



UNIVERSIDAD DE MURCIA

UNIVERSIDAD DE MURCIA - FACULTAD DE BIOLOGÍA

ARB: P4. Representación de redes de regulación de expresión génica

ASIGNATURA: (6653) ANÁLISIS DE REDES BIOLÓGICAS - MÁSTER DE BIOINFORMÁTICA
2023-2024

Autor:

Francisco Javier Redondo Anierte

orcid :

0000-0002-0794-5408

Coordinador del curso:

Álvaro Ortega Retuerta

24 de marzo de 2024

Índice

1. Introducción	2
2. Metodología	2
3. Actividades	3
3.1. Simulación de una red de regulación en una célula.	3
3.1.1. Expresar el sistema de ecuaciones para un red de regulación de proteínas	4
3.1.2. Demostrar y comentar el efecto de la cooperatividad, la constante de dilución/degradación del mensajero y el coeficiente de Hill	6
3.1.3. ¿Cómo incluiría en el sistema de ODE la formación del dímero AB , qué parámetros sería necesario conocer para su simulación?	11
3.1.4. Red metabólica mediante Cell Designer.	12
3.1.5. Importar el modelo generado en Cell Designer sobre COPASI.	12
3.2. Autorregulación positiva y negativa: Motivos NAR y PAR	14
3.2.1. Evaluar la autoregulación en la transcripción del gen a	14
3.2.2. Inclusión de NAR y PAR para el gen a en red completa	16
3.3. Motivo C1-FFL del sistema de arabinosa	18
3.3.1. Evolución temporal de los componentes del sistema de arabinosa de <i>Escherichia coli</i>	18
3.3.2. Describir el modelo del operón de arabinosa importado en COPASI	19
3.3.3. Análisis de eventos	20
3.3.4. Análisis de la señal cAMP	20
3.3.5. ¿Cómo sería el comportamiento si en lugar de incluirse una puerta AND se empleara una puerta OR para los factores CRP y araC?	20
3.3.6. Implementar un modelo para el sistema del operón lactosa de E.coli	20
3.3.7. ¿Cuáles son las principales diferencias entre ambos sistemas?	22
3.3.8. ¿Cuál es la adaptación principal que genera un motivo C1-FFL?	23

1. Introducción

Se pretenden alcanzar los siguientes objetivos:

1. Conocer el principio de funcionamiento de una expresión génica.
2. Montar una herramienta in silico para representar dentro del crecimiento celular los procesos de transcripción y regulación.
3. Medir la concentración de los componentes implicados y considerar que hay etapas limitantes debido presencia de factores de regulación y términos de dilución en la célula.
4. Aplicar la herramienta desarrollada para calcular las cuestiones planteadas.

2. Metodología

Se va a hacer uso de las siguientes aplicaciones:

- Berkeley Madonna [7]
- COPASI [2].
- Cell Designer [4]

3. Actividades

3.1. Simulación de una red de regulación en una célula.

El estudio de una red de regulación se puede realizar estableciendo un sistema de ecuaciones diferenciales que expresen la dinámica de concentraciones de proteínas con respecto del tiempo. A continuación, se van explicar algunos principios básicos que son útiles para la elaboración de este trabajo.

La velocidad de producción de una proteína A controlada por el factor de transcripción X en su forma activa, es proporcional a la velocidad en la que se produce ($f(A)$), menos su concentración por un factor de disociación y degradación (α_A):

$$\frac{dA}{dt} = f(A) - \alpha_A A$$

Los factores de transcripción que actúan como represores de las zonas promotoras siguen la ecuación de Hill siguiente:

$$f(A) = \frac{\beta_A K^n}{K^n + A^n}$$

Para una concentración de A mucho menor que K , el promotor se libera y la velocidad de producción alcanza el valor máximo de β . En este caso, la velocidad de producción de A es:

$$\frac{dA}{dt} = \beta_A - \alpha_A A$$

La ecuación de Hill para el caso de un activador de una región promotora es la siguiente:

$$f(A) = \frac{\beta_A A^n}{K^n + A^n} \quad (1)$$

En este caso, la producción de A es máxima cuando la concentración de A es mucho mayor que el coeficiente de activación K . El coeficiente de Hill (n) determina la forma de la curvatura de la función de Hill. La velocidad máxima está determinada por el parámetro β .

3.1.1. Expresar el sistema de ecuaciones para un red de regulación de proteínas

En este apartado se va a realizar el sistema de ecuaciones correspondiente a la Figura 1.

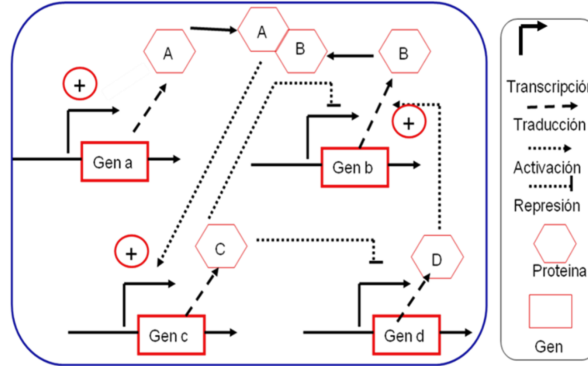


Figura 1: Representación de la red de regulación de la producción de proteínas

En la Figura 1 se muestra la expresión de genes y la interacción con los factores de transcripción que los regulan. Los valores iniciales de las variables, de las constantes de velocidad, dilución/degradación y cooperatividad son las siguientes:

- Valores iniciales de concentración de cada factor de transcripción: $\text{init } A = 0$; $\text{init } B = 0$; $\text{init } C = 0$; $\text{init } D = 0$
- Velocidades máximas de transcripción de cada gen (β): $V_a = 1$; $V_b = 1$; $V_c = 1$; $V_d = 1$
- Constantes de dilución / degradación (α): $k_{da} = 1$; $k_{db} = 0.1$; $k_{dc} = 0.1$; $k_{dd} = 1$
- Constantes de afinidad del factor (primer subíndice) por el sitio de unión en el promotor del gen (segundo subíndice) (K): $K_{d_b} = 5$; $K_{c_b} = 0.5$; $K_{c_d} = 0.5$; $K_{ab_c} = 0.1$
- Coeficientes de Hill (n): $h_{db} = 1$; $h_{cd} = 4$; $h_{abc} = 1$; $h_{cb} = 4$

Se ha creado el siguiente sistema de ecuaciones (ODE):

$$\begin{aligned}\frac{dA}{dt} &= V_a - k_{da} \cdot A \\ \frac{dB}{dt} &= V_b \cdot \left(\frac{K_{c_b}^{h_{cb}}}{K_{c_b}^{h_{cb}} + C^{h_{cb}}} \right) \cdot \left(\frac{D^{h_{db}}}{K_{d_b}^{h_{db}} + D^{h_{db}}} \right) - k_{db} \cdot B \\ \frac{dC}{dt} &= V_c \cdot \left(\frac{AB^{h_{abc}}}{K_{ab_c}^{h_{abc}} + AB^{h_{abc}}} \right) - k_{dc} \cdot C \\ \frac{dD}{dt} &= V_d \cdot \left(\frac{K_{c_d}^{h_{cd}}}{K_{c_d}^{h_{cd}} + C^{h_{cd}}} \right) - k_{dd} \cdot D\end{aligned}$$

Según el principio de la conservación de masas:

$$[A]_{\text{total}} = [A]_{\text{disociada}} + [AB]$$

$$[B]_{\text{total}} = [B]_{\text{disociada}} + [AB]$$

, en el supuesto teórico, de que la conversión de A y B en AB sea completa e inmediata, la concentración de las formas disociadas serán despreciables. Estas ecuaciones simplificadas podrían multiplicarse, para simular el *AND* lógico que supone la formación de un dímero ante la presencia necesaria de A y de B . Por tanto, quedaría así:

$$[AB] = ([A]_{\text{total}} \cdot [B]_{\text{total}})^{\frac{1}{2}}$$

Finalmente, la ecuación diferencial que expresa la velocidad de cambio de la concentración de C con el tiempo sería la siguiente:

$$\frac{dC}{dt} = V_c \cdot \left(\frac{(A \cdot B)^{habc/2}}{K_{ab-c}^{habc} + (A \cdot B)^{habc/2}} \right) - k_{dc} \cdot C \quad (2)$$

