



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS  
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

**Unidad Monterrey**

**Efecto de los Lazos de Retroalimentación en la  
Respuesta en Frecuencia del Operón Triptófano en  
*Bacillus subtilis* y *Escherichia coli***

Tesis que presenta

**Ing. José Alberto Nakauma González**

Para obtener el grado de

**Maestro en Ciencias en  
Ingeniería y Física Biomédicas**

Director de la Tesis

Dr. Jesús Guadalupe Rodríguez González

Guadalupe, Nuevo León

Agosto, 2012

## Agradecimientos

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca que me fue otorgada para mis estudios de maestría.

También agradezco al CINVESTAV-Monterrey por permitirme realizar la maestría en sus instalaciones.

Agradezco al grupo de biología de sistemas, que con su apoyo me guiaron y ayudaron en mis preparaciones.

También agradezco al Dr. Jesús Rodríguez que me guió y confió en mi, para la realización de este proyecto.

# Índice general

Índice general	III
Índice de Figuras	IV
Índice de figuras	V
Índice de Tablas	V
Índice de tablas	VI
Abstract	VII
Resumen	VIII
<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
1.1. Síntesis de triptófano en bacterias . . . . .	4
1.1.1. Organización del operón <i>trp</i> . . . . .	4
1.1.2. Ruta biosintética . . . . .	5
1.1.3. Regulación de la síntesis de triptófano . . . . .	5
<b>2. Justificación</b>	<b>9</b>
<b>3. Hipótesis</b>	<b>10</b>
<b>4. Objetivos</b>	<b>11</b>
4.1. General . . . . .	11
4.2. Particulares . . . . .	11

ÍNDICE GENERAL	IV
<b>5. Métodos</b>	<b>12</b>
5.1. Modelo matemático del operón <i>trp</i> . . . . .	12
5.1.1. Modelo en <i>B. subtilis</i> . . . . .	12
5.1.2. Modelo en <i>E. coli</i> . . . . .	14
5.2. Linealización . . . . .	16
5.2.1. Estado estacionario . . . . .	16
5.2.2. Modelos lineales . . . . .	17
5.3. Función de transferencia . . . . .	18
<b>6. Resultados</b>	<b>20</b>
6.1. Efecto regulador del operón <i>trp</i> . . . . .	20
6.2. Modelos linealizados . . . . .	21
6.3. Análisis del efecto de los lazos de retroalimentación sobre la frecuencia . . . . .	23
6.3.1. Análisis en el operón <i>trp</i> de <i>B. subtilis</i> . . . . .	23
6.3.2. Análisis en el operón <i>trp</i> de <i>E. coli</i> . . . . .	26
6.3.3. Efecto de la ausencia de los lazos de retroalimentación sobre la respuesta en frecuencia . . . . .	28
<b>7. Discusión</b>	<b>32</b>
<b>8. Conclusiones</b>	<b>37</b>
<b>9. Perspectivas</b>	<b>38</b>
<b>A. Apéndice</b>	<b>40</b>
A.1. Obtención de las funciones de transferencia . . . . .	40
<b>Bibliografía</b>	<b>42</b>

# Índice de figuras

1.1. Diferentes formas de estímulos . . . . .	2
1.2. Diagrama de ganancia de Bode . . . . .	3
1.3. Descomposición de una pulso en sinusoidales . . . . .	3
1.4. Organización de los genes en el operón <i>trp</i> . . . . .	5
1.5. Ruta de Biosíntesis de triptófano . . . . .	6
1.6. Regulación de operón <i>trp</i> . . . . .	7
6.1. Influencia en la síntesis de triptófano en <i>B. subtilis</i> debido al $T_{ext}$ . . . . .	21
6.2. Influencia en la síntesis de triptófano en <i>E. coli</i> debido al $T_{ext}$ . . . . .	22
6.3. $T_S$ en función de $T_{ext}$ . . . . .	22
6.4. Respuesta al impulso de los modelos lineal y no lineal en <i>B. subtilis</i> . . . . .	23
6.5. Respuesta al impulso de los modelos lineal y no lineal en <i>E. coli</i> . . . . .	24
6.6. Influencia del mecanismo de atenuación de la transcripción sobre la respuesta en frecuencia y la respuesta temporal en <i>B. subtilis</i> . . . . .	26
6.7. Influencia del mecanismo de inhibición enzimática sobre la respuesta en frecuencia y la respuesta temporal en <i>B. subtilis</i> . . . . .	27
6.8. Influencia de los lazos de retroalimentación negativa sobre la respuesta en frecuencia del operón <i>trp</i> en <i>E. coli</i> . . . . .	29
6.9. Efecto de la ausencia de los lazos de retroalimentación negativa sobre la respuesta en frecuencia del operón <i>trp</i> en <i>B. subtilis</i> y <i>E. coli</i> . . . . .	30

# Índice de tablas

5.1. Parámetros del modelo del operón <i>trp</i> en <i>B. subtilis</i> . . . . .	14
5.2. Parámetros del modelo del operón <i>trp</i> en <i>E. coli</i> . . . . .	16
6.1. Frecuencias de corte ( $\omega_c$ ) y ganancias máximas ( $G_{max}$ ) de cada cepa en estudio. . . . .	31

# Abstract

In the environment, bacteria must respond appropriately to different stimuli that they are exposed. In such responses are involved complex signaling pathways. For example, in the tryptophan operon of *Escherichia coli* has been studied the dynamic response of the three feedback loops: transcriptional repression, transcriptional attenuation and enzyme inhibition. On the other hand, also the dynamic effect of the two feedback loops: transcriptional attenuation and enzyme inhibition has been studied in the *trp* operon of *Bacillus subtilis*. Why these bacteria, that share the need to produce this aminoacid, have developed different molecular machinery for the same purpose, is one open question in this moment. Amount other different ways to study the response in a bacterium, the frequency response allows compare in jus one graphic the response time and the gain of the system. In this work, we wonder how it alters the frequency response of the *trp* in *B. subtilis* and *E. coli* modifying the strength of the different feedback loops. The concentration of external tryptophan was taken as stimulus and synthesized tryptophan as response. We found that the effect on the frequency response when the strength of the attenuation feedback is modified in *B. subtilis* is the same when the strength of the repression feedback is modified in *E. coli*. In both cases by increasing the strength of the feedbacks, the time response increases and the gain decreases. While decreasing the strength of the feedbacks, the time response increases too and the gain is kept. Decreasing the strength of the enzyme inhibition, in both bacteria, has the greatest effect on increasing the response time. In all cases studied, the system maintain the properties of a low-pass filter. In conclusion, the strength of the feedback loops are balanced to maintain adequately the time response and the gain according to the duplication time of each bacterium.

# Resumen

En el ambiente natural, las bacterias deben responder adecuadamente ante diferentes estímulos a los cuales están sometidas. En dichas respuestas están involucradas complejas vías de señalización. Por ejemplo, en el operón triptófano de *Escherichia coli* se ha estudiado la respuesta dinámica de los tres lazos de retroalimentación: represión transcripcional, atenuación de la transcripción e inhibición enzimática. Por otro lado, también se ha estudiado el efecto dinámico de los dos lazos de retroalimentación: atenuación de la transcripción e inhibición enzimática en el operón *trp* de *Bacillus subtilis*. Por qué estas bacterias que comparten la necesidad de producir este aminoácido, han desarrollado diferente maquinaria molecular para un mismo fin, es una pregunta abierta en este momento. Entre muchas otras formas de estudiar la respuesta de una bacteria, la respuesta en frecuencia permite comparar en una gráfica el tiempo de respuesta y la ganancia del sistema. En este trabajo nos preguntamos cómo se altera la respuesta en frecuencia del operón *trp* en *B. subtilis* y *E. coli* modificando la fuerza de los diferentes lazos de retroalimentación. Se tomó como estímulo la concentración de triptófano externo y como respuesta la del triptófano sintetizado. Encontramos que el efecto sobre la respuesta en frecuencia al modificar la fuerza del lazo de atenuación en *B. subtilis* es el mismo cuando se modifica la fuerza del lazo de represión en *E. coli*. En ambos casos al aumentar la fuerza de los lazos, el tiempo de respuesta aumenta y la ganancia disminuye. Mientras que al disminuir la fuerza de estos lazos, el tiempo de respuesta aumenta y la ganancia se mantiene. Disminuir la fuerza del lazo de inhibición enzimática, en ambos sistemas, tiene el mayor efecto sobre el aumento del tiempo de respuesta. En todos los casos estudiados, el sistema conserva las propiedades de un filtro pasa-bajas. En conclusión, la fuerza de los lazos de retroalimentación están balanceados para mantener un tiempo de respuesta y ganancia adecuados al tiempo de duplicación de cada bacteria.

# 1

## Introducción

Las células están siempre expuestas a condiciones externas que son muy cambiantes, a las cuales deben responder de una manera adecuada para su adaptación y supervivencia. Estas condiciones externas son estímulos con diferentes amplitudes y formas. Por eso, existen muchos enfoques para estudiar la respuesta de una célula ante diferentes estímulos. Los estímulos típicos que pueden encontrarse en diferentes estudios biológicos son: respuesta a un escalón [1], a un pulso [1, 2], a una rampa [3] o incluso a un impulso [4]. Cada uno de estos estímulos puede dar una respuesta diferente, con información distinta (Fig. 1.1). Sin embargo, otro tipo de estímulos que han sido explorados recientemente, son los estímulos oscilatorios. Las respuestas a este tipo de estimulación contienen información que puede ser analizada en el dominio de la frecuencia [5].

La respuesta en frecuencia se define como la respuesta en estado estacionario de un sistema lineal, ante una entrada sinusoidal [6]. La razón que existe entre la amplitud de la salida ( $A_S$ ) y la amplitud de la entrada ( $A_E$ ) es llamada ganancia del sistema ( $G = A_S/A_E$ ). La ganancia dependerá de la frecuencia a la cual es estimulado el sistema. Una respuesta en frecuencia típica se puede construir marcando una asíntota para las ganancias a frecuencias bajas y otra para frecuencias altas. La intersección de las asíntotas corresponde a la frecuencia de corte. La frecuencia de corte separa dos regiones en el diagrama de ganancia de Bode, una para frecuencias en la que el sistema puede responder con ganancias superiores a la ganancia indicada en la frecuencia de corte, conocida también como el ancho de banda, y la otra región para la cual el sistema no responde, porque las ganancias son inferiores a la ganancia que indica la frecuencia de corte (Fig. 1.2).

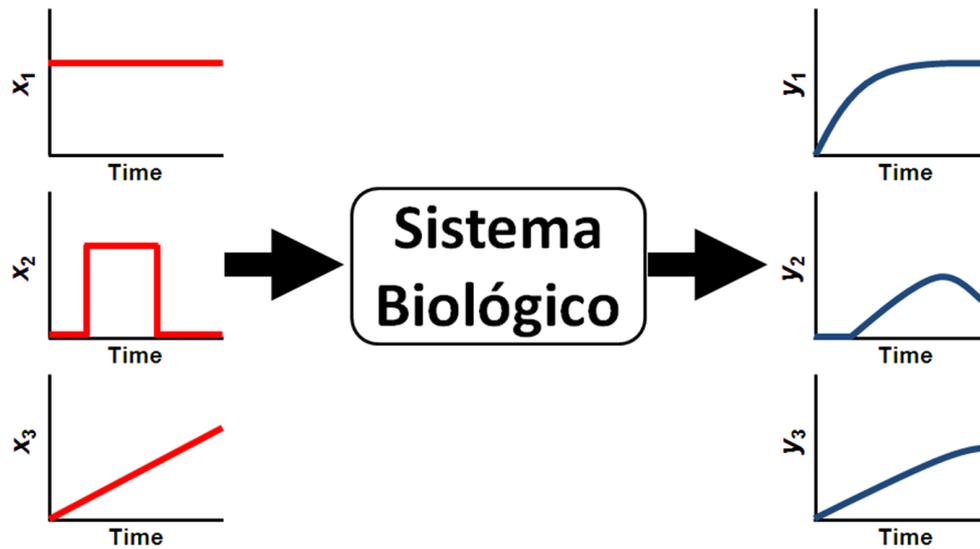


Figura 1.1: **Diferentes formas de estímulos.** Un sistema biológico puede ser estimulado con un escalón  $x_1$ , un pulso  $x_2$ , una rampa  $x_3$  y las respuestas  $y_1$ ,  $y_2$  y  $y_3$  son distintas para incluso el mismo agente estimulante.

Además, la frecuencia de corte está relacionada con el tiempo de respuesta de un sistema biológico, definiéndose ésta como el tiempo al cual la mitad del nuevo estado estacionario es alcanzado cuando existe un cambio en la entrada [7]. Cuando la frecuencia de corte se encuentre en frecuencias altas, el tiempo de respuesta es corto, caso contrario si la frecuencia de corte se encuentra en frecuencias bajas [8].

La ventaja que ofrece la respuesta en frecuencia (respuestas en función de la frecuencia) contra la respuesta temporal (respuestas en función del tiempo), es que, con la respuesta en frecuencia se puede conocer la respuesta temporal que tiene un sistema ante cualquier forma que tenga un estímulo, no importando si es un escalón, un pulso o cualquier otra forma. Esto debido a que cualquier señal puede ser descompuesta en sus componentes sinusoidales [10]. Un ejemplo se muestra en la Fig. 1.3, donde una señal cuadrada es descompuesta en las sinusoidales que lo componen, entonces cualquier forma que tenga una señal puede ser representada como sumas de sinusoidales.

