

Centro de Investigación y de Estudios Avanzados

del Instituto Politécnico Nacional



Unidad Monterrey

Modelo del circuito de regulación del operón de triptofanasa en *Escherichia coli*

Tesis que presenta:

MARIANA GÓMEZ SCHIAVON

para obtener el Grado en:

Maestría en Ciencias

en Ingeniería y Física Biomédicas

Director de tesis: Dr. Moisés Santillán Zerón

Apodaca, NL., 4 de julio de 2011

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer al Centro de Investigación y Estudios Superiores del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV) y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por su indispensable apoyo en mi formación académica. Particularmente, quisiera agradecer al CINVESTAV Unidad Monterrey por brindarme todas las facilidades necesarias para el desarrollo de este proyecto, sumamente enriquecedor en mi crecimiento personal e intelectual.

En especial agradezco a mi asesor, Moisés Santillán, por guiarme a lo largo de este camino y ser un modelo de inspiración; me siento profundamente orgullosa de haber tenido la oportunidad de trabajar a su lado. Igualmente agradezco a mis profesores y compañeros de la Unidad Monterrey por sus largas horas de atención y oportunos comentarios, que fueron un pilar esencial para la construcción de este trabajo de investigación; en particular agradezco a mis sinodales, Dr. Bruno Escalante y Dr. Jesús Rodríguez, y mis compañeros Criseida Zamora, Norma Pérez y Eder Zavala. También quisiera agradecer al Dr. Carlos Ruíz, Felipe Pacheco, Juan Manuel Solano y Jorge González, quienes han ayudado a expandir mi visión de la biología y la ciencia en general.

Finalmente quisiera agradecer a mis padres por brindarme todo el soporte necesario para alcanzar mis sueños y sobre todo por enseñarme a luchar por ellos. Y a Sur Herrera, por todo su apoyo y ayuda, tanto académica como personalmente, y por ser la principal fuerza que me invita a dar lo mejor de mí cada día.

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| Resumen | 7 |
| Abstract | 9 |
| I. Introducción | 13 |
| a. Conceptos generales | 13 |
| <i>i.</i> El genoma & la información genética | 13 |
| <i>ii.</i> Dogma central de la biología molecular | 13 |
| b. Genes & su regulación | 14 |
| <i>i.</i> Genes & operones | 15 |
| <i>ii.</i> Redes de regulación | 16 |
| — Biestabilidad | 17 |
| c. El operón de triptofanasa en <i>Escherichia coli</i> | 18 |
| <i>i.</i> El operón: Estructura & componentes | 19 |
| <i>ii.</i> Mecanismos de regulación | 20 |
| <i>iii.</i> Arquitectura del sistema | 22 |
| II. Justificación, hipótesis & objetivo | 25 |
| III. Metodología & resultados | 27 |
| a. Modelo | 27 |
| b. Parámetros | 29 |
| c. Biestabilidad | 31 |
| <i>i.</i> Aproximación analítica | 31 |
| <i>ii.</i> Exploración numérica | 34 |
| <i>iii.</i> Pesos: Retroalimentación positiva vs. Retroalimentación negativa | 36 |
| <i>iv.</i> Sin retroalimentación negativa | 42 |

| | | |
|-------------|---|-----------|
| v. | Estados estacionarios | 45 |
| vi. | Retroalimentación negativa & tiempos de inducción | 51 |
| IV. | Conclusiones & perspectivas | 57 |
| V. | Apéndices | 59 |
| <i>I.</i> | Vida media & constantes de reacción | 59 |
| <i>II.</i> | $P_A(G)$ & sus parámetros | 60 |
| <i>III.</i> | Exploración Monte Carlo & estimación de estados estacionarios | |
| | (CÓDIGO) | 62 |
| <i>IV.</i> | Variando W_E | 69 |
| | Lista de siglas & acrónimos | 73 |
| | Referencias | 75 |

RESUMEN

Escherichia coli, como muchos otros organismos, utiliza la glucosa como su principal fuente de carbono. Sin embargo, cuando ésta escasea en el medio, la bacteria es capaz de activar los mecanismos necesarios para el consumo de una fuente alterna de carbono, como lactosa y triptófano (Wong *et al.*, 1997; Adhya & Shapiro, 1969; Yanofsky *et al.*, 1991). La activación de estos mecanismos debe ser un proceso estrictamente regulado, en primer lugar porque estas bacterias son mucho más eficientes consumiendo glucosa, y en segundo lugar porque estos mecanismos son costosos energéticamente. En otras palabras, el organismo sólo debe gastar energía en producir la maquinaria necesaria para el consumo de una fuente alterna de carbono si hay suficiente de este compuesto en el medio; en particular, el triptófano, al ser un aminoácido, es indispensable para la síntesis proteica, por lo que la fina regulación de su consumo es crucial.

El operón *tna* codifica para la triptofanasa, enzima que degrada al triptófano en indol, amonio y piruvato, y la permeasa específica de triptófano. La expresión de ambos genes está sujeta a represión catabólica, la cual asegura que éstos se expresen en una tasa alta únicamente cuando la glucosa extracelular escasea; y la región líder del operón, *tnaC*, mide la concentración de triptófano para garantizar que haya suficiente de éste como para ser gastado para la producción de piruvato. La red de regulación del operón *tna* tiene dos lazos de retroalimentación de signos opuestos: por un lado, el triptófano intracelular induce la síntesis de la permeasa, quien a su vez incrementa la concentración de triptófano intracelular (retroalimentación positiva); por el otro lado, el triptófano intracelular también promueve la síntesis de la triptofanasa, y ésta reduce la concentración de triptófano al degradarlo (retroalimentación negativa). El lazo positivo vuelve al sistema candidato a mostrar biestabilidad y la presencia de los dos lazos de signos opuestos ha sido observada en otros sistemas de control para el uso de fuentes alternas de carbono, como el operón *lac* en *E. coli* (Ozbudak *et al.*, 2004) y la red de señalización de galactosa en levadura (Acar *et al.*, 2005).

En esta tesis se construyó un modelo de ecuaciones diferenciales para la red de regulación del operón *tna* en *E. coli*. El objetivo es elucidar la función y relevancia de la arquitectura del circuito de regulación; en particular, el papel de ambos lazos de retroalimentación sobre la dinámica del mismo. Encontramos que el sistema es capaz de mostrar biestabilidad en un amplio rango de parámetros biológicamente factibles y que la retroalimentación negativa, contrario a lo pensado inicialmente, aumenta el potencial biestable del sistema al permitir al lazo de retroalimentación positiva ser más fuerte. Además, el lazo negativo también incrementa la sensibilidad del sistema a concentraciones bajas de triptófano intracelular y extracelular. Finalmente, la retroalimentación negativa, en presencia de biestabilidad, aumenta la velocidad de inducción del sistema.

ABSTRACT

Escherichia coli (as many other organisms) has glucose as its favorite carbon source. Nonetheless, in case of glucose scarcity, these bacteria are capable of activating specific mechanisms to consume alternative carbon and energy sources; like lactose and tryptophan (Wong *et al.*, 1997; Adhya & Shapiro, 1969; Yanofsky *et al.*, 1991). The activation of these mechanisms oughts to be a strictly regulated process, firstly because these bacteria are much more efficient at consuming glucose, and secondly because the activation of such mechanisms is energetically expensive. Hence, the organism shouldn't spend its energy in producing the machinery needed to consume the alternative carbon source unless there is enough of this compound in the environment; tryptophan is also essential for protein synthesis, for this reason, accurate regulation of its consumption as a carbon source is crucial.

The *tna* operon codes for tryptophanase, the enzyme that degrades tryptophan into indole, ammonium and pyruvate, and a tryptophan specific permease. The expression of both genes is subject to catabolite repression, which ensures that they are expressed at a high rate only when extracellular glucose is scarce; and the leader region *tnaC* senses tryptophan concentration to guarantee that there is enough to be spent to produce pyruvate. The *tna* operon regulatory circuit has two feedbacks loops of different sign: on the one hand, intracellular tryptophan induces permease synthesis, and this one in turn increases intracellular tryptophan concentration (positive feedback); on the other hand, intracellular tryptophan stimulates tryptophanase synthesis too, and this enzyme reduces tryptophan concentration (negative feedback). The positive loop makes the system candidate to show bistability and the presence of both feedbacks has been observed in other control systems for the use of an alternative carbon sources, like the *lac* operon in *E. coli* (Ozbudak *et al.*, 2004) and the galactose signaling network in yeast (Acar *et al.*, 2005).

In this study, we constructed a differential equation model for the *tna* operon regulatory system in *E. coli*. Our aim is to elucidate the function and relevance of this circuit architecture; in particular, the role played by both feedback loops. We found that the system is capable of showing bistability in a wide range of biologically feasible parameters and the negative feedback loop, contrary to our original guess, enhances the system's bistability potential by allowing the positive feedback loop to be stronger. Besides, the negative loop also increases the system sensibility to low extracellular and intracellular tryptophan concentrations. Finally, the negative feedback loop, in presences of bistability, augments the induction velocity of the system.

*The most incomprehensible thing about the universe is
that it is comprehensible.*

Albert Einstein

I. INTRODUCCIÓN

CONCEPTOS GENERALES

El genoma & la información genética

Si se pregunta qué hace a la vida tan especial, incluso alejándose de la visión antropocéntrica, la respuesta es sencilla: Los organismos vivos no sólo son capaces de responder y contender con su entorno, sino que también se reproducen y preservan, logrando la aparición de sistemas altamente complejos que no podrían existir sin esta evolución gradual y el acumulado de instrucciones para la construcción de un nuevo organismo.

Las moléculas utilizadas para la transmisión de esta información son los **ácidos nucleicos**, largos polímeros de nucleótidos en cuya secuencia específica se encuentran contenidos los **genes**, es decir, segmentos que codifican para un componente funcional, ya sea catalítico o estructural, así como el complejo de instrucciones para su expresión. En otras palabras, un gen es la unidad mínima de información biológica y se encuentra escrito en los ácidos nucleicos.

Al conjunto de toda la **información genética** (genes) de un organismo se le denomina **genoma**. Éste es el encargado de almacenar y codificar la información necesaria para la formación, mantenimiento y reproducción de un organismo vivo. Por ello resulta crucial el estudio del mismo, su estructura, código y mecanismos de regulación, para entender a los organismos y la vida en general.

Dogma central de la biología molecular

Para ser funcional, la información genética debe ser preservada y decodificada, lo cual se da por una serie de pasos que denominamos el **dogma central de la biología molecular** (figura 1). En su versión tradicional nos dice que el genoma, compuesto por ácido desoxirribonucleico (ADN) en todos los organismos vivos, es capaz de copiarse a sí mismo mediante un proceso llamado **replicación**. Por otro lado, para expresar los genes, la secuencia en el ADN es transferida a una nueva molécula, compuesta por ácido ribonucleico (ARN), y a

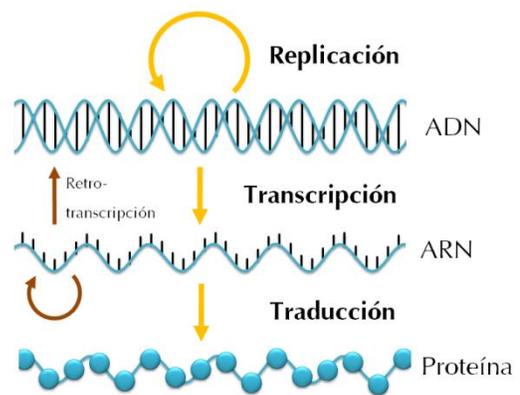


Figura 1 Dogma central de la biología molecular.

este proceso se le nombra **transcripción**; esta secuencia de ARN puede ser en sí misma funcional, como es el caso de los ARN de transferencia (tARN) y ribosomales (rARN), o simplemente acarrear la información del gen para la síntesis proteica, en cuyo caso se le conoce como ARN mensajero (ARNm). Este último es finalmente decodificado mediante la **traducción** de la secuencia en una cadena de aminoácidos que forman una proteína, elemento funcional base de la célula. En el caso de algunos virus, la información es almacenada en ARN y copiada a ADN (retrotranscripción) al entrar a la célula hospedera, lo que ha hecho que se amplíe el esquema de este dogma central.

Así, el genoma debe ser completamente replicado antes de cada división celular, lo que permite a la célula hija conservar su información genética. Y, por otro lado, decimos que un gen se está expresando cuando éste recorre los pasos del dogma central hasta su forma funcional, es decir, es transcrito y, en muchos casos, traducido; de hecho, la mayoría de los genes codifica para proteínas, aunque el tipo y número de moléculas de ARN funcional descubiertas han aumentado considerablemente en los últimos años. Las proteínas cumplen funciones enzimáticas dentro de la célula, mediando una gran diversidad de reacciones químicas que permiten el metabolismo celular, o pueden funcionar como receptores y transmisores de señales químicas, o simplemente como estructura, dando soporte y forma a la célula; las moléculas de ARN cumplen a su vez funciones tan esenciales como la traducción del ARNm en proteínas o la regulación de la expresión de otros genes.

GENES & SU REGULACIÓN

Hoy en día se sabe que la complejidad de un organismo no está del todo determinada por el tamaño de su genoma o el número de genes, sino en gran medida por la altamente estructurada regulación de la expresión de los mismos. En un momento particular, no todos los genes en un organismo se encuentran activos, sólo algunos serán expresados dependiendo del estadio del desarrollo, el entorno y especialización de la célula; un ejemplo claro es la gran diversidad celular en el humano, donde a pesar de que todas las células contienen exactamente la misma información genética, la composición y función de una célula hepática es muy distinta a la de una neurona. Es por ello que entender los mecanismos de regulación es también fundamental para comprender el funcionamiento celular.

Genes & operones

De manera general, un gen está compuesto por una **región reguladora** y la **secuencia codificante** del elemento funcional, ya sea una proteína o un ARN. Sin embargo, a pesar de que el dogma central de la biología molecular es válido para todos los organismos, la estructura y mecanismos de regulación específicos pueden variar mucho, particularmente entre organismos eucariontes y procariontes; nosotros nos centraremos en la descripción general de un gen en bacterias.

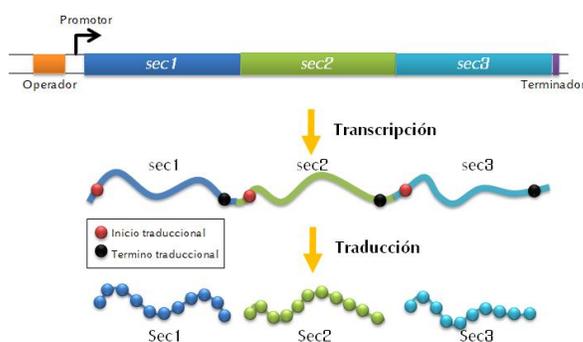


Figura 2 Arquitectura típica de un operón en bacterias.

La ARN polimerasa, enzima encargada de la transcripción, reconoce una secuencia específica en el ADN para unirse a éste, llamada **promotor**, e iniciar la transcripción. La accesibilidad o afinidad de la polimerasa por el ADN puede ser regulada por la unión de otras moléculas, usualmente cerca del promotor; a las secuencias del sitio de unión se les conoce como **operadores** y a las moléculas reguladoras como **factores de transcripción**. Estos

factores de transcripción pueden funcionar como **represores** o **inductores**, dependiendo de si inhiben o inducen la transcripción del gen, respectivamente. Al final del gen hay otra secuencia reguladora que indica la terminación de la transcripción y liberación de la ARN polimerasa; en general ésta se clasifica en dos, **terminación intrínseca** y **terminación dependiente de Rho**. La terminación intrínseca o independiente de Rho se da por la formación de un bucle de secuencia complementaria al final del ARNm naciente, que desestabiliza la unión de la ARN polimerasa al ADN, haciendo que ésta sea liberada y la transcripción finalice. La terminación dependiente de Rho es mediada, como su nombre lo indica, por la proteína Rho; ésta se une a una secuencia particular en el ARNm naciente y rompe la unión entre éste y el ADN, haciendo que el ARNm sea liberado y termine la transcripción (Banerjee *et al.*, 2006). Finalmente, el ARNm contiene una **secuencia de unión al ribosoma** (complejo molecular encargado de la síntesis proteica) y una **señal de inicio y termino de la traducción**.

En bacterias, varios genes pueden estar asociados a una misma estructura reguladora, es decir, a un mismo promotor, operadores y terminador transcripcional, y al conjunto se le llama **operón** (figura 2). Estos genes son transcritos en un solo evento, generando un único ARNm; mientras que cada gen conserva su señal de inicio y término de la traducción, formando proteínas independientes.

Redes de regulación

Una **red de regulación transcripcional** describe la interacción entre los factores de transcripción y los genes regulados por éstos. La presencia y actividad de los factores transcripcionales responden a señales biológicas, que van desde un cambio en las condiciones ambientales hasta la expresión de un gen regulador de los mismos, logrando modular la expresión de los genes controlados por éstos según la demanda celular.

Estas redes pueden tornarse sumamente complejas; sin embargo, se han encontrado pequeños patrones de regulación recurrentes en ellos, a los cuales se les llama **motivos**, que pueden pensarse como los bloques que interconectados conforman la red (Alon, 2006). La teoría predice que al entender la dinámica de estos motivos se puede entender a su vez la dinámica de la red completa; esto es obviamente una idealización, pero existen actualmente muchos ejemplos que confirman la validez de esta aproximación (Rosenfeld *et al.*, 2007; Ma *et al.*, 2009).

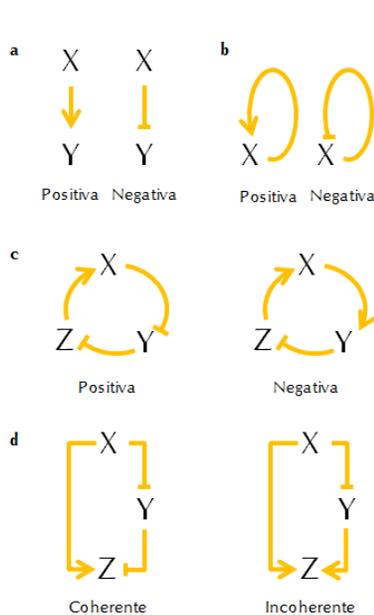


Figura 3 Motivos encontrados en redes de regulación transcripcional. **a** Regulación simple de X sobre Y. **b** Autorregulación de X sobre el mismo. **c** Ejemplos de retroalimentación positiva y negativa. **d** Ejemplos de lazos *feedforward* coherentes e incoherentes.

Bajo este contexto, en una red transcripcional llamamos una **regulación simple** a la que ejerce el factor X sobre el gen Y cuando X regula la expresión, ya sea de manera positiva (inductor) o negativa (represor), de Y (figura 3-a). En algunos casos puede darse que un factor de transcripción X regule su propia expresión (negativa o positivamente) y se denomina **autorregulación** (figura 3-b). La autorregulación puede aparecer también como un circuito de regulaciones simples que eventualmente regresa al gen inicial, y se le llama **retroalimentación**, que nuevamente puede ser positiva o negativa, dependiendo de la paridad de regulaciones simples negativas y, en consecuencia, el efecto final de la regulación (figura 3-c). Finalmente, los lazos de **feedforward** incluyen al menos 3 genes, donde el gen X regula tanto al gen Y como al Z, y el Z a su vez es regulado por Y, formando dos lazos de regulación paralelos; se les llama coherentes cuando la regulación de ambos lazos tiene la misma paridad de regulaciones simples negativas, es decir, que ambos se han positivos (con paridad par) o ambos negativos (con paridad impar), de lo contrario se conocen como incoherentes (figura 3-d; Alon, 2007).

La presencia de algunos motivos ha sido relacionada con la aparición de ciertas propiedades del sistema. Por ejemplo, un lazo *feedforward* incoherente permite que un sistema muestre adaptación, es decir, éste responde ante un cambio en el estímulo pero esta respuesta es transitoria incluso cuando el estímulo persiste (Ma *et al.*, 2009). Igualmente, el papel de los lazos de retroalimentación ha sido ampliamente estudiado, tanto teórica como experimentalmente (Elowitz & Leibler, 2000; Thomas & Kaufman, 2001; Cinquin & Demongeot, 2002; Tan *et al.*, 2009) y, en particular, se ha encontrado que la presencia de un lazo de retroalimentación positiva es necesario para que el sistema muestre **biestabilidad**.

Biestabilidad

La **biestabilidad** es un fenómeno que puede observarse en una gran diversidad de eventos naturales, como la diferenciación celular durante el desarrollo, el equilibrio entre dos poblaciones en un mismo nicho ecológico, el plegamiento de una proteína o el ensamble de un grupo de partículas. Formalmente se define como la coexistencia de dos estados estables para una misma condición del sistema (Strogatz, 1994). La definición del estado del sistema depende del ejemplo que estemos tratando; en el caso de una red de regulación genética, su **estado** en un momento particular queda determinado por la concentración de todos sus componentes y llamamos **estado estacionario** a aquél en la cual las concentraciones no cambian a través del tiempo. Si un cambio en el ambiente o cualquier perturbación externa al sistema cambia mínimamente la concentración de alguno de los componentes y el sistema es inevitablemente repelido del estado estacionario decimos que este estado es **inestable**; de lo contrario, si existe una región cercana al estado estacionario, donde a pesar de la perturbación el sistema es atraído nuevamente al estado estacionario, le llamamos **estable**.

Una buena analogía para entender la biestabilidad es pensar en una colina rodeada por dos cuencas y una canica que se mueve entre

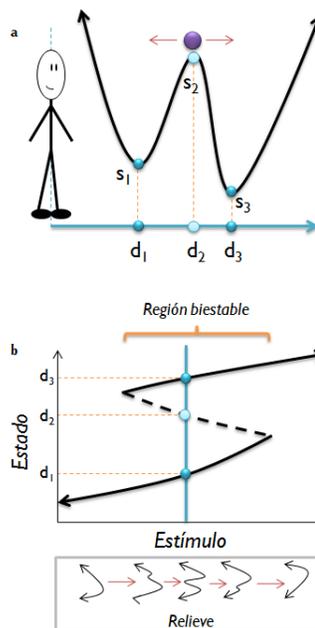


Figura 4 a Una analogía de la biestabilidad en un sistema es un relieve con una colina y dos cuencas a los lados, y una canica se mueve sobre éste. Existen tres estados estacionarios (s_1 , s_2 , s_3) definidos por la distancia con respecto al observador (d_1 , d_2 , d_3). s_1 y s_3 son estables, mientras que s_2 es inestable. **b** La gráfica muestra los estados estacionarios de un sistema con respecto a un estímulo que cambia el relieve (diagrama inferior); las líneas continuas muestran el valor de la distancia con respecto al observador de los estados estables y la línea punteada del estado inestable. Al rango de valores del estímulo donde coexisten dos estados estables se le llama región biestable.

ellas (figura 4-a). Llamemos *estado* del sistema únicamente a la distancia horizontal entre la canica y el observador. En este caso tenemos tres posibles *estados estacionarios*: si la canica se encuentra en el fondo de alguna de las cuencas o en la cima de la colina, ésta no se moverá. La cima de la colina es altamente *inestable*, si se empuja ligeramente a la canica, esta rodará colina abajo. Por otro lado, el fondo de las cuencas es *estable*, si la perturbación es suficientemente pequeña (como para no cruzar la colina: $d_2 - d_1$ en s_1 o $d_3 - d_2$ en s_3), la canica siempre regresará al reposo exactamente en la misma posición. Si algún estímulo externo puede modificar el relieve, cambiando la pendiente de la colina, su altura o haciendo desaparecer las cuencas, también cambiarán los estados estacionarios y la distancia entre ellos (figura 4-b). A la región donde el valor del estímulo genera dos estados estacionarios estables le llamamos región biestable.

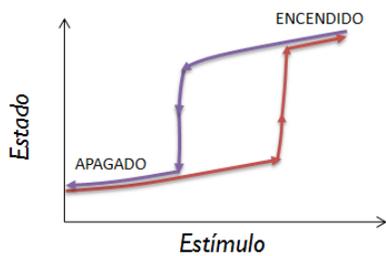


Figura 5 Ejemplo de un sistema biestabilidad. La línea morada muestra la trayectoria de transición del estado encendido al apagado y la línea roja de apagado a encendido. El sistema muestra una transición abrupta entre estados y el valor requerido del estímulo para esta transición depende del estado previo del sistema.

De manera práctica, un sistema biestable se caracteriza por dos propiedades: **transición abrupta** entre estados e **histerénesis** (figura 5). Cuando el sistema se encuentra cerca de la frontera de la región biestable, un pequeño cambio en el estímulo puede ocasionar una transición abrupta al otro estado estacionario. Dónde se dé este cambio abrupto depende de la historia del sistema y a este desfase del umbral de transición se le conoce como **histerénesis**. La histerénesis a su vez lleva a dos rasgos característicos: *memoria*, la respuesta del sistema a un valor dado del estímulo en la región biestable depende del estado previo del sistema; y *robustez*, una vez que el sistema cambia de estado requiere una variación mucho mayor del estímulo para regresar al estado previo. Esto puede ser sumamente conveniente en algunos sistemas biológicos, como en la regulación del ciclo celular o los estadios del desarrollo embrionario.

