



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

UNIDAD MONTERREY

**Efecto del operón *tna* en el
comportamiento dinámico del operón
trp en *Escherichia coli***

Tesis que presenta:

Daniela Nevárez Torres

Para obtener el grado de:

**Maestra en Ciencias en Ingeniería y Física
Biomédicas**

Director de Tesis:

Dr. Moisés Santillán Zerón

Apodaca, Nuevo León

Agosto de 2018

A Celia, José, Josué y Darío.

Agradecimientos

Quiero agradecer al CONACYT por brindarme el apoyo económico y hacer posible mi formación como maestra en ciencias. Al CINVESTAV unidad Monterrey por todas las facilidades necesarias para llevar a completitud este proyecto. Gracias al personal administrativo y de mantenimiento de la Unidad Monterrey. Al laboratorio de Biología Cuantitativa por el apoyo, materiales e infraestructura brindados para el desarrollo de esta tesis. Al laboratorio Bio-Arts a cargo del Dr. José Luis García Cordero y en especial a Alan Mauricio González Suárez. Al Dr. Alexander de Luna de LANGEBIO, al laboratorio del Dr. Kevin Young y a la Dra. Susana De la Torre Zavala del Instituto de Biotecnología de la UANL.

En especial agradezco a mi asesor el Dr. Moisés Santillán Zerón por su invaluable consejo y guía durante todo este trayecto. Estoy profundamente agradecida y orgullosa de haber trabajado con él. Le agradezco infinitamente por inspirarme y sembrar en mí la semilla de la interdisciplinariedad. De igual forma, agradezco al Dr. Bruno Escalante por su ejemplo y alentadoras palabras y al Dr. Mauricio Carrillo por su oportuno consejo. También quisiera agradecer al Dr. Christian Scheckhuber y al Dr. J. Eduardo Soza Hernández.

Gracias a mi compañero y amigo David Israel Orozco por su inmensa paciencia e incondicional apoyo. Así mismo, agradezco a mis compañeros de laboratorio y a mis compañeros de generación Roberto, Óscar, Richie, Lalo, Eli, Alberto, Leo, Bere, Uba y Dani.

Finalmente, quisiera agradecer a mi familia porque todo logro que tengo es suyo.

Índice

Índice de figuras.....	i
Índice de tablas.....	i
Resumen.....	1
Abstract.....	2
1 Introducción.....	3
1.1 Conceptos generales.....	3
1.2 Operón triptófano o <i>trp</i>	4
1.2.1 Estructura y función.....	4
1.2.2 Regulación.....	5
1.2.2.1 Represión.....	5
1.2.2.2 Atenuación.....	5
1.2.2.3 Inhibición enzimática.....	6
1.3 Operón triptofanasa o <i>tna</i>	7
1.3.1 Estructura y función.....	7
1.3.2 Regulación.....	8
1.3.2.1 Represión catabólica.....	8
1.3.2.2 Terminación transcripcional dependiente de Rho.....	9
1.4 Relación entre <i>trp</i> y <i>tna</i>	10
2 Marco teórico.....	13
2.1 Estado estacionario.....	13
2.2 Cultivos de flujo continuo.....	13
3 Hipótesis y Objetivos.....	16
3.1 Hipótesis.....	16
3.2 Objetivo General.....	16

3.3	Objetivos Particulares	16
4	Metodología	17
4.1	Métodos.....	17
4.1.1	Cepas y condiciones de crecimiento.....	17
4.1.2	Fabricación de dispositivos de microfluídica	18
4.1.3	Montaje experimental	19
4.1.4	Adquisición de datos.....	21
4.1.4.1	Microscopía de contraste de fases	21
4.1.4.2	Procesamiento de imágenes.....	21
4.1.5	Análisis de datos	21
4.2	Diseño experimental.....	23
5	Resultados	27
5.1	Cepas	27
5.2	Selección de parámetros.....	28
5.2.1	Flujo de perfusión	28
5.2.2	Tiempo de experimentación	29
5.3	Experimentos en estado estacionario	30
6	Discusión.....	37
7	Conclusiones y Perspectivas	43
8	Anexos	44
9	Bibliografía	51

Índice de figuras

Figura 1 Crecimiento de cepas con delección del operón <i>trp</i>	11
Figura 2 Altas concentraciones de TnaA inducen mayor expresión de las enzimas de <i>trp</i>	12
Figura 3 Diagrama de bifurcación: Solución de la ecuación (1).....	14
Figura 4 Diagrama del dispositivo de microfluídica.....	19
Figura 5 Selección del flujo de perfusión.....	28
Figura 6 Selección del tiempo de experimentación - Crecimiento poblacional.....	29
Figura 7 Selección del tiempo de experimentación - Intensidad de fluorescencia.....	30
Figura 8 Histogramas de función de densidad de probabilidad de intensidad de fluorescencia.....	31
Figura 9 Análisis de medias y varianzas: diagrama de dispersión.....	32
Figura 10 Repetibilidad entre repeticiones de experimentos independientes.....	33
Figura 11 Distribuciones gamma de probabilidad de intensidad de fluorescencia.....	34
Figura 12 Intensidad de fluorescencia promedio en función de la concentración de triptófano.....	35
Figura 13 Comparación de valores de k	36
Figura 14 Efecto de la ausencia de <i>tnaA</i> sobre la expresión del operón <i>tna</i>	40
Figura 15 TnaB es necesaria para la producción óptima de indol.....	41

Índice de tablas

Tabla 1 Cepas de <i>E. coli</i> utilizadas en el presente trabajo.	17
---	----

Resumen

El presente trabajo es un estudio experimental del comportamiento dinámico del operón *trp* en respuesta a la expresión del operón *tna* en *Escherichia coli*. Ambos operones se encuentran relacionados con el metabolismo de triptófano: *trp* con su biosíntesis y *tna* con su degradación. Considerando que la expresión de *trp* es exclusivamente reprimida por triptófano, evaluamos el efecto de *tna* en función de su capacidad para modificar la concentración citoplasmática de este aminoácido. El operón *tna* expresa dos genes estructurales: TnaA que degrada el triptófano en indol, piruvato y amoníaco; y TnaB, una permeasa específica de triptófano que transporta el aminoácido hacia el citoplasma. En términos de la concentración intracelular, TnaA la disminuye por su acción degradativa; mientras que TnaB, la incrementa. La expresión de *tna* es inducida por triptófano; por lo que TnaA participa en un ciclo de regulación negativa sobre su propia expresión y TnaB en un ciclo de regulación positiva.

La expresión de *tna* es regulada por un segundo mecanismo conocido como represión catabólica. Por lo que su expresión se espera disminuida en medios de cultivo enriquecidos con glucosa. Para probar la interferencia entre ambos operones, se midió la expresión de *trp* en respuesta a distintas concentraciones de triptófano y en presencia de glucosa o piruvato de sodio. Este último es una fuente de carbono no inductora de represión catabólica. En total se utilizaron 4 cepas de *E. coli* sin deleciones (WT) o con deleciones en uno o ambos genes del operón *tna* ($\Delta tnaA$, $\Delta tnaB$ o $\Delta tnaAB$). La expresión de *trp* se dedujo al medir la intensidad de fluorescencia de GFPmut2 expresada por un plásmido regulado por el promotor y péptido líder de *trp*. Las mediciones se realizaron en cultivos de flujo continuo en los que la intensidad de fluorescencia puede suponerse proporcional a la actividad del operón *trp* genómico.

Los resultados obtenidos indican que ambos productos génicos de *tna* interfieren con la expresión de *trp*. Sin embargo, TnaB tiene mayor capacidad para aumentar la concentración citoplasmática, que TnaA para reducirla. Por lo que el efecto neto del operón *tna* es el de incrementar la concentración intracelular de triptófano y reprimir la expresión del operón *trp*. Con los resultados obtenidos también fue posible evidenciar la importancia de los ciclos de regulación anidados en la expresión de *tna* y cómo modificaciones en estos ciclos resultan en desbalances en la acumulación de triptófano con efectos en la expresión de *trp*.

Abstract

The present work is an experimental study of the *trp* operon dynamic behavior in response to *tna* operon expression in *Escherichia coli*. Both operons are related to L-tryptophan metabolism: *trp* gene products produce it from the *novo* whereas *tna* degrades it either for metabolic purposes or for signaling. Considering that *trp* expression is solely repressed in the presence of tryptophan, we evaluated the effect of *tna* via its capability to modify intracellular tryptophan concentration. *tna* operon expresses two structural genes: TnaA that degrades tryptophan into indole, pyruvate and ammonia; and TnaB, a specific tryptophan permease that transports the amino acid into the cytoplasm. *tna* expression is induced by tryptophan; consequently, TnaA participates in a negative feedback loop over its own expression and TnaB in a positive feedback loop.

The expression of *tna* is also regulated by a mechanism known as catabolite repression. By which *tna* expression is expected to be reduced in growth medium supplemented with glucose. To assess *tna* interference, *trp* operon expression level was measured in response to several tryptophan concentrations and in growth mediums supplemented with either glucose or sodium pyruvate. The latter is a non-catabolite repression carbon source. Four *E. coli* mutant strains containing (*WT*) or lacking *tna* structural genes ($\Delta tnaA$, $\Delta tnaB$ or $\Delta tnaAB$) were used. The expression of *trp* operon was deduced by measuring fluorescence intensity of GFPmut2 reporters expressed by a plasmid regulated by the promoter and leader peptide of *trp*. Bacteria were grown in continuous flow cultures and measurements were taken under steady state conditions in which fluorescence intensity can be assumed proportional to *trp* operon genomic expression.

The results obtained indicate that both *tna*'s gene products interfere with *trp* operon expression. However, TnaB has a greater capability to increase tryptophan concentration than TnaA to reduce it. Thus, the overall effect of *tna* operon activity is to increase the intracellular tryptophan concentration and to repress *trp* operon expression. The results also demonstrate the importance of the nested feedback loops in *tna* expression and how modifications in these feedback loops result in tryptophan accumulation imbalances with effects on *trp* operon dynamic behavior.

1 Introducción

1.1 Conceptos generales

Los seres vivos aseguran su preservación mediante la conservación y transferencia de información genética. Esta información se encuentra resguardada y disponible en los ácidos nucleicos: el ácido desoxirribonucleico (**ADN**) y el ácido ribonucleico (**ARN**). El ADN es el depositario físico de los **genes**, unidades hereditarias que codifican elementos funcionales en secuencias de nucleótidos; mientras que el ARN es el principal agente en la transmisión de información [1].

La transferencia de información génica depende de los procesos de **traducción** y **transcripción**. El primero involucra el traspaso de información de generación en generación; mientras que el segundo implica el paso de información desde el ADN a moléculas de ARN, específicamente de ARN mensajero (**ARNm**), para que unidades ribosomales la decodifiquen en secuencias específicas de aminoácidos. Ambos procesos requieren de una gran cantidad de maquinaria molecular para llevarse a cabo y se encuentran altamente regulados. En células procariontes, por ejemplo, únicamente el 3% de los genes están siendo transcritos en cualquier momento [1].

El proceso de transcripción comienza con el reconocimiento y unión de la ARN polimerasa (**ARNp**), enzima encargada de transcribir el código genético en una secuencia complementaria de ARNm, a una región específica en el ADN llamada **promotor**. La afinidad de la ARNp por un promotor, y con ello la tasa de transcripción, puede ser modificada por proteínas reguladoras llamadas **factores de transcripción**. Los cuales interactúan en regiones comúnmente adyacentes al promotor conocidas como **operadores**. La forma en que el operador y los factores de transcripción modulan la expresión es controlando el acceso de la ARNp al promotor. Si los factores de transcripción favorecen la expresión, se conocen como **inductores**; si la disminuyen o inhiben, se llaman **represores**.

En células procariontes es común que la expresión de genes se dé en respuesta a pequeñas moléculas que sirven de señal sobre las condiciones nutricionales o ambientales en las que se encuentra la célula. Por lo general, estas moléculas se encuentran relacionadas con el proceso metabólico que desempeñan los genes que controlan. Por ejemplo, sustratos capaces de activar la síntesis de las enzimas que los metabolizan se llaman **co-inductores**.

En cambio, metabolitos (que generalmente son los productos finales) que reprimen la expresión de las enzimas que catabolizan su biosíntesis se conocen como **co-represores**. Más aún, una misma molécula puede servir como co-inductor o co-represor dependiendo del sistema que regule. Tal es el caso del aminoácido triptófano, el cual modula la expresión de dos operones: *trp* y *tna*.

En bacterias es común encontrar genes funcionalmente relacionados entre sí agrupados en unidades genéticas conocidas como operones. Un **operón** es un conjunto de genes cuya expresión está regulada por el mismo promotor y operador, y que son transcritos en conjunto. Dependiendo de cómo responden a los factores de transcripción que los regulan, los operones pueden ser clasificados como **inducibles**, **reprimibles** o **ambos**. Los operones reprimibles son expresados sólo en ausencia de sus represores; los inducibles se expresan únicamente en presencia de sus inductores.

En este proyecto de tesis nos enfocamos en el estudio de dos operones en *Escherichia coli*: *trp* y *tna*. El primero es reprimible por triptófano; en tanto que el segundo es inducible por dicho aminoácido. Además, ambos operones se encuentran relacionados con el metabolismo del aminoácido triptófano: el operón *trp* con su síntesis y el operón *tna* con su degradación.

1.2 Operón triptófano o *trp*

1.2.1 Estructura y función

El triptófano es un aminoácido aromático esencial. Lo que implica que no puede ser sintetizado por los seres humanos, pero sí por otros organismos como plantas y bacterias. En *E. coli* la biosíntesis de triptófano depende de la expresión del operón *trp*. Este operón está compuesto por un promotor principal, un operador, un gen que codifica para un péptido líder (*trpL*) y cinco genes estructurales (*trpE*, *trpD*, *trpC*, *trpB* y *trpA*). Estos últimos, una vez expresados, conforman a las enzimas y complejos enzimáticos que catalizan la síntesis de L-triptófano *de novo*.

La ruta anabólica de triptófano se encuentra altamente conservada: todos los organismos capaces de producirlo lo sintetizan a partir del precursor aromático corismato; mediante las mismas reacciones específicas [2]. Además, este aminoácido es, bioquímicamente hablando, muy costoso de producir [3 – 5]. Lo antedicho se evidencia en que otros aminoácidos como glutamina y serina, y pentosas como PRPP sirven como precursores

para su formación. Esto en concordancia con que es el aminoácido menos abundante en todos los seres vivos [6] y que la mayoría de los organismos que se alimentan de otros organismos, han perdido la capacidad de sintetizarlo [3].

En consecuencia, no es de extrañarse que su ruta biosintética se encuentre estrictamente regulada. *E. coli* posee 3 distintos mecanismos de regulación por retroalimentación negativa: represión, atenuación e inhibición enzimática. Los primeros dos corresponden a mecanismos de regulación transcripcional, mientras que el último es un mecanismo postraduccional. Todos ellos dependientes de la concentración intracelular de triptófano.

1.2.2 Regulación

1.2.2.1 Represión

El mecanismo de represión regula el inicio de la transcripción en respuesta a la concentración intracelular de triptófano y es mediado por el péptido represor TrpR activado. El péptido TrpR es codificado por el operón *trpR* río abajo del operón *trp* y una vez expresado, se dimeriza. En presencia de triptófano, el homodímero se une a dos moléculas de triptófano, lo que provoca un cambio conformacional y genera la forma activa del complejo. En su forma activa TrpR se une al operador del operón *trp* e impide la unión de la RNAP al promotor. En consecuencia, la expresión de los 5 genes estructurales es inhibida. En cambio, cuando la concentración de triptófano es baja, los sitios de unión a triptófano en el dímero TrpR permanecen vacíos por lo que su afinidad por el operador es mucho menor. Además de regular la expresión de *trp*, el péptido TrpR activado regula su propia síntesis reprimiendo la expresión del gen que lo codifica hasta una tercera parte de su máximo nivel de expresión [3].

El mecanismo de represión regula la expresión de *trp* en un factor de 100 [7]. Además, este mecanismo de regulación es el más sensible a cambios en la concentración intracelular de triptófano [7].

1.2.2.2 Atenuación

La atenuación es un mecanismo de regulación que permite interrumpir prematuramente la transcripción. En células procariontes, los procesos de transcripción y traducción se encuentran acoplados, de modo que la traducción de los genes recién expresados regula la transcripción de los genes río abajo [1]. En el operón *trp* de *E. coli*, la atenuación está a cargo de la región líder *trpL* y depende directamente de la disponibilidad de ARN de

transferencia (ARNt) cargado con triptófano (ARNt^{Trp}); lo que a su vez depende de la concentración intracelular de triptófano.

La región líder *trpL* codifica para un péptido transcribible con 4 secuencias de pares de bases. Estas secuencias se enumeran del 1 al 4 y una vez transcritas pueden formar horquillas entre sí de la siguiente forma: 1:2, 3:4 y 2:3. Una importante característica de la secuencia 1 es la presencia de dos codones triptófano UGG en tándem.

Una vez transcritos los primeros dos segmentos, se forma la horquilla 1:2 y la transcripción se detiene. Hasta que unidades ribosomales se unen al ARNm recién sintetizado, la horquilla se deshace y la transcripción continúa simultáneamente con la traducción. Cuando el ribosoma llega a los codones de triptófano se detiene en espera de ARNt^{Trp}. Si la disponibilidad es suficiente, la traducción continúa sin retraso y el ribosoma avanza a la secuencia 2 favoreciendo la formación de la horquilla 3:4. Esta estructura es reconocida como señal de terminación, provocando que la ARNp se desestabilice y termine el proceso de transcripción antes de que los genes estructurales sean expresados.