Estudiando la respuesta en frecuencia de sistemas biológicos, se ha encontrado que la quimiotaxis en *Escherichia coli* [11–15] y en *Rhodobacter sphaeroides* [16], así como la respuesta de la vía HOG en *Saccharomyces cerevisiae*, tienen un comportamiento de filtro pasa-banda, es decir, que responden a estímulos con una banda de frecuencias específicas y rechazan los estímulos con frecuencias altas y bajas. En otros sistemas, se ha encontrado

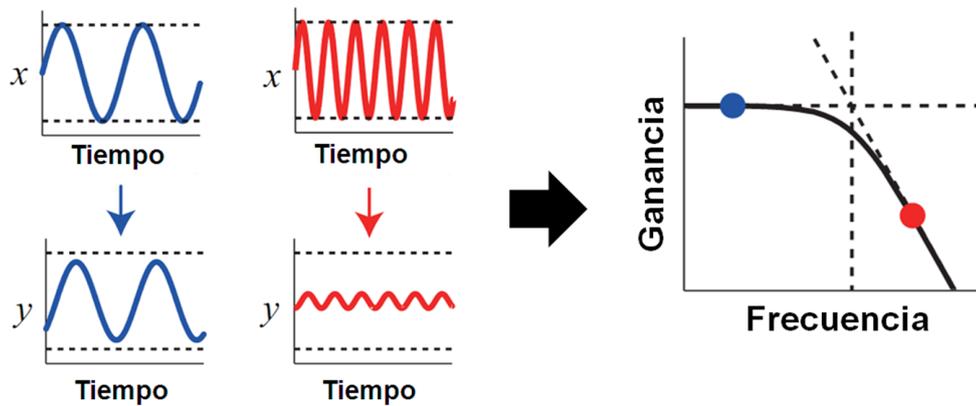


Figura 1.2: **Diagrama de ganancia de Bode.** El sistema es estimulado con una entrada  $x$ , a diferentes frecuencias, manteniendo una misma amplitud. El sistema responde con una salida  $y$ , con la misma frecuencia a la que fue estimulada pero con diferente amplitud. Las amplitudes son comparadas obteniendo una razón de la amplitud de salida con la de entrada y es graficada en función de la frecuencia. La intersección de las asíntotas formadas por las ganancias de altas y bajas frecuencias, indican la frecuencia de corte. Tomado y modificado de [9].

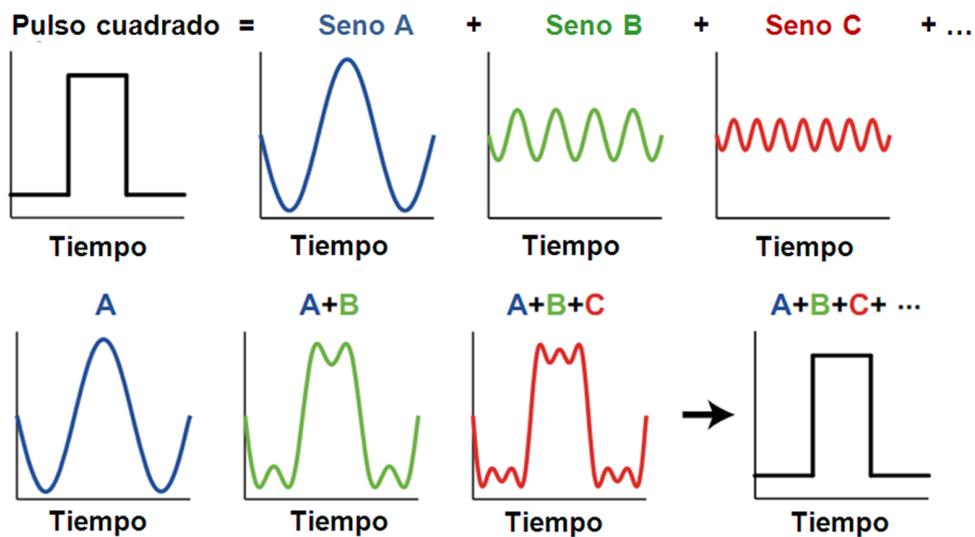


Figura 1.3: **Descomposición de una pulso en sinusoidales.** Un pulso cuadrado puede ser descompuesto en sinusoidales de diferentes frecuencias con diferentes amplitudes (arriba). De igual manera se puede volver a construir el pulso original a partir de las ondas sinusoidales (abajo). Tomado y modificado de [9].

que el comportamiento es de tipo pasa-bajas, como en la respuesta a cambios de la fuente de carbono en *S. cerevisiae* [17] y como en la respuesta del operón triptófano de *E. coli* [18].

En este trabajo se estudia la respuesta en frecuencia del operón *trp* en la bacteria de suelo Gram-positiva *Bacillus subtilis* y se compara con la bien estudiada enterobacteria Gram-negativa *E. coli*. Principalmente se compara el efecto que tienen los lazos de retroalimentación sobre la respuesta en frecuencia en ambas bacterias. En la siguiente sección se detalla el mecanismo para regular la síntesis de triptófano a través del operón *trp* de ambos sistemas biológicos.

## 1.1. Síntesis de triptófano en bacterias

Para que pueda subsistir una bacteria, ésta debe obtener sus nutrientes del exterior o producirlas ella misma. En el caso del aminoácido triptófano, *B. subtilis* y *E. coli* tienen la capacidad de transportarlo del medio extracelular, obtenerlo a partir de la degradación de proteínas o sintetizarlo mediante la activación de un grupo de genes organizados en lo que se conoce como el operón triptófano [19]. A continuación se describe como esta organizado el operón *trp* en ambas bacterias, cómo se lleva a cabo la síntesis de triptófano y cómo se regula esta síntesis.

### 1.1.1. Organización del operón *trp*

Existen diferencias en la organización de los genes del operón *trp* en *B. subtilis* y *E. coli*. En *E. coli*, cinco genes codifican para los siete dominios catalíticos necesarios en la biosíntesis de triptófano. Esto debido a que cuatro de los dominios son producto de dos genes fusionados, *trpG-D* y *trpC-F*. Estos cinco genes se encuentran organizados en un solo operón (Fig. 1.4) [19].

Los genes de los polipéptidos necesarios en la síntesis de triptófano en *B. subtilis* se encuentran distribuidos en dos operones, seis de ellos pertenecen al operón *trp*, que es un suboperón que pertenece al supraoperon aromático *aro* de 12 genes, que también está relacionada con la síntesis de otros aminoácidos aromáticos. El séptimo gen está ubicado en el operón del ácido fólico (Fig. 1.4) [19].

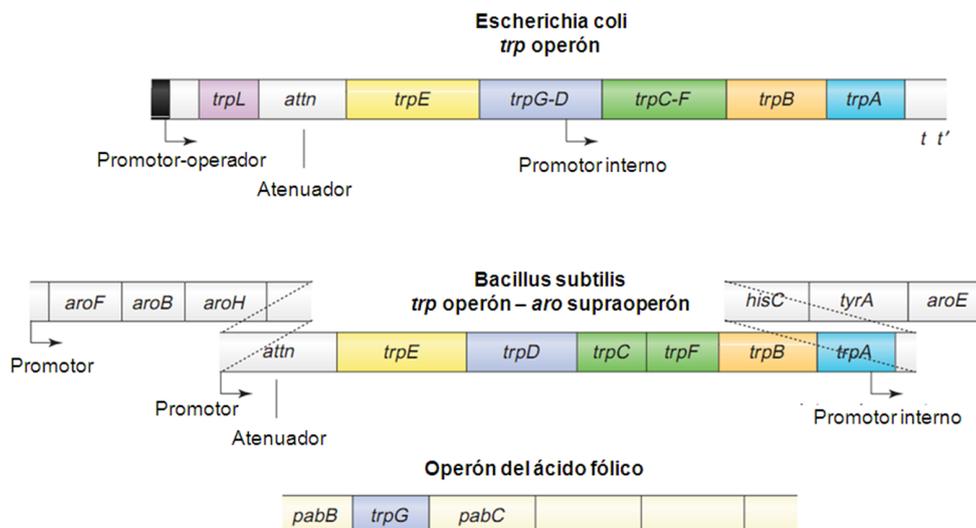


Figura 1.4: **Organización de los genes en el operón *trp*.** Genes involucrados en la síntesis de triptófano y su organización en *E. coli* (arriba) y *B. subtilis* (abajo). Se muestran en color para resaltar los genes fusionados en *E. coli* que son independientes en *B. subtilis*. Tomado y modificado de [19].

### 1.1.2. Ruta biosintética

La mayoría de los microorganismos que tienen la capacidad de sintetizar triptófano, usan la misma ruta biosintética, las mismas siete reacciones y los mismos siete dominios catalíticos [19]. La síntesis de triptófano requiere de un sustrato que es el corismato (forma aniónica del ácido corísmico) que también es usado para la síntesis de otros aminoácidos aromáticos. La primer reacción enzimática se realiza con un complejo enzimático formado por el producto de dos genes, el TrpE y el TrpG. Las siguientes tres reacciones son catalizadas por polipéptidos individuales, el TrpD, TrpF y TrpC. Las últimas dos reacciones son catalizadas por otro complejo enzimático compuesto de los polipéptidos TrpA y TrpB, para finalmente formar el triptófano (fig. 1.5) [20].

### 1.1.3. Regulación de la síntesis de triptófano

La síntesis de triptófano es cara energéticamente hablando, por lo que las bacterias han ideado formas para la regulación de su biosíntesis. A continuación se presentan los mecanismos de control, que actúan de manera simultánea, usados por *B. subtilis* y *E. coli* para regular la síntesis de triptófano.

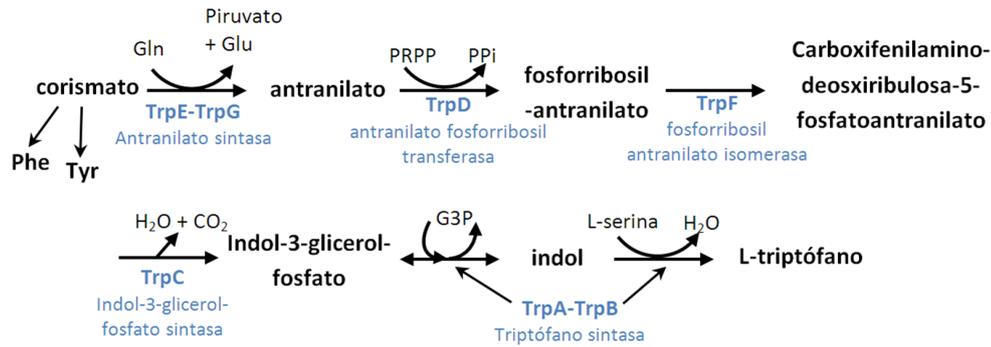


Figura 1.5: **Ruta de Biosíntesis de triptófano.** La síntesis de triptófano se lleva a cabo por medio de siete reacciones, catalizados por siete dominios enzimáticos. Tomado y modificado de [20] y [21].

### *Bacillus subtilis*

**Inhibición enzimática** En *B. subtilis*, la síntesis de triptófano comienza cuando no hay suficiente triptófano disponible intracelularmente o en el medio, entonces el operón *trp* y el operón del ácido fólico comienzan a transcribir los genes estructurales para posteriormente ser traducidos a las enzimas necesarias en la ruta biosintética del triptófano. Una vez que se satisface la demanda de triptófano, existe un mecanismo de control conocido como inhibición enzimática, en el que dos moléculas de triptófano se unen a la enzima antranilato sintasa para inhibir su acción catalítica, disminuyendo así la biosíntesis de triptófano.

**Atenuación de la transcripción** Existe otro mecanismo de control que actúa a nivel transcripcional, conocido como atenuación de la transcripción. El mRNA que se sintetiza a partir del operón *trp*, puede formar dos estructuras secundarias llamadas terminador y anti-terminador. Las estructuras están traslapadas por cuatro nucleótidos, por lo tanto son estructuras excluyentes. La proteína TRAP (Proteína de Atenuación del *trp* RNA) juega un papel esencial, porque de manera natural se forma preferentemente el anti-terminador, pero si la proteína TRAP llega a activarse por la unión de hasta 11 moléculas de triptófano, ésta se une al transcrito y se enrolla en la secuencia de mRNA para evitar la formación del anti-terminador y de esta manera favorecer la formación del terminador, evitando con esto la transcripción. Cuando nuevamente disminuye la concentración de triptófano, entra en juego un tercer operón, el operón *at* que codifica para la proteína anti-TRAP (AT), cuatro trímeros de AT se unen a la TRAP activada para inhibirla y permitir así la transcripción de los genes estructurales. Pero la síntesis de la proteína AT

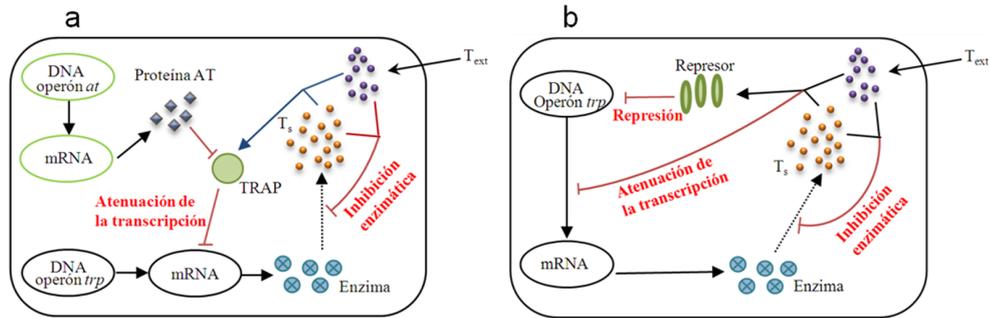


Figura 1.6: **Regulación de operón *trp*.** a) La regulación del operón *trp* en *B. subtilis* solo tiene dos lazos de retroalimentación, la atenuación de la transcripción y la inhibición enzimática. b) La regulación del operón *trp* en *E. coli* cuenta con tres lazos de retroalimentación, la represión, la atenuación de la transcripción y la inhibición enzimática. En ambos sistemas se asume que el triptófano externo (que se encuentra en el medio) es transportado de manera instantánea. Para más detalle consultar [19], [20] y [21].

esta mediada por el censado de  $tRNA^{Trp}$  no cargado. Cuando hay suficiente triptófano intracelular, la región líder del transcrito del operón forma una estructura secundaria llamada terminador, sin embargo cuando la concentración de triptófano está reducida, la cantidad de  $tRNA^{Trp}$  no cargado aumenta y ésta se une a la región líder que promueve la formación de un anti-terminador. Después de la región líder existe un gen de 10 codones llamado *rtpLP* que contiene tres codones para triptófano, entonces si no está cargado el  $tRNA^{Trp}$ , la traducción se para en uno de los tres codones exponiendo la secuencia Shine Delgarno del gen *rtpA* para que se traduzca la proteína AT. Una vez que se alcanzan los niveles deseados de triptófano, el gen *rtpLP* se traduce completamente llegando a su codón de paro, obstruyendo de esta manera la secuencia Shine Delgarno del gen *rtpA* [20]. Un esquema de la regulación de la síntesis de triptófano en *B. subtilis* puede verse en la Fig. 1.6a.

