada, el cuál desencadena la cascada de señalización de tipo fosforilación que culmina en la degradación de CtrA [90].

En nuestro modelo lógico, este comportamiento tipo *switch* puede ser interpretado como un cambio en el estado de PleC, DivJ o DivK, el cuál induce un cambio a nivel del sistema del atractor que corresponde al micro-dominio de la célula flagelada al atractor que corresponde a la célula anclada (Figura 9.III). El estado de los nodos en este atractor tiene sentido biológico debido a que CtrA es degradado por el complejo proteolítico ClpXP-RcdA en la célula anclada. Nuestro modelo además revela que cambios en el estado de fosforilación de las cinasas CckA, ChpT podrían dar lugar también a la diferenciación celular. Estos resultados coinciden con los obtenidos con un modelo matemático desarrollado recientemente [54], el cual muestra que PleC tiene una respuesta bi-estable al actuar como cinasa o fosfatasa, misma actividad que es propagada a la cascada de señalización.

#### **4.1.3.4 Simulación de las dinámicas de perturbaciones a la red de regulación en *C. crescentus***

No observamos un cambio significativo en la dinámica de la red  $G_2$  posterior a simular la eliminación de los nodos de las subredes  $G_{2a}$  y  $G_{2b}$  (Tablas 2.1, 3.1, 4.1 y 5.1); sin embargo, perturbaciones en la  $G_{2b}$  podrían tener efectos más pronunciados debido a que esta subred resultó ser más sensible a eliminaciones de vértices (Tabla 2.1). A pesar de que, ambas subredes parecen ser lo suficientemente robustas para mantener el ciclo celular, así como otros eventos importantes en esta bacteria.

**Tabla 2.1** Dinámicas de simulaciones de perturbaciones en nodos en la  $G_{2a}$  en *C. crescentus*. Incluye el nodo perturbado denotado por  $\Delta$  y su nombre correspondiente, el efecto observado y la referencia experimental.

<b>Mutante</b>	<b>Efecto</b>	<b>Referencia PMID</b>
$\Delta ctrA_a$	El atractor cíclico es perturbado. Solo los estados de DnaA y GcrA oscilan. Esto es en el mismo sentido que los datos experimentales, donde se pueden observar oscilaciones de DnaA independiente de la acción de CtrA y se puede explicar porque la mutante en <i>ctrA</i> no puede conducir a división asimétrica	[34]
$\Delta gcrA$	Esta mutación es experimentalmente letal, se puede deber a que el efecto de la mutación en este gen produce que no se puedan expresar genes para morfogénesis.	[74]
$\Delta dnaA$	Esta mutación es letal por el efecto celular que provoca que no se exprese DnaA no se puede replicar el cromosoma, con el modelo se pudieron observar las oscilaciones de CtrA, observadas experimentalmente.	[54]
$\Delta ccrM$	Esta mutación es letal experimentalmente, principalmente por que no se expresa DnaA, mismo comportamiento observado bajo la simulación de nuestro modelo	[64]
$\Delta sciP$	Se predice que el ciclo celular es perturbado y se produce una afectación en la expresión de CtrA. Esto coincide con la evidencia experimental.	[35]

**Tabla 3.1** Dinámicas de simulaciones de cepas constitutivas o sobre-expresantes de nodos en la  $G_{2a}$  en *C. crescentus*. Incluye el nodo perturbado denotado por \* y su nombre correspondiente, el efecto observado y cotejado con evidencia experimental, y la referencia de esta evidencia

<b>Cepa constitutiva</b>	<b>Efecto</b>	<b>Referencia PMID</b>
$CtrA_a(*)$	El ciclo es detenido en el punto donde solo son expresados CtrA y SciP, causa inhibición en la replicación del cromosoma. Esto en acuerdo con evidencia experimental.	[34]
$GcrA(*)$	Puede provocar un detenimiento en el ciclo celular por que no se expresa DnaA. Los demás genes son expresados correctamente, coincide parcialmente con la evidencia experimental.	[74]
$DnaA(*)$	El ciclo celular es perturbado y se dan varias rondas de replicación del cromosoma, debido a la expresión constante de DnaA.	[54]
$CcrM(*)$	El ciclo celular es detenido, evidenciado por la simulación. No se pueden expresar CtrA, GcrA, DnaA ni SciP.	[64]
$SciP(*)$	La sobreexpresión provoca que el ciclo sea detenido, esto en concordancia con evidencia experimental.	[35]

**Tabla 4.1** Dinámicas de simulaciones de perturbaciones en nodos en la  $G_{2b}$  en *C. crescentus*. Incluye el nodo perturbado denotado por  $\Delta$  y su nombre correspondiente, el efecto observado y cotejado con evidencia experimental, y la referencia de esta evidencia

<b>Mutante</b>	<b>Efecto</b>	<b>Referencia PMDI</b>
$\Delta ctrA_b$	Esta mutación experimentalmente es letal y se produce solo un atractor debido a que no se expresa CtrA.	[34]
$\Delta divK$	El ciclo celular es perturbado y solo se genera un punto fijo, se puede deber a que no existe degradación de CtrA, estos resultados coinciden con evidencia experimental.	[73]
$\Delta divJ$	La simulación de esta mutante, exhibe solo un atractor puntual relacionado con el tipo celular flagelado, en acuerdo con evidencia experimental.	[77]
$\Delta pleC$	Se generan los dos estados, indica un fenotipo normal, lo cual concuerda con evidencia experimental.	[77]
$\Delta divL$	Se evidencia un cambio en la fosforilación de CtrA (no fosforilado), pero puede generar los dos estados de degradación y expresión de CtrA, coincide con evidencia experimental.	[78]
$\Delta cckA, \Delta chpT$	No existe fosforilación ni degradación de CtrA, por lo cual no puede existir diferenciación celular, esto en acuerdo con la evidencia experimental.	[22]
$\Delta cpdR$	No se muestra una alteración celular evidente, solo que no existe degradación de CtrA debido a que no se forma el complejo proteolítico, concuerda con evidencia experimental.	[80]
$\Delta clpXP-rcdA$	No existe degradación de CtrA, se generan los dos estados; uno de fosforilación y el otro de no fosforilación de CtrA, en acuerdo con evidencia experimental.	[81]

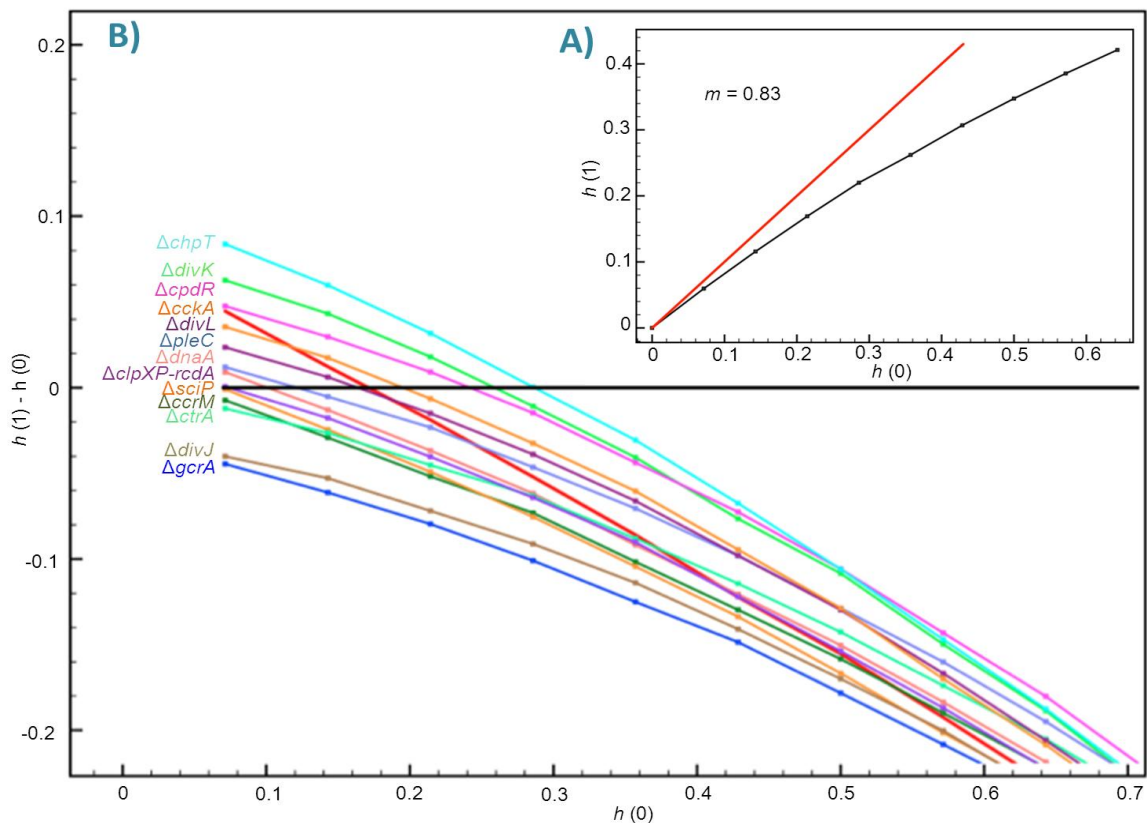
**Tabla 5.1** Dinámicas de simulaciones de cepas constitutivas o sobre-expresantes de nodos en la  $G_{2b}$  en *C. crescentus*. Incluye el nodo perturbado denotado por + y su nombre correspondiente, el efecto observado y cotejado con evidencia experimental, y la referencia de esta evidencia

<b>Cepa constitutiva</b>	<b>Efecto</b>	<b>Referencia PMID</b>
$CtrA_b(*)$	No existe degradación proteolítica de CtrA.	[34]
$DivK(*), DivJ(*), PleC(*)$	Se presenta solo un punto fijo e indica solo división celular pero no diferenciación.	[77]
$DivL(*), CckA(*), ChpT(*), CpdR(*)$	No existe degradación de CtrA, no hay formación de los dos puntos fijos. No existe evidencia experimental para comparar.	-----
$ClpXP-RcdA(*)$	Un efecto letal predicho, debido que no hay fosforilación ni expresión de CtrA, no existe evidencia experimental para comparar.	-----

#### 4.1.3.5 Régimen dinámico de la red $G_2$ en *C. crescentus*

Encontramos que la red  $G_2$  en *C. crescentus* opera en el régimen ordenado muy cercano a la criticalidad; con un valor de sensibilidad de  $m = 0.83$ , como se puede observar en la Figura 10 (A). La Figura 10 (B) muestra el resultado de que la eliminación de cualquier vértice cambia la dinámica de toda la red, la cual lleva a la red al régimen caótico.

