



UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS  
DEPARTAMENTO DE INGENIERIA CIVIL QUÍMICA Y BIOTECNOLOGÍA

MODELAMIENTO MATEMÁTICO DE LA HOMEOSTASIS DE COBRE EN BACTERIAS

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA

WALDO SEBASTIÁN ARACENA PÉREZ

PROFESOR GUÍA:  
J. CRISTIAN SALGADO HERRERA

MIEMBROS DE LA COMISIÓN:  
ZIOMARA GERDTZEN HAKIM  
CARLOS JEREZ GUEVARA

SANTIAGO DE CHILE  
2013



## MODELAMIENTO MATEMÁTICO DE LA HOMEOSTASIS DE COBRE EN BACTERIAS

A lo largo del tiempo, los organismos vivos han desarrollado la capacidad de utilizar y acumular metales de transición. Esta capacidad resulta de suma importancia al considerar que estos elementos, entre los cuales se encuentra el cobre, están asociados a distintos procesos y rutas metabólicas. A pesar de esto, pueden llegar a ser tóxicos para la célula sobrepasando ciertas concentraciones.

En el presente trabajo se proponen mecanismos cinéticos de los componentes de la homeostasis del cobre en *Escherichia coli* para estudiar la resistencia de éste elemento en bacterias. Estos mecanismos se relacionan mediante un modelo cuantitativo de flujos a partir de EDOs, donde se identificó y caracterizó cada componente del sistema. La cinética de tres proteínas (CopA, CueO y CusCBA) es estudiada en base a sus actividades reportadas para la obtención de los parámetros cinéticos, los cuales son ajustados por los mecanismos propuestos mediante la técnica de análisis numérico de mínimos cuadrados.

Para desarrollar el modelo se realizaron algunos supuestos, como considerar las concentraciones de ATP,  $H^+$  y  $O_2$  en exceso para las reacciones, y mantener la cantidad de proteínas constante. Como resultado principal, se obtiene que la cantidad de cobre en el citoplasma y periplasma varía entre 2 a 12 átomos (0,003 a 0,02 [ $\mu M$ ]) y 55 a 570 átomos (0,09 a 0,95 [ $\mu M$ ]) respectivamente; otorgando a este segundo compartimiento 48 veces más capacidad de almacenamiento de cobre libre. Además, las escalas de tiempo de respuesta de las simulaciones, están en el orden de los 30 minutos, acercándose al tiempo de respuesta que se espera para mantener el supuesto de proteínas constante. Por otra parte, el resultado del modelo es más sensible a perturbaciones de los parámetros cinéticos de CueO y del volumen extracelular; mientras que se observan variaciones menores del 1% al perturbar los parámetros del sistema transportador CusCBA-CusF.

El modelo se validó mediante ensayos de comparación entre distintos casos de mutaciones de tipo *knockdown* y los valores de las MICs asociadas a ellos, pudiendo recuperar los valores vinculando las MICs reportadas con las MICs obtenidas mediante una relación. En los casos de silenciamiento genético de CopA, se observa la importancia de insertar un transportador putativo que transporte cobre desde el periplasma hacia el citoplasma.

A través del modelo, es posible estudiar el comportamiento de los elementos principales de la homeostasis de cobre en bacteria, validando la metodología utilizada. A partir de esto, se puede tener aproximaciones de la dinámica del sistema de homeostasis de cobre y dada la flexibilidad del modelo, extrapolarlo a otros organismos para evaluar concentraciones críticas de este elemento en distintos casos como polímeros biocidas o enfermedades relacionadas con la absorción del cobre.



*Aunque tuviera el don de la profecía  
y entendiese todos los misterios y toda ciencia;  
aunque tuviese toda la fe,  
de tal manera que trasladase montes,  
si no tengo amor, nada soy.  
(1 Cor 13, 2)*

# Agradecimientos

Que extrañeza produce este momento, se veía tan lejano estar escribiendo los agradecimientos de este trabajo y, más aún, los agradecimientos de toda esta etapa que finaliza. Pero estamos aquí, sonriendo cada vez que recuerdo algún momento que me hizo decir “gracias”. Estas palabras son para ustedes, para esas personas que alumbraron mi vida con su presencia.

Comenzar por mi familia, fuente de descanso y lugar donde sentirse seguro. Gracias mamá y papá, mis gorditos, por confiar, por darme todas las herramientas y oportunidades que estuvieron a su alcance para que pudiera formarme íntegramente; gracias por sus palabras, por su paciencia y por todo el amor que me han entregado. Del camino recorrido, la mayor parte de mis logros es gracias a ustedes. También a mi hermano Adrián, por tu ánimo, tu trabajo constante, por tus conversaciones eternas y por darme visiones de las cosas que no tengo; gracias porque sé que cruzando la escalera se encuentra un amigo en el cual puedo confiar.

El paso por la Universidad de Chile me dio la oportunidad de conocer a gente notable, gracias Pablito, Carmi, Daniel y Maca, tienen un espacio de grandes momentos en mi memoria. Feña y Pili, mis compañeras de trabajo, gracias por todas las conversaciones, los ataques de risa y todo lo que pude aprender de uds; el paso por esta casa de estudios fue mucho más llevadera con su ayuda. A los chicos de teatro, especialmente a Mati y Carmen, por toda la confianza y buenos momentos vividos. Gracias Felipe, por darme esa primera oportunidad de estar en un cuerpo docente y por todo el testimonio que imprimes con tus acciones.

Gracias las personas del laboratorio PMCD, a las personas del Departamento de Ingeniería Civil Química y Biotecnología, a Gina, Irene y Sra. Erika; siempre pude encontrar una sonrisa y una ayuda en todos ustedes. A los profesores Francisco Gracia, Oriana Salazar, Alvaro Olivera, María Elena y especialmente a mis profesores guías, profesor Cristian y profesora Ziomara, por su apoyo, conocimiento y por valorar las personas que hay detrás de cada alumno.

También a uds, Arturo, Naty Trincado, Feñita Sepúlveda, Flani, Diego, mis pollos de confirmación, Padre Eduardo y Hermana Tere; que a lo largo de estos años y de maneras muy diversas, han alegrado mi vida y me han acompañado en el camino de la fe.

A ti te dejo para el final, porque mis palabras de agradecimiento merecen ser especiales por todo lo que me has ayudado y comprendido. Gracias Morita por este tiempo juntos, por nuestras conversaciones interminables, por nuestras rabetas y risas. Que podamos soñar juntos me alegra la vida.

Y finalmente al buen Dios, que tu amor sigue moviendo el corazón de maneras inesperadas.







# Tabla de contenido

<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
1.1. Antecedentes Generales . . . . .	1
1.2. Descripción del proyecto . . . . .	4
1.3. Motivación del proyecto . . . . .	4
<b>2. Objetivos y Limitaciones</b>	<b>6</b>
2.1. Objetivos Generales . . . . .	6
2.2. Objetivos Específicos . . . . .	6
2.3. Limitaciones . . . . .	6
<b>3. Marco Teórico</b>	<b>8</b>
3.1. Estructura y características de la bacteria <i>Escherichia coli</i> . . . . .	8
3.2. Sistema de Regulación de la homeostasis de cobre . . . . .	9
3.2.1. Sistema Cue (Cu-efflux) . . . . .	9
3.2.2. Sistema Cus (Cu-sensing) . . . . .	11
3.2.3. Otros componentes . . . . .	13
3.3. Modelos y Mecanismos . . . . .	13
<b>4. Metodología</b>	<b>17</b>
4.1. Herramientas utilizadas . . . . .	17
4.1.1. Base de datos biológicas . . . . .	17
4.1.2. Herramientas Computacionales . . . . .	18
4.1.3. Mecanismos Reportados . . . . .	18
4.1.4. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) Reportados . . . . .	18
4.2. Procedimiento . . . . .	19
4.2.1. Caracterización de las proteínas y propuestas de sus mecanismos . . . . .	19
4.2.2. Ensayo de actividad y ajuste de parámetros . . . . .	20
4.2.3. Ensamble de los sistemas Cue y Cus . . . . .	20
4.2.4. Ensamble del sistema general de la homeostasis de cobre . . . . .	20
4.2.5. Validación del modelo . . . . .	21
<b>5. Resultados y Discusión</b>	<b>22</b>
5.1. Resultados del Sistema Cue . . . . .	22
5.1.1. Proteína transportadora CopA . . . . .	22
5.1.2. Enzima CueO . . . . .	26
5.1.3. Proteína reguladora CueR . . . . .	29
5.2. Resultados del Sistema Cus . . . . .	30

5.2.1. Multiproteína Transportadora CusCBA . . . . .	30
5.2.2. Subsistema CusCBA-CusF . . . . .	33
5.2.3. Subsistema regulador CusS-CusR . . . . .	34
5.3. Parámetros Utilizados . . . . .	36
5.4. Sistema Global . . . . .	39
5.5. Validación del Modelo . . . . .	45
<b>6. Conclusiones</b>	<b>49</b>
6.1. Recomendaciones . . . . .	50
<b>Bibliografía</b>	<b>51</b>
<b>Anexos</b>	<b>I</b>
A. Desarrollo matemático para la expresión de velocidad de CopA	II
B. Desarrollo matemático para la expresión de velocidad de CueO	III
C. Valores de los parámetros cinéticos obtenidos de literatura	IV
D. Resultados adicionales para caso de cobre externo variable	V
E. Resultados adicionales para caso de cobre externo constante	VII
F. Análisis de sensibilidad de los parámetros	IX
G. Código del sistema de ecuaciones utilizado	XI

# Índice de tablas

4.1. Lista de mecanismos reportados para las proteínas del modelo . . . . .	18
4.2. Lista de MICs reportadas . . . . .	19
5.1. Velocidades de mecanismo de estados de CopA. . . . .	24
5.2. Velocidades de mecanismo de estados de CueO. . . . .	27
5.3. Velocidades de mecanismo de estados de CueR. . . . .	30
5.4. Velocidades de mecanismo de estados de CusCBA. . . . .	31
5.5. Velocidades agregadas al mecanismo de estado de CusCBA por interacción con CusF . . . . .	34
5.6. Velocidades de mecanismo de estados de CusS-CusR . . . . .	36
5.7. Parámetros utilizados en el Sistema . . . . .	37
5.8. Comparación entre MICs reportados y MICs obtenidos por el modelo . . . . .	47
C.1. Parámetros obtenidos de literatura utilizados en el Sistema . . . . .	IV

# Índice de figuras

1.1. Esquema del sistema general de la homeostasis de cobre en <i>E. coli</i> . . . . .	3
3.1. Esquema de la estructura de una célula Gram Positiva y una célula Gram Negativa. . . . .	8
3.2. Esquema de regulación del sistema Cue . . . . .	9
3.3. Esquema de la estructura de la ATPasa CopA. . . . .	10
3.4. Mecanismo cinético reportado para CueO . . . . .	10
3.5. Esquema de la estructura de la bomba CusCBA . . . . .	12
3.6. Esquema de regulación del sistema Cus . . . . .	12
3.7. Esquema de una red de Petri. . . . .	14
4.1. Esquema de la metodología utilizada. . . . .	19
5.1. Mecanismo de estados propuesto y esquema de función biológica para CopA . . . . .	23
5.2. Ajuste de CopA a datos experimentales . . . . .	25
5.3. Mecanismo de estados propuesto y esquema de función biológica para CueO . . . . .	26
5.4. Ajuste de CueO a datos experimentales . . . . .	28
5.5. Mecanismo de estados propuesto para CueR . . . . .	29
5.6. Mecanismo de estados propuesto para CusCBA . . . . .	30
5.7. Ajuste de CusCBA a datos experimentales . . . . .	32
5.8. Mecanismo de estados propuesto para la interacción entre CusF y CusCBA . . . . .	33
5.9. Mecanismo de estados propuesto para CusR y CusS . . . . .	35
5.10. Respuesta del sistema realizando una perturbación del 10% a los parámetros. . . . .	38
5.11. Esquema del Sistema Global del modelo propuesto para la homeostasis de cobre . . . . .	39
5.12. Casos de cobre extracelular variable . . . . .	41
5.13. Caso de cobre extracelular constante . . . . .	42
5.14. Respuesta del modelo a distintas concentraciones de cobre, considerando concentración de cobre extracelular constante . . . . .	45
5.15. Respuesta del modelo a distintos casos de <i>knockdown</i> , considerando concentración de cobre extracelular constante. . . . .	46
D.1. Variación de la concentración de cobre citoplasmático para el caso de cobre externo variable . . . . .	V
D.2. Variación de la concentración de cobre periplasmático para el caso de cobre externo variable . . . . .	VI
D.3. Variación de la concentración de cobre extracelular para el caso de cobre externo variable . . . . .	VI

E.1. Variación de la concentración de cobre citoplasmático para el caso de cobre externo constante . . . . .	VII
E.2. Variación de la concentración de cobre periplasmático para el caso de cobre externo constante . . . . .	VIII
E.3. Variación de la concentración de cobre extracelular para el caso de cobre externo constante . . . . .	VIII
F1. Análisis de sensibilidad con variaciones positivas de los parámetros del sistema .	IX
F2. Análisis de sensibilidad con variaciones negativas de los parámetros del sistema	X



# Capítulo 1

## Introducción

### 1.1. Antecedentes Generales

La capacidad de un organismo para captar metales de transición es vital para su supervivencia. Estos elementos, a pesar de presentarse como elementos traza, son nutrientes esenciales y juegan un rol crítico en varios procesos bioquímicos [1–3]. La cantidad dentro de la célula de los elementos como: plata, cobre, níquel, plomo, zinc y oro; es regulada dado que en exceso, pueden inhibir procesos vitales y por ejemplo competir con otros metales por sitios activos de enzimas [1, 4].

En términos evolutivos, esta dependencia por elementos corrosivos proviene de un cambio en las características oxidativas de la atmósfera al incrementarse la concentración de oxígeno en ella, produciendo la adaptación de algunos organismos vivos a estas condiciones los cuales, por ejemplo, pueden producir energía a partir de la reducción de dioxígeno ( $O_2$ ) en agua ( $O_2 + 4e^- + 4H^+ \rightarrow 2H_2O$ ). El problema es que a partir de estas reacciones con dioxígeno pueden derivar componentes altamente reactivos y tóxicos, los cuales es posible contrarrestarlos a partir de: pequeñas moléculas antioxidantes, sistemas de reparación intracelular y enzimas, como las Súper oxidodismutasas (SOD) que utilizan iones metálicos para catalizar la disminución de estos [2].

En particular, el cobre es un elemento esencial para el crecimiento y supervivencia de las células dada su habilidad única de adoptar distintos estados de oxidación, tanto como  $Cu^{+2}$  o como  $Cu^+$  para un rango específico de potencial redox [5–7]. Esta característica le proporciona ser un cofactor esencial en varios procesos biológicos y está presente en al menos 30 tipos de proteínas conocidas, como por ejemplo, el citocromo C de la cadena transportadora de electrones, tirosinas (requerida para la síntesis de melanina) y la familia de superóxido dismutasas, requeridas para la defensa del daño oxidativo [5]. A su vez, por su reactividad, el cobre es un elemento tóxico para las células dado que la transición entre sus estados de reducción puede generar radicales superóxido ( $OH^-$ ) e hidroxilo ( $\bullet OH$ ) a partir de ciertas reacciones (Ec. 1.1, Ec. 1.2) [8–10] los que producen daño en estructuras celulares como peroxidación en membranas, oxidación directa de proteínas o ruptura del material genético [9, 11].



En el interior de la célula, el estado  $Cu^+$  resulta ser más peligroso que el estado  $Cu^{+2}$  [12, 13], aun así las concentraciones de este elemento son trazas al interior del citoplasma y no superan los  $10^{-6}$  M en total y los  $10^{-9}$  M como cobre libre [14], que se traduce en que existe de cero a un átomo en el interior de la célula. El estado de oxidación del cobre depende del compartimiento y de la acidez en que se encuentre.

Es así como las células han desarrollado un sistema que es capaz de mantener un control sobre la concentración de cobre en su interior. Este sistema se ha conservado en gran medida en los organismos vivos [15], y específicamente en *E. coli* cuenta con dos sistemas principales: El sistema Cue (*Cu-efflux*) y el sistema Cus (*Cu-sensing*) [11, 16]. El funcionamiento de estos sistemas es complementario y depende principalmente de las concentraciones de cobre, aunque también es, entre otros factores, afectado por la presencia de oxígeno [12, 13].

Para el estudio de la resistencia de algún elemento al crecimiento celular, se ha definido el valor MIC (mínima concentración inhibitoria) como el valor de concentración más bajo de dicho elemento, en el que se pueda apreciar visiblemente una inhibición del crecimiento celular. [17]. En el caso del cobre, la MIC se ha definido en 2,25 mM para *E. coli* [13].

En la Figura 1.1, se observa un esquema del sistema general de la homeostasis de cobre en *E. coli*. En él se encuentran los sistemas Cue, Cus y otros componentes anexos a éstos. El sistema Cue se compone de CopA, bomba transportadora de cobre de la familia de ATPasas [18]; CueO, enzima oxidoreductasa que cambia el estado de oxidación de cobre (I) a cobre (II) [14]; CueR, regulador transcripcional del sistema Cue [19, 20]. A su vez, el sistema Cus se compone de el complejo transportador CusCBA, bomba que utiliza el gradiente de protones como fuerza motriz [16, 21, 22]; CusF, proteína chaperona de CusCBA [23, 24]; CusR, regulador de la transcripción de los genes del sistema Cus [13, 24, 25]; y CusS, sensor histidina-quinasa que activa a CusR fosforilándolo [7, 13]. ComC y la familia de proteínas Pco son componentes que ayudan a la resistencia al cobre y que se encuentran en plásmidos [26, 27].