### *Escherichia coli*

**Represión** Existen dos mecanismos de regulación a nivel transcripcional. Uno es la represión, donde es necesaria la participación de la proteína represora que es activada por la unión de hasta dos moléculas de triptófano. Esta proteína activada puede unirse a uno de los tres operadores presentes en el promotor del operón *trp* inhibiendo de esta manera la síntesis de mRNA.

**Atenuación** El otro mecanismo de regulación es la atenuación de la transcripción, que se lleva a cabo mediante el censado de tRNA<sup>Trp</sup> no cargado. La región líder del transcrito contiene dos codones para triptófano. Cuando no hay triptófano (alta concentración de tRNA<sup>Trp</sup> no cargado) se forma una estructura en el mRNA llamada antiterminador, que permite la síntesis del transcrito. Cuando la concentración de triptófano es alta (baja concentración de tRNA<sup>Trp</sup> no cargado) se favorece la formación de la estructura anti-antiterminador y terminador que abortan la síntesis del transcrito.

**Inhibición enzimática** El operón *trp* en *E. coli* comparte el mismo mecanismo de inhibición enzimática con *B. subtilis*. El esquema sintetizado de la regulación en la biosíntesis de triptófano en *E. coli* se presenta en la Fig. 1.6b [19].

## 2

# Justificación

La respuesta en frecuencia es una herramienta que permite analizar dos características de la respuesta de un sistema biológico: amplitud y tiempo de respuesta. Además, se sabe que en teoría cualquier forma que tenga una señal puede ser descompuesta en sinusoidales con diferentes frecuencias y amplitudes, es decir, se puede obtener el espectro de una señal dada. Por esta razón, es importante estudiar la respuesta en frecuencia de un sistema biológico, porque si ésta se conoce entonces es posible conocer la respuesta temporal ante cualquier forma que tenga un estímulo, ya sea un escalón, rampa, u otras formas mas complejas.

Como se ha dicho anteriormente *B. subtilis* y *E. coli* son bacterias con características diferentes, pero que comparten mecanismos para regular el operón *trp*. Por lo tanto, es interesante hacer un estudio comparativo de los efectos que tienen los lazos de retroalimentación sobre la respuesta en frecuencia de ambos sistemas biológicos. Por lo que surgen las siguientes preguntas: ¿qué diferencias existen en tener dos o tres lazos de retroalimentación para regular la biosíntesis de un mismo aminoácido?, ¿tienen efectos similares los mismos lazos de retroalimentación sobre la respuesta en frecuencia de ambas bacterias?, ¿qué ventajas y desventajas ofrece tener una lazo más fuerte o más débil?

# 3

## Hipótesis

Los lazos de retroalimentación permiten responder adecuadamente al operón triptófano en *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli* ante estímulos de triptófano externo. Sin embargo, una alteración en la fuerza de los lazos afectan la amplitud y tiempo de respuesta de ambas bacterias.

# 4

## Objetivos

### 4.1. General

Estudiar el efecto de los lazos de retroalimentación sobre la respuesta en frecuencia del operón *trp* en *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli* ante estímulos de triptófano externo.

### 4.2. Particulares

Para cada una de las bacterias:

- Obtener la respuesta en frecuencia de una cepa silvestre.
- Evaluar y comparar los efectos sobre la respuesta en frecuencia cuando se reduce o aumenta la fuerza de cada lazo de retroalimentación .
- Estudiar el efecto de la ausencia de los lazos de retroalimentación sobre la respuesta en frecuencia.

# 5

## Métodos

En este trabajo se modificaron los modelos matemáticos no lineales de la dinámica del operón *trp* de *B. subtilis* y *E. coli* ya publicados [22, 23] para considerar el triptófano externo. Posteriormente, para obtener las funciones de transferencia de cada sistema, se linealizaron los modelos en el estado estacionario con una concentración dada de triptófano externo. Por último, se obtuvieron los diagramas de ganancia de Bode. Una descripción mas detallada del método se presenta a continuación.

### 5.1. Modelo matemático del operón *trp*

Para los modelos matemáticos que a continuación se presentan, la concentración de triptófano externo ( $T_{ext}$ ) fue tomado como entrada y la concentración de triptófano sintetizado ( $T_S$ ) como salida. La forma de considerar al  $T_{ext}$  fue inspirada en el trabajo de Bhartiya et al. [24].

#### 5.1.1. Modelo en *B. subtilis*

El modelo de Ecuaciones Diferenciales Ordinarias no lineales del operón *trp* en *B. subtilis* se obtuvo de [22]. En este modelo, la dinámica de las concentraciones de mRNA ( $M$ ), de la enzima antranilato sintasa ( $E$ ), de la proteína AT ( $A$ ) y del triptófano sintetizado ( $T_S$ ), son representados con las siguientes ecuaciones:

$$\dot{M} = k_M DP_A(T_T, A) - (\lambda_M + \mu)M, \quad (5.1)$$

$$\dot{E} = \frac{1}{2}k_E M - (\lambda_E + \mu)E, \quad (5.2)$$

$$\dot{T}_S = k_{T_S} EP_I(T_T) - \rho \frac{T_S}{K_\rho + T_S} - \mu T_S, \quad (5.3)$$

$$\dot{A} = \beta \Omega(T_T) \Theta(T_T) - \mu A, \quad (5.4)$$

$$T_T = T_S + T_{ext}. \quad (5.5)$$

La concentración de triptófano intracelular total ( $T_T$ ), es la suma algebraica de  $T_S$  y de  $T_{ext}$ , este último se considera que es transportado de manera instantánea a la célula. El parámetro  $k_M$  es la tasa de transcripción,  $k_E$  es la tasa de traducción,  $k_{T_S}$  es la tasa de síntesis de triptófano y  $\beta$  es la tasa de síntesis de la proteína AT. El parámetro  $D$  es la concentración del promotor *trp*. Los parámetros  $\lambda_M$  y  $\lambda_E$  indican la tasa de degradación de mRNA y de la enzima, respectivamente. La concentración de las biomoléculas producidas puede disminuir debido a la dilución por la división celular,  $\mu$ . El factor  $\frac{1}{2}$  es porque se requieren dos polipéptidos del gen *trpE* para formar la enzima antranilato sintasa. El término  $\rho \frac{T_S}{K_\rho + T_S}$ , es el consumo de triptófano usado en la síntesis de proteínas, donde  $\rho$  es la tasa de consumo máximo de triptófano y  $K_\rho$  es la constante de saturación del consumo de triptófano. Los mecanismos de regulación en el operón *at* están dados por las funciones  $\Omega(T_T)$  y  $\Theta(T_T)$ . Las funciones  $P_A(T_T, A)$  y  $P_I(T_T)$  representan los mecanismos de atenuación de la transcripción y la inhibición enzimática del operón *trp*, respectivamente. Las funciones de regulación del operón *at* y del operón *trp* están definidas por:

$$P_A(T_T, A) = \frac{K_D}{K_D + \left(\frac{T_T}{K_T + T_T}\right)^{11} \left(\frac{K_A}{K_A + A}\right)^4 Y_T}, \quad (5.6)$$

$$P_I(T_T) = \left(\frac{K_Q}{K_Q + T_T}\right)^2, \quad (5.7)$$

$$\Omega(T_T) = \frac{K}{K + T_T}, \quad (5.8)$$

$$\Theta(T_T) = \frac{1 + 3\alpha \frac{T_T}{K_G + T_T} + 3\alpha \left(\frac{T_T}{K_G + T_T}\right)^2}{\left(1 + \alpha \frac{T_T}{K_G + T_T}\right)^3}. \quad (5.9)$$

Tabla 5.1: Parámetros del modelo del operón *trp* en *B. subtilis* [22].

Parámetro	Valor	Parámetro	Valor
$k_M$	$16 \text{ min}^{-1}$	$K_\rho$	$10 \text{ } \mu\text{M}$
$k_E$	$20 \text{ min}^{-1}$	$K_D$	$1,2 \times 10^{-4} \text{ } \mu\text{M}$
$k_{T_S}$	$7,3 \times 10^4 \text{ min}^{-1}$	$K_T$	$0,4 \text{ } \mu\text{M}$
$\beta$	$6 \times 10^{-4} \text{ } \mu\text{Mmin}^{-1}$	$K_A$	$0,6 \text{ } \mu\text{M}$
$D$	$3,3 \times 10^{-4} \text{ } \mu\text{M}$	$Y_T$	$8 \times 10^{-2} \text{ } \mu\text{M}$
$\lambda_M$	$0,53 \text{ min}^{-1}$	$K_Q$	$4,1 \text{ } \mu\text{M}$
$\lambda_E$	$0,0 \text{ min}^{-1}$	$K$	$2 \times 10^{17} \text{ } \mu\text{M}$
$\mu$	$6 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$	$\alpha$	95
$\rho$	$24,3 \text{ } \mu\text{Mmin}^{-1}$	$K_G$	$1,6 \text{ } \mu\text{M}$

$K_D$  es la constante de disociación de la proteína TRAP activa y la región líder naciente en el operón *trp*,  $K_T$  representa la constante de disociación entre una molécula de triptófano y un sitio vacío en la proteína TRAP,  $K_A$  es la constante de disociación entre la proteína AT y un sitio de la molécula TRAP activa,  $Y_T$  es la concentración total de la proteína TRAP,  $K_Q$  representa la constante de disociación entre una molécula de triptófano y su sitio de unión en la enzima antranilato sintasa. El parámetro  $K$  equivale a  $G_{Tot}K_G/K_Z$ , donde  $G_{Tot}$  es la concentración total de tRNA<sup>*Trp*</sup>,  $K_G$  es la constante de disociación del complejo tRNA<sup>*trp*</sup> no cargado y una molécula de triptófano y  $K_Z$  es la constante de disociación del complejo región líder del operón *at* con un tRNA<sup>*Trp*</sup> no cargado. El parámetro  $\alpha$  es la razón de  $G_{Tot}$  entre la constante de disociación que hay entre el codón *trp* y el tRNA<sup>*Trp*</sup> cargado. Los valores de los parámetros pueden ser consultados en la Tabla 5.1 [22].

### 5.1.2. Modelo en *E. coli*

El modelo de EDOs no lineales de la dinámica del operón *trp* en *E. coli* se basó en [23]. A diferencia del modelo en *B. subtilis*, en *E. coli* solamente se contemplan tres variables,  $M$ ,  $E$  y  $T_S$ , que son modelados con las siguientes ecuaciones:

$$\dot{M} = k_M D P_R(T_T) P_A(T_T) - (\lambda_M + \mu) M, \quad (5.10)$$

$$\dot{E} = \frac{1}{2} k_E M - (\lambda_E + \mu) E, \quad (5.11)$$

$$\dot{T}_S = k_{T_S} E P_I(T_T) - \rho \frac{T_S}{K_\rho + T_S} - \mu T_S. \quad (5.12)$$

Donde  $k_M$ ,  $k_E$ ,  $k_{T_S}$ ,  $D$ ,  $\lambda_M$ ,  $\lambda_E$ ,  $\mu$  y el término  $\rho \frac{T_S}{K_\rho + T_S}$  se definen de igual manera que en el modelo de *B. subtilis*. Las funciones  $P_R(T_T)$ ,  $P_A(T_T)$  y  $P_I(T_T)$ , representan los tres mecanismo de regulación que existen en el operón *trp* en *E. coli*: represión, atenuación de la transcripción e inhibición enzimática. Las funciones de regulación están definidas por:

$$P_R(T_T) = \frac{1}{\left(1 + \frac{RT_2}{K^{(3)}}\right) \left(1 + \frac{RT_2}{K^{(1)}} + \frac{RT_2}{K^{(2)}} + \frac{k_C (RT_2)^2}{K^{(1)} K^{(2)}}\right)}, \quad (5.13)$$

$$P_A(T_T) = \frac{1 + 2\gamma \frac{T_T}{K_B + T_T}}{\left(1 + \gamma \frac{T_T}{K_B + T_T}\right)^2}, \quad (5.14)$$

$$P_I(T_T) = \frac{K_I^n}{T_T^n + K_I^n}. \quad (5.15)$$

$RT_2$  representa la concentración de represor unido con dos moléculas de triptófano, por lo tanto es función de  $T_T$ ,  $RT_2 = R_T \left(\frac{T_T}{T_T + K_R}\right)^2$ , donde  $R_T$  es la concentración total de represores y  $K_R$  es la constante de saturación de la reacción para formar el  $RT_2$ .  $K^{(i)}$  es la constante de disociación de los represores en el operador, donde  $i = 1, 2, 3$ ,  $k_C$  indica la cooperatividad que existe entre los operadores cuando los represores están unidos a ellos,  $\gamma$  es una constante asociada a la fuerza del lazo de retroalimentación en la atenuación de la transcripción,  $K_B$  es la tasa de disociación del complejo triptófano-tRNA<sup>Trp</sup>,  $K_I$  es la constante de inhibición enzimática y  $n$  es el coeficiente de Hill. Una explicación amplia de cómo se desarrolló el modelo puede consultarse en [23]. Los valores de los parámetros se muestran en la Tabla 5.2.

Tabla 5.2: Parámetros del modelo del operón *trp* en *E. coli* [23].

Parámetro	Valor	Parámetro	Valor
$k_M$	$26 \text{ min}^{-1}$	$K_\rho$	$1,66 \mu M$
$k_E$	$20,7 \text{ min}^{-1}$	$R_T$	$0,664 \mu M$
$k_{T_S}$	$300 \text{ min}^{-1}$	$K_R$	$159,4 \mu M$
$D$	$3 \times 10^{-3} \mu M$	$k_c$	40
$\lambda_M$	$0,69 \text{ min}^{-1}$	$\gamma$	18,8
$\lambda_E$	$0,0 \text{ min}^{-1}$	$K_B$	$2 \mu M$
$\mu$	$0,013 \text{ min}^{-1}$	$K_I$	4.15
$\rho$	$222,5 \mu M \text{ min}^{-1}$	$n$	1,2

## 5.2. Linealización

La linealización de los modelos se realizó alrededor del estado estacionario. El estado estacionario depende de los parámetros y de la concentración de  $T_{ext}$ . En las siguientes secciones se presentas detalladamente como se obtuvo el estado estacionario y como se realizó la linealización en cada sistema.