EL OPERÓN DE TRIPTOFANASA EN *ESCHERICHIA COLI*

La bacteria *Escherichia coli*, como muchos otros organismos, utiliza la glucosa como su principal fuente de carbono y energía; sin embargo, cuando este azúcar no se encuentra en el medio, es capaz de activar mecanismos alternos para la utilización de otros compuestos para satisfacer esta necesidad primaria, que van desde otros azúcares como la lactosa y la galactosa (Wong *et al.*, 1997; Adhya & Shapiro, 1969), hasta aminoácidos, como es el caso del triptófano (Yanofsky *et al.*, 1991). Pero éste es de hecho un proceso

estrictamente regulado, en primer lugar porque *E. coli* es mucho más eficiente consumiendo la glucosa, por lo que la preferirá sobre otros compuestos presentes en el medio; por otro lado, cuando escasea la glucosa la célula se encuentra en una situación de estrés por falta de alimento, y echar a andar la maquinaria necesaria para el consumo de una fuente alterna de carbono es costoso energéticamente hablando, por lo que la bacteria debe asegurarse de que hay suficiente de este nuevo compuesto de tal modo que la inversión sea remunerable. En el caso particular del triptófano este último punto de la regulación es crucial, ya que es un aminoácido es indispensable para la síntesis proteica, es decir, si no hay bastante para suplir su principal finalidad, el triptófano no debe ser consumido como fuente de energía.

El operón: Estructura & componentes

El operón de triptofanasa en *Escherichia coli* es el encargado de regular el consumo del triptófano como fuente de carbono. Está compuesto únicamente por dos genes estructurales: *tnaA* y *tnaB*. El

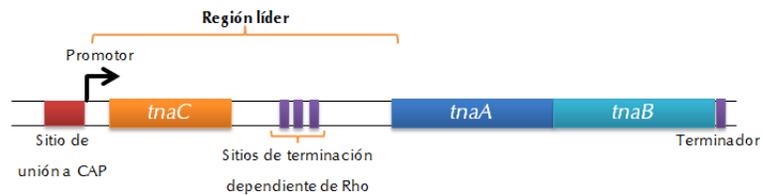


Figura 6 Esquema del operón de triptofanasa en *Escherichia coli*.

primero codifica para la **triptofanasa**, enzima encargada de degradar el triptófano en amonio, indol y piruvato; el amonio funciona como fuente nitrógeno para la célula, el indol se ha encontrado que puede servir como molécula señal en la detección de quórum (*quorum sensing*; Wang *et al.*, 2001) y el piruvato es también el producto final de la glucólisis y sirve como fuente de carbono y energía, tanto en condiciones aerobias como anaerobias (Nelson & Cox, 2004). La enzima es únicamente activa como un homotetrámero; su formación y disociación en subunidades depende de la concentración, temperatura y pH, así como de la presencia de su co-enzima, piroxidal 5'-fosfato (Snell, 1975; Ku *et al.*, 2006). Además, la triptofanasa es capaz de degradar otros aminoácidos en piruvato, como la serina y cisteína, aunque la afinidad por estos sustratos es claramente menor que por el triptófano (Snell, 1975); igualmente, cuando existe una alta concentración de los sustratos, piruvato e indol, la enzima puede llevar a cabo la reacción reversa, es decir, sintetizar triptófano (Watanabe & Snell, 1972).

El segundo gen, *tnaB*, codifica para la **permeasa específica de triptófano**. Existen otras dos permeasas capaces de transportar triptófano al medio intracelular, AroP y Mtr; sin embargo, AroP tiene preferencia por otros aminoácidos aromáticos, como la fenilalanina y tirosina, y Mtr se ha encontrado principalmente vinculada con el transporte de indol. La presencia de TnaB es esencial para que la bacteria pueda crecer con triptófano como su única fuente de carbono y la mutación de *aroP* y *mtr* no tienen un efecto visible sobre la actividad del operón (Yanofsky *et al.*, 1991).

La expresión de ambos genes está sujeta a un promotor dependiente de la proteína catabólica activadora (CAP), factor transcripcional mediador de la represión catabólica; el promotor está seguido por una región líder o reguladora de aproximadamente 320 pares de bases, que contiene tres elementos esenciales para la regulación del operón: una secuencia codificante de sólo 24 aminoácidos, *tnaC*, llamada **péptido líder**; los **sitios de unión de la proteína Rho** al ARNm naciente; y **pausas transcripcionales** (Yanofsky, 2007).

Mecanismos de regulación

El inicio de la transcripción es regulado por la **represión catabólica**, la cual es causada por la glucosa y otros azúcares internalizados mediante el sistema de fosfotransferasa (PTS) y permite establecer una jerarquía en la utilización de fuentes de energía. A grandes rasgos, el adenil monofosfato cíclico (cAMP) se une a la proteína catabólica activadora (CAP), ocasionando un cambio en la conformación de la misma, lo que permite que el complejo cAMP-CAP se una al ADN en un sitio específico de reconocimiento (su operador) y se favorezca la unión de la ARN polimerasa al promotor, induciendo así el inicio de la transcripción. La glucosa reduce de manera indirecta los niveles de cAMP, ya que cuando es importada al medio intracelular por PTS, el grupo fosfato del sistema es transferido al azúcar, por lo que la

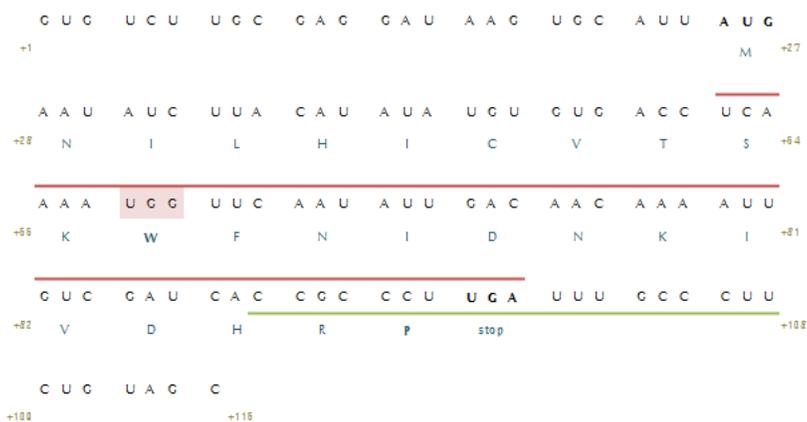


Figura 7 Inicio de la región líder del operón de triptofanasa en *E. coli*. En azul se muestra el péptido líder TnaC debajo de la secuencia codificante. La línea roja muestra la región donde se forma la pausa transcripcional; y la línea verde el sitio de reconocimiento y unión de la proteína Rho al ARNm naciente (Gong & Yanofsky, 2003).

enzima EIIA^{glu} (parte del complejo PTS) se encontrará predominantemente en su forma no fosforilada; la concentración de cAMP es ajustada por la adenilato ciclasa, cuya actividad depende a su vez de la forma fosforilada de EIIA^{glu}. Por otro lado, la expresión de *cya* (gen de la adenilato ciclasa) y de *crp* (gen de la CAP) puede ser inhibida por el complejo cAMP-CAP, pero esta autoregulación es muy débil *in vivo* (Kolb *et al.*, 1993). Además de regular los genes involucrados en el catabolismo de carbohidratos, CAP forma parte de la regulación de muchos otros procesos celulares; en *E. coli*, CAP activa la transcripción de más de 100 promotores y en algunos casos funciona incluso como represor (Botsford & Harman, 1992; Brückner & Titgemeyer, 2002).

Una vez iniciada la transcripción, el que ésta continúe hasta los genes estructurales depende de la **inhibición de la terminación transcripcional dependiente de Rho** por el triptófano libre intracelular. Este mecanismo es mediado por la región líder del operón, y se puede resumir a grandes rasgos en los siguientes puntos (Yanofsky, 2007):

1. **Sincronización de la transcripción y traducción.** Un bucle formado al inicio del operón por la hibridización del ARNm recién sintetizado (entre la posición +52 y +99, con respecto al sitio de inicio de la transcripción; figura 7) funciona como pausa transcripcional, reteniendo a la polimerasa hasta que el ribosoma inicia la traducción de *tnaC*.
2. **El ribosoma alcanza la última posición del gen del péptido líder, *tnaC*.** Al llegar al final de *tnaC*, el triptófano en la posición 12 del péptido naciente TnaC se une al ribosoma, ocasionando un cambio conformacional en éste (Cruz-Vera *et al.*, 2006).
 - a. **En presencia de triptófano libre intracelular.** Dado el cambio conformacional del ribosoma, una molécula libre de triptófano es capaz de unirse a éste, inhibiendo su capacidad de cortar el enlace entre el último aminoácido unido al péptido naciente, la prolina en la posición 24, y su ARN de transferencia, tARN^{Pro}, dejando al ribosoma estancado. Dado que el sitio de reconocimiento y unión de la proteína Rho al ARNm está en superposición con el final de *tnaC* (figura 7), el ribosoma estancado impide que Rho se una al ARNm y termine con la transcripción. En consecuencia, la triptofanasa y la permeasa específica son expresadas.
 - b. **En ausencia de triptófano libre intracelular.** El ribosoma alcanza la señal de terminación de *tnaC*, el péptido naciente es liberado y el ribosoma se despega del ARNm, dejando el sitio de unión a la proteína Rho libre, la cual se une al ARNm y alcanza a la polimerasa, dando

por terminada la transcripción antes de que ésta llegue al final del operón. Es decir, los genes estructurales no son expresados.

3. **La maquinaria es liberada y reutilizada.** El factor de reciclamiento del ribosoma (RRF) y el factor de liberación del ribosoma β (RF β) se unen al ribosoma estancado con el triptófano libre unido y el péptido TnaC-tARN^{Pro}, promoviendo la liberación de este último. TnaC-tARN^{Pro} es degradado y el ribosoma se despega del ARNm para ser reutilizado (Gong *et al.*, 2007).

El primer mecanismo de regulación, la represión catabólica, se encarga de valorar si existe o no suficiente glucosa en el medio, para definir si es necesario buscar una fuente alterna de carbono o no. Si la célula requiere de una fuente alterna de carbono, el segundo mecanismo, la inhibición de la terminación dependiente de Rho por el triptófano libre intracelular, evalúa si la concentración de triptófano es bastante alta como para consumir éste como fuente de carbono, sin afectar su disponibilidad para la síntesis proteica.

Arquitectura del sistema

Una vez definidos los mecanismos de regulación de la expresión del operón de triptofanasa en *Escherichia coli* se puede determinar la red de regulación que describe la interacción de sus componentes (figura B). A pesar de

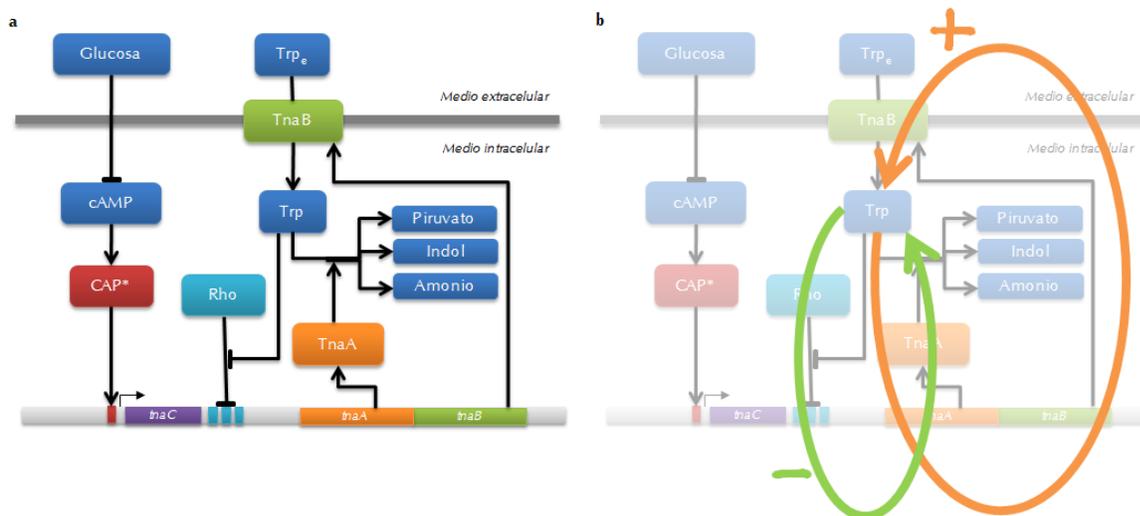


Figura B a Arquitectura de la red de regulación del operón de triptofanasa en *E. coli*. Las flechas representan regulación positiva y las flechas de punta plana regulación negativa. **b** En este esquema se resaltan los lazos de retroalimentación positiva (naranja) y negativa (verde) anidados, actuando ambos sobre la concentración de triptófano intracelular y en consecuencia sobre la expresión del operón.

que el proceso mediante el cual la concentración de **glucosa** extracelular regula la concentración de **cAMP** es sumamente complejo e involucra varios pasos (*Mecanismos de regulación; pp. 20*), su efecto final es simplemente negativo; igualmente, el efecto de la concentración de triptófano intracelular (**Trp**) sobre la actividad de la proteína **Rho** en la expresión del operón puede resumirse como una regulación negativa. Así, decimos que la glucosa reprime la concentración de cAMP, quien a su vez favorece la concentración de proteína catabólica activadora activa (**CAP***) que al unirse al promotor induce la transcripción del operón; es decir, la glucosa está reprimiendo la expresión del operón.

El triptófano inhibe la terminación transcripcional mediada por Rho, por lo que la triptofanasa (**TnaA**) y la permeasa específica de triptófano (**TnaB**) son sintetizadas. TnaA disminuye la concentración de Trp, al degradar éste en **piruvato, indol** y **amonio**, por lo que reduce su propia síntesis; es decir, tenemos un **lazo de retroalimentación negativa**. Por otro lado, TnaB aumenta la concentración de Trp al importar el triptófano extracelular (**Trp_e**) al citoplasma, aumentando su propia síntesis, en otras palabras, hay un **lazo de retroalimentación positiva**. Sin embargo, ambas proteínas, al estar en un operón, afectan la síntesis de las dos por igual, así que se puede decir que ambos lazos de retroalimentación se encuentran *anidados*; esto será relevante durante el análisis del modelo del circuito de regulación.

El circuito de retroalimentación positiva vuelve al sistema **candidato a mostrar biestabilidad** (Thomas & Kaufman, 2001) y la presencia de los lazos de retroalimentación de signos opuestos ha sido observada en otros sistemas de regulación para el uso de una fuente alterna de carbono, como el operón de lactosa en *E. coli* (Ozbudak *et al.*, 2004) y la red de señalización de galactosa en levadura (Acar *et al.*, 2005).

II. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS & OBJETIVO

JUSTIFICACIÓN

La arquitectura de las redes de regulación ha probado ser fundamental para la adecuada expresión de los genes asociados a ésta y finalmente para el correcto funcionamiento del sistema y del organismo. Estas redes muchas veces suelen tornarse complejas y dar como resultado propiedades emergentes difíciles de intuir sin un análisis formal, como oscilaciones o biestabilidad.

En particular, la red de regulación del operón de triptofanasa en *Escherichia coli* se ha encontrado muy semejante a la del operón de lactosa en el mismo organismo e incluso a la red de señalización de galactosa en levadura (Ozbudak *et al.*, 2004; Acar *et al.*, 2005), sugiriendo que la arquitectura de la misma debe cumplir un papel esencial en el control del uso de fuentes alternas de carbono.

En lo que se refiere al lazo de retroalimentación positiva, éste ha sido probado teórica y experimentalmente como necesario para que un sistema muestre biestabilidad. Sin embargo se sabe que ésta no es característica suficiente para asegurar que así sea; lo cual deja una pregunta sin resolver, ¿qué otras propiedades del sistema son requeridas para dar origen a la biestabilidad? Por otro lado, el papel del lazo de retroalimentación negativa anidado al lazo de retroalimentación positiva ha sido poco explorado y su presencia recurrente sugiere que debe ser parte primordial del mecanismo de regulación del sistema.

HIPÓTESIS

Los lazos de retroalimentación, y la arquitectura del circuito de regulación en general, juegan un papel fundamental en la regulación de la utilización del triptófano como una fuente alterna de carbono: en particular, el lazo de retroalimentación positiva confiere al sistema la capacidad de mostrar biestabilidad para cierta concentración de glucosa y triptófano extracelular.

OBJETIVOS

Estudiar, mediante el modelado matemático, la dinámica del circuito de regulación del operón de triptofanasa en *Escherichia coli*. Esto para cumplir con los siguientes objetivos particulares:

1. Entender mejor el sistema de regulación y los mecanismos involucrados en éste.
2. Brindar nueva información acerca de la biestabilidad como mecanismo natural de regulación genética.
3. Dilucidar el papel del circuito de retroalimentación negativa en la regulación del sistema.

III. METODOLOGÍA & RESULTADOS

MODELO

Para construir el modelo nos basamos en \mathbb{B} supuestos generales fundamentados en la literatura:

1. La regulación del operón se da únicamente a nivel transcripcional mediante la represión catabólica y la inhibición de la terminación transcripcional dependiente de Rho (Yanofsky, 2007).
2. La concentración de la proteína Rho y CAP no son limitantes en las condiciones del experimento y permanecen contantes. No existe ningún mecanismo de regulación conocido entre el triptófano o los componentes del operón *tna* y la síntesis de éstas (Yanofsky, 2007).
3. La importación basal del triptófano a la célula (no dependiente de la permeasa TnaB) es a tasa constante y linealmente dependiente de la concentración de triptófano extracelular (Burrous & DeMoss, 1963).
4. La acción reversa de la triptofanasa se considera insignificante. Ésta sólo se da cuando existe una alta concentración de los sustratos, que involucran piruvato e indol (Watanabe & Snell, 1972). El indol se acumulará únicamente si el triptófano ha sido degradado por la triptofanasa, y la triptofanasa sólo estará activa en escasez de energía, por lo que habrá poco piruvato en la célula.
5. El experimento ocurre en condiciones aerobias y a pH neutro. Se sabe que en condiciones anaerobias, cuando *E. coli* usa TMAO como aceptor de electrones, la expresión del operón *tna* es inducida por el regulador TorR como mecanismo de prevención de alcalinización del medio (Bordi *et al.*, 2003). Igualmente, en cultivos aerobios a pH's básicos se induce fuertemente la expresión del operón (Stancik *et al.*, 2002).
6. No existe síntesis de triptófano en la célula mientras la dinámica del sistema es observada. Si la bacteria se ve en la necesidad de sintetizar su propio triptófano, un proceso costoso y altamente regulado (Yanofsky, 2007), es claro que éste se encontrará a bajas concentraciones y el operón de triptofanasa no estará activo.

La síntesis de ambos ARNm, al estar en un mismo operón, es idéntico y está definido por el número promedio de operones *tna* en la célula (O) y la tasa máxima de transcripción del promotor (k_M), que es re-escalada por la probabilidad de que el promotor se encuentre activo dada la concentración de glucosa extracelular ($P_A(G)$) y la probabilidad de que la transcripción no sea terminada prematuramente por Rho dada la concentración de triptófano intracelular ($P_T(W)$). La tasa de pérdida de los ARNm está dada tanto por la dilución, dada la tasa

de división celular, suponiendo difusión libre de los ARNm, y la degradación activa de éstos, la cual varía de un ARNm a otro (γ_{M_A} y γ_{M_B}).

La síntesis proteica queda determinada por la tasa de traducción (k) y la concentración de ARNm presente. En el caso de la triptofanasa, ésta es re-escalada por $\frac{1}{4}$ dado que la enzima es únicamente activa como homotetrámero (*El operón: Estructura & componentes*; pp. 19). La degradación de las proteínas se considera insignificante, dada la vida promedio de éstas y la tasa de crecimiento de *E. coli*, por lo que en ambas proteínas la pérdida se debe a la tasa dilución de las mismas ante la división celular (γ) y la concentración de éstas.

Finalmente, la concentración del triptófano intracelular varía según la actividad de la permeasa y la triptofanasa, además de la importación basal, el consumo para la síntesis proteica y la dilución del aminoácido. La acción de la permeasa es determinada por la tasa de importación del triptófano mediada por ésta (β) y la afinidad de la proteína por su sustrato (constante de Michaelis-Menten, K_B), así como la concentración del sustrato (W_E) y el número de permeasas activas (B). Análogamente para la triptofanasa, su actividad depende de una constante de catalización (α), la afinidad por el sustrato (K_A) y la concentración de sustrato (W) y enzima (A). Como se mencionó en los supuestos, la importación basal se da por una tasa constante (k_X) y la concentración de triptófano extracelular. El consumo de triptófano para la síntesis proteica se ha estimado como una función Michaelis-Menten creciente, con una velocidad máxima de consumo ρ y una constante K_W .

Así, el modelo propuesto del circuito de regulación del operón de triptofanasa en *Escherichia coli* consiste en cinco ecuaciones diferenciales que describen el cambio en el tiempo de la concentración del ARN mensajero del gen *tnaA* (M_A), del ARN mensajero del gen *tnaB* (M_B), de la triptofanasa TnaA (A), de la permeasa TnaB (B) y del triptófano libre en el espacio intracelular (W):

$$\dot{M}_A = Ok_M P_A(G) P_T(W) - \gamma_{M_A} M_A$$

$$\dot{M}_B = Ok_M P_A(G) P_T(W) - \gamma_{M_B} M_B$$

$$\dot{A} = \frac{1}{4} k M_A - \gamma A$$

$$\dot{B} = k M_B - \gamma B$$

$$\dot{W} = \beta B \frac{W_E}{W_E + K_B} + k_X W_E - \alpha A \frac{W}{W + K_A} - \rho \frac{W}{W + K_W} - \gamma W$$

Donde la concentración del triptófano extracelular (W_E) y de glucosa extracelular (G) son arbitrarias, fijadas por las condiciones del experimento, y se suponen constantes. La tasa de síntesis de ambos ARN mensajeros queda determinada por dos funciones de regulación que representan la represión catabólica e inhibición de la terminación transcripcional dependiente de Rho (*Mecanismos de regulación*; pp. 20):

$$P_A(G) = \alpha_A + (1 - \alpha_A) \frac{K_G^{n_A}}{K_G^{n_A} + G^{n_A}}$$

$$P_T(W) = \alpha_T + (1 - \alpha_T) \frac{W^{n_T}}{W^{n_T} + K_W^{n_T}}$$

Para ambas funciones $\alpha_{A/T}$ representa la actividad basal del operón, con saturación de glucosa y ausencia de triptófano, respectivamente; las constantes $K_{G/T}$ y $n_{A/T}$ representan la sensibilidad de la regulación a las concentraciones de glucosa y triptófano, respectivamente. $P_A(G)$ es una función decreciente con respecto a la glucosa, lo que implica que a mayor G menor síntesis de los genes estructurales; mientras que $P_T(W)$ es creciente, a mayor W mayor actividad del operón.