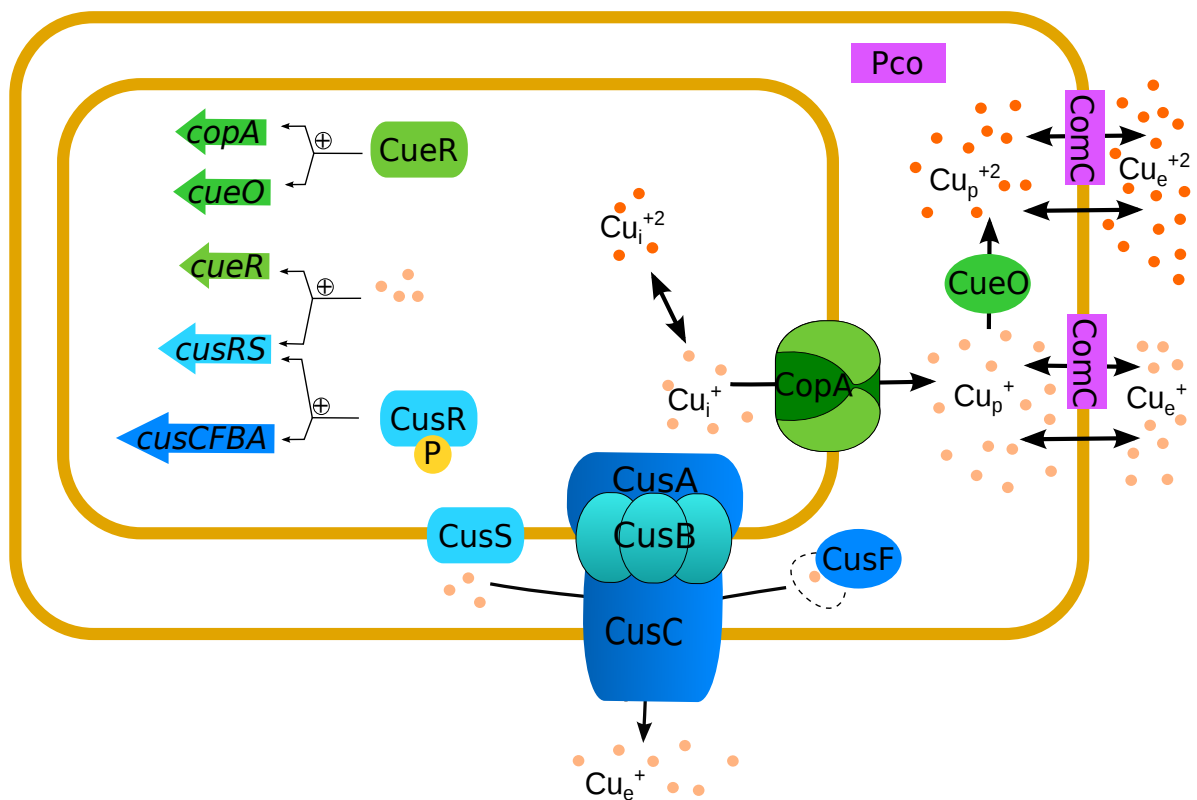


Figura 1.1: Esquema del sistema general de la homeostasis de cobre en *E. coli*. En verde se observa el sistema Cue, en azul el sistema Cus y en morado los componentes complementarios.

Actualmente, una herramienta disponible para analizar y predecir el comportamiento de sistemas biológicos es la utilización de modelos matemáticos. Esta herramienta ha sido beneficiada por el mejor conocimiento de los sistemas biológicos y por el aumento en la capacidad de ordenadores para realizar cálculos [28].

Dentro del estudio del metabolismo de metales, existen distintos tipos de modelos que permiten ayudar a la comprensión de estos sistemas. Cada tipo logra afrontar el problema de una perspectiva distinta, otorgando respuestas dependiendo de las variables que se consideren más importantes [29].

Uno de los posibles caminos para la modelación de estas interacciones es proponer mecanismos de estados para las proteínas, los cuales son descritos como reacciones consecutivas. Esta técnica tiene la ventaja de ser flexible y poder incorporar distintos elementos a su planteamiento, aunque se ve limitada por los datos experimentales reportados, los cuales permiten ajustar las características cinéticas de las interacciones y con esto lograr que el modelo represente al sistema real.

## 1.2. Descripción del proyecto

El presente trabajo consistió en el desarrollo de un modelo matemático que estudia la homeostasis de cobre en bacterias y que pretende estudiar cómo es regulada la concentración de este elemento dentro del microorganismo y cómo es la interacción entre los componentes del sistema que genera este control.

De manera más precisa, este trabajo considera la propuesta de un mecanismo por proteína presente en los sistemas, con lo que se obtienen siete mecanismos en total. A partir de estos y del estudio individual de la cinética de cada componente, se pretende representar el funcionamiento acoplado de los Sistemas Cue y Cus.

Hay mecanismos que ya han sido descritos previamente en distintos trabajos como es el caso de CopA y CueO, ocurre lo mismo con las estructuras y funciones de las proteínas CopA, CueO, CusCBA, CusF y CusR; además se han reportado sistemas similares en otro tipo de organismos como en *E. hirae*, pero no se ha reportado la interacción de estos sistemas para *E. coli*.

Cada mecanismo se probará individualmente para analizar, en primera instancia, su comportamiento cualitativo, y luego ajustar los parámetros cinéticos correspondientes según los datos reportados obteniendo resultados cuantitativos. A partir de esto se construirá el sistema global de la homeostasis de cobre basado en los mecanismos anteriores y la adición de distintas interacciones de los estados de oxidación del cobre en los compartimientos celulares pertinentes.

Finalmente, para evaluar la respuesta del modelo general, se utilizaron MICs reportados para distintos casos de mutaciones de tipo *knockdown* y se compararon con las respuestas que exhibía el modelo al reproducir los escenarios experimentales.

En el desarrollado del proyecto se utilizaron software matemáticos para la programación de los modelos, la resolución de los sistemas de ecuaciones diferenciales y los ajustes de parámetros realizados.

## 1.3. Motivación del proyecto

La importancia de profundizar en el funcionamiento y las interacciones de los componentes que controlan la homeostasis de cobre radica en la relación que tiene el cobre y sus problemas de absorción con distintas patologías como la Enfermedad de Wilson, el Síndrome de Menkes o el Alzheimer. También es relevante el uso de este material como superficie biocida tanto en hospitales o lugares públicos permitiendo un mayor control bacteriano de esas zonas. Incluso, bajo el contexto de lo relevante que es la minería en Chile, la comprensión de la resistencia al cobre de algunos microorganismos podría brindar nuevas alternativas para su extracción. Es por esto, que un avance en este conocimiento sería un paso para diseñar y generar medicamentos, componentes o procesos que permitan aprovechar esta dualidad del cobre de: ser esencial y tóxico en los metabolismos celulares.

Por lo mismo, este proyecto busca otorgar antecedentes que permitan una mejor comprensión de la regulación que tiene el cobre en bacterias y con esto saber las características de los elementos importantes y la relación que pueden tener unos con otros y así, utilizando la conservación de estos sistemas en los organismos, relacionar los resultados obtenidos en *E. coli* a otros casos de estudio según se requiera.

La herramienta de modelación matemática se hace necesaria para acotar y ayudar en los esfuerzos experimentales, al estar frente a un problema donde las variables medibles son elementos trazas al interior de la célula. Logrando una correcta modelación, es posible dirigir ciertos experimentos ahorrando en costos y recursos.

Finalmente, y analizando la motivación a través de la Ingeniería Civil en Biotecnología, este tipo de problemas que mezclan componentes biológicos, matemáticos y computacionales se vuelven sumamente interesantes dado el aporte que es posible brindar a partir de la comprensión de los fenómenos que se están estudiando. La capacidad de generar un modelo que contenga la interacción de distintos elementos proteicos además de reacciones en diferentes compartimientos de la célula, contribuye a visualizar nuevas variables que pueden mejorar la comprensión del problema.

# Capítulo 2

## Objetivos y Limitaciones

### 2.1. Objetivos Generales

Estudiar la resistencia al cobre en bacterias mediante el desarrollo de un modelo de homeostasis de cobre en *Escherichia coli*.

### 2.2. Objetivos Específicos

- Identificar elementos claves de la cinética, estructura de los transportadores, regulación génica y metabólica del mecanismo regulador.
- Estudiar y caracterizar los elementos más importantes del sistema general.
- Proponer un modelo matemático que integre los elementos antes mencionados y analizar su respuesta comparándolo con datos experimentales.

### 2.3. Limitaciones

Entre las limitaciones presentes en el trabajo se encuentran:

Los mecanismos propuestos se han basado en estudios para *E. coli*, por lo que para generalizar el modelo a otro tipo de bacterias u organismos en general, es necesario realizar los cambios pertinentes para que los componentes e interacciones de estos sean correctos.

Para obtener los parámetros cinéticos no se cuentan con resultados experimentales propios, por lo que se han estimado a partir de datos reportados, de los cuales algunos se relacionan directamente con los componentes a estudiar y otros son aproximados mediante analogía de sistemas biológicos similares.

Dada la complejidad de los sistemas biológicos en general, se desarrollaran mecanismos que

solo contengan los principales componentes que regulan la homeostasis de cobre en bacterias, dejando de lado ciertas variables. Esta decisión acota a que los componentes del modelo sean transportadores, enzimas y elementos principales de este sistema, como las concentraciones de cobre en los distintos compartimientos de la célula; y deje de lado proteínas que no pertenecen al sistema Cue o Cus, además de, concentraciones de elementos como el oxígeno disuelto o ATP.

En esta misma línea, se considerará la escala de tiempo metabólica bajo el supuesto que la degradación y la transcripción de las proteínas no afecte. Por lo tanto, los tiempos en los cuales sea posible concluir, a partir de los resultados del modelo, serán los que se encuentren en este rango.

El modelo planteado hace referencia al comportamiento de una célula, esto se debe tener en consideración al querer extrapolarlo a casos generales del comportamiento de un cultivo celular.

# Capítulo 3

## Marco Teórico

### 3.1. Estructura y características de la bacteria *Escherichia coli*

Las bacterias son el mayor grupo de organismos vivos unicelulares y se pueden encontrar en una variedad de formas y lugares [30]. De manera particular, *E. coli* se encuentra normalmente en los intestinos de animales y se considera una parte importante en la salud del tracto intestinal aún cuando algunas se consideran patógenas pudiendo causar enfermedad en el tracto intestinal o fuera de éste [31]. *E. coli* es la bacteria que se ha estudiado más meticulosamente, y el entendimiento de sus características biológicas, incluida la función de sus genes, ha ayudado a avances en el entendimiento de los organismos vivos en general [32].

Esta bacteria se considera una anaeróbica facultativa Gram Negativa [33]. Esto quiere decir que su pared celular, que confiere integridad estructural, se compone de una pared externa, un espacio entre membranas llamado espacio periplasmático y de una membrana interna [34] (Figura 3.1).

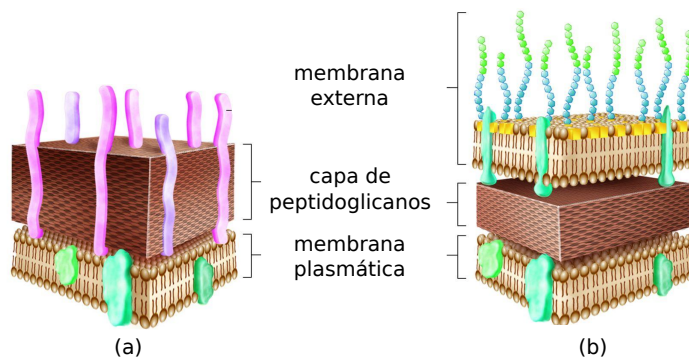


Figura 3.1: Esquema de la estructura de una célula Gram Positiva y una célula Gram Negativa. (a): Estructura de una célula Gram Positiva. (b): Estructura de una célula Gram Negativa. En este tipo de células, la capa de peptidoglicanos se encuentra en el espacio periplasmático. (Modificado de [35]).

El primer componente que está en contacto con iones o moléculas del medio es la pared celular externa. En esta los compuestos se pueden depositar e interaccionar con distintos grupos funcionales presentes como aminos, hidroxilos, carboxilos, etc. Estos últimos participando activamente en la unión de cationes metálicos y disminuyendo la cantidad neta de compuestos que pueden finalmente ser absorbidos por la célula [30]. El periplasma, pudiendo constituir hasta el 40% del volumen total de la célula, está formado por estructuras de peptidoglicanos y por proteínas que juegan un rol importante en la absorción de nutrientes y control de elementos tóxicos [36].

## 3.2. Sistema de Regulación de la homeostasis de cobre

### 3.2.1. Sistema Cue (Cu-efflux)

Cue es uno de los sistemas reguladores de la concentración de cobre en *E. coli*. Este cuenta con tres componentes, la bomba transportadora CopA, la enzima oxidasa CueO y CueR, proteína que regula la transcripción de ambas [18,37] (Figura 3.2). El sistema se expresa, en cantidades basales bajo condiciones anaeróbicas y aeróbicas, siendo esta última la condición con mayor efectividad en controlar la toxicidad del cobre [13]. La función global del sistema consiste en bajar la concentración de  $Cu^+$  del citoplasma transportando iones al periplasma y luego catalizar su transformación a  $Cu^{+2}$ .

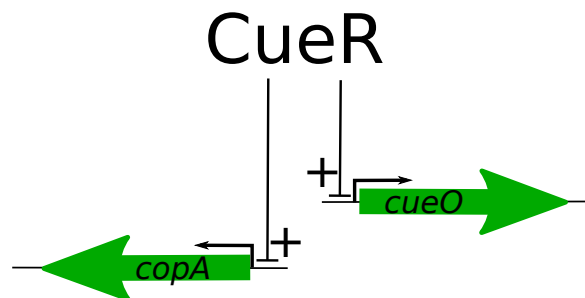


Figura 3.2: Esquema de regulación del sistema Cue.

CopA es el componente central de la homeostasis de cobre en *E. coli*, manteniendo su función en condiciones anaeróbicas y aeróbicas. Perteneciente a la familia de las ATPasas tipo P, la CopA asegura la remoción del exceso de  $Cu^+$  del citoplasma transportándolo hacia el periplasma mediante transporte activo [18]. Esta bomba se ha encontrado en distintos tipos de organismos tales como: arqueas, procariontes y eucariontes, incluyendo humanos [11,38,39]. La estructura de esta proteína, mayormente conservada [11,40], consta de ocho dominios transmembrana unidos a la membrana citoplasmática y dos dominios de unión a metales en el extremo N-terminal tal como se observa en la figura 3.3 [11,15]. Existen mecanismos cinéticos o ciclos catalíticos reportados para esta bomba en los trabajos de Argüello, et al.(2007), Gonzales-Guerrero, et al.(2009) y Gonzales-Guerrero, et al (2010). Su transcripción es regulada por CueR a través de un lazo feedback positivo [19,20,41].

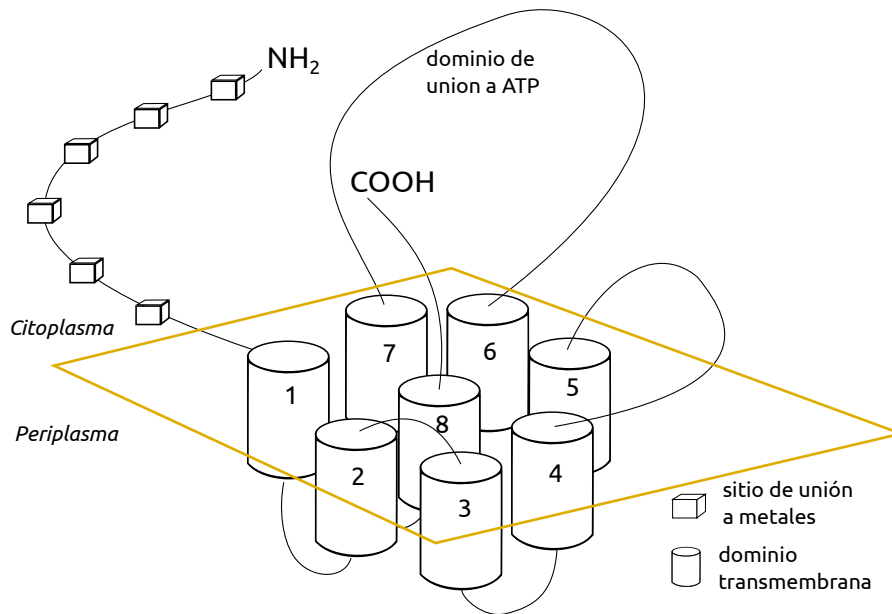


Figura 3.3: Esquema de la estructura de la ATPasa CopA. (Modificado de [11])

CueO (también denominada yacK) es una enzima multicobre oxidasa (MCO) involucrada en la oxidación de cobre en el periplasma, perteneciente a la familia de oxidoreductasas [14]. De 53.4 kDa [42], cuenta con tres sitios para el avance de la reacción con el cobre (T1, T2 y T3), donde T1 generalmente cataliza la oxidación del sustrato, y T2, T3 catalizan la reducción del dioxígeno [14]. Por lo tanto, esta enzima es funcional sólo en condiciones aeróbicas [13,14,42] y cataliza reacciones de oxidación de componentes orgánicos y de algunos metales como el cobre [42], que en particular cambia su estado oxidativo de  $Cu^+$  a  $Cu^{+2}$ . Tal como se menciona en la Sección 1.1, el estado oxidativo del cobre depende de la acidez del compartimiento en que se encuentre, donde en el periplasma, el estado más común para el cobre es el de  $Cu^{+2}$ . El mecanismo cinético descrito para CueO se presenta en la Figura 3.4. La proteína necesita de la presencia de  $Cu^{+2}$  en el periplasma para operar correctamente [43,44]. Su transcripción se regula por CueR a través de un lazo feedback positivo relativo a la concentración de  $Cu^+$  [19,20,41].

