



Dinámica de circuitos de regulación genética en bacterias

María Lorena Espinar Calvo

Memoria presentada para optar al grado de Doctor por la
Universidad Politécnica de Cataluña

Director:

Jordi García Ojalvo

Departamento de Física e Ingeniería Nuclear

Universidad Politécnica de Cataluña

Terrassa, 2012

Dinámica de circuitos de regulación genética en bacterias

Resumen

El objetivo de esta Tesis es el estudio de diferentes comportamientos celulares dinámicos en los microorganismos *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*. Resulta interesante comprender cómo estos organismos sencillos poseen mecanismos no tan simples para responder al entorno en el que se encuentran. Dicha respuesta está regulada por complicadas redes de regulación formadas por genes y proteínas, donde al igual que los instrumentistas de una orquesta, cada elemento de las redes genéticas debe tomar parte en armonía, en el momento justo y la cantidad adecuada para dar lugar a la respuesta celular apropiada. A continuación, se describe brevemente el contenido de los Capítulos que se encontrarán en esta Tesis.

En la Parte I se introducen algunos aspectos básicos de la metodología utilizada y conceptos fundamentales para la comprensión de los resultados presentados en esta Tesis. En el Capítulo 1 se hace una breve introducción a los circuitos de regulación genética y el uso de proteínas fluorescentes utilizadas en esta Tesis para el estudio *in vivo* y en células individuales de la dinámica de dichos circuitos. En el Capítulo 2 se describen los materiales y las técnicas utilizadas, desde el cultivo y la obtención de las cepas bacterianas, la metodología seguida para la filmación de dichas cepas mediante microscopía de fluorescencia temporalizada, hasta el análisis de las imágenes obtenidas. En el Capítulo 3 se describen las características principales de los procesos biológicos de estudio en los microorganismos *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*. De esta forma, se pretende facilitar la comprensión de los resultados obtenidos. El Capítulo 4 hace referencia a determinados aspectos de la dinámica celular, tales como el comportamiento oscilatorio o excitable de algunos sistemas biológicos, además

de las herramientas matemáticas utilizadas para contrastar los datos obtenidos de forma experimental.

La Parte II corresponde a los resultados obtenidos separados en cuatro capítulos, de los cuales en el Capítulo 5 se describen los resultados del estudio del control del inicio de la replicación cromosómica en *Escherichia coli*. Se llevaron a cabo una serie de perturbaciones en las proteínas principales que regulan este proceso, y mediante el análisis de las imágenes obtenidas por microscopía de fluorescencia, se cuantificó el efecto ejercido sobre el inicio de replicación, comparando los resultados con una cepa control. En el Capítulo 6 se describen los resultados obtenidos del estudio de la forma en que un circuito genético de *Bacillus subtilis*, concretamente el que regula la competencia, integra múltiples señales simultáneas. Se caracterizó experimentalmente y con un análisis de bifurcación del modelo matemático del circuito, la respuesta en células individuales e *in vivo* a señales químicas de diferente intensidad que controlan la expresión constitutiva de los genes que forman el circuito, además de a la variación del número de copias de uno de estos genes. En el Capítulo 7 se describen los resultados del estudio del proceso de toma de decisión celular. Este estudio, realizado en el microorganismo *Bacillus subtilis*, se basa en la decisión de estas bacterias por optar entre dos programas de diferenciación como son la competencia genética y la esporulación, los cuales compiten entre sí en el tiempo. El análisis simultáneo y en células individuales de ambos programas permitió descubrir el motivo por el cual las bacterias optan por uno u otro mediante un mecanismo de carrera molecular entre estos dos programas en competición. El Capítulo 8 describe los resultados del estudio de la adaptación celular al estrés mediante la esporulación y la toma de decisión de una forma robusta en *Bacillus subtilis*. Con este objetivo, se analizó de forma cuantitativa la expresión de los genes implicados en la progresión hacia la formación de esporas y se desarrolló un modelo matemático poblacional para estudiar el efecto de la reversibilidad en el proceso de adaptación celular a cambios en los niveles de estrés.

En la Parte III se detallan las Conclusiones obtenidas tras el análisis de los resultados y una descripción de la posible perspectiva futura para cada uno de los Capítulos que se han mencionado en la Parte II. Se ha incluido un Glosario con algunas definiciones breves.

Los resultados obtenidos en esta Tesis contribuyen a la comprensión de determinados comportamientos dinámicos en los microorganismos *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*. Estas bacterias, aunque sencillas si se comparan con organismos superiores, nos ofrecen la posibilidad de estudiar mecanismos que en cierta manera son utilizados por sistemas más complejos, pero en los que para su estudio se requieren técnicas más complicadas. El estudio a nivel de células individuales de la dinámica de las redes de regulación genética en bacterias, mediante las técnicas utilizadas en esta Tesis, tales como la clonación de proteínas fluorescentes y la microscopía de fluorescencia temporalizada, nos permiten el análisis *in vivo* y en tiempo real de lo que sucede con dichas redes en el interior de las células respecto de lo que ocurre en el exterior celular.

Dynamics of genetic circuit regulation in bacteria

Abstract

The aim of this Thesis is the study of different dynamic cellular behaviors in the microorganisms *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. It is interesting to understand how these simple organisms have not so simple mechanisms to respond to their environment. This response is regulated by complex regulatory networks consisting of genes and proteins, where as instrumentalists in an orchestra, each element of the network should operate in harmony, at the right time and the right amount to give an appropriate cellular response. Below, we briefly describe the content of the chapters that form this Thesis.

Part I introduces some basic aspects of the methodology and concepts for the understanding of the results presented in this Thesis. Chapter 1 provides a brief introduction to genetic regulatory circuits and the fluorescent proteins used for the study of the dynamics of such circuits *in vivo* and in individual cells. Chapter 2 describes the materials and techniques used, from growing and obtaining bacterial strains, to the methodology used for filming these strains by temporalized fluorescence microscopy, and to the analysis of the obtained images. Chapter 3 describes the main features of the dynamical biological processes studied in the microorganisms *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. Thus, it is intended to facilitate the understanding of the results. Chapter 4 refers to certain aspects of cellular dynamics such as oscillatory or excitable behavior of some biological systems, as well as the mathematical tools used to compare the data obtained experimentally.

Part II corresponds to the results obtained, and is divided in four separate chapters, of which Chapter 5 describes the results of the study of the control of chromosome replication initiation in *Escherichia coli*. We implemented a set of perturbations in

the main proteins that regulate this process, and their effect on the initiation of replication, quantified by analyzing the images obtained by fluorescence microscopy, comparing the results with a control strain. Chapter 6 describes the results obtained from the study of how a genetic circuit in *Bacillus subtilis*, namely the one regulating competence, integrates multiple simultaneous inputs. We characterized experimentally the response of individual cells *in vivo* to different chemical signals that control the strength of the constitutive expression of genes forming the circuit, in addition to the copy number variation of one of these genes. The results were compared with a bifurcation analysis of the mathematical model of the circuit. Chapter 7 describes the results obtained in a study of the decision making process of microorganism *Bacillus subtilis*. Specifically, we studied the decision of these bacteria between two differentiation programs such as genetic competence and sporulation, which compete with each other in time. The simultaneous analysis in individual cells of both programs allowed us to uncover the way in which bacteria choose between these two competing programs, showing that the competition occurs through a molecular race. Finally, Chapter 8 describes the results obtained in the study of reversible progression towards an all-or-none switch in the sporulation of *Bacillus subtilis*. We quantitatively analyzed the expression of genes involved in the progression towards spore formation and a population model was developed to study the effect of reversibility in the process of cellular adaptation to changes in stress levels.

Part III details the conclusions obtained after the analysis of the results and a description of the possible future perspectives for each of the results that have been described in Part II. A Glossary has been included with some brief definitions.

The results obtained in this Thesis contribute to the understanding of certain dynamic behaviors in the microorganisms *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. These bacteria, although simple when compared with higher organisms, offer the possibility of studying mechanisms that are frequently utilized by more complex systems, which require more sophisticated analysis techniques. The study at the single cell level of

network dynamics of gene regulation in bacteria by the techniques used in this Thesis, such as genetic perturbations and time-lapse fluorescence microscopy, allows the analysis *in vivo* and in real time of the underlying dynamic of such networks inside cells in response to the cell environment.

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer a mi Director de Tesis Jordi García Ojalvo por darme la oportunidad de trabajar en su grupo. Gracias por tanta paciencia, dedicación y positividad en todos los momentos que lo he necesitado, que no han sido pocos. El reto de empezar de cero fue grande pero creo que juntos lo hemos superado, yo al menos me voy feliz y satisfecha con la gran experiencia que he vivido. Gracias Jordi.

Quiero agradecer a G. Süel y su equipo (Anna, Mark, Eric, Andra, Munehiro) por su fabulosa acogida en su laboratorio, y en especial a Tolga Çağatay, mi “hermano” en la vida y maestro en la ciencia.

A los compañeros que están (Andrés, Belén, Dani, Elena, Ignacio, Lina, Marta, Nikhil, Pau, Simone, Toni, Yu-Chieh, los nuevos!) y los que han pasado por el DONLL, los Jordi’s (Tiana y Zamora), Cristi, Cristina, Núria, Vito, os llevaré conmigo para siempre. Marta, mil gracias por pararme alguna película que otra, y darle alegría al lab, ánimo en tu Tesis, ¡*Show must go on!* Son muchas personas en este grupo genial, no cabrían en una sola hoja. Isabel, gracias por unos buenos días con sonrisas. Jaume, gracias por un incubador que facilitaría la vida a mis bacterias.

Muchas gracias a Héctor por su apoyo incondicional, por escucharme, por las charlas sobre mis experimentos, por animarme en los peores momentos, por estar ahí.

Por último y no menos importante, a mi familia. Gracias a mis padres, mis pilares. Sin ellos no hubiera sido lo mismo, mi padre mi referente y mi madre mi mejor confidente. A mis hermanos (por aguantarme) y mi sobrina (por hacerme siempre reír). Les dedico este trabajo con todo mi corazón.

*Darí­a todo lo que sé por
la mitad de lo que ignoro
(René Descartes)*

Índice general

I	Introducción	7
1.	Introducción general	2
1.1.	Regulación genética	2
1.2.	Efectos del ruido en la expresión genética	3
1.3.	Dinámica de la expresión genética	5
1.4.	Estudio de la dinámica de expresión genética en células individuales	7
1.5.	Ámbitos estudiados en esta Tesis	10
2.	Materiales y Métodos	13
2.1.	Cultivos Celulares	13
2.1.1.	Cultivo en medio líquido	13
2.1.2.	Cultivo en placa	16
2.1.3.	Antibióticos	17
2.1.4.	Suplementos	17
2.2.	Técnicas de ingeniería genética	18
2.2.1.	Reacción de PCR (Polymerase Chain Reaction)	18
2.2.2.	Restricción enzimática	21

2.2.3.	Purificación de ADN mediante electroforesis en gel de agarosa	22
2.2.4.	Reacción de ligación y transformación de moléculas de ADN	25
2.2.5.	Selección y conservación de cepas bacterianas	27
2.3.	Obtención de cepas bacterianas	30
2.3.1.	<i>Escherichia coli</i>	30
2.3.2.	<i>Bacillus subtilis</i>	36
2.4.	Técnicas de microscopía	53
2.4.1.	Microscopía de fluorescencia temporalizada	53
2.4.2.	Preparación del <i>sandwich</i> de agarosa	55
2.4.3.	Condiciones de crecimiento de las cepas de <i>Bacillus subtilis</i>	56
2.4.4.	Condiciones de crecimiento de las cepas de <i>Escherichia coli</i>	58
2.5.	Análisis de imágenes	59
2.5.1.	Análisis de células individuales	59
2.5.2.	Análisis del número de divisiones celulares	61
3.	Regulación genética en <i>Escherichia coli</i> y <i>Bacillus subtilis</i>	63
3.1.	Regulación de la replicación cromosómica en <i>Escherichia coli</i>	64
3.1.1.	Regulación negativa de oriC y represión transcripcional de DnaA por parte de SeqA	67
3.1.2.	RIDA: Regulación por inactivación de DnaA	68
3.1.3.	Regulación negativa de DnaA mediante <i>datA</i>	69
3.2.	Competencia y esporulación en <i>B. subtilis</i>	70
3.2.1.	Competencia genética en <i>B. subtilis</i>	72
3.2.2.	Esporulación en <i>B. subtilis</i>	75

4. Modelos dinámicos de la regulación genética	80
4.1. Regímenes dinámicos en circuitos genéticos y su modelización	80
4.2. Pulsos de competencia en <i>B. subtilis</i>	88
4.3. Progresión hacia la esporulación en <i>B. subtilis</i>	90
II Resultados	95
5. Dinámica de la replicación cromosómica en <i>Escherichia coli</i>	97
5.1. Regulación de la replicación	97
5.2. Perturbación del ciclo celular	100
5.3. Discusión	106
6. Control multiparamétrico de la competencia en <i>Bacillus subtilis</i>	108
6.1. Perturbación del circuito de regulación de la competencia	111
6.2. Caracterización estadística de los eventos de competencia	115
6.3. Caracterización dinámica de los eventos de competencia	121
6.4. Consecuencias fenotípicas de la respuesta integrada	128
6.5. Discusión	131
7. Competición dinámica entre decisiones celulares alternativas	133
7.1. Dinámica de la progresión hacia la esporulación	134
7.2. Probabilidad de la competencia en la progresión a la esporulación . .	137
7.3. Regulación cruzada pre- y post-decisión	140
7.4. Activación dual de competencia y esporulación	142
7.5. Localización temporal del punto de exclusión de la competencia . . .	145

7.6. Carrera molecular entre las decisiones de competencia y esporulación	150
7.7. Perturbaciones sintéticas de la carrera molecular	153
7.8. Discusión	157
8. Progresión reversible hacia una decisión irreversible en <i>Bacillus subtilis</i>	159
8.1. Reversibilidad e irreversibilidad de las decisiones celulares	160
8.2. Progresión gradual hacia la esporulación	161
8.3. Compromiso irreversible a la esporulación en <i>B. subtilis</i>	165
8.4. Modelos poblacionales de la toma de decisión en <i>B. subtilis</i>	167
8.5. Progresión a la esporulación en condiciones de estrés cambiante . . .	172
8.6. Discusión	176
III Conclusiones	178
9. Conclusiones	180
9.1. Conclusiones	180
9.1.1. Dinámica de la regulación cromosómica en <i>Escherichia coli</i> . .	180
9.1.2. Control multiparamétrico de la competencia en <i>Bacillus subtilis</i>	181
9.1.3. Competición dinámica entre decisiones celulares alternativas .	182
9.1.4. Progresión reversible hacia una decisión irreversible en <i>Bacillus subtilis</i>	183
9.2. Perspectiva futura	184
9.2.1. Dinámica de la replicación cromosómica en <i>Escherichia coli</i> .	184
9.2.2. Integración de señales en circuitos celulares	185

9.2.3. Diferenciación y toma de decisión celular 190

Glosario **194**

Parte I

Introducción

Capítulo 1

Introducción

1.1. Regulación genética

La vida que nos rodea está en continuo cambio y evolución. Las células han desarrollado un sinnúmero de mecanismos de reacción y respuesta a la influencia del entorno en el que se encuentran. Dicha respuesta a las condiciones externas es gobernada por genes y proteínas que conforman una intrincada red de regulación genética, la cual dará lugar a los patrones de respuesta celular apropiados.

La arquitectura de los circuitos genéticos en la respuesta celular, determinada por las interconexiones que se dan entre los genes que conforman el genoma, es la clave para entender el perfil fenotípico (ver definición en página 192) que las células presentan como respuesta al entorno al que están sometidas. La comprensión de dicha respuesta es uno de los problemas principales de la biología moderna, debido a la gran variedad de mecanismos a nivel molecular que se organizan en complejos sistemas de regulación, además de las señales intra e intercelulares, que acoplan lo que ocurre en el interior y exterior de la célula con el comportamiento de la misma.

Si partimos del sistema de expresión genético más simple descrito por *Jacob y*

Monod en el año 1961 (Jacob & Monod, 1961), podemos definir como se muestra en la Fig. 1.1 la unidad transcripcional básica en la producción de proteínas. En la figura se pueden ver dos genes (*Gen1* y *Gen2*) que codifican unas proteínas determinadas, cuya producción está regulada por una secuencia denominada promotor (*P*) donde se inicia la transcripción del ADN. Se observa también una secuencia de terminación de la transcripción (*T*) y una secuencia reguladora (*R*) asociada al promotor donde se pueden unir moléculas represoras o activadoras de la transcripción del ADN en ARNm (ver definición en página 192) (Savageau, 2001).

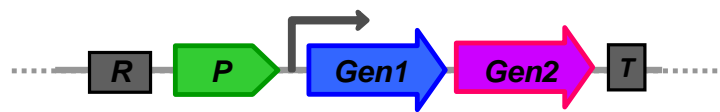


Figura 1.1: Esquema simplificado de una unidad de transcripción.

A partir de este sencillo sistema de transcripción que contiene información genómica, se organizan e interconectan los diferentes circuitos de regulación que darán lugar a proteínas que actuarán a nivel de otras unidades transcripcionales que conforman los circuitos genéticos. Por lo tanto, la información recibida por la célula se propaga en redes de regulación transcripcional que son detectadas por las secuencias reguladoras para reprimir o inducir la expresión de uno o más genes. De esta forma tienen lugar las conexiones entre genes y proteínas que dan lugar a las redes y circuitos genéticos.

1.2. Efectos del ruido en la expresión genética

Dentro de una misma población celular se puede encontrar cierto grado de variabilidad de célula a célula, incluso en aquellas poblaciones idénticas genéticamente y expuestas a las mismas condiciones ambientales. La expresión genética celular está sometida a cierto ruido, y esto se refleja en fluctuaciones dinámicas en la expresión de

proteínas en células individuales y en la variabilidad fenotípica dentro de una misma población.

El ruido en la expresión genética se puede dividir en dos componentes: intrínseco y extrínseco (Elowitz et al., 2002). El ruido intrínseco es causado por el carácter estocástico de las reacciones bioquímicas, por ejemplo la unión al azar de los factores de transcripción (ver definición en página 192) y ARN polimerasas a los promotores en la transcripción del ADN al ARN, o los ribosomas a las secuencias de ARNm en la traducción a proteínas. Esto provoca la expresión en diferentes concentraciones de idénticas copias de un mismo gen o variaciones en la actividad de un mismo promotor en el tiempo. Por otro lado, el ruido extrínseco se debe a las fluctuaciones en los componentes celulares que afectan a la regulación de los genes de interés, tales como proteínas reguladoras, factores de transcripción o polimerasas (Garcia-Ojalvo, 2011).

La Fig. 1.2 de Elowitz et al. (2002) muestra esquemáticamente el efecto del ruido intrínseco y extrínseco en la expresión de dos genes regulados por el mismo promotor. En este caso, se introdujeron en el cromosoma una copia del gen de las proteínas fluorescentes CFP (cyan fluorescent protein) y YFP (yellow fluorescent protein). Para evitar diferencias en el número de copias de cada proteína, ambos genes se clonaron equidistantes y opuestos uno del otro en relación al origen de replicación *oriC*. Se muestra un esquema del cromosoma de *Escherichia coli* y la localización de los genes clonados a la derecha de la Fig. 1.2. Las células con la misma cantidad de cada proteína fluorescente se muestran amarillas, mientras que aquellas células que expresan más cantidad de una de ellas aparecen verdes o rojas. En el panel superior a la izquierda se puede ver que en ausencia de ruido intrínseco ambas proteínas fluctúan en correlación. En el panel inferior se muestra que en la población cada célula tendrá la misma cantidad de ambas proteínas, pero debido al ruido extrínseco estas cantidades diferirán de célula a célula. La expresión de ambos genes no estará correlacionada en las células individuales debido al ruido extrínseco y por tanto algunas células

expresarán más una de las proteínas fluorescentes que la otra.

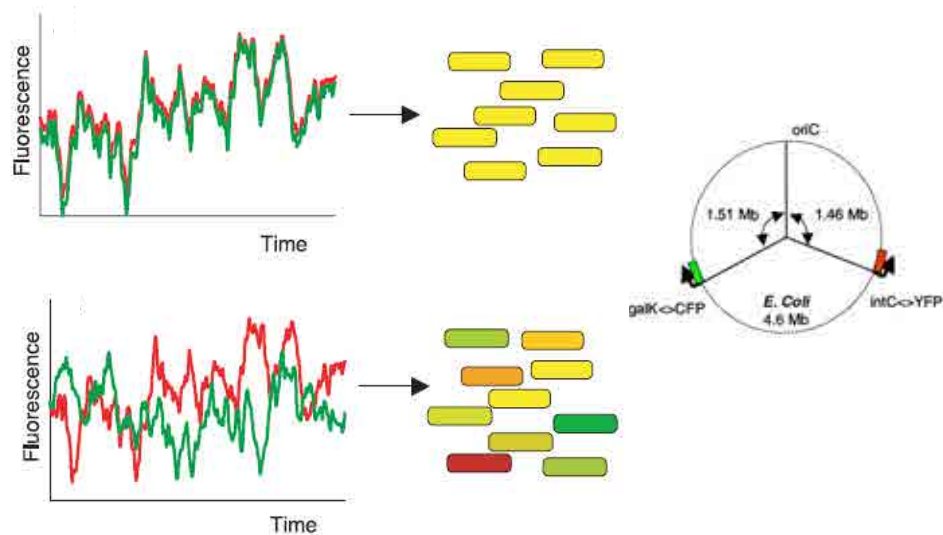


Figura 1.2: Esquema donde se muestra el efecto del ruido intrínseco y extrínseco en la expresión de dos genes regulados por el mismo promotor. Imagen adaptada de Elowitz et al. (2002).

1.3. Dinámica de la expresión genética

Debido a que el ambiente celular está sometido a continuos cambios, las redes biológicas que controlan las reacciones bioquímicas que tienen lugar en la célula, también están bajo variaciones. De hecho, los circuitos genéticos que gobiernan el comportamiento celular son sistemas dinámicos, donde las concentraciones de proteínas y moléculas de señalización varían con el tiempo, y donde cobra importancia la conectividad entre los componentes que conforman dichos circuitos.

Un claro ejemplo de comportamiento dinámico es la producción periódica de determinadas proteínas durante la división celular. La replicación del ADN celular debe realizarse una vez en el marco de un ciclo celular. En las células eucariotas, la degra-

dación y en consecuencia la inhibición del factor Cdt1, (responsable de la formación del complejo de pre-replicación) es mediada por la proteína Geminin. Esto es vital para la prevención de nuevos eventos de replicación durante un ciclo celular (Sakaue-Sawano et al., 2008). En la Fig. 1.3 se pueden ver las oscilaciones de los niveles de ambas proteínas, donde en verde se expresa la actividad de Geminin y en rojo la de Cdt1.

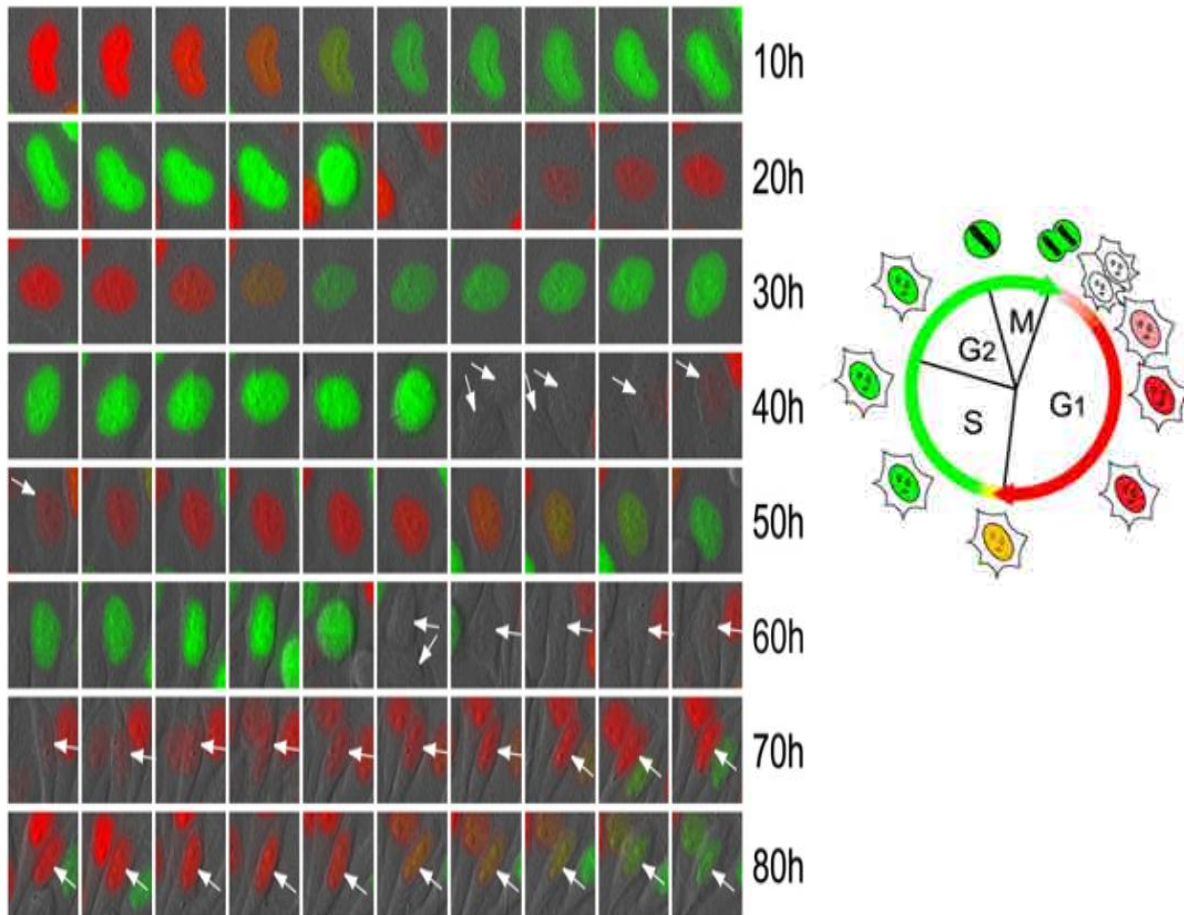


Figura 1.3: Cambios en los niveles de la fluorescencia de Cdt1 (en rojo) y Geminin (en verde) dependiente del ciclo celular en células HeLa (ver definición en página 193). Imagen tomada de Sakaue-Sawano et al. (2008).

1.4. Estudio de la dinámica de expresión genética en células individuales

Gracias al avance en la ingeniería molecular, existen numerosas técnicas enfocadas al estudio de la dinámica de un circuito genético. Entre ellas cabe destacar el uso de proteínas fluorescentes para el análisis del comportamiento *in vivo* de células individuales. Es posible analizar el patrón de expresión de un gen mediante la clonación de una proteína fluorescente unida al promotor que controla dicha expresión (Fig. 1.4A). Otra alternativa es la fusión de la proteína de interés a la secuencia codificante de una proteína fluorescente (Fig. 1.4B), que además en algunos casos proporciona información acerca de la localización celular de las proteínas (Fig. 1.4C, se puede ver en amarillo la localización de una proteína en el polo celular). Además, se pueden expresar en la misma célula múltiples proteínas fluorescentes para estudiar diferentes componentes de un mismo circuito genético (Fig. 1.4D).

Los niveles de expresión de estas proteínas se puede monitorizar *in vivo* mediante microscopía de fluorescencia. Las técnicas de clonación de proteínas fluorescentes y su seguimiento por microscopía se han utilizado en esta Tesis, donde se realiza la cuantificación en tiempo real de la actividad de los genes de estudio que se expresan en células individuales.

La creación de películas a partir de las imágenes tomadas por microscopía nos permite observar la dinámica de poblaciones celulares que aún encontrándose en el mismo ambiente y compartiendo genotipo, pueden tener patrones de expresión diferentes, mostrando la heterogeneidad de la población. Los datos que se obtienen tras el análisis de las imágenes tomadas a las células, se utilizan en combinación con el análisis de los circuitos genéticos mediante modelos matemáticos para elucidar el comportamiento celular.

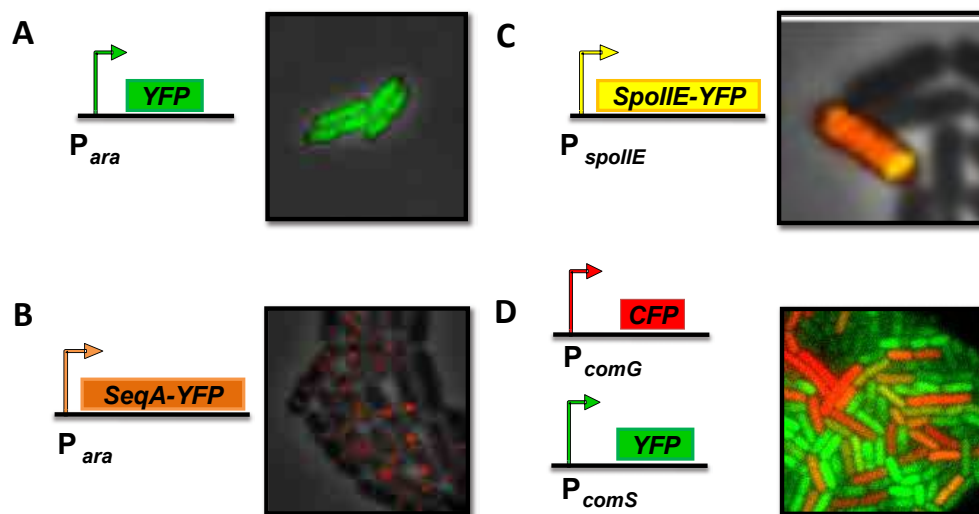


Figura 1.4: Uso de proteínas fluorescentes en el estudio del patrón de expresión de un gen. En la imagen A se muestra a la proteína YFP (yellow fluorescent protein) bajo el control de un promotor regulado por inducción con arabinosa. En la imagen B se puede ver la fusión de la proteína SeqA (reguladora de la replicación de ADN en *Escherichia coli*) con la proteína YFP. La imagen C muestra la fusión de la proteína SpoIIIE (implicada en la formación del septo asimétrico en *Bacillus subtilis*) a YFP y su localización en el polo celular (en amarillo en la imagen). En naranja se puede ver la expresión del promotor $P_{comG-cfp}$ regulador utilizado para observar el estado de competencia en *Bacillus subtilis*. La imagen D muestra la expresión simultánea de dos promotores diferentes, P_{comG} y P_{comS} (implicados en el estado competente en *Bacillus subtilis*) fusionados a *cfp* (en rojo en la imagen) y *yfp* (en verde en la imagen), respectivamente.

En la Fig. 1.5 se puede ver en el panel (a) un circuito genético que gobierna un comportamiento celular y las interacciones entre sus componentes, y en el panel (b) un ejemplo de una población de *B. subtilis* que muestra mucha heterogeneidad a pesar de ser isogénica y estar en el mismo ambiente. El panel (c) muestra esquemáticamente cómo el uso de la microscopía temporalizada permite seguir los efectos de las interacciones en el tiempo, y su efecto en la expresión de los genes que forman parte de los circuitos genéticos dinámicos. En este caso, se observa una correlación

con retraso entre x y z que refleja la activación de la segunda por parte de la primera. Dicha correlación sería imposible de detectar mediante medidas instantáneas aisladas en el tiempo.

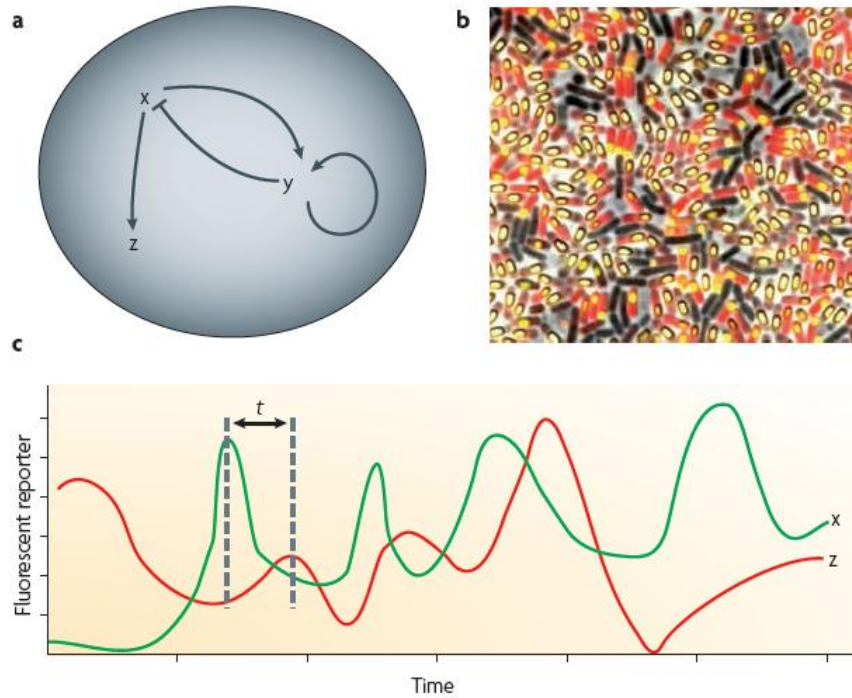


Figura 1.5: Monitorización de un circuito genético mediante microscopía de fluorescencia temporalizada. (a) Interacciones de un determinado circuito donde x actúa sobre z . (b) Población isogénica que presenta un comportamiento heterogéneo. (c) Análisis temporal de la expresión de x y z . Imagen tomada de Locke & Elowitz (2009).

Además del seguimiento de la dinámica de expresión de genes de interés mediante la clonación de proteínas fluorescentes, se puede controlar la cantidad y el momento en que se expresan dichos genes clonándolos bajo la regulación de promotores inducibles, tanto a nivel cromosómico como en plásmidos (ver breve definición en página 193). La activación de estos promotores tiene lugar en presencia de un agente inductor, que comúnmente suele ser un agente químico (sintético o natural) que se añade al

medio de cultivo donde crecen las cepas bacterianas.

1.5. Ámbitos estudiados en esta Tesis

En esta Tesis se implementan las técnicas anteriormente descritas para el estudio de diferentes comportamientos celulares dinámicos. Se ha inducido químicamente la expresión de proteínas de interés y observado a nivel de células individuales el resultado de estas perturbaciones *in vivo* monitorizando diversas proteínas fluorescentes mediante microscopía temporalizada. Este es el caso del estudio realizado de un oscilador natural como es el ciclo celular en *Escherichia coli* donde se sobreexpresan diferentes proteínas que participan en la replicación del ADN durante la división celular.

Por otro lado, hemos estudiado la forma en que un circuito genético integra múltiples señales que actúan sobre él simultáneamente, en función de las intensidades relativas de dichas señales. En este caso se ha utilizado el circuito que regula la competencia genética para la incorporación de ADN exógeno en el organismo *B. subtilis*. En este circuito se ha caracterizado la respuesta de células individuales *in vivo* a señales químicas que controlan la expresión constitutiva (definición en página 192) de los genes de competencia, en combinación con variaciones controladas en el número de copias de uno de estos genes. Los resultados experimentales se contrastan con el análisis de bifurcación del modelo matemático del circuito, observándose diferentes respuestas integradas por parte del circuito, que se traducen en cambios fenotípicos celulares.

Durante el desarrollo de la Tesis se participó también en el estudio del proceso de toma de decisión celular a partir de dos programas de diferenciación que compiten en el tiempo, como son la esporulación y la competencia genética en *B. subtilis*. Tras la construcción de diferentes cepas bacterianas, se midió simultáneamente la actividad

de ambos programas en células individuales, donde se vio que la célula excluye uno u otro en función del tiempo relativo en que los programas tienen lugar, es decir, la decisión celular parece tomarse a partir de una carrera molecular entre dos programas en competición.

El último estudio en que se participó durante esta Tesis consistió en comprender cómo las células bajo estrés se adaptan y toman decisiones robustas. Con este objetivo se estudió la progresión hacia la formación de esporas por parte de *B. subtilis*, midiendo cuantitativamente la expresión de los genes implicados en dicho proceso. Además se desarrolló un modelo matemático poblacional para investigar cómo afecta en la toma de decisión celular el grado de reversibilidad hacia el punto de compromiso celular. Concretamente, se evaluó el efecto de la reversibilidad en la adaptabilidad celular a cambios dinámicos en los niveles de estrés en el ambiente extracelular.

Capítulo 2

Materiales y Métodos

En este capítulo se describen el material y las técnicas utilizadas para llevar a cabo los experimentos con los que se obtienen los resultados que se describen en esta Tesis.

2.1. Cultivos Celulares

2.1.1. Cultivo en medio líquido

En los experimentos realizados en esta Tesis se han utilizado los siguientes medios de cultivo:

Medio LB (Luria Broth:1.10285.0500)

Este medio de cultivo es uno de los más frecuentes en el cultivo bacteriano. En los estudios realizados se utiliza como medio principal de cultivo, cuando los experimentos requieren el crecimiento de las bacterias en unas condiciones de no estrés. Se inocula un cultivo denominado de *overnight*, del que se reinocula a medio fresco al día siguiente.

Para la preparación de 1 litro de medio se pesan 25g de preparado comercial en

polvo y se disuelven en agua desionizada. Posteriormente se autoclava durante 15 minutos a 121°C y se conserva a 4°C.

Medio de resuspensión (RM) (Sterlini & Mandelstam, 1969)

Este medio de cultivo se utiliza para el crecimiento del microorganismo *Bacillus subtilis*. En los experimentos realizados en esta Tesis, se inocula en medio LB fresco (descrito anteriormente), para realizar un cultivo *overnight* a partir del cual reinocularemos medio RM al día siguiente. Este medio proporciona las condiciones adecuadas de estrés necesarias para realizar los experimentos con este microorganismo. Se prepara a partir de las siguientes sales:

Solución A (500ml):

FeCl ₃ .6H ₂ O (Sigma-Aldrich 23,648-9)	0.49g
MgCl ₂ .6H ₂ O (Sigma-Aldrich M2670)	4.150g
MnCl ₂ .6H ₂ O (Sigma-Aldrich 221279)	5.895g

Solución B (500ml):

NH ₄ Cl (Sigma-Aldrich A9434)	26.75g
Na ₂ SO ₄ (Sigma-Aldrich 204447)	5.3g
KH ₂ PO ₄ (Merck 1.04873.1000)	3.4g
NH ₂ NO ₃ (Sigma-Aldrich 9642)	4.85g

Se ajusta el pH a 7 con NaOH.

Se filtran las soluciones A y B con un filtro de 0.2µm de diámetro para esterilizarlas y a continuación se prepara la solución A+B o medio de esporulación. Para preparar 1 litro se mezclan 1ml de Solución A y 10ml de Solución B y se ajusta el volumen con agua desionizada. Para la preparación de RM se dispensan:

A+B	90ml
10 % L-Glutamato (Sigma-Aldrich G5889)	2ml

0.1M CaCl ₂ (vwr 22313.294)	1ml
1M MgSO ₄ (Sigma-Aldrich M2643)	4ml

Se ajusta el volumen con agua desionizada y se conserva a 4°C.

Medio de transformación (TM)

En este medio de cultivo el microorganismo *Bacillus subtilis* adquiere la capacidad de competencia, es decir de adquirir material genético del medio, debido al estrés causado por la pobreza del medio. Para la preparación de 250ml de TM se dispensan:

K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O (Sigma-Aldrich P5504)	4.77g
KH ₂ PO ₄ (Sigma-Aldrich P3786)	1.5g
Citrato trisodio (Sigma-Aldrich S4641)	0.25g
MgSO ₄ ·7H ₂ O (Sigma M2773)	50mg
Na ₂ SO ₄ (Aldrich 204447)	0.5g
100mM FeCl ₃ (Aldrich 451649)	125μl
100mM MnSO ₄ (Sigma M8179)	5μl
Glucosa (Sigma G7528)	1g
Glutamato (Sigma G5889)	0.5g

Se ajusta el volumen con agua desionizada y se filtra con un filtro de 0.2μm de diámetro para esterilizar. Conservar a 4°C.

Medio 2xYT

Este medio de cultivo se utiliza tras el proceso de transformación, es decir, cuando se introduce ADN exógeno en un microorganismo. El medio TM descrito anteriormente es pobre y se somete a las bacterias a condiciones de estrés en el proceso de transformación. Por este motivo, se cultivan tras este proceso con medio 2xYT, que es un medio rico, eliminando las condiciones de estrés. Para la preparación de 1 litro de medio se dispensan:

Triptona (FlukaT7293)	16g
-----------------------	-----

Estracto de levadura (Sigma Y1625)	10g
NaCl (Sigma S5886)	5g

Se ajusta el volumen con agua desionizada y se filtra con un filtro de $0.2\mu\text{m}$ de diámetro para esterilizar. Conservar a 4°C .

2.1.2. Cultivo en placa

Además de cultivo en líquido se pueden sembrar las bacterias en medio sólido en placa y obtener colonias bacterianas de forma aislada. En primer lugar, se prepara el medio de cultivo líquido deseado (por ejemplo medio LB) y se añaden 15g/l de agar-agar. Se autoclava durante 15 minutos y tras enfriarse se añaden si es necesario los antibióticos para la selección bacteriana. En la Fig. 2.1 se observa un cultivo en placa para el aislamiento de colonias bacterianas. Esta técnica se denomina en estría o por agotamiento, donde las colonias quedan aisladas de forma individual, como se puede ver en la imagen el paso de siembra número (4).

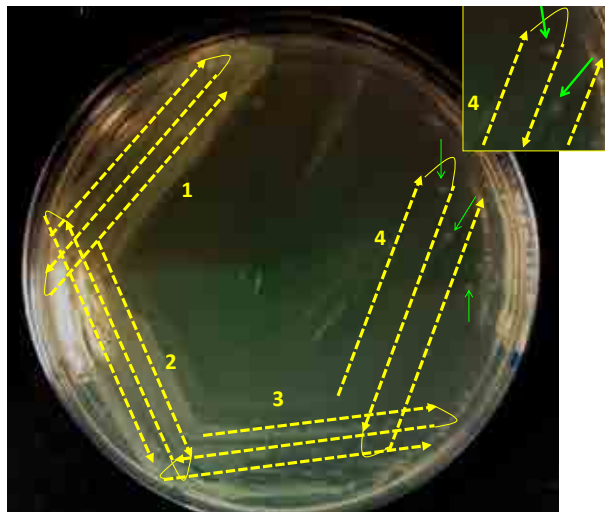


Figura 2.1: Aislamiento de colonias bacterianas por estría. Los números indican el orden y dirección de la siembra y las flechas las colonias aisladas.

2.1.3. Antibióticos

Las bacterias genéticamente modificadas expresan genes de resistencia para al menos un antibiótico. Esto permite seleccionar aquellas bacterias que sobreviven en presencia de estos compuestos, lo que indica que expresan el gen que codifica para dicha resistencia. En la Tabla 2.1 siguiente se describen los antibióticos utilizados y la concentración de trabajo.

Antibiótico	Concentración de trabajo ($\mu\text{g/ml}$)
Espectinomicina (Calbiochem 567570)	100
Kanamicina (Calbiochem 420311)	5
Eritromicina (Sigma E5389)	5
Cloranfenicol (Calbiochem 220551)	5 y 10
Neomicina (Calbiochem 220551)	5 y 10

Tabla 2.1: Listado de antibióticos utilizados.

2.1.4. Suplementos

L-Glutamato (Sigma G5889)

El L-glutamato se añade al medio de cultivo como suplemento de aminoácidos.

IPTG (isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido) (Sigma I1284)

Se añade al medio como inductor de aquellos genes que se transcriben bajo el control del promotor P_{lac} .

Arabinosa (Sigma A3256)

Monosacárido utilizado como inductor de expresión genética bajo la regulación del promotor P_{BAD} .

Glucosa (Sigma G7528)

Monosacárido utilizado como fuente de carbono en el cultivo celular.

2.2. Técnicas de ingeniería genética

2.2.1. Reacción de PCR (Polymerase Chain Reaction)

Mediante PCR (Polymerase Chain Reaction) se consigue amplificar una secuencia de ADN generando grandes cantidades de copias. Esta técnica consiste en una sucesión de ciclos térmicos repetidos de alta temperatura, para la separación de las dos cadenas de ADN (desnaturalización), pasando después a la temperatura ideal para la unión de cebadores o moldes y conseguir así la elongación de la cadena copiada, tal y como se observa en la Fig. 2.2. Esto se consigue mediante la acción de una polimerasa que incorpora las subunidades básicas denominadas deoxinucleótidos trifosfato (Sambrook & Russell, 2001). Los componentes básicos para llevar a cabo esta reacción son:

- Muestra de ADN que contiene la secuencia a amplificar.
- Un par de oligonucleótidos sintéticos (cebadores o moldes) complementarios a los extremos **3'** (ver definición en página 192) de cada cadena del ADN a amplificar que tras unirse actúan de molde para la elongación de la nueva molécula de ADN.
- Deoxidonucleótidos trifosfato o dNTPs. Una reacción básica de PCR contiene una relación equimolar de cada dNTP (dATP, dTTP, dCTP y dGTP). Estas moléculas se incorporan a los oligonucleótidos elongando así la nueva cadena de ADN naciente.
- Polimerasa termoestable que lleva a cabo la reacción de elongación incorporando los dNTPs.
- Solución tamponadora (Tpn) que proporciona el ambiente adecuado para el correcto funcionamiento de la polimerasa. Contiene cationes monovalentes y divalentes.

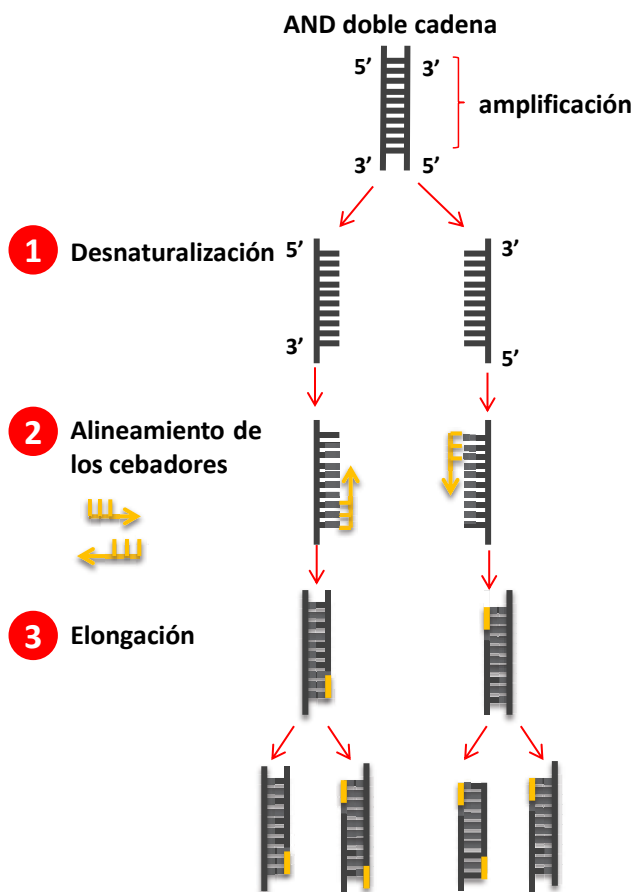


Figura 2.2: Proceso de amplificación exponencial de una secuencia de ADN mediante PCR. En (1) se observa la desnaturalización del ADN seguido del alineamiento de los cebadores (2). Posteriormente la ADN polimerasa elonga la nueva cadena añadiendo deoxinucleótidos trifosfato (3). El proceso se repite durante ciclos amplificando el ADN de forma exponencial.

Mezcla de reacción para PCR: (50 μ l)

En un tubo de PCR se prepara la mezcla de los componentes necesarios para llevar a cabo la reacción de PCR, pipeteando las cantidades indicadas a continuación de todos los reactivos.

Tpn a 1X (Finnzymes F530)	10 μ l
dNTPs (NEB N04465)	1 μ
2 Cebadores	2.5 μ l
Polimerasa High Fidelity (Finnzymes F530)	0.5 μ l
Muestra	x μ l
dH ₂ O	hasta 50 μ l

Ciclos de PCR:

Una vez se realiza la mezcla de reacción en el tubo, se deposita en la máquina que selecciona automáticamente las temperaturas óptimas para llevar a cabo la reacción. Las temperaturas y tiempos de reacción que se detallan a continuación se deben introducir previamente en el programa de la máquina.

1. 95°C 2'
2. 95°C 30"
3. 55°C 30"
4. 72°C 30"/Kb

Repetir (1-4) 34 ciclos

5. 72°C 9'
6. 4°C ∞

Una vez se amplifica por PCR el fragmento de ADN de interés se puede introducir en células bacterianas mediante un vector de clonación, por ejemplo un plásmido (ver definición en página 193). Con esto se consigue expresar el gen clonado en la bacteria huésped. En la Fig. 2.3 se puede ver un esquema del proceso de clonación de un fragmento ADN amplificado por PCR y su posterior inserción en un vector de clonaje. En el diseño de los cebadores sintéticos se incluye una secuencia de corte (región verde) compatible con la misma región que se encuentra en el vector de clonaje (en verde). Es en esta zona donde se produce la inserción del gen amplificado por PCR. Para poder clonar el fragmento de ADN se debe someter a una reacción de restricción que se detalla en la Sección 2.2.2

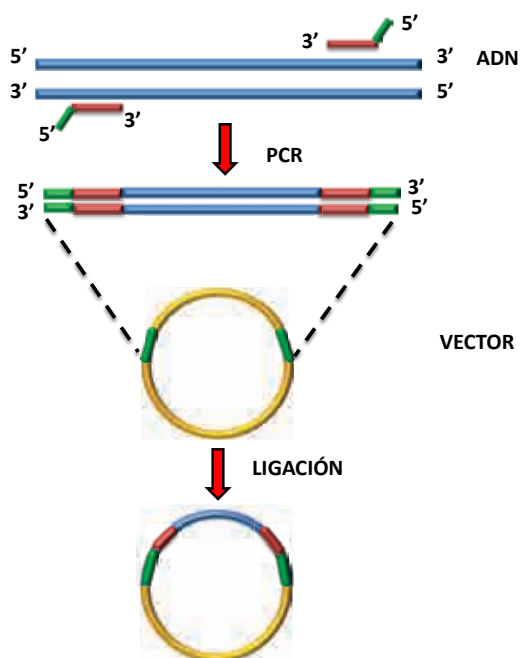


Figura 2.3: Esquema representativo del proceso de clonación de un producto de PCR en un vector.

2.2.2. Restricción enzimática

Mediante la reacción de restricción enzimática se preparan fragmentos de ADN para ser ligados. Dicha reacción es mediada por enzimas de restricción que cortan ADN con una secuencia específica de nucleótidos. Esta técnica se utiliza por ejemplo, para ligar un gen amplificado por PCR (inserto) en un vector de clonación como por ejemplo un plásmido. Una vez se cortan tanto el inserto como el vector con las enzimas pertinentes, se obtienen extremos compatibles, que tras su purificación serán ligados mediante la reacción de ligación que se explica en la Sección 2.2.4. En primer lugar, se prepara la mezcla de reacción de restricción ($50\mu\text{l}$).

En un tubo se prepara la mezcla de reacción pipeteando los reactivos que se detallan a continuación.

Muestra	$x\mu\text{l}$
Enzima	$1\mu\text{l}$
Tpn a 1x	$5\mu\text{l}$
BSA a 1x*	$0.5\mu\text{l}$
dH ₂ O	hasta $50\mu\text{l}$

*BSA: Se añade si la enzima de restricción lo requiere. Se debe consultar las especificaciones de la enzima utilizada en cuanto a tiempo y temperatura de incubación. Las enzimas de restricción adquiridas son de la casa comercial New England Biolabs (NEB). Se deben consultar las especificaciones de la enzima utilizada en cada caso en cuanto a tiempo y temperatura de incubación (ver página 192 para breve definición)

2.2.3. Purificación de ADN mediante electroforesis en gel de agarosa

Esta técnica se utiliza para separar fragmentos de ADN mediante la migración de dichos fragmentos por tamaño. Posteriormente a la reacción de restricción, se deben eliminar los fragmentos de ADN sobrantes y una de las técnicas aplicadas es la electroforesis en gel de agarosa. Las muestras dentro del gel de agarosa son sometidas a un campo eléctrico que las induce a moverse hacia el ánodo del tanque de electroforesis, debido a la carga neta negativa proveniente de los azúcares y fosfatos de la cadena de ácido nucleico. Las moléculas grandes migran de forma lenta debido a que ofrecen más resistencia al gel. Para poder comparar el patrón de migración se carga en el gel y junto a las muestras, un marcador de peso molecular conocido. En la Fig. 2.4 se representa un gel de electroforesis de agarosa donde en la línea 1 se ve el marcador de peso y posición conocido, y en las líneas 2 y 3 la migración de dos fragmentos de ADN. A continuación se lista el material necesario para realizar la técnica de electroforesis.

Agarosa BDH Electran 443665W

TAE 50X E.Z.N.A. Omega

Tanque de electroforesis y fuente de alimentación VWR collection y CBS

Marcador de ADN Se utilizan dos marcadores patrón con referencias: Sigma D7058, D3937

Bromuro de etidio Sigma E1510

Tpn de carga 6x Novagen 69180

Equipo de visualización de geles UVITEC Cambridge

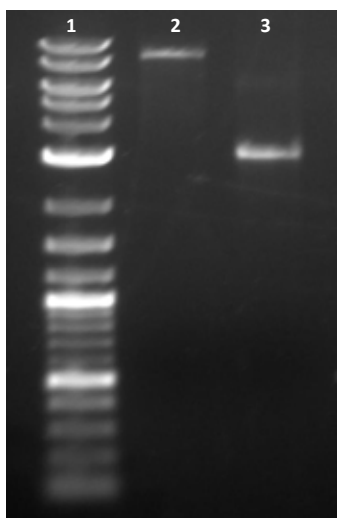


Figura 2.4: Gel de electroforesis de ADN. Línea 1: Marcador de peso molecular conocido. Líneas 2 y 3: Patrón de bandas de la migración de dos fragmentos de ADN

En la Fig. 2.5 se representa el equipo necesario para hacer una electroforesis en gel de agarosa. Se observa la fuente de alimentación con los dos electrodos conectados, el tanque de electroforesis donde se deposita el gel una vez ha polimerizado, cubierto con Tpn TAE 1X y finalmente la cubeta de polimerización, donde se deposita la agarosa con el peine de plástico que se retira una vez el gel ha polimerizado, dando lugar a los pocillos de carga de las muestras. Para la preparación del gel, se pesa

la agarosa según el porcentaje deseado y se disuelve en TAE 1X, se calienta en microondas o baño hasta conseguir una solución homogénea y una vez se enfría se añade el bromuro de etidio, que permitirá la visualización de las bandas de ADN.

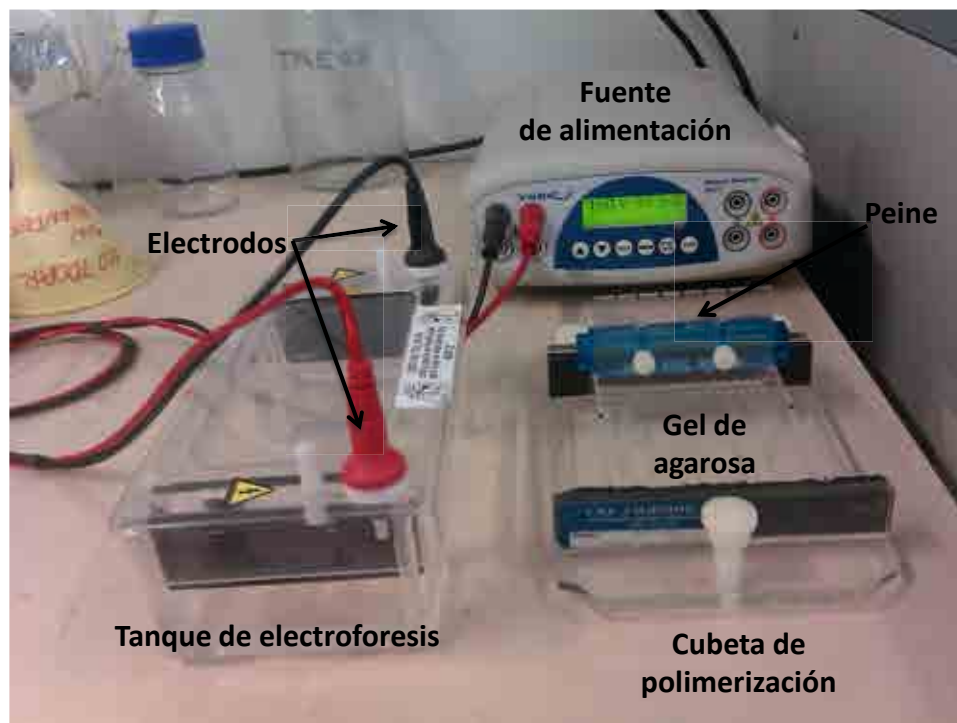


Figura 2.5: Representación del equipo de electroforesis.