PARÁMETROS

| Parámetro | Valor | Metodología | Referencia |
|---------------|---|---|--|
| ρ | $0.004 \mu M$ | Con un operón (u operador) por genoma y tomando en cuenta que el promedio de genomas por célula en <i>E. coli</i> es 2. | Santillán & Zeron (2004) |
| k_M | 0.73627 seg^{-1} | Se sabe que la expresión del promotor <i>tet</i> es aproximadamente 30 veces menor que el del promotor <i>tna</i> sin represión catabólica (Gish & Yanofsky, 1993); por otro lado se sabe que la expresión del promotor <i>tet</i> es cerca del 28.88% de la expresión del promotor <i>trp</i> (Russel & Bennett, 1982), teniendo el promotor <i>trp</i> una tasa de transcripción alrededor de 5.1 min^{-1} (Santillán & Zeron, 2004). | Estimado. Usando datos de: Gish & Yanofsky (1993) Russel & Bennett (1982) Santillán & Zeron (2004) |
| γ_{MA} | 0.23105 min^{-1} $+ 0.03 \text{ min}^{-1}$ $= 0.00435 \text{ seg}^{-1}$ | La vida media promedio del ARNm de <i>tnaA</i> en <i>E. coli</i> se estima en 3 min . Así, la tasa de degradación es $\frac{\ln(2)}{3 \text{ min}} = 0.23105 \text{ min}^{-1}$ (Apéndice I). Por otro lado, el tiempo de duplicación celular en <i>E. coli</i> varía entre 24-50 minutos según las condiciones de crecimiento, por lo tanto la tasa de dilución está entre 0.01 y 0.03 min^{-1} . | Pastan & Perlman (1969) Bilezikian <i>et al.</i> (1967) Santillán & Zeron (2004) |

| | | | |
|---------------|---|---|--|
| γ_{MB} | 0.12404 min^{-1} $+ 0.03 \text{ min}^{-1}$ $= 0.15404 \text{ min}^{-1}$ | La proporción entre la tasa de degradación del ARNm de <i>tnaA</i> y el de <i>tnaB</i> es 0.54, por lo que la vida media promedio del ARNm de <i>tnaB</i> en <i>E. coli</i> se estima en 5.6 min y la correspondiente tasa de degradación en 0.12404 min^{-1} . La tasa de dilución es la misma para ambos ARNm. | Bernstein <i>et al.</i> 2002 Santillán & Zeron (2004) |
| k | 30 min^{-1} | Cálculo en TrpE; suponemos que no varía mucho de una proteína a otra en el mismo organismo. | Santillán & Zeron (2004) |
| γ | 0.03 min^{-1} | La tasa de dilución es la misma que para el ARNm (la degradación de las proteínas y del triptófano –independiente de la triptofanasa- se considera insignificante ante la tasa de dilución). | Santillán & Zeron (2004) |
| K_A | $K_A = 0.33 \text{ mM}$ | Medido en Snell (1975), Díaz <i>et al.</i> (2001) y otras referencias en BRENDA . | Snell (1975) Díaz <i>et al.</i> (2001) |
| α | $\alpha = 6 \text{ s}^{-1}$ | Medido en Phillips <i>et al.</i> (2002) | Phillips <i>et al.</i> (2002) |
| K_B | <i>Desconocido</i> | Existen algunos datos cinéticos (Burrous & De Moss, 1963), pero son inconsistentes, por lo que se consideran poco confiables. | --- |
| β | <i>Desconocido</i> | Existen algunos datos cinéticos (Burrous & De Moss, 1963), pero son inconsistentes, por lo que se consideran poco confiables. | --- |
| k_X | 0.07 min^{-1} | En una cepa carente de los genes <i>tnaA</i> y <i>tnaB</i> , con $W_e = 100 \mu\text{M}$, la acumulación intracelular de triptófano, incluyendo aquel incorporado a proteínas, es aproximadamente $W_{Total} = 233.33 \mu\text{M}$, independientemente de la previa inducción del sistema (Burrous & De Moss, 1963). Así, la tasa de importación basal es estimada, suponiendo la dinámica de la reacción como acción de masas. | Burrous & De Moss (1963) |
| K_ρ | $8.3 \mu\text{M}$ | Estimado en la literatura. | Hernández-Valdez <i>et al.</i> (2010) |
| ρ | $16.61 \mu\text{M} \cdot \text{s}^{-1}$ | Estimado en la literatura. | Hernández-Valdez <i>et al.</i> (2010) |
| α_A | 0.0046 | La síntesis basal del operón (independiente de CAP) es 0.46% de la expresión activada. | Stewart & Yanofsky (1985) |
| K_G | $7.6703 \mu\text{M}$ | Con datos experimentales obtenidos en Ozbudak <i>et al.</i> (2004) para el operón de lactosa, se puede ajustar la represión catabólica a una función tipo Hill. Se supone que los parámetros de ésta, K_G y n_A , vinculados a la interacción | Ozbudak <i>et al.</i> (2004) |

| | | | |
|------------|--------------------|--|------------------------------|
| | | entre la proteína CAP y cAMP, la afinidad de CAP activa por su operador, así como la cooperatividad entre de CAP activa y la polimerasa, no deben variar mucho entre estos dos operones (<i>Apéndice II</i>).* | |
| n_A | 1.0788 | * | Ozbudak <i>et al.</i> (2004) |
| α_T | 0.044 | En ausencia de triptófano o cualquier inductor artificial, <i>in vitro</i> la expresión del operón es 4.4% de la observada en completa inducción. | Gong & Yanofsky (2001) |
| K_W | <i>Desconocido</i> | --- | --- |
| n_T | <i>Desconocido</i> | --- | --- |

BIESTABILIDAD

Aproximación analítica

Para definir si el circuito de regulación del operón de triptofanasa muestra o no biestabilidad se requieren dos cosas: encontrar los estados estacionarios del sistema y determinar la estabilidad de los mismos. Tal como fue descrito previamente, un estado estacionario es aquél donde la concentración de los componentes ya no cambia en el tiempo ($M_A^*, M_B^*, A^*, B^*, W^*$), es decir, donde todas las ecuaciones diferenciales están igualadas a cero:

$$\dot{M}_A = 0 \Leftrightarrow M_A^* = \frac{1}{\gamma M_A} O k_M P_A(G) P_T(W^*)$$

$$\dot{M}_B = 0 \Leftrightarrow M_B^* = \frac{1}{\gamma M_B} O k_M P_A(G) P_T(W^*)$$

$$\dot{A} = 0 \Leftrightarrow A^* = \frac{1}{4\gamma} M_A^* = \frac{1}{4\gamma} \frac{1}{\gamma M_A} O k_M P_A(G) P_T(W^*)$$

$$\dot{B} = 0 \Leftrightarrow B^* = \frac{k}{\gamma} M_B^* = \frac{k}{\gamma} \frac{1}{\gamma M_B} O k_M P_A(G) P_T(W^*)$$

$$\dot{W} = 0 \Leftrightarrow 0 = \beta B^* \frac{W_E}{W_E + K_B} + k_X W_E - \alpha A^* \frac{W^*}{W^* + K_A} - \rho \frac{W^*}{W^* + K_W} - \gamma W^*$$

$$\Leftrightarrow f(W^*) = \beta \left(\frac{k}{\gamma \gamma M_B} O k_M P_A(G) P_T(W^*) \right) \frac{W_E}{W_E + K_B} + k_X W_E - \alpha \left(\frac{1}{4\gamma \gamma M_A} O k_M P_A(G) P_T(W^*) \right) \frac{W^*}{W^* + K_A} - \rho \frac{W^*}{W^* + K_W} - \gamma W^* = 0$$

En el estado estacionario, el modelo puede ser reducido a una única igualdad $f(W^*) = 0$ cuyas soluciones definirán las soluciones del sistema; sin embargo esta función no puede ser resuelta analíticamente, que en otras palabras significa que no podemos encontrar una expresión de los parámetros del modelo que prediga cual será el estado estacionario del sistema. Aún así, los estados estacionarios y su estabilidad pueden ser analizados de manera cualitativa.

La matriz de derivadas parciales de las funciones de cambio, conocida como Jacobiano, funciona como una aproximación lineal del efecto de la variación en la concentración de alguno de los componentes del sistema sobre la función de cambio de otro y, evaluada cerca de los estados estacionarios, nos dice como el sistema responderá a un pequeña perturbación en las concentraciones, es decir, si el estado estacionario es estable o inestable. El Jacobiano para nuestro sistema es:

$$J = \begin{pmatrix} \frac{\partial \dot{M}_A}{\partial M_A} & \frac{\partial \dot{M}_A}{\partial M_B} & \frac{\partial \dot{M}_A}{\partial A} & \frac{\partial \dot{M}_A}{\partial B} & \frac{\partial \dot{M}_A}{\partial W} \\ \frac{\partial \dot{M}_B}{\partial M_A} & \frac{\partial \dot{M}_B}{\partial M_B} & \frac{\partial \dot{M}_B}{\partial A} & \frac{\partial \dot{M}_B}{\partial B} & \frac{\partial \dot{M}_B}{\partial W} \\ \frac{\partial \dot{A}}{\partial M_A} & \frac{\partial \dot{A}}{\partial M_B} & \frac{\partial \dot{A}}{\partial A} & \frac{\partial \dot{A}}{\partial B} & \frac{\partial \dot{A}}{\partial W} \\ \frac{\partial \dot{B}}{\partial M_A} & \frac{\partial \dot{B}}{\partial M_B} & \frac{\partial \dot{B}}{\partial A} & \frac{\partial \dot{B}}{\partial B} & \frac{\partial \dot{B}}{\partial W} \\ \frac{\partial \dot{W}}{\partial M_A} & \frac{\partial \dot{W}}{\partial M_B} & \frac{\partial \dot{W}}{\partial A} & \frac{\partial \dot{W}}{\partial B} & \frac{\partial \dot{W}}{\partial W} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} -\gamma_{M_A} & 0 & 0 & 0 & \theta_M \\ 0 & -\gamma_{M_B} & 0 & 0 & \theta_M \\ \frac{1}{4}k & 0 & -\gamma & 0 & 0 \\ 0 & k & 0 & -\gamma & 0 \\ 0 & 0 & -\alpha \frac{W}{W+K_A} & \beta \frac{W_E}{W_E+K_B} & \theta_W \end{pmatrix}$$

$$\theta_M = Ok_M P_A(G)(1 - \alpha_T) \frac{n_T \cdot W^{n_T-1} \cdot K_W^{n_T}}{(W^{n_T} + K_W^{n_T})^2}$$

$$\theta_W = -\frac{\alpha K_A}{(W+K_A)^2} - \frac{\rho K_\rho}{(W+K_\rho)^2} - \gamma$$

El Jacobiano también puede ser interpretado gráficamente como la red de interacciones de los componentes del sistema (figura 9), donde cada elemento de la matriz $a_{ij} = \frac{\partial j}{\partial i} \neq 0$ implica que existe un efecto del elemento i sobre la función de cambio de j y se dibuja como una flecha de i a j , con punta si el efecto es positivo ($a_{ij} > 0$), trunca si es negativo ($a_{ij} < 0$). Decimos que el sistema no cambia de manera cualitativa si la red de interacciones derivada del Jacobiano se mantiene al variar la concentración de los componentes del sistema, es decir, que ningún elemento a_{ij} cambia de signo; así se pueden definir regiones en el espacio de variables donde el sistema se conserva cualitativamente. Si una propiedad es válida para una región del espacio de variables, lo será en particular para cualquier estado estacionario que caiga dentro de ella, lo que nos permite caracterizar cualitativamente al sistema.

En el Jacobiano de nuestro modelo hay únicamente cuatro elementos que dependen del valor de las variables:

$$\begin{aligned}
 a_{5,3} &= -\alpha \frac{W}{W+K_A} > 0 & \forall W > 0 \\
 a_{1,5} = a_{2,5} = \theta_M &= Ok_M P_A(G)(1 - \alpha_T) \frac{n_T \cdot W^{n_T-1} \cdot K_W^{n_T}}{(W^{n_T} + K_W^{n_T})^2} > 0 & \forall W > 0 \\
 a_{5,5} = \theta_W &= -\frac{\alpha K_A}{(W+K_A)^2} - \frac{\rho K_\rho}{(W+K_\rho)^2} - \gamma < 0 & \forall A > 0
 \end{aligned}$$

Todos ellos conservan su signo dentro del cuadrante positivo del espacio de variables, que es donde existe nuestro sistema, dado que las concentraciones no pueden tomar valores negativos. Por lo tanto, existe una única región cualitativa para este sistema, cuya red de interacciones se muestra en la figura 9.

Thomas & Kaufman (2001) prueban que la presencia de dos circuitos completos con signos opuestos en el Jacobiano es una condición necesaria, aunque no suficiente, para que el sistema sea capaz de mostrar biestabilidad. Un **circuito completo** es un subconjunto de la red de interacciones tal que cada componente tenga una y sólo una flecha que sale de él y una y sólo una que entra, es decir, un subconjunto de los elementos de la matriz del Jacobiano tal que no haya dos elementos en una misma columna ni en una misma fila (figura 10), y corresponden a su vez a los sumandos del determinante del Jacobiano, donde cada sumando es un circuito completo y cada factor del sumando un elemento a_{ij} en éste:

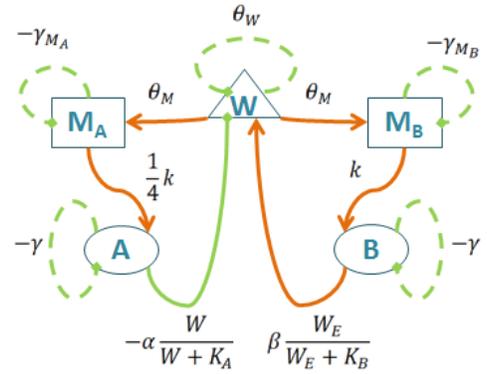


Figura 9 Representación gráfica del Jacobiano del modelo de la red de regulación del operón *tna* en *E. coli*. Las líneas muestran que existe un efecto del componente i sobre la función de cambio del componente j , con la magnitud relativa del efecto ($a_{ij} = \frac{\partial j}{\partial i}$) al lado; las flechas naranjas corresponden a interacciones positivas ($a_{ij} > 0$), las flechas verdes interacciones negativas ($a_{ij} < 0$).

$$\begin{aligned}
 \det|J| &= [(-\gamma_{MA}) \cdot (-\gamma_{MB}) \cdot (-\gamma) \cdot (-\gamma) \cdot (\theta_W)] \\
 &+ [(\theta_M) \left(\frac{1}{4}k\right) \left(-\alpha \frac{W}{W+K_A}\right) \cdot (-\gamma_{MB}) \cdot (-\gamma)] \\
 &+ [(-\gamma_{MA}) \cdot (-\gamma) \cdot (\theta_M)(k) \left(\beta \frac{W_E}{W_E+K_B}\right)]
 \end{aligned}$$

El signo de un circuito completo se determina por la paridad del número de circuitos de retroalimentación positivos (p) en él como $(-1)^{p+1}$; es decir, si p es par, el circuito completo será negativo; si p es impar, positivo (Kaufman *et al.*, 2007). En nuestro sistema tenemos dos circuitos completos negativos (figura 9-a y 9-b) y un circuito completo positivo (figura 9-c). Así que sin importar el valor preciso del estado estacionario, el

modelo de la red de regulación del operón de triptofanasa en *Escherichia coli* cumple los requerimientos propuestos por Thomas & Kaufman, confirmando al sistema como candidato a mostrar biestabilidad.

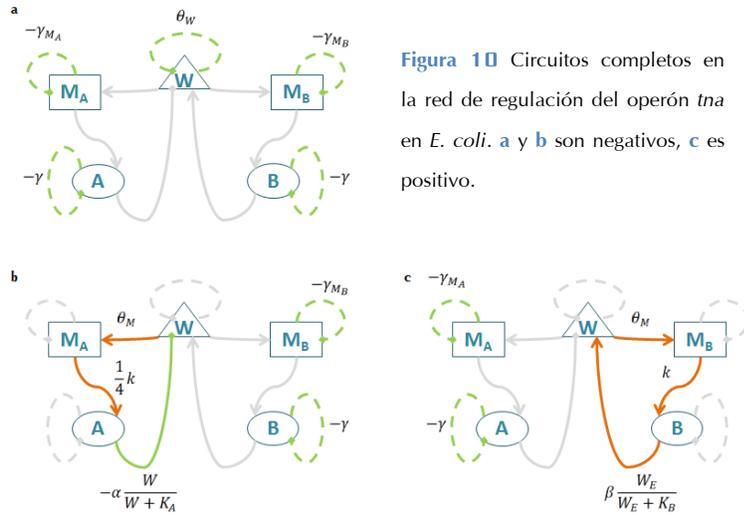


Figura 10 Circuitos completos en la red de regulación del operón *tna* en *E. coli*. **a** y **b** son negativos, **c** es positivo.

Exploración numérica

Para estudiar la relación entre el valor de los parámetros desconocidos (K_B, β, K_W, n_T) y la presencia de biestabilidad en el sistema realizamos una **exploración Monte Carlo** (Apéndice III), la cual consiste en el muestreo aleatorio del espacio de parámetros, donde cada punto es evaluado en búsqueda de los estados estacionarios del sistema. El rango de exploración es definido de manera arbitraria, con la única consideración de que se cubran los valores biológicamente factibles y nos permita una exploración relativamente amplia del espacio:

$$\begin{aligned}
 K_B &= [1, 1\,000] \mu M \\
 \beta &= [0, 10] s^{-1} \\
 K_W &= [1, 1\,000] \mu M \\
 n_T &= [0, 3]
 \end{aligned}$$

Los estados estacionarios, como se mencionó previamente, no pueden ser resueltos de manera analítica, por lo que tendrán que ser hallados de manera numérica (Apéndice III). Sin embargo, la búsqueda de los estados estacionarios no puede ser exhaustiva, por lo que ésta es limitada a los estados estacionarios con una concentración de triptófano igual o menor a 10 mM ; nuevamente, éste es un umbral arbitrario, pero incluye los valores biológicamente factibles.

Fijando la concentración de triptófano extracelular en $25\ \mu M$ y en ausencia de glucosa, con 910,274 iteraciones se encontraron 4,788 casos con biestabilidad, es decir, aproximadamente el 0.5% de los casos. La distribución de los valores de los parámetros que presentan biestabilidad se muestran en la figura 11. Los cuatro parámetros explorados, K_B, β, K_W, n_T , varían en un amplio rango en los distintos casos con biestabilidad, aunque aparecen un par de notorias restricciones sobre los valores que pueden tomar los

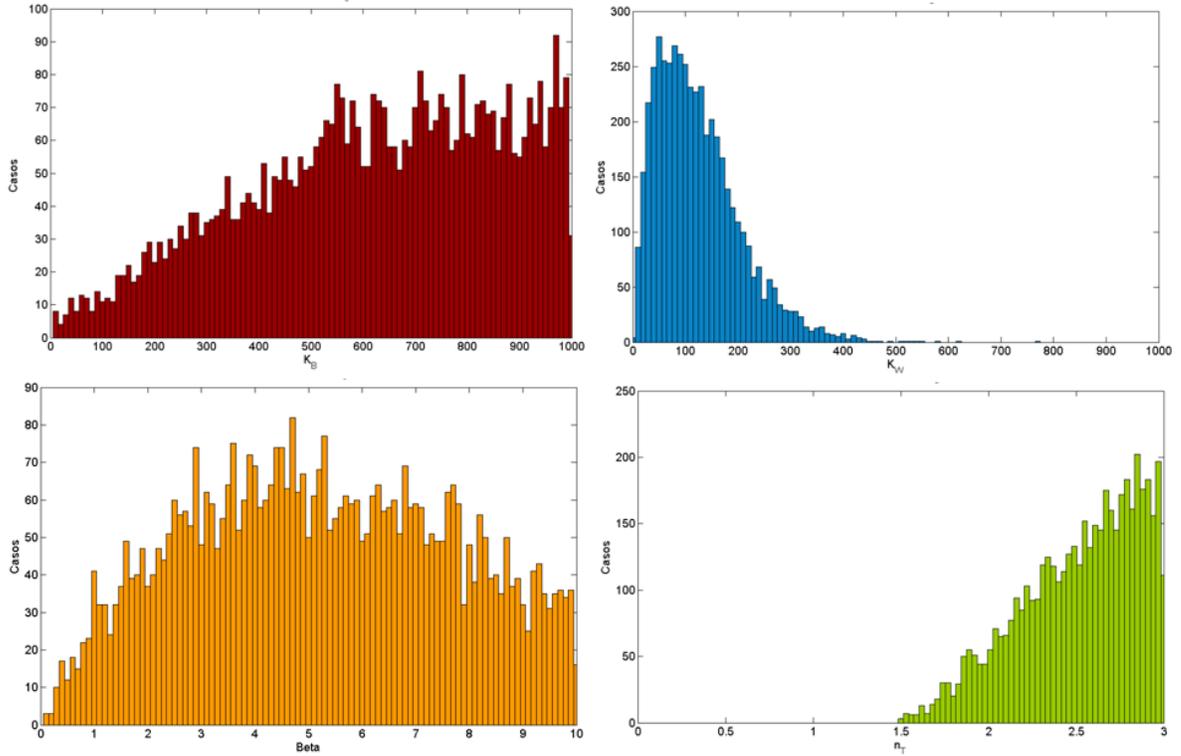


Figura 11 Histograma de la distribución de valores de los cuatro parámetros desconocidos (K_B, β, K_W, n_T) en los casos con biestabilidad. Con $W_E = 25\mu M$, $G = 0$ y 910,274 iteraciones.

parámetros vinculados con la función de regulación dependiente del triptófano, K_W y n_T . La constante de Michael-Menten, K_W , muestra una clara tendencia hacia valores bajos, lo que implica una mayor sensibilidad a cambios en la concentración de triptófano intracelular; y tener cooperatividad positiva en esta función, $n_T > 1$, es estrictamente necesario para que el sistema muestre biestabilidad, lo cual es congruente con otros estudios que han demostrado que la presencia de cooperatividad en la inducción de un sistema (además del circuito de regulación positiva) aumenta considerablemente el potencial de biestabilidad del mismo (Lou *et al*, 2010). No se encontró ninguna correlación evidente entre el valor de un parámetro con respecto a otro en los casos con biestabilidad (figura 12), lo que deja una pregunta abierta: si no es precisamente el valor de los parámetros lo que restringe la biestabilidad del sistema, qué es.

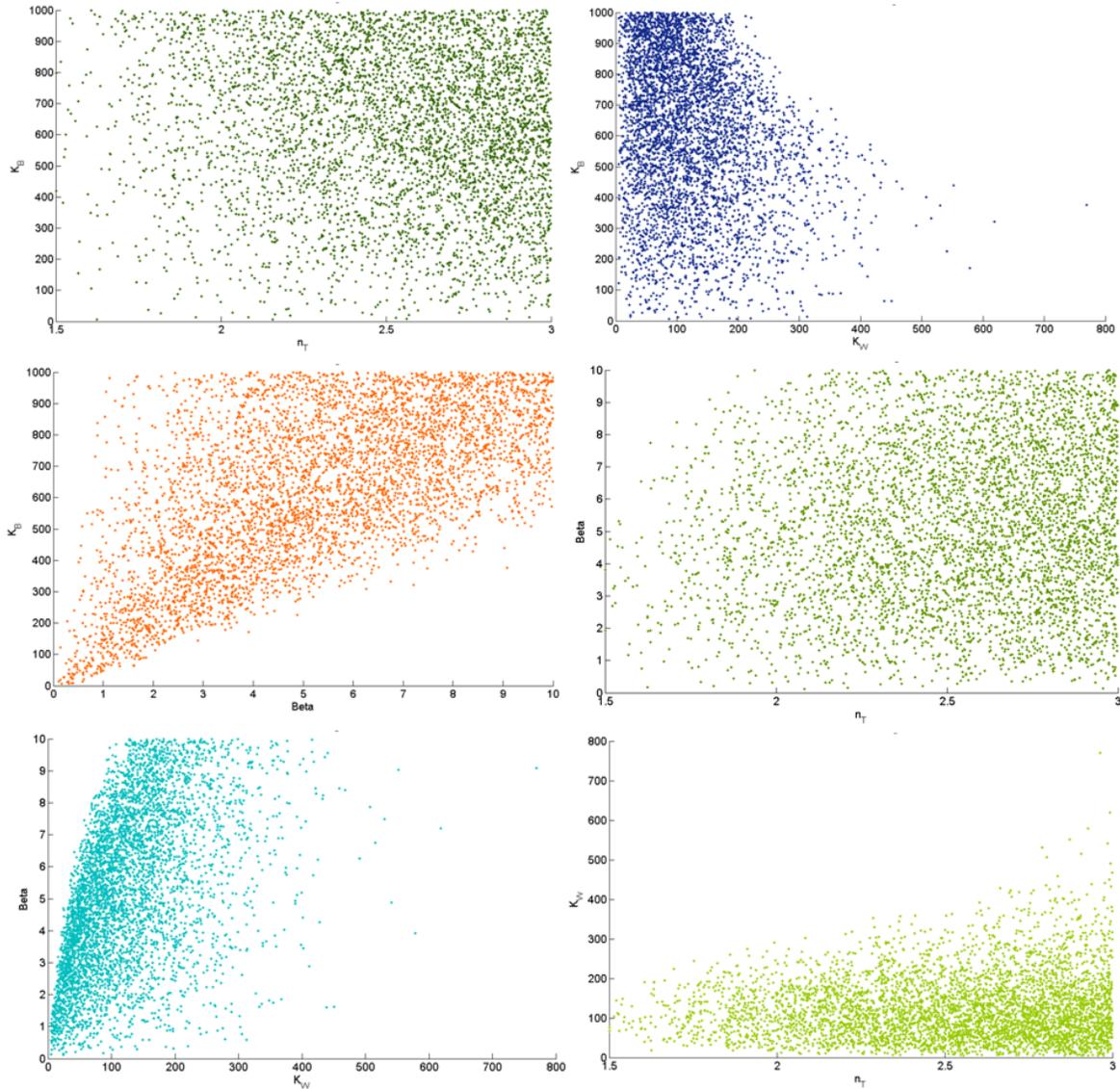


Figura 12 Relación entre el valor de los parámetros escaneados, K_B, β, K_W, n_T , en los casos con biestabilidad. Con $W_E = 25\mu M$, $G = 0$ y 910,274 iteraciones.

Pesos: Retroalimentación positiva vs. Retroalimentación negativa

Acar *et al.* (2005) proponen que en el caso de la red de regulación de galactosa en levadura, el circuito de retroalimentación negativa está compitiendo con uno de los lazos de retroalimentación positiva disminuyendo así la capacidad de memoria del sistema, vinculada con la biestabilidad del mismo. Es por ello que nosotros decidimos evaluar la relación entre ambos circuitos de retroalimentación en la red de regulación del operón *tna* en los casos con y sin biestabilidad.