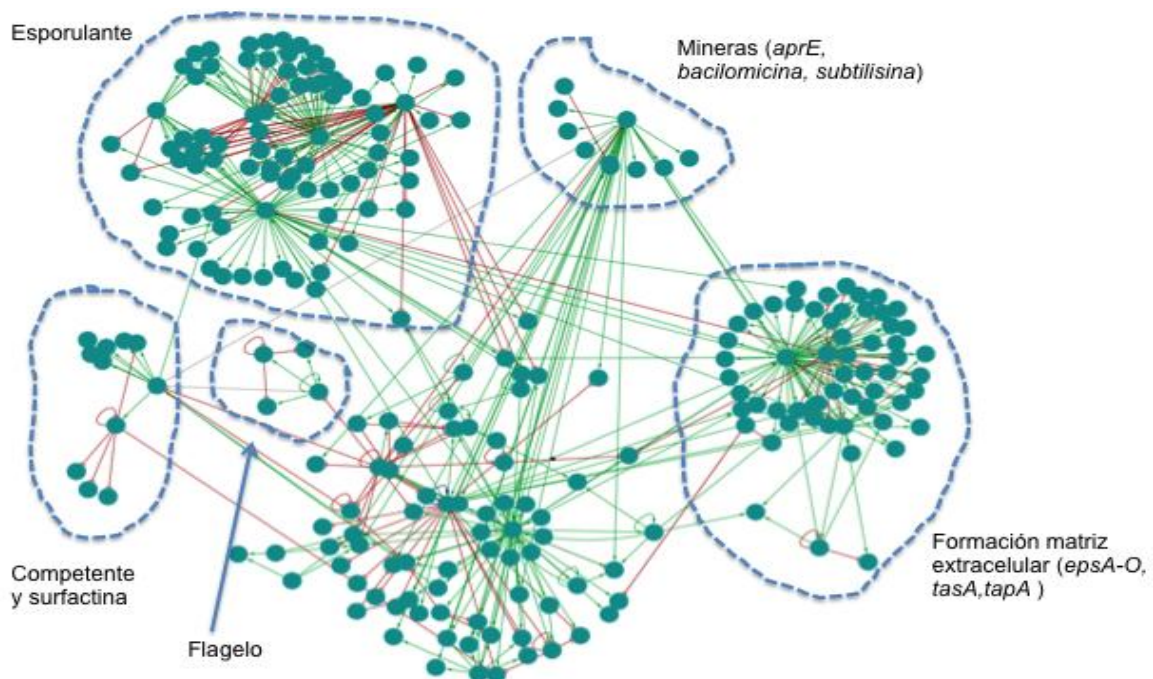
Sólo la eliminación de los nodos *gcrA*, *divJ* y *SciP*, referidos como  $\Delta gcrA$ ,  $\Delta divJ$  y  $\Delta sciP$ , modifican la red a un régimen más ordenado. La operación de la  $G_2$  cercano al régimen crítico explicaría por qué la bacteria, incluso al estar sometida a un constante cambio del entorno, es capaz de mantener su ciclo celular característico y la división asimétrica.



**Figura 10.** Mapa de Derrida para el análisis de sensibilidad de la subred de ciclo celular y división asimétrica en *C. crescentus*. A) Mapa de Derrida para la  $G_2$  sin realizar perturbaciones en su arquitectura, B) Mapa de Derrida en la  $G_2$  al realizar perturbaciones en su arquitectura.

## 4.2 Red de regulación reconstruida para *B. subtilis*

Para *B. subtilis*, la red completa  $G_I$  está compuesta de los factores de transcripción reguladores del fenómeno de diferenciación en fenotipos como son: esporulante, minero, competente y productor de matriz extracelular. Además involucra las cinasas que activan a los factores de transcripción. La  $G_I$  completa está compuesta de 380 nodos ( $V_I=380$ ) y 430 aristas ( $E_I=430$ ). Esta red completa  $G_I$  se muestra en la Figura 11, se indica el fenotipo asociado a los grupos de genes (nodos).



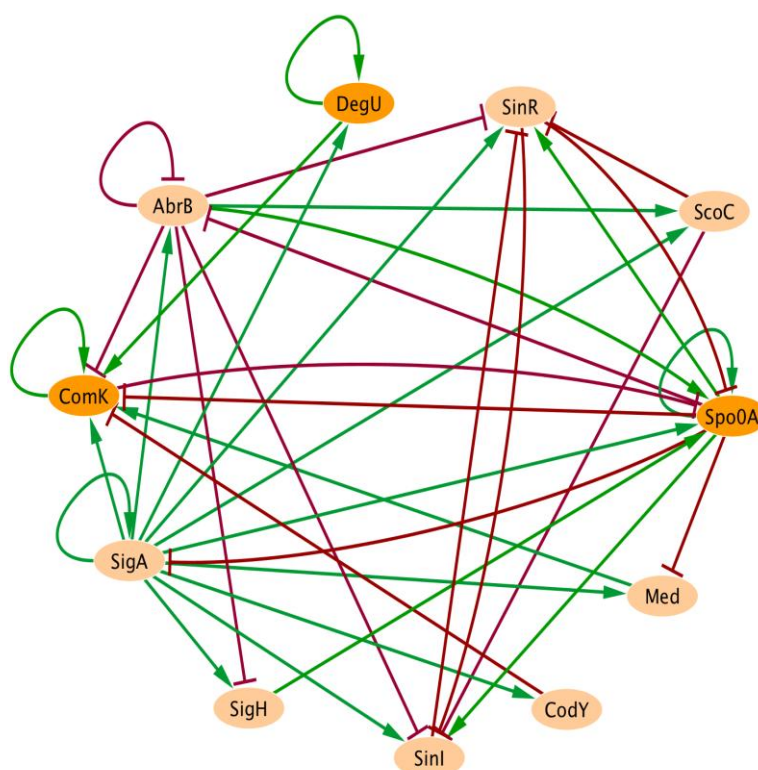
**Figura 11.** Red de regulación para diferenciación en *B. subtilis*. Se muestra la red donde los nodos corresponden a los genes reguladores y sus genes regulados, mismo que están agrupados en el fenotipo relacionado a su actividad celular. Las aristas indican las interacciones, donde las verdes son positivas y rojas negativas.

### 4.2.1 Reducción de la red de regulación en *B. subtilis*

Al igual que la red pequeña para *C. crescentus*, para la red de *B. subtilis* también se eliminaron nodos no reguladores, porque no influyen en la dinámica de la red. El proceso de diferenciación toma algunas generaciones (~ 5-7), que corresponde a una escala temporal

de horas (~24). Esta escala de operación es más cercana a la que ocurre en regulación transcripcional por factores de transcripción [50], en contraste con las tasas de fosforilación y de-fosforilación por cinasas y fosfatasas; estimadas en ~1-100 microsegundos [70]. Considerando estos criterios, solo se dejaron en la red reducida  $G_2$  a los factores de transcripción y a los factores sigma.

En *B. subtilis*, la  $G_2$  contiene exclusivamente factores de transcripción y factores sigma (Figura 12). Se analizó también la red incluyendo otras proteínas como las cinasas y fosfatasas de algunos de estos factores de transcripción, considerando a estas se obtuvo el mismo patrón de puntos fijos. En la Tabla 6.1 se muestran las características de los elementos de la red en *B. subtilis*. Esta red reducida en *B. subtilis* (Figura 12), presenta once nodos ( $V_2=11$ ) y treinta y seis aristas ( $E_2=36$ ).



**Figura 12.** Red de regulación genética reducida para el control de la diferenciación en *B. subtilis*. Los nodos representan a factores de transcripción, se puede apreciar que tres nodos tienen un color más oscuro que el resto de los demás, esto hace referencia a que son los 3 factores de transcripción clave para la formación de los 4 fenotipos. Las aristas representan las interacciones entre ellos; aristas verdes interacciones positivas y rojas negativas.



**Tabla 6.1** Componentes de la  $G_2$  para diferenciación en *B. subtilis*. Se indica el nombre del regulador, su actuación en la formación de fenotipos, las interacciones con otros genes (+ positiva, - negativa) y la referencia

Proteína	Acción en la formación de fenotipos	Interacciones en la $G_2$	Referencia PMID
Spo0A	Regulador transcripcional clave en el control del desarrollo, principalmente en activar genes para formación de la endoespora. En el <i>oriC</i> del cromosoma existen cajas 0A a las cuales se une Spo0A y se evita que se pueda iniciar la replicación del material genético	Regula a: SinR (+), SinI(+), Med(-), SigA(-), ComK(-), AbrB(-) y su propio promotor (+)	[41], [49]
ComK	Regulador transcripcional para el control de genes encargados del desarrollo del fenotipo de competencia	Regula a: Spo0A (-) y su propio promotor (+)	[92]
DegU	Regulador involucrado en varias formas de adaptación a fase estacionaria, principalmente de células productoras de exoproteasas. Junto con la cinasa DegS forma un sistema de dos componentes.	Regula a: ComK(+) y su propio promotor (+)	[93]
AbrB	Regulador expresado durante la transición de crecimiento vegetativo a fase estacionaria y en esporulación. Involucrada además en represión catabólica	Regula a: Spo0A (+), ScoC(+), ComK(-), SinR(-), SinI(-), SigH(-)	[94], [44]
SigA	Factor sigma 43 de la RNA polimerasa. Es el sigma principal durante el crecimiento exponencial	Transcribe a: Spo0A(+), ComK(+), DegU(+), AbrB(+), SigH(+), ScoC(+), CodY(+), Med(+), SinI(+), SinR(+)	[95], [96], [97], [98], [99]
SigH	Factor sigma 30 de la RNA polimerasa. Transcribe algunos genes para crecimiento vegetativo y en el inicio de la fase estacionaria	Transcribe a: Spo0A (+)	[99]
ScoC	Regulador de transición de fase de crecimiento, entre las fases logarítmica y exponencial	Regula a: SinI(-) y SinR(-)	[100]
CodY	Regulador transcripcional negativo de la formación del fenotipo de competencia	Regula a: ComK (-)	[102]
Med	Factor de transcripción promotor de la formación del fenotipo de competencia	Regula a: ComK(+)	[101]
SinI	Antagonista de SinR, al unirse con SinR previene que SinR reprima genes para la formación de la matriz extracelular	Reprime a SinR(-)	[103]
SinR	Regulador transcripcional de la fase de crecimiento estacionaria, co-regula procesos de competencia y formación de flagelo y reprime la esporulación y síntesis de exoproteasas	Reprime a: SinI(-)	[104]



#### 4.2.2 Descripción funcional de la red $G_2$ en *B. subtilis*

La  $G_2$ , como se mencionó anteriormente, está compuesta por factores de transcripción que median el proceso de diferenciación celular en algún fenotipo dado. En la  $G_2$  está el factor de transcripción Spo0A, el cual promueve la expresión de *sinI* y de *sinR*, y de su propio gen [40], reprime la expresión de *med*, *abrB*, *comK* y *sigA* [91]. Por un lado promueve la expresión de las proteínas necesarias para la formación del biofilm –SinI y SinR–, y contrariamente reprime al factor de transcripción ComK clave en la generación del fenotipo competente.

El regulador clave de competencia, ComK, activa su propia expresión e inhibe la transcripción de *spo0A* [92]. Debido a esto, la decisión en la elección del destino celular debe ser excluyente, ya que una vez que se expresa ComK se reprime Spo0A. El factor de transcripción para el fenotipo minero DegU, promueve la formación de DegU y ComK [93]. AbrB es un regulador clave en la formación de los fenotipos, ya que regula negativamente a ComK, SigH, SinI, SinR y su propia transcripción [94], por otro lado activa la transcripción de Spo0A y ScoC [95].

Otro regulador que integra la red de regulación es el factor sigma SigA, este es el principal factor sigma que transcribe en el crecimiento exponencial. Transcribe a todos los genes de la red incluida su propia expresión [95], [96], [97], [98], [99]. Por otro lado, el factor sigma de transición de crecimiento a fase estacionaria, SigH, transcribe a Spo0A [99]. Otro factor en esta transición de fases es ScoC, el cual reprime la transcripción de SinI y SinR [100], y reprime indirectamente la formación del fenotipo productor de matriz extracelular.

Los reguladores transcripcionales Med y CodY, regulan la transcripción de ComK; Med lo activa y CodY lo reprime [101], [102]. Por último, tenemos a SinI y SinR, mismos que se reprimen mutuamente [103]. Además de esta regulación, SinR reprime la transcripción de Spo0A [104].