### 5.2.1. Estado estacionario

El estado estacionario corresponde al valor que toman las variables cuando la derivada con respecto al tiempo del sistema de ecuaciones 5.1-5.5 y 5.10-5.12 son igual a cero. Por lo tanto, el estado estacionario para el operón *trp* en *B. subtilis* se obtiene resolviendo el siguiente sistema de ecuaciones:

$$M^* = \frac{k_M DP_A(T_T, A^*)}{\lambda_M + \mu}, \quad (5.16)$$

$$E^* = \frac{1}{2} \frac{k_E M^*}{\lambda_E + \mu}, \quad (5.17)$$

$$A^* = \frac{\beta}{\mu} \Omega(T_T) \Theta(T_T), \quad (5.18)$$

$$k_{T_S} E^* P_I(T_T) = \rho \frac{T_S^*}{K_\rho + T_S^*} + \mu T_S^*. \quad (5.19)$$

Donde  $M^*$ ,  $E^*$ ,  $A^*$  y  $T_S^*$  son valores en el estado estacionario. Considerando a  $T_{ext}$  constante,  $T_T$  solo depende de  $T_S^*$ ,  $T_T = T_S^* + T_{ext}$ , entonces la ecuación (5.18) solo depende de  $A^*$  y  $T_S^*$ . Sustituyendo (5.18) y  $T_T$  en la función  $P_A(T_T, A^*)$  de (5.16), luego (5.16) en (5.17). Posteriormente se sustituye (5.17) en (5.19), encontramos que la ecuación (5.19) solo depende de  $T_S^*$ . El lado izquierdo de la ecuación 5.19 es una función decreciente y la del lado derecho es creciente, por lo tanto, en la intersección se encuentra el valor de  $T_S^*$ . Una vez que se conoce  $T_S^*$ , el valor en el estado estacionario de las demás variables, de las ecuaciones (5.16-5.18), quedan definidas automáticamente.

Para el modelo de *E. coli* se siguió la misma mecánica, definiendo las siguientes ecuaciones para los estados estacionarios de las tres variables:

$$M^* = \frac{k_M D P_R(T_T) P_A(T_T)}{\lambda_M + \mu}, \quad (5.20)$$

$$E^* = \frac{1}{2} \frac{k_E M^*}{\lambda_E + \mu}, \quad (5.21)$$

$$k_{T_S} E^* P_I(T_T) = \rho \frac{T_S^*}{K_\rho + T_S^*} + \mu T_S^*. \quad (5.22)$$

Cuando se considera  $T_{ext} = 0$  los valores de los estados estacionarios, en ambos sistemas, corresponden a los reportados en [22, 23].

### 5.2.2. Modelos lineales

Un sistema lineal es representado como:

$$\dot{\mathbf{x}} = \mathbf{A}\mathbf{x} + \mathbf{B}\mathbf{u}. \quad (5.23)$$

Donde  $\mathbf{x}$  es un vector de las variables de estado,  $\mathbf{u}$  es el vector de entrada,  $\mathbf{A}$  es la matriz jacobiana y  $\mathbf{B}$  la matriz de entrada [6, 10]. Los coeficientes de la matriz  $\mathbf{A}$  y  $\mathbf{B}$  evaluados en el estado estacionario están definidas por:

$$a_{i,j} = \left. \frac{\partial f_i(\mathbf{x}, \mathbf{u})}{\partial x_j} \right|_{\mathbf{x}^*, \mathbf{u}^*}, \quad (5.24)$$

$$b_i = \left. \frac{\partial f_i(\mathbf{x}, \mathbf{u})}{\partial u} \right|_{\mathbf{x}^*, \mathbf{u}^*}. \quad (5.25)$$

Donde  $f_i$  es una función ( $\dot{M}$ ,  $\dot{E}$ ,  $\dot{T}_S$  o  $\dot{A}$ ),  $x_j$  es una variable ( $M$ ,  $E$ ,  $T_S$  o  $A$ ). En  $a_{i,j}$ , los subíndices indican la fila  $i$  y la columna  $j$ . Por lo tanto, la matriz A y B, del modelo de *B. subtilis*, quedan definidas como:

$$A = \begin{pmatrix} \frac{\partial \dot{M}}{\partial M} & \frac{\partial \dot{M}}{\partial E} & \frac{\partial \dot{M}}{\partial T_S} & \frac{\partial \dot{M}}{\partial A} \\ \frac{\partial \dot{E}}{\partial M} & \frac{\partial \dot{E}}{\partial R} & \frac{\partial \dot{E}}{\partial T_S} & \frac{\partial \dot{E}}{\partial A} \\ \frac{\partial \dot{T}_S}{\partial M} & \frac{\partial \dot{T}_S}{\partial E} & \frac{\partial \dot{T}_S}{\partial T_S} & \frac{\partial \dot{T}_S}{\partial A} \\ \frac{\partial \dot{A}}{\partial M} & \frac{\partial \dot{A}}{\partial E} & \frac{\partial \dot{A}}{\partial T_S} & \frac{\partial \dot{A}}{\partial A} \end{pmatrix}_{\mathbf{x}^*, \mathbf{u}^*} = \begin{pmatrix} a_{11} & a_{12} & a_{13} & a_{14} \\ a_{21} & a_{22} & a_{23} & a_{24} \\ a_{31} & a_{32} & a_{33} & a_{34} \\ a_{41} & a_{42} & a_{43} & a_{44} \end{pmatrix}_{\mathbf{x}^*, \mathbf{u}^*}, \quad (5.26)$$

$$B = \begin{pmatrix} \frac{\partial \dot{M}}{\partial T_{ext}} \\ \frac{\partial \dot{E}}{\partial T_{ext}} \\ \frac{\partial \dot{T}_S}{\partial T_{ext}} \\ \frac{\partial \dot{A}}{\partial T_{ext}} \end{pmatrix}_{\mathbf{x}^*, \mathbf{u}^*} = \begin{pmatrix} b_1 \\ b_2 \\ b_3 \\ b_4 \end{pmatrix}_{\mathbf{x}^*, \mathbf{u}^*}. \quad (5.27)$$

La matriz A y B para el modelo de *E. coli* puede consultarse en el Apéndice A.

### 5.3. Función de transferencia

La función de transferencia es usada para construir de forma analítica la respuesta en frecuencia del sistema a partir de las ecuaciones lineales. Para el análisis en frecuencia se debe aplicar la transformada de Laplace al sistema de ecuaciones lineales y trabajar en el dominio de  $s = i\omega$ , quedando definida la función de transferencia de la siguiente manera:

$$H(s) = \frac{Y(s)}{U(s)}. \quad (5.28)$$

Donde  $Y(s)$  y  $U(s)$  son la transformada de Laplace de la salida y de la entrada, respectivamente [6, 10].

Para construir el diagrama de ganancia de Bode, es necesario obtener la magnitud en decibeles de la función de transferencia, como se indica en la siguiente ecuación:

$$G_{dB} = 20 \log_{10}(|H(s)|). \quad (5.29)$$

Las funciones de transferencia que se obtuvieron para los modelos del operón *trp* en *B. subtilis* ( $H_{Bs}$ ) y en *E. coli* ( $H_{Ec}$ ) fueron:

$$H_{Bs}(s) = \frac{b_3(s - a_{11})(s - a_{22})(s - a_{44}) + a_{32}a_{21}b_1(s - a_{44}) + a_{32}aa_{21}a_{14}b_4}{(s - a_{11})(s - a_{22})(s - a_{33})(s - a_{44}) - a_{32}a_{21}a_{13}(s - a_{44}) - a_{32}a_{21}a_{14}a_{43}}, \quad (5.30)$$

$$H_{Ec}(s) = \frac{b_3(s - a_{11})(s - a_{22}) + a_{32}a_{21}b_1}{(s - a_{11})(s - a_{22})(s - a_{33}) - a_{32}a_{21}a_{13}}. \quad (5.31)$$

En el apéndice A se detalla paso a paso la obtención de las funciones de transferencia.

# 6

## Resultados

En esta sección se presentan los resultados que se obtuvieron al resolver numéricamente en MATLAB (MathWorks) todas las ecuaciones.

### 6.1. Efecto regulador del operón *trp*

Para observar el efecto que tiene el  $T_{ext}$  sobre  $T_S$ . Se resolvieron las ecuaciones no lineales del operon *trp* de *B. subtilis* (Ec. 5.1-5.5) y de *E. coli* (Ec. 5.10-5.12). Al considerar la concentración de  $T_{ext}$  en  $0 \mu\text{M}$ , la concentración de  $T_S$  alcanzada en el equilibrio es máxima ( $T_{S\_max}$ ). Al aumentar la concentración de  $T_{ext}$ , se observa el efecto regulador del operón *trp*, debido a que la concentración de  $T_S$  disminuye. El efecto regulador es muy similar en *B. subtilis* (Fig. 6.1) y *E. coli* (Fig. 6.2). Las gráficas fueron normalizadas para cada bacteria, tomando como base a  $T_{S\_max} = 1$ .

Otra forma de ver el resultado obtenido en la Fig. 6.1 y 6.2, es graficar el valor en el estado estacionario que alcanza  $T_S$  como función de  $T_{ext}$ . Se observa la disminución de  $T_S$  al aumentar  $T_{ext}$  y una región lineal que va desde  $T_{ext} = 0$  hasta  $T_{ext} = 1$  aproximadamente (Fig. 6.3). Ésta región lineal es importante, porque al linealizar se busca que el modelo lineal, sea lo más parecido posible al modelo no lineal en las vecindades del estado estacionario.

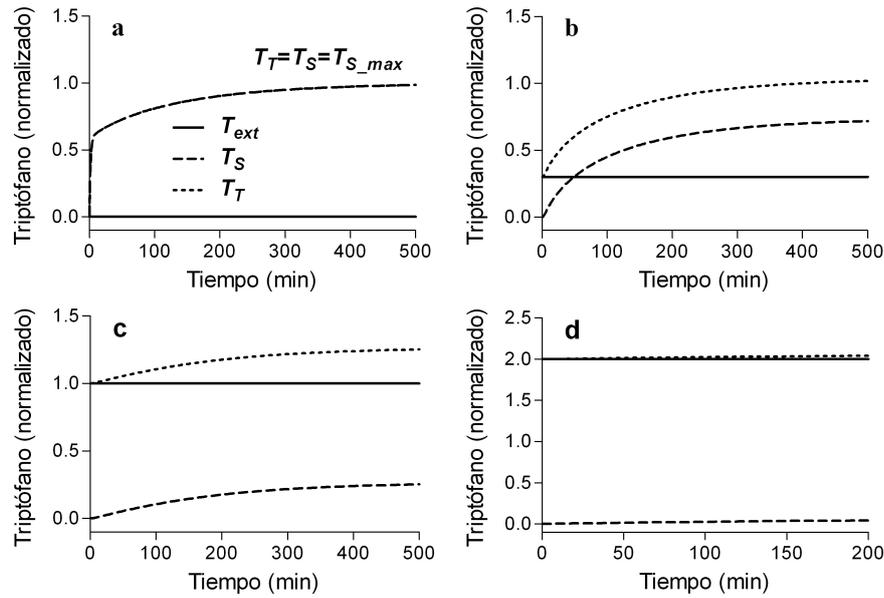


Figura 6.1: **Influencia en la síntesis de triptófano en *B. subtilis* debido a  $T_{ext}$ .** a) En ausencia de  $T_{ext}$ , la síntesis de triptófano es máxima ( $T_{S\_max}$ ) y  $T_T$  es solo contribución de  $T_S$ . Cuando aumenta la concentración de  $T_{ext}$  la síntesis de  $T_S$  disminuye como en b) y c), entonces  $T_T$  es contribución de  $T_S$  y de  $T_{ext}$ . d) Sin embargo, cuando la concentración de  $T_{ext}$  es muy alta, por ejemplo dos veces el valor de  $T_{S\_max}$ ,  $T_S$  disminuye casi a cero, por lo que  $T_T$  es casi exclusivamente contribución de  $T_{ext}$ .

## 6.2. Modelos linealizados

Después de encontrar que el operón *trp* regula la síntesis de triptófano en presencia de  $T_{ext}$ , el siguiente paso fue linealizar los modelos y compararlos con los modelos no lineales con el fin de validar la linealización. Como se observa en la Fig. 6.3, existe una región amplia de linealidad, que va desde  $T_{ext} = 0$  hasta  $T_{ext} = 1$  aproximadamente. Por lo tanto, se decidió linealizar alrededor de  $T_{ext} = 0,3$ . Posteriormente, se simuló una perturbación al minuto 5 sobre la concentración de  $T_S$  para el sistema lineal y no lineal en el estado estacionario. Los resultados muestran que el modelo lineal y no lineal tienen un comportamiento dinámico muy parecido cuando se perturba  $T_S$ . Con una perturbación de hasta  $\Delta T_S = \pm 0,3$ , la evolución temporal de la respuesta es similar en ambos modelos, por lo cual es confiable usar los modelos lineales en el análisis del efecto de los lazos de retroalimentación sobre la respuesta en frecuencia. Los resultados en *B. subtilis* (Fig. 6.4) y *E. coli* (Fig. 6.5) son muy parecidos y la linealización en ambos casos es válida.

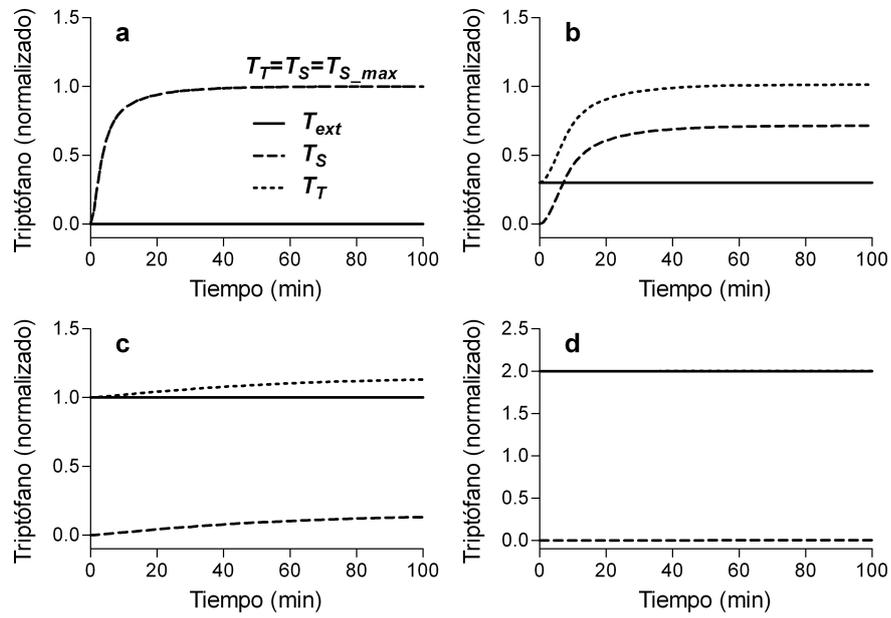


Figura 6.2: **Influencia en la síntesis de triptófano en *E. coli* debido a  $T_{ext}$ .** La influencia que ejerce la presencia de  $T_{ext}$  en la síntesis de  $T_S$  en el operón *trp* de *E. coli* tienen el mismo comportamiento que en el del *B. subtilis* (ver Fig. 6.1).