En cambio, cuando la disponibilidad de ARNt^{Trp} es baja, el ribosoma se detiene en los codones UGG, impidiendo la formación de la horquilla de terminación y favoreciendo la horquilla 2:3. Esta estructura es conocida como de anti-terminación y permite que la transcripción transcurra hasta los genes estructurales.

La presencia de sólo dos codones UGG en el péptido líder convierte a este proceso de regulación relativamente insensible a deficiencias de triptófano. Sólo una extrema deficiencia de ARNt^{Trp} previene que el mecanismo de atenuación reprima la expresión [7]. Este proceso regula la transcripción de los genes estructurales en un factor de 4 a 8 [8].

1.2.2.3 Inhibición enzimática

Un tercer mecanismo que regula la tasa de producción de triptófano es el de inhibición enzimática. Este mecanismo es postraducciona y controla la entrada del precursor corismato a la ruta biosintética de L-triptófano.

La enzima antranilato sintasa (TrpE-D) es un complejo polipeptídico compuesto por dos pares de los productos génicos del primer y segundo gen de *trp*. En conjunto cataliza dos reacciones enzimáticas y aunque ambas son susceptibles a inhibición por triptófano, la conversión de corismato a antranilato es la más sensible [2]. Cuando el triptófano abunda en el medio, dos moléculas se unen a la enzima antranilato sintasa e inhiben su función

enzimática. Al inhibir la primera reacción, todo el proceso biosintético de triptófano se interrumpe.

1.3 Operón triptofanasa o *tna*

1.3.1 Estructura y función

E. coli utiliza la glucosa como fuente principal de energía. Sin embargo, cuando ésta escasea, *E. coli* tiene la capacidad de utilizar otros compuestos para satisfacer sus necesidades metabólicas. No obstante, el catabolismo de fuentes de energía no preferentes es, energéticamente hablando, muy costoso. Así, la bacteria debe asegurarse que el gasto energético implicado en la utilización del compuesto alternativo sea remunerable; esto en relación con la concentración del nuevo compuesto. El triptófano, además de cumplir con funciones estructurales y funcionales, puede ser degradado para fines metabólicos o de señalización. Esta reacción catabólica es exclusiva de bacterias [9] y en *E. coli* depende de la expresión del operón *tna*. Este operón está conformado por un promotor, un péptido líder (*tnaC*) y dos genes estructurales (*tnaA* y *tnaB*).

tnaA codifica para la enzima triptofanasa (TnaA), la cual cataliza la degradación de triptófano en amoníaco, piruvato e indol. El amoníaco es principalmente utilizado como fuente de nitrógeno, el piruvato como fuente de carbono y de energía, mientras que el indol juega un rol importante como molécula de señalización y en la comunicación intercelular [10]. Recién sintetizada, TnaA forma dímeros y se agrupa en gránulos cercanos a los polos de la bacteria [11]. Estos gránulos no presentan características de cuerpos de inclusión y se relacionan con la actividad enzimática de TnaA. En esta forma la enzima se encuentra inactiva hasta que, por un mecanismo aún desconocido, el gránulo se disocia, los dímeros se difunden en el citoplasma y se conforman en tetrámeros constituyendo la forma funcional de TnaA [12]. TnaA tiene preferencia por el triptófano, aunque también puede degradar otros aminoácidos como serina y cisteína [13]; igualmente en exceso de indol y piruvato, puede catalizar la reacción inversa y sintetizar triptófano. Aunque la reacción favorecida es la degradación [13]. Además, recientemente se describió que TnaA es susceptible a un mecanismo de regulación postraducciona dependiente de los carbohidratos disponibles en el medio de cultivo: la actividad enzimática, es decir, su capacidad para degradar triptófano y producir indol, se ve rápidamente inhibida en presencia de distintos carbohidratos, especialmente de glucosa [14].

tnaB codifica para una permeasa específica de triptófano TnaB. Esta permeasa es el transportador más eficiente de triptófano en ausencia de fuentes de carbono que inducen represión catabólica. *E. coli* posee otras dos permeasas capaces de transportar triptófano: Mtr y AroP. Mtr es un transportador específico de triptófano, mientras que AroP también transporta fenilalanina y tirosina, los otros dos aminoácidos aromáticos. Ambos transportadores son expresados por operones independientes y son susceptibles a mecanismos de regulación distintos a los de *tna*. La expresión del operón *mtr* es reprimida por el represor TrpR en presencia de triptófano e inducida por el producto del operón *tyrR* y fenilalanina. El operón *AroP* es reprimido por el producto génico de *tyrR* y su expresión se encuentra reducida en un factor de 3 en medios con caseína hidrolizada con ácido [15]. De todas las permeasas, en medios que contienen todos los aminoácidos, TnaB es la más importante para el transporte de triptófano. Siendo esencial para el crecimiento celular en medios con triptófano como única fuente de carbono [3].

La expresión de *tna* está controlada por dos mecanismos de regulación: represión catabólica y terminación transcripcional dependiente de Rho. El primer mecanismo establece una jerarquía en la utilización de fuentes de energía y asegura que el triptófano no sea preferentemente degradado; y el segundo evalúa si el suministro de triptófano es suficiente para ser utilizado como catabolito.

1.3.2 Regulación

1.3.2.1 Represión catabólica

La represión catabólica es un mecanismo de regulación global que coordina la expresión de ciertos genes con el estado nutricional y fisiológico de la célula [1]: mientras haya glucosa disponible en el medio, *E. coli* la catabolizará en preferencia a cualquier otra fuente de energía. Este mecanismo establece una jerarquía en la utilización de fuentes de carbono: asegura que los operones involucrados en el catabolismo de sustratos energéticos alternos, como es el caso del operón *tna* (pero también otros como *lac* y *gal*), se mantengan reprimidos hasta que la fuente preferente se haya consumido. El mecanismo de represión catabólica regula la transcripción de más de 180 genes en *E. coli* [16, 17].

En breve, en presencia de glucosa el sistema de fosfotransferasa (PTS) en la membrana celular transfiere un grupo fosfato a la glucosa durante su transporte al citoplasma. De este modo la enzima E-IIA^{GLC} (parte del complejo PTS) permanece desfosforilada, lo que a su vez inhibe a la enzima adenilato ciclasa. Esta enzima cataliza la conversión de ATP a

AMPc; en consecuencia, mientras se encuentre inhibida los niveles de AMPc serán bajos. A niveles insuficientes de AMPc, la proteína activadora por catabolitos (CAP) o también denominada proteína receptora de AMPc (CRP) permanece inactiva y separada del promotor. Esta proteína favorece la unión entre la enzima RNAP y el promotor del operón *tna*. En concreto, la glucosa (o alguna otra fuente de carbono inductora de represión catabólica), reprime la expresión de *tna*.

Como recordará el lector, la glucosa no sólo reprime la expresión génica de este operón, sino que además inhibe la actividad enzimática de TnaA [14]. No obstante, aún en presencia de represión catabólica y triptófano el operón *tna* es inducido y expresa niveles basales de TnaA funcional y de TnaB [3]. Una vez iniciada la transcripción, que llegue hasta los genes estructurales depende de un segundo mecanismo de regulación.

1.3.2.2 Terminación transcripcional dependiente de Rho

El péptido líder *tnaC* codifica una región de unión para el factor de terminación Rho. El cual es un complejo proteínico con actividad ATPasa que cataliza la separación de cadenas híbridas ADN:ARN [1]. Una vez que inicia la transcripción de *tnaC*, el ARNm recién transcrito se pliega formando una horquilla debido a la hibridación de sus pares de bases. Esto provoca que la ARNp se detenga hasta que un ribosoma se una al ARNm y comience la traducción. La pausa transcripcional asegura que los procesos de transcripción y traducción procedan al unísono [8, 18] y que los genes transcritos afecten la expresión de los genes río abajo.

En ausencia de triptófano, el ribosoma transcribe el péptido líder *tnaC* y se separa del ARNm. Esto permite que Rho se una al ARNm y avance en la dirección 5' -> 3' hasta alcanzar a la ARNp. Rho cataliza la separación entre la ARNp y el ADN finalizando prematuramente el proceso transcripción. En presencia de triptófano, el ribosoma se detiene durante la traducción de *tnaC* e impide la unión de Rho, lo que evita la interrupción de la expresión de los genes estructurales. Por lo que el efecto global del triptófano es inducir la expresión de *tna*.

El hecho de que el triptófano sea co-inductor de *tna*, y más aún, que los productos génicos de este operón tengan un efecto directo sobre la concentración intracelular de triptófano, permiten que la regulación de *tna* sea descrita como una red con dos ciclos de retroalimentación anidados: TnaA metaboliza el triptófano, lo que disminuye su concentración intracelular y reduce su propia expresión; mientras que TnaB aumenta la

concentración de triptófano transportándolo hacia el citoplasma, incrementando la inducción de *tna*. Por lo tanto, TnaA y TnaB participan en lazos de retroalimentación negativo y positivo, respectivamente.

1.4 Relación entre *trp* y *tna*

Como se vio en las secciones anteriores, la expresión de *trp* y *tna* es regulada por triptófano. Sin embargo, su función en cada operón es opuesta: en *trp* actúa como co-represor, mientras que en *tna* como co-inductor. Además, los productos génicos de ambos operones contribuyen a importantes cambios en la concentración intracelular de triptófano: TrpE-A incrementan la concentración catalizando su biosíntesis, TnaA disminuye la concentración debido a su acción degradativa y TnaB la aumenta transportando triptófano exógeno al citoplasma. De este análisis es posible que exista algún tipo de interacción en la actividad de ambos operones.

En condiciones normales TnaA no degrada suficiente triptófano endógeno como para afectar la viabilidad celular, aun cuando su expresión se ve aumentada en un factor de 2 o 3 [20] o cuando se expresa de forma constitutiva [9]. Esto se debe a que TnaA tiene una afinidad mucho menor por el triptófano en comparación con otras enzimas, por ejemplo, con los péptidos que regulan la expresión de *trp*: la K_m media de TnaA varía entre 0.30 y 0.60 mM [13, 19–22], mientras que la K_m del ARNt para el mismo sustrato es de 0.017 mM [23] y la constante de disociación del péptido represor TrpR es de 0.018 mM [24]. Como resultado, TnaA se encuentra en desventaja competitiva por el triptófano en presencia de estos péptidos. La degradación de triptófano por TnaA cobra importancia cuando TnaB importa suficiente sustrato desde el medio extracelular, pero cuando TnaA degrada la mayor cantidad, vuelve a competir deficientemente por el aminoácido intracelular disponible.

Sin embargo, aún en ausencia de triptófano exógeno, *E. coli* puede acumular indol en bajas concentraciones [25]. Lo anterior indica que TnaA puede degradar parte del triptófano biosintético y que esta acción degradativa debe ser compensada mediante un incremento en la producción de triptófano. Esto se evidencia en que en ausencia del operón *trp*, incluso en presencia de represión catabólica, la expresión de *tna* genera suficiente enzima TnaA para degradar el poco triptófano transportado por TnaB e inhibir el crecimiento celular (Figura 1). Lo antedicho, concuerda con que el indol producido por *E. coli* en ausencia de

triptófano exógeno, es incluso mayor a la concentración intracelular de este aminoácido [26].

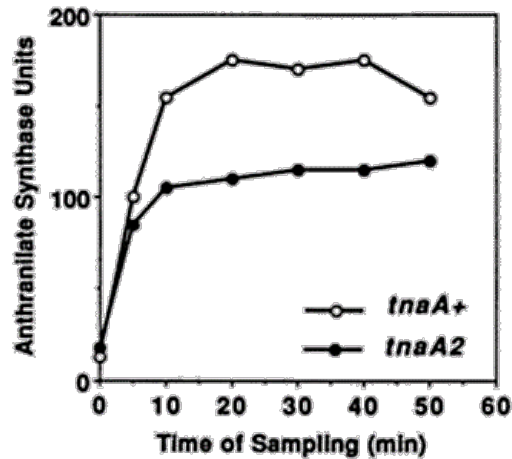
Figura 1 Crecimiento de cepas con delección del operón trp. Obtenida de [3].

Strain	Relevant genotype ^b	Growth on glucose-tryptophan ^c plus:		
		No other addition	Phe + Tyr ^d	CH ^e
CY15213		++	++	++
CY15214	<i>tnaA2</i>	++	++	++
CY15215	<i>tnaB</i>	++	++	++
CY15216	<i>mtr</i>	++	++	+
CY15217	<i>aroP</i>	++	++	++
CY15218	<i>mtr tnaB</i>	++	++	+
CY15219	<i>mtr aroP</i>	+	-	-
CY15220	<i>aroP tnaB</i>	++	++	++
CY15221	<i>mtr aroP tnaA2</i>	++	++	++
CY15222	<i>mtr aroP tnaB</i>	+	-	-

Se evaluó visualmente el crecimiento celular en cepas incapaces de expresar *trp* y con mutaciones en los distintos transportadores de triptófano. Se evaluaron en 3 distintos medios de cultivo enriquecidos con triptófano: medio con glucosa (c); medio con glucosa, fenilalanina y tirosina (d); y medio con glucosa y caseína hidrolizada con ácido (e). La cepa con mutaciones en AroP y Mtr (CY15219) no creció en (d) ni en (e), y creció poco en (c). Sin embargo, al eliminar *tnaA* (CY15221), el crecimiento se restableció en todos los medios. La inhabilidad de utilizar triptófano es debido a la acción degradativa de TnaA.

Si bien la acción catabólica de TnaA no afecta la viabilidad celular, bajo ciertas condiciones su actividad degradativa es suficiente para inducir un incremento en la expresión de las enzimas de *trp* [3]. Después de cultivar células *E. coli* en condiciones que promueven la expresión de *tna*, y cambiarlas a un medio sin triptófano externo, los niveles de TnaA producidos pueden degradar parte del triptófano endógeno y provocar una deficiencia parcial del aminoácido. A fin de mantener niveles óptimos de triptófano y promover el crecimiento celular, las bacterias incrementan la expresión de enzimas anabólicas de triptófano en respuesta al cambio nutricional (Figura 2). Este incremento puede atribuirse a la acción degradativa de la enzima TnaA.

Figura 2. Altas concentraciones de TnaA inducen mayor expresión de las enzimas de *trp*.
Obtenido de [3]



Se estudiaron cepas isogénicas de *E. coli* capaces de producir TnaA (*tnaA+*) e incapaces de producir (*tnaA2*). Después de crecer las células en presencia de triptófano y ausencia de represión catabólica, se cambiaron a un medio de cultivo sin triptófano. Se midieron los niveles de antranilato sintasa (*trpE-D*), un producto génico del operón *trp*, a distintos intervalos de tiempo. Se observó una mayor concentración de *trpE-D* en la cepa capaz de producir TnaA (*tnaA+*) en comparación con aquella que no (*tnaA2*). Esta diferencia puede ser atribuida a la actividad catabólica de TnaA.

A partir de los mecanismos que regulan la expresión de ambos operones podría pensarse que *trp* y *tna* operan en rangos de concentración de triptófano distintos y que la actividad de uno no interfiere con la actividad del otro: *trp* se expresa a bajas concentraciones de triptófano, mientras que *tna* se expresa cuando éste abunda en el medio. Sin embargo, de lo dicho anteriormente, es posible concluir que algún tipo de interacción existe entre ambos operones. No obstante, ninguno de los resultados hasta ahora presentados brinda información suficiente sobre la naturaleza de esta interacción. La desventaja de estos estudios es que no es posible relacionar la respuesta del sistema a las condiciones del medio en el tiempo en el que las muestras fueron tomadas. Y debido a que ambos operones son regulados por triptófano, es de vital importancia conocer la concentración de este aminoácido en el medio de cultivo en todo momento. Este tipo de estudios no es posible realizarlos en los cultivos convencionales tipo *batch*. En los que inicialmente se proporcionan todos los sustratos y a falta de renovación, las condiciones del medio de cultivo cambian a medida que los organismos crecen. De esto surge la necesidad de estudiar cultivos celulares en estado estacionario.

2 Marco teórico

2.1 Estado estacionario

Un estado estacionario es un punto en el que la respuesta del sistema no cambia con respecto al tiempo y es independiente de las condiciones iniciales. Es un término acuñado para describir el comportamiento dinámico de distintos fenómenos en términos matemáticos, pero cuyo uso se ha extendido a otras disciplinas incluyendo la biología. En esta área, el fenómeno estudiado corresponde a un sistema biológico que puede ser desde el crecimiento poblacional de un cultivo celular, una serie de reacciones enzimáticas o la síntesis de algún producto metabólico. En cualquier caso, las condiciones en las que se estudia el fenómeno de interés deben mantenerse invariables a lo largo del tiempo para evitar cambios en la respuesta del sistema.

El estudio de sistemas biológicos en estado estacionario ha resultado ser de gran utilidad. Principalmente debido a que, al controlar todas las condiciones de estudio, es posible relacionar la respuesta del sistema a parámetros específicos y conocidos. Históricamente, el *gold standard* para experimentalmente mantener cultivos celulares en estado estacionario es el uso de biorreactores. Un biorreactor es un dispositivo que permite tener un cultivo celular en flujo continuo.