Para comparar ambos circuitos entre sí y con respecto a distintos casos es necesario asignarle un valor a los mismos. Cinquin & Demongeot (2002) sugieren utilizar el peso de los circuitos de retroalimentación como una medida cuantitativa de los mismos. El **peso de un circuito** se define como el producto del peso de las interacciones de sus componentes, donde el peso de una interacción es justamente el componente del Jacobiano asociado a ella:

$$C = \prod_{i,j} a_{ij} = \prod_{i,j} \frac{\partial j}{\partial i} \quad \forall i, j \in \text{circuito}$$

Para nuestro modelo, el peso del **circuito positivo** es:

$$C_{Pos} = Ok_M P_A(G)(1 - \alpha_T) \frac{n_T \cdot W^{n_T-1} \cdot K_W^{n_T}}{(W^{n_T} + K_W^{n_T})^2} \cdot k \cdot \beta \frac{W_E}{W_E + K_B}$$

y del **circuito negativo**:

$$C_{Neg} = Ok_M P_A(G)(1 - \alpha_T) \frac{n_T \cdot W^{n_T-1} \cdot K_W^{n_T}}{(W^{n_T} + K_W^{n_T})^2} \cdot \frac{1}{4} k \cdot -\alpha \frac{W}{W + K_A}$$

Ambos tienen en común el primer factor, θ_M , ya que el efecto del triptófano sobre la concentración de los ARNm es el mismo para ambos genes; sólo el circuito positivo depende de manera directa del triptófano extracelular; y se espera que el circuito negativo sea más sensible a la concentración de triptófano intracelular, dado el factor $\frac{W}{W + K_A}$ (figura 13).

La pregunta que queremos responder es si la presencia de biestabilidad en el sistema impone una restricción sobre el valor de los pesos de ambos circuitos o sobre la relación entre ellos. Usando 10,890 casos de la exploración numérica previa ($W_E = 25 \mu M$, $G = 0 \mu M$, y los rangos de exploración definidos en la página 34), se calculó el peso de los circuitos positivo y negativo con respecto a la concentración de triptófano entre 0 y 10,000 μM , a intervalos de 5 μM . La figura 14 muestra el valor promedio de los pesos con respecto a la concentración de triptófano para el total de casos y el promedio de los casos con biestabilidad (56 casos), así como el coeficiente de variación de los pesos entre los distintos casos.

Las curvas promedio del peso de los circuitos de retroalimentación en los casos con biestabilidad claramente difieren de manera cualitativa con respecto al total de casos. Los pesos con biestabilidad se caracterizan por

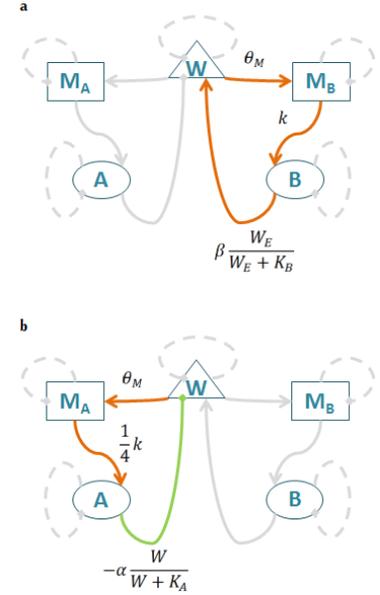


Figura 13 a Circuito de retroalimentación positiva y el peso de las interacciones de sus componentes. b Circuito de retroalimentación negativa y el peso de las interacciones de sus componentes.

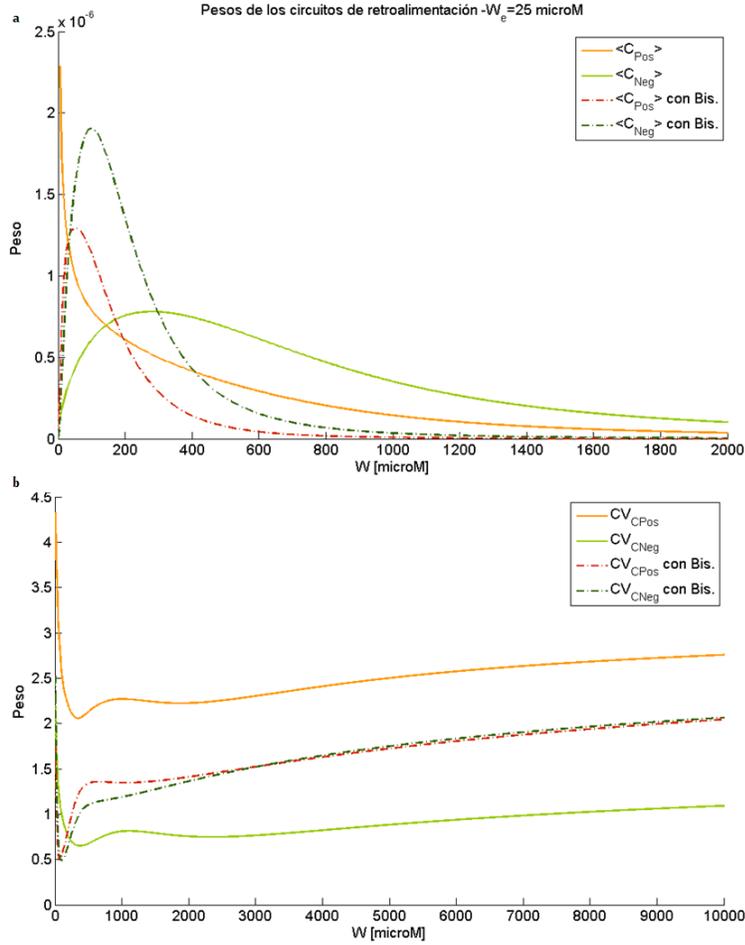


Figura 14 a Peso promedio de los circuitos de retroalimentación positiva (C_{Pos}) y negativa (C_{Neg}) en la red de regulación del operón *tna* en *E. coli* con respecto a la concentración de triptófano intracelular (con una resolución de $5 \mu M$). **b** Coeficiente de variación (desviación estándar sobre el promedio, $\sigma/\langle x \rangle$) de los distintos casos. Las líneas continuas corresponden al promedio de los 10,890 casos analizados; las líneas discontinuas al promedio de sólo aquellos con biestabilidad (561 casos). Los casos son tomados de la exploración Monte Carlo descrita en pp.34-35.

una respuesta rápida pero transitoria al incremento de la concentración de triptófano (figura 14-a) y el peso del circuito negativo parece ser siempre mayor que el del circuito positivo. El coeficiente de variación (CV), que se define como la desviación estándar sobre el promedio y sirve como una medida normalizada de la variación dentro de un grupo, con respecto a la concentración de triptófano muestra que la respuesta inicial observada en el promedio de los pesos con biestabilidad está bastante conservada dentro de los casos analizados (figura 14-b).

El conjunto total analizado incluye tanto casos con cooperatividad positiva ($n_T > 1$), como casos con cooperatividad negativa ($n_T < 1$). En los casos con cooperatividad negativa, el peso del circuito positivo tiende a infinito conforme la

concentración de triptófano tiende a cero, mientras que con cooperatividad positiva el peso decae junto con la concentración de triptófano:

Si $0 < n_T < 1$, entonces $n_T - 1 < 0$ y

$$\lim_{W \rightarrow 0} C_{Pos} = Ok_M P_A(G)(1 - \alpha_T) n_T K_W^{n_T} k \cdot \beta \frac{W_E}{W_E + K_B} \cdot \lim_{W \rightarrow 0} \left(\frac{1}{W^{1-n_T} (W^{n_T} + K_W^{n_T})^2} \right) = \infty$$

Si $n_T > 1$, entonces $n_T - 1 > 0$ y

$$\lim_{W \rightarrow 0} C_{Pos} = Ok_M P_A(G)(1 - \alpha_T) n_T K_W^{n_T} k \cdot \beta \frac{W_E}{W_E + K_B} \cdot \lim_{W \rightarrow 0} \left(\frac{W^{n_T-1}}{(W^{n_T} + K_W^{n_T})^2} \right) = 0$$

Esto genera dos comportamientos completamente distintos del peso del circuito positivo a bajas concentraciones de triptófano. Para estar seguros que la diferencia cualitativa observada en los casos con biestabilidad no se debe únicamente a que en éstos la cooperatividad es siempre positiva, calculamos los pesos promedio separando el total de casos en dos grupos, dependiendo de su cooperatividad (figura 15); nuevamente, el promedio de los pesos con biestabilidad es diferente del total de casos.

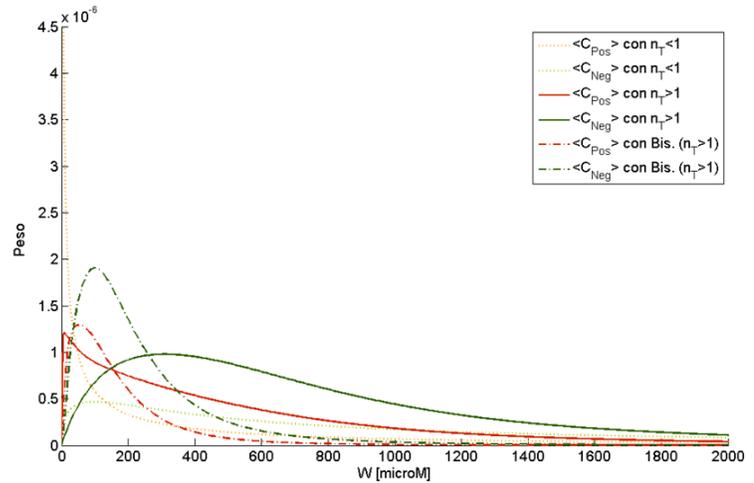


Figura 15 Peso promedio de los circuitos de retroalimentación positiva (C_{Pos}) y negativa (C_{Neg}) en la red de regulación del operón *tna* en *E. coli* con respecto a la concentración de triptófano intracelular (con una resolución de $5 \mu M$) agrupados según su cooperatividad. Las líneas punteadas corresponden al promedio del total de casos con cooperatividad negativa y las líneas continuas al de aquellos con cooperatividad positiva; las líneas discontinuas muestran nuevamente el promedio de aquellos con biestabilidad. Los casos son tomados de la exploración Monte Carlo descrita en pp.34-35.

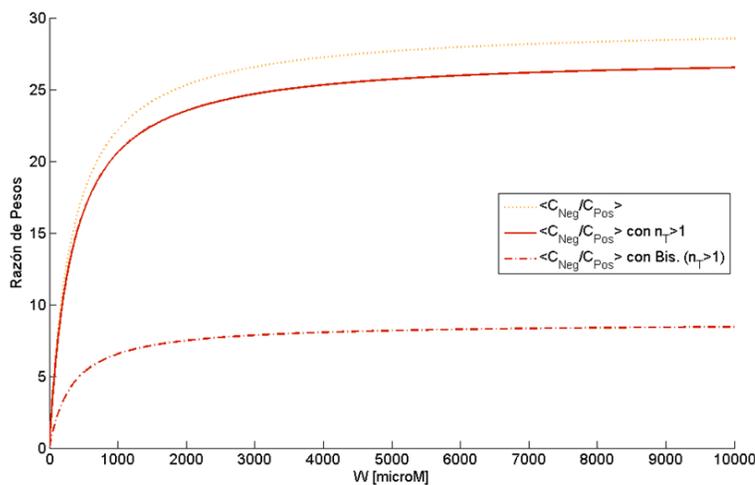


Figura 16 Promedio de la razón del peso del circuito negativo (C_{Neg}) sobre el peso del circuito positivo (C_{Pos}) en la red de regulación del operón *tna* en *E. coli* con respecto a la concentración de triptófano intracelular. La línea punteada corresponde al promedio del total de casos y la línea continua únicamente al de aquellos con cooperatividad positiva; la línea discontinua muestra el promedio de aquellos casos con biestabilidad. Los casos son tomados de la exploración Monte Carlo descrita en pp.34-35.

La razón del peso del circuito negativo sobre el peso del circuito positivo también parece comportarse diferencialmente entre estos grupos (figura 16). En todos los promedios evaluados, el peso del circuito negativo es mayor que el peso del circuito positivo ($\langle C_{Neg}/C_{Pos} \rangle > 1$); sin embargo, aunque esta razón es mucho mayor en promedio para el total de casos con cooperatividad positiva en comparación con los casos con biestabilidad, también el coeficiente de variación es mayor para el primer grupo, con un valor

de 7.6585, mientras que en el grupo biestable es de únicamente 0.4670 (ambos CV constantes para cualquiera de las concentraciones de triptófano evaluadas). Esto implica que aunque en la mayoría de los casos C_{Neg} será mayor que C_{Pos} , esta razón tomará valores muy dispersos en el espacio de parámetros y puede haber varios casos en los que incluso el peso del circuito positivo sea mayor que el del negativo; por otro lado, el promedio de la razón para los casos con biestabilidad es mucho más representativo del grupo, dado que con un coeficiente de variación tan bajo esperamos que la mayoría de los casos del grupo se encuentren cerca de la curva promedio.

Para tener una imagen más amplia del comportamiento de los pesos caso por caso, observamos el valor máximo que toma cada uno de ellos en el espectro evaluado y la concentración de triptófano a la que este máximo aparece (figura 17-a y 17-b). Estos dos parámetros nos describen de manera general dos características fundamentales de los circuitos de retroalimentación; el peso máximo alcanzado nos habla de la magnitud relativa del efecto del lazo de retroalimentación sobre el sistema, mientras que la concentración de triptófano para alcanzar este máximo nos da información sobre la sensibilidad del circuito con respecto a W . Tanto el máximo del peso del circuito positivo como el del negativo en los casos de biestabilidad tienden a ser altos y a aparecer a bajas concentraciones de triptófano, sin embargo aparecen muchos otros casos con características similares que no presentan biestabilidad.

Comparando el peso máximo entre ambos circuitos (figura 17-c) corroboramos que aunque en la mayoría de los casos el peso máximo negativo es mayor que el peso máximo positivo, existen varios casos en los que el peso máximo positivo es mayor. Por otro lado, los casos con biestabilidad muestran siempre un peso máximo negativo mayor o, en su defecto, el peso máximo del circuito positivo extremadamente grande junto con el peso máximo negativo cerca del mayor valor observado; y, cuando el peso máximo negativo no ha alcanzado su aparente punto de saturación, la razón entre pesos máximos muestra una proporción prácticamente constante, congruente con lo observado en la gráfica de la figura 16.

En conjunto, los datos muestran que la biestabilidad pone una restricción sobre el valor de los pesos de los circuitos de retroalimentación y, en particular, sobre la relación entre ellos, tal como se esperarí al ser los circuitos completos asociados indispensables para la misma. Sin embargo, de manera contra-intuitiva, el circuito de retroalimentación negativa es quien debe ser más fuerte para favorecer la presencia de biestabilidad.

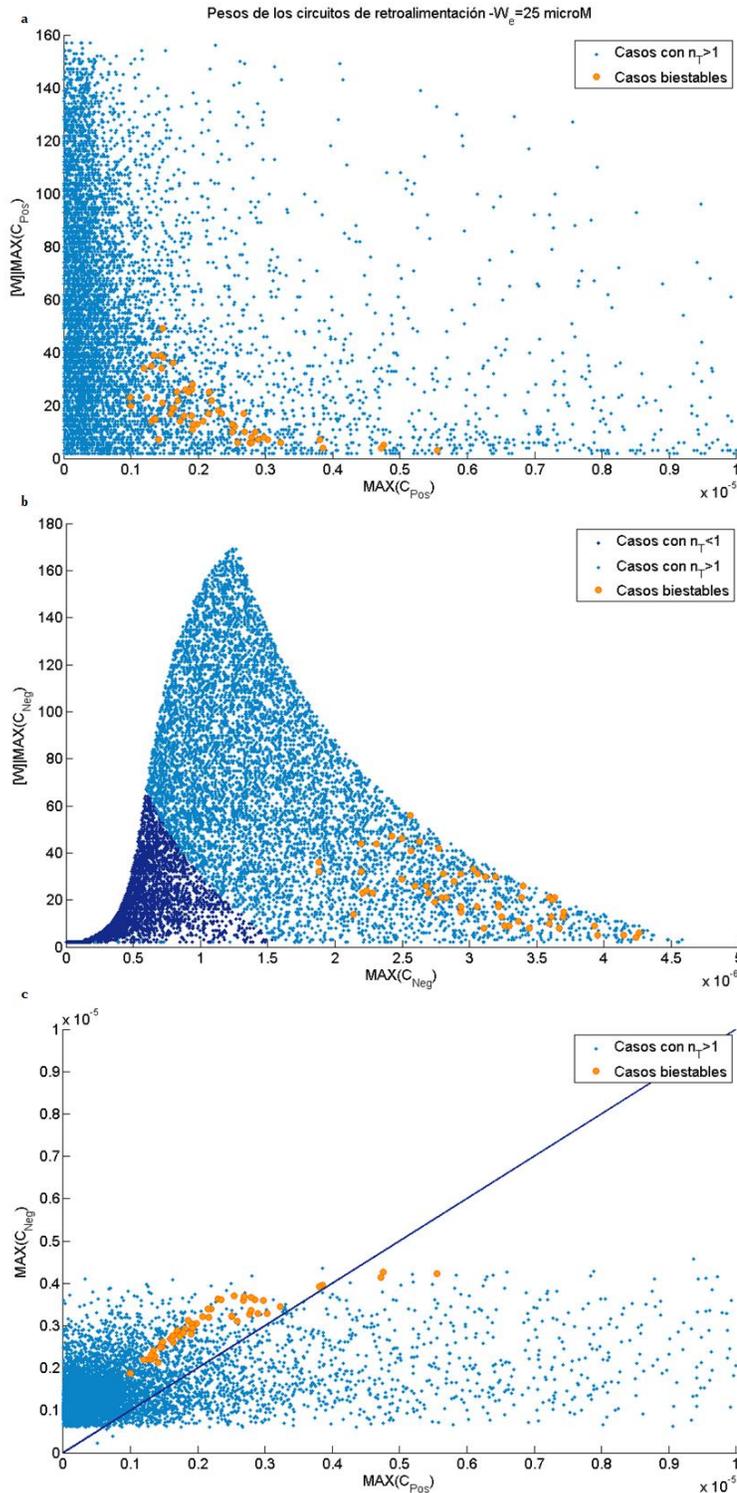


Figura 17 **a** Valor máximo del peso del circuito de retroalimentación positiva con respecto a la concentración de triptófano a la que este máximo aparece. Los puntos azules muestran los valores para los casos con cooperatividad positiva analizados; los puntos anaranjados muestran los casos con biestabilidad. Algunos puntos con valores extremos de C_{Pos} son omitidos en la gráfica. **b**. Valor máximo del peso del circuito de retroalimentación negativa con respecto a la concentración de triptófano a la que este máximo aparece. Los puntos azules muestran los valores para los casos con cooperatividad positiva analizados y los puntos azul marino para aquellos con cooperatividad negativa; los puntos anaranjados muestran los casos con biestabilidad. **c**. El valor máximo del peso del circuito de retroalimentación positiva contra el valor máximo del peso del circuito de retroalimentación negativa. Los puntos azules muestran los valores para los casos con cooperatividad positiva analizados; los puntos anaranjados muestran los casos con biestabilidad. Se muestra la línea de pendiente uno como referencia; los valores por encima de ésta tienen el máximo valor de C_{Neg} mayor al máximo de C_{Pos} , y viceversa para los puntos debajo de ella. Algunos puntos con valores extremos de C_{Pos} son omitidos en la gráfica. (Mismos datos que los usados en la figura 15).

Sin retroalimentación negativa

La retroalimentación positiva en este sistema es suficiente para volver a la red de regulación candidata a mostrar biestabilidad, ya que presenta dos circuitos completos negativos y sólo uno de ellos es dependiente del lazo de retroalimentación negativa (*Aproximación Analítica*, pp. 31), sin embargo el análisis previo muestra que el peso de la retroalimentación negativa no sólo está limitado a un valor máximo dado el peso de la retroalimentación positiva, sino que la proporción debe mantenerse entre estos dos pesos para mostrar biestabilidad (figura 17-c). Para analizar si el sistema puede presentar biestabilidad sin el lazo de retroalimentación negativa, así como los cambios en las distribuciones de los parámetros desconocidos y los pesos de los circuitos, repetimos la exploración Monte Carlo, pero simulando una cepa carente del gen de la triptofanasa (*Apéndice III*).

Fijando la concentración de triptófano extracelular en $25 \mu M$ y en ausencia de glucosa, usando los mismos rangos de exploración que en la simulación previa (*Exploración numérica*, pp. 34), con 100,000 iteraciones se encontraron 461 casos con biestabilidad, es decir, aproximadamente 0.46% del total de casos y 65 casos menos de los esperados en el sistema original (alrededor del 88% de lo esperado con retroalimentación

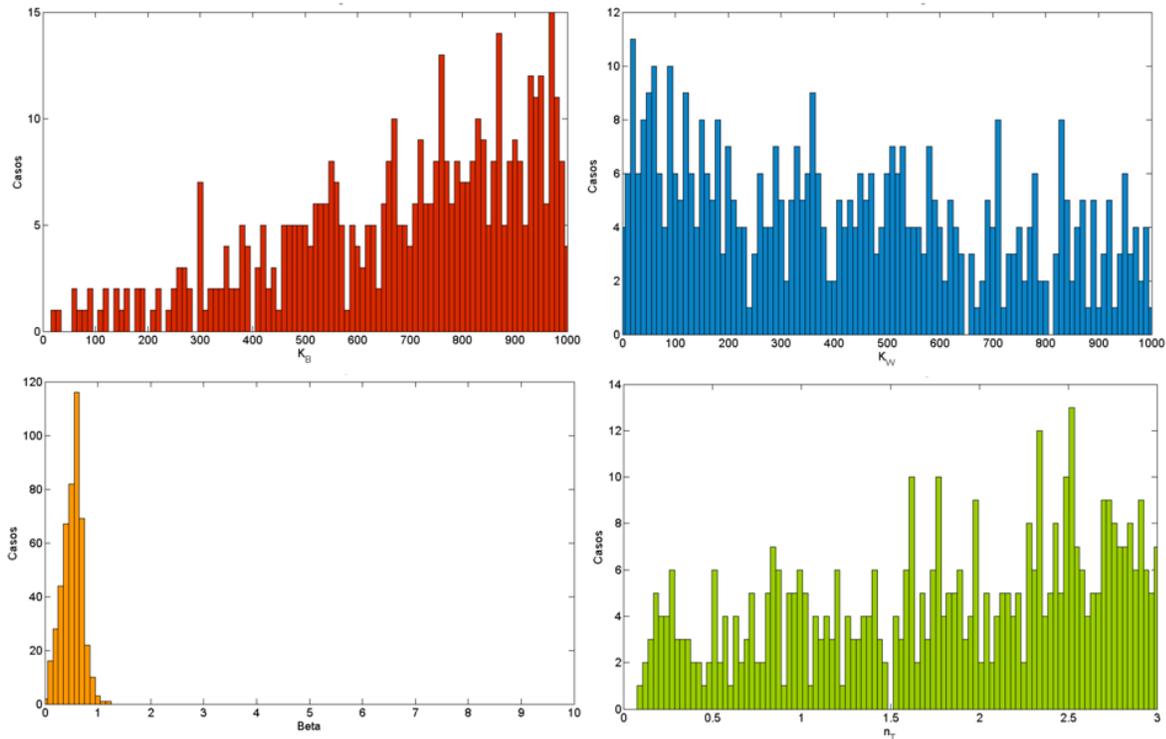


Figura 18 Histograma de la distribución de valores de los cuatro parámetros desconocidos (K_B, β, K_W, n_T) en los casos con biestabilidad para el sistema sin retroalimentación negativa ($\Delta tnaA$). Con $W_E = 25 \mu M$, $G = 0$ y 100,000 iteraciones.