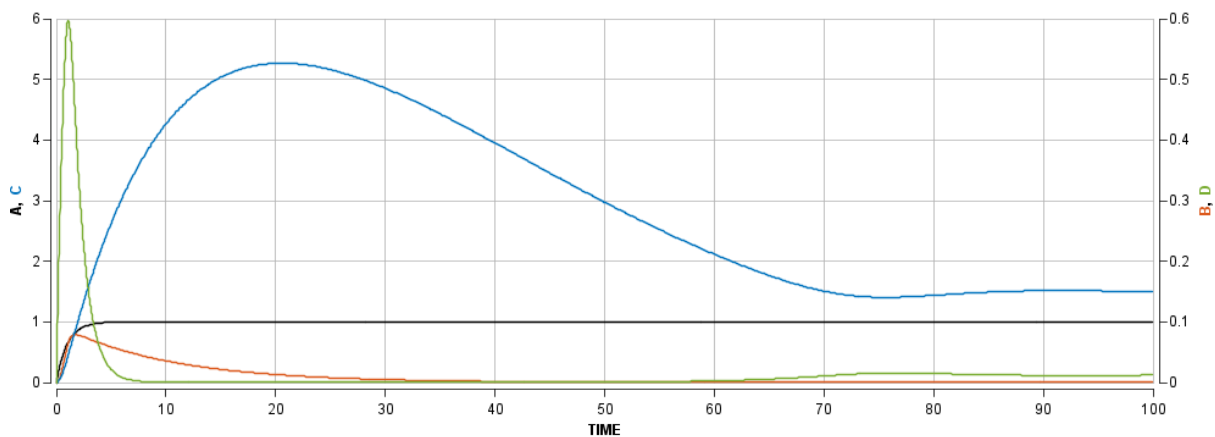


Figura 2: Berkeley Madonna: Evolución con el tiempo de A , B , C y D

Análisis de la Figura 2: La primera proteína en aumentar su concentración es D . Este pico de D , potencia la transcripción/traducción de B . Por otro lado, A aumenta su producción también rápidamente y se estabiliza puesto que tiene una constante de dilución alta. La generación del dímero AB aumenta la velocidad de producción de C , el cual inicia su acción inhibitoria sobre A y D . La caída en la producción de D y de B afecta a la producción del dímero AB , que a su vez hace descender el pico de C . Finalmente, todo se estabiliza.

3.1.2. Demostrar y comentar el efecto de la cooperatividad, la constante de dilución/degradación del mensajero y el coeficiente de Hill

Para este estudio hay que tener en cuenta como afecta del coeficiente de Hill (n) en la cooperatividad del sistema. Este coeficiente influye en la pendiente de la curva sigmoidea de estímulo-respuesta y, por tanto, es un parámetro de sensibilidad. Para ilustrar esto, se va a considerar la ecuación de Hill para el caso de un activador de una región promotora (Ecuación 1):

El coeficiente de Hill mayor que uno es indicativo de cooperatividad positiva y, por lo tanto, el sistema exhibe ultrasensibilidad [3]. Los sistemas con un coeficiente de Hill menor que 1 exhiben cooperatividad negativa. Por último, los sistemas con un coeficiente de Hill de 1 no son cooperativos y siguen la cinética clásica de Michaelis-Menten. Por ejemplo, las enzimas que exhiben actividad no cooperativa están representadas por curvas hiperbólicas de estímulo/respuesta, en comparación con las curvas sigmoidales de las enzimas cooperativas (ultrasensibles). Muchos procesos biológicos son binarios (ON-OFF), como las decisiones sobre el destino celular, los estados metabólicos y las vías de señalización. La ultrasensibilidad es un interruptor que ayuda a la toma de decisiones en este tipo de procesos biológicos.

Se ha elegido como caso de estudio, el efecto de producir **dos incrementos en cada uno de los parámetros que afectan a C** (Ecuación 2).

- Efectos sobre A :

En este caso de uso se esperaba que la dinámica de variación de A no se viera afectada y se ha comprobado que así ha sido para las diferentes variaciones realizadas en este experimento.

- Aumentos en el coeficiente de Hill.

El primer sumando de la Ecuación 2 es la ecuación de Hill para el caso de un activador (AB) de una región promotora. Habitualmente, se refiere al coeficiente de Hill como el exponente del activador (AB). En este caso, correspondería a $\frac{h_{abc}}{2}$. Se han elegido los siguientes valores para el parámetro h_{abc} : 1, 1.75 y 2.5, que corresponderán a exponentes de AB o coeficientes de Hill, respectivamente, de: 0.5, 0.875 y 1.25. Los dos primeros corresponden a cooperatividad negativa y el tercero a cooperatividad positiva. Se espera que C varíe con un pico más pronunciado de subida y bajada, según sea mayor h_{abc} , y, por tanto, en ese caso, habrá un aumento en la inhibición de la generación de B y D .

Se encuentra el siguiente comportamiento:

La Figura 3 muestra como la concentración de C tiene curvas más altas y estrechas conforme aumenta el parámetro $habc$. Al final se tiene a la estabilización en valores parecidos, pero ligeramente superiores en el caso de un $habc$ menor. Tiene una relación inversamente proporcional en el estado estacionario.

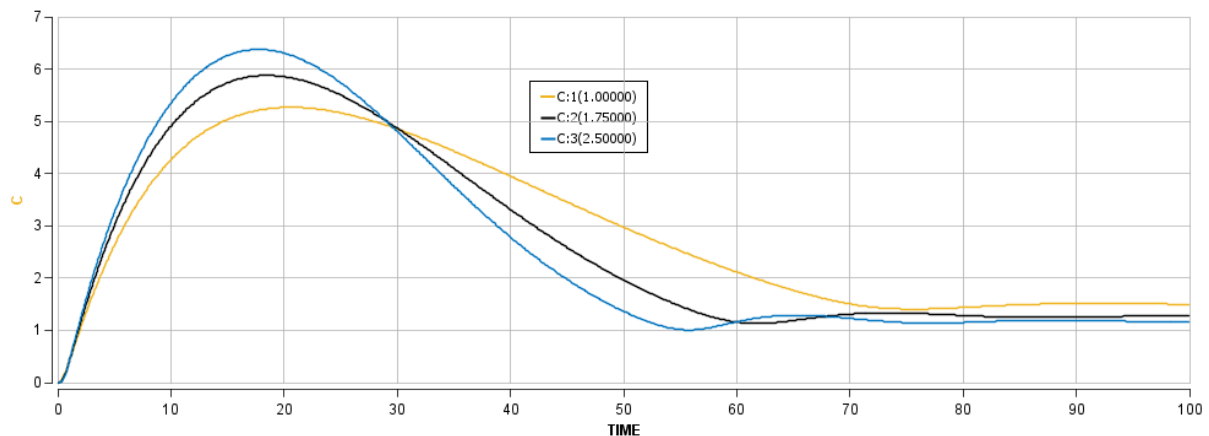


Figura 3: Cambios en $habc$ sobre C

Las Figuras 4 y 5, muestran una inhibición muy pronunciada de B y D cuando C aumenta su concentración. La variación del parámetro $habc$ no tiene un efecto mayor sobre B y D puesto que la inhibición alcanza el límite de saturación y ésta es máxima. Posteriormente, cuando la concentración de C disminuye se provoca un ligero aumento en la producción tanto de B como de D en la fase estacionaria. Ambos dos acaban estabilizándose, con valores muy bajos.