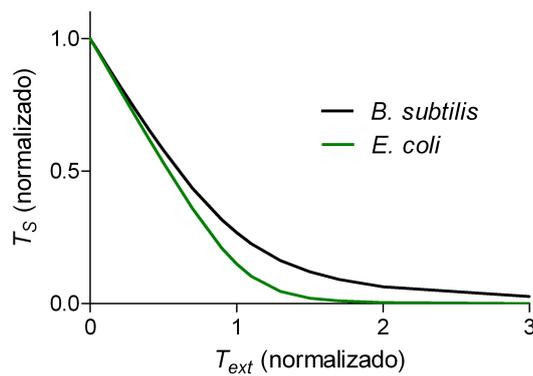


Figura 6.3:  $T_S$  en función de  $T_{ext}$ . La disminución de  $T_S$  debido a la presencia de  $T_{ext}$  es lineal hasta una concentración cercana a  $T_{ext} = 1$ . Cuando  $T_{ext} > 1$  la disminución de  $T_S$  tiende a cero. Sin embargo, La concentración de  $T_S$  disminuye más en presencia de  $T_{ext}$  en *E. coli* que en *B. subtilis*.

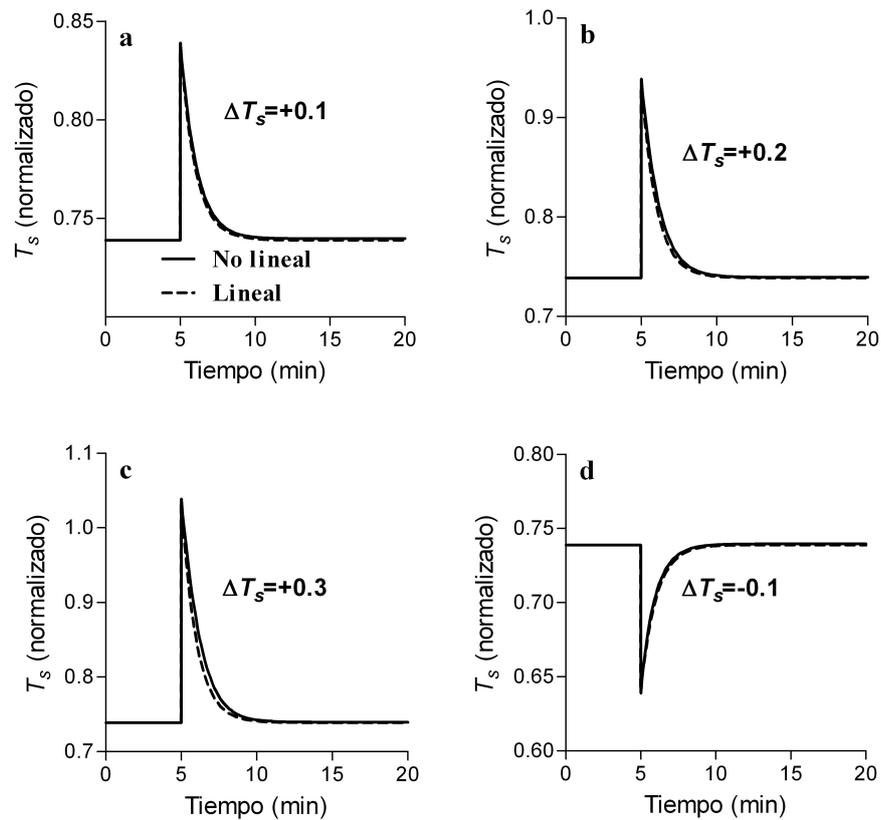


Figura 6.4: Respuesta al impulso de los modelos lineal y no lineal en *B. subtilis*. Con un impulso de a)  $\Delta T_S = 0,1$ , b)  $\Delta T_S = 0,2$ , c)  $\Delta T_S = 0,3$  on incluso un impulso negativo d)  $\Delta T_S = -0,1$ , la respuesta temporal en el modelo lineal y no lineal son muy parecidos.

### 6.3. Análisis del efecto de los lazos de retroalimentación sobre la respuesta en frecuencia

En esta sección se muestran las respuestas en frecuencias de ambos sistemas biológicos analizados en este trabajo. Primero se presentan resultados para el operon *trp* en *B. subtilis* y posteriormente los resultados para *E. coli*.

#### 6.3.1. Análisis en el operón *trp* de *B. subtilis*

Se siguieron dos estrategias para obtener la respuesta en frecuencia del operón *trp* en *B. subtilis*. Una de ellas consistió en hacer más fuerte alguno de los lazos de retroalimentación. La otra estrategia fue disminuir la fuerza de los lazos. Los resultados obtenidos fueron

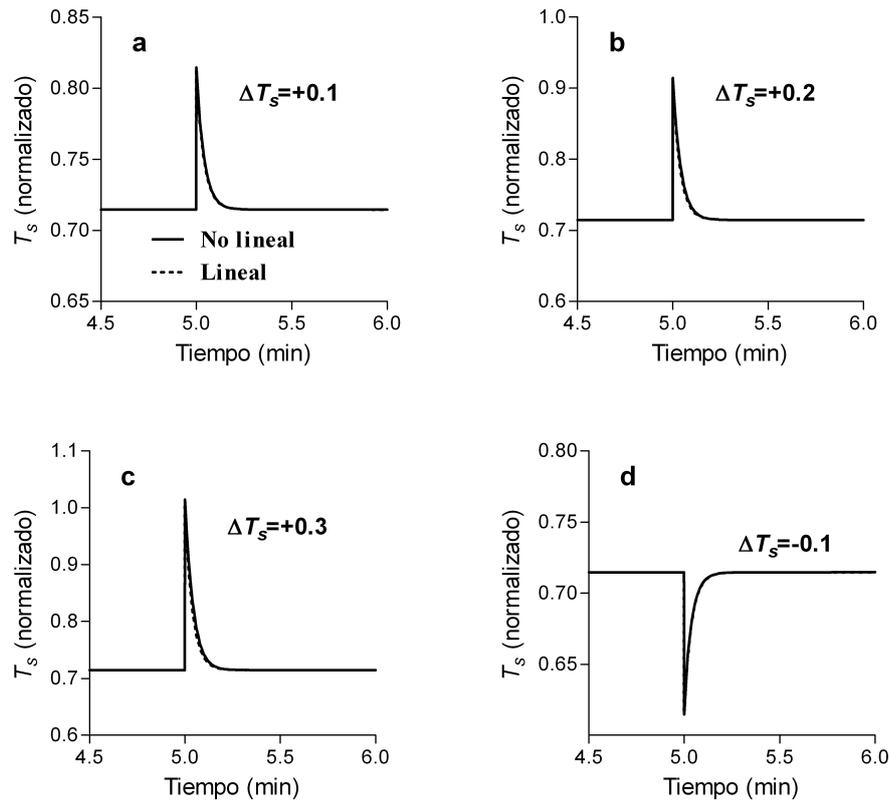


Figura 6.5: **Respuesta al impulso de los modelos lineal y no lineal en *E. coli*.** Los resultados en *E. coli* son similares a los obtenidos en *B. subtilis*, por lo que la descripción de la Fig. 6.4 es la misma que para esta figura.

graficados en un diagrama de ganancia de Bode junto con la respuesta en frecuencia que tiene una cepa silvestre.

En el caso del mecanismo de atenuación de la transcripción. Para hacerlo más fuerte, el parámetro  $K_D$  fue disminuido en dos (fuerte (+)) y cinco (fuerte (++)) ordenes de magnitud de su valor original. Para hacer más débil el lazo, se disminuyó en dos (débil(-)) y cinco (débil(--)) ordenes de magnitud el mismo parámetro. La misma estrategia fue adoptada para los demás experimentos donde se hace más fuerte o más débil alguno de los lazos de retroalimentación, cambiando en este caso el parámetro correspondiente.

Cuando el lazo de atenuación se hace débil, la frecuencia de corte se recorre a frecuencias bajas, indicando con esto una lenta respuesta del sistema (Fig. 6.6). Sin embargo al hacer el lazo más fuerte, la frecuencia de corte avanza a frecuencias altas, pero la ganancia disminuye. Este efecto se observa mejor cuando se realizan simulaciones

temporales del modelo no lineal (recordar que el modelo se linealizó para encontrar la respuesta en frecuencia y proporciona información del comportamiento del sistema completo en el estado estacionario). La simulación temporal se realizó colocando una perturbación en forma de escalón (estímulo de frecuencia baja) al sistema en el estado estacionario en el minuto 10, de  $T_{ext} = 0,3T_{S,max}$  a  $T_{ext} = 0,5T_{S,max}$ . Se observa que la respuesta de la cepa silvestre es más rápida que las cepas con el lazo de atenuación fuerte o débil. Se aprecia en la respuesta temporal de la cepa con el lazo fuerte (++) , que existe una respuesta rápida al momento de iniciar la perturbación, sin embargo, la amplitud de la respuesta es insuficiente para responder al estímulo, entonces aparece una respuesta más lenta que tiene la magnitud suficiente para llegar al estado estacionario, pero con un tiempo muy grande. Este efecto temporal puede ser observado en la gráfica de la respuesta en frecuencia para la cepa con el lazo fuerte (++) , donde se aprecian dos pendientes, por lo tanto, podemos asociar dos frecuencias de corte, uno que corresponde a la respuesta rápida con ganancia pequeña, que se observa a frecuencias altas, y la otra frecuencia de corte que esta a bajas frecuencias con una ganancia más grande, que corresponde a la respuesta lenta (Fig. 6.6).

El efecto que tiene el lazo de inhibición enzimática sobre la respuesta en frecuencia en *B. subtilis* también fue evaluado. El parámetro  $K_Q$  fue modificado de igual manera que el parámetro  $K_D$  para hacer más fuerte o más débil el lazo de inhibición. Cuando el lazo de inhibición es fuerte, la frecuencia de corte se recorre a frecuencias altas y la ganancia disminuye. Estos efectos pueden observarse muy bien en la respuesta temporal, donde se aprecia que ante la entrada de un escalón en la concentración de  $T_{ext}$ , la cepa con el lazo fuerte responde más rápido que la cepa silvestre, pero la magnitud es casi la mitad del estímulo. Sin embargo, con la cepa que tiene el lazo más débil, se observa que la respuesta ante el escalón es mucho más lenta, esto asociado a la frecuencia de corte que se recorre a frecuencias bajas con esta cepa. Otro efecto notable es que la ganancia, y por lo tanto la magnitud de la respuesta de la cepa con el lazo de inhibición debilitado disminuyen (Fig. 6.7).

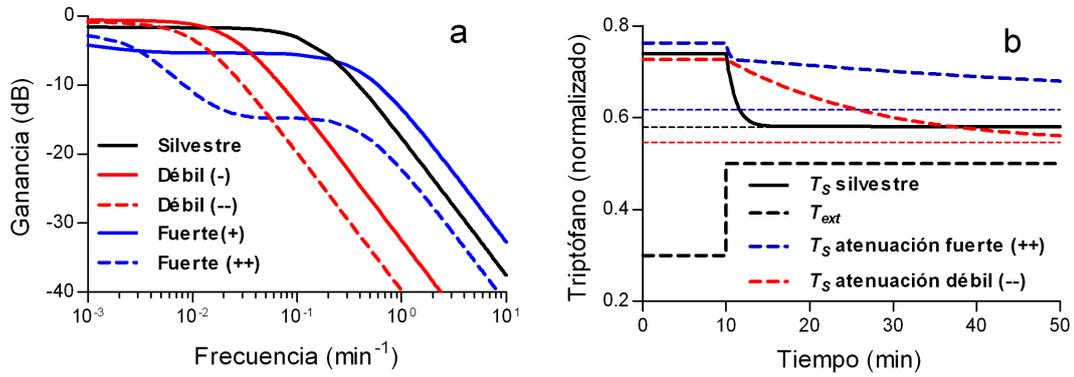


Figura 6.6: **Influencia del mecanismo de atenuación de la transcripción sobre la respuesta en frecuencia y la respuesta temporal en *B. subtilis*.** a) Respuesta en frecuencia de una cepa silvestre comparada con la de cepas que tienen la fuerza del lazo de atenuación aumentado ( $K_D$  disminuido en dos (fuerte +) y cinco (fuerte ++) ordenes de magnitud) y disminuido ( $K_D$  aumentado en dos (débil (-)) y cinco (débil (--)) ordenes de magnitud). Las cepas con la fuerza de lazo aumentado, disminuyen la ganancia y la frecuencia de corte se cambia a frecuencias altas. Las cepas con el lazo debilitado, mantienen la ganancia pero disminuyen la frecuencia de corte. b) Respuesta temporal del modelo no lineal ante una entrada escalón en  $T_{ext}$  al minuto 10 desde  $T_{ext} = 0,3T_{S,max}$  hasta  $T_{ext} = 0,5T_{S,max}$ , de la cepa silvestre, cepa con el lazo fuerte (++) y de la cepa con el lazo débil (--). La cepa silvestre responde más rápido que las cepas con el lazo debilitado e incluso más rápido que la cepa con el lazo fuerte. La cepa con el lazo fuerte responde rápido al inicio, pero la magnitud de la respuesta es insuficiente y finalmente responde lento con la magnitud adecuada. Las líneas punteadas delgadas indican el nuevo estado estacionario al que debe llegar el sistema después de aplicar un escalón. Normalizada con la concentración de  $T_{S,max}$  que cada cepa alcanza.