En la Tabla 2.2 se detallan los rangos de separación de moléculas de ADN según el porcentaje de agarosa en el gel. Una vez la muestra ha sido identificada, se corta la banda y se purifica utilizando un kit de purificación de bandas en gel de agarosa (Life Technologies K210012).

Concentración de Agarosa (% w/v)	Separación de ADN (kb)
0.3	5-60
0.6	1-20
0.7	0.8-10
0.9	0.5-7
1.2	0.4-6
1.5	0.2-3
2	0.1-2

Tabla 2.2: Rango de separación de moléculas lineales de ADN (Kb) en función de la concentración de agarosa en gel (% w/v) (Sambrook & Russell, 2001).

2.2.4. Reacción de ligación y transformación de moléculas de ADN

Reacción de ligación y transformación en *Escherichia coli* comerciales

La enzima ADN ligasa media la reacción de ligación, la cual consiste en la formación de enlaces fosfodiéster entre los extremos 3- hidroxil y 5'-fosfato de las moléculas de ácido nucleico (Sambrook & Russell, 2001). Tras la reacción de restricción enzimática y posterior purificación tanto del inserto como del vector de clonación se lleva a cabo este proceso utilizando un kit de Ligación (New England Biolabs M22005). Posteriormente, el producto de la reacción de ligación puede conservarse a -20°C o ser directamente transformada en bacterias competentes de *Escherichia coli* comerciales (Life Technologies C4040-52).

El proceso de transformación consiste en introducir ADN en bacterias competentes, es decir, bacterias que han sido preparadas químicamente para aceptar ADN exógeno ya que se induce artificialmente permeabilidad en la membrana bacteriana (Barker, 2005). Siempre incluiremos un control negativo de transformación en el

que se siembran bacterias competentes no transformadas como control negativo, o bacterias en las que no se añade inserto en la mezcla de ligación.

Preparación de bacterias *Escherichia coli* competentes en el laboratorio y transformación química con CaCl_2

A partir de un cultivo *overnight* se centrifuga 1.5ml de dicho cultivo durante 1 minuto a 13000 rpm. Se descarta el sobrenadante y se resuspende el pelet o sedimentado con 500 μl de CaCl_2 50mM a 4°C y se incuba en hielo durante 30 minutos. Pasado este tiempo se centrifuga la mezcla anterior durante 1 minuto a 13000 rpm y se descarta el sobrenadante. Se disuelve el pelet *suavemente* con 100 μl de CaCl_2 50mM a 4°C y se añaden de 0.1-0.5 μg de ADN. Se incuba nuevamente en hielo durante 30 minutos. Inmediatamente se transfiere el tubo en un baño a 42°C durante exactamente 90 segundos (*heat-shock*) y se incuba en hielo durante 2 minutos. Posteriormente se pipetea al mismo tubo 1ml de LB y se incuba con agitación a 37°C durante 1 hora. Pasada 1 hora se centrifuga a 13000 rpm, se elimina el exceso de LB y se siembra aproximadamente 50 μl en una placa de LB conteniendo el antibiótico adecuado para la selección de transformantes. Se siembran en otra placa bacterias competentes no transformadas como control negativo, o bacterias en las que no se añade inserto en la mezcla de ligación.

Transformación en *Bacillus subtilis*

El método utilizado en Jarmer et al. (2002) induce la expresión de genes de competencia por estrés nutricional en un medio pobre. El procedimiento es el siguiente: En primer lugar se siembra en una placa de LB la cepa deseada y se incuba a 37°C toda la noche. De la placa obtenida se inocula una colonia en 5ml de medio de transformación (TM) y se incuba a 37°C en un incubador agitador hasta que el cultivo alcance una densidad óptica de 0.4-0.8. Posteriormente se inocula 1ml de este cultivo con 0.5-4 μg de ADN y se incuba a 37°C en un incubador agitador durante 40 minutos. Pasado este tiempo se añade 1ml de medio 2xYT y se incuba durante 45 minutos

de la misma forma que en el paso anterior. Se centrifuga a 13000 rpm 2 minutos y se elimina el exceso de medio para sembrar aproximadamente $100\mu\text{l}$ en placa de LB conteniendo el antibiótico adecuado para la selección de transformantes. Se siembran en otra placa bacterias competentes no transformadas como control negativo.

2.2.5. Selección y conservación de cepas bacterianas

Selección de cepas transformadas

A partir de las placas de siembra obtenidas tras la transformación bacteriana del material genético de interés, se analizan las colonias de forma individual para comprobar que efectivamente han incorporado el gen clonado. Para ello se disuelven colonias individuales en un tubo numerado con $5\mu\text{l}$ de agua desionizada. Estas muestras se someterán a lo que se denomina como PCR de colonia, donde se aplicarán a las muestras al igual que en una PCR convencional, ciclos térmicos repetidos. Debido a las elevadas temperaturas alcanzadas durante los ciclos de PCR, las bacterias se lisan liberando en la mezcla de reacción el material genético que contienen, proporcionando la muestra a amplificar, en este caso, el ADN clonado. Se añaden a la mezcla de reacción de PCR dos cebadores complementarios a la secuencia de ADN clonada y posteriormente transformada en bacterias competentes. Si las bacterias han incorporado dicho ADN durante la transformación, obtendremos una señal positiva en el gel de agarosa debido a que los cebadores han encontrado su secuencia complementaria.

Seguidamente se prepara la Master mix o mezcla de reacción que contiene los reactivos necesarios para llevar a cabo la PCR. A continuación, se listan las cantidades a pipetear de cada reactivo para el análisis i.e. de 18 colonias. Si el volumen de cada PCR individual es de $25\mu\text{l}$, el volumen total de Master mix será de $450\mu\text{l}$. Posteriormente, se pipetea en cada tubo como se puede ver esquemáticamente en la Fig. 2.6, $5\mu\text{l}$ de colonia disuelta en agua desionizada y $20\mu\text{l}$ de Master mix.

Tpn a 1x (NEB M02675)	45 μ l
dNTPs 25mM a 0.2mM (NEB N04465)	3.6 μ l
2x Cebadores (10mM a 0.2mM)	9 μ l
TaqPolimerasa 0.2mM x 25 μ l (NEB M02675)	3.6 μ l
Muestra total*	(5 μ l x 18 μ l) 90 μ l
dH ₂ O	289.8 μ l hasta 450 μ l totales

*Solamente tenemos en cuenta la cantidad de muestra total (5 μ l x número de colonias) para calcular el volumen de Master Mix pero no se añade a la mezcla de reacción.

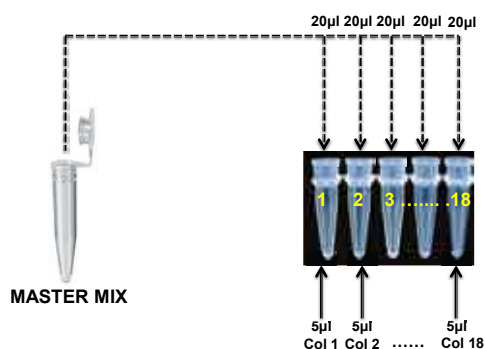


Figura 2.6: Representación esquemática del procedimiento de PCR de colonia. En cada tubo se dispensan 5 μ l de muestra (Col1 = Colonia 1 y así sucesivamente) y 20 μ l de Master mix.

Ciclos de PCR:

Una vez se realiza la mezcla de reacción en los tubos, se deposita en la máquina que selecciona automáticamente las temperaturas óptimas para llevar a cabo la reacción. Las temperaturas y tiempos de reacción que se detallan a continuación se deben introducir previamente en el programa de la máquina.

1. 95°C 30''
2. 95°C 15-30''
3. 55°C 30'
4. 68°C 1'/Kb

Repetir (1-4) 34 ciclos

5. 68°C 5'

6. 4°C ∞

Siempre debemos incluir un control negativo procedente de la placa negativa de transformación donde no esperamos amplificación, y un control positivo en el que sabemos con seguridad que habrá amplificación con el par de cebadores sintéticos diseñados, ya que se ha caracterizado con anterioridad.

Para visualizar la existencia de transformaciones positivas tras realizar la PCR de colonia, haremos una electroforesis en gel de agarosa. En la Fig. 2.7 se puede ver un ejemplo de PCR de colonia. En la línea 1 (L1) se carga el marcador de peso molecular, desde la línea 2 a la 11 (L2-L11), se observan las PCR de colonia positivas obtenidas tras la transformación. Las líneas 15 y 18 (L15 y L18) corresponden a los controles negativos y positivos, respectivamente.

El control negativo refleja que no hay amplificación del gen clonado en las bacterias competentes transformadas con una mezcla de ligación a la que que no se añade el gen de interés en el tubo de control negativo. Se comprueba con esto último que no existe contaminación de la Master Mix. El control positivo nos da idea de que no ha habido error en el proceso de PCR, y que el par de cebadores escogidos amplifican correctamente.

Conservación de cepas bacterianas

Es posible conservar a largo plazo cepas bacterianas a -80°C. Para ello se hace un cultivo de noche a 37°C con las bacterias positivas de la PCR de colonia, es decir, que han incorporado el ADN de interés. Al día siguiente se pipetea 1ml de dicho cultivo y 1ml de Glicerol al 40 % (Merck 1.04094.1000). Se deposita a -80°C.

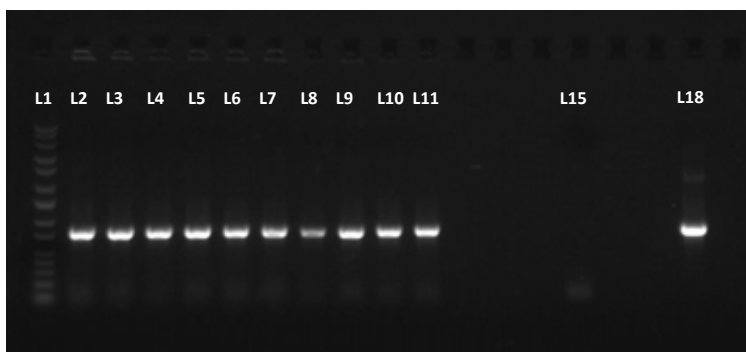


Figura 2.7: Gel de electroforesis de una PCR de colonia.

2.3. Obtención de cepas bacterianas

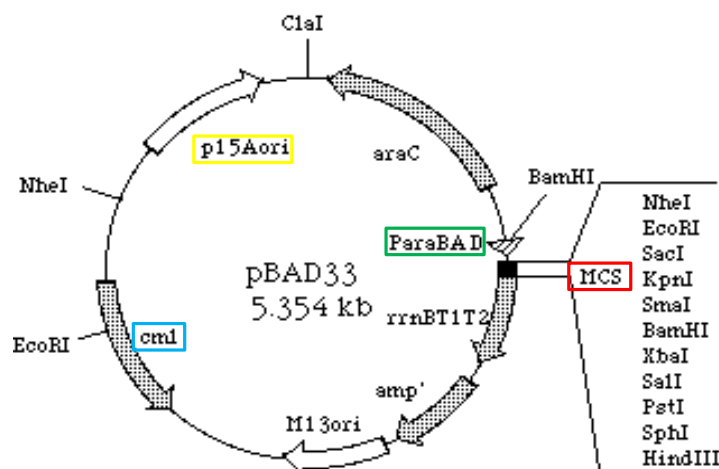
2.3.1. *Escherichia coli*

En el estudio de las oscilaciones en el ciclo celular de *Escherichia coli* se utilizaron tres cepas bacterianas con el fondo genético de la cepa MG1655, cedida gentilmente por el laboratorio del Dr. Gurol Süel (UT Southwestern, Dallas). Como se puede ver en la Tabla 2.3, el vector de clonaje utilizado es el pBAD33 con resistencia a Cloranfenicol (Guzman et al., 1995). Este vector de expresión contiene un MCS (*Multi-cloning-site*), es decir un sitio múltiple de clonaje donde se realizan las inserciones de los genes a expresar, ya que contiene una gran variedad de sitios de reconocimiento para enzimas de restricción. En la Fig. 2.8 se muestra una representación del plásmido pBAD33, donde se pueden ver marcados el MCS en rojo, el promotor inducible en verde, la resistencia a Cloranfenicol en azul y el origen de replicación en amarillo. El plásmido tiene un tamaño total de 5,354 Kb.

El objetivo es clonar en pBAD33 los genes *yfp*, *seqA-yfp* y *hda-dnaN-yfp* bajo el control del promotor inducible en presencia de arabinosa P_{ara} . En primer lugar se realiza el clonaje del gen *yfp*. Mediante PCR se amplifica dicho gen a partir de una muestra cedida por el laboratorio del Dr. Gurol Süel (UT Southwestern, Dallas).

Cepa de <i>Escherichia coli</i>	Plásmido
MG1655	pBAD33:: <i>P_{ara}-yfp</i>
MG1655	pBAD33:: <i>P_{ara}-seqA-yfp</i>
MG1655	pBAD33:: <i>P_{ara}-hda-dnaN-yfp</i>

Tabla 2.3: Cepa de *Escherichia coli* utilizada para transformar los genes *yfp*, *seqA-yfp* y *hda-dnaN-yfp* clonados en pBAD33 bajo el control del promotor inducible en presencia de arabinosa P_{ara} .



<http://www.shigen.nig.ac.jp/ecoli/strain/cvectorDetailAction.do?cvectorId=61>

Figura 2.8: Plásmido utilizado para clonar los genes *yfp*, *seqA-yfp* y *hda-dnaN-yfp* bajo el control del promotor inducible en presencia de arabinosa P_{ara} .

Para la amplificación por PCR se utilizan los cebadores:

Forward 5'-CGAGCTCGGTACCCAAGGAGGAAAGTCACATT-3'

Reverse 5'-ATTCTAGATTATTTATACAGTTTCGTCC-3'

Estos incluyen la secuencia de reconocimiento para las enzimas de restricción SacI y XbaI presentes en el MCS y utilizadas para la clonación de *yfp*. Tras realizar la PCR

se purifican las muestras mediante electroforesis en gel de agarosa. Posteriormente se realiza la reacción de restricción con las enzimas de restricción mencionadas anteriormente, (tanto en el vector como en el producto de PCR), se purifican y se ligan para ser transformadas en bacterias MG1655 hechas competentes en el laboratorio. Posteriormente se realiza la PCR de colonia para verificar la transformación. En la Fig. 2.9 se pueden ver los geles A, B y C que corresponden a la amplificación por PCR, purificación tras la restricción y PCR de colonia, respectivamente.

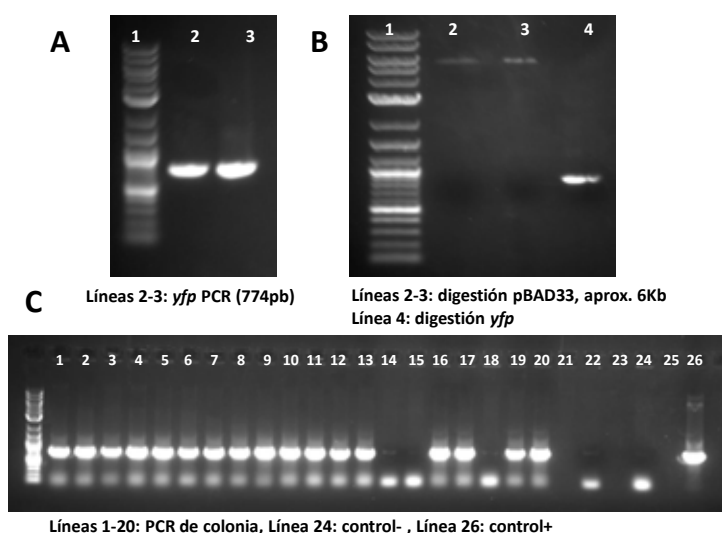


Figura 2.9: Geles de electroforesis en agarosa A, B y C que corresponden a la PCR, purificación tras la restricción y PCR de colonia respectivamente, del clonaje del gen *yfp* en pBAD33.

En segundo lugar se procede al clonaje en pBAD33 de la fusión de los genes *seqA* y *yfp*. Para ello se realizan las reacciones que se detallan en la Fig. 2.10.

Para unir los dos genes se utiliza un *linker* (LK en la Fig. 2.10) que es amplificado gracias a la secuencia complementaria en los cebadores 2 y 3 (en amarillo). En primer lugar se hace la amplificación por PCR de *seqA* y *yfp* con los pares de cebadores 1-2 y 3-4, respectivamente. Se realiza una tercera reacción de PCR de fusión con los

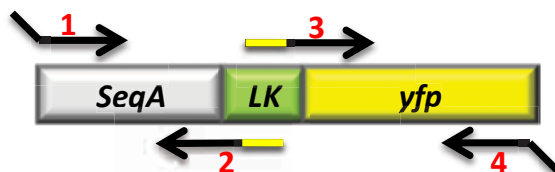


Figura 2.10: Esquema del proceso de fusión de los genes *seqA* y *yfp*.

cebadores 1 y 4 con 70 ng de cada PCR anterior, consiguiendo amplificar así la pieza completa. En este caso la inserción se realiza utilizando las enzimas de restricción del MCS SacI y XbaI. Para la amplificación por PCR se utilizan los cebadores (nota: se ha separado en dos aquellos cebadores de gran longitud, la secuencia completa es de 5'a 3'):

Amplificación del gen *seqA* a partir del gen natural de *Escherichia coli* MG1655:

Forward 5'-AAGAGCTCAAGGAGGAAAGTCACATTATGAAAACGATTGA-
-AGTTGATGATGAACTC-3'

Reverse 5'-AATTGATTGAGAAGGTTTGCGGAACTATCGATCAAGCCAAA-
-GCGGCAAACCAT-3'

Amplificación del gen *yfp* a partir del clonaje anterior:

Forward 5'-GATCAAGCCAAAGCGGCAAACCATAGCAAAGGTGAAGAAC-
-TGTTACCCG-3'

Reverse 5'-GCGGATTACTCGCCCGAAAAAATCTAGAAT-3'

Amplificación de la fusión *seqA-yfp*:

Forward 5'-AAGAGCTCAAGGAGGAAAGTCACATTATGAAAACGATTGAA-
-GTTGATGATGAACTC-3'

Reverse 5'-GCGGATTACTCGCCCGAAAAAATCTAGAAT-3'

Tras realizar las PCR individuales y la PCR de fusión, se purifican las muestras mediante electroforesis en gel de agarosa, y se realiza la reacción de restricción con las enzimas de restricción mencionadas anteriormente, (tanto en el vector como en el producto fusión por PCR), se purifican y se ligan para ser transformadas en bacterias MG1655 hechas competentes en el laboratorio. Posteriormente se realiza la PCR de

colonia para verificar la transformación. En la Fig. 2.11 se pueden ver los geles A, B y C que corresponden a las PCR individuales, purificación tras la PCR de fusión y la PCR de colonia respectivamente.

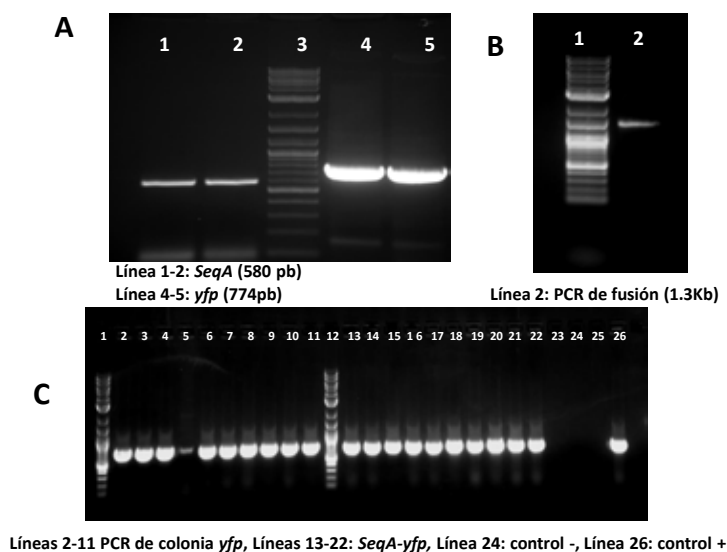


Figura 2.11: Geles de electroforesis en agarosa A, B y C que corresponden a las PCR individuales, purificación tras la PCR de fusión y PCR de colonia respectivamente, del clonaje de la fusión *seqA-yfp* en pBAD33.

El último clonaje realizado es el de los genes *hda* y la fusión *dnaN-yfp*. En primer lugar se realiza la inserción en pBAD33 del gen *hda* utilizando las enzimas de restricción *SacI* y *XbaI*. En la Fig. 2.12 se pueden ver los geles A y B que corresponden a la PCR de amplificación del gen *hda* y la PCR de colonia, respectivamente. Para la amplificación por PCR se utilizan los siguientes cebadores:

Amplificación del gen *hda* a partir del gen natural de *Escherichia coli* MG1655:

Forward 5'-ATGAGCTCGGAGATATACATATGGTA-3'

Reverse 5'-ATCTAGACCGCATCCGACAATAAACA-3'

Una vez introducido el gen de *hda* en el plásmido pBAD33 se realiza el clonaje de la fusión *dnaN-yfp*. La técnica de fusión usada en este caso es exactamente la misma

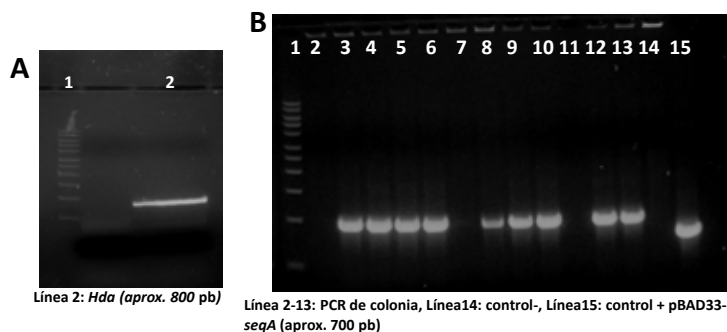


Figura 2.12: Geles de electroforesis en agarosa A y B que corresponden a la PCR de amplificación del gen *hda*, y la PCR de colonia, respectivamente.

que la utilizada para el caso de *seqA-yfp*. Para este clonaje se utilizan las enzimas de restricción *XbaI* y *HindIII*. Para la amplificación por PCR se utilizan los siguientes cebadores (nota: se ha separado en dos aquellos cebadores de gran longitud, la secuencia completa es de 5' a 3'):

Amplificación del gen *dnaN* a partir del gen natural de *Escherichia coli* MG1655:

Forward 5'-ATAAGCTTTATTACAGTCTCATTGGCA-3'

Reverse 5'-ATGGTTTGCCGCTTTGGCTTGATCCA-3'

Amplificación del gen *yfp*:

Forward 5'-GATCAAGCCAAAGCGGCAAACCATAGCAAAGGTGAAGAACT-
-G TTCACCG-3'

Reverse 5'-ATAAGCTTTATTTTTTCGGGCGAGTAA-3'

Amplificación de la fusión *dnaN-yfp*:

Forward 5'-ATAAGCTTTATTACAGTCTCATTGGCA-3'

Reverse 5'-ATAAGCTTTATTTTTTCGGGCGAGTAA-3'

En la Fig. 2.13 se pueden ver los geles de electroforesis en agarosa A, B y C que se corresponden a las PCR individuales, la fusión de los dos genes y la PCR de colonia, respectivamente.

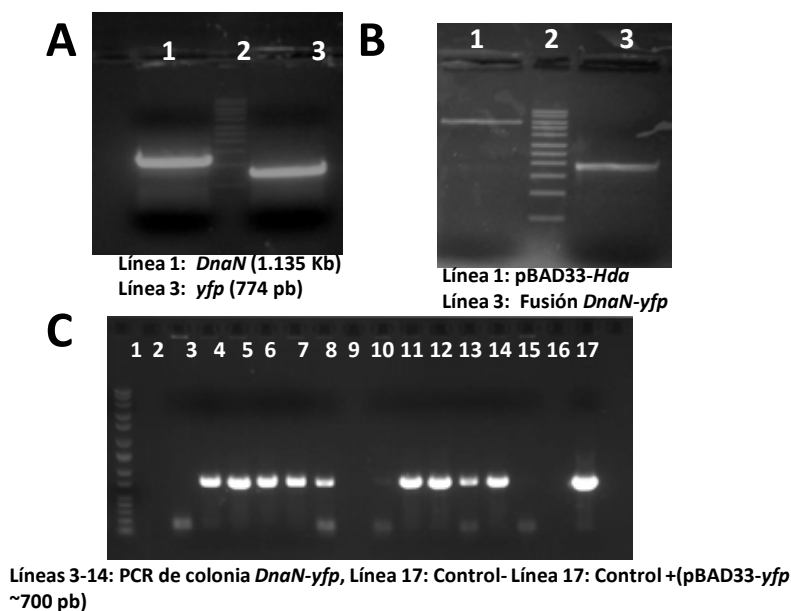


Figura 2.13: Geles de electroforesis en agarosa A, B y C que corresponden a las PCR individuales, purificación tras la PCR de fusión y PCR de colonia respectivamente, del clonaje de la fusión *dnaN-yfp* en pBAD33.

2.3.2. *Bacillus subtilis*

Para la obtención de la cepa bacteriana que se describe a continuación se utilizó una cepa resistente a Cloranfenicol que tiene integrado los genes P_{spo0A} -*yfp* y P_{comG} -*cfp* en el locus *SacA* (cepa denominada R1 proveniente del laboratorio del Dr. Gurol Süel de UT Southwestern, Dallas). Esta cepa fue la primera alternativa utilizada para obtener la cepa de Kuchina et al. (2011), denominada NoE.

En primer lugar se realiza el clonaje de P_{spoIIE} -*spoIIE*-XP en el plásmido integrativo ECE173 que confiere la resistencia a Kanamicina, el cual se integra en el locus *gltA* de *B. subtilis*. En la Fig. 2.14 se puede ver el mapa del plásmido ECE173 con la resistencia a Kanamicina y las enzimas de restricción que contiene. Con este plásmido se introduce en R1 el gen *spoIIE* marcado con una etiqueta de degradación que será reconocida por el sistema de degradación de proteínas ClpXP (Flynn et al.,

2001; Gottesman et al., 1998). Para ello se amplifica mediante PCR el gen y su promotor utilizando los cebadores (nota: se ha separado en dos aquellos cebadores de gran longitud, la secuencia completa es de 5'a 3'):

PCR1:

GS-231 Forward 5'-TTGGATCCGTACGGGTCATCCTAACAAATCGG-3'

GS-365 Reverse 5'-CAGACGAACAGACAGATGACAGCGAAG-3'

PCR2:

GS-364 Forward 5'-CTTCGCTGTCATCTGTCTGTTTCGTCTG-3'

GS-331 Reverse 5'-CTACGCCGCCAGCGCCACGTTCTGGTTAAAGCTGTT-
-GGTTTTGCCCGCTGAAATTTCTTGTTTGTGTTTTGAAA-
-GATTGC-3'

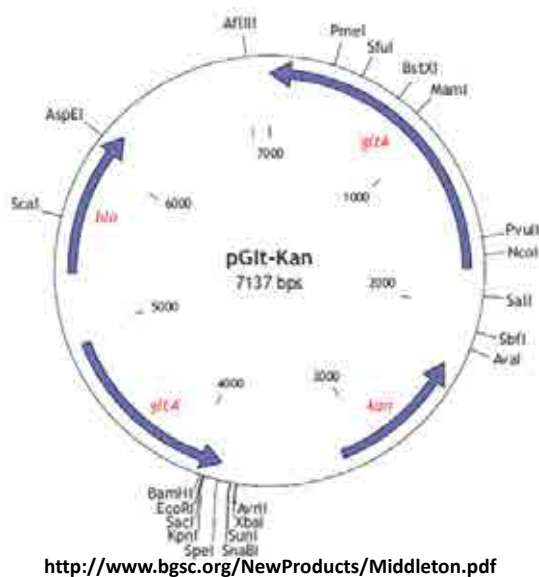


Figura 2.14: Plásmido integrativo que confiere resistencia a Kanamicina a la bacteria huésped. El lugar de integración en el cromosoma de *B. subtilis* es el locus *gtaA*. Imagen tomada de <http://www.bgsc.org/NewProducts/Middleton.pdf>

En la Fig. 2.15A se observan las bandas correspondientes a las PCR 1 y 2 con un

tamaño de 1,376 Kb (líneas 2 y 3) y 1,397 Kb (líneas 5 y 6) respectivamente. Tras realizar la PCR de fusión utilizando las piezas 1 y 2 y los cebadores GS-231 y GS-331 se obtiene una banda de aproximadamente 3 Kb (línea 2) que se puede observar en la Fig. 2.15B. Los cebadores GS-231 y GS-331 poseen la secuencia de restricción para BamHI, por lo que se decidió cambiar la enzima de restricción en el cebador GS-231. En este caso se utilizó XbaI por lo que los nuevos cebadores utilizados fueron (nota: se ha separado en dos aquellos cebadores de gran longitud, la secuencia completa es de 5'a 3'):

GS-366 Forward 5'-TTTCTAGAGTACGGGTCATTCTAACAAATCGG-3'
 GS-314 Reverse 5'-AAGGATCCGGCATTTCGTGCATAAAAAAACCGAT-
 -TTCCGGAAGGAAATCGGTTTGCTACGCCGCCAGCG-
 -CCACGTTCTGGTTAAAGCTGTTGGTTTTGCCCCACG-
 -TTCTGGTTAAAGCTGTTGGTTTTGCCCGCTGAAAT-
 -TTCTTGTTTGTGTTTTGAAAGATTGC-3'

En la Fig. 2.15C se observa la nueva amplificación por PCR (línea 2) y en la Fig. 2.15D las bandas correspondientes al vector y a la PCR anterior, tras la purificación por electroforesis en agarosa después de someterlos a la reacción de restricción con las enzimas BamHI y XbaI (líneas 2 y 3). En la figura Fig. 2.15E se observa la PCR de colonia tras la reacción de ligación y transformación en bacterias competentes TOP10. Posteriormente se realiza la transformación de la cepa R1 con el plásmido ECE173:: P_{spoIIE}-spoIIE-XP.

Debido a que se tenía que delecionar (eliminar) el gen salvaje *spoIIE* de la cepa R1 se utilizó el plásmido pER449::ΔIIE, que al eliminar dicho gen inserta la resistencia a Neomicina. El plásmido ECE173:: P_{spoIIE}-spoIIE-XP confiere a la cepa receptora la resistencia a Kanamicina, lo que dificulta la selección por Neomicina, ya que ambos genes de resistencia son de la misma familia e interfieren en la función ribosomal con lo que alteran el proceso de traducción a proteínas. Es por eso que se tomaron dos estrategias: i) se cambió el gen Neomicina de pER449::ΔIIE por Eritromicina (PCR

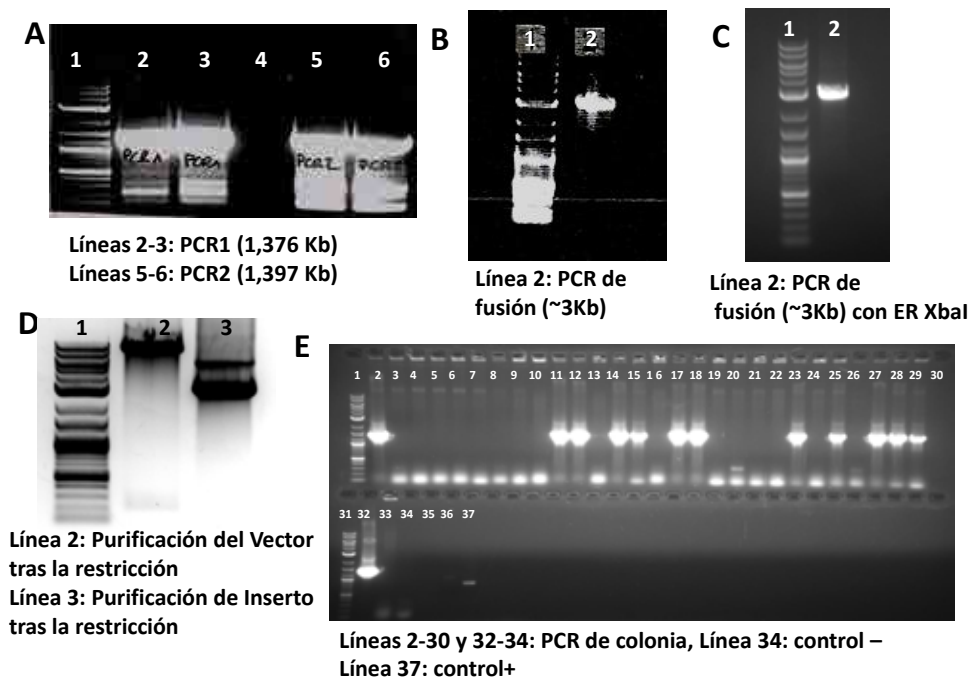


Figura 2.15: Geles de electroforesis en agarosa A, B, C, D y E que corresponden a las PCR 1 y 2 para la obtención de las piezas a fusionar (A), PCR de fusión (B), PCR tras cambiar la enzima de restricción BamHI por XbaI en el cebador forward (C), bandas obtenidas tras la purificación mediante electroforesis en gel de agarosa después de la reacción de restricción (D), y la PCR de colonia (E) del clonaje de P_{spoIIE} - $spoIIE$ - XP en el plásmido de integración ECE173.

y geles de electroforesis no mostrados debido a que finalmente se opta por la ii)), y ii) se cambió el gen de resistencia a la Kanamicina de ECE173:: P_{spoIIE} - $spoIIE$ - XP por el de resistencia a Eritromicina. A continuación se muestra en la figura Fig. 2.16A la amplificación por PCR del gen de resistencia a Eritromicina (líneas 2 y 3). Se utilizaron los siguientes cebadores para amplificar dicho gen:

GS-158 Forward 5'-TCGGATCCCTACTCAGGAGAGCGTTCACCGAC-3'

GS-159 Reverse 5'-GATCTAGATACAAATTCCCCGTAGGCGCTAG-3'

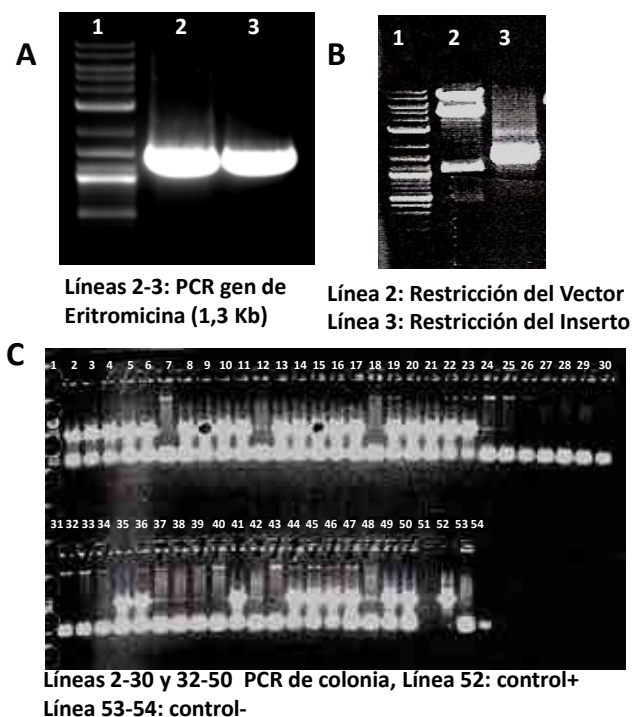


Figura 2.16: Geles de electroforesis en agarosa A, B y C que corresponden a las PCR para la obtención del gen de resistencia a Eritromicina, purificación tras la restricción con BamHI y EcoRV del vector (línea 2) y la restricción con XbaI del gen de Eritromicina, y por último la PCR de colonia tras la ligación y transformación del plásmido ECE173:: P_{spoIIE} - $spoIIE$ -XP con resistencia a Eritromicina.

Tras la reacción de restricción con BamHI y EcoRV tanto del vector como del inserto, ambos se purifican mediante un gel de electroforesis en agarosa (Fig. 2.16B) y se corta la banda superior (línea 2) que se corresponde con el fragmento de vector que se utilizará para ligar con el gen de Eritromicina (línea 3). En la Fig. 2.16C se observa la PCR de colonia tras la ligación y transformación del plásmido ECE173:: P_{spoIIE} - $spoIIE$ -XP con resistencia a Eritromicina en bacterias competentes TOP10.

El siguiente paso en la obtención de esta nueva cepa es la transformación en R1

tanto del plásmido pER449:: Δ IIE con resistencia a Neomicina como el plásmido ECE173:: P_{spoIIE} - $spoIIE$ -XP con resistencia a Eritromicina. En la Fig. 2.17A y B se muestran las PCR de colonia realizadas para comprobar la transformación de los plásmidos pER449:: Δ IIE y ECE173:: P_{spoIIE} - $spoIIE$ -XP, respectivamente.

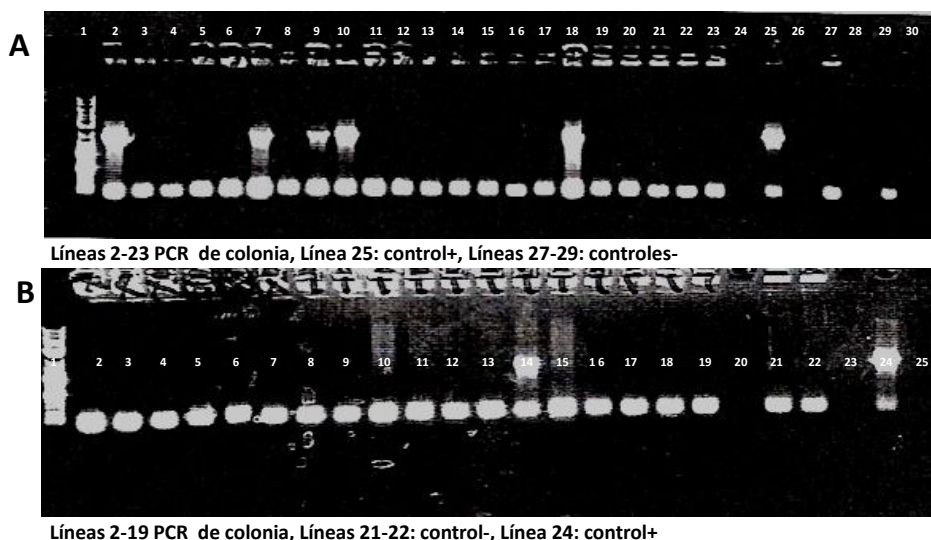


Figura 2.17: Geles de electroforesis en agarosa A, B donde se muestran las PCR de colonia tras la transformación de los plásmidos pER449:: Δ IIE y ECE173:: P_{spoIIE} - $spoIIE$ -XP respectivamente.

La última transformación realizada en la cepa R1 es la del plásmido pLD30:: P_{spoIIG} - $comK$ - P_{comG} - $ClpXP$ que se integra en el locus *AmyE* de *B. subtilis*, confiriendo a la bacteria receptora la resistencia a Espectinomicina. Por último se realizó una PCR de colonia para los tres plásmidos transformados utilizando los siguientes cebadores:

Transformación de pER449:: Δ IIE:

GS-231 Forward 5'-TTGGATCCGTACGGGTCATCCTAACAATCGG-3'

GS-57 Reverse 5'-GACCAGACATTACGAACTGGCACAG-3'

Transformación de ECE173:: P_{spoIIE} - $spoIIE$ -XP :

AA-51 Forward 5'-CAGCCACCTCCATAAAATAACGCAG-3'

GS-351 Reverse 5'-GTCGCTACCATTACCAGTTGGTCTGG -3'

Transformación de pLD30::P_{spoIIG}-comK-P_{comG}-ClpXP:

GS-53 Forward 5'-AATGCAGTGGCTGAATCTTCTCC-3'

GS-54 Reverse 5'-CAAGCTCATCTGTGATCCCTTGG-3'

En la Fig. 2.18 se muestra el resultado de la PCR de colonia para los tres plásmidos. La línea 1 corresponde al marcador, las líneas 2-4 son las PCR de colonia para pER449:: Δ IIE, y las líneas 5 y 6 corresponden a los controles positivo y negativo respectivamente. Las líneas 7-9 son las PCR de colonia para ECE173:: P_{spoIIE}-spoIIE-XP. Las líneas 10 y 11 corresponden a los controles positivo y negativo, respectivamente. Por último, las líneas 12 y 16 corresponden al control negativo y positivo para pLD30:: P_{spoIIG}-comK- P_{comG}-ClpXP, respectivamente, y las líneas 13-15 corresponden a la PCR de colonia para pLD30:: P_{spoIIG}-comK- P_{comG}-ClpXP.

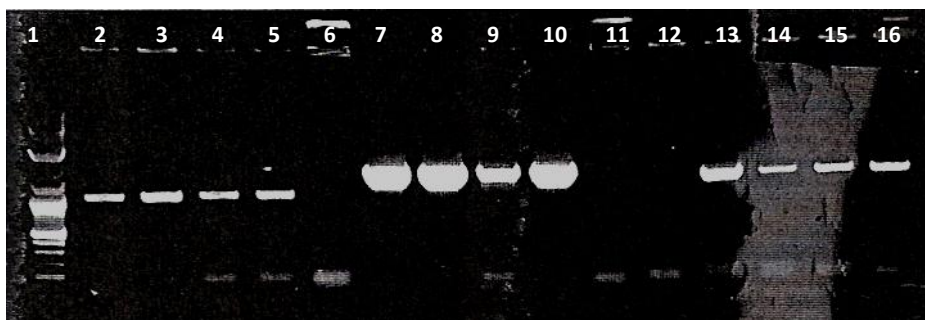


Figura 2.18: Gel de electroforesis en agarosa de la PCR de colonia tras la transformación de los plásmidos pER449:: Δ IIE, ECE173:: P_{spoIIE}-spoIIE-XP y pLD30:: P_{spoIIG}-comK-P_{comG}-ClpXP.

En la creación de esta cepa se pretende la degradación de la proteína SpoIIE marcándola con una etiqueta de degradación (XP). Tras realizar los experimentos de microscopía se observó que el efecto de degradación de SpoIIE era demasiado elevado debido a que las proteasas que degradan SpoIIE eran estables. En la Fig. 2.19 se muestra una célula R1 señalada por una flecha roja, la cual expresa P_{spo0A}-yfp

y $P_{comG-cfp}$ (amarillo y azul, respectivamente). Se ha interferido con el proceso de esporulación debido a la elevada degradación de SpoIIE, de tal forma que las bacterias son incapaces de esporular produciéndose la lisis celular.

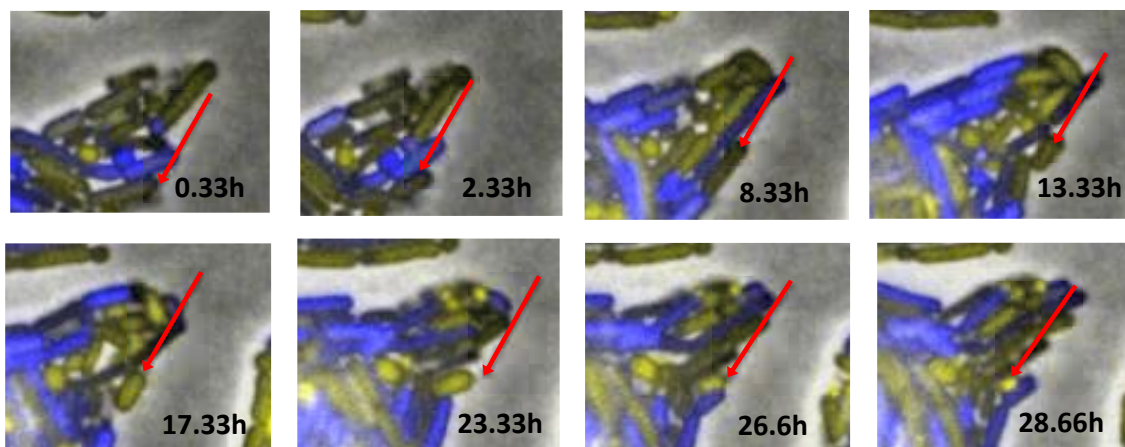


Figura 2.19: Imágenes de microscopía de la cepa que expresa $P_{spo0A-yfp}$ (amarillo) y $P_{comG-cfp}$ (azul), y a la que se le integraron los plásmidos ECE173:: $P_{spoIIE-spoIIE-XP}$ y pLD30:: $P_{spoIIG-comK} - P_{comG-ClpXP}$. En esta cepa se pretendía interferir en la localización y actividad de spoIIE. Se puede ver marcada con una flecha roja una célula que es incapaz de completar el proceso de esporulación.

Se opta por una nueva estrategia para la obtención de la cepa NoE de Kuchina et al. (2011). En este caso se clona $P_{spoIIE-spoIIE}$ en el plásmido ECE173 con resistencia a Eritromicina clonado anteriormente, pero se substituye la etiqueta de degradación XP por la secuencia $ssrA$ de *E. coli* en un intento de disminuir la tasa de degradación de SpoIIE. La degradación de SpoIIE tiene lugar en presencia de SspB, también natural de *E. coli*, bajo el control del promotor natural de *B. subtilis* P_{spoIIG} . Para cambiar la etiqueta de degradación XP se amplifica por PCR la secuencia $P_{spoIIE-spoIIE}$ del clon ECE173:: $P_{spoIIE-spoIIE-XP}$ anterior pero utilizando un cebador reverso que contiene la secuencia $ssrA$. Los cebadores usados son los siguientes:

GS-366 Forward 5'-TTTCTAGAGTACGGGTCATTCTAACAAATCGG-3'
 GS-442 Reverse 5'-AAGGATCCGGCATTTCGTGCATAAAAAAACCGATT-
 -TCCGGAAGGAAATCGGTTTGCTAGCCGCCAAGAGCA-
 -TAATTTTCGCTATAATTTTCATCATTGTCAGCTGAAA-
 -TTTCTTGTGTTGTTTTGAAAGATTGC-3'

Se somete tanto al vector ECE173 con resistencia a Eritromicina (eliminando el anterior ECE173::P_{spoIIE-spoIIE-XP}) como al producto de PCR a la restricción con las enzimas de restricción XbaI y BamHI. Tras la reacción de ligación de ambas piezas se transforma en bacterias *Escherichia coli* competentes TOP10. Se extrae el nuevo plásmido ECE173::P_{spoIIE-spoIIE-XP-ssrA^{EC}} y se transforma en la cepa R1 que tiene deleciónado el gen endógeno *spoIIE* mediante pER449::ΔIIE resistente a Cloranfenicol y Neomicina.

En la Fig. 2.20A se observan las PCR de amplificación de P_{spoIIE-spoIIE-XP-ssrA^{EC}}, en la Fig. 2.20B se muestra el gel de electroforesis para la PCR de colonia tras las transformación del plásmido ECE173::P_{spoIIE-spoIIE-XP-ssrA^{EC}} en las bacterias competentes TOP10 y en la Fig. 2.20C se muestra la PCR de colonia para la comprobación de la transformación de ECE173::P_{spoIIE-spoIIE-XP-ssrA^{EC}} (Eritromicina) en la cepa R1 (Cloranfenicol) con pER449::ΔIIE (Neomicina).

En segundo lugar se llevó a cabo la fusión del promotor P_{comG} con el gen *SspB*. Para ello se realizan las PCR individuales y posteriormente la PCR de fusión utilizando los siguientes cebadores:

PCR del promotor P_{comG}:

GS-79 Forward 5'-AATGTGACTTTCCTCCTTTCAACGC-3'
 GS-306 Reverse 5'-AATAAGCTTAGATCACCACGCCATTTCCCTTATA-3'

PCR del gen *SspB*:

GS-441 Forward 5'-ATCAGCTGGTTTCGTGGTGAATATGATTGCCAC-3'
 GS-440 Reverse 5'-GCGTTGAAAGGAGGAAAGTCACATTATGGATTT-
 -GTCACAGCTAACACCACG-3'

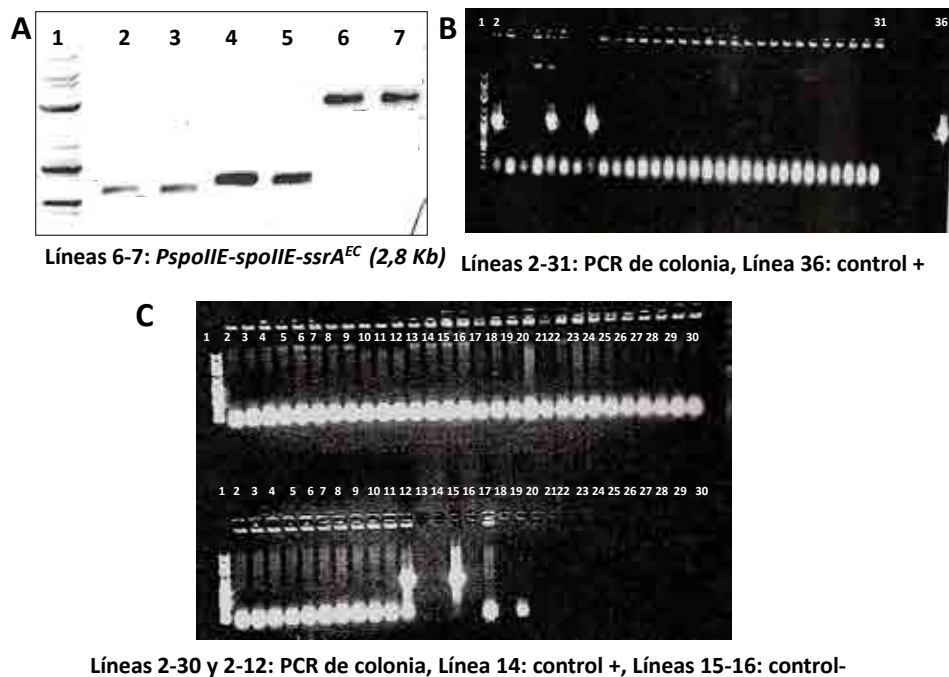


Figura 2.20: Geles de electroforesis en agarosa de la amplificación por PCR de *P_{spoIIE}-spoIIE-XP-ssrA^{EC}* (A), la PCR de colonia para la transformación de ECE173::*P_{spoIIE}-spoIIE-XP-ssrA^{EC}* en bacterias TOP10 (B), y la PCR de colonia para la transformación de ECE173::*P_{spoIIE}-spoIIE-XP-ssrA^{EC}* en *B. subtilis* R1 con pER449:: Δ IIE.

PCR de fusión:

GS-441 Forward 5'-ATCAGCTGGTTTCGTGGTGAATATGATTGCCAC-3'

GS-306 Reverse 5'-AATAAGCTTAGATCACCACGCCATTTCCCTTATA-3'

Una vez realizada la PCR de fusión se clona en el plásmido pDL30::*P_{spoIIG}-comK*, que confiere a las bacterias huéspedes la resistencia a Espectinomicina. La clonación se realiza mediante la restricción con las enzimas de restricción HindIII y EcoRV en el vector, y HindIII y PvuII en el inserto. Tras la reacción de ligación se transforma en bacterias TOP10 competentes. En la Fig. 2.21A se muestran las PCR individuales de *P_{comG}* y *SspB*, en la Fig. 2.21B la PCR de fusión y la PCR de colonia en la Fig. 2.21C

de la transformación de la mezcla de ligación en bacterias TOP10.

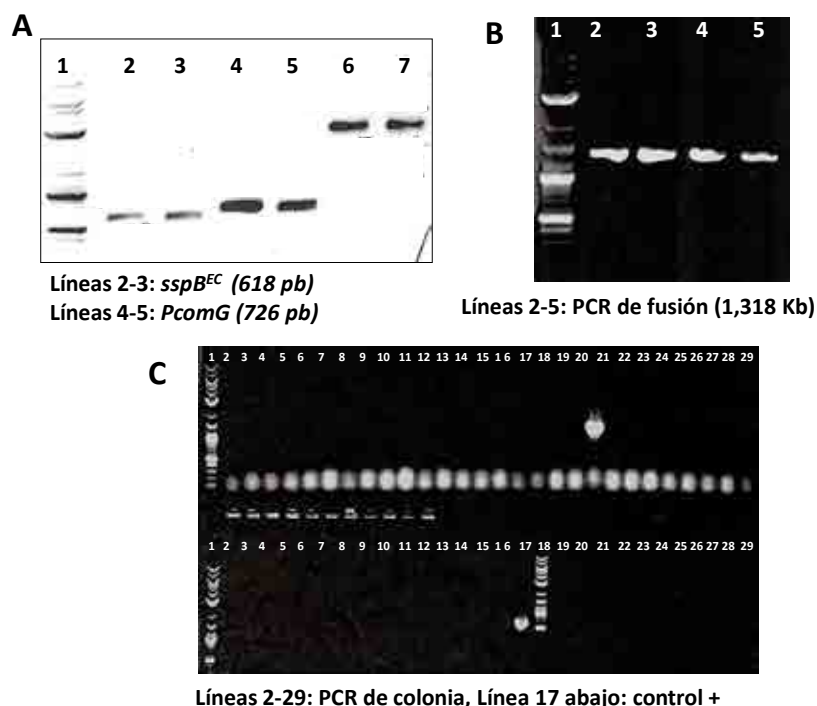


Figura 2.21: Geles de electroforesis A, B y C de las PCR individuales de *P_{comG}* y *SspB*, PCR de fusión y PCR de colonia del clon pDL30::P_{spoIIG-comK-P_{comG}-SspB respectivamente.}

La creación de estas cepas se realizó durante una estancia en el laboratorio del Dr. Gurol Süel (UT Southwestern, Dallas). Debido a la conclusión de dicha estancia la finalización de esta cepa fue llevada a cabo por A. Kuchina del laboratorio del Dr. Süel. El último paso para concluir esta cepa fue la extracción y transformación del plásmido pDL30::P_{spoIIG-comK-P_{comG}-SspB. En la Fig. 2.22 se muestra una célula que falla en la consecución de la esporulación en presencia de la expresión simultánea de ComK y Spo0A en células NoE que expresan a su vez el factor SspB. Posteriormente A. Kuchina añadió una etiqueta de degradación de *B. subtilis* al factor exógeno SspB y reducir de esta forma su vida media. De esta manera se obtuvo finalmente la cepa NoE de Kuchina et al. (2011).}

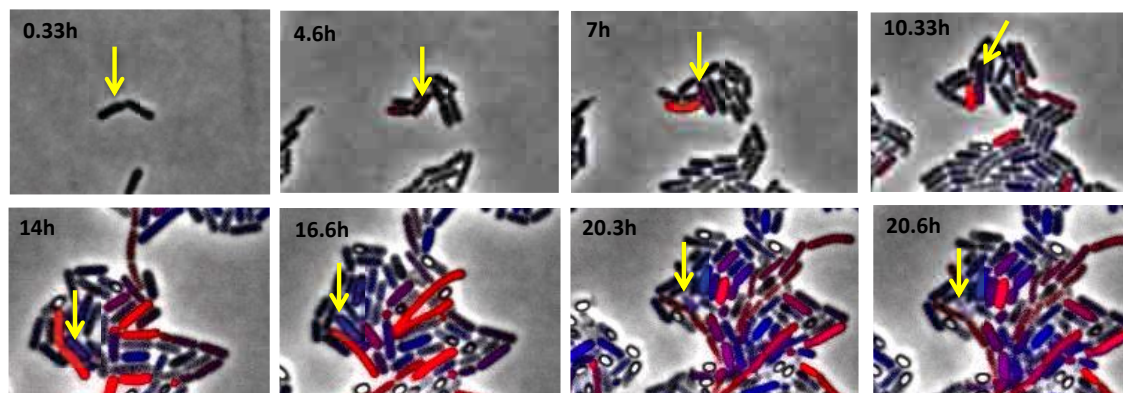


Figura 2.22: Secuencia que muestra el crecimiento de la cepa que expresa P_{spo0A} -*yfp* (azul) y P_{comG} -*cfp* (rojo), y a la que se le integraron los plásmidos ECE173:: P_{spoIIE} -*spoIIE*-*XP-ssrA^{EC}* y pDL30:: P_{spoIIG} -*comK*- P_{comG} -*SspB*. De la misma forma que en el caso anterior, el objetivo de la creación de esta cepa era interferir en la localización y actividad de SpoIIE, mediante su degradación. Se puede ver marcada con una flecha amarilla una célula en la que se expresan simultáneamente P_{spo0A} -*yfp* y P_{comG} -*cfp* que es incapaz de completar el proceso de esporulación (células blancas en la imagen) ya que se lisa.