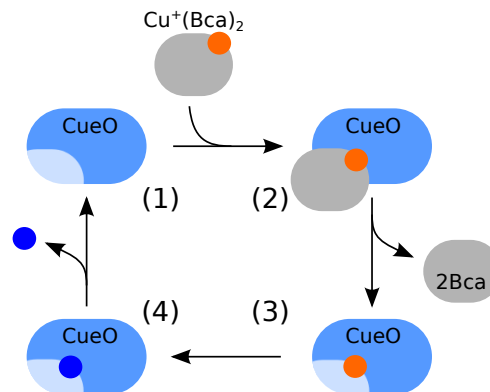


Figura 3.4: Mecanismo cinético reportado para CueO. Reacción mediante el sustrato  $[Cu^{+}(Bca)_2]^{-3}$  en BisTris Buffer. El círculo naranja representa  $Cu^+$  y el azul representa  $Cu^{+2}$  (modificado de [14]).



Finalmente, CueR es una proteína perteneciente a la familia de proteínas metaloreguladoras MerR [44, 45] y se comporta con una función selectiva por los metales de cobre, plata y oro activando la transcripción de *copA* [19, 20, 41]. Se ha medido la sensibilidad de esta proteína por  $Cu^+$  y se ha reportado que puede detectar concentraciones del orden de  $1 - 2 \cdot 10^{-21} M$ , esto se traduce que en poblaciones celulares, la activación o desactivación del regulador depende de la existencia de un átomo del elemento libre en el citoplasma; lo que en comparación con otros sensores, como el ZntR ( $1,15 \cdot 10^{-15} M$  de  $Zn^{+2}$  libre), es varios ordenes de magnitud más sensible [42]. La estructura de CueR cuenta con una región de unión al cobre en el extremo C-terminal, un dominio de dimerización y una región de unión al ADN en el extremo N-terminal [46].

### 3.2.2. Sistema Cus (Cu-sensing)

El sistema Cus cuenta con cuatro componentes, regulados por el loci *cus* el cual contiene dos operones, *cusCFBA* y *cusRS*, que se transcriben regulados por el sistema RS [18]. Cus es expresado a partir de un mayor estrés producido por cobre en el citoplasma, cuando el sistema Cue se va saturando en capacidad regulatoria (sobre  $100 \mu M$  en poblaciones celulares cultivadas en medios con sulfato de cobre) [13] y al estar bajo condiciones anaeróbicas [18, 47]. La función global del sistema es transportar iones  $Cu^+$  desde el citoplasma hacia el espacio extracelular.

Dentro de los componentes de este sistema tenemos:

La bomba transportadora CusCBA, homologa a AcrAB-TolC [23, 24, 47–49], compuesta por tres elementos: CusC, lipo-proteína de membrana de 457 aminoácidos y que es la responsable de anclarse a la membrana externa de la bacteria y servir de canal para la salida de los iones [18]. CusB, proteína de 279 aminoácidos que tiene como función conectar a CusA y CusC; y dar anclaje a la membrana interna para todo el complejo [18, 50, 51]. Esta proteína es capaz de unir  $Cu^+$ , que es el primer paso para transportar el ion fuera de la célula [52]. Finalmente CusA es la bomba central del complejo [24], perteneciente a la familia de proteínas RND que transportan distintas sustancias utilizando la energía del gradiente de protones de la membrana interna generando un transporte antiporte con ellos [16, 21, 22]. Este tipo de proteínas tiene un tamaño de más de 1000 aminoácidos (750 kDa aproximadamente) y se componen de dos dominios hidrofóbicos y dos hidrofílicos [53].

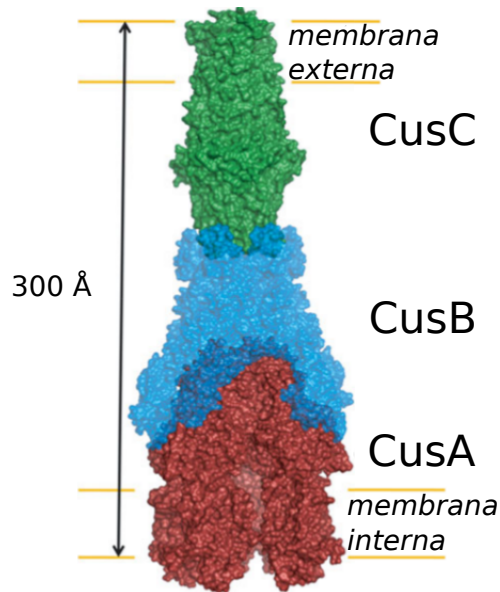


Figura 3.5: Esquema de la estructura de la bomba CusCBA (modificado de [48]).

CusF es una metalochaperona que interacciona con la proteína de membrana CusB [23,24]. Su función consiste en acercar o entregar moléculas de Cu(I) al transportador CusCBA interaccionando con CusB [23, 47, 54]. Específicamente, la proteína puede acoplar una unidad de cobre [55]. Su estructura consiste en cinco “Beta”-plegadas formando una estructura acilindrada [47]. Se han encontrado varias proteínas similares en una variedad de organismos Gram-negativos [47]. La transcripción de esta chaperona está mediada por la proteína CusR bajo el operon CusCFBA.

El sistema regulador CusRS (Figura 3.6) se compone de dos proteínas, CusR y CusS, ambas involucradas en la regulación de la transcripción del operón *cusCFBA* y que dependen de la concentración de  $Cu^+$  o  $Ag^+$  presente a través de un lazo feedback negativo [7,56,57]. CusS es un sensor histidina-quinasa que se encuentra en la membrana citoplasmática y que monitorea la concentración de cobre en el periplasma [7, 13, 25], mientras que CusR es un regulador que activa la transcripción de los genes *cusCFBA* y *cusRS* luego de ser fosforilado por CusS [7, 13, 24, 25, 58].

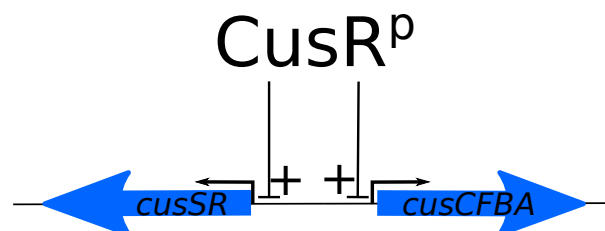


Figura 3.6: Esquema de regulación del sistema Cus.

### 3.2.3. Otros componentes

Existen otros componentes relacionados con la homeostasis de cobre en *E. coli* que no pertenecen a los sistemas descritos anteriormente. Unos, no son codificados en el cromosoma de la bacteria si no que están incorporados a algunos plásmidios dentro de esta, otros son componentes secundarios de la homeostasis de cobre [26,27].

Los genes *pco* se encuentran presentes en el plasmidio pRJ1004 [59]. En total este grupo de genes cuenta con siete componentes agrupados en los operones *pcoABCD*, *pcoRS* y el gen *pcoE* [59]. PcoR y PcoS son las proteínas que regulan el sistema y pueden asemejarse a la función que realiza CusR y CusS, donde la primera es un activador transcripcional y el segundo es un sensor quinasa. PcoA es una multicobre oxidasa presente en el periplasma de función similar a CueO [59,60]. PcoB y PcoD son bombas presentes en la membrana citoplasmática y externa respectivamente [60]. En cuanto a *pcoE* se ha encontrado que es capaz de unir cobre en el periplasma y se cree que su función es la de proteína chaperona [18,60].

Dentro del genoma de *E. coli* hay genes como *cutC*, *cutF* y *ndh* los cuales se ha sugerido que están involucrados en la homeostasis de cobre pero su rol aun no ha sido determinado [58,61–63].

## 3.3. Modelos y Mecanismos

Para el metabolismo de metales se ha estado utilizando un tipo de herramienta que permite conectar gran la cantidad de investigación desarrollada en el último tiempo [29]. Esta herramienta, definida por Ríos (1995) como: “*Un modelo es un objeto, concepto o conjunto de relaciones, que se utiliza para representar y estudiar de forma simple y comprensible una porción de la realidad empírica*”, por tanto, un modelo matemáticos es la representación de un proceso que permite predecir a partir datos empíricos, ciertos sucesos o comportamientos para algún evento. Los modelos, y en particular los modelos matemáticos, pueden tomar distintas formas, y para el caso de la homeostasis de cobre, pueden ser utilizados para relacionar la concentración de metales a nivel traza al interior de la célula, con las altas concentraciones al exterior de esta a partir de los distintos fenómenos que utilizan los microorganismos para su regulación.

Es posible agrupar los métodos utilizados en metabolismo de metales en cuatro grupos:

- modelos basados en red Petri de regulación cualitativa.
- modelos de sistemas multiagente.
- modelos estocásticos.
- modelos basados en ecuaciones diferenciales de predicción cuantitativa de flujos.

La idea fundamental detrás de la red de Petri (Figura 3.7) es derivada de la teoría de grafos y consiste en definir ciertos *lugares (place)* que pueden ser ocupados por *fichas (tokens)* las cuales pueden moverse de un lugar a otro a través de *transiciones (transition)*. La transición de un lugar a otro sólo puede ocurrir si en el primer lugar está presente una ficha. En el caso de sistemas biológicos, es posible incorporar información conocida a partir de invariantes

asociadas a lugares o transiciones [29]. En el caso de metabolismo de metales, este tipo de modelo fue aplicado a metabolismo del hierro en humanos en los trabajos de Formanowicz, et al. [64–67]

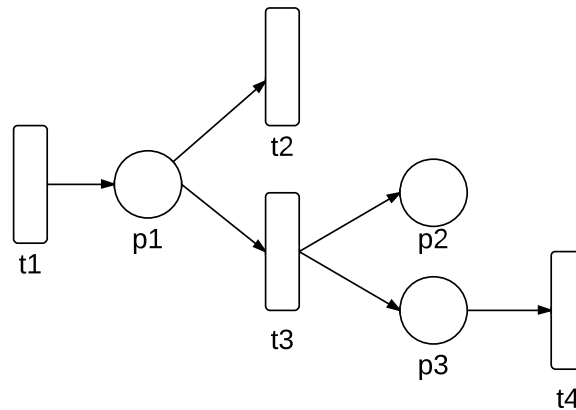


Figura 3.7: Esquema de una red de Petri. En el esquema, los círculos representan los lugares, los rectángulos las transiciones. Las fichas pasan de un lugar a otro si la transición se lo permite.

Para los modelos de sistemas multiagentes, se definen un gran número de elementos unitarios donde cada elemento evoluciona a través del tiempo a partir de reglas simples. Esta evolución puede ser tanto determinista o ser aleatoria dependiendo de las reglas que se impongan. En este último caso, el modelo es llamado también métodos de Monte-Carlo [29]. Las aplicaciones de este tipo de modelos en el campo biológico van desde simulaciones de supervivencia de colonias celulares [68], del transporte de aluminio en la sangre [69,70], señalización de rutas intracelulares [71], entre otras.

Los modelos estocásticos están basado en procesos aleatorios al cual se asocia un conjunto de variables aleatorias relacionadas a una variable integrable (comúnmente llamada *tiempo*) que puede ser discreta o continua. Con esta conformación es posible saber el valor de cada variable a un tiempo determinado donde, el valor puede ser distinto para ese mismo tiempo en iteraciones posteriores. Los modelos estocásticos desarrollados para metabolismo de metales son basados en procesos de Markov donde la dependencia entre variables está bien definida [29]. Algunos casos donde se apliquen este tipo de modelos son la predicción de sitios de unión del zinc en proteínas *zinc-finger* [72] o aplicaciones en el metabolismo del calcio [73] o del plomo [74].

Finalmente, los modelos de predicción cuantitativa de flujos son los más utilizados en el contexto del metabolismo de metales. Esto se debe a que el uso de ecuaciones diferenciales permite modelar gran cantidad de sistemas dado que cualquier sistema puede ser interpretado como la evolución en el tiempo de flujos o materia [29]. Dada la flexibilidad de este modelo, podemos distinguir distintas agrupaciones de planteamientos con características similares.

Es así como se tienen modelos farmaco-cinéticos que describen el sistema como una serie de compartimientos donde, más que las reacciones, el sistema se ve controlado por el proceso de eliminación o movimiento de las especies entre los compartimientos y se ha utilizado para cobre [75, 76], hierro [77, 78], entre otros.

Otro grupo son los modelos de poblaciones celulares, donde el metabolismo de metales se estudia en el efecto que produce en el crecimiento de la población. Esto puede ser descrito a partir de tasas de muerte o duplicación, por lo general de primer orden, y donde se monitorea una variable que representa el número total de células. Algunos ejemplos de modelación a partir de estos modelos son: Crecimiento celular en presencia de hierro en *Pseudomonas fluorescens* [79], Toxicidad de níquel y cromo en keratinocitos [80], entre otros.

También existen los modelos de una célula donde, a partir de una división de los compartimientos celulares se observa la transformación metabólica de algún componente. Estas transformaciones son modeladas a partir de ecuaciones de primer orden para difusión o por ecuaciones de Michaelis-Menten para transporte [29]. Estos modelos se han utilizado en absorción de calcio intestinal [81, 82], Homeostasis de cobre en *E. hirae* [83], entre otros.

Finalmente, están los modelos a escala molecular que pretenden construir modelos cinéticos a partir del estudio específico de las reacciones presentes. Es así como se define el cambio neto del metabolito  $A$  como  $v_A = dA/dt$ , positivo si  $A$  aparece y negativo si  $A$  desaparece. Cuando un sistema incluye varias reacciones, el cambio neto de  $A$  es una suma de los cambios individuales de cada reacción (Ec.3.1).

$$v_A = \frac{dA}{dt} = \sum_{i=1}^n k_{A,i} \cdot v_{A,i} \quad (3.1)$$

Donde  $v_{A,i}$  es la velocidad de la reacción  $i$  en la que está presente el compuesto  $A$ , y  $k_{A,i}$  es la constante cinética asociada a la reacción  $i$ . Este grupo de modelos se ha utilizado en la modelación de la cinética de superóxido dimutasa (SOD) en el control oxidativo de Zinc y Cobre [84].

La suma de velocidades parciales presentada anteriormente, puede relacionarse con cinéticas enzimáticas y generar reacciones de distintos ordenes. Además, es en estos modelos donde se incorporan las cinéticas de Michaelis-Menten (Ec. 3.2) o cinéticas tipo Ecuación de Hill (Ec. 3.3) para el caso de enzimas alostéricas o cinéticas no Michaelianas. Otro caso, se obtiene cuando  $v_{A,i}$  es reemplazado por las concentraciones de los reactantes de la reacción, donde se obtienen reacciones de orden parcial uno para cada componente.

$$v_{A,i} = \frac{k_{max} \cdot S}{K_m \cdot S} \quad (3.2)$$

$$v_{A,i} = \frac{k_{max} \cdot S^\theta}{K_m \cdot S^\theta} \quad (3.3)$$

Donde, para la Ecuación 3.2,  $k_{max}$  es la velocidad máxima teórica de la enzima,  $S$  la concentración de sustrato y  $K_m$  es la constante de Michaelis-Menten. Y para la Ecuación 3.3, el término  $\theta$  es el coeficiente de Hill que indica el grado de cooperatividad.

# Capítulo 4

## Metodología

### 4.1. Herramientas utilizadas

#### 4.1.1. Base de datos biológicas

A partir de la definición de los componentes del sistema de homeostasis de cobre en *E. coli*, se utilizaron distintas bases de datos biológicas en línea para revisar y ampliar los detalles reportados de los elementos estudiados. Con estas herramientas, se profundizó el conocimiento referente a la estructura y secuencia de las proteínas, además de obtener el alineamiento de secuencias de las proteínas similares. Estas bases de datos se describen a continuación:

**KEGG ([www.genome.jp/kegg](http://www.genome.jp/kegg)):** KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) es una base de datos en línea desarrollada para el entendimiento de funciones de los sistemas biológicos y contiene información de genomas, rutas enzimáticas y rutas metabólicas. A través de la herramienta, es posible registrar las redes de interacciones moleculares dentro de las células, especialmente datos de tecnologías *High-throughput* [85]. Actualmente KEGG ha cambiado a un modelo de suscripción y el acceso a través de FTP ya no es gratis, aunque el uso de su base de datos sí lo es.

**BRENDA ([www.brenda-enzymes.org](http://www.brenda-enzymes.org)):** BRENDA (BRAunschweig ENzyme DAtabase) es una base de datos en línea que contiene información molecular y bioquímica de enzimas clasificadas por IUBMB. Se actualiza dos veces por año con información de literatura científica incorporada manualmente y además se actualiza automáticamente de literatura menos especializada. Toda enzima clasificada es caracterizada con respecto a su reacción y las propiedades cinéticas de los reactantes correspondientes, también cuenta con información de la expresión y regulación de ésta [86].

**EcoCyc ([ecocyc.org](http://ecocyc.org)):** EcoCyc es una base de datos de la bacteria *Escherichia coli* K-12 MG1655, ésta contiene información acerca del genoma, de la regulación transcripcional, de los transportadores y las rutas metabólicas de la bacteria. Además, entrega herramientas de visualización para el análisis de datos de distintas omicas. Otra de las opciones que en-

trega es la descarga de archivos y herramientas de rutas metabólicas [32, 87].