2.2 Cultivos de flujo continuo

En su forma más simple, un cultivo de flujo continuo está compuesto por un recipiente en el que los microorganismos pueden crecer, una entrada y una salida. Su principal característica es que el medio de cultivo se renueva constantemente: al tiempo que se suministra medio de cultivo fresco, los productos metabólicos y el exceso de biomasa son removidos; ambos a un mismo flujo constante. Esto mantiene la concentración de sustratos y el volumen del cultivo invariables. En consecuencia, la respuesta de las células a las condiciones no cambia y se mantienen en la fase crecimiento exponencial durante largos periodos de tiempo con una tasa de crecimiento fija. Bajo estas condiciones es posible relacionar, por ejemplo, los efectos que algún nutriente en particular tiene en la fisiológica o bioquímica celular.

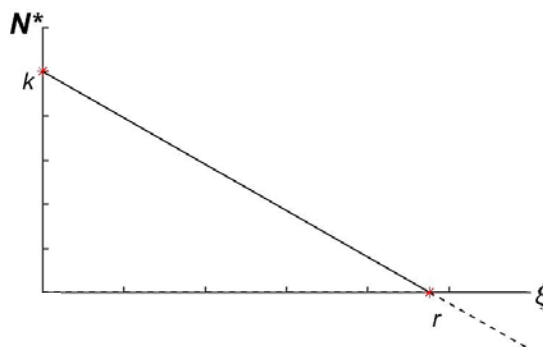
En una descripción muy simple, los organismos en el recipiente de cultivo crecen a una tasa descrita por el primer término del lado derecho de la siguiente ecuación y simultáneamente se lavan a una tasa determinada por el segundo término:

$$\frac{dN}{dt} = r \left(1 - \frac{N}{k} \right) - \xi N \quad (1)$$

donde dN/dt representa el cambio del tamaño poblacional con respecto al tiempo; el primer término del lado derecho describe la tasa de crecimiento según un modelo de crecimiento logístico, y está determinado por la tasa de crecimiento específico r ; el tamaño de la población N , y la capacidad de carga k ; en tanto que el segundo término contempla el flujo de salida ξ y el tamaño de la población.

Al resolver la ecuación (1) en estado estacionario y evaluar la estabilidad de sus puntos fijos se obtiene el siguiente diagrama de bifurcación (Figura 3) en el que N^* indica los valores de N en estado estacionario, las líneas sólidas representan las soluciones estables y las líneas punteadas, las inestables. Se puede apreciar que en los valores de $N^* > 0$, existe una relación lineal entre el tamaño de la población y el flujo de salida. En la Figura 3 las intersecciones con los ejes x y y indican la tasa de crecimiento y la capacidad de carga, respectivamente. Cuando el flujo es igual a cero, el tamaño de la población iguala la capacidad de carga (la concentración máxima de organismos que el medio puede soportar). De la ecuación (1), cuando esto sucede el término de crecimiento se vuelve cero; lo que corresponde a un estadio final de un cultivo tipo *batch*. Conforme el flujo va en aumento, el tamaño de la población disminuye hasta un segundo punto crítico: cuando el flujo es mayor a la tasa de crecimiento, el tamaño de la población es cero porque en este

*Figura 3 Diagrama de bifurcación
Solución de la ecuación (1)*



Solución en estado estacionario de la ecuación (1). Las líneas sólidas representan las soluciones para las que N^* es estable; las punteadas, para las que es inestable.

N^* : Valores para N en puntos fijos.

ξ : flujo

k : capacidad de carga

r : tasa de crecimiento

punto todos los microorganismos son lavados del recipiente. Por lo que un flujo óptimo se encuentra en un rango de valores entre k y r .

Los parámetros modificables por el investigador son el flujo de perfusión y el medio de cultivo. Esta técnica de estudio resulta atractiva para nuestro trabajo de investigación porque nos interesa estudiar un sistema de dos operones en relación con distintas concentraciones de triptófano. Por lo que es preciso conocer las concentraciones de los sustratos en todo momento y vincular la respuesta del sistema a las condiciones específicas del medio de cultivo.

3 Hipótesis y Objetivos

3.1 Hipótesis

La expresión y actividad del operón *tna* interfieren con el comportamiento dinámico del operón *trp* en *Escherichia Coli*.

3.2 Objetivo General

Demostrar el efecto que la expresión del operón *tna* tiene sobre la expresión del operón *trp* en *E. coli*.

3.3 Objetivos Particulares

3.3.1 Caracterizar la dinámica del operón *trp* en respuesta a distintas condiciones de cultivo en estado estacionario.

3.3.2 Demostrar la interferencia del operón *tna* con la dinámica del operón *trp*.

3.3.3 Estudiar cuál de los dos genes estructurales del operón *tna* es el principal responsable de la interferencia con la expresión del operón *trp*.

4 Metodología

4.1 Métodos

4.1.1 Cepas y condiciones de crecimiento

En la Tabla 1 se enlistan las cepas utilizadas para el presente trabajo. Todas ellas son derivadas de *E. coli* MG1655 K12.

Tabla 1 Cepas de *E. coli* utilizadas en el presente trabajo.

Cepa	Fenotipo relevante	Fuente [ref]
UAG12*	MG1655 pUA66[trp/trpL::GFPmut2 Kan]	Colección de Uri Alon [27]
GL607	MG1655 Δ tnaAB::frit	Laboratorio del Dr. Kevin Young [9]
GL504	MG1655 Δ tnaA::frit	Laboratorio del Dr. Kevin Young [12]
MAJ824	MG1655 Δ tnaB::frit	Laboratorio del Dr. Kevin Young
DN01*	GL607 pUA66[trp/trpL::GFPmut2 Kan]	Transformadas de GL607
DN02*	GL504 pUA66[trp/trpL::GFPmut2 Kan]	Transformadas de GL504
DN03*	MAJ824 pUA66[trp/trpL::GFPmut2 Kan]	Transformadas de MAJ824

*Cepas con las que se realizaron los experimentos en estado estacionario.

La cepa *E. coli* UAG12 pertenece a la colección de Uri Alon [27] y fue donada por el Dr. Alexander de Luna del Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO). De esta cepa, se extrajo el ADN plasmídico con el kit miniprep (QIAprep® Spin Miniprep Kit, Qiagen®) para posteriormente transformar por choque térmico las cepas GL607, GL504 y MAJ82; las cuales fueron obtenidas del laboratorio del Dr. Kevin Young del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Universidad de Arkansas para Ciencias Médicas (UAMS). Las cepas transformadas DN01, DN02 y DN03 fueron seleccionadas por antibiótico en placas de LB con agar adicionadas con 50 μ g/ml de kanamicina.

Se prepararon respaldos de las cepas en solución de glicerol al 15% y se mantuvieron en refrigeración a -80°C. Para los cultivos de trabajo, se sembraron muestras de los respaldos en placas de LB con agar y kanamicina (50 μ g ml⁻¹). Las placas se dejaron crecer toda la noche a 37°C y fueron conservadas a 4°C por un periodo no mayor a 30 días.

En todos los experimentos de flujo continuo se utilizó medio mínimo M9 suplementado según [12] con MgSO_4 (2 mM), CaCl_2 (0.1 mM), tiamina (33 mM), uracilo (20 mg ml^{-1}) y 1% de caseína hidrolizada con ácido (BD Bacto™ Casamino Acids, Technical). De aquí en adelante se referirá a este caldo de cultivo como medio M9 suplementado. La caseína hidrolizada con ácido fue donada por la Dra. Susana De la Torre Zavala del Instituto de Biotecnología de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL). Para los pre-inóculos y el montaje experimental, se usó como base medio M9 suplementado y enriquecido con o sin triptófano (0, 0.25, 0.5, 1 o 2 mM) y una fuente de carbono: glucosa (0.2%) o piruvato de sodio (30 mM). Todos los medios de cultivo y soluciones de reserva fueron esterilizados en autoclave o filtrados.

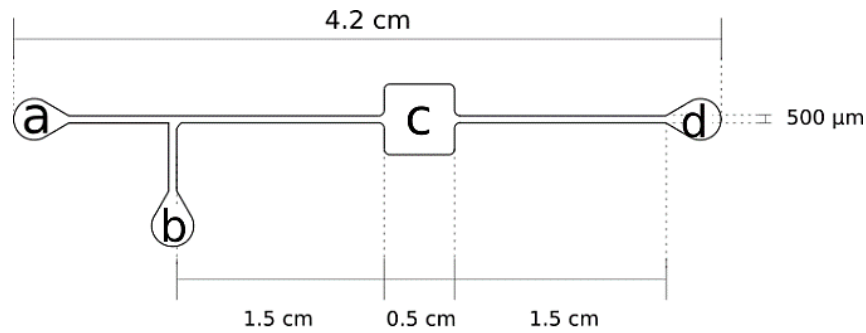
4.1.2 Fabricación de dispositivos de microfluídica

Las cepas antes mencionadas se estudiaron en estado estacionario mediante el uso de cultivos de flujo continuo. Para los experimentos se emplearon dispositivos de microfluídica diseñados como un termostato miniaturizado. El diseño del dispositivo (Figura 4) se realizó en AutoCAD (versión 2018, Autodesk Inc.) en escala 1:1. A partir de éste se fabricó un molde por fotolitografía en colaboración con el laboratorio del Dr. José Luis García Cordero del CINVESTAV. Brevemente, una oblea de silicio de 10 cm de diámetro (Desert Silicon Inc.) fue recubierta con fotorresina negativa SU-8 2075 (MicroChem Corp.) girándola a 3500 rpm en un spin coater (mod. SCS 6800, Specialty Coating Systems Inc.). La oblea se colocó en el equipo de fotolitografía Micro Pattern Generator (mod. μ PG 101, Heidelberg Instruments Mikrotechnik GmbH,), se cargó el diseño a la PC y se expuso con una energía de 70 mW al 100%. Después, el molde se reveló sumergiéndolo en PGMEA (Propylene glycol monomethyl ether acetate, Sigma-Aldrich Co.) por aproximadamente 10 minutos y se lavó con alcohol isopropílico. Para mejorar la adhesión de la resina, el molde se introdujo en un horno por dos horas a 135 °C. Por último, el molde se expuso por 30 minutos a una solución de clorotrimetil silano (Chlorotrimethylsilane, Sigma-Aldrich Co.) para evitar adhesión entre las estructuras del molde y el polidimetilsiloxano (PDMS). La altura del molde resultó en 50 μm .

Para la fabricación de los dispositivos se mezcló PDMS y catalizador (SYLGARD® 184 Silicohne Elastomer Kit) en una proporción 10:1. Después de desgasificar, la mezcla se vertió sobre el molde y dejó polimerizar durante 2 horas en un horno a 80°C. El molde se dejó enfriar a temperatura ambiente y los dispositivos se cortaron, extrajeron del molde y perforaron en las entradas y salida con un perforador de 1.5 mm Uni-Core®.

Posteriormente, se colocaron en un frasco de vidrio y lavaron en sonicación 2 veces con agua MiliQ durante 30 minutos, seguido de 15 minutos con isopropanol al 97% y, por último 15 minutos en agua MiliQ. Se secaron con nitrógeno gaseoso y dejaron en el desecador durante 48 horas.

Figura 4 Diagrama del dispositivo de microfluídica



a) entrada de medio de cultivo; *b)* entrada de bacterias; *c)* cámara de crecimiento, *d)* salida del dispositivo

Diseño elaborado por David Israel Orozco Gómez, del laboratorio de Biología Cuantitativa, CINVESTAV, Monterrey.

Se limpiaron portaobjetos con solución Micro-90 (Cole-Parmer®): 2 gotas por cada 250 ml de agua MiliQ, y en sonicación durante 30 minutos. Los dispositivos y portaobjetos secos se colocaron en el equipo Plasma cleaner (Zepto, Diener Electronic GmbH & Co.) y se trataron con plasma de oxígeno por 1.5 minutos. Inmediatamente después, las superficies expuestas se pusieron en contacto y los dispositivos se calentaron durante 2 horas a 80°C.

Una vez ensamblados, los dispositivos se perfundieron con isopropanol al 97%. Se secaron a 95°C y se trataron polivinilpirrolidona (PVP-40) al 0.04%. Se colocaron de nuevo en un horno a 95°C, y una vez secos, se envolvieron en aluminio, colocaron dentro de frascos de vidrio y esterilizaron en autoclave.

4.1.3 Montaje experimental

De las placas de LB sólido con agar se tomaron muestras de colonias individuales para inocular frascos de cultivo con 10 ml de medio M9 suplementado (4.2.1) y adicionado con glucosa (11 mM), L-triptófano (2 mM) y kanamicina (50 $\mu\text{g ml}^{-1}$). Los pre-inóculos se dejaron toda la noche a 37°C y en agitación a 200 rpm. Al día siguiente, las bacterias se recuperaron por centrifugación a 1 G por 10 minutos. Se lavaron y centrifugaron dos veces en PBS (Phosphate Buffer Saline, 10 mM) y tras descartar el sobrenadante, fueron

resuspendidas en 800 μ l de PBS. Esta suspensión se resguardó en jeringas de 1 ml para su posterior uso.

En total se utilizaron 10 medios de cultivo distintos para los experimentos de flujo continuo. Se prepararon con medio M9 suplementado (4.2.1) y se adicionaron con L-triptófano (0.0, 0.25, 0.5, 1.0 o 2.0 mM), glucosa (11 mM) o piruvato de sodio (30 mM) y tween 20 (Tween® 20, Sigma-Aldrich) para una concentración final al 0.02%. Se desgasificaron por un tiempo mínimo de 30 minutos en una cámara de vacío a 25 mmHg.

Para perfundir los medios de cultivo se conectaron mangueras (Tygon® Microbore Tubing, 0.020" x 0.060"OD) a las entradas *a* y *b*, y a la salida *d* de los dispositivos. Las mangueras de salida fueron previamente tratadas con PVP-40 al 0.04%. A los extremos distales de las mangueras de entrada se introdujeron puntas de aguja estériles de calibre 21G.

Los dispositivos se llenaron previamente con los medios correspondientes como se describe a continuación. El medio de cultivo se colocó en una jeringa de 3 ml; la aguja se introdujo a la manguera de salida y se perfundió medio a 150 μ l/min mediante una bomba de infusión de jeringas (kdScientific® KDS-210). Se esperó a que el medio saliera a través de la base de las agujas y se conectaron inyectoros (Injection male luer lock, World Precision Instruments). Los inyectoros se desgasificaron y cerraron herméticamente. Posteriormente, los dispositivos se inocularon con las bacterias: la correspondiente jeringa con la suspensión de bacterias se insertó al inyector de la entrada *b*. Se cerró la entrada *a* y los dispositivos se inocularon con 60 μ l a un flujo de 120 μ l/min. Se selló la manguera de entrada *b* y se resguardó el dispositivo.

Las jeringas de 3 ml con los medios de cultivo correspondientes se montaron sobre la bomba de infusión y se conectaron al inyector de la entrada *a*. Manteniendo la entrada *b* cerrada, se perfundió el medio de cultivo a un flujo de 0.225 μ l/min. Los dispositivos se colocaron sobre una placa térmica con control de temperatura a 37°C.

Después de un mínimo de 24 horas, se recolectaron 5 μ l de muestra desde la manguera de salida *d*. La muestra se colocó sobre un portaobjetos previamente tratado con agarosa al 1% para analizarse por microscopía de contraste de fases.

4.1.4 Adquisición de datos

4.1.4.1 Microscopía de contraste de fases

De cada muestra se tomaron un mínimo de 10 fotografías en campo claro y fluorescencia con una cámara HT-2000 (Emergent Vision Technologies, Inc.) montada sobre un microscopio de contraste de fases Olympus® BX51 y con un objetivo de inmersión 100× (Olympus® 1.3 UplanFNL pH3). Para las imágenes de fluorescencia se utilizó la fuente de fluorescencia Olympus® BH2-RFL-T3, los filtros U-MNIB2 (Olympus®, 470-490 nm excitación / 510 nm emisión) y la intensidad de luz se bajó por completo desde la perilla del microscopio.

4.1.4.2 Procesamiento de imágenes

El procesamiento de las imágenes obtenidas se realizó mediante un código escrito en MatLab R2017b® (The MathWorks, Inc.) en colaboración con el Dr. Juan Eduardo Sosa Hernández.

Primeramente, las imágenes de campo claro se emplearon como plantilla para identificar y localizar las bacterias. Para ello, dichas imágenes se binarizaron mediante una segmentación utilizando la función *imbinarize* y un umbral igual a la mitad de la intensidad máxima (IBW). Para detectar las bacterias se estableció un rango de área entre 350 y 1400 píxeles, con área promedio de 700 píxeles. El límite inferior permite incluir bacterias más pequeñas o recién divididas y excluye manchas y elementos ajenos a la muestra. El límite superior incluye bacterias en proceso de división y excluye conglomerados celulares.

Después, la imagen IBW se utilizó como máscara y multiplicó por la imagen de fluorescencia (IF). De modo que todas las bacterias detectadas quedaron ubicadas en la IF. Posteriormente se calculó la intensidad promedio del fondo de la IF y se substrajo a cada píxel asociado a una bacteria. Finalmente, para cada célula se calculó la intensidad de fluorescencia, que es el promedio de la intensidad de los píxeles que forman parte de una sola célula.