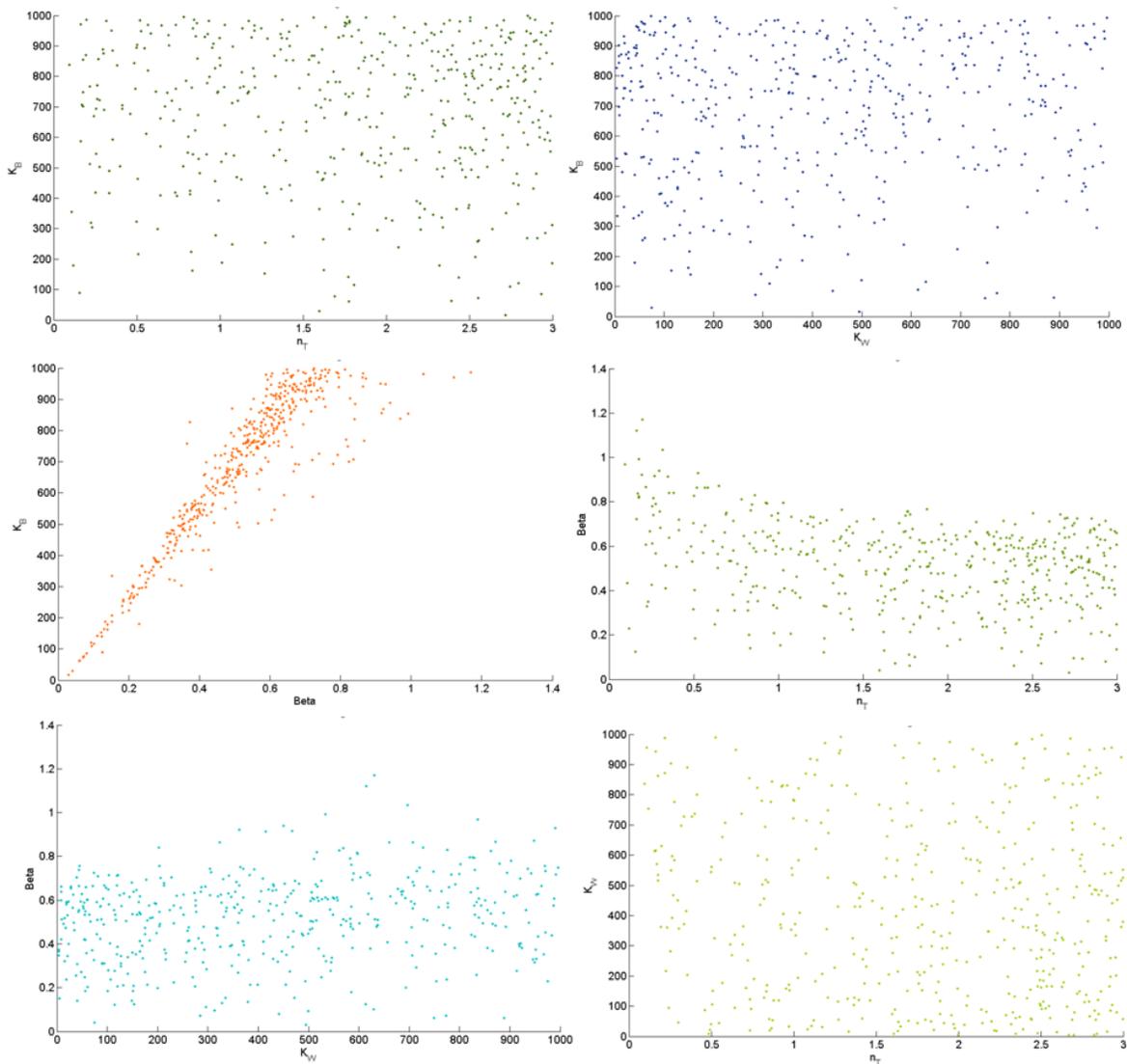
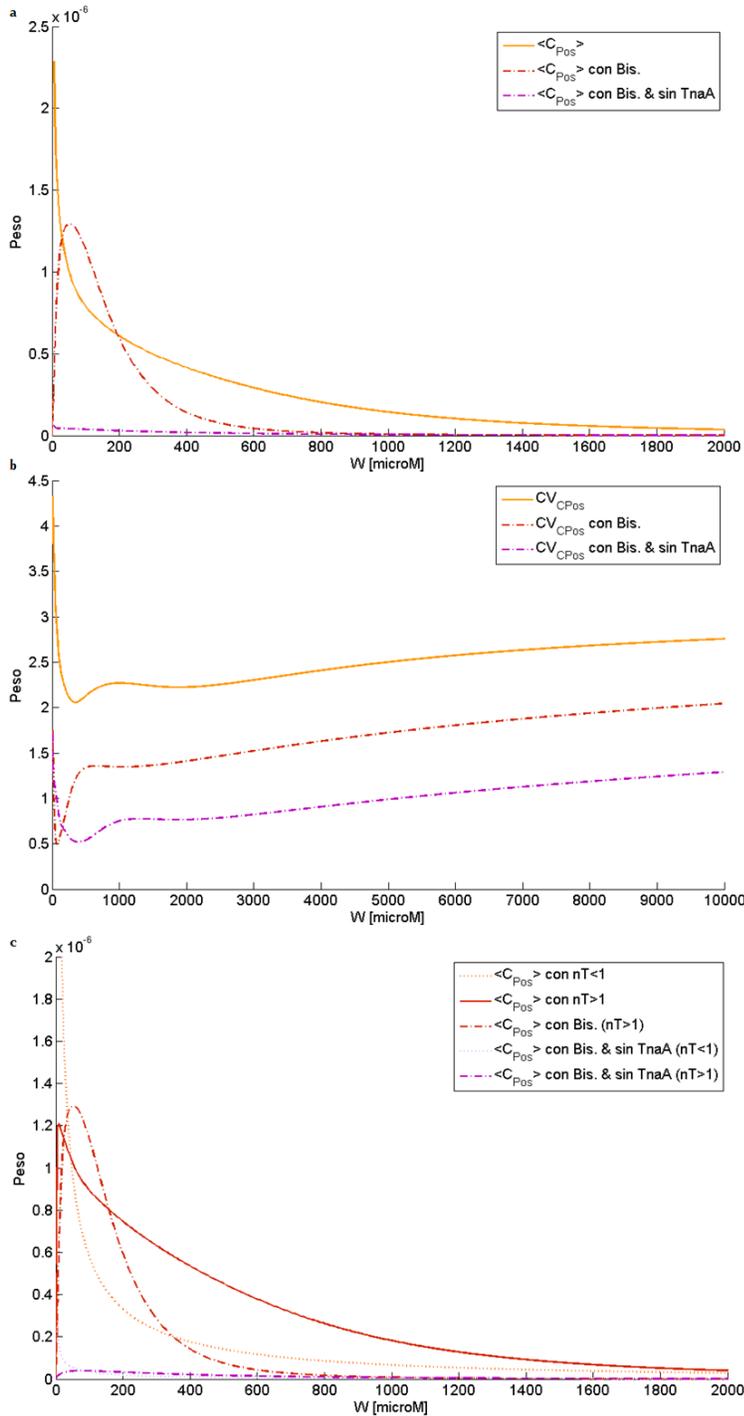


Figura 19 Relación entre el valor de los parámetros escaneados, K_B, β, K_W, n_T , en los casos con biestabilidad para el sistema sin retroalimentación negativa ($\Delta tnaA$). Con $W_E = 25\mu M$, $G = 0$ y 100,000 iteraciones.

negativa). La distribución de los valores de los parámetros desconocidos que presentan biestabilidad cambia claramente con respecto al sistema original (figura 18; figura 11). La distribución de valores del parámetro β en los casos con biestabilidad se vuelve drásticamente más angosta en el sistema mutado, lo cual se explica por una mayor sensibilidad del sistema a bajas concentraciones de triptófano extracelular (Apéndice IV) al perder el consumo de la triptofanasa. Por otro lado, las restricciones sobre los parámetros vinculados con la función de regulación dependiente del triptófano, K_W y n_T , en los casos con biestabilidad desaparecen por completo, tomando éstos valores a lo largo de todo el rango explorado sin ninguna tendencia aparente; en

particular, la cooperatividad positiva en la función de inducción deja de ser necesaria para que el sistema muestre biestabilidad. Nuevamente, no se encontró ninguna correlación evidente entre el valor de un parámetro con respecto a otro en los casos con biestabilidad más allá de las mismas restricciones impuestas por los histogramas (figura 19).



El peso del circuito de retroalimentación positiva también cambia visiblemente entre los casos con biestabilidad en el sistema original y en el sistema mutado (figura 20). El

Figura 20 a Peso promedio de los circuitos de retroalimentación positiva (C_{Pos}) en la red de regulación del operón *tna* en *E. coli* con respecto a la concentración de triptófano intracelular.

b Coeficiente de variación de los distintos casos. La línea continua anaranjada corresponde al promedio de los 10,890 casos analizados; la línea discontinua roja al promedio de aquellos con biestabilidad en el sistema original (56 casos) y la línea discontinua violeta al promedio de los casos con biestabilidad en el sistema mutado ($\Delta tnaA$; 56 casos). **c** Peso promedio de los circuitos de retroalimentación positiva (C_{Pos}) agrupados según su cooperatividad. La línea punteada anaranjada corresponde al promedio del total de casos con cooperatividad negativa; la línea continua roja a los de cooperatividad positiva; la línea roja discontinua es para los casos con biestabilidad en el sistema original; las línea punteada lila es para los casos con biestabilidad en el sistema mutado y con cooperatividad negativa; igualmente, la línea discontinua violeta, pero con cooperatividad positiva. Los casos son tomados de la exploración Monte Carlo descrita en pp.34-35.

comportamiento de la curva, cualitativamente hablando, es de hecho bastante similar para el peso promedio del circuito positivo en los casos con biestabilidad para ambos sistemas; sin embargo, el peso que puede alcanzar el circuito positivo es notoriamente bajo en los casos con biestabilidad en el sistema que carece de la triptofanasa. Nuevamente el coeficiente de variación nos muestra que la respuesta inicial en ambos casos está conservada, y en general el CV es menor para los casos con biestabilidad del sistema mutado (figura 20-b).

La gráfica 21 muestra el valor máximo que toma el peso del circuito de retroalimentación positiva en el espectro evaluado y la concentración de triptófano a la que este máximo aparece, resaltando los casos que muestran biestabilidad tanto en el sistema original como en el sistema sin triptofanasa (figura 21). Aquí se

confirma que el peso máximo del circuito de retroalimentación positiva en el sistema mutado es estrictamente bajo para poder mostrar biestabilidad; también observamos que la tendencia de los pesos máximos a aparecer a bajas concentraciones de triptófano en los casos con biestabilidad se relaja considerablemente para el sistema mutado, apareciendo casos biestables casi a todo lo largo del espectro observado para el total de casos con cooperatividad positiva.

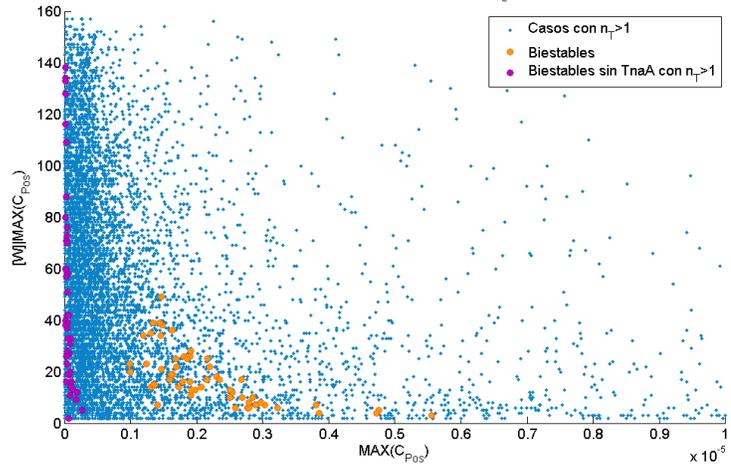


Figura 21 Valor máximo del peso del circuito de retroalimentación positiva con respecto a la concentración de triptófano a la que este máximo aparece. Los puntos azules muestran los valores para los casos con cooperatividad positiva analizados; los puntos anaranjados muestran los casos con biestabilidad en el sistema original; y los puntos violetas los casos con biestabilidad en el sistema $\Delta tnaA$. Algunos puntos con valores extremos de C_{Pos} son omitidos en la gráfica. (Mismos datos que los usados en la figura 20).

Estados estacionarios

Especulamos que la localización de los máximos de los pesos de los circuitos de retroalimentación debería verse reflejada en la concentración de triptófano acumulado en los estados estacionarios. Para analizar esta hipótesis comparamos ambos sistemas con y sin biestabilidad.

En el caso del sistema original, los estados estacionarios aparecen a lo largo de todo el rango explorado, aunque existe una mayor tendencia a concentraciones bajas de triptófano acumulado (figura 22-a y figura 27).

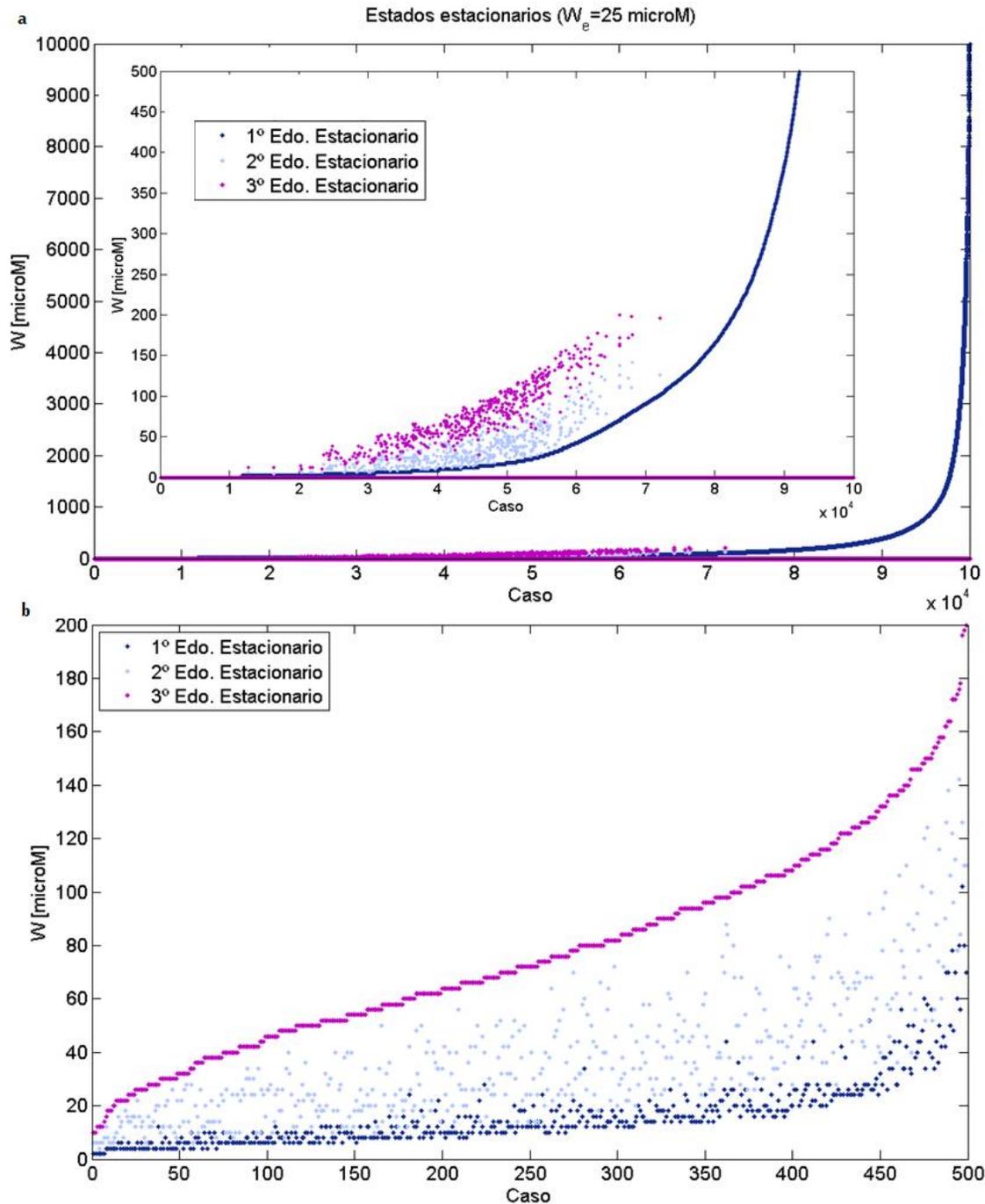


Figura 22 a Concentración de triptófano acumulada en los estados estacionarios de 100,000 casos analizados del sistema original; los casos están ordenados de manera ascendente según el valor del primer estado estacionario (estado no inducido). Dentro se muestra un acercamiento de la gráfica. **b** Concentración de triptófano acumulada en los estados estacionarios de 499 casos del sistema original con biestabilidad; los casos están ordenados de manera ascendente según el valor del tercer estado estacionario (estado inducido).

En particular, los casos con biestabilidad quedan restringidos a concentraciones bajas de triptófano acumulado, con todos los estados estacionarios con una concentración menor o igual a $200 \mu\text{M}$, muy por debajo del límite

arbitrario impuesto a la búsqueda ($10mM$), por lo que ésta en realidad no afecta los resultados. Los estados no inducidos aparecen en un amplio rango de valores también, entre $2\mu M$ y $102\mu M$; y la diferencia entre el estado no inducido y el inducido varía entre $8\mu M$ y $130\mu M$ (figura 22-b).

La gráfica siguiente (figura 23) muestra la relación entre la concentración de triptófano acumulada en el estado inducido y en el estado no inducido para los casos con biestabilidad en el sistema original. El coeficiente de correlación, es decir, la covarianza normalizada de ambos estados estacionarios es de 0.8422 , con un p -value del orden de 10^{-165} , lo cual nos dice que la probabilidad de obtener este coeficiente al azar, sin que los datos estén correlacionados, es casi nula. Aquí se observa que el valor de la concentración de triptófano en el primer estado estacionario fuerza al tercer estado estacionario a tomar valores más altos que aquellos impuestos por la simple definición de éstos: ya que los estados estacionarios son clasificados según su valor, de menor a mayor, el estado inducido es siempre mayor o igual al estado no inducido, pero si ajustamos los datos de la gráfica a una ecuación lineal, la pendiente es aproximadamente 2.45 y la ordenada al origen 36.54 ($R^2 = 0.7787$); esto no quiere decir que la relación entre ambos valores sea lineal, pero si nos dice

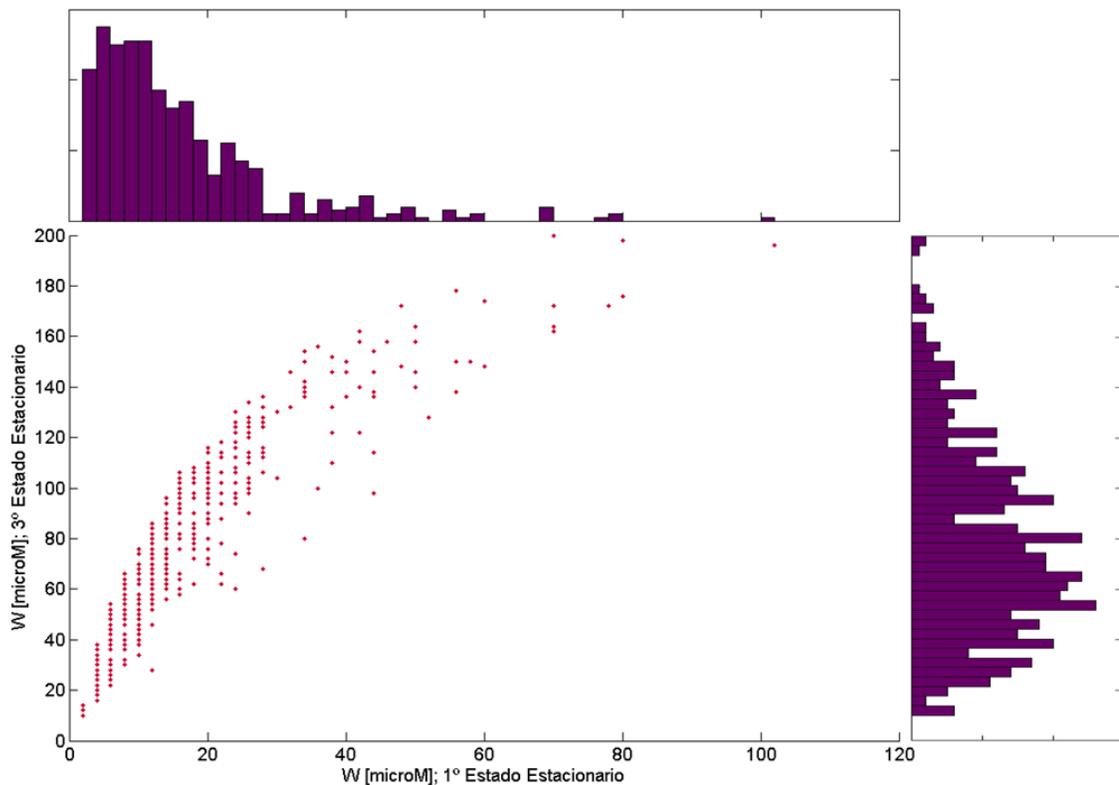


Figura 23 Concentración de triptófano acumulada en el estado inducido (3° estado estacionario) con respecto a la concentración en el estado no inducido (1° estado estacionario). En los ejes se muestran los histogramas de incidencia de los valores de cada estado estacionario.

algo sobre el factor de relación entre uno y otro.

Para el sistema sin triptofanasa ($\Delta TnaA$) nuevamente los estados estacionarios aparecen a todo lo largo del rango explorado, pero la distribución de valores, tanto para el estado inducido como no inducido, cambia notablemente (figura 24-a y figura 27); aproximadamente el 92.8% de los casos muestran una concentración

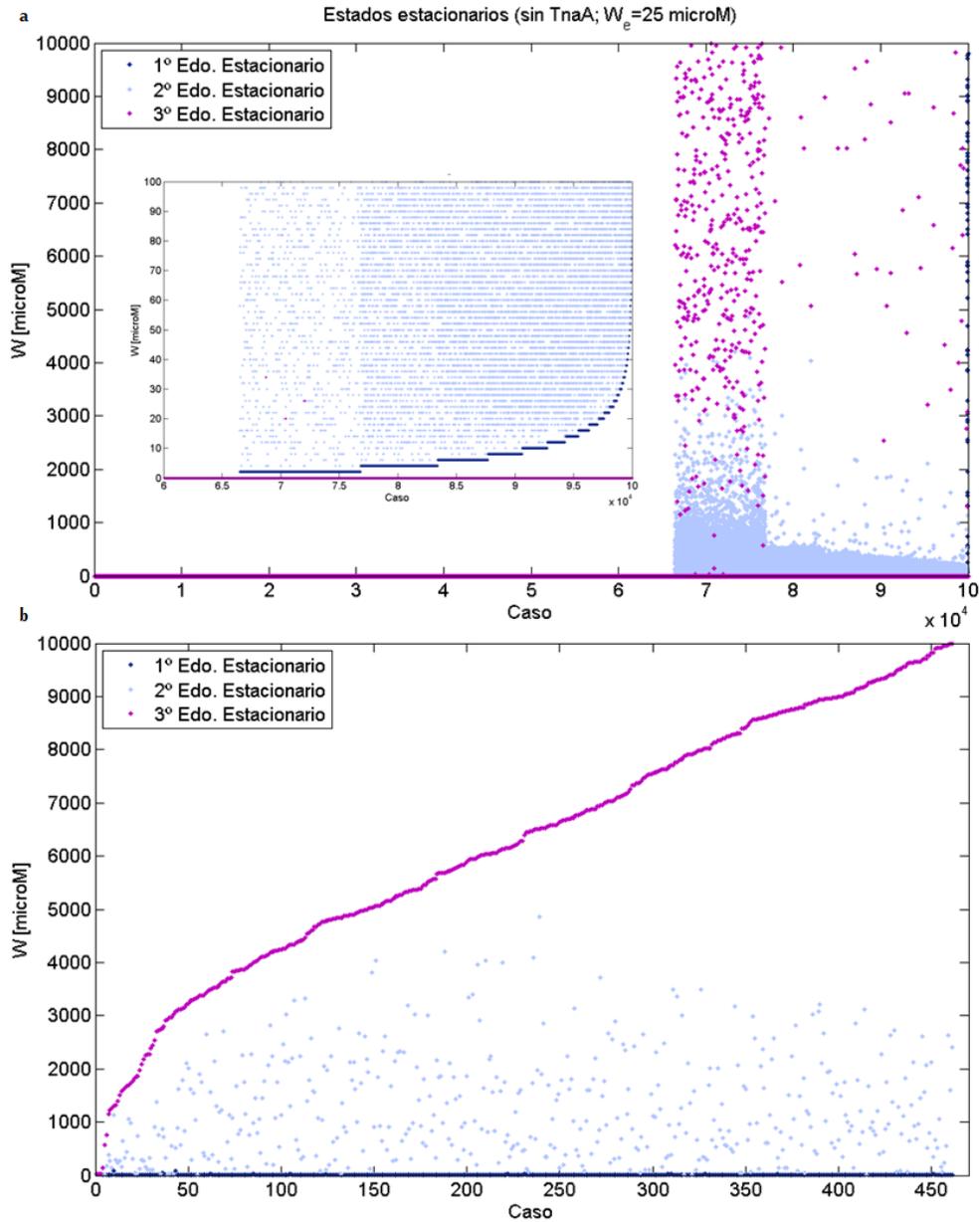


Figura 24 a Concentración de triptófano acumulada en los estados estacionarios de 100,000 casos analizados del sistema mutado ($\Delta TnaA$); los casos están ordenados de manera ascendente según el valor del primer estado estacionario (estado no inducido). Dentro se muestra un acercamiento de la gráfica. **b** Concentración de triptófano acumulada en los estados estacionarios de 461 casos del sistema $\Delta TnaA$ con biestabilidad; los casos están ordenados de manera ascendente según el valor del tercer estado estacionario (estado inducido).

de triptófano acumulado en el primer estado estacionario menor o igual a $10\mu M$, a diferencia del 43.5% en el sistema original. Por otro lado, la restricción a valores bajos de los estados estacionarios desaparece por completo para el estado de inducción al perder la acción de la triptofanasa (figura 24-b); la concentración de triptófano acumulada en el tercer estado estacionario toma valores desde $20\mu M$ hasta $9,992\mu M$, mostrando que la detección de casos biestables en el sistema mutado está claramente restringida por el umbral de búsqueda ($W \leq 10mM$). Lo contrario sucede para el valor del estado estacionario no inducido, cuyo rango se reduce a $[2\mu M, 88\mu M]$, y con más del 90% de los casos igual a $2\mu M$; esto define una clara región biestable observable en la gráfica 24-a.