**BLAST (blast.ncbi.nlm.nih.gov):** BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) es un programa en línea de alineamiento de secuencias de ADN, ARN y proteínas. Para esto, el programa realiza una búsqueda de la secuencia problema en la base de datos entregando un parámetro de significación de los resultados lo que permite juzgar las respuestas obtenidas. Esta aplicación es gratuita y es posible descargarlo e instalarlo para uso local [88].

#### 4.1.2. Herramientas Computacionales

Para la resolución del sistema de ecuaciones planteadas en el proyecto se utilizaron paquetes de softwares especializados. De estos softwares se distingue la utilización de herramientas que permitieran resolver ecuaciones diferenciales de manera numérica. En particular, para este proyecto se utilizó el comando ODE23s de MATLAB que finalmente es un algoritmo de Runge-Kutta de paso adaptativo de orden 2 y 3 modificado para problemas *stiff*. Además, se utilizaron algoritmos de minimización para el ajuste de parámetros donde se destacan la minimización por mínimos cuadrados y la minimización por *simulated annealing*.

#### 4.1.3. Mecanismos Reportados

De los elementos a estudiar, han sido reportados mecanismos cinéticos para algunas proteínas del sistema global de la homeostasis de cobre. Estos mecanismos corresponden a CopA, CueO y CusCBA los cuales son analizados respectivamente en las secciones 5.1.1, 5.1.2 y 5.2.1. A continuación, en la Tabla 4.1, se presentan de donde se obtuvieron estos mecanismos.

Tabla 4.1: Lista de mecanismos reportados para las proteínas del modelo.

Proteína	Mecanismo Reportado
CopA	M. González-Guerrero, D. Raimunda, X. Cheng, J. Argüello. 2010 J. Argüello, E. Elif, M. González-Guerrero. 2007
CueO	K. Djoko, L. Chong, A. Wedd, Z. Xiao. 2010 S. Singh, G. Grass, Ch. Rensing, W. Montfort. 2004
CusCBA	F. Long, Ch. Su, H. Lei, J. Bolla, S. Do, E. Yu. 2012
AcrAB-TolC	S. Murakami. 2010

#### 4.1.4. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) Reportados

A partir de distintos casos de *knockdown* de los genes que componen el sistema de homeostasis de cobre, se pretende aislar el efecto de cada componente en la dinámica de transporte y control de este elemento en el sistema y así, validar el modelo tal como se plantea en la Sección 4.2.5. Es así como en la Tabla 5.8 se presentan las MICs reportadas para distintas mutaciones de tipo *knockdown*, los cuales serán el punto a comparar para la validación del modelo.



Tabla 4.2: Lista de MICs reportadas.

<sup>a</sup>: Resultados no publicados

Cepa	Knockdown	MIC [mM]	Autor
W3110	$\Delta cueO$	3.25	Franke 2003
	$\Delta cueO \Delta cusAB$	1.50	Franke 2003
	$\Delta cueO \Delta cusF$	2.25	Franke 2003
	Wild Type	3.50	Grass 2001
	$\Delta cueO$	2.75	Grass 2001
	$\Delta cusFCBA$	3.50	Grass 2001
K12	Wild Type	2.75	Navarro y Jerez 2011 <sup>a</sup>
	$\Delta copA$	0.50	Navarro y Jerez 2011 <sup>a</sup>
	$\Delta cusFCBA$	3.00	Navarro y Jerez 2011 <sup>a</sup>
	$\Delta cueO$	2.75	Navarro y Jerez 2011 <sup>a</sup>
	$\Delta cueO \Delta cusCBA$	1.00	Navarro y Jerez 2011 <sup>a</sup>
	$\Delta cueO \Delta cueO \Delta cusCBA$	0.25	Navarro y Jerez 2011 <sup>a</sup>

## 4.2. Procedimiento

A continuación, se presenta la metodología utilizada donde se detallarán los protocolos empleados para la realización del proyecto de tesis. Previo a esto, se muestra en la Figura 4.1 un diagrama que resume las distintas etapas involucradas.

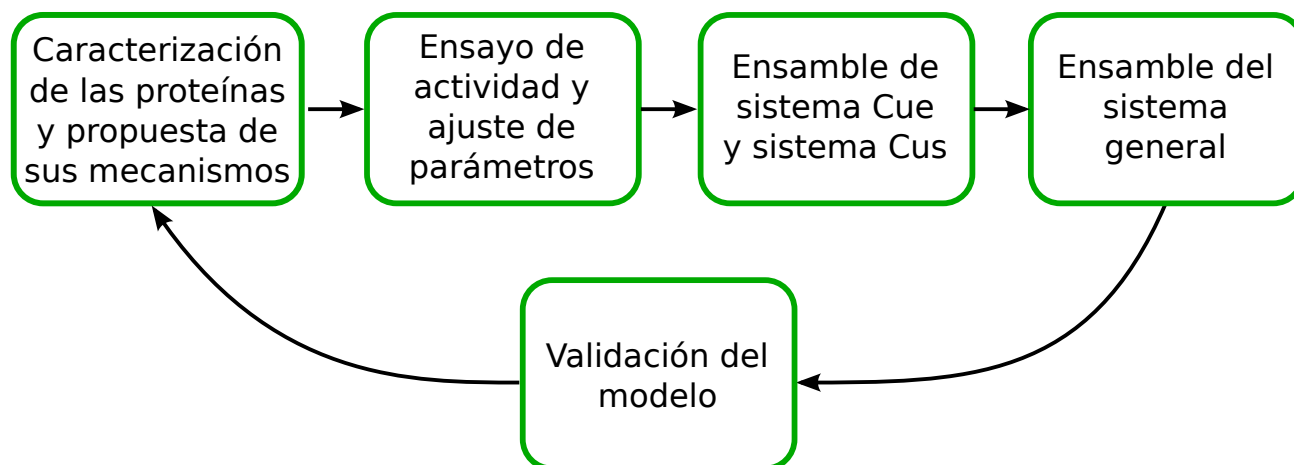


Figura 4.1: Esquema de la metodología utilizada.

### 4.2.1. Caracterización de las proteínas y propuestas de sus mecanismos

La primera etapa de la metodología considera una búsqueda bibliográfica para identificar los distintos componentes del sistema de la homeostasis de cobre en *E. coli* para luego profundizar en sus tipologías estructurales, enzimáticas y la similitud con las características de otras proteínas. En esta etapa, también se realiza el estudio de distintos modelos, las ventajas que

tienen para el desarrollo de un sistema como el estudiado y mecanismos ya propuestos para sistemas similares de control de concentraciones.

En cuanto a la información de las proteínas, se obtuvo la estructura de todos los componentes proteicos, además de información sobre sus funciones biológicas. Se relacionó algunos componentes a familias de proteínas como son el caso de las ATPasa, superóxido dimutasas y RND. Sólo se obtuvieron los valores de la actividad para las proteínas CopA y CueO.

Para los modelos estudiados se definió trabajar con predicción cuantitativa de flujo por el probado uso en este tipo de sistemas y la flexibilidad que otorgan en modificar sus componentes. Además, se encontró mecanismos reportados para CopA, CueO y CusCBA. A estos se les realizaron los correspondientes balances de masa, de acuerdo a los mecanismos propuestos para cada proteína.

#### **4.2.2. Ensayo de actividad y ajuste de parámetros**

Una vez planteados los mecanismos, éstos se ajustaron a los distintos ensayos de actividad reportados. Estos ajustes tienen la intención de definir el valor numérico de los parámetros cinéticos que están asociados a cada velocidad de reacción. Esta etapa de ajuste se realizó, en primera instancia, con valores reportados de sistemas similares, luego con la programación de algoritmos, como diferencia de mínimos cuadrados, y finalmente con el uso de *softwares* especializados. En el caso de las proteínas sin ensayos de actividad reportados, se utilizaron datos de proteínas similares, como es el caso del símil entre AcrAB-TolC y CusCBA.

#### **4.2.3. Ensamble de los sistemas Cue y Cus**

Definidos los componentes, estos se unen para formar cada subsistema y así evaluar el comportamiento del sistema Cue y el sistema Cus individualmente. Los resultados obtenidos son comparados cualitativamente con los estudios o descripciones realizadas.

Como los ensayos de actividades utilizados tienen unidades distintas, es necesario ajustarlos para que sean coherentes con las variables utilizadas por el modelo. Es así como, fue necesario normalizar por el peso molecular de algunas proteínas o utilizar los volúmenes adecuados para transformar moles a concentraciones.

#### **4.2.4. Ensamble del sistema general de la homeostasis de cobre**

Finalmente, los subsistemas se unen y se definen los componentes restantes presentes en la homeostasis de cobre como la difusión o el equilibrio en los distintos compartimientos de la célula. En esta etapa, nuevamente se realiza una evaluación cualitativa de las características o descripciones reportadas.

Se definen los volúmenes de operación y las constantes para el transporte de cobre entre membranas.

#### 4.2.5. Validación del modelo

Para la validación del modelo se utilizaron MICs reportadas para distintos casos de mutación tipo *knockdown*, basándose en el siguiente protocolo:

1. Definir un caso de control que represente el estado del sistema bajo la concentración de la MIC reportada. Este caso control establecerá las concentraciones de cobre relativas permitidas al modelo donde es posible decir que el crecimiento es viable.
2. Realizar los experimentos de simulación para los distintos *knockdown* con una concentración de cobre externo igual al MIC reportada para este caso. A partir de esto, observar cuan sensible es el sistema a la concentración de cobre externo al suprimir una o varias proteínas.
3. Hacer una búsqueda de concentración de cobre externa para cada caso de *knockdown*, y así definir a que razón de la MIC se debe reducir la concentración obtenida en el paso anterior para que el modelo alcance una concentración igual o menor al caso control.
4. Calcular la MIC asociada al caso de *knockdown* estudiado a partir de la razón obtenida anteriormente.

# Capítulo 5

## Resultados y Discusión

### 5.1. Resultados del Sistema Cue

#### 5.1.1. Proteína transportadora CopA

A partir de los trabajos de Gonzalez-Guerrero, et al.(2009) y Argüello, et al(2007), y añadiendo los datos reportados por Gonzalez-Guerrero, et al.(2010), se propone el mecanismo para la proteína CopA en la Figura 5.1. El mecanismo propuesto de cuatro estados para CopA, es similar al mecanismo de Argüello, et al. (2007) salvo en que en este último la incorporación de ATP en conjunto con el metal, que corresponde a una simplificación que se tratará más adelante. A su vez, el mecanismo de Gonzalez-Guerrero, et al (2010) propuesto para ATPasas que tienen como chaperona a CopZ difiere de los anteriores en que la incorporación de ATP y cobre es independiente, agregando dos estados cinéticos más (CopA-Cu y ATP-CopA) al separar estos compuestos. Según lo observado en otros mecanismos relacionados [89, 90], la incorporación de ATP a este tipo de transportadores no se realiza en conjunto con el metal, aunque su velocidad de incorporación es mayor y por lo tanto sería posible despreciarlo si está presente en exceso o unirlos en una sola transición de ser necesario incorporarlo. En relación a la reversibilidad, esta existe en todas las reacciones de transiciones de estado en los mecanismos antes mencionados, tanto como en el propuesto como en los reportados. Esto se profundizará en la Sección 5.4.

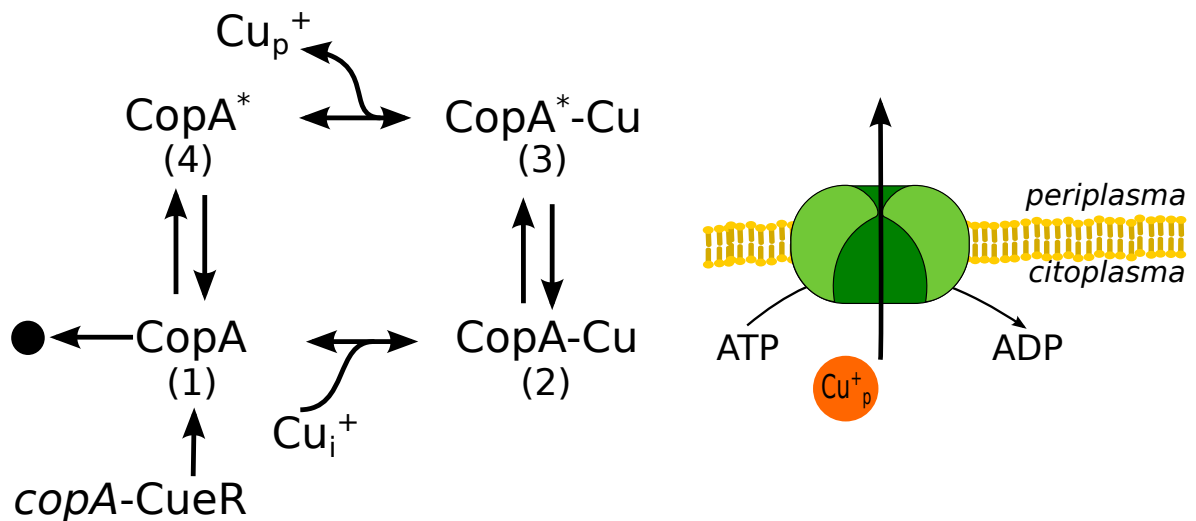


Figura 5.1: Mecanismo de estados propuesto y esquema de función biológica para CopA. Se denomina: Estado 1 a la proteína CopA que no está asociada a ninguna molécula por el lado citoplasmático. Estado 2 a CopA unida a  $\text{Cu}^+$  por el lado del citoplasma. Estado 3 a CopA unida a un  $\text{Cu}^+$  por el lado del periplasma. Estado 4 a CopA libre por el lado del periplasma. *copA* se refiere al gen de la proteína y  $\bullet$  al estado de degradación de la misma.

En la Figura 5.1 se observan cuatro estados distintos, dos a cada lado de la membrana. El mecanismo propuesto supone que la concentración de ATP está en exceso y no afecta la velocidad de transporte a pesar de ser un transporte activo. El supuesto de ATP en exceso dentro del citoplasma limita al modelo, provocando que no sea aplicable a casos de estrés o uso intensivo de ATP, ya sea por la homeostasis de cobre o por algún otro proceso de la célula. En este caso la velocidad de transporte no se vería afectada, siendo que en un caso real, la baja de ATP disponible resultaría en una disminución de la cantidad de átomos de cobre transportado afectando la resistencia al cobre de la bacteria. A pesar de esto, se decidió utilizar las simplificaciones por los datos experimentales recopilados para el ajuste de la cinética de la proteína, y aunque, teóricamente el uso de los mecanismos reportados limita de menor manera el modelo, el mecanismo propuesto acota el problema y utiliza variables relacionadas directamente con el sistema de homeostasis de cobre. Lo cual, es conveniente como primera aproximación a los objetivos planteados.

Para los mecanismos propuestos anteriormente, todas las reacciones son reversibles [15,91] y por tanto, el sistema de ecuaciones que define los mecanismos se presenta en la Ec. 5.1. La expresión de las velocidades asociadas al sistema se encuentran en la Tabla 5.1. Estas velocidades son obtenidas en base a lo planteado en la Sección 3.3 y hacen referencia a reacciones de primer orden parcial para cada componente, esto bajo la base que, al proponer una cinética de mecanismos para del transportador, el paso de un estado a otro se relaciona con una reacción elemental o concertada. Tal definición de las velocidades se aplicará para el resto de los elementos del sistema de homeostasis de cobre.

$$\text{CopA} = \begin{cases} \frac{d[\text{CopA}_1]}{dt} = v_{ag1} - v_{a1d} - v_{a12} + v_{a21} - v_{a41} + v_{a14} \\ \frac{d[\text{CopA}_2]}{dt} = v_{a12} - v_{a21} - v_{a23} + v_{a32} \\ \frac{d[\text{CopA}_3]}{dt} = v_{a23} - v_{a32} - v_{a34} + v_{a43} \cdot (V_p/V_c) \\ \frac{d[\text{CopA}_4]}{dt} = -v_{a41} + v_{a14} - v_{a34} + v_{a43} \cdot (V_p/V_c) \end{cases} \quad (5.1)$$

Tabla 5.1: Velocidades de mecanismo de estados de CopA.

Velocidad directa	Expresión	Velocidad inversa	Expresión
$v_{ag1}$	$a_{g1} \cdot [\text{copA} - \text{CueR}]$	$v_{a1d}$	$a_{g1} \cdot [\text{CopA}_1]$
$v_{a12}$	$a_{12} \cdot [\text{CopA}_1] \cdot [\text{Cu}_i^+]$	$v_{a21}$	$a_{21} \cdot [\text{CopA}_2]$
$v_{a23}$	$a_{23} \cdot [\text{CopA}_2]$	$v_{a32}$	$a_{32} \cdot [\text{CopA}_3]$
$v_{a34}$	$a_{34} \cdot [\text{CopA}_3]$	$v_{a43}$	$a_{43} \cdot [\text{CopA}_4] \cdot [\text{Cu}_p^+]$
$v_{a41}$	$a_{41} \cdot [\text{CopA}_4]$	$v_{a14}$	$a_{14} \cdot [\text{CopA}_1]$

La nomenclatura de las velocidades hace referencia a las reacciones que las definen, así  $v_{aij}$  es la velocidad relacionada a la reacción que va del estado  $i$  al estado  $j$  del mecanismo de CopA. Donde,  $g$  se refiere al estado de generación y  $d$  al de degradación.