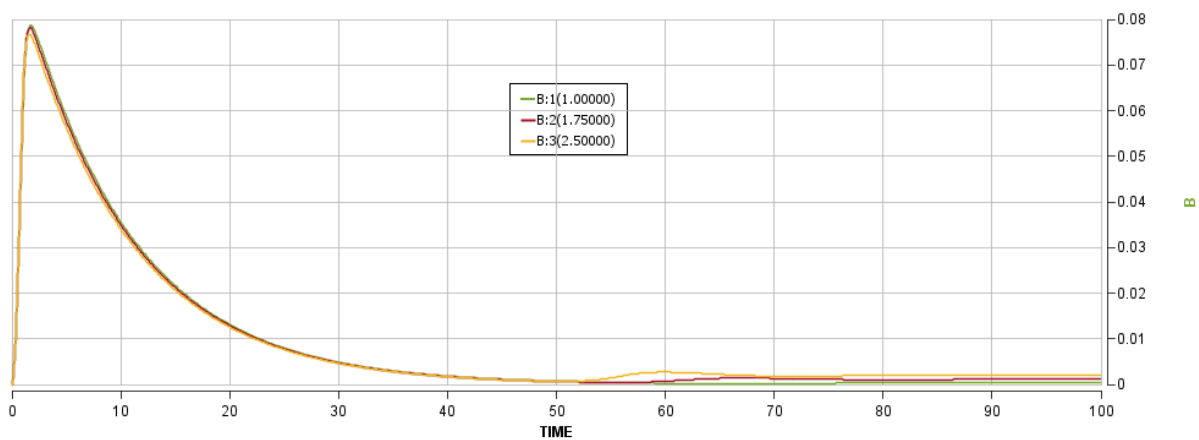
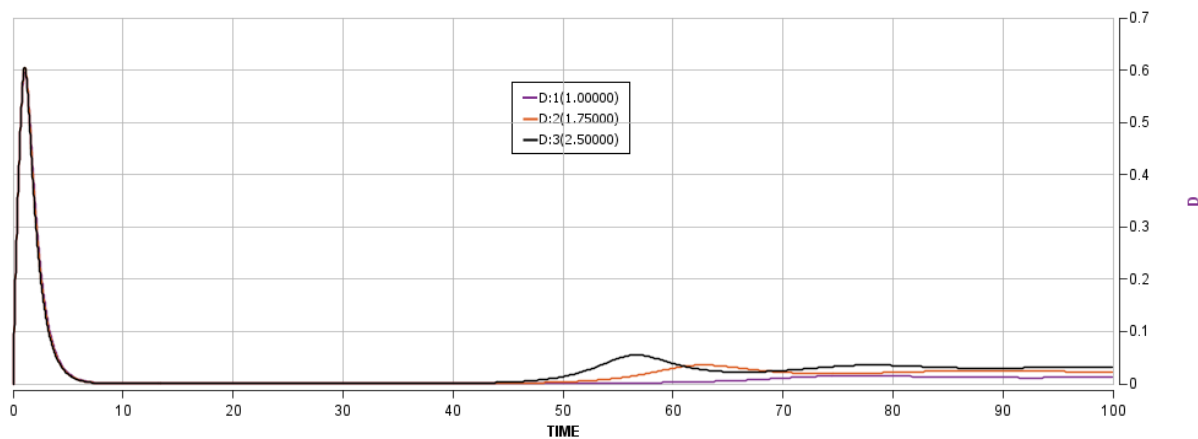


Figura 4: Cambios en $habc$ sobre B

Figura 5: Cambios en *h_{abc}* sobre D

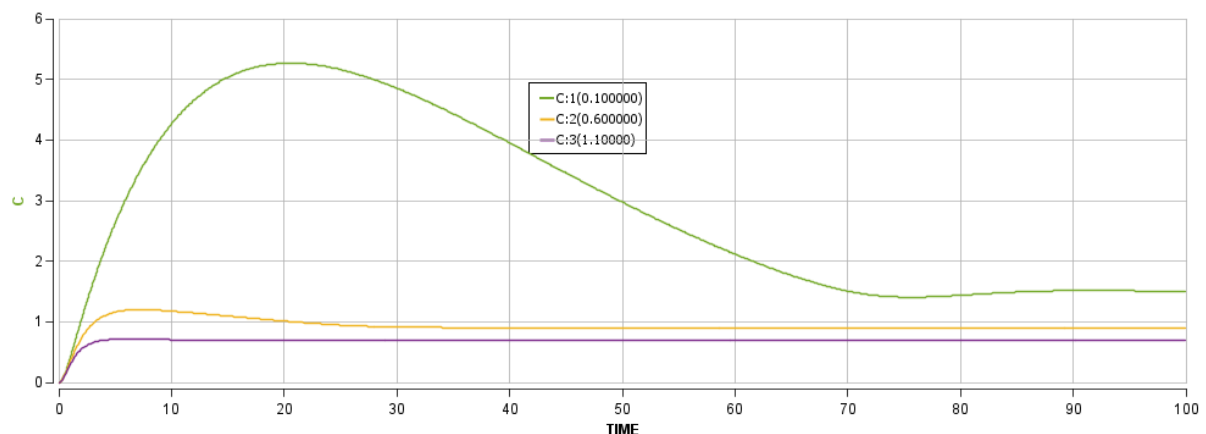
■ Aumento de la constante de dilución/degradación del mensajero (*k_{dc}*)

Se van a dar los siguientes valores al parámetro *k_{dc}*: 0.1, 0.6 y 1.1.

Puesto que la velocidad de degradación es mayor cuanto mayor es la concentración de *C*, se espera que mayores valores de *k_{dc}* suavicen los picos de incremento de *C*, para acabar en valores constantes en el estado estacionario. Por otro lado *B* y *D* han de estar afectadas en relación a que la línea de estabilización será más alta ya que el pico de inhibición es más suave.

Se encuentra el siguiente comportamiento:

La Figura 6 muestra cómo la concentración de *C* está más regulada, y es también algo más baja, conforme aumenta el coeficiente de dilución y degradación *k_{dc}*. Es una relación inversamente proporcional.

Figura 6: Cambios en *k_{dc}* sobre C

Las Figuras 7 y 8, muestran cómo la disminución de la concentración de C , debida a un aumento del coeficiente k_{dc} , provoca el aumento en la producción tanto de B como de D . Por tanto, ambos dos tienen una relación directamente proporcional.

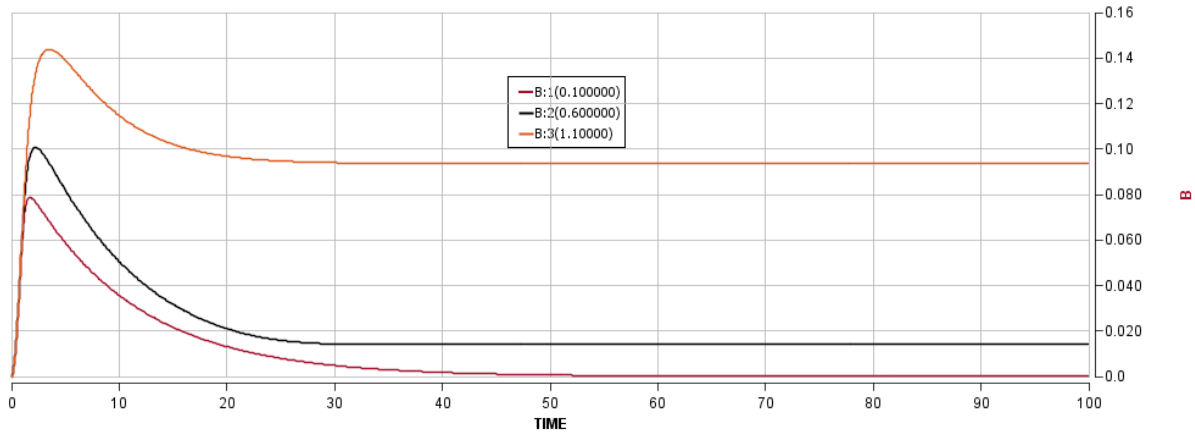


Figura 7: Cambios en k_{dc} sobre B

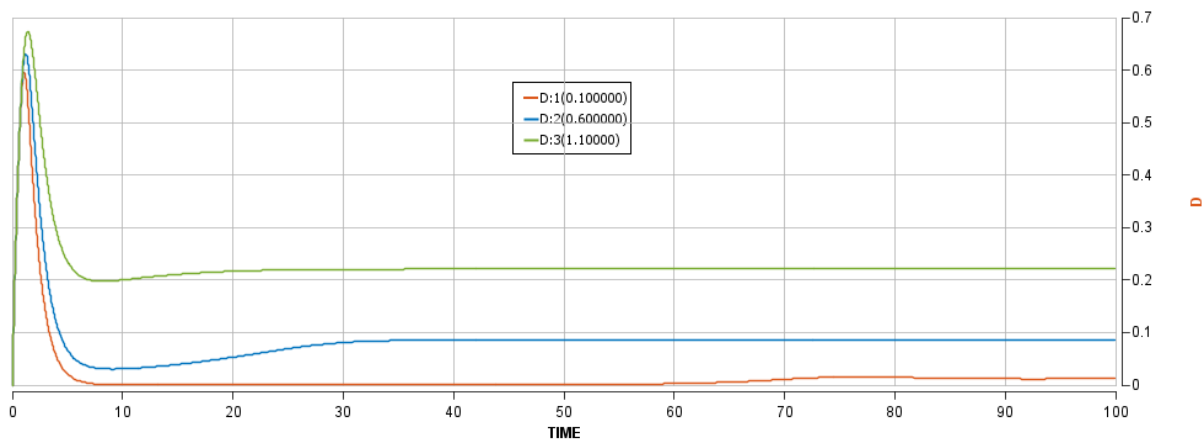


Figura 8: Cambios en k_{dc} sobre D

- Aumento en la constante de afinidad del factor AB por el sitio de unión en el promotor del gen C (K_{ab_c})

Se van a dar los siguientes valores al parámetro K_{ab_c} : 0.1, 0.6 y 1.1.