Cuando el sistema carece de la triptofanasa no se observa ninguna correlación significativa entre el valor del estado estacionario inducido y no inducido (coeficiente de correlación igual a -0.0783 , con un p -value mayor a 0.09; figura 25).

La gráfica 26 confirma que la distribución de valores de triptófano acumulado de los estados estacionarios en los casos con biestabilidad son drásticamente diferentes entre el sistema con y sin retroalimentación negativa

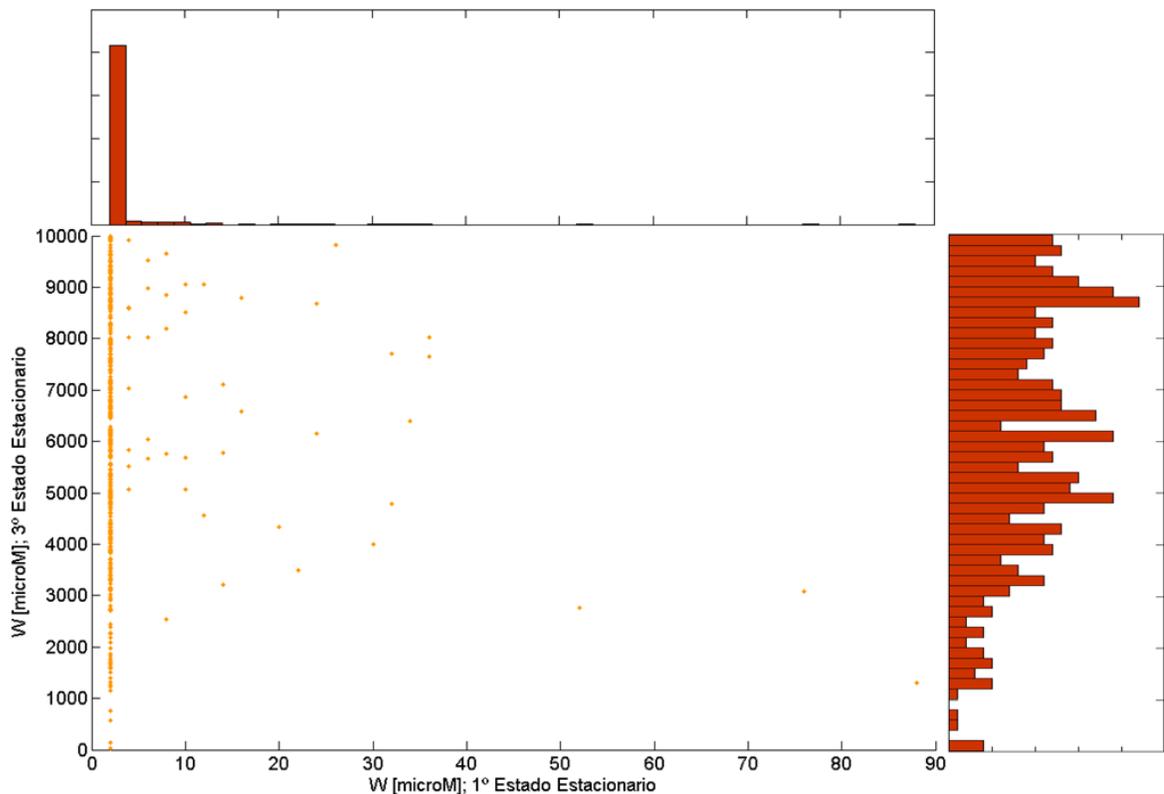


Figura 25 Concentración de triptófano acumulado en el estado inducido (3º estado estacionario) con respecto a la concentración en el estado no inducido (1º estado estacionario) en el sistema mutado ($\Delta TnaA$). En los ejes se muestran los histogramas de incidencia de los valores de cada estado estacionario.

(figura 26). Esto se observa también para los valores del primer estado estacionario en general (figura 27), así que ambos sistemas se comportan cualitativamente distintos, con o sin biestabilidad.

El hecho de que la presencia de biestabilidad en el sistema mutado esté circunscrita a condiciones tan particulares ($W_{Edo. no inducido} = 2\mu M$) la hace poco probable en el medio natural; además de que

concentraciones tan altas de triptófano acumulado como las observadas en el estado inducido para muchos de los casos sin TnaA son también poco factibles biológicamente hablando. La biestabilidad como propiedad del

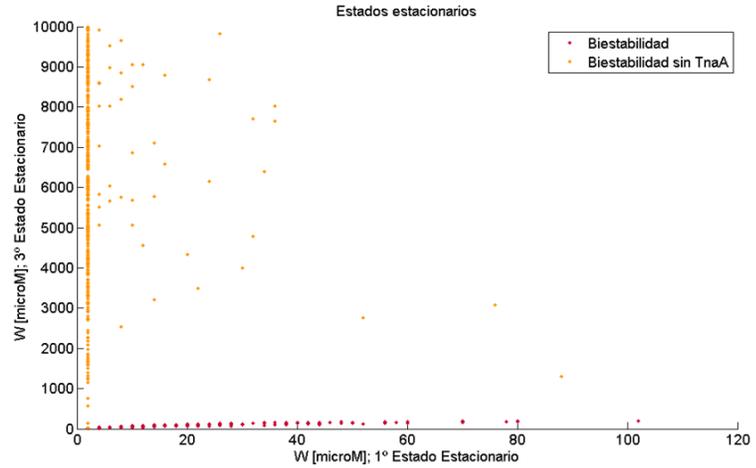


Figura 27 Concentración de triptófano acumulado en el estado inducido (3º estado estacionario) con respecto a la concentración en el estado no inducido (1º estado estacionario); en rojo el sistema original, en naranja el sistema mutado ($\Delta TnaA$).

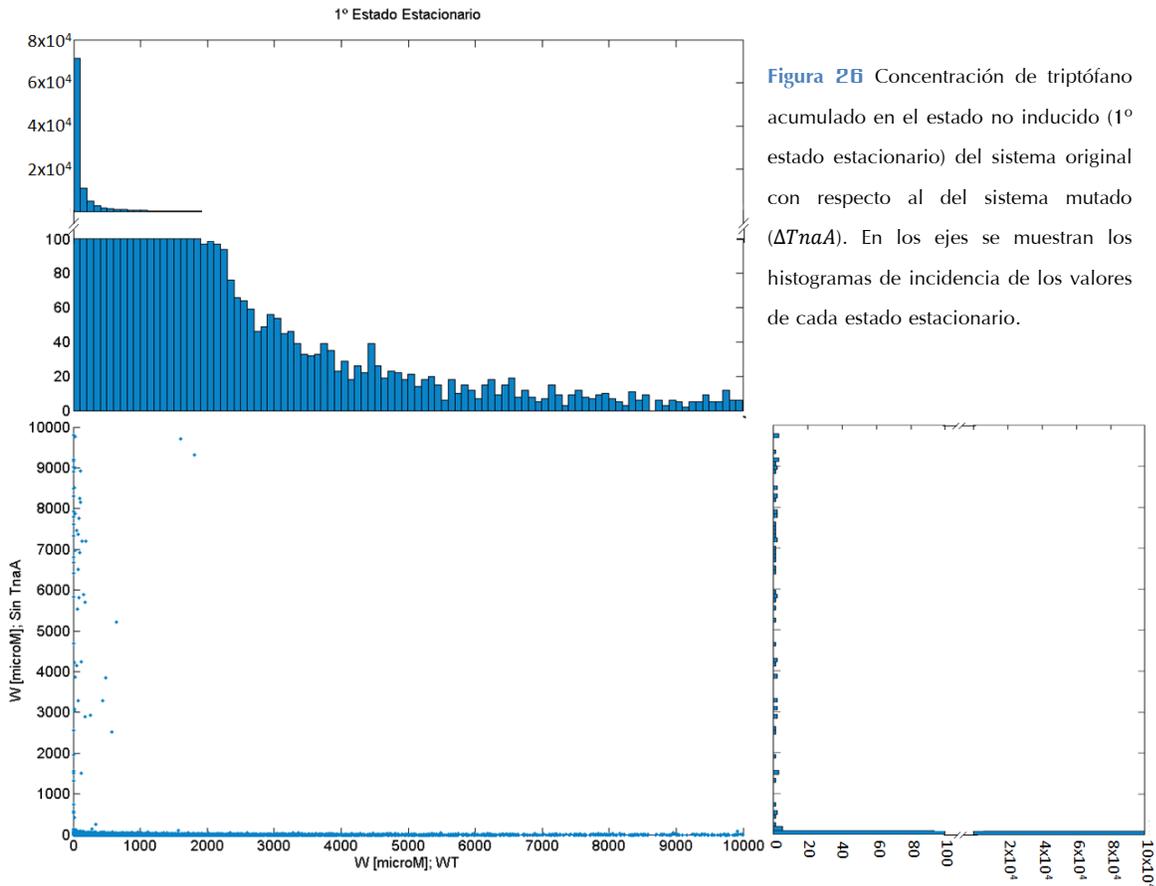


Figura 26 Concentración de triptófano acumulado en el estado no inducido (1º estado estacionario) del sistema original con respecto al del sistema mutado ($\Delta TnaA$). En los ejes se muestran los histogramas de incidencia de los valores de cada estado estacionario.

sistema parece ser mucho más robusta si se cuenta con el lazo de retroalimentación negativa.

Retroalimentación negativa & tiempos de inducción

Los resultados previos nos permiten dilucidar algunos aspectos del papel de la retroalimentación negativa en la regulación del sistema. Al entrar en competencia con el lazo de retroalimentación positiva, la retroalimentación negativa permite que el peso del circuito positivo tome valores mucho más altos, es decir, que la **retroalimentación positiva** sea **más fuerte**. También, en presencia de retroalimentación negativa, el sistema es **más sensible** a cambios en la concentración de triptófano intracelular, por lo que el peso máximo de los circuitos puede aparecer a una menor concentración; en consecuencia, también los **estados estacionarios inducidos** muestran una **menor concentración de triptófano** acumulado y a su vez la diferencia entre el estado inducido y no inducido es menor. Esto en conjunto indica que la retroalimentación negativa debe tener un efecto sobre la velocidad de inducción del sistema.

Para explorar esta hipótesis, simulamos 1,000 casos sin biestabilidad y 1,000 con biestabilidad del sistema original, así como 1,000 casos sin biestabilidad y 456 casos con biestabilidad del sistema mutado ($\Delta TnaA$), y calculamos la **velocidad de inducción** para cada uno de ellos. Llamamos velocidad de inducción a la razón entre la máxima concentración de triptófano intracelular acumulada sobre el tiempo de inducción. La simulación utiliza siempre como condiciones iniciales todas las variables igualadas a cero, es decir, cuando no hay ni ARNm ni proteínas ni triptófano intracelular, así que la **máxima concentración de triptófano** será siempre equivalente al primer estado estacionario del sistema; y definimos como **tiempo de inducción** al número de segundos que le toma al sistema alcanzar el 95% del triptófano máximo acumulado.

Variando la concentración de triptófano extracelular entre $2.5\mu M$ y $100\mu M$ para los casos del sistema original, observamos que la velocidad de inducción aumenta conforme W_E , tanto para los casos con biestabilidad como sin biestabilidad; sin embargo, para este último, el incremento es prácticamente lineal, mientras que en los casos biestables la respuesta al incremento de W_E permanece reprimida al principio para después dar un cambio abrupto (figura 2B-a y 2B-b). Por otro lado, la velocidad de inducción promedio para los casos sin biestabilidad es considerablemente más alta que para los casos con biestabilidad en todo el rango W_E explorado. Si observamos el tiempo de inducción, éste se mantiene prácticamente constante a lo largo de todo el rango explorado (excepto para una región de los casos con biestabilidad que se asocia con el final de la región biestable) y es muy similar entre los casos con y sin biestabilidad ($t_{Ind} = 9879.8$ y $t_{Ind,Bis} = 9475.0$;

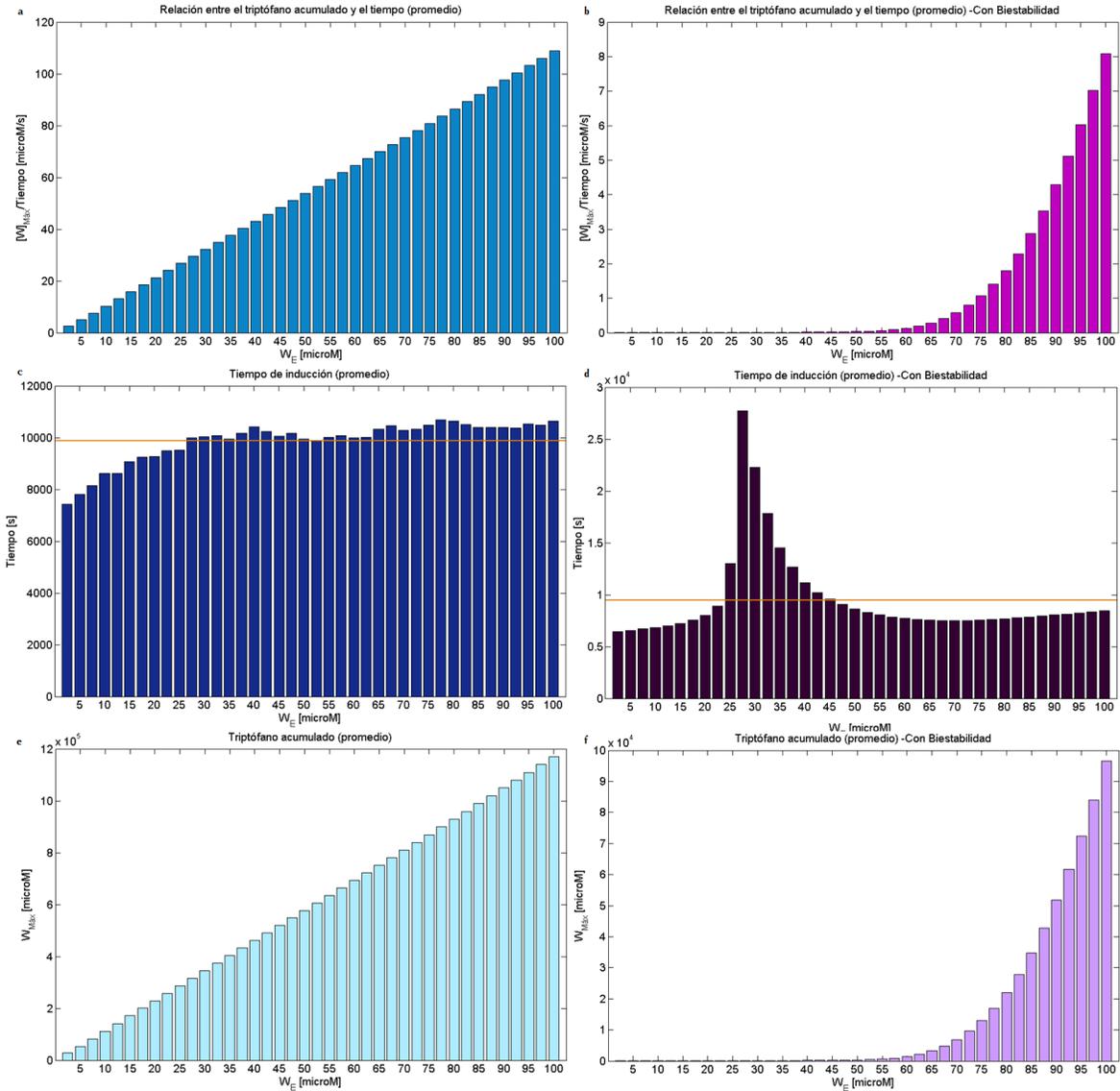


Figura 2B a y b Velocidad de inducción promedio ($[W]_{Max}/t_{Ind}$) con respecto a la concentración de triptófano extracelular ($W_E = [2.5, 100]\mu M$) para 1,000 casos del sistema original sin y con biestabilidad, respectivamente. **c y d** Tiempo de inducción promedio (t_{Ind} ; para alcanzar el 95% de $[W]_{Max}$) con respecto a W_E para 1,000 casos del sistema original sin y con biestabilidad, respectivamente; la línea naranja corresponde al valor del promedio global. **e y f** Concentración máxima de triptófano acumulado promedio ($[W]_{Max}$) con respecto a W_E para 1,000 casos del sistema original sin y con biestabilidad, respectivamente.

figura 2B-c y 2B-d), siendo más bien la concentración máxima de triptófano acumulada quien determina la velocidad de inducción (figura 2B-e y 2B-f).

En lo que respecta al sistema mutado sin triptofanasa, variamos la concentración de triptófano extracelular en un rango más amplio, entre $25\mu M$ y $1000\mu M$, dado que en los casos biestables se requiere una mayor W_E para dejar la región biestable en comparación con el sistema original. En los casos sin biestabilidad, la relación

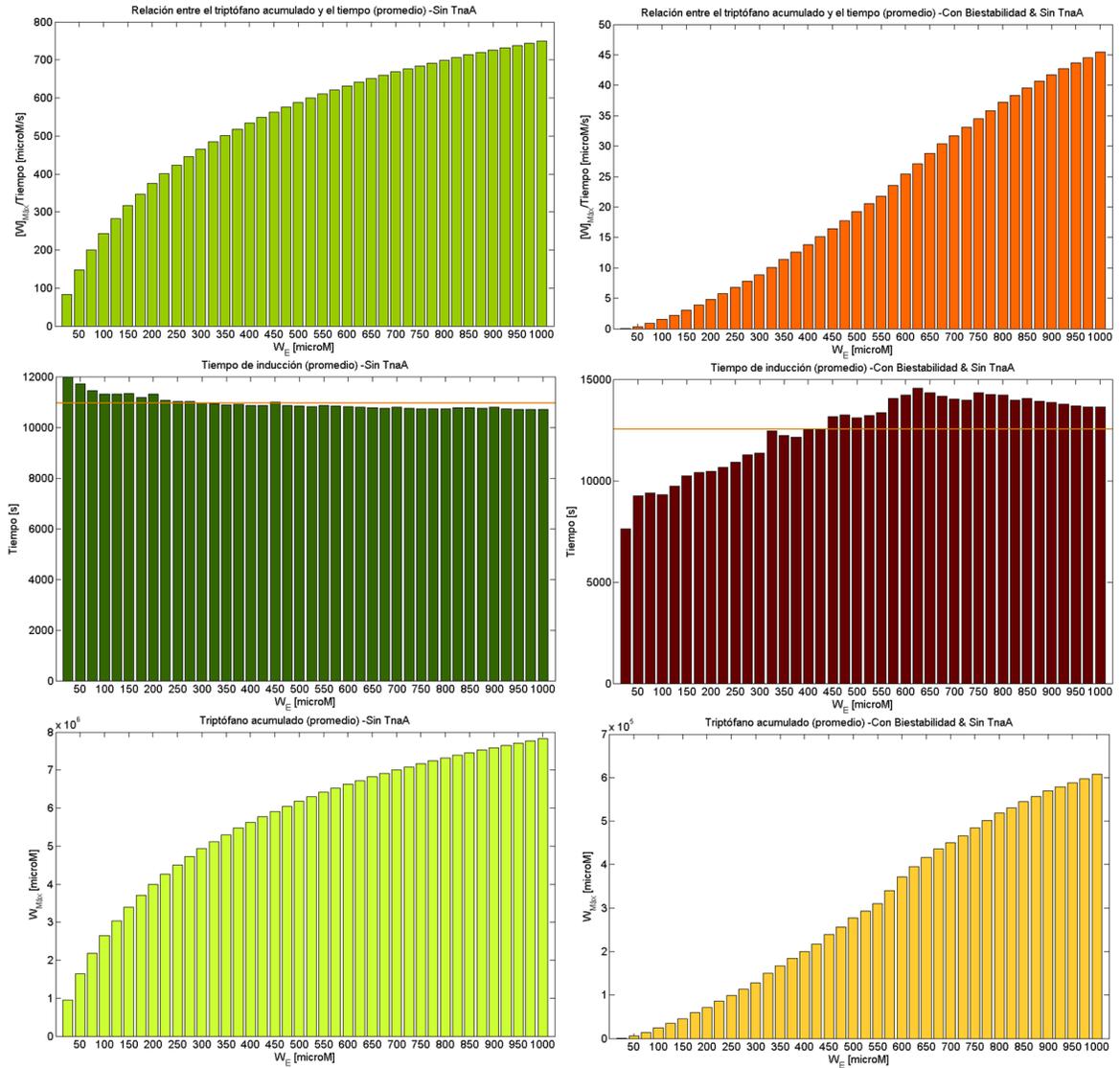


Figura 29 a y b Velocidad de inducción promedio ($[W]_{Max}/t_{Ind}$) con respecto a la concentración de triptófano extracelular ($W_E = [2.5,100]\mu\text{M}$) para 1,000 casos del sistema mutado sin biestabilidad y 456 con biestabilidad, respectivamente. **c y d** Tiempo de inducción promedio (t_{Ind} ; para alcanzar el 95% de $[W]_{Max}$) con respecto a W_E para 1,000 casos del sistema original sin biestabilidad y 456 con biestabilidad, respectivamente; la línea naranja corresponde al valor del promedio global. **e y f** Concentración máxima de triptófano acumulado promedio ($[W]_{Max}$) con respecto a W_E para 1,000 casos del sistema original sin biestabilidad y 456 con biestabilidad, respectivamente.

lineal entre la velocidad de inducción y W_E se pierde, y el retraso en la respuesta de la velocidad de inducción al incremento en W_E en los casos biestables se hace menos evidente (figura 29-a y 29-b). Nuevamente, la velocidad de inducción promedio para los casos sin biestabilidad es considerablemente más alta que para los casos con biestabilidad en todo el rango W_E explorado; el tiempo de inducción se mantiene prácticamente constante (en este caso el final de la región biestable es más variable entre los distintos casos, por lo que el efecto se diluye) y es similar entre los casos con y sin biestabilidad ($t_{Ind,SA} = 10959$ y

$t_{Ind,SA,Bis} = 12534$; figura 29-c y 29-d). Los tiempos de inducción promedio son mayores para el sistema mutado que para el sistema original, pero es claro que sigue siendo la concentración máxima de triptófano acumulada quien determina la velocidad de inducción (figura 29-e y 29-f).