### 6.3.2. Análisis en el operón *trp* de *E. coli*

El siguiente experimento fue variar la fuerza de los lazos de retroalimentación negativa para el sistema de *E. coli*. La estrategia utilizada fue la misma que en los experimentos para *B. subtilis*. Se aumentaron o disminuyeron en dos y cinco ordenes de magnitud los parámetros  $K_R$ ,  $K_B$  y  $K_I$  para debilitar o aumentar la fuerza de los mecanismos de represión de la transcripción, atenuación de la transcripción e inhibición enzimática, respectivamente.

En las cepas con la fuerza del lazo de represión disminuido en dos y cinco ordenes de magnitud, la frecuencia de corte se recorre a frecuencias bajas pero en ambas cepas

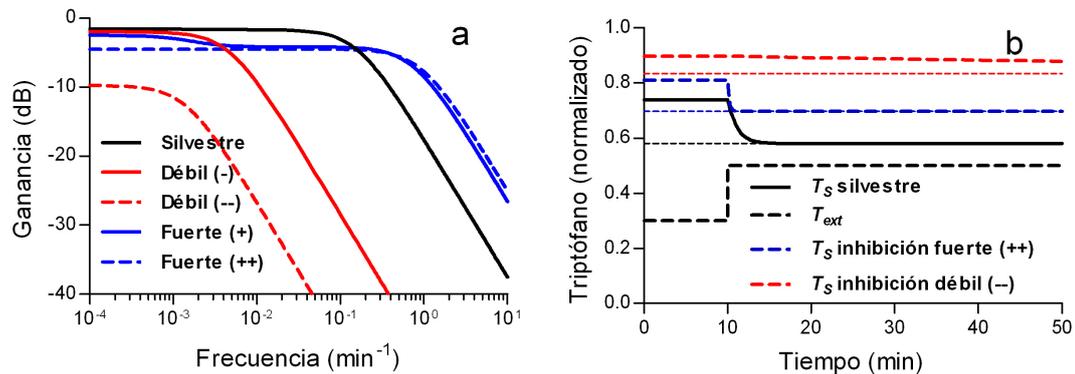


Figura 6.7: **Influencia del mecanismo de inhibición enzimática sobre la respuesta en frecuencia y la respuesta temporal en *B. subtilis*.** a) Respuesta en frecuencia de una cepa silvestre y de cepas con la fuerza del lazo de atenuación aumentado y disminuido. Para obtener las cepas mutantes,  $K_Q$  fue modificado como  $K_D$  en la Fig. 6.6. La cepas con el lazo fuerte aumentan la frecuencia de corte, pero disminuyen la ganancia. Las cepas con el lazo débil, disminuyen la frecuencia de corte y disminuyen la ganancia. b) Respuesta temporal del modelo no lineal realizada como en la Fig. 6.6 para mutantes con el lazo fuerte y débil. La cepa con el lazo fuerte responde rápido pero con una amplitud reducida. La cepa con el lazo débil, responde lentamente y con la magnitud disminuida. Las líneas punteadas delgadas indican indican el nuevo estado estacionario al que debe llegar el sistema después de aplicarle un escalón. Normalizada con la concentración de  $T_{S,max}$  que cada cepa alcanza.

es la misma (Fig. 6.8a). Por el contrario, al fortalecer el lazo de represión, se observan dos frecuencias de corte, una asociada a una respuesta rápida pero con una ganancia muy pequeña (frecuencia de corte a altas frecuencias) y la otra con una respuesta lenta y ganancia mas grande (frecuencia de corte a bajas frecuencias). Este fenómeno también se presentó en *B. subtilis* con el mecanismo de atenuación fuerte (Fig. 6.6a).

Con la cepa que tiene debilitado el lazo de atenuación de la transcripción, la respuesta en frecuencia cambia ligeramente con comparación con la cepa silvestre. La ganancia aumenta y la frecuencia de corte se desplaza ligeramente a frecuencias bajas. Haciendo el lazo de atenuación más fuerte no modifica la respuesta en frecuencia del operón *trp* en *E. coli* (Fig. 6.8b).

Con el lazo de inhibición enzimática más débil, la frecuencia de corte asociada a la respuesta lenta domina sobre la de respuesta rápida, esto debido a que la ganancia máxima predomina a frecuencias bajas. Aquí se da una importante diferencia entre la

respuesta en frecuencia cuando se ve debilitada el mismo lazo de retroalimentación en ambas bacterias estudiadas en este trabajo. Por un lado, el lazo de inhibición débil en *B. subtilis* afecta dramáticamente la ganancia, mientras que el mismo experimento en *E. coli* no se ve afectada la ganancia, aunque en ambos sistemas la frecuencia de corte se recorre a frecuencias bajas (Fig. 6.7a y 6.8c). Cuando la inhibición enzimática es mas fuerte en *E. coli*, la frecuencia de corte se traslada a frecuencias altas y la ganancia se ve disminuida (Fig. 6.8c).

### 6.3.3. Efecto de la ausencia de los lazos de retroalimentación sobre la respuesta en frecuencia

Para corroborar los resultados anteriores, se evaluó el efecto que tienen los sistemas cuando carecen de los lazos de retroalimentación, ya que esto equivale a debilitar al máximo los lazos. Se evaluaron uno por uno los lazos. Para lograr esto, se igualaron a 1 cada una de las funciones de regulación que corresponden a cada lazo de retroalimentación, es decir,  $P_R = 1$ ,  $P_A = 1$  y  $P_I = 1$ . Este experimento se realizó para *B. subtilis* y para *E. coli*.

En *B. subtilis*, la ausencia de cualquiera de los lazos mueve la frecuencia de corte a frecuencias bajas, sin embargo la ganancia es severamente afectada cuando carece de la inhibición enzimática, es decir, que *B. subtilis* no responde a perturbaciones de  $T_{ext}$  (Fig. 6.9a). Éstos resultados concuerdan con los encontrados en el experimento donde los lazos están debilitados (Fig. 6.6a y 6.7a).

Cuando el operón *trp* en *E. coli* carece de alguno de los lazos, se observa un corrimiento hacia frecuencias bajas de la frecuencia de corte, con un aumento en la ganancia (Fig. 6.9b). Estos resultados pueden ser comparados con los de la Fig. 6.8, en donde los lazos de retroalimentación son debilitados y concuerdan ambos. Esto asegura que el método usado para hacer fuerte o débil los lazos es adecuado.

Debido a que el operón *trp* en *B. subtilis* solo tiene un lazo de retroalimentación a nivel transcripcional, se quitaron los dos lazos que controlan la transcripción en el operón *trp* de *E. coli* (cepa sin represión ni atenuación) y se comparó con la cepa de *B. subtilis* que no tiene el único lazo que controla la transcripción (cepa sin atenuación de la transcripción).

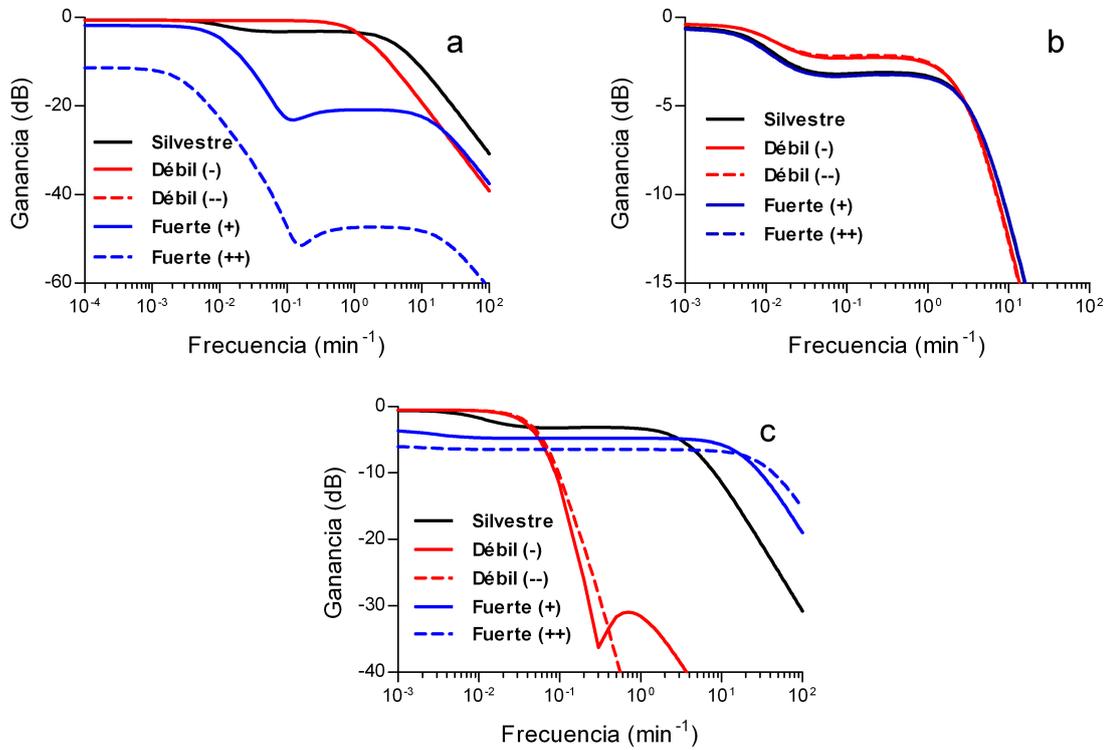


Figura 6.8: **Influencia de los lazos de retroalimentación negativa sobre la respuesta en frecuencia del operón *trp* en *E. coli*.** Para fines comparativos, en todas las gráficas se muestra la respuesta de la cepa silvestre. En a) la respuesta en frecuencia de una cepa con la fuerza del lazo de represión aumentado y disminuido. Con el lazo fuerte, aparecen dos frecuencias de corte con la ganancia disminuida. La cepa con el lazo débil mantiene la ganancia pero se recorre la frecuencia de corte a frecuencias bajas. b) Cepa con la fuerza del lazo de atenuación aumentado y disminuido. Los cambios no se aprecian notablemente. c) Cepa con la fuerza del lazo de inhibición aumentado y disminuido. Con el lazo fuerte, la frecuencia de corte se recorre a frecuencias altas y la ganancia disminuye. Con el lazo débil, la ganancia se mantiene pero la frecuencia de corte se recorre a frecuencias bajas. Se siguió la misma estrategia que en los experimentos en *B. subtilis*, modificando un parámetro para disminuir o aumentar la fuerza de los lazos. Los parámetros  $K_R$ ,  $K_B$  y  $K_I$  fueron modificados para afectar los lazos de represión, atenuación e inhibición, respectivamente.

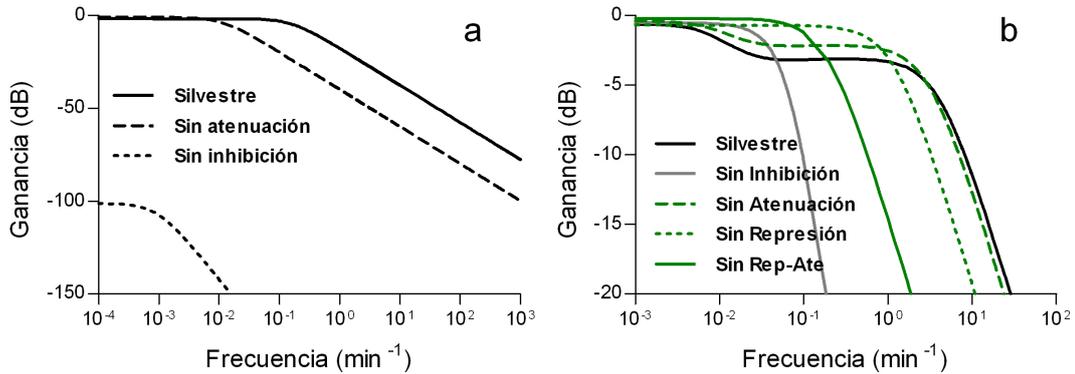


Figura 6.9: **Efecto de la ausencia de los lazos de retroalimentación negativa sobre la respuesta en frecuencia del operón *trp* en *B. subtilis* y *E. coli*.** a) Respuesta en frecuencia del operon *trp* en *B. subtilis* cuando carece de alguno de los dos lazos de retroalimentación. En ausencia del mecanismo de atenuación, la frecuencia de corte se recorre a frecuencias bajas y la ganancia se mantiene. En ausencia de la inhibición, la frecuencia de corte se recorre a frecuencias mas bajas que en cualquiera de los otros caos, y la ganancia disminuye drásticamente. b) Respuesta en frecuencia del operón *trp* en *E. coli* cuando carece de alguno de los tres lazos de retroalimentación, y cuando la regulación a nivel transcripcional esta ausente (carece del mecanismo de represión y de atenuación). En todos los casos, la frecuencia de corte se recorre a frecuencias bajas y la ganancia se mantiene. La cepa sin inhibición enzimática, muestra que la frecuencia de corte se encuentra en las frecuencias mas bajas.

Este experimento muestra que si no hay control a nivel transcripcional en el operón *trp* de ambas bacterias, la frecuencia de corte se mueve hacia frecuencias bajas y hay un ligero aumento en la ganancia de los sistemas (Fig. 6.9).

Un resumen de las frecuencias de corte y de la ganancia máxima de cada una de las cepas evaluadas en este trabajo se presentan en la tabla 6.1. La frecuencia de corte se tomó como la caída en 3 dB de la ganancia máxima. La ganancia máxima se obtuvo al evaluar la magnitud de la función de transferencia cuando la frecuencia se acerca a cero,  $\omega = 0$ , esto fue posible debido a que todas las respuestas corresponden a un filtro pasa-bajas. En los casos en que aparecen dos pendientes, que corresponde a dos frecuencias de corte distintos, solo se tomó en cuenta la ganancia mas grande, es decir la ganancia máxima, por eso en la tabla se observa que en algunos casos la frecuencia de corte es menor para cepas que tienen algún lazo con la fuerza aumentada que para cepas silvestres. Como se mencionó anteriormente, la frecuencia de corte está relacionada con el tiempo de

Tabla 6.1: Frecuencias de corte ( $\omega_c$ ) y ganancias máximas ( $G_{max}$ ) de cada cepa en estudio.

