



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

FACULTAD DE CIENCIAS

EXCITABILIDAD EN LA  
REGULACIÓN DE  
TRANSCRIPCIÓN Y  
VARIABILIDAD FENOTÍPICA  
EN BACTERIAS

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGO

PRESENTA

**ALFREDO ANTONIO LÓPEZ CASTILLO**

DIRECTOR DE TESIS:

**MARCO ARIELI HERRERA VALDEZ**



ESTA TESIS CONTÓ CON EL APOYO DE DGAPA-UNAM A TRAVÉS  
DEL PROYECTO PAPIIT IA105816-RA105816.

Ciudad Universitaria, 2019  
**Cd. Mx.**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**1. Datos del alumno**

Alfredo Antonio

López Castillo

5547211407

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

310005568

**2. Datos del tutor**

Dr.

Marco Arieli

Herrera Valdez

**3. Datos del sinodal 1**

Dra.

Mariana

Benítez Keinrad

**4. Datos del sinodal 2**

Dr.

Rafael

Peña Miller

**5. Datos del sinodal 3**

Dr.

Alessio

Franci

**6. Datos del sinodal 4**

Dra.

Lorena del Carmen

Caballero Coronado

## **7. Datos del trabajo escrito**

Excitabilidad en la regulación de transcripción y variabilidad fenotípica en bacterias

89 p

2019

## **Agradecimientos**

A mi madre y mi padre, por todo su apoyo y confianza.

A mi hermana, por tus consejos, apoyo y compañía.

A toda mi familia, por su apoyo incondicional.

A Marco, por todas tus enseñanzas y consejos, por todas las discusiones y reflexiones.

A Rafael Peña, por todo tu tiempo, recomendaciones y gran ayuda.

A Alessio Franci, por todo tu tiempo, apoyo y comentarios.

A Mariana Benítez, por todo tu tiempo y tus comentarios para enriquecer este trabajo.

A Lorena Caballero, por todo tu tiempo y sugerencias.

A mis amigos de la facultad, por todo su apoyo incondicional.

A DGAPA-UNAM a través del proyecto PAPIIT IA105816-RA105816.

## Índice general

<b>Resumen</b>	<b>8</b>
<b>Introducción</b>	<b>9</b>
<b>1. Regulación de la expresión genética</b>	<b>13</b>
1.1. Expresión genética . . . . .	13
1.2. Regulación de la expresión genética . . . . .	14
1.3. Regulación transcripcional . . . . .	15
1.4. Genes y ambiente . . . . .	17
1.5. Complejidad biológica y genoma . . . . .	17
1.6. Redes de regulación genética . . . . .	19
1.7. Sistemas teleológicos en la biología . . . . .	21
<b>2. Revisión literaria y antecedentes sobre el estudio del estado de competencia en <i>B. subtilis</i></b>	<b>23</b>
2.1. Antecedentes históricos . . . . .	23
2.2. Transformación bacteriana . . . . .	24
2.3. Estado de competencia en <i>B. subtilis</i> . . . . .	25
2.4. Características generales de <i>B. subtilis</i> . . . . .	25
2.4.1. Esporulación . . . . .	26
2.5. Reguladores del estado de competencia en <i>B. subtilis</i> . . . . .	27
2.5.1. Factor transcripcional ComK . . . . .	28
2.5.2. Péptido ComS . . . . .	29

2.5.3. Complejo degradador MecA . . . . .	30
2.5.4. Reguladores adicionales . . . . .	30
2.6. Expresión basal de <i>comK</i> . . . . .	32
2.7. Biestabilidad . . . . .	32
2.8. Definición operacional de excitabilidad . . . . .	34
2.9. Monitoreo de células individuales . . . . .	35
<b>3. Análisis de la dinámica de regulación del estado de competencia de <i>B. subtilis</i></b>	<b>37</b>
3.1. Elementos mínimos necesarios para modelar la entrada transitoria hacia el estado de competencia en <i>B. subtilis</i> . . . . .	37
3.2. Modelo teórico . . . . .	40
3.3. Análisis geométrico . . . . .	45
3.4. Análisis de ceroclinas . . . . .	51
3.4.1. Transiciones hacia estados competentes . . . . .	51
3.4.2. Transiciones hacia estados vegetativos . . . . .	53
3.5. Análisis de bifurcación . . . . .	54
3.5.1. Circuitos genéticos alternativos . . . . .	57
3.6. Distintos tipos de excitabilidad . . . . .	58
3.6.1. Ciclos límite . . . . .	61
<b>4. Discusión y conclusiones</b>	<b>64</b>
<b>Glosario</b>	<b>70</b>
<b>Material suplementario</b>	<b>73</b>
4.1. Métodos . . . . .	73
4.2. Tablas de valores . . . . .	73
4.3. Ceroclinas . . . . .	74
4.4. Análisis de estabilidad local . . . . .	75
4.5. Curvas de puntos fijos . . . . .	76

4.6. Derivación de los términos de decremento de ComK y ComS . . . . .	77
4.7. Extensiones del modelo teórico de regulación de la expresión genética. . . . .	79
<b>Bibliografía</b>	<b>81</b>

## Resumen

¿Por qué sólo un mínimo porcentaje de células que poseen el mismo genoma en *Bacillus subtilis* se diferencian transitoriamente hacia el estado de competencia? Bajo condiciones de estrés y limitación de nutrientes, la mayoría de las células pertenecientes a poblaciones isogénicas de *B. subtilis* entran a el estado de esporulación, y sólo un mínimo porcentaje se diferencia transitoriamente hacia el estado de competencia, el cual es un estado que permite la internalización de material genético exógeno al interior celular. Diversos autores han planteado diferentes hipótesis para explicar este fenómeno, y han caracterizado a la mayoría de los elementos que regulan a el estado de competencia. Sin embargo, no se ha comprendido en su totalidad cómo es que la interacción entre dichos reguladores induce la entrada hacia estados competentes de forma transitoria. El eje fundamental del presente trabajo consistió en analizar la dinámica de regulación del circuito genético del estado de competencia, desde el punto de vista de la excitabilidad. Mediante el análisis de un modelo teórico basado en ecuaciones diferenciales, se analizó la posibilidad de diseñar circuitos genéticos alternativos capaces de permitir transiciones hacia estados de excitación, y de permanencia en el estado de competencia. Lo que se encontró fue que la modulación de los componentes internos de los circuitos genéticos, puede inducir diferentes tipos de sucesiones de bifurcaciones. Algunas de estas transiciones son hacia regímenes oscilatorios y de expresión sostenida del factor transcripcional maestro (ComK), el cual es necesario y suficiente para inducir la entrada hacia el estado de competencia. Finalmente, se examinó el concepto de la excitabilidad desde una perspectiva crítica, en el contexto de la regulación de la expresión genética, y se discutieron algunas perspectivas a futuro sobre minimalidad en modelos de regulación de la expresión genética.

## Introducción

La entrada hacia el estado de competencia en *B. subtilis* es un proceso de diferenciación transitorio que ocurre de manera natural, durante la fase de crecimiento estacionaria, bajo condiciones de estrés y limitación de nutrientes (Grossman, 1995). Además, se ha reportado que menos del 10 % de las células pertenecientes a poblaciones isogénicas de *B. subtilis* logra entrar hacia dicho estado (Dubnau, 1991).

El estado de competencia es un estado que permite la internalización de material genético exógeno del microambiente al interior celular, y es capaz de alterar y detener procesos fisiológicos adicionales (Dubnau, 1991). La entrada y salida de dicho estado está controlada principalmente por tres elementos; el factor transcripcional ComK, el péptido ComS y el complejo proteolítico MecA (Süel et al., 2006). Además, se ha encontrado que cada uno de estos elementos participa en más de un proceso fisiológico en diferentes redes de regulación genética (Grossman, 1995). El factor transcripcional ComK es el elemento más importante, y se ha sugerido que su presencia es imprescindible para inducir la entrada hacia el estado de competencia (Gamba et al., 2015; Smits et al., 2005). ComK promueve su propia expresión (retroalimentación positiva) y la expresión de *PcomG*, el cual es un promotor que controla la expresión de productos que facilitan la incorporación de material genético exógeno al interior celular (Van Sinderen and Venema, 1994). El péptido ComS tiene un efecto positivo sobre ComK, el cual compite por su propia degradación mediada por MecA. El complejo proteolítico MecA degrada al factor transcripcional ComK, lo cual disminuye su concentración en el interior de la célula (Hahn et al., 1994). Durante la fase estacionaria, el péptido ComS incrementa e inhibe competitivamente la degradación de ComK mediada por MecA (Ogura et al., 1999). El incremento subsecuente en ComK promueve la represión de *comS*, causando un “pulso” en la

expresión de *comK* indicando un fenómeno de excitabilidad <sup>1</sup>. Se han identificado reguladores adicionales que actúan en diferentes etapas de crecimiento (Leisner, 2008; Sinderen et al., 1995; Van Sinderen and Venema, 1994), y es argumentable que la influencia de reguladores adicionales puede alterar el comportamiento pulsátil en la expresión de *comK*. Sin embargo, el monitoreo de la actividad simultánea de los promotores *PcomG* y *PcomK* utilizando genes reporteros y microscopia de fluorescencia cuantitativa ha sugerido un alto nivel de sincronía entre ambos, sobre todo durante la diferenciación hacia estados competentes en células individuales (Süel et al., 2006, 2007). En principio, dicho monitoreo sugiere que la influencia de reguladores adicionales no es determinante para inducir comportamientos de excitabilidad (Ver Capítulo 3). El enfoque minimal que abordo en el presente trabajo está dirigido hacia el estudio de los elementos mínimos necesarios capaces de generar comportamientos de excitabilidad. Desde un punto de vista teórico, la dimensión mínima para que un sistema sea excitable sin que deje de ser continuo es 2 (Herrera-Valdez, 2018). La unidad de elementos mínimos necesarios compuesta por ComK, MecA y ComS cumple con las características requeridas para generar comportamientos de excitabilidad, debido a las interacciones entre la variable de autoamplificación de ComK, la degradación de MecA sobre ComK, y la competencia de ComK por su propia degradación, la cual es atenuada por ComS (Süel et al., 2006, 2007).

El análisis de los perfiles de expresión genética ha aportado información valiosa para analizar la diferenciación transitoria hacia el estado de competencia; sin embargo, la dinámica de regulación subyacente que controla a este proceso de diferenciación no ha sido comprendida en su totalidad. Una investigación encabezada por Süel et al. (2006), ha planteado que la entrada transitoria hacia el estado de competencia puede ser explicada en términos de un circuito genético excitable, el cual está compuesto por un conjunto de elementos mínimos necesarios que poseen asas de retroalimentación positivas y negativas. La manera en la que Süel et al. (2006) y sus colaboradores contrastaron el modelo, se llevó a cabo mediante

---

<sup>1</sup>La definición clásica de excitabilidad dice que un sistema es excitable si estando en reposo (estado atractor), una perturbación pequeña lo hace regresar al reposo, pero exhibe un comportamiento pulsátil que regresa al reposo para perturbaciones lo suficientemente grandes. En el Capítulo 2 se presenta una definición más detallada sobre la excitabilidad en el contexto de la regulación de la expresión genética.

el registro de transiciones entre estados competentes y no competentes, cuantificando de manera indirecta las concentraciones del factor transcripcional ComK y del péptido ComS en células individuales de manera simultánea. ¿Es posible transitar hacia estados de excitación y de permanencia en el estado de competencia, al modificar la dinámica de regulación del circuito genético excitable descrito por Süel et al. (2006)? El análisis cualitativo del modelo teórico es capaz de proveer intuición acerca de los posibles escenarios que emergen tras alterar la dinámica de regulación de circuitos genéticos alternativos, lo que lo convierte en una herramienta útil ya que no suele ser sencillo analizar la dinámica de regulación a nivel de células individuales. Los registros sobre la entrada y salida del estado de competencia coinciden con comportamientos predecibles por el modelo teórico, por lo que la hipótesis del presente trabajo plantea que es posible inducir transiciones hacia estados de excitación, y de permanencia en el estado de competencia al modular propiedades intrínsecas de los componentes internos, en particular de los promotores. El presente trabajo analiza el modelo de excitabilidad propuesto por Süel et al. (2006) y tiene como eje los siguientes objetivos:

- Entender las bases biológicas de la regulación de la expresión genética durante la diferenciación hacia el estado de competencia en *B. subtilis*.
- Analizar la dinámica de regulación del circuito genético descrito por Süel et al. (2006), y analizar circuitos genéticos alternativos posiblemente capaces de inducir la entrada hacia estados de excitación y de permanencia en el estado de competencia.
- Discutir desde una perspectiva crítica el significado biológico de las transiciones descritas por el modelo.
- Relacionar la estructura de bifurcación del modelo con propiedades intrínsecas del circuito genético del estado de competencia.

En el capítulo uno se abordan brevemente los fundamentos sobre regulación de la expresión genética bacteriana. Se discuten conceptos básicos sobre complejidad biológica en el contexto de la regulación de la expresión genética y nociones generales sobre flujos de información

biológica. En el capítulo dos se recopila literatura relevante sobre la caracterización de los mecanismos más importantes que regulan la diferenciación transitoria hacia el estado de competencia, y la relación de dicha transición temporal con la excitabilidad en un sistema de ecuaciones que lo modela. En el capítulo tres se analiza el modelo de excitabilidad propuesto por Süel et al. (2006), se analizan posibles transiciones hacia el estado de competencia como función de variaciones sistemáticas de parámetros, donde cada parámetro representa características internas del circuito genético, particularmente de los promotores. Se realiza un análisis cualitativo del sistema mediante planos fase y se analiza la dinámica de regulación de circuitos genéticos alternativos, discutiendo su relación con algunos comportamientos que han sido reportados en la literatura; además, se analiza la estructura de bifurcación del modelo y se discute sobre cómo poder relacionarla con propiedades intrínsecas del circuito genético. En el capítulo cuatro se presenta una discusión y perspectivas a futuro sobre minimalidad en sistemas excitables que modelan circuitos genéticos. Información adicional y detalles sobre el desarrollo del modelo pueden ser consultados en el material suplementario.

## Capítulo 1

### Regulación de la expresión genética

En este capítulo presento algunos conceptos básicos sobre mecanismos de regulación de la expresión genética, en particular sobre regulación transcripcional bacteriana abordando las siguientes preguntas: ¿qué es la expresión genética?, ¿cómo se lleva a cabo? y ¿cuáles son los mecanismos que la regulan? Dichos conceptos son necesarios para entender por qué algunos mecanismos de regulación transcripcional pueden ser vistos como sistemas excitables. No obstante, en la actualidad siguen existiendo preguntas abiertas sobre el papel de los sistemas excitables en la regulación de la expresión genética, y sus repercusiones en la variabilidad fenotípica.

#### 1.1. Expresión genética

La expresión genética genera diferentes tipos de productos <sup>1</sup> por medio de mecanismos que son regulados a nivel genético y epigenético (Nelson et al., 2008). De acuerdo con Jablonka and Lamb (2014), los genes no son unidades estáticas que almacenan información únicamente para producir proteínas. La razón es que los genes de todos los organismos están sujetos a contextos que determinan su significado. Es decir, no basta con conocer la secuencia de un gen para determinar sus efectos, para ello se debe analizar a los genes dentro de un contexto más amplio. Por esa razón, el estudio de la expresión genética abarca mucho más que relaciones gen-proteína.

---

<sup>1</sup>En este contexto, el significado de “producto” está asociado al material bioquímico generado por la expresión genética de varios genes.

Existen diferentes tipos de información biológica de relevancia que no se restringen a secuencias de nucleótidos y de aminoácidos. Por ejemplo, se ha observado que las células son capaces de transmitir información a las células hijas por medio de mecanismos no genéticos (epigenéticos) (Caballero et al., 2012; Jablonka and Lamb, 2014). Algunos de estos mecanismos consisten en marcajes bioquímicos que no alteran las secuencias de DNA, pero son capaces de inducir cambios en las características heredables. Algunos ejemplos son las fosforilaciones, metilaciones y acetilaciones, las cuales son fundamentales para transmitir una gran diversidad de mensajes (Jenuwein and Allis, 2001). Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos juegan un papel importante al estudiar flujos de información a nivel celular. Sin embargo, la célula es un ente dinámico en el que los efectos de uno o varios elementos no son siempre los mismos. Por esa razón, no toda la información hereditaria puede ser reducida a la herencia genética y epigenética (Jablonka and Lamb, 2014). Además de la herencia genética y epigenética, Jablonka and Lamb (2014) propone la existencia de 2 tipos de herencia adicionales: simbólica y de comportamiento. Como se verá más adelante, dichas consideraciones son importantes para estudiar diferentes tipos de flujos de información.

## 1.2. Regulación de la expresión genética

De los miles de genes que alberga cualquier célula viva, no todos ellos son expresados; además, muchos de los genes que son expresados no lo hacen de manera constante y sus niveles de expresión pueden cambiar a lo largo del tiempo (Nelson et al., 2008). El costo energético asociado a la síntesis de proteínas es muy elevado, por esa razón, los mecanismos de regulación de la expresión genética son sumamente importantes para la fisiología bacteriana (Dale and Park, 2013).

La regulación de la expresión genética puede clasificarse como positiva o negativa; la primera promueve un aumento cuantitativo en la expresión genética, mientras que la segunda promueve una reducción cuantitativa (Zapata, 2004). Existen diversos mecanismos capaces de controlar la expresión genética en las bacterias, y generalmente suelen ser más fáciles

de estudiar que en los organismos eucariontes. Los primeros modelos sobre regulación de la expresión genética en los organismos procariontes, han sido la base de numerosas investigaciones que buscan develar los mecanismos de regulación detrás de la diversidad fenotípica. Gracias a los trabajos pioneros de [Jacob and Monod \(1961\)](#) se concretaron modelos que explican cómo es que se regulan algunas unidades genéticas funcionales, en particular, del operon lac en *Escherichia coli* ([Davies and Jacob, 1968](#); [Jacob and Monod, 1961](#)). El impacto de estos trabajos impulsó gran parte de las investigaciones contemporáneas sobre mecanismos de regulación y su importancia sigue siendo vigente.

### 1.3. Regulación transcripcional

El control de la expresión genética en los organismos procariontes ocurre principalmente a nivel transcripcional, mientras que en los organismos eucariontes los controles a nivel post-transcripcional y traduccional suelen ser más relevantes ([Nelson et al., 2008](#)). El estudio del control a nivel transcripcional se enfoca en la caracterización de los procesos moleculares que derivan en la conversión de la información codificada en secuencias de DNA, a la producción de la molécula de RNA mensajero. Este proceso se lleva a cabo mediante la acción de la polimerasa de RNA y al igual que la duplicación del DNA, se lleva a cabo en la dirección 5' a 3' ([Dale and Park, 2013](#)). La polimerasa de RNA en *B. subtilis* está compuesta por un complejo de múltiples subunidades, las cuales son:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\beta'$ ,  $\delta$  y  $\omega$ ; la unión de este complejo con el factor sigma constituyen a una holoenzima, la cual es capaz de unirse a promotores de manera específica ([Voet and Voet, 2006](#)). En los organismos procariontes, existen diferentes mecanismos de regulación a nivel transcripcional, por ejemplo: regulación positiva, negativa, multivalente o autógena, donde cada uno de estos mecanismos es capaz de exhibir dinámicas particulares ([Zapata, 2004](#)). Además, estos sistemas están controlados por un gran número de elementos conocidos como factores transcripcionales y en algunos casos por RNAs reguladores ([Voet and Voet, 2006](#)). A pesar de que los mecanismos de regulación genética en los organismos procariontes son diferentes a los mecanismos de los organismos

eucariontes, el uso de organismos modelos como *E. coli* y *B. subtilis* ha ayudado a dilucidar mecanismos clave para entender la regulación de la expresión genética. Las enzimas y factores transcripcionales que intervienen en la transcripción en *B. subtilis* son bastante parecidos a los de *E. coli* y otras bacterias, sin embargo, los procesos fisiológicos que se derivan a partir de estos mecanismos pueden ser muy diferentes entre sí (Hoch et al., 1993; Ramos et al., 2000; Sezonov et al., 2007).

Podemos identificar dos tipos de genes en las bacterias: constitutivos e inducibles, dependiendo de sus características pueden ser capaces de regular la expresión de otros genes y en algunos casos regularse a sí mismos positivamente o negativamente (Nelson et al., 2008; Zapata, 2004). Los genes de expresión constitutiva son aquellos que se transcriben continuamente mediante la interacción de un promotor y la polimerasa de RNA sin intervención de reguladores adicionales. Por otro lado, los genes inducibles son regulados por elementos adicionales a la polimerasa de RNA (Zapata, 2004). Este tipo de genes y las interacciones con sus reguladores son temas que han sido ampliamente estudiados, y sus aportaciones han sido sumamente relevantes para entender una gran variedad de procesos fisiológicos (Hayes et al., 1964; Rud et al., 2006).

El estudio de la expresión genética en las bacterias engloba diferentes aspectos; la sola presencia de un gen dentro de una célula no es un indicador en sí mismo de cuándo ni cómo es producido el producto codificado. No es recomendable limitarnos exclusivamente a la identificación de genes debido a los múltiples mecanismos de regulación que controlan a la expresión genética (Voet and Voet, 2006). Por ejemplo, se han identificado genes que codifican la síntesis de una cápsula de ácido poliglutámico en la cepa 168 de *B. subtilis*. Sin embargo, estos genes no son expresados y la cápsula no es sintetizada (Switzer et al., 2002). Es posible encontrar ejemplos parecidos en los organismos eucariontes y dichos hallazgos refuerzan el planteamiento anterior: la presencia de un gen no determina en su totalidad la expresión del producto codificado.

#### 1.4. Genes y ambiente

Las células interactúan constantemente con el ambiente recibiendo señales externas que pueden modificar sus patrones de expresión genética. La regulación de la expresión genética permite que las bacterias respondan ante fluctuaciones ambientales constantes, lo cual suele ser necesario para su supervivencia (Zapata, 2004). Además, la expresión genética puede cambiar a lo largo del ciclo de vida de los organismos (Nelson et al., 2008). La habilidad de las bacterias para monitorear y responder ante cambios ambientales involucra procesos de transducción de señales, los cuales influyen en la expresión genética (Baker et al., 2003). Los sistemas de dos componentes utilizados por las bacterias son un ejemplo. Este tipo de mecanismos consiste generalmente en una proteína que recibe una señal extracelular, y posteriormente una cinasa fosforila un segundo regulador, el cual a su vez activa genes específicos dentro de la célula (Hoch et al., 1993). La célula no es un ente aislado que actúa de manera independiente ante las fluctuaciones ambientales, y a pesar de que se han caracterizado algunos mecanismos moleculares de estas interacciones, aún siguen existiendo preguntas abiertas.