En la Tabla 2.4 se detallan las cepas de *Bacillus subtilis* utilizadas en el estudio descrito en el Capítulo 6. Cabe señalar que todas ellas comparten el mismo fondo genético, que se corresponde con la cepa de *Bacillus subtilis* PY79.

Para la obtención de la cepa denominada 75xS se utiliza un vector que exprese P_{comS} -*comS* en elevadas cantidades. El plásmido usado es de elevado número de copias y se denomina pDG148, gentilmente cedido por Beth A. Lazazzera (UCLA).

En la Fig. 2.23 se muestra una representación del plásmido pDG148 donde se pueden ver los orígenes de replicación para *Bacillus subtilis* (oriUB110) y *Escherichia coli* (ori pBR322). El plásmido confiere resistencia a Kanamicina y Ampicilina a las bacterias huéspedes y tiene un tamaño total de 8,274 Kb.

Para clonar P_{comS} -*comS* en este plásmido se amplifica por PCR en primer lugar la secuencia P_{comS} -*comS* utilizando como muestra el plásmido PHP13:: P_{comS} -*comS*

Cepa	Genotipo	Referencia
V10	<i>AmyE::P_{comG}-cfp-P_{comS}-yfp</i>	(Süel et al., 2006)
6xS	<i>AmyE::P_{comG}-cfp-P_{comS}-yfp</i> pHP13:: <i>P_{comS}-comS</i>	(Süel et al., 2007)
75xS	<i>AmyE::P_{comG}-cfp-P_{comS}-yfp</i> pDG148:: <i>P_{comS}-comS</i>	Este estudio
Hyper-αS	<i>AmyE::P_{hyp}-comS</i> <i>SacA::P_{comG}-cfp-P_{comS}-yfp</i>	(Süel et al., 2007)
Hyper-αS-6xS	<i>AmyE::P_{hyp}-comS</i> <i>SacA::P_{comG}-cfpP_{comS}-yfp</i> pHP13:: <i>P_{comS}-comS</i>	Este estudio
Hyper-αS-75xS	<i>AmyE::P_{hyp}-comS</i> <i>SacA::P_{comG}-cfpP_{comS}-yfp</i> pDG148:: <i>P_{comS}-comS</i>	Este estudio
Hyper-αK	<i>AmyE::P_{hyp}-comK</i> <i>SacA::P_{comG}-cfpP_{comS}-yfp</i>	Este estudio
Hyper-αK-6xS	<i>AmyE::P_{hyp}-comK</i> <i>SacA::P_{comG}-cfpP_{comS}-yfp</i> pHP13:: <i>P_{comS}-comS</i>	Este estudio
Hyper-αK-75xS	<i>AmyE::P_{hyp}-comK</i> <i>SacA::P_{comG}-cfpP_{comS}-yfp</i> pDG148:: <i>P_{comS}-comS</i>	Este estudio
Control-αS	<i>AmyE::P_{hyp}-yfp</i>	(Süel et al., 2007)
Control-αK (KG)	<i>AmyE::P_{comG}-cfp-P_{comK}-yfp</i>	(Süel et al., 2006)
Control-βS6xS	<i>AmyE::P_{hyp}-yfp</i> pHP13:: <i>P_{comS}-cfp</i>	Este estudio
Control-βS75xS	<i>AmyE::P_{hyp}-yfp</i> pDG148:: <i>P_{comS}-cfp</i>	Este estudio
Norm-βS	<i>AmyE::P_{comS}-cfp</i>	Este estudio

Tabla 2.4: Cepas utilizadas en el estudio descrito en el Capítulo 6. Definición del genotipo y referencia.

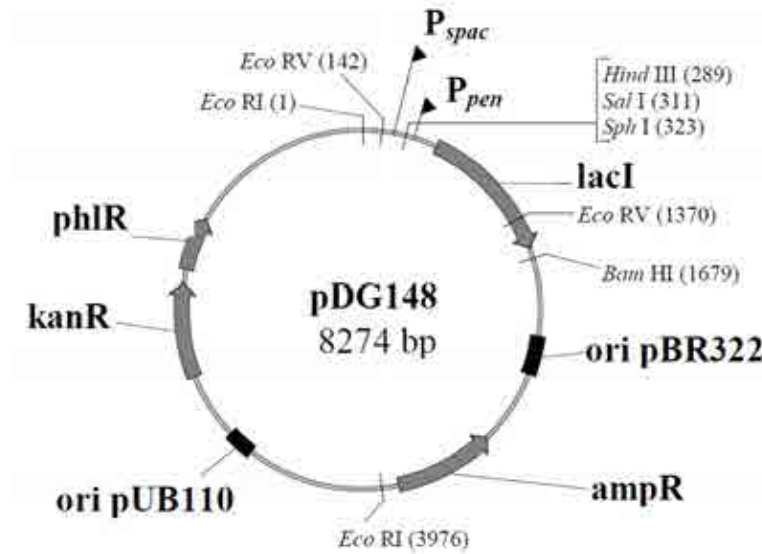


Figura 2.23: Plásmido pDG148 utilizado para la expresión de genes de interés en cepas de *Bacillus subtilis*. Imagen cedida por Beth A. Lazazzera (UCLA).

cedido por Beth A. Lazazzera (UCLA). Las bacterias huéspedes de este vector de clonación adquieren los genes de resistencia a los antibióticos Cloranfenicol y Eritromicina (Süel et al., 2007). Las enzimas de restricción seleccionadas para este clonaje son *EcoRV* y *BamHI*, por eso son incluidas en el diseño de los cebadores sintéticos. Para la amplificación por PCR se utilizan los cebadores:

GS-342 Forward 5'-GAGGATCCAAAGCCTCATGCCTATTCTTGA-3'
 GS-329 Reverse 5'-ATGATATCCAGAAAGTCAAAAGCCTCCGACCGGA-
 -GGCTTTTGACTATTACTCCTACTTCTCCCTCCAGC-
 -AGAAGTACAG-3'

Una vez realizada la reacción de ligación, se transforma el producto en *Escherichia coli* comercial (Life Technologies C4040-52). En la Fig. 2.24 se pueden ver los geles de electroforesis en agarosa A, B y C que se corresponden a la purificación tras la restricción del plásmido, la purificación de la secuencia $P_{comS-comS}$ y la PCR de colonia, respectivamente. Se realiza la extracción plasmídica utilizando el kit comercial

de la casa Sigma. Una vez obtenido el plásmido pDG148::P_{comS}-comS se transforma en la cepa de *B. subtilis* denominada V10 (Tabla 2.4) (Süel et al., 2006).

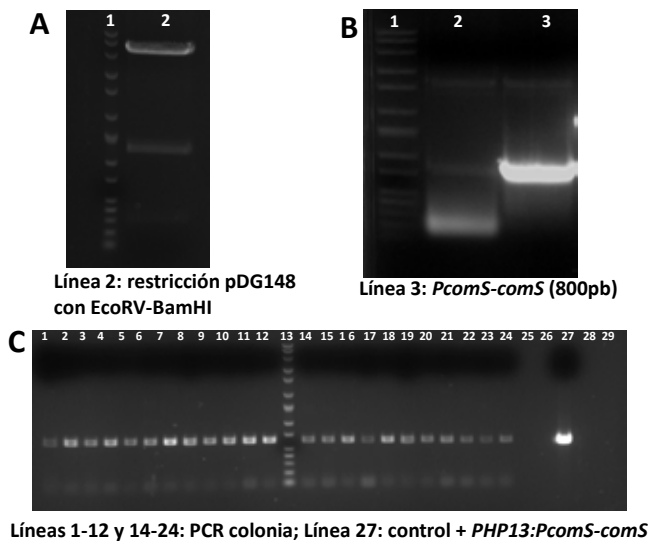


Figura 2.24: Geles de electroforesis en agarosa A, B y C que corresponden a la purificación tras la restricción del plásmido, la purificación de la secuencia P_{comS}-comS y la PCR de colonia respectivamente, del clonaje de P_{comS}-comS en pDG148.

Para la construcción de la cepa Control-βS6xS se clonó en el plásmido PHP13 la fusión P_{comS}-cfp, utilizando las enzimas de restricción SmaI y HindIII. En la Fig. 2.25 se observan los geles de electroforesis A, B y C que se corresponden a la banda de PHP13 purificada tras la restricción, la PCR de fusión P_{comS}-cfp, y la PCR de colonia, respectivamente. Los cebadores utilizados para la amplificación son los mismos que para la cepa Control-βS75xS, pero con las enzimas SmaI y HindIII. Una vez realizada la reacción de ligación, se transforma en *Escherichia coli* comerciales (Life Technologies C4040-52) y tras la PCR de colonia se extrae el plásmido con el kit de la casa comercial de Sigma.

Una vez obtenido el plásmido PHP13::P_{comS}-cfp se transforma en la cepa de *B. subtilis* denominada Control-αS (Tabla 2.4) (Süel et al., 2007).

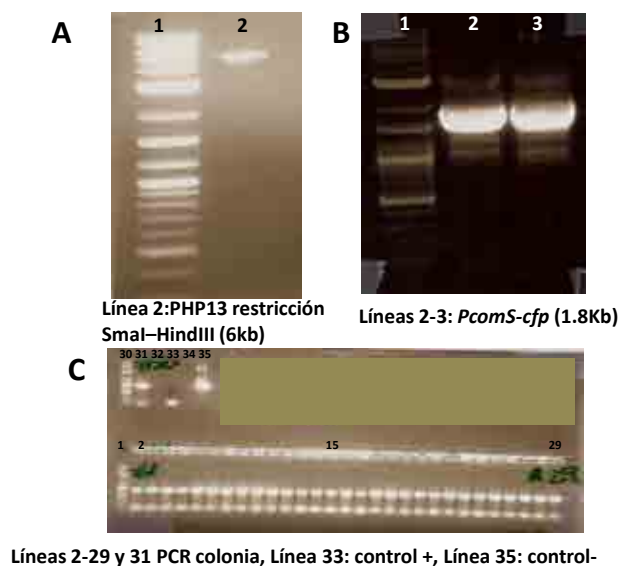


Figura 2.25: Geles de electroforesis en agarosa A, B y C que corresponden a la banda de PHP13 purificada tras la restricción, la PCR de fusión *P_{comS}-cfp*, y la PCR de colonia, del clonaje de *P_{comS}-cfp* en PHP13.

La cepa Control- β S75xS se obtuvo clonando en el plásmido pDG148 la fusión *P_{comS}-cfp*. Para ello se amplifica por PCR en primer lugar la secuencia *P_{comS}-cfp* utilizando como muestra el plásmido PHP13::*P_{comS}-cfp* del clonaje anterior, cambiando en el par de cebadores las enzimas de restricción anteriores por EcoRV y BamHI. Los cebadores utilizados fueron:

Forward 5'-GGATCCGGAAATGGCGTGGTGATCTACATATTC-3'

Reverse 5'-ATGATATCTGTCACTCAGAAAGTCAAAAGCCTCCA-3'

Una vez realizada la reacción de ligación, se transforma en bacterias *Escherichia coli* comercial (Life Technologies C4040-52). En la Fig. 2.26 se pueden ver los geles de electroforesis en agarosa A, B y C que se corresponden a la PCR de la fusión *P_{comS}-cfp*, purificación tras la restricción del plásmido y de la fusión *P_{comS}-cfp*, y la PCR de colonia respectivamente. Se realiza la extracción plasmídica utilizando el kit de la casa comercial de Sigma.

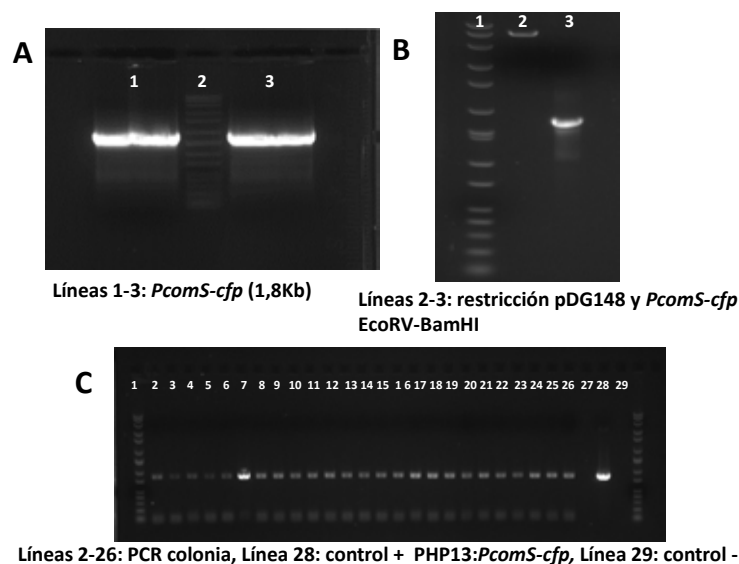


Figura 2.26: Geles de electroforesis en agarosa A, B y C que corresponden a la PCR de la fusión P_{comS} -*cfp*, purificación tras la restricción del plásmido y de la fusión P_{comS} -*cfp*, y la PCR de colonia respectivamente, del clonaje de P_{comS} -*cfp* en pDG148.

Una vez obtenido el plásmido pDG148:: P_{comS} -*cfp* se transforma en la cepa de *B. subtilis* denominada Control- α S (Süel et al., 2007).

En la Tabla 2.5 se definen las cepas que se obtienen mediante la transformación en las cepas denominadas como Hyper- α S y Hyper- α K (Tabla 2.4) (Süel et al., 2007) de los plásmidos obtenidos anteriormente.

La cepa denominada como Norm- β S (Tabla 2.4) fue construida por Tolga Çağatay del laboratorio del Dr. Gurol Süel (UT Southwestern, Dallas). Se integró cromosómicamente en el locus *AmyE* la fusión P_{comS} -*cfp*.

Cepa	Plásmido	Cepa resultante (Tabla 2.4)
Hyper- α S	PHP13::P _{comS} - <i>cfp</i>	Hyper- α S- 6xS
Hyper- α S	pDG148::P _{comS} - <i>comS</i>	Hyper- α S- 75xS
Hyper- α K	PHP13::P _{comS} - <i>cfp</i>	Hyper- α K- 6xS
Hyper- α K	pDG148::P _{comS} - <i>comS</i>	Hyper- α K- 75xS

Tabla 2.5: Cepas obtenidas tras la transformación de los plásmidos PHP13::P_{comS}-*cfp* y pDG148::P_{comS}-*comS*.

2.4. Técnicas de microscopía

2.4.1. Microscopía de fluorescencia temporalizada

Utilizando las técnicas de clonaje molecular descritas anteriormente podemos observar *in vivo* y a nivel de células individuales la dinámica de expresión de algunos de los genes que componen los circuitos genéticos de estudio. Con este objetivo, se utiliza la microscopía de fluorescencia temporalizada. En la Fig. 2.27 se observa el equipo con el que se toman en el tiempo y de forma automatizada imágenes de colonias bacterianas en crecimiento. El sistema consta de un microscopio Nikon TE2000 y platina Prior motorizada en x-y-z. Las imágenes se toman con una cámara Hamamatsu ORCA-ER y el software Nis-Elements AR automatiza el funcionamiento integral de todo el equipo. Para el mantenimiento de la temperatura, se utiliza una cámara incubadora de temperatura regulable.

En la Fig. 2.28 se puede ver a la izquierda (A), todos los componentes del microscopio a través de los cuales pasa la luz de la lámpara halógena y de fluorescencia hasta llegar al espécimen. El objetivo se encuentra situado debajo de la platina que soporta la muestra y la luz procede de la parte superior del sistema. A la derecha de la imagen (C), se observa el camino óptico hasta los oculares. En la parte central de

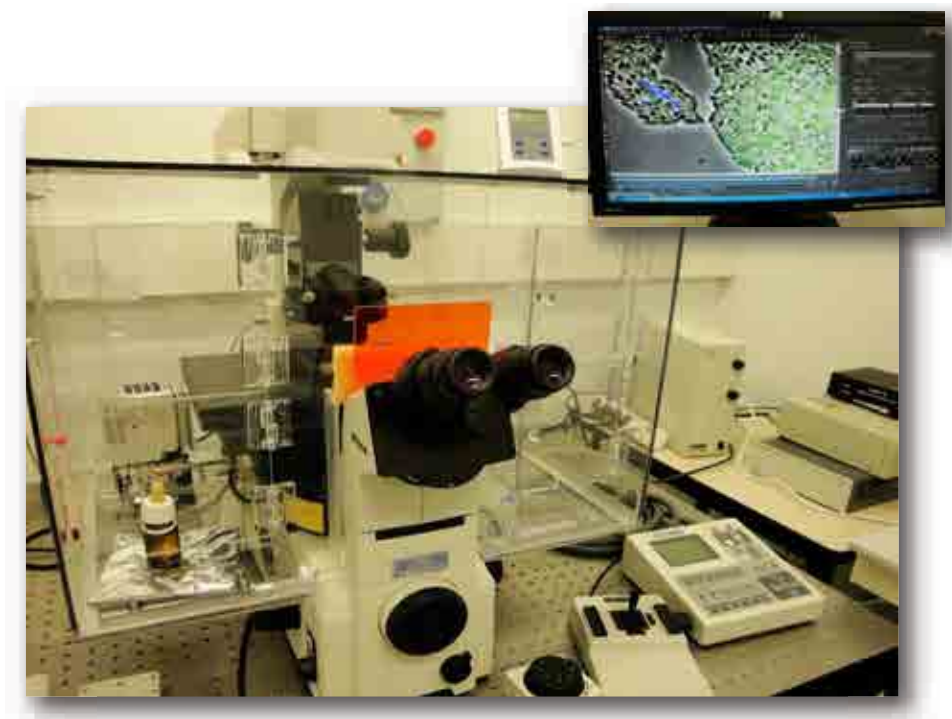


Figura 2.27: Equipo con el que se realizan las medidas de microscopía de fluorescencia temporalizada.

la imagen (B) como se produce el contraste de fase en la luz para la observación de la muestra, desde el anillo de fase hasta el ocular. El anillo de fase forma un cono de luz que ilumina la muestra y al pasar sobre ella parte de esa luz (en amarillo en la imagen), queda fuera de fase (normalmente $-1/4\lambda$) con respecto a la luz que no pasa sobre la muestra (en rojo en la imagen). En el objetivo la luz que no se ve afectada por la muestra (en rojo), llega al *phase plate* y es *phase shifted* mientras pasa por él ($+1/4\lambda$). Tras pasar por el objetivo, el *phase shift* total entre la luz afectada (amarillo) y la luz no afectada por la muestra (rojo) es $1/2\lambda$. Cuando la luz se combina, ocurre una interferencia entre ambos haces de luz y los cambios de fase debido a la interacción con la muestra se observan como cambios en el contraste.

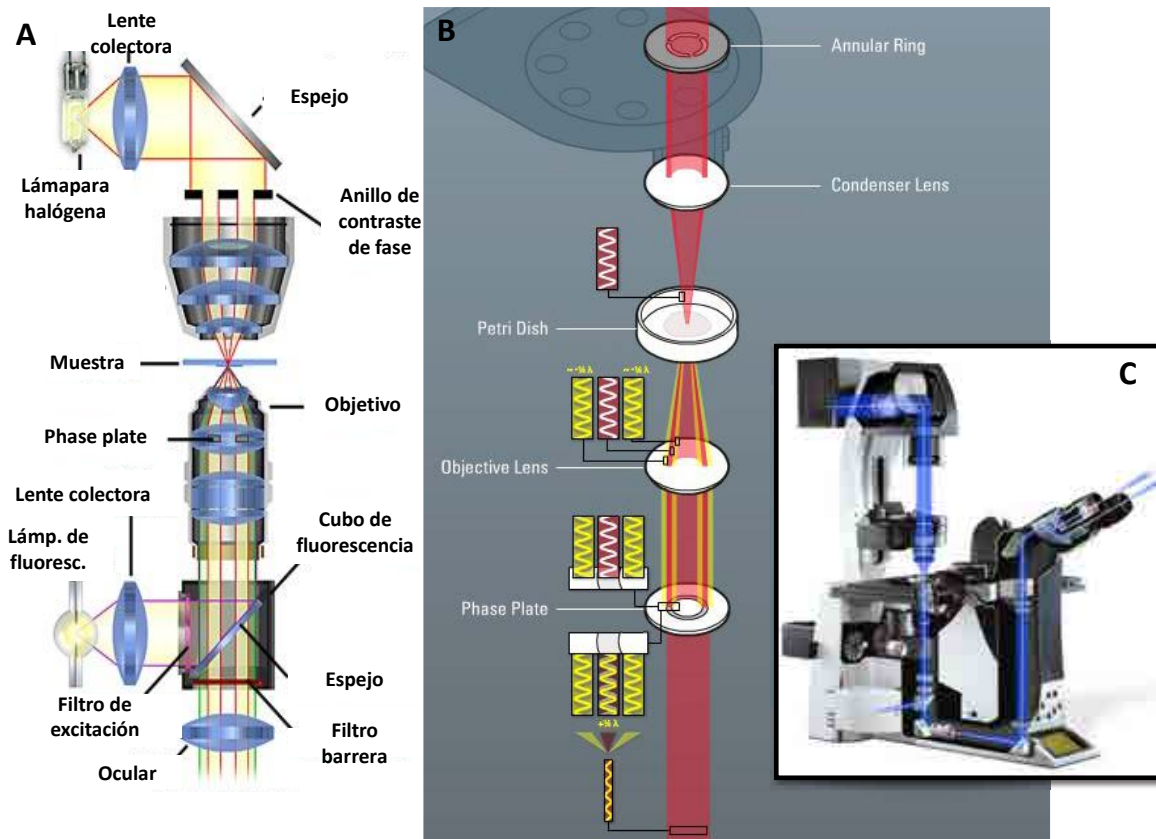


Figura 2.28: (A) Componentes del microscopio a través de los cuales pasa la luz de la lámpara halógena y de fluorescencia hasta llegar al espécimen (Fuente: <http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/fluorescence/fluorophase.html>). (B) Contraste de fase para la observación de la muestra Fuente: <http://www.leica-microsystems.com/science-lab/the-principles-of-phase-contrast-a-step-by-step-guide/>. (C) Camino óptico hasta los oculares (Fuente: <http://www.leica-microsystems.com/science-lab/the-principles-of-phase-contrast-a-step-by-step-guide/>)

2.4.2. Preparación del *sandwich* de agarosa

Se disuelve en un microondas (sin llegar a ebullición) 0.18g de agarosa (SeaPlaque Low Melting Agarose) en 10ml de medio (RM o LB) y se deja reposar para eliminar las burbujas. Una vez se ha enfriado se añaden los suplementos termolábiles según

las necesidades del estudio, tales como inductores (IPTG o arabinosa) o suplementos (L-glutamato). Se pipetea 5ml en un cubreobjetos, y se deposita otro cubreobjetos encima para alisar la mezcla de agarosa y medio. Una vez el sandwich ha polimerizado, cortamos pequeños cuadrados a los que denominamos pads de agarosa y donde se depositará la muestra a observar bajo el microscopio. Se puede ver esquemáticamente el proceso de preparación del *sandwich* de agarosa en la Fig. 2.29A. En la Fig. 2.29B representa la preparación de la muestra para su observación en el microscopio. El pad una vez contiene el cultivo de bacterias, se coloca en una placa Willco hacia abajo, de manera que las bacterias quedan entre el pad y el fino vidrio del Willco.

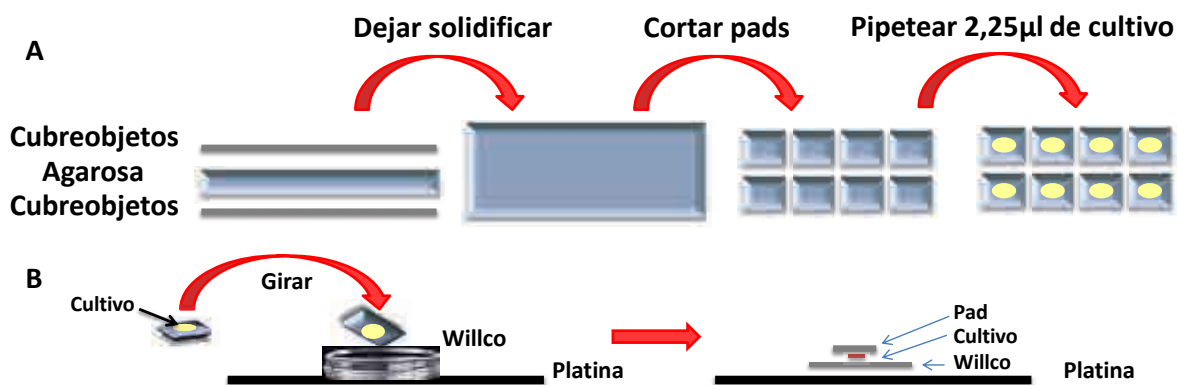


Figura 2.29: (A) Esquema del procedimiento a seguir para preparar un sandwich de agarosa. (B) Preparación de la muestra para observarla en el microscopio.

2.4.3. Condiciones de crecimiento de las cepas de *Bacillus subtilis*

En primer lugar, se cultiva con agitación la cepa deseada en LB a 37°C con el antibiótico adecuado para la selección bacteriana. Mientras las bacterias alcanzan la densidad óptica deseada se prepara un sandwich de agarosa como se detalla en la Sección 2.4.2 con medio de cultivo RM e IPTG como inductor.

Cuando el cultivo alcanza una densidad óptica de 1.8 se centrifuga 1ml de cultivo a 4000 rpm durante 1 minuto, se descarta el sobrenadante y se resuspende el pelet con 1ml de medio RM (cuando sea necesario se añadirá IPTG como inductor). Se repite el paso anterior pero resuspendiendo el pelet en 0.5ml de medio RM. Se incuba a 37°C durante 1.5 horas. Pasado este tiempo, se diluye el cultivo 1:20 - 1:40 en RM y se depositan 2.25 μ l en cada sección de pad del sandwich de agarosa. Se deja secar de 45 minutos a 1 hora. Pasado este tiempo, se depositan los pads en una placa Willco, que sellamos con una fina cinta de Parafilm para evitar que el pad se deshidrate durante el experimento y se deja equilibrar verticalmente el Willco en el microscopio 1 hora aproximadamente. Las fotos se toman con un intervalo de tiempo de 20 minutos. Este protocolo ha sido optimizado tal y como se describe en Süel et al. (2006).

En la Fig. 2.30 se puede ver un ejemplo de algunas fotos tomadas en un experimento de microscopía con una cepa de *Bacillus subtilis* en el que las bacterias expresan dos proteínas fluorescentes; YFP (*Yellow Fluorescent Protein*) y CFP (*Cyan Fluorescent Protein*) bajo el control de los promotores P_{comS} y P_{comG} , respectivamente. Estos promotores están directamente relacionados con la respuesta al estrés y el estado de competencia de estas células. En este ejemplo no se han integrado las fotos tomadas en contraste de fase, solamente se muestran imágenes compuestas por las dos fluorescencias, *yfp* en verde y *cfp* en rojo.

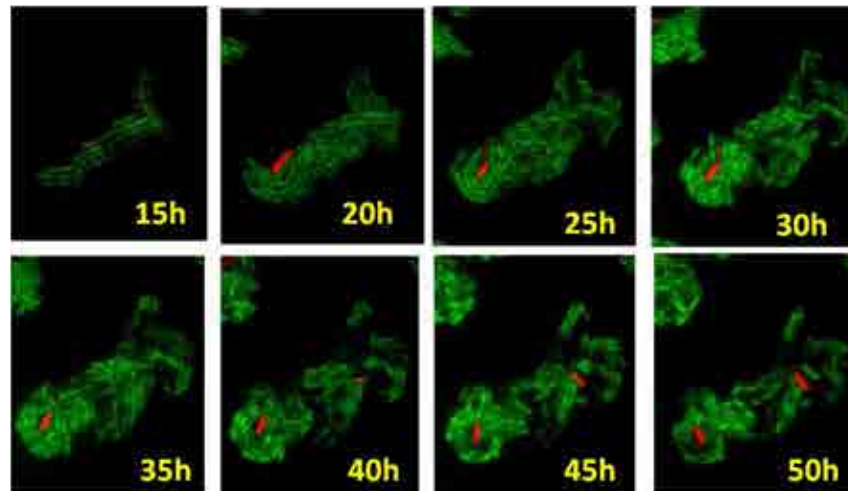


Figura 2.30: Experimento de microscopía con células de *Bacillus subtilis*. La composición de las imágenes se ha realizado con las fotos tomadas en las fluorescencias *yfp* (verde) y *cfp* (rojo).

2.4.4. Condiciones de crecimiento de las cepas de *Escherichia coli*

A partir de un cultivo *overnight* de la cepa deseada, se diluye 1:100 en medio LB suplementado con 0.7% de arabinosa como inductor (se realizaron varios experimentos de inducción que no son mostrados para determinar esta concentración de arabinosa y se analizaron sus efectos fenotípicos, y se concluyó que esta era una concentración adecuada para los experimentos a realizar).

Se incuba 3 horas a 37°C con el antibiótico adecuado para la selección bacteriana. Se prepara el sandwich de agarosa con LB mientras se deja crecer el cultivo bajo inducción 3 horas. El procedimiento para hacer el sandwich de agarosa es igual que el descrito en 2.4.2, pero en este caso el inductor es la arabinosa. Tras las 3 horas de incubación se diluye la muestra 1:1000 con LB suplementado con arabinosa al 0.7% y se depositan 2.25 μ l en cada sección de pad del sandwich de agarosa. Se deja secar de

45 minutos a 1 hora. Pasado este tiempo, se depositan los pads en una placa Willco, que sellamos con una fina cinta de Parafilm para evitar que el pad se deshidrate durante el experimento y se deja equilibrar verticalmente el Willco en el microscopio 1 hora aproximadamente.

En la Fig. 2.31 se muestra un ejemplo de fotos tomadas cada 5 minutos de una cepa de *Escherichia coli* que expresa una proteína que participa en la regulación del ciclo celular (SeqA) que se agrega al ADN secuestrándolo. Esta última ha sido fusionada a la proteína fluorescente YFP (*Yellow Fluorescent Protein*), que se observa en las imágenes como puntos de color azul. En este caso se han integrado las imágenes de contraste de fase y fluorescencia.



Figura 2.31: Experimento de microscopía con células de *Escherichia coli* en la que se observa la composición de las imágenes a partir de las fotos tomadas en fase y yfp (azul en la imagen).

2.5. Análisis de imágenes

2.5.1. Análisis de células individuales

Para llevar a cabo el análisis de las imágenes obtenidas a partir de los experimentos realizados con microscopía, se utilizan una serie de códigos desarrollados por Jordi García Ojalvo en Matlab. A partir de las fotos obtenidas se pueden analizar células

individuales a lo largo del tiempo.

En la Fig. 2.32 se observa en la primera fila las imágenes tomadas en fluorescencia (en azul) y contraste de fases de una cepa de *Escherichia coli* que expresa la proteína fluorescente YFP (*Yellow Fluorescent Protein*).

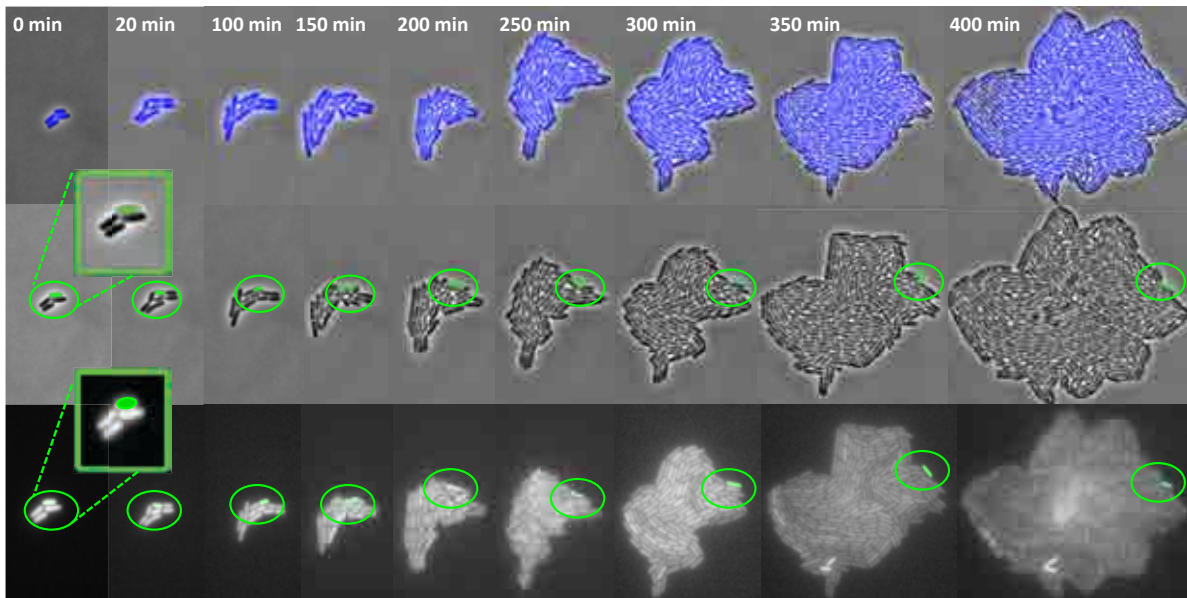


Figura 2.32: Fotogramas del análisis de las imágenes obtenidas tras un experimento de microscopía. En la primera, segunda y tercera fila, composición de fotos de fluorescencia y contraste de fases, y análisis en fase y fluorescencia, respectivamente, de la célula resaltada en verde.

En la segunda fila de imágenes se observa el análisis individual y en el tiempo de una de las células que forman la colonia. El código funciona de forma que el análisis se hace desde la última foto a la primera que se quiere analizar, es decir, hacia atrás en el tiempo. De esta forma se consigue analizar toda la descendencia de una célula individual. Tras seleccionar la bacteria de estudio el código en Matlab la marca automáticamente en todo su contorno (bacteria en verde en la imagen Fig. 2.32) pasando a la siguiente foto de la serie y recordando la posición donde se encuentra

la bacteria de interés.

Durante el análisis se puede seguir en el tiempo la bacteria de estudio en las imágenes de contraste de fase, y fluorescencia en función de la fluorescencia que expresen las bacterias, i.e. rfp (*Red Fluorescent Protein*), cfp (*Cyan Fluorescent Protein*), gfp (*Green Fluorescent Protein*) y yfp (*Yellow Fluorescent Protein*), este último es el caso de la tercera fila de la imágenes.

Los datos que se obtienen tras el análisis y que tienen mayor interés en nuestros estudios son del tipo que se representan en la Fig. 2.33, donde en la gráfica de la izquierda se muestra como ejemplo una de las series temporales de fluorescencia obtenida tras el análisis de una bacteria individual. En la gráfica de la derecha se representa la longitud de una célula individual, donde los mínimos de la serie temporal representan las divisiones celulares.

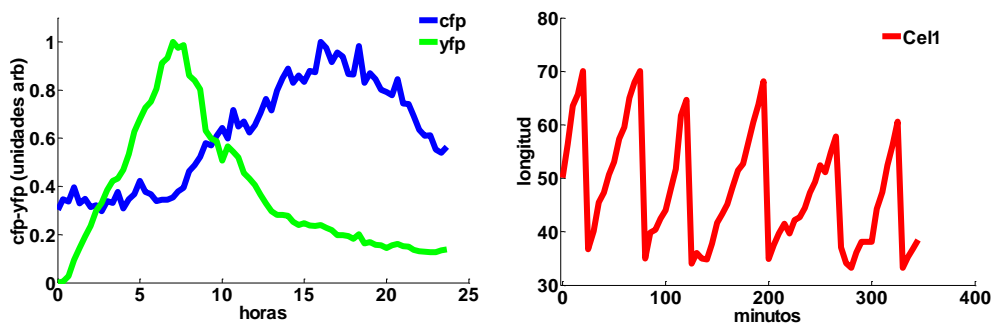


Figura 2.33: Series temporales de fluorescencia (izquierda) y longitud (derecha) obtenidas mediante el análisis de una célula individual.

2.5.2. Análisis del número de divisiones celulares

Otro de los análisis realizados en nuestros estudios es el conteo del número de divisiones celulares que tienen lugar en la colonia en un intervalo determinado de tiempo. Para llevar a cabo este análisis, se cuenta con otro código implementado en

Matlab en el que, como se muestra en la Fig. 2.34, se marca una división celular con un círculo rojo y al pasar a la siguiente imagen, se recuerda la división anterior con un círculo amarillo, marcando en esa foto las nuevas divisiones celulares encontradas. Una vez se analizan todas las imágenes Matlab nos muestra el número total de divisiones seleccionadas.

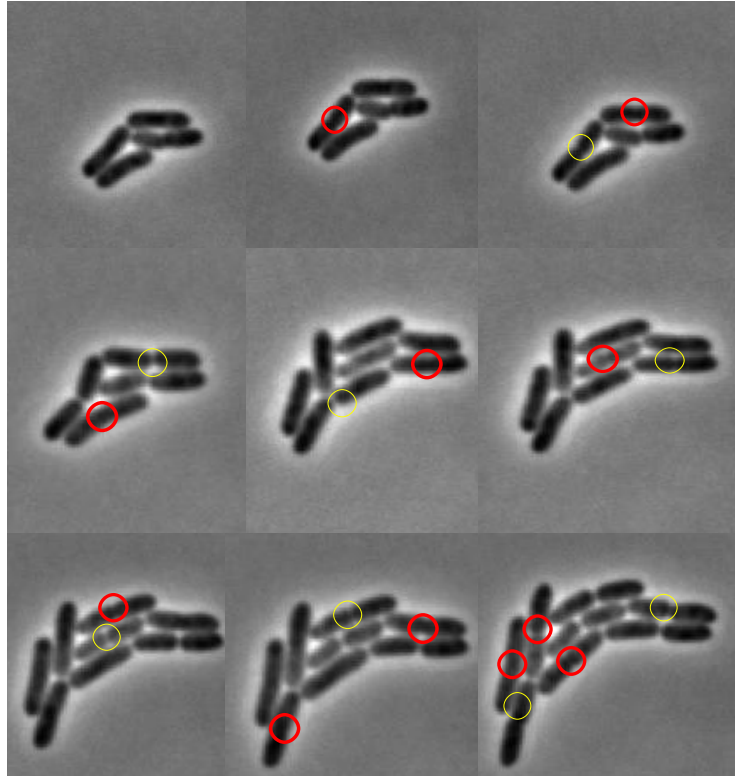


Figura 2.34: Análisis de las divisiones celulares en una serie de fotogramas. En rojo se marcan las divisiones actuales que se marcan en amarillo en la siguiente imagen. Al final del análisis se obtiene el número total de divisiones en un intervalo determinado de tiempo.

Capítulo 3

Regulación genética en *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*

En este Capítulo se explicarán determinados aspectos de la biología de los microorganismos *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli*, los cuales son objeto de estudio en esta Tesis. En primer lugar, en la Sección 3.1 se introducen las características básicas de los mecanismos de regulación del inicio de la replicación en *E. coli*. De esta forma, se pretende una mejor comprensión de los resultados obtenidos en el Capítulo 5. En segundo lugar, en la Sección 3.2 se introducen dos estados biológicos del microorganismo *B. subtilis* que serán objeto de estudio en los Capítulos 6, 7 y 8. Concretamente, en este Capítulo se hablará de los programas que desencadenan por un lado, la competencia genética bacteriana y por otro lado, la formación de esporas por parte de estas bacterias.

3.1. Regulación de la replicación cromosómica en *Escherichia coli*

Durante el crecimiento exponencial en condiciones adecuadas de nutrientes, las bacterias doblan su masa y se dividen en su centro para dar lugar a dos células hijas de tamaños equivalentes. Esto se lleva a cabo mediante un complicado proceso que da lugar a la fisión binaria. En particular, en el intervalo de tiempo en el que doblan su masa, las bacterias deben experimentar un único proceso de replicación en el que se genera una copia del cromosoma. Por otro lado, para que tenga lugar la división celular, deben poner en marcha la maquinaria de formación del septo que divide la célula por citocinesis o estrangulación del citoplasma (Chien et al., 2012).

En la Fig. 3.1 se observa la serie temporal de crecimiento y división de una célula de *Escherichia coli*, donde se puede ver la elongación y posterior división celular en cada ciclo.

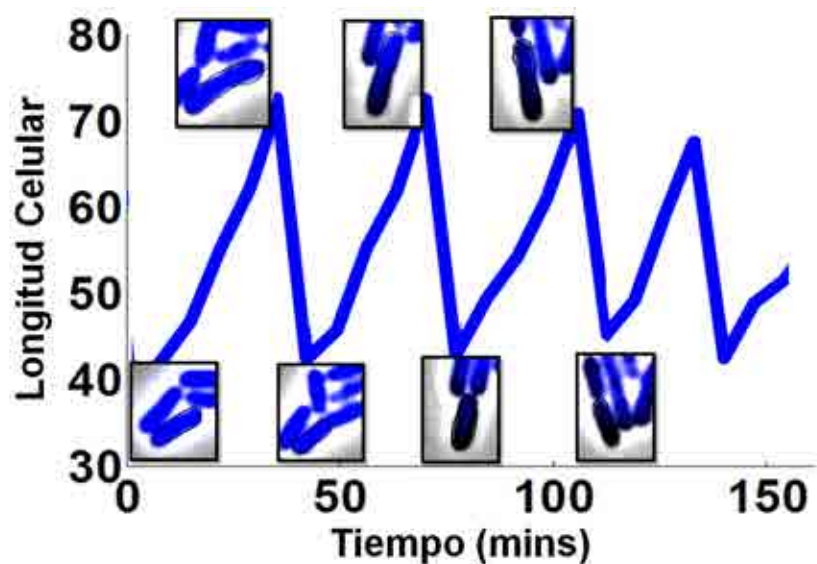


Figura 3.1: Serie temporal de crecimiento y división de una célula de *Escherichia coli*. La caída brusca en la longitud celular en cada ciclo indica la división de la célula.

En la Fig. 3.2A se muestra un esquema del proceso que sufre una célula bacteriana en el momento de la división celular. Antes de la división, la célula tiene las proteínas FtsZ sin ensamblar y el cromosoma (en azul en la figura) situado en el centro celular. Se muestra un solo origen de replicación (en verde en la figura) (1). Después de que se inicie la replicación del cromosoma los orígenes de replicación se separan y se mueven hacia los polos de la célula. Una vez la replicación se completa los cromosomas se separan (2), y se forma el anillo de FtsZ (3). Durante la citocinesis el anillo constriñe el citoplasma dividiendo la célula en dos (4-5). La Fig. 3.2B muestra el anillo formado por la proteína FtsZ en células de *Bacillus subtilis* en crecimiento exponencial.

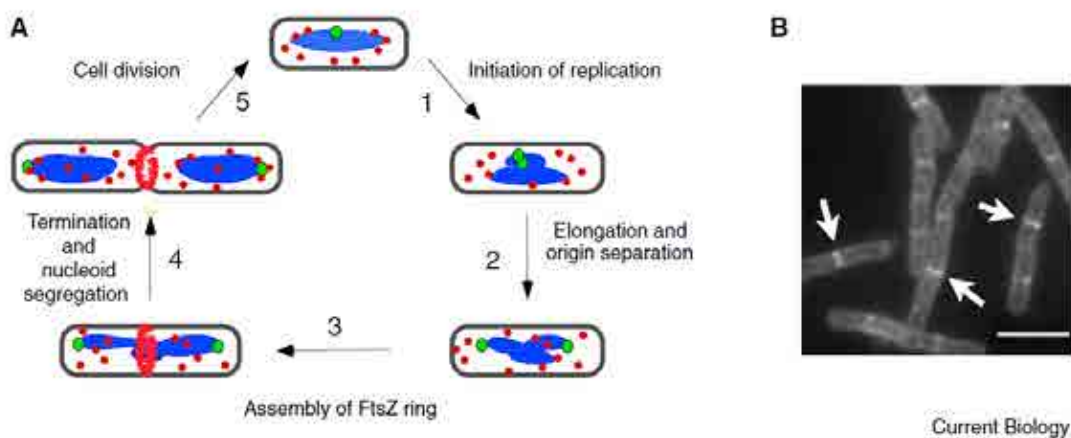


Figura 3.2: Imagen donde se muestra el proceso de división celular (A), y el anillo formado por la proteína FtsZ (flechas blancas en la imagen) en células de *B. subtilis*. Imagen tomada de Chien et al. (2012).

Como se ha comentado con anterioridad, previamente a la división celular se debe replicar el cromosoma, así cada una de las células hijas obtendrá una copia del material genético. En la Fig. 3.3 se puede ver de forma esquemática el inicio de la replicación. Las moléculas iniciadoras de la replicación DnaA, (en verde en la figura) se unen al origen de replicación oriC promoviendo a su vez la unión de helicasas

DnaB (en rojo en la figura) y moléculas tales como DnaC (en azul claro en la figura), encargadas de unir estas últimas al ADN. Estas moléculas se encargan de abrir la doble hebra de ADN. La primasa DnaG (en azul en la figura) genera pequeños fragmentos molde o cebadores para que la polimerasa III junto a la subunidad β o también denominada DnaN (en violeta), se unan a los sitios del ADN con cebador y sinteticen las nuevas cadenas de ADN complementarias.

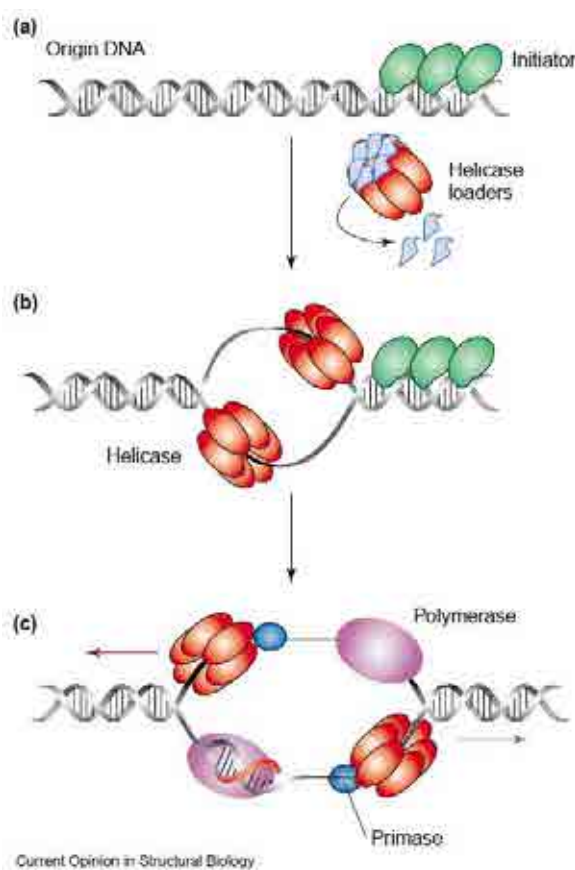


Figura 3.3: Perspectiva general del inicio de la replicación en OriC. Las moléculas iniciadoras DnaA (en verde) se unen al origen de replicación oriC y promueven el ensamblaje de las helicasas (en rojo) (a). Dichas moléculas desenrollan el ADN (b) y a éste se unen las primasas (en azul) y polimerasas (en violeta) que sintetizan pequeños moldes o cebadores a partir de los que la polimerasa procederá a la elongación de la nueva cadena de ADN (c). Imagen tomada de Cunningham & Berger (2005).

Según Boye et al. (2000) es de suma importancia que el cromosoma se replique antes de la división celular, pero también es importante que se replique solamente una vez. Para asegurar que sucede de esta forma, existen tres mecanismos de regulación que evitan múltiples rondas de replicación del ADN.

Como se ha mencionado anteriormente, es necesaria la proteína activadora DnaA para el inicio de la replicación. Ésta forma un complejo estable tanto con ADP como con ATP, pero solamente la unión DnaA-ATP puede iniciar la replicación, ya que esta última es la forma activa de dicha proteína. En *oriC* de *Escherichia coli* existe una región con múltiples cajas de DnaA, las cuales son secuencias de 9 nucleótidos de longitud que funcionan como sitios de unión específico para DnaA (Boye et al., 2000).

Para que el ADN cromosómico se replique una vez durante un ciclo de división celular *Escherichia coli* posee los mecanismos de regulación negativa que se explican a continuación.

3.1.1. Regulación negativa de *oriC* y represión transcripcional de DnaA por parte de SeqA

Cuando *oriC* es replicado pasa del estado completamente metilado al hemimetilado. En *Escherichia coli* el origen de replicación contiene 11 copias de la secuencia GATC de las cuales la adenina (A) es el nucleótido que se encuentra metilado. Para que el ADN vuelva al estado completamente metilado tras la replicación, la enzima Dam metilasa añade un grupo metilo (CH_3) a la adenina de la secuencia GATC y su complementaria CTAG (Fig. 3.4). Durante un periodo de tiempo, el ADN se encuentra hemimetilado y la proteína SeqA se une a estas secuencias GATC hemimetiladas secuestrándolas. Dichas secuencias se solapan y coinciden con algunas de las regiones de unión de la molécula iniciadora de la replicación DnaA, por lo que la unión competitiva de SeqA a regiones hemimetiladas de *oriC* impide la unión de DnaA-ATP (Katayama et al., 2010). De esta forma se bloquean reiniciaciones secundarias de la replicación.

Además de secuestrar secuencias GATC hemimetiladas en *oriC*, la proteína SeqA reprime la transcripción del gen de *dnaA*, ya que dicho gen se encuentra localizado

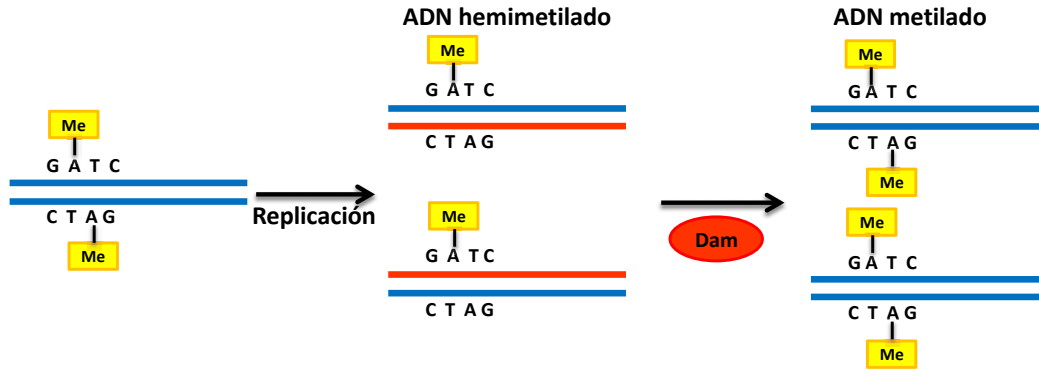


Figura 3.4: Metilación del ADN tras la replicación. Se puede ver la metilación en las adeninas de la secuencia GATC. Tras la replicación, la enzima Dam metilasa añade un grupo metilo (CH_3) en las nuevas cadenas de ADN, pasando éste de hemimetilado a completamente metilado.

cerca de *oriC* e inmediatamente después de su replicación las múltiples secuencias de GATC hemimetiladas del gen *DnaA* están unidas a SeqA, la cual cosa reprime la transcripción de dicho gen (Katayama et al., 2010).

3.1.2. RIDA: Regulación por inactivación de DnaA

El segundo mecanismo de regulación negativa es la inactivación de las moléculas de DnaA mediante la hidrólisis de ATP en ADP durante la replicación. Este proceso se lleva a cabo mediante el sistema RIDA (*Regulatory inactivation of DnaA*). Este sistema está compuesto por un complejo estable entre la proteína Hda y la subunidad β de la polimerasa III o también conocida como DnaN, la cual se une al ADN como una grapa por lo que se la denomina como grapa- β (Katayama et al., 2010; Camara et al., 2005).

3.1.3. Regulación negativa de DnaA mediante *datA*

El último mecanismo de regulación negativa consiste en la titulación de las moléculas de DnaA por parte de *datA*. El locus *datA* es una secuencia de ADN cercana a *oriC* que contiene cinco regiones de unión de moléculas de DnaA y un único sitio de unión a IHF, la cual es una proteína que promueve la unión de las moléculas de DnaA. Esta secuencia denominada *datA* capta una gran cantidad de moléculas de DnaA con una elevada afinidad previniendo que se unan a *oriC*. Un elevado número de copias de *datA* elimina la iniciación de la replicación en *oriC*. No es necesario que *datA* se encuentre cerca de *oriC* para que tenga lugar una replicación normal del cromosoma, lo que sugiere que si *datA* se sitúa lejos de *oriC* y la replicación de esta secuencia ocurre más tarde por lo que no se capta nuevas moléculas de DnaA, no es limitante mientras el secuestro de *oriC* por parte de SeqA siga activo (Boye et al., 2000).

En un estudio realizado por Camara et al. (2005) se observó que células de *Escherichia coli* en las que se delecionó el gen que codifica para la proteína Hda, presentaban un incremento significativo en el ratio de replicación de regiones cercanas a *oriC* en el cromosoma, lo que demuestra la importancia del sistema RIDA en la prevención de rondas extra de replicación. Por el contrario, la deleción del locus *datA* resultó indistinguible con respecto a la cepa *wild type* en el ratio de replicación de regiones cercanas a *oriC*, y la eliminación del gen *seqA* del cromosoma tenía un efecto muy pequeño. Esto último indica que posiblemente la titulación de las moléculas de DnaA por parte del locus *datA* y el secuestro de *oriC* no contribuyen significativamente en la prevención de nuevas rondas de replicación.

En el Capítulo 5 se muestran los resultados obtenidos en el estudio de la regulación del inicio de la replicación en *Escherichia coli*. Basándonos en los precedentes comentados anteriormente, se compara el efecto que produce en el inicio de la replicación la sobreexpresión de las moléculas que parecen contribuir significativamente

en la regulación negativa de dicho proceso. Concretamente, se sobreexpresan de forma independiente la proteína SeqA, y las proteínas que componen el sistema RIDA, es decir Hda y DnaN, comparando los resultados obtenidos con una cepa control de *Escherichia coli*.

3.2. Competencia y esporulación en *B. subtilis*

El microorganismo *B. subtilis* es una bacteria que se encuentra comúnmente en el suelo y se ha utilizado para el estudio de numerosos procesos celulares, entre los cuales destacan dos procesos de desarrollo celular como son la esporulación y competencia, que se explicarán a continuación. Ambos programas de diferenciación, comparten componentes que regulan ambos perfiles, pero a la vez son programas de diferenciación que se excluyen mutuamente (Hahn & Roggiani, 1995; Kuchina et al., 2011), ya que la activación de uno de los programas da lugar a la inhibición del otro.

Existen numerosas señales extracelulares que desencadenan una respuesta en este microorganismo, y esto hace que adquiera la capacidad de adaptarse a las condiciones fluctuantes del exterior y así sobrevivir. Las condiciones externas tales como el estrés en el medio donde se encuentran, ya sea por deficiencias nutricionales o debido a la superpoblación, hacen que *B. subtilis* desarrolle diferentes estrategias de supervivencia.

Cuando se supera la fase de crecimiento exponencial y la búsqueda de nutrientes se vuelve complicada, las bacterias comienzan a segregar moléculas que degradan recursos alternativos e incluso sintetizan antibióticos que utilizan para eliminar a otras bacterias competidoras. Si el estrés persiste y la densidad de la población aumenta, se ponen en marcha mecanismos como la competencia genética, estado transitorio en el que las bacterias de forma natural pueden incorporar ADN del medio procedente de otras bacterias, e incluso llegan a formar esporas, lo cual les

confiere resistencia a condiciones extremas de estrés (Hamoen, 2003).