Bacteria	Cepa	$G_{max}$ (dB)	$\omega_c$ ( $\text{min}^{-1}$ )
<i>B. subtilis</i>	Silvestre	-1.56	0.1562
	Atenuación fuerte (++)	-2.43	0.0034
	Atenuación débil (--)	-0.85	0.0113
	Sin atenuación	-0.85	0.0113
	Inhibición fuerte (++)	-4.51	0.9405
	Inhibición débil (--)	-9.75	0.0014
	Sin Inhibición	-101.1	0.0006
<i>E. coli</i>	Silvestre	-0.58	1.463
	Represión fuerte (++)	-11.4	0.0028
	Represión débil (--)	-0.69	1.183
	Sin represión	-0.69	1.183
	Atenuación fuerte (++)	-0.69	1.44
	Atenuación débil (--)	-0.39	1.809
	Sin atenuación	-0.39	1.809
	Sin Represión-Atenuación	-0.20	0.194
	Inhibición fuerte (++)	-5.96	34.19
	Inhibición débil (--)	-0.51	0.05
	Sin inhibición	-0.51	0.05

respuesta, y como se aprecia en la cepa de *B. subtilis* que tiene la fuerza de la atenuación aumentada, la frecuencia de corte es menor que en la cepa silvestre y esto corresponde a un tiempo de respuesta lento, como se aprecia en la Fig. 6.6b.

# 7

## Discusión

En este trabajo se analizó la respuesta en frecuencia del operón *trp* de dos bacterias muy estudiadas: *B. subtilis* y *E. coli*. Con la respuesta en frecuencia se pueden analizar tanto la amplitud, presentado como ganancia, como el tiempo de respuesta, relacionado con la frecuencia de corte, en una sola gráfica. El estudio se basó en los modelos de EDOs de la dinámica del operón *trp* de *B. subtilis* y *E. coli* desarrollados y validados por [22,23], tomando en cuenta la influencia de  $T_{ext}$  como en [24]. El efecto que tiene el  $T_{ext}$  en la síntesis de triptófano, es de regular la concentración de  $T_S$  que puede ser sintetizado por el operón *trp*. Si la concentración de  $T_{ext} = 0\mu M$ , la cantidad de triptófano sintetizado en el estado estacionario es máxima ( $T_{S,max}$ ), este resultado es el mismo obtenido por [22, 23]. Sin embargo, mientras la concentración de  $T_{ext}$  aumenta, la concentración de  $T_S$  disminuye, este resultado es congruente con [24].

Para estudiar el efecto de los lazos de retroalimentación sobre la respuesta en frecuencia, se linealizaron los modelos. La linealización se realizó considerando una concentración de  $T_{ext} = 0,3$  (valores normalizados con  $T_{S,max}$ ), debido a que esta región muestra linealidad sobre la concentración de  $T_S$  como función de  $T_{ext}$ , ver Fig. 6.3. Se compararon los modelos lineales y no lineales, sometiendo a los sistemas en el estado estacionario a una perturbación (impulso) sobre la concentración de  $T_S$ . La evolución temporal para regresar al estado estacionario del modelo lineal se ajusta muy bien a la del modelo no lineal. Este resultado muestra la validez de la linealización y el modelo lineal del operón *trp* de ambas bacterias puede ser usado para el análisis de la respuesta en frecuencia.

Se evaluó el efecto que tiene el lazo de atenuación de la transcripción sobre la respuesta en frecuencia del operón *trp* en *B. subtilis*. Al debilitar el lazo, se observa un corrimiento en la frecuencia de corte a bajas frecuencias y un ligero aumento en la ganancia del sistema (Fig. 6.6a, Tabla 6.1). Esto indica que si *B. subtilis* requiere aumentar la ganancia, es decir, responder en casi la misma proporción que la magnitud de la entrada, el tiempo de respuesta debe aumentar. Este resultado concuerda con [25], donde ellos demuestran que con un lazo de retroalimentación negativo débil, el sistema tarda más en alcanzar el estado estacionario. La lenta respuesta del sistema cuando el lazo de atenuación de la transcripción es débil se muestra en la Fig. 6.6b. También se evaluó el efecto de tener el lazo de atenuación más fuerte. Se encontró que la frecuencia de corte se traslada a frecuencias altas, sin embargo a frecuencias más bajas pareciera que existe otra frecuencia de corte con una ganancia mayor que la primera. Para entender mejor este fenómeno, se estudió la concentración de  $T_S$  en el tiempo ante un escalón de  $T_{ext}$ . Se observa una respuesta rápida, al inicio del estímulo, pero insuficiente para contrarrestar la magnitud de la entrada. Esta respuesta es rápida debido a que, en este experimento, se disminuye el valor de la constante de disociación  $K_D$ , es decir que la proteína TRAP activa interacciona con mayor probabilidad con la región líder del mRNA naciente, provocando con ello, que se aborte la transcripción. Sin embargo, esta reacción entre la proteína TRAP activa y la región líder del mRNA naciente posiblemente se sature rápido y es insuficiente para alcanzar el valor del nuevo estado estacionario después de la perturbación en la concentración de  $T_{ext}$ . Es aquí, donde actúa un segundo mecanismo asociado a la frecuencia de corte de baja frecuencia que es más lento pero con la ganancia suficiente para responder al estímulo. Lo que se observa entonces para el lazo de atenuación de la transcripción es que, entre mas fuerte es el lazo, menor es la ganancia, además que para alcanzar el siguiente estado estacionario después de un estímulo permanente en  $T_{ext}$ , *B. subtilis* necesita de mucho tiempo. Por lo tanto, no beneficia en nada a *B. subtilis* tener este lazo de retroalimentación negativa más fuerte o más débil, debido a que las respuestas son más lentas en ambos casos.

En el siguiente experimento se estudió el efecto de modificar la fuerza del lazo de inhibición enzimática sobre la respuesta en frecuencia del operón *trp* en *B. subtilis*. Se encontró que mientras más fuerte es el lazo, más rápido responde el sistema ante

perturbaciones de  $T_{ext}$ , y mientras más débil es el lazo, mayor es el tiempo que tarda el sistema en alcanzar el estado estacionario después de una perturbación. Sin embargo, un lazo de inhibición enzimática, para *B. subtilis*, fuerte o débil representa una disminución en la ganancia. Esta disminución en la ganancia podría perjudicar a *B. subtilis* para adaptarse en un medio cambiante, debido a que una ganancia pequeña significa que *B. subtilis* no responde de manera proporcional a las necesidades nutricionales, es decir, que no importa si en el exterior hay triptófano, ya que la bacteria sintetizaría el triptófano por medio del operón *trp* y por lo tanto gastaría energía en ello aún si no fuera necesario.

En la respuesta en frecuencia de la cepa silvestre de *B. subtilis* y *E. coli*, se aprecia una frecuencia de corte en frecuencias más altas para *E. coli* (Tabla 6.1). Esto debido a que *E. coli* tiene un tiempo de duplicación menor (30 - 90 min) [26,27] que *B. subtilis* (60-20 min) [28,29] y por lo tanto, tiene un metabolismo más rápido. Entonces, es de esperarse que la frecuencia de corte del operón *trp* en *E. coli* se encuentre en frecuencias más altas que en *B. subtilis*.

También se estudió el efecto de la fuerza de los lazos de retroalimentación negativa en el operón *trp* en *E. coli*. Cuando el mecanismo de represión de la transcripción es débil, la frecuencia de corte se recorre a frecuencias bajas mientras la ganancia se mantiene igual que en una cepa silvestre. Si este lazo es fuerte, se aprecia nuevamente, como en el caso de la atenuación de la transcripción en *B. subtilis*, dos pendientes asociadas a dos respuestas temporales, una lenta y una rápida, pero la respuesta rápida (asociada a la frecuencia de corte a frecuencias altas) tiene una ganancia pequeña, mientras que la respuesta lenta (asociada a la frecuencia de corte a bajas frecuencias) tiene una ganancia mayor. Entonces, se observa que el mecanismo de represión en el operón *trp* de *E. coli*, tiene una respuesta similar al mecanismo de atenuación en *B. subtilis*, es decir, diferentes lazos de retroalimentación en estas bacterias tienen el mismo efecto sobre la respuesta en frecuencia. La misma forma de responder en ambos sistemas, por diferentes mecanismos, puede deberse a que, evolutivamente hablando, estos lazos convergen en la forma de regular un circuito clave en las bacterias [30].

En el caso del mecanismo de atenuación de la transcripción en *E. coli*, sólo se aprecia una ligera diferencia en la frecuencia de corte y sobre la ganancia cuando el lazo es débil, pero no hay diferencia cuando el lazo es fuerte (Tabla 6.1). Entonces si *E. coli*

quiere responder con una amplitud mayor, deberá pagar con una respuesta más lenta. Sin embargo, no puede responder de una manera más rápida aumentando la fuerza de este lazo. Este resultado es diferente al obtenido en *B. subtilis* para el mismo lazo de retroalimentación negativa posiblemente por lo que se explicó en el párrafo anterior.

Aumentar la fuerza del lazo de inhibición enzimática en el operón *trp* en *E. coli* tiene el mismo efecto que el observado en *B. subtilis*, para el mismo lazo de retroalimentación. Sin embargo, al disminuir la fuerza del lazo en *E. coli*, la frecuencia de corte se recorre a frecuencias bajas, la ganancia máxima se mantiene (Tabla 6.1) y la ganancia que corresponde a la respuesta rápida desaparece al disminuir aún más la fuerza del lazo (lazo débil (–) Fig. 6.8c). Además la pendiente es ligeramente diferente cuando se debilita este lazo. Una diferencia al disminuir la fuerza del lazo de inhibición del operón *trp* de *B. subtilis*, es que en *E. coli*, se observa un ligero aumento en la ganancia, contrario a lo que sucede con *B. subtilis* (Tabla 6.1). Estas diferencias en la respuesta en frecuencia al modificar la fuerza del lazo de inhibición enzimática, puede deberse a las diferencias en la estructura del operón *trp* en ambas bacterias o a otros factores que no se consideran en el modelo, porque se sabe que la ruta biosintética de la síntesis de triptófano esta muy bien conservada en la mayoría de las especies [19], por lo tanto, se esperarí observar la misma tendencia en la respuesta al modificar la fuerza del lazo de inhibición en ambos sistemas.

Finalmente, se evaluó el efecto sobre la respuesta en frecuencia de ambas bacterias cuando el operón *trp* no es regulado por ninguno de los lazos de retroalimentación negativa. Este experimento se realizó con el propósito de corroborar que el método usado para modificar la fuerza de los lazos es válido. Se encontró que las respuestas en frecuencia que se obtienen cuando carecen de alguno de estos lazos, corresponde a los obtenidos cuando los lazos son debilitados, esto valida el método empleado para modificar la fuerza de los lazos. Además, debido a que ambas bacterias tienen diferentes lazos de retroalimentación, se buscó una forma de poder compararlas. Por lo tanto, se dividió la regulación en dos niveles: nivel transcripcional (represión y atenuación transcripcional) y nivel postraducciona (inhibición enzimática). Cuando el operón *trp* en *B. subtilis* carece de regulación sobre la transcripción hay un ligero aumento en la ganancia, pero un corrimiento en la frecuencia de corte hacia frecuencias bajas. Este efecto se conserva en *E. coli*, por lo que el mecanismo de regulación a nivel transcripcional en ambos

sistemas se conserva (Fig. 6.9, Tabla 6.1). Cuando el mecanismo de inhibición en *B. subtilis* está ausente, la ganancia baja hasta cerca de  $-100dB$ , además que la frecuencia de corte se recorre a frecuencias bajas, volviendo a *B. subtilis* insensible y lento para responder ante perturbaciones de  $T_{ext}$  (Tabla 6.1). Otro efecto importante observado es que la pendiente de la respuesta en frecuencia de las cepas que carecen de la inhibición, es mayor, lo que corresponde a un aumento en el grado de un sistema cuando es analizado como un filtro. El grado puede medirse como:  $-20NdB/decada$ , donde  $N$  corresponde al grado del filtro, es decir, si la pendiente cae  $-20dB$  por decada corresponde a un filtro de primer orden y si cae  $-40dB$  por decada entonces se habla de filtro de orden dos [6]. Bajo este contexto, la respuesta en frecuencia de *B. subtilis* pasa de ser un filtro grado uno a un filtro grado dos. Los efectos en el corrimiento de la frecuencia de corte y el cambio en la pendiente de la respuesta en frecuencia cuando se carece del mecanismo de inhibición, son los mismo para ambas bacterias. Sin embargo, el efecto sobre la ganancia son opuestas en ambos sistemas, mientras en *B. subtilis* disminuye, en *E. coli* aumenta ligeramente al compararlo con las cepas silvestres de cada bacteria (Tabla 6.1). Estas diferencias ya fueron discutidas anteriormente.

Por otro lado, las dos pendientes que aparecen en la respuesta en frecuencias, relacionadas con dos frecuencias de corte y por lo tanto, con dos respuestas temporales diferentes, se pueden atribuir al hecho de que estos dos sistemas biológicos cuentan con más de dos lazos de retroalimentación, elevando con ello la complejidad del sistema. Esta complejidad de multiples lazos de retroalimentación son observados comúnmente en sistemas de regulación biológicos y contrastan con los típicamente estudiados en ingeniería de control, en donde sólo cuentan con un lazo de retroalimentación [31]. La doble pendiente que se aprecia en ambos sistemas desaparece cuando solo se considera un lazo de retroalimentación. Esto se observa cuando las cepas no tienen regulación sobre alguno de los dos niveles de control (nivel transcripcional o nivel postraducciona). Sin embargo, estas cepas siguen manteniendo las propiedades de un filtro pasa-bajas, porque incluso un solo lazo de retroalimentación negativo tiene la capacidad de funcionar como un filtro pasa-bajas [32].