#### 1.5. Complejidad biológica y genoma

Si elaboramos una clasificación de los organismos basada en la cantidad de genoma haploide presente en cada uno de ellos, podemos preguntarnos si existen organismos más complejos <sup>2</sup> que otros en función de la cantidad de DNA presente en cada célula. Esta pregunta ha sido analizada en el pasado generando discusiones enriquecedoras. La paradoja del valor C acuñada por Thomas Jr (1971) y que nace con los estudios y nomenclatura propuesta por Swift (1950) señala que no existe una relación lineal entre complejidad y tamaño de genoma. Se han encontrado amebas unicelulares que poseen genomas cien veces más grandes que el genoma humano a pesar de parecer a simple vista organismos menos complejos (Eddy, 2012).

---

<sup>2</sup>En los fenómenos biológicos intervienen múltiples factores que al interactuar entre sí generan resultados impredecibles. Por lo tanto, la complejidad no debería estar asociada al tamaño de los genomas ya que esta postura no toma en cuenta las interacciones que ocurren en distintos niveles de organización biológica.

Este tipo de ejemplos exponen las deficiencias de las clasificaciones de organismos basadas únicamente en el tamaño de los genomas, por esa razón debemos ser más cautelosos con las suposiciones que establecen relaciones lineales entre complejidad biológica y tamaño de genomas. Adicionalmente, existe la paradoja del valor G, la cual establece que no existe una relación lineal entre número de genes y complejidad de un organismo, haciendo un paralelismo con la paradoja del valor C (Hahn et al., 2002).

Si el número de genes o el tamaño del genoma no determinan el grado de complejidad biológica de un organismo, ¿entonces qué lo determina? Podemos visualizar las diferentes formas de organización de la materia en distintos niveles de organización que incrementan su complejidad. Las moléculas biológicas se organizan y forman macromoléculas, las cuáles a su vez forman células, y en el caso de los organismos eucariontes y algunos procariontes, son capaces de formar cuerpos multicelulares que dan lugar a nuevas jerarquías (Lobo, 2008). Una diferencia importante entre los organismos eucariontes y procariontes (además del tamaño de sus genomas) radica en la diversidad de mecanismos reguladores de la expresión genética. Los tipos de mecanismos en los organismos eucariontes suelen ser más sofisticados y la mayoría de las veces ni siquiera son comprendidos en su totalidad. El estudio de la complejidad biológica no solamente involucra tamaños y números, también involucra la comprensión sobre cómo se integran distintos niveles de organización, y los mecanismos de regulación subyacentes en cada uno de estos niveles. De esta manera, los cuestionamientos sobre las correlaciones lineales entre complejidad y número de elementos en redes de regulación genética incrementan su relevancia. Gran parte de los mecanismos de regulación genética son no lineales, y su comprensión exige más que correlatos lineales carentes de explicaciones sobre mecanismos biológicos. A pesar de que se han caracterizado numerosos mecanismos de regulación genética, muchos de ellos siguen sin ser comprendidos en su totalidad.

## 1.6. Redes de regulación genética

Las redes de regulación genética son capaces de controlar una gran variedad de estados fisiológicos bacterianos (Alon, 2006; Martínez-Antonio and Collado-Vides, 2003). No todas las redes están compuestas por el mismo número de elementos, algunas de ellas pueden poseer el doble o triple de elementos con respecto a redes más pequeñas, y el tipo de interacciones entre sus elementos suelen ser diferentes entre sí (Alon, 2006). Los elementos de cada red de regulación genética interactúan entre sí de diferentes maneras, y son dichas interacciones las que controlan cómo es que generan los diferentes tipos de productos genéticos. No siempre existe una delimitación clara entre las redes de regulación genética que controlan diferentes procesos fisiológicos dentro de una célula. Los elementos de una red de regulación genética pueden asociarse a más de un proceso fisiológico, y la mayoría de las veces no es posible visualizarlas como entidades separadas (Alon, 2006, 2007). Sin embargo, al identificar los elementos mínimos necesarios capaces de controlar un determinado tipo de comportamiento biológico, se facilitan las condiciones para poder estudiar los núcleos que controlan procesos fisiológicos de interés.

Existen diferentes maneras de estudiar la regulación de la expresión genética a nivel celular. Una manera de hacerlo desde el punto de vista teórico, consiste en la implementación de modelos de redes booleanas (Arias Del Angel et al., 2018; Quiñones-Valles et al., 2014). En particular, Arias Del Angel et al. (2018) implementaron un modelo de redes booleanas para estudiar la transición hacia la multicelularidad en *Myxococcus xanthus*. Dicho modelo describe los mecanismos biológicos capaces de regular la agregación de células, y los diferentes escenarios que emergen de las interacciones entre los elementos que la regulan. Algunos de los atractores generados por el modelo booleano son capaces de ser asociados con tipos celulares observados durante diferentes etapas del ciclo de vida de *M. xanthus*. Por ejemplo, el modelo predice cuatro tipos de atractores que representan células vegetativas, esferoplastos, mixoesporas y células que entran al estado de autólisis. Dicho estudio puede ayudarnos a comprender los mecanismos detrás de la transición hacia la multicelularidad entre células de

diferentes tipos. Un elemento distintivo de dicho estudio es que no se enfoca en el análisis de genes de manera aislada. Este enfoque integrativo es capaz de capturar las interacciones entre enzimas, factores transcripcionales y estímulos ambientales de manera dinámica. Otro enfoque similar consiste en la aplicación de modelos booleanos para estudiar el ciclo celular. En particular, [Quiñones-Valles et al. \(2014\)](#) implementaron un modelo booleano para estudiar la diferenciación y el ciclo celular de *Caulobacter crescentus*. Dicho modelo genera predicciones sobre comportamientos sincrónicos y oscilatorios entre los elementos que regulan a el ciclo celular. Además, captura la dinámica de regulación subyacente de los elementos que regulan el ciclo celular de *C. crescentus* bajo diferentes tipos de estímulos ambientales. Una predicción de relevancia es la de dos tipos celulares observables en *C. crescentus*. Uno de ellos consiste en una célula que posee un flagelo que le confiere movilidad, mientras que el otro tipo de célula es capaz de adherirse a superficies ([Quiñones-Valles et al., 2014](#)). Cabe señalar que los procesos asociados a la duplicación de DNA y ciclo celular no ocurren de la misma manera en ambos tipos de células, por lo que lo convierte en un modelo de interés para estudiar procesos similares. Generalmente, el ciclo celular es un proceso altamente controlado en la mayoría de los organismos, y está compuesto por un gran número de elementos ([McAdams and Shapiro, 2003](#)). Las redes booleanas tienen la capacidad de capturar las interacciones entre un gran número de elementos regulatorios, lo que las convierte en una buena herramienta para modelar redes muy grandes. Como todas las herramientas que tenemos a nuestra disposición, existen ventajas y desventajas (Ver discusión del Capítulo 4). De ahí la importancia de tener claro cuáles son los objetivos y las preguntas de interés.

Se ha argumentado que la “redundancia” en redes de regulación genética puede proporcionar “robustez” a los sistemas biológicos ([Whitacre, 2012](#)). No obstante, existen sistemas biológicos en los cuales la “redundancia” no necesariamente proporciona “robustez” a las redes de regulación genética. Algunos sistemas catalogados como “redundantes”, poseen características particulares para el procesamiento de señales biológicas en sistemas de transducción de señales ([Antebi et al., 2017](#)). Es decir, la redundancia puede dar lugar a mecanismos de decodificación de señales celulares mediante combinaciones de elementos redundantes.

En ese sentido, podemos replantearnos cuál es el efecto de los elementos tradicionalmente catalogados como redundantes en la decodificación de mensajes dentro de la célula.

En muchos casos, los elementos de una red de regulación genética están vinculados con distintos tipos de sensores; esta conexión entre sensores y redes de regulación genética le permite a las bacterias responder a fluctuaciones ambientales constantes (Hamoen et al., 2003). Los mecanismos biológicos que le permiten a los organismos interactuar con el ambiente no tienen que ser sumamente complejos para garantizar su supervivencia. Podría parecer que si un grupo organismos posee mecanismos de regulación menos sofisticados que otro grupo, entonces sus posibilidades para habitar en ambientes extremos es menor, sin embargo, este no es siempre el caso. Mientras que algunos organismos poseen mecanismos de regulación compuestos por un gran número de elementos, otros organismos no requieren mecanismos tan sofisticados para sobrevivir. Tal es el caso de las bacterias, las bacterias han sido capaces de sobrevivir en ambientes extremos en los que no es posible encontrar plantas o animales, como por ejemplo ambientes con un alto nivel de acidez, alcalinidad o de temperaturas extremas (Rothschild and Mancinelli, 2001). Por esa razón, debemos replantear y cuestionar las nociones tradicionales de organismos “superiores” e “inferiores”.

### **1.7. Sistemas teleológicos en la biología**

La teleología o doctrina de las causas finales (Española, 2003), ha tenido una influencia importante en la biología (Ayala, 1970), en particular en estudios sobre la expresión genética. De acuerdo con dicha visión, cada gen o elemento dentro de la célula obedece a una causa final. Tal como se ha revisado, los genes se transcriben cuando existen los mecanismos y condiciones que garantizan su transcripción, pero no necesariamente cuando la célula lo “necesita”. La maquinaria de regulación transcripcional en las bacterias es capaz de detener la transcripción de algunos genes; sin embargo, es posible encontrar ejemplos en los que se transcriben genes que no se “necesitan”. Por el contrario, actúan en detrimento de la célula afectando procesos fisiológicos que derivan en condiciones patológicas (Proctor and

Fuhrman, 1990). De esta manera, se hace patente la noción de que en *B. subtilis*, la secuencia de un gen no determina la entrada hacia el estado de competencia o de esporulación. Sin embargo, existen elementos que al interactuar dinámicamente inducen la entrada hacia alguno de dichos estados cuando existen las condiciones y los mecanismos apropiados. Las visiones teleológicas en la biología siguen siendo un tema de discusión y sin lugar a dudas hay mucho que debatir.

## Capítulo 2

### Revisión literaria y antecedentes sobre el estudio del estado de competencia en *B. subtilis*

El estudio sobre la regulación del estado de competencia en *B. subtilis* ha contado con la participación de numerosos grupos de trabajo, cada uno con enfoques y preguntas diferentes. En este capítulo presento un breve recuento sobre algunas de estas investigaciones, las cuáles son el fundamento para plantear nuevas preguntas sobre la regulación del estado de competencia desde el punto de vista de la excitabilidad utilizando modelos teóricos. Hago particular énfasis en analizar los mecanismos biológicos y condiciones involucradas en la regulación del estado de competencia.

#### 2.1. Antecedentes históricos

El estado de competencia se define de manera general como un estado fisiológico que permite la unión, procesamiento e internalización de DNA exógeno en forma macromolecular al interior celular (Dubnau, 1991). Dicho estado es observado principalmente durante la fase estacionaria, bajo condiciones de limitación de nutrientes y alta densidad celular (Hamoen et al., 2003). Además, es un estado ampliamente extendido entre las bacterias conocidas y ha sido propuesto como un mecanismo de transferencia horizontal de genes, al igual que la transducción y conjugación bacteriana (Solomon and Grossman, 1996).

Es importante distinguir entre el estado de competencia que ocurre de manera “natural”, del estado de competencia inducido de manera artificial mediante el uso de agentes físicos y

químicos. Griffith (1928) descubrió la competencia “natural” al investigar cepas patogénicas y no patogénicas de *Streptococcus pneumoniae*, y encontró que las bacterias de cepas no patogénicas podían transformarse en bacterias patogénicas mediante la inoculación de bacterias patogénicas muertas. Además, observó que la patogenicidad podía ser transmitida a la progenie; sin embargo, no fue capaz de caracterizar el “factor transformante” responsable de estos cambios, hasta que en 1944 Avery proporcionó evidencia contundente que señalaba a el DNA como dicho factor transformante (Avery et al., 1944).

El estado de competencia es un estado presente tanto en bacterias Gram <sup>1</sup> positivas como en bacterias Gram negativas y es considerado como un estado fisiológico relevante en la fisiología bacteriana (Dubnau, 1991). El estudio del estado de competencia tiene alcances que ya están siendo explotados por numerosos laboratorios y centros de investigación alrededor del mundo (Wang et al., 2018). Sin embargo, el estudio de las interacciones y la dinámica entre los componentes que regulan a este estado requiere mayor profundización.

## 2.2. Transformación bacteriana

La transformación bacteriana es un proceso que altera el material genético de una célula, mediante la incorporación de material genético exógeno y puede ocurrir de manera “natural” o “artificial” (Blokesch, 2016). Existen varias etapas durante el proceso de transformación en *B. subtilis*. Dichas etapas consisten en la unión, fragmentación e incorporación del material genético (Switzer et al., 2002). Para que una célula pueda llevar a cabo la incorporación de material genético exógeno primero debe de entrar a el estado de competencia (Hoch et al., 1993). Las células que entran a el estado de competencia, no sólo adquieren la capacidad para incorporar DNA exógeno, también sufren alteraciones a nivel fisiológico. Estas alteraciones promueven la entrada a un estado de latencia, arresto del ciclo celular y disminución en la síntesis de macromoléculas (Nester and Stocker, 1963). Además, la entrada a el estado de

---

<sup>1</sup>La clasificación entre bacterias gram positivas y bacterias gram negativas se basa en la técnica de laboratorio conocida como tinción de gram. Las bacterias gram positivas se tiñen de color morado y las gram negativas de color rosa. Dichas diferencias radican en los diferentes componentes estructurales de las paredes celulares.

competencia es influenciada por el medio de cultivo que proporciona nutrientes a las bacterias; se han reportado disminuciones en la frecuencia de entrada a el estado de competencia cuando se sustituye glucosa por glicerol o cuando se adiciona glutamina a la glucosa (Albano et al., 1987). A pesar de que es posible seguir enumerando una gran cantidad de variables que afectan a este estado fisiológico, es de gran interés identificar las que son más relevantes.

### 2.3. Estado de competencia en *B. subtilis*

No todos los individuos de una población isogénica de *B. subtilis* responden de la misma manera al ser sometidos a un ambiente con insuficiencia de nutrientes. Bajo condiciones de estrés nutricional, la mayoría de las células entran a el estado de crecimiento vegetativo y, posteriormente, esporulan al término de la fase de crecimiento exponencial e inicio de la fase estacionaria (Süel et al., 2006). Sin embargo, se han identificado subpoblaciones que no esporulan y se diferencian transitoriamente hacia el estado de competencia (Tsang and Van Oudenaarden, 2006). De acuerdo con algunos autores, la transición de células no competentes a células competentes se asemeja a la de un interruptor genético, y se han propuesto diversos mecanismos que actúan a través de mecanismos de autoactivación cooperativa o represión mútua para explicar este fenómeno (Leisner et al., 2007). Adicionalmente, existen procesos de diferenciación alternativos que ocurren durante la fase estacionaria, como la motilidad, expresión de enzimas degradadoras y producción de antibióticos (Hoch et al., 1993).

### 2.4. Características generales de *B. subtilis*

El género *Bacillus* se caracteriza por la endoespora, la cual es una estructura muy resistente, y es capaz de sorportar una gran variedad de agentes físicos y químicos. Gran parte de las esporas se observan ante situaciones desfavorables para la obtención de nutrientes (Hoch et al., 1993). Por otro lado, en los organismos eucariontes, la espora juega un papel diferente ya que su formación está asociada principalmente a procesos reproductivos y no siempre de supervivencia (Sonenshein et al., 2002). El estudio de los miembros del género *Bacillus* sigue

siendo un tema de discusión por muchas razones, una de ellas se debe a la existencia de agregados de células filamentosas que ponen en discusión la definición de célula individual (Dawes and Thornley, 1970). A pesar de que muchas de las clasificaciones taxonómicas del género *Bacillus* se basan en características morfológicas, los análisis de las secuencias de DNA complementan a las clasificaciones morfológicas cuando son muy complicadas (Priest, 1993).

Es posible clasificar a las especies del género *Bacillus* en seis taxa de acuerdo a su fisiología. Dentro de esta clasificación, *B. subtilis* pertenece al grupo II, que se caracteriza por su capacidad para producir ácidos a partir de glucosa, y representa un grupo intermedio entre anaeróbicos facultativos verdaderos del grupo I y aerobios estrictos de los grupos III y IV (Hoch et al., 1993).

El intercambio de genes entre individuos provenientes de poblaciones clonales de *B. subtilis* suele ser más frecuente que en *E. coli* y *Salmonella typhirium*, aunque las implicaciones a nivel evolutivo de este intercambio no han quedado del todo esclarecidas (Sonenshein et al., 2002). A su vez, la transferencia de plásmidos en *E. coli* y *S. typhirium* ocurre con mayor frecuencia en comparación de *B. subtilis* y otras especies de bacterias (Hoch et al., 1993; Van Elsas et al., 1987). Los suelos son el tipo de hábitat más común de *B. subtilis*, aunque también es posible encontrarlo en plantas, animales e incluso algunos cuerpos de agua (Hoch et al., 1993).

La pared celular de *B. subtilis*, al igual que la de otras bacterias Gram positivas esta compuesta principalmente de peptidoglicano, polimeros aniónicos, polisacáridos y otras proteínas (Sonenshein et al., 2002). *B. subtilis* posee un sistema de transformación eficiente, lo que lo convierte en un organismo modelo ideal para estudiar procesos importantes, como la duplicación de cromosomas. Además, es un modelo ampliamente utilizado para estudiar mecanismos de regulación transcripcional en bacterias Gram positivas (Hoch et al., 1993).

#### **2.4.1. Esporulación**

Las células de *B. subtilis* se alargan durante su crecimiento y una vez que duplican su tamaño original se dividen por fisión binaria (Angert, 2005). No obstante, no todas las células

siguen este proceso y algunas esporulan. La esporulación en *B. subtilis* es un proceso de diferenciación que culmina con la formación de la endoespora, sobre todo ante situaciones de falta de nutrientes. Dicho estado es precedido por el estado de crecimiento vegetativo, que ocurre principalmente durante la fase estacionaria, sin embargo, se han observado algunos eventos de esporulación durante la fase de crecimiento exponencial (Schaeffer et al., 1965). Algunos autores han sugerido que la esporulación es un proceso inherentemente probabilístico, y consideran que la falta de nutrientes es sólo una forma de incrementar la probabilidad de entrar hacia dicho estado (Dawes and Thornley, 1970).

Se asume de manera general que durante el proceso de esporulación, los individuos de las especies del género *Bacillus* no requieren interacciones con otras células para inducirlo (Piggot and Coote, 1976). Además, una vez que una célula entra al proceso de esporulación, es posible observar cambios a nivel bioquímico y morfológico (Piggot and Hilbert, 2004; Stragier and Losick, 1996). Otro dato interesante podemos encontrarlo en el grado de variabilidad que las esporas de *B. subtilis* son capaces de exhibir al ser expuestas ante altas temperaturas (Condón et al., 1996), dicha evidencia apunta hacia la existencia de heterogeneidad dentro de un mismo estado de diferenciación celular. Es decir, grupos de células que poseen el mismo genoma y que entran hacia un mismo estado de diferenciación, son capaces de exhibir heterogeneidad en sus respuestas ambientales.

## **2.5. Reguladores del estado de competencia en *B. subtilis***

La transición hacia el estado de competencia en *B. subtilis* depende de un incremento en la concentración del factor transcripcional ComK, el cual es capaz de activar al operón *comG* (Süel et al., 2006). El conjunto de genes que conforman al operón *comG* está directamente regulado por el factor transcripcional ComK, por lo que su estudio es fundamental para entender el control del estado de competencia. El operón *comG* es crucial para inducir el estado de competencia, este operón codifica proteínas que facilitan la unión de DNA exógeno desde la superficie al interior celular (Süel et al., 2006). Estas proteínas son capaces de permitir el

acceso de DNA de doble cadena al receptor ComEA en la superficie de la célula (Switzer et al., 2002).

Es posible visualizar la regulación del estado de competencia a partir de módulos que interactúan entre sí. Por un lado, existe un módulo que recibe señales de comunicación celular y de limitación de nutrientes del ambiente. Dichas señales regulan la concentración del péptido ComS, el cual afecta positivamente a ComK, mientras que ComK compite por su propia degradación por el complejo degradador MecA (ver Fig 3.1) (Switzer et al., 2002). Podemos visualizar un segundo módulo productor del factor transcripcional ComK, el cual es el elemento principal que induce la entrada hacia el estado de competencia (Switzer et al., 2002). La interacción de estos dos módulos junto con reguladores adicionales intervienen en el control del estado de competencia en *B. subtilis* (Fig 2.1).

### 2.5.1. Factor transcripcional ComK

El elemento principal de la red de regulación genética capaz de controlar la entrada transitoria hacia el estado de competencia es el factor transcripcional ComK (Hahn et al., 1994; Sinderen et al., 1995). Su regulación ocurre principalmente a nivel transcripcional y post-traducciona (Leisner et al., 2007; Van Sinderen and Venema, 1994). ComK es una proteína compuesta por 192 residuos de aminoácidos capaz de activar su propia expresión (retroalimentación positiva) uniéndose a una región río arriba del promotor *P<sub>comK</sub>* (Switzer et al., 2002). No es posible prescindir de este factor transcripcional para inducir el estado de competencia; sin embargo, es posible prescindir de un gran número de reguladores de la red de regulación genética (Van Sinderen and Venema, 1994). De acuerdo con Gamba et al. (2015), a pesar de bloquear a los reguladores adicionales que actúan sobre *comK*, es posible seguir observando células que se diferencian hacia estados competentes.