A partir de lo anterior, el sistema fue simplificado para ajustar los datos reportados relacionados con su actividad, es por eso que se supone en equilibrio las reacciones del estado  $2 \rightarrow 3$  y  $4 \rightarrow 1$ . Esta suposición se basa en el estudio de cinéticas de transportadores similares [90, 92], en donde se observó que las dinámicas asociadas al cambio del estado  $2 \rightarrow 3$  y  $4 \rightarrow 1$  son más rápidas que las otras reacciones y por ende alcanzan el equilibrio con mayor velocidad. Además, se centró en el fenómeno de transporte ignorando la cinética de generación y degradación de la proteína. Es así, como se obtiene la ecuación 5.2 para el flujo de  $\text{Cu}^+$  al ser transportado por CopA. El desarrollo de la expresión se encuentra en Anexo A.

$$V_c \cdot \frac{d[\text{Cu}_p^+]}{dt} \left( \frac{1}{\text{CopA}_{tot}} \right) = \frac{1}{K_a + [\text{Cu}_i^+]} \cdot \left( K_1 \cdot [\text{Cu}_i^+] \cdot V_c - K_2 \cdot [\text{Cu}_p^+] \cdot V_p \right) \quad (5.2)$$

La expresión anterior se asemeja a una ecuación de Michaelis-Menten con  $K_1$  y  $K_2$  como los términos de velocidad máxima  $V_{max}$ ; y  $K_a$  como la constante de Michaelis  $K_m$ . El ajuste del modelo a la actividad reportada del transportador se muestra a continuación en la Figura 5.2 y se observa una curva típica de saturación de tipo Michaelis-Menten, donde la velocidad aumenta asintóticamente a medida que aumenta la concentración de cobre teniendo como límite la velocidad máxima.

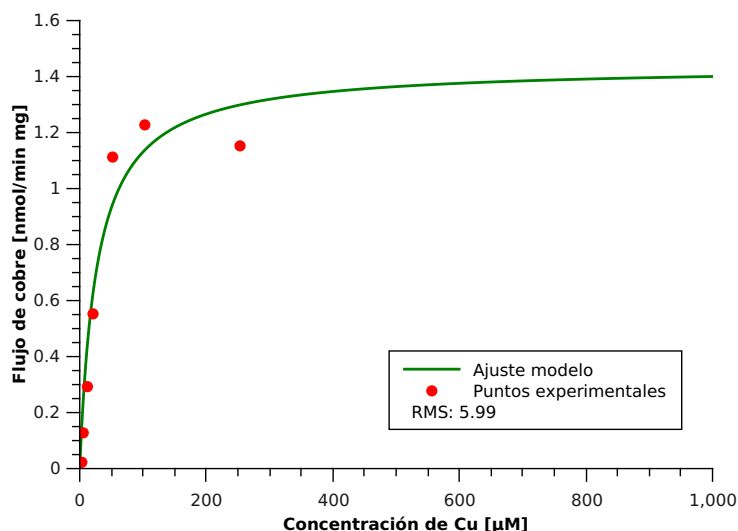


Figura 5.2: Ajuste de CopA a datos experimentales. Para el ajuste presentado,  $K_1$  tiene un valor de  $9,63 \cdot 10^1$  [nmol/min · mg],  $K_2$  tiene un valor de  $1,00 \cdot 10^1$  [nmol/min · mg] y  $K_a$  es igual a  $2,72 \cdot 10^1$  [µM].

El ajuste de parámetros de esta proteína se realiza mediante la función de mínimos cuadrados, donde se comparan los datos experimentales de Gonzalez-Guerrero, et al.(2010) con la Ecuación 5.2. Tal como está presente en la Figura 5.2, de este ajuste se obtuvo un RMS de 5.99 logrando que el modelo planteado ajuste los datos experimentales.

La ecuación planteada por Gonzalez-Guerrero, et al.(2010) para los puntos experimentales obtenidos, no cuenta con el término asociado a  $K_2$ ; a pesar de eso, el ajuste alcanzado por el modelo de CopA obtiene el mismo resultado, ya que la expresión propuesta es factorizable logrando que el término asociado a  $V_{max}$  sea la suma de  $K_1$  y  $K_2$ . A partir de esto, el modelo propuesto incorpora un transporte reversible entre el cobre del citoplasma al periplasma, donde la velocidad neta en la mayoría de los casos tiene la dirección de la función típica reportada para el transportador. Este comportamiento es razonable por los mecanismos revisados para distintos transportadores y en específico para el de CopA. Este tema se profundizará en la Sección 5.4.

Sobre el supuesto de ATP constante planteado anteriormente, en primera instancia, sería posible incorporar la dependencia de la concentración de esta molécula agregándola a la ecuación  $v_{a12}$ , lo que se traduce en que la proteína, se una tanto al cobre transportado como al ATP entre los estados 1 y 2 del mecanismo. Otra opción es agregar un nuevo estado de incorporación de ATP entre los estados 1 y 2 propuestos, tal como se ha reportado para este tipo de proteínas.

El supuesto de no considerar la cinética de generación y degradación se abordará en sección posterior (Sección 5.4).

### 5.1.2. Enzima CueO

Para CueO, los trabajos de Djoko, et al.(2010) y los datos reportados por Singh, et al.(2004), son la base para proponer el mecanismo de la proteína (Figura 5.3). El mecanismo, basado en el reportado por Djoko, et al (2010) considera cuatro estados: la incorporación del oxígeno, la del sustrato, luego la reacción y finalmente el desprendimiento del producto. Este mecanismo es el mismo planteado para la enzima por Djoko, et al (2010), salvo en la incorporación del oxígeno, diferencia que se discutirá más adelante.

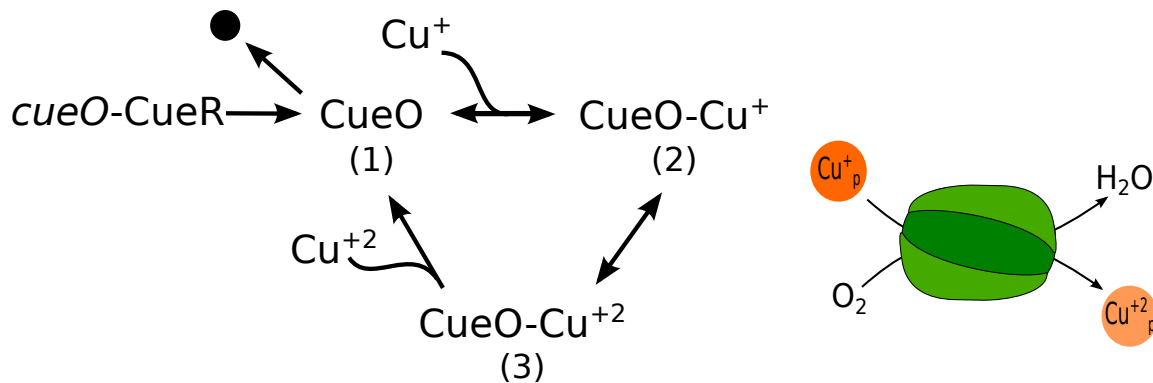


Figura 5.3: Mecanismo de estados propuesto y esquema de función biológica para CueO. Se denomina: Estado 1 a la proteína CueO en estado libre. Estado 2 a CueO unida a un  $\text{Cu}^+$ . Estado 3 a CueO unida a un  $\text{Cu}^{+2}$  luego de la reacción de oxidación. *cueO* se refiere al gen de la proteína y  $\bullet$  al estado de degradación de la misma.

En el esquema anterior se observan tres estados distintos. El mecanismo propuesto supone la concentración de oxígeno en exceso para la reacción, lo cual limita la acción del modelo a casos aeróbicos. Es posible incorporar esta variable agregando el término de concentración de oxígeno a la velocidad  $v_{o23}$ , entre los estados 1 y 2; esto se traduce en hacer dependiente la cinética de oxidación del cobre a la concentración del aceptor de electrones, teniendo en cuenta la solubilidad de este elemento en solución. Aun así, los datos reportados a los que se ajustaron los parámetros cinéticos, son obtenidos a condiciones aeróbicas haciendo independiente la reacción de este elemento. Al igual que para CopA, el uso del mecanismo planteado tiene la ventaja de utilizar las variables relacionadas directamente con la homeostasis de cobre y con esto permitir, en primera instancia, construir el modelo en base a datos experimentales y relaciones que han sido reportadas para esto.

El sistema de ecuaciones que define al mecanismos se observa en la Ecuación 5.3, la expresión de las velocidades que participan en el sistema se encuentran en la Tabla 5.2, donde estas expresiones están definidas según lo expuesto en la Sección 5.1.1. Para este caso, el balance de masa se realiza en el espacio periplasmático y por tanto el volumen asociado a las concentraciones es el mismo, mostrándose a continuación las expresiones simplificadas del sistema.



$$CueO = \begin{cases} \frac{d[CueO_1]}{dt} = v_{og1} - v_{o1d} - v_{o12} + v_{o21} + v_{o31} \\ \frac{d[CueO_2]}{dt} = v_{o12} - v_{o21} - v_{o23} + v_{o32} \\ \frac{d[CueO_3]}{dt} = v_{o23} - v_{o32} - v_{o31} \end{cases} \quad (5.3)$$

Tabla 5.2: Velocidades de mecanismo de estados de CueO.

Velocidad directa	Expresión	Velocidad inversa	Expresión
$v_{og1}$	$o_{g1} \cdot [cueO - CueR]$	$v_{o1d}$	$o_{g1} \cdot [CueO_1]$
$v_{o12}$	$o_{12} \cdot [CueO_1] \cdot [Cu_p^+]$	$v_{o21}$	$o_{21} \cdot [CueO_2]$
$v_{o23}$	$o_{23} \cdot [CueO_2]$	$v_{o32}$	$o_{32} \cdot [CueO_3]$
$v_{o31}$	$o_{31} \cdot [CueO_3]$		

La nomenclatura de las velocidades hace referencia a las reacciones que las definen, así  $v_{oij}$  es la velocidad relacionada a la reacción que va del estado  $i$  al estado  $j$  del mecanismo de CueO. Donde,  $g$  se refiere al estado de generación y  $d$  al de degradación.

El sistema se simplificó para ajustar los datos de actividad reportados y es por eso, que se supone en equilibrio las reacciones del estado  $1 \rightarrow 2$  y  $2 \rightarrow 3$ , para esto, se tuvo en consideración una cinética mendeliana que considera reversible la unión de la enzima con el sustrato, e irreversible la reacción una vez liberado el producto al medio. Además, se centra en el fenómeno de transporte ignorando la cinética de generación y degradación de la proteína. Obteniendo la ecuación 5.4 para la aparición de  $Cu^{+2}$  al ser catalizado por CueO. El desarrollo de la expresión se encuentra en Anexo B.

$$\frac{d[Cu_p^{+2}]}{dt} \left( \frac{1}{CueO_{tot}} \right) = K_1 \cdot \frac{1}{K_a + [Cu_p^+]} [Cu_p^+] \quad (5.4)$$

Se observa que la ecuación, se asemeja a una ecuación de Michaelis-Menten con  $K_1$  como los términos de velocidad máxima  $V_{max}$  y  $K_a$  como la constante de Michaelis  $K_m$ . El ajuste del modelo a dichos datos se muestra en la Figura 5.4.

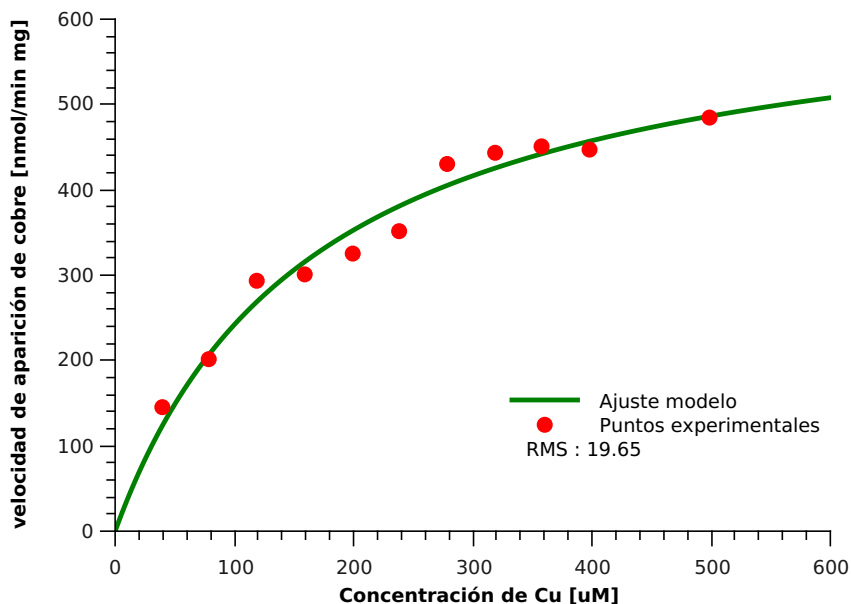


Figura 5.4: Ajuste de CueO a datos experimentales. Para el ajuste presentado,  $K_1$  tiene un valor de  $3,91 \cdot 10^1$  [nmol/min · mg],  $K_a$  es igual a  $2,72 \cdot 10^1$  [ $\mu$ M].

El ajuste de parámetros de esta proteína se realiza mediante la función de mínimos cuadrados, donde se comparan los datos experimentales de Singh, et al.(2004) con la Ecuación 5.4. Se aprecia que la velocidad enzimática se comporta como una cinética de saturación de Michaelis-Menten y que, a medida que aumenta la concentración de cobre, la velocidad se va reduciendo hasta alcanzar la saturación a la velocidad máxima. Teniendo en cuenta lo anterior, los resultados del mecanismo de CueO se ajusta a los datos experimentales de su actividad para el caso estudiado, obteniendo un RMS de 19.65 para la metodología de ajuste utilizada.

El supuesto de no considerar la cinética de generación y degradación se abordará en sección posterior (Sección 5.4).

### 5.1.3. Proteína reguladora CueR

En el caso de CueR, su actividad radica en el control génico de la expresión de CopA y CueR. Es por eso que el mecanismo propuesto (Figura: 5.5) se relaciona con los genes de estas proteínas.

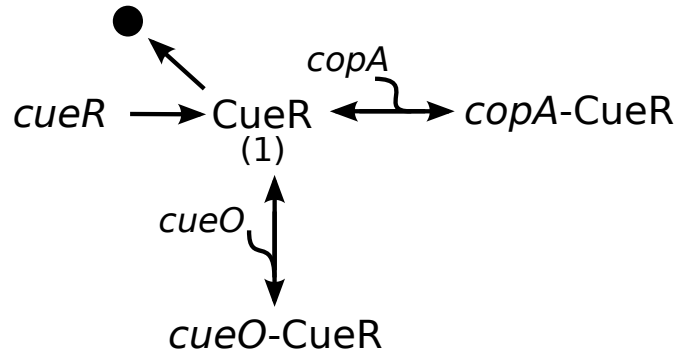


Figura 5.5: Mecanismo de estados propuesto para CueR. Se denomina: Estado 1 a la proteína CueR no asociada a ninguna molécula. *cueR* se refiere al gen de la proteína y  $\bullet$  al estado de degradación de la misma. Las expresiones *copA* y *cueO* unidos a CueR hace referencia al complejo gen-regulador.

Se observa un estado, además de la generación y degradación, y la interacción de la proteína con los genes. La regulación es un lazo feedback positivo y el sistema que se define por el mecanismo se presenta a continuación. Este sistema de regulación (feedback positivo), es común en los sistemas biológicos y especialmente en regulación génica.

$$CueR = \begin{cases} \frac{d[CueR_1]}{dt} = v_{rg1} - v_{r1d} - v_{r1gAr} + v_{rgAr1} - v_{r1gOr} + v_{rgOr1} \\ \frac{d[gcopA - CueR]}{dt} = v_{r1gAr} - v_{rgAr1} \\ \frac{d[gcueO - CueR]}{dt} = v_{r1gOr} - v_{rgOr1} \end{cases} \quad (5.5)$$

Es apreciable en el sistema expuesto anteriormente, que la transcripción del regulador depende del cobre presente en el citoplasma, es conocido lo sensible que puede ser esta dependencia aunque no se ha reportado algún mecanismo que describa su actividad.

Este mecanismo no se incorporó al modelo global al no encontrarse datos reportados para su actividad.

Tabla 5.3: Velocidades de mecanismo de estados de CueR.

Velocidad directa	Expresión	Velocidad inversa	Expresión
$v_{rg1}$	$r_{g1} \cdot [cueR] \cdot [Cu_p^+]$	$v_{r1d}$	$r_{g1} \cdot [CueR_1]$
$v_{r1gAr}$	$r_{1gAr} \cdot [CueR_1] \cdot [copA]$	$v_{rgAr1}$	$r_{gAr1} \cdot [copA - CueR]$
$v_{r1gOr}$	$r_{1gOr} \cdot [CueR_1] \cdot [copO]$	$v_{rgOr1}$	$r_{gOr1} \cdot [copO - CueR]$

La nomenclatura de las velocidades hace referencia a las reacciones que las definen, así  $v_{rij}$  es la velocidad relacionada a la reacción que va del estado  $i$  al estado  $j$  del mecanismo de CueR. Donde,  $g$  se refiere al estado de generación y  $d$  al de degradación.

## 5.2. Resultados del Sistema Cus

### 5.2.1. Multiproteína Transportadora CusCBA

Basados en la información reportada de Murakami (2012) y Long, et al. (2012), se propone un mecanismo de estados para el transportador CusCBA que se observa en la Figura 5.6. Este mecanismo contiene las etapas cinéticas reportadas y que son similar para la familia de proteínas RND.