Estos dos estados se observan en la Fig. 3.5, donde las células que están en crecimiento vegetativo (panel izquierdo), es decir, en condiciones óptimas de crecimiento, se duplican en el medio, pero bajo condiciones de estrés optan por uno de los dos programas de diferenciación. En el panel inferior de la figura se pueden observar las células competentes (en rojo) debido a la fusión de un promotor dependiente de la proteína ComK (principal reguladora de la competencia), denominado P_{comG} con la proteína fluorescente CFP (*cyan fluorescent protein*). En el panel superior se observan células en esporulación debido al estrés (células blancas en la imagen).

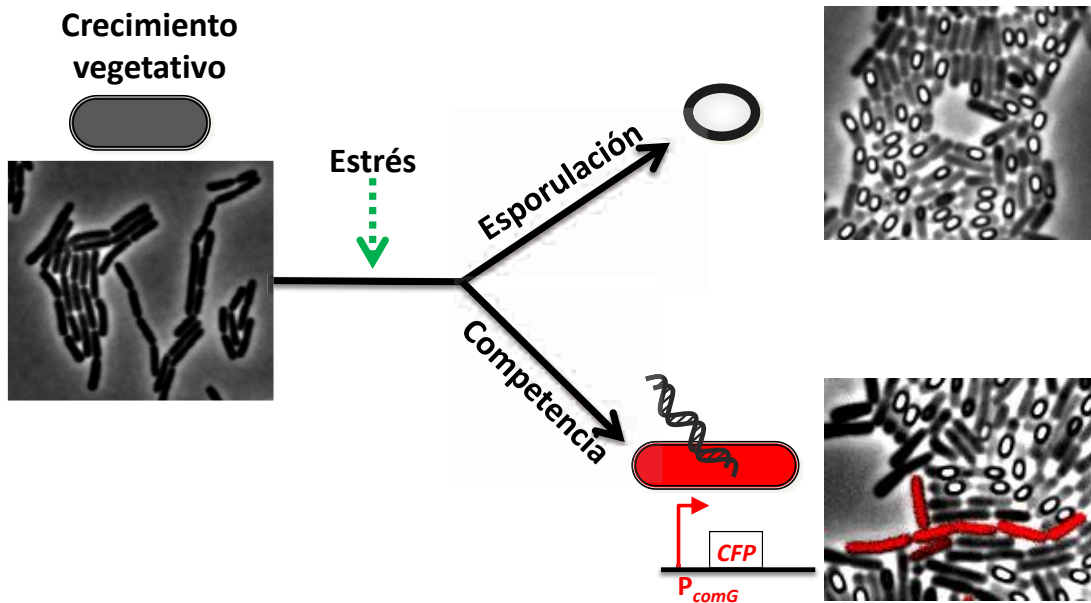


Figura 3.5: Imagen de una microcolonia de *B. subtilis* en estado vegetativo, que en condiciones de estrés opta por el programa de competencia o el de esporulación. El falso color rojo representa la presencia de proteína fluorescente en la célula (CFP), debido a que está bajo el control del promotor P_{comG} , el cual es activado por el regulador maestro de la competencia ComK.

Las bacterias *B. subtilis* deben ser capaces de tomar la mejor decisión bajo con-

diciones variables, ya que si en el medio en el que se encuentran surgen nuevos nutrientes, las células que optaron por la esporulación se encontrarán en desventaja con respecto a aquellas células que no lo hicieron y que continúan con el crecimiento vegetativo. Por otro lado, si en el medio persiste el déficit nutricional, las bacterias que no optaron por formar esporas morirán irremediablemente (Grossman, 1995).

3.2.1. Competencia genética en *B. subtilis*

En *B. subtilis*, el estado de competencia se desarrolla al final de la fase exponencial en una subpoblación celular del 1 al 10 % de la población total, dependiendo de las condiciones de crecimiento (Grossman, 1995).

La competencia genética y la formación de todo el sistema que conlleva a la captación e incorporación de ADN, está regulada por el factor de transcripción ComK (van Sinderen et al., 1995). Dicha proteína ComK se une a su propio promotor en forma de tetrámero compuesto de dos dímeros, promoviendo su propia transcripción (Fig. 3.6A, flecha roja de autoinducción en ComK).

Existe una inducción fisiológica de la competencia provocada por el aumento de la densidad celular (Grossman, 1995). Las bacterias se comunican entre sí a través de *quorum sensing* (breve descripción en página 193), liberando feromonas en el medio y estimulando el proceso de competencia (Hamoen, 2003). Dichas feromonas se requieren para la expresión del gen *comS* (Magnuson et al., 1994), el cual es necesario para el desarrollo de la competencia. La proteína ComS actúa como un sensor de estrés, ya sea debido al aumento de la población como al déficit nutricional, lo que promueve a su vez la entrada en el estado competente. Las feromonas interactúan con un receptor expuesto en la superficie celular estimulando la producción de ComA-P, forma activada de comA mediante la fosforilación (Fig. 3.6B). ComA fosforilado se une al promotor de ComS activándolo (Roggiani & Dubnau, 1993).

La proteína ComK está regulada negativamente mediante la degradación por parte

de MecA, la cual para llevarlo a cabo forma un complejo con ClpP y ClpC (Fig. 3.6C, símbolo \perp en naranja). Por otro lado, la proteína ComS se une a MecA y estimula la degradación de ésta última mediante el mismo complejo ClpCP (Ogura et al., 1999) (Fig. 3.6D, símbolo \perp en verde). Por lo tanto, la síntesis de ComS protege a ComK de la degradación por lo que se inicia la autoestimulación de ComK (Hamoen, 2003).

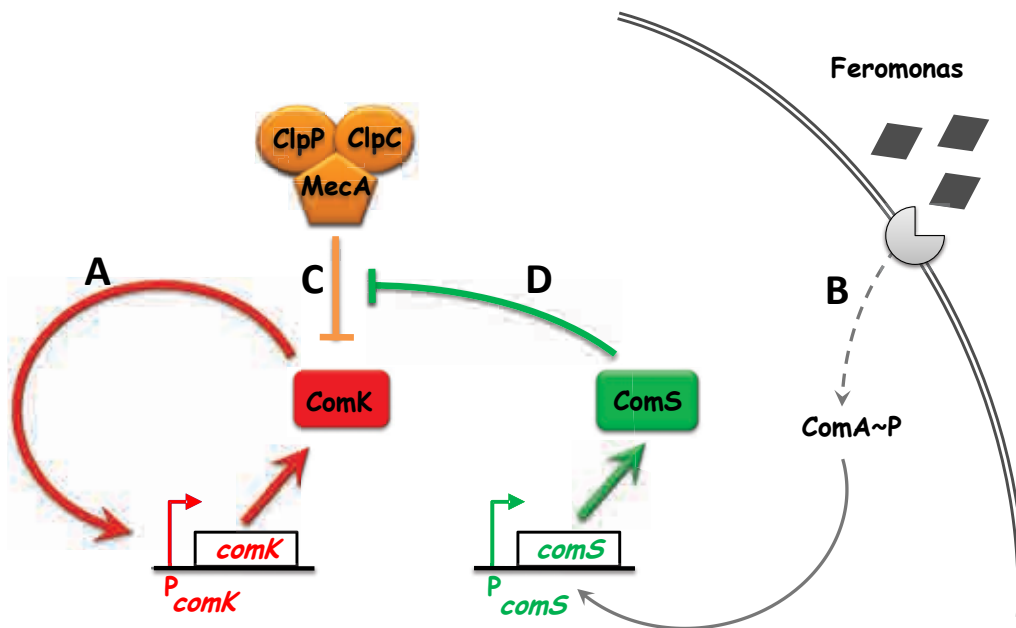


Figura 3.6: Regulación de la competencia en *B. subtilis*. El símbolo \perp indica inhibición

En Süel et al. (2006) se considera a las interacciones de MecA, ComK y ComS como el módulo MeKs, y de esta forma lo denominaremos en esta Tesis. Este módulo se comporta como un sistema dinámico excitable donde efectos estocásticos en la expresión génica dan lugar a variabilidad dentro de una misma población. Dicha estocasticidad hace que las células entren en competencia de una forma probabilística y transitoria (Süel et al., 2006). Según el estudio realizado por Süel et al. (2006), el estado de competencia es transitorio y las células vuelven al crecimiento vegetativo debido a la combinación de un bucle rápido de alimentación positiva (Fig. 3.6A, flecha roja de autoinducción en ComK), y un bucle lento y negativo (Fig. 3.6D, símbolo

↓ en verde), donde en primer lugar, la expresión de ComK se activa y por tanto su autoactivación mediada por ComS, ya que inhibe la degradación de ComK por parte de MecA. A su vez, la degradación progresiva de ComS hace que eventualmente la célula salga del estado competente debido a la degradación de ComK por parte de MecA.

La expresión de los genes de unión y recombinación del ADN incorporado con el cromosoma bacteriano está controlado por ComK (van Sinderen et al., 1995). En la Fig. 3.7 se muestra un esquema de la maquinaria de incorporación e integración del ADN durante el estado de competencia en *B. subtilis*. Se han identificado cinco genes involucrados en el transporte del ADN al interior celular: *comC*, *comE*, *comF*, *comG* y *nucA*. ComC está involucrado en el correcto ensamblaje de toda la estructura protéica para la internalización del ADN. La proteína ComG forma un poro en la membrana celular. El gen *comE* codifica para una proteína transmembrana (ComEC) que guía el ADN al interior celular, donde se asocia con una helicasa codificada por *comF* que desenrolla el ADN. No existe una secuencia de ADN específica para que las células de *B. subtilis* competentes incorporen, puede ser ADN plasmídico, de fagos (breve definición en página 192) o ADN cromosómico. La nucleasa NucA realiza la degradación del ADN incorporado en forma de fragmentos lineales de cadena sencilla. La cadena de ADN complementaria se degrada y los nucleótidos restantes se liberan al medio. Tras la internalización del ADN, éste se asocia con la proteína RecA y se realiza la integración del nuevo ADN al genoma bacteriano Hamoen (2003).

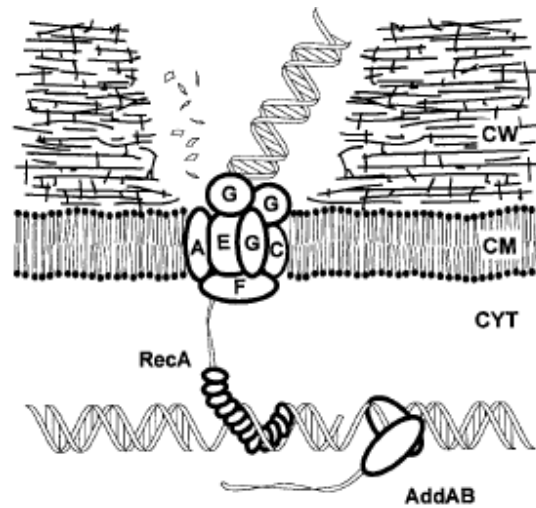


Figura 3.7: Maquinaria molecular necesaria para internalizar e integrar el ADN por parte de *B. subtilis*. (A, NucA; C, ComC; E, omE; F, ComF; G, ComG; CW, *cell wall*; CM, *cell membrane*; CYT, *cytoplasm*). Imagen tomada de Hamoen (2003).

3.2.2. Esporulación en *B. subtilis*

Algunas bacterias responden a condiciones ambientales adversas formando lo que se denominan esporas, las cuales son capaces de resistir y sobrevivir a situaciones extremas de temperaturas elevadas, disección y radiaciones ionizantes durante largos períodos de tiempo, gracias a la deshidratación del núcleo de la spora y la compactación del ADN cromosómico. El proceso por el cual *B. subtilis* reinicia el crecimiento vegetativo cuando las condiciones ambientales lo permiten se denomina germinación (Higgins & Dworkin, 2012).

El estímulo principal para que el programa de esporulación se ponga en marcha es la falta de nutrientes, aunque también es importante el incremento de la densidad celular. El regulador principal de la esporulación es el factor de transcripción Spo0A, cuya actividad es controlada por fosforilación. La transferencia de fosfatos para activar Spo0A (Spo0A-P), está regulada por las kinasas KinA, KinB, KinC,

KinD y KinE. El fosfato es transferido a Spo0A por dos intermediarios; Spo0F y Spo0B como se puede ver en la Fig. 3.8. Una vez la proteína Spo0A es fosforilada, actúa como activadora de la transcripción de genes específicos de la esporulación, tales como *spoIIA*, *spoIIE* y *spoIIG*.

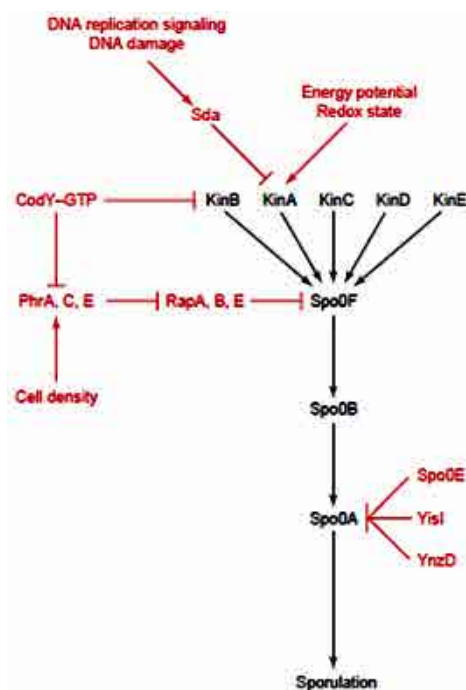


Figura 3.8: Sistema regulador de la fosforilación de Spo0A para su activación. En rojo se muestra el sistema que regula negativamente el proceso hacia la esporulación. Imagen tomada de Piggot & Hilbert (2004).

La proteína Spo0A-P regula además su propia transcripción y la del intermediario en la transferencia de fosfatos Spo0F. Bajo ciertas condiciones, *B. subtilis* retrasa la esporulación durante múltiples ciclos celulares (Fig. 3.9 panel A). En Levine et al. (2012) se observaron una serie de pulsos de fosforilación de Spo0A que aumentaban progresivamente durante el retraso de la esporulación. Para poder observar la actividad de Spo0A-P, integraron en el cromosoma la fusión P_{spo0F} -*yfp* debido a que el promotor P_{spo0F} presenta una elevada afinidad por Spo0A-P. En la Fig. 3.9 panel B se observa una serie de imágenes de una colonia que expresa dicha fusión. La actividad del promotor P_{spo0F} se observó en forma de pulsos discretos en células individuales (Fig. 3.9 panel C), que comenzaron después de transferir a las células en condicio-

nes limitantes de nutrientes, y continuó pulsando hasta la esporulación. Aunque la formación de esporas se retrasa y ocurre de forma lenta, las células responden a los cambios durante el periodo de retraso, i.e. mediante aumentos continuos de la actividad de Spo0A, aunque la esporulación ocurre de una forma estocástica solamente en una fracción de la población celular (Chastanet et al., 2010).

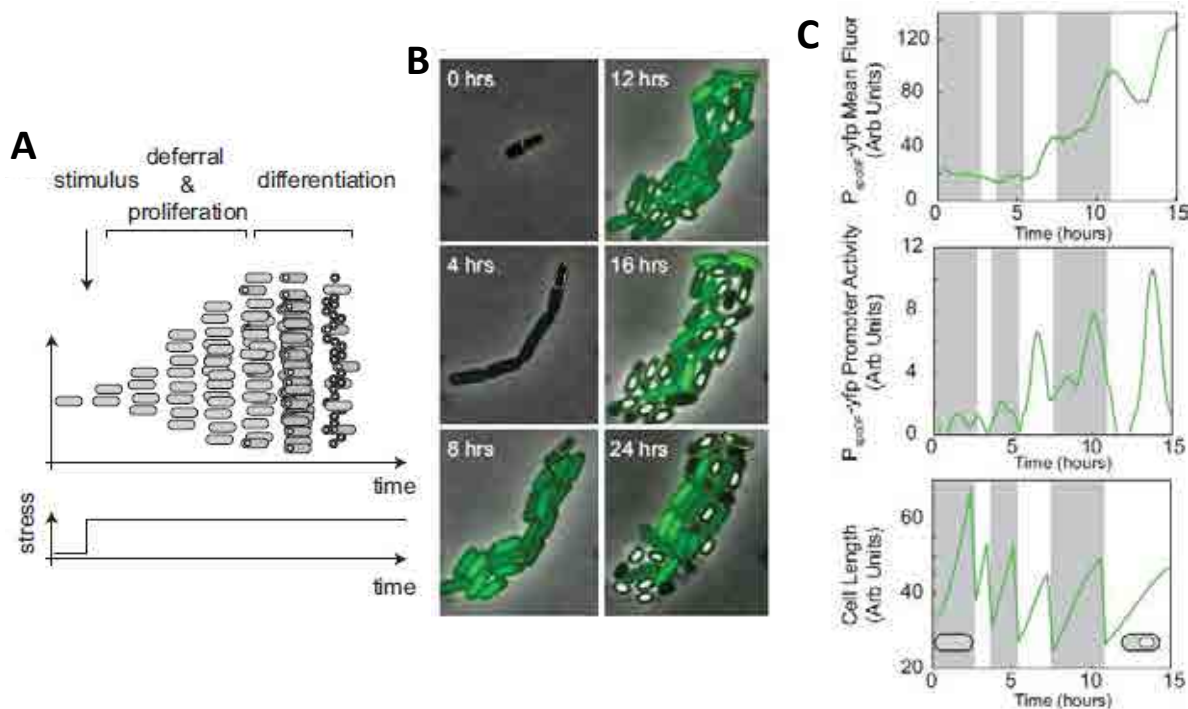


Figura 3.9: (A) En condiciones de estrés nutricional, las células primero proliferan y después inician la diferenciación hacia esporas. (B) Imágenes de una microcolonia de *B. subtilis* en crecimiento y esporulación. Las células contienen la fusión P_{spo0F} -yfp (en verde). Se observa el incremento de fluorescencia con los ciclos celulares. (C) Expresión de YFP en el tiempo para la célula señalada en amarillo en (B). El panel superior muestra los cambios abruptos de la intensidad de fluorescencia media. El panel medio muestra la actividad del promotor en función de los cambios en la fluorescencia y el tamaño celular (panel inferior). Se observan los pulsos de YFP a partir del promotor P_{spo0F} . Imagen tomada de Levine et al. (2012).

En la Fig. 3.10 se observa el ciclo de formación de la espora, que se inicia con la división asimétrica de la célula, seguida de lo que se denomina *engulfment* de la célula más pequeña (forespora) por parte la célula madre, la cual proporciona a la forespora una serie de capas protectoras.

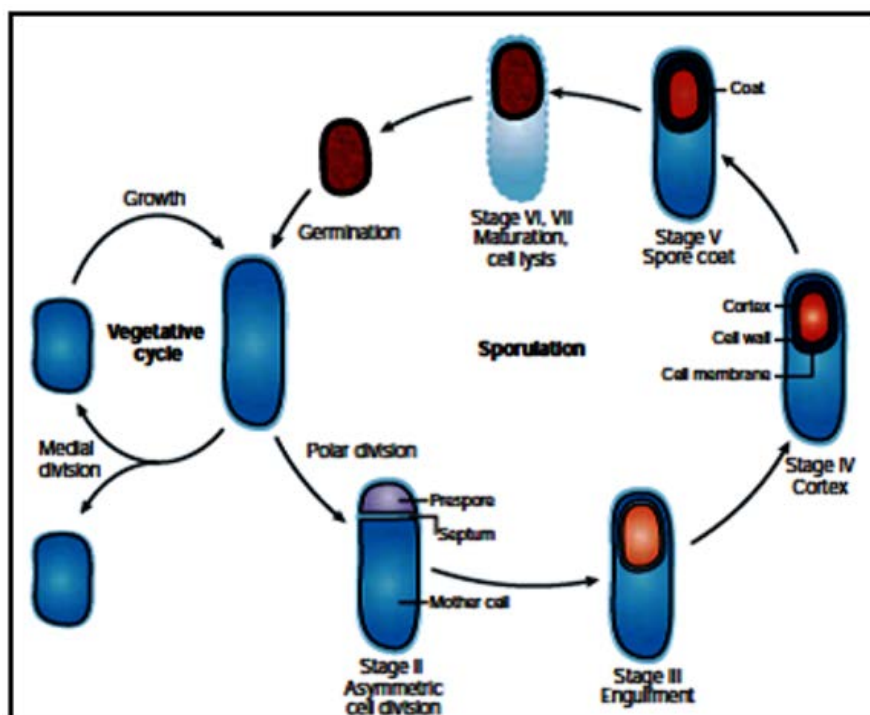


Figura 3.10: Estadios por los que *B. subtilis* atraviesa hasta formar la espora madura y la posterior germinación. Imagen tomada de Errington (2003).

Como se ha comentado anteriormente, el primer paso en la formación de la espora es la división asimétrica mediante la formación del septo. La molécula principal responsable de este proceso es la proteína FtsZ, homologa a la tubulina en células eucariotas. Esta proteína polimeriza en forma de filamentos, dando lugar al anillo Z. La acumulación de FstZ y SpoIIE hace que el anillo Z se sitúe en uno de los polos, produciéndose posteriormente la constricción dando lugar a la división asimétrica.

El interior de la espora sufre marcados cambios durante su formación. Se sinte-

tizan grandes cantidades de proteínas de bajo peso molecular que rodean el ADN, previniendo así que sufra daños. En la célula madre se sintetiza gran cantidad de ácido dipicolínico responsable de la resistencia al calor por parte de *B. subtilis* y se acumulan cationes bivalentes (normalmente Ca^{2+}), lo cual da lugar a la deshidratación. Mientras tanto se forma el córtex de la espora y finalmente una corteza de proteína en el exterior.

En este Capítulo se hace referencia a determinados procesos dinámicos de los microorganismos *Escherichia coli* (regulación del inicio de la replicación) y *Bacillus subtilis* (competencia y esporulación), los cuales son objeto de estudio en esta Tesis. Mediante la descripción realizada en este Capítulo, se pretende una visión general de estos procesos dinámicos y una mejor comprensión de los resultados descritos en la Parte II.

Capítulo 4

Modelos dinámicos de la regulación genética

4.1. Regímenes dinámicos en circuitos genéticos y su modelización

Como se ha podido ver hasta ahora, las células poseen mecanismos de adaptación y respuesta a las condiciones externas a las que se encuentran sometidas. Las fluctuaciones ambientales como la privación nutricional y de oxígeno, cambios en el pH, la temperatura o la presión osmótica y moléculas de señalización provenientes de otras células, ejercen un importante efecto sobre ellas y provocan una respuesta rápida y crucial de adaptación. Estos mecanismos de respuesta están asociados a un conjunto de genes y proteínas que forman complejos sistemas de regulación que gobiernan los procesos celulares y que forman como se ha visto anteriormente los circuitos de regulación genética (Savageau, 2001). La respuesta a la cuestión de cómo esta intrincada red de genes y proteínas que conforman dichos circuitos de regulación se controlan para dar lugar a un patrón de respuestas, se complica si se añade el carácter dinámico

y estocástico de las reacciones que ocurren en el interior celular. La generación de moléculas en la célula varía con el tiempo y el ambiente. Un ejemplo de esta situación se presenta en la producción de proteínas de forma periódica con ritmos de 24 horas, lo que se denominan ciclos circadianos (Morelli & Jülicher, 2007), o la síntesis oscilatoria de ciertas proteínas que regulan el ciclo celular de crecimiento y división (Chen et al., 2004).

Las interacciones entre genes y proteínas determinan la arquitectura de los circuitos genéticos, la cual es susceptible a fluctuaciones estocásticas. Además dichos circuitos genéticos comparten genes y proteínas, existiendo así regulación cruzada entre ellos y, en algunos casos, circuitos con diferente arquitectura pueden generar comportamientos dinámicos similares (Çağatay et al., 2009).

Una descripción muy acertada de este tipo de escenario es la realizada por Huang (2011), en el que se presenta la dinámica como el puente de unión entre la arquitectura de las redes genéticas y el comportamiento celular. Según el autor, la interpretación lineal y causal de las conexiones entre los nodos de un circuito genético (por ejemplo, el gen $X1$ inactiva al gen $X2$, el cual codifica un fenotipo determinado, por lo tanto el gen $X1$ causa este fenotipo), es demasiado simplista si tenemos en cuenta el gran número de interacciones que ocurren en todo el genoma. Huang (2011) presenta el *espacio de estados* como una herramienta para entender la dinámica de los circuitos de regulación y el comportamiento celular (Fig. 4.1).

Dicha descripción tiene en cuenta que cada nodo (gen) de un circuito genético (panel izquierdo de la Fig. 4.1) cambia su nivel de expresión en el tiempo de una forma coordinada con el resto de los genes que forman parte de dicho circuito. En primer lugar, se define un estado del circuito en el tiempo t , $S(t)$, por los niveles de expresión x_i de todos los genes N por lo que $S(t) = [x_1, x_2, x_3, \dots, x_n]$, y por lo tanto el estado $S(t)$ (bolas azules en el panel de la derecha de la Fig. 4.1), es un punto en el espacio que contiene todas las posibles combinaciones de niveles de expresión x_i .

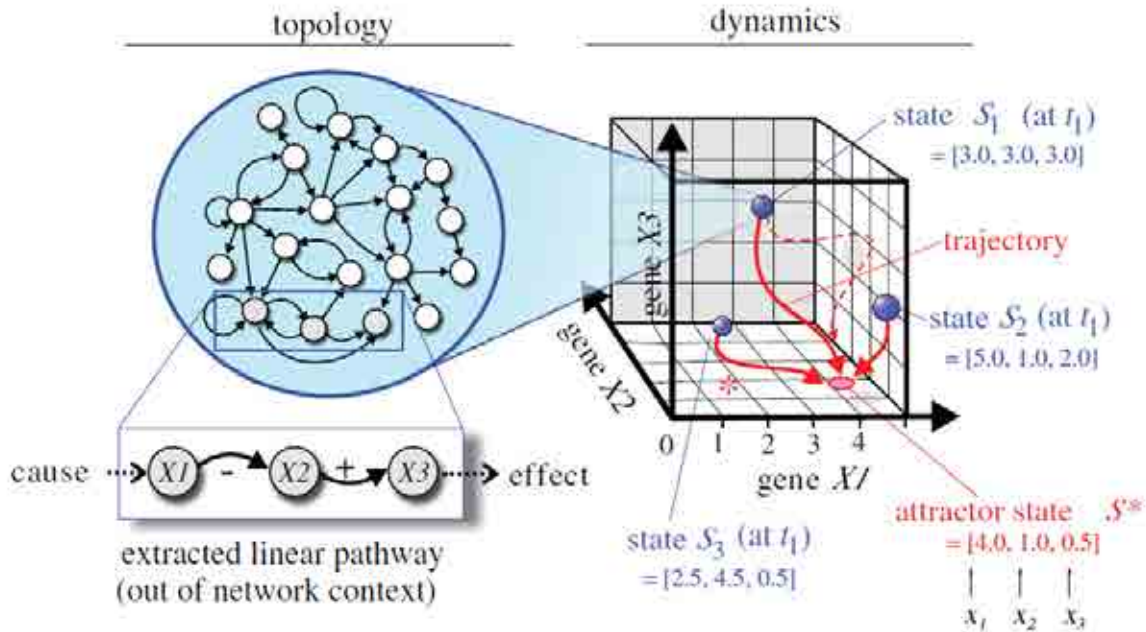


Figura 4.1: De la topología de los circuitos de regulación, a la dinámica del espacio de estados. En la figura se representa la dinámica del espacio de estados de tres genes ($X1$, $X2$ y $X3$) y la influencia entre ellos dentro de una red genética de regulación. Se define un espacio S en un tiempo t , por el perfil de expresión $(x_1, x_2, x_3, \dots, x_n)$ que actúan de coordenadas para los tres estados arbitrarios S_1 , S_2 y S_3 , definiendo su posición en el espacio mediante trayectorias (líneas rojas), que acaban en un estado estable o atractor S^* . La trayectoria punteada representa un ejemplo de perturbación en el perfil de expresión, en el que el sistema tiende a volver rápidamente al estado atractor. Imagen tomada de Huang (2011).

El panel derecho en la Fig. 4.1 muestra el espacio de estados de una red de 3 genes ($n = 3$), por lo que el espacio de estados está compuesto por 3 dimensiones. Las interacciones entre los genes que conforman la red determinan la trayectoria de $S(t)$. Por ejemplo, tengamos en cuenta el efecto del gen $X1$ sobre el gen $X2$, donde el primero inhibe al segundo. Si existe un aumento de x_1 , por consiguiente habrá una disminución de x_2 y esto hará que el espacio $S(t)$, en este caso S_3 , se

mueva en la dirección de la trayectoria marcada con un (*) hacia el atractor S^* ; por lo tanto, $S(t)$ se mueve en las trayectorias del espacio de estados en la forma en que los genes ejercen su acción regulatoria entre ellos, de manera que la red se encuentre en su propio estado de equilibrio, $(x_1\uparrow, x_2\downarrow)$, donde S se encuentra en un estado estacionario de “no cambio” y es atraído por un estado atractor S^* , caracterizado por un perfil de expresión genético estable y robusto a pequeñas perturbaciones.

Las perturbaciones en las trayectorias (i.e. alteraciones en el patrón de expresión $(x_1, x_2, x_3, \dots, x_n)$ debido al efecto de una droga) que no sean de larga duración, harán que un estado se desvíe de forma transitoria del estado atractor, pero siempre tenderá a restablecer el perfil de expresión específico (trayectoria punteada). El comportamiento celular es por tanto el resultado de un conjunto de procesos dinámicos que determinan el correcto funcionamiento de todo el sistema de regulación genética, siempre expuesto a fluctuaciones externas.

Las oscilaciones y la excitabilidad son dos fenómenos comunes en la dinámica de la regulación genética. Las oscilaciones en biología celular tienen lugar en un gran número de procesos de señalización, en los que existe una variación de los componentes de dicha señalización de una forma periódica (Kruse & Jülicher, 2005). Un caso sencillo de circuito que puede producir oscilaciones genéticas se observa en la Fig. 4.2, en donde la expresión de un gen viene determinada por su propia inhibición, formando un bucle de retroalimentación negativa que inhibe la transcripción del ARNm, impidiendo así su propia producción. La expresión de la proteína producto de la expresión de este gen oscila si el tiempo que transcurre entre el comienzo de la transcripción y el final de la traducción del ARNm es suficientemente grande (Swinburne et al., 2008).

Un ejemplo de dinámica oscilatoria se encuentra en la proteína supresora de tumores p53 y su modulador negativo Mdm2. En la Fig. 4.3A (Lahav et al., 2004) se representa el bucle de retroalimentación negativa en el que la proteína p53 activa transcripcionalmente a Mdm2 y éste a su vez inhibe la acción de la primera median-

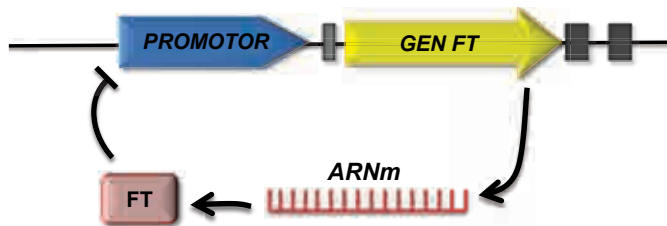


Figura 4.2: Imagen en la que se representa un circuito simple generador de oscilaciones. Consiste en un bucle de retroalimentación negativa formado por la inhibición por parte de un factor de transcripción (FT) que inhibe el promotor que regula la expresión del gen que codifica para el mismo FT.

do su degradación. En condiciones de estrés tales como daño en el ADN, existe una disminución de la producción de Mdm2, incrementándose en consecuencia los niveles de p53 y por tanto la transcripción y producción de Mdm2 (Lahav et al., 2004). En el estudio realizado por Lahav et al. (2004), se fusionaron p53 y Mdm2 a las proteínas fluorescentes CFP y YFP, respectivamente, para seguir *in vivo* su dinámica de expresión. El resultado obtenido de este estudio se muestra en la Fig. 4.3B, en la que se observa un retraso en las oscilaciones de Mdm2 (serie temporal roja) de aproximadamente 100 minutos en relación con las oscilaciones de p53 (serie temporal verde). En la Fig. 4.3C, se observa una célula que presenta dos pulsos y donde el color amarillo representa la colocalización de ambas proteínas, apareciendo en primer lugar p53-CFP en el núcleo, seguido con un cierto retraso por Mdm2-YFP. Se observa un segundo pulso aproximadamente a los 700 minutos.

Según Batchelor et al. (2009), el ADN de doble cadena se rompe tras irradiación γ y los niveles de p53 sufren un dramático incremento y posteriormente decrecen, en lo que se pensó que eran oscilaciones amortiguadas en las que la amplitud disminuye con el tiempo. El análisis a nivel de células individuales reveló que p53 presenta una serie de pulsos, por lo que la caracterización inicial en oscilaciones amortiguadas era el resultado del análisis a nivel poblacional. Según este autor la respuesta *in vivo* es

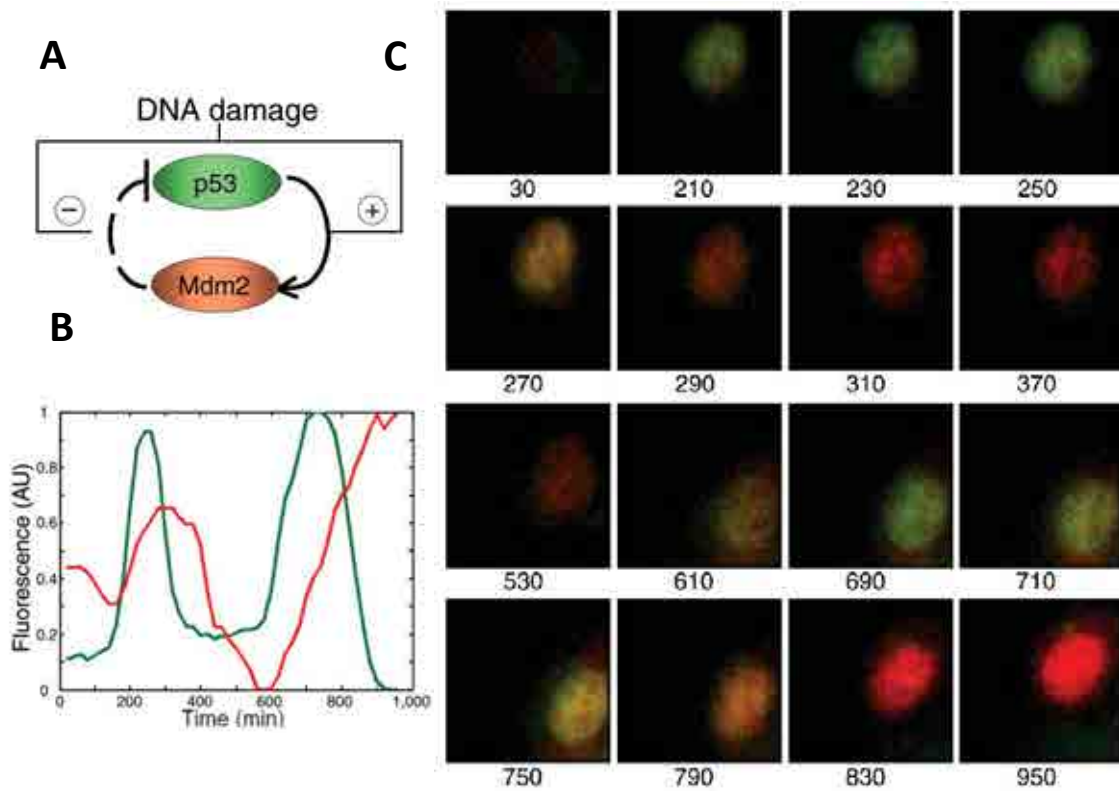


Figura 4.3: En la figura A se representa el bucle de retroalimentación negativa. Tras una situación de estrés como puede ser daño en el ADN, p53 activa transcripcionalmente a Mdm2 que a su vez inhibe a p53 mediando en su degradación. La figura B muestra las series temporales para las proteínas p53-CFP (serie temporal verde) y Mdm2-YFP (serie temporal roja). La figura C muestra imágenes de la dinámica *in vivo* de las oscilaciones periódicas de ambas proteínas, tomadas en el tiempo. Imágenes tomadas de Lahav et al. (2004).

específica de tejido, por lo que existen diferentes dinámicas de respuesta del circuito que regula la expresión de p53. La pregunta que se plantean en Batchelor et al. (2009) es la siguiente: ¿Constituyen los pulsos de expresión de p53 oscilaciones o son pulsos independientes?. Los osciladores son sistemas autónomos, mientras que los generadores de pulsos responden a un estímulo con un pico de actividad que puede

repetirse en el tiempo. Otra característica de los osciladores es que pueden surgir de un solo bucle de retroalimentación negativa, mientras que un sistema generador de pulsos requiere interacciones adicionales para que surja el umbral de activación y generar la respuesta.

Según Batchelor et al. (2009), p53 comparte características con un sistema oscilatorio, en el que los componentes cambian su concentración o localización siguiendo un patrón regular y repetitivo, siendo resistentes a pequeñas fluctuaciones en su trayectoria basal. A este tipo de trayectoria representada en la Fig. 4.4A se le denomina ciclo límite estable. En realidad esta no es la única dinámica que presenta la regulación de p53, ya que en otras situaciones dicha dinámica comparte características con un sistema excitable en el que, como se muestra en la Fig. 4.4B, el estado basal es un estado estacionario estable, en el que un cierto umbral hace que el sistema vuelva rápidamente al punto fijo estable. En el caso de que las fluctuaciones sean suficientemente grandes, el sistema se excita y se produce transitoriamente un cambio significativo en las concentraciones de los componentes antes de volver al estado estable.

Tras un análisis de la dinámica de expresión de p53 (Batchelor et al., 2009), se menciona la posibilidad de que dependiendo de las condiciones celulares (cantidad de daño en el ADN o concentraciones iniciales de las proteínas en el momento del daño), el sistema puede actuar como un generador de pulsos o como un sistema oscilatorio. Se podría especular que en ausencia de daño, los niveles de p53 son bajos y excitables hasta que aparece un estímulo. Si después del pulso el estímulo permanece, se produce una consecución de pulsos llegando a un ciclo límite estable.

A medida que se han ido conociendo mejor los procesos celulares, ha aumentado considerablemente el número de factores que forman parte de los circuitos de regulación genética, y al mismo tiempo se ha hecho evidente que dichos factores interaccionan entre si de manera no lineal, en la mayoría de ocasiones. Estas dos características dificultan la comprensión del comportamiento celular. La biología de

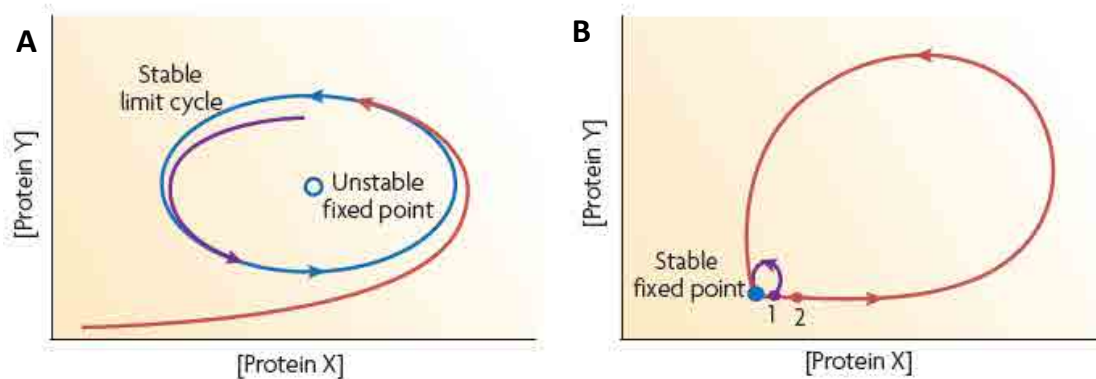


Figura 4.4: En la figura A se representa un ciclo límite (en azul) en donde las proteínas oscilan con un patrón cíclico estable. En púrpura y rojo se muestran dos trayectorias que relajan hacia el ciclo límite de forma gradual. En la figura B se muestra un punto fijo estable donde permanecen las concentraciones de proteínas mientras el sistema no sufra perturbaciones. En el momento en que existe una pequeña perturbación (punto 1), el sistema se relaja al punto fijo estable con pequeños cambios en la concentración de proteínas, describiendo la trayectoria púrpura. Por el contrario, en el momento en que el sistema sufre perturbaciones a un cierto umbral (punto 2), la concentración de proteínas cambia drásticamente, describiendo la trayectoria roja donde la excursión para alcanzar el punto estable es mayor. Imágenes de Batchelor et al. (2009)

sistemas tiene como objetivo principal enfrentarse a esos retos.

Según Robeva (2010), cuando nos enfrentamos al estudio de sistemas complejos debemos centrarnos en los elementos regulatorios principales y realizar experimentos perturbando dichos elementos y observar el comportamiento del sistema *in vivo* para determinar así su función e interacciones. Por otro lado, debemos realizar aproximaciones teóricas de la dinámica observada *in vivo* de estos elementos. Para llevarlo a cabo se establecen modelos matemáticos que representen las interacciones entre los elementos que componen las redes de regulación genética, y que describan la evolución y dinámica del sistema.

A continuación se describe un modelo matemático que ejemplifica lo anteriormente mencionado y que reproduce la dinámica del circuito genético que gobierna la diferenciación de células de *B. subtilis* al estado de competencia. En segundo lugar se describe un modelo poblacional utilizado para evaluar las ventajas de la progresión reversible en la toma de decisión celular, en este caso la progresión hacia la esporulación en células de *B. subtilis*.

4.2. Pulsos de competencia en *B. subtilis*

Como se pudo ver en el Capítulo 3.2, dependiendo de las condiciones de crecimiento, una subpoblación de células de *B. subtilis* comprendida entre el 1 y 10% entra en un estado transitorio denominado competencia, en el que adquieren la capacidad de incorporar ADN del exterior al medio intracelular (Grossman, 1995).

En la Fig. 4.5 se puede ver el circuito que regula la competencia en *B. subtilis*, al que se denomina circuito MeKS (Süel et al., 2006). Los símbolos \neg y \rightarrow indican inhibición y activación, respectivamente. El principal gen que regula la competencia, *comK*, es activado indirectamente por la proteína ComS, cuya producción viene determinada por los niveles de estrés. Esta proteína inhibe la degradación de ComK mediada por el complejo formado por MecA-ClpP-ClpC mediante unión competitiva, dando lugar a una realimentación indirecta globalmente negativa señalada en color púrpura en la figura.

La proteína ComK activa su propia transcripción (retroalimentación positiva en rojo) y se inicia el estado de competencia. Esta situación es transitoria, ya que el estado de competencia acaba cuando la producción de ComS finaliza debido a la degradación de esta proteína y a la inhibición del promotor de dicho gen, P_{ComS} por parte de ComK (línea púrpura punteada de ComK al promotor P_{ComS}) (Süel et al., 2007). Este circuito de regulación funciona como un sistema excitable en el que una

pequeña perturbación genera largas excursiones en el espacio de fases, que acaban devolviendo al sistema al estado inicial (Süel et al., 2007).

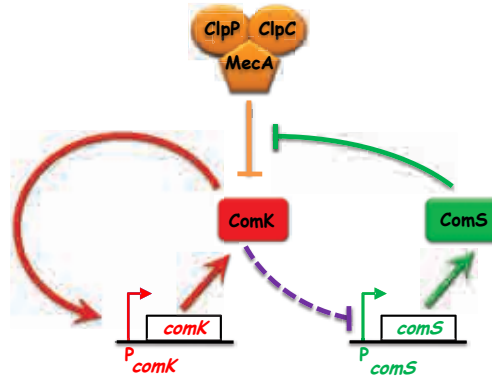


Figura 4.5: Imagen del circuito MeKs. Autoregulación transcripcional positiva del gen *comK* y retroalimentación negativa en la cual la proteína ComK inhibe la expresión de la proteína ComS, la cual interfiere con la degradación de ComK. Nota: Los símbolos \dashv y \rightarrow indican inhibición y activación, respectivamente.

La dinámica de las proteínas ComK y ComS viene definida por el siguiente sistema de ecuaciones diferenciales:

$$\frac{dK}{dt} = \alpha_k + \frac{\beta_k K^n}{k_k^n + K^n} - \frac{\delta_k K}{1 + (K/\Gamma_K) + (S/\Gamma_s)} - \lambda_k K \quad (4.1)$$

$$\frac{dS}{dt} = \alpha_s + \frac{\beta_s}{1 + (K/K_s)^p} - \frac{\delta_s S}{1 + (K/\Gamma_K) + (S/\Gamma_s)} - \lambda_s S \quad (4.2)$$

Donde las constantes α_k y α_s describen el efecto de la expresión constitutiva (definición breve en página 192) de los promotores P_{ComK} y P_{ComS} , respectivamente. Los segundos términos describen la autoregulación transcripcional positiva de la proteína ComK sobre su propio gen (4.1), y la inhibición de la expresión de la proteína ComS por parte de ComK (4.2). El parámetro β_s mide la expresión inducida y regulada de ComS. En ambas ecuaciones el tercer término corresponde a la unión competitiva del complejo de degradación controlado por MecA. El último término representa la degradación lineal con coeficientes λ_k (4.1), y λ_s (4.2). La unión competitiva se mide

mediante los parámetros δ_k y δ_s para ComK y ComS, respectivamente. La afinidad de estas proteínas por MecA viene dada por los valores de EC_{50} , Γ_k y Γ_s .

4.3. Progresión hacia la esporulación en *B. subtilis*

El crecimiento de una sola especie de células bacterianas puede definirse utilizando la ecuación:

$$\frac{dN}{dt} = \text{nacimientos} - \text{muertes} + \text{migración} \quad (4.3)$$

donde $N(t)$ es la población en un tiempo t , a partir del ritmo de variación de la población, el cual se rige por una ecuación de conservación del tipo (Murray, 2001).

Si suponemos que no existe migración y los nacimientos y muertes son proporcionales a N se llega simplemente a:

$$\frac{dN}{dt} = bN - dN \quad (4.4)$$

Por tanto,

$$N(t) = N_0 e^{(b-d)t} \quad (4.5)$$

Donde b y d son constantes positivas y la población inicial en $N(0) = N_0$. Si b es mayor que d la población crece exponencialmente, pero si b es menor que d la población muere.

A partir de este sencillo modelo podemos definir un sistema de ecuaciones lineales que nos permitan evaluar la dinámica de población, en este caso de la progresión de células de *B. subtilis* hacia el estado de esporulación. En condiciones de estrés debido a la deprivación de nutrientes, estas bacterias desarrollan un mecanismo para la formación de esporas, resistentes durante años a condiciones ambientales adversas (Grossman, 1995). En la Fig. 4.6 se muestra esquemáticamente el proceso de

transición hacia la esporulación en una serie de pasos, compatibles con la evidencia experimental (ver Capítulo 8) que combinan una progresión gradual y reversible a través de estados intermediarios, hasta un estado en que las células deciden continuar hacia la esporulación de una forma irreversible.

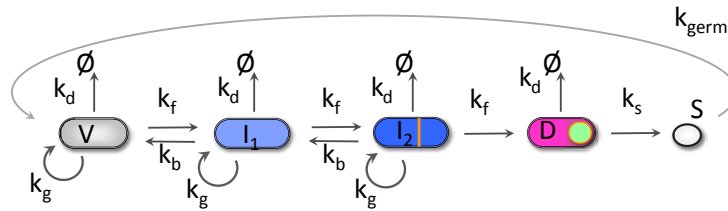


Figura 4.6: Esquema de estados celulares donde se aprecia la progresión de células vegetativas (V) hacia la esporulación (S) a través de transiciones reversibles (intermediarios I_1 e I_2) y una transición irreversible al estado en que se toma la decisión (D) de esporular. (k_d = ratio de muerte, k_g = ratio de generación, k_s = ratio de esporulación, k_f y k_b avanzar y retroceder, respectivamente. k_{germ} = ratio de germinación).

En la medida en que las células progresan al estado de esporulación, la dinámica de la población se define por la siguiente ecuación lineal:

$$\frac{d\mathbf{n}}{dt} = \mathbf{A}\mathbf{n} \quad (4.6)$$

Donde \mathbf{n} es el vector de estados del sistema dado el número de células en cada estado, y \mathbf{A} es la matriz que contiene los ratios de transición entre poblaciones celulares.

Si definimos los estados celulares como vegetativo (V), decidido (D), espóra (S) y dos estados intermedios I_1 e I_2 , se llega a un vector de dimensión 5, $\mathbf{n} = (V, I_1, I_2, D, S)^T$,

donde T indica la transposición del vector y la matriz de transición A es la siguiente:

$$A = \begin{pmatrix} -k_f - k_d + k_g + k_{\text{germ}} & k_b & 0 & 0 & 0 \\ k_f & k_g - k_d - k_b - k_f & k_b & 0 & 0 \\ 0 & k_f & k_g - k_d - k_b - k_f & 0 & 0 \\ 0 & 0 & k_f & -k_s - k_d & 0 \\ 0 & 0 & 0 & k_s & -k_{\text{germ}} \end{pmatrix}$$

Las constantes k_i están definidas al pie de la Fig. 4.6. La solución de la ecuación lineal 4.6 tiene la forma:

$$\mathbf{n}(t) = \sum_{i=1}^d c_i \mathbf{v}_i \exp(\lambda_i t), \quad (4.7)$$

donde d hace referencia a la dimensión de la matriz A, de la que sus valores propios están representados por λ_i y sus vectores propios por \mathbf{v}_i . Los escalares c_i son las constantes de integración que dependen de las condiciones iniciales. La ecuación 4.7 puede expresarse de una forma más compacta definiendo la matriz $d \times d$ de vectores propios V (de la cual sus columnas son los vectores propios de A), la matriz $d \times d$ de valores propios Λ (de la cual los elementos de la diagonal son los valores propios de A), y el vector \mathbf{c} de constantes de integración, de dimensión d . De esta forma la solución de 4.7 se puede escribir como:

$$\mathbf{n}(t) = \mathbf{V} \exp(\Lambda t) \mathbf{c} \quad (4.8)$$

La expresión que nos da los valores de las constantes de integración en términos de condiciones iniciales es:

$$\mathbf{n}(0) = \mathbf{V} \mathbf{c} \quad \implies \quad \mathbf{c} = \mathbf{V}^{-1} \mathbf{n}(0)$$

De esta forma la expresión final de la solución de la ecuación de balance 4.6 es:

$$\mathbf{n}(t) = \mathbf{V} \exp(\Lambda t) \mathbf{V}^{-1} \mathbf{n}(0) \quad (4.9)$$

Esta expresión se puede utilizar para describir el estado de la población celular en un ambiente variable, siempre que las variaciones se puedan expresar en forma de

un proceso dicotómico como el mostrado en la Fig. 4.7, donde se alternan fases de bajo estrés (medio de crecimiento rico), y alto estrés (medio de crecimiento pobre). Cada una de las dos fases de estrés viene caracterizada por un conjunto distinto de parámetros de reacción k_i (véase el Capítulo 8 para ejemplos concretos).

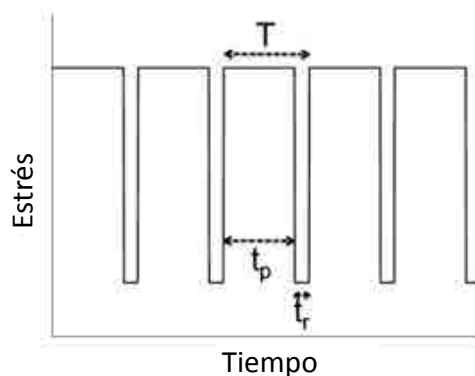


Figura 4.7: Esquema de los ciclos dicotómicos en el que se alternan fases de bajo estrés (medio de crecimiento rico), y alto estrés (medio de crecimiento pobre). T es la duración total de un ciclo, y t_p y t_r se corresponden con la duración de la fase pobre y rica, respectivamente.

Si T es la duración total de un ciclo, y t_p y t_r se corresponden con la duración de la fase pobre y rica, respectivamente, después de la fase pobre del primer ciclo la población se representa:

$$\mathbf{n}(t_p) = \mathbf{V}_p \exp(\Lambda_p t_p) \mathbf{V}_p^{-1} \mathbf{n}(0) \quad (4.10)$$

Este valor se utilizará como condición inicial de la siguiente fase (fase rica), en la que la población se define por:

$$\mathbf{n}_1 = \mathbf{V}_r \exp(\Lambda_r t_r) \mathbf{V}_r^{-1} \mathbf{V}_p \exp(\Lambda_p t_p) \mathbf{V}_p^{-1} \mathbf{n}_0, \quad (4.11)$$

donde el subíndice en \mathbf{n} denomina el ciclo. Después de q ciclos, la población vale:

$$\mathbf{n}_q = (\mathbf{V}_r \exp(\Lambda_r t_r) \mathbf{V}_r^{-1} \mathbf{V}_p \exp(\Lambda_p t_p) \mathbf{V}_p^{-1})^q \mathbf{n}_0. \quad (4.12)$$

En esta Tesis se han estudiado diferentes comportamientos celulares dinámicos, mediante el uso de técnicas experimentales que nos permiten analizar dicho comportamiento a nivel de células individuales. Así mismo, se han utilizado herramientas matemáticas como las descritas en este Capítulo, a partir de las cuales se contrastan los datos experimentales obtenidos. De esta forma se pretende comprender la respuesta celular a partir de la estructura de un circuito genético y la integración de señales por parte del mismo, para dar lugar a un comportamiento dinámico (véase concretamente el Capítulo 6, donde se estudia el circuito que regula la competencia). Utilizando un modelo poblacional como el descrito anteriormente, se analizó el efecto de la reversibilidad en la progresión hacia un determinado estado celular, en concreto la formación de esporas (véase concretamente el Capítulo 8).

Parte II

Resultados

Capítulo 5

Dinámica de la replicación cromosómica en *Escherichia coli*

5.1. Regulación de la replicación

Como se pudo ver en la Sección 3.1, las bacterias doblan su masa y se dividen dando lugar a dos células hijas. Antes de que tenga lugar la división celular, se debe replicar el cromosoma generando otra copia. Para que el ADN cromosómico se replique una vez dentro de un ciclo celular, debe existir un control adecuado del inicio de la replicación.

En *Escherichia coli*, la regulación del inicio de la replicación se lleva a cabo mediante tres mecanismos distintos: el secuestro por parte de la proteína SeqA del origen de replicación *oriC*, la hidrólisis mediada por el sistema RIDA (*Regulatory inactivation of DnaA*) del ATP en ADP de la forma activada de la proteína DnaA, la cual es la molécula iniciadora de la replicación, y por último, la titulación de las moléculas de DnaA por parte del locus *datA*.

El cromosoma de *Escherichia coli* es circular y se ha dividido en 100 minutos, que

corresponden al tiempo necesario para que tenga lugar la transferencia de todo el cromosoma por parte de una célula a otra mediante el proceso de conjugación (breve descripción en página 192). En la Fig. 5.1 se muestra el cromosoma de *Escherichia coli* donde se observan la localización del origen de replicación *oriC* a 85 minutos y la región *ter*, donde finaliza la replicación del cromosoma a 35 minutos de la región 0/100.

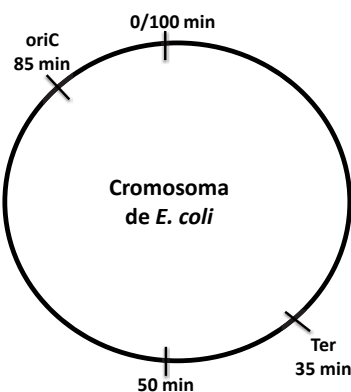


Figura 5.1: Mapa en minutos del cromosoma de *Escherichia coli* donde se puede ver la localización de *oriC* y la región de terminación (*ter*) de la replicación respecto de la región 0/100.