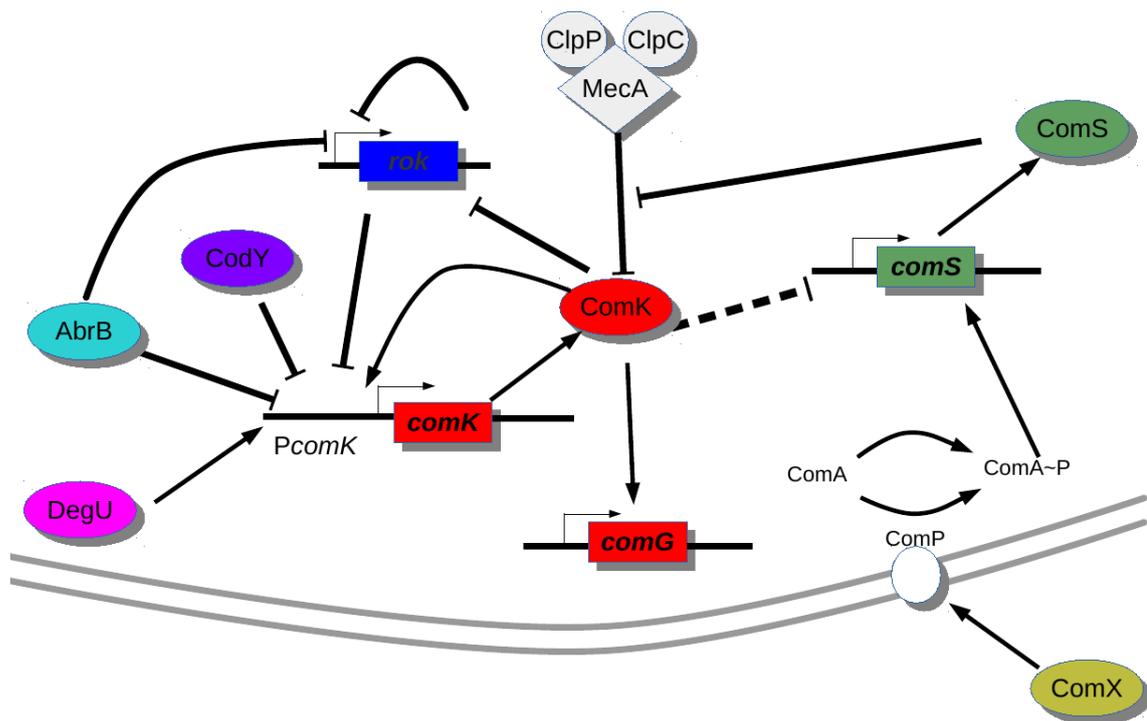


Figura 2.1: Representación esquemática de las interacciones intracelulares y extracelulares que regulan la entrada transitoria hacia el estado de competencia en *B. subtilis*. ComK es capaz de autoactivarse a sí mismo y de activar al operón *comG*. El complejo proteolítico MecA degrada a ComK. ComS previene la degradación de ComK por medio de inhibición competitiva. ComK inhibe de manera indirecta a ComS reprimiendo al promotor *comS*. ComK compete contra ComS por su degradación mediada por el complejo proteolítico MecA. DegU estimula la unión del factor transcripcional ComK a *PcomK*. AbrB afecta negativamente la transcripción de *comK* y de *rok*. CodY regula negativamente la expresión de *comK*. Rok es capaz de afectar negativamente la expresión de *comK* y de sí mismo. ComK afecta negativamente la expresión de *rok*. ComX es capaz de modular la regulación del estado de competencia a nivel poblacional. ComX activa a la cinasa ComP. ComP se autofosforila y transfiere un grupo fosfato a ComA. ComA-P modula a *srfA*. *srfA* es un operón que contiene al gen *comS*. Las flechas negras representan activación, las líneas achatadas representan inhibición si la interacción actúa sobre productos genéticos y represión si actúan sobre los genes.

### 2.5.2. Péptido ComS

El gen *comS* codifica un péptido de 46 residuos de aminoácidos que se encuentra embebido dentro del operón *srfA*, y puede estar regulado por mecanismos de comunicación bacteriana (Switzer et al., 2002). En condiciones de estrés y por falta de nutrientes, el péptido ComS inhibe competitivamente la degradación de ComK por el complejo MecA durante la fase estacionaria (Ogura et al., 1999). A su vez, ComK actúa como un represor de *comS*, lo cual en última instancia disminuye la concentración de ComK debido a un incremento en la degradación de ComK mediada por el complejo MecA (Hahn et al., 1994). El monitoreo simultáneo de las actividades de los promotores *PcomS* y *PcomG* ha mostrado la existencia de una correlación

negativa entre ellos. Dicho hallazgo advierte la existencia de un alto nivel de sincronía entre las actividades de ambos promotores, lo que permite que una fracción de células logre diferenciarse transitoriamente hacia el estado de competencia (Süel et al., 2006). La regulación de ComS es sumamente compleja durante etapas ajenas al proceso de diferenciación hacia estados competentes, por lo que la dinámica de ComS no puede ser explicada únicamente a partir de la correlación negativa con el promotor de *P<sub>comG</sub>* durante etapas ajenas a el estado de competencia; por ejemplo, antes de la fase de crecimiento exponencial.

### **2.5.3. Complejo degradador MecA**

El complejo degradador MecA es fundamental en el proceso de diferenciación transitorio hacia estados competentes; MecA es un complejo ternario que incluye a las proteasas ClpP, ClpC y el adaptador MecA, los cuales en su conjunto degradan a ComK (Turgay et al., 1998). Las proteasas ClpP y ClpC pertenecen a la familia de proteínas de choque térmico HSP100 (por sus siglas en inglés, Heat Shock Protein) (Switzer et al., 2002). La caracterización de MecA ha revelado que posee dos dominios; el dominio amino es capaz de interactuar con ComK, mientras que el dominio carboxilo interactúa con ClpC incrementando la afinidad del adaptador MecA con ComK (Switzer et al., 2002). De la misma manera, la unión de MecA con el péptido ComS ocurre en el dominio amino terminal. Dicha unión atenúa la degradación de ComK mediada por el complejo degradador MecA, lo que promueve un incremento en los niveles de ComK al interior de la célula (Süel et al., 2006). Experimentos in vitro han mostrado que este complejo degradador también es capaz de degradar a ComS, sin embargo, dicho fenómeno aún no ha sido observado en condiciones naturales (Switzer et al., 2002).

### **2.5.4. Reguladores adicionales**

La caracterización de numerosos reguladores involucrados en el control del estado de competencia, ha sugerido que es posible prescindir de la mayoría de ellos sin afectar significativamente la entrada transitoria hacia el estado de competencia (Süel et al., 2006). No obstante,

la ausencia de estos reguladores, puede derivar en algunas modificaciones de los patrones de expresión genética, sin impedir la aparición de células competentes (Gamba et al., 2015).

Además del péptido ComS y del complejo degradador MecA, existen reguladores adicionales de ComK que afectan positivamente y negativamente su transcripción. El factor transcripcional DegU es capaz de estimular la unión de ComK al promotor *PcomK*, cuando las concentraciones de ComK son bajas (Hamoen et al., 2003).

El factor transcripcional AbrB es capaz de unirse al promotor *PcomK* afectando negativamente su transcripción; se ha sugerido que este factor transcripcional es capaz de impedir la entrada prematura de *B. subtilis* hacia el estado de competencia, lo que podría evitar posibles afectaciones para la división celular (Switzer et al., 2002).

Existe un regulador adicional llamado CodY, el cual está directamente relacionado con cambios en el metabolismo celular, en particular, con cambios asociados a la disponibilidad de nutrientes en el medio; la evidencia sugiere que el factor transcripcional CodY regula negativamente a *comK* disminuyendo sus niveles de expresión (Slack et al., 1995)

Adicionalmente, se ha encontrado que el factor transcripcional Rok afecta negativamente la expresión de *comK*; sin embargo, ComK es capaz de afectar negativamente la expresión del promotor de *rok* (Hoa et al., 2002). ComK no es el único regulador que afecta negativamente la expresión de *rok* debido a que el mismo afecta negativamente su propia expresión (Hamoen et al., 2003). La interacción entre ComK y Rok resulta en un mecanismo de autoinhibición e inhibición mútua interesante, sin embargo, no es un mecanismo necesario para que *B. subtilis* pueda entrar a el estado de competencia.

Las bacterias son capaces de comunicarse entre sí por medio de mecanismos de señalización mediados por diferentes moléculas (Hamoen et al., 2003). Se tiene conocimiento de que el oligopéptido ComX modula la regulación del estado de competencia a nivel poblacional, dicho oligopéptido esta compuesto por 10 aminoácidos y se ha encontrado que al incrementar su concentración en el medio de cultivo, el porcentaje de células competentes puede aumentar hasta un 36 % (Leisner et al., 2007). Por otro lado, existe un regulador adicional llamado *comQ*, el cual es un gen que se localiza río arriba de *comX* y se ha encontrado que su presencia es

necesaria para llevar a cabo modificaciones post-traduccionales de ComK, las cuales pueden ser necesarias para estabilizar a ComK (Hamoen et al., 2003).

## 2.6. Expresión basal de *comK*

Se han observado variaciones significativas en los niveles de expresión basal de *comK* entre células provenientes de poblaciones isogénicas de *B. subtilis*, y se ha sugerido que estas diferencias pueden ser determinantes en la diferenciación hacia el estado de competencia por parte de células individuales (Leisner, 2008). La tasa de expresión basal incrementa de forma exponencial, alcanza un máximo y posteriormente decae a valores cercanos a cero durante la fase estacionaria. Paralelamente a estos cambios en la tasa de expresión basal, el número de individuos que entran a el estado de competencia tiende a variar (Leisner et al., 2007). Dicho de otra forma, la probabilidad de que una célula transite hacia el estado de competencia podría depender de su tasa intrínseca de expresión basal. Este planteamiento sugiere la existencia de una ventana de tiempo que restringe los fenotipos de *B. subtilis* a fases de crecimiento particulares. Se ha planteado la existencia de un umbral que al ser alcanzado, podría ser capaz de promover la activación de una asa de autoactivación positiva, la cuál podría permitir que una célula individual logre llevar a cabo una transición exitosa hacia el estado de competencia (Leisner et al., 2007). En principio, células con niveles de expresión basal más elevados que el promedio, tienen mayores posibilidades de transitar hacia el estado de competencia. Este es un aspecto que se considera más adelante para el análisis del modelo teórico.

## 2.7. Biestabilidad

La biestabilidad puede tener significados diferentes en la biología con respecto a las matemáticas. En la biología, algunos autores definen a la biestabilidad como un fenómeno en el que es posible observar la coexistencia de dos fenotipos distintos en un mismo lugar (Leisner, 2008). Por ejemplo, en el caso del desarrollo del estado de competencia en *B. subtilis* puede referirse a la coexistencia de células competentes y no competentes. Por otro lado, desde

una perspectiva matemática, la biestabilidad se refiere a la coexistencia de dos conjuntos atractores en un determinado sistema (Strogatz, 2018). Si bien es cierto que en algunos casos es posible relacionar ambas nociones. Es importante recordar que algunos modelos matemáticos están dirigidos hacia el estudio de células individuales, por lo que utilizar esta terminología indiscriminadamente al tratar con poblaciones de células y células individuales puede derivar en algunas confusiones.

La biestabilidad tiene importancia en diversos procesos celulares, por ejemplo: respuestas a estrés, diferenciación y ciclo celular (Angeli et al., 2004; Ferrell Jr and Ha, 2014; Tiwari and Igoshin, 2012). Se han reportado en la literatura varios tipos de arreglos en sistemas de regulación de la expresión genética capaces de exhibir biestabilidad. En particular, un arreglo común en circuitos genéticos, consiste en un sistema de señalización celular que contiene ciclos de autoactivación positiva acoplados a una respuesta cooperativa no-lineal. Otro arreglo común consiste en un sistema con dos ciclos de retroalimentación negativa mutuamente represibles entre sí (Angeli et al., 2004; Leisner et al., 2007). Se ha sugerido que la presencia del factor transcripcional ComK es capaz de generar distribuciones bimodales, debido al ciclo de autoactivación positiva que posee (Fig. 3.1) (Gamba et al., 2015). Esto genera una subpoblación de células que expresa a *comK* induciendo la entrada hacia el estado de competencia, mientras que el resto de las células no expresan a *comK*, y por lo tanto no entran hacia el estado de competencia (Maamar and Dubnau, 2005; Smits et al., 2005). Algunos sistemas de regulación transcripcional bacterianos que poseen ciclos de autoactivación positiva pueden generar distribuciones bimodales (Leisner, 2008). Sin embargo, existen circuitos de regulación genética que no poseen ciclos de autoactivación positiva y sin embargo, son capaces de exhibir distribuciones bimodales (Gardner et al., 2000), lo cual sugiere que la bimodalidad no necesariamente implica biestabilidad.

## 2.8. Definición operacional de excitabilidad

La excitabilidad es un concepto del que se se suele hablar por medio de nociones intuitivas sin tener una definición necesariamente precisa. Sin embargo, las nociones mas precisas desde el punto de vista teórico pueden llegar a presentar inconsistencias con respecto al enfoque experimental. La definición clásica reducida a su forma más simple dice que un sistema es excitable si estando en reposo (estado atractor), una perturbación pequeña lo hace regresar al reposo, pero exhibe un comportamiento pulsátil que regresa al reposo para perturbaciones lo suficientemente grandes (Fig. 3.6). Es importante tomar en cuenta que una perturbación debería ser equivalente a cambiar de condición inicial sin cambiar de sistema dinámico (sin cambiar de parámetros). Sin embargo, desde un punto de vista experimental, las perturbaciones suelen ser cambios en los parámetros del sistema (e.g. pulso de corriente inducido en una neurona), lo que equivale a cambiar de sistema dinámico (Herrera-Valdez, 2018). En el caso de la herencia asimétrica de componentes celulares, generados por un proceso de división celular asimétrico, las células nuevas poseen concentraciones iniciales de proteína distintas con respecto a las células progenitoras. Sin embargo, en principio ambas células poseen las mismas reglas de cambio que modulan los componentes internos a nivel subcelular. En adelante, diremos que el sistema que controla a el estado de competencia es excitable, cuando es posible encontrar concentraciones iniciales de ComK y ComS, a partir de las cuales podemos observar transiciones hacia estados competentes con altas concentraciones de ComK, que no necesariamente exhiben retornos hacia el estado vegetativo (Fig. 3.8). Por otro lado, es argumentable que un sistema es excitable si exhibe comportamiento pulsátil recurrente (Fig. 3.7) (sin regresar al reposo) después de ser perturbado.

En el modelo (3.1)-(3.2) es importante que los pulsos de expresión de ComK induzcan la entrada hacia estados competentes. Esto es, que las concentraciones de ComK sean lo suficientemente grandes para activar la maquinaria capaz de internalizar DNA exógeno (Fig. 3.6). La actividad de una célula puede ser representada por familias de sistemas dinámicos autónomos definidos por ecuaciones de evolución con las mismas formas funcionales, pero

variando parámetros dentro de un subconjunto de relevancia dentro del espacio de parámetros (Herrera-Valdez, 2018). En consideración de lo anterior, diremos que una célula es excitable si al menos un miembro de la familia de sistemas dinámicos que la modela es capaz de exhibir comportamientos de excitabilidad. Dichas precisiones son fundamentales para analizar la estructura de bifurcación del modelo. La razón es que resulta insuficiente utilizar un sólo sistema dinámico para modelar la dinámica de regulación del estado de competencia; de ahí la necesidad de incluir familias de sistemas dinámicos para modelar este fenómeno. Otra razón por la cual se optó por utilizar esta definición operacional queda de manifiesto al analizar los distintos tipos de excitabilidad de *B. subtilis*. Es decir, grupos de células que se diferencian transitoriamente hacia estados competentes pueden exhibir distintos tipos de excitabilidad, o bien, una misma célula es capaz de exhibir distintos tipos de excitabilidad ante diferentes estímulos intracelulares o extracelulares.

## 2.9. Monitoreo de células individuales

¿Por qué estudiar células individuales y no poblaciones de células? La entrada hacia el estado de competencia en *B. subtilis* es un fenómeno que ocurre a bajas frecuencias, por lo que utilizar promedios poblacionales podría enmascarar información sumamente valiosa sobre la dinámica de regulación a nivel de células individuales (Rosenfeld et al., 2005). En la actualidad es posible analizar poblaciones de células y células individuales mediante diferentes metodologías. Un elemento distintivo de las investigaciones realizadas por Süel et al. (2006), es su énfasis en monitorear la dinámica de regulación de genes de células individuales de manera simultánea, mediante el uso de microscopía de fluorescencia cuantitativa con promotores controlados. Este enfoque permite obtener información que la mayoría de las veces se diluye con metodologías basadas en promedios poblacionales (Locke and Elowitz, 2009).

El uso de modelos teóricos nos ha permitido analizar el comportamiento de sistemas biológicos desde enfoques complementarios a el trabajo experimental. La capacidad para monitorear experimentalmente la actividad de genes individuales, junto con el uso de modelos

teóricos aporta intuición que difícilmente se obtendría al utilizar por separado experimentos y teoría, en particular, el área de la biología sintética ofrece algunos ejemplos exitosos (Becskei et al., 2001; Gardner et al., 2000). No es de sorprender que los enfoques teóricos hayan permeado en diferentes áreas de la biología (Angeli et al., 2004; FitzHugh, 1969; Hodgkin and Huxley, 1952; Süel et al., 2006, 2007). Dicha diversificación puede ayudar a contrastar paradigmas de pensamiento para poder plantear preguntas biológicas biológicas de interés. En particular, preguntas encaminadas a investigar los mecanismos generadores de heterogeneidad celular con mayor detalle, y sus posibles beneficios a nivel evolutivo.

## Capítulo 3

### **Análisis de la dinámica de regulación del estado de competencia de *B. subtilis***

En el presente capítulo analizo la transición hacia el estado de competencia en *B. subtilis*, desde el punto de vista de la excitabilidad utilizando el modelo teórico de Süel et al. (2006). Presento un análisis de circuitos genéticos alternativos posiblemente capaces de permitir que una célula transite hacia estados de excitación, y también para la permanencia en el estado de competencia, así como una justificación de los parámetros utilizados. Posteriormente, presento un análisis de bifurcación para estudiar los cambios cualitativos generados por variaciones en las características internas de circuitos genéticos alternativos, y su respectiva interpretación biológica.

#### **3.1. Elementos mínimos necesarios para modelar la entrada transitoria hacia el estado de competencia en *B. subtilis***

No siempre resulta sencillo realizar manipulaciones experimentales para modificar los parámetros de un circuito genético, por esa razón, el uso de modelos teóricos es de gran utilidad. El modelo teórico de Süel et al. (2006) y sus colaboradores, parte de un conjunto de suposiciones basadas en evidencia experimental, en las que se identifica y caracteriza a un conjunto de elementos mínimos necesarios capaces de generar comportamientos de excitabilidad, durante la diferenciación hacia estados competentes, y los incorpora en un modelo con dos variables de estado.

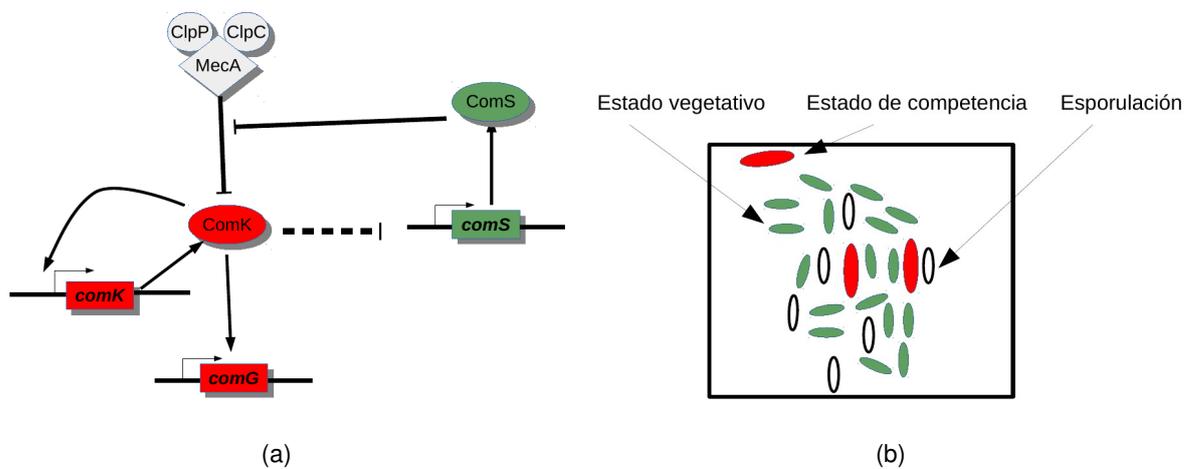


Figura 3.1: Elementos mínimos necesarios capaces de modular la transición hacia el estado de competencia en *B. subtilis* y representación de su diversidad fenotípica ante condiciones de estrés. (a) El factor transcripcional ComK, el péptido ComS y el complejo proteolítico MecA constituyen una unidad funcional capaz de regular la transición hacia el estado de competencia en *B. subtilis*. ComK compete contra ComS por su degradación mediada por el complejo proteolítico MecA. ComK es capaz activarse a sí mismo y al operón *comG*, el cual es un operón que contiene genes que codifican productos necesarios para la internalización de material genético exógeno. Las flechas negras representan activación, las líneas achatadas representan inhibición si la interacción actúa sobre productos genéticos y represión si actúan sobre los promotores de los productos genéticos. Las líneas discontinuas de ComK hacia *PcomS* representan la inhibición indirecta de ComK sobre ComS. (b) Posibles respuestas de *B. subtilis* en respuesta a condiciones de estrés y falta de nutrientes. Las células verdes representan células que entran al estado vegetativo al introducir el gen reportero *yfp* bajo el control de *PcomS*, las células ovaladas blancas con borde negro representan células que han esporulado, las células rojas representan células competentes al introducir el gen reportero *cfp* bajo el control de *PcomG*.

¿Cómo se justifica la selección de los reguladores necesarios para generar comportamientos de excitabilidad? Tal como se mencionó en el Capítulo 2, existen varios reguladores involucrados de manera directa e indirecta en la actividad de *comK* (Fig. 2.1). Un elemento distintivo de este sistema de regulación, radica en el hecho de que los reguladores adicionales que actúan sobre *comK* no siempre se encuentran activos. De hecho, durante la diferenciación hacia estados competentes, la mayoría de ellos no actúan sobre *PcomG*, el cual es el promotor que controla la expresión de los genes necesarios para internalizar el material genético exógeno, y que está controlado directamente por *comK* (Süel et al., 2006, 2007). Esto se conoce por varios experimentos; el primero de ellos fue realizado por Süel et al. (2006), y consiste en el monitoreo de la actividad simultánea de *PcomG* y *PcomK* utilizando genes reporteros en células individuales. El alto grado de sincronía exhibido entre ellos, sugiere que los reguladores adicionales que se han identificado no ejercen un papel significativo sobre *PcomG* ni *PcomK* durante la diferenciación hacia estados competentes. Sin embargo, pueden tener un papel más significativo antes de la fase de crecimiento exponencial. El segundo experimento de relevancia realizado por Süel et al. (2006) consiste en el monitoreo simultáneo de las actividades de los promotores *PcomS* y *PcomG*. Lo que se encontró fue que cuando la diferenciación hacia estados competentes inicia, los niveles de ComK aumentan y los de ComS disminuyen, lo cual sugiere una sincronía negativa entre ambos. Sin embargo, cuando esto ocurre, MecA degrada a ComK. Cabe señalar que este nivel de sincronía no se observa durante etapas ajenas a la diferenciación hacia estados competentes. Es decir, durante etapas ajenas a la transición hacia el estado de competencia, ComK no compete por su propia degradación mediada por MecA. En un tercer experimento realizado por Gamba et al. (2015), se observó que el bloqueo de todos los reguladores adicionales que actúan sobre *comK*, no impide que una fracción de células se diferencie hacia estados competentes. Es decir, la autoactivación de *comK* es suficiente para inducir la entrada hacia estados competentes debido a su capacidad para autoactivarse positivamente. A pesar del bloqueo de los reguladores adicionales, es posible observar distribuciones bimodales de células que entran hacia el estado de competencia, con concentraciones variables de ComK y células que no lo hacen. Las conclusiones generadas a partir del monito-

reo de las actividades de diferentes promotores, coincide con la perspectiva minimal del modelo teórico. De esta manera, es posible establecer suposiciones para construir un modelo que no involucre a ciertos elementos de forma explícita, capturando de forma razonable la entrada y salida transitoria del estado de competencia (para mayores detalles sobre el tratamiento de las ecuaciones favor de consultar el material suplementario). Por lo anterior, se ha sugerido que dicho conjunto de elementos mínimos necesarios constituye una unidad funcional capaz de generar los pulsos de expresión transitorios y oscilatorios que han sido reportados en la literatura (Süel et al., 2006, 2007). Los elementos que constituyen dicha unidad funcional son el factor transcripcional maestro ComK, el péptido ComS y el complejo degradador MecA. La interacción entre estos tres elementos es capaz de generar el comportamiento pulsátil en la expresión de ComK, y son estas interacciones en las que me concentro. Los parámetros del modelo teórico se obtuvieron de la cuantificación indirecta del factor transcripcional ComK y del péptido ComS de Süel et al. (2006), en la que los autores utilizaron técnicas de microscopia de fluorescencia cuantitativa, y genes reporteros acoplados a promotores controlados en células individuales. De esta manera, *cfp* fue acoplado bajo el control de *comG* y *yfp* fue acoplado bajo el control de *comS*. Debido a que ComK es el regulador más importante, y que además está fuertemente correlacionado con *comG*, se incorporó a ComK como una de las variables de estado del modelo (Süel et al., 2006). Las simulaciones computacionales generadas para el análisis geométrico del modelo teórico se obtuvieron utilizando el lenguaje de programación Python 2.7, junto con los módulos Matplotlib y SciPy. Para mayores detalles favor de consultar el material suplementario.