Comparando los casos con biestabilidad del sistema mutado y del sistema original encontramos que la presencia de retroalimentación negativa aumenta considerablemente la velocidad de inducción del sistema (figura 30-a). Con una concentración de triptófano extracelular de $100\mu M$, el sistema original ha alcanzado ya una velocidad promedio de $8\mu M/s$, mientras que para el sistema mutado es de apenas $2\mu M/s$; y la tendencia se conserva, ya que si evaluamos el sistema original con $W_E = 1000\mu M$, este muestra $t_{Ind} = 10452s$ con $[W]_{Max} = 7326.7mM$, es decir, una velocidad de inducción igual a $703.18\mu M/s$, a comparación de $t_{Ind} = 13649s$, $[W]_{Max} =$

$607.5mM$ y $[W]_{Max}/t_{Ind} = 45.46\mu M$ para el sistema mutado; esto es más de 15 veces más eficiente. Sin embargo, para los casos sin biestabilidad, la retroalimentación negativa no parece brindar una ventaja sobre el sistema mutado, siendo este último aproximadamente el doble de rápido para alcanzar inducción (figura 30-b). La pérdida del beneficio de la retroalimentación negativa en los casos sin biestabilidad es congruente con la hipótesis de que es el efecto de ésta sobre el peso del circuito positivo quien influye en la velocidad de inducción. Tomando el mismo grupo de parámetros a analizar para ambos sistemas, el peso del circuito positivo no varía como tal, ya que no depende de la

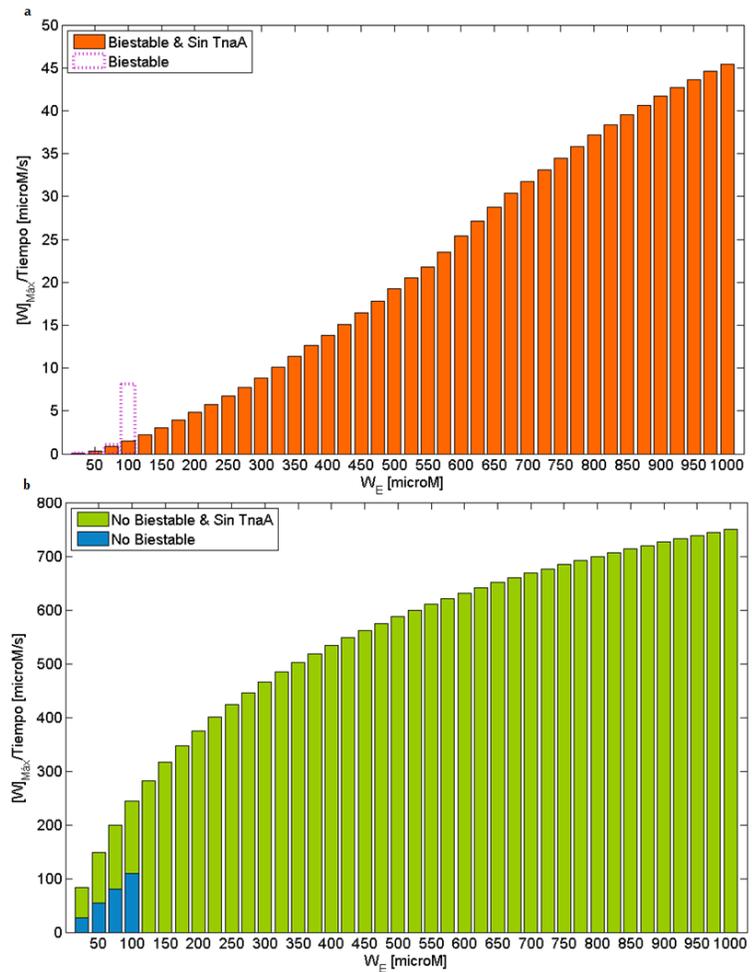


Figura 30 a Comparación entre el sistema mutado y el sistema original de la velocidad de inducción con respecto a W_E para los casos con biestabilidad. **b** Comparación entre el sistema mutado y el sistema original de la velocidad de inducción con respecto a W_E para los casos sin biestabilidad.

presencia de la triptofanasa, lo que varía es que casos pueden o no mostrar biestabilidad; por otro lado, al perder el consumo de la triptofanasa se espera que la concentración de triptófano acumulado aumente, con o sin biestabilidad.

IV. CONCLUSIONES & PERSPECTIVAS

CONCLUSIONES

El modelo presentado en esta tesis nos permite hacer algunas conclusiones generales y relevantes con respecto al papel de la arquitectura del circuito de regulación del operón de triptofanasa en *Escherichia coli* sobre su comportamiento dinámico, en particular acerca del lazo de retroalimentación negativa. En primer lugar, se encontró que el sistema cumple con las condiciones teóricas necesarias para ser biestable y que éste es capaz de mostrar biestabilidad en un amplio rango de parámetros biológicamente factibles.

No existe ninguna correlación evidente entre el valor de un parámetro con respecto a otro en los casos con biestabilidad; sin embargo, el análisis indica que es el valor del peso de los circuitos de retroalimentación, en particular la razón entre ellos, quienes deben cumplir restricciones particulares para que el sistema pueda tener dos estados estacionarios estables. En los casos con biestabilidad, los pesos se caracterizan por una respuesta rápida pero transitoria al incremento de la concentración de triptófano y, de manera contra-intuitiva, el circuito de retroalimentación negativa es quien debe ser más fuerte para favorecer la presencia de biestabilidad.

Si se pierde la retroalimentación negativa, por ejemplo mutando el gen de la triptofanasa, el peso que puede alcanzar el circuito positivo es notoriamente bajo y este puede requerir concentraciones mucho más altas que las observadas en el sistema original para alcanzarse. Una de las consecuencias más trascendentes de esto es que la presencia de biestabilidad en el sistema mutado queda circunscrita a condiciones muy particulares que la hace poco probable en la realidad; por ejemplo, el 90% de los casos encontrados tiene $W = 2\mu M$ en el estado no inducido. Además, dado que muchos de los casos sin TnaA requieren concentraciones sumamente altas de triptófano acumulado para alcanzar el estado inducido, hace también poco factible a la biestabilidad en este sistema biológicamente hablando. En conjunto, la biestabilidad como propiedad del sistema parece ser mucho más robusta si se cuenta con el lazo de retroalimentación negativa.

La retroalimentación negativa, menospreciada en muchos análisis previos, parece jugar un papel en la biestabilidad del sistema, cuando ésta se encuentra anidada con otro lazo de retroalimentación positiva. El circuito negativo, al entrar en competencia con el circuito positivo, aumenta la fuerza de éste último, y es capaz de incrementar la velocidad de inducción en un sistema biestable hasta más de 15 veces en comparación con el sistema mutado. También amplía considerablemente la sensibilidad del sistema a concentraciones bajas de triptófano extracelular.

Contrario a lo esperado, la biestabilidad en sí misma parece no favorecer la velocidad de inducción del sistema en comparación con los casos sin biestabilidad; pero ésta es necesaria para que, en conjunto con la retroalimentación negativa, se logre un beneficio en la velocidad de inducción.

Por otro lado, el peso de un circuito parece ser una medida informativa acerca de un lazo de retroalimentación, permitiendo la comparación entre distintos circuitos, además de la caracterización de los mismos en diversos sistemas y condiciones.

PERSPECTIVAS

Se sabe que todas las reacciones químicas, incluyendo aquellas partícipes de los procesos biológicos, son inherentemente ruidosas (Paulsson, 2004), por lo que para extender las conclusiones de este modelo sería necesario incluir fluctuaciones en las ecuaciones diferenciales, por ejemplo utilizando el algoritmo de Gillespie (Gillespie, 1977). Esto nos permitiría explorar el papel de ambos lazos de retroalimentación y el peso de los mismos sobre la robustez de la biestabilidad del sistema, así como analizar la factibilidad de la misma ante explosiones transcripcionales (*bursts*; Golding *et al.*, 2005) u otras perturbaciones, haciendo al modelo más realista.

Otro paso necesario sería la validación de las conclusiones de estos modelos mediante un diseño experimental, empezando por definir el valor de los parámetros desconocidos y probando la capacidad de predicción del modelo en distintos medios y condiciones experimentales. Finalmente, sería sumamente interesante modificar biotecnológicamente el peso de los circuitos y analizar la respuesta del sistema a ello.

V. APÉNDICES

APÉNDICE I

Vida media & constantes de reacción

El tiempo de vida media de una reacción, $t_{\left(\frac{1}{2}\right)}$, es el tiempo que tardan en convertirse en productos la mitad de los reactivos. En una reacción de primer orden, $t_{\left(\frac{1}{2}\right)}$ es una constante y se puede calcular a partir de la constante de reacción (k) del siguiente modo:

$$t_{\left(\frac{1}{2}\right)} = \frac{\ln 2}{k} = \frac{0.693}{k}$$

Esta relación de reciprocidad entre el tiempo de vida medio y la constante de velocidad resulta muy útil a la hora de hacer un cálculo aproximado del tiempo que tardará en producirse una reacción dada. Así, para $k = 0.01 \text{ s}^{-1}$, el tiempo de vida medio sería aproximadamente 70 s. Para $k = 10 \text{ s}^{-1}$, el tiempo de vida medio sería $\sim 0.07 \text{ s}$. El tiempo de vida medio en las reacciones de primer orden también es independiente de la concentración inicial. Si la primera mitad de las moléculas tarda en reaccionar 20 s, la mitad de las moléculas restantes tardará también 20 s en reaccionar, y así sucesivamente. El hecho de que el tiempo de vida medio en una reacción unimolecular sea constante significa que, en cualquier tiempo de la reacción, una fracción constante de moléculas de reactivo tiene la energía suficiente para superar la barrera cinética y transformarse en moléculas de producto. Esto tiene sentido porque la energía de un conjunto de moléculas se reparte de forma aleatoria según una distribución de Boltzmann (Sauer, 1999).

APÉNDICE II

$P_A(G)$ & sus parámetros

La probabilidad de que una polimerasa (P) se encuentre unida al promotor, tomando en cuenta la cooperatividad con el inductor CAP* es:

$$Prob = \frac{\left(\frac{P}{K_P}\right)\left(1+K_{Coop}\left(\frac{CAP^*}{K_C}\right)\right)}{1+\frac{P}{K_P}+\left(1+K_{Coop}\left(\frac{P}{K_P}\right)\right)\left(\frac{CAP^*}{K_C}\right)}$$

Donde K_P , K_C y K_{Coop} representan la constante de disociación de la polimerasa, la proteína CAP* y la polimerasa dado que CAP* se encuentra unido, al ADN, respectivamente. La cantidad de moléculas CAP* depende a su vez la cantidad de cAMP en la célula:

$$CAP^* = CAP_T \cdot \frac{cAMP}{cAMP+K_a} = CAP_T \cdot \frac{cAMP/K_a}{(cAMP/K_a)+1}$$

con K_a como la constante de disociación entre CAP y cAMP, y CAP_T como el número total de proteínas CAP, activas o inactivas. Así que podemos reescribir la probabilidad como:

$$Prob = \frac{1+K_{Coop}\frac{CAP_T}{K_C}\left(\frac{cAMP/K_a}{(cAMP/K_a)+1}\right)}{\frac{K_P+P}{K_P}+\left(\frac{K_P}{P}+K_{Coop}\right)\left(\frac{CAP_T}{K_C}\right)\left(\frac{cAMP/K_a}{(cAMP/K_a)+1}\right)} = \frac{1+\left(1+K_{Coop}\left(\frac{CAP_T}{K_C}\right)\right)\left(\frac{cAMP}{K_a}\right)}{\left(\frac{K_P+P}{P}\right)+\left(\left(\frac{K_P+P}{P}\right)+\left(\frac{K_P}{P}\right)\left(\frac{CAP_T}{K_C}\right)+K_{Coop}\left(\frac{CAP_T}{K_C}\right)\right)\left(\frac{cAMP}{K_a}\right)}$$

$$Prob = \frac{\left(\frac{P}{K_P+P}\right)+\left(\frac{P}{K_P+P}\right)\left(1+K_{Coop}\left(\frac{CAP_T}{K_C}\right)\right)\left(\frac{cAMP}{K_a}\right)}{1+\left(1+\left(\frac{K_P}{K_P+P}\right)\left(\frac{CAP_T}{K_C}\right)+K_{Coop}\left(\frac{P}{K_P+P}\right)\left(\frac{CAP_T}{K_C}\right)\right)\left(\frac{cAMP}{K_a}\right)} = \frac{\alpha_A+\beta_A\left(\frac{cAMP}{K_a}\right)}{1+\beta_A'\left(\frac{cAMP}{K_a}\right)}$$

con $\alpha_A = \frac{P}{K_P+P}$

entonces, si $cAMP = 0$, $Prob|_{cAMP=0} = \alpha_A$ y el límite $\lim_{cAMP \rightarrow \infty} Prob = \frac{\beta_A}{\beta_A'}$

Dado que por definición una probabilidad es siempre menor o igual que uno, sabemos que $\beta_A \leq \beta_A'$. Por otro lado, a concentraciones muy altas de cAMP esperamos que $Prob \approx 1$, por lo que suponemos $\beta_A \approx \beta_A'$.

Entonces:

$$Prob = \frac{\alpha_A+\beta_A\left(\frac{cAMP}{K_a}\right)}{1+\beta_A'\left(\frac{cAMP}{K_a}\right)} = \alpha + (1 - \alpha_A) \frac{\beta_A\left(\frac{cAMP}{K_a}\right)}{1+\beta_A'\left(\frac{cAMP}{K_a}\right)}$$

Suponiendo que la concentración de cAMP depende de la concentración de glucosa extracelular como una función tipo Hill decreciente (Ozbudak *et al.*, 2004), tenemos:

$$cAMP = cAMP_{max} \frac{K^{n_A}}{K^{n_A}+G^{n_A}}$$

$$Prob = \alpha_A + (1 - \alpha_A) \frac{\beta_A\left(\frac{cAMP_{max}}{K_a}\right)\left(\frac{K^{n_A}}{K^{n_A}+G^{n_A}}\right)}{1+\beta_A'\left(\frac{cAMP_{max}}{K_a}\right)\left(\frac{K^{n_A}}{K^{n_A}+G^{n_A}}\right)} = \alpha_A + (1 - \alpha_A) \frac{\beta_A\left(\frac{cAMP_{max}}{K_a}\right)(K^{n_A})}{\left(1+\beta_A'\left(\frac{cAMP_{max}}{K_a}\right)\right)(K^{n_A}+G^{n_A})}$$

Por lo tanto:

$$Prob = \alpha_A + (1 - \alpha_A) \frac{K_G^{n_A}}{K_G^{n_A} + G^{n_A}} \text{ con } K_G^{n_A} = \beta_A \left(\frac{cAMP_{max}}{K_a} \right) K^{n_A}$$

El parámetro α_A está vinculado con la afinidad de la polimerasa al promotor, sin CAP*; mientras que el parámetro β_A depende de la afinidad de CAP* y su operador, así como de la cooperatividad entre CAP* y la polimerasa cuando ambas están unidas al ADN. $\frac{cAMP_{max}}{K_a}$ refleja la interacción entre cAMP y CAP; y finalmente K y n_A nos hablan de la producción de cAMP regulada por la concentración extracelular de glucosa. Así, los parámetros K y n_A deben ser los mismos para cualquier sistema bajo regulación catabólica en *E. coli*, y se espera que la afinidad de CAP* y su operador no cambie mucho de un operón a otro; así los parámetros $K_G^{n_A}$ y n_A calculados en el trabajo de Ozbudak *et al.* (2004) deben ser similares a aquellos del operón de triptofanasa.

APÉNDICE III

Exploración Monte Carlo & estimación de estados estacionarios

Sistema original

Código desarrollado en MATLAB

```
%%% Escaneo de biestabilidad en el circuito de regulación del
%%% operón de triptofanasa en Escherichia coli

% Exploración aleatoria (Monte Carlo) del espacio de parámetros.
% Evaluación de los estados estacionarios del sistema para cada punto.

% Por Mariana G. Schiavon (2010)

% Parámetros fijos:
We=[25]; % Triptófano extracelular
rho=[16.6]; % Tasa de consumo de Trp por síntesis proteica
O=[0.004]; % Número de operones tna promedio en la célula
kM=[0.73627]; % Tasa máxima de transcripción del operón tna
gammaMA=[0.00435]; % Tasa de degradación del ARNm de la triptofanasa
gammaMB=[0.00257]; % Tasa de degradación del ARNm de la permeasa
k=[0.5]; % Tasa de traducción
gamma=[0.0005]; % Tasa de dilución
KA=[330]; % Afinidad de la triptofanasa por su sustrato
alpha=[6]; % Tasa de reacción de la triptofanasa
kX=[0.00117]; % Tasa de importación basal de triptófano
Krho=[8.3]; % Constante de Michaelis-Menten de la
            % cinética de
            % consumo de Trp por síntesis proteica

alphaT=[0.044]; % Actividad basal del operón, en ausencia de Trp
Pa_G=[1]; % Represión catabólica (PA(G)=1 en ausencia
            % de
            % Glucosa)

% Rango de los parámetros a escanear:
KB_lim=[0,1000]; % Afinidad de la permeasa por su sustrato
beta_lim=[0,10]; % Tasa de reacción de la permeasa
KW_lim=[0,1000]; % Constante de Michaelis-Menten de la
                % función de
                % regulación dependiente de triptófano
nT_lim=[0,3]; % Coeficiente de Hill de la función de
              % regulación
              % dependiente de triptófano

% Generar números aleatorios:
for i=1:910274 % Número de iteraciones
    x(i,:)=rand rand rand rand;
end

for i=1:910274
    % Parámetros escaneados:
    KB=(x(i,1)*(KB_lim(2)-KB_lim(1)))+KB_lim(1);
    beta=(x(i,2)*(beta_lim(2)-beta_lim(1)))+beta_lim(1);
    KW=(x(i,3)*(KW_lim(2)-KW_lim(1)))+KW_lim(1);
    nT=(x(i,4)*(nT_lim(2)-nT_lim(1))+nT_lim(1);
end
```

```

parameters(i,:)=[KB beta KW nT];

% Constantes que definen el estado estacionario:
ma=0*kM*Pa_G/gammaMA; % MA*=ma*PT(W);
mb=0*kM*Pa_G/gammaMB; % MB*=mb*PT(W);
a=0.25*k*ma/gamma; % A*=a*PT(W);
b=k*mb/gamma; % B*=b*PT(W);

j=1; % Bandera que cuenta el número de raíces
(estados estacionarios)
r(i,j)=0; % Inicializa el valor de la primera raíz en 0.
W=0:2:10000; % Rango de búsqueda de estados estacionarios,
W<=10 mM, con una sensibilidad de 0.002mM

% Evalúa el primer caso, W=0:
%% PT(W), función de regulación dependiente de triptófano:
PTW=alphaT+((1-alphaT)*(W(1)^nT)/((W(1)^nT)+(KW^nT)));

fB=b*beta*(We/(We+KB))*PTW;
fX=(kX*We);
fA=-a*alpha*(W(1)/(W(1)+KA))*PTW;
fp=-rho*(W(1)/(W(1)+Krho));
fW=-gamma*W(1);
F0=fB+fX+fA+fp+fW; % Calcula f(W*)

% Evalúa el resto de los casos, comparando siempre con el caso
previo:
for n=2:5001
    PTW=alphaT+((1-alphaT)*(W(n)^nT)/((W(n)^nT)+(KW^nT)));
    fB=b*beta*(We/(We+KB))*PTW;
    fX=(kX*We);
    fA=-a*alpha*(W(n)/(W(n)+KA))*PTW;
    fp=-rho*(W(n)/(W(n)+Krho));
    fW=-gamma*W(n);
    F=fB+fX+fA+fp+fW; % Calcula f(W*)

    % Si f(W*) cambia de signo con respecto al caso previo hay
    una raíz entre los dos valores de W:
    if (F0*F)<=0
        r(i,j)=W(n); % Guarda el valor de W asociado a la raíz.
        j=j+1;
    end

    % El valor actual de f(W*) pasa a ser el valor previo:
    F0=F;
end
end

% Analizando los resultados:
j=1;
for i=1:910274
    % Si existe una tercera raíz, el caso es biestable:
    if(r(i,3)>0)
        bis(j)=i; % La variable guarda los casos biestables.
        j=j+1;
    end
end

% Gráficas:
%% Histogramas:
figure (1);

```

```

x=0:10:1000;           % Intervalos del histograma
y=parameters(bis,1); % Los valores de KB en los casos con biestabilidad.
hist(y,x)
    title('Casos de biestabilidad -W_e=25 microM');
    xlabel('K_B');
    ylabel('Casos');
    xlim([0 1000]);

figure (2);
x=0:0.1:10;           % Intervalos del histograma
y=parameters(bis,2); % Los valores de Beta en los casos con
biestabilidad.
hist(y,x)
    title('Casos de biestabilidad -W_e=25 microM');
    xlabel('Beta');
    ylabel('Casos');
    xlim([0 10]);

figure (3);
x=0:10:1000;           % Intervalos del histograma
y=parameters(bis,3); % Los valores de KW en los casos con biestabilidad.
hist(y,x)
    title('Casos de biestabilidad -W_e=25 microM');
    xlabel('K_W');
    ylabel('Casos');
    xlim([0 1000]);

figure (4);
x=0:0.03:3;           % Intervalos del histograma
y=parameters(bis,4); % Los valores de nT en los casos con biestabilidad.
hist(y,x)
    title('Casos de biestabilidad -W_e=25 microM');
    xlabel('n_T');
    ylabel('Casos');
    xlim([0 3]);

%% Correlaciones:
figure (5);
x=parameters(bis,4); % Los valores de nT en los casos con biestabilidad.
y=parameters(bis,1); % Los valores de KB en los casos con biestabilidad.
scatter(x,y,'MarkerEdgeColor',[0.8 0 0.2],'Marker','.');
    title('Casos de biestabilidad -W_e=25 microM');
    xlabel('n_T');
    ylabel('K_B');

figure (6);
x=parameters(bis,4); % Los valores de nT en los casos con biestabilidad.
y=parameters(bis,2); % Los valores de Beta en los casos con
biestabilidad.
scatter(x,y,'MarkerEdgeColor',[0.749 0.749 0],'Marker','.');
    title('Casos de biestabilidad -W_e=25 microM');
    xlabel('n_T');
    ylabel('Beta');

figure (7);
x=parameters(bis,4); % Los valores de nT en los casos con biestabilidad.
y=parameters(bis,3); % Los valores de KW en los casos con biestabilidad.
scatter(x,y,'MarkerEdgeColor',[0.749 0 0.749],'Marker','.');
    title('Casos de biestabilidad -W_e=25 microM');
    xlabel('n_T');
    ylabel('K_W');

```

```

figure (8);
x=parameters(bis,3); % Los valores de KW en los casos con biestabilidad.
y=parameters(bis,1); % Los valores de KB en los casos con biestabilidad.
scatter(x,y,'MarkerEdgeColor',[0.8 0 0.2],'Marker','.');
    title('Casos de biestabilidad -w_e=25 microM');
    xlabel('K_W');
    ylabel('K_B');

figure (9);
x=parameters(bis,3); % Los valores de KW en los casos con biestabilidad.
y=parameters(bis,2); % Los valores de Beta en los casos con
biestabilidad.
scatter(x,y,'MarkerEdgeColor',[0.749 0.749 0],'Marker','.');
    title('Casos de biestabilidad -w_e=25 microM');
    xlabel('K_W');
    ylabel('Beta');

figure (10);
x=parameters(bis,2); % Los valores de Beta en los casos con
biestabilidad.
y=parameters(bis,1); % Los valores de KB en los casos con biestabilidad.
scatter(x,y,'MarkerEdgeColor',[0.8 0 0.2],'Marker','.');
    title('Casos de biestabilidad -w_e=25 microM');
    xlabel('Beta');
    ylabel('K_B');

```

Sistema mutado ($\Delta TnaA$)

Código desarrollado en MATLAB

```

%%% Escaneo de biestabilidad en el circuito de regulación del
%%% operón de triptofanasa en Escherichia coli
%%% Sin retroalimentación negativa
%%% Simulando sistema carente del gen de la triptofanasa

% Exploración aleatoria (Monte Carlo) del espacio de parámetros.
% Evaluación de los estados estacionarios del sistema para cada punto.

% Por Mariana G. Schiavon (2010)

% Parámetros fijos:
We=[25]; % Triptófano extracelular
rho=[16.61]; % Tasa de consumo de Trp por síntesis proteica
O=[0.004]; % Número de operones tna promedio en la célula
kM=[0.73627]; % Tasa máxima de transcripción del operón tna
gammaMA=[0.00435]; % Tasa de degradación del ARNm de la triptofanasa
gammaMB=[0.00257]; % Tasa de degradación del ARNm de la permeasa
k=[0.5]; % Tasa de traducción
gamma=[0.0005]; % Tasa de dilución
KA=[330]; % Afinidad de la triptofanasa por su sustrato
alpha=[6]; % Tasa de reacción de la triptofanasa
kX=[0.00117]; % Tasa de importación basal de triptófano
Krho=[8.3]; % Constante de Michaelis-Menten de la
cinética de
consumo de Trp por síntesis proteica

```

```

alphaT=[0.044];           % Actividad basal del operón, en ausencia de Trp
Pa_G=[1];                 % Represión catabólica (PA(G)=1 en ausencia
                           de
                           Glucosa)

% Rango de los parámetros a escanear:
KB_lim=[0,1000];         % Afinidad de la permeasa por su sustrato
beta_lim=[0,10];         % Tasa de reacción de la permeasa
KW_lim=[0,1000];         % Constante de Michaelis-Menten de la
                           función de
                           regulación dependiente de triptófano
nT_lim=[0,3];            % Coeficiente de Hill de la función de
                           regulación
                           dependiente de triptófano

% Generar números aleatorios:
for i=1:100000           % Número de iteraciones
    x(i,:)=rand rand rand rand;
end

for i=1:100000
    % Parámetros escaneados:
    KB=(x(i,1)*(KB_lim(2)-KB_lim(1)))+KB_lim(1);
    beta=(x(i,2)*(beta_lim(2)-beta_lim(1)))+beta_lim(1);
    KW=(x(i,3)*(KW_lim(2)-KW_lim(1)))+KW_lim(1);
    nT=(x(i,4)*(nT_lim(2)-nT_lim(1)))+nT_lim(1);
    parameters(i,:)=KB beta KW nT;

    % Constantes que definen el estado estacionario:
    ma=0;                 % MA*=ma*PT(W);
    mb=0*kM*Pa_G/gammaMB; % MB*=mb*PT(W);
    a=0;                  % A*=a*PT(W);
    b=k*mb/gamma;         % B*=b*PT(W);

    j=1;                  % Bandera que cuenta el número de raíces
                           (estados estacionarios)
    r(i,j)=0;             % Inicializa el valor de la primera raíz en 0.
    W=0:2:10000;         % Rango de búsqueda de estados estacionarios,
                           W<=10 mM, con una sensibilidad de 0.002mM

    % Evalúa el primer caso, W=0:
    %% PT(W), función de regulación dependiente de triptófano:
    PTW=alphaT+((1-alphaT)*(W(1)^nT)/((W(1)^nT)+(KW^nT)));

    fB=b*beta*(We/(We+KB))*PTW;
    fX=(kX*We);
    fA=-a*alpha*(W(1)/(W(1)+KA))*PTW;
    fp=-rho*(W(1)/(W(1)+Krho));
    fW=-gamma*W(1);
    FO=fB+fX+fA+fp+fW;    % Calcula f(W*)

    % Evalúa el resto de los casos, comparando siempre con el caso
    previo:
    for n=2:5001
        PTW=alphaT+((1-alphaT)*(W(n)^nT)/((W(n)^nT)+(KW^nT)));
        fB=b*beta*(We/(We+KB))*PTW;
        fX=(kX*We);
        fA=-a*alpha*(W(n)/(W(n)+KA))*PTW;
        fp=-rho*(W(n)/(W(n)+Krho));
        fW=-gamma*W(n);
    end
end