4.1.5 Análisis de datos

Función de Densidad de probabilidad. Para cada muestra se graficó la función de densidad de probabilidad vs. la intensidad de fluorescencia de todas las células. Las muestras obtenidas bajo las mismas condiciones de experimentación (repeticiones

independientes) se colocaron en el mismo gráfico (Figura 8). En total se obtuvieron 10 gráficos por cepa, en correspondencia con los 10 medios de cultivo utilizados. De los histogramas obtenidos se concluyó que la distribución gamma es adecuada para modelar el comportamiento de los datos. De esta distribución, se sabe está definida por los parámetros k y θ , de los que depende su forma y alcance por la derecha, respectivamente. Y que la media y la varianza se encuentran determinadas por ambos parámetros como a continuación:

$$\mu = k\theta \quad (2), \quad \text{y} \quad \sigma^2 = k\theta^2 \quad (3).$$

Análisis de medias y varianzas. Suponiendo que las distribuciones gamma esperadas se originan a partir de eventos de Poisson, se calculó la varianza de la intensidad de fluorescencia de cada muestra (σ_m^2) y se graficó en función de su media (μ_m) (Figura 9). El diagrama de dispersión se analizó por regresión lineal. De la función de correlación, y las ecuaciones (2) y (3), se obtuvo el valor de θ . De todo lo anterior, se concluyó que μ es suficiente como único parámetro para caracterizar las distribuciones gamma y compararlas entre sí.

Repetibilidad. Del conjunto de repeticiones independientes (mínimo 3 por condición experimental), se calculó el promedio de los valores de μ_m ($\mu_{m,m}$). Para cada cepa y condición experimental, se graficó este valor con su desviación estándar en función de la concentración de triptófano utilizada. De la Figura 10 y anexos, se determinó que la repetibilidad entre los experimentos independientes es apropiada. De esto y con la intención de aumentar el tamaño de la muestra y obtener una mejor estimación de μ , las repeticiones independientes de cada condición se agruparon en una sola muestra y se calculó la media de la intensidad de fluorescencia tomando en cuenta todos los datos. A partir de este valor, el valor θ del análisis de medias y varianzas y la ecuación (2), se calculó k y para cada condición experimental los datos se ajustaron a distribuciones gamma (Figura 11).

Ajuste exponencial. Con la media como parámetro característico de cada distribución, para cada condición experimental se graficó μ en función a la concentración de triptófano utilizada. En total se obtuvieron 4 gráficas: una para cada cepa con los datos obtenidos en glucosa diferenciados de los obtenidos con piruvato de sodio. Cada conjunto de datos se ajustó a una función exponencial con la forma:

$$f(x) = ae^{-\frac{x}{k}} + b \quad (4),$$

donde $f(x)$ son los valores de μ calculados para los experimentos en presencia de la misma fuente de carbono, x representa la concentración de triptófano utilizada en cada condición experimental: 0.0, 0.25, 0.5, 1 o 2 mM; b es un factor de escalamiento del eje y ; y a y k son los parámetros de ajuste. De la Figura 12, se aprecia que para todas las cepas el valor de μ para la concentración más alta de triptófano es diferente de 0, por lo que la función exponencial de ajuste se acerca asintóticamente al valor de b , el cual se calculó para cada cepa promediando los valores de μ a 2 mM de triptófano de ambas fuentes de carbono. De los parámetros de ajuste, el parámetro de interés es k .

Comparación de los valores k . Por último, se realizó un gráfico de barras de los valores de k calculados para cada cepa y fuente de carbono utilizada. Las barras de error corresponden a la desviación estándar del parámetro de ajuste k , calculada a partir de la varianza del ajuste (Figura 13).

4.2 Diseño experimental

El presente trabajo es un estudio experimental del comportamiento dinámico del operón *trp* en *E. coli*. Se evaluó la expresión de *trp* en respuesta a distintos medios de cultivo y en relación con la actividad de un segundo operón: *tna*. Ambos operones participan en el metabolismo del aminoácido L-triptófano: *trp* en su biosíntesis; *tna* en su degradación. Además, la expresión génica de ambos es regulada por triptófano: *trp* es inhibido en presencia del aminoácido, mientras que *tna* es inducido por altas concentraciones de triptófano. Sin embargo, *tna* es susceptible a un segundo mecanismo de regulación conocido como represión catabólica. Lo que implica que la expresión de *tna* se espera disminuida en medios de cultivo con glucosa en comparación con medios enriquecidos con fuentes de carbono no inductoras de represión catabólica. Por lo discutido anteriormente, para estudiar el efecto de *tna* sobre *trp*, se midió la expresión de *trp* en cepas de *E. coli* a distintas concentraciones de triptófano y en presencia de glucosa o piruvato de sodio (la segunda es una fuente de carbono no inductora de represión catabólica).

En total se estudiaron 4 cepas diferentes de *E. coli* con o sin deleciones de los genes del operón *tna* (Tabla 1). Todas las cepas contienen un plásmido de expresión de bajo número de copias (pUA66) que incluye un gen de resistencia a kanamicina y un gen reportero *gfpmut2*. La expresión de este último está regulada por el promotor y péptido líder *trpL* del operón *trp*. En consecuencia, la expresión y traducción de *trp* resulta en los productos génicos para la biosíntesis de triptófano y en la proteína reportera proveniente del plásmido.

De esta forma, cambios en la señal de fluorescencia pueden atribuirse a cambios en la actividad transcripcional del operón *trp*. La cepa UAG12 (*wild-type*) fue empleada para caracterizar el comportamiento dinámico de *trp*. DN01 ($\Delta tnaAB$) se utilizó para determinar el efecto de *tna* sobre la expresión de *trp*. Y las cepas DN02 ($\Delta tnaA$) y DN03 ($\Delta tnaB$) fueron utilizadas para determinar qué componente de *tna* es el principal responsable de la interferencia con *trp*.

Para cada cepa se midió la intensidad de fluorescencia en respuesta a 5 distintas concentraciones de triptófano (0.0, 0.25, 0.5, 1 y 2 mM) y en presencia de glucosa (0.2%) o piruvato de sodio (30 mM). Debido a que la regulación del operón *trp* es independiente de la fuente de carbono disponible, diferencias en la intensidad de fluorescencia entre medios de cultivo con glucosa y piruvato de sodio pueden atribuirse a un mecanismo susceptible a represión catabólica; en nuestro caso, el operón *tna*. Para los pre-inóculos y cultivos de trabajo se utilizó medio mínimo M9 (suplementado como se indica en la sección 4.1.1), una de las concentraciones de triptófano y una fuente de carbono. La concentración más alta de triptófano en este protocolo corresponde al doble de la máxima utilizada en los estudios realizados por [3, 9] sobre la expresión de *trp*.

En condiciones de estado estacionario es posible asumir que la expresión de *trp* es proporcional a la acumulación de la proteína GFPmut2. Como hemos discutido, un estado estacionario es aquel en el que la respuesta del sistema, en este caso la respuesta de las bacterias al medio de cultivo no cambia en función del tiempo. Experimentalmente, un estado estacionario se consigue mediante el uso de cultivos de flujo continuo. A diferencia de los cultivos tipo *batch*, los de flujo continuo están diseñados para mantener el cultivo bacteriano en la fase de crecimiento exponencial mediante la continua perfusión de medio fresco y la remoción de productos de desecho metabólico y exceso de biomasa. Una vez que el sistema alcanza el equilibrio, el volumen, el número de células y las condiciones del medio permanecen constantes. Bajo estas condiciones es posible relacionar la intensidad de fluorescencia con la expresión del operón *trp* en respuesta a las características del medio; específicamente, a la concentración de triptófano extracelular y a la fuente de carbono.

El uso de biorreactores es el *gold standard* para cultivos celulares de flujo continuo. Sin embargo, estos dispositivos son generalmente voluminosos y costosos, lo que los convierte en imprácticos para diseños experimentales en los que deben de probarse diversos medios de cultivo. En el laboratorio de Biología Cuantitativa del CINVESTAV se solucionó esta

problemática al diseñar, construir y validar un dispositivo de microfluídica ideado como un quimiostato miniaturizado. El dispositivo cuenta con dos entradas (*a* y *b*), una cámara central (*c*) y una salida (*d*) (Figura 4). El medio de cultivo fluye de la entrada *a* a la salida *d* a una velocidad tal que impide el nado de las bacterias en dirección contraria al flujo. Sin embargo, la velocidad del medio disminuye 10 veces una vez que entra en la cámara central, permitiendo el crecimiento celular. El exceso de biomasa y productos metabólicos son expulsados por la salida. El dispositivo se coloca sobre una placa térmica con control de temperatura a 37°C.

Los dispositivos se construyeron sobre un molde de silicio fabricado por fotolitografía. El material empleado fue PDMS. Entre las características deseables de este material destacan su permeabilidad al oxígeno, transparencia, inocuidad y baja permeabilidad al agua [28]. Lo primero permite asumir que el suministro de oxígeno no es un factor limitante del crecimiento celular. Además, las superficies en contacto con el medio de cultivo fueron previamente tratadas y cubiertas con PVP-40, un polímero que previene la acumulación de proteínas en las superficies del dispositivo y la formación de biopelículas [29]. Estos dispositivos no son reutilizables.

Primeramente, se establecieron los parámetros de experimentación: ¿cuál flujo es el óptimo para permitir el crecimiento celular sin comprometer la viabilidad de las bacterias? y ¿cuánto tiempo es suficiente para que el sistema de estudio, es decir, el nivel de expresión de *trp*, alcance el estado estacionario? Para el primer parámetro, se realizaron experimentos de flujo continuo según la metodología en 4.1.3 con la cepa UAG12 a 3 flujos de perfusión distintos. Después de 24 horas, se vació la cámara del dispositivo, se recolectó la muestra y se midió la densidad óptica (OD_{600}). Los resultados se graficaron con respecto al flujo y ajustaron a una línea recta (Figura 5). Siguiendo el modelo descrito por la ecuación (1), se escogió un flujo que aproximadamente permitiese un tamaño de población igual a la mitad de la capacidad de carga (5.2.1).

El tiempo necesario para que el cultivo alcance el estado estacionario se estableció tras realizar experimentos según el protocolo en 4.1.3 y monitorear a distintas instancias de tiempo el cambio en el tamaño poblacional y el cambio en la expresión de *trp*. Para el tamaño poblacional se midió la OD_{600} y para la expresión de *trp* se calculó la intensidad de fluorescencia promedio como en las secciones 4.1.4 y 4.1.5. Los resultados obtenidos se compararon con los de la muestra anterior para evaluar el cambio en función del tiempo. Se escogió un tiempo de experimentación tal que el crecimiento poblacional y la intensidad

de fluorescencia permanecen constantes. El tiempo de experimentación seleccionado asegura el estado estacionario en los experimentos realizados (5.2.2).

Para cada cepa y medio de cultivo se montaron 3 experimentos independientes de acuerdo con el protocolo descrito en 4.1.3. Después de 24 horas, se recolectaron muestras de la salida del dispositivo y se colocaron sobre un portaobjetos tratado con agarosa al 1%. Este tratamiento permite fijar a las bacterias manteniéndolas vivas para analizarlas por microscopía de contraste de fases y fluorescencia. De cada muestra se tomaron fotografías en campo claro y en fluorescencia.

De las imágenes obtenidas se calculó la intensidad de fluorescencia de cada célula (4.1.4.2). Posteriormente, para cada cepa y condición experimental se elaboraron histogramas de la función de densidad de probabilidad con ajuste a distribuciones gamma. A partir de un análisis de medias y varianzas, se determinó que la media (μ) puede ser utilizada como único parámetro para caracterizar las distribuciones de probabilidad. Después de estudiar la repetibilidad de los experimentos, se optó por tratar las repeticiones independientes de cada experimento como parte de una misma muestra, y obtener una mejor aproximación de μ . Las μ calculadas para cada cepa y fuente de carbono se graficaron en función de la concentración de triptófano utilizada y se ajustaron a una función exponencial con dos parámetros de ajuste, según la ecuación (4). El parámetro de interés es k , el cual representa la concentración de triptófano necesaria para disminuir la intensidad de fluorescencia en $\frac{1}{e}$ de su valor sin triptófano extracelular. A partir de este valor, es posible inferir el efecto de *tna* en la concentración intracelular de triptófano y el balance de los mecanismos involucrados en su transporte o metabolismo. Este dato se calculó y graficó para cada cepa y en comparación entre las dos fuentes de carbono (5.3).

5 Resultados

La expresión del operón *trp* es reprimida exclusivamente por triptófano intracelular. Esto permite inferir el efecto que distintos mecanismos tienen sobre su expresión, en función de su capacidad para modificar la concentración citoplasmática de triptófano. En este trabajo nos interesa particularmente la contribución de los productos génicos del operón *tna*. El operón *tna* expresa dos genes estructurales: TnaA que degrada el triptófano en indol, piruvato y amoníaco; y TnaB, una permeasa específica de triptófano que transporta el aminoácido hacia el citoplasma. En términos de la concentración intracelular de triptófano, TnaA disminuye la concentración por su acción degradativa; mientras que TnaB, la incrementa. La expresión de *tna* es inhibida por represión catabólica pero inducida por triptófano. De lo anterior, para probar la posible interferencia entre ambos operones, se midió la expresión de *trp* en respuesta a distintas concentraciones de triptófano y en presencia de glucosa o piruvato de sodio. Se utilizaron 4 cepas de *E. coli* sin deleciones (WT) o con deleciones en uno o ambos genes del operón *tna* ($\Delta tnaA$, $\Delta tnaB$ o $\Delta tnaAB$). La expresión de *trp* se dedujo al medir la intensidad de fluorescencia de GFPmut2 expresada por un plásmido regulado por el promotor y péptido líder de *trp*. Las mediciones se realizaron en cultivos de flujo continuo en los que la intensidad de fluorescencia puede suponerse proporcional a la actividad del operón *trp* genómico.

Esta sección se compone de 3 partes: la primera trata sobre las deleciones y transformaciones de las cepas utilizadas (5.1), la segunda valida los parámetros utilizados en el montaje experimental (5.2) y la tercera muestra los resultados obtenidos de los experimentos en estado estacionario (5.3).

5.1 Cepas

Las cepas GL607 [9], GL504 [12] y MAJ824 fueron donadas para este trabajo de investigación. Las deleciones fueron realizadas en el Laboratorio del Dr. Kevin Young.

De la cepa UAG12 [29] se extrajo el plásmido pUA66 como en 4.2.1 en una concentración final de 42 ng/ μ l. Las cepas GL607, GL504 y MAJ824 se prepararon competentes con cloruro de calcio y se transformaron por choque térmico. La selección se realizó en placas de agar con kanamicina (Kan, 50 μ g/ml). Las cepas resultantes se nombraron DN01 ($\Delta tnaAB$), DN02 ($\Delta tnaA$) y DN03 ($\Delta tnaB$), las cuales contienen deleciones de ambos genes, del primer gen y del segundo gen del operón *tna*, respectivamente.

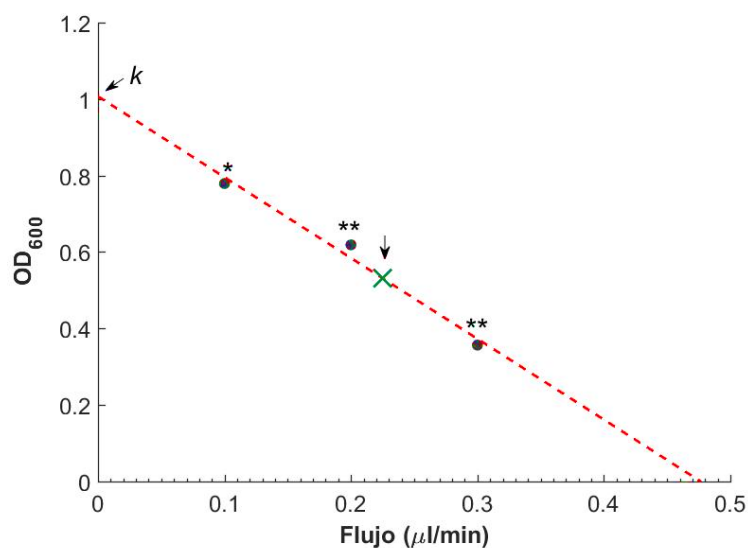
5.2 Selección de parámetros

5.2.1 Flujo de perfusión

Se realizaron cultivos en estado estacionario con la cepa *E. coli* UAG12 a 3 flujos de perfusión distintos: 0.1, 0.2 y 0.3 $\mu\text{l}/\text{min}$. Para cada flujo se realizaron 3 o 5 experimentos independientes. El montaje experimental se realizó como se describe en la sección 4.1.3. Después de 24 horas, las cámaras de crecimiento *c* de los dispositivos se vaciaron cambiando el flujo de perfusión a 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ y recolectando las muestras desde la salida *d* durante 1 minuto. Las muestras se pipetearon a una placa de micropozos (Corning® 384 well microplate, low volume) y se midió la OD_{600} en un espectrofotómetro (Thermo Scientific™ Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer).

Los resultados para cada flujo se promediaron; los promedios se graficaron en función del flujo de perfusión y se ajustaron a una línea recta con un coeficiente de determinación $R^2 \approx 0.981$ (Figura 5). A partir de los resultados, se eligió un flujo de 0.225 $\mu\text{l}/\text{min}$. Este flujo de perfusión permite un tamaño poblacional en la cámara de cultivo aproximadamente igual a la mitad de la capacidad de carga, de acuerdo con el modelo descrito en la sección 2.2.