### 3.2. Modelo teórico

De acuerdo con Süel et al. (2007), la arquitectura de los circuitos genéticos (o las interacciones entre sus elementos), los parámetros cuantitativos (fuerzas de los promotores) y el ruido de componentes internos y externos, determinan diferentes tipos de comportamientos dinámicos a nivel celular. El enfoque del presente trabajo se centra en los primeros dos elementos: la

arquitectura de los circuitos genéticos y los parámetros cuantitativos. La versión más simple del modelo determinista y autónomo de Süel et al. (2006), consta de un sistema de dos ecuaciones diferenciales no lineales acopladas de la forma:

$$\frac{dK}{dt} = a_k + \frac{b_k K^n}{K_0^n + K^n} - \frac{K}{1 + K + S} \quad (3.1)$$

$$\frac{dS}{dt} = \frac{b_s}{1 + (K/K_1)^p} - \frac{S}{1 + K + S} \quad (3.2)$$

Donde  $dK/dt$  (ecuación (3.1)) representa el cambio en la concentración intracelular del factor transcripcional ComK ( $K$ ), mientras que  $dS/dt$  (ecuación (3.2)) representa al cambio en la concentración intracelular del péptido ComS ( $S$ ). Bajo la suposición de que ocurren sin retardo, la ecuación (3.1) y la ecuación (3.2) representan procesos globales de regulación de la expresión genética, y dentro de ellas se encuentran embebidos diferentes mecanismos de regulación, como lo son el control transcripcional y post-traducciona (Fig. 3.2). La represión y la activación son mecanismos que modulan la actividad de los promotores, los represores actúan asociándose con regiones reguladoras del DNA, y la secuencia de bases nucleotídicas que constituye a los promotores determina la frecuencia de inicio de la transcripción (Zapata, 2004). Más adelante profundizaremos sobre qué término corresponde a cada mecanismo de regulación.

El primer término  $a_k$  en la ecuación (3.1), es un parámetro constante que representa la tasa de expresión basal de ComK. El segundo término,  $\frac{b_k K^n}{K_0^n + K^n}$ , representa el ciclo de autoestimulación positiva de ComK, el cual es un mecanismo de control transcripcional que exhibe un comportamiento del tipo Michaelis-Menten (Fig. 3.3). A su vez,  $a_k + b_k$  representa la tasa máxima de producción de ComK, mientras que  $K_0$  representa la concentración de ComK requerida para alcanzar el 50 % de su activación, lo cual ocurre cuando  $K = K_0$ . El coeficiente  $n$  denota un término de cooperatividad para la autoactivación de ComK,  $n > 1$  indica cooperatividad positiva, mientras que  $n < 1$  indica cooperatividad negativa.

El término de autoactivación positiva de la ecuación (3.1) puede ser utilizado para modelar

diferentes mecanismos de control transcripcional que siguen una cinética del tipo Michaelis-Menten. Sin embargo, la autoactivación positiva de ComK se distingue del resto debido a su cinética individual. ComK compite contra ComS por su propia degradación, la cual es mediada por el complejo proteolítico MecA, dicho fenómeno es capturado por el tercer término de la ecuación (3.1),  $\frac{K}{1+K+S}$ , que es un decremento no lineal obtenido a partir de una suposición de estado estable en las reacciones de degradación de MecA-ComK y MecA-ComS (para mayores detalles sobre la derivación de los términos de decremento, favor de consultar el material suplementario). Cuando los niveles de ComS al interior de la célula incrementan, la degradación de MecA sobre ComK disminuye, lo cual provoca un incremento en los niveles de ComK. Por otro lado, cuando los niveles de ComS disminuyen, la degradación de MecA sobre ComK aumenta, generando una reducción en los niveles de ComK. El término de decremento nunca deja de ser negativo, sin embargo, degradar más o degradar menos tiene un efecto directo en los niveles de ComK al interior de la célula. La degradación de ComK mediada por MecA, es un mecanismo de control post-traducciona, y junto con el término de control transcripcional, modulan la dinámica de regulación de ComK durante la diferenciación hacia estados competentes.

Los términos de la ecuación (3.2) de ComS son muy parecidos a los términos de la ecuación (3.1) de ComK, excepto por algunos detalles. El primer término de la ecuación (3.2),  $\frac{b_s}{1+(K/K_1)^p}$ , representa un mecanismo de control transcripcional para la inhibición indirecta de ComK sobre *comS*. ComK reprime al gen *comS* de manera indirecta, por medio de una interacción con el operón *srfA*, el cuál es un operón que contiene al gen *comS*. Dicho término puede ser clasificado como un mecanismo de control transcripcional. El parámetro  $b_s$  representa la tasa máxima de activación de *comS*, la cuál es alcanzada en ausencia del factor transcripcional ComK, o bien, la tasa de activación de *comS* es cercana a dicho valor  $b_s$ , cuando las concentraciones intracelulares de ComK son mínimas. Al igual que en la ecuación (3.1), el coeficiente  $p$  es un término de cooperatividad. Asimismo,  $K_1$  denota el valor en el que ComS alcanza el 50 % de su activación, lo cual ocurre cuando  $K = K_1$ . A medida que la concentración de ComK aumenta, la represión sobre *comS* aumenta, lo que genera una reducción en los niveles del

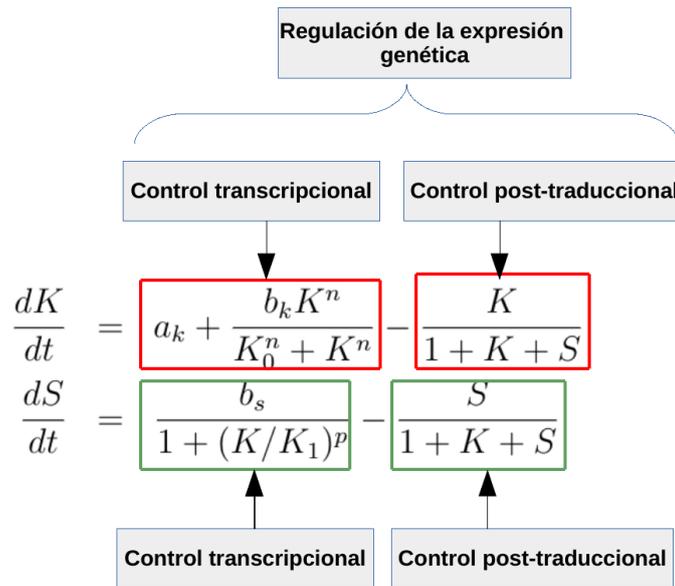


Figura 3.2: Mecanismos de regulación transcripcional y post-traducciona embebidos en el modelo teórico de Süel et al. (2006).

péptido ComS (Fig. 3.4).

De manera similar, el decremento no lineal de ComS,  $\frac{S}{1+K+S}$ , describe algunas de las características más importantes de los mecanismos generadores de pulsos de expresión transitorios. Cuando ComK incrementa, la inhibición indirecta sobre *comS* es mayor, lo que genera una reducción en los niveles del péptido ComS. Al haber una reducción en los niveles de ComS, la degradación de MecA sobre ComK aumenta, lo que genera una disminución en los niveles de ComK, y en última instancia produce un incremento transitorio del péptido ComS, hasta que los niveles de ComK se recuperan suficientemente para volver a inhibir indirectamente a *comS*. El término de decremento de *comS*, es un mecanismo de control que opera a nivel post-traducciona, y junto con el término de control transcripcional, constituyen los principales mecanismos de regulación que describen las reglas de evolución de ComS durante la diferenciación hacia estados competentes.

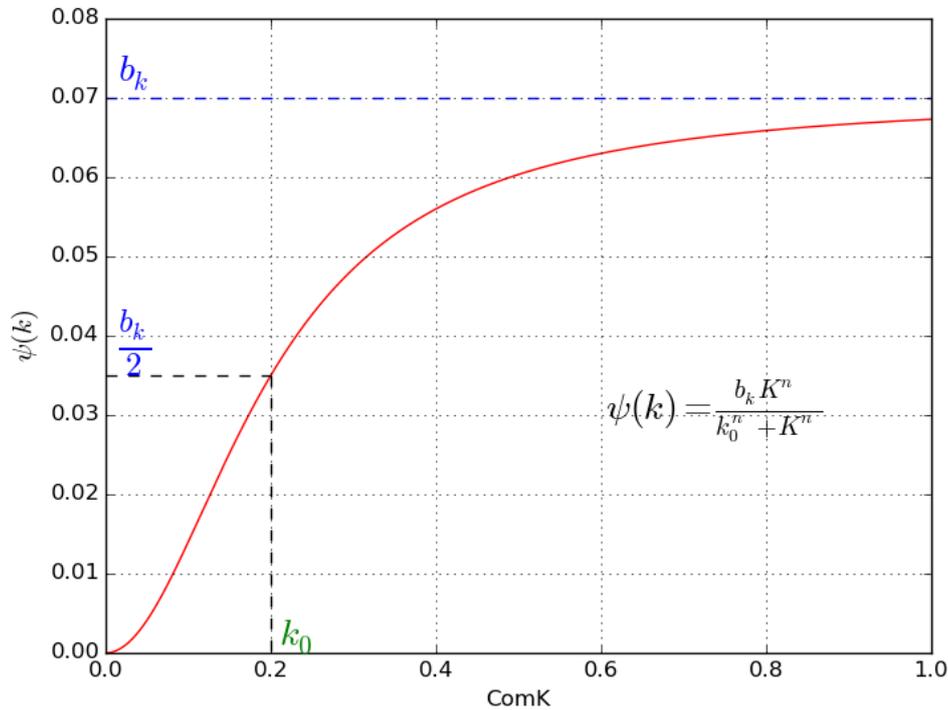


Figura 3.3: Cinética de autoactivación positiva de ComK con parámetros  $K_0 = 0.2$ ,  $n = 2$  y  $b_k = 0.07$ . ComK es un factor transcripcional capaz de autoactivarse a sí mismo.

### Interpretación y manipulación de parámetros

¿Cuál es el significado biológico de aumentar o disminuir la tasa máxima de activación, la tasa de expresión basal, o la concentración requerida para alcanzar el 50 % de la activación de los ciclos de retroalimentación positivos o negativos? La fuerza de los promotores está determinada principalmente por sus secuencias nucleotídicas, las cuales a su vez influyen en la tasa de transcripción (Li and Zhang, 2014). Existen bibliotecas de promotores que exhiben variaciones en las tasas de transcripción, lo cual ha sido una herramienta útil para manipular el comportamiento de una célula (Li and Zhang, 2014). Por otro lado, una manera de manipular la tasa de expresión basal, se lleva a cabo mediante la introducción de copias adicionales de *comK* y *comS* controladas por promotores inducibles, en medios de cultivo con concentraciones variables del inductor Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) (Süel et al., 2007). De esta manera, es posible hacer que una célula produzca una determinada cantidad de proteína de

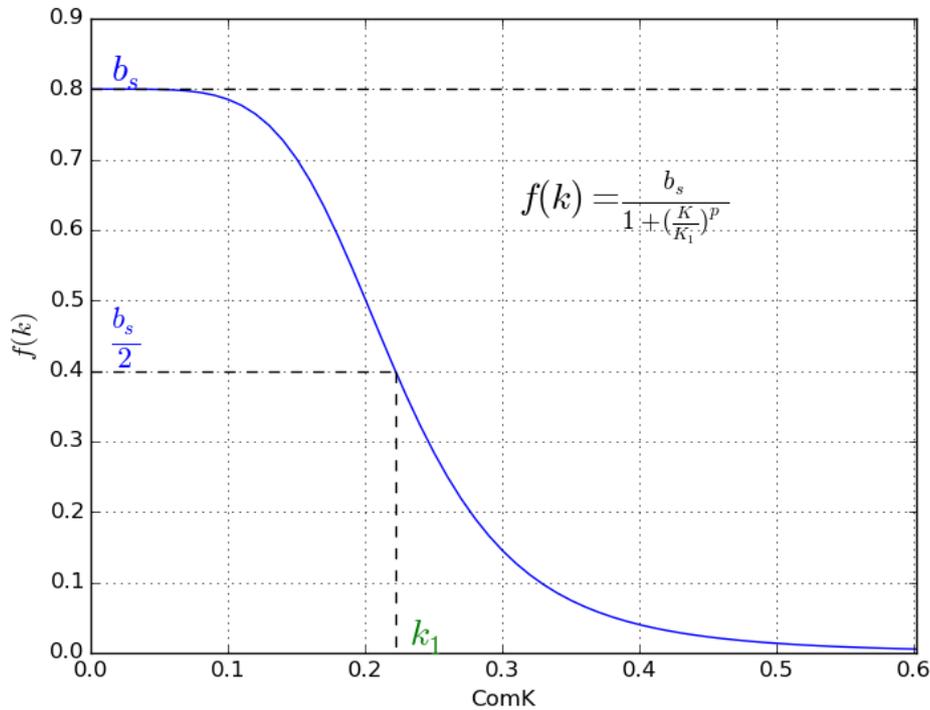


Figura 3.4: Represión de ComK hacia *comS* con parámetros  $K_1 = 0.22$ ,  $b_s = 0.8$  y  $p = 5.0$ . El factor transcripcional ComK es capaz de reprimir a *comS*.

manera constante, sin alterar la dinámica de regulación del circuito genético original.

### 3.3. Análisis geométrico

El análisis cualitativo de sistemas dinámicos no lineales ha sido una herramienta fundamental para estudiar células capaces de exhibir comportamientos de excitabilidad (Av-Ron et al., 1993; FitzHugh, 1969; Morris and Lecar, 1981). A pesar de que el uso de estas herramientas ha sido predominante en el área de las neurociencias, también es posible implementarlas para analizar sistemas excitables de diferentes fenómenos biológicos, en particular, en procesos de regulación de la expresión genética.

Sistemas bidimensionales como (3.1)-(3.2) pueden ser estudiados mediante el análisis de planos fase, identificando ceroclinas, puntos fijos y trayectorias representativas. Dichos elementos determinan el tipo de comportamiento que una célula individual puede exhibir durante la diferenciación hacia estados competentes o vegetativos. De esta manera, es posible

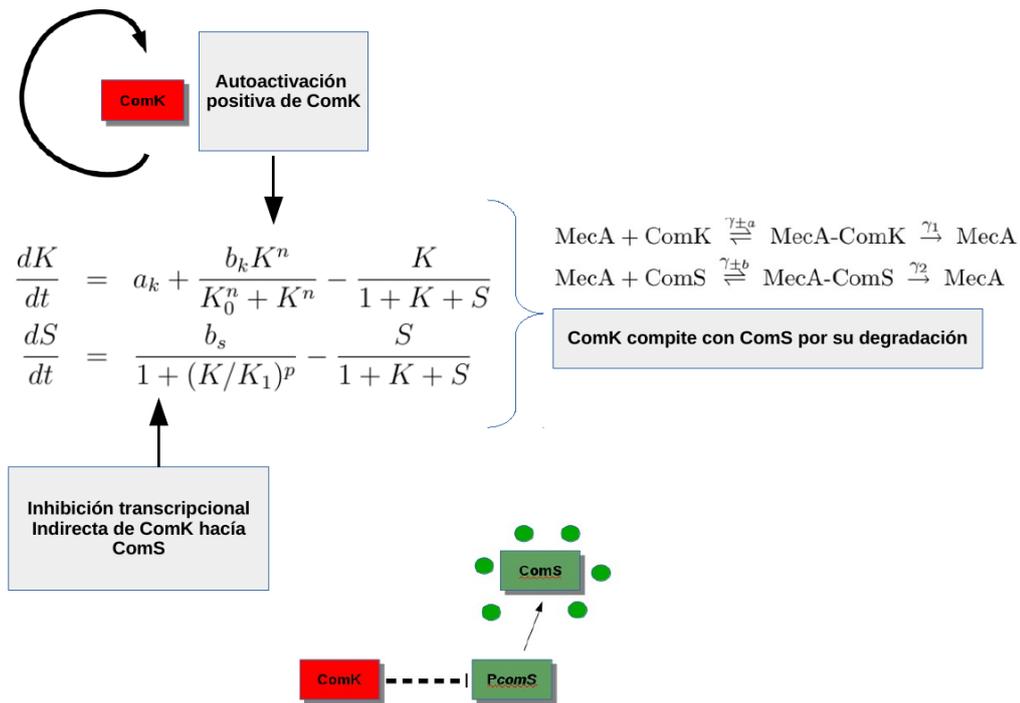


Figura 3.5: Descripción de los principales mecanismos de regulación de cada término de las ecuaciones de Süel et al. (2006).

articular explicaciones que nos ayuden a comprender, ¿por qué una población de células isogénicas es capaz de exhibir distintos tipos de excitabilidad?, o bien, ¿cómo es que una sola célula es capaz de exhibir distintos tipos de excitabilidad en respuesta a estímulos intracelulares o extracelulares?

Las ceroclinas del sistema (3.1)-(3.2) representan curvas para las cuales no hay cambio en las concentraciones de ComK y ComS, y satisfacen respectivamente que  $\frac{dK}{dt} = 0$  y  $\frac{dS}{dt} = 0$  (Para mayores detalles sobre las expresiones analíticas de las ceroclinas del sistema, favor de consultar el material suplementario en la sección de Ceroclinas). A su vez, los puntos fijos están dados por las intersecciones de las ceroclinas, y en ellos no hay cambio con respecto a ambas variables de estado (no hay cambio en ComK ni en ComS).

Las ceroclinas de sistemas como (3.1)-(3.2) suelen intersectarse en al menos un punto, esto significa que existirá al menos un estado en el que no hay cambio en los niveles de ComK ni de ComS. No obstante, los tipos y números de puntos fijos pueden variar dependiendo de la configuración del sistema debido a diferentes combinaciones de parámetros. En ade-

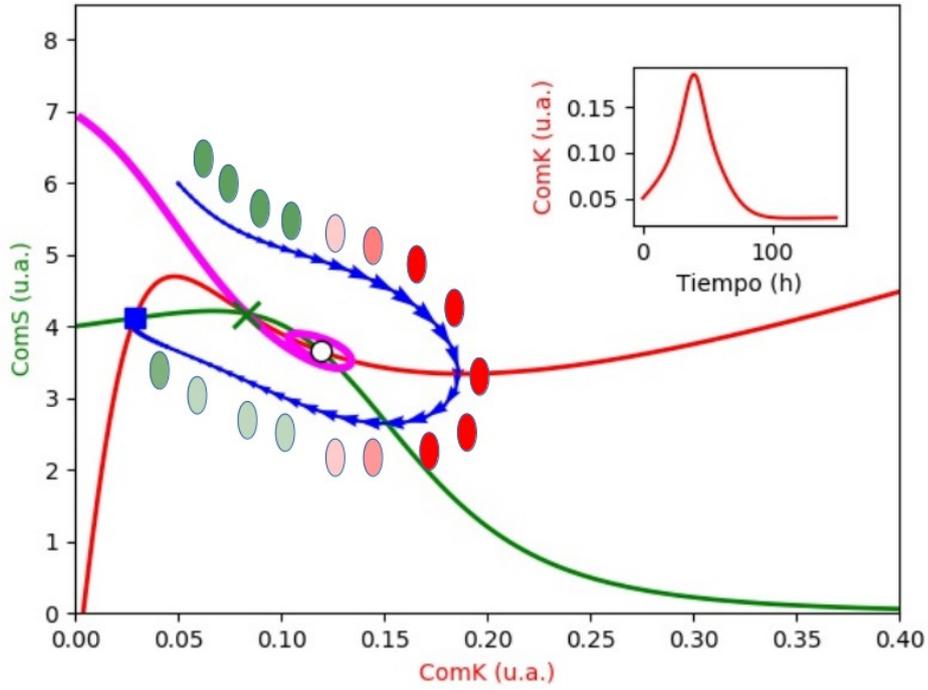


Figura 3.6: Diferenciación transitoria hacia el estado de competencia. Plano fase de una configuración de excitabilidad monoestable con tres puntos fijos. Parámetros  $b_k = 0.08$  y  $b_s = 0.8$ , el resto de los parámetros corresponden a los valores de la Tabla S1. Cuando una trayectoria del sistema (curva con flechas azules) se mueve hacia la derecha la expresión de ComK aumenta, lo cual induce la entrada hacia estados competentes de mayores concentración de ComK (células rojas). Cuando las concentraciones de ComS aumentan y las de ComK disminuyen se induce la entrada hacia estados vegetativos (células verdes). El recuadro de la esquina superior derecha esquematiza el curso temporal de un evento de diferenciación hacia el estado de competencia. Nodos asintóticamente estables (cuadrados azules), sillas-nodo (cruces verdes), focos repulsivos (círculos blancos). Cerocлина de ComK (curva roja), cerocлина de ComS (curva verde), variedad estable (curva morada).

lante, nos referiremos a los puntos fijos como las parejas ordenadas  $(K_*, S_*)$  que satisfacen  $dK/dt(K_*, S_*) = 0 = dS/dt(K_*, S_*)$  simultáneamente. Es importante enfatizar que las concentraciones de ComK y ComS no necesariamente son nulas en esos puntos, simplemente no están cambiando. Una vez que se han identificado los puntos fijos del sistema, se procede a caracterizar su tipo y estabilidad, la cual depende de los valores propios  $\lambda_1$  y  $\lambda_2$  de la matriz jacobiana del sistema (3.1)-(3.2), evaluada en los puntos fijos  $(K_*, S_*)$  (Para mayores detalles, favor de consultar el material suplementario en la sección Análisis de Estabilidad Local). Definimos operacionalmente a un punto fijo asintóticamente estable o atractor, como un estado hacia el cual convergen trayectorias cercanas a partir de cierto conjunto de concentraciones