La constante refleja la concentración de AB a la que se llega a la mitad de la velocidad máxima en la producción de C . Valores más pequeños de la constante K_{ab_c} , implican curvas de concentración de C más rápidas, elevadas y sostenidas en el tiempo. En relación a la velocidad del cambio de la concentración de B y D , se espera que a mayor K_{ab_c} las curvas sean más altas y pronunciadas, ya que la concentración de C es menor y también su efecto inhibitorio.

Se encuentra el siguiente comportamiento:

La Figura 9 muestra cómo la concentración de C es mayor (valores máximos más altos y curvas más alargadas) para valores menores de Kab_c como era de esperar. Es una relación inversamente proporcional.

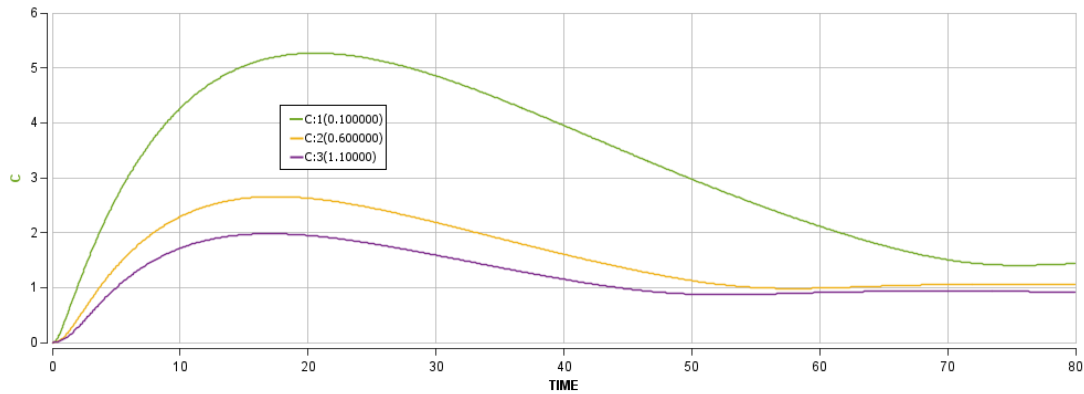


Figura 9: Cambios en Kab_c sobre C

Las Figuras 10 y 11, muestran cómo la disminución de la concentración de C , debida a un aumento de la constante Kab_c , provoca el aumento en la producción tanto de B como de D . Por tanto, ambos dos tienen una relación directamente proporcional.

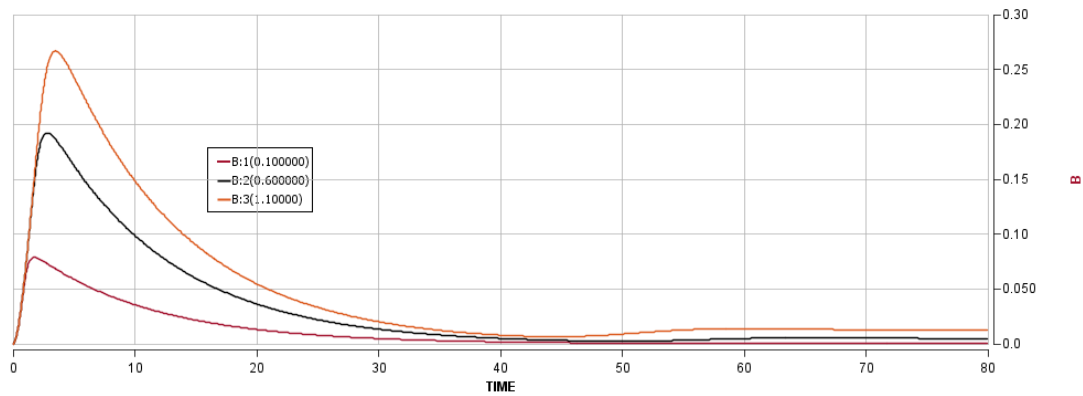


Figura 10: Cambios en Kab_c sobre B

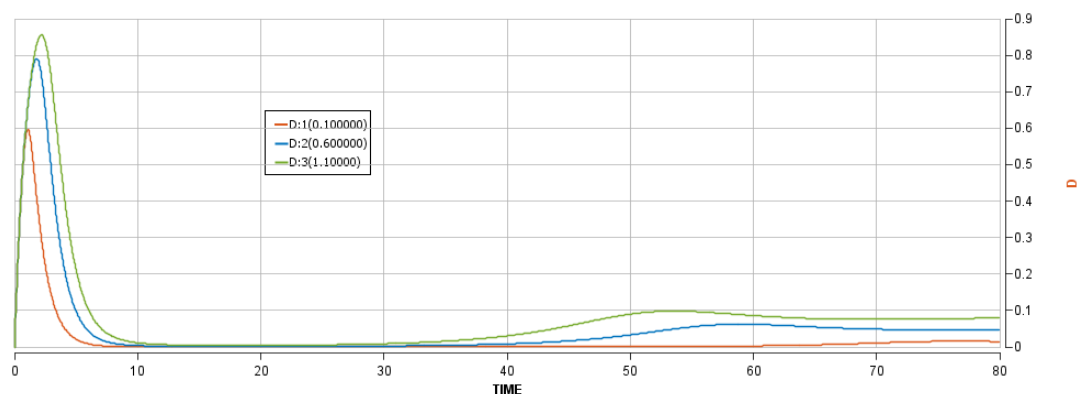


Figura 11: Cambios en Kab_c sobre D

3.1.3. ¿Cómo incluiría en el sistema de ODE la formación del dímero AB , qué parámetros sería necesario conocer para su simulación?

La formación del dímero se puede representar con la siguiente reacción reversible: $A + B \rightleftharpoons AB$

El cambio de concentración del dímero AB con el tiempo, correspondería a la velocidad de formación de AB , menos, la velocidad de descomposición de AB . Expresado mediante una ecuación quedaría de la siguiente manera:

$$\frac{d[AB]}{dt} = k_f \cdot [A] \cdot [B] - k_r \cdot [AB] \quad (3)$$

- k_f es la constante de velocidad de la formación de AB .
- k_r es la constante de velocidad de la descomposición de AB .

Una vez conocidas las constantes de velocidad anteriores, el cambio de concentración de C con el tiempo quedaría así:

$$\frac{d[C]}{dt} = V_c \cdot \left(\frac{[AB]^{habc}}{K_{ab,c}^{habc} + [AB]^{habc}} \right) - k_{dc} \cdot [C]$$

En la Figura 12 se ha tenido en cuenta una velocidad de descomposición del dímero 10 veces menor que de formación de éste. Al final de las oscilaciones se llega, igualmente, a un sistema en equilibrio (estado estacionario).

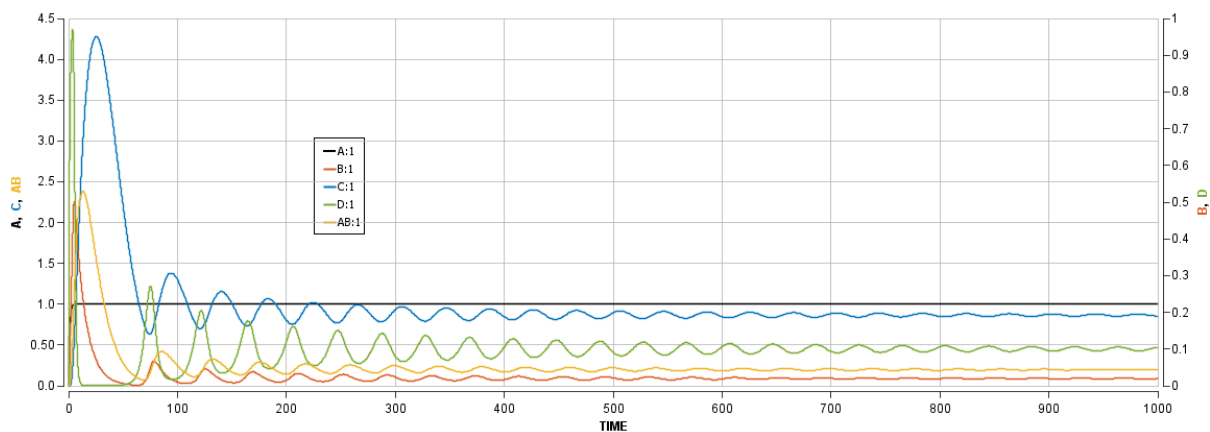


Figura 12: Berkeley Madonna: Evolución del dímero AB para $k_f = 1$ y $k_r = 0,1$

3.1.4. Red metabólica mediante Cell Designer.

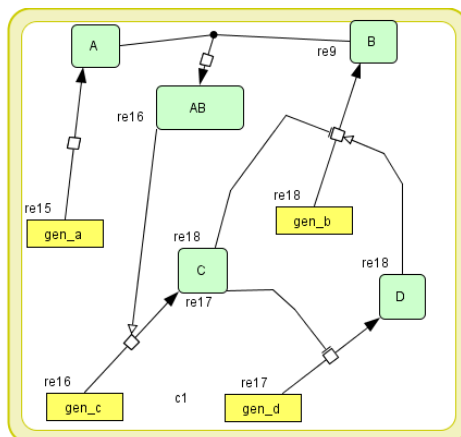


Figura 13: Red metabólica representada con Cell Designer

Este modelo se exporta a un archivo con formato SBML y posteriormente se importa en la aplicación COPASI.