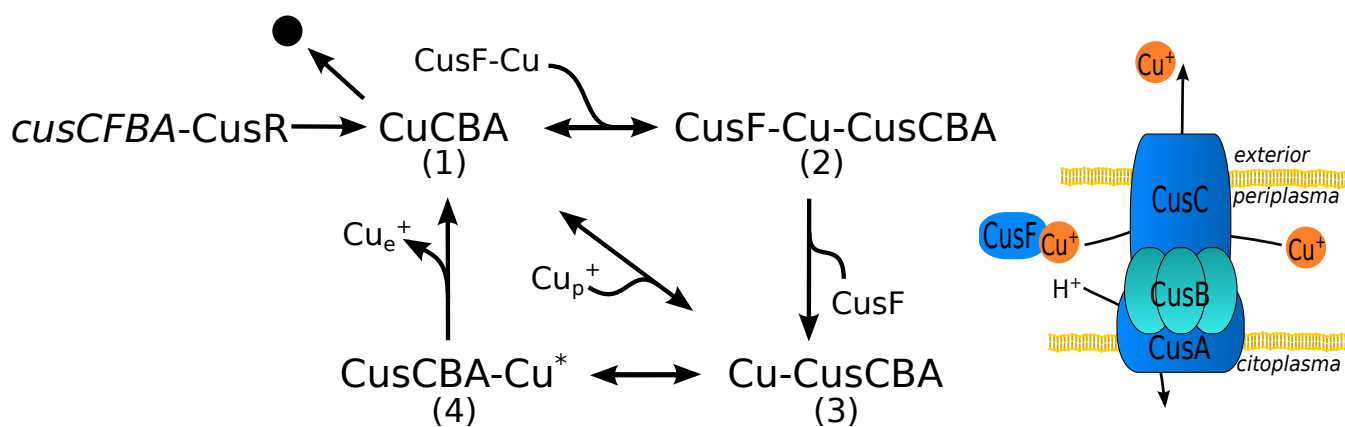


Figura 5.6: Mecanismo de estados propuesto para CusCBA. Se denomina: Estado 1 a la proteína CusCBA en estado libre. Estado 2 a CusCBA unida al complejo formado por CusF y  $Cu^+$ . Estado 3 a CusCBA unida a  $Cu^+$  en el espacio periplasmático. Estado 4 a CusCBA unida a  $Cu^+$  en el espacio extracelular.  $cusCFBA$  se refiere al operón de la proteína y  $\bullet$  al estado de degradación de la misma.

Para este mecanismo se tienen cuatro estados, y se supone que la concentración de protones en el periplasma se encuentra en exceso. Además, la proteína puede incorporar cobre directamente desde el periplasma o el cobre unido a CusF. A partir de lo anterior, se plantea un sistema de ecuaciones diferenciales (Ec. 5.6) donde la expresión de las velocidades se observa en la Tabla 5.4. En el balance de masa realizado, los componentes están relacionados con el volumen periplasmático, por lo que en el sistema propuesto observado ya se ha realizado la simplificación de este término.

El supuesto de protones en exceso en el periplasma trae consigo un problema similar al que ocurre suponiendo el transporte mediante CopA sin dependencia de ATP. Una disminución en la concentración de protones en el periplasma reduce el gradiente de este elemento en el citoplasma, afectando otros procesos como la cadena transportadora de electrones. Es así, como una sobreexpresión de CusCBA para el transporte de cobre o una situación de uso intensivo de esta fuerza motriz, debería disminuir la cantidad de cobre transportado mediante esta proteína; situación que no se refleja en el modelo propuesto. Aún así, se utiliza el modelo planteado porque los datos experimentales con los cuales se obtiene la actividad, fueron obtenidos en sistemas sin estrés por  $H^+$  y porque con la simplificación, es posible acotar el problema a las variables directamente relacionadas con la homeostasis de cobre.

En esta línea, el uso de un mecanismo de estados permite relacionar la proteína CusCBA con la chaperona CusF al tener estados en común, situación que no sería factible al utilizar el modelo de una ecuación de Hill reportado por Nagano, et al (2009).

$$CusCBA = \begin{cases} \frac{d[CusCBA_1]}{dt} = v_{cg1} - v_{c1d} - v_{c12} + v_{c21} - v_{c13} + v_{c31} + v_{c41} \\ \frac{d[CusCBA_2]}{dt} = v_{c12} - v_{c21} - v_{c23} \\ \frac{d[CusCBA_3]}{dt} = v_{c23} - v_{c34} + v_{c34} + v_{c13} - v_{c31} \\ \frac{d[CusCBA_4]}{dt} = v_{c34} - v_{c43} - v_{c41} \end{cases} \quad (5.6)$$

Tabla 5.4: Velocidades de mecanismo de estados de CusCBA.

Velocidad directa	Expresión	Velocidad inversa	Expresión
$v_{cg1}$	$c_{g1} \cdot [cusCFBA - CusR]$	$v_{c1d}$	$c_{g1} \cdot [CusCBA_1]$
$v_{c12}$	$c_{12} \cdot [CusCBA_1] \cdot [CusF - Cu^+]$	$v_{c21}$	$c_{21} \cdot [CusCBA_2]$
$v_{c23}$	$c_{23} \cdot [CusCBA_2]$		
$v_{c34}$	$c_{34} \cdot [CusCBA_3]$	$v_{c43}$	$c_{43} \cdot [CusCBA_4]$
$v_{c41}$	$c_{41} \cdot [CusCBA_4]$		
$v_{c13}$	$c_{13} \cdot [CusCBA_1] \cdot [Cu_p^+]$	$v_{c31}$	$c_{31} \cdot [CusCBA_3]$

La nomenclatura de las velocidades hace referencia a las reacciones que las definen, así  $v_{cij}$  es la velocidad relacionada a la reacción que va del estado  $i$  al estado  $j$  del mecanismo de CusCBA. Donde,  $g$  se refiere al estado de generación y  $d$  al de degradación

Para este transportador y el trabajo de ajuste de los parámetros, se utilizó el trabajo de Nagano, et al.(2009) sobre la actividad de AcrAB-TolC. Se eligió la actividad del transportador en conjunto con la molécula cefaloridina, al ser la que mejor se acercaba al comportamiento del cobre dentro de la célula. Para el ajuste de parámetros no se consideró la generación ni degradación de la proteína, además se supuso la velocidad máxima de CusCBA igual a la

reportada para AcrAB-TolC. El ajuste se observa en la Figura 5.7 y se realizó mediante minimización por mínimos cuadrados comparando los datos experimentales antes mencionados con los resultados del sistema de la Ecuación 5.6. La elección del modelo elegido se justificará más adelante.

La elección del transportador AcrAB-TolC para obtener la actividad de CusCBA se debe a que ambos complejos pertenecen a la familia RND, reportándose mecanismos de transporte similar de los sustratos correspondientes, y ambos son dependiente del gradiente de protones como fuerza motriz. Se eligió la cefaloridina como símil con el cobre como sustrato a transportar porque, a pesar de no ser estructuralmente similares, esta molécula no difunde a través de la membrana periplasmática, no así las otras moléculas con velocidad de transporte reportada para AcrAB-TolC. Además, al ser transportadores dependientes de la fuerza protón motriz y encontrarse ésta en exceso se espera que la estructura de la molécula transportada no sea un punto tan relevante en inhibir el transporte.

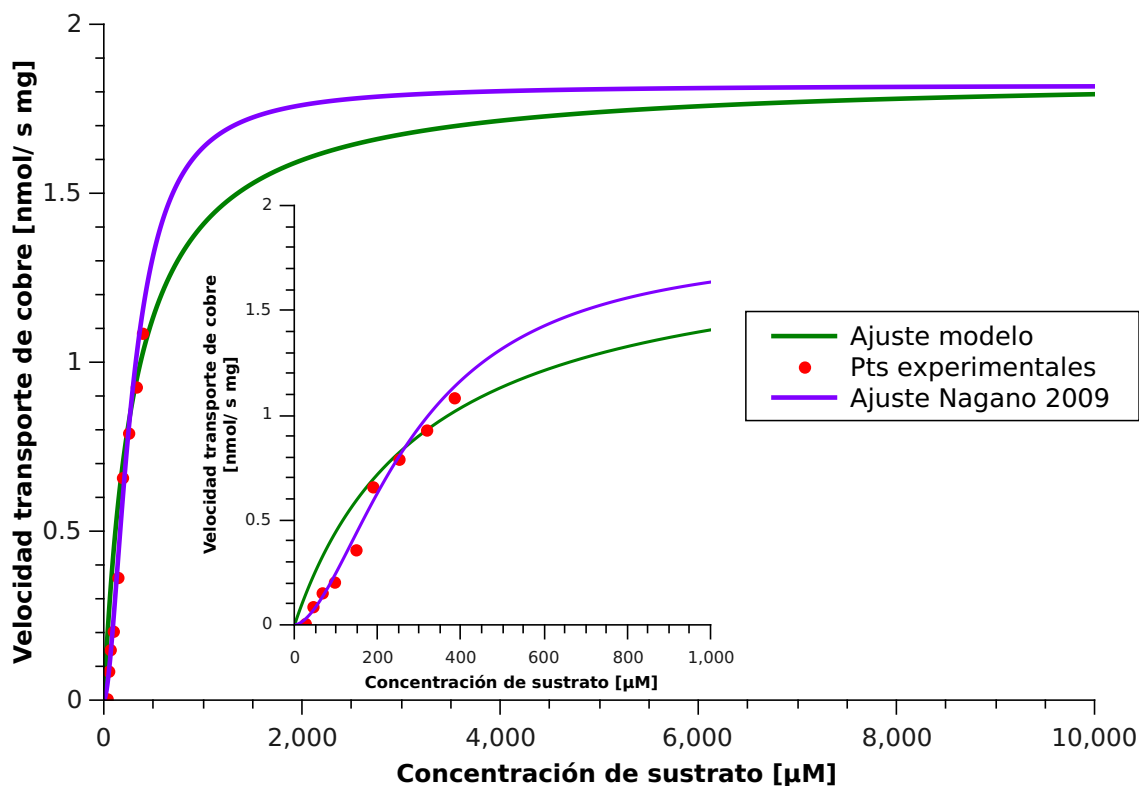


Figura 5.7: Ajuste de CusCBA a datos experimentales. Para el ajuste presentado se tiene el ajuste reportado por Nagano, et al. (2009) mediante una ecuación de Hill, en morado, con un coeficiente de Hill ( $\theta$ ) de 1.75; y el logrado por el modelo propuesto en verde. Se observa la simulación realizada a 10000 [ $\mu\text{M}$ ] de sustrato en el gráfico principal, con un acercamiento a los primeros 1000 [ $\mu\text{M}$ ] de sustrato en el gráfico secundario.

Se observa, en la figura anterior, cómo la velocidad de transporte del modelo propuesto para CusCBA aumenta asintóticamente a la velocidad máxima alcanzada por el ajuste de Nagano, et al (2009) a medida que la concentración de sustrato aumenta. Para las concentraciones

iniciales se tiene un comportamiento distinto, mientras que el ajuste reportado se comporta con una dinámica que probablemente sea de un alto orden, el modelo propuesto comienza con un comportamiento de cinética de orden uno, lo que genera un ajuste a los datos experimentales no tan preciso. Esto podría explicarse dado que AcrAB-TolC transporta un gran número de moléculas distintas, por lo que no sería específica en la unión del sustrato ocasionando que, a bajas concentraciones, el transporte por CusCBA sea más rápido al no depender del tipo de sustrato para iniciar el transporte. Además, el uso de un mecanismo de estados permite relacionar la proteína CusCBA con la chaperona CusF al tener estados en común, situación que no sería factible al utilizar el modelo de una ecuación de Hill reportado por Nagano, et al (2009).

Sería posible añadir la dependencia a la concentración de protones, agregando este término a la velocidad  $v_{c34}$ , con esto no se afectaría la velocidad de unión del sustrato a la proteína, pero si lo haría el cambio conformacional que se produce al pasar el cobre unido desde el periplasma hacia el canal CusC afectando la velocidad de transporte.

### 5.2.2. Subsistema CusCBA-CusF

Dada la interacción entre el transportador CusCBA y la proteína chaperona CusF, se propone un mecanismo en conjunto que se observa en la Figura 5.8 a continuación. Es posible observar que el estado (2) y (3) de CusCBA son los mismos que para CusF, lo que permite que se logre representar la interacción de estas proteínas tal como se ha reportado [37, 48].

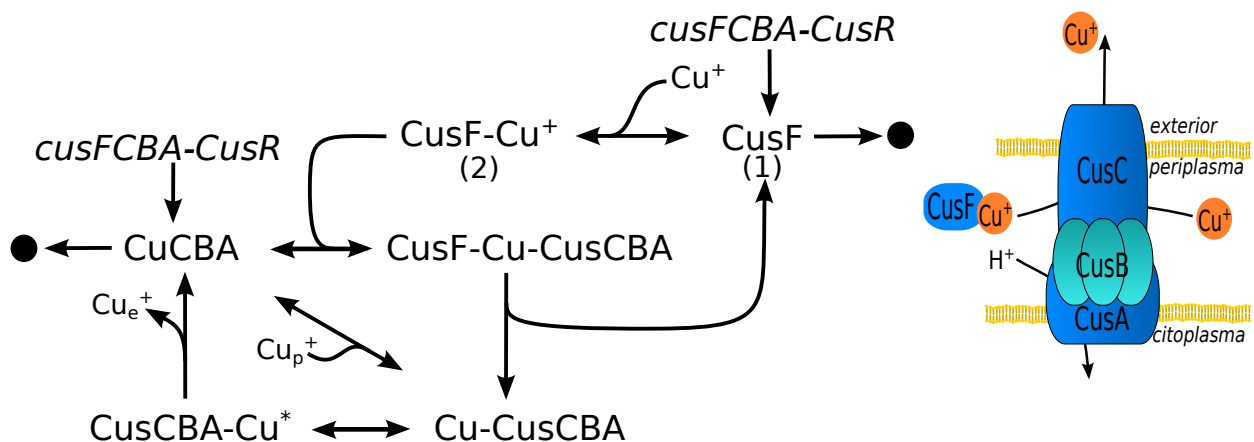


Figura 5.8: Mecanismo de estados propuesto para la interacción entre CusF y CusCBA. En este caso, se agregan dos estados al mecanismo propuesto para CusCBA. El estado Estado 1 de CusF, que es la proteína libre; y el estado 2 de CusF, que es hace referencia a la chaperona unida a un  $\text{Cu}^+$ . Notar que todas las proteínas de CusCBA y CusF, son sintetizadas a partir del operón *cusCFBA*.

Este subsistema conformado por CusCBA y CusF se representa por seis estados. Los supuestos aplicados para CusCBA se mantienen al incorporar a la chaperona CusF al mecanismo. A partir de lo anterior, el sistema de ecuaciones diferenciales que representa lo planteado son las expresiones de la la Tabla 5.4 agregando las expresiones de la Tabla 5.5. Al igual que para el

caso de CusCBA, el término de los volúmenes ha sido simplificado al realizarse el balance de masa en el espacio periplasmático.

$$CusF = \begin{cases} \frac{d[CusF_1]}{dt} = v_{fg1} - v_{f1d} - v_{f12} + v_{f21} + v_{c23} \\ \frac{d[CusF_2]}{dt} = v_{f12} - v_{f21} - v_{c12} + v_{c21} \end{cases} \quad (5.7)$$

Tabla 5.5: Velocidades agregadas al mecanismo de estado de CusCBA por interacción con CusF

Velocidad directa	Expresión	Velocidad inversa	Expresión
$v_{fg1}$	$v_{cg1}$	$v_{f1d}$	$f_{g1} \cdot [CusF_1]$
$v_{f12}$	$f_{12} \cdot [CusF_1] \cdot [CusF - Cu_p^+]$	$v_{c21}$	$c_{21} \cdot [CusF_2]$

La nomenclatura de las velocidades hace referencia a las reacciones que las definen, así  $v_{fij}$  es la velocidad relacionada a la reacción que va del estado  $i$  al estado  $j$  del mecanismo de CusF. Donde,  $g$  se refiere al estado de generación y  $d$  al de degradación.

La incorporación de CusF al mecanismo de CusCBA agrega una nueva vía en la que el cobre puede acoplarse a la proteína transportadora. Según lo reportado, la presencia de chaperonas imprimiría una velocidad mayor a esta vía, que la incorporación del cobre libre. Dado que AcrAB-TolC no tiene asociada una chaperona, el ajuste de actividad fue realizado sin la presencia de CusF en el mecanismo (idea que se profundizará en la Sección 5.3). Pero comparando a los mecanismo propuestos para CopZ, chaperona presente en *E. Hirae*, lo presentado para CusF se asemeja dada la reversibilidad de la unión con el cobre y la irreversibilidad una vez que el metal se asocia a CusCBA.

### 5.2.3. Subsistema regulador CusS-CusR

El sistema CusS-CusR regula transcripcionalmente los operones *cusCFBA* y *cusSR*. El mecanismo de control propuesto (Figura 5.9) se observa a continuación. Al igual que para el regulador CueR, se utiliza un lazo feedback positivo que es común en los sistemas biológicos para la regulación génica.