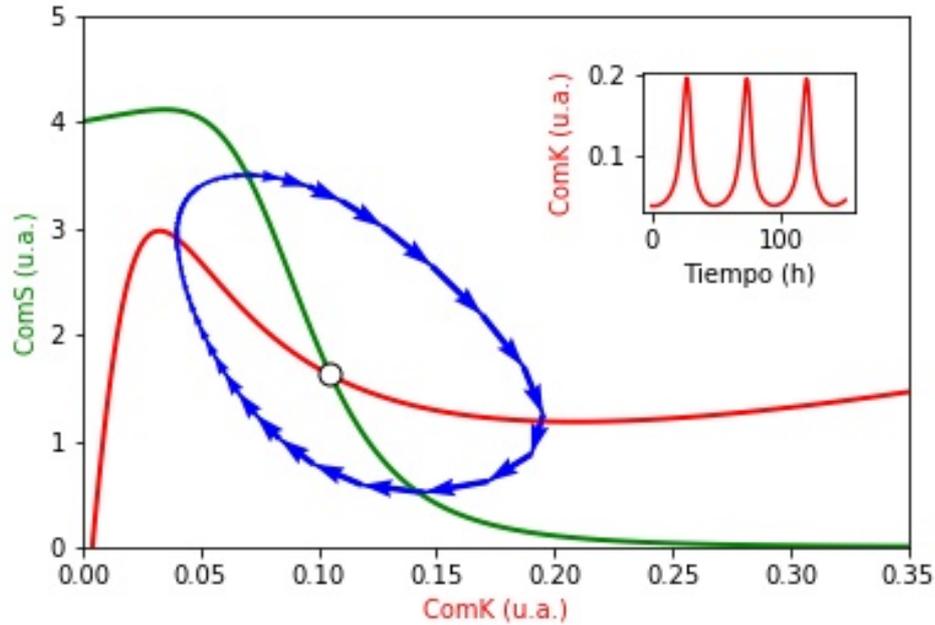


Figura 3.7: Comportamiento pulsátil recurrente. Plano fase de un régimen de oscilaciones con parámetros  $b_k = 0.16$ ,  $b_s = 0.8$ ,  $K_0 = 0.2$  y  $K_1 = 0.13$ , el resto de los parámetros corresponden a los valores de la Tabla S1. El recuadro de la esquina superior derecha esquematiza la dinámica de expresión de ComK bajo un régimen de oscilaciones periódicas. Foco repulsor (círculo blanco). Ceroclina de ComK (curva roja), ceroclina de ComS (curva verde), trayectoria representativa (curva con flechas azules)

iniciales de ComK y ComS. A su vez, definimos a un punto fijo repulsor como un punto en el que trayectorias cercanas divergen a partir de cierto conjunto de concentraciones iniciales. Dentro de estos dos tipos de puntos fijos encontramos a los nodos y a los focos. Los nodos atractores atraen estados lo suficientemente cercanos sin oscilaciones, (de forma exponencial, monótona creciente o decreciente en cada variable de estado). En cambio, las trayectorias suficientemente cercanas a un foco atractor convergen hacia el foco de forma oscilatoria (Fig. 3.9).

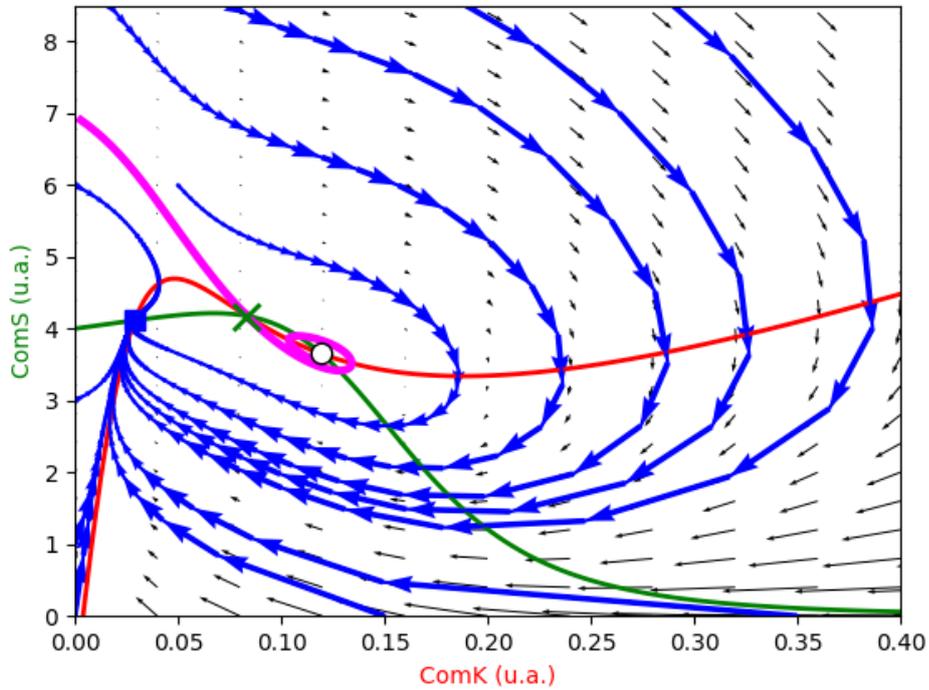


Figura 3.8: Plano fase del sistema (3.1)-(3.2) con parámetros  $b_k = 0.08$  y  $b_s = 0.8$ , el resto de los parámetros corresponden a los valores de la Tabla S1. Cada estado del modelo corresponde a un vector  $(K, S) \in \mathbb{R}^2$  en el plano  $\mathbb{R}^2$ . Las trayectorias (curvas con flechas azules) representan eventos de diferenciación hacia estados competentes o vegetativos. Cuando las trayectorias se mueven hacia la derecha se generan incrementos en la concentración de ComK favoreciendo la entrada hacia estados competentes. Cuando las trayectorias se mueven hacia la izquierda se generan disminuciones en los niveles de ComK favoreciendo la salida de estados competentes. Cuando las trayectorias se mueven hacia arriba se generan incrementos en la concentración de ComS favoreciendo la entrada hacia estados vegetativos. Cuando las trayectorias se mueven hacia abajo se generan disminuciones en los niveles de ComS. El plano fase está dividido en regiones que favorecen el incremento o decremento de ComK y ComS. Las trayectorias que se sitúan por encima de la ceroclina de ComK (curva roja) tienden a aumentar los niveles de ComK y las que se sitúan por debajo tienden a disminuirlos. Las trayectorias que se sitúan por encima de la ceroclina de ComS (curva verde) tienden a disminuir los niveles de ComS y las que se sitúan por debajo tienden a aumentarlos. Nodos asintóticamente estables (cuadrados azules), sillan-nodo (cruces verdes), focos repulsivos (círculos blancos). Ceroclina de ComK (curva roja), ceroclina de ComS (curva verde), variedad estable (curva morada). Campo vectorial del sistema (3.1)-(3.2) (flechas negras).

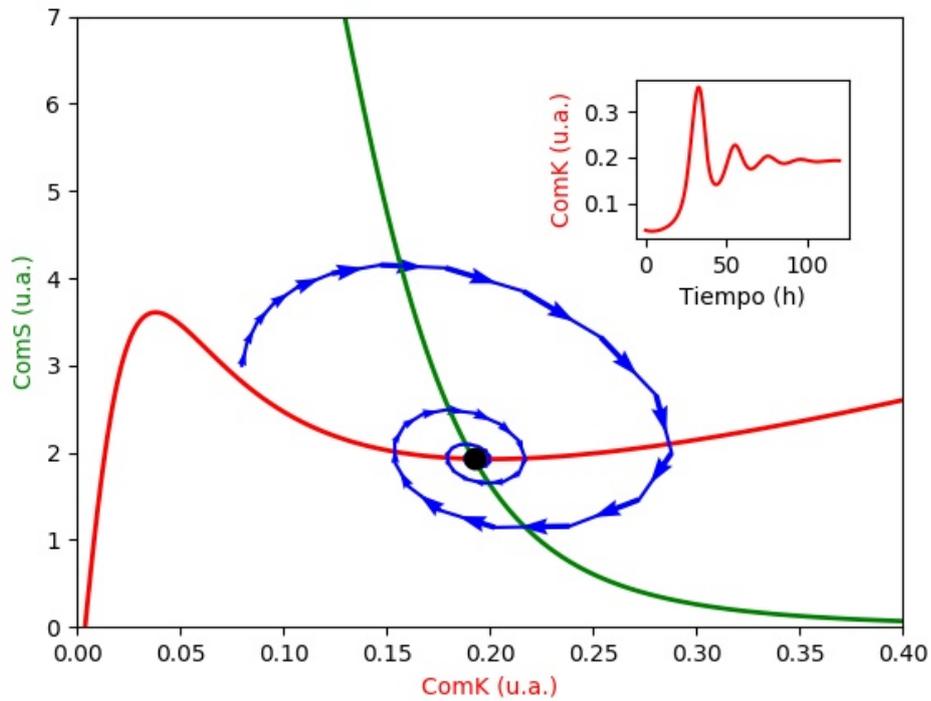


Figura 3.9: Permanencia en el estado de competencia. Plano fase de una configuración competente monoestable con parámetros  $b_k = 0.12$  y  $b_s = 0.92$ , el resto de los parámetros corresponden a los valores de la Tabla S1. El recuadro de la esquina superior derecha esquematiza el curso temporal de un evento de expresión sostenida de ComK. Foco atractor (círculo negro). Ceroclina de ComK (curva roja), ceroclina de ComS (curva verde), trayectoria representativa (curva con flechas azules).

Los puntos fijos hacia los cuales convergen las trayectorias del sistema (3.1)-(3.2), y en general, los estados del sistema, pueden ser asociados con la dicotomía de fenotipos que exhibe *B. subtilis* en respuesta a la falta de nutrientes, un punto ubicado en una región con altas concentraciones del factor transcripcional ComK, representa un estado competente en el que la célula es capaz de activar a los genes que codifican productos necesarios para internalizar material genético exógeno del microambiente. Por otro lado, un estado con bajas concentraciones de ComK, representa un estado en el que no se generan los productos necesarios para llevar a cabo la internalización de material genético exógeno.

Podemos pensar en las trayectorias del sistema como eventos de diferenciación hacia estados competentes o vegetativos, en los que ocurren incrementos o decrementos en los niveles de ComK y ComS, con o sin comportamiento pulsátil. Para una configuración de

parámetros capaz de exhibir comportamientos de excitabilidad (Fig. 3.8), es posible encontrar concentraciones iniciales de ComK y de ComS tales que el sistema es capaz de exhibir comportamientos pulsátiles en la expresión de ComK, y en consecuencia activar la maquinaria de internalización de DNA exógeno. Dicho comportamiento puede ocurrir de forma transitoria, antes de regresar al reposo. A diferencia de otro tipo de células excitables, el estado de reposo (que en este caso equivale al estado vegetativo), puede variar significativamente pese a tratarse de células del mismo tipo. Es decir, puede existir una variedad de estados vegetativos para distintas concentraciones de ComS.

### **3.4. Análisis de ceroclinas**

¿Cuál es la influencia de los parámetros que representan características internas del circuito genético? Variaciones en los componentes internos del circuito genético generan diferentes efectos en la geometría del sistema (3.1)-(3.2). Algunas de estas variaciones pueden ser implementadas experimentalmente, y en otros casos suelen estar sujetas a fluctuaciones intracelulares o extracelulares.

Dependiendo del parámetro que se manipula, es posible observar cambios en los tipos y números de puntos fijos, y en algunos casos la aparición de ciclos límite (Fig. 3.7), los cuáles son orbitas cerradas que dan lugar a comportamientos periódicos. Es de gran interés comprender los mecanismos generadores de este tipo de cambios, y en función de ello esbozar circuitos genéticos alternativos capaces de permitir que una célula transite hacia estados competentes permanentes.

#### **3.4.1. Transiciones hacia estados competentes**

Sabemos que el péptido ComS impide la degradación de ComK mediada por el complejo proteolítico MecA. Sin embargo, la presencia de niveles altos del péptido ComS al interior de una célula, no implica que dicha célula entrará de inmediato al estado de competencia, por lo que es necesario analizar las interacciones entre los elementos que modulan la diferenciación

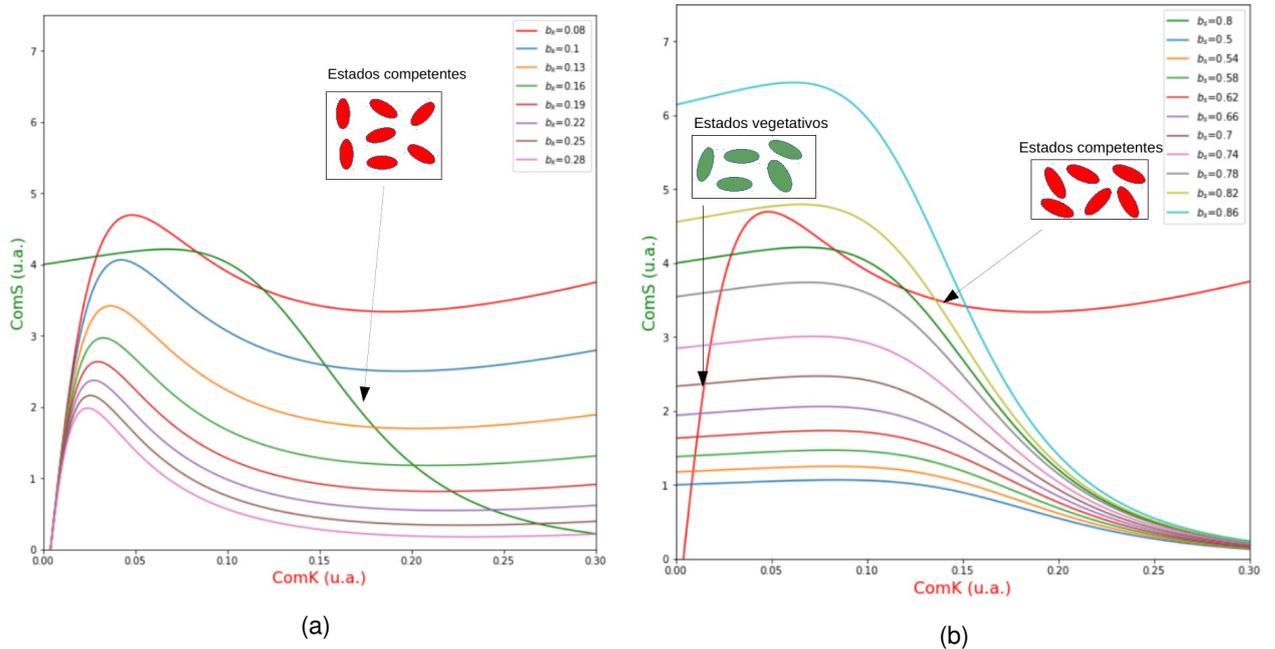


Figura 3.10: Análisis de ceroclinas. Los valores de los parámetros fijos corresponden a los valores de la Tabla S1. (a) Desplazamientos de la ceroclina de K (ComK) como función del parámetro  $b_k$ . El incremento en los valores de  $b_k$  induce desplazamientos de los estados competentes hacia regiones con altos niveles de ComK (b) Desplazamientos de la ceroclina de S (ComS) como función del parámetro  $b_s$ .

hacia estados competentes. Incrementar la tasa máxima de autoactivación de ComK ( $b_k$ ) a partir de una configuración que exhibe comportamientos de excitabilidad, incrementa la posibilidad de que una célula quede atrapada dentro del estado de competencia (Fig. 3.10(a)). La razón es que el aumento de la tasa máxima de autoactivación de ComK ( $b_k$ ) genera un desplazamiento de los estados competentes hacia regiones con mayores concentraciones de ComK, y ocurre una bifurcación silla-nodo; la silla-nodo y el nodo asintóticamente estable que representa al estado vegetativo coalescen y desaparecen, dejando un único punto fijo globalmente atractor en una región con altas concentraciones de ComK. Consecuentemente, el único estado hacia el cual las trayectorias del sistema convergen a partir de cualquier concentración inicial de proteína es un estado competente. De esta manera las células quedan atrapadas en regímenes de expresión sostenida de ComK, lo que permite que la célula produzca la maquinaria necesaria para internalizar material genético exógeno del microambiente.

También es posible transitar de una configuración que exhibe comportamientos de excitabilidad, hacia regímenes en los que la célula queda atrapada dentro de estados competentes al

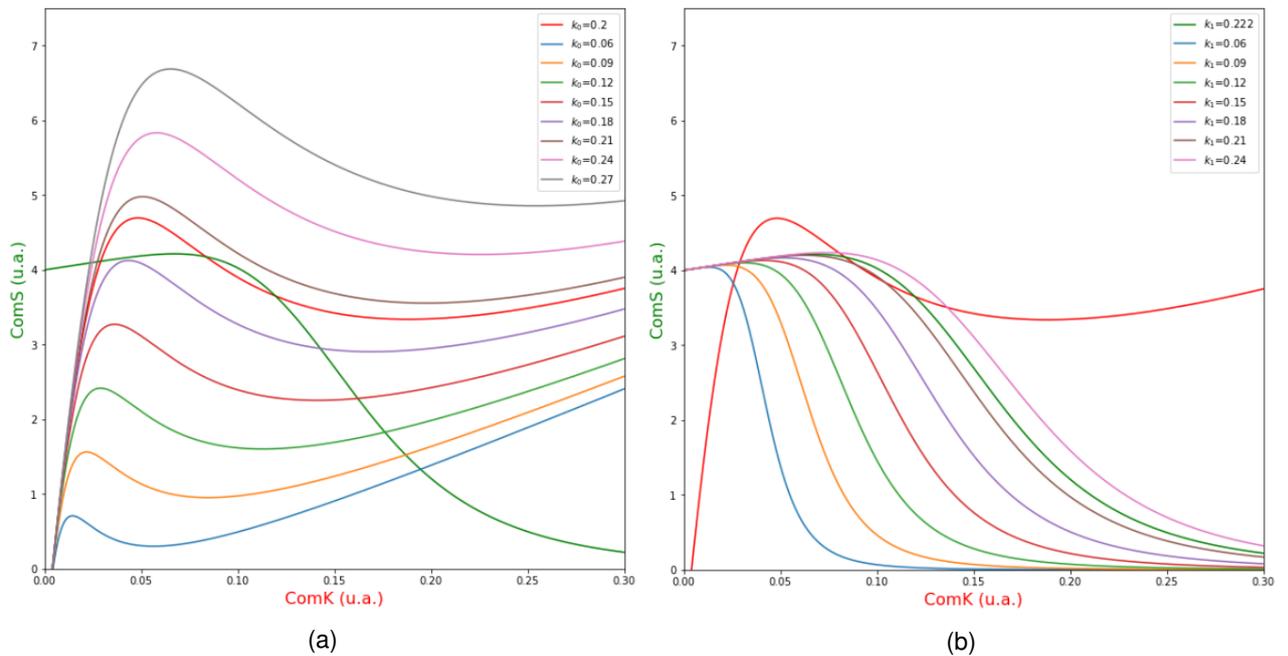


Figura 3.11: Análisis de ceroclinas. Los valores de los parámetros fijos corresponden a los valores de la Tabla S1. (a) Desplazamientos de la ceroclina de K (ComK) como función del parámetro  $K_0$ . (b) Desplazamientos de la ceroclina de S (ComS) como función del parámetro  $K_1$ .

disminuir la tasa media de activación del ciclo de autoactivación positiva de ComK ( $K_0$ ) (Fig. 3.11(a)). Esto quiere decir que cuando el ciclo de autoestimulación se activa rápidamente, la célula tiene mayores posibilidades de transitar hacia estados competentes de forma sostenida. Cuando la autoactivación de ComK es más lenta, la célula puede entrar a estados competentes pero sólo de forma transitoria, y cuando el ciclo de autoactivación de ComK se vuelve muy lento, la célula queda atrapada dentro de estados vegetativos con bajas concentraciones de ComK y concentraciones de ComS variables.

### 3.4.2. Transiciones hacia estados vegetativos

¿Qué ocurre cuando reducimos la tasa máxima de activación ( $b_s$ ) de ComS? Cuando partimos de una configuración que exhibe comportamientos de excitabilidad, y disminuimos la tasa máxima de activación de ComS ( $b_s$ ), se inducen regímenes monoestables con un sólo punto fijo globalmente atractor que atrapa a la célula dentro de estados vegetativos con bajas concentraciones de ComK (Fig. 3.10(b)). De esta manera se impide que la célula logre entrar hacia estados competentes con altas concentraciones de ComK. Esto se debe

a que la reducción de la tasa máxima de activación de ComS ( $b_s$ ) rompe el balance con la fuerza del promotor de ComK, y el efecto generado por la represión de ComK sobre *comS* no permite que ComS se pueda recuperar suficientemente para impedir la degradación de ComK, mediada por el complejo proteolítico MecA. Algunos de los estados vegetativos inducidos por esta manipulación presentan bajas concentraciones de ComS, con respecto a otro tipo de manipulaciones capaces de atrapar a la célula dentro de estados vegetativos con altas concentraciones de ComS (Fig. 3.11(b)). Esto se debe a que no existe un único tipo de estado vegetativo, existe un conjunto de estados vegetativos que en este contexto varían en función de la cantidad del péptido ComS presente al interior de la célula.