3.1.5. Importar el modelo generado en Cell Designer sobre COPASI.

- Implementar el sistema de ecuaciones que representa cada una de las reacciones incluidas en el modelo.

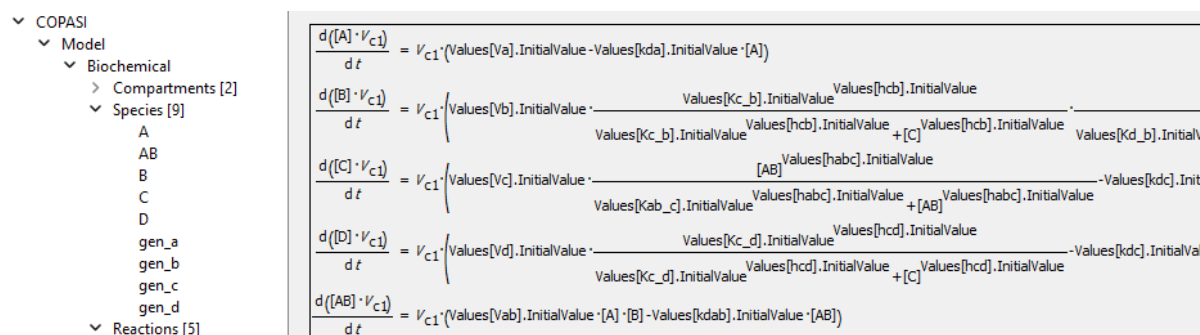


Figura 14: Ecuaciones diferenciales introducidas en COPASI

- ¿Qué modificaciones son necesarias para completar el sistema de ecuaciones tal y como se ha diseñado manualmente.

Se requiere introducir las propiedades iniciales globales y programar las ecuaciones diferenciales en cada especie. Se puede ver en la Figura 15 como se ha implementado el cambio en [A]:

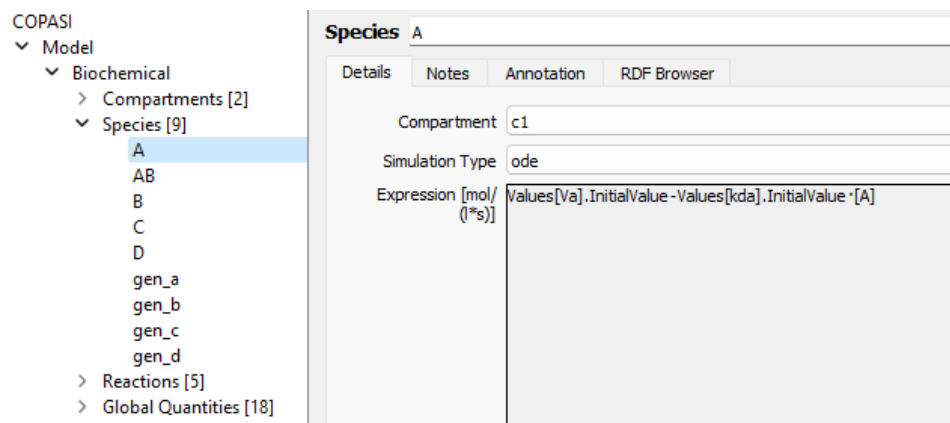


Figura 15: COPASI: Ecuación diferencial de A

- ¿Es posible generar un sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias idéntico al generado manualmente, implementando especies y reacciones en COPASI?

Sí, en la Figura 15 se muestra la simulación obtenida en COPASI. Como se puede ver, es similar al resultado obtenido manualmente (Figura 12).

3.2. Autorregulación positiva y negativa: Motivos NAR y PAR

En este apartado se va a evaluar la autorregulación de la transcripción del gen a de la Figura 1, para ello se va a emplear la constante de Hill de afinidad del factor de transcripción A por su promotor $K_{a-a} = 3$

3.2.1. Evaluar la autoregulación en la transcripción del gen a .

En este apartado se incluye, únicamente, la simulación del gen a , independientemente del resto de componentes de la red de la Figura 1, en un sistema no regulado o simple (As), con una autorregulación negativa ($Anar$) y con una autorregulación positiva ($Apar$).

El sistema de ecuaciones diferenciales para el estudio es:

$$\frac{dAs}{dt} = V_a - k_{da} \cdot As$$

$$\frac{dAnar}{dt} = V_a \cdot \left(\frac{K_{a-a}^{haa}}{K_{a-a}^{haa} + Anar^{haa}} \right) - k_{da} \cdot dAnar \quad (4)$$

$$\frac{dApar}{dt} = V_a \cdot \left(\frac{dApar^{haa}}{K_{a-a}^{haa} + Apar^{haa}} \right) - k_{da} \cdot dApar \quad (5)$$

- ¿Cuáles son las principales diferencias entre los tres sistemas?

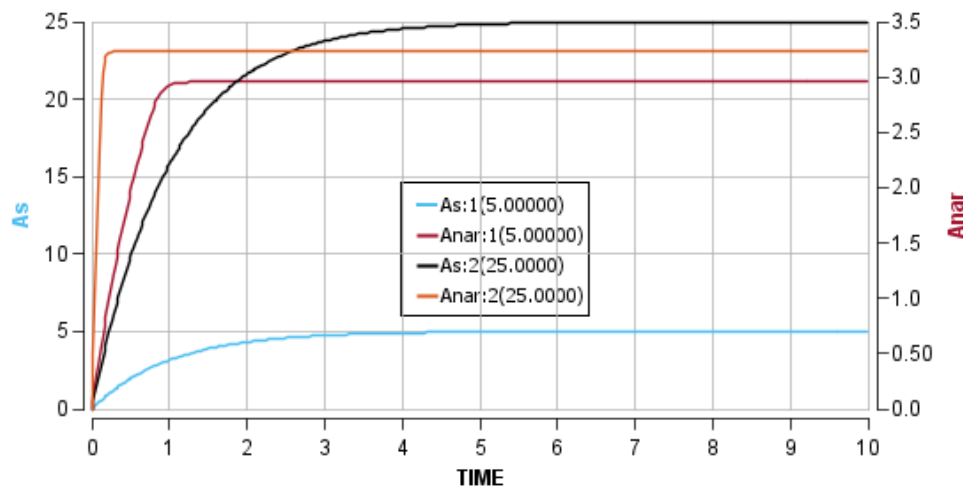


Figura 16: NAR: Simple (As) vs NAR ($Anar$)

La Figura 16, compara el comportamiento de un sistema No Regulado (As) y un sistema NAR ($Anar$), para dos modificaciones de la velocidad: 5 y 25.

Como se puede ver, NAR provee robustez al sistema respecto a las variaciones en la velocidad

de producción de proteína. Los cambios en la velocidad alteran muy poco los valores de concentración de proteína en el estado estacionario para el caso *Anar*, en cambio, el sistema No Regulado (*As*) pasa de 5 a 25.

Otro aspecto a resaltar es la rapidez con la que se alcanza el estado estacionario. La respuesta es más rápida en el sistema NAR, que con el sistema No Regulado.

En la Figura 17 se compara el comportamiento de un sistema No Regulado (*As*) y un sistema PAR (*Apar*), para una concentración inicial de 0,01 de proteína. Como se puede ver, el sistema PAR tiene una respuesta retardada, pero, finalmente, alcanza el estado estacionario.