Figura 5 Selección del flujo de perfusión



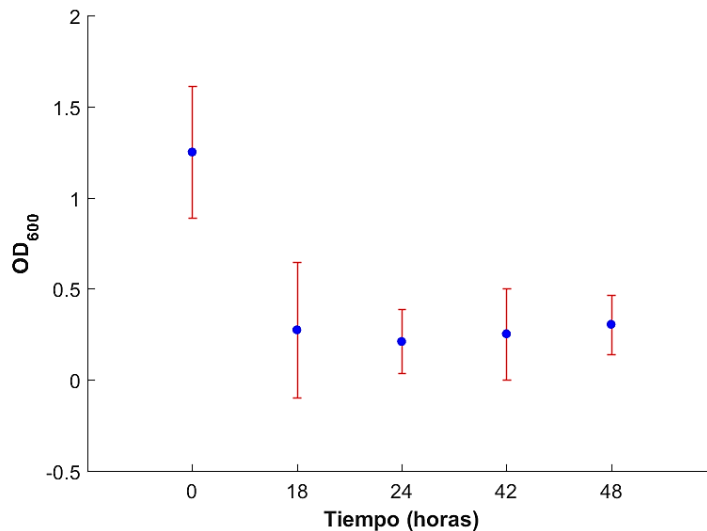
Relación entre el flujo de perfusión ($\mu\text{l}/\text{min}$) y el tamaño poblacional inferido por OD_{600} . La muestra con * indica el promedio de 3 experimentos independientes; las muestras con ** indican el promedio de 5 experimentos independientes. La línea roja punteada es la línea de regresión lineal ($R^2 = 0.9810$). La cruz en verde señala el flujo seleccionado para los experimentos en estado estacionario. La capacidad de carga (k) es cercana a 1.

El flujo de perfusión seleccionado impulsa el medio de cultivo a una velocidad de $150 \mu\text{m/s}$ en los canales de entrada y de salida del dispositivo. Esta velocidad es más de 7 veces mayor que la velocidad media de nado de las bacterias *E. coli* [31], lo que impide que éstas naden en dirección contraria al flujo y contaminen el medio contenido en las jeringas. Sin embargo, una vez que el medio de cultivo alcanza la cámara de crecimiento, la velocidad se reduce a $15 \mu\text{m/s}$, permitiendo el crecimiento celular sin fuentes de estrés mecánico.

5.2.2 Tiempo de experimentación

Para determinar en cuánto tiempo los cultivos alcanzan el estado estacionario se montaron 5 experimentos independientes como en 4.1.3, con la cepa UAG12 y medio M9 suplementado (4.1.1) y enriquecido con glucosa (0.2%) y triptófano (0.25 mM). Los experimentos se dejaron correr 48 horas continuas con un flujo de $0.225 \mu\text{l/min}$. Se tomaron muestras a distintos instantes de tiempo (0, 18, 24, 42 y 48 horas) y se evaluó el estado estacionario en función al cambio en el tamaño poblacional y con respecto al nivel de expresión de *trp*. Para cada instante de tiempo, se recolectaron $10 \mu\text{l}$ de la salida *d* del dispositivo, se pipetearon a una placa de micropozos y se midió la OD_{600} . Posteriormente, se recolectaron $5 \mu\text{l}$ para analizar las muestras bajo el microscopio y obtener la media de

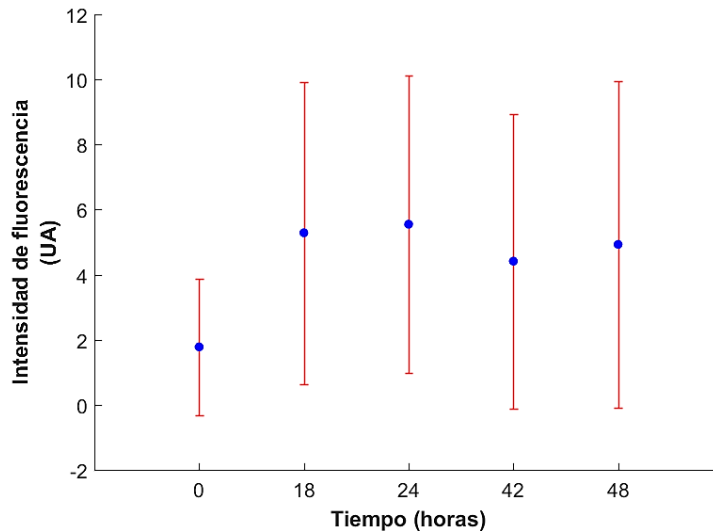
Figura 6 Selección del tiempo de experimentación
Tamaño poblacional



Se evaluó el tiempo necesario para alcanzar el estado estacionario en función del tamaño poblacional. Se montaron experimentos en estado estacionario para la cepa UAG12 en medio M9 suplementado como en 4.1.1 y adicionado con glucosa (0.2%) y triptófano (0.25 mM). Se midió la OD_{600} a distintos intervalos de tiempo (0, 18, 24, 42 y 48 horas). Cada punto indica el promedio de 5 experimentos independientes. Las barras de error muestran la desviación estándar.

la intensidad de fluorescencia como en 4.1.5. Los datos obtenidos se graficaron con respecto al tiempo en que la muestra fue obtenida (Figura 6 y Figura 7).

*Figura 7 Selección del tiempo de experimentación
Intensidad de fluorescencia*



Se evaluó el tiempo necesario en el que el sistema alcanza el estado estacionario en función de la intensidad de fluorescencia promedio. Se montaron experimentos en estado estacionario para la cepa UAG12 en medio M9 suplementado como en 4.1.1 y adicionado con glucosa (0.2%) y triptófano (0.25 mM). Se obtuvieron muestras a distintos intervalos de tiempo (0, 18, 24, 42 y 48 horas) y se calculó la intensidad de fluorescencia como en 4.1.5. Cada punto indica el promedio de 5 experimentos independientes. Las barras de error muestran la desviación estándar.

En las Figura 6 y Figura 7 se aprecia que el cambio en el tamaño poblacional y el cambio en la intensidad de fluorescencia, respectivamente, no son significativos a partir de las 18 horas. Lo antedicho evidencia la capacidad del sistema para alcanzar y mantener el estado estacionario una vez transcurrido suficiente tiempo. El tiempo de experimentación seleccionado fue de 24 horas.

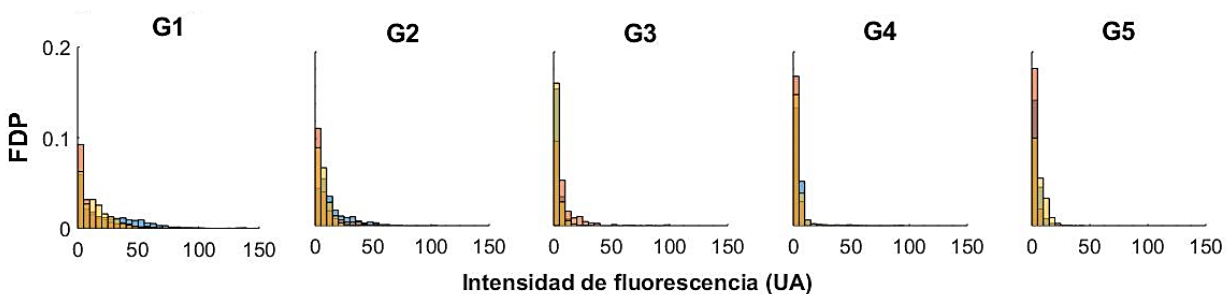
5.3 Experimentos en estado estacionario

Los experimentos en estado estacionario se realizaron para las 4 cepas (Tabla 1) y los 10 medios de cultivo siguiendo la metodología descrita en 4.1.3. Para cada muestra se obtuvo la intensidad de fluorescencia como en 4.1.4. y a partir de estos datos, para cada cepa y en función de la fuente de carbono utilizada, se calculó la concentración de triptófano extracelular necesaria para disminuir la intensidad de fluorescencia a la mitad de la

intensidad sin triptófano exógeno. Este dato se obtuvo mediante el proceso descrito en la sección 4.1.5, cuyos resultados se muestran a continuación.

Primeramente, para cada muestra se graficó la función de densidad de probabilidad vs. la intensidad de fluorescencia de todas las células. Los experimentos realizados bajo las mismas condiciones, es decir, las repeticiones independientes se colocaron en el mismo gráfico con distinto color. En total se obtuvieron 10 gráficos por cepa. Por fines prácticos, a continuación, se muestra el análisis de una cepa y una fuente de carbono. Los demás histogramas pueden revisarse en la sección de anexos (Anexo 2).

Figura 8 Histogramas de la función de densidad de probabilidad de intensidad de fluorescencia



Se graficó la función de densidad de probabilidad (FDP) vs. la intensidad de fluorescencia para cada experimento independiente. Se muestran los histogramas de la cepa DN01 ($\Delta tnaAB$) en glucosa (0.2%) y para las 5 concentraciones de triptófano extracelular (G1: 0 mM; G2: 0.25 mM; G3: 0.5 mM; G4: 1 mM y G5: 2 mM). Cada color representa un experimento independiente. UA: Unidades Arbitrarias.

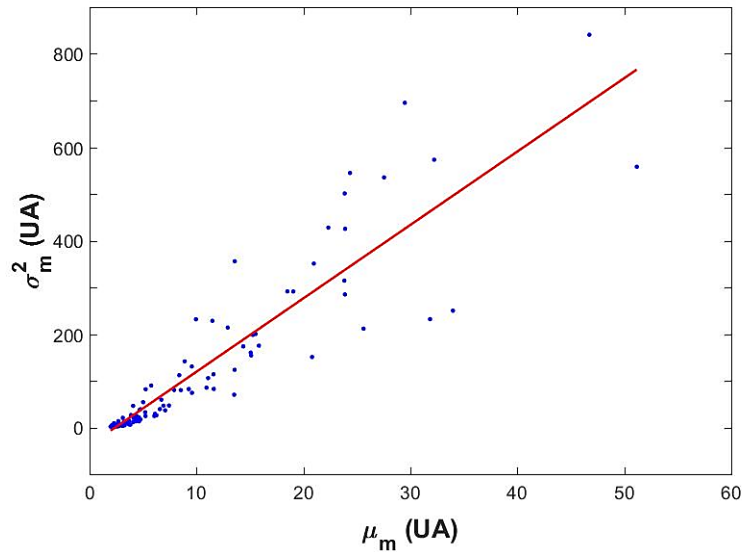
En la Figura 8 se muestran las distribuciones de probabilidad de intensidad de fluorescencia para la cepa DN01 con glucosa (0.2%) y las 5 concentraciones de triptófano. De ella, se observa que el comportamiento de las distribuciones entre experimentos independientes es similar; además, en conjunto, la respuesta es la esperada: conforme la concentración de triptófano aumenta, la dispersión de probabilidad disminuye, al tiempo que la máxima probabilidad crece y se concentra en los valores de intensidad de fluorescencia cercanos a 0. Esto en concordancia al esperado comportamiento del operón *trp*: a medida que la concentración de triptófano extracelular aumenta, la expresión del operón *trp*, y por ende la intensidad de fluorescencia, disminuyen.

De los histogramas se aprecia que los datos son continuos, positivos y con asimetría positiva; esto supone que la distribución gamma es adecuada para modelar el comportamiento de los datos. La distribución gamma se relaciona con la distribución de

Poisson en que la primera define el tiempo necesario en que sucedan determinado número de eventos por procesos de Poisson. En el modelo de nacimiento y muerte más simple, las distribuciones de probabilidad para el número de individuos son de Poisson y en ellas, $\mu = \sigma^2$. Si las distribuciones gamma que esperamos se originan de un modelo de nacimiento y muerte, es probable que $\mu \propto \sigma^2$. Así, para cada muestra se calculó y graficó la media de la intensidad de fluorescencia (μ_m) en función de su varianza (σ_m^2) (Figura 9). En total se graficaron 121 puntos. Los datos se analizaron por regresión lineal, de lo que se observa existe una correlación entre ambas variables con un coeficiente de determinación de $R^2 \approx 0.833$. De este análisis, resulta que:

$$\sigma^2 \approx 15.71 \mu \quad (5).$$

Figura 9 Análisis de medias y varianzas: diagrama de dispersión



Para cada muestra se calculó la media de la intensidad de fluorescencia (μ_m) y se graficó con respecto a su varianza (σ_m^2). Los datos se analizaron por regresión lineal. La recta de regresión está dada por: $\sigma_m^2 = 15.71\mu_m - 37.3695$ (línea roja). El coeficiente de correlación es $R^2 = 0.8338$.

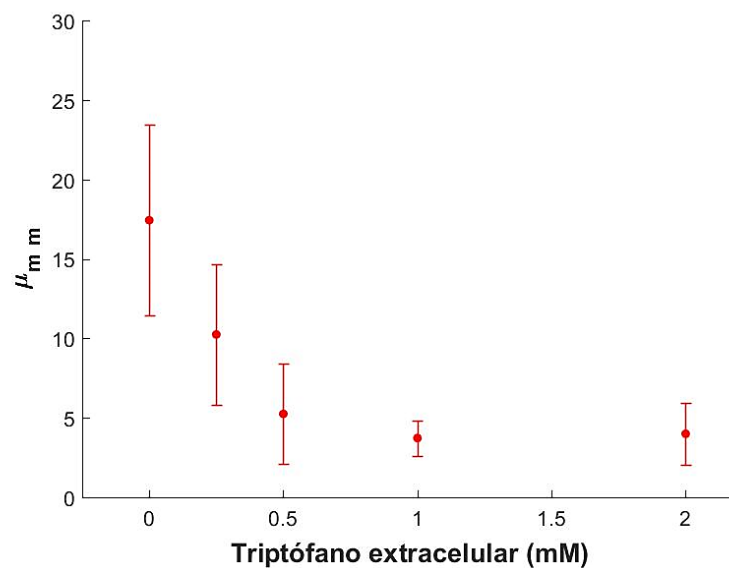
De esto, y tomando en cuenta las ecuaciones (2) y (3), se obtiene que:

$$\theta \approx 15.71 \quad (6).$$

De lo anterior y considerando la relación entre μ y θ en las distribuciones gamma (2), se concluyó que un sólo parámetro es suficiente para representar cada una de las distribuciones de probabilidad. Este parámetro puede ser μ o k . Por practicidad, se optó por utilizar μ .

Con el objetivo de incrementar el tamaño de la muestra y obtener una mejor estimación de la media de la intensidad de fluorescencia, se evaluó la repetibilidad entre los experimentos independientes. Para ello, se obtuvo el promedio de las μ_m de las repeticiones independientes ($\mu_{m,m}$). Estos valores se graficaron con su desviación estándar en función de la concentración de triptófano utilizada. Se obtuvo un gráfico por cepa. Los datos obtenidos con cada fuente de carbono se encuentran diferenciados. En la Figura 10 se muestran los resultados para la cepa DN01 con glucosa. Las gráficas para las demás cepas están disponibles en la sección de anexos (Anexo 3).

Figura 10 Repetibilidad entre repeticiones de experimentos independientes

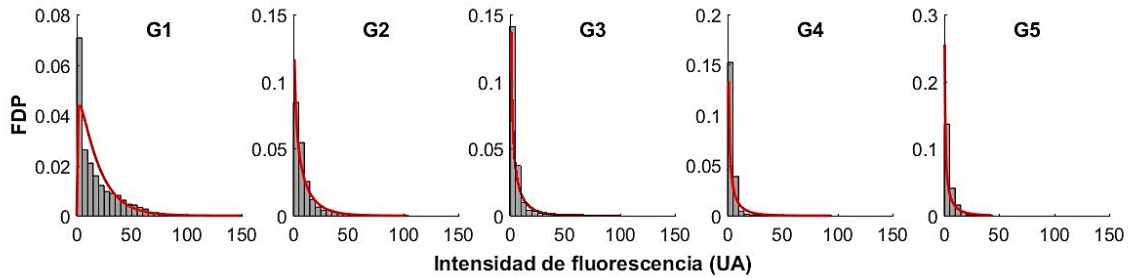


Se graficó el promedio ($\mu_{m,m}$) del promedio de las intensidades de fluorescencia (μ_m) de las repeticiones independientes en función de la concentración de triptófano. Las barras de error representan la desviación estándar. En este gráfico se muestran los datos de la cepa DN01 ($\Delta TnaAB$), con glucosa (0.2%) y las 5 concentraciones de triptófano (0, 0.25, 0.5, 1 y 2 mM).

En la Figura 10 y anexos, se observa que la desviación estándar de $\mu_{m,m}$ disminuye conforme la concentración de triptófano aumenta y la intensidad de fluorescencia se reduce. Únicamente el primer punto, que corresponde a una concentración extracelular de triptófano igual a 0 y a las condiciones con mayor intensidad de fluorescencia, se observa mucha más variabilidad en comparación con los otros 4 puntos. Por lo que en general, los experimentos realizados tienen buena repetibilidad. Por ello, se optó por juntar los datos de las repeticiones independientes en una sola muestra, a expensas del primer punto, y calcular la media de la intensidad de fluorescencia (μ) para cada condición de experimento.

A partir de esto, la distribución de probabilidad para cada condición experimental se ajustó a una distribución gamma con el parámetro θ obtenido de (6) y calculando k a partir de la ecuación (2). A modo de ejemplo, en la Figura 11 se muestran los datos para la cepa DN01 con glucosa. Los demás gráficos pueden consultarse en la sección de anexos (Anexo 5).

Figura 11 Distribuciones gamma de probabilidad de intensidad de fluorescencia



Se muestran las distribuciones de intensidad de fluorescencia para la cepa DN01 con glucosa (0.2%) y las 5 concentraciones de triptófano (G1: 0 mM; G1: 0.25mM; G3: 0.4 mM; G4: 1 mM y G5: 2 mM). En rojo, el ajuste a la distribución gamma con los parámetros θ y k calculados como en 4.1.5.