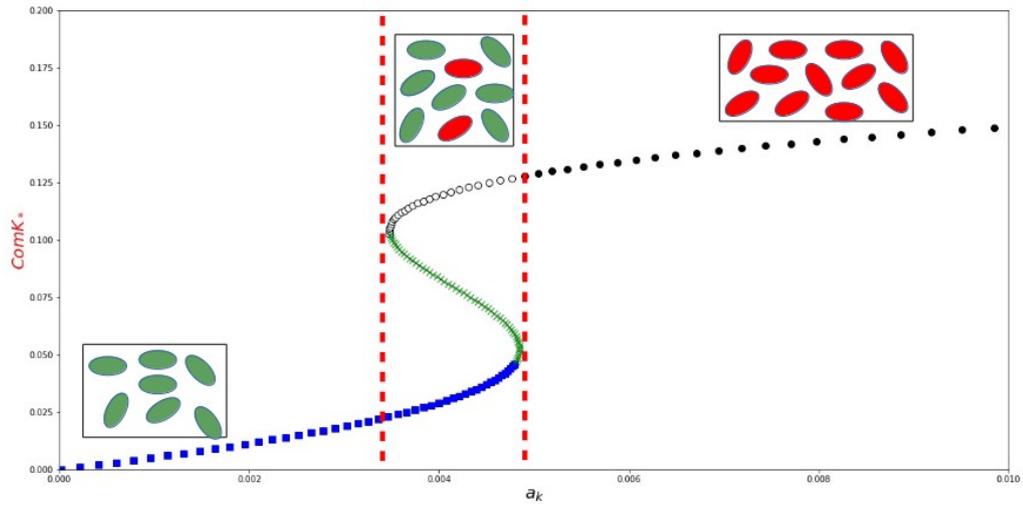
Al disminuir la concentración requerida para que ComS alcance el 50 % de su activación ( $K_1$ ), se incrementa la posibilidad de que una célula quede atrapada dentro de estados vegetativos con bajas concentraciones de ComK (Fig. 3.11(b)). Esto quiere decir que cuando ComK reprime a *comS* rápidamente, no permite que ComS compita contra MecA suficientemente para impedir la degradación de ComK y lograr que los niveles de ComK se recuperen. En consecuencia, hay mayor degradación de MecA sobre ComK, favoreciendo que la célula quede atrapada dentro de estados vegetativos. Por otro lado, al aumentar la concentración requerida para que ComS alcance el 50 % de su activación ( $K_1$ ), se incrementa la posibilidad de que una célula transite hacia estados competentes pero sólo de forma transitoria. Es decir, la modulación de la tasa media de activación de ComS ( $K_1$ ) no es un parámetro crucial para inducir la entrada hacia estados competentes permanentes, debido a que sólo es capaz de inducir configuraciones que atrapan a las células dentro de estados vegetativos, o bien, configuraciones que sólo permiten transiciones hacia estados competentes de forma transitoria más no permanente.

### 3.5. Análisis de bifurcación

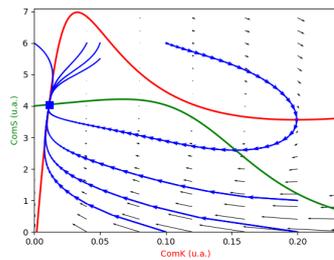
A continuación analizo la estructura de bifurcación en codimensión uno (variando un sólo parámetro) asociada al sistema de ecuaciones (3.1)-(3.2), tomando a la tasa de expresión

basal de ComK ( $a_k$ ) como parámetro de bifurcación (Fig. 3.12(a), 3.14(a), 3.15(a), 3.13(a)). Es decir, me concentro en los cambios cualitativos en los números y tipos de puntos fijos de la familia de sistemas dinámicos que modela a una célula de *B. subtilis*, como función de variaciones sistemáticas en la tasa de expresión basal de ComK ( $a_k$ ). Dicho análisis nos permitirá saber qué tipo de configuraciones del sistema (3.1)-(3.2) le permiten a una célula transitar hacia estados permanentes o transitorios del estado de competencia, a partir de circuitos genéticos alternativos. El análisis se centra alrededor de los efectos generados al inducir variaciones en la tasa de expresión basal de ComK ( $a_k$ ) por ser el parámetro más fácil de manipular experimentalmente cuando se introduce una copia adicional de ComK, bajo el control de un promotor inducible con concentraciones variables del inductor IPTG en el medio de cultivo.

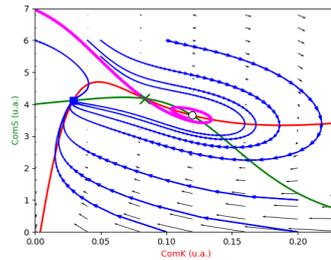
En línea con nuestra definición operacional de excitabilidad, el análisis está dirigido a el estudio de familias de sistemas dinámicos. En el momento en el que se induce un incremento en la tasa de expresión basal de ComK ( $a_k$ ) el sistema dinámico cambia, de esta manera cambiar de sistema dinámico equivale a tomar otro representante de la familia de sistemas dinámicos que modelan a una célula. De lo anterior, se hace patente la noción de que un sólo sistema dinámico resulta insuficiente para modelar a una célula ante manipulaciones intracelulares o extracelulares.



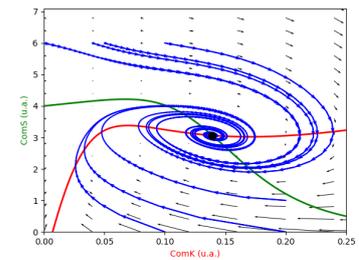
(a)



(b)



(c)



(d)

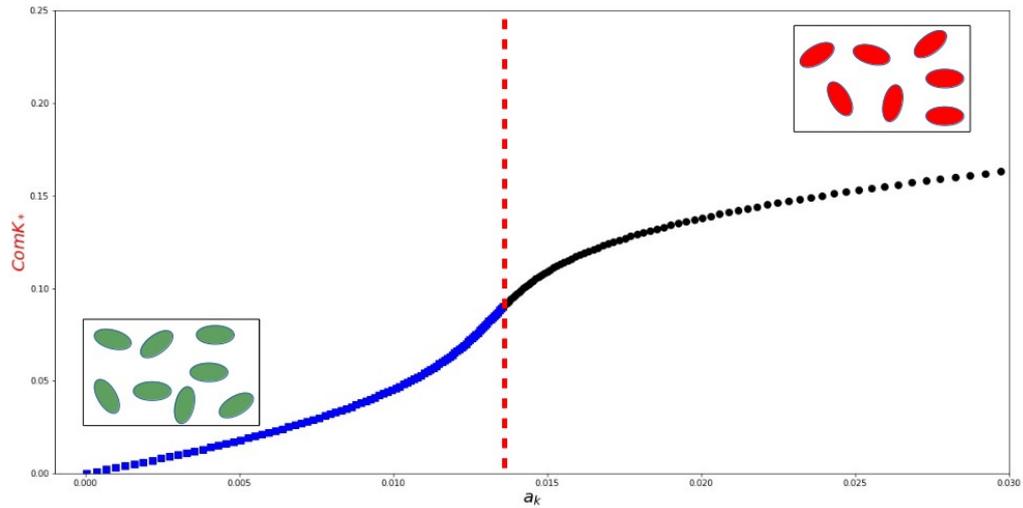
Figura 3.12: (a) Diagrama de bifurcación del sistema (3.1)-(3.2) con respecto al parámetro  $a_k$  y con parámetros fijos  $b_k = 0.08$  y  $b_s = 0.68$ , el resto de los parámetros corresponden a los valores de la Tabla S1. (b) Plano fase asociado al diagrama de bifurcación (a) con valor  $a_k = 0.002$ . (c) Plano fase asociado al diagrama de bifurcación (a) con valor  $a_k = 0.004$ . (d) Plano fase asociado al diagrama de bifurcación (a) con valor  $a_k = 0.006$ . Nodos asintóticamente estables (cuadrados azules), sillan-nodo (cruces verdes), focos atractores (círculos negros), focos repulsores (círculos blancos).

Si partimos de una configuración de excitabilidad monoestable con tres puntos fijos (e.g. un nodo asintóticamente estable que representa al estado vegetativo, una silla-nodo y un foco repulsor, Fig. 3.12(c)), y aumentamos la tasa de expresión basal de ComK ( $a_k$ ), se incrementa la posibilidad de inducir transiciones hacia configuraciones con un sólo punto fijo globalmente atractor (Fig. 3.12(d)), para el que a partir de cualquier concentración inicial de ComK y de ComS, la célula queda atrapada dentro de estados competentes con concentraciones de ComK crecientes conforme la expresión basal de ComK ( $a_k$ ) aumenta (Fig. 3.12(a)). Esto quiere decir que es posible inducir transiciones hacia estados competentes permanentes a partir

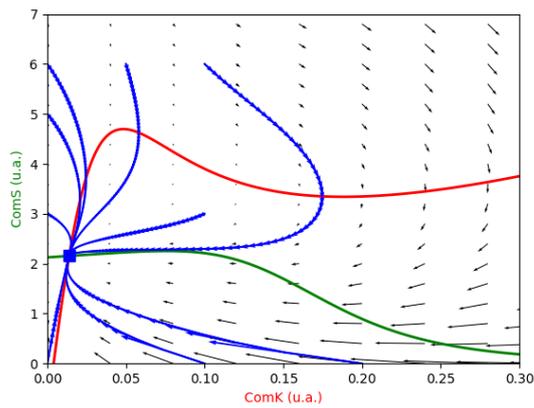
de configuraciones que únicamente permiten transiciones transitorias. La tasa de expresión basal de ComK además de ser uno de los parámetros más factibles de manipular en el ámbito experimental, satisface las condiciones requeridas para promover eventos de diferenciación hacia estados competentes de forma permanente.

### 3.5.1. Circuitos genéticos alternativos

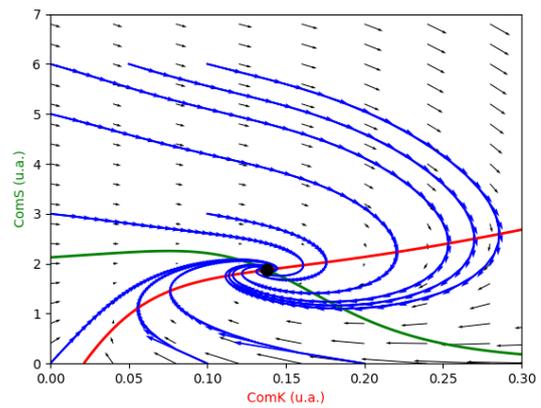
Existe un tipo de transición hacia estados competentes permanentes que no requiere pasos intermedios de sistemas excitables con tres tipos de puntos fijos (Fig. 3.13(a)). Es decir, se puede partir de configuraciones monoestables en las que a partir de cualquier concentración inicial de ComK y ComS, todas las trayectorias convergen hacia estados vegetativos (Fig. 3.13(b)), y de ahí hacia configuraciones con estados competentes monoestables, en las que todas las trayectorias del espacio fase convergen hacia estados competentes a partir de cualquier concentración inicial de ComK y ComS (Fig. 3.13(c)). En esta configuración del sistema, la curva de puntos fijos del diagrama de bifurcación es monótona con respecto a ComK, y únicamente exhibe transiciones de nodos asintóticamente estables a focos asintóticamente estables. Esto quiere decir que se puede transitar directamente desde sistemas que atrapan a la célula dentro de estados vegetativos, hacia sistemas que atrapan a la célula dentro de estados competentes permanentes al aumentar la tasa de expresión basal de ComK ( $a_k$ ), sin tener que pasar por estadios intermedios que únicamente permiten transiciones transitorias hacia el estado de competencia.



(a)



(b)



(c)

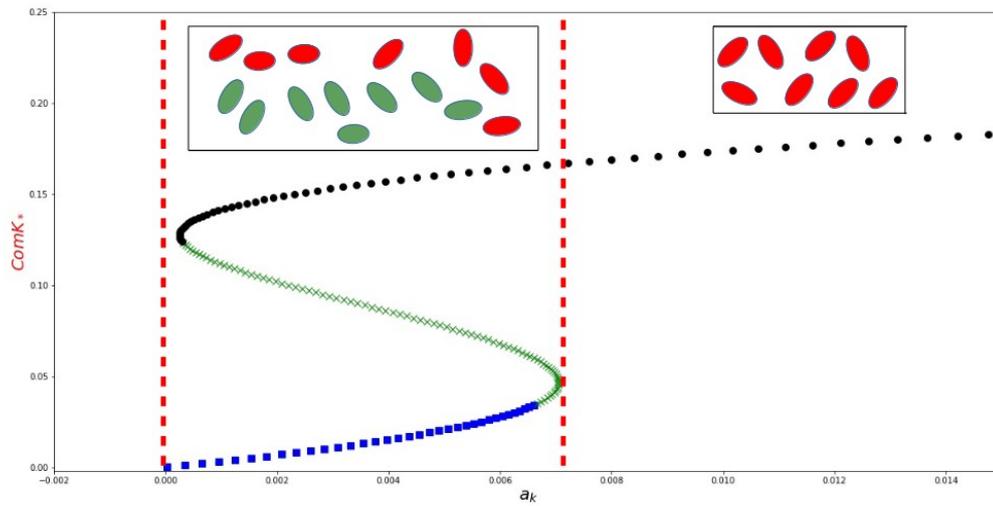
Figura 3.13: (a) Diagrama de bifurcación con respecto al parámetro  $a_k$  y con parámetros fijos  $b_k = 0.08$  y  $b_s = 0.68$ , el resto de los parámetros corresponden a los de la Tabla S1. (b) Plano fase asociado al diagrama de bifurcación (a) con valor  $a_k = 0.005$ . (c) Plano fase asociado al diagrama de bifurcación (a) con valor  $a_k = 0.015$ . Nodos asintóticamente estables (cuadrados azules), focos atractores (círculos negros).

### 3.6. Distintos tipos de excitabilidad

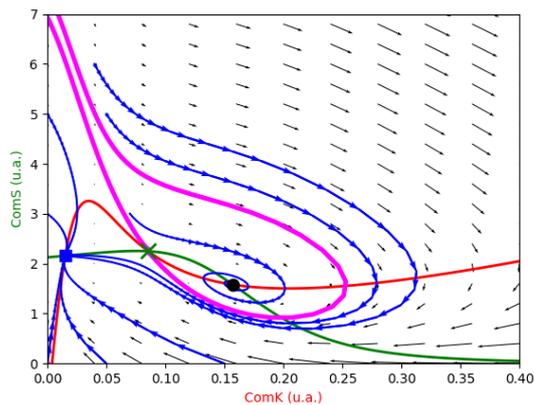
No todas las células que se diferencian hacia estados competentes exhiben el mismo tipo de comportamiento (Süel et al., 2006). Lo que es más, una misma célula es capaz de exhibir distintos tipos de comportamiento en respuesta a estímulos intracelulares y extracelulares. Los modelos teóricos pueden ayudarnos a comprender cómo es que se origina esta diversidad

de respuestas tomando en consideración características internas del circuito genético, y las interacciones entre los reguladores que lo constituyen. De la definición operacional de excitabilidad que se proporcionó con anterioridad, se sigue que es posible generar distintos tipos de excitabilidad a partir de variaciones en las características internas del circuito genético (Fig. 3.16(c)). A continuación examinaré algunas de ellas.

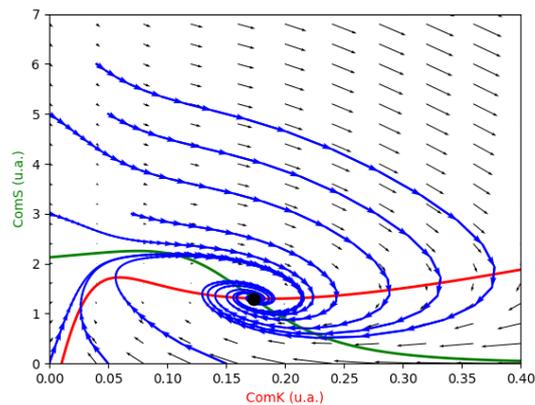
Es posible encontrar configuraciones de excitabilidad monoestables con tres puntos fijos; un nodo asintóticamente estable que representa al estado vegetativo, una silla-nodo y un foco repulsor (Fig. 3.12(a)). Bajo esta configuración y para un cierto conjunto de concentraciones iniciales de ComK y ComS, podemos observar pulsos transitorios hacia estados competentes con altas concentraciones de ComK. Por otro lado, para cierto conjunto de concentraciones iniciales, no se observa más que una convergencia exponencial hacia el estado vegetativo sin comportamiento pulsátil. No obstante, dicho comportamiento de excitabilidad no es el único que puede ser observado para un sistema como el de (3.1)-(3.2). No sólo es posible observar excitabilidad monoestable con tres tipos de puntos fijos (Fig. 3.8), también es posible generar excitabilidad con biestabilidad (Fig. 3.14(b)). Esto es, un nodo asintóticamente estable que representa a el estado vegetativo, una silla-nodo y un foco atractor que representa a el estado de competencia rodeado por una cuenca de atracción. Una de las características más interesantes de este sistema es que dependiendo de las concentraciones iniciales de ComK y de ComS, es posible observar tres tipos de eventos: (a) convergencia exponencial hacia el estado vegetativo sin comportamiento pulsátil; (b) diferenciación transitoria hacia estados competentes con comportamiento pulsátil; y (c) transiciones hacia estados competentes de forma permanente. Bajo esta configuración, al incrementar la tasa de expresión basal de ComK ( $a_k$ ), se incrementa la posibilidad de que la célula transite hacia estados competentes de forma permanente, sin retorno hacia estados vegetativos (Fig. 3.14(b)). Una vez más, el parámetro ( $a_k$ ) parece ser un buen candidato para inducir estados competentes de forma permanente en circuitos genéticos alternativos.



(a)



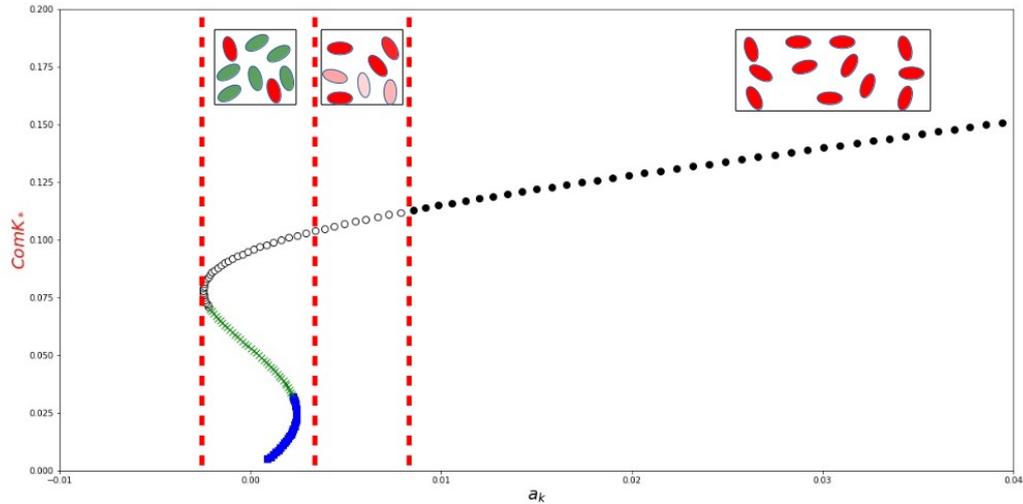
(b)



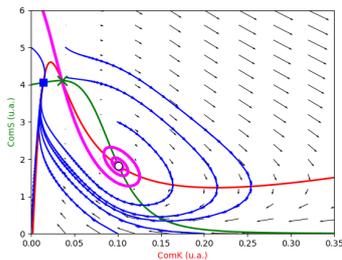
(c)

Figura 3.14: (a) Diagrama de bifurcación con respecto al parámetro  $a_k$  y con parámetros fijos  $b_k = 0.08$  y  $b_s = 0.68$ , el resto de los parámetros corresponden a los valores de la Tabla S1. (b) Plano fase asociado al diagrama de bifurcación (a) con valor  $a_k = 0.002$ . (c) Plano fase asociado al diagrama de bifurcación (a) con valor  $a_k = 0.010$ . Nodos asintóticamente estables (cuadrados azules), sillas-nodo (cruces verdes), focos atractores (círculos negros).

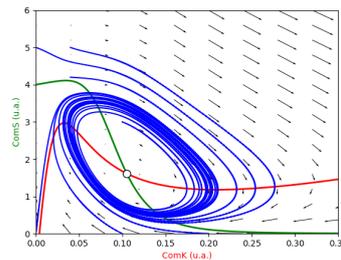
### 3.6.1. Ciclos límite



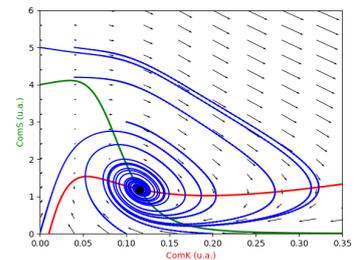
(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 3.15: (a) Diagrama de bifurcación con respecto al parámetro  $a_k$  y con parámetros fijos  $b_k = 0.16$ ,  $b_s = 0.8$ ,  $K_0 = 0.2$  y  $K_1 = 0.13$ , el resto de los parámetros corresponden a los valores de la Tabla S1. (b) Plano fase asociado al diagrama de bifurcación (a) con valor  $a_k = 0.002$ . (c) Plano fase asociado al diagrama de bifurcación (a) con valor  $a_k = 0.004$ . (d) Plano fase asociado al diagrama de bifurcación (a) con valor  $a_k = 0.010$ . Nodos asintóticamente estables (cuadrados azules), sillan-nodo (cruces verdes), focos atractores (círculos negros), focos repulsores (círculos blancos).

El análisis teórico sugiere que es posible transitar hacia regímenes oscilatorios a partir de configuraciones que exhiben excitabilidad monoestable con tres puntos fijos (Fig. 3.15(b)). En línea con nuestras definiciones operacionales, consideraremos a un régimen oscilatorio como un sistema excitable. La razón es que bajo este régimen, la célula es capaz de transitar hacia un estado de excitación en el cuál ocurren múltiples eventos de diferenciación hacia estados competentes (Fig. 3.15(a)). Al igual que en las sucesiones de bifurcaciones anteriores,

es posible transitar hacia estados competentes permanentes (monoestabilidad con un punto fijo globalmente atractor ubicado en regiones con altas concentraciones de ComK). En este caso, se parte de configuraciones que exhiben comportamientos de excitabilidad monoestable con tres puntos fijos (Fig. 3.15(b)), y al incrementar la tasa de expresión basal de ComK ( $a_k$ ) se transita hacia regímenes de oscilaciones periódicas (Fig. 3.15(c)). Incrementos subsecuentes atrapan a la célula dentro de estados competentes permanentes (Fig. 3.15(d)). La configuración en la que aparece un ciclo límite únicamente tiene un punto fijo (foco repulsor), en el que a partir de cualquier concentración inicial de proteína, la célula es capaz de entrar y salir del estado de competencia de forma periódica. En este caso podemos identificar dos bifurcaciones de relevancia, una bifurcación silla-nodo en la que el nodo-silla y el nodo asintóticamente estable que representa a el estado vegetativo coalescen y desaparecen dejando un único punto fijo (foco repulsor). La otra bifurcación es una bifurcación de Hopf supercrítica, en la que el foco asintóticamente estable pierde su atractividad y se vuelve un foco repulsor.

Es importante mencionar que la curva de puntos fijos que describe estas transiciones no es monótona con respecto a ComK, a diferencia de la curva de puntos fijos monótona que únicamente exhibe transiciones de nodos asintóticamente estables a focos asintóticamente estables (Fig 3.13(a)). Este detalle es importante ya que genera intuición útil para poder inducir distintos tipos de comportamiento al estudiar familias de sistemas dinámicos. Lo que el análisis revela, es que la fuerza del promotor de *PcomK* relativa a la represión que ejerce sobre *PcomS* no puede ser muy grande para poder observar pulsos transitorios o de oscilaciones sostenidas. Para ello, debe de existir un balance entre activación y represión, y si ambas son muy dispares, entonces no es posible observar pulsos transitorios de expresión de ComK o de oscilaciones sostenidas.