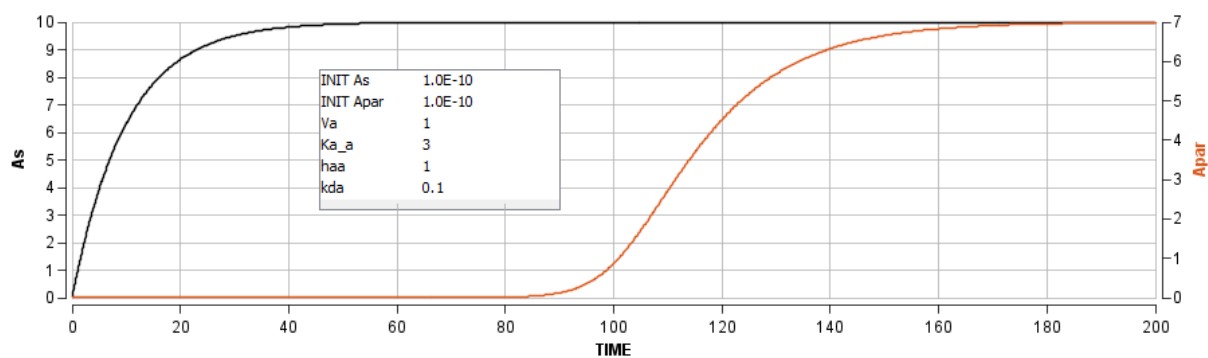


Figura 17: PAR: Simple (*As*) vs PAR (*Apar*)

En la Figura 18 se muestra la variación de la concentración inicial del sistema PAR (*Apar*), para los valores 6, 7 y 8. Se pretende ilustrar el hecho que los sistemas con autoregulación positiva tienen memoria alrededor de la concentración de proteína en el estado estacionario. Independientemente, de la concentración inicial de proteína el sistema PAR regula su concentración para dejarla siempre en el mismo valor en el estado estacionario.

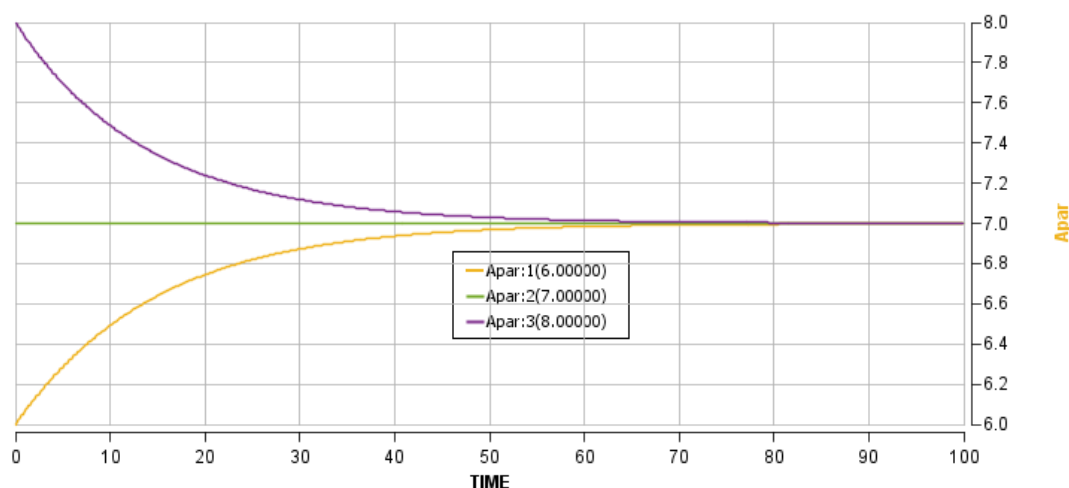


Figura 18: PAR: Estado estacionario al variar la concentración inicial

- ¿Qué ventajas evolutivas supondrían la presencia de estos motivos en la transcripción de un gen?

El sistema PAR, permite evitar oscilaciones de las concentraciones finales de proteína, tiene una respuesta sólida a señales independiente de la concentración y permite crear sistema Biestables con dos estados de memoria en el estado estacionario [5].

El sistema NAR permite alcanzar la velocidad de transcripción máxima de una manera más rápida. Además, ofrece robustez [6], ya que el sistema regula la concentración final de la proteína sin afectarse por los cambios de velocidad en la producción de la misma.

3.2.2. Inclusión de NAR y PAR para el gen *a* en red completa

En este apartado se van a incluir las alternativas NAR y PAR a la regulación de la transcripción del gen *a* en la red simulada de mostrada en la Figura 1.

Como ejemplo, se muestra en la Figura 19 la representación de la red incluyendo el motivo NAR. El motivo PAR se representaría de manera análoga sustituyendo la inhibición sobre el gen *a*, por una activación.

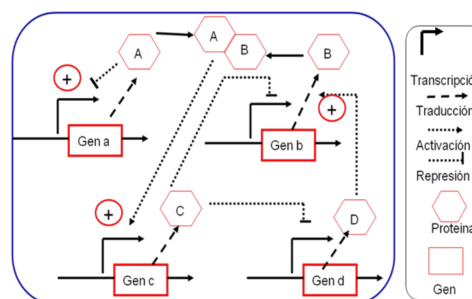


Figura 19: Representación de la red incluyendo el motivo NAR

Las ecuaciones 4 y 5 se introducen en el sistema de ecuaciones global. El resultado se muestra en las Figuras 20 y 21.

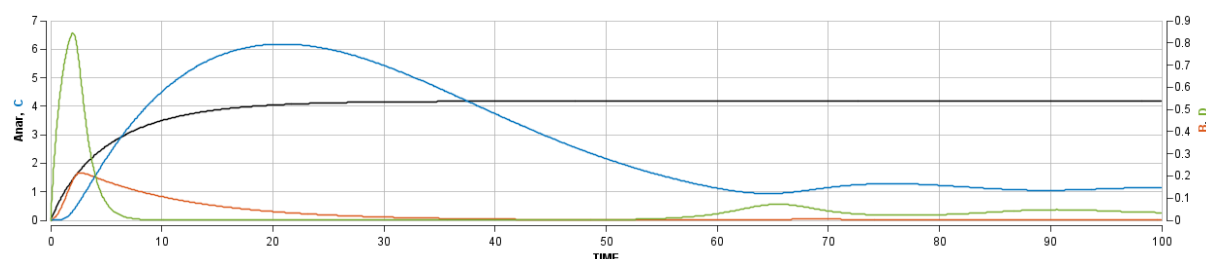


Figura 20: Red metabólica con autoregulación negativa del gen *a* (NAR)

Como se puede ver en la Figura 20, el periodo previo a alcanzarse la concentración de la fase estacionaria de A , permite generar unos picos de producción de B y D . Una vez que se forma el dímero AB , se potencia la generación de C . En este momento comienza el decrecimiento de B y D rápidamente, como consecuencia de la inhibición por parte de C .

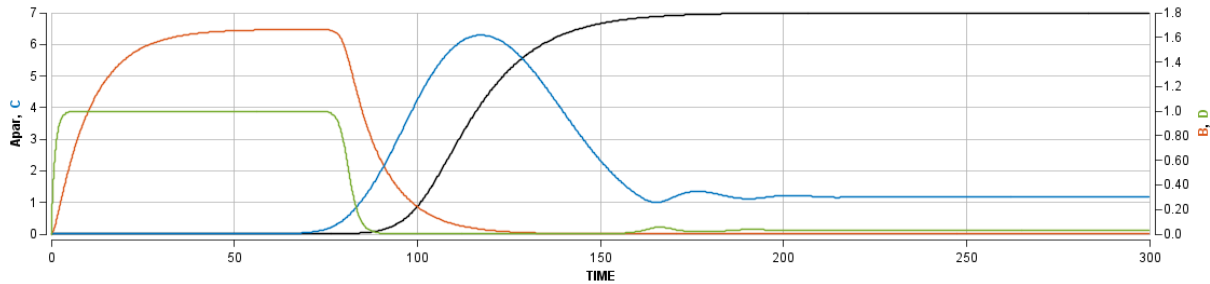


Figura 21: Red metabólica con autoregulación positiva del gen a (PAR)

Como se puede ver en la Figura 21, el periodo previo a alcanzarse la concentración de la fase estacionaria de A es mucho más largo que con el caso NAR (mostrado en la Figura 20). Esto permite generar unos picos de producción de B y D más extensos en el tiempo. Una vez que se forma el dímero AB , se potencia la generación de C . En este momento comienza el decrecimiento de B y D rápidamente, como consecuencia de la inhibición por parte de C .