```

```

F=fB+fX+fA+fp+fW; % Calcula f(W*)

% Si f(W*) cambia de signo con respecto al caso previo hay
una raíz entre los dos valores de W:
if (F0*F)<=0
    r(i,j)=W(n); % Guarda el valor de W asociado a la raíz.
    j=j+1;
end

% El valor actual de f(W*) pasa a ser el valor previo:
F0=F;
end
end

% Analizando los resultados:
j=1;
for i=1:100000
    % Si existe una tercera raíz, el caso es biestable:
    if(r(i,3)>0)
        bis(j)=i; % La variable guarda los casos biestables.
        j=j+1;
    end
end

% Gráficas:
%% Histogramas:
figure (1);
x=0:10:1000; % Intervalos del histograma
y=parameters(bis,1); % Los valores de KB en los casos con biestabilidad.
hist(y,x)
title('Casos de biestabilidad Sin TnaA -W_e=25 microM');
xlabel('K_B');
ylabel('Casos');
xlim([0 1000]);

figure (2);
x=0:0.1:10; % Intervalos del histograma
y=parameters(bis,2); % Los valores de Beta en los casos con
biestabilidad.
hist(y,x)
title('Casos de biestabilidad Sin TnaA -W_e=25 microM');
xlabel('Beta');
ylabel('Casos');
xlim([0 10]);

figure (3);
x=0:10:1000; % Intervalos del histograma
y=parameters(bis,3); % Los valores de KW en los casos con biestabilidad.
hist(y,x)
title('Casos de biestabilidad Sin TnaA -W_e=25 microM');
xlabel('K_W');
ylabel('Casos');
xlim([0 1000]);

figure (4);
x=0:0.03:3; % Intervalos del histograma
y=parameters(bis,4); % Los valores de nT en los casos con biestabilidad.
hist(y,x)
title('Casos de biestabilidad Sin TnaA -W_e=25 microM');
xlabel('n_T');
ylabel('Casos');
xlim([0 3]);

```

```

%% Correlaciones:
figure (5);
x=parameters(bis,4); % Los valores de nT en los casos con biestabilidad.
y=parameters(bis,1); % Los valores de KB en los casos con biestabilidad.
scatter(x,y,'MarkerEdgeColor',[0.8 0 0.2],'Marker','.');
    title('Casos de biestabilidad Sin TnaA -W_e=25 microM');
    xlabel('n_T');
    ylabel('K_B');

figure (6);
x=parameters(bis,4); % Los valores de nT en los casos con biestabilidad.
y=parameters(bis,2); % Los valores de Beta en los casos con
biestabilidad.
scatter(x,y,'MarkerEdgeColor',[0.749 0.749 0],'Marker','.');
    title('Casos de biestabilidad Sin TnaA -W_e=25 microM');
    xlabel('n_T');
    ylabel('Beta');

figure (7);
x=parameters(bis,4); % Los valores de nT en los casos con biestabilidad.
y=parameters(bis,3); % Los valores de KW en los casos con biestabilidad.
scatter(x,y,'MarkerEdgeColor',[0.749 0 0.749],'Marker','.');
    title('Casos de biestabilidad Sin TnaA -W_e=25 microM');
    xlabel('n_T');
    ylabel('K_W');

figure (8);
x=parameters(bis,3); % Los valores de KW en los casos con biestabilidad.
y=parameters(bis,1); % Los valores de KB en los casos con biestabilidad.
scatter(x,y,'MarkerEdgeColor',[0.8 0 0.2],'Marker','.');
    title('Casos de biestabilidad Sin TnaA -W_e=25 microM');
    xlabel('K_W');
    ylabel('K_B');

figure (9);
x=parameters(bis,3); % Los valores de KW en los casos con biestabilidad.
y=parameters(bis,2); % Los valores de Beta en los casos con
biestabilidad.
scatter(x,y,'MarkerEdgeColor',[0.749 0.749 0],'Marker','.');
    title('Casos de biestabilidad Sin TnaA -W_e=25 microM');
    xlabel('K_W');
    ylabel('Beta');

figure (10);
x=parameters(bis,2); % Los valores de Beta en los casos con
biestabilidad.
y=parameters(bis,1); % Los valores de KB en los casos con biestabilidad.
scatter(x,y,'MarkerEdgeColor',[0.8 0 0.2],'Marker','.');
    title('Casos de biestabilidad Sin TnaA -W_e=25 microM');
    xlabel('Beta');
    ylabel('K_B');

```

APÉNDICE IV

Variando W_E

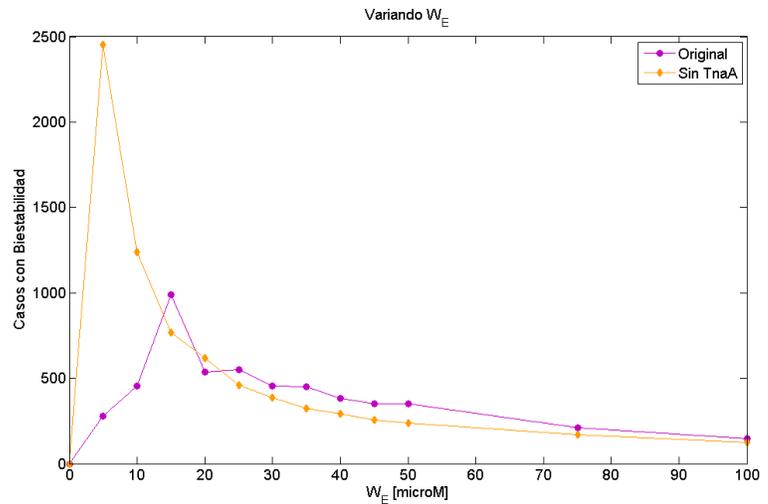
Repetimos la exploración Monte Carlo del espacio de parámetros en búsqueda de los estados estacionarios del sistema con distintas concentraciones de triptófano extracelular:

$$W_E = \{0\mu M, 5\mu M, 10\mu M, 15\mu M, 20\mu M, 25\mu M, 30\mu M, 35\mu M, 40\mu M, 45\mu M, 50\mu M, 75\mu M, 100\mu M\},$$

con 100,000 iteraciones tanto para el sistema original como para el sistema mutado.

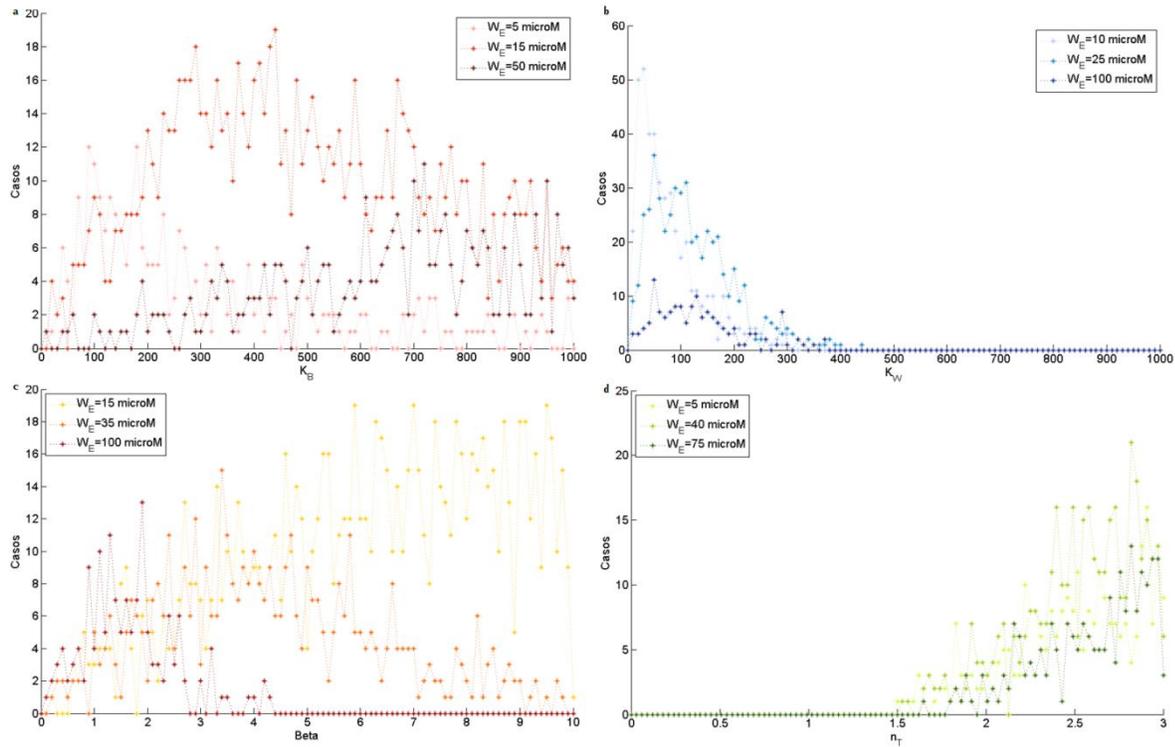
El número de casos biestables dada W_E para cada sistema se muestra en la siguiente tabla y gráfica:

| W_E | Casos Biestables | |
|--------------|------------------|-------------|
| | Original | Sin TnaA |
| 0 μM | 0 | 0 |
| 5 μM | 280 | 2454 |
| 10 μM | 453 | 1237 |
| 15 μM | 989 | 767 |
| 20 μM | 535 | 618 |
| 25 μM | 549 | 461 |
| 30 μM | 454 | 387 |
| 35 μM | 452 | 323 |
| 40 μM | 381 | 293 |
| 45 μM | 351 | 254 |
| 50 μM | 350 | 237 |
| 75 μM | 212 | 172 |
| 100 μM | 147 | 125 |
| TOTAL | 5153 | 7328 |

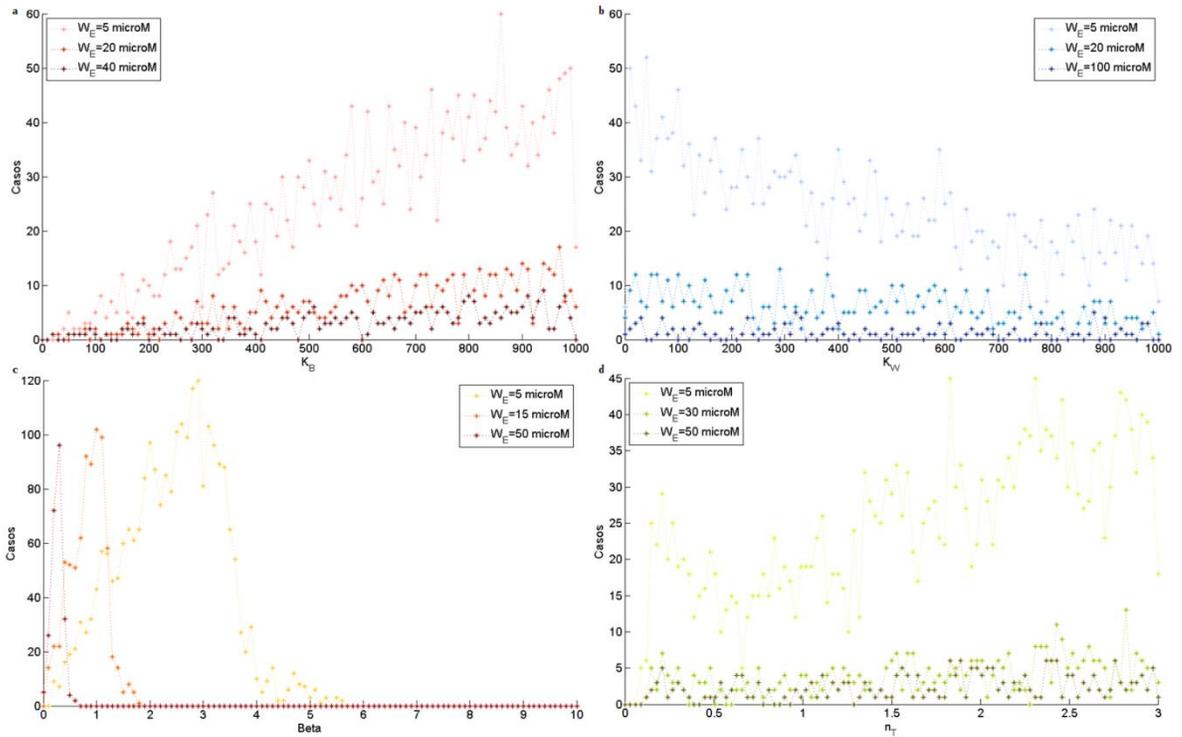


A-IV 1 Número de casos con biestabilidad entre 100,000 iteraciones para distintas concentraciones de triptófano extracelular, tanto para el sistema original como para el sistema mutado ($\Delta TnaA$).

También se observan cambios en la distribución de parámetros, aunque éstos parecen explicarse por el cambio en el número neto de casos biestables y la sensibilidad de los sistemas a la concentración de triptófano extracelular:



A-IV 2 Histograma de la distribución de valores de los cuatro parámetros desconocidos (K_B, β, K_W, n_T) en los casos con biestabilidad para tres diferentes valores de W_E , con $G = 0$ y $100,000$ iteraciones por ejemplo; en el sistema original.



A-IV 3 Histograma de la distribución de valores de los cuatro parámetros desconocidos (K_B, β, K_W, n_T) en los casos con biestabilidad para tres diferentes valores de W_E , con $G = 0$ y $100,000$ iteraciones por ejemplo; en el sistema mutado ($\Delta TnaA$).

En cuanto a los pesos no se observan cambios cualitativos.

Lista de siglas & acrónimos

| | |
|------------------------|---|
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| ARN | Ácido ribonucleico |
| cAMP | Adenil monofosfato cíclico |
| CAP | Proteína catabólica activadora |
| CAP* | Proteína catabólica activadora activa, en complejo con cAMP |
| ARNm | ARN mensajero |
| PTS | Sistema de fosfotransferasa |
| rARN | ARN ribosomal |
| RF3 | Factor de liberación del ribosoma 3 |
| RRF | Factor de reciclamiento del ribosoma |
| tARN | ARN de transferencia |
| tna | Triptofanasa (operón <i>tna</i>) |
| TnaA | Enzima triptofanasa |
| TnaB | Permeasa específica de triptófano |
| TnaC | Péptido líder del operón <i>tna</i> |
| Trp | Triptófano |
| Trp_e | Triptófano extracelular |

REFERENCIAS

- Acar, M., Becskei, A. & van Oudenaarden, A. **Enhancement of cellular memory by reducing stochastic transitions.** *Nature.* **2005**; 435:228-232.
- Adhya, S.L. & Shapiro, J.A. **The galactose operon of *E. coli* K-12. I. Structural and pleiotropic mutations of the operon.** *Genetics.* **1969**; 26:231-247.
- Alon, U. **Introduction to Systems Biology: Design Principles Of Biological Circuits.** *CRC, Boca Raton.* **2006**; 5-37.
- Alon, U. **Network motifs: theory and experimental approaches.** *Nature Reviews Genetics.* **2007**; 8:450-461.
- Banerjee, S., Chalissery, J., Bandey, I. & Sen, R. **Rho-dependent Transcription Termination: More Questions than Answers.** *J Microbiol.* **2006**; 44(1): 11-22.
- Bernstein, J.A., Khodursky, A.B., Lin, P., Lin-Chao, S. & Cohen, S.N. **Global analysis of mRNA decay and abundance in *Escherichia coli* at a single-gene resolution using two-color fluorescent microarrays.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2002**; 99: 9697-9702.
- Bilezikian, J.P., Kaempfer, R.O.R. & Magasanik, B. **Mechanism of Tryptophanase induction *Escherichia coli*.** *J. Mol. Bio.* **1967**; 27: 495-506.
- Bordi, C., Théraulaz, L., Méjean, V. & Jourlin-Castelli, C. **Anticipating an alkaline stress through the Tor phosphorelay system in *Escherichia coli*.** *Molecular microbiology.* **2003**; 48(1):211-223.
- Botsford, J.L. & Harman, J.G. **Cyclic AMP in Prokaryotes.** *Microbiological Reviews.* **1992**; 56-1:100-122.
- Brückner, R. & Titgemeyer, F. **Carbon catabolite repression in bacteria: choice of the carbon source and autoregulatory limitation of sugar utilization.** *FEMS Microbiology Letters.* **2002**; 209:141-148.
- Burrous, S.E. & DeMoss, R.D. **Studies on Tryptophan Permease in *Escherichia Coli*.** *Biochimica et biophysica acta.* **1963**; 73:623-637.
- Cinquin, O. & Demongeot, J. **Roles of positive and negative feedback in biological systems.** *C. R. Biologies.* **2002**; 325:1085-1095.
- Cruz-Vera, L.R., Gong, M. & Yanofsky, C. **Changes produced by bound tryptophan in the ribosome peptidyl transferase center in response to TnaC, a nascent leader peptide.** *PNAS.* **2006**; 103(10):3598-3603.
- Díaz, E., Ferrández, A., Prieto, M.A. & García, J.L. **Biodegradation of Aromatic Compounds by *Escherichia coli*.** *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2001**; 65: 523-569.
- Elowitz, M.B. & Leibler, S. **A synthetic oscillatory network of transcriptional regulators.** *Nature.* **2000**; 403:335-338.

- Gillespie, D.T. **Exact Stochastic Simulation of Coupled Chemical Reactions.** *The Journal of Physical Chemistry.* **1977**; 81(25):2340–2361.
- Gish, K. & Yanofsky, C. **Inhibition of expression of the tryptophanase operon in *Escherichia coli* by extrachromosomal copies of the *tna* leader region.** *J. Bacteriol.* **1993**; 175: 3380-3387.
- Golding, I., Paulsson, J., Zawilski, S.M. & Cox, E.C. **Real-time kinetics of gene activity in individual bacteria.** *Cell.* **2005**; 123(6):1025-1036.
- Gong, F. & Yanofsky, C. **Reproducing *tna* operon regulation in vitro in an S-30 system. Tryptophan induction inhibits cleavage of TnaC peptidyl-tRNA.** *The Journal of biological chemistry.* **2001**; 276(3):1974-1983.
- Gong, F. & Yanofsky, C. **A Transcriptional Pause Synchronizes Translation with Transcription in the Tryptophanase Operon Leader Region.** *Journal of Bacteriology.* **2003**; 185-21:6472–6476.
- Gong, M., Cruz-Vera, L.R. & Yanofsky, C. **RRF and RF3 action promotes TnaC-peptidyl-tRNA dropoff and relieves ribosome stalling during tryptophan induction of *tna* operon expression in *Escherichia coli*.** *J. Bacteriol.* **2007**; 189:3147–3155.
- Hernández-Valdez, A., Santillán, M. & Zeron, E.S. **Cycling expression and cooperative operator interaction in the *trp* operon of *Escherichia coli*.** *J. Theor. Biol.* **2010**; 263(3):340-52.
- Kaufman, M., Soulé, C. & Thomas, R. **A new necessary condition on interaction graphs for multistationarity.** *Journal of Theoretical Biology.* **2007**; 248:675–685
- Kolb, A., Busby, S., Buc, H., Garges, S. & Adhya, S. **Transcriptional regulation by cAMP and its receptor protein.** *Annu. Rev. Biochem.* **1993**; 62:749-95.
- Ku, S.Y., Yip, P. Howell, P.L. **Structure of *Escherichia coli* tryptophanase.** *Acta Cryst.* **2006**; D62:814–823.
- Lou, C., Liu, X., Ni, M., Huang, Y., Huang, Q., Huang, L., Jiang, L., Lu, D., Wang, M., Liu, C., Chen, D., Chen, C., Chen, X., Yang, L., Ma, H., Chen, J. & Ouyang, Q. **Synthesizing a novel genetic sequential logic circuit: a push-on push-off switch.** *Molecular systems biology.* **2010**; 6:350
- Ma, W., Trusina, A., El-Samad, H., Lim, W.A. & Tang, C. **Defining Network Topologies that can achieve biochemical adaptation.** *Cell.* **2009**; 138:760-773.
- Nelson, D.L. & Cox, M.M. **Lehninger Principles of Biochemistry.** *W.H. Freeman.* **2004**; 4 Ed.
- Ozbudak, E.M., Thattai, M., Lim, H.N., Shraiman, B.I. & van Oudenaarden, A. **Multistability in the lactose utilization network of *Escherichia coli*.** *Nature.* **2004**; 427:737-740.

- Pastan, I. & Perlman, R.L. **Stimulation of tryptophanase synthesis in *Escherichia coli* by cyclic 3',5'-Adenosine monophosphate.** *J. Biol. Chem.* **1969**; 244: 2226-2232.
- Paulsson, J. **Summing up the noise in gene networks.** *Nature.* **2004**; 427:415-419.
- Phillips, R.S., Johnson, N. & Kamath, A.V. **Formation in vitro of hybrid dimmers of H463F and Y74F mutant *Escherichia coli* tryptophan indole-lyase rescues activity with l-tryptophan.** *Biochemistry.* **2002**; 41: 4012-4019.
- Russell, D.R. & Bennett, G.N. **Construction and analysis of in vivo activity of *E. coli* promoter hybrids and promoter mutants that alter the -35 to -10 spacing.** *Gene.* **1982**; 20: 231-243.
- Rosenfeld, N., Young, J.W., Alon, U., Swain, P.S. & Elowitz, M.B. **Accurate prediction of gene feedback circuit behavior from component properties.** *Molecular Systems Biology.* **2007**; 3:143.
- Santillán, M. & Zeron, E. **Dynamic influence of feedback enzyme inhibition and transcription attenuation on the tryptophan operon response to nutritional shifts.** *J. Theor. Biol.* **2004**; 231: 287-298.
- Saur, R.T. **1999**; <http://mit.ocw.universia.net/7.51/f01/pdf/fa01-lec02.pdf>
- Snell, E.E. **Tryptophanase: structure, catalytic activities, and mechanism of action.** *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **1975**; 42:287-333.
- Stancik, L.M., Stancik, D.M., Schmidt, B., Barnhart, D.M., Yoncheva, Y.N. & Slonczewski, J.L. **pH-dependent expression of periplasmic proteins and amino acid catabolism in *Escherichia coli*.** *J Bacteriol.* **2002**; 184(15):4246-4258.
- Stewart, V. & Yanofsky, C. **Evidence for transcription antitermination control of tryptophanase operon expression in *Escherichia coli* K-12.** *Journal of bacteriology.* **1985**; 164(2):731-740.
- Strogatz, S.H. **Nonlinear dynamics and chaos: with applications to physics, biology, chemistry, and engineering.** *Adison-Wesley.* **1994**.
- Tan, C., Marguet, P. & You, L. **Emergent bistability by a growth-modulating positive feedback circuit.** *Nature Chemical Biology.* **2009**; 11-5:842-848.
- Thomas, R. & Kaufman, M. **Multistationarity, the basis of cell differentiation and memory. I. Structural conditions of multistationarity and other nontrivial behavior.** *Chaos.* **2001**; 11-1:170-179.
- Wang, D., Ding, X. & Rather, P.N. **Indole can act as an extracellular signal in *Escherichia coli*.** *J Bacteriol.* **2001**; 183: 4210-4216.

Watanabe, T. & Snell, E.E. **Reversibility of the tryptophanase reaction: Synthesis of tryptophan from indole, pyruvate, and ammonia.** *Proc. Nat. Acad. Sci.* **1972**; 62-5:1086-1090.

Wong, P., Gladney, S. & Keasling, J.D. **Mathematical model of the *lac* operon: inducer exclusion, catabolite repression, and diauxic growth on glucose and lactose.** *Biotechnol. Prog.* **1997**; 13:132-143.

Yanofsky, C., Horn, V. & Gollnick, P. **Physiological studies of tryptophan transport and tryptophanase operon induction in *Escherichia coli*.** *Journal of Bacteriology.* **1991**; 173-19:6009-6017.

Yanofsky, C. **RNA-based regulation of genes of tryptophan synthesis and degradation, in bacteria.** *RNA.* **2007**; 13:1141-1154.