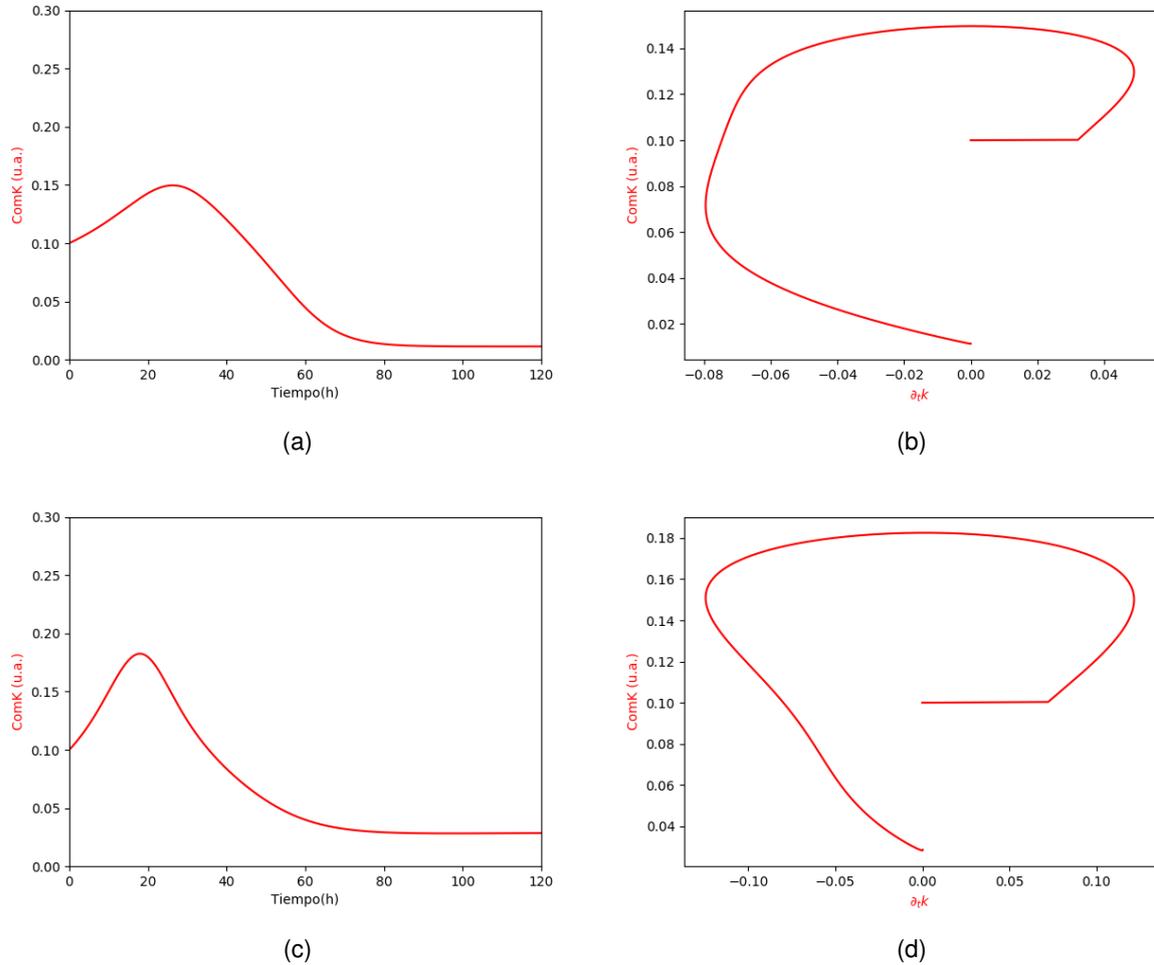


Figura 3.16: Comparación de dos pulsos de expresión de ComK asociados a dos configuraciones monoestables distintas con concentraciones iniciales iguales. Los pulsos de expresión transitorios que exhiben las células competentes pueden tener diferentes amplitudes alcanzando máximos que no son iguales entre sí. Diferentes células pueden responder de diferentes maneras debido a diferencias en las características internas de sus circuitos genéticos. (a) Dinámica de un pulso de expresión de ComK asociado a una configuración monoestable con parámetros fijos  $b_k = 0.08$  y  $b_s = 0.68$ , el resto de los parámetros corresponden a los valores de la Tabla S1. (b) Cambio en la derivada del pulso de expresión de ComK de 3.16(a). (c) Dinámica de un pulso asociado a una configuración de excitabilidad monoestable con parámetros fijos  $b_k = 0.08$  y  $b_s = 0.8$ , el resto de los parámetros corresponden a los valores de la Tabla S1. (d) Cambio en la derivada del pulso de expresión de ComK de (3.16(c)).

## Capítulo 4

### Discusión y conclusiones

El enfoque del presente trabajo cuestiona desde una perspectiva crítica, a las posturas que sitúan a los genes como los únicos factores de importancia para estudiar procesos de diferenciación celular. La presencia de genes que codifican productos capaces de internalizar material genético exógeno, no determina en su totalidad la diferenciación de *B. subtilis* hacia el estado de competencia. La razón es que este proceso está controlado por reguladores que al interactuar entre sí, exhiben una gran variedad de comportamientos dinámicos y dichas interacciones son capaces de modular la entrada hacia el estado de competencia.

El modelo teórico de Süel et al. (2006) describe el proceso de diferenciación transitorio hacia el estado de competencia en términos de un circuito genético excitable. De la definición operacional de excitabilidad usada en este trabajo, junto con el análisis del modelo teórico (con enfoque de análisis de familias de sistemas dinámicos), se sigue que: la modulación de las propiedades de los componentes internos del circuito genético del estado de competencia, puede inducir diferentes tipos de sucesiones de bifurcaciones. Además, las células que transitan hacia el estado de competencia, son capaces de exhibir distintos tipos de excitabilidad asociados con comportamientos pulsátiles en la expresión del factor transcripcional ComK (entrada a el estado de competencia de forma transitoria), o con comportamientos oscilatorios (entrada y salida del estado de competencia de forma periódica). El hecho de que distintas células exhiben distintos tipos de excitabilidad, no implica la existencia de células más o menos excitables, simplemente ejemplifica la heterogeneidad de respuestas que un grupo de organismos es capaz de exhibir.

La versión determinista y autónoma del modelo que fue analizado no incluye la incorpo-

ración de ruido (entendido como cambios estocásticos en parámetros) en la expresión de *comK* y *comS*, lo cual puede ser abordado para trabajo futuro tomando en consideración el significado biológico del tipo de ruido que se incluya en el modelo; ¿cuál es el efecto de ruidos aditivos y multiplicativos en el ciclo de autoactivación positiva de *comK*?, ¿cuál es el efecto de los distintos tipos de ruido en la inhibición indirecta hacia *comS*?, ¿cómo se ve alterada la intuición generada por el análisis de bifurcación al incorporar ruido en el modelo? El tratamiento del presente trabajo estuvo dirigido hacia el análisis de las relaciones entre las fuerzas de los promotores, tasas de expresión basal y su influencia en las interacciones entre los reguladores del circuito genético. Dichas relaciones se estudiaron al analizar la estructura de bifurcación del modelo, tomando a la tasa de expresión basal de ComK ( $a_k$ ) como parámetro de bifurcación. Lo que se encontró fue que es posible inducir regímenes oscilatorios, y de expresión sostenida, al variar dicho parámetro para cierto tipo de familias de sistemas dinámicos. A pesar de que el modelo teórico describe una gran variedad de escenarios que describen eventos de diferenciación hacia estados competentes, no todos ellos son biológicamente plausibles, o bien, las manipulaciones experimentales requeridas son difíciles de implementar. Por esa razón, puse énfasis en analizar los cambios cualitativos generados por parámetros capaces de ser contrastados en el ámbito experimental, como es el caso de la tasa de expresión basal de ComK ( $a_k$ ). El análisis de la estructura de bifurcación del modelo (3.1)-(3.2) sugiere que las características individuales de los promotores, junto con las interacciones entre los reguladores del circuito genético, son capaces de inducir diferentes patrones de expresión genética.

Las células de *B. subtilis* son capaces de integrar el material genético exógeno en sus cromosomas antes de que salgan del estado de competencia, y antes de que la división celular ocurra (Boonstra et al., 2018). ¿Existen diferencias entre los procesos de transformación de células que entran a el estado de competencia de forma transitoria, con respecto a las células que entran a dicho estado de forma oscilatoria? Dicha pregunta podría encaminarnos hacia el establecimiento de conexiones explícitas entre la fisiología de la transformación bacteriana, y los distintos tipos de excitabilidad que emergen de las interacciones entre los reguladores de estados competentes. Por ejemplo, la mayoría de los estados competentes que se han

observado de forma natural son transitorios (Sinderen et al., 1995; Süel et al., 2006, 2007). Sin embargo, las células de algunas cepas pueden oscilar de forma sostenida (Süel et al., 2007). En principio, una célula que se encuentra resonando en estados competentes podría tener una mayor capacidad para incorporar DNA exógeno, con respecto a una célula que entra a el estado de competencia de forma transitoria. Las implicaciones a nivel evolutivo sobre la existencia de células capaces de integrar material genético exógeno han sido debatidas (Brito et al., 2017; Mell and Redfield, 2014). Sin embargo, por lo anterior, podemos pensar que dichas implicaciones podrían ir más allá de la división entre células competentes y no competentes. Es decir, las implicaciones también podrían estar asociadas a las distintas maneras en las que las células entran hacia los estados competentes. La razón es que dentro del conjunto de células capaces de integrar DNA exógeno, podrían existir algunas células capaces de hacerlo con mayor eficiencia dependiendo de sus patrones de expresión genética, los cuales a su vez están asociados con características internas de la célula. De esta manera, la clasificación de convergencias exponenciales (monótonas crecientes o decrecientes en cada variable de estado) hacia estados estables, con respecto a convergencias que exhiben oscilaciones que se atenúan pueden ser de gran relevancia. El estado de competencia es un estado fisiológico que se alcanza por medio de múltiples pasos, por lo que relacionar la diversidad de patrones de expresión genética con los posibles efectos a nivel fisiológico puede aportar información muy valiosa.

De acuerdo con el modelo teórico, las tasas de expresión basal de ComK y ComS permanecen constantes a lo largo del tiempo, y no se ven alteradas durante los eventos de entrada y salida del estado de competencia. Sin embargo, algunas investigaciones han sugerido que las tasas de expresión basal pueden cambiar a lo largo del tiempo (Leisner et al., 2007). ¿Cómo puede cambiar la dinámica de regulación del circuito genético al considerar parámetros que no son constantes? El análisis de versiones no autónomas del modelo pueden ser los caminos lógicos a seguir, debido a la naturaleza aleatoria (no determinista) de la mayoría de los fenómenos biológicos. No obstante, la intuición básica generada a partir de la versión determinista y autónoma es de gran utilidad como primera aproximación.

La comunicación celular tiene un efecto directo sobre el circuito genético de el estado de competencia por medio de la molécula ComX (ver Fig. 2.1) (Leisner et al., 2007). Para generar una extensión del modelo teórico que incluya interacciones entre células, se debe tener en cuenta que el efecto de ComX sobre ComS es indirecto, y se lleva a cabo mediante un mecanismo que ya ha sido caracterizado. ComX es capaz de activar a la cinasa ComP, la cual es capaz de autofosforilarse y transferir un grupo fosfato a ComA. ComA en su forma fosforilada modula a *PsrA*, el cual es un operón que contiene al gen *comS* (Leisner et al., 2007). De esta manera, un incremento en ComX debería generar indirectamente un aumento en la expresión de *comS*. A su vez, esto debería reducir la degradación de MecA sobre el factor transcripcional ComK.

¿Son los sistemas dinámicos continuos la única herramienta para modelar redes de regulación genética? Existen herramientas adicionales para modelar redes de regulación genética de organismos procariontes, como por ejemplo las redes booleanas (Arias Del Angel et al., 2018). Sin embargo, la modelación matemática mediante redes booleanas y la modelación matemática mediante sistemas dinámicos continuos exhiben diferencias importantes entre sí. No todas las diferencias entre los modelos booleanos y los modelos continuos subyacen en el ámbito cuantitativo, también existen diferencias conceptuales, lo cual influye en la manera de entender los fenómenos biológicos de estudio (Smolen et al., 2000). Algunos modelos de redes booleanas aplicados a el estudio de circuitos genéticos simples, son capaces de generar oscilaciones en condiciones en las que las versiones continuas no son capaces de hacerlo y viceversa (Gehrmann and Drossel, 2010). En los modelos continuos, cierto tipo de variaciones en los términos de cooperatividad y tasas de degradación de mRNAs, pueden restringir la aparición de ciclos límite, mientras que las versiones booleanas pueden predecir oscilaciones (Gehrmann and Drossel, 2010; Polynikis et al., 2009). Los niveles de expresión genética pueden saturarse, lo cual puede ser capturado al implementar esquemas de reacciones químicas que consideran tasas de transcripción, traducción y degradación proteica. Dichos esquemas se ajustan para la implementación de sistemas de ecuaciones diferenciales no lineales. Sin embargo, la incorporación de numerosos detalles en los sistemas continuos

puede ser una gran desventaja. Por otro lado, las redes booleanas son capaces de manejar un gran número de elementos con reglas de cambio más simples, lo cual es una gran ventaja, debido a que muchas redes de regulación genética están compuestas por numerosos elementos. A pesar de ello, existen algunas limitaciones al utilizar redes booleanas para modelar algunos tipos de comportamientos a nivel celular. En particular, [Arias Del Angel et al. \(2018\)](#) encontraron algunas limitaciones en los modelos booleanos para reproducir comportamientos transitorios. En contraparte, el modelaje mediante sistemas continuos cuenta con una amplia teoría matemática capaz de reproducir comportamientos transitorios y de excitabilidad. Resulta crucial identificar los elementos mínimos necesarios capaces de modular diferentes procesos fisiológicos al interior de la célula, la razón es que cuando consideramos a todos los elementos involucrados en un fenómeno biológico, su estudio puede volverse inmanejable. La perspectiva del presente trabajo es un ejemplo concreto de cómo un enfoque minimal puede ayudar a abordar preguntas biológicas de interés. Cabe señalar que dicha perspectiva minimal debe de ser sustentada con el conocimiento biológico disponible.

La biología exhibe numerosos ejemplos del impacto beneficioso que tiene la integración de diversas disciplinas científicas para responder y plantear preguntas biológicas de interés ([Ferrell Jr and Ha, 2014](#); [Gardner et al., 2000](#); [Hodgkin and Huxley, 1952](#); [Morris and Lecar, 1981](#); [Süel et al., 2007](#)). Dichos ejemplos han ayudado a reconciliar visiones que tradicionalmente han sido consideradas como antagónicas. Además, la investigación en la biología tiene el potencial de acelerarse mediante el uso de las matemáticas y el cómputo. En el área de las neurociencias, dicha aplicación no solamente ha sido aceptada, sino que además ha ganado reconocimiento en algunos casos ([Hodgkin and Huxley, 1952](#)). Al igual que en la física, una pregunta importante a la hora de implementar cualquier modelo matemático en la biología es, ¿cuál es la aportación del modelo? Muchos autores consideran que la aportación de los modelos matemáticos se restringe a su capacidad predictiva. No obstante, la aportación de los modelos teóricos también puede proporcionar herramientas conceptuales que nos ayudan a entender problemas biológicos.

El estado de competencia ejemplifica la diversidad de respuestas que un grupo de or-

ganismos es capaz de exhibir, aún tratándose de individuos pertenecientes a poblaciones isogénicas. Dicho estado podría parecer una apuesta sumamente riesgosa para la bacteria, no obstante, este proceso de diferenciación sigue apareciendo en bajas frecuencias de forma natural a pesar de implicar una inversión energética sumamente elevada. Esto es un ejemplo de cómo algunos rasgos fenotípicos no están predeterminados en su totalidad por los genes, y dependen de mecanismos de regulación que poseen dinámicas particulares.

La evolución biológica no debería ser considerada como un proceso lineal debido a que existen diferentes tipos de fuerzas evolutivas que operan en todos los organismos, y no todas ellas están encaminadas hacia el perfeccionamiento de características ventajosas. Además, rasgos que podrían parecer riesgosos o ineficientes pueden preservarse a lo largo de varias generaciones. El estudio de organismos modelo como *B. subtilis* puede ayudarnos a comprender la vasta complejidad detrás de la regulación de la expresión genética, y nos motiva a ir más allá del determinismo genético que aún impera en algunas áreas de la biología.

## Glosario

- **Alosterismo:** Regulación de la actividad de una enzima por medio de la unión de una molécula en un sitio distinto del sitio activo.
- **Bacteria Gram positiva:** Grupo de bacterias que dan positivo a la prueba de tinción de Gram con la cual adquieren una coloración azul.
- **Bacteria Gram negativa:** Grupo de bacterias que no marcan positivo a la prueba de tinción de Gram y adquieren una coloración violeta.
- **Ceroclina de ComK:** Curva de puntos para la cuál no hay cambio en la concentración de ComK.
- **Ceroclina de ComS:** Curva de puntos para la cuál no hay cambio en la concentración de ComS.
- **Código genético:** Conjunto de reglas que define cómo se va a decodificar la información secuencial almacenada en el material genético.
- **Cooperatividad:** Fenómeno en el cual la unión de un sustrato a una enzima que posee múltiples sitios activos es capaz de influir en la unión sustratos subsecuentes sobre la misma.
- **DNA:** El ácido desoxirribonucleico es una molécula biológica de doble cadena en la cual se almacena la información secuencial en algunos organismos.
- **Fenotipo:** Conjunto de características visibles de un organismo, las cuales pueden ser fisiológicas, morfológicas o bioquímicas.

- Gen: Fragmento de DNA asociado a la codificación de productos genéticos o también a funciones de regulación genética.
- Inhibición: Fenómeno que interfiere en la formación del complejo enzima-sustrato alterando la formación de productos.
- Inhibición competitiva: Tipo de inhibición en la cual una molécula distinta al sustrato se une al sitio activo de la enzima interfiriendo en la formación de productos.
- Inhibición no competitiva: Tipo de inhibición en la cual una molécula distinta al sustrato se une a un sitio distinto del sitio activo de una enzima interfiriendo en la formación de productos.
- Operon: Unidad funcional de DNA que contiene un conjunto de genes junto con un promotor y un operador capaces de controlar la transcripción.
- Población clonal: Conjunto de células idénticas que provienen de un linaje común.
- Polimerasa de DNA: Enzima involucrada en el proceso de duplicación del DNA.
- Polimerasa de RNA: Enzima capaz de pasar la información secuencial del DNA a RNA durante la transcripción.
- Plásmido: Molécula de DNA independiente del DNA cromosomal capaz de duplicarse de manera independiente.
- Policistrónico: RNA que puede codificar más de un producto.
- Promotor: Segmento de DNA donde ocurre el inicio de la transcripción.
- Proteína verde fluorescente: Proteína capaz de emitir fluorescencia al ser expuesta a la luz ultravioleta.
- Red de regulación genética: Conjunto de reguladores capaces de controlar diversos procesos biológicos.

- Regulación autógena: Mecanismo de regulación en la cual el producto de un operón puede regular la unidad en la que reside.
- Regulon: Grupo de genes regulados por un sólo elemento.
- RNA: El ácido ribonucleico es un ácido nucleíco involucrado en procesos como la transcripción pero también es asociado a funciones regulatorias.
- Represión: Proceso mediante el cual se interfiere en la formación de un producto.
- Transferencia horizontal: Proceso asociado al flujo de información genética entre individuos distintos, de manera independiente al flujo de información por medio de la reproducción.

## Material suplementario

### 4.1. Métodos

#### Análisis del modelo teórico y simulaciones computacionales

Las simulaciones computacionales se realizaron utilizando el lenguaje de programación Python 2.7 en una computadora portátil Lenovo Yoga 510 con sistema operativo Linux Kubuntu 17.04 y con procesador Intel CORE i5. El análisis del modelo teórico se llevó a cabo mediante el análisis de planos fase, ceroclinas y digramas de bifurcación. Las figuras de las simulaciones, planos fase y diagramas de bifurcación fueron generadas utilizando los módulos Matplotlib y SciPy de Python. Las simulaciones numéricas se realizaron utilizando el método de Runge-Kutta de cuarto orden con un paso en el tiempo de 0.05 s.

### 4.2. Tablas de valores

Parámetros	Valores
$a_k$	0.004
$b_k$	0.07
$b_s$	0.82
$K_0$	0.2
$K_1$	0.222
$n$	2
$p$	5

**Tabla S1:** Tabla de parámetros del modelo adimensional de Süel et al. (2006)

Configuraciones	Cociente: $\frac{b_k}{b_s}$	Valores
Excitable biestable	$\frac{0.14}{0.68}$	0.2058
Competente monoestable	$\frac{0.12}{0.92}$	0.1304
Vegetativo monoestable	$\frac{0.08}{0.68}$	0.1176
Excitable monoestable	$\frac{0.08}{0.8}$	0.1000

**Tabla S2:** Proporciones relativas de las tasas máximas de producción de ComS y ComK asociadas a configuraciones de parámetros distintas

### 4.3. Ceroclinas

#### Ceroclina de $K$ (ComK)

Para obtener la ceroclina de ComK comenzamos por tomar la ecuación (3.1) y la igualamos a cero:

$$0 = \partial_t K = a_K + \frac{b_K K^n}{K_0^n + K^n} - \frac{K}{1 + K + S_{nullK}}$$

Sea

$$G(K) = a_K + \frac{b_K K^n}{K_0^n + K^n}$$

Entonces

$$\begin{aligned} G(K) &= \frac{K}{1 + K + S_{nullK}} \\ G(K)(1 + K + S_{nullK}) &= K \\ G(K)S_{nullK} &= K - G(K)(1 + K) \end{aligned}$$

Por tanto, la ceroclina de  $K$  (ComK) esta dada por:

$$S_{nullK}(K) = K \frac{(1 - G(K))}{G(K)} - 1.$$

### Ceroclina de $S$ (ComS)

Para obtener la ceroclina de ComS comenzamos por tomar la ecuación (3.2) y la igualamos a cero:

$$0 = \partial_t S = \frac{b_s}{1 + (K/K_1)^p} - \frac{S}{1 + K + S_{nullS}}$$

Sea

$$g(K) = \frac{K_1^p b_s}{K_1^p + K^p}$$

Entonces

$$\begin{aligned} g(K) &= \frac{S_{nullS}}{1 + S_{nullS} + K} \\ (1 + K)g(K) &= (1 - g(K))S_{nullS} \end{aligned}$$

Por tanto, la ceroclina de  $S$  (ComS) esta dada por:

$$S_{nullS}(K) = \frac{(1 + K)g(K)}{1 - g(K)}$$

#### 4.4. Análisis de estabilidad local

Los puntos fijos del sistema (3.1)-(3.2) son parejas ordenadas  $(K_*, S_*)$  que satisfacen  $K(K_*, S_*) = 0$  y  $S(K_*, S_*) = 0$  respectivamente. El tipo de puntos fijos depende de los valores propios  $\lambda_1$  y  $\lambda_2$  de la matriz jacobiana del sistema (3.1)-(3.2) evaluada en los puntos fijos  $(K_*, S_*)$ . La matriz jacobiana del sistema (3.1)-(3.2) es:

$$J(K, S) = \begin{pmatrix} \partial_K (\partial_t K) & \partial_S (\partial_t K) \\ \partial_K (\partial_t S) & \partial_S (\partial_t S) \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \frac{nK_0^n b_K K^{n-1}}{(K_0^n + K^n)^2} - \frac{1+S}{(1+K+S)^2} & \frac{K}{(1+K+S)^2} \\ \frac{-b_s K^{P-1} K_1^P P}{(K^P + K_1^P)^2} - \frac{S}{(1+K+S)^2} & \frac{1+K}{(1+K+S)^2} \end{pmatrix}$$

Donde los valores propios son:  $J_* = J(K_*, S_*)$ ,

$$disc J_* = tr J_*^2 - 4 \det J_*$$

$$\lambda_* = tr J_* \pm \sqrt{disc}$$

Si  $disc J_* > 0$ , entonces  $\lambda_* \in \mathbb{R}$  y el punto fijo es un nodo. Si  $disc J_* < 0$ , entonces  $\Im(\lambda_*) \neq 0$  y el punto fijo es un foco. El punto fijo  $(K_*, S_*)$  es asintóticamente estable si  $\Re(\lambda_*) < 0$ .