## 4.2.3 Modelo lógico multi-valor para la descripción de la diferenciación celular en *B. subtilis*

### 4.2.3.1 Dinámica de la $G_2$ para el control de la elección del destino celular en *B. subtilis*

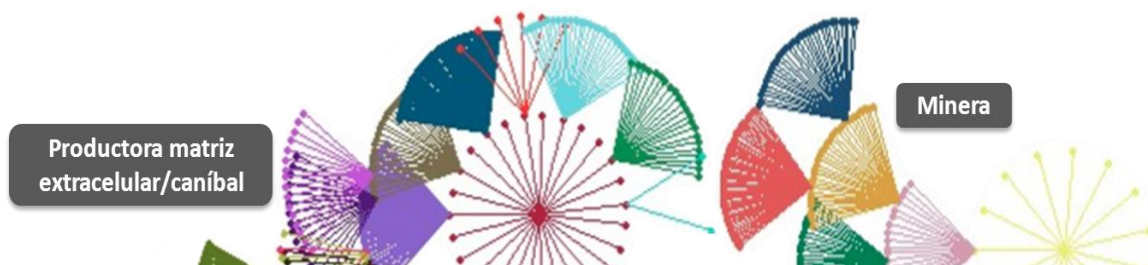
Una muestra general de las trayectorias de eventos dinámicos, seguidas desde cualquier condición inicial, se muestra en la Figura 13. Se puede apreciar el paisaje de atractores que esquematiza el grafo de transición de estados en forma de abanicos, donde los nodos corresponden a un estado dado de los genes de la red y las interacciones hacen referencia a la sucesión de un estado y juntos conforman las trayectorias en los estados.

La dinámica mostró ser multi-estable ya que se exhiben cuatro atractores de tipo puntual. Esto indica que al partir de cualquier condición inicial de estados se puede alcanzar alguno de los cuatro finales. En la Tabla 7.1 se muestran las configuraciones de los estados de los nodos de la  $G_2$  en cada atractor. Estos atractores coinciden la configuración activa de los reguladores en cada uno de los fenotipos que la red de regulación controla.

**Tabla 7.1** Puntos fijos para la  $G_2$  de diferenciación en *B. subtilis*. Se puede observar el estado de los nodos de la red en cada atractor

	Spo0A	SigH	AbrB	ComK	SinI	DegU	SinR	ScoC	CodY	Med	SigA
Atractor 1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
Atractor 2	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0
Atractor 3	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
Atractor 4	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0

El atractor 1 con una configuración [10001100000], está relacionado con el fenotipo productor de matriz extracelular. Para que se pueda dar la activación de los genes que producen la matriz, es necesaria la expresión de Spo0A, así como del factor de transcripción DegU. Estos factores de transcripción activan la transcripción de las proteínas de síntesis de los exopolisacáridos [105].



**Figura 13.** Paisaje de atractores exhibidos por la  $G_2$  de *B. subtilis*. Cada conjunto de abanicos corresponden a la cuenca de atracción de cada punto fijo, se indica a cual fenotipo es asociado; note que difieren entre ellos el tamaño de la cuenca.

Un punto importante a notar, es que en el atractor se muestra la expresión de la proteína SinI, misma que al unirse a SinR lo reprime [103]. Esta regulación en la formación del fenotipo como producto de la matriz no ha sido reportado. Además se ha visto que al madurar el biofilm, existe un tránsito entre el destino celular productor de matriz extracelular al de productor de exoproteasas o fenotipo minero, lo cual se puede deber a la co-expresión de Spo0A y DegU [106].

El punto fijo donde están expresadas las proteínas ComK, DegU y SinR lo relacionamos en el contexto de la formación del fenotipo minero. La condición para que se dé la expresión de este tipo celular es mediada principalmente por DegU, el cual regula a las exoproteasas, como la subtilisina [106], además al estar expresada también la proteína SinR se reprime el fenotipo productor de matriz extracelular [107]. El regulador ComK reprime a un buen número de proteínas necesarias para desencadenar la esporulación [92], y se reprime el fenotipo esporulante.

Otro atractor encontrado en la dinámica, es donde se encuentra expresado ComK y SinR. Este estado tiene relevancia en el fenotipo competente, donde el factor clave es ComK. Mismo que regula la expresión de los genes necesarios para el desarrollo de este tipo celular [43]. Además al estar expresado el regulador SinR se reprime al fenotipo productor de matriz extracelular.

El cuarto atractor mostrado, es el que relacionamos con el destino celular esporulante. Debido a que en este estado se encuentra expresado Spo0A y SinI, siendo Spo0A el regulador maestro de la generación de la spora y las proteínas que median este evento [40], [91]. Al expresarse también el regulador SinI, evidenciado en nuestro modelo, se podría contextualizar porque algún grupo de células que forman la spora en algún punto de la maduración del biofilm, también podrían generar matriz extracelular y viceversa como se ha observado experimentalmente [46].

Además de la Figura 13, es evidente que los atractores difieren considerablemente en el tamaño de su cuenca de atracción –todos los estados que convergen a un punto fijo–. Se cuantificó el número de estados de la cuenca de atracción y se le asignó una proporción respectiva del espacio total de estados; bajo la siguiente relación: proporción = tamaño de la cuenca o estados de cada cuenca / estados totales posibles; en este caso  $2^{11} = 2048$ .

Las proporciones de cada atractor en la totalidad de estados posibles se pudieron relacionar con las proporciones que tendrían los fenotipos generados en un biofilm en base a observaciones y evidencia experimental. Estas proporciones tanto del espacio de estados como de la comunidad bacteriana se pueden apreciar en la Tabla 8.1, donde se muestra el fenotipo asociado, la cuenca de atracción y el porcentaje poblacional. Dada la topología de la red de regulación en *B. subtilis*, así como las reglas lógicas, se pueden generar dichas proporciones.

**Tabla 8.1** Cuenca de atracción para cada atractor en la  $G_2$  de diferenciación en *B. subtilis*.

Se puede observar el tamaño de la cuenca de cada punto fijo y el porcentaje poblacional asociado a cada fenotipo y atractor

	Fenotipo Asociado	Cuenca de atracción	Porcentaje poblacional
Atractor 1	Productora de matriz extracelular	1040 estados	50.93%
Atractor 2	Minero (exoproteasas)	494 estados	24.09%
Atractor 3	Competente	304 estados	14.88%
Atractor 4	Esporulante	208 estados	10.18%

El tipo celular productor de matriz extracelular, es el más presente en la comunidad. Esto es evidentemente, ya que en la formación del biofilm es crucial tener altas concentraciones de exopolisacáridos que forman parte de la matriz [108]. Mientras que el tipo celular minero o productor de exoproteasas es el siguiente en proporciones, mismo que se ha visto en un cultivo ocupa aproximadamente la cuarta parte de la comunidad bacteriana [47], teniendo relación con aproximadamente el 24% que se obtuvo del modelo.

Mientras que los fenotipos competente y esporulante ocupan un porcentaje bajo, aproximadamente de 14 y 10% correspondiente. Estas proporciones coinciden con evidencia experimental el usar sistemas de microfluidos y resolución a nivel celular individual, donde mostraron que el proceso es probabilista y representa entre el 10 y el 20% del fenotipo competente en un cultivo bacteriano [55], [109].

Por ahora no es muy claro el porcentaje que tiene en un biofilm el fenotipo esporulante, dado que la mayoría de los métodos para coleta de células esporulantes utilizan métodos que inducen este estrés. Sin embargo, de manera natural se ha observado aproximadamente entre un 8 y un 15% de las células forman esporas [39], muy cercano con la proporción obtenida de nuestro modelo; que el 10% es para el fenotipo esporulante.

#### 4.2.3.2 Simulación de las dinámicas de perturbaciones a la $G_2$

Se analizó el efecto que tiene la eliminación de nodos en la dinámica de la red. De este análisis se observó que se podían eliminar hasta 6 nodos y en la simulación resultó que no eran esenciales puesto que la red podía exhibir los mismos cuatro atractores. Los nodos que en cambio parecen esenciales son Spo0A, ComK y DegU.

En la Tabla 9.1 se muestra el desempeño de las mutantes al simular la eliminación de un nodo, y el efecto que tiene. En la mayoría de los casos donde existe evidencia experimental los resultados de estas simulaciones coinciden con lo observado experimentalmente. Estos resultados muestran que la red es robusta ante la eliminación de un buen número de nodos, esto posiblemente es producto de la redundancia de elementos en la arquitectura de la red.

**Tabla 9.1** Dinámicas de simulaciones de perturbaciones en nodos en la  $G_2$  en *B. subtilis*.

Incluye el nodo perturbado denotado por  $\Delta$  y su nombre correspondiente, el efecto observado y cotejado con evidencia experimental, y la referencia de esta evidencia.

Mutante	Efecto	Referencia
$\Delta spo0A$	El modelo mostró que la célula es incapaz de formar tanto el fenotipo esporulante como el productor de matriz extracelular, se limita solo a la generación de competente y minero resultados que coinciden con evidencia experimental	[41], [49]
$\Delta comK$	La simulación de esta mutante mostró que el organismo no puede ser capaz de formar el fenotipo competente ni el minero. La evidencia experimental corrobora la mutación en <i>comK</i> , se inhibe el tipo celular competente, pero solo hay hipótesis que esta mutación influye sobre el fenotipo minero.	[92]
$\Delta degU$	Esta simulación mostró afectación tanto en la incapacidad para formar el fenotipo minero como en el productor de matriz extracelular. Ambos resultados coinciden con evidencia experimental que indica la relación en la generación de los fenotipos.	[93]
$\Delta abrB, \Delta scoC, \Delta codY, \Delta med, \Delta sinI, \Delta sinR$	La simulación en la mutación de todos estos genes no presentó afectación en la generación de los 4 fenotipos, todos estos casos coinciden con evidencia experimental.	[94], [44],[101], [102], [103], [104]
$\Delta sigA$	El modelo mostró que la simulación de esta mutante no afecta la generación de los 4 fenotipos. Sin embargo este factor sigma es esencial y tal vez se debe a que el modelo no analiza la participación de este sigma en otros procesos vitales.	-----
$\Delta sigH$	El modelo mostró que al eliminar este gen no se altera la decisión en la generación de los 4 fenotipos, no se puede comparar este resultado ya que la mutación en este gen le impide a la célula entrar a diferenciación por un proceso que no se ha descrito completamente y el modelo no toma en cuenta.	[99]

Por otro lado, en las simulaciones al fijar el valor de cada nodo a 1, que simula expresión constitutiva, mostraron que los mismo tres nodos anteriormente relevantes (*Spo0A*, *ComK* y *DegU*), eran los que presentaban un efecto importante. Estas simulaciones se pueden apreciar en la Tabla 10.1 donde se indica el nodo perturbado y el efecto obtenido de la simulación junto con la comparación con evidencia experimental.

**Tabla 10.1** Dinámicas de simulaciones de cepas constitutivas de nodos en la  $G_2$  en *B. subtilis*. Incluye el nodo perturbado denotado por + y su nombre correspondiente, el efecto observado y comparado con la evidencia experimental, y la referencia de esta evidencia.