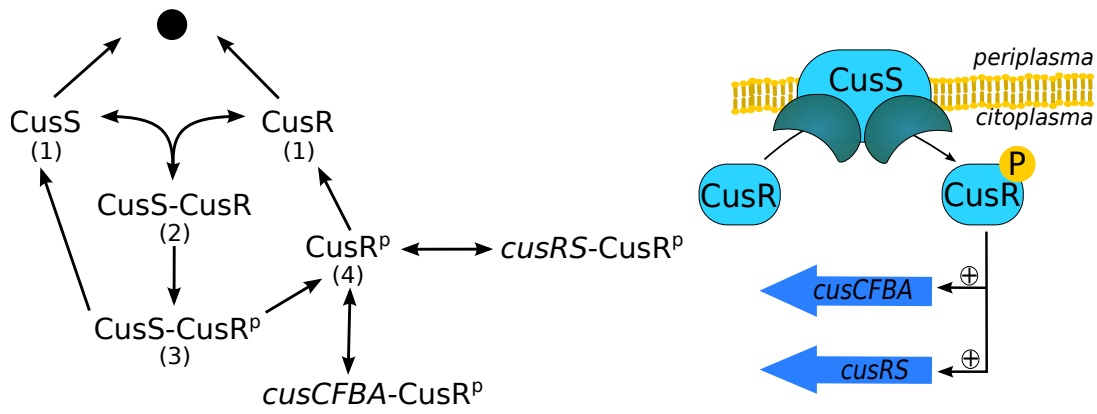


Figura 5.9: Mecanismo de estados propuesto para CusR y CusS. Se denomina: Estado 1 a la proteína CusR y CusS en estado libre. Estado 2 a CusS-CusR formando un complejo. Estado 3 al complejo CusS-CusR con CusR fosforilado. Estado 4 a CusR fosforilado ( $CusR^P$ ) y libre en el citoplasma. • al estado de degradación de las proteínas.

Este subsistema conformado por CusS y CusR se representa por cinco estados, la regulación es un lazo feedback positivo donde se observa la interacción de  $CusR^P$  con los genes antes mencionados. Se propone un punto de control referente a la concentración de cobre en el lazo en la velocidad  $v_{SR23}$ . A partir de lo anterior, el sistema de ecuaciones diferenciales que representa lo planteado se observa a continuación en Ec. 5.8 donde la expresión de las velocidades se encuentran en la Tabla 5.6.

$$CusS - CusS = \begin{cases} \frac{d[CusS_1]}{dt} = v_{SRg1} - v_{SR1d} - v_{SR12} + v_{SR21} + v_{SR13} \\ \frac{d[CusR_1]}{dt} = v_{SRg1} - v_{SR1d} - v_{SR12} + v_{SR21} + v_{SR41} \\ \frac{d[CusSR_2]}{dt} = v_{SR12} - v_{SR21} - v_{SR23} \\ \frac{d[CusSR_3]}{dt} = v_{SR23} - v_{SR31} + v_{SR34} \\ \frac{d[CusSR_4]}{dt} = v_{SR34} - v_{SR41} \end{cases} \quad (5.8)$$

La dependencia de cobre periplásmico para la velocidad  $v_{SR23}$  propone que la proteína reguladora CusR no fuera independiente en su regulación y existiera otra variable que controlara su transcripción génica. Este es, hasta donde se ha encontrado, el primer mecanismo propuesto para este sistema, por lo que no es posible realizar una comparación. A pesar de eso, el control génico es similar a lo propuesto para el control proporcionado para CueR.

Tabla 5.6: Velocidades de mecanismo de estados de CusS-CusR

Velocidad directa	Expresión	Velocidad inversa	Expresión
$v_{SRg1}$	$SR_{g1} \cdot [cusSR - CusR^P]$	$v_{SR1d}$	$SR_{1d} \cdot [CusR_1]$
$v_{SR12}$	$SR_{12} \cdot [CusS_1] \cdot [CusR_1]$	$v_{SR1d}$	$SR_{1d} \cdot [CusS_1]$
$v_{SR23}$	$SR_{23} \cdot [CusSR_2] \cdot [Cu_p^+]$	$v_{SR21}$	$SR_{21} \cdot [CusSR_2]$
$v_{SR31}$	$SR_{31} \cdot [CusSR_3]$		
$v_{SR34}$	$SR_{34} \cdot [CusSR_3]$		
$v_{SR41}$	$SR_{41} \cdot [CusSR_4]$		

La nomenclatura de las velocidades hace referencia a las reacciones que las definen, así  $v_{SRij}$  es la velocidad relacionada a la reacción que va del estado  $i$  al estado  $j$  del mecanismo de CusS-CusR. Donde,  $g$  se refiere al estado de generación y  $d$  al de degradación.

### 5.3. Parámetros Utilizados

Los parámetros utilizados para el sistema global se han obtenido mediante el ajuste de los modelos propuestos a datos experimentales o definidos según diferentes criterios. Dichos parámetros se dividen en dos grupos, los que se encuentran en la Tabla C.1 representan los utilizados por el modelo propuesto de homeostasis de cobre sin regulación génica. Los parámetros de los mecanismos que sólo afectan la regulación génica no se asociaron a ningún valor numérico y son los relacionados con CueR ( $r_{1gAr}$ ,  $r_{gAr1}$ ,  $r_{1gOr}$  y  $r_{gOr1}$ ) y CusS-CusR ( $SR_{12}$ ,  $SR_{21}$ ,  $SR_{31}$ ,  $SR_{34}$ ,  $SR_{34}$  y  $SR_{41}$ ).

Se observa que los valores más altos se obtienen por parte de CueO, aunque, dado que los parámetros están acoplados de manera distinta en las reacciones representándose eso en las unidades asociadas, no es posible comparar los valores numéricos uno a uno. A pesar de esto, según los datos experimentales de actividad reportadas, para las proteínas estudiadas CueO sería el elemento con mayor actividad, concordando con lo expuesto anteriormente. La lista de los parámetros originales se encuentran en Anexo C.

Los parámetros de volúmenes propuestos se obtuvieron en base a lo reportado por Kubitschek y Friske (1986), a partir del volumen total de la bacteria se dividió en un tercio para el periplasma y dos tercios para el citoplasma, según lo reportado para el tamaño que puede tener el espacio periplasmático [95]. Para el caso del volumen externo, se definió que sería igual al volumen de una célula y por tanto el volumen total con el que se opera en el modelo es de dos veces el volumen de una célula.

Para el equilibrio dentro del citoplasma, al suponerse un equilibrio entre los estados del cobre y ser el pH de este compartimiento ligeramente básico, los valores de sus parámetros se definieron para que en concentraciones iguales, el equilibrio estuviera desplazado hacia el  $Cu^{+1}$  en una razón de 5:1, traducándose que en el citoplasma el estado dominante sea el  $Cu^{+1}$ .

Tabla 5.7: Parámetros utilizados en el Sistema.

<sup>a</sup>: parámetros ajustados de datos experimentales. <sup>b</sup>: parámetros igualados a datos experimentales reportados.

Proteína	Parámetro	Valor	Unidad	Referencia
CopA	$K_1$	$1,73 \cdot 10^0$	$\mu M / \text{min}$	[91] <sup>a</sup>
	$K_a$	$2,72 \cdot 10^1$	$\mu M$	[91] <sup>b</sup>
	$K_2$	$1,79 \cdot 10^{-1}$	$\text{nmol} / \text{min}$	[91] <sup>a</sup>
CueO	$K_1$	$1,73 \cdot 10^1$	$\mu M / \text{min}$	[45] <sup>b</sup>
	$K_a$	$1,69 \cdot 10^2$	$\mu M$	[45] <sup>b</sup>
CusF-CusCBA	$f_{12}$	$1,5 \cdot 10^0$	$1 / \mu M \cdot \text{min}$	[49] <sup>a</sup>
	$f_{21}$	$5,51 \cdot 10^{-1}$	$1 / \text{min}$	[49] <sup>a</sup>
	$f c_{12}$	$1,09 \cdot 10^0$	$1 / \text{min}$	Propuesto
	$f c_{21}$	$2,24 \cdot 10^{-1}$	$1 / \text{min}$	Propuesto
	$f c_{23}$	$4,41 \cdot 10^1$	$1 / \text{min}$	[93] <sup>a</sup>
	$c_{34}$	$4,48 \cdot 10^2$	$1 / \text{min}$	[93] <sup>a</sup>
	$c_{43}$	$7,06 \cdot 10^1$	$1 / \text{min}$	[93] <sup>a</sup>
	$c_{41}$	$2,71 \cdot 10^1$	$1 / \text{min}$	[93] <sup>a</sup>
	$c_{13}$	$1,09 \cdot 10^{-1}$	$1 / \mu M \cdot \text{min}$	[93] <sup>a</sup>
	$c_{31}$	$2,24 \cdot 10^{-2}$	$1 / \text{min}$	[93] <sup>a</sup>
Difusión Cu	$P$	$1,20 \cdot 10^{-2}$	$\mu m / \text{min}$	[93] <sup>a</sup>
	$A$	$6,00 \cdot 10^0$	$\mu m^2$	[94] <sup>b</sup>
Equilibrio Cu	$Cu_{i12}$	$1,00 \cdot 10^0$	$1 / \mu M \cdot \text{min}$	Propuesto
	$Cu_{i21}$	$5,00 \cdot 10^0$	$1 / \mu M \cdot \text{min}$	Propuesto
Volúmenes	Citoplasma ( $V_c$ )	2/3	$\mu m^3$	Propuesto
	Periplasma ( $V_p$ )	1/3	$\mu m^3$	Propuesto
	Externo ( $V_e$ )	1	$\mu m^3$	Propuesto

En cuanto a los parámetros propuestos para CusCBA,  $c_{13}$  y  $c_{31}$  se relacionan con la etapa de unión del cobre periplasmático a la proteína. Dado que el ajuste para CusCBA se realizó mediante un símil con una proteína a la que no hay asociada una chaperona, los valores obtenidos del ajuste se asociaron a los parámetros antes mencionados. Por lo anterior, para los parámetros  $f c_{12}$  y  $f c_{21}$ , relacionados con la etapa de unión de CusF a CusCBA, se propuso el valor obtenido por el ajuste para la unión del cobre libre aumentado 10 veces, haciendo referencia a lo reportado, en cuanto al cambio de velocidades de proteínas transportadoras con y sin chaperonas en sus mecanismos de transporte.

Para la difusión del cobre desde el espacio extracelular al periplasma, se tomaron los datos de dos fuentes distintas. El coeficiente de permeabilidad ( $P$ ) es obtenido tomando de base el valor propuesto para las molécula transportadas por AcrAB-TolC y modificándolo según el supuesto que los átomos de cobre son menos permeables a la membrana al ser elementos cargados. Es por esto que se reduce en 10 veces el valor reportado.

Los otros valores se ajustaron a datos de actividad para cada proteína tal como se explicó en las secciones anteriores.

El sistema global a estudiar no cuenta con transcripción o traducción génica, y por eso no se le dió valor a los parámetros asociados a las reacciones que controlan la cantidad de proteínas. Aún así, sería posible obtener estimaciones de éstos si se ajustaran según los tiempos de respuesta que entrega el modelo. El valor obtenido podría representar una aproximación y debería contrastarse con actividades reportadas para proteínas de regulación similares.

Finalmente, En la Figura 5.10, se observa la cantidad de parámetros de los que depende el modelo; además, el resultado de la simulación es más sensible a los parámetros de CueO ( $K_1$  y  $K_a$ ) y al volumen externo ( $V_e$ ), donde a perturbaciones del 10%, se obtienen errores absolutos de 39, 29 y 26 % respectivamente. A su vez, los parámetros perturbados que menos afectan el sistema son los relacionados a CusCBA, con errores absolutos de menos del 1% en el resultado final. Esto se debe a que el sistema CusCBA es el mecanismo con mayor cantidad de parámetros y por ende la perturbación de alguno de ellos es amortiguada por los restantes, a su vez, los mecanismos con menor cantidad de parámetros son los que más afectan al resultado final con sus perturbaciones. Este comportamiento se asemeja a los sistemas biológicos donde, a pesar de que la complejidad del sistema aumenta a medida que se van agregando nuevos componentes, el asociar una mayor cantidad de parámetros al modelo, la misma perturbación en alguno de ellos, afecta de menor manera el resultado final.

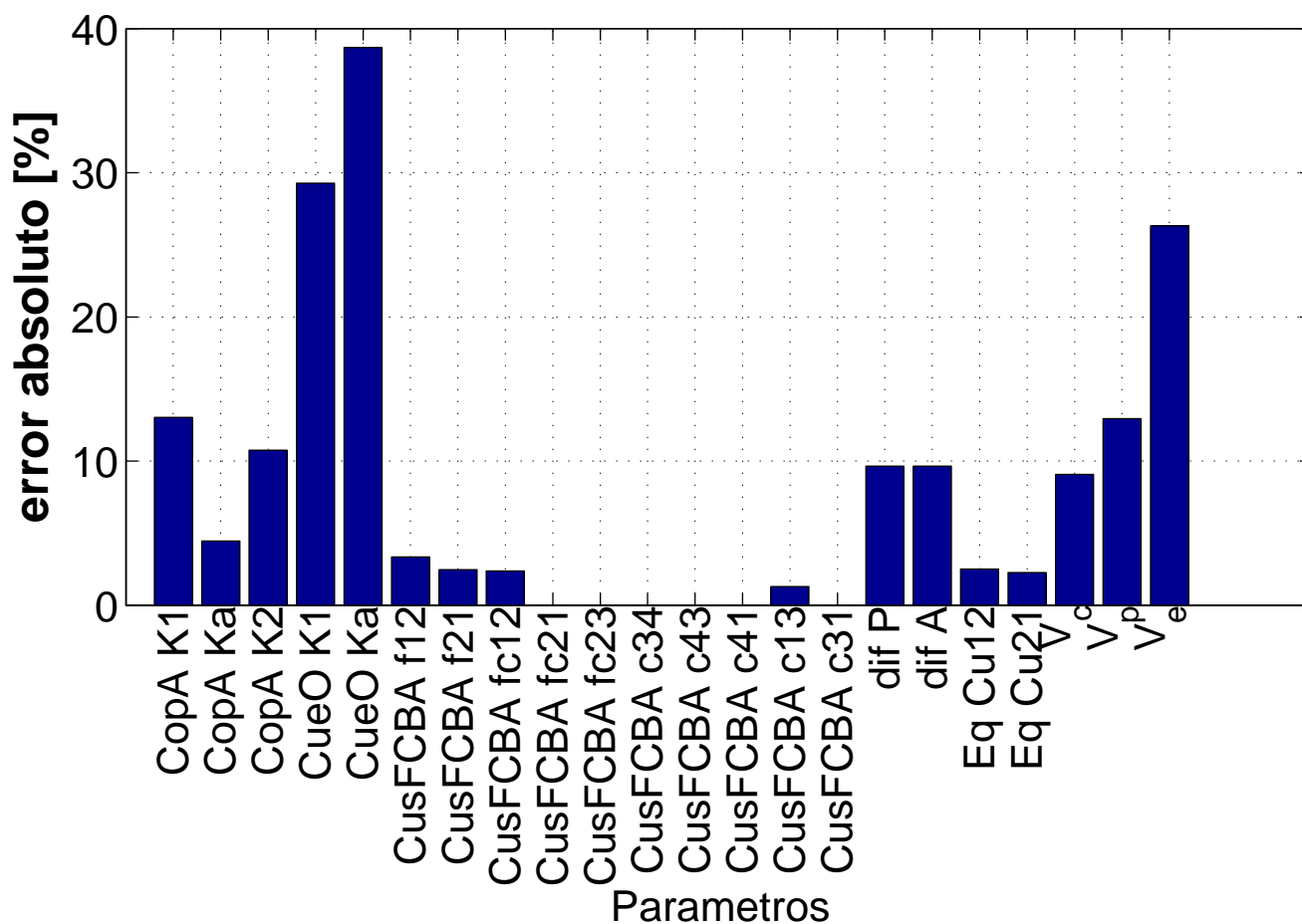


Figura 5.10: Respuesta del sistema realizando una perturbación del 10% a los parámetros. Cada parámetro es perturbado de manera independiente antes de realizar la simulación.

El análisis de sensibilidad de cada parámetro fue realizado para perturbaciones de -40% a 40% de los valores de éstos. El resultado de estas simulaciones se observan en el Anexo F. En este anexo se observa que los cambios en las simulaciones

Es importante destacar que los parámetros de CueO fueron obtenidos de ajustes de datos experimentales de la actividad de la proteína, tal como, se presenta en la Sección 5.1.2. Es por ello que, se espera que los datos obtenidos para los parámetros más sensibles, sean confiables.

## 5.4. Sistema Global

A partir de lo planteado, el modelo del sistema de homeostasis de cobre propuesto, compuesto por el Sistema Cue y el Sistema Cus, se observa a continuación (5.11).

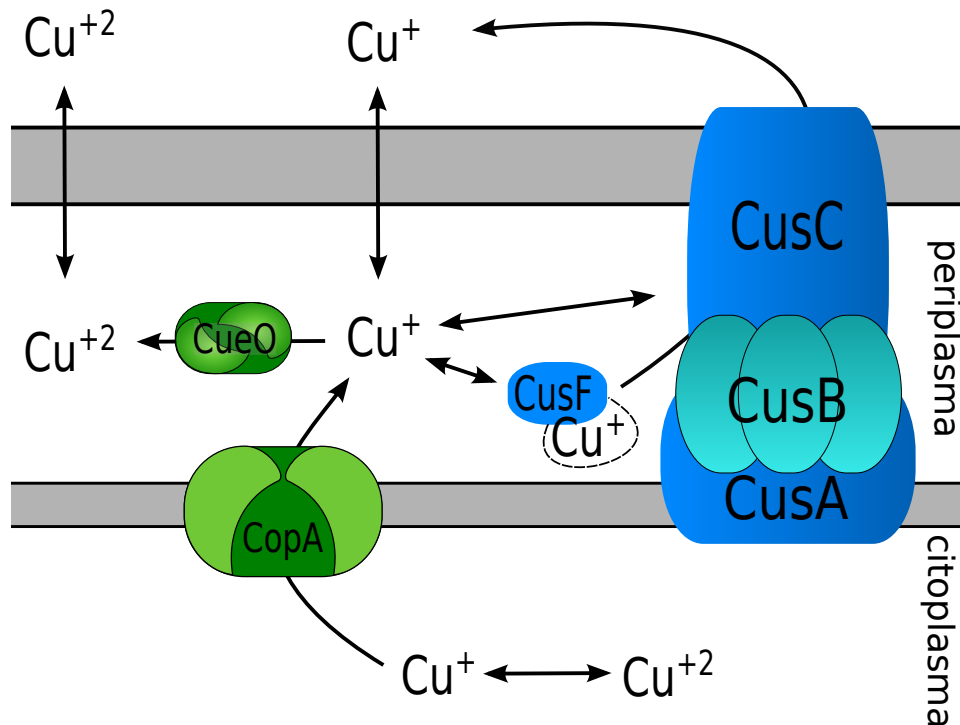


Figura 5.11: Esquema del Sistema Global del modelo propuesto para la homeostasis de cobre. En verde se encuentran los componentes provenientes del sistema Cue y en azul los componentes provenientes del sistema Cus. Se observa que el cobre puede difundir a través de la membrana y existe equilibrio entre los estados del cobre en el citoplasma.