Otro detalle importante, es que la concentración máxima de B es más alta en el caso PAR, ya que está potenciada durante más tiempo por D .

3.3. Motivo C1-FFL del sistema de arabinosa

El motivo “feedforward loop” (FFL) en su variante coherente de tipo I (C1), consiste en la activación de la transcripción de un gen a partir de la acción de dos factores de transcripción en su forma activada: X^* e Y^* (equivale a un circuito AND, como se muestra en la Figura 23). Además, la generación de uno de los factores de transcripción está regulado de manera positiva por la forma activa del otro. La Figura 22 muestra cómo funciona dicho sistema y cómo depende también del estímulo de dos moléculas señalizadoras (S_x y S_y).

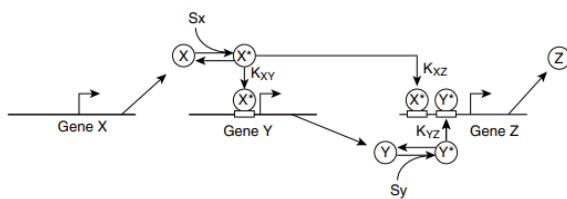


Figura 22: Motivo C1-FFL [6]

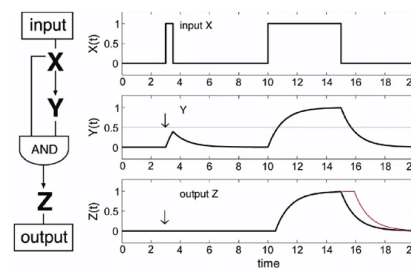


Figura 23: Análisis de eventos de los pulsos de X [6]

3.3.1. Evolución temporal de los componentes del sistema de arabinosa de *Escherichia coli*

Un ejemplo importante en *Escherichia coli* del motivo C1-FFL es el sistema de arabinosa (Figura 24). Este consiste en proteínas que transportan arabinosa hacia el interior de la célula y la rompen para su uso como fuente de carbono y energía. La arabinosa se emplea en este organismo únicamente cuando no hay glucosa disponible, y por tanto debe activarse este sistema en su ausencia, indicada mediante una señal intracelular en forma de cAMP. El sistema consiste en dos activadores de la transcripción de los genes implicados en la asimilación de arabinosa: CRP que detecta cAMP y araC, que detecta directamente arabinosa.

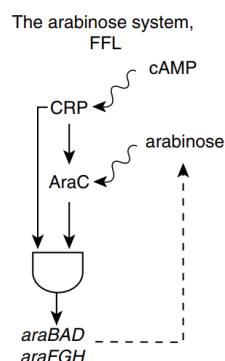


Figura 24: Motivo C1-FFL del sistema de arabinosa [6]

3.3.2. Describir el modelo del operón de arabinosa importado en COPASI

En la Figura 25 se muestra con Cell Designer el modelo importado de Biomodels [1], mientras que en la Figura 26 se muestra el sistema de ecuaciones que explica cómo varía con el tiempo la producción de Y ($AraC$) y Z ($araBAD/araFGH$).

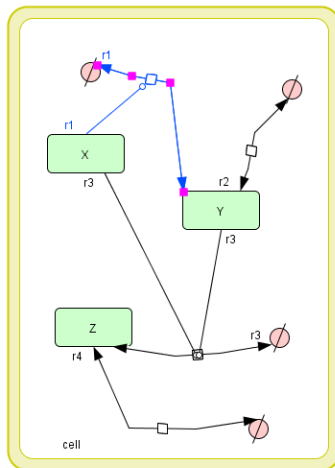


Figura 25: Modelo BIOMD0000000316 importado de Biomodels

$$\begin{aligned} \frac{d([Y] \cdot V_{\text{cell}})}{dt} &= +V_{\text{cell}} \cdot \left(\frac{F([X], 0.5)}{V_{\text{cell}}} \right) \\ &\quad - V_{\text{cell}} \cdot \left(\frac{1 \cdot [Y]}{V_{\text{cell}}} \right) \\ \frac{d([Z] \cdot V_{\text{cell}})}{dt} &= -V_{\text{cell}} \cdot \left(\frac{1 \cdot [Z]}{V_{\text{cell}}} \right) \\ &\quad + V_{\text{cell}} \cdot \left(\frac{F([X], 0.5) \cdot F([Y], 0.5)}{V_{\text{cell}}} \right) \end{aligned}$$

Figura 26: COPASI: Sistema de ecuaciones diferenciales del modelo del operón *ara*

La función $F(V, p) : \mathbb{R} \times \mathbb{R} \rightarrow \{0, 1\}$ a la que se refieren las ecuaciones mostradas en la Figura 26, tiene la siguiente lógica: $if(V \geq p, 1, 0)$.

En la Figura 27 se muestra la simulación realizada en COPASI.

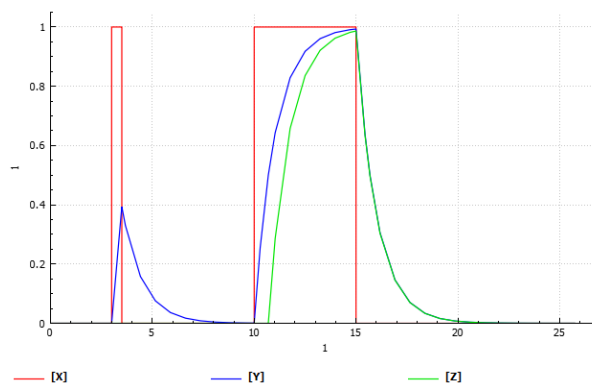


Figura 27: Evolución temporal de la expresión de Y y Z tras dos pulsos de X

Se pueden apreciar dos pulsos de X , uno entre los instantes 3 y 3.5 y otro, más largo, entre 10 y 15. Otro detalle a considerar, es que el pulso Z sólo se empieza a generar cuando la concentración de Y supera el umbral de 0.5 y hay presencia de X .

3.3.3. Análisis de eventos

- ¿Cuál es la principal diferencia entre la respuesta obtenida tras el primer evento y la obtenida tras el segundo?. ¿En qué se diferencian estos dos eventos?

Como se puede observar en las Figuras 27 y 23 cuando X se activa, la señal se transmite a la salida Z por dos vías, una directa desde X y otra retardada a través de Y . Si la activación de X es transitoria, Y no puede alcanzar el nivel necesario para activar significativamente Z , y la señal de entrada no se transmite a través del circuito. Solo cuando X permanece durante el tiempo suficiente para que los niveles de Y puedan acumularse, se activará Z . Una vez que X se desactiva, Z decae rápidamente.

3.3.4. Análisis de la señal cAMP

(Representado por la activación del factor CRP, o comienzo y final del pulso).

- ¿Qué ocurre cuando aparece la señal de cAMP?. ¿Qué ocurre cuando ésta deja de estar presente?.

La señal de cAMP indica una ausencia de Glucosa (primer requisito para que se active la transcripción del transportador de arabinosa) y activa la transcripción del factor CRP.

La presencia de glucosa, hace que baje la concentración de cAMP y, por tanto, disminuye rápidamente la producción de CRP.

3.3.5. ¿Cómo sería el comportamiento si en lugar de incluirse una puerta AND se empleara una puerta OR para los factores CRP y araC?

Un modelo en OR no sería adecuado para la captación de arabinosa, ya que desperdiciaría recursos. En ese caso, se activaría únicamente en presencia de glucosa, sin estar presente la arabinosa, o, incluso, se activaría en presencia de arabinosa cuando también hay glucosa en el medio.

3.3.6. Implementar un modelo para el sistema del operón lactosa de E.coli

El operón *lac* de *E. coli* contiene los genes involucrados en el metabolismo de la lactosa. Se expresa solamente cuando la lactosa está presente y la glucosa está ausente. Dos reguladores “encienden” y “apagan” el operón en respuesta a los niveles de lactosa y de glucosa: el represor

lac y la CRP. El represor *lac* actúa como un sensor de la lactosa. Normalmente bloquea la transcripción del operón, pero deja de actuar como represor cuando la lactosa está presente. El represor *lac* detecta la lactosa indirectamente, a través de su isómero alolactosa. Cuando la lactosa no está disponible, el represor *lac* se une firmemente al operador, y así evita la transcripción por la ARN polimerasa. Sin embargo, cuando la lactosa está presente, el represor *lac* pierde su capacidad de unirse al ADN. Se separa del operador, y despeja el camino para que la ARN polimerasa transcriba el operón.