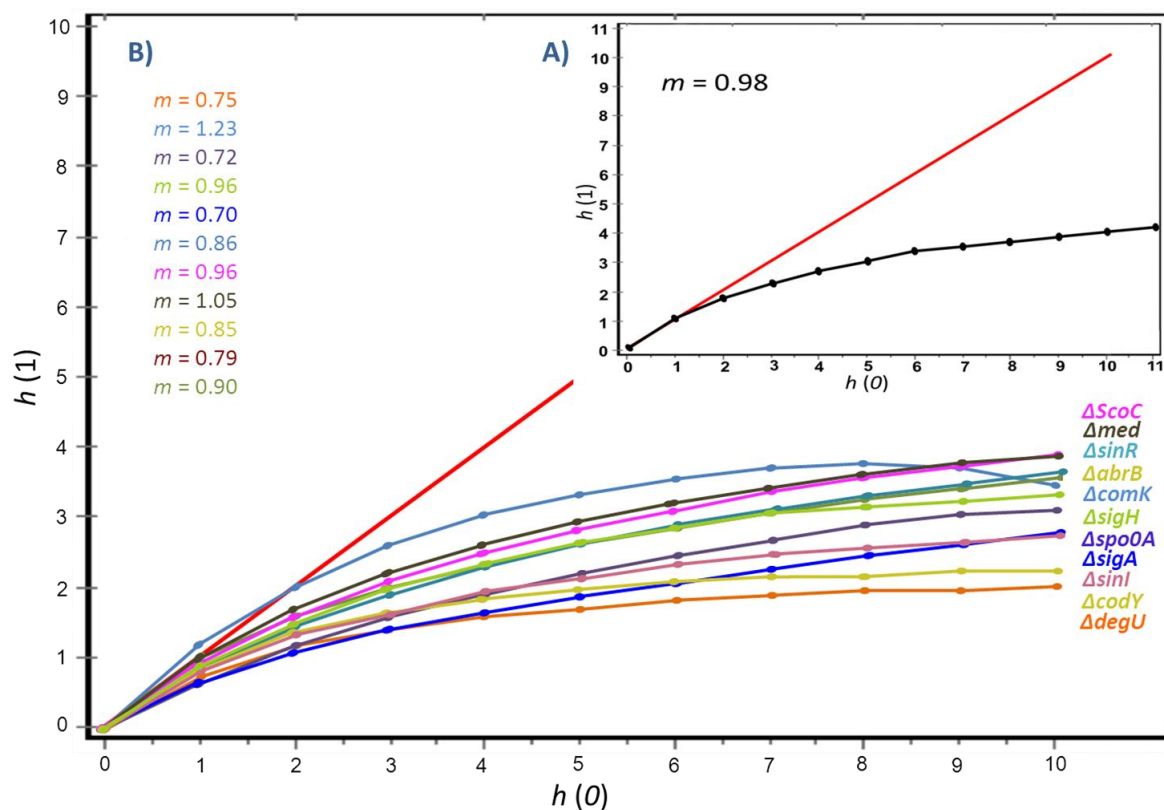
Cepa constitutiva	Efecto	Referencia
Spo0A(*)	La simulación de esta alteración de la red resulta que sólo se generen dos fenotipos esporulante y productor de matriz extracelular, mismo resultado que coincide con evidencia experimental, donde se ha aumentado hasta en 50% esta expresión.	[41], [49]
ComK(*)	La simulación muestra solo dos atractores competente y el minero, ambos coinciden con la evidencia experimental.	[92]
DegU(*)	La simulación muestra dos puntos fijos correspondientes al atractor del fenotipo minero y del productor de matriz extracelular. Solo el atractor minero tiene correspondencia experimental, ya que en la sobre-expresión de DegU se ha podido observar que genera un número muy grande de células que producen exoproteasas pero no se ha generado el otro fenotipo.	[93]
AbrB(*), ScoC(*), CodY(*), Med(*), SinI(*), SinR(*)	La simulación de la sobreexpresión de todas estas proteínas generaban los 4 puntos fijos y ajusta con la evidencia experimental. Esta evidencia demuestra que estos factores de transcripción son importantes en el proceso de diferenciación pero que no son esenciales.	[94], [44],[101], [102], [103], [104]
SigA(*)	La simulación de la expresión constitutiva de SigA mostro la emergencia de los 4 puntos fijos. Aunque no hay evidencia experimental es posible que así sea ya que es un factor sigma muy relevante en crecimiento.	_____
SigH(*)	La simulación de la dinámica al expresar esta proteína, mostro la generación de los 4 fenotipos originales (sin perturbación). Mismos que tienen evidencia experimental, además este factores de transcripción es importante en la transición de crecimiento a fase estacionaria y en diferenciación.	[99]

#### 4.2.3.3 Régimen dinámico de la red $G_2$ en *B. subtilis*

Del análisis de sensibilidad se encontró que la red  $G_2$  opera en el régimen ordenado muy cercano al límite con el caótico. El valor de sensibilidad que tuvo fue  $m = 0.98$ , hay que recordar que el valor para encontrarse en el régimen crítico es de  $m = 1$ .

Como se puede apreciar en el Figura 14 (A) que corresponde al Mapa de Derrida, se visualiza la evolución de las distancias Hamming entre los estados de la red. Además se muestra el Mapa de Derrida (Figura 14. B) y la  $m$  al momento que la  $G_2$  fue perturbada. Se pueden apreciar las simulaciones de mutaciones en los nodos de la red y el comportamiento en el régimen dinámico que muestran.

A partir de este análisis, se muestra que la red en su conjunto es robusta tanto a perturbaciones en la topología (eliminación de nodos), como ante alteraciones en la dinámica (transiciones de estados).



**Figura 14.** Mapa de Derrida de la sensibilidad de la  $G_2$  de diferenciación en *B. subtilis*. A) Mapa de Derrida de la red  $G_2$  completa (11 nodos), B) Mapa de Derrida para el caso de la  $G_2$  en cada simulación de una mutación.



## 5. Discusión

El presente trabajo aporta un modelo cualitativo del fenómeno de diferenciación por separado en las bacterias *C. crescentus* y *B. subtilis*. Las observaciones que arroja el modelo en ambas bacterias tienen correspondencia con la evidencia experimental y permite el análisis de algunas propiedades dinámicas de las redes como es la sensibilidad ante perturbaciones genéticas o de regulación. El estudio permitió también definir un mínimo número de elementos necesarios para poder llevar a cabo el control de los procesos del ciclo celular de una forma robusta en estas bacterias.

Un bosquejo de la subred de control del ciclo celular en *C. crescentus* presentada en este trabajo fue previamente esbozado por McAdams y Shapiro [37], [110]. Estos autores introducen la noción de un control central con actividad jerárquica de los reguladores en el control del ciclo celular. Además sugieren la existencia de una cascada de señalización del tipo de fosforilación que puede ser responsable de mediar la división asimétrica en el control del estado de fosforilación de CtrA. Nuestro modelo discreto dinámico resultó coherente con estas propuestas y es suficiente para el surgimiento de los destinos celulares basados en la integración de la subred de regulación del ciclo celular y la subred de señalización.

El modelo presentado en este trabajo hace sentido del funcionamiento de la subred en el control del ciclo celular completo. Proponemos que el complejo proteolítico de CtrA en la subred, dado por la asociación del complejo ClpXP y la proteína presentadora de CtrA, RcdA, debe ser un elemento importante implícito en la cascada de señalización. Encontramos que la arquitectura de la red produce actividad oscilatoria de las proteínas reguladoras. Entre las cuales está CtrA, el regulador central de la red estudiada en *Caulobacter* y exhibe comportamiento oscilatorio durante las diferentes fases del ciclo celular.

En cuanto a *C. crescentus*, nuestro enfoque de modelado discreto describe las cinéticas de síntesis, de degradación y actividad de los reguladores. Por la naturaleza de nuestro modelo y simulaciones, especulamos que es posible que los reguladores de la red pudieran actuar de una forma sincronizada.

Algunos modelos previos han tratado de explicar la dinámica del control del ciclo celular y el comportamiento oscilatorio de las proteínas reguladoras asociadas a estos procesos biológicos [52], [53]. Sin embargo, estos modelos no consideran cómo la dinámica de la red podría dar lugar a la formación de los dos tipos celulares conocidos en *C. crescentus*. Además, en dichos modelos no se explica la expresión dependiente de tipo celular de la proteína SciP y su relevancia en la regulación del ciclo celular, como ha sido descrito posteriormente a la propuesta de estos modelos [72]. Nuestro modelo en cambio ilustra el posible mecanismo para la formación de los dos fenotipos e integra la actividad de la proteína SciP en su regulación; más específicamente, muestra porque la expresión de SciP solo ocurre en el tipo celular flagelado.

Otro modelo posterior [54] sugiere que la cinasa PleC podría tener comportamiento bi-estable y podría conducir a la formación de los dos tipos celulares. Esta propuesta coincide con nuestros hallazgos de los dos puntos fijos en la subred de fosfo-proteólisis y la formación de los micro-dominios. Por otra parte, en nuestro modelo se tomó en cuenta el papel del complejo proteolítico ClpXP-RcdA, y explica como en un estado inicial de fosforilación de las cinasas o del complejo ClpXP-RcdA en la subred de señalización puede dar lugar al surgimiento de los dos fenotipos.

La descripción dinámica que desarrollamos ajusta también con algunas propuestas en la literatura sobre el surgimiento de los dos tipos celulares [78], [84]. En dichas propuestas, se sugiere que este proceso de división asimétrica es debido a la localización espacial diferencial de proteínas de señalización (cinasas y fosfatasa), como son el caso de DivK, PleC y DivJ.

En cuanto a *B. subtilis* su diferenciación celular principalmente a esporulación ha sido sujeta de varios modelos matemáticos. Mediante un modelo en base a ecuaciones diferenciales ordinarias, se pudo evidenciar la expresión máxima del regulador Spo0A en la etapa de crecimiento estacionaria y relacionar la ocurrencia del evento de esporulación al paso de varias rondas de división celular del organismo [111]. En otro modelo cuantitativo se pudo apreciar el papel dual o bi-estable de la molécula PhrA en el sistema de señalización. Esta molécula es clave en el proceso de decisión de la selección del destino celular, además se especula que podría generar un comportamiento bimodal en la expresión de Spo0A [112].

Por otro lado, también mediante un análisis matemático se resaltó que la decisión de diferenciarse en este fenotipo tienen un comportamiento tipo *switch* y la elección de esporular depende de un umbral de concentraciones de las cinasas de Spo0A; entre ellas KinA es la más importante, y este umbral induce una respuesta rápida y ultrasensible [113]. Por otra parte, el proceso de diferenciación en el fenotipo minero, se ha analizado matemáticamente y se sugiere una dinámica bi-estable la cual corresponde al comportamiento que tiene una población celular con expresión bimodal del regulador DegU [114].

Otros modelos matemáticos, cuantitativos y mediante parámetros cinéticos continuos, han integrado la exclusión de fenotipos. Estos modelos mostraron el rango en parámetros en las concentraciones de los reguladores Spo0A y ComK; ambos en su condición activa de fosforilación exhibían una dinámica bi-estable. La decisión de entrar a diferenciación en alguno de los dos fenotipos esporulante o competente, está dada como una ventana temporal y de parámetros muy pequeña para el caso del fenotipo competente e incluso la decisión es estocástica [56], [57]. Estos análisis también se han hecho al analizar la elección entre los fenotipos esporulante o minero, mediante este modelo se observó que una fracción poblacional expresaba altas concentraciones de DegU al igual que el factor de transcripción Spo0A [44].