A los mecanismos descritos anteriormente para las proteínas, se agrega un componente de paso del cobre externo (con independencia entre los estados de oxidación I y II) al periplasma a través de la membrana tal como se ha reportado. Este término difusivo, definido por la velocidad de difusión ( $v_{dif}$ ), se aproximará como un transporte de masa entre dos fases a partir de la ecuación 5.9, tal como se reporta en Nagano, et al.(2009) y donde:  $P$  es el coeficiente de Permeabilidad y  $A$  el área superficial de la bacteria.

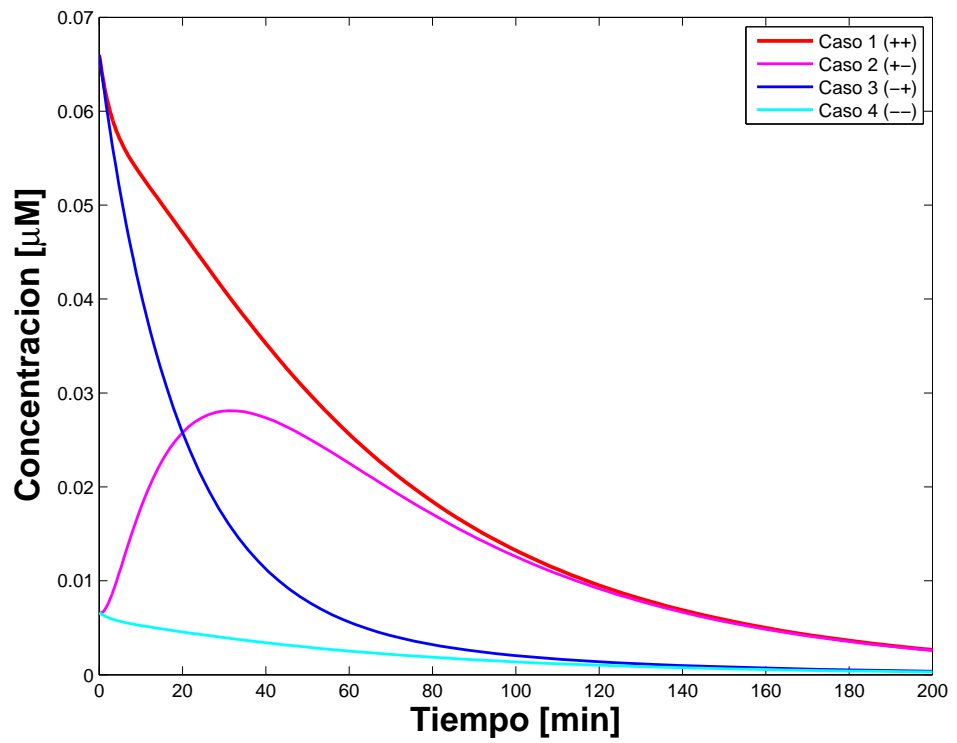
$$v_{dif} = P \cdot A \cdot (C_e - C_p) \quad (5.9)$$

Así, el balance de masa de la concentración de cobre queda como se observa en la Ecuación 5.10, donde las expresiones para las velocidades se encuentran en las Tablas 5.1, 5.2, 5.4 y 5.5. En este balance, cada expresión de cambio neto de concentración se normalizó por el volumen correspondiente, por lo que, si alguna velocidad no está acompañado de este término, quiere decir que fue simplificado de la ecuación.

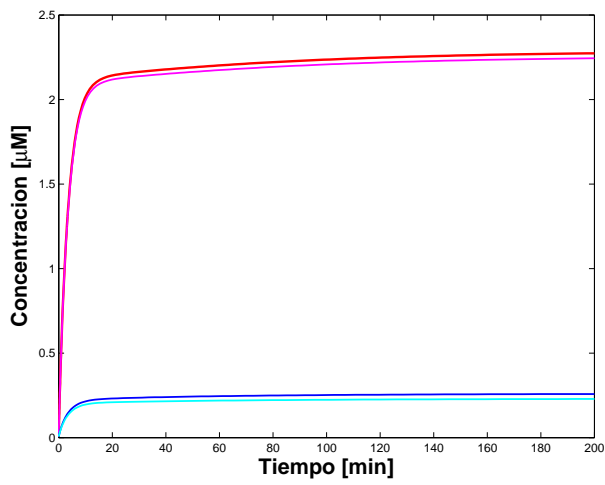
$$\text{Cobre} = \left\{ \begin{array}{l} V_c \cdot \frac{d[Cu_c^+]}{dt} = -V_c \cdot v_{a1} - V_c \cdot v_{eq12} + V_p \cdot v_{a2} + V_c \cdot v_{eq21} \\ V_c \cdot \frac{d[Cu_c^{+2}]}{dt} = V_c \cdot v_{eq12} - V_c \cdot v_{eq21} \\ V_p \cdot \frac{d[Cu_p^+]}{dt} = v_{dif1} + V_c \cdot v_{a1} - V_p \cdot v_{a2} - V_p \cdot v_{O1} - V_p \cdot v_{f12} + V_p \cdot v_{f21} - V_p \cdot v_{c13} + V_p \cdot v_{c31} \\ V_p \cdot \frac{d[Cu_p^{+2}]}{dt} = V_p \cdot v_{O1} + v_{dif2} \\ V_e \cdot \frac{d[Cu_e^+]}{dt} = V_p \cdot v_{c41} - v_{dif1} \\ V_e \cdot \frac{d[Cu_e^{+2}]}{dt} = -v_{dif2} \end{array} \right. \quad (5.10)$$

Tal como se explicó anteriormente, el uso simultáneo de estos dos sistemas por parte de la célula, corresponde a un caso particular de condiciones ambientales el cual, es un medio aerobio con media-alta concentración de cobre cercana a la MIC. Es así cómo se observa la respuesta del modelo a distintos casos variando la concentración de cobre del medio y del citoplasma, suponiendo una cantidad constante de proteínas durante el tiempo de simulación. Las condiciones iniciales de dichas simulaciones para las concentraciones de cobre, son de:  $6,6 \cdot 10^{-3}$  y  $6,6 \cdot 10^{-4} \mu M$  para los casos de cobre alto y bajo en el citoplasma respectivamente; y de 3 y  $0,3 \mu M$  para los casos de cobre alto y bajo en el exterior respectivamente. Estos casos son representados como (+) para el caso de cobre alto, y como (-) para los casos de cobre bajo.

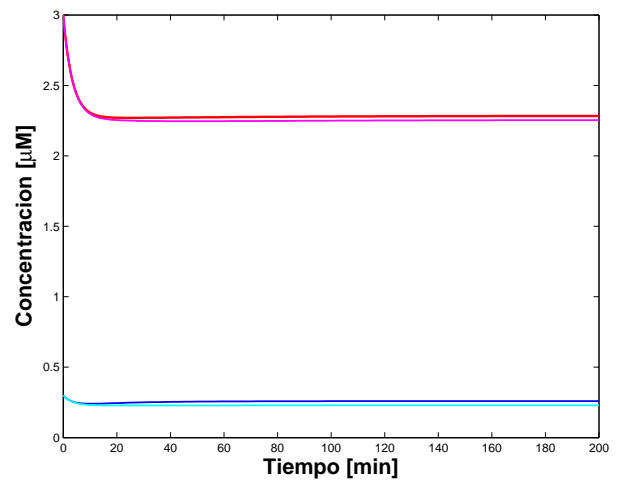
El detalle de los resultados para las concentraciones de cobre en el citoplasma, periplasma y espacio extracelular, se encuentran en el Anexo E y Anexo D para los casos de cobre constante y variable respectivamente.



(a) Cobre total en citoplasma

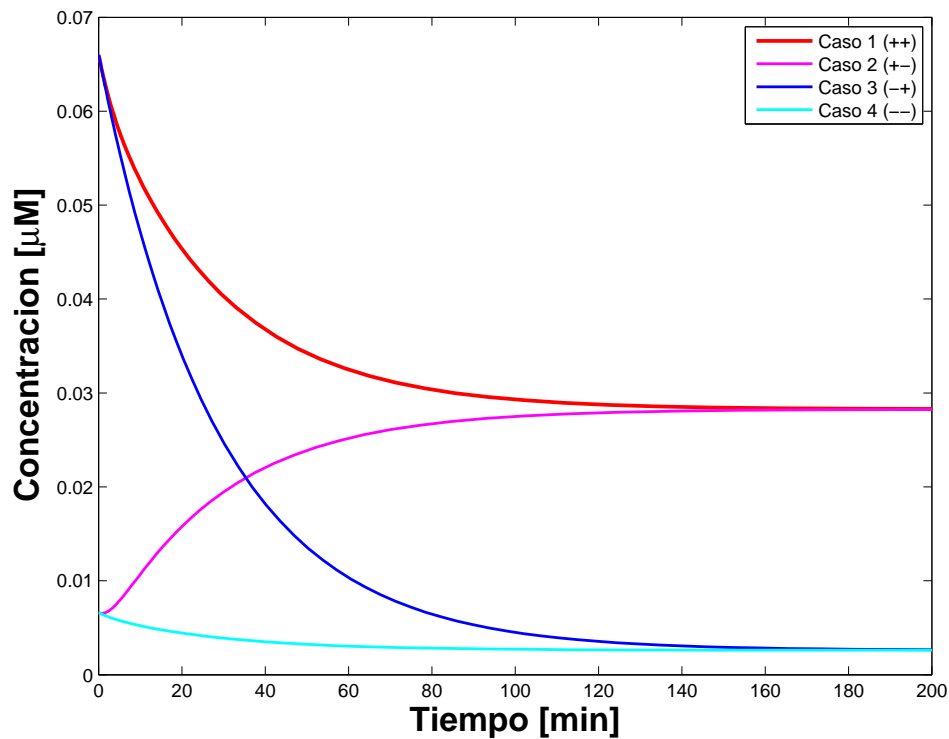


(b) Cobre total en periplasma

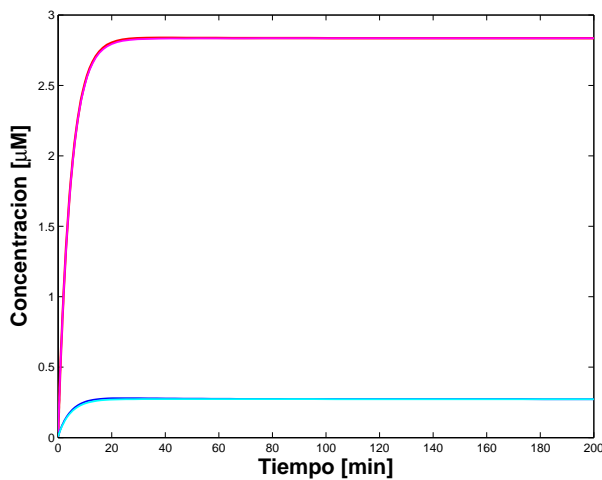


(c) Cobre total extracelular

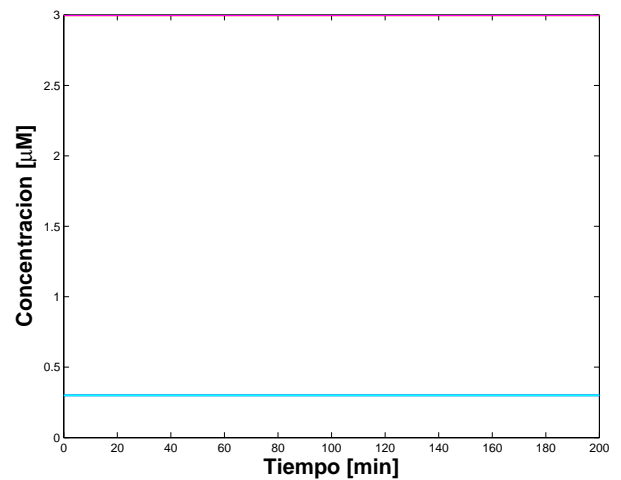
Figura 5.12: Casos de cobre extracelular variable



(a) Cobre total en citoplasma



(b) Cobre total en periplasma



(c) Cobre total extracelular

Figura 5.13: Caso de cobre extracelular constante

Se observa en la Figura 5.12, donde la concentración de cobre externo es variable, que independiente del caso en que se encuentre la concentración de cobre dentro del citoplasma, esta llega a tener concentraciones nulas en tiempos sobre 250 minutos. Para los compartimientos del periplasma y espacio extracelular se alcanza un estado de equilibrio a aproximadamente 100 minutos y donde el transporte entre estos compartimientos es más rápida para los primeros 10 minutos que para el resto de la simulación.

Para la Figura 5.13, donde la concentración de cobre externo es constante, se tienen dos concentraciones de cobre en el citoplasma para el estado estacionario. Este estado depende de la concentración externa de cobre y alcanza valores de  $2,8 \cdot 10^2 [\mu M]$  y  $2,7 \cdot 10^{-3} [\mu M]$  pa-



ra los casos de cobre extracelular alto, y bajo respectivamente. Para los compartimientos del periplasma y espacio extracelular se alcanza el estado estacionario a 30 minutos aproximadamente donde se observa que el cobre en el periplasma no alcanza los valores de concentración presentes el exterior de la célula a pesar de existir difusión. Este fenómeno ocurre debido a la acción del transportador CusCBA, el cual agrega un término de salida adicional para el cobre hacia el medio extracelular, desplazado el valor del equilibrio. La diferencia entre el valor del equilibrio existiendo solo difusión y con CusCBA depende de la concentración de cobre externa y al número de transportadores que exista.

Ambos casos presentados, con concentraciones de cobre variable y constante en el espacio extracelular, se refieren a dos formas en que puede cambiarse la concentración de cobre en el medio. La primera hace referencia a una perturbación puntual en donde se observa que la célula logra disminuir a la mitad de la concentración de cobre en el citoplasma en tiempos bajo los 50 y 80 minutos para casos de cobre alto y bajo respectivamente. El segundo caso hace referencia a una perturbación que se mantiene en el tiempo y que, a pesar de llegar a dos estados estacionarios distintos, también se tiene tiempos donde la mitad de la concentración final se alcanza a tiempos bajo los 30 minutos. Para ambos casos presentados, el modelo alcanza un estado estacionario. Los análisis siguientes de esta sección y los correspondientes a la validación (Sección 5.5) se realizarán con el caso de perturbaciones que se mantienen en el tiempo dado que, por los tiempos logrados en las simulaciones, una célula de *E. coli* no percibiría el cambio de concentración de cobre en el medio por sus tiempos de generación. En esta misma línea, a pesar de que en un caso real las células crecen en poblaciones y no se encuentran aisladas en el medio, los volúmenes definidos pretenden acotar el espacio de interacción con la célula para que la respuesta del modelo considere un pequeño volumen al rededor de esta. Sería posible utilizar las perturbaciones puntuales en el caso de simular poblaciones celulares.

El tiempo de respuesta del sistema está relacionado con la cantidad de proteínas presentes. En el caso del modelo se consideró un supuesto de proteínas constante en el tiempo o en otras palabras, se consideró que no existía transcripción ni traducción génica. Dado que la transcripción demora más tiempo que la traducción y por lo observado en resultados, como los tiempos de respuesta del modelo se encuentran por debajo de este control génico, se podría decir que el sistema no se ve afectado por esta variable. Aún así, en la célula hay ARMm (ARN mensajeros) presentes, los cuales son capaces de generar proteínas en tiempos menores a la transcripción afectando el supuesto realizado. A pesar de esto, se cree que mantener la cantidad de proteínas constante es una buena aproximación dado que para tiempos de 20 a 40 minutos, no se vería afectado de manera significativa el número de transportadores y enzimas. Se podría incorporar al modelo la presencia de ARNm suponiendo una cantidad de estos y que existiera una velocidad de generación de cada proteína, esta velocidad tendría que ser afectada por la cantidad de cobre presente y por la concentración de la proteína generada.

Según los resultados obtenidos, la cantidad de cobre libre en el citoplasma y en el periplasma para casos de bajo y alto cobre extracelular varía de 2 a 12 átomos (0,003 a 0,02  $\mu M$ ) y 55 a 570 átomos respectivamente (0,09 a 0,95  $\mu M$ ). Esto indica que para el modelo, el periplasma puede almacenar 48 veces más cobre libre que el citoplasma en condiciones de cobre extracelular alto. No se han encontrado datos cuantitativos reportados para comparar estas proporciones, a pesar de esto, si existe antecedente experimental cualitativo que valide esta afirmación [13, 18, 42].