A partir de estudios previos realizados por Camara et al. (2005), se vio que la eliminación del locus *datA* no suponía diferencia alguna en la replicación si se comparaba con bacterias *wild type*, por lo que en los experimentos que se realizaron para obtener los resultados de esta Tesis y que se describen a continuación, no se incluye el estudio del efecto que ejerce el locus *datA* en la regulación del inicio de la replicación. En la Fig. 5.2 se muestran los resultados obtenidos a partir de un experimento realizado mediante la técnica de microarray en Camara et al. (2005) (en la página 193 se realiza una breve descripción de esta técnica). En dicho experimento se determinaron los efectos de la delección (eliminación) de los genes *hda*, *seqA* y el locus *datA* sobre todo el genoma. Se incluyó el análisis del ADN genómico de una

cepa *wild type* para la posterior comparación. La cantidad de ADN que hibrida en el microarray se representa en el eje y para cada caso en la figura. En el eje x se representa la posición de las secuencias hibridadas en el cromosoma relativa a *oriC*, el cual se sitúa en este caso, centrado a 0 minutos. Cabe esperar que la delección de estos genes incrementaría la frecuencia del inicio de la replicación, lo que aumentaría a su vez el número de copias de los genes cercanos a *oriC* en relación a la secuencia de terminación de la replicación *ter*. El resultado que se obtendría sería un pico en *oriC* y un mínimo en *ter*.

En la Fig. 5.2 se observa la cantidad de ADN que hibrida en el microarray de *oriC* a *ter* en células *wild type* (A), células con delección en *hda* (B), *seqA* (C) y *datA* (D). La línea negra representa la media obtenida para todos los casos. Si se comparan las gráficas para las tres delecciones con la cepa *wild type*, la delección en *datA* y *seqA* no presentan una diferencia significativa respecto a la cepa *wild type*. Es solamente en la cepa con delección en el gen *hda* donde se observa un incremento considerable en la replicación de *oriC* a *ter* respecto de las células *wild type*, lo que indica que se produce un aumento de la iniciación de la replicación. En este estudio se midieron las cantidades de determinadas secuencias marcadoras del origen de replicación en relación a secuencias marcadoras de la terminación de la replicación. Los resultados que obtuvieron fueron: 1.9 para la cepa *wild type* y 4.1, 2.0 y 2.1 para las cepas con delección en *hda*, *datA* y *seqA*, respectivamente. Esto último, corrobora los datos obtenidos mediante la hibridación en microarray del ADN genómico para las tres cepas con delección.

En este Capítulo centraremos nuestro interés en la dinámica de dos de los tres mecanismos que poseen las bacterias *Escherichia coli*, para evitar rondas secundarias de replicación durante un ciclo de división celular: la regulación negativa por el secuestro de *oriC* mediante la unión competitiva de la proteína SeqA, y la regulación negativa de DnaA mediante el sistema RIDA.

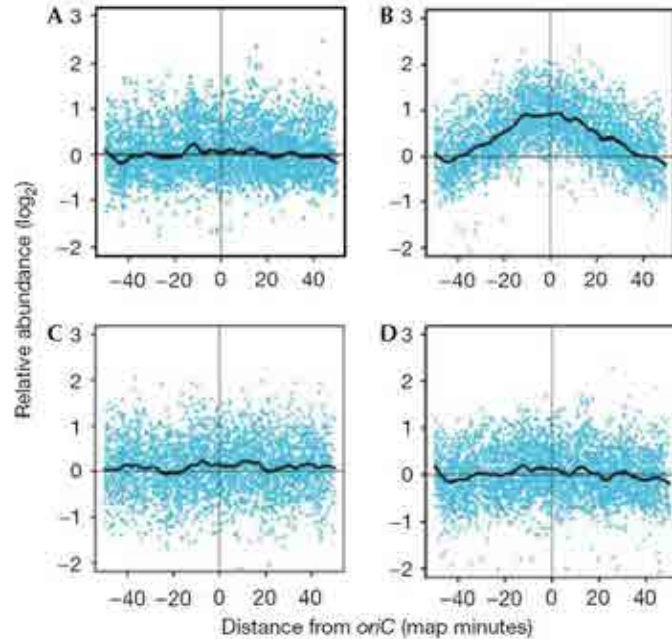


Figura 5.2: Replicación de *oriC* a *ter* en células *wild type* (A), células con delección en *hda* (B), *seqA* (C) y *datA* (D). En el eje *y* se representa la cantidad de ADN que hibrida en el microarray, y en el eje *x* la posición de las secuencias hibridadas del genoma relativas a *oriC*, centrado a 0 minutos y de *ter*, situado en ambos extremos. La línea negra representa la media obtenida en cada caso. Imagen de Camara et al. (2005).

5.2. Perturbación del ciclo celular

A continuación se muestran los resultados de la comparación del efecto dinámico de dos de los tres mecanismos de regulación negativa, (secuestro de *oriC* por parte de SeqA e inactivación de las moléculas de DnaA por parte del sistema RIDA), *in vivo* y a nivel de células individuales. Con este fin se perturban diferentes componentes del sistema de regulación del inicio de la replicación, concretamente incrementando la expresión de la proteína SeqA y de las moléculas que conforman el sistema RIDA. Para ello se crearon las tres cepas descritas en la Sección 2.3.1, una de las cuales expresa la proteína SeqA fusionada a la proteína fluorescente YFP, otra la proteína

Hda y la fusión de la proteína DnaN a YFP, y por último una cepa control en la que se expresa solamente la proteína YFP.

En las tres cepas se activa la transcripción de las proteínas de interés mediante la inducción del promotor P_{ara} con arabinosa al 0.7%. Utilizando las técnicas de microscopía descritas en la Sección 2.4.4, se tomaron imágenes cada 7 minutos, las cuales posteriormente se analizaron para determinar a lo largo del tiempo la duración del período de cada ciclo celular. El análisis se realiza en células individuales utilizando una serie de códigos en Matlab (para más detalles ver la Sección 2.5.1). Tras este análisis se pueden comparar las dos cepas que sobreexpresan las proteínas que modulan el inicio de la replicación frente a la cepa que solamente expresa la proteína YFP, que se generó como control *wild type*.

En la Fig. 5.3 se puede observar la evolución del crecimiento de las tres cepas comparadas (derecha) y el clonaje realizado en cada caso (izquierda). En la fila superior se muestra la cepa control que expresa la proteína fluorescente YFP ($P_{ara-yfp}$). En la fila central se aprecia el crecimiento de la cepa que sobreexpresa la fusión *seqA-yfp* ($P_{ara-seqA-yfp}$), y en la fila inferior se muestra una colonia de la cepa que sobreexpresa las proteínas que forman el sistema RIDA ($P_{ara-hda-dnaN-yfp}$).

Fenotípicamente se aprecian diferencias entre las tres cepas. En primer lugar, En las bacterias de la fila central de la figura se puede observar la localización de la proteína SeqA gracias a que lleva fusionada la proteína fluorescente YFP. Se observan puntos de color verde que corresponden a acúmulos de SeqA que se unen al cromosoma bacteriano. Por otro lado, en la fila inferior de la figura se puede ver que la expresión de la proteína DnaN fusionada a YFP es uniforme en toda la bacteria y además, si se compara la longitud de las bacterias que expresan *hda-dnaN-yfp* con la de la cepa control, se puede ver que son más alargadas las bacterias que expresan las moléculas del sistema RIDA.

El resultado que cabe esperar es un retraso de la replicación del cromosoma debido

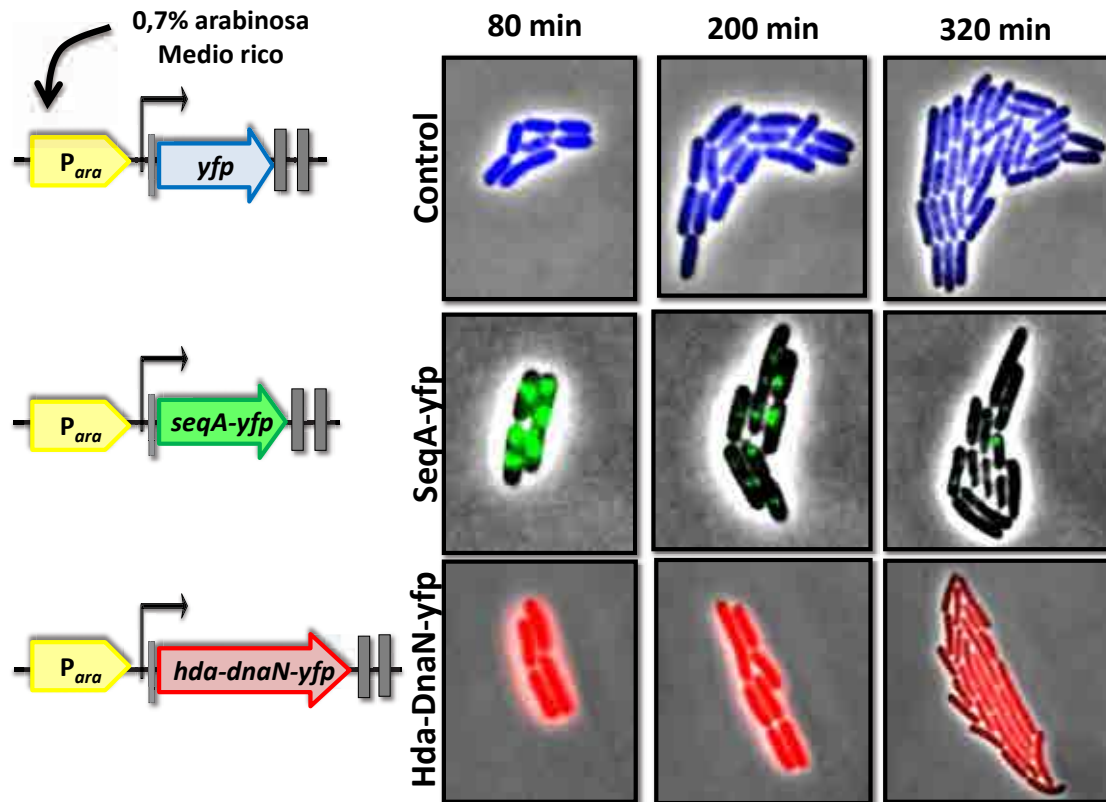


Figura 5.3: Crecimiento de las tres cepas de *Escherichia coli* (derecha) y los genes que expresan en cada caso bajo la regulación del mismo promotor inducible por arabinosa (P_{ara})(izquierda).

a un secuestro prolongado de $oriC$ por parte de la sobreexpresión de la proteína SeqA o una mayor desactivación de las moléculas de DnaA, mediada por la sobreexpresión de las moléculas que conforman el sistema RIDA.

En la Fig. 5.4 se muestra un ejemplo de la serie temporal del crecimiento y división de una célula individual para las tres cepas. En la gráfica superior se comparan las divisiones celulares para una célula que expresa P_{ara} - yfp (línea azul) y otra célula que expresa P_{ara} - $seqA$ - yfp (línea roja). Se aprecia un desfase en los períodos hasta aproximadamente los 110 minutos, igualándose a partir de este momento. Por el

contrario, si se observa la gráfica inferior se aprecia que el efecto en el desfase de los períodos es mucho más acusado si se compara la misma célula que expresa $P_{ara-yfp}$ (línea azul) y otra célula que expresa $P_{ara-hda-dnaN-yfp}$ (línea verde). Este desfase introducido en el ciclo celular es transitorio, y pasados los 210 minutos la duración de los períodos se iguala para estas dos cepas.

Tras la observación de las series temporales de crecimiento en células individuales y comprobar que el efecto de la sobreexpresión era temporal, se opta por analizar la duración de los períodos para las tres cepas de hasta al menos cinco ciclos celulares en múltiples células individuales.

El resultado obtenido fue de 34.14 ± 1.04 (minutos), 34.84 ± 0.89 (minutos) y 48.25 ± 2.14 (minutos) para las cepas que expresan $P_{ara-yfp}$ ($n = 48$), $P_{ara-seqA-yfp}$ ($n = 42$) y $P_{ara-hda-dnaN-yfp}$ ($n = 27$), respectivamente. En la Fig. 5.5 se muestra la distribución de duraciones por ciclo celular para las tres cepas comparadas. Se observa que a medida que avanza el número de divisiones celulares la duración de los períodos se iguala para las tres cepas. Cabe destacar que en las células que sobreexpresan $hda-dnaN-yfp$ el período es más largo en las primeras divisiones celulares, por el contrario de la cepa que sobreexpresa $seqA$, en la que no se observa un incremento significativo en la duración de los períodos.

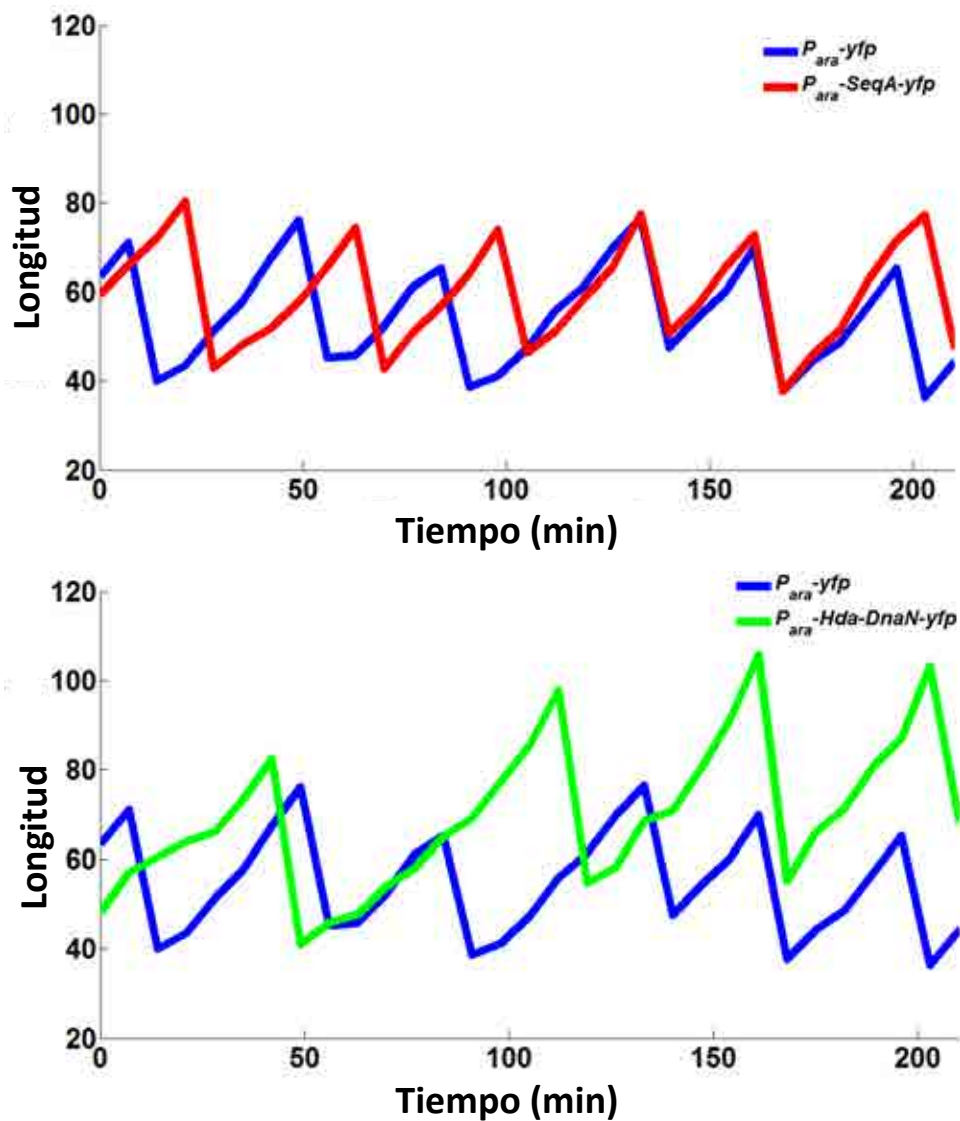


Figura 5.4: Series temporales de crecimiento y división de una célula individual de las tres cepas analizadas. En la gráfica superior se comparan las divisiones celulares para una célula que expresa $P_{ara}\text{-yfp}$ (línea azul) y otra que expresa $P_{ara}\text{-seqA-yfp}$ (línea roja), y en la gráfica inferior se compara la misma célula que expresa $P_{ara}\text{-yfp}$ (serie azul) y otra célula que expresa $P_{ara}\text{-hda-dnaN-yfp}$ (serie verde).

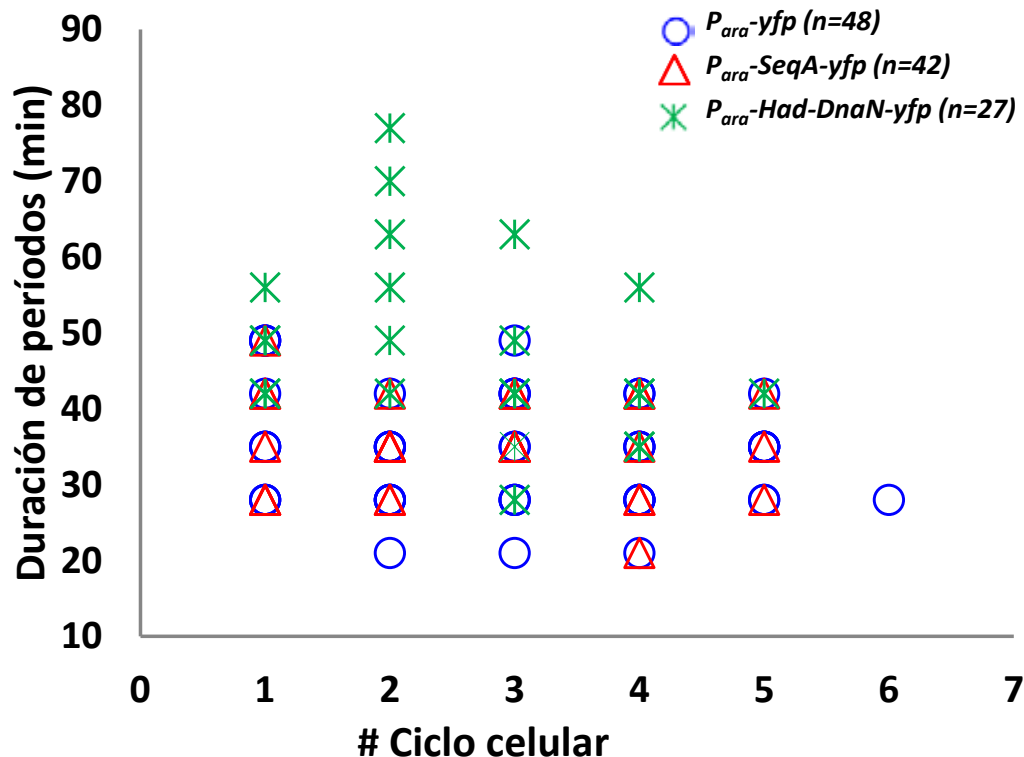


Figura 5.5: Distribución de duraciones en los períodos para las cepas que expresan $P_{ara-yfp}$ (círculos), $P_{ara-seqA-yfp}$ (triángulos) y $P_{ara-hda-dnaN-yfp}$ (asteriscos).

Como ya se ha mencionado, las bacterias incrementan su tamaño y se dividen dando lugar a dos células hijas con la misma información genética que su predecesora. La masa celular en el tiempo del inicio de la replicación es constante, pero una variación en el tiempo de inicio en la replicación del cromosoma tiene grandes consecuencias en el ciclo celular y con ello en el tamaño celular (Donachie, 1968). Resultó interesante determinar la relación entre la longitud celular y el inicio de la replicación del cromosoma en las tres cepas analizadas en este estudio.

Se calculó la longitud de las bacterias durante 4-7 ciclos celulares antes de cada división realizando la media de todas las longitudes celulares y el resultado obtenido

fue de 29.85 ± 0.94 (pixel), 34.14 ± 1.70 (pixel) y 45.41 ± 2.72 (pixel) para las cepas que expresan $P_{ara-yfp}$ ($n = 62$), $P_{ara-seqA-yfp}$ ($n = 56$) y $P_{ara-hda-dnaN-yfp}$ ($n = 35$), respectivamente. La longitud determinada antes de que se produzca la división celular en las tres cepas, está relacionada con el efecto que se observa en la duración de los períodos celulares. Se puede ver que el mayor incremento en la longitud se aprecia en la cepa en la que se sobreexpresa *hda-dnaN-yfp*.

5.3. Discusión

Los resultados obtenidos son poco concluyentes, pero los experimentos realizados indican que el sistema RIDA juega un importante papel en el control del inicio de la replicación. Se ha observado que la sobreexpresión de las moléculas que forman el complejo RIDA da lugar a un incremento en la masa celular previa a la división y a un aumento en el período de los ciclos celulares.

Por otro lado, los datos obtenidos en este estudio son consistentes con los de Banack et al. (2005) en el que se observó que al expresar la proteína Hda mediante un sistema de inducción diferente al utilizado en este estudio (sistema inducible por IPTG), las células presentaban un tamaño superior al salvaje.

Como se mencionó anteriormente, la masa celular en el tiempo del inicio de la replicación es constante. Un cambio en el tiempo de inicio en la replicación tiene una gran repercusión en el ciclo celular y con ello en el tamaño celular (Donachie, 1968). La delección del gen *hda* causa un incremento en la cantidad de DnaA-ATP por lo que aumenta el número de reiniciaciones de la replicación (Donachie & Blakely, 2003).

Según Kawakami et al. (2006), existen evidencias de que el sistema RIDA es el mecanismo más importante en la represión de iniciaciones múltiples de la replicación. Los resultados obtenidos, son comparables con los que se obtienen en el estudio realizado por Camara et al. (2005) en el que en lugar de sobreexpresar las moléculas

que regulan el inicio de la replicación, se delecionaron los genes que codifican para dichas moléculas, lo que supuso un aumento de las reiniciaciones en la replicación.

En ese estudio se observó que una delección de estos genes aumentaba la frecuencia de iniciación de la replicación por lo que consecuentemente se incrementaba el número de copias de los genes que se encuentran cerca de *oriC* relativas a las secuencias de terminación. Este fue el resultado obtenido en ese estudio para la cepa que tenía delecionado el gen *hda*. Por el contrario, aquellas bacterias a las que se les delecionó el gen *seqA* mostraron diferencias mínimas en comparación con la cepa salvaje.

Sería conveniente realizar experimentos que determinen la cantidad de proteína que se sobreexpresa en cada cepa. El análisis realizado debería hacerse en un medio pobre y observar y cuantificar el efecto que produce en el ciclo celular, ya que se ha visto que existe relación entre la masa celular en el momento de la división y la disponibilidad de nutrientes (Chien et al., 2012).

El análisis realizado de la regulación del inicio de la replicación en *Escherichia coli* a nivel de células individuales, aunque poco concluyente, enfatiza el papel que juega el sistema RIDA en dicha regulación, si se compara con la regulación negativa por parte de la proteína SeqA. Las perturbaciones aplicadas, aunque transitorias, ejercen un determinado efecto en la regulación de la replicación en *Escherichia coli*, tanto en el comportamiento como a nivel fenotípico. Las bacterias dividen su masa con un cierto retraso respecto a las células que no sobreexpresan los componentes de RIDA, y a su vez presentan un incremento en su longitud.

En el siguiente Capítulo, se estudiarán los efectos de perturbar el nivel de expresión, de determinados genes que conforman el circuito genético que regula el estado de competencia en *Bacillus subtilis* en respuesta al estrés. En este Capítulo observaremos como el comportamiento dinámico y fenotípico de dichas bacterias puede cambiar en función del tipo de perturbación aplicada.

Capítulo 6

Control multiparamétrico de la competencia en *Bacillus subtilis*

En este Capítulo se explicará a partir de un circuito genético sencillo, como es el que regula el estado de competencia genética en *B. subtilis*, la integración de múltiples señales por parte de dicho circuito y el efecto de estas señales según si actúan en diferentes puntos del circuito o si afectan a un mismo componente. Con este objetivo se han utilizado técnicas de microscopía de fluorescencia temporalizada junto a un análisis *in silico* del modelo matemático que rige dicho estado de competencia.

Las células reciben múltiples señales químicas y físicas provenientes de las células vecinas y del medio en el que se encuentran. Para poder responder adecuadamente a dichas señales, éstas deben ser integradas por la red de regulación genética. La mayor parte de estas señales afectan a distintos elementos de la red celular, por lo que es necesario comprender cómo la respuesta de las redes de regulación genética a señales simultáneas depende de la localización específica de la entrada de cada señal en el circuito.

En el marco de esta Tesis hemos estudiado el efecto *in vivo* de señales multi-

dimensionales en células individuales, combinando la microscopía de fluorescencia temporalizada y un modelo matemático del circuito genético que gobierna el estado de competencia en el organismo *B. subtilis*.

La competencia genética se desencadena debido al déficit nutricional en el medio en el que habitan estas bacterias, las cuales adquieren la capacidad de incorporar ADN extracelular. Es la activación del factor de transcripción ComK lo que da lugar a la expresión de toda la maquinaria necesaria para poner en marcha el estado de competencia. Véase la Sección 3.2 del Capítulo 3, en el que se detallan algunos aspectos del desarrollo de este estado celular en *B. subtilis*.

En la Fig. 6.1 se puede ver una microcolonia de *B. subtilis* creciendo en condiciones de estrés nutricional. Mediante la fusión de los promotores P_{comG} y P_{comS} con las proteínas fluorescentes CFP y YFP (en rojo y verde en la figura, respectivamente), se puede observar la dinámica de la actividad de ambos promotores. El promotor P_{comG} es dependiente de la actividad de ComK. En este caso, se ha marcado con una flecha amarilla una célula que pasa dos veces por el estado de competencia.

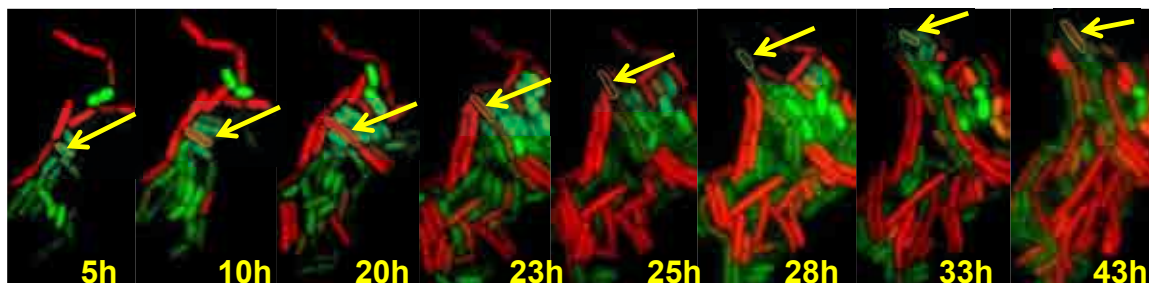


Figura 6.1: Secuencia del crecimiento de una microcolonia de *B. subtilis* bajo estrés nutricional. La flecha amarilla muestra una célula que pasa dos veces por el estado de competencia. En rojo se visualizan las células competentes que contienen una fusión del promotor P_{comG} a la proteína fluorescente CFP. Mediante la fusión del promotor P_{comS} con la proteína fluorescente YFP se observa la actividad de ComS (células en verde), que refleja el nivel de estrés al que se encuentra sometida la célula.

El comportamiento de estos promotores se monitoriza midiendo la fluorescencia media en función del tiempo. Esto se observa en la Fig. 6.2, donde se puede ver que el estado de competencia es dinámico y en forma de pulsos de activación en ComK. Dichos pulsos se pueden caracterizar de forma estadística mediante las probabilidades de iniciación, salida y reiniciación del estado de competencia.

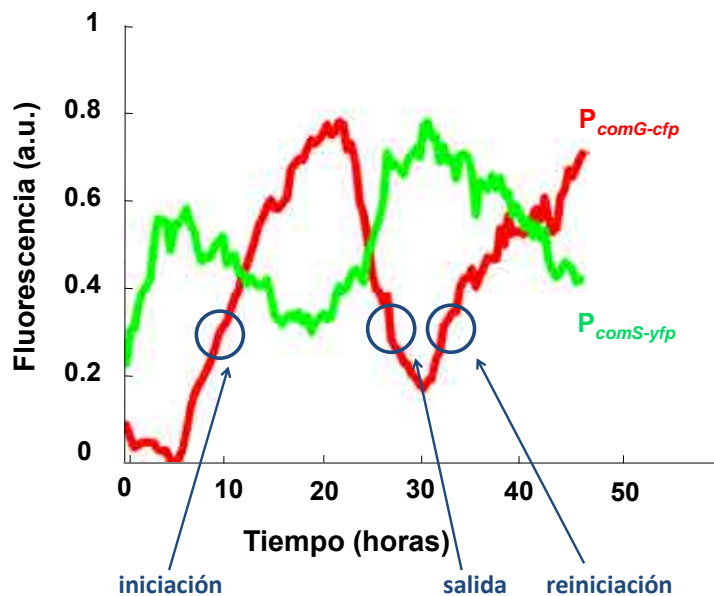


Figura 6.2: Series temporales de la actividad de los promotores P_{comG} y P_{comS} obtenidas a partir de la fluorescencia media de las proteínas CFP y YFP, respectivamente, para la célula resaltada en la Fig. 6.1.

El hecho de que el circuito genético que regula la competencia haya sido definido y ampliamente analizado lo convierte en un candidato ideal para este estudio. En la Fig. 6.3 se muestra un esquema simplificado de los componentes principales que conforman este circuito (Süel et al., 2006). La proteína reguladora de la competencia ComK activa su propia transcripción a través de un bucle positivo de alimentación, y regula negativamente la expresión del sensor de estrés ComS, el cual promueve la activación de ComK compitiendo con la proteasa MecA (Süel et al., 2006). La com-

binación de estos bucles positivo y negativo da lugar a un comportamiento excitable en forma de pulsos de ComK, lo que se denomina como eventos de competencia.

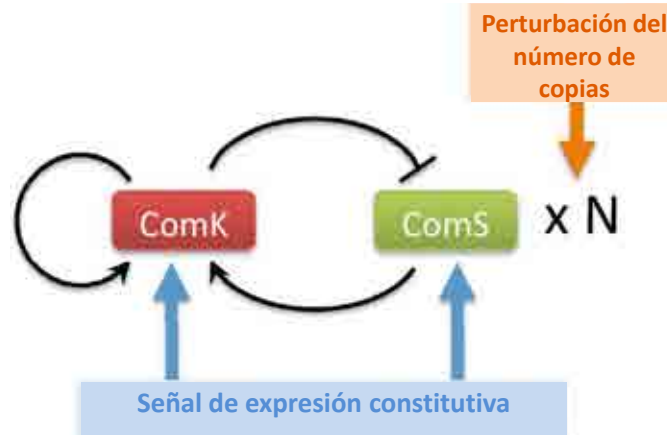


Figura 6.3: Esquema del circuito que regula el estado de competencia en *B. subtilis*. Se muestran las perturbaciones que se llevan a cabo en el presente estudio y el lugar donde se aplican en el circuito.

6.1. Perturbación del circuito de regulación de la competencia

Pretendemos caracterizar la respuesta del circuito descrito en la Fig. 6.3 a partir de parejas de perturbaciones simultáneas, dependiendo de la localización de dichas perturbaciones en el circuito. En la Fig. 6.3 se muestran ambos tipos de perturbaciones i) la expresión constitutiva de los dos componentes principales que gobiernan la competencia, y ii) la intensidad de la expresión regulada del promotor P_{comS} mediante la perturbación del número de copias.

Para controlar la expresión constitutiva de las proteínas ComK y ComS se usaron cepas que contienen copias adicionales de estos dos genes bajo el control del promotor $P_{hyperspank}$ (P_{hyp}) inducido por IPTG, que además contienen la fusión P_{comG} -*cfp*. En

la Tabla 2.4 (ver Sección 2.3.2) se detallan todas las cepas utilizadas. Se aplicaron cinco niveles de IPTG en cada caso, siendo estos 0, 3, 5, 10 y 100 μM .

En primer lugar, se debe calibrar la expresión del promotor P_{hyp} inducido con IPTG, y para ello se cuantificó la fluorescencia emitida por la cepa $P_{hyp-yfp}$ (Control- α , ver Tabla 2.4) bajo los niveles de IPTG mencionados. Para llevarlo a cabo, se analizaron células individuales en fotos tomadas a diferentes tiempos mediante códigos implementados en Matlab (para mayor detalle consultar la técnica descrita en 2.5.1). Posteriormente se comparan los niveles de fluorescencia obtenidos con el de las cepas que contienen la fusión $P_{comS-yfp}$ (cepa V10, ver Tabla 2.4) y $P_{comK-yfp}$ (cepa KG, ver Tabla 2.4) bajo las concentraciones de IPTG anteriormente mencionadas y bajo estrés (en células que no entran en competencia). Las células crecen en pads de agarosa, como se explica en la Sección 2.4.2.

En la Fig. 6.4 se muestran las curvas de calibración de la expresión de $P_{hyp-yfp}$ en función de la concentración de IPTG y respecto a la expresión de los promotores $P_{comS-yfp}$ (cepa V10) y $P_{comK-yfp}$ (cepa KG). En la Tabla 6.1 se detallan los niveles de fluorescencia obtenidos para cada concentración de IPTG.

Esto nos permite establecer la expresión constitutiva de los promotores P_{comS} y P_{comK} en función de IPTG en aumento, con respecto al máximo nivel de expresión del promotor P_{comS} y a la expresión basal del promotor P_{comK} , respectivamente. En lo siguiente se denominarán estos valores normalizados como α_k^{wt} y β_s^{wt} .

Para controlar la intensidad de expresión natural de ComS se introdujo una copia adicional del gen *comS* bajo el control de su promotor nativo en dos plásmidos con diferente número de copias. Sendos plásmidos fueron cedidos amablemente por Beth A. Lazazzera (UCLA). En primer lugar, el plásmido pHP13, cuyo número de copias está en 6 aproximadamente, tenía insertado en gen *comS* bajo la regulación de su propio promotor y en segundo lugar se insertó en el plásmido pDG148, de un número elevado de copias (superior a la veintena, y que calibraremos a continuación). Para

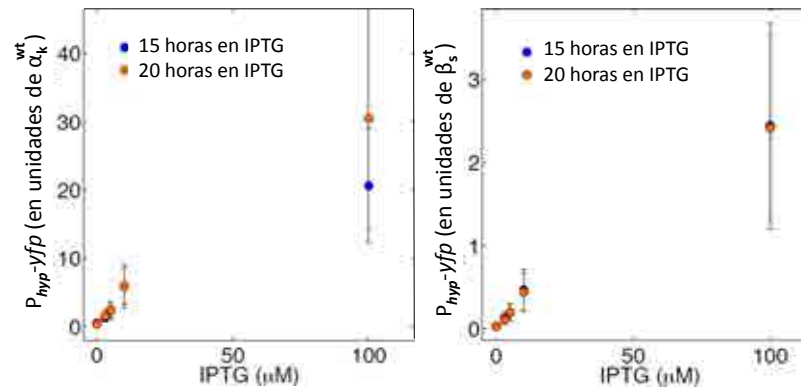


Figura 6.4: Respuesta de dosis de IPTG del promotor $P_{hyp-yfp}$. Se muestran los niveles de $P_{hyp-yfp}$ en función de la concentración de IPTG a las 15 y 20 horas de crecimiento en pads con IPTG para la calibración de $P_{comK-yfp}$ (gráfica izquierda), y a las 20 y 30 horas de crecimiento para $P_{comS-yfp}$ (gráfica derecha).

calibrar el número de copias de estos dos plásmidos se comparó la fluorescencia que emitían las células que contienen ambos plásmidos con las fusiones pHP13:: $P_{comS-cfp}$ y pDG148:: $P_{comS-cfp}$ (cepas denominadas Control- β S-6xS y Control- β S-75xS, respectivamente, ver la Tabla 2.4), con la que emiten las células que contienen una única copia de $P_{comS-cfp}$ integrada de forma cromosómica (Norm- β S, ver Tabla 2.4). Se tomaron medidas de los niveles de cfp en cada caso y se normalizaron los niveles de fluorescencia, dividiendo tiempo a tiempo las señales obtenidas para pHP13:: $P_{comS-cfp}$ y pDG148:: $P_{comS-cfp}$ en las cepas Control- β S-6xS y Control- β S-75xS por la expresión de $P_{comS-cfp}$ en la cepa Norm- β S. La Fig. 6.5 muestra en negro y rojo (línea continua) las series temporales obtenidas después de la normalización de las cepas Control- β S6xS y Control- β S75xS, respectivamente. Las líneas discontinuas, siguiendo con la relación de colores anterior, representan el promedio a tiempos largos de dichas medidas normalizadas. La cuantificación de la expresión media en el tiempo nos permite establecer el número de copias de los plásmidos pHP13:: $P_{comS-cfp}$ y pDG148:: $P_{comS-cfp}$, en aproximadamente 6.5 y 75, respectivamente. De esta forma seremos capaces de aplicar tres valores de niveles de expresión máxima del promo-

Tabla 6.1: Fluorescencia obtenida para las cepas control bajo las concentraciones de IPTG 0, 3, 5 10 y 100 μM of IPTG a las 15, 20 y 30 horas. SEM = *standard error of the mean*. n = número de células analizadas.

Fluorescencia de cepas control (arb. units)									
Cepa	15 h	SEM	n	20 h	SEM	n	30 h	SEM.	n
V10	79.70	43.80	155	57.74	26.50	252	57.98	25.19	102
KG	6.12	1.99	77	4.63	2.25	52	-	-	-
Control-α 0μM IPTG	3.14	0.87	118	1.79	0.81	107	1.56	0.79	48
Control-α 3μM IPTG	8.32	1.94	160	7.22	1.87	251	6.27	1.70	86
Control-α 5μM IPTG	14.39	4.34	207	11.15	2.81	131	11.44	3.47	55
Control-α 10μM IPTG	36.31	10.98	217	27.14	6.96	203	25.69	6.82	73
Control-α 100μM IPTG	126.30	30.14	214	141.13	31.16	250	139.93	23.25	96

tor P_{comS} respecto del nivel basal de expresión que denominaremos en lo que sigue β_s/β_s^{wt} .

A continuación se transformaron los plásmidos que contenían la copia extra de *comS*, pHP13:: $P_{comS-comS}$ y pDG148:: $P_{comS-comS}$ en las cepas que contienen la fusión del promotor inducible por IPTG P_{hyp} y los genes *comK* y *comS*, para generar de esta forma las cepas Hyper- $\alpha\text{K-6xS}$ y Hyper- $\alpha\text{K-75xS}$, respectivamente (ver Tabla 2.4). Esto nos permite variar estas dos entradas en el circuito de forma simultánea e independiente.

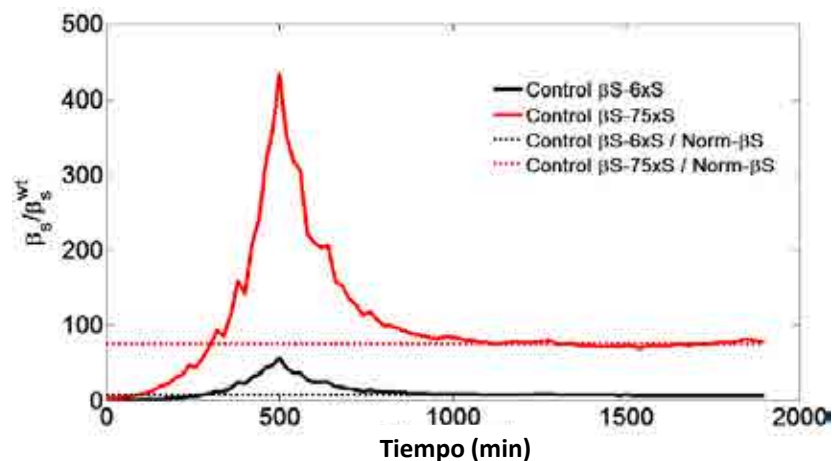


Figura 6.5: Calibración de la actividad del promotor P_{comS} . Las líneas continuas representan las series temporales de las cepas Control- β S-6xS ($n=10$, negro) y Control- β S-75xS ($n=15$, rojo), respectivamente, normalizadas por la cepa de copia única Norm- β S ($n=10$). Las líneas punteadas representan a tiempos largos los valores medios de estas series normalizadas, los cuales son 6.46 y 74.97 para los plásmidos pHP13:: P_{comS} -*cfp* y pDG148:: P_{comS} -*cfp*, respectivamente.

6.2. Caracterización estadística de los eventos de competencia

El microorganismo *B. subtilis* entra en el estado de competencia de una forma probabilística, con una frecuencia de menos del 10% de células en una colonia que se encuentra bajo condiciones de estrés. Este comportamiento puede ser caracterizado de forma estadística si se cuantifica la probabilidad de los eventos asociados con los pulsos de ComK, como son la iniciación, salida y reiniciación del estado de competencia después de una ventana de tiempo determinada, tras la salida de este estado. Esto queda reflejado en la Fig. 6.2, donde se han marcado las tres posibles probabilidades a tener en cuenta. Se evaluaron estas probabilidades aplicando la combinación de dos entradas al circuito de las que se describen anteriormente.

Para el cálculo de la probabilidad de iniciación de la competencia (P_{init}) se tienen en cuenta el número de eventos de iniciación ocurridos en un cierto intervalo de tiempo, dividido por el número total de divisiones que ocurren en dicha ventana de tiempo (utilizando la técnica descrita en 2.5.2). El intervalo de tiempo sobre el que se toma la medida se escoge como aquel en el que la expresión del promotor P_{comS} aumenta de forma monótona, lo que indica que la colonia está creciendo en condiciones de estrés adecuadas. En nuestro caso, esto supone una ventana temporal de ~ 140 -150 minutos.

La probabilidad de salida del estado de competencia (P_{exit}) se calcula como la fracción de células competentes que salen de este estado con éxito. Finalmente, la probabilidad de reiniciación (P_{reini}) se define como la probabilidad de que una célula, después de salir del estado competente, vuelva a este estado después de un período de tiempo determinado, que en este caso se considera igual a dos ciclos celulares. En las Tablas 6.2, 6.3 y 6.4 se resume la estadística experimental obtenida para las tres probabilidades, calculadas para todas las combinaciones de pares de perturbaciones de β_s y α_s (Tablas en las páginas 118, 119 y 120).

La Fig. 6.6 muestra la caracterización experimental de la respuesta integrada del circuito a los pares de perturbaciones simultáneas descritas anteriormente. En la fila superior se muestran los resultados para la integración de la expresión constitutiva de ComS, α_s , con el número de copias del gen natural β_s , mientras que en la fila inferior se muestra este último junto a la variación de la expresión constitutiva de ComK, α_k . La figura muestra los tres observables P_{init} , P_{exit} y P_{reini} y la diferente respuesta según el par de perturbaciones aplicadas al circuito.

En el caso de α_s/β_s (columna izquierda), la probabilidad de iniciación es pequeña para todos los valores de α_s , con un pequeño incremento causado por β_s (Fig. 6.6A). Para valores crecientes de α_k , la probabilidad de iniciación aumenta hasta un 100 %, pero se observa que el incremento es suave en valores de β_s pequeños, siendo más acusado y ocurriendo antes en valores elevados de β_s (Fig. 6.6D). La probabilidad

de salida (columna central) de la competencia genética por otro lado, decrece abruptamente en todos los casos observados a medida que aumentan los niveles de α_k (Fig. 6.6E), mientras que el decrecimiento en P_{exit} es gradual con respecto a α_s (Fig. 6.6B). Finalmente, la probabilidad de reiniciación (última columna) es sólo diferente de cero para valores pequeños de β_s y valores intermedios de α_k (Fig. 6.6F), manteniéndose cero cuando aumenta α_s (Fig. 6.6D)

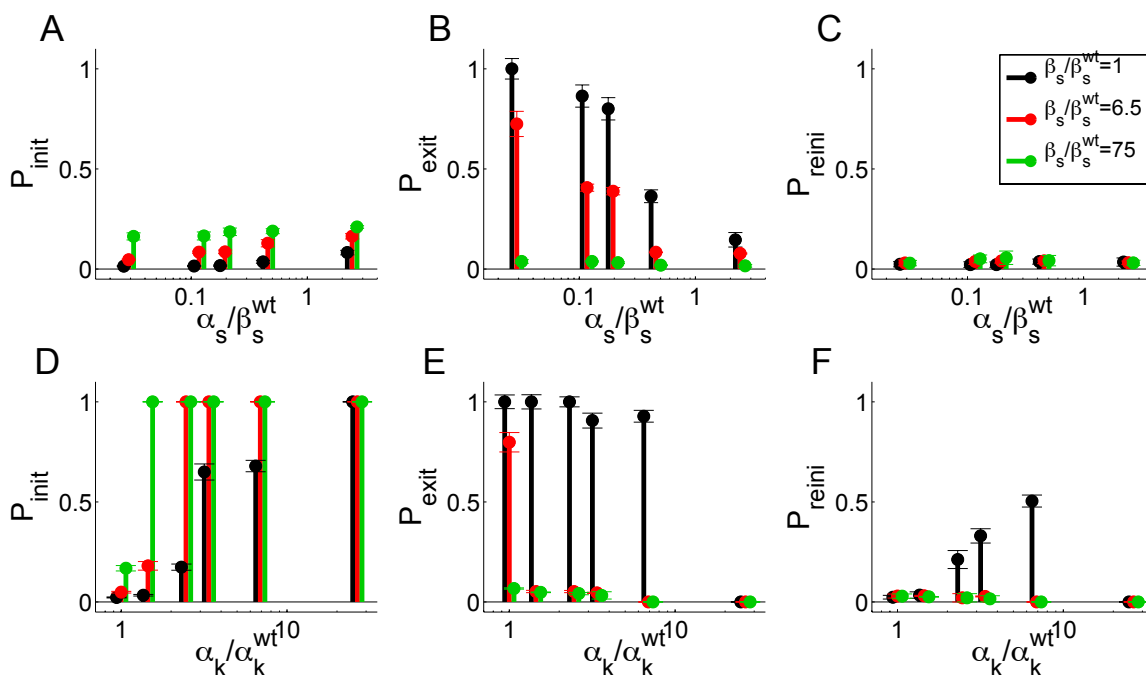


Figura 6.6: Análisis experimental de las propiedades estadísticas del estado de competencia, en presencia de los dos pares de perturbaciones descritas en el texto. En las filas superior e inferior se varía la expresión constitutiva de *comS* y *comK*, respectivamente. En ambos casos se estudian tres valores del número de copias gen natural *comS*: 1 (negro), 6.5 (rojo) y 75 (verde). Las barras de error representan la desviación estándar de la media en las diferentes películas analizadas.

Tabla 6.2: Probabilidad de iniciación para todas las perturbaciones. wt = *wild type*. SEM = *standard error of the mean*. n = Fracción de eventos de competencia dividido respecto al número total de divisiones. NA = no aplicable, todas las células entran en competencia.

Probabilidad de iniciación variando α_s									
IPTG (μM)	$\beta_s = 1$ n	prob. (%)	SEM	$\beta_s=6.5$ n	prob. (%)	SEM	$\beta_s=75$ n	prob. (%)	SEM
wt	11/534	2.26	0.26	38/781	4.90	0.42	243/1485	16.86	1.35
0	12/838	1.46	0.24	16/337	4.66	0.30	126/745	16.32	1.76
3	10/637	1.52	0.13	52/591	8.45	0.53	38/231	16.53	2.00
5	14/801	1.72	0.30	54/602	8.61	0.89	94/538	18.61	1.86
10	24/592	3.61	0.72	31/213	12.91	1.81	88/431	18.94	1.27
100	71/891	8.24	1.14	94/119	16.38	1.33	84/444	21.02	0.68
Probabilidad de iniciación variando α_k									
IPTG (μM)	$\beta_s = 1$ n	prob. (%)	SEM	$\beta_s=6.5$ n	prob. (%)	SEM	$\beta_s=75$ n	prob. (%)	SEM
wt	11/534	2.26	0.26	38/781	4.90	0.42	243/1485	16.86	1.35
0	12/388	3.37	0.39	46/243	18.05	2.17	NA	100.00	NA
3	95/546	17.39	1.56	175/329	54.36	3.67	NA	100.00	NA
5	464/695	64.95	4.03	NA	100.00	NA	NA	100.00	NA
10	131/193	67.90	2.86	NA	100.00	NA	NA	100.00	NA
100	NA	100.00	NA	NA	100.00	NA	NA	100.00	NA

Tabla 6.3: Probabilidad de salida para todas las perturbaciones. wt = *wild type*. SEM = *standard error of the mean*. n = fracción de células competentes que salen con éxito del estado competente respecto al número total de eventos. NA = no aplicable, las células no salen de la competencia.

Probabilidad de salida variando α_s									
IPTG (μM)	$\beta_s = 1$ n	prob. (%)	SEM	$\beta_s=6.5$ n	prob. (%)	SEM	$\beta_s=75$ n	prob. (%)	SEM
wt	88/147	61.12	3.41	57/122	48.77	4.86	12/287	4.12	0.32
0	21/35	61.21	5.11	51/596	44.29	6.30	14/596	2.34	0.94
3	13/25	52.80	5.53	31/123	24.84	1.79	9/365	2.32	0.30
5	27/54	48.91	5.56	76/326	23.77	1.83	7/353	1.96	0.43
10	17/76	22.24	3.21	3/59	5.13	0.13	8/660	1.20	0.23
100	17/220	8.93	3.62	25/525	4.77	0.27	4/429	0.99	0.71
Probabilidad de salida variando α_k									
IPTG (μM)	$\beta_s = 1$ n	prob. (%)	SEM	$\beta_s=6.5$ n	prob. (%)	SEM	$\beta_s=75$ n	prob. (%)	SEM
wt	88/147	61.12	3.41	57/122	48.77	4.86	12/287	4.12	0.32
0	16/26	62.14	3.54	12/380	3.19	0.57	10/340	2.95	0.17
3	45/74	61.55	2.49	13/405	3.18	0.54	9/360	2.56	0.56
5	63/115	55.39	3.72	12/435	2.79	0.29	7/350	2.01	1.84
10	58/103	56.71	2.95	NA	0.00	NA	NA	0.00	NA
100	NA	0.00	NA	NA	0.00	NA	NA	0.00	NA

Tabla 6.4: Probabilidad de reiniciación para todas las cepas. wt = *wild type*. SEM = *standard error of the mean*. n= fracción de células que tras salir del estado competente vuelven a dicho estado dividido por dos ciclos celulares, respecto al número total de eventos de competencia observados. NA = no aplicable, las células no reinician la competencia.

Probabilidad de reiniciación variando α_s									
IPTG (μM)	$\beta_s = 1$ n	prob. (%)	SEM	$\beta_s=6.5$ n	prob. (%)	SEM	$\beta_s=75$ n	prob. (%)	SEM
wt	6/213	2.38	0.92	9/240	2.96	1.01	8/192	2.93	1.09
0	3/87	2.43	1.31	6/193	3.09	1.46	5/127	2.97	1.33
3	2/64	2.23	1.41	8/207	3.80	1.46	4/96	5.11	1.94
5	2/101	2.22	1.36	12/299	4.05	1.03	3/96	5.65	3.35
10	4/90	3.75	1.27	4/67	4.13	1.40	2/60	4.22	2.59
100	3/93	3.54	2.04	13/360	3.18	0.85	3/84	3.11	1.30
Probabilidad de reiniciación variando α_k									
IPTG (μM)	$\beta_s = 1$ n	prob. (%)	SEM	$\beta_s=6.5$ n	prob. (%)	SEM	$\beta_s=75$ n	prob. (%)	SEM
wt	6/213	2.38	0.92	9/240	2.96	1.01	8/192	2.93	1.09
0	7/121	3.47	1.58	2/66	3.06	0.28	2/78	2.57	0.07
3	15/75	21.20	4.49	1/52	2.08	2.08	1/42	2.08	2.08
5	84/262	33.02	3.59	2/73	2.77	0.27	1/62	1.56	1.56
10	69/142	50.43	2.99	NA	0.00	NA	NA	0.00	NA
100	NA	0.00	NA	NA	0.00	NA	NA	0.00	NA

6.3. Caracterización dinámica de los eventos de competencia

Los resultados mostrados en la Sección anterior, se pueden interpretar en términos de distintos comportamientos dinámicos. Una baja probabilidad de iniciación, junto a una elevada probabilidad de salida y no reiniciación, como es el caso para valores bajos de α_s y β_s (Fig. 6.6A) y α_k y β_s (Fig. 6.6C) se corresponden al régimen excitable identificado por Süel et al. (2006). Desde esta perspectiva, un decrecimiento en la probabilidad de salida como el que ocurre para valores altos de α_s (Fig. 6.6B), se corresponde con el estado excitable volviéndose estable, con lo cual el sistema alcanzaría un comportamiento biestable.

Por otro lado, si la probabilidad de salida se vuelve muy pequeña y la probabilidad de inicio se incrementa considerablemente (Fig. 6.6D), el sistema se vuelve monoestable, y el estado de competencia pasa ser el único estado estable del circuito.

Por otro lado, una probabilidad de reiniciación no nula es indicativo de un comportamiento oscilatorio, lo cual ocurre para valores intermedios de α_k y valores bajos de β_s (Fig. 6.6F)

En la Tabla 6.5 se puede ver un resumen del criterio de clasificación adoptado.

Tabla 6.5: Clasificación dinámica de los regímenes de competencia

	P_{init}	P_{exit}	P_{reini}
Oscilaciones	bajo-med	alto	alto
Excitabilidad	bajo-med	alto	bajo
Biestabilidad (estacionario)	bajo-med	bajo	N/A
Biestabilidad (<i>switching</i>)	alto	alto	N/A
Monoestabilidad	alto	bajo	N/A

Utilizando este criterio se han representado las diferentes dinámicas que se obtienen al perturbar el sistema. Esto se muestra en la Fig. 6.7, en la que se pueden ver los diferentes regímenes experimentales obtenidos representados mediante símbolos. El color y la forma codifican el estado dinámico; los círculos verdes representan el comportamiento *wild-type* excitable definido en Süel et al. (2006). Los cuadros azules corresponden a biestabilidad entre los estados vegetativo y competente. Los triángulos negros denotan un comportamiento monoestable en el que la competencia es el único estado posible, o el estado vegetativo para casos con β_s bajo. Finalmente, los diamantes rojos representan un comportamiento oscilatorio. Concretamente, en la figura los símbolos y líneas representan:

- Los círculos verdes corresponden a dinámicas excitables (definidas aquí por $P_{\text{init}} < 0,5$ y $P_{\text{exit}} > 0,85$).
- Los cuadros azules representan comportamiento biestable ($P_{\text{exit}} < 0,85$ si $P_{\text{init}} < 0,5$) donde una fracción de células vuelven a la competencia y permanecen así, lo que es representativo de la heterogeneidad entre dos estados estables; o por el contrario, la mayoría de las células entran en competencia y salen después de un tiempo fijo, lo que es representativo de un *switch* temporal entre dos estados estables ($P_{\text{exit}} > 0,85$ si $0,5 < P_{\text{init}} < 0,95$).
- Los triángulos negros corresponden a monoestable en competencia ($P_{\text{init}} > 0,5$ y $P_{\text{exit}} < 0,1$), y los diamantes rojos a una dinámica oscilatoria ($P_{\text{reini}} > 0,1$).
- Las líneas representan las bifurcaciones del modelo matemático del circuito de competencia, simulado con el programa de continuación numérica AUTO a través de XPP. Las líneas sólidas representan bifurcaciones de silla-nodo y las líneas punteadas bifurcaciones de Hopf. Los símbolos y líneas son los mismos para las tres columnas, las cuales difieren en las cantidades graficadas en gris y que corresponden con las medidas estadísticas descritas en la Sección anterior,

P_{init} , P_{exit} y P_{reini} . Estos cuantificadores se obtienen de las simulaciones discretas del circuito: P_{init} (A,D), P_{exit} (B,E), y P_{reini} (C,F).