Es evidente al revisar los trabajos anteriormente mencionados de la necesidad de una visión integral del proceso de diferenciación en esta bacteria. Un modelo donde se analice la totalidad del fenómeno y cómo emergen de la dinámica de la red de control dichos fenotipos. Además, los modelos previos coinciden con la evidencia experimental sobre trabajos en condiciones de laboratorio donde se predispone la emergencia de cierto fenotipo en condiciones específicas [114]. En nuestro trabajo, se aborda un modelo integral de la emergencia de los fenotipos y encontramos una coincidencia entre las proporciones poblacionales de cada fenotipo con el tamaño de las cuencas de cada atractor correspondiente a cada fenotipo.

Por otro lado, se analizaron en el grafo de transición de estados para la dinámica de la  $G_2$  en *B. subtilis* condiciones como el tamaño de la cuenca de atracción, número y configuraciones de los estados edén –estados iniciales a los que no se accede desde ningún otro estado–, estados altamente conectados y tamaño de las trayectorias. De dichos análisis la única condición que encontramos con relevancia biológica fue el tamaño de la cuenca de atracción. Dichas proporciones coinciden con las que tienen los fenotipos en una comunidad bacteriana. Esto evidencia que la arquitectura de la red y sus interconexiones no solo puede generar los fenotipos, dadas por la multi-estabilidad que exhibe, además tienen una relación en la probabilidad de ocurrencia de cada tipo celular.

En ciertos modelos previos se ha observado una relación entre el tamaño de la cuenca con la probabilidad de ocurrencia de cierto fenotipo [115]. De la cuantificación de la cuenca de atracción, pudimos obtener las proporciones teóricas de cada tipo celular. Al cotejar con evidencia experimental tienen semejanza, y mostró que el fenotipo productor de matriz extracelular es el más abundante. Esto coincide al cuantificar fenotipos en una comunidad madura, en la cual constituyen más del 50% de las células [108]. Mientras que los destinos celulares competente y esporulante son los menores, muy por debajo de las proporciones de los otros dos fenotipos, entre los dos tipos representan menos del 25% [55].

También se puede explicar porque en fases de maduración del biofilm, células productoras de matriz extracelular/caníbales pueden posteriormente formar esporas; y esto al parecer es

debido a la expresión de Spo0A. También porque el fenotipo competente fácilmente puede dar lugar a la síntesis del flagelo. Ya que en el atractor encontrado que referimos como competente, también se encuentra expresada SinR, el principal factor en el control de la formación del flagelo [46].

En el atractor que relacionamos con el fenotipo productor de matriz extracelular sólo están expresadas las proteínas regulatorias Spo0A, SinI y DegU. Se ha demostrado experimentalmente que como condición para la diferenciación en este fenotipo la existencia de una puerta lógica AND; que hace referencia a que se necesitan tanto el factor de transcripción Spo0A como DegU, mismos que pudimos identificar. Dicha compuerta lógica, se creó, que se da porque algunas proteínas necesarias para la síntesis de la matriz pudieran ser co-reguladas por los factores de transcripción mencionados, además de la expresión de SinI que reprime a SinR –principal represor de las proteínas necesarias para la síntesis de la matriz– [116].

Al reducir la red en *B. subtilis* y simulando mutaciones deletéreas se conservaron en la mayoría de los casos los mismo cuatro atractores. Para los nodos de los factores de transcripción Spo0A, ComK y DegU, se presentan sólo dos atractores en cada caso, correspondiendo a los fenotipos que antagonizan a los factores de transcripción eliminados.

Nuestro modelo, por la naturaleza discreta del mismo, es una descripción básica y minimalista, debido a esto no puede explicar un buen número de condiciones del proceso e implica varios supuestos importantes. Entre estos están los niveles de expresión de Spo0A que influyen en la expresión de ciertos genes, mismo que no pudimos observar y no se pudo incluir en el modelo debido a que es todavía un problema abierto y solo hay sugerencias que argumentan que los niveles de Spo0A se incrementan con el paso del tiempo en la célula [91].

Otros supuestos son otros niveles de regulación celular que presenta la diferenciación en *B. subtilis*, mismos que no tomamos en cuenta como la degradación proteolítica del regulador

DegU o cambios en los estados post-traduccionales, entre ellos la fosforilación; mismo que se predice puede influir en la decisión de destino celular [116].

El régimen dinámico en el cuál las redes  $G_2$  de ambos organismos operan es cercano el crítico. Se ha demostrado que redes biológicas operan en el régimen crítico o muy cercano a este [117]. Y se ha argumentado que dichas redes son adaptables a cambios, pero lo suficientemente robustas ante perturbaciones [118]. Estas propiedades emergentes son muy relevantes ya que le permiten a los organismos poder resistir y adaptarse ante cambios como ciertas mutaciones deletéreas y ante cambios en el medio donde se encuentra el organismo. Además se ha visto, por modelos teóricos, que estas propiedades emergen al evolucionar las redes [119].

## 6. Conclusiones

Las redes de regulación son una abstracción formal, muy útil para la representación de sistemas moleculares de regulación biológica. Los modelos dinámicos aplicados a la descripción temporal de estas redes permiten obtener resultados importantes que pueden contrastarse con datos experimentales. El estudio de las redes también permite la generación de predicciones y simulaciones. Ofrecen un medio, en ciertos casos únicos, de exploración de algunas propiedades dinámicas de dichas redes, y se aproximan a análisis integrales que permiten abordar la complejidad de los sistemas biológicos.

Los modelos de la dinámica del ciclo celular y división asimétrica en *C. crescentus* así como en la diferenciación en *B. subtilis* fueron reconstruidos de la literatura original y algunas bases de datos especializadas. Por medio del uso de un formalismo discreto fue posible explicar la operación de las redes completas.

La red de *C. crescentus* exhibe comportamiento oscilatorio de los reguladores durante el ciclo celular. Esta actividad temporal puede ser explicada en el contexto de la formación de los micro-dominios espaciales en la célula bajo condiciones precisas. Las cascadas de fosforilación y proteólisis, las cuales convergen en el regulador global CtrA y permiten la generación de los dos tipos celulares, esto brinda algunas respuestas a posibles condiciones que promuevan la diferenciación celular.

Por un lado, lo que sabemos sobre la red de regulación que controla el ciclo celular en *C. crescentus* es el hecho que esta dirige un proceso robusto y complejo, capaz de hacer frente a perturbaciones en la red sin propagar alguna disfunción. Por otro lado, la cascada relativamente larga (8 elementos) de quinasas y proteínas proteolíticas hace a la red lo suficiente sensible para responder a múltiples condiciones ambientales. Este trabajo

contribuye al entendimiento del mecanismo de regulación que opera en el centro del proceso de división asimétrica en *C. crescentus*.

En cuanto a *B. subtilis*, se reconstruyó la red con el menor número de elementos para poder regular la emergencia de fenotipos de resistencia a condiciones ambientales desfavorables. El modelo indicó que la red exhibe una dinámica multi-estable y los fenotipos generados son excluyentes. Además las trayectorias y la cuenca de atracción de cada fenotipo están relacionadas con las proporciones poblacionales de cada tipo celular en un biofilm. El fenotipo productor de matriz extracelular es el más abundante.

La red, además de exhibir un comportamiento dinámico multi-estable, mostró ser muy robusta ante perturbaciones en su estructura y se pudieron evidenciar los nodos más relevantes y esenciales en la generación de los fenotipos. La red es robusta ante la eliminación de la mayoría de los nodos, con excepción de los nodos Spo0A, ComK y DegU, ya que se pueden presentar los 4 atractores en dichas mutaciones. En cuanto a la estabilidad de la red ante perturbaciones en las transiciones de estados, se obtuvo que la red opera en el régimen ordenado muy cercano al crítico, con las implicaciones adaptativas que esto representa –ser robusta, sensible y adaptable a cambios en las condiciones del medio–.

Al analizarse la propiedad dinámica de sensibilidad de la red ante deleciones se puede proponer que la red en conjunto integra tanto la emergencia de los 4 destinos celulares y lo hace de una forma robusta y adaptable ante perturbaciones; dado por la integración de la red completa.

En ambos modelos dinámicos, las simulaciones tanto de eliminaciones de nodos uno a la vez y el fijar el valor de un nodo dado, tienen correspondencia con la evidencia experimental.

El presente trabajo aporta una visión general integrada y cualitativa del proceso de generación de múltiples fenotipos en *B. subtilis* y el control del ciclo celular en *C.*



*crescentus*. También muestra la relevancia de la topología de las redes de regulación, tanto a nivel dinámico como a nivel adaptativo.

## 7. Perspectivas

Sería relevante estudiar dinámicamente alguna red para controlar división simétrica, que podría ser el caso de la bacteria *E. coli*. Evaluar si esta presenta dinámica mono-estable, además al comparar las propiedades operacionales que presente con las redes consideradas en el presente trabajo. Ya que algunos trabajos han revisado y comparado propiedades físicas de la célula con división asimétrica con las que presentan división simétrica [120], y no se ha analizado la relevancia que pudiera tener la red de regulación en esta distinción celular.

Además se podrían examinar estructuralmente las redes, motivos recurrentes o módulos disímiles. Si existe relación evolutiva entre los componentes de las redes o si, en caso contrario, hubo un re-arreglo por nodos no relacionadas filogenéticamente. Aunado a esto, algunas evidencias sugieren que la red de regulación abordada en este trabajo podría tener ortólogos en un buen número de organismos de la misma clase taxonómica que *C. crescentus* [121]. Y se ha identificado diferenciación celular y división asimétrica en organismos relacionados con *C. crescentus*, esto al momento de infectar a sus hospederos respectivos, pero no se conoce el mecanismo que controla este proceso [122].

Al igual que la red de *C. crescentus* en *B. subtilis* la red de diferenciación celular podría estar ampliamente representada en el orden de los *Bacillales*, ya que un número considerable de organismos presentan los fenotipos similares a *B. subtilis* [123]. Resulta relevante el estudio dinámico en especies relacionadas con *B. subtilis*, para poder analizar diferencias en las proporciones celulares de cada fenotipo en el contexto de una comunidad.

Por otro lado, varios requerimientos se han marcado para que un organismo pueda ser considerado multicelular, como es un complejo programa de desarrollo, diferenciación robusta y la emergencia de células de líneas germinales [126]. Algunos de estos rasgos los presenta *C. crescentus* en su ciclo de vida y ciertos rasgos en la diferenciación en *B. subtilis*. Nuestro modelo dinámico puede dar indicios sobre la formación de dos células diferenciadas al partir de una célula polarizada. Con el uso de nuestro modelo se podría explicar este fenómeno y contribuir al entendimiento del origen de organismos multicelulares.