Posteriormente, la μ calculada para cada condición se graficó en función de la concentración de triptófano utilizada. Se realizó un gráfico por cada cepa (Figura 12) con los datos realizados en presencia de glucosa diferenciados de los realizados en piruvato de sodio. Los datos para cada fuente de carbono se ajustaron a una función exponencial con la forma de (4), en la que los parámetros de ajuste son a y k .

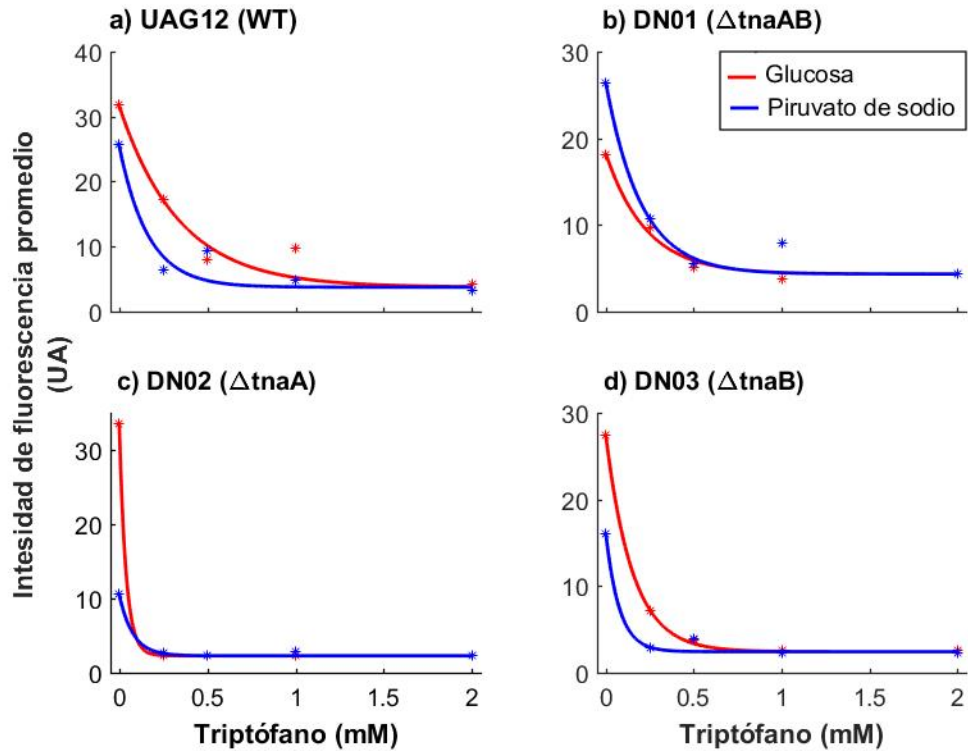
De los parámetros de ajuste el de interés es k . El cual se relaciona con el parámetro $k_{\frac{1}{2}}$ de la siguiente forma:

$$k_{\frac{1}{2}} = \ln(2) k \quad (7).$$

El parámetro $k_{\frac{1}{2}}$ indica la concentración extracelular de triptófano a la cual la intensidad de fluorescencia promedio disminuye a la mitad de la intensidad de fluorescencia en ausencia de triptófano exógeno. Entre mayor es el valor de $k_{\frac{1}{2}}$, la función exponencial decae más lento; es decir, mayor concentración de triptófano exógeno es necesario para disminuir la intensidad de fluorescencia promedio. Y viceversa, valores más bajos de $k_{\frac{1}{2}}$ indican que la función exponencial decrece con mayor rapidez y por lo tanto menor concentración de triptófano exógeno es necesario para reprimir la intensidad de fluorescencia. Se realizó un gráfico de barras de los valores de k calculados para cada cepa y fuente de carbono. Las

barras de error corresponden a la desviación estándar, obtenida a partir de la varianza del de ajuste del parámetro k (Figura 13).

Figura 12 Intensidad de fluorescencia promedio en función de la concentración de triptófano



Ajuste exponencial. Se muestran las medias de la intensidad de fluorescencia (μ) de cada condición experimental en función de la concentración de triptófano. (*) Los datos obtenidos de medios con glucosa (0.2%) se muestran en rojo; los obtenidos de medios con piruvato de sodio (30 mM) se muestran en azul. Las líneas sólidas son el ajuste a la función exponencial descrita en (4). a) UAG12 (WT); b) DN01 ($\Delta tnaAB$); c) DN02 ($\Delta tnaA$); y d) DN03 ($\Delta tnaB$).

De la Figura 13 y con lo que respecta a la cepa *wild type* (WT, UAG12) se aprecia que el valor de k es significativamente mayor en el medio cuya fuente principal de carbono es glucosa, en comparación con el valor de k en el medio enriquecido con piruvato de sodio. Esto evidencia que el nivel de expresión de *trp* es distinto entre ambas fuentes de carbono. En cambio, en la cepa con delección completa del operón *tna* ($\Delta tnaAB$, DN01) se observa que no existe diferencia significativa en los valores k entre los medios con glucosa y piruvato de sodio; sin embargo, los valores son menores en comparación con la cepa WT.

Figura 13 Comparación de valores de k

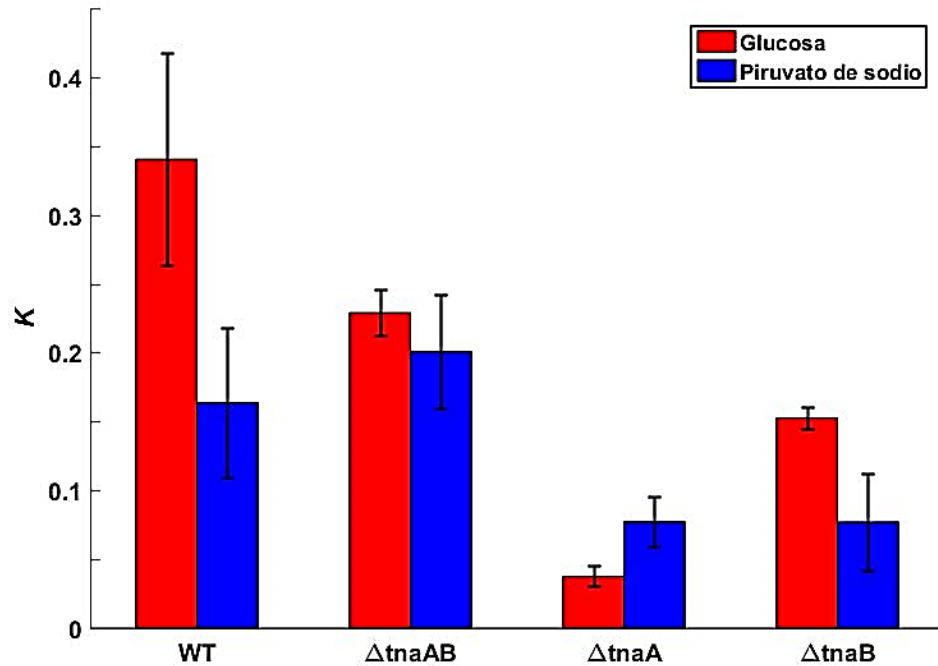


Gráfico de barras del valor de k calculado a partir del ajuste de la función exponencial (4). Las barras en rojo indican los experimentos realizados con glucosa (0.2%); las barras en azul aquellos realizados con piruvato de sodio (30mM). UAG12: WT; DN01: $\Delta tnaAB$; DN02: $\Delta tnaA$; DN03: $\Delta tnaB$.

En la cepa con delección de *tnaA* ($\Delta TnaA$, DN02), no se aprecia diferencia entre ambas fuentes de carbono. Pero, los valores de k para ambos medios son menores en referencia con la cepa WT y la cepa con $\Delta TnaAB$. Además, es la única cepa con tendencia a un valor de k menor en el medio con glucosa.

Y, por último, el valor de k para la cepa sin el gen *tnaB* ($\Delta TnaB$, DN03) es menor en el medio con piruvato de sodio, en comparación con el valor de k en presencia de glucosa. Los valores son significativamente menores en comparación con la cepa WT. La diferencia en k entre ambas fuentes de carbono en la cepa $\Delta tnaB$ se asemeja a la presentada por la cepa $\Delta TnaAB$. Finalmente, no existe diferencia entre los valores k en piruvato de sodio entre las cepas $\Delta TnaA$ y $\Delta TnaB$, pero si se observa diferencia entre los valores de k en glucosa.

6 Discusión

El presente trabajo es un estudio experimental del comportamiento dinámico del operón *trp* en relación con la actividad de un segundo operón: *tna*. El nivel de expresión de *trp* responde directamente a la concentración intracelular de triptófano. Esto nos permite evaluar el efecto de *tna* en función de su capacidad para modificar la concentración citoplasmática de este aminoácido. El operón *tna* codifica dos genes estructurales: *tnaA* que una vez transcrito y traducido degrada el triptófano con fines metabólicos o de señalización y *tnaB* una permeasa específica de triptófano que lo transporta hacia el citoplasma. Las contribuciones de *tnaA* y *tnaB* se traducen en incrementar y disminuir la concentración intracelular de triptófano, respectivamente. Anudado a esto, la expresión de *tna* es inducida por triptófano; por lo que TnaA participa en un ciclo de regulación negativa sobre su propia expresión y TnaB en un ciclo de regulación positiva. El balance neto de estos mecanismos y, por ende, su efecto sobre la expresión de *trp* es desconocido. En este trabajo de investigación se pretende elucidar el efecto del operón *tna* sobre la expresión del operón *trp*.

TnaA es capaz de degradar triptófano endógeno [3], sin embargo, su acción degradativa no es suficiente para afectar negativamente la viabilidad celular [9]. Esto en parte debido a la participación del operón *trp*: en respuesta a cualquier deficiencia parcial de triptófano, el operón *trp* incrementa su expresión aumentando la biosíntesis de triptófano. A pesar de esto, se desconoce el efecto de TnaA sobre la expresión de *trp* a nivel transcripcional, y más aún, se ignora la contribución de la permeasa TnaB.

Debido a que ambos operones son regulados por el triptófano intracelular, fue de suma importancia conocer su concentración en el medio de extracelular en todo momento durante los experimentos. De esto, surgió la necesidad de hacer uso de cultivos de flujo continuo y estudiar la expresión en estado estacionario. Además, valiéndonos de que *tna* es susceptible a un segundo mecanismo de regulación conocido como represión catabólica, comparamos la expresión de *trp* en medios de cultivo enriquecidos con glucosa o piruvato de sodio. La glucosa es una fuente de carbono inductora de represión catabólica, por lo que la expresión de *tna* se espera disminuida en comparación con su expresión en medios con piruvato de sodio. De esta forma, diferencias en el nivel de expresión de *trp* entre ambos medios de cultivo, pueden atribuirse a un mecanismo dependiente de la fuente de carbono disponible, este mecanismo suponemos es *tna*.

La expresión de *trp* se infirió a partir de la intensidad de fluorescencia en cepas transformadas con un plásmido de expresión que contiene un gen reportero *gfpmut2* regulado por el promotor y péptido líder del operón *trp*. En total se utilizaron 4 cepas diferentes, con o sin deleciones en los genes del operón *tna* (WT, Δ tnaAB, Δ tnaA, Δ tnaB; [Tabla 1](#)). Se midió la intensidad de fluorescencia en respuesta a 5 concentraciones de triptófano (0, 0.25, 0.5, 1 y 2 mM) y en presencia de glucosa (0.2%) o piruvato de sodio (30 mM). En estado estacionario es posible suponer que la intensidad de fluorescencia es proporcional a la actividad transcripcional de *trp*.

Para cada cepa y fuente de carbono, se calculó la concentración de triptófano extracelular a la cual la expresión de *trp* disminuye a la mitad de su expresión en ausencia de triptófano exógeno. Este valor es conocido como $k_{\frac{1}{2}}$ y se obtuvo a partir de los valores k calculados como en [4.5.1](#) y mostrados en la [Figura 13](#). Recordando que *trp* es reprimido por triptófano intracelular, valores bajos de k indican que el triptófano se acumula dentro de la célula más fácilmente a medida que aumenta la concentración extracelular de triptófano, en comparación con valores mayores de $k_{\frac{1}{2}}$. Esto nos permite deducir el balance neto de los mecanismos que modifican la concentración citoplasmática de triptófano.

La concentración intracelular de triptófano puede ser modificada por 3 mecanismos generales: síntesis, degradación y transporte. La síntesis depende de la expresión de *trp* y dado que es reprimido exclusivamente por triptófano, sirve como reportero de la concentración intracelular de este aminoácido. La degradación depende de la tasa de utilización del triptófano para síntesis proteica y la degradación a cargo de TnaA. La primera, a su vez depende de la tasa metabólica y la tasa de crecimiento. Ambos mecanismos de degradación disminuyen la concentración intracelular. Por otra parte, el transporte de triptófano está a cargo principalmente de tres permeasas: AroP, Mtr y TnaB [3], las cuales en conjunto incrementan la concentración intracelular. La participación de AroP y Mtr en medios enriquecidos con caseína hidrolizada es mínima en comparación con la aportación de TnaB [3], por lo que la contribución de AroP y Mtr puede despreciarse como mecanismos responsables de los cambios observados. Considerando que *trp* es reprimido únicamente por triptófano, hemos explotado el hecho de que los productos génicos de *tna* afectan la concentración intracelular de triptófano para inferir cómo influyen la expresión de *trp*.

De los resultados obtenidos y mostrados en la [Figura 13](#), se observa que para la cepa WT los valores de k difieren significativamente entre ambas condiciones de cultivo, lo que

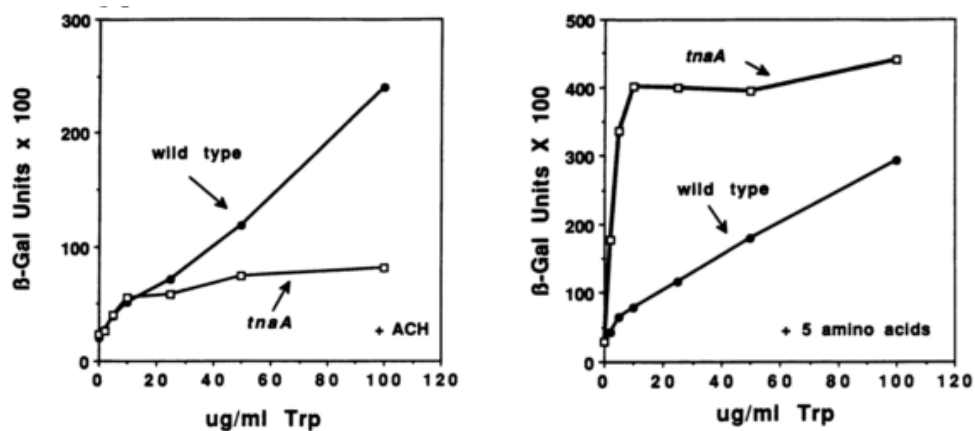
sugiere la participación de un mecanismo dependiente de la fuente de carbono disponible. El valor de k es significativamente menor en el medio de cultivo enriquecido con piruvato de sodio en comparación con el medio adicionado con glucosa. De lo anterior, se entiende que la cepa WT acumula triptófano intracelular conforme incrementa el triptófano externo con mayor facilidad en el medio con piruvato de sodio. Recordando que, debido a la represión catabólica la expresión del operón *tna* se mantiene baja aun en presencia de triptófano; y que, en ausencia de represión catabólica, *tna* es inducido en función de la concentración extracelular de triptófano, podemos concluir que la acumulación de triptófano intracelular se favorece en las condiciones que inducen la expresión de *tna*. De los productos génicos de *tna*, TnaB es quien contribuye a incrementar la concentración intracelular de triptófano, por lo que este análisis sugiere que la actividad transportadora de TnaB tiene mayor efecto en los niveles de triptófano citoplasmático que la acción degradativa de TnaA.

En los experimentos para la cepa Δ TnaAB (DN01) no se observa diferencia significativa en los valores de k entre ambos medios de cultivo. Esto supone que el mecanismo dependiente de la fuente de carbono se encuentra abolido, lo que es consistente con la hipótesis de que los cambios observados en la cepa WT son debidos a la actividad del operón *tna*. Sin embargo, podría esperarse que el comportamiento de la cepa Δ TnaAB fuera similar al comportamiento de la cepa WT en glucosa, en el que la actividad del operón *tna* se espera reprimida. En concordancia con esto, se observa que el valor de k obtenido en los experimentos con piruvato de sodio para Δ TnaAB es mayor que el de la cepa WT en piruvato de sodio; aunque no tan alto como el de la cepa WT en glucosa. Con la información recabada, no somos capaces de explicar esta diferencia.