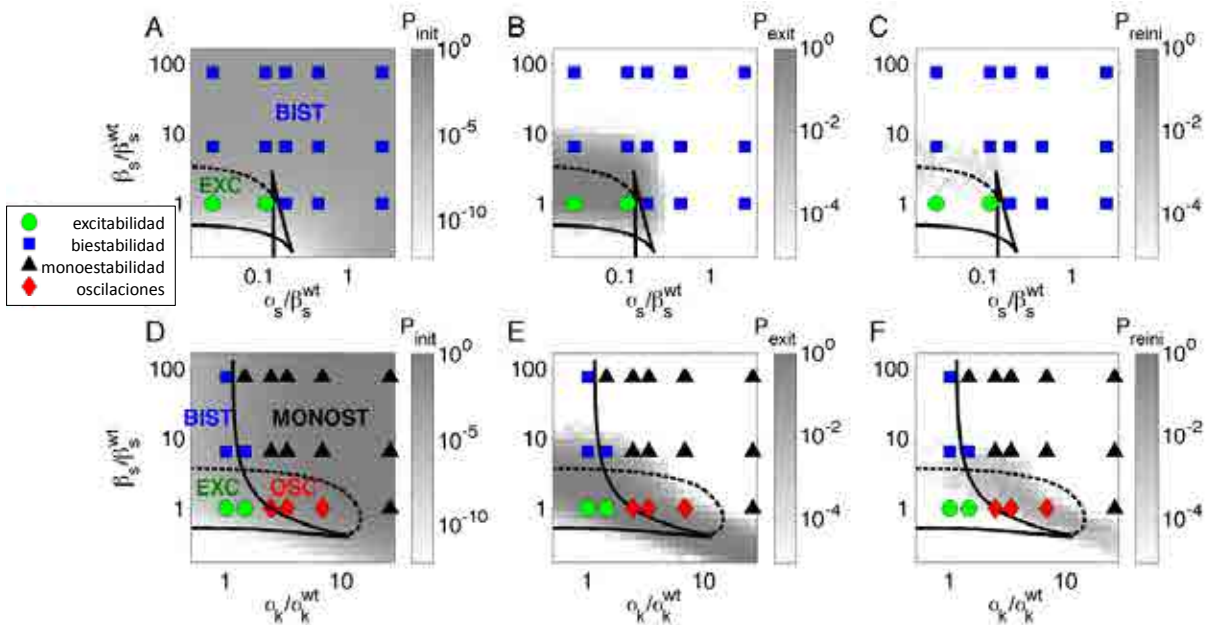


Figura 6.7: Diagramas de fase del circuito de la competencia. La fila superior corresponde a la variación constitutiva de la expresión de ComS, α_s , y del número de copias de ComS, β_s , mientras que la fila inferior representa la expresión constitutiva de ComK, α_k , que se varía junto a β_s . El significado de los símbolos, líneas y del mapa de color se describe en el texto. Los parámetros del modelo determinista son $\alpha_k^{wt} = 0,00035$, $\beta_k = 0,25$, $\alpha_s^{wt} = 0$, $\beta_s^{wt} = 3$, $k_k = 0,2$, $k_s = 0,0625$, $\delta_k = \delta_s = 0,1$, $n = 2$, y $p = 5$. Los parámetros del modelo estocástico se dan en el texto.

Los resultados obtenidos revelan diferentes formas de integración de señales en cada caso. Cuando se varía la expresión constitutiva del mismo gen *comS* del que se perturba el número de copias (Fig. 6.7A), no aparecen nuevos regímenes dinámicos respecto al caso de perturbaciones por separado: en ambos casos el aumento independiente de las dos señales hace que la dinámica celular cambie de excitable a biestable, y lo mismo ocurre cuando las dos entradas se varían conjuntamente.

Cuando el control de la expresión constitutiva es aplicado al gen *comK* (Fig. 6.7D), el comportamiento es diferente para la introducción de dos señales independientes. Mientras que el aumento del número de copias del gen *comS* da lugar a una transición desde un estado excitable hacia uno biestable, el incremento de la expresión constitutiva del gen *comK* genera un comportamiento oscilatorio y una competencia monoestable para niveles de inducción con IPTG elevados. Estos casos son diferentes al caso de una variación conjunta de la dos señales, ya que las oscilaciones y la biestabilidad son casi inexistentes y el sistema en la mayoría de los casos pasa directamente de excitable a monoestable.

Con el objetivo de comprender las diferentes respuestas del circuito para cada par de perturbación experimental de la Fig. 6.7, se analiza este efecto en el modelo matemático previamente establecido por Süel et al. (2006), en el que además se ha podido analizar anteriormente el efecto de perturbaciones únicas e independientes (Süel et al., 2007). El modelo se describe mediante dos ecuaciones diferenciales acopladas:

$$\frac{dK}{dt} = \alpha_k + \frac{\beta_k K^n}{k_k^n + K^n} - \frac{K}{1 + K + S} - \delta_k K \quad (6.1)$$

$$\frac{dS}{dt} = \alpha_s + \frac{\beta_s}{1 + (K/k_s)^p} - \frac{S}{1 + K + S} - \delta_s S \quad (6.2)$$

donde K y S representan la concentración de ComK y ComS en la célula, respectivamente. Los parámetros α_k , α_s , y β_s tienen el mismo significado que el dado en la Sección 4.2 del Capítulo 4, mientras que β_k representa la intensidad máxima de la expresión regulada de ComK. El modelo incluye términos de relajación no lineal correspondientes a la degradación de ComK y ComS por parte de la proteína MecA (Süel et al., 2006).

Para establecer los regímenes dinámicos se realizó un análisis de los diferentes puntos fijos que exhibe el par de ecuaciones anteriormente descritas. Los diferentes regímenes están separados por puntos de bifurcación (Garcia-Ojalvo, 2011), los cuales se pueden trazar en espacios de parámetros de dos dimensiones. Este análisis nos

permite establecer diferentes regiones separadas por líneas de bifurcación. Las líneas sólidas de la Fig. 6.7 denotan bifurcaciones silla-nodo, en las cuales un punto fijo inestable y otro estable colisionan y se destruyen mutuamente. Las líneas discontinuas corresponden a bifurcaciones de Hopf, en la que aparecen oscilaciones estables (García-Ojalvo, 2011). Los símbolos correspondientes a las medidas experimentales concuerdan bastante con los resultados teóricos obtenidos.

En la fila superior de la Fig. 6.7 se puede ver que cuando α_s y β_s se varían simultáneamente la dinámica de excitable a biestable es la misma que se observa cuando se varían por separado, concretamente, si una de ellas es pequeña, ya que si es elevada el circuito es siempre biestable. Podemos decir por lo tanto, que en este caso la combinación de las señales no altera el comportamiento del circuito.

En la fila inferior de la Fig. 6.7 donde las perturbaciones se aplican en α_k y β_s , se puede ver que los datos experimentales se ajustan de igual forma satisfactoriamente a los resultados teóricos. Un incremento de cada una de las entradas por separado da lugar a diferentes regímenes dinámicos, biestable para un incremento de β_s (igual al caso anterior), mientras que para un incremento en α_k se observa un régimen oscilatorio. Esta respuesta es diferente si ambas perturbaciones se producen de forma simultánea, en cuyo caso se produce una transición directa de un régimen excitable a uno monoestable.

La concordancia entre los resultados experimentales y teóricos dependen en cierta manera del criterio establecido para clasificar el comportamiento dinámico de las medidas de probabilidad determinadas experimentalmente. La modificación de los criterios utilizados no cambian los resultados obtenidos de forma cualitativa, aunque afectan algunas de las asignaciones dinámicas, especialmente aquellas que se encuentran cercanas a las líneas de bifurcación. Esto último es algo de esperar, debido a la existencia de ruido bioquímico, que hace que los límites definidos por las líneas de bifurcación se suavicen. Para poder determinar la importancia de este efecto, se realizaron simulaciones discretas de las reacciones que tienen lugar en el circuito genético

que regula el estado de competencia. En la Fig. 6.7 se puede ver un mapa de color (en escala de grises) que representa los valores simulados para las tres probabilidades determinadas anteriormente de forma experimental, P_{init} (A,D), P_{exit} (B,E), y P_{reini} (C,F). Las reacciones simuladas se detallan en la página 127.

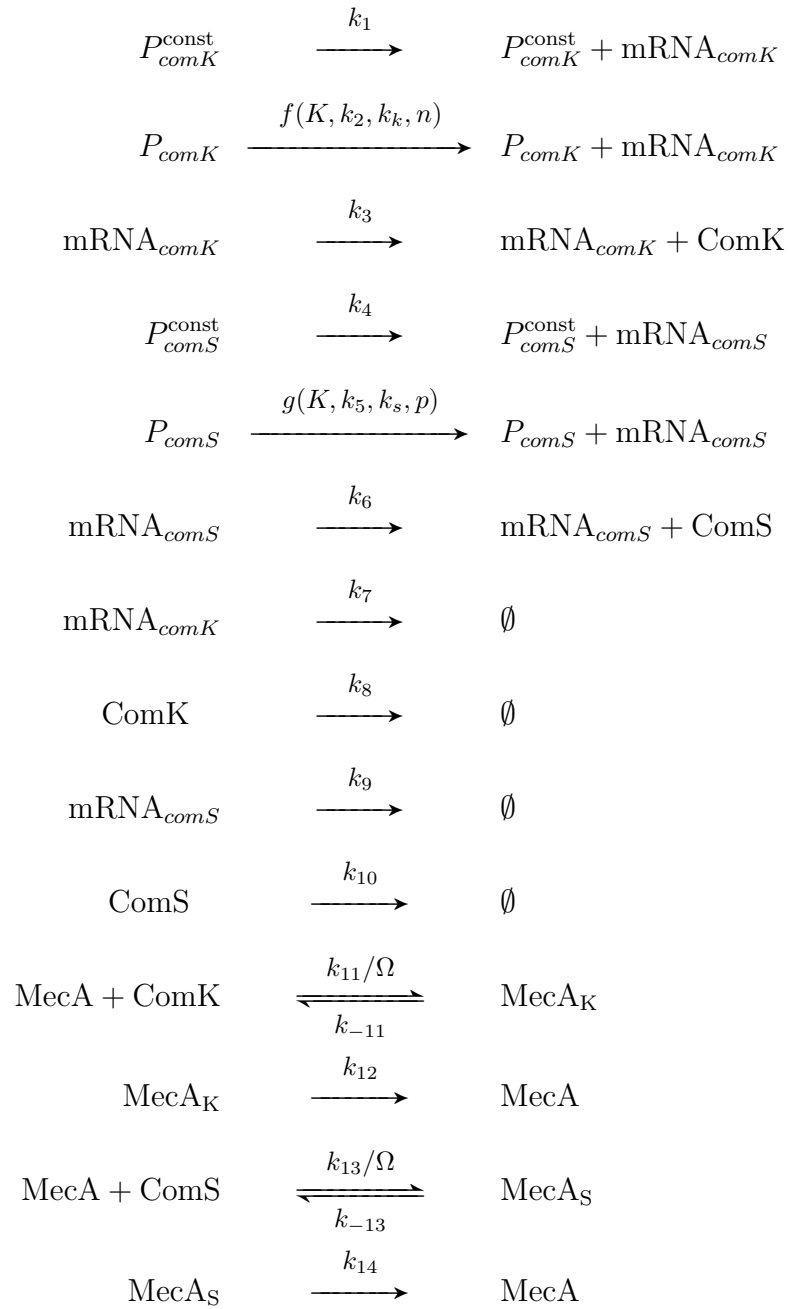
Las simulaciones discretas del circuito de la competencia se realizaron utilizando el método de la primera reacción de Gillespie (Gillespie, 1977). En estas reacciones P_i^{const} y P_i son los promotores constitutivos regulados de sus correspondientes genes, k_i son los ritmos de reacción, y Ω representa un factor de volumen el cual se toma como 1 molec/nM (Gillespie, 1977). La regulación transcripcional de ComK y ComS se representa por las siguientes funciones de Hill:

$$f(K, k_2, k_k, n) = \frac{k_2(K/\Omega)^n}{k_k^n + (K/\Omega)^n}, \quad g(K, k_5, k_s, p) = \frac{k_5}{1 + (K/(\Omega k_s))^p}$$

donde K y S son el número de moléculas de ComK y ComS, respectivamente, y k_k (k_s) representa la concentración de ComK para la que la activación de ComK (represión de ComS) es la mitad del máximo. El número de moléculas de MecA se conserva y se asume igual a 1000 moléculas. Los valores de los parámetros de este modelo estocástico se detallan en la Tabla 6.6.

Tabla 6.6: Parámetros del modelo estocástico.

k_1	$6,25 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$	k_7	$0,005 \text{ s}^{-1}$	k_{12}	$0,025 \text{ s}^{-1}$
k_2	$0,15625 \text{ s}^{-1}$	k_8	$0,0001 \text{ s}^{-1}$	k_{13}	$3,5 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$
k_3	$0,2 \text{ s}^{-1}$	k_9	$0,005 \text{ s}^{-1}$	k_{-13}	$5 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$
k_4	$0,0 \text{ s}^{-1}$	k_{10}	$0,0001 \text{ s}^{-1}$	k_{14}	$2 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$
k_5	$0,00025 \text{ s}^{-1}$	k_{11}	$1,02 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$	k_k	5000 molec
k_6	$0,2 \text{ s}^{-1}$	k_{-11}	$0,0005 \text{ s}^{-1}$	k_s	1562,5 molec



Los resultados obtenidos muestran que las probabilidades P_{init} (A,D), P_{exit} (B,E), y

P_{reini} (C,F), varían de forma relativamente suave a través de las líneas de bifurcación, y una modificación en el umbral de las probabilidades dado provocaría un cambio en la clasificación de los regímenes dinámicos obtenidos, de la misma forma que ocurriría en los resultados experimentales. De todos modos podemos decir que el resultado obtenido a nivel cualitativo, ofrece una explicación a las diferentes respuestas que da el circuito a cada uno de los pares de perturbaciones aplicadas.

6.4. Consecuencias fenotípicas de la respuesta integrada

Se pueden observar diversas consecuencias biológicas como respuesta a las diferentes perturbaciones aplicadas al circuito que regula la competencia biológica en *B. subtilis*. En la Fig. 6.8 se muestra la dinámica a nivel de células individuales para cuatro combinaciones de cada uno de los pares de perturbaciones, a las que se ha sometido en este estudio al circuito que regula la competencia, concretamente en las dos filas superiores α_s/β_s , y en las dos filas inferiores α_k/β_s .

En ambos casos el número de copias del gen *comS* crece de abajo hacia arriba, y la expresión constitutiva se incrementa de izquierda a derecha. Como se puede ver en cada panel, la gráfica que se encuentra a la izquierda representa las series temporales de células individuales, alineadas de forma que se pueda observar el inicio del estado de competencia simultáneamente para todas las series temporales. Además, se puede ver todos los comportamientos dinámicos encontrados en cada caso, representados con el código de color anteriormente utilizado, es decir, verde para la excitabilidad, azul para la biestabilidad, rojo para el comportamiento oscilatorio y negro para la dinámica monoestable.

En el caso de la dinámica biestable, se pueden ver dos tipos de comportamientos en las series temporales. Algunas células no entran en dicho estado y otras células

expresan ComK durante más de 40 horas. En cada caso se incluye un histograma en rojo para el nivel de CFP cuantificado en el momento en que la colonia celular muestra su comportamiento típico para cada dinámica. Estos histogramas revelan en el régimen biestable la bimodalidad existente (paneles A, B, D y E). Esto último contrasta con lo observado en los paneles C y G, en los cuales para el régimen excitable se observa una débil bimodalidad coherente con la baja probabilidad de entrada en competencia en las células *wild-type*.

Para que el estado de competencia sea funcional, las células deben no solamente activar la expresión de ComK, si no que se debe inactivar eventualmente, ya que las células que no dejan de expresar ComK acaban muriendo en dicho estado sin dividirse y sin pasar ninguna ventaja (debido a potenciales cambios en el ADN cromosómico resultantes de la integración de ADN exógeno) a su progenie. Se puede decir de esta forma, que la biestabilidad y la monoestabilidad (panel F), eliminan la competencia funcional. Por el contrario, en el caso del régimen oscilatorio (panel H), las células son capaces de volver al estado vegetativo y dividirse antes de activar la expresión de ComK nuevamente, por lo que en dicho régimen la competencia sigue siendo funcional desde el punto de vista biológicos.

La competencia genética, además de las ventajas que confiere a las células mediante la incorporación de ADN extracelular, retrasa la entrada en el estado de esporulación, el cual es la respuesta al estrés en donde la célula forma una spora hasta que las condiciones externas mejoran lo suficiente como para germinar y volver al estado vegetativo (ver Capítulo 3, Sección 3.2 en la página 70). La expresión de ComK inhibe la esporulación (Kuchina et al., 2011), y en el caso de los regímenes oscilatorio y excitable, mientras se expresa de forma transitoria ComK, la esporulación se retrasa pero no es eliminada. De la misma manera ocurre en el caso de la biestabilidad, ya que una subpoblación celular no expresa ComK y mantiene la capacidad de esporular. La presencia de esporas en estos tres regímenes se puede ver en las imágenes de microcolonias de la Fig. 6.8.

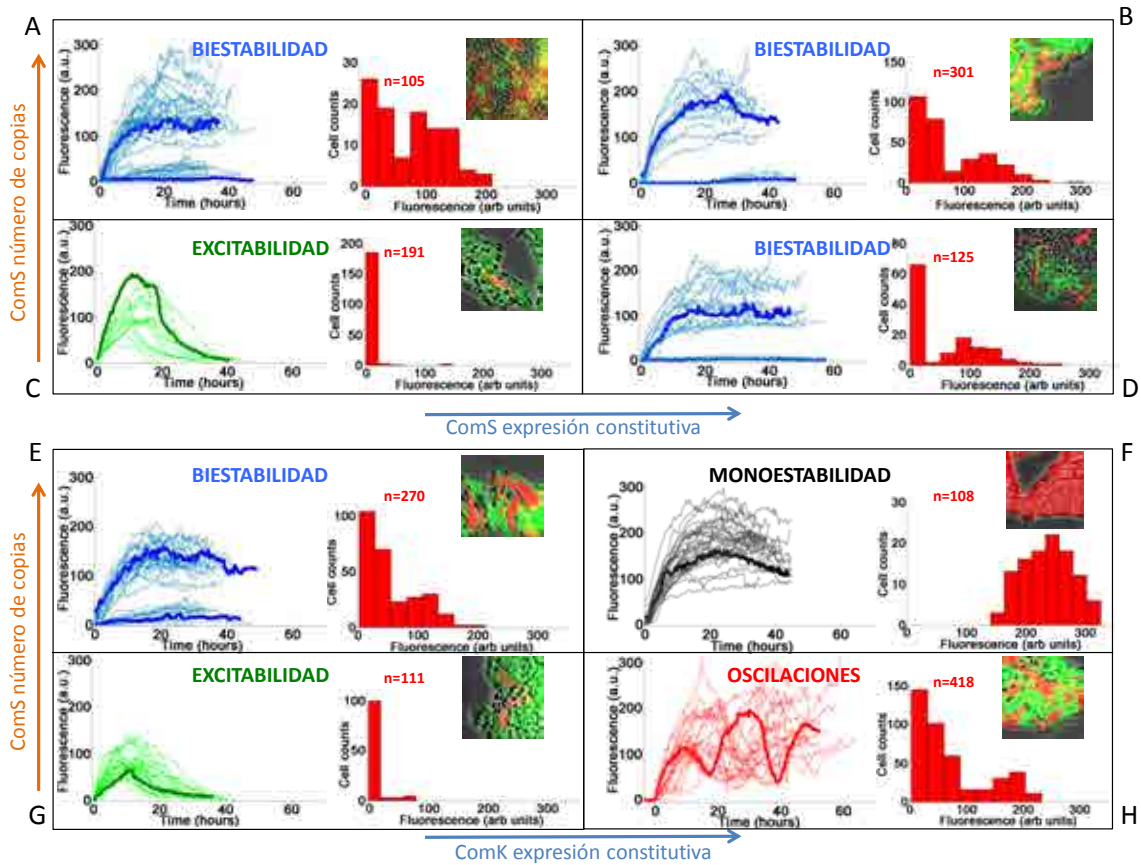


Figura 6.8: Fenotipos dinámicos tras la perturbación del circuito. Los cuatro paneles superiores corresponden a la variación conjunta del número de copias de *comS* (incremento vertical hacia la derecha) y en la expresión constitutiva de ComS (incremento horizontal hacia la derecha): **A**, $\alpha_s/\beta_s^{wt} = 0,03$, $\beta_s/\beta_s^{wt} = 75$, **B**, $\alpha_s/\beta_s^{wt} = 0,45$, $\beta_s/\beta_s^{wt} = 75$, **C**, $\alpha_s/\beta_s^{wt} = 0,03$, $\beta_s/\beta_s^{wt} = 1$, y **D**, $\alpha_s/\beta_s^{wt} = 0,45$, $\beta_s/\beta_s^{wt} = 1$. Los cuatro paneles inferiores corresponden a la variación conjunta del número de copias de *comS* (incremento vertical hacia la derecha) y la expresión constitutiva de ComS (incremento horizontal hacia la derecha): **E**, $\alpha_k/\alpha_k^{wt} = 1$, $\beta_s/\beta_s^{wt} = 75$, **F**, $\alpha_k/\alpha_k^{wt} = 3,2$, $\beta_s/\beta_s^{wt} = 75$, **G**, $\alpha_k/\alpha_k^{wt} = 1$, $\beta_s/\beta_s^{wt} = 1$, y **H**, $\alpha_k/\alpha_k^{wt} = 3,2$, $\beta_s/\beta_s^{wt} = 1$. En cada panel las gráficas de la izquierda representan las series temporales de células individuales de CFP bajo el control de P_{comG} . El código de colores se corresponde al utilizado en la Fig. 6.7, donde una serie temporal típica se ha resaltado. A la derecha se muestra un histograma de los niveles de CFP en un momento característico de cada régimen, además de una imagen típica de una microcolonia.

En el caso del comportamiento monoestable, todas las células expresan ComK de forma permanente como se puede ver en las series temporales y el histograma en el panel F. Las células son por tanto incapaces de esporular.

6.5. Discusión

Diversos efectos fisiológicos de la dinámica de circuitos genéticos en células de mamífero han sido reportados (Ashall et al., 2009; Batchelor et al., 2011; Purvis et al., 2012). En nuestro caso, el estudio de un fenómeno dinámico en la forma de activación transitoria de un programa de diferenciación celular, nos permite definir observables que no dependen de factores arbitrarios que se asocian al proceso de medición, como podría ser el seguimiento de proteínas fluorescentes a nivel de células individuales. La señal se normaliza respecto a cepas de referencia, lo que nos permite una comparación objetiva con el modelo teórico del circuito que regula la competencia, para comprender mejor la respuesta bacteriana al estrés.

Los resultados obtenidos muestran que las consecuencias fenotípicas varían dependiendo de la naturaleza de las perturbaciones que actúan sobre el circuito genético que regula el estado de competencia en *B. subtilis*. En el caso de las dos perturbaciones actuando sobre el mismo elemento del circuito, como es el caso de ComS en el panel izquierdo de la Fig. 6.9, el resultado de la eliminación de una competencia efectiva mediante la biestabilidad (sin ningún efecto en la esporulación), no es diferente del efecto de cada perturbación actuando independientemente.

Por otro lado, cuando ambas perturbaciones actúan sobre distintos elementos del circuito, i.e. ComS y ComK, como es el caso del panel derecho, la respuesta obtenida es muy diferente funcionalmente a cuando las perturbaciones se aplican de forma independiente. Mientras que ninguna entrada actuando de forma aislada impide la esporulación y el crecimiento vegetativo, en combinación se eliminan estos dos últimos

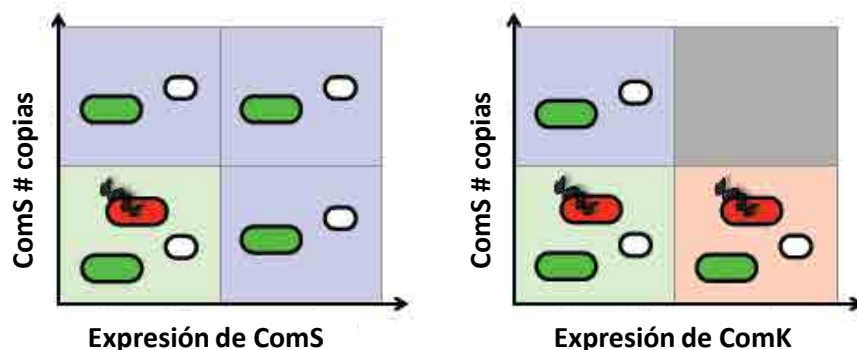


Figura 6.9: Resumen esquemático del efecto fenotípico de las dos integraciones estudiadas experimentalmente. El color de cada panel tiene el mismo significado que en las Fig. 6.7 y Fig. 6.8. Además, las células verdes representan células vegetativas, las células rojas denotan competencia *funcional*, y las células blancas representan esporas.

estados mencionados.

En este estudio se consideran dos entradas con dos naturalezas muy diferentes, por un lado una de ellas corresponde al nivel de la expresión constitutiva de uno de los dos genes principales que gobiernan el circuito, y que además es controlable de una forma continua, y la otra son múltiples copias de uno de los dos genes principales del circuito, el cual mantiene su regulación natural. Biológicamente, la primera entrada se corresponde con una señal contextual como la que afecta a los patrones de señalización en organismos en desarrollo (Artavanis-Tsakonas, 1999), y como la que se ha estudiado recientemente en circuitos de desarrollo por parte de Cotterell & Sharpe (2010). La segunda perturbación se corresponde a la variación del número de copias, como las que se observan en el genoma humano (Conrad et al., 2010) y en levaduras (DeLuna et al., 2008). La combinación de estos dos niveles de control celular es muy importante para el correcto funcionamiento de la célula, pero no ha sido estudiada hasta el momento de forma sistemática a nivel de células individuales. Estudios del tipo presentado en este Capítulo pueden ayudar a comprender mejor la relación existente entre la estructura y la función de las redes genéticas.

Capítulo 7

Competición dinámica entre decisiones celulares alternativas

Las células deben ser capaces de entender todas las señales provenientes de las interacciones bioquímicas que se dan en su interior y de acuerdo con ellas tomar una decisión ante un ambiente cambiante, optando habitualmente entre decisiones alternativas. En este contexto, una pregunta que surge es: cómo pueden las células tomar una decisión entre dos programas de diferenciación que son excluyentes mutuamente?. En este Capítulo se examinará esta cuestión en el caso de la competición temporal entre dos programas de diferenciación celular en *Bacillus subtilis*.

Existen estudios que sugieren que dos programas de diferenciación que compiten entre sí están acoplados por regulación cruzada, la cual controla la toma de decisión (Grossman, 1995), pero no está claro si dicha regulación es necesaria antes de la toma de decisión o si su función es asegurar la ejecución de un programa de diferenciación una vez la célula ha tomado una decisión. En este Capítulo se estudia, al nivel de células individuales, la interacción entre dos programas de diferenciación celular en el organismo *B. subtilis*, como son la esporulación y la competencia. Como se ha comentado en la Sección 3.2 del Capítulo 3, en estrés nutricional la mayoría de las

células optan por entrar en el estado de esporulación (Losick et al., 1986), mientras que aproximadamente un 2-5% de la población celular se diferencia a un estado transitorio de competencia en el que pueden incorporar ADN extracelular (Grossman, 1995; Dubnau, 1999). En el primer caso la molécula reguladora es la forma fosforilada del factor de transcripción Spo0A, y en el segundo caso es el factor de transcripción ComK. En los estudios realizados por Süel et al. (2006) y Chastanet et al. (2010) a nivel de células individuales se observó variabilidad intercelular en la expresión de *comK* y *spo0A*, respectivamente, lo que da lugar a una heterogeneidad a nivel poblacional. Por otro lado, aún no es del todo bien conocido cómo los dos programas de diferenciación interactúan entre sí durante la progresión hacia sus respectivos destinos.

El objetivo del estudio que presentamos en este Capítulo es determinar si se requiere regulación cruzada entre los programas que regulan los estados de competencia y esporulación antes de la toma de decisión celular, o si la propia dinámica de cada programa celular dicta la decisión final de estas bacterias hacia un estado determinado, excluyendo el estado competidor.

7.1. Dinámica de la progresión hacia la esporulación

Para el estudio de los programas de diferenciación en células de *B. subtilis* tanto en esporas como en células competentes, en primer lugar se estableció la dinámica de la progresión hacia la formación de esporas. Para ello se utilizó la fusión del promotor P_{spo0A} con un gen fluorescente, lo que nos permitió seguir la dinámica de expresión de dicho promotor en el tiempo con microscopía de fluorescencia temporalizada. Este promotor expresa el factor de transcripción Spo0A imprescindible para el inicio del desarrollo hacia las esporas. Simultáneamente y de la misma forma que para P_{spo0A}

se midió la actividad del promotor P_{spoIIR} para así establecer un punto de referencia en la formación de la espora, ya que la expresión del gen *spoIIR* solamente ocurre en la forespora, lo cual indica un punto de compromiso irreversible en el camino hacia la esporulación (Dworkin & Losick, 2005). En la Fig. 7.1A se muestra una secuencia de imágenes en el tiempo de una microcolonia de la cepa que expresa simultáneamente las fusiones $P_{spo0A-yfp}$ (azul) y $P_{spoIIR-cfp}$ (verde). En (B) se puede ver la serie temporal media de la dinámica de expresión del promotor $P_{spo0A-yfp}$. Las series individuales se normalizaron en amplitud y se alinearon en el tiempo respecto a la iniciación de la expresión del promotor $P_{spoIIR-cfp}$.

Los niveles de expresión de P_{spo0A} se incrementan y alcanzan su máximo cerca de la formación de la forespora, aumentando la probabilidad de la formación de esporas, como se puede ver en la figura Fig. 7.2A (línea negra). Se observó de la misma forma un incremento en la probabilidad de esporulación a medida que aumenta la expresión del promotor P_{spo0F} (línea negra en la Fig. 7.2B), el cual es gobernado por el factor de transcripción Spo0A en su forma fosforilada. Por todo ello, P_{spo0A} proporciona una medida ideal para determinar la progresión gradual a la formación de esporas. De la misma forma, se determinó también la probabilidad de entrar en competencia (línea roja) en función de P_{spo0A} (A) y P_{spo0F} (B).

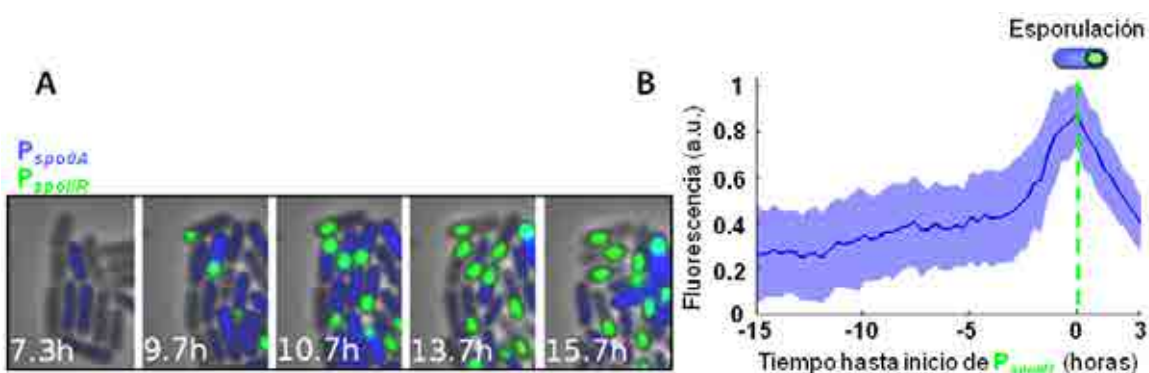


Figura 7.1: Progresión hacia la esporulación de una microcolonia de *Bacillus subtilis*. En (A) se observa una secuencia de imágenes tomadas en el tiempo, con P_{spo0A} -*yfp* (azul) y P_{spoIIR} -*cfp* (verde). En (B) se muestra la serie temporal media para la expresión de P_{spo0A} -*yfp*. Las series individuales se normalizaron y alinearon en el tiempo respecto a la iniciación de la expresión del promotor P_{spoIIR} -*cfp*. El área azul corresponde a la desviación estándar de las medidas de células individuales. La disminución de la señal de fluorescencia tras el máximo es debida a la lisis de la célula madre en la formación de las esporas.

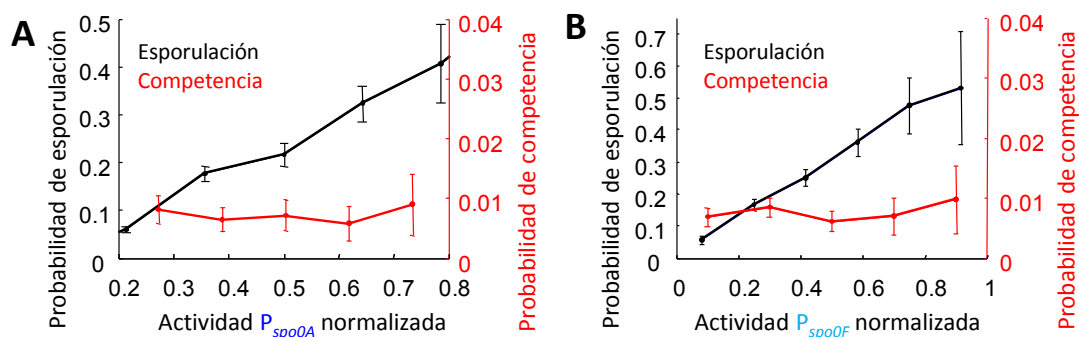


Figura 7.2: Probabilidad de esporulación en función de P_{spo0A} (A) y P_{spo0F} (B). En el cálculo de la probabilidad de esporulación (línea negra), cada promotor se normalizó por las distribuciones observadas en el total de células analizadas que habían formado la forespora (medido por la activación de P_{spoIIR}). Se determinó también la probabilidad de entrar en competencia (línea roja) en función de P_{spo0A} (A) y P_{spo0F} (B).

7.2. Probabilidad de la competencia en la progresión a la esporulación

Es importante determinar la probabilidad de que las células opten por la diferenciación hacia el estado de competencia y la forma en que dicha probabilidad cambia, a medida que se avanza en la formación de esporas. De esta forma se establece si existe regulación cruzada entre ambos programas antes de la toma de decisión celular. Para ello, mediante la fusión con proteínas fluorescentes, se sigue la dinámica de expresión de los promotores reguladores de la esporulación y la competencia, en este caso $P_{spo0A-yfp}$ y $P_{comG-cfp}$, respectivamente, de forma simultánea y en células individuales. El promotor P_{comG} es únicamente controlado por la proteína ComK. De estos datos se puede calcular la actividad de P_{spo0A} (círculo negro en la Fig. 7.3), al inicio de competencia ($>30\%$ de expresión de P_{comG} respecto a la máxima amplitud de expresión de P_{comG}).

En la Fig. 7.3 se muestran en la parte superior imágenes tomadas para la cepa que expresa ambos promotores (en azul para P_{spo0A} y en rojo para P_{comG}), y en la imagen inferior se pueden ver las series temporales para una célula individual de la dinámica de los dos promotores y la amplitud de la expresión de P_{spo0A} en el momento de iniciación de la competencia. La Fig. 7.4 muestra los valores de la actividad de P_{spo0A} en el instante de la iniciación de la competencia para todos los eventos observados. Los resultados muestran que la iniciación de la competencia ocurre en un gran rango de amplitudes de expresión de P_{spo0A} antes de la formación de las esporas (panel A). Adicionalmente, la probabilidad de iniciar la competencia permanece en su mayor parte constante durante la progresión a la formación de esporas, medido en términos de la expresión de P_{spo0A} (panel B). Estos resultados son compatibles con el comportamiento observado en función de la expresión de los promotores P_{spo0A} y P_{spo0F} , mostrados en la Fig. 7.2A y B. Se muestran datos de P_{spo0A} entre un 20% y 80% debido a que por debajo de 20% se incrementa el error

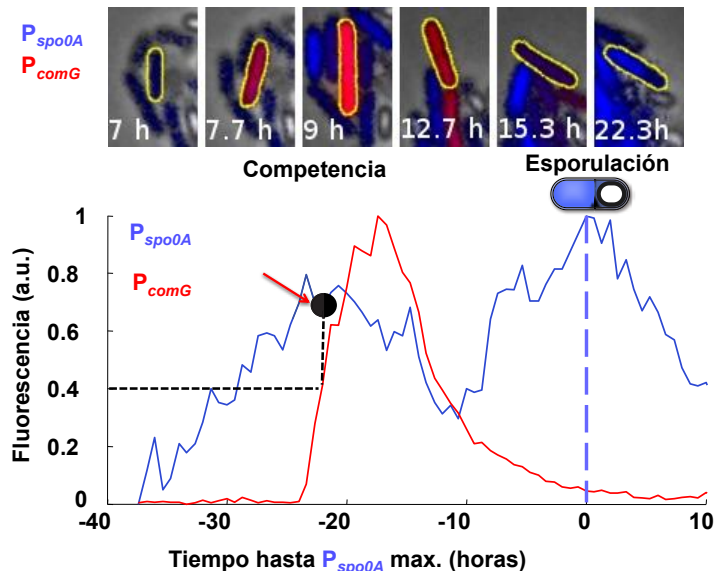


Figura 7.3: Expresión de los promotores P_{spo0A} (azul) y P_{comG} (rojo) fusionados a *yfp* y *cfp*, respectivamente. En la parte inferior se observan las series temporales para P_{spo0A} y P_{comG} de una célula individual que entra en competencia y tras salir de este estado esporula, como muestran las imágenes de microscopía. Las series temporales están alineadas en función del máximo de P_{spo0A} ($t=0$).

en la toma de datos, y por encima de 80 % las células están muy cerca de la formación de las esporas.

Se observa también que dos células hermanas son capaces de divergir en la toma de decisión aunque compartan el mismo citoplasma y el promotor P_{spo0A} comience a estar en activo. Un ejemplo de esta situación se puede ver en la Fig. 7.5 para dos células provenientes del mismo ancestro, de las cuales una de ellas entra en esporulación, mientras que su hermana opta por el programa de diferenciación que da lugar a la competencia.

Estos resultados son indicativos de la independencia entre las decisiones de entrar en competencia y esporular, por parte de células de *B. subtilis* bajo estrés nutricional.

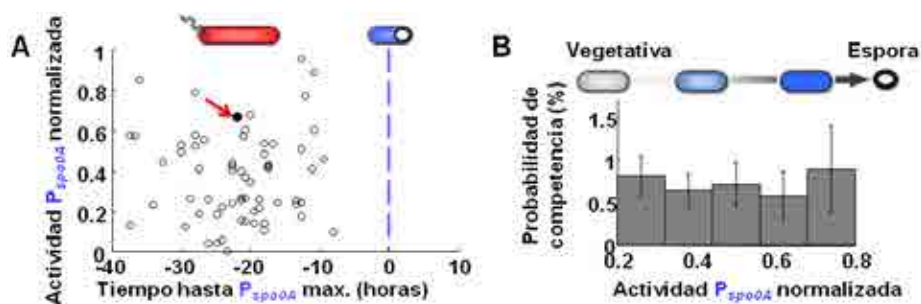


Figura 7.4: (A) Actividad de P_{spo0A} (círculos blancos) al inicio de la competencia. (La medida tomada en la Fig. 7.3 está resaltada en negro y marcada con una flecha). Las muestras se alinean respecto del máximo de P_{spo0A} (línea azul discontinua, $t=0$). (B) Probabilidad de competencia, igual al número de iniciaciones normalizada por el número de células, en función de expresión de P_{spo0A} .

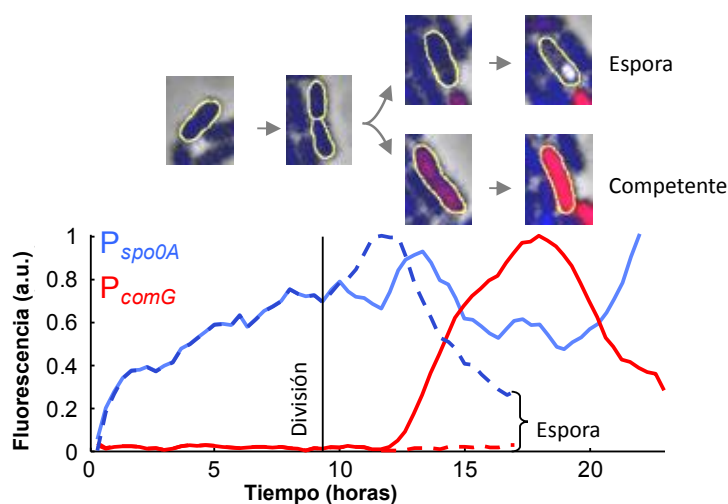


Figura 7.5: Actividad de los promotores P_{spo0A} -*cfp* (en azul) y P_{comG} -*mCherry* (en rojo) en dos células hermanas una de las cuales está esporulando (líneas azul y roja punteada), mientras que la otra entra en estado de competencia (líneas azul y roja sólida). Se ha indicado con una línea vertical el momento en que las dos células se dividen. En la parte superior se muestran imágenes de microscopía de las células hermanas en el correspondiente estadio mostrado por las series temporales.

Consecuentemente podemos anticipar que no existe regulación cruzada entre ambos programas de diferenciación antes del punto en el que las células toman la decisión.

7.3. Regulación cruzada pre- y post-decisión

La siguiente cuestión que surge es si la independencia entre los programas de decisión hacia la competencia y la esporulación sugerida por los estudios estadísticos presentados anteriormente, se refleja en los genes que participan en la regulación cruzada entre los estados de competencia y esporulación *una vez dichos estados se han establecido*. En particular, si dichos genes están activos antes del punto de toma de decisión, se podría predecir dicha decisión. Con el objetivo de analizar esta posibilidad, examinamos los genes *abrB* y *sinI* implicados en la regulación cruzada post-decisión. Ambos genes están regulados por Spo0A, que reprime el promotor P_{abrB} (Hahn & Roggiani, 1995) e induce la expresión del promotor P_{sinI} . En Bai et al. (1993) se sugiere que SinI reprime la competencia indirectamente antagonizando con SinR, el cual es un inductor transcripcional de ComK. Por otro lado AbrB es un factor de transcripción que activa o reprime la expresión de ComK de una forma dependiente de la concentración. Si alguno de estos promotores, o ambos, juegan un papel principal en el proceso que precede a la toma de decisión, su actividad antes de que tenga lugar uno de los programas de diferenciación estudiados debería diferir.

Para elucidar la implicación de dichos componentes de regulación cruzada en la progresión hacia la decisión, se utilizaron proteínas fluorescentes para medir de forma simultánea y en células individuales la actividad de P_{comG} , P_{spo0A} , P_{abrB} y P_{sinI} . En la Fig. 7.6 se muestra el análisis de la actividad de los promotores P_{abrB} (panel A) y P_{sinI} (panel B) antes de la iniciación de la competencia o la esporulación (pre-decisión), no apreciándose diferencias en la amplitud absoluta de la expresión de ambos promotores. Estos resultados revelan que la expresión de ambos genes de regulación cruzada antes del punto de decisión no predice el resultado final tras la

decisión, indicando la *no* regulación cruzada antes de la toma de decisión. Como se puede ver en la Fig. 7.6, también se analizó la actividad de estos promotores durante la ejecución de la competencia y la formación de esporas, observando que la amplitud absoluta en su expresión era diferente entre los dos estados celulares. En primer lugar, la actividad de P_{abrB} era menor en células que estaban esporulando si se compara con aquellas células que estaban ejecutando la competencia, mientras que se observó lo contrario para P_{sinI} . Los resultados indican que la esporulación se inhibe en células que entran en competencia, por lo que se deduce que estos promotores se expresan con un perfil específico durante la ejecución de la competencia y la esporulación, pero no antes de la decisión.

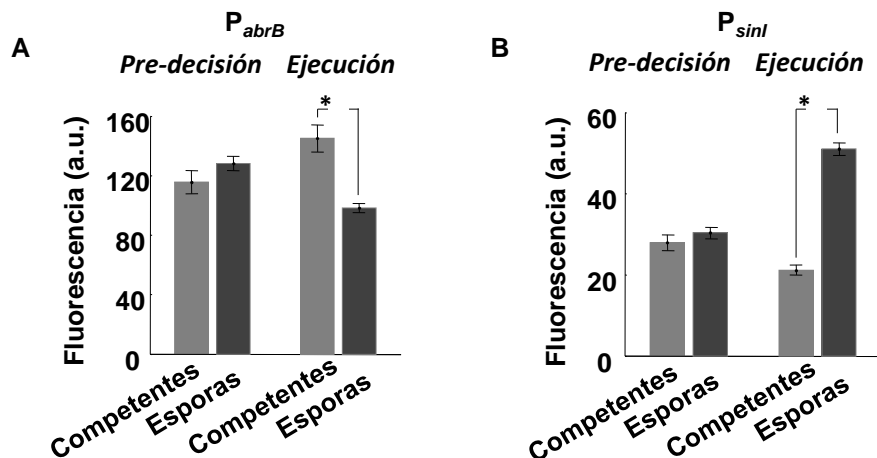


Figura 7.6: Expresión de los promotores P_{abrB} y P_{sinI} , antes y después de la toma de decisión hacia la competencia o la esporulación. Se muestra la fluorescencia media de P_{abrB} -*yfp* (A) y P_{sinI} -*yfp* (B), (ambos expresados en cepas que contienen a su vez P_{spo0A} -*cfp* y P_{comG} -*mCherry*) para monitorizar las dos decisiones. Las medidas de fluorescencia se tomaron 40 min antes de la iniciación de cada programa según la expresión de los promotores (30% del valor máximo de P_{comG} y 90% del valor máximo de P_{spo0A}), y se denomina como *pre-decisión*. Se tomaron también medidas tras 40 min una vez iniciada la expresión de los promotores P_{spo0A} y P_{comG} , denominándose *ejecución*.

7.4. Activación dual de competencia y esporulación

La ausencia de regulación cruzada implicaría que la expresión de ComK podría incluso tener lugar en células que se encuentran cerca del punto irreversible de compromiso hacia la esporulación. En este estudio se identificó un pequeño porcentaje de células ($0.11 \pm 0.04\%$) en las que el estado de competencia se había iniciado en el momento de la formación de esporas. Estas células se denominaron DA (dual-activity), ya que presentaban expresión de ComK iniciando la competencia y a su vez procedían directamente a la formación de esporas.

En la Fig. 7.7 se muestran las series temporales para la expresión de $P_{comG-cfp}$ (rojo). Se ha marcado con una flecha y una representación de una célula el momento de formación de la forespora, que en el caso (A) ocurre cuando la célula ha salido del estado competente, pero en el (B) ocurre cuando la célula ya ha comenzado a esporular. En (C) se observan imágenes tomadas para una célula DA típica (panel superior), en las que se puede ver la formación de la espora a pesar de la expresión de ComK, comparada con una célula en esporulación (panel inferior).

No es sorprendente que la fracción de células DA sea tan pequeña dado que este estado se caracteriza por dos hechos de baja probabilidad, en primer lugar la expresión estocástica de la proteína ComK, y en segundo lugar su localización temporal, muy cercana al punto de decisión a la esporulación.

Como se puede ver en la Fig. 7.8, las células DA son también similares a aquellas que inician la competencia, ya que ambas expresan P_{comG} , pero si se comparan ambos tipos celulares se puede ver que las células DA no se elongan durante la actividad de ComK, sino que comienzan a desarrollar la forespora aunque ComK siga incrementándose, y acaban en la lisis de la célula madre, tal y como ocurre en una célula en esporulación.

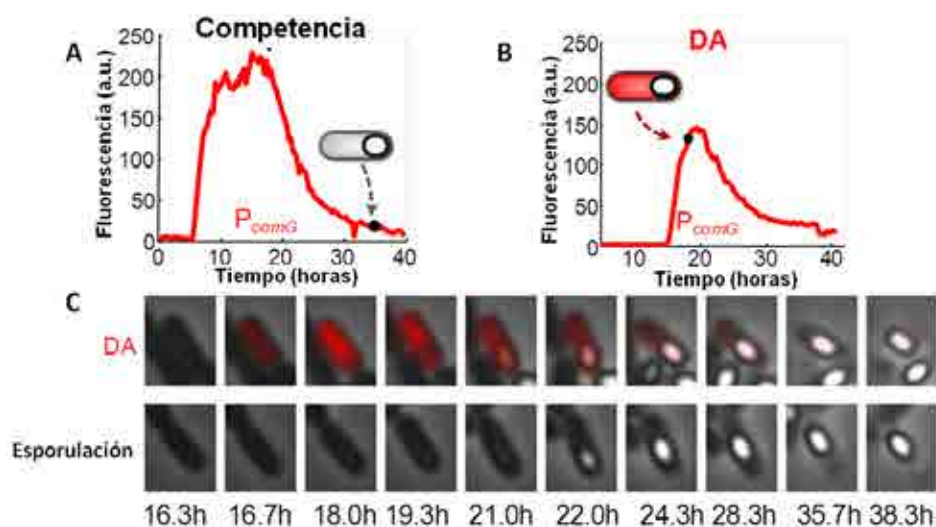


Figura 7.7: Series temporales de la expresión de $P_{comG-cfp}$ (rojo), tanto para una célula en estado de competencia (A) como para una célula DA (B). En ambas figuras se representa mediante una flecha el momento de la formación de la forespora. (C) imágenes de microscopía de una célula DA (fila superior) y una célula en proceso de esporulación (fila inferior). Se puede ver que la dinámica de formación de la espora en la célula DA es similar a la célula en esporulación normal, excepto por el hecho de que en la célula DA existe expresión de $P_{comG-cfp}$ (en rojo).

Parece ser entonces que la expresión fútil de la proteína ComK en células DA es la única diferencia entre estas últimas y células en esporulación. Esto se ha demostrado midiendo en células DA los genes de regulación cruzada. Al contrario que las células competentes, las células DA presentan una actividad de los promotores P_{abrB} y P_{sinI} similar a las células en esporulación, tal y como se puede ver en la Fig. 7.9. La existencia de células en este estado límite de activación dual muestra que la expresión del regulador principal de la competencia no se ve inhibido por la progresión hacia la esporulación y viceversa. Esto viene a corroborar el hecho de que la regulación cruzada no tiene un papel importante antes de la toma de decisión celular.

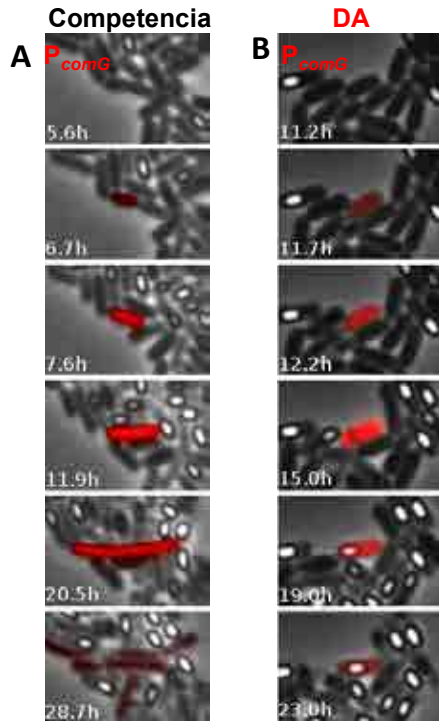


Figura 7.8: Secuencia de imágenes que muestran una célula en competencia (A) y una célula DA (B) donde en ambas se observa la expresión de P_{comG} -*cfp* (rojo). La célula DA procede a la formación de la espora, en lugar de elongarse como lo hace una célula en competencia.

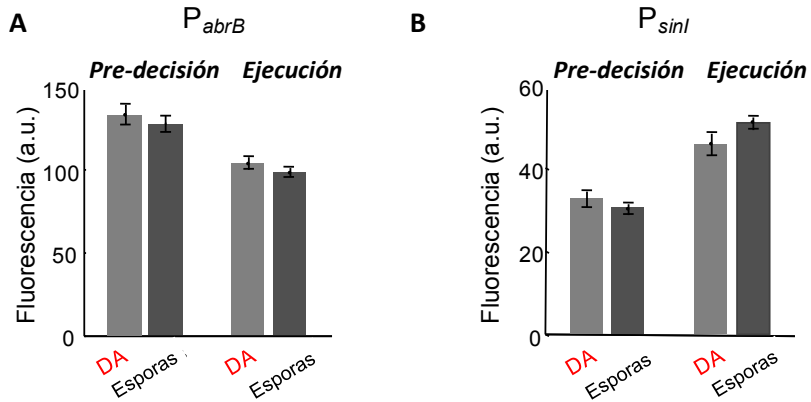


Figura 7.9: Fluorescencia media de P_{abrB} -*yfp* y P_{sinI} -*yfp* medida en células individuales (en cepas que expresan a su vez P_{spo0A} -*cfp* y P_{comG} -*mCherry*) DA y en esporulación. Las medidas se tomaron 40 min antes de la expresión (90% del valor máximo) en lo que se denomina *pre-decisión*, o 40 min después del máximo de expresión de P_{spo0A} , en lo que se denomina *ejecución*.

7.5. Localización temporal del punto de exclusión de la competencia

Aunque las células DA no son un estado relevante a nivel fisiológico, son útiles a la hora revelar la dinámica de la toma de decisión celular. En particular, a partir de los resultados descritos anteriormente es posible determinar la localización temporal del punto de exclusión del estado de competencia. Estas células expresan simultáneamente los reguladores principales tanto de la esporulación (P_{spo0A}) como de la competencia ($ComK$), pero este último estado es excluido a medida que se procede a la formación de esporas. En la Fig. 7.10A se muestra la actividad de los promotores de la esporulación (P_{spo0A} en azul) y de la competencia (P_{comG} en rojo) mediante la fusión con genes de fluorescencia (si se compara con la Fig. 7.3 se puede ver la diferencia en el perfil de expresión de P_{comG}). Al contrario que en las células competentes, la expresión de P_{comG} en células DA se restringe a una ventana de tiempo muy pequeña justo antes de la formación de esporas, donde la amplitud en la expresión de P_{spo0A} es elevada y menos variable (Fig. 7.10B). De esta forma, las células DA proporcionan un punto de referencia en la toma de decisión hacia la competencia que viene dado por el punto de exclusión de la misma.

Para estudiar con mayor detalle el punto de exclusión del estado de competencia identificado en células DA, se determinó su localización temporal con respecto al resto de fases del desarrollo de la esporulación. Con este objetivo se estudió la dinámica de expresión de cuatro marcadores de la esporulación como son P_{spo0A} , P_{spoIIG} , $spoIIE$, y P_{spoIIR} por separado, pero de forma simultánea al promotor de competencia P_{comG} . Se fusionó el gen $spoIIE$ a una proteína fluorescente ya que SpoIIE es una fosfatasa que activa un factor de transcripción específico de la forespora (σ^F), y su localización en el septo asimétrico es el primer marcador morfológico de la formación de la forespora (Barak et al., 1996).

Se analizaron estos cuatro marcadores en células DA resultando en la dinámica de

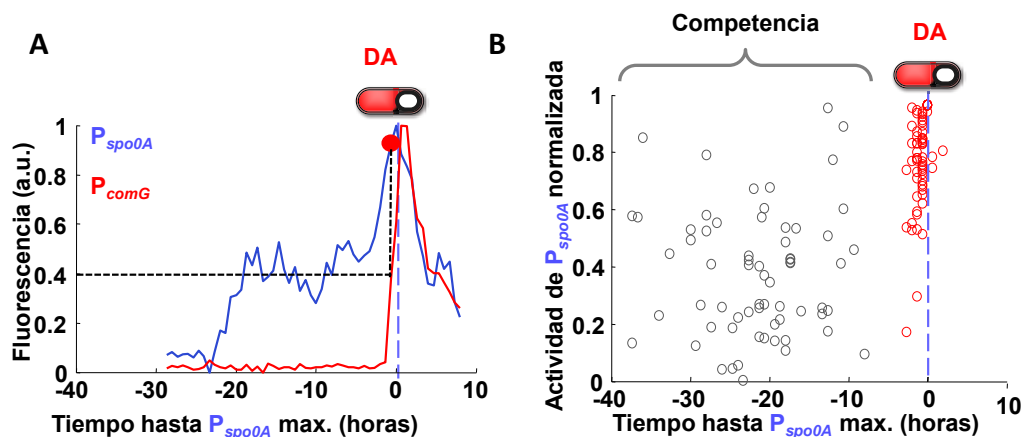


Figura 7.10: (A) Expresión de $P_{spo0A-yfp}$ (azul) y $P_{comG-cfp}$ (rojo) en células DA. Las series están alineadas en el tiempo con respecto a la actividad de P_{spo0A} durante la esporulación ($t=0$). Este punto se utilizó para determinar la actividad de P_{spo0A} (círculo rojo) al inicio de la expresión de P_{comG} (definida como superior al 30% de la actividad de P_{comG} respecto a su máxima amplitud) en células DA. Ambas series están normalizadas con respecto a la amplitud. (B) Actividad de P_{spo0A} en células DA (círculos rojos vacíos). Las muestras se alinean respecto del máximo de P_{spo0A} . Los círculos vacíos (o) mostrados anteriormente en la Fig. 7.3 se muestran aquí de nuevo para su comparación.

expresión mostrada en la Fig. 7.11A, donde las series temporales están alineadas con respecto al aumento de la actividad de P_{comG} , que se usa como origen de tiempos. La figura muestra las series temporales de P_{comG} (rojo), P_{spo0A} (azul), SpoIIE (naranja), P_{spoIIG} (magenta) y P_{spoIIR} (verde). Se hizo el estudio de cada marcador por separado y siempre simultáneamente con P_{comG} . Las Fig. 7.11B y C corresponden al mismo análisis realizado en A pero en cepas que expresan $P_{spo0A-comK}$ y $P_{spoIIG-comK}$ respectivamente, es decir, con expresión ectópica del gen $comK$ inducida por factores de esporulación situados a lo largo de la progresión de la célula hacia dicho estado. En el panel A de la Fig. 7.11 recuadrado en amarillo se muestra la media de las series temporales en células DA individuales, que se han normalizado en amplitud y alineado en el tiempo respecto a la actividad de P_{comG} (30% del pico de actividad).