## 8. Bibliografía

1. Helmstetter CE (1969) Sequence of bacterial reproduction. *Annu Rev Microbiol* 23: 223–238.
2. Lybarger SR, Maddock JR (2001) Polarity in action: Asymmetric protein localization in bacteria. *J Bacteriol* 183: 3261–3267.
3. Paul J (1968) Molecular aspects of cytodifferentiation. *Adv Comp Physiol Biochem* 3: 115–172.
4. Rudel D, Sommer RJ (2003) The evolution of developmental mechanisms. *Dev Biol* 264: 15–37.
5. Lopez D, Vlamakis H, Losick R, Kolter R (2009) Paracrine signaling in a bacterium. *Genes Dev* 23: 1631–1638.
6. Casadesús J, Low D (2006) Epigenetic gene regulation in the bacterial world. *Microbiol Mol Biol Rev* 70: 830–856.
7. Waddington CH (1947) *Organisers & genes*. Press CU, editor Cambridge.
8. Waddington CH (1942) Canalisation of development and the inheritance of acquired characters. *Nature* 150: 563–564.
9. Kashtan N, Alon U (2005) Spontaneous evolution of modularity and network motifs. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 13773–13778.
10. Barabási A-L, Albert R, Jeong H (1999) Mean-field theory for scale-free random networks. *Physica A* 272: 173–187.
11. Alon U (2007) Network motifs: theory and experimental approaches. *Nat Rev Genet* 8: 450–461.
12. Kauffman S (1969) Homeostasis and cell differentiation in random genetic control networks. *Nature* 224: 117–178.
13. Martínez-Antonio A, Janga SC, Salgado H, Collado-Vides J (2006) Internal-sensing machinery directs the activity of the regulatory network in *Escherichia coli*. *Trends Microbiol* 14: 22–27.
14. Thomas R, Kaufman M (2001) Multistationarity, the basis of cell differentiation and memory. II. Logical analysis of regulatory networks in terms of feedback circuits. *Chaos* 11: 180–195.
15. Thieffry D, Thomas R (1995) Dynamical behavior of biological regulatory networks--II. Immunity control in bacteriophage lambda. *Bull Math Biol* 57: 277–297.
16. Espinosa-Soto C, Padilla-Longoria P, Alvarez-Buylla E (2004) A gene regulatory network model for cell-fate determination during *Arabidopsis thaliana* flower development that is robust and recovers experimental gene expression profiles. *Plant Cell* 16: 2923–2939.

17. Mendoza L (2006) A network model for the control of the differentiation process in Th cells. *Biosystems* 84: 101–114.
18. Huang S, Eichler G, Bar-Yam Y, Ingber DE (2005) Cell fates as high-dimensional attractor states of a complex gene regulatory network. *Phys Rev Lett* 94: 128701–128704.
19. Laub MT, Shapiro L, McAdams HH (2007) Systems biology of *Caulobacter crescentus*. *Annu Rev Genet* 41: 429–441.
20. Shapiro L, Agabian-keshishian N, Bendis I (1971) Bacterial differentiation. *Science* (80- ) 173: 884–892.
21. Terrana B, Newton A (1975) Pattern of unequal cell division and development in *Caulobacter crescentus*. *Dev Biol* 44: 380–385.
22. Brazhnik P, Tyson JJ (2006) Cell cycle control in bacteria and yeast: A case of convergent evolution? *Cell Cycle* 5: 522–529.
23. Reisinger SJ, Huntwork S, Viollier PH, Ryan KR (2007) DivL performs critical cell cycle functions in *Caulobacter crescentus* independent of kinase activity. *J Bacteriol* 189: 8308–8320.
24. Wagner JK, Galvani CD, Brun Y V (2005) *Caulobacter crescentus* requires RodA and MreB for stalk synthesis and prevention of ectopic pole formation. *J Bacteriol* 187: 544–553.
25. Jensen RB (2006) Coordination between Chromosome Replication , Segregation , and Cell Division in *Caulobacter crescentus*. *J Bacteriol* 188: 2244–2253.
26. Judd EM, Ryan KR, Moerner WE, Shapiro L, McAdams HH (2003) Fluorescence bleaching reveals asymmetric compartment formation prior to cell division in *Caulobacter crescentus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 8235–8240.
27. Reisenauer A, Shapiro L (2002) DNA methylation affects the cell cycle transcription of the CtrA global regulator in *Caulobacter crescentus*. *EMBO J* 21: 4969–4977.
28. Gober JW, Marques M V (1995) Regulation of cellular differentiation in *Caulobacter crescentus*. *Microbiol Rev* 59: 31–47.
29. Quon KC, Yang B, Domain IJ, Shapiro L, Marczynski GT (1998) Negative control of bacterial DNA replication by a cell cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 120–125.
30. Hottes AK, Shapiro L, McAdams HH (2005) DnaA coordinates replication initiation and cell cycle transcription in *Caulobacter crescentus*. *Mol Microbiol* 58: 1340–1353.
31. Modell JW, Hopkins AC, Laub MT (2011) A DNA damage checkpoint in *Caulobacter crescentus* inhibits cell division through a direct interaction with FtsW. *Genes Dev* 25: 1328–1343.
32. Fioravanti A, Fumeaux C, Mohapatra SS, Bompard C, Brillì M, et al. (2013) DNA binding of the cell cycle transcriptional regulator GcrA depends on N6-adenosine methylation in *Caulobacter crescentus* and other Alphaproteobacteria. *PLoS Genet* 9: e1003541.
33. Chen JC, Viollier PH, Shapiro L (2005) A membrane metalloprotease participates in the sequential degradation of a *Caulobacter crescentus* polarity determinant. *Mol Microbiol* 55: 1085–1103.

34. Ryan KR, Shapiro L (2003) Temporal and spatial regulation in prokaryotic cell cycle progression and development. *Annu Rev Biochem* 72: 367–394.
35. Tan MH, Kozdon JB, Shen X, Shapiro L, McAdams HH (2010) An essential transcription factor, SciP, enhances robustness of *Caulobacter crescentus* cell cycle regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 18985–18990.
36. Biondi EG, Reisinger SJ, Skerker JM, Arif M, Perchuk BS, et al. (2006) Regulation of the bacterial cell cycle by an integrated genetic circuit. *Nature* 444: 899–904.
37. McAdams HH, Shapiro L (2009) System-level design of bacterial cell cycle control. *FEBS Lett* 583: 3984–3991.
38. Branda SS, González-Pastor JE, Ben-Yehuda S, Losick R, Kolter R (2001) Fruiting body formation by *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 11621–11626.
39. Aguilar C, Vlamakis H, Losick R, Kolter R (2007) Thinking about *Bacillus subtilis* as a multicellular organism. *Curr Opin Microbiol* 10: 638–643.
40. McKenney PT, Driks A, Eichenberger P (2013) *The Bacillus subtilis* endospore: assembly and functions of the multilayered coat. *Nat Rev Microbiol* 11: 33–44.
41. Molle V, Fujita M, Jensen ST, Eichenberger P, González-pastor JE, et al. (2003) The Spo0A regulon of *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 50: 1683–1701.
42. Setlow P (2006) Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *J Appl Microbiol* 101: 514–525.
43. Dubnau D (1991) Genetic competence in *Bacillus subtilis*. *Microbiol Rev* 55: 395–424.
44. Hamoen LW, Venema G, Kuipers OP (2003) Controlling competence in *Bacillus subtilis*: shared use of regulators. *Microbiol* 149: 9–17.
45. Veening J-W, Igoshin OA, Eijlander RT, Nijland R, Hamoen LW, et al. (2008) Transient heterogeneity in extracellular protease production by *Bacillus subtilis*. *Mol Syst Biol* 4: 184.
46. Murray EJ, Kiley TB, Stanley-Wall NR (2009) A pivotal role for the response regulator DegU in controlling multicellular behaviour. *Microbiol* 155: 1–8.
47. Lemon KP, Earl AP, Vlamakis HC, Aguilar C, Kolter R (2008) Biofilm development with an emphasis on *Bacillus subtilis*. *Curr Top Microbiol Immunol* 18: 333–340.
48. Vlamakis H, Chai Y, Beaugard P, Losick R, Kolter R (2013) Sticking together: building a biofilm the *Bacillus subtilis* way. *Nat Rev Microbiol* 11: 157–168.
49. Fujita M, Losick R (2005) Evidence that entry into sporulation in *Bacillus subtilis* is governed by a gradual increase in the level and activity of the master regulator Spo0A. *Genes Dev* 19: 2236–2244
50. Claverys JP, Havarstein LS (2007) Cannibalism and fratricide: mechanisms and raisons d’etre. *Nat Rev Microbiol* 5: 219–229.
51. Lopez D, Kolter R (2010) Extracellular signals that define distinct and coexisting cell fates in *Bacillus*

- subtilis*. FEMS Microbiol Rev 34: 134–149.
52. Li S, Brazhnik P, Sobral B, Tyson JJ (2009) Temporal controls of the asymmetric cell division cycle in *Caulobacter crescentus*. PLoS Comput Biol 5: e1000463.
  53. Li S, Brazhnik P, Sobral B, Tyson JJ (2008) A quantitative study of the division cycle of *Caulobacter crescentus* stalked cells. PLoS Comput Biol 4: e9.
  54. Shen X, Collier J, Dill D, Shapiro L, Horowitz M, et al. (2008) Architecture and inherent robustness of a bacterial cell-cycle control system. Proc Natl Acad Sci U S A 105: 11340–11345.
  55. Subramanian K, Paul MR, Tyson JJ (2013) Potential role of a bistable histidine kinase switch in the asymmetric division cycle of *Caulobacter crescentus*. PLoS Comput Biol 9: e1003221.
  56. Süel GM, Garcia-Ojalvo J, Liberman LM, Elowitz MB (2006) An excitable gene regulatory circuit induces transient cellular differentiation. Nature 440: 545–550.
  57. Shultz D, Ben-Jacob E, Onuchic JN, Wolynes PG (2007) Molecular level stochastic model for competence cycles in *Bacillus subtilis*. Proc Natl Acad Sci USA 104: 17582–17587.
  58. Shultz D, Wolynes PG, Ben-Jacob E, Onuchic JN (2009) Deciding fate in adverse times: Sporulation and competence in *Bacillus subtilis*. Proc Natl Acad Sci USA 106: 21027–21034.
  59. Thomas R (1978) Logical analysis of systems comprising feedback loops. J Theor Biol 73: 631–656.
  60. Siervo N, Makita Y, de Hoon M, Nakai K (2008) DBTBS: a database of transcriptional regulation in *Bacillus subtilis* containing upstream intergenic conservation information. Nucleic Acids Res 36: D93–6.
  61. Karp PD, Ouzounis C a, Moore-Kochlacs C, Goldovsky L, Kaipa P, et al. (2005) Expansion of the BioCyc collection of pathway/genome databases to 160 genomes. Nucleic Acids Res 33: 6083–6089.
  62. Smoot M, Ono K, Ruscheinski J, Wang P, Ideker T (2011) Cytoscape 2.8: new features for data integration and network visualization. Bioinformatics 27: 431–432.
  63. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>)
  64. Collier J, McAdams H, Shapiro L (2007) A DNA methylation ratchet governs progression through a bacterial cell cycle. Proc Natl Acad Sci USA, 104: 17111–17116.
  65. Collier J, Murray SR, Shapiro L (2006) DnaA couples DNA replication and the expression of two cell cycle master regulators. EMBO J 25: 346–356.
  66. Naldi A, Berenguier D, Fauré A, Lopez F, Thieffry D, et al. (2009) Logical modelling of regulatory networks with GINsim 2.3. BioSystems 97: 134–139.
  67. Aldana M, Coppersmith S, Kadanoff Lp (2003) Boolean dynamics with random couplings. Kaplan E, Marsden JE, Sreenivasan KR (Springer NY), Ed Springer Apple Math Sci: 23–89.
  68. Derrida B, Pomeau Y (1986) Random networks of automata: A simple annealed approximation. Eur Lett 1: 45–49.