# 8

## Conclusiones

A partir de los experimentos realizados en este trabajo, podemos concluir que:

- La respuesta en frecuencia del operón *trp* en *B. subtilis* y *E. coli*, tiene un comportamiento de filtro pasa-bajas. Éste comportamiento se conserva aún cuando se modifican los lazos de retroalimentación con los que cuentan ambas bacterias.
- Ambas bacterias han evolucionado para tener un balance entre el tiempo de respuesta (relacionado directamente con la frecuencia de corte) y la amplitud de la respuesta (relacionado con la ganancia), ya que en general, las cepas que tienen un lazo de retroalimentación negativo más débil tienen una ganancia ligeramente mayor, pero un tiempo de respuesta más grande y las cepas que tienen un lazo de retroalimentación más fuerte, tienen un tiempo de respuesta generalmente más rápido, pero con una amplitud pequeña e insuficiente para responder a los cambios externos.
- Los resultados sugieren también que la falta del lazo de represión en *B. subtilis* es compensado con el lazo de atenuación de la transcripción, porque el efecto de la represión en *E. coli* es el mismo que el de la atenuación en *B. subtilis*.
- A pesar de que existen uno y dos lazos para la regulación transcripcional en *B. subtilis* y *E. coli*, respectivamente, la regulación transcripcional está conservada en ambas bacterias. Sin embargo, a pesar de solo tener un lazo a nivel postraducciona en ambos sistemas, la conservación no se observa.

## 9

# Perspectivas

En este trabajo se obtuvo la respuesta en frecuencia del operón *trp* en *B. subtilis* y *E. coli* a partir de modelos matemáticos. Debido a que en este trabajo se considera una entrada instantánea de  $T_{ext}$ , queda por mejorar la dinámica de la entrada de triptófano a la célula, porque es sabido que las células tienen proteínas que transportan el triptófano del medio extracelular al intracelular [33,34], y vale la pena considerar que existe un flujo de entrada y que puede existir saturación por parte de la proteína transportadora.

El tiempo de retardo en la transcripción y traducción es un punto a considerar en el trabajo a futuro, ya que las reacciones no suceden instantáneamente. Existe un tiempo desde que se inicia la transcripción y termina, y un tiempo desde que inicia la traducción y termina.

Debido a que se encontraron grandes diferencias al modificar la fuerza del lazo de inhibición enzimática entre ambas bacterias, sabiendo que la inhibición enzimática es un lazo de retroalimentación muy conservado entre las especies que sintetizan triptófano, es importante proponer experimentos donde se modifiquen la fuerza de éste lazo, con el fin de compararlos. También sería importante realizar esos experimentos en el laboratorio para los otros lazos de retroalimentación y compararlos con los resultados teóricos. Una forma de modificar los lazos de retroalimentación sería quitando o aumentando codones en los genes de la enzima antranilato sintasa. De igual manera modificando las proteínas involucradas en los otros lazos de retroalimentación y siguiendo la respuesta en diferentes intervalos de tiempo. La respuesta podría seguirse midiendo con fluorescencia la concentración de la enzima antranilato sintasa o su activada enzimática.

Todas estas consideraciones son importantes y pueden ser tomadas en cuenta para el trabajo a futuro y estudiar la respuesta en frecuencia de ambas bacterias. Además para entender de mejor manera la regulación que se da para un mismo aminoácido cuando esta regulado con dos o tres lazos de retroalimentación negativo.

# Apéndice A

## A.1. Obtención de las funciones de transferencia

A continuación se detalla el método usado para obtener la función de transferencia para el modelo matemático del operón *trp* de *E. coli*. El mismo método se siguió para el modelo de *B. subtilis* aunque no se detalla aquí.

Partimos de la definición de un sistema lineal:

$$\dot{\mathbf{x}} = \mathbf{A}\mathbf{x} + \mathbf{B}\mathbf{u}, \quad (\text{A.1})$$

donde

$$\begin{aligned} \mathbf{A} &= \begin{pmatrix} \frac{\partial \dot{M}}{\partial M} & \frac{\partial \dot{M}}{\partial E} & \frac{\partial \dot{M}}{\partial T_S} \\ \frac{\partial \dot{E}}{\partial M} & \frac{\partial \dot{E}}{\partial E} & \frac{\partial \dot{E}}{\partial T_S} \\ \frac{\partial \dot{T}_S}{\partial M} & \frac{\partial \dot{T}_S}{\partial E} & \frac{\partial \dot{T}_S}{\partial T_S} \end{pmatrix}_{M^*, E^*, T_S^*, T_{ext}^*} = \begin{pmatrix} a_{11} & a_{12} & a_{13} \\ a_{21} & a_{22} & a_{23} \\ a_{31} & a_{32} & a_{33} \end{pmatrix}, \\ \mathbf{B} &= \begin{pmatrix} \frac{\partial \dot{M}}{\partial T_{ext}} \\ \frac{\partial \dot{E}}{\partial T_{ext}} \\ \frac{\partial \dot{T}_S}{\partial T_{ext}} \end{pmatrix}_{M^*, E^*, T_S^*, T_{ext}^*} = \begin{pmatrix} b_1 \\ b_2 \\ b_3 \end{pmatrix}, \\ \mathbf{x} &= \begin{pmatrix} M - M^* \\ E - E^* \\ T_S - T_S^* \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} x_1 \\ x_2 \\ x_3 \end{pmatrix}, \\ \mathbf{u} &= T_{ext} - T_{ext}^* = u. \end{aligned}$$

Además sabemos que  $\frac{\partial \dot{M}}{\partial E} = a_{12} = 0$ ,  $\frac{\partial \dot{E}}{\partial T_S} = a_{23} = 0$ ,  $\frac{\partial \dot{T}_S}{\partial M} = a_{31} = 0$  y que  $\frac{\partial \dot{E}}{\partial T_{ext}} = b_2 = 0$ , por lo que las ecuaciones lineales quedan definidas como

$$\dot{x}_1 = a_{11}x_1 + a_{13}x_3 + b_1u, \quad (\text{A.2})$$

$$\dot{x}_2 = a_{21}x_1 + a_{22}x_2, \quad (\text{A.3})$$

$$\dot{x}_3 = a_{32}x_2 + a_{33}x_3 + b_3u. \quad (\text{A.4})$$

Aplicando la transformada de Laplace a las ecuaciones lineales obtenemos

$$sX_1(s) = a_{11}X_1(s) + a_{13}X_3(s) + b_1U(s), \quad (\text{A.5})$$

$$sX_2(s) = a_{21}X_1(s) + a_{22}X_2(s), \quad (\text{A.6})$$

$$sX_3(s) = a_{32}X_2(s) + a_{33}X_3(s) + b_3U(s). \quad (\text{A.7})$$

Despejando  $X_1(s)$ ,  $X_2(s)$  y  $X_3(s)$  tenemos

$$X_1(s) = \frac{a_{13}X_3(s) + b_1U(s)}{s - a_{11}}, \quad (\text{A.8})$$

$$X_2(s) = \frac{a_{21}X_1(s)}{s - a_{22}}, \quad (\text{A.9})$$

$$X_3(s) = \frac{a_{32}X_2(s) + b_3U(s)}{s - a_{33}}. \quad (\text{A.10})$$

Sustituyendo la ecuación A.8 en la ecuación A.9 y la ecuación A.9 en la ecuación A.10 tenemos que

$$X_3(s) = \frac{a_{32}a_{21}a_{13}X_3(s)}{(s - a_{11})(s - a_{22})(s - a_{33})} + \frac{a_{32}a_{21}b_1U(s)}{(s - a_{11})(s - a_{22})(s - a_{33})} + \frac{b_3U(s)}{s - a_{33}}. \quad (\text{A.11})$$

Despejando podemos encontrar la función de transferencia

$$H_{Ec}(s) = \frac{X_3(s)}{U(s)} = \frac{b_3(s - a_{11})(s - a_{22}) + a_{32}a_{21}b_1}{(s - a_{11})(s - a_{22})(s - a_{33}) - a_{32}a_{21}a_{31}}. \quad (\text{A.12})$$

# Bibliografía

- [1] T. Kobayashi and R. Kageyama. Dynamic advances in NF- $\kappa$ B signaling analysis. *Sci. Signal*, 2:pe47, 2009.
- [2] J. Zaim, E. Speina, and A. M. Kierzek. Identification of new genes regulated by the Crt1 transcription factor, an effector of the DNA damage checkpoint pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 280:28–37, 2005.
- [3] A. Cisneros-Mejorado and D. P. Sánchez Herrera. cGMP and cyclic nucleotide-gated channels participate in mouse sperm capacitation. *FEBS Lett.*, 586:149–153, 2012.
- [4] S. M. Block, J. E. Segall, and H. C. Berg. Impulse responses in bacterial chemotaxis. *Cell*, 31:215–226, 1982.
- [5] J. Ang, B. Ingalls, and D. McMillen. Probing the input-output behavior of biochemical and genetic systems system identification methods from control theory. *Meth. Enzymol.*, 487:279–317, 2011.
- [6] K. Ogata. *Ingeniería de Control Moderna*. Prentice Hall, 2a. edición, 1993.
- [7] O. Shalem, O. Dahan, M. Levo, M. Rodríguez Martínez, I. Furman, E. Segal, and Y. Pilpel. Transient transcriptional responses to stress are generated by opposing effects of mRNA production and degradation. *Mol. Syst. Biol.*, 4:223, 2008.
- [8] T. Yi, B. W. Andrews, and P. A. Iglesias. Control analysis of bacterial chemotaxis signaling. *Meth. Enzymol.*, 422:123–143, 2007.
- [9] K. A. Fujita, Y. Toyoshima, S. Uda, Y. Ozaki, H. Kubota, and S. Kuroda. Decoupling of receptor and downstream signals in the Akt pathway by its low-pass filter characteristics. *Sci. Signal*, 3:ra56, 2010.

- [10] E. W. Kamen and B. S. Heck. *Fundamentos de señales y sistemas usando la Web y MATLAB*. Prentice Hall, 4a. edición, 2006.
- [11] J. E. Segall, S. M. Block, and H. C. Berg. Temporal comparisons in bacterial chemotaxis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 83:8987–8991, 1986.
- [12] B. W. Andrews, T. Yi, and P. A. Iglesias. Optimal noise filtering in the chemotactic response of *Escherichia coli*. *PLoS Comput. Biol.*, 2:e154, 2007.
- [13] Y. Tu, T. S. Shimizu, and H. C. Berg. Modeling the chemotactic response of *Escherichia coli* to time-varying stimuli. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105:14855–14860, 2008.
- [14] J. Luo, J. Wang, T. M. Ma, and Z. Sun. Reverse engineering of bacterial chemotaxis pathway via frequency domain analysis. *PLoS ONE*, 5:e9182, 2010.
- [15] T. C. Shimizu, Y. Tu, and H. C. Berg. A modular gradient-sensing network for chemotaxis in *Escherichia coli* revealed by responses to time-varying stimuli. *Mol. Syst. Biol.*, 6:382, 2010.
- [16] A. Hamadeh, M. A. J. Roberts, E. August, P. E. McSharry, P. K. Maini, J. P. Armitage, and A. Papachristodoulou. Feedback control architecture and the bacterial chemotaxis network. *PLoS Comput. Biol.*, 7:e1001130, 2011.
- [17] M. R. Bennett, W. L. Pang, N. A. Ostroff, B. L. Baumgartner, S. Nayak, L. S. Tsimring, and J. Hasty. Metabolic gene regulation in a dynamically changing environment. *Nature*, 454:1119–1122, 2008.
- [18] B. P. Ingalls. A frequency domain approach to sensitivity analysis of biochemical networks. *J. Phys. Chem. B*, 108:1143–1152, 2004.
- [19] C. Yanofsky. The different roles of tryptophan transfer RNA in regulating *trp* operon expression in *E. coli* versus *B. subtilis*. *Trends Genet.*, 20:367–374, 2004.
- [20] P. Gollnick, P. Babitzke, A. Antson, and C. Yanofsky. Complexity in regulation of tryptophan biosynthesis in *Bacillus subtilis*. *Annu. Rev. Genet.*, 39:47–68, 2005.

- [21] C. Yanofsky. RNA-based regulation of genes of tryptophan synthesis and degradation, in bacteria. *RNA*, 13:1141–1154, 2007.
- [22] C. Zamora-Chimal, M. Santillán, and J. Rodríguez-González. Influence of the feedback loops in the trp operon of *B. subtilis* on the system dynamic response and noise amplitude. *J. Theor. Biol.*, 310:119–131, 2012.
- [23] E. Salazar-Cabazos and M. Santillán. *Enzyme Inhibition and Bioapplications*, chapter Transcriptional bursting in the tryptophan operon of *E. coli* and its effect on the system stochastic dynamics, pages 179–194. InTech, 2012.
- [24] S. Bhartiya, S. Rawool, and K. V. Venkatesh. Dynamic model of *Escherichia coli* tryptophan operon shows an optimal structural design. *Eur. J. Biochem.*, 270:2644–2651, 2003.
- [25] X. Tian, X. Zhang, F. Liu, and W. Wang. Interlinking positive and negative feedback loops creates a tunable motif in gene regulatory networks. *Phys. Rev. E.*, 80:011926, 2009.
- [26] L. D. Plank and J. D. Harvey. Generation time statistics of *Escherichia coli* B measured by synchronous culture techniques. *J. Gen. Microbiol.*, 115:69–77, 1979.
- [27] K. Skarstad, H. B. Steen, and E. Boye. *Escherichia coli* DNA distributions measured by flow cytometry and compared with theoretical computer simulations. *J. Bacteriol.*, 163:661–668, 1985.
- [28] S. O. Hoch, C. W. Roth, I. P. Crawford, and E. W. Nester. Control of tryptophan biosynthesis by the methyltryptophan resistance gene in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, 105:38–45, 1971.
- [29] J. Bernhardt, J. Weibezahn, C. Scharf, and M. Hecker. *Bacillus subtilis* during feast and famine: Visualization of the overall regulation of protein synthesis during glucose starvation by proteome analysis. *Genome Research*, 13:224–237, 2003.
- [30] U. Alon. Biological networks: The tinkerer as an engineering. *Science*, 301:1866–1867, 2003.

- [31] K. V. Venkatesh, S. Bhartiya, and A. Ruhela. Multiple feedback loops are key to a robust dynamic performance of tryptophan regulation in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.*, 563:234–240, 2004.
- [32] C. V. Rao, D. M. Wolf, and A. P. Arkin. Control, exploitation and tolerance of intracellular noise. *Nature*, 420:231–237, 2002.
- [33] J. P. Sarsero, E. Merino, and C. Yanofsky. A *Bacillus subtilis* gene of previously unknown function, yhaG, is translationally regulated by tryptophan-activated TRAP and appears to be involved in tryptophan transport. *J. Bacteriol.*, 182:2329–331, 2000.
- [34] C. Yanofsky, V. Horn, and P. Gollnick. Physiological studies of tryptophan transport and tryptophanase operon induction in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 173:6009–6017, 1991.