Se hizo el mismo tratamiento de los datos para las Fig. 7.11B y C. Los resultados obtenidos muestran que el estado DA aparece después de la activación de P_{spo0A} y antes de la activación de P_{spoIIG} y P_{spoIIR} . Además se puede ver que el estado DA se superpone en el tiempo con la localización de SpoIIE en el septo asimétrico.

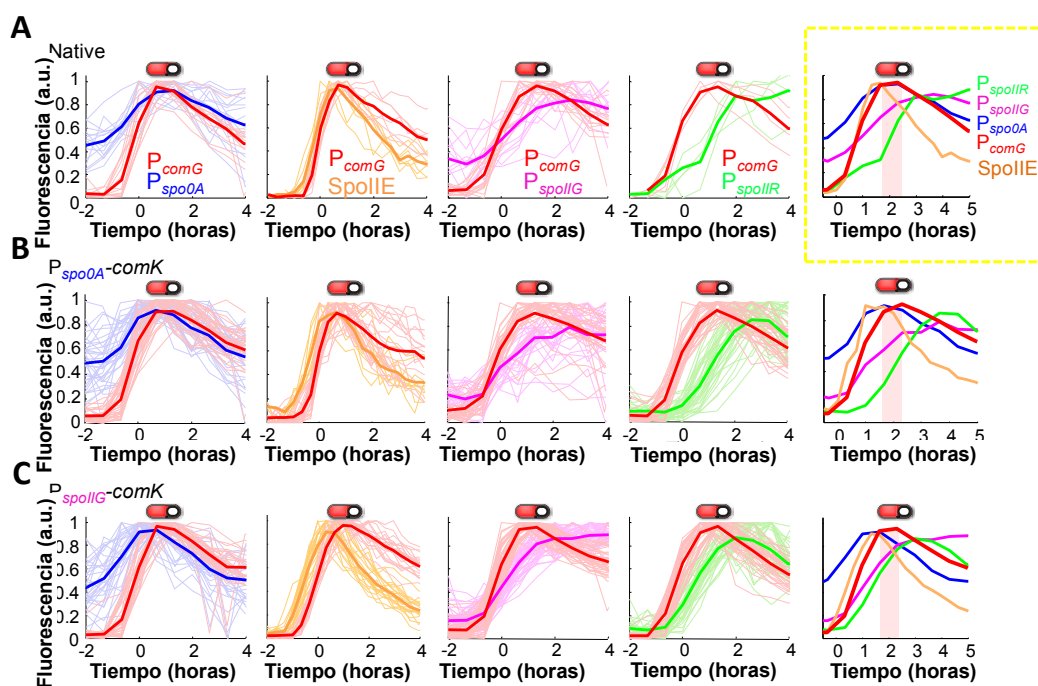


Figura 7.11: (A) Series temporales obtenidas para los marcadores de esporulación fusionados a YFP y el promotor P_{comG} a CFP (rojo), P_{spo0A} (azul), SpoIIE (naranja), P_{spoIIG} (magenta) y P_{spoIIR} (verde). En (B) y (C) se muestran las series para los marcadores de esporulación y el promotor P_{comG} , además de la expresión ectópica de $comK$ regulada por P_{spo0A} y P_{spoIIG} , respectivamente. Todas las series se normalizaron en amplitud y se alinearon en el tiempo respecto a la actividad de P_{comG} (30% del pico de actividad), la cual marca el origen de tiempo. En cada fila (series sombreadas, y media de las series en oscuro) se combinaron los datos obtenidos de las cuatro primeras gráficas para obtener los promedios mostrados en la quinta columna.

Seguidamente, se estudió en las células DA el solapamiento temporal de la acti-

vación de P_{comG} con la localización de *spoIIE*. Concretamente, se interfirió con la localización y actividad de SpoIIE mediante degradación proteolítica exclusivamente en células que expresaban *comK*. Con este objetivo se crearon las cepas descritas en la Sección 2.3.2, que darían lugar a la cepa NoE. En esta cepa se deletó el gen natural *spoIIE*, substituyéndolo por P_{spoIIE} -*spoIIE* seguido de una etiqueta de degradación natural de *Escherichia coli* denominada *ssrA*, quedando de esta forma marcado para la degradación en presencia del factor SspB de *Escherichia coli* (Griffith & Grossman, 2008). Se clonó la proteína exógena SspB bajo el control del promotor P_{comG} asegurándose la degradación de SpoIIE en caso de expresión simultánea con ComK, ya que dicho promotor está controlado exclusivamente por ComK. Por lo tanto, si ambos programas de diferenciación se activan a la vez, como es el caso del estado DA, en la cepa NoE se degradará la proteína SpoIIE.

Los resultados obtenidos tras los experimentos de microscopía muestran que el uso de una proteasa estable elimina completamente las células DA y además interfiere con la esporulación. Para solucionar esta problema, se añadió una etiqueta de degradación de *B. subtilis* al factor exógeno SspB y reducir así su vida media. De esta manera se obtuvo finalmente la cepa NoE.

En la Fig. 7.12A se compara la cepa NoE (imágenes inferiores) con la cepa que expresa *comK* bajo la regulación del promotor de esporulación P_{spoIIG} . Se observa que en la cepa NoE la degradación de SpoIIE no interfiere en la consecución de la esporulación. En la Fig. 7.12B se puede ver la cepa NoE entrando en el proceso de competencia, seguido finalmente por la esporulación. Por otro lado, si se comparan los histogramas de la Fig. 7.12C, se observa casi una reducción en la fracción de células DA, y un aumento en la frecuencia de células competentes. Esto indica que la perturbación realizada permite el rescate de las células DA, con lo cual éstas pueden continuar con el proceso de competencia sin afectar a la esporulación.

Los resultados obtenidos muestran que el punto de exclusión de la competencia coincide con la localización de SpoIIE, y que tras la localización de SpoIIE, las células

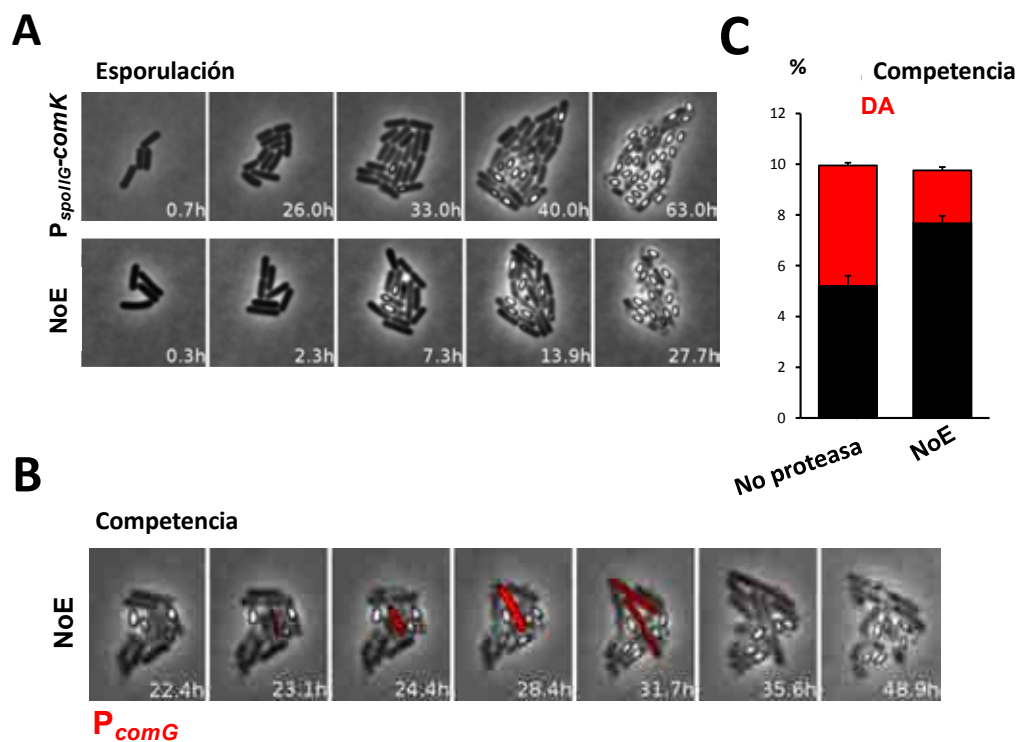


Figura 7.12: (A) Secuencia de imágenes de una microcolonia de *B. subtilis* expresando $P_{spoIIG-comK}$ (panel superior), y la cepa NoE (panel inferior). (B) Evento típico de competencia visualizado en la cepa NoE mediante la expresión de $P_{comG-cfp}$ (en rojo) seguido de la esporulación. (C) Frecuencias de células DA (en rojo) y competentes (en negro) observadas en una cepa que no expresa la proteasa y la cepa NoE.

DA continúan con la esporulación y la consecuente lisis de la célula madre.

7.6. Carrera molecular entre las decisiones de competencia y esporulación

Para poder interpretar adecuadamente los resultados, es necesario determinar si las células DA tienen suficiente tiempo para desarrollar la competencia antes de la lisis de la célula madre en la formación de la espora. Para ello examinamos cuánto tiempo se tarda en el proceso de la competencia, una vez iniciada la expresión de *comK*, en alcanzar la capacidad de incorporar ADN extracelular, i.e. en desarrollar competencia funcional.

Un marcador funcional de la competencia es la localización de la proteína de membrana ComGA en el polo celular, como parte del complejo dependiente de ATP que se requiere para la incorporación de ADN extracelular (Chung & Dubnau, 1998). Además, se ha sugerido que la localización de ComGA participa en el bloqueo de la replicación del cromosoma durante la competencia (Haijema et al., 2001).

En eventos de competencia típicos, la localización de ComGA ocurre unas 4 horas después del inicio de la expresión de *comK* (Fig. 7.13A, C). Por el contrario, en las células DA el tiempo necesario para la localización de SpoIIE es de 40 minutos después del inicio de la expresión de ComK, a partir de lo cual se produce la lisis de la célula madre (Fig. 7.13B y C). Esto último indica que las células DA alcanzan la localización de spoIIE y la formación de la espora en menos tiempo del que es necesario para la localización del sistema de incorporación de ADN durante la competencia. Se observó además que ninguna célula DA exhibe localización de ComGA (Fig. 7.13D). Podemos interpretar que cuando las células alcanzan la localización de SpoIIE, el estado de competencia se queda sin tiempo, dejando el estado de esporulación como el único programa posible.

Basándonos en estos resultados, surge la hipótesis de que la toma de decisión celular entre los programas de diferenciación de esporulación y competencia proviene de una

carrera molecular (Fig. 7.13E). La competencia (panel superior) ocurre si la expresión de *comK* comienza con tiempo suficiente para dar lugar a la localización de ComGA (punto verde) antes de la localización de SpoIIE (línea amarilla). La competencia funcional no puede darse si *comK* se expresa en la ventana temporal crítica (en rosa) cerca de la localización de SpoIIE, resultando en el estado DA donde la esporulación sigue adelante (panel medio). Se muestra en el panel inferior la esporulación como referencia. Según este escenario, el tiempo en el que se dan ambos programas de diferenciación que compiten entre sí, es determinante en la toma de decisión celular. Si la expresión de *comK* se inicia inmediatamente después de la localización de SpoIIE, la competencia funcional carece de tiempo suficiente para desarrollarse, dando lugar así a las células DA y la formación de esporas (Fig. 7.13E panel medio). Por el contrario, la competencia se puede desarrollar plenamente si se inicia la expresión de ComK mucho antes de la localización de SpoIIE. Esta competición temporal asegura la exclusión mutua de ambos programas de diferenciación incluso si ambos se inician simultáneamente, ya que solamente uno de ellos tendrá tiempo suficiente para desarrollarse hacia su estado funcional.

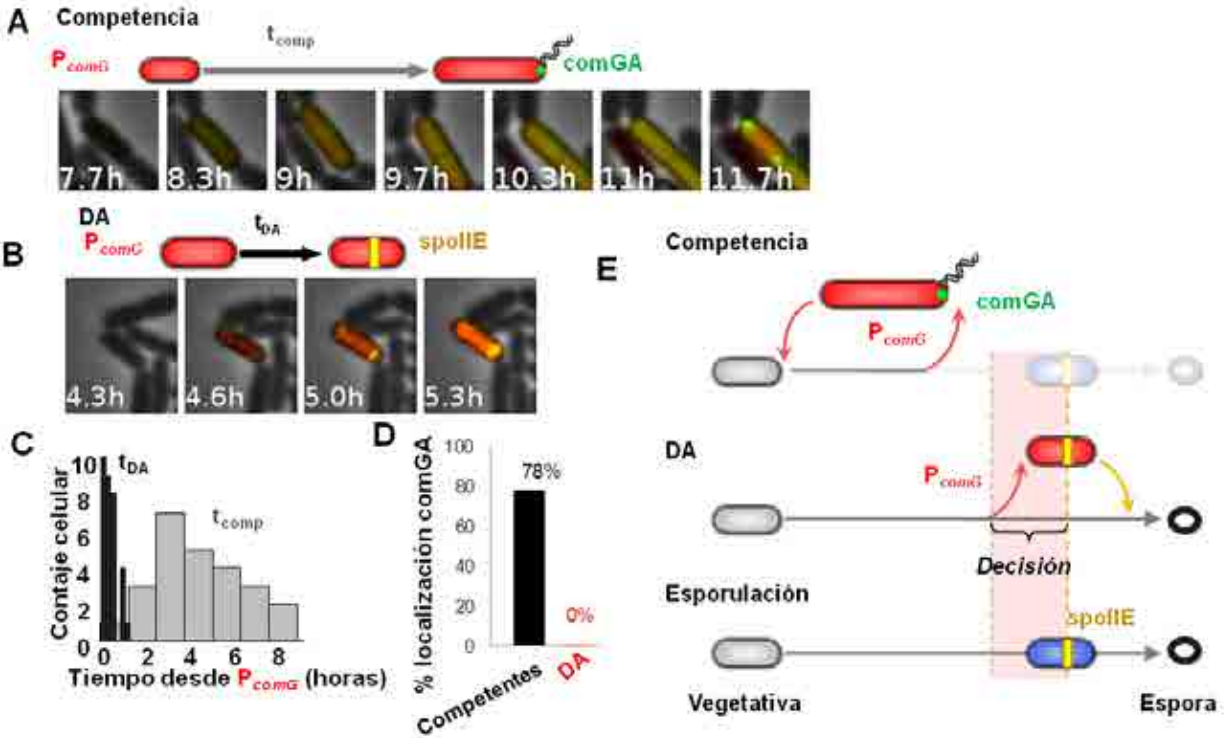


Figura 7.13: Carrera molecular entre competencia y esporulación. (A) Imágenes de una célula competente típica de una cepa que expresa P_{comG} -*cfp* (en rojo) y la fusión *comGA-yfp* (en verde). El tiempo entre la activación de P_{comG} (>30% del máximo) y la localización de ComGA (11.7 h) se indica como t_{comp} . (B) Imágenes de una célula DA en la que se expresan P_{comG} -*cfp* (en rojo) y *spoIIE-yfp* (en naranja). El tiempo entre la activación de P_{comG} (>30% del máximo) y la localización de SpoIIE en el septo asimétrico (>40% del máximo, 5.3 h) se indica como t_{DA} . (C) Histograma de tiempo entre la activación de P_{comG} ($t=0$) y la localización de ComGA en células competentes, (o la localización de SpoIIE en células DA). (D) Porcentaje de células que presentan localización de ComGA en células competentes y en células DA. (E) Esquema de la hipótesis de la “carrera molecular”.

7.7. Perturbaciones sintéticas de la carrera molecular

Con el objeto de validar experimentalmente la hipótesis de la carrera molecular hacia la exclusión mutua de ambos programas de diferenciación, hemos investigado el efecto temporal de la expresión de *comK* en relación con el progreso del programa de esporulación. Para ello se utilizaron los promotores reguladores de esporulación P_{spo0A} , P_{spoIIG} y P_{spoIIR} para controlar la expresión ectópica de una copia del gen *comK* en tres estadios distintos de la esporulación (Fig. 7.14, panel superior). En la Fig. 7.15 se observa el resultado de estas perturbaciones genéticas, en términos de los porcentajes de competencia y estado DA resultantes de cada perturbación. Tal y como se espera, la expresión de *comK* desde el promotor P_{spoIIR} , el cual se activa después del punto de decisión no altera la elección celular respecto de una cepa salvaje (denominada en la Fig. 7.15 como “Native”). Por otro lado, la expresión de *comK* regulada por el promotor temprano de esporulación P_{spo0A} desvía la decisión celular hacia la competencia, incrementando la frecuencia de un 2% a un 13.9% (Fig. 7.15). Dicha perturbación también lleva a un incremento en el porcentaje de células DA, lo que indica que la actividad de P_{spo0A} no sólo se limita a las fases tempranas de la esporulación. Por el contrario, la expresión de *comK* desde el promotor tardío de esporulación P_{spoIIG} produjo un mayor incremento relativo de la frecuencia del estado DA que de la competencia. Concretamente, la frecuencia de células DA pasó de 0.11% a 4.8%, aumento considerable con respecto a la cepa salvaje. Estos resultados muestran cómo la variación temporal en la expresión de *comK* respecto a la esporulación puede cambiar la toma de decisión celular.

Se investigó también la contribución de la intensidad en la expresión ectópica de *comK* introduciendo una segunda copia (Fig. 7.14, panel medio). En células con dos copias de P_{spo0A} -*comK* la frecuencia de células competentes respecto de DA sufre un incremento si se compara con la cepa de copia única. Concretamente, el cociente

entre las probabilidades de competencia y DA pasó de 5.5 a 29.3 i.e., con la adición de la segunda copia más células optaron por la competencia que por el estado DA (Fig. 7.15). En las células que expresan dos copias de $P_{spoIIG-comK}$ se incrementó la frecuencia de células DA alcanzando un 23.6%, mientras que la probabilidad de competencia apenas un 3% (Fig. 7.15). Estos resultados muestran que la dependencia temporal de la competencia y el estado DA se mantiene aún doblando el número de copias de dicho gen.

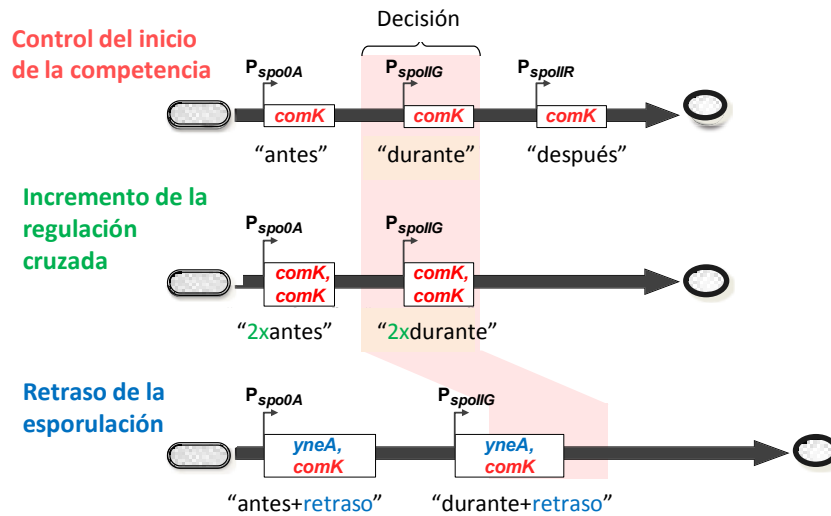


Figura 7.14: Esquema de los diseños genéticos implementados para evaluar la hipótesis de la carrera molecular. En el panel superior se observa el diseño que lleva a la expresión ectópica de *comK* regulada por: i) el promotor temprano de esporulación P_{spo0A} , antes de la ventana de tiempo discutida en la Fig. 7.13E (“Decisión”, área rosa), ii) el promotor tardío cercano al punto de decisión P_{spoIIG} , iii) el promotor P_{spoIIR} que se activa una vez tomada la decisión. En el panel medio se observa la expresión ectópica de dos copias de *comK* reguladas por P_{spo0A} y P_{spoIIG} . El panel inferior muestra la expresión ectópica de *yneA* y *comK* regulada de nuevo por P_{spo0A} y P_{spoIIG} .

La hipótesis de la “carrera molecular” predice también que un retraso en la esporulación podría favorecer al estado de competencia. Se testó esta posibilidad retrasando

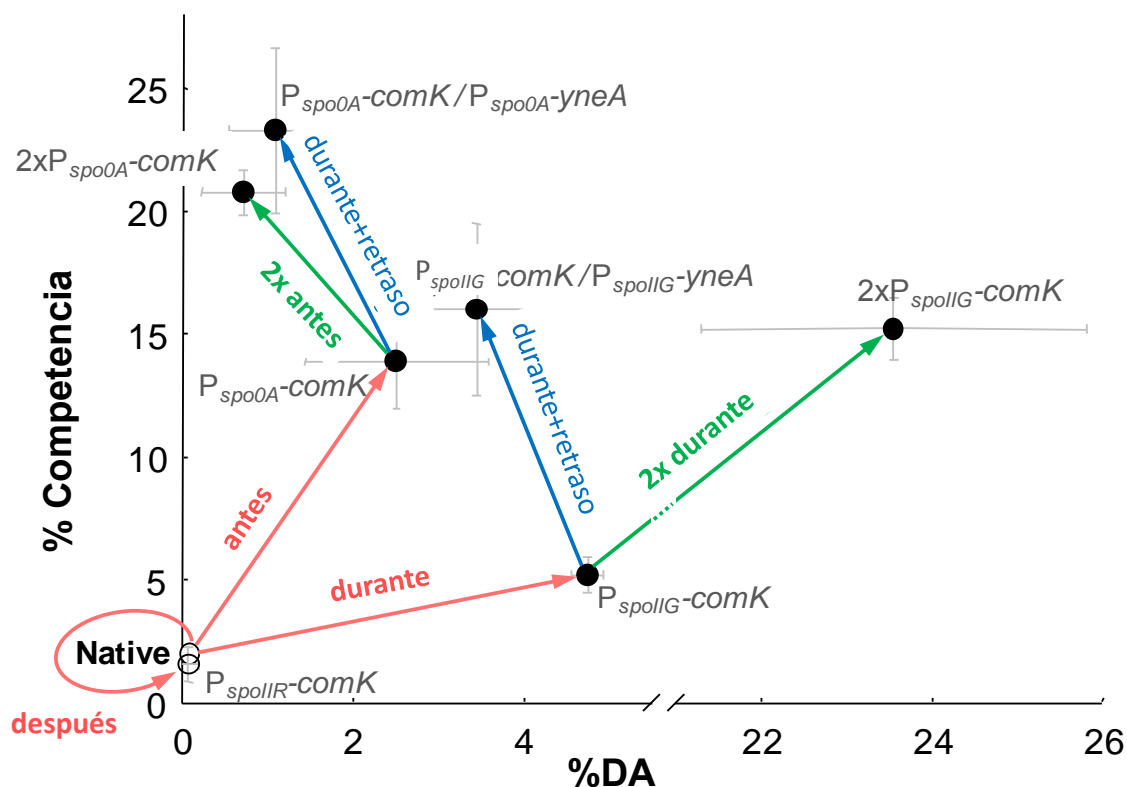


Figura 7.15: Se muestran las fracciones de células competentes y DA medidas en las cepas que expresan *yneA* y/o *comK* regulados por los promotores tempranos y tardíos, tal y como se describen en Fig. 7.14. Todas las cepas expresan también $P_{comG-cfp}$ para reportar la actividad de *comK*. La denominación “Native” denota una cepa salvaje que expresa solamente el promotor P_{comG} . Las expresiones “antes” y “durante” denotan las cepas que contienen expresión ectópica a partir de P_{spo0A} y P_{spoIIG} , respectivamente. Las flechas rojas indican la expresión de *comK*. Las flechas verdes indican las cepas que expresan dos copias de $P_{spo0A-comK}$ (2×antes) y $P_{spoIIG-comK}$ (2×después). Las flechas azules muestran las expresiones de *yneA* regulada por los promotores P_{spo0A} y P_{spoIIG} , denominadas como “antes + retraso” y “durante + retraso”, respectivamente.

la esporulación mediante la expresión ectópica del gen *yneA* a partir de los promotores de esporulación anteriormente comentados (Fig. 7.14, panel inferior). El gen

yneA se expresa normalmente durante la competencia y se ha demostrado que retrasa el crecimiento e inhibe la división celular, retrasando la formación del anillo FtsZ necesario para la formación del septo asimétrico (Kawai et al., 2003). La formación del anillo de FtsZ también se requiere para la localización de SpoIIE y consecuentemente la formación de la espora (Ben-Yehuda & Losick, 2002). Como se muestra en la Fig. 7.16, tras la expresión ectópica del gen *yneA* a partir del promotor de esporulación P_{spoIIG} se confirmó a nivel de células individuales un retraso en la progresión hacia la formación de esporas debido a la expresión de dicho gen. Además las células presentaban periodos prolongados de expresión elevada de P_{spoIIG} en comparación con las células salvajes.

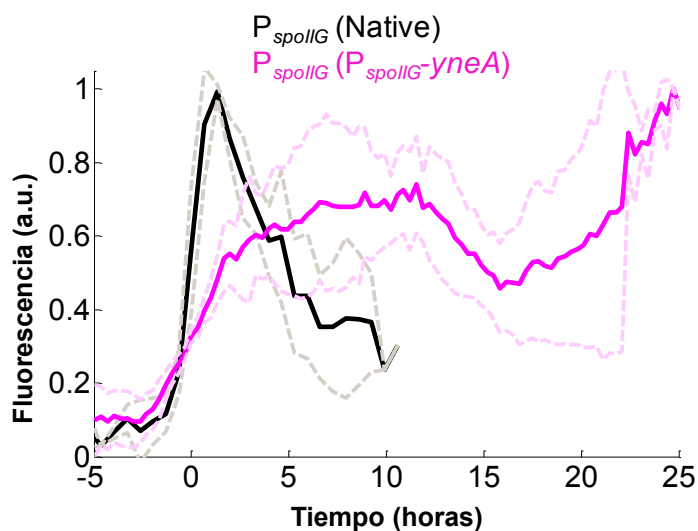


Figura 7.16: Series temporales medias analizadas en células individuales de la cepa salvaje que expresa $P_{spoIIG-yfp}$ (negro), y la que expresa $P_{spoIIG-yfp}$, $P_{spoIIG-yneA}$ (magenta). Esta última cepa exhibe períodos de expresión prolongados para P_{spoIIG} . Las series se han normalizado con respecto al máximo y se han alineado al inicio de expresión de P_{spoIIG} ($>30\%$ de la actividad máxima). Las series puntuadas representan la desviación estándar.

Se expresaron *yneA* y *comK* ectópicamente desde el mismo promotor, observándose de forma sincronizada la activación de la expresión de *comK* y un retraso en la

esporulación. La expresión ectópica de *yneA* regulada por los promotores de esporulación incrementa la frecuencia de la competencia, pero no así de células DA (de hecho dicha frecuencia disminuye, Fig. 7.15). Estos resultados concuerdan con la hipótesis de la “carrera molecular”, ya que muestran que un retraso en la esporulación en cualquier fase de la formación de la espora favorece la entrada en competencia, dándole a este estado tiempo extra para iniciarse.

7.8. Discusión

Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que la probabilidad de iniciación de la competencia es independiente del programa de esporulación previamente a la decisión. No existe por tanto regulación cruzada antes de la toma de decisión celular en este sistema bacteriano. Uno de los principales hechos que llevan a esta conclusión es la existencia de células en el estado DA (“Dual activated”), donde ambos programas de diferenciación están activos simultáneamente, lo que demuestra la ausencia de puntos de control. Se pudo comprobar que las células que se encontraban en este estado en conflicto llegaban a una situación de exclusión mutua basada en la competición temporal entre la esporulación y la competencia. Una vez que las células consiguen desarrollar el septo y se produce la localización de SpoIIE no hay tiempo suficiente para que las células alcancen un estado de competencia funcional aunque se inicie la expresión de *comK*, por lo que se excluye dicho estado. Solamente un pequeño porcentaje de células entran en competencia e incluso un porcentaje menor entran en el estado DA. La ventaja de este mecanismo de regulación pasiva es que el coste asociado a esta carrera molecular solamente afecta a una pequeña fracción de la población, mientras que el coste de la expresión y regulación de un complejo sistema de regulación cruzada estaría activo en todas las células.

El hecho de que las células dispongan de diversos programas de diferenciación podría resultar beneficioso dependiendo de si éstas presentan un bias a la hora de

adoptar estados celulares diferentes. Además, la independencia entre los programas de diferenciación es más ventajoso dada la heterogeneidad inherente a la respuesta al estrés de la población (Chastanet et al., 2010).

La “carrera molecular” descrita en este Capítulo constituye un mecanismo sencillo de toma de decisiones de una forma precisa, que no requiere de complejas interacciones de regulación cruzada entre los programas de diferenciación previos a la toma de decisión celular. Los resultados obtenidos sugieren por tanto, un grado de independencia entre los programas de diferenciación estudiados. Se sabe por otro lado que algunos genes de *B. subtilis*, tales como el regulador transcripcional AbrB, ciertamente regulan de forma cruzada los estados de competencia y esporulación. Sin embargo, las medidas realizadas a nivel de células individuales muestran que dichos reguladores están activos de forma específica solamente durante la ejecución del programa de diferenciación elegido, después de la toma de decisión celular. Estos reguladores pueden ser críticos en el marco general del destino de las células después de la toma de decisión, pero tras los estudios realizados y los resultados obtenidos podemos decir que no participan activamente en los procesos que llevan al punto de decisión. Un mecanismo dinámico sencillo basado en la competición temporal parece ser el proceso más efectivo de dicha toma de decisión. En ese sentido los resultados descritos en este Capítulo enfatizan la importancia que suponen la dinámica y el tiempo relativo entre programas de diferenciación que compiten entre sí. De una forma específica y mediante la creación de interacciones de regulación cruzada artificial, hemos mostrado que mediante la perturbación del tiempo relativo para la consecución de los estados de competencia y esporulación, se puede controlar el resultado final en la toma de decisión. Las perturbaciones genéticas aplicadas a los circuitos que regulan la diferenciación celular permiten un control más preciso de la decisión celular, si se compara con los métodos de perturbación tradicional, como puede ser la delección de genes.

Capítulo 8

Progresión reversible hacia una decisión irreversible en *Bacillus subtilis*

En el Capítulo anterior hemos visto que la decisión de esporular requiere de un aumento gradual (y reversible) de la actividad del promotor del factor de esporulación Spo0A, entre otros. Al mismo tiempo, la decisión propiamente dicha viene marcada por la activación irreversible de otro factor, concretamente SpoIIR, que marca el punto de retorno del proceso de esporulación (Dworkin & Losick, 2005). Nos preguntamos en este Capítulo cuales son las ventajas de este doble carácter reversible e irreversible en la decisión hacia la esporulación en *B. subtilis*.

8.1. Reversibilidad e irreversibilidad de las decisiones celulares

Se han propuesto mecanismos de decisión celular que combinan la ultrasensibilidad y retroalimentación positiva dando lugar a una elección celular irreversible (de todo o nada), tal y como la que se observa durante la maduración de los oocitos de *Xenopus* (Ferrell & Machleder, 1998). Por otro lado, en aquellas células individuales que presentan respuestas irreversibles, puede faltar flexibilidad para responder adecuadamente a ambientes cambiantes, en donde incluso pequeños cambios reversibles pueden desencadenar respuestas irreversibles. Por el contrario, la progresión hacia nuevos estados celulares a través de pasos intermediarios reversibles permite flexibilidad y la capacidad de responder proporcionalmente a los cambios que se den en el ambiente. Por ejemplo, la diferenciación multipotente de las células madre hematopoiéticas es un proceso en el que las células pasan por diferentes estadios comprendidos por numerosos estados intermediarios reversibles que permite a las células adaptarse gradualmente a los cambios en la señalización extracelular (Moldovan, 2005). Esta estrategia, sin embargo, puede dar lugar a respuestas poco robustas, pues cambios no relevantes en las condiciones finales podrían causar una vuelta atrás no deseada en el proceso de decisión. En este sentido es lícito preguntarse cómo las células alcanzan un estado final robusto a la vez que mantienen la capacidad de responder a los cambios en el ambiente.

Para llegar a comprender cómo se produce la toma de decisión celular es muy importante determinar al nivel de células individuales la dinámica que rige la progresión de las células hacia un estado determinado. Con este fin, la medida simultánea de múltiples componentes de un programa de diferenciación multipotente puede ayudar a revelar la dinámica que tiene lugar en dicha toma de decisión. Como hemos visto en el Capítulo anterior, la bacteria *B. subtilis* constituye un modelo ideal en el cual se puede medir simultáneamente y en células individuales la dinámica de múltiples

genes que conforman un circuito de diferenciación. Además, en la Sección 3.2 del Capítulo 3, vimos que en un ambiente de estrés nutricional la mayoría de las células de *B. subtilis* forman esporas que sobreviven a estas condiciones de estrés (Piggot & Hilbert, 2004). El programa que gobierna la esporulación ha sido ampliamente caracterizado a nivel de los genes involucrados (Schultz et al., 2009), pero la dinámica (al nivel de células individuales) del proceso que lleva a la formación de esporas, y las implicaciones funcionales de la misma a nivel poblacional, han sido mucho menos estudiadas. Con la finalidad de entender dicha dinámica en células de *B. subtilis* hemos medido simultáneamente, como se ha descrito en el Capítulo anterior, la actividad de múltiples componentes del circuito que regula la esporulación a nivel de células individuales. A partir de la información obtenida de dichas medidas moleculares, se pueden extraer conclusiones de la dinámica celular observada sobre la funcionalidad de la misma a nivel poblacional.

8.2. Progresión gradual hacia la esporulación

El inicio de la progresión hacia la esporulación en *B. subtilis* está controlado por una cadena de fosforilaciones que incluye dos fosfotransferasas, Spo0F y Spo0B y un factor de transcripción, Spo0A (Piggot & Hilbert, 2004). La proteína Spo0F integra una amplia variedad de señales de estrés y como resultado se fosforila (Burbulys et al., 1991). El grupo fosfato se transfiere a través de Spo0F a Spo0A a través de Spo0B. El regulador principal de la esporulación es Spo0A, el cual tras su fosforilación controla la expresión de unos 120 genes, incluido *spo0F* (Fujita et al., 2005). Entre estos genes se encuentra también la proteína SpoIIE, necesaria para la activación del factor de transcripción específico de la forespora (σ^F) y cuya localización en el septo asimétrico es el primer marcador morfológico de la formación de la espora (Barak et al., 1996). La activación de σ^F en la forespora activa la expresión de SpoIIR, lo cual activa a su vez σ^E , factor de transcripción específico de la célula madre que activa la expresión

de numerosos genes de esporulación tardíos (Karow et al., 1995). Es en este punto cuando la célula está comprometida irreversiblemente hacia la esporulación (Karow et al., 1995; Dworkin & Losick, 2005).

Mediante el uso de proteínas fluorescentes cuantificamos la actividad de Spo0A, Spo0F y SpoIIR, como se muestra en la Fig. 8.1 (paneles superior y medio). También medimos la localización de la proteína SpoIIE (panel inferior). Cada gen de esporulación se midió simultáneamente con la actividad del promotor de SpoIIR, lo que permitió establecer el perfil temporal para los diferentes estadios de la esporulación en células individuales.

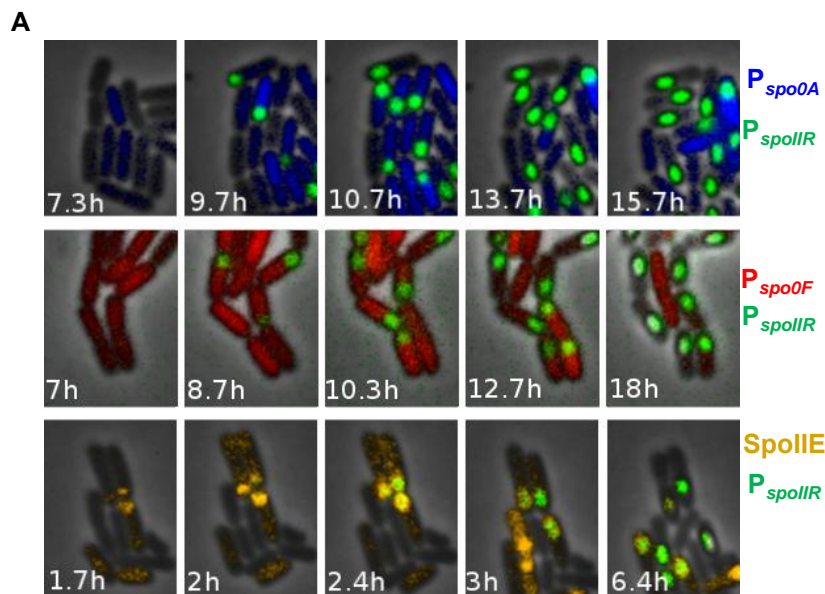


Figura 8.1: Serie de imágenes de *B. subtilis* en esporulación expresando pares de genes, en concreto y para todos los paneles se expresa CFP regulado por el promotor P_{spoIIR} (en verde). En todas las células se expresa YFP regulado por P_{spo0A} (en azul, panel superior), P_{spo0F} (en rojo, panel medio) y como fusión con la proteína SpoIIE (en naranja, panel inferior).

Esta cuantificación se muestra en la Fig. 8.2. En esta figura se representa la actividad a lo largo del tiempo de las proteínas mencionadas anteriormente (tres primeros

paneles a la izquierda), junto al promedio de dichas series temporales en el cuarto panel. La figura muestra la existencia de una secuencia temporal entre estas proteínas, con Spo0A activándose en primer lugar y SpoIIR en último lugar. En la Fig. 8.3 se muestra un esquema de los estados celulares en los que se puede dividir la progresión hacia la formación de esporas.

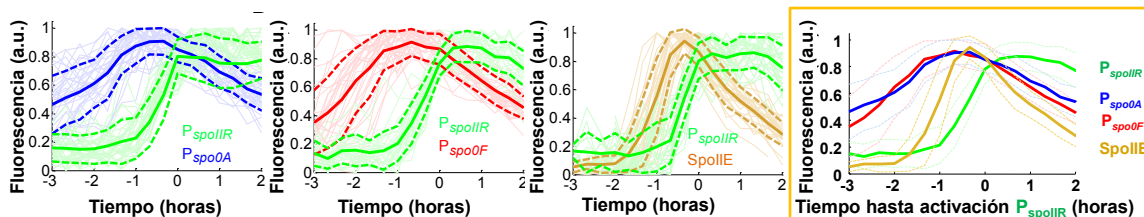


Figura 8.2: Dinámica de la activación de los promotores de diversos genes asociados con la esporulación durante un evento típico de formación de una espora: series temporales de células individuales (líneas continuas claras), series temporales promedio (líneas oscuras sólidas) y desviación estándar (líneas oscuras punteadas). Todas las series se alinearon en relación a la activación de P_{spoIIR} (en verde), definida como el punto donde la actividad de $SpIIR$ sobrepasa el 70 % de su valor máximo de actividad. Estos datos se combinan para generar la gráfica de la derecha resaltada en naranja.

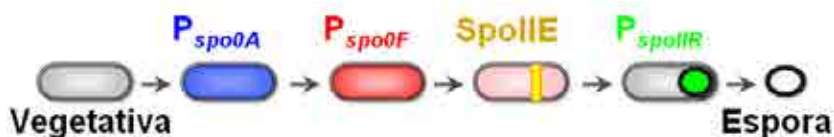


Figura 8.3: Secuencia temporal de los estados celulares durante la progresión hacia la formación de esporas.

Las medidas tomadas para los genes de esporulación en células individuales muestran que la progresión hacia la formación de la espora se comprende de pasos reversibles. En particular, durante las fases tempranas de dicha progresión las células exhiben picos de actividad de P_{spo0A} que no dan lugar a la formación de la espora (Fig. 8.4A). Este comportamiento no es sincrónico en la población, siendo la activación de Spo0A durante la esporulación de *B. subtilis* heterogénea a nivel de células individuales (Chastanet et al., 2010). Se observaron picos de expresión de igual manera en P_{spo0F} (Fig. 8.4B). Debido a que P_{spo0F} se activa mediante Spo0A fosforilado, la dinámica de este promotor nos informa acerca de la actividad de Spo0A. Consecuentemente, los picos observados en P_{spo0F} no sólo indican su propia actividad sino que indican también la de Spo0A. Los picos en la expresión de los genes estudiados introducen variabilidad y reversibilidad durante los estados tempranos del proceso de formación de la espora, mientras que los estados tardíos no se ven afectados por esta situación estocástica. Además, se observa la localización reversible de la proteína SpoIIE en aproximadamente un $2 \pm 1\%$ (SEM) de las células (Fig. 8.4C). En concreto se observaron eventos de localización transitoria de la fusión de proteínas SpoIIE-YFP al septo asimétrico que no dieron lugar a la formación de esporas. En estas células la proteína SpoIIE cambia su posición entre los polos de la célula y ésta acaba dividiéndose (Fig. 8.4C). Por el contrario, no se detectaron picos de actividad en la expresión de P_{spoIIR} , promotor de esporulación tardío (Fig. 8.4A-C), sino un acusado incremento en su señal de actividad, que como se ha comentado en el Capítulo anterior se corresponde con el punto de no retorno en la decisión hacia la esporulación (Dworkin & Losick, 2005). Se han observado picos de actividad de promotores y localización de proteínas en células individuales de forma similar en otros sistemas, la cual cosa se atribuye a la naturaleza estocástica y reversible de los procesos biológicos (Dubnau & Losick, 2006).

La reversibilidad observada en células individuales es distinta de la ya reportada a nivel poblacional en la que se mostró que la esporulación se puede abortar transfi-

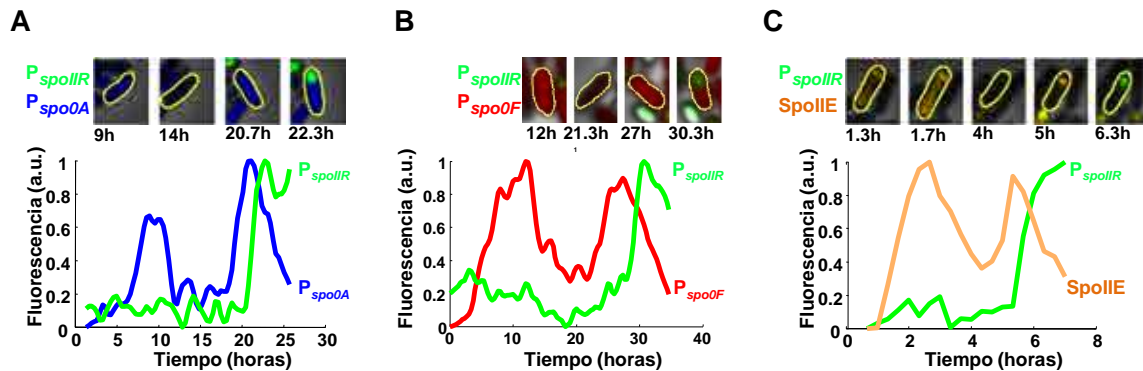


Figura 8.4: Comportamiento dinámico de una célula de la cepa que expresa (A) P_{spo0A} -*cfp* (azul). (B) P_{spo0F} -*yfp* (rojo). (C) proteína de fusión SpoIIE-YFP (naranja). En todos los casos, la actividad de P_{spoIIR} -*cfp* (verde). Los paneles superiores muestran en cada caso las imágenes tomadas para las células analizadas.

riendo las células de un medio de estrés a un medio rico (Dworkin & Losick, 2005). Por el contrario, la reversibilidad demostrada en este estudio en células individuales parece responder a un comportamiento autónomo que ocurre al azar y sin que se produzcan cambios en las condiciones ambientales. Este comportamiento ha sido observado en otras situaciones tales como la generación de resistencia a antibióticos en *E. coli* (Balaban et al., 2004).

8.3. Compromiso irreversible a la esporulación en *B. subtilis*

Según se ha visto en la Fig. 8.4 la activación de P_{spoIIR} (línea verde), que como se menciona anteriormente es el punto de compromiso celular hacia la esporulación, es de forma abrupta. Para cuantificar cuándo se produce el compromiso celular se utilizó la morfología de las esporas (zona brillante en las células de la imagen de fase) como punto de referencia para medir el tiempo de compromiso celular (Fig. 8.5A).

El análisis de células individuales muestra que la distancia temporal entre la activación de P_{spoIIR} y la formación de una forespora morfológicamente visible tiene una distribución muy ajustada (Fig. 8.5B). La precisión temporal del punto de toma de decisión celular fue previamente pasada por alto en las medidas tomadas a nivel poblacional (Fig. 8.2), debido a la variabilidad entre células en la progresión reversible a la formación de la espora.

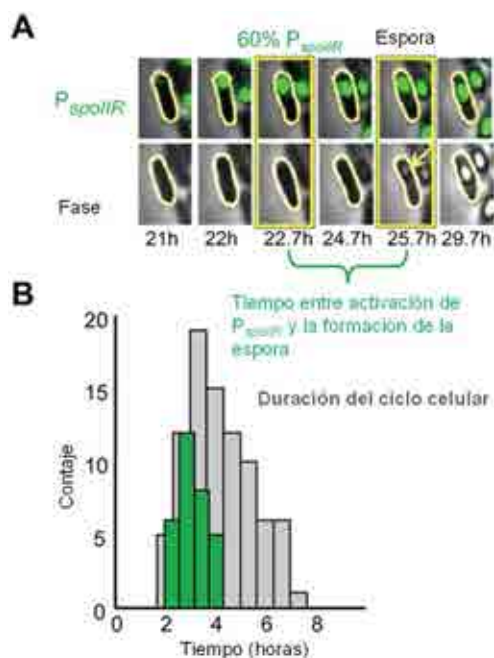


Figura 8.5: (A) Imágenes en fluorescencia (panel superior) y fase (panel inferior) de células en esporulación. La activación de P_{spoIIR} se define como el instante en el que la actividad del promotor supera el 60% del máximo de fluorescencia expresada por P_{spoIIR} . Se observa la activación de P_{spoIIR} en la forespora (verde). Se ha indicado con una flecha la aparición de una espora en fase. (B) histograma de la distribución de tiempo (en verde) entre la activación de P_{spoIIR} y la aparición de la espora (eventos recuadrados en amarillo en A). En gris se muestra el histograma de la duración de los ciclos celulares medidos en las mismas células.

8.4. Modelos poblacionales de la toma de decisión en *B. subtilis*

Con el fin de analizar las ventajas potenciales de este mecanismo híbrido de decisión, se compararon las respuestas obtenidas en tres modelos simples de toma de decisión en un ambiente de estrés cambiante. Estos modelos describen las dinámicas seguidas en una población de células que progresan hacia la esporulación en condiciones de estrés, en términos del número de células que existen en cada momento y en los diferentes estados en los que se encuentran durante la progresión, comenzando en el estado vegetativo y terminando en el estado de espora.

Los tres modelos se muestran de forma esquemática en la Fig. 8.6, donde en el panel superior se observa una situación de todo o nada e irreversibilidad, en el que las células deciden en un solo paso si esporulan y dicha decisión es irreversible. A este modelo le denominaremos *irreversible*. En el panel central se puede ver como las células pasan de forma gradual a través de múltiples estados intermediarios reversibles en el camino hacia la esporulación, donde solamente la última transición al estado de espora después de la decisión (que es puramente un estado *reporter*) es irreversible. A este modelo le denominaremos *reversible*. En el último panel se observa el tercer modelo, al que denominaremos *híbrido*, en donde se combina la progresión gradual a través de estados intermediarios reversibles con una decisión irreversible antes de la transición a espora.

Como se ha dicho anteriormente, pretendemos desarrollar modelos que describan la dinámica de una población celular hacia la esporulación en condiciones de estrés en términos del número de células que existen en cada momento y en los diferentes estados durante la progresión a la formación de esporas. Dicha dinámica de poblaciones celulares se puede describir mediante un conjunto de ecuaciones diferenciales ordinarias acopladas y lineales.

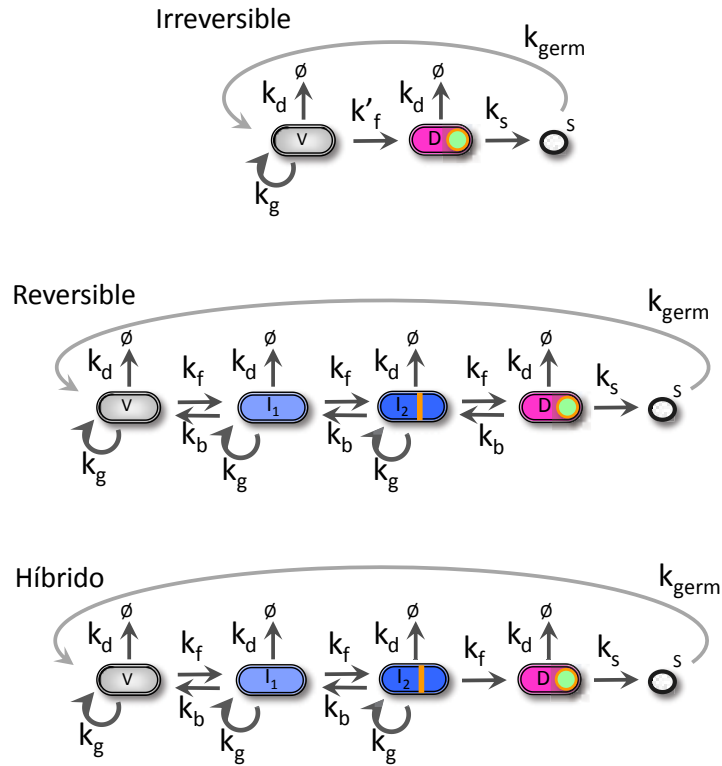


Figura 8.6: Esquema de los tres modelos usados para estudiar la transición hacia la esporulación. En el panel superior se observa el modelo *irreversible*, donde la decisión a esporular se lleva a cabo en un solo paso, y con solo tres estados; vegetativo (V), decidido (D) y esporula (S). En el panel central el modelo *reversible*, donde las células vegetativas (V) avanzan al estado de esporulación a través de dos estados intermedios I_1 e I_2 , y donde hasta el estado decidido (D) las transiciones son reversibles. Se observa en el último panel el modelo *híbrido* en el que se combinan características de los modelos descritos anteriormente. Se muestran las constantes de transición entre estados K_f y K_b , y los ritmos de generación K_g , de esporulación K_s , de germinación K_{germ} y de muerte K_d . Para los tres modelos, las constantes de transición entre estados, de crecimiento y muerte (\emptyset) están acopladas al nivel de estrés.

Para la implementación de los tres modelos se aplica el procedimiento detallado en la Sección 4.3, que lleva al siguiente sistema de ecuaciones:

$$\frac{d\mathbf{n}}{dt} = \mathbf{A}\mathbf{n}, \quad (8.1)$$

donde \mathbf{n} es el vector de estado del sistema, que da el número de células en cada estado celular, y \mathbf{A} es la matriz que contiene los ritmos de transición entre poblaciones celulares. En el esquema de la Fig. 8.6 se definen los diferentes parámetros del modelo: constantes de transición entre estados y ritmos de crecimiento, germinación y muerte.

Como se puede deducir de la Fig. 8.6, para cada modelo las estructuras de \mathbf{n} y \mathbf{A} son diferentes:

- En el modelo *irreversible*, las células deciden en un solo paso si esporulan o no. El modelo se comprende de tres estados diferentes: vegetativo (V), decidido (D) y espora (S). El correspondiente vector de estados es de tres dimensiones, $\mathbf{n} = (v, d, s)^T$ (con el superíndice ‘T’ indicando la transposición del vector). La matriz de transición tiene la forma:

$$\mathbf{A} = \begin{pmatrix} -k'_f - k_d + k_g + k_{\text{germ}} & 0 & 0 \\ k'_f & -k_d - k_s & 0 \\ 0 & k_s & -k_{\text{germ}} \end{pmatrix}$$

El rango de \mathbf{A} es 2 porque la dinámica de las esporas no afecta a las otras dos variables.

- En el modelo *reversible*, la transición del estado vegetativo a esporas transcurre en múltiples pasos. Se asumen dos estados intermedios (I_1 e I_2). En este caso no existe una decisión de todo o nada, ya que la última transición al estado decidido (D) es reversible. El vector de estados es de cinco dimensiones, $\mathbf{n} = (v, i_1, i_2, d, s)^T$. La matriz de transición tiene la siguiente forma:

$$A = \begin{pmatrix} -k_f - k_d + k_g + k_{\text{germ}} & k_b & 0 & 0 & 0 \\ k_f & k_g - k_d - k_b - k_f & k_b & 0 & 0 \\ 0 & k_f & k_g - k_d - k_b - k_f & k_b & 0 \\ 0 & 0 & k_f & -k_s - k_d - k_b & 0 \\ 0 & 0 & 0 & k_s & -k_{\text{germ}} \end{pmatrix}$$

- El modelo *híbrido*, combina como se ha dicho anteriormente, características de los modelos *irreversible* y *reversible*. Por un lado el modelo es irreversible debido a que la transición al estado decidido (D) es de todo o nada, y por otro lado el modelo progresa gradualmente mediante estados intermedios. El vector de estados es de cinco dimensiones, $\mathbf{n} = (v, i_1, i_2, d, s)^T$, y la matriz de transición tiene la forma:

$$A = \begin{pmatrix} -k_f - k_d + k_g + k_{\text{germ}} & k_b & 0 & 0 & 0 \\ k_f & k_g - k_d - k_b - k_f & k_b & 0 & 0 \\ 0 & k_f & k_g - k_d - k_b - k_f & 0 & 0 \\ 0 & 0 & k_f & -k_s - k_d & 0 \\ 0 & 0 & 0 & k_s & -k_{\text{germ}} \end{pmatrix}$$

Los valores que hemos elegido para las constantes de transición de los que A depende se definen en la Tabla 8.1.

La solución de la ecuación lineal 8.1 se puede escribir de la forma:

$$\mathbf{n}(t) = \sum_{i=1}^d c_i \mathbf{v}_i \exp(\lambda_i t), \quad (8.2)$$

donde d hace referencia a la dimensión de la matriz A, de la que sus valores propios están representados por λ_i y sus vectores propios por \mathbf{v}_i . Los escalares c_i son las constantes de integración que dependen de las condiciones iniciales. La solución 8.2 puede expresarse de una forma más compacta definiendo la matriz $d \times d$ de vectores propios V (de la cual sus columnas son los vectores propios de A), la matriz $d \times d$

Ratio	Valor (fase rica)	Valor (fase pobre)
k_f	0	0.6
k'_f	0	0.2
k_b	20	0
k_g	1	0.1
k_d	0.1	1
k_s	0	0.2
k_{germ}	0.1	0

Tabla 8.1: Parámetros utilizados en las fases rica y pobre.

de valores propios Λ (matriz cuyos elementos de la diagonal son los valores propios de \mathbf{A}), y el vector \mathbf{c} (de dimensión d) de constantes de integración. De esta forma la solución de 8.2 se puede escribir como:

$$\mathbf{n}(t) = \mathbf{V} \exp(\Lambda t) \mathbf{c} \quad (8.3)$$

Los valores de las constantes de integración se pueden escribir en términos de las condiciones iniciales mediante:

$$\mathbf{n}(0) = \mathbf{V} \mathbf{c} \quad \implies \quad \mathbf{c} = \mathbf{V}^{-1} \mathbf{n}(0)$$

De esta forma la expresión final para definir la dinámica del sistema es:

$$\mathbf{n}(t) = \mathbf{V} \exp(\Lambda t) \mathbf{V}^{-1} \mathbf{n}(0) \quad (8.4)$$

8.5. Progresión a la esporulación en condiciones de estrés cambiante

Hemos utilizado la expresión 8.4 para determinar la progresión de la población hacia el estado de esporulación en un ambiente cambiante, sometiendo a las células a ciclos de estrés dicotómico, alternando fases de bajo estrés (medio de crecimiento rico) y alto estrés (medio de crecimiento pobre), que se muestran esquemáticamente en la Fig. 8.7. Se ha asumido que durante las fases de estrés bajo, no existe una progresión al estado de esporulación, por lo que $k_f = k_s = 0$ y el ritmo de muerte es pequeño si se compara con el de crecimiento (k_g). Además se considera que durante la fase de estrés elevado no existe la posibilidad de revertir el camino hacia la esporulación ($k_b = 0$).