#### 4.5. Curvas de puntos fijos

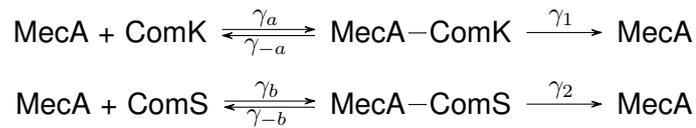
Basado en la ecuación (3.1) de ComK, las curvas de puntos fijos para  $a_k$  es

$$a_k = -\frac{b_k}{1 + (K_0/K)^n} + \frac{K}{1 + K + S_{nullS}(K)}$$

#### 4.6. Derivación de los términos de decremento de ComK y ComS

##### Reacciones de degradación enzimática

Las reacciones de degradación enzimática siguen una cinética de tipo Michaelis-Menten y pueden escribirse de la siguiente manera



Las cuales se basan en las siguientes suposiciones:

1. Las reacciones de degradación enzimática del complejo proteolítico MecA siguen una cinética del tipo Michaelis-Menten.
2. La cantidad total del complejo degradador MecA es constante y se conserva.
3. Las tasas  $\gamma_1^{-1}$  y  $\gamma_2^{-1}$  son mucho menores que resto de las tasas del sistema y se pueden despreciar.

##### Ecuaciones

A partir del esquema de degradación enzimática podemos derivar el siguiente sistema de ecuaciones:

$$\frac{dM_k}{dt} = -(\gamma_{-a} + \gamma_1)[M_K] + \gamma_a[M_f][K] \quad (4.1)$$

$$\frac{dM_s}{dt} = -(\gamma_{-b} + \gamma_2)[M_S] + \gamma_b[M_f][S] \quad (4.2)$$

En donde [K] y [S] representan las concentraciones proteicas de ComK y ComS, mientras que  $[M_f]$ ,  $[M_K]$  y  $[M_S]$  denotan las concentraciones de los complejos MecA, MecA-ComK y

MecA-ComS.

### Derivación del término de decremento en ComK

Tomamos la derivada de la ecuación (4.1) y la igualamos a cero

$$-(\gamma_{-a} + \gamma_1)[M_K] + \gamma_a[M_f][K] = 0$$

Luego

$$\gamma_a[M_f][K] = (\gamma_{-a} + \gamma_1)[M_K]$$

Dividimos ambos lados de la ecuación entre  $[M_K]$  y  $\gamma_a$

$$\frac{[M_f][K]}{[M_K]} = \frac{\gamma_{-a} + \gamma_1}{\gamma_a}$$

Sea

$$\Gamma_K = \frac{\gamma_{-a} + \gamma_1}{\gamma_a}$$

De esta manera

$$[M_K] = \frac{[M_f][K]}{\Gamma_K}$$

Tomando en consideración la suposición 2 sobre una cantidad constante de complejo degradador llegamos a la relación

$$[M_T] = [M_f] + [M_k] + [M_s]$$

Sustituimos  $[M_k]$  y  $[M_s]$

$$[M_T] = [M_f] + \frac{[M_f][K]}{\Gamma_K} + \frac{[M_f][S]}{\Gamma_S}$$

Factorizamos  $[M_f]$

$$[M_T] = [M_f] \left( 1 + \frac{[K]}{\Gamma_K} + \frac{[S]}{\Gamma_S} \right)$$

Despejamos  $[M_f]$

$$[M_f] = \frac{[M_T]}{1 + \frac{[K]}{\Gamma_K} + \frac{[S]}{\Gamma_S}}$$

Multiplicamos por  $\frac{K}{\Gamma_k}$

$$\frac{[M_f][K]}{\Gamma_K} = \frac{[M_T][K]}{\Gamma_K(1 + \frac{[K]}{\Gamma_K} + \frac{[S]}{\Gamma_S})}$$

En donde

$$[M_k] = \frac{[M_f][K]}{\Gamma_K}$$

Considerando el esquema de reacción enzimática descrito anteriormente

$$\gamma_1[M_K] = \frac{\gamma_1[M_T][K]}{\Gamma_k(1 + \frac{[K]}{\Gamma_k} + \frac{[S]}{\Gamma_S})}$$

Finalmente

$$\gamma_1[M_K] = \frac{\delta_k[K]}{1 + \frac{[K]}{\Gamma_K} + \frac{[S]}{\Gamma_S}}$$

En donde

$$\delta_K = \frac{\gamma_1[M_T]}{\Gamma_K}$$

Y en la versión adimensional del modelo queda como

$$\frac{K}{1 + K + S}$$

## Derivación del término de decremento en ComS

Se realiza de manera similar al término de decremento en ComK.

### 4.7. Extensiones del modelo teórico de regulación de la expresión genética.

Süel et al. (2006) introdujeron una copia adicional de *comS* bajo el control de ComK compensando la inhibición de ComK hacia ComS. De esta manera es posible modificar la

ecuación (3.2) de ComS agregando un término adicional que describe la activación de *comS* por ComK.

$$\frac{dS}{dt} = \frac{b_s}{1 + (K/K_1)^p} + \frac{b_g K^n}{K_g^n + K^n} + -\frac{S}{1 + K + S} \quad (4.3)$$

Al agregar términos de degradación lineal de ComK ( $\Delta_k K$ ) y ComS ( $\Delta_s S$ ) en el sistema (3.1)(3.2) las ecuaciones quedan de la siguiente manera:

$$\frac{dK}{dt} = a_k + \frac{b_k K^n}{K_0^n + K^n} - \frac{K}{1 + K + S} - \Delta_k K \quad (4.4)$$

$$\frac{dS}{dt} = \frac{b_s}{1 + (K/K_1)^p} - \frac{S}{1 + K + S} - \Delta_s S \quad (4.5)$$

## Bibliografía

- Albano, M., Hahn, J., and Dubnau, D. (1987). Expression of competence genes in *Bacillus subtilis*. *Journal of bacteriology*, 169(7):3110–3117.
- Alon, U. (2006). *An introduction to systems biology: design principles of biological circuits*. CRC press.
- Alon, U. (2007). Network motifs: theory and experimental approaches. *Nature Reviews Genetics*, 8(6):450.
- Angeli, D., Ferrell, J. E., and Sontag, E. D. (2004). Detection of multistability, bifurcations, and hysteresis in a large class of biological positive-feedback systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(7):1822–1827.
- Angert, E. R. (2005). Alternatives to binary fission in bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 3(3):214.
- Antebi, Y. E., Linton, J. M., Klumpe, H., Bintu, B., Gong, M., Su, C., McCardell, R., and Elowitz, M. B. (2017). Combinatorial signal perception in the bmp pathway. *Cell*, 170(6):1184–1196.
- Arias Del Angel, J. A., Escalante, A. E., Martínez-Castilla, L. P., and Benítez, M. (2018). Cell-fate determination in myxococcus xanthus development: Network dynamics and novel predictions. *Development, Growth & Differentiation*, 60(2):121–129.
- Av-Ron, E., Parnas, H., and Segel, L. A. (1993). A basic biophysical model for bursting neurons. *Biological cybernetics*, 69(1):87–95.

- Avery, O. T., MacLeod, C. M., and McCarty, M. (1944). Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types: induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type iii. *Journal of experimental medicine*, 79(2):137–158.
- Ayala, F. J. (1970). Teleological explanations in evolutionary biology. *Philosophy of science*, 37(1):1–15.
- Baker, T. A., Watson, J. D., Bell, S. P., Gann, A., Losick, M., and Levine, R. (2003). *Molecular biology of the gene*. Benjamin-Cummings Publishing Company.
- Becskei, A., Séraphin, B., and Serrano, L. (2001). Positive feedback in eukaryotic gene networks: cell differentiation by graded to binary response conversion. *The EMBO journal*, 20(10):2528–2535.
- Blokesch, M. (2016). Natural competence for transformation. *Current Biology*, 26(21):R1126–R1130.
- Boonstra, M., Vesel, N., and Kuipers, O. P. (2018). Fluorescently labeled dna interacts with competence and recombination proteins and is integrated and expressed following natural transformation of bacillus subtilis. *mBio*, 9(5):e01161–18.
- Brito, P. H., Chevreux, B., Serra, C. R., Schyns, G., Henriques, A. O., and Pereira-Leal, J. B. (2017). Genetic competence drives genome diversity in bacillus subtilis. *Genome biology and evolution*, 10(1):108–124.
- Caballero, L., Benítez, M., Alvarez-buylla, E. R., Hernández, S., Arzola, A. V., and Cocho, G. (2012). An epigenetic model for pigment patterning based on mechanical and cellular interactions. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 318(3):209–223.
- Condón, S., Palop, A., Raso, J., and Sala, F. (1996). Influence of the incubation temperature

- after heat treatment upon the estimated heat resistance values of spores of *Bacillus subtilis*. *Letters in Applied Microbiology*, 22(2):149–152.
- Dale, J. W. and Park, S. F. (2013). *Molecular genetics of bacteria*. John Wiley & Sons.
- Davies, J. and Jacob, F. (1968). Genetic mapping of the regulator and operator genes of the lac operon. *Journal of molecular biology*, 36(3):413–417.
- Dawes, I. and Thornley, J. (1970). Sporulation in *Bacillus subtilis*. theoretical and experimental studies in continuous culture systems. *Microbiology*, 62(1):49–66.
- Dubnau, D. (1991). Genetic competence in *Bacillus subtilis*. *Microbiological reviews*, 55(3):395–424.
- Eddy, S. R. (2012). The c-value paradox, junk dna and encode. *Current biology*, 22(21):R898–R899.
- Española, M. R. A. (2003). *Diccionario de la real academia española*. Espasa-Calpe.
- Ferrell Jr, J. E. and Ha, S. H. (2014). Ultrasensitivity part iii: cascades, bistable switches, and oscillators. *Trends in biochemical sciences*, 39(12):612–618.
- FitzHugh, R. (1969). Mathematical models of excitation and propagation in nerve. *Biological engineering*, 1(9):1–85.
- Gamba, P., Jonker, M. J., and Hamoen, L. W. (2015). A novel feedback loop that controls bimodal expression of genetic competence. *PLoS Genet*, 11(6):e1005047.
- Gardner, T. S., Cantor, C. R., and Collins, J. J. (2000). Construction of a genetic toggle switch in *Escherichia coli*. *Nature*, 403(6767):339–342.
- Gehrmann, E. and Drossel, B. (2010). Boolean versus continuous dynamics on simple two-gene modules. *Physical Review E*, 82(4):046120.

- Griffith, F. (1928). The significance of *pneumococcal* types. *Epidemiology & Infection*, 27(2):113–159.
- Grossman, A. D. (1995). Genetic networks controlling the initiation of sporulation and the development of genetic competence in *Bacillus subtilis*. *Annual review of genetics*, 29(1):477–508.
- Hahn, J., Kong, L., and Dubnau, D. (1994). The regulation of competence transcription factor synthesis constitutes a critical control point in the regulation of competence in *Bacillus subtilis*. *Journal of bacteriology*, 176(18):5753–5761.
- Hahn, M. W., Wray, G. A., et al. (2002). The g-value paradox. *Evolution and Development*, 4(2):73–75.
- Hamoen, L. W., Venema, G., and Kuipers, O. P. (2003). Controlling competence in *Bacillus subtilis*: shared use of regulators. *Microbiology*, 149(1):9–17.
- Hayes, W. et al. (1964). The genetics of bacteria and their viruses. studies in basic genetics and molecular biology. *The genetics of bacteria and their viruses. Studies in basic genetics and molecular biology*.
- Herrera-Valdez, M. (2018). Excitabilidad y plasticidad sináptica en el núcleo estriado (papiitia208618).
- Hoa, T. T., Tortosa, P., Albano, M., and Dubnau, D. (2002). Rok (ykuw) regulates genetic competence in *Bacillus subtilis* by directly repressing *comK*. *Molecular microbiology*, 43(1):15–26.
- Hoch, J. A. L., Sonenshein, R., Abraham, L., et al. (1993). *Bacillus subtilis and other gram-positive bacteria: biochemistry, physiology and molecular genetics*. Number 579.22/. 25 BAC.
- Hodgkin, A. L. and Huxley, A. F. (1952). A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *The Journal of physiology*, 117(4):500–544.

- Jablonka, E. and Lamb, M. J. (2014). *Evolution in four dimensions, revised edition: Genetic, epigenetic, behavioral, and symbolic variation in the history of life*. MIT press.
- Jacob, F. and Monod, J. (1961). On the regulation of gene activity. In *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, volume 26, pages 193–211. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Jenuwein, T. and Allis, C. D. (2001). Translating the histone code. *Science*, 293(5532):1074–1080.
- Leisner, M. (2008). *Genetic switching into the competent state-Bacillus subtilis: a single cell approach*. PhD thesis, PhD thesis, Ludwig Maximilians Universität München.
- Leisner, M., Stingl, K., Rädler, J. O., and Maier, B. (2007). Basal expression rate of *comK* sets a ‘switching-window’ into the k-state of *Bacillus subtilis*. *Molecular microbiology*, 63(6):1806–1816.
- Li, J. and Zhang, Y. (2014). Relationship between promoter sequence and its strength in gene expression. *The European physical journal E*, 37(9):86.
- Lobo, I. (2008). Biological complexity and integrative levels of organization. *Nature Education*, 1(1):141.
- Locke, J. C. and Elowitz, M. B. (2009). Using movies to analyse gene circuit dynamics in single cells. *Nature Reviews Microbiology*, 7(5):383.
- Maamar, H. and Dubnau, D. (2005). Bistability in the *Bacillus subtilis* k-state (competence) system requires a positive feedback loop. *Molecular microbiology*, 56(3):615–624.
- Martinez-Antonio, A. and Collado-Vides, J. (2003). Identifying global regulators in transcriptional regulatory networks in bacteria. *Current opinion in microbiology*, 6(5):482–489.
- McAdams, H. H. and Shapiro, L. (2003). A bacterial cell-cycle regulatory network operating in time and space. *Science*, 301(5641):1874–1877.

- Mell, J. C. and Redfield, R. J. (2014). Natural competence and the evolution of dna uptake specificity. *Journal of bacteriology*, 196(8):1471–1483.
- Morris, C. and Lecar, H. (1981). Voltage oscillations in the barnacle giant muscle fiber. *Biophysical journal*, 35(1):193–213.
- Nelson, D. L., Lehninger, A. L., and Cox, M. M. (2008). *Lehninger principles of biochemistry*. Macmillan.
- Nester, E. and Stocker, B. (1963). Biosynthetic latency in early stages of deoxyribonucleic acid transformation in *Bacillus subtilis*. *Journal of bacteriology*, 86(4):785–796.
- Ogura, M., Liu, L., LaCelle, M., Nakano, M. M., and Zuber, P. (1999). Mutational analysis of coms: evidence for the interaction of coms and meca in the regulation of competence development in *Bacillus subtilis*. *Molecular microbiology*, 32(4):799–812.
- Piggot, P. and Coote, J. (1976). Genetic aspects of bacterial endospore formation. *Bacteriological reviews*, 40(4):908.
- Piggot, P. J. and Hilbert, D. W. (2004). Sporulation of *Bacillus subtilis*. *Current opinion in microbiology*, 7(6):579–586.
- Polynikis, A., Hogan, S., and di Bernardo, M. (2009). Comparing different ode modelling approaches for gene regulatory networks. *Journal of theoretical biology*, 261(4):511–530.
- Priest, F. G. (1993). Systematics and ecology of bacillus. In *Bacillus subtilis and other Gram-positive bacteria*, pages 3–16. American Society of Microbiology.
- Proctor, L. M. and Fuhrman, J. A. (1990). Viral mortality of marine bacteria and cyanobacteria. *Nature*, 343(6253):60.
- Quiñones-Valles, C., Sánchez-Osorio, I., and Martínez-Antonio, A. (2014). Dynamical modeling of the cell cycle and cell fate emergence in caulobacter crescentus. *PloS one*, 9(11):e111116.

- Ramos, H. C., Hoffmann, T., Marino, M., Nedjari, H., Presecan-Siedel, E., Dreesen, O., Glaser, P., and Jahn, D. (2000). Fermentative metabolism of *Bacillus subtilis*: physiology and regulation of gene expression. *Journal of Bacteriology*, 182(11):3072–3080.
- Rosenfeld, N., Young, J. W., Alon, U., Swain, P. S., and Elowitz, M. B. (2005). Gene regulation at the single-cell level. *science*, 307(5717):1962–1965.
- Rothschild, L. J. and Mancinelli, R. L. (2001). Life in extreme environments. *Nature*, 409(6823):1092.
- Rud, I., Jensen, P. R., Naterstad, K., and Axelsson, L. (2006). A synthetic promoter library for constitutive gene expression in *Lactobacillus plantarum*. *Microbiology*, 152(4):1011–1019.
- Schaeffer, P., Millet, J., and Aubert, J.-P. (1965). Catabolic repression of bacterial sporulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 54(3):704–711.
- Sezonov, G., Joseleau-Petit, D., and D'Ari, R. (2007). *Escherichia coli* physiology in luria-bertani broth. *Journal of bacteriology*, 189(23):8746–8749.
- Sinderen, D., Luttinger, A., Kong, L., Dubnau, D., Venema, G., and Hamoen, L. (1995). *comK* encodes the competence transcription factor, the key regulatory protein for competence development in *Bacillus subtilis*. *Molecular microbiology*, 15(3):455–462.
- Slack, F. J., Serror, P., Joyce, E., and Sonenshein, A. L. (1995). A gene required for nutritional repression of the *Bacillus subtilis* dipeptide permease operon. *Molecular microbiology*, 15(4):689–702.
- Smits, W. K., Eschevins, C. C., Susanna, K. A., Bron, S., Kuipers, O. P., and Hamoen, L. W. (2005). Stripping *Bacillus comk* auto-stimulation is responsible for the bistable response in competence development. *Molecular microbiology*, 56(3):604–614.
- Smolen, P., Baxter, D. A., and Byrne, J. H. (2000). Modeling transcriptional control in gene networks—methods, recent results, and future directions. *Bulletin of mathematical biology*, 62(2):247–292.

- Solomon, J. M. and Grossman, A. D. (1996). Who's competent and when: regulation of natural genetic competence in bacteria. *Trends in Genetics*, 12(4):150–155.
- Sonenshein, A. L., Hoch, J. A., and Losick, R. (2002). *Bacillus subtilis*: from cells to genes and from genes to cells. In *Bacillus subtilis and Its Closest Relatives*, pages 3–5. American Society of Microbiology.
- Stragier, P. and Losick, R. (1996). Molecular genetics of sporulation in *Bacillus subtilis*. *Annual review of genetics*, 30(1):297–341.
- Strogatz, S. H. (2018). *Nonlinear dynamics and chaos: with applications to physics, biology, chemistry, and engineering*. CRC Press.
- Süel, G. M., Garcia-Ojalvo, J., Liberman, L. M., and Elowitz, M. B. (2006). An excitable gene regulatory circuit induces transient cellular differentiation. *Nature*, 440(7083):545–550.
- Süel, G. M., Kulkarni, R. P., Dworkin, J., Garcia-Ojalvo, J., and Elowitz, M. B. (2007). Tunability and noise dependence in differentiation dynamics. *Science*, 315(5819):1716–1719.
- Swift, H. (1950). The constancy of desoxyribose nucleic acid in plant nuclei. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 36(11):643–654.
- Switzer, R., Zalkin, H., and Saxild, H. (2002). *Bacillus subtilis* and its closest relatives: from genes to cells.
- Thomas Jr, C. A. (1971). The genetic organization of chromosomes. *Annual review of genetics*, 5(1):237–256.
- Tiwari, A. and Igoshin, O. A. (2012). Coupling between feedback loops in autoregulatory networks affects bistability range, open-loop gain and switching times. *Physical biology*, 9(5):055003.
- Tsang, J. and Van Oudenaarden, A. (2006). Exciting fluctuations: monitoring competence induction dynamics at the single-cell level. *Molecular systems biology*, 2(1).

- Turgay, K., Hahn, J., Burghoorn, J., and Dubnau, D. (1998). Competence in *Bacillus subtilis* is controlled by regulated proteolysis of a transcription factor. *The EMBO journal*, 17(22):6730–6738.
- Van Elsas, J. D., Govaert, J. M., and Van Veen, J. A. (1987). Transfer of plasmid pft30 between *bacilli* in soil as influenced by bacterial population dynamics and soil conditions. *Soil Biology and Biochemistry*, 19(5):639–647.
- Van Sinderen, D. and Venema, G. (1994). *comK* acts as an autoregulatory control switch in the signal transduction route to competence in *Bacillus subtilis*. *Journal of bacteriology*, 176(18):5762–5770.
- Voet, D. and Voet, J. G. (2006). *Bioquímica*. Ed. Médica Panamericana.
- Wang, J. T., Huston, W. M., Johanesen, P., Lloyd, M., and Waller, K. L. (2018). A laboratory competency examination in microbiology. *FEMS microbiology letters*, 365(20):fny224.
- Whitacre, J. M. (2012). Biological robustness: paradigms, mechanisms, and systems principles. *Frontiers in genetics*, 3:67.
- Zapata, F. G. B. (2004). *Fundamentos y casos exitosos de la biotecnología moderna*. El Colegio Nacional.