69. Naldi A, Remy E, Thieffry D, Chaouiya C (2009) A reduction of logical regulatory graphs preserving essential dynamical properties. *Compt Meth Syst Biol, Lect Notes Compt Sci* 5688: 266–280.
70. Yu J, Xiao J, Ren X, Lao K, Xie X (2006) Probing gene expression in Live Cells, One protein Molecule at a Time. *Science* (80- ) 311: 1600–1603.
71. Reisenauer A, Quon K, Shapiro L (1999) The CtrA response regulator mediates temporal control of gene expression during the *Caulobacter crescentus* cell cycle. *J Bacteriol* 181: 2430–2439.
72. Gora K, Tsokos C, Chen Y, Srinivasan B, Perchuk B, et al. (2010) A cell-type-specific protein-protein interaction modulates transcriptional activity of a master regulator in *Caulobacter crescentus*. *Mol Cell* 39: 455–467.
73. Laub M, Chen S, Shapiro L, McAdams H (2002) Genes directly controlled by CtrA, a master regulator of the *Caulobacter crescentus* cell cycle. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 4632–4637.
74. Holtzendorff J, Hung D, Brende P, Reisenauer A, Viollier PH, et al. (2004) Oscillating global regulators control the genetic circuit driving a bacterial cell cycle. *Science* (80- ) 304: 983–987.
75. Winzeler E, Shapiro L (1996) A novel promoter motif for *Caulobacter crescentus* cell cycle-controlled DNA replication genes. *J Mol Biol* 264: 412–425.
76. Reisenauer A, Kahng L, McCollum S, Shapiro L (1999) Bacterial DNA methylation: a cell cycle regulator? *J Bacteriol* 181: 5135–5139.
77. Matroule J-Y, Lam H, Burnette DT, Jacobs-Wagner C (2004) Cytokinesis monitoring during development; rapid pole-to-pole shuttling of a signaling protein by localized kinase and phosphatase in *Caulobacter crescentus*. *Cell* 118: 579–590.
78. Tsokos CG, Perchuk BS, Laub MT (2011) A dynamic complex of signaling proteins uses polar localization to regulate cell fate asymmetry in *Caulobacter crescentus*. *Dev Cell* 20: 329–341.
79. Chen YE, Tsokos CG, Biondi EG, Perchuk BS, Laub MT (2009) Dynamics of two Phosphorelays controlling cell cycle progression in *Caulobacter crescentus*. *J Bacteriol* 191: 7417–7429.
80. Iniesta A a, McGrath PT, Reisenauer A, McAdams HH, Shapiro L (2006) A phospho-signaling pathway controls the localization and activity of a protease complex critical for bacterial cell cycle progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 10935–10940.
81. Jenal U, Fuchs T (1998) An essential protease involved in bacterial cell-cycle control. *EMBO J* 17: 5658–5669.
82. Chien P, Perchuk B, Laub M, Sauer R, Baker T (2007) Direct and adaptor-mediated substrate recognition by an essential AAA+ protease. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 6590–6595.
83. Domian I, Quon K, Shapiro L (1997) Cell type-specific phosphorylation and proteolysis of a transcriptional regulator controls the G1-to-S transition in a bacterial cell cycle. *Cell* 90: 415–424.
84. Tsokos C, Laub M (2011) Polarity and cell fate asymmetry in *Caulobacter crescentus*. *Curr Opp Microbiol* 15: 744–750.
85. Holtzendorff J, Reinhardt J, Viollier PH (2006) Cell cycle control by oscillating regulatory proteins in *Caulobacter crescentus*. *Bioessays* 28: 355–361.



86. Hottes AK, Shapiro L, McAdams HH (2005) DnaA coordinates replication initiation and cell cycle transcription in *Caulobacter crescentus*. *Mol Microbiol* 58: 1340–1353.
87. Kelly A, Sackett M, Din N, Quardokus E, Brun Y (n.d.) Cell cycle-dependent transcriptional and proteolytic regulation of FtsZ in *Caulobacter crescentus*. *Genes Dev* 12: 880–893.
88. Blinov M, Moraru I (2012) Logic modeling and the ridiculome under the rug. *BMC Biol* 10: 1–8.
89. Viollier PH, Sternheim N, Shapiro L (2002) A dynamically localized histidine kinase controls the asymmetric distribution of polar pili proteins. *EMBO J* 21: 4420–4428.
90. Wheeler RT, Shapiro L (1999) Differential localization of two histidine kinases controlling bacterial cell differentiation. *Mol Cell* 4: 683–694.
91. Fujita M, González-Pastor JE, Losick R (2005) High- and low-threshold genes in the Spo0A regulon of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 187: 1357–1368
92. Berka RM, Hahn J, Albano M, Draskovic I, Persuch M, et al. (2002) Microarray analysis of the *Bacillus subtilis* K-state: genome-wide expression changes dependent on ComK. *Mol Microbiol* 43: 1331–1345.
93. Shimane K, Ogura M (2004) Mutational analysis of the helix-turn-helix region of *Bacillus subtilis* response regulator DegU, and identification of cis-acting sequences for DegU in the *aprE* and *comK* promoters. *J Biochem* 136: 387–397.
94. Hamoen LW, Kausche D, Marahiel MA, van Sinderen D, Venema G, et al. (2003) The *Bacillus subtilis* transition state regulator AbrB binds to the -35 promoter region of *comK*. *FEMS Microbiol Lett* 218: 299–304.
95. Perego M, Spiegelman GB, Hoch JA (1988) Structure of the gene for the transition state regulator, *abrB*: regulator synthesis is controlled by the *spo0A* sporulation gene in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 2: 689–699.
96. Yasuruma A, Abe S, Tanaka T (2008) Involvement of nitrogen regulation in *Bacillus subtilis degU* expression. *J Bacteriol* 190: 5162–5171.
97. Van Sinderen D, ten Berge A, Hayema BJ, Hamoen LW, Venema G (1994) Molecular cloning and sequence of *comK*, a gene required for genetic competence in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 11: 695–703.
98. Weir J, Predich M, Dubnau D, Nair G, Smith I (1991) Regulation of *spo0H*, a gene coding for the *Bacillus subtilis* Sigma H factor. *J Bacteriol* 173: 521–529.
99. Eymann C, Mittenhuber G, Hecker M (2001) The stringent response, *sigma H*-dependent gene expression and sporulation in *Bacillus subtilis*. *Mol Gen Genet* 264: 913–923.
100. Shafikhani SH, Mandic-Mulec I, Strauch M, Smith I, Leighton T (2002) Postexponential regulation of *sin* operon expression in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 184: 564–571.
101. Ogura M, Ohshiro Y, Hirao S, Tanaka T (1997) A new *Bacillus subtilis* gene, *med*, encodes a positive regulator of *comK*. *J Bacteriol* 179: 6244–6253.
102. Serror P, Sonenshein AL (1996) CodY is required for nutritional repression of *Bacillus subtilis* genetic

- competence. *J Bacteriol* 78: 5910–5915.
103. Chai Y, Kolter R, Losick R (2010) Reversal of an epigenetic switch governing cell chaining in *Bacillus subtilis* by protein instability. *Mol Microbiol* 78: 218–229.
  104. Kearns DB, Chu F, Branda SS, Kolter R, Losick R (2005) A master regulator for biofilm formation by *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 55: 739–749.
  105. Verhamme DT, Murray EJ, Stanley-Wall NR (2009) DegU and Spo0A Jointly Control Transcription of Two Loci Required for Complex Colony Development by *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 191: 100–108.
  106. Marlow VL, Cianfanelli FR, Porter M, Cairns LS, Dale KJ, et al. (2014) The prevalence and origin of exoprotease-producing cells in the *Bacillus subtilis* biofilm. *Microbiol* 160: 56–66.
  107. Newman JA, Rodriguez C, Lewis RJ (2013) Molecular basis of the activity of SinR protein, the master regulator of biofilm formation in *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* 288: 10766–10778.
  108. Lopez D, Kolter R (2010) Extracellular signals that define distinct and coexisting cell fates in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol Rev* 34: 134–149.
  109. Fujita M, Losick R (2005) Evidence that entry into sporulation in *Bacillus subtilis* is governed by a gradual increase in the level and activity of the master regulator Spo0A. *Genes Dev* 19: 2236–2244.
  110. McAdams H, Shapiro L (2011) The architecture and conservation pattern of whole-cell control circuitry. *J Mol Biol* 409: 28–35.
  111. Jeong JW, Snay J, Atai MM (1990) A mathematical model for examining growth and sporulation processes of *Bacillus subtilis*. *Biotechnol Bioeng* 35: 160–184.
  112. Jabbari S, Heap JT, King JR (2011) Mathematical modelling of the sporulation-initiation network in *Bacillus subtilis* revealing the dual role of the putative Quorum-sensing signal molecule PhrA. *Bull Math Biol* 73: 181–211.
  113. Narula J, Devi SN, Fujita M, Igoshin OA (2012) Ultrasensitivity of the *Bacillus subtilis* sporulation decision. *Proc Natl Acad Sci USA* 109: E3513–22.
  114. Davidson FA, Seon-Yi C, Stanley-Wall NR (2012) Selective heterogeneity in exoprotease production by *Bacillus subtilis*. *PLoS One* 7: e38574.
  115. Villarreal C, Padilla-Longoria P, Alvarez-Buylla E (2012) A general theory of genotype to phenotype mapping: derivation of epigenetic landscapes for N-node complex gene regulatory networks. *Phys Rev Lett* 109: 118102.
  116. Marlow VL, Porter M, Hobley L, Kiley TB, Swedlow JR, et al. (2013) Phosphorylated DegU manipulates cell fate differentiation in the *Bacillus subtilis* biofilm. *J Bacteriol* 196: 16–27.
  117. Balleza E, Alvarez-Buylla E, Chaos A, Kauffman S, Shmulevich I, et al. (2008) Critical dynamics in genetic regulatory networks: examples from four kingdoms. *PLoS One* 3: e2456.
  118. Aldana M, Balleza E, Kauffman S, Resendiz O (2007) Robustness and evolvability in genetic regulatory networks. *J Theo Biol* 245: 433–448.

119. Torres-Sosa C, Huang S, Aldana M (2012) Criticality is an emergent property of genetic networks that exhibit evolvability. *PLoS Comput Biol* 8: e1002669.
120. Wang X, Montero PL, Rudner DZ (2013) Organization and segregation of bacterial chromosomes. *Nat Rev Genet* 14: 191–203.
121. Brilli M, Fondi M, Fani R, Mengoni A, Ferri L, et al. (2010) The diversity and evolution of cell cycle regulation in alpha-proteobacteria: a comparative genomic analysis. *BMC Sys Biol* 4: 1–16.
122. Hallez R, Bellefontaine A-F, Letesson J-J, De Bolle X (2004) Morphological and functional asymmetry in alpha-proteobacteria. *Trends Microbiol* 12: 361–365.
123. Hoon MJL De, Eichenberger P (2010) Hierarchical Evolution of the Bacterial Sporulation Network. *Curr Biol* 20: R735–R745.
124. Deris JB, Kim M, Zhang Z, Okano H, Hermsen R, et al. (2013) The Innate Growth Bistability and Fitness Landscapes of Antibiotic-Resistant Bacteria. *Science* (80- ) 342.
125. Shapiro J (1998) Thinking about bacterial populations as multicellular organisms. *Annu Rev Microbiol* 52: 81–104.
126. Furusawa C, Kaneko K (2002) Origin of multicellular organisms as an inevitable consequence of dynamical systems. *Anat Rec* 268: 327–342.