En los experimentos con la cepa Δ TnaA (DN02), ambos valores de k son menores en comparación con las cepas WT y Δ TnaAB. Es de notar que, en ambos medios de cultivo, la intensidad de fluorescencia alcanza un estado estacionario a una concentración extracelular de triptófano de 0.25 mM (Figura 12, c)), la segunda concentración más baja en este protocolo. Esto implica que la precisión de k está comprometida y no es posible comparar los valores entre ambas fuentes de carbono; únicamente podemos afirmar que, para ambas, el valor de k es menor o igual a 0.25 mM. Por otro lado, la disminución de k en relación con las cepas WT y Δ TnaAB, implica que menor concentración de triptófano extracelular es necesaria para reducir la expresión del operón *trp*; por lo que los mecanismos que aumentan la concentración intracelular de triptófano se ven aún más

beneficiados en ausencia de *tnaA*. Esto puede ser por el hecho de que el transporte de triptófano por parte de TnaB (aún en bajos niveles, como es el caso del experimento con glucosa) permite una acumulación más rápida de triptófano al no ser degradado por TnaA; lo antedicho puede explicarse de la siguiente manera: cuando *tnaA* no se expresa, el lazo de retroalimentación negativa en la regulación de *tna* está abolido, por lo que no existe elemento que reprima la expresión de *tna* y el gen remanente, *tnaB*, se expresa en mayor medida. Esto incrementa aún más la entrada de triptófano hacia el citoplasma, lo que resulta en una represión de *trp* a menor concentración de triptófano extracelular. Estos resultados están en concordancia con que en ausencia de *tnaA*, la expresión del operón *tna* alcanza el estado estacionario a concentraciones mucho menores de triptófano extracelular, e incluso, su nivel de expresión máxima es hasta 30% mayor que cuando se expresan ambos genes (Figura 14) [3]. En resumen, la ausencia de TnaA reprime la expresión de *trp* mediante dos mecanismos: el flujo de entrada de triptófano es mayor debido la sobreexpresión de TnaB y no hay disminución de la concentración intracelular por parte de TnaA.

Figura 14 Efecto de la ausencia de *tnaA* sobre la expresión del operón *tna*
Obtenido de [2].

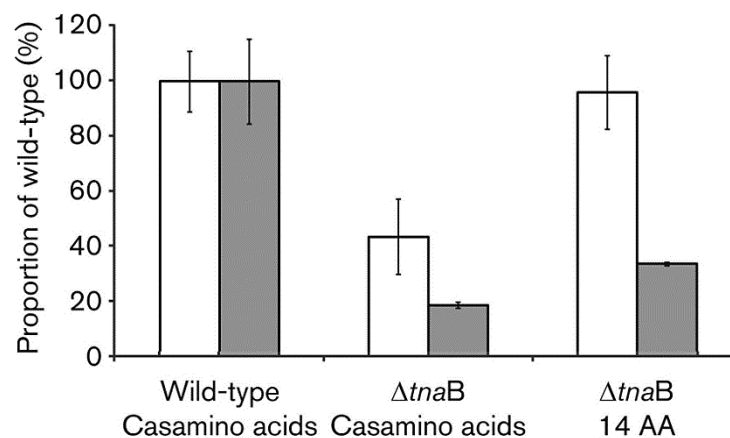


Para los experimentos mostrados se utilizó una fusión transcripcional de *tnaA-lacZ*, en la que el que el promotor y la región reguladora del operón *tna* resultan en la producción de la fusión TnaA-β-galactosidasa. La cepa *tnaA* no expresa el gen *tnaA* genómico y es deficiente en la expresión de *tnaB*. Se midieron los niveles de β-gal en medios con caseína hidrolizada con ácido (+ACH) y en ausencia de aminoácido aromáticos (+ 5 amino acids). Izquierda: la expresión de TnaA alcanza su valor máximo a concentraciones mucho más bajas de triptófano. Nótese que el nivel de expresión máxima de TnaA es menor que en la imagen derecha, debido a la deficiencia de TnaB. Derecha: en este medio AroP y Mtr contribuyen al transporte de triptófano. La expresión de *tna* alcanza el estado estacionario a concentraciones bajas de triptófano y el nivel es más alto que la *wild type*.

En lo que respecta a la cepa Δ TnaB (DN03), la ausencia del gen *tnaB* anula el ciclo de retroalimentación positiva en la ruta reguladora del operón *tna*. En consecuencia, el gen restante *tnaA* es exclusivamente susceptible a regulación negativa. Por lo que, en esta cepa no sólo *tnaB* está ausente, sino la expresión de *tnaA* se encuentra disminuida. De acuerdo con lo anterior, los experimentos con la cepa Δ TnaB deberían dar resultados similares a los de la cepa Δ TnaAB (que carece de ambos genes). Una comparación de los valores de *k* correspondientes demuestra que, en ambas cepas, el valor de *k* para el experimento con piruvato de sodio es menor que el del experimento con glucosa. Y la diferencia entre ambas fuentes de carbono es similar. Sin embargo, los valores de *k* para la cepa Δ TnaB son evidentemente menores que los valores correspondientes para la cepa Δ TnaAB. Esta diferencia puede atribuirse a una menor tasa de crecimiento en la cepa Δ TnaB, en comparación con la cepa Δ TnaAB, debido a un aumento en la carga metabólica (puesto que Δ TnaB tiene un gen adicional); lo que a su vez facilita la acumulación de triptófano intracelular.

Estos resultados refuerzan los presentados por Yanofsky y Young: la participación de TnaB es fundamental para inducir la expresión del gen *tnaA* y para la producción de indol [3], [9]. Sin su participación, la expresión el gen remanente, *tnaA*, puede verse reducida hasta en un 60% y la producción de indol hasta en un 50% (Figura 15). Lo primero, vía la

Figura 15 TnaB es necesaria para la producción óptima de indol
Obtenido de [9]



Cepas de *E. coli* que expresan TnaA-sfGFP y TnaB (Wild-type) o sólo TnaA-sfGFP (Δ tnaB) se cultivaron en medio M9 suplementado con triptófano 0.5 mM, 1% de Casamino ácidos o 1 % de medio con 14 aminoácidos (excluyendo los aromáticos). Para cada cultivo se midieron las concentraciones de fluorescencia (barras claras) y de indol (barras oscuras). Los valores se expresan como porcentajes de lo producido por la cepa *wild type*.

suspensión del lazo de retroalimentación positiva; lo segundo, por un ineficiente transporte de sustrato. Esto comprueba que la capacidad de TnaB para modificar la concentración intracelular de triptófano es mayor que la contribución de TnaA. Por lo tanto, el efecto de TnaB sobre la expresión de *trp*, es mayor.

7 Conclusiones y Perspectivas

En el presente trabajo se evaluó el efecto del operón *tna* sobre la expresión del operón *trp*. Los resultados obtenidos indican que ambos productos génicos de *tna* tiene la capacidad de interferir con la expresión de *trp* vía su capacidad para modificar la concentración intracelular de triptófano. Sin embargo, TnaB tiene mayor capacidad para aumentar la concentración intracelular de triptófano, que TnaA para reducirla. En términos de flujos, podemos decir que el flujo de entrada de triptófano extracelular es mayor que el flujo de salida ocasionado por la acción degradativa de TnaA; por lo que el efecto neto del operón *tna* es el de incrementar la concentración intracelular de triptófano y reprimir la expresión del operón *trp*. Con los resultados obtenidos también fue posible evidenciar la importancia de los ciclos de regulación anidados en la expresión de *tna* y cómo modificaciones en estos ciclos resultan en desbalances en la acumulación de triptófano con efectos en la expresión de *trp*.

Adicionalmente, de la metodología utilizada podemos argumentar que el uso de dispositivos de microfluídica con diseños simples, son una buena opción para realizar experimentos de flujo continuo. Con pocos volúmenes es posible estudiar sistemas a nivel de célula única y poblacional.

A pesar del diseño experimental, no fue posible mantener bajo control todas las variables de los sistemas involucrados. De ahí que ciertos comportamientos no pudieron ser explicados y otros más fueron atribuidos a las tasas metabólicas y de crecimiento entre las distintas cepas. Además, recientemente se comprobó experimentalmente que el operón *tna* es biestable (resultados aún no publicados), por lo que su comportamiento es altamente no lineal y podría contribuir a nuestra incapacidad para explicar ciertos resultados. De esto, sería interesante realizar un experimento in-silico en el que se controlaran aún más variables y se incluyeran las fluctuaciones propias de los sistemas biológicos y su efecto en sistemas biestables para extender las conclusiones de este trabajo experimental.

Finalmente, para futuros trabajos experimentales se propone utilizar fusiones de *trpE*-gfp al genoma.

8 Anexos

8.1 Procesamiento de imágenes - Código de Matlab

```
% % By: Eduardo Soza
% Modified by: Daniela Nevarez
clear all;
close all;
warning('off','all');

hm = 1/9.*[1 1 1;1 1 1;1 1 1];
strain = 'UAG12'; %'DN01'; %/ 'DN02' / 'DN03'
res = strcat('\Resultados',strain);
directorio =
strcat('C:\Users\Daniela\Documents\CINVESTAV\Master\Datos
Maestría\',strain);
mkdir([pwd,res]);

% Inicializacion de Variable en Disco Duro
data = [];
dirData = strcat(pwd,res,'\data.mat');
save(dirData,'data','-v7.3');
DataFile = matfile(dirData,'Writable',true);
contCnt = 1;
nameFolds=extractNames(directorio); %Carpetas
numFolds = size(nameFolds); %Numero de carpetas
BacteriaArea = 700; % Area promedio de bacteria
tic

for karp = 1:numFolds(1)% Para cada Carpeta / G0011T00 ... P0000T20
de cepa
    RutaFolder =
dir(fullfile(directorio,strtrim(nameFolds(karp,:)),'*C.tif'));
    nameFolds1 = {RutaFolder(:).name}';
    nameFolds1(ismember(nameFolds1,{'.','..'})) = [];
    nameFolds1 = char(nameFolds1);
    numFolds1 = size(nameFolds1); %número de archivos por carpeta

    for vid = 1:numFolds1(1)% Por archivos / videos / SXImXX_C
        ruta =
strcat(directorio,'\',strtrim(nameFolds(karp,:)),'\',nameFolds1(vid,
1:end-5));
        imageFullFileNameC = strcat(ruta, 'C.tif'); % Imagen
Contraste de fases
        imageFullFileNameF = strcat(ruta, 'F.tif'); % Imagen de
Fluorescencia
        IC = imread(imageFullFileNameC);
        IF = imread(imageFullFileNameF);

        %Alineación de IC sobre IF
        icmedia = ceil(mean(mean(IC)));
        [optimizer, metric] = imregconfig('multimodal');
        tform = imregtform(IC, IF, 'affine', optimizer, metric);
        IC =
imwarp(IC,tform,'OutputView',imref2d(size(IF)),'FillValues',icmedia)
;
;
```

```

IF = imfilter(IF,hm);
IC = imfilter(IC,hm);

Id = imadjust(IC,[0 1],[0 1]);
Id = imadjust(Id);
IBW_Td = imbinarize(Id,.5);
IF_Td = immultiply(IBW_Td,IF);
IF_Td = double(IF_Td);
IF_Td(IF_Td == 0) = NaN;
ThresD2 = mean((mean(IF_Td, 'omitnan')),'omitnan');

Io = imadjust(IC,[0 1],[1 0]);
Io = imadjust(Io);
IBW = imbinarize(Io,.5);
IBW(1:2,:) = 0; IBW(end-1:end,:) = 0; IBW(:,end-1:end) = 0;
IBW(:,1:2) = 0;
S0 = regionprops(IBW, 'area', 'centroid');
cc = bwconncomp(IBW);

idx = find(0.5*BacteriaArea < [S0.Area] & [S0.Area] <
2*BacteriaArea);
IBW2 = ismember(labelmatrix(cc), idx); %Máscara
S1 = regionprops(IBW2, 'area', 'centroid');
cc1 = bwconncomp(IBW2);

IFM = immultiply(IBW2,IF);
IMABSDIF = IFM - ThresD2;

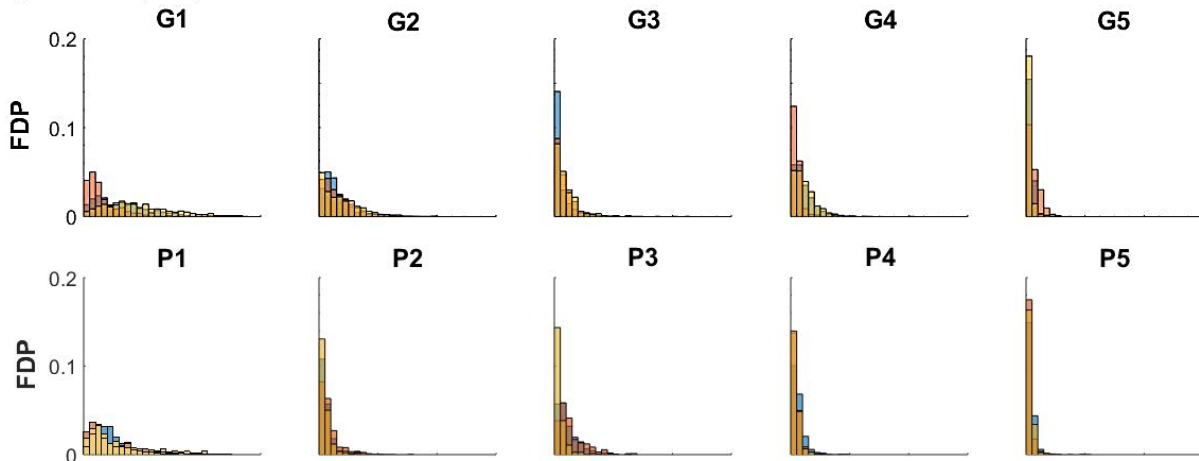
% % % Data for each bacteria
CS = str2num(nameFolds(karp,4)); %Carbon source
SN = str2num(nameFolds1(vid,2)); %Sample Number
IN = str2num(nameFolds1(vid,5:6)); %Image Number
TN = str2num(nameFolds(karp,7:8)); %Tryptophan concentration

for m = 1:cc1.NumObjects
    Bacteria = IMABSDIF(cc1.PixelIdxList{m});
    Area = length(Bacteria); %
    Bacterias = round(Area/BacteriaArea); %Número de
bacterias aprox
    MDF = mean(Bacteria);
    SDF = sum(Bacteria);
    DataFile.data(contCnt,1:8)= [CS,TN, SN,IN, Bacterias,
Area, MDF, SDF];
    contCnt=contCnt+1;
end
end
toc
end

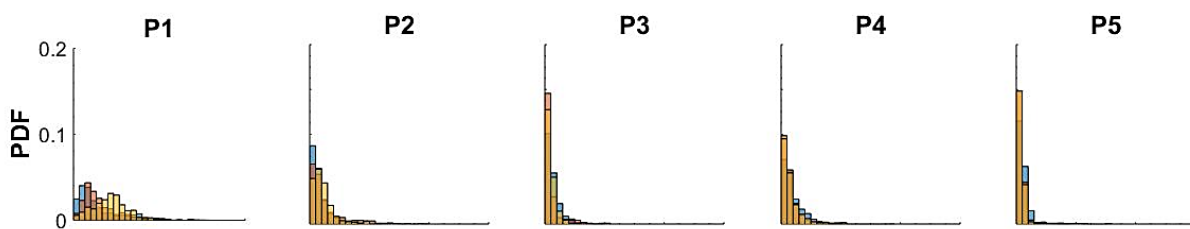
```

8.2 Histogramas – Distribuciones de probabilidad

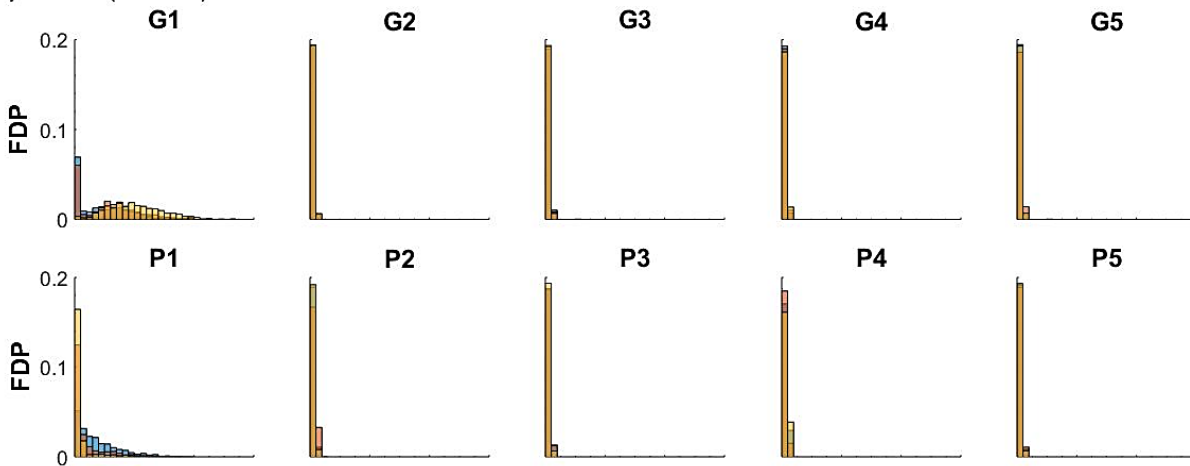
a) UAG12 (WT)