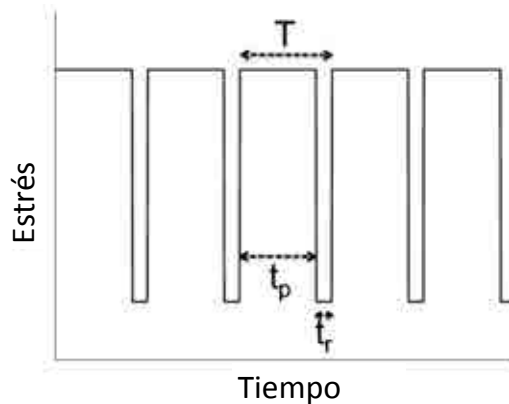


Figura 8.7: Esquema de los ciclos de estrés dicotómico en el que se alternan fases de bajo estrés (medio de crecimiento rico), y alto estrés (medio de crecimiento pobre). T es la duración total de un ciclo, y t_p y t_r se corresponden con la duración de la fase pobre y rica, respectivamente.

Si T es la duración total de un ciclo, y t_p y t_r representan la duración de la fase pobre y rica, respectivamente, después de la fase pobre del primer ciclo la población

se representa por el vector de estado,

$$\mathbf{n}(t_p) = \mathbf{V}_p \exp(\Lambda_p t_p) \mathbf{V}_p^{-1} \mathbf{n}(0) \quad (8.5)$$

En el ambiente cíclico de la Fig. 8.7 este valor se corresponde con la condición inicial de la siguiente fase (fase rica), al final de la cual la población viene dada por:

$$\mathbf{n}_1 = \mathbf{V}_r \exp(\Lambda_r t_r) \mathbf{V}_r^{-1} \mathbf{V}_p \exp(\Lambda_p t_p) \mathbf{V}_p^{-1} \mathbf{n}_0 \quad (8.6)$$

donde el subíndice en \mathbf{n} representa el ciclo. Aplicando la ecuación anterior de forma iterativa, la población después de q ciclos vale:

$$\mathbf{n}_q = (\mathbf{V}_r \exp(\Lambda_r t_r) \mathbf{V}_r^{-1} \mathbf{V}_p \exp(\Lambda_p t_p) \mathbf{V}_p^{-1})^q \mathbf{n}_0 \quad (8.7)$$

Tras someter a los tres modelos descritos anteriormente a variaciones aleatorias del ambiente, alternando períodos de alto y bajo estrés (inset en Fig. 8.8), y manteniendo la duración total de cada ciclo constante, se calculó el *fitness* relativo del modelo híbrido, medido como el cociente del número total de células en la población entre este modelo respecto de los modelos reversible e irreversible (Fig. 8.8, líneas azules y rojas, respectivamente).

El resultado mostrado en la Fig. 8.8 muestra que la supervivencia de los diferentes modelos dependen del perfil de estrés impuesto, ya que ninguno de ellos domina en todo el rango de condiciones de estrés aplicado, pero cabe destacar que el modelo híbrido siempre responde mejor que al menos alguno de los dos modelos alternativos para todos los perfiles de estrés considerados. Tal y como muestra la línea azul en la Fig. 8.8, el modelo híbrido sobrepasa al modelo irreversible para duraciones cortas de la fase de estrés elevado, ya que este último lleva a las células irreversiblemente a la esporulación incluso para períodos cortos de estrés. Bajo estas mismas condiciones, el modelo híbrido y el reversible (línea roja) responden de manera similar, ya que en ambos modelos la progresión reversible retrasa la esporulación. Si observamos el límite opuesto, es decir la parte derecha de la Fig. 8.8, el modelo irreversible sobrepasa

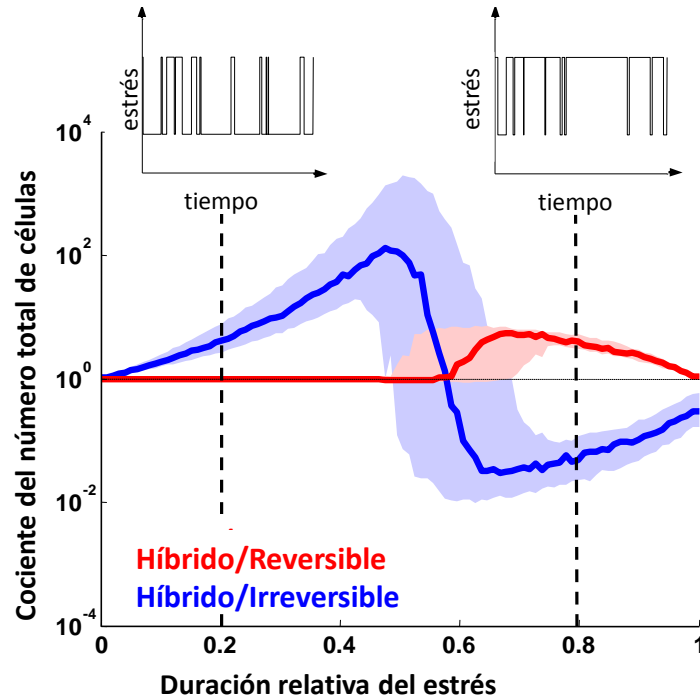


Figura 8.8: *Fitness* relativo del modelo híbrido respecto de los modelos irreversible y reversible. Las líneas azul y roja corresponden al cociente de la población celular total (suma de todos los estados) entre los modelos híbrido y reversible e irreversible, respectivamente. Se ha aplicado una variación aleatoria en el ambiente a los tres modelos con una media de duración relativa de estrés alto vs bajo que se incrementa en el eje x. Las áreas sombreadas representan la variación máxima para cambios aleatorios en aquellos parámetros diferentes de cero de hasta un 20% alrededor de los valores dados en la Tabla 8.1. Las dos inset corresponden a ejemplos de perfiles de estrés para una duración media de alto estrés de 0.2 y 0.8

al híbrido para duraciones largas de la fase de alto estrés, ya que la capacidad de respuesta en este caso es una desventaja. Para fases largas de elevado estrés, las esporas se encuentran en ventaja respecto del resto de células ya que estas últimas poseen un ratio de muerte mayor que de crecimiento bajo condiciones de estrés. En este límite el modelo híbrido es mucho más efectivo que el modelo reversible, ya

que este último se aleja de la esporulación incluso en períodos cortos de fase rica. El análisis de sensibilidad de los parámetros muestra que los resultados obtenidos se ajustan en un amplio rango de parámetros (Fig. 8.8, regiones roja y azul sombreadas).

Los resultados obtenidos nos muestran que el modelo híbrido responde mejor sobre los otros dos modelos en un amplio rango de perfiles cambiantes de estrés, debido a su capacidad de respuesta y recuperación a largo plazo del estrés y su robustez durante los períodos cortos de fase rica.

A continuación se compararon los tres modelos bajo condiciones variables en la fracción de tiempo que pasan en la fase de estrés elevado. Para ello las células se expusieron a un muestreo de cien perfiles de estrés variable (como en el ejemplo mostrado en el inset de la Fig. 8.9). Después se calculó el cociente del número de células en la población del modelo híbrido frente a los modelos irreversible y reversible, obteniéndose el *fitness* relativo de cada uno (Fig. 8.9). Los datos muestran que el modelo híbrido tiene un *fitness* mayor que los modelos irreversible y reversible cuando la población está bajo condiciones ambientales cambiantes. En conclusión, la combinación de una progresión gradual hacia una decisión irreversible en *B. subtilis*, representada por el modelo híbrido y coherente con las observaciones experimentales, permite al sistema enfrentarse a un rango mucho más amplio de condiciones de estrés impredecibles.

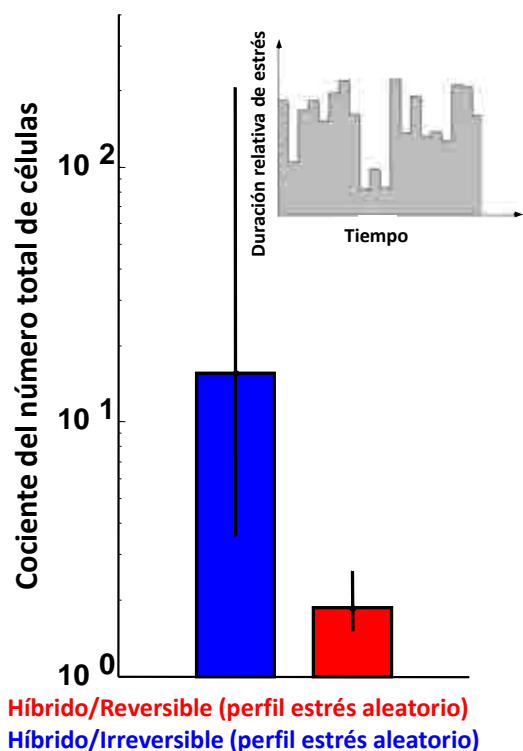


Figura 8.9: *Fitness* medio del modelo híbrido respecto de los modelos irreversibles y reversibles en presencia de una variación aleatoria de las condiciones ambientales. Las barras azules y rojas representan el cociente del número total de células en la población del modelo híbrido frente a los modelos irreversible y reversible, respectivamente, promediados sobre cien valores de la duración media de estrés alto versus bajo (igual que en la Fig. 8.8). Para cada nivel de estrés, los modelos se integraron treinta horas en las mismas condiciones que en la Fig. 8.8. Las barras de error representan la variación máxima para cambios aleatorios en aquellos parámetros diferentes de cero de hasta un 20% alrededor de los valores dados en la Tabla 8.1. En el inset se muestra un ejemplo de serie de niveles de estrés variable como las utilizadas para el estudio.

8.6. Discusión

Medidas tomadas a nivel de células individuales de los componentes principales en el proceso hacia la esporulación en *B. subtilis* muestran la progresión temporal hacia dicho estado. Estas características no se pueden observar con las medidas tomadas a nivel poblacional, ya que al promediar sobre la población celular se omitiría la variabilidad entre células.

Las observaciones realizadas en este Capítulo, basadas en medidas de múltiples componentes del sistema de decisión de la esporulación de forma simultánea y en la misma célula, permite identificar puntos de referencia temporales en la célula pa-

ra poder establecer de una forma precisa la secuencia en la que se producen los diversos eventos moleculares que conducen a esta decisión celular. Los resultados indican que el proceso de diferenciación en esporas del organismo *B. subtilis* combina regímenes dinámicos opuestos tales como la reversibilidad/gradualidad y la irreversibilidad/carácter todo-o-nada. En este Capítulo mostramos mediante un estudio teórico que dicha estrategia híbrida permite conciliar requerimientos contradictorios tales como la adaptabilidad y la robustez en la toma de decisión celular.

El tiempo que requieren las células para formar las esporas es muy variable, la cual cosa les permite disponer de una amplia distribución de tiempos de espera, antes de decidirse por un estado celular u otro. Esto último hace que este organismo tenga un período de tiempo considerable para responder a los cambios medioambientales que sucedan, por lo que la variabilidad en la progresión hacia la formación de esporas pueda suponer una ventaja biológica. Los resultados obtenidos amplían otros estudios en los que se puede ver el papel ventajoso de la estocasticidad a la hora de potenciar la supervivencia bajo condiciones ambientales inciertas (Thattai & van Oudenaarden, 2004).

La decisión final de esporular viene gobernada por una dinámica irreversible de todo o nada, lo cual proporciona la ejecución fiable del programa de esporulación. En células de mamífero se ha visto que la decisión de ir hacia la apoptosis (muerte celular programada), es una decisión rápida con una progresión lenta, lo que sugiere que utilizan una estrategia híbrida similar a la estudiada en este caso (Choi et al., 2007). Es por esto que esta estrategia de combinar comportamientos dinámicos opuestos podría ser común a otros procesos en las células, representando un mecanismo general utilizado en la toma de decisión celular en condiciones ambientales impredecibles.

Parte III

Conclusiones

Capítulo 9

Conclusiones

En esta Tesis hemos estudiado diversos procesos celulares dinámicos en bacterias incluyendo oscilaciones genéticas, pulsos de activación y diferenciación multipotente. En este Capítulo presentamos las conclusiones principales obtenidas en los distintos estudios realizados, describimos las cuestiones que quedan abiertas en cada tema, y planteamos nuevos estudios que se pueden realizar como continuación de esta Tesis.

9.1. Conclusiones

9.1.1. Dinámica de la regulación cromosómica en *Escherichia coli*

Hemos caracterizado, al nivel de células individuales, el efecto de diversas proteínas implicadas en el control del inicio de la replicación del ADN en *Escherichia coli*. Esto se ha realizado perturbando el sistema mediante la sobreexpresión de dichas proteínas. Nos referimos concretamente a la proteína SeqA y aquellas que conforman el sistema RIDA, denominadas Hda y DnaN. Los resultados obtenidos muestran

que la sobreexpresión de las moléculas que forman el complejo RIDA da lugar a un aumento significativo en el período de los ciclos celulares y un incremento en la masa celular previa a la división, en comparación con el comportamiento de una cepa control de *Escherichia coli* que no sobreexpresa las proteínas de estudio. El problema con el que nos enfrentamos en este estudio, es el carácter transitorio del efecto que ejerce sobre la replicación del ADN la sobreexpresión de las proteínas de interés. Por otro lado, se podría tratar de un efecto producido por la adaptación de las células al medio en el que se realizan los experimentos, ya que éstas pasan de medio líquido a sólido para poderlas filmar por microscopía. Se debe tener en cuenta que una vez se procede a la toma de imágenes, las bacterias han pasado un período de dos horas aproximadamente en este medio sólido durante el tiempo de secado y equilibrado del pad, lo cual debería ser suficiente para su adaptación. En cualquier caso, si se comparan los datos obtenidos con la cepa control, se puede ver que el efecto en el período celular de la sobreexpresión de $P_{ara-hda-dnaN-yfp}$ dura unos 200 minutos si se compara con la cepa que sobreexpresa $P_{ara-seqA-yfp}$, el cual es de unos 100 minutos.

9.1.2. Control multiparamétrico de la competencia en *Bacillus subtilis*

Hemos establecido la forma en que un circuito genético sencillo, concretamente el que regula el estado de competencia en *B. subtilis*, integra múltiples señales que le llegan de forma simultánea actuando sobre diferentes puntos de dicho circuito. Este estudio se ha llevado a cabo mediante señales químicas que controlan la expresión constitutiva de genes elementales de la competencia, y mediante una perturbación genética en forma de número de copias de uno de estos genes.

Los resultados obtenidos de forma experimental e *in silico* muestran que, dependiendo de la naturaleza de las perturbaciones, el circuito integra dicha información

dando una respuesta fenotípica diferente según el caso. Si ambas perturbaciones inciden sobre el mismo elemento del circuito, en este caso ComS (expresión constitutiva y número de copias), la respuesta no difiere en el caso de que cada perturbación actúe por separado. Si las perturbaciones actúan sobre diferentes elementos, en este caso ComK y ComS, la respuesta sí es diferente en el caso de que las perturbaciones sean independientes. En la Sección 9.2.2 se presenta un ejemplo de este método de estudio del circuito de regulación de la dinámica de desarrollo en crecimiento filamentoso y reproducción sexual en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

9.1.3. Competición dinámica entre decisiones celulares alternativas

En las células existen diferentes y múltiples programas de diferenciación que actúan de forma simultánea. Éstas deben tomar decisiones y optar por uno u otro eligiendo el programa adecuado. Muchos de estos programas interaccionan entre sí y existen muchas preguntas acerca de la forma en que lo hacen.

En este estudio se midió en células individuales la actividad de dos programas que compiten entre sí, concretamente la esporulación y la competencia en *B. subtilis*. Los resultados sugieren que el inicio del estado de competencia es independiente de la esporulación, lo cual contradice la hipótesis de que existe una regulación cruzada entre ambos programas antes del punto de decisión. Podemos decir entonces que dicha regulación cruzada sólo existe tras la toma de decisión para la correcta ejecución del programa de elección celular.

Se pudo identificar células en un estado al que se denominó como DA (*dual activated*), en las que ambos programas estaban activos. Cuando se encontraban en el punto de compromiso hacia la formación de esporas, comenzaban a expresar el regulador principal de la competencia, pero procedían a la formación de esporas; se les había acabado el tiempo para desarrollar un estado funcional de competencia.

Esto lleva a la idea de una *carrera molecular* entre ambos programas, la cual se comprobó mediante la creación de interacciones entre ambos programas de forma artificial, expresando el regulador de la competencia bajo el control de promotores que se activan en diferentes momentos de la progresión hacia la esporulación. Se pudo ver que mediante la perturbaciones del tiempo entre la competencia y la esporulación se puede controlar la elección celular.

El método utilizado en este estudio para el seguimiento de la dinámica de cada programa de diferenciación es mucho más eficiente que el método habitual de deleción genética, donde se podrían eliminar componentes determinantes para el desarrollo de un programa u otro.

9.1.4. Progresión reversible hacia una decisión irreversible en *Bacillus subtilis*

El ambiente extracelular es cambiante y las células deben adaptarse a las condiciones externas y responder a dichos cambios. En esta Tesis hemos cuantificado en células individuales la expresión genética y la localización de proteínas en el organismo *B. subtilis* para comprender la dinámica durante la formación de esporas.

Los resultados obtenidos demuestran que la esporulación tiene lugar mediante estados reversibles y ruidosos que confluyen en un punto de compromiso celular irreversible (de todo-o-nada). En las medidas tomadas en células individuales se observaron picos de expresión en genes de esporulación, y localización transitoria de proteínas durante el proceso de esporulación. Se implementaron modelos matemáticos poblacionales para determinar el efecto de la reversibilidad en la robustez de la progresión a la esporulación, y la adaptabilidad celular ante las condiciones fluctuantes de estrés ambiental. Los resultados obtenidos mostraron que la reversibilidad observada permite que las células se mantengan capaces de responder a fluctuaciones externas de larga duración. Por otro lado, el punto de compromiso celular irreversible hacia la

esporulación hace que la ejecución del programa de esporulación tras la toma de decisión celular sea robusta ante períodos cortos de reducción de estrés.

Se puede concluir que la combinación de reversibilidad e irreversibilidad hace que la toma de decisión celular sea adaptable y a su vez robusta ante una situación de condiciones ambientales fluctuantes. Se puede decir por tanto que las células utilizan este método híbrido de toma de decisión para afrontar los cambios en las condiciones externas donde se encuentran.

9.2. Perspectiva futura

9.2.1. Dinámica de la replicación cromosómica en *Escherichia coli*

Sería conveniente la determinación de la cantidad de proteína que se sobreexpresa en cada cepa y compararla con la cepa *wild type*. En relación a lo anterior, los experimentos se realizaron en cepas a las que no se les ha delecionado el gen natural de las proteínas de análisis. Una deleción en estos genes, aseguraría que el efecto observado es a causa de la sobreexpresión y no debido a la expresión de los genes naturales. Si los experimentos se llevan a cabo en cepas con deleciones en los genes que expresan las moléculas de interés, se podría determinar la cantidad de proteína que se sobreexpresa, con lo que podremos comprobar en el tiempo si se siguen expresando las proteínas de interés pasados los 100 y 200 minutos que perdura el efecto transitorio ejercido en el ciclo celular.

El análisis realizado en este estudio se podría llevar a cabo también en un medio pobre, y observar y cuantificar en ese caso el efecto que las proteínas estudiadas producen en el ciclo celular, ya que se ha visto que existe relación entre la masa celular en el momento de la división y la disponibilidad de nutrientes (Chien et al.,

2012).

Lo que se espera de la sobreexpresión de proteínas que regulan negativamente la frecuencia de iniciación de la replicación, es lo contrario a lo observado por Camara et al. (2005), en donde al deletar dichos genes se producía un aumento en el ratio de replicación de regiones cercanas a oriC en el cromosoma (ver página 98). En nuestro caso, disminuiría el ratio de replicación de los genes que se encuentran cerca de oriC relativas a las secuencias de terminación. Para observar si realmente existe un efecto tras la perturbación, se podría clonar en el genoma de *Escherichia coli* cerca de OriC una proteína fluorescente, diferente a la que se co-expresa con las proteínas SeqA y Hda-DnaN, en este YFP, y cuantificar a nivel de células individuales los niveles de dicha proteína, incluso en la cepa *wild type*, determinando antes y después de perturbar el sistema si realmente existe un efecto de arresto en la replicación del ADN.

9.2.2. Integración de señales en circuitos celulares

El estudio de la respuesta que ofrecen los circuitos genéticos, mediante la variación del número de copias y el control de la expresión constitutiva de genes elementales, descrito en el Capítulo 6, se podría aplicar en organismos eucariotas más complejos como las levaduras. En estas últimas se conocen muchos componentes de las cascadas de señalización celular, pero falta mucho por saber en algunos casos como se interrelacionan los elementos que las componen. A continuación, se propone el estudio de la integración de señales recibidas por parte de las levaduras para optar entre dos comportamientos tales como el crecimiento filamentoso y la reproducción sexual. Mediante el control químico de la expresión constitutiva de uno de los elementos que regulan la reproducción sexual, y mediante la variación del número de copias de uno de los genes que regulan el comportamiento filamentoso, se pretende perturbar ambas cascadas de regulación de forma simultánea y estudiar su comportamiento

dinámico.

Las levaduras son organismos eucariotas y entre ellas encontramos a *Saccharomyces cerevisiae*. Estas levaduras se reproducen por división asexual (*budding*) y por reproducción sexual (*mating*). Esto último ocurre cuando dos tipos celulares MATa y MAT α secretan feromonas (factor-a y factor- α , respectivamente) y el tipo celular opuesto expresa el receptor apropiado para la feromona (Moore et al., 2008). Las células MATa y MAT α son haploides y el resultado del emparejamiento da lugar a células diploides (Fig. 9.1).

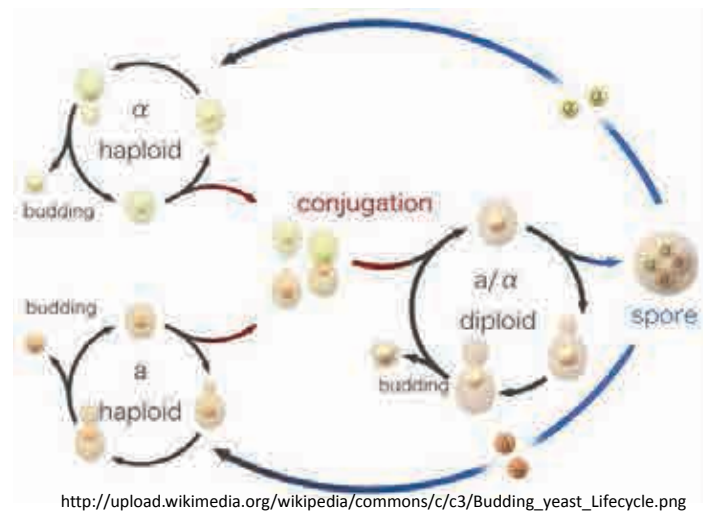


Figura 9.1: Esquema del ciclo vital de la levadura. Imagen tomada de http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/c/c3/Budding_yeast_Lifecycle.png

Cuando una levadura es estimulada por una feromona secretada por el tipo celular opuesto, se producen una serie de cambios fisiológicos para la reproducción, el ciclo celular se para en la fase G1 y el crecimiento se orienta hacia la célula opuesta. Posteriormente se fusionan las membranas plasmáticas y los núcleos. Algunos de los componentes del sistema de regulación de la reproducción sexual (*mating*) forman parte de otros sistemas de señalización en levaduras, como el crecimiento invasivo y la respuesta al estrés (Bardwell, 2004; McClean et al., 2007). Cuando la levadura

crece en un medio pobre, lo hace en forma de filamentos compuestos por cadenas de células delgadas y finas que penetran en el agar donde crecen. La reproducción sexual y el crecimiento en filamentos comparten elementos de las cascadas de señalización celular (MAP kinasas) que dan lugar a estos patrones de desarrollo, por lo que es importante determinar como se diferencian las señales para optar por un programa u otro. Cuando las levaduras son expuestas a las feromonas, la kinasa Fus3 se fosforila y activa la transcripción del factor Ste12, el cual se une en forma de homodímeros a los elementos de los promotores de respuesta a feromonas (PRE) y activa su transcripción. Los genes *fus3* y *ste12* contienen PRE en sus promotores. Por otro lado, la kinasa Kss1 involucrada en el crecimiento filamentosamente también activa a Ste12. En condiciones de privación nutricional el factor de transcripción Tec1 se activa y forma heterodímeros con Ste12, que se une a los promotores de los genes con elementos de respuesta filamentosa (FRE). El promotor de Tec1 contiene un FRE, por lo que se produce un bucle de retroalimentación positivo (Roberts & Fink, 1994; McClean et al., 2007). Cuando Fus3 es activado se produce la degradación de Tec1 (Chou et al., 2004). En la Fig. 9.2 se detalla la conexión entre ambas vías de señalización.

Las células deben detectar y responder a las señales del ambiente priorizando en la respuesta. En este caso, ambos mecanismos comparten moléculas de señalización. Para comprender el comportamiento dinámico de estas células ante esta situación se podría seguir la estrategia que se detalla en la Fig. 9.3.

En primer lugar, se realizaría la integración cromosómica del gen *fus3* regulado por un promotor inducible mediante galactosa según Dixon et al. (2009). Por consiguiente controlaríamos el nivel de expresión de *fus3* con diferentes concentraciones de galactosa (Fig. 9.3A, a la derecha de la imagen). En segundo lugar, en la misma cepa se integrarían cromosómicamente las fusiones P_{FLO11} -*gfp* según Voynov et al. (2006) y P_{fus1} -*rfp* (Fig. 9.3B, parte inferior de la imagen). De esta forma podemos observar la dinámica de expresión de cada fluorescencia según el patrón de desarrollo al que optan las células. Para el perfil de crecimiento invasivo y filamentosamente se ha elegido el

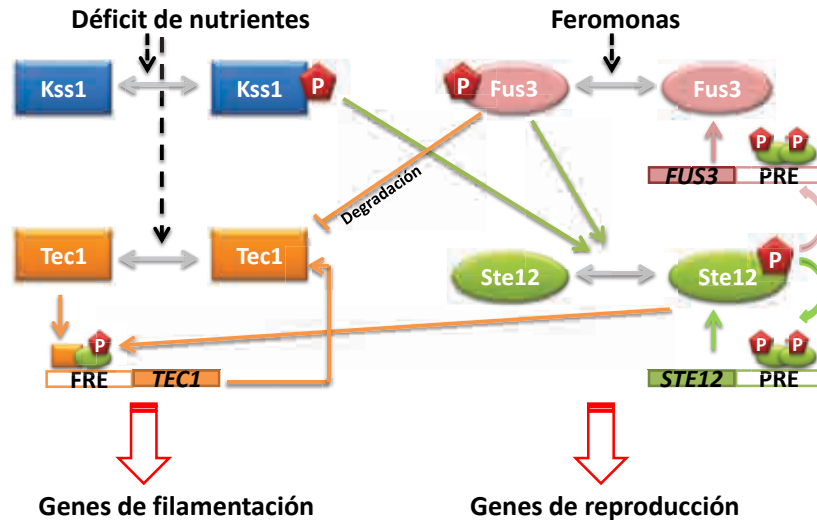


Figura 9.2: Esquema de las conexiones moleculares entre las cascadas de señalización en los programas de reproducción sexual y crecimiento filamentososo en *Saccharomyces cerevisiae*. El pentágono rojo (P) indica activación por fosforilación.

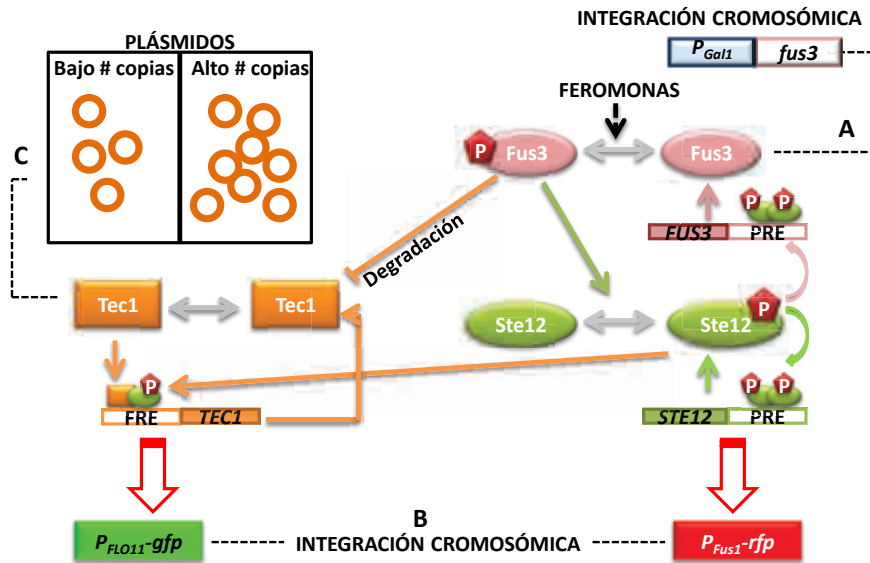
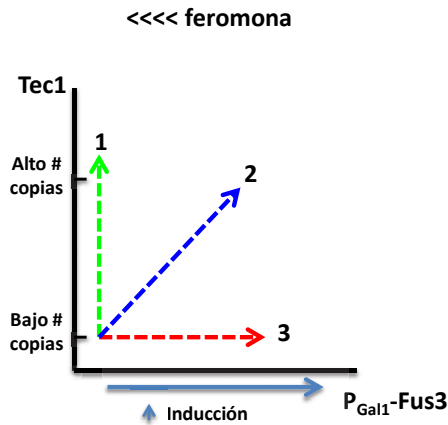


Figura 9.3: Estrategia para comprender el patrón de respuesta celular entre los programas de reproducción sexual y crecimiento filamentososo en *Saccharomyces cerevisiae*.

gen *FLO11*, que es necesario para el crecimiento invasivo y su transcripción depende de Ste12-Tec1 (Lo & Dranginis, 1998). En el caso de la reproducción sexual se utiliza el gen *fus1*, que es el gen más fuertemente inducido en la respuesta a feromonas (Nagiec & Dohlman, 2012). Por último, clonaríamos el gen *tec1* y su promotor en plásmidos de bajo y alto número de copias (Fig. 9.3C, a la izquierda de la imagen) y por separado se transformarían en la cepa anterior de *Saccharomyces cerevisiae*, que contiene la integración cromosómica de $P_{gal-fus3}$ y las fusiones $P_{FLO11-gfp}$ y $P_{fus1-rfp}$. Obtendríamos por lo tanto dos cepas con las mismas integraciones cromosómicas (A y B de la Fig. 9.3) pero cada una con un tipo de plásmido de número muy distinto de copias expresando *tec1*.

A continuación se inducirían estas dos cepas a una concentración mínima de feromonas para la activación por fosforilación de Fus3, y se induciría la expresión de *fus3* mediante diferentes concentraciones de galactosa. Como control de normalización se utilizarán los perfiles de fluorescencia obtenidos (GFP y RFP) de las mismas cepas sin estímulo de feromonas y sin inducción por galactosa. Las posibles dinámicas del sistema se observan en la Fig. 9.4. La flecha verde indica una predilección por el crecimiento filamentoso, la roja por el comportamiento de reproducción sexual y la azul corresponde a una dinámica biestable.

En resumen, mediante los experimentos detallados anteriormente, se pretende el estudio de la integración de señales por parte de *Saccharomyces cerevisiae* para optar entre dos comportamientos, i) mediante el control químico de la expresión constitutiva de uno de los elementos que regulan la reproducción sexual, y ii) mediante la variación del número de copias de uno de los genes que regulan el comportamiento filamentoso. A partir del control en diferentes niveles de dos de los parámetros que regulan los dos perfiles, se perturbarían ambas cascadas de regulación de forma simultánea y se estudiaría su comportamiento dinámico.



1. Con una concentración mínima de feromona para activar Fus3, expresión basal de Fus3 y elevadas cantidades de Tec1: Crecimiento filamentososo.
2. Se aumentan las cantidades de Tec1 y de expresión de Fus3 que lo degrada pero el bucle de retroalimentación en Tec1 hace que algunas células se escapen y crezcan de forma filamentososa.
3. Poca expresión de Tec1 y aumento de la expresión de Fus3 suficiente para desarrollar la reproducción sexual.

Figura 9.4: Posibles dinámicas a partir de las perturbaciones aplicadas al sistema. La flecha verde indica una predilección por el crecimiento filamentososo, la roja por el comportamiento de reproducción sexual y la azul corresponde a una dinámica biestable.

9.2.3. Diferenciación y toma de decisión celular

Sería interesante evaluar el método utilizado en el estudio realizado en los Capítulos 7 y 8 en otros sistemas de decisión múltiple y en células más complejas como por ejemplo en levaduras, o incluso en células de mamífero, ya que con la metodología utilizada se evita la delección de genes, que en general pueden ser importantes para el desarrollo y consecución de los programas de diferenciación de estudio. La aplicación de este método quizá revele la no existencia de regulación cruzada, en muchos casos considerada solamente porque programas distintos comparten determinadas proteínas. La medida simultánea de múltiples componentes de un programa de diferenciación en la misma célula es una herramienta potencial para comprender la dinámica de la toma de decisión celular. Además, se pueden aplicar los modelos poblacionales implementados al estudio del efecto de las fluctuaciones externas en la toma de decisión en una población, donde existan varios tipos celulares.

Glosario

ARNm (ARN mensajero): a partir de la transcripción de la secuencia de ADN la cual está formada por la combinación de los nucleótidos adenina (A), citosina (C), guanina (G), y timina (T), se obtiene la molécula de ARNm que en lugar de la timina presenta el uracilo (U). A partir del ARNm se obtienen las proteínas mediante el proceso de traducción.

BSA: corresponde a las siglas anglosajonas Bovine Serum Albumin. Se debe añadir en determinadas reacciones de restricción ya que estabiliza a las enzimas durante el proceso de incubación de la reacción. Además, evita que las enzimas queden adheridas al tubo y las puntas de pipetas.

Conjugación: proceso por el cual se transfiere material genético de una bacteria a otra. Para ello, es necesario el contacto entre ellas ya que se forma un pelo sexual a través del cual el ADN pasa de la bacteria donante a la huésped (Tortora et al., 2007).

Expresión constitutiva: tiene lugar en aquellos genes que se transcriben de forma continua.

Extremos 3' del ADN: las moléculas de ADN tienen una configuración antiparalela. Esto se debe a que los azúcares que la forman se unen en el tercer (3') y quinto (5') átomo de carbono entre dos azúcares contiguos. Se forman enlaces de forma asimétrica, por lo que la dirección de los nucleótidos en cada hebra será de 3'-5' y de 5'-3'.

Factor de transcripción: proteínas que regulan la transcripción del ADN activándola o inhibiéndola interfiriendo en la unión de las polimerasas, las cuales llevan a cabo dicha transcripción.

Fago: son virus que infectan bacterias y de los cuales se conocen miles de variedades.

Fenotipo: corresponde a los rasgos visibles de un individuo. Viene determinado por

el genotipo, que es el conjunto de genes de dicho individuo y la influencia del ambiente en el que se encuentra.

HeLa: son células inmortales utilizadas en investigación. Proviene de un tumor uterino. Su nombre deriva de las dos primeras letras del nombre y apellido de la paciente a la que fue extirpado.

Microarray de ADN: secuencias de ADN adheridas a un soporte sólido de las cuales se conoce su posición exacta. Uno de sus usos es el genotipado de regiones de un genoma. Se adiciona la muestra que contiene el ADN a genotipar y el resultado que se obtiene depende de la cantidad de secuencias de ADN que hibriden con el microarray. La hibridación consiste en la unión por complementariedad de nucleótidos, la adenina (A) es complementaria a la (T) y la citosina (C) a la guanina (G). Las secuencias a analizar se marcan con un fluoróforo, por lo que darán lugar a una señal que será más o menos intensa en función de la complementariedad entre las secuencias, es decir, a mayor cantidad de secuencias complementarias, mayor será la señal.

Plásmido: molécula de ADN circular utilizada en la clonación de secuencias de ADN en bacterias, a las que confieren resistencia a determinados antibióticos.

Quorum sensing: se descubrió en dos especies de bacterias marinas denominadas *Vibrio fischeri* y *Vibrio harveyi*, las cuales emiten luz. Se observó que dicha emisión tenía lugar cuando la densidad celular era elevada (Nealson & Hastings, 1979). Sintetizan moléculas de señalización denominadas autoinductores y las liberan al medio, aumentando su concentración a medida que incrementa la densidad poblacional. Un umbral mínimo de autoinductores provoca una alteración en la expresión genética. Mediante este sistema las bacterias se comunican y regulan algunos comportamientos como la competencia, producción de antibióticos, esporulación, entre otros (Miller & Bassler, 2001).

Bibliografía

- Artavanis-Tsakonas, S. (1999). Notch Signaling: Cell Fate Control and Signal Integration in Development. *Science*, *284*(5415), 770–776.
- Ashall, L., Horton, C. A., Nelson, D. E., Paszek, P., Harper, C. V., Sillitoe, K., Ryan, S., Spiller, D. G., Unitt, J. F., Broomhead, D. S., Kell, D. B., Rand, D. A., Sée, V., & White, M. R. H. (2009). Pulsatile Stimulation Determines Timing and Specificity of NF-kB – Dependent Transcription. *Science*, *324*(April), 242–246.
- Bai, U., Mandic-Mulec, I., & Smith, I. (1993). SinI modulates the activity of SinR, a developmental switch protein of *Bacillus subtilis*, by protein-protein interaction. *Genes & Development*, *7*(1), 139–148.
- Balaban, N. Q., Merrin, J., Chait, R., Kowalik, L., & Leibler, S. (2004). Bacterial persistence as a phenotypic switch. *Science (New York, N.Y.)*, *305*(5690), 1622–5.
- Banack, T., Clauson, N., Ogbaa, N., Villar, J., Oliver, D., & Firshein, W. (2005). Overexpression of the Hda DnaA-related protein in *Escherichia coli* inhibits multiplication, affects membrane permeability, and induces the SOS response. *Journal of bacteriology*, *187*(24), 8507–10.
- Barak, I., Behari, J., Olmedo, G., Guzman, P., Brown, D. P., Castro, E., Walker, D., Westpheling, J., & Youngman, P. (1996). Structure and function of the Ba-

- cillus SpoIIE protein and its localization to sites of sporulation septum assembly. *Molecular Microbiology*, 19(5), 1047–1060.
- Bardwell, L. (2004). A walk-through of the yeast mating pheromone response pathway. *Peptides*, 25(9), 1465–76.
- Barker, K. (2005). *At the Bench: A Laboratory Navigator, Updated Edition*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Batchelor, E., Loewer, A., & Lahav, G. (2009). The ups and downs of p53: understanding protein dynamics in single cells. *Nature reviews. Cancer*, 9(5), 371–7.
- Batchelor, E., Loewer, A., Mock, C., & Lahav, G. (2011). Stimulus-dependent dynamics of p53 in single cells. *Molecular systems biology*, 7(488), 488.
- Ben-Yehuda, S., & Losick, R. (2002). Asymmetric cell division in *B. subtilis* involves a spiral-like intermediate of the cytokinetic protein FtsZ. *Cell*, 109(2), 257–66.
- Boye, E., Løbner-Olesen, A., & Skarstad, K. (2000). Limiting DNA replication to once and only once. *EMBO reports*, 1(6), 479–83.
- Burbulys, D., Trach, K. A., & Hoch, J. A. (1991). Initiation of sporulation in *B. subtilis* is controlled by a multicomponent phosphorelay. *Cell*, 64(3), 545–52.
- Camara, J. E., Breier, A. M., Brendler, T., Austin, S., Cozzarelli, N. R., & Crooke, E. (2005). Hda inactivation of DnaA is the predominant mechanism preventing hyperinitiation of *Escherichia coli* DNA replication. *EMBO reports*, 6(8), 736–41.
- Çağatay, T., Turcotte, M., Elowitz, M. B., Garcia-Ojalvo, J., & Süel, G. M. (2009). Architecture-dependent noise discriminates functionally analogous differentiation circuits. *Cell*, 139(3), 512–22.
- Chastanet, A., Vitkup, D., Yuan, G.-C., Norman, T. M., Liu, J. S., & Losick, R. M. (2010). Broadly heterogeneous activation of the master regulator for sporulation

- in *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(18), 8486–91.
- Chen, L., Wang, R., Kobayashi, T., & Aihara, K. (2004). Dynamics of gene regulatory networks with cell division cycle. *Physical Review E*, 70(1).
- Chien, A.-C., Hill, N. S., & Levin, P. A. (2012). Cell Size Control in Bacteria. *Current Biology*, 22(9), 340–349.
- Choi, H.-S., Han, S., Yokota, H., & Cho, K.-H. (2007). Coupled positive feedbacks provoke slow induction plus fast switching in apoptosis. *FEBS letters*, 581(14), 2684–90.
- Chou, S., Huang, L., & Liu, H. (2004). Fus3-regulated Tec1 degradation through SCFCdc4 determines MAPK signaling specificity during mating in yeast. *Cell*, 119(7), 981–90.
- Chung, Y. S., & Dubnau, D. (1998). All seven comG open reading frames are required for DNA binding during transformation of competent *Bacillus subtilis*. *Journal of bacteriology*, 180(1), 41–5.
- Conrad, D. F., Pinto, D., Redon, R., Feuk, L., Gokcumen, O., Zhang, Y., Aerts, J., Andrews, T. D., Barnes, C., Campbell, P., Fitzgerald, T., Hu, M., Ihm, C. H., Kristiansson, K., Macarthur, D. G., Macdonald, J. R., Onyiah, I., Pang, A. W. C., Robson, S., Stirrups, K., Valsesia, A., Walter, K., Wei, J., Tyler-Smith, C., Carter, N. P., Lee, C., Scherer, S. W., & Hurles, M. E. (2010). Origins and functional impact of copy number variation in the human genome. *Nature*, 464(7289), 704–12.
- Cotterell, J., & Sharpe, J. (2010). An atlas of gene regulatory networks reveals multiple three-gene mechanisms for interpreting morphogen gradients. *Molecular systems biology*, 6(425), 425.

- Cunningham, E. L., & Berger, J. M. (2005). Unraveling the early steps of prokaryotic replication. *Current Opinion in Structural Biology*, (pp. 68–76).
- DeLuna, A., Vetsigian, K., Shoresh, N., Hegreness, M., Colón-González, M., Chao, S., & Kishony, R. (2008). Exposing the fitness contribution of duplicated genes. *Nature genetics*, *40*(5), 676–81.
- Dixon, J. M., Lubomirski, M., Amaratunga, D., Morrison, T. B., Brenan, C. J. H., & Ilyin, S. E. (2009). Nanoliter high-throughput RT-qPCR: a statistical analysis and assessment. *BioTechniques*, *46*(6), ii–viii.
- Donachie, W. D. (1968). Relationship between Cell Size and Time of Initiation of DNA Replication. *Nature*, *219*(5158), 1077–1079.
- Donachie, W. D., & Blakely, G. W. (2003). Coupling the initiation of chromosome replication to cell size in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Microbiology*, *6*(2), 146–150.
- Dubnau, D. (1999). DNA uptake in bacteria. *Annual review of microbiology*, *53*, 217–44.
- Dubnau, D., & Losick, R. (2006). Bistability in bacteria. *Molecular microbiology*, *61*(3), 564–72.
- Dworkin, J., & Losick, R. (2005). Developmental commitment in a bacterium. *Cell*, *121*(3), 401–9.
- Elowitz, M. B., Levine, A. J., Siggia, E. D., & Swain, P. S. (2002). Stochastic gene expression in a single cell. *Science (New York, N.Y.)*, *297*(5584), 1183–6.
- Errington, J. (2003). Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. *Nature reviews. Microbiology*, *1*(2), 117–26.

- Ferrell, J. E., & Machleder, E. M. (1998). The biochemical basis of an all-or-none cell fate switch in *Xenopus* oocytes. *Science (New York, N.Y.)*, *280*(5365), 895–8.
- Flynn, J. M., Levchenko, I., Seidel, M., Wickner, S. H., Sauer, R. T., & Baker, T. A. (2001). Overlapping recognition determinants within the *ssrA* degradation tag allow modulation of proteolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *98*(19), 10584–9.
- Fujita, M., González-Pastor, J. E., Gonza, E., & Losick, R. (2005). High- and Low-Threshold Genes in the *Spo0A* Regulon of *Bacillus subtilis*. *Journal of bacteriology*, *187*(4), 1357–1368.
- Garcia-Ojalvo, J. (2011). Physical approaches to the dynamics of genetic circuits: a tutorial. *Contemporary Physics*, *52*(5), 439–464.
- Gillespie, D. T. (1977). Exact Stochastic Simulation of Coupled Chemical Reactions. *The Journal of Physical Chemistry*, *81*(1), 2340–2361.
- Gottesman, S., Roche, E., Zhou, Y., & Sauer, R. T. (1998). The ClpXP and ClpAP proteases degrade proteins with carboxy-terminal peptide tails added by the SsrA-tagging system. *Genes & development*, *12*(9), 1338–47.
- Griffith, K. L., & Grossman, A. D. (2008). Inducible protein degradation in *Bacillus subtilis* using heterologous peptide tags and adaptor proteins to target substrates to the protease ClpXP. *Molecular microbiology*, *70*(4), 1012–25.
- Grossman, A. D. (1995). Genetic networks controlling the initiation of sporulation and the development of genetic competence in *Bacillus subtilis*. *Annual review of genetics*, *29*, 477–508.
- Guzman, L. M., Belin, D., Carson, M. J., Beckwith, J., Guzman, L. M., Belin, D., & Carson, M. J. (1995). Tight regulation, modulation, and high-level expression by

- vectors containing the arabinose PBAD promoter. *Microbiology*, 177(14), 4121–4130.
- Hahn, J., & Roggiani, M. (1995). The major role of Spo0A in genetic competence is to downregulate abrB, an essential competence gene. *Microbiology*, 177(12), 3601–3605.
- Haijema, B. J., Hahn, J., Haynes, J., & Dubnau, D. (2001). A ComGA-dependent checkpoint limits growth during the escape from competence. *Molecular microbiology*, 40(1), 52–64.
- Hamoen, L. W. (2003). Controlling competence in *Bacillus subtilis*: shared use of regulators. *Microbiology*, 149(1), 9–17.
- Higgins, D., & Dworkin, J. (2012). Recent progress in *Bacillus subtilis* sporulation. *FEMS microbiology reviews*, 36(1), 131–48.
- Huang, S. (2011). Systems biology of stem cells: three useful perspectives to help overcome the paradigm of linear pathways. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 366(1575), 2247–59.
- Jacob, F., & Monod, J. (1961). Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *Journal of molecular biology*, 3, 318–56.
- Jarmer, H., Berka, R., Knudsen, S., & Saxild, H. H. (2002). Transcriptome analysis documents induced competence of *Bacillus subtilis* during nitrogen limiting conditions. *FEMS microbiology letters*, 206(2), 197–200.
- Karow, M. L., Glaser, P., & Piggot, P. J. (1995). Identification of a gene, spoIIR, that links the activation of sigma E to the transcriptional activity of sigma F during sporulation in *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(6), 2012–6.

- Katayama, T., Ozaki, S., Keyamura, K., & Fujimitsu, K. (2010). Regulation of the replication cycle: conserved and diverse regulatory systems for DnaA and oriC. *Nature Reviews Microbiology*, *8*(3), 163–170.
- Kawai, Y., Moriya, S., & Ogasawara, N. (2003). Identification of a protein, YneA, responsible for cell division suppression during the SOS response in *Bacillus subtilis*. *Molecular microbiology*, *47*(4), 1113–22.
- Kawakami, H., Su'etsugu, M., & Katayama, T. (2006). An isolated Hda-clamp complex is functional in the regulatory inactivation of DnaA and DNA replication. *Journal of structural biology*, *156*(1), 220–9.
- Kruse, K., & Jülicher, F. (2005). Oscillations in cell biology. *Current opinion in cell biology*, *17*(1), 20–6.
- Kuchina, A., Espinar, L., Çağatay, T., Balbin, A. O., Zhang, F., Alvarado, A., Garcia-Ojalvo, J., & Süel, G. M. (2011). Temporal competition between differentiation programs determines cell fate choice. *Molecular systems biology*, *7*(557), 557.
- Lahav, G., Rosenfeld, N., Sigal, A., Geva-Zatorsky, N., Levine, A. J., Elowitz, M. B., & Alon, U. (2004). Dynamics of the p53-Mdm2 feedback loop in individual cells. *Nature genetics*, *36*(2), 147–50.
- Levine, J. H., Fontes, M. E., Dworkin, J., & Elowitz, M. B. (2012). Pulsed feedback defers cellular differentiation. *PLoS biology*, *10*(1), e1001252.
- Lo, W. S., & Dranginis, A. M. (1998). The cell surface flocculin Flo11 is required for pseudohyphae formation and invasion by *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular biology of the cell*, *9*(1), 161–71.
- Locke, J. C. W., & Elowitz, M. B. (2009). Using movies to analyse gene circuit dynamics in single cells. *Nature reviews. Microbiology*, *7*(5), 383–92.

- Losick, R., Youngman, P., & Piggot, P. J. (1986). Genetics of endospore formation in *Bacillus subtilis*. *Annual review of genetics*, *20*, 625–69.
- Magnuson, R., Solomon, J., & Grossman, A. D. (1994). Biochemical and genetic characterization of a competence pheromone from *B. subtilis*. *Cell*, *77*(2), 207–16.
- McClean, M. N., Mody, A., Broach, J. R., & Ramanathan, S. (2007). Cross-talk and decision making in MAP kinase pathways. *Nature genetics*, *39*(3), 409–14.
- Miller, M. B., & Bassler, B. L. (2001). Quorum sensing in bacteria. *Annual review of microbiology*, *55*, 165–99.
- Moldovan, N. I. (2005). Functional adaptation: the key to plasticity of cardiovascular “stem” cells? *Stem cells and development*, *14*(2), 111–21.
- Moore, T. I., Chou, C.-S., Nie, Q., Jeon, N. L., & Yi, T.-M. (2008). Robust spatial sensing of mating pheromone gradients by yeast cells. *PloS one*, *3*(12), e3865.
- Morelli, L., & Jülicher, F. (2007). Precision of Genetic Oscillators and Clocks. *Physical Review Letters*, *98*(22).
- Murray, J. D. (2001). *Mathematical Biology: I. An Introduction, Third Edition*. Springer.
- Nagiec, M. J., & Dohlman, H. G. (2012). Checkpoints in a yeast differentiation pathway coordinate signaling during hyperosmotic stress. *PLoS genetics*, *8*(1), e1002437.
- Nealson, K. H., & Hastings, J. W. (1979). Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance. *Microbiological reviews*, *43*(4), 496–518.
- Ogura, M., Liu, L., Lacelle, M., Nakano, M. M., & Zuber, P. (1999). Mutational analysis of ComS: evidence for the interaction of ComS and MecA in the regulation

- of competence development in *Bacillus subtilis*. *Molecular microbiology*, 32(4), 799–812.
- Piggot, P. J., & Hilbert, D. W. (2004). Sporulation of *Bacillus subtilis*. *Current opinion in microbiology*, 7(6), 579–86.
- Purvis, J. E., Karhohs, K. W., Mock, C., Batchelor, E., Loewer, A., & Lahav, G. (2012). P53 Dynamics Control Cell Fate. *Science (New York, N.Y.)*, 336(6087), 1440–4.
- Roberts, R. L., & Fink, G. R. (1994). Elements of a single MAP kinase cascade in *Saccharomyces cerevisiae* mediate two developmental programs in the same cell type: mating and invasive growth. *Genes & development*, 8(24), 2974–85.
- Robeva, R. (2010). Systems biology - old concepts, new science, new challenges. *Frontiers in psychiatry*, 1(January), 1.
- Roggiani, M., & Dubnau, D. (1993). ComA, a phosphorylated response regulator protein of *Bacillus subtilis*, binds to the promoter region of *srfA*. *Journal of bacteriology*, 175(10), 3182–7.
- Sakaue-Sawano, A., Kurokawa, H., Morimura, T., Hanyu, A., Hama, H., Osawa, H., Kashiwagi, S., Fukami, K., Miyata, T., Miyoshi, H., Imamura, T., Ogawa, M., Masai, H., & Miyawaki, A. (2008). Visualizing spatiotemporal dynamics of multicellular cell-cycle progression. *Cell*, 132(3), 487–98.
- Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual, Volume 2*. CSHL Press.
- Savageau, M. A. (2001). Design principles for elementary gene circuits: Elements, methods, and examples. *Chaos (Woodbury, N.Y.)*, 11(1), 142–159.

- Schultz, D., Wolynes, P. G., Ben Jacob, E., & Onuchic, J. N. (2009). Deciding fate in adverse times: sporulation and competence in *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(50), 21027–34.
- Sterlini, J. M., & Mandelstam, J. (1969). Commitment to sporulation in *Bacillus subtilis* and its relationship to development of actinomycin resistance. *The Biochemical journal*, *113*(1), 29–37.
- Süel, G. M., Garcia-Ojalvo, J., Liberman, L. M., & Elowitz, M. B. (2006). An excitable gene regulatory circuit induces transient cellular differentiation. *Nature*, *440*(7083), 545–50.
- Süel, G. M., Kulkarni, R. P., Dworkin, J., Garcia-Ojalvo, J., & Elowitz, M. B. (2007). Tunability and noise dependence in differentiation dynamics. *Science (New York, N.Y.)*, *315*(5819), 1716–9.
- Swinburne, I. A., Miguez, D. G., Landgraf, D., & Silver, P. A. (2008). Intron length increases oscillatory periods of gene expression in animal cells. *Genes & Development*, *22*, 2342–2346.
- Thattai, M., & van Oudenaarden, A. (2004). Stochastic gene expression in fluctuating environments. *Genetics*, *167*(1), 523–30.
- Tortora, G. J., Funke, B. R., & Case, C. L. (2007). *Introducción a la microbiología*. Ed. Médica Panamericana.
- van Sinderen, D., Luttinger, A., Kong, L., Dubnau, D., Venema, G., & Hamoen, L. (1995). comK encodes the competence transcription factor, the key regulatory protein for competence development in *Bacillus subtilis*. *Molecular microbiology*, *15*(3), 455–62.
- Voynov, V., Verstrepen, K. J., Jansen, A., Runner, V. M., Buratowski, S., & Fink, G. R. (2006). Genes with internal repeats require the THO complex for trans-

cription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(39), 14423-8.

Lista de publicaciones

Kuchina, A.*, Espinar, L.*, Garcia-Ojalvo, J., Süel, G. M. (2011). Reversible and noisy progression towards a commitment point enables adaptable and reliable cellular decision-making. *PLoS computational biology*, 7 (11), e1002273.

*These authors contributed equally to this work.

Kuchina, A., Espinar, L., Cağatay, T., Balbin, A. O., Zhang, F., Alvarado, A., Garcia-Ojalvo, J., Süel, G. M. (2011). Temporal competition between differentiation programs determines cell fate choice. *Molecular systems biology*, 7 (557), 557.

Espinar, L., Cağatay, T., Süel, G. M., Garcia-Ojalvo, J. Circuit-level input integration in bacterial gene regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (under review 2012).