# Apéndice

**Funciones lógicas para simulación de la dinámica en las  $G_2$  tanto para  $C. crescentus$  como en  $B. subtilis$**

**Para *Caulobacter Crescentus***

**Tabla 1.2** Función lógica para la evolución temporal del estado del nodo CtrA de la subred  $G_{2a}$  de  $C. crescentus$

$$CtrA_a^{t+1} = \left\{ \begin{array}{l} 1 \text{ if } (CtrA_a^t = 1) \text{ OR } (GcrA^t = 1) \text{ AND } (CcrM^t = 0) \text{ AND } (SciP^t = 0) \\ 0 \text{ if } (CtrA_a^t = 0) \text{ AND } (GcrA^t = 0) \text{ OR } (CcrM^t = 1) \text{ OR } (SciP^t = 1) \end{array} \right\}$$

**Tabla 2.2** Función lógica para la evolución temporal del estado del nodo GcrA de la subred  $G_{2a}$  de  $C. crescentus$

$$GcrA^{t+1} = \left\{ \begin{array}{l} 1 \text{ if } (DnaA^t = 1) \text{ AND } (CtrA_a^t = 0) \\ 0 \text{ if } (DnaA^t = 0) \text{ OR } (CtrA_a^t = 1) \end{array} \right\}$$

**Tabla 3.2.** Función lógica para la evolución temporal del estado del nodo DnaA de la subred  $G_{2a}$  de  $C. crescentus$

$$DnaA^{t+1} = \left\{ \begin{array}{l} 1 \text{ if } (CtrA_a^t = 1) \text{ AND } (CcrM^t = 1) \text{ AND } (GcrA^t = 0) \text{ AND } (DnaA^t = 0) \\ 0 \text{ if } (CtrA_a^t = 0) \text{ OR } (CcrM^t = 0) \text{ OR } (GcrA^t = 1) \text{ OR } (DnaA^t = 1) \end{array} \right\}$$

**Tabla 4.2.** Función lógica para la evolución temporal del estado del nodo CcrM de la subred  $G_{2a}$  de  $C. crescentus$

$$CcrM^{t+1} = \left\{ \begin{array}{l} 1 \text{ if } (CtrA_a^t = 1) \text{ AND } (CcrM^t = 0) \text{ AND } (SciP^t = 0) \\ 0 \text{ if } (CtrA_a^t = 0) \text{ OR } (CcrM^t = 1) \text{ OR } (SciP^t = 1) \end{array} \right\}$$

**Tabla 5.2.** Función lógica para la evolución temporal del estado del nodo SciP de la subred  $G_{2a}$  de  $C. crescentus$

$$SciP^{t+1} = \left\{ \begin{array}{l} 1 \text{ if } (CtrA_a^t = 1) \text{ AND } (DnaA^t = 0) \\ 0 \text{ if } (CtrA_a^t = 0) \text{ OR } (DnaA^t = 1) \end{array} \right\}$$

**Tabla 6.2.** Función lógica para la evolución temporal del estado del nodo CtrA de la subred  $G_{2b}$  de C.

*crescentus*

$$\text{CtrA}_b^{t+1} = \left\{ \begin{array}{l} 2 \text{ if } (\text{ChpT}^t = 2) \text{ AND } (\text{ClpXP} - \text{RcdA}^t = 0) \\ 1 \text{ if } (\text{ChpT}^t = 1) \text{ AND } (\text{ClpXP} - \text{RcdA}^t = 0) \\ 0 \text{ if } (\text{ChpT}^t = 2) \text{ OR } (\text{ChpT}^t = 1) \text{ AND } (\text{ClpXP} - \text{RcdA}^t = 1) \end{array} \right\}$$

**Tabla 7.2.** Función lógica para la evolución temporal del estado del nodo DivK de la subred  $G_{2b}$  de C.

*crescentus*

$$\text{DivK}^{t+1} = \left\{ \begin{array}{l} 2 \text{ if } (\text{DivJ}^t = 2) \text{ AND } (\text{PleC}^t = 1) \\ 1 \text{ if } (\text{DivJ}^t = 1) \text{ OR } (\text{PleC}^t = 2) \end{array} \right\}$$

**Tabla 8.2.** Función lógica para la evolución temporal del estado del nodo PleC de la subred  $G_{2b}$  de C.

*crescentus*

$$\text{PleC}^{t+1} = \left\{ \begin{array}{l} 2 \text{ if } (\text{DivK}^t = 1) \\ 1 \text{ if } (\text{DivK}^t = 2) \end{array} \right\}$$

**Tabla 9.2.** Función lógica para la evolución temporal del estado del nodo DivJ de la subred  $G_{2b}$  de C.

*crescentus*

$$\text{DivJ}^{t+1} = \left\{ \begin{array}{l} 2 \text{ if } (\text{DivK}^t = 2) \text{ AND } (\text{PleC}^t = 1) \\ 1 \text{ if } (\text{DivK}^t = 1) \text{ OR } (\text{PleC}^t = 2) \end{array} \right\}$$

**Tabla 10.2.** Función lógica para la evolución temporal del estado del nodo DivL de la subred  $G_{2b}$  de C.

*crescentus*

$$\text{DivL}^{t+1} = \left\{ \begin{array}{l} 1 \text{ if } (\text{DivK}^t = 1) \\ 0 \text{ if } (\text{DivK}^t = 2) \end{array} \right\}$$

**Tabla 11.2.** Función lógica para la evolución temporal del estado del nodo CckA de la subred  $G_{2b}$  de C.

*crescentus*

$$\text{CckA}^{t+1} = \left\{ \begin{array}{l} 2 \text{ if } (\text{DivL}^t = 1) \\ 1 \text{ if } (\text{DivL}^t = 0) \end{array} \right\}$$

**Tabla 12.2.** Función lógica para la evolución temporal del estado del nodo ChpT de la subred  $G_{2b}$  de C.

*crescentus*

$$\text{ChpT}^{t+1} = \left\{ \begin{array}{l} 2 \text{ if } (\text{CckA}^t = 2) \\ 1 \text{ if } (\text{CckA}^t = 1) \end{array} \right\}$$

**Tabla 13.2.** Función lógica para la evolución temporal del estado del nodo CpdR de la subred  $G_{2b}$  de *C.*

*crescentus*

$$CpdR^{t+1} = \left\{ \begin{array}{l} 2 \text{ if } (ChpT^t = 2) \\ 1 \text{ if } (ChpT^t = 1) \end{array} \right\}$$

**Tabla 14.2.** Función lógica para la evolución temporal del estado del nodo ClpXP-RcdA de la subred

$G_{2b}$  de *C. crescentus*

$$ClpXP-RcdA^{t+1} = \left\{ \begin{array}{l} 1 \text{ if } (CpdR^t = 1) \\ 0 \text{ if } (CpdR^t = 2) \end{array} \right\}$$

### Para *Bacillus subtilis*

**Tabla 15.2.** Función lógica para la evolución temporal del estado del nodo Spo0A de la subred  $G_2$  de *B.*

*subtilis*

$$Spo0A^{t+1} = \left\{ \begin{array}{l} 1 \text{ if } (Spo0A^t = 1) \text{ OR } (SigA^t = 1) \text{ OR } (SigH^t = 1) \text{ OR } (AbrB^t = 1) \\ \quad \text{AND NOT } (ComK^t = 1) \text{ AND NOT } (SinR^t = 1) \\ 0 \text{ if } (ComK^t = 1) \text{ OR } (SinR^t = 1) \end{array} \right\}$$

**Tabla 16.2.** Función lógica para la evolución temporal del estado del nodo ComK de la subred  $G_2$  de *B.*

*subtilis*

$$ComK^{t+1} = \left\{ \begin{array}{l} 1 \text{ if } (ComK^t = 1) \text{ OR } (SigA^t = 1) \text{ OR } (DegU^t = 1) \text{ OR } (Med^t = 1) \\ \quad \text{AND NOT } (Spo0A_a^t = 1) \text{ AND NOT } (AbrB^t = 1) \text{ AND NOT } (CodY^t = 1) \\ 0 \text{ if } (Spo0A_a^t = 1) \text{ OR } (AbrB^t = 1) \text{ OR } (CodY^t = 1) \end{array} \right\}$$

**Tabla 17.2.** Función lógica para la evolución temporal del estado del nodo DegU de la subred  $G_2$  de *B.*

*subtilis*

$$DegU^{t+1} = \left\{ \begin{array}{l} 1 \text{ if } (DegU_a^t = 1) \text{ OR } (SigA^t = 1) \\ 0 \text{ if } (DegU^t = 0) \text{ OR } (SigA^t = 0) \end{array} \right\}$$

**Tabla 18.2.** Función lógica para la evolución temporal del estado del nodo AbrB de la subred  $G_2$  de *B.*

*subtilis*

$$AbrB^{t+1} = \left\{ \begin{array}{l} 1 \text{ if } (SigA_a^t = 1) \text{ AND NOT } (AbrB^t = 1) \text{ AND NOT } (Spo0A^t = 1) \\ 0 \text{ if } (AbrB^t = 1) \text{ OR } (Spo0A^t = 1) \end{array} \right\}$$

**Tabla 19.2.** Función lógica para la evolución temporal del estado del nodo SigA de la subred  $G_2$  de  $B$ .

*subtilis*

$$\boxed{SigA^{t+1} = \begin{cases} 1 \text{ if } (SigA^t = 1) \text{ AND NOT } (Spo0A^t = 1) \\ 0 \text{ if } (Spo0A^t = 1) \end{cases}}$$

**Tabla 20.2.** Función lógica para la evolución temporal del estado del nodo SigH de la subred  $G_2$  de  $B$ .

*subtilis*

$$\boxed{SigH^{t+1} = \begin{cases} 1 \text{ if } (SigA^t = 1) \text{ AND NOT } (AbrB^t = 1) \\ 0 \text{ if } (AbrB^t = 1) \end{cases}}$$

**Tabla 21.2.** Función lógica para la evolución temporal del estado del nodo ScoC de la subred  $G_2$  de  $B$ .

*subtilis*

$$\boxed{ScoC^{t+1} = \begin{cases} 1 \text{ if } (SigA^t = 1) \text{ OR } (AbrB^t = 1) \\ 0 \text{ if } (SigA^t = 0) \text{ OR } (AbrB^t = 0) \end{cases}}$$

**Tabla 22.2.** Función lógica para la evolución temporal del estado del nodo CodY de la subred  $G_2$  de  $B$ .

*subtilis*

$$\boxed{CodY^{t+1} = \begin{cases} 1 \text{ if } (SigA^t = 1) \\ 0 \text{ if } (SigA^t = 0) \end{cases}}$$

**Tabla 23.2.** Función lógica para la evolución temporal del estado del nodo Med de la subred  $G_2$  de  $B$ .

*subtilis*

$$\boxed{Med^{t+1} = \begin{cases} 1 \text{ if } (SigA^t = 1) \text{ AND NOT } (Spo0A^t = 1) \\ 0 \text{ if } (Spo0A^t = 1) \end{cases}}$$

**Tabla 24.2.** Función lógica para la evolución temporal del estado del nodo SinI de la subred  $G_2$  de  $B$ .

*subtilis*

$$\boxed{SinI^{t+1} = \begin{cases} 1 \text{ if } (Spo0A^t = 1) \text{ OR } (SigA^t = 1) \text{ AND NOT } (AbrB^t = 1) \text{ AND NOT } (SinR^t = 1) \\ 0 \text{ if } (AbrB^t = 1) \text{ OR } (SinR^t = 1) \end{cases}}$$

**Tabla 25.2.** Función lógica para la evolución temporal del estado del nodo SinR de la subred  $G_2$  de  $B$ .

*subtilis*

$$\boxed{SinR^{t+1} = \begin{cases} 1 \text{ if } (Spo0A^t = 1) \text{ OR } (SigA^t = 1) \text{ AND NOT } (AbrB^t = 1) \\ \quad \text{AND NOT } (ScoC^t = 1) \text{ AND NOT } (SinI^t = 1) \\ 0 \text{ if } (AbrB^t = 1) \text{ OR } (ScoC^t = 1) \text{ OR } (SinI^t = 1) \end{cases}}$$