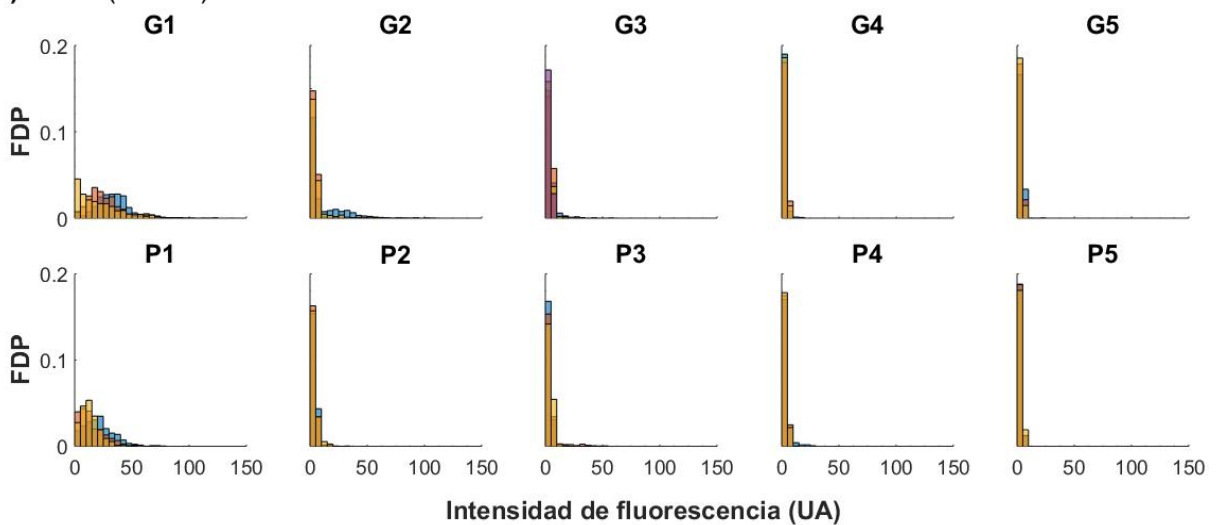
b) DN01 ($\Delta tnaAB$)



c) DN02 ($\Delta tnaA$)

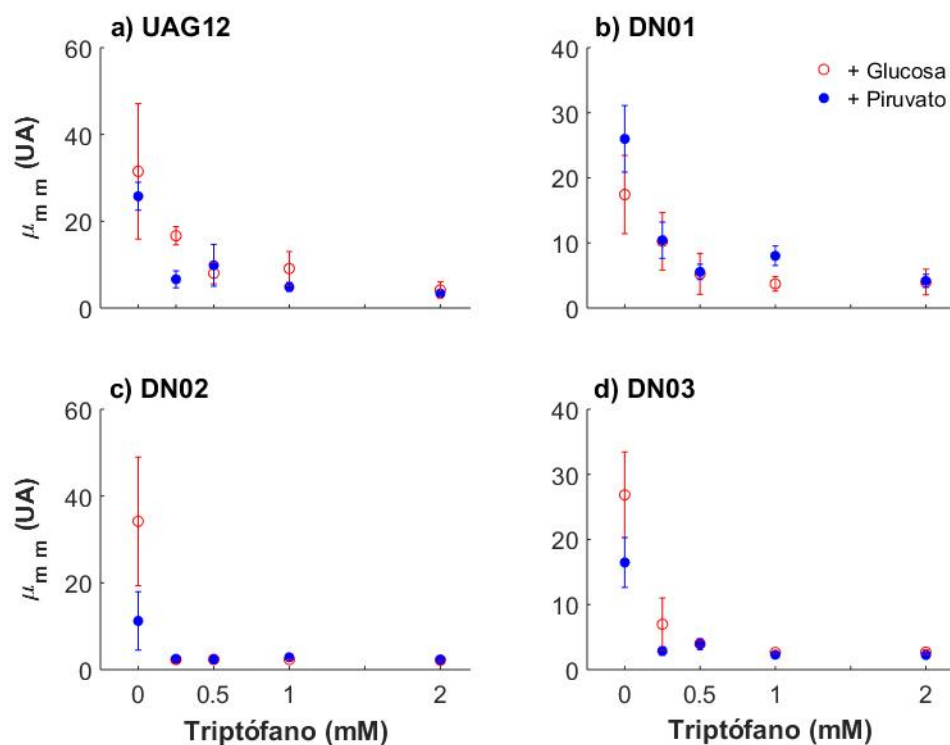


d) DN03 ($\Delta tnaB$)



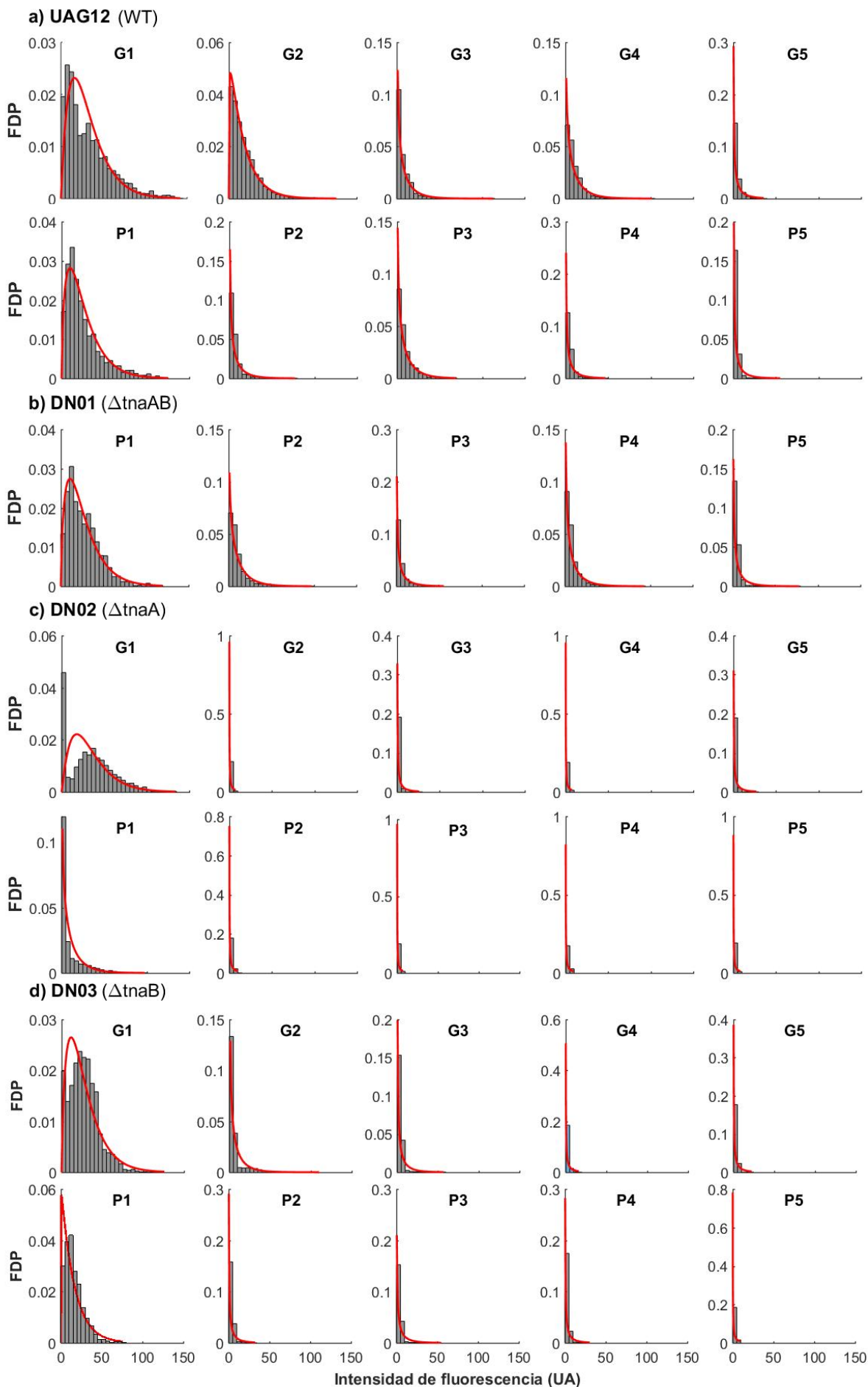
Anexo 2. Se graficó la función de densidad de probabilidad (FDP) vs. la intensidad de fluorescencia para cada cepa y experimento independiente. a) UAG12 (*Wild type*); b) DN01 ($\Delta tnaAB$); c) DN02 ($\Delta tnaA$); d) DN03 ($\Delta tnaB$). Las células se crecieron en estado estacionario en medios de cultivos M9 suplementados y adicionados con glucosa (G) o piruvato de sodio (P) y una de las 5 concentraciones de triptófano (1, 2, 3, 4, 5). FDP: Función de Densidad de Proabilidad; G: Glucosa (0.2%); P: Piruvato de sodio (30 mM); 1: 0.0 mM; 2: 0.25 mM; 3: 0.5 mM; 4: 1.0 mM; 5: 2.0 mM; UA: Unidades Arbitrarias. Cada color representa un experimento independiente. Los resultados de la cepa DN01 con glucosa se muestran en la Figura 8.

8.3 Análisis de repetibilidad entre repeticiones independientes



Anexo 3. Se graficó el promedio ($\mu_{m,m}$) del promedio de las intensidades de fluorescencia (μ_m) de las repeticiones independientes en función de la concentración de triptófano. Las barras de error representan la desviación estándar. Las viñetas en rojo indican los experimentos en glucosa (0.2%); las viñetas en azul, los experimentos en piruvato de sodio (30 mM). Se observa que en general la variabilidad (desviación estándar) disminuye conforme aumenta la concentración de triptófano.
UA: Unidades Arbitrarias.

8.4 Distribuciones gamma de densidad de probabilidad



Anexo 4. Se muestra la distribución de intensidad de fluorescencia para cada condición experimental. En rojo, el ajuste a la distribución gamma con los parámetros θ y k calculados como en 4.1.5.

FDP: Función de Densidad de Probabilidad; G: Glucosa (0.2%); P: Piruvato de sodio (30 mM); UA: Unidades Arbitrarias. Concentraciones de triptófano: 1 (0.0 mM); 2 (0.25 mM); 3 (0.5 mM); 4 (1.0 mM); 5 (2.0 mM).

Los resultados de la cepa DN01 en glucosa, se muestran en la Figura 11.

9 Bibliografía

- [1] R. H. Garrett and C. M. Grisham, “Biochemistry,” in *Biochemistry*, Mary Finch, 2010, p. 219.
- [2] R. D. Bliss, “Analysis of the Dynamic Behavior of the Tryptophan Operon in *Escherichia coli*: The Functional Significance of Feedback Inhibition,” University of California Riverside, 1979.
- [3] C. Yanofsky, V. Horn, and P. Gollnick, “Physiological studies of tryptophan transport and tryptophanase operon induction in *Escherichia coli*,” *J. Bacteriol.*, vol. 173, no. 19, pp. 6009–6017, 1991.
- [4] E. Salazar-Cavazos and M. Santillán, “Optimal Performance of the Tryptophan Operon of *E. coli*: A stochastic, Dynamical, Mathematical-Modeling Approach,” *Bull. Math. Biol.*, vol. 76, no. 2, pp. 314–334, 2014.
- [5] S. P. B. Marmorstein R.Q., “Structure and Mechanism of the trp Repressor/Operator System,” in *Nucleic Acids and Molecular Biology*, vol. 3, Springer, Berlin, Heidelberg, 1986, pp. 56–78.
- [6] J. Boyle, “Lehninger principles of biochemistry (4th ed.): Nelson, D., and Cox, M.,” *Biochem. Mol. Biol. Educ.*, vol. 33, no. 1, pp. 74–75, Jan. 2005.
- [7] C. Yanofsky and V. Horn, “Role of regulatory features of the trp operon of *Escherichia coli* in mediating a response to a nutritional shift,” *J. Bacteriol.*, vol. 176, no. 20, pp. 6245–6254, 1994.
- [8] C. Yanofsky, “Transcription Attenuation: Once Viewed as a Novel Regulatory Strategy,” *J. Bacteriol.*, vol. 182, no. 1, pp. 1–8, Jan. 2000.
- [9] G. Li and K. D. Young, “Indole production by the tryptophanase TnaA in *Escherichia coli* is determined by the amount of exogenous tryptophan,” *Microbiol. (United Kingdom)*, vol. 159, no. 2, pp. 402–410, 2013.
- [10] T. Bansal, D. Englert, J. Lee, M. Hegde, T. K. Wood, and A. Jayaraman, “Differential Effects of Epinephrine, Norepinephrine, and Indole on *Escherichia coli* O157:H7 Chemotaxis, Colonization, and Gene Expression,” *Infect. Immun.*, vol. 75, no. 9, pp. 4597–4607, 2007.
- [11] G. Li and K. D. Young, “Isolation and identification of new inner membrane-associated proteins that localize to cell poles in *Escherichia coli*,” *Mol. Microbiol.*, vol. 84, no. 2, pp. 276–295, 2012.
- [12] G. Li and K. D. Young, “A new suite of tnaA mutants suggests that *Escherichia coli* tryptophanase is regulated by intracellular sequestration and by occlusion of its active site,” *BMC Microbiol.*, vol. 15, no. 1, p. 14, 2015.
- [13] E. E. Snell, “Tryptophanase: Structure, Catalytic Activities, and Mechanism of Action,” in *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, A. Meister, Ed. John Wiley & Sons, Inc., 2006, pp. 227–286.

- [14] G. Li and K. D. Young, "A cAMP-independent carbohydrate-driven mechanism inhibits *tnaA* expression and TnaA enzyme activity in *Escherichia coli*," *Microbiol. (United Kingdom)*, vol. 160, no. PART 9, pp. 2079–2088, 2014.
- [15] M. L. Chye and J. Pittard, "Transcription control of the *aroP* gene in *Escherichia coli* K-12: Analysis of operator mutants," *J. Bacteriol.*, vol. 169, no. 1, pp. 386–393, 1987.
- [16] R. Gutierrez-Ríos, J. A. Freyre-Gonzalez, O. Resendis, J. Collado-Vides, M. Saier, and G. Gosset, "Identification of regulatory network topological units coordinating the genome-wide transcriptional response to glucose in *Escherichia coli*," *BMC Microbiol.*, vol. 7, no. 1, p. 53, 2007.
- [17] D. Zheng, "Identification of the CRP regulon using in vitro and in vivo transcriptional profiling," *Nucleic Acids Res.*, vol. 32, no. 19, pp. 5874–5893, Oct. 2004.
- [18] F. Gong and C. Yanofsky, "A Transcriptional Pause Synchronizes Translation with Transcription in the Tryptophanase Operon Leader Region," *J. Bacteriol.*, vol. 185, no. 21, pp. 6472–6476, 2003.
- [19] J. London, C. Skrzynia, and M. E. Goldberg, "Renaturation of *Escherichia coli* tryptophanase after exposure to 8 M urea. Evidence for the existence of nucleation centers.," *Eur. J. Biochem.*, vol. 47, no. 2, pp. 409–15, Sep. 1974.
- [20] W. A. NEWTON, Y. MORINO, and E. E. SNELL, "PROPERTIES OF CRYSTALLINE TRYPTOPHANASE.," *J. Biol. Chem.*, vol. 240, pp. 1211–8, Mar. 1965.
- [21] M. Scheer *et al.*, "BRENDA, the enzyme information system in 2011," *Nucleic Acids Res.*, vol. 39, no. Database, pp. D670–D676, Jan. 2011.
- [22] T. Watanabe and E. E. Snell, "The interaction of *Escherichia coli* tryptophanase with various amino and their analogs. Active site mapping.," *J. Biochem.*, vol. 82, no. 3, pp. 733–45, Sep. 1977.
- [23] R. Zúñiga, J. Salazar, M. Canales, and O. Orellana, "A dispensable peptide from *Acidithiobacillus ferrooxidans* tryptophanyl-tRNA synthetase affects tRNA binding.," *FEBS Lett.*, vol. 532, no. 3, pp. 387–90, Dec. 2002.
- [24] A. N. Lane, "The interaction of the *trp* repressor from *Escherichia coli* with L-tryptophan and indole propanoic acid.," *Eur. J. Biochem.*, vol. 157, no. 2, pp. 405–13, Jun. 1986.
- [25] N. M. Vega, K. R. Allison, A. S. Khalil, and J. J. Collins, "Signaling-mediated bacterial persister formation," *Nat. Chem. Biol.*, vol. 8, no. 5, pp. 431–433, May 2012.
- [26] B. D. Bennett, E. H. Kimball, M. Gao, R. Osterhout, S. J. Van Dien, and J. D. Rabinowitz, "Absolute metabolite concentrations and implied enzyme active site occupancy in *Escherichia coli*," *Nat. Chem. Biol.*, vol. 5, no. 8, pp. 593–599, Aug. 2009.

- [27] A. Zaslaver *et al.*, “A comprehensive library of fluorescent transcriptional reporters for *Escherichia coli*,” *Nat. Methods*, vol. 3, no. 8, pp. 623–628, 2006.
- [28] J. M. K. Ng, I. Gitlin, A. D. Stroock, and G. M. Whitesides, “Components for integrated poly(dimethylsiloxane) microfluidic systems.,” *Electrophoresis*, vol. 23, no. 20, pp. 3461–73, Oct. 2002.
- [29] H. Zhang and M. Chiao, “Anti-fouling Coatings of Poly(dimethylsiloxane) Devices for Biological and Biomedical Applications,” *J. Med. Biol. Eng.*, vol. 35, no. 2, pp. 143–155, Apr. 2015.
- [30] A. Bren, J. O. Park, B. D. Towbin, E. Dekel, J. D. Rabinowitz, and U. Alon, “Glucose becomes one of the worst carbon sources for *E. coli* on poor nitrogen sources due to suboptimal levels of cAMP,” *Sci. Rep.*, vol. 6, no. December 2015, pp. 2–11, 2016.
- [31] D. Deepika, R. Karmakar, M. S. Tirumkudulu, and K. V. Venkatesh, “Variation in swimming speed of *Escherichia coli* in response to attractant,” *Arch. Microbiol.*, vol. 197, no. 2, pp. 211–222, Mar. 2015.