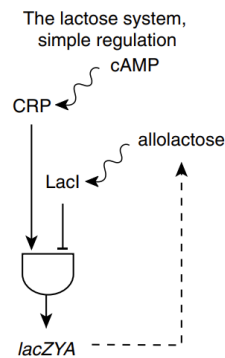


Figura 28: Operón lactosa [6]

- Implementar en COPASI un modelo para el sistema del operón lactosa de *E. coli*.

En la Figura 29 se muestra con Cell Designer el modelo creado con COPASI, mientras que en la Figura 30 se muestra el sistema de ecuaciones que explica cómo varía con el tiempo la producción de *Y* (*LacI*) y *Z* (*lacZYA*).

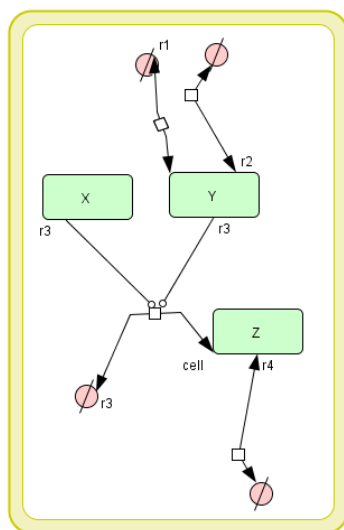


Figura 29: Modelo de operón lactosa

$$\begin{aligned} \frac{d([Y] \cdot V_{\text{cell}})}{dt} &= +V_{\text{cell}} \cdot \left(\frac{0.5}{V_{\text{cell}}} \right) \\ &\quad - V_{\text{cell}} \cdot \left(\frac{1 \cdot [Y]}{V_{\text{cell}}} \right) \\ \frac{d([Z] \cdot V_{\text{cell}})}{dt} &= +V_{\text{cell}} \cdot \left(\frac{F([X], 0.5) \cdot (1 - F([Y], 0.5))}{V_{\text{cell}}} \right) \\ &\quad - V_{\text{cell}} \cdot \left(\frac{1 \cdot [Z]}{V_{\text{cell}}} \right) \end{aligned}$$

Figura 30: COPASI: Ecuaciones diferenciales del modelo de operón *lac*

La función $F(V, p) : \mathbb{R} \times \mathbb{R} \rightarrow \{0, 1\}$ a la que se refieren las ecuaciones mostradas en la Figura 30, tiene la siguiente lógica: $if(V \geq p, 1, 0)$.

- Realice la simulación de la evolución temporal de las proteínas involucradas en este operón.

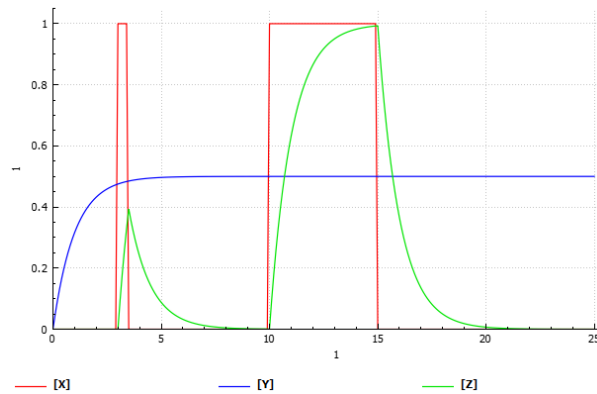


Figura 31: COPASI: Evolución temporal de proteínas en operón *lac*

3.3.7. ¿Cuáles son las principales diferencias entre ambos sistemas?

La Figura 27 muestra la evolución temporal, en el operón *ara* (motivo C1-FFL), de la expresión de *Y* y *Z* tras dos pulsos de *X*, mientras que la Figura 31, lo hace, igualmente, para el operón *lac* (regulación SIMPLE).

Diferencias encontradas:

- Retardo después de los pasos de activación en C1-FFL: Se puede ver en la Figura 27 como el pico de *Z* (en verde) aparece con un retardo, posteriormente al momento 10. Este retardo no se produce en el caso de la regulación Simple (Figura 31).
- En la desactivación no hay retraso en ninguno de los dos modelos.
- Estímulos filtrados por duración en C1-FFL: Ante un estímulo menor de un umbral, no hay respuesta de *Z* en el caso C1-FFL y sí en la regulación Simple, como se puede ver en la Figura 31.
- *Y* es independiente de *X* en el caso de modelo Simple. En concreto, en el operón *lac*, *LacI* exhibe una cinética similar a la de Michaelis-Menten. La función $(1-F(V,p))$, aplicada a *Y* permite desconectar su acción represora sobre *Z* una vez que la concentración de *Y* alcanza el nivel *p*.

3.3.8. ¿Cuál es la adaptación principal que genera un motivo C1-FFL?

El retraso observado en el FFL de arabinosa permite filtrar las fluctuaciones cortas en la señal de entrada de cAMP. Responde únicamente a estímulos largos, como períodos persistentes de privación de glucosa que requieren la utilización del azúcar arabinosa. Esto permite una mejor gestión de los recursos.

Por otro lado, el retraso en la aparición de Z también tiene una desventaja, porque durante pulsos largos, Z se produce sólo con retraso y no se produce parte del beneficio potencial del pulso.

Los estudios de funciones de adecuación [6] que tienen en consideración el coste/beneficio, permiten entender por qué se selecciona evolutivamente un modelo de regulación Simple para el caso del operón *lac* y un modelo con el motivo C1-FFL en el caso del operón *ara*.

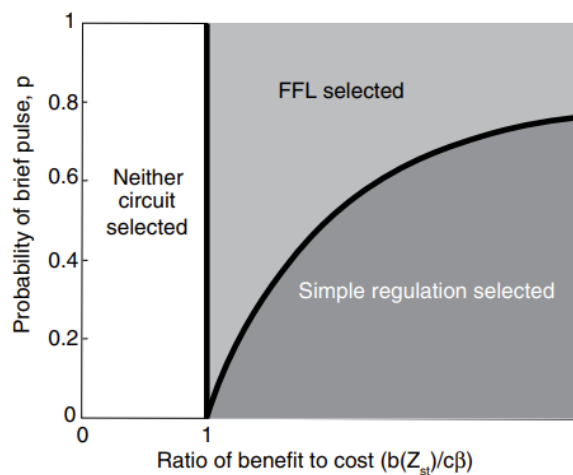


Figura 32: Estudios de adecuación según coste/beneficio.[6]

Referencias

- [1] Shai S Shen-Orr et al. «Network motifs in the transcriptional regulation network of *Escherichia coli*». En: *Nature genetics* 31.1 (2002), págs. 64-68. DOI: [10.1038/ng881](https://doi.org/10.1038/ng881). URL: <https://doi.org/10.1038/ng881>.
- [2] Stefan Hoops et al. «COPASI—a COmplex PAthway SIMulator». En: *Bioinformatics* 22.24 (oct. de 2006), págs. 3067-3074. ISSN: 1367-4803. DOI: [10.1093/bioinformatics/btl485](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl485).
- [3] Nils Blüthgen et al. «Mechanisms Generating Ultrasensitivity, Bistability, and Oscillations in Signal Transduction». En: *Introduction to Systems Biology*. Ed. por Sangdun Choi. Totowa, NJ: Humana Press, 2007, págs. 282-299. ISBN: 978-1-59745-531-2. DOI: [10.1007/978-1-59745-531-2_15](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-531-2_15).
- [4] Akira Funahashi et al. «CellDesigner: A Graphical Biological Network Editor and Workbench Interfacing Simulator». En: *Introduction to Systems Biology*. Ed. por Sangdun Choi. Totowa, NJ: Humana Press, 2007, págs. 422-434. ISBN: 978-1-59745-531-2. DOI: [10.1007/978-1-59745-531-2_21](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-531-2_21).
- [5] Omer Karin y Uri Alon. «Biphasic response as a mechanism against mutant takeover in tissue homeostasis circuits». En: *Molecular Systems Biology* 13.6 (2017), pág. 933. DOI: <https://doi.org/10.15252/msb.20177599>.
- [6] Uri Alon. *An introduction to systems biology: design principles of biological circuits*. Chapman y Hall/CRC, 2019.
- [7] Frank V. Marcoline et al. «Berkeley Madonna Version 10—A simulation package for solving mathematical models». En: *CPT: Pharmacometrics & Systems Pharmacology* 11.3 (2022), págs. 290-301. DOI: <https://doi.org/10.1002/psp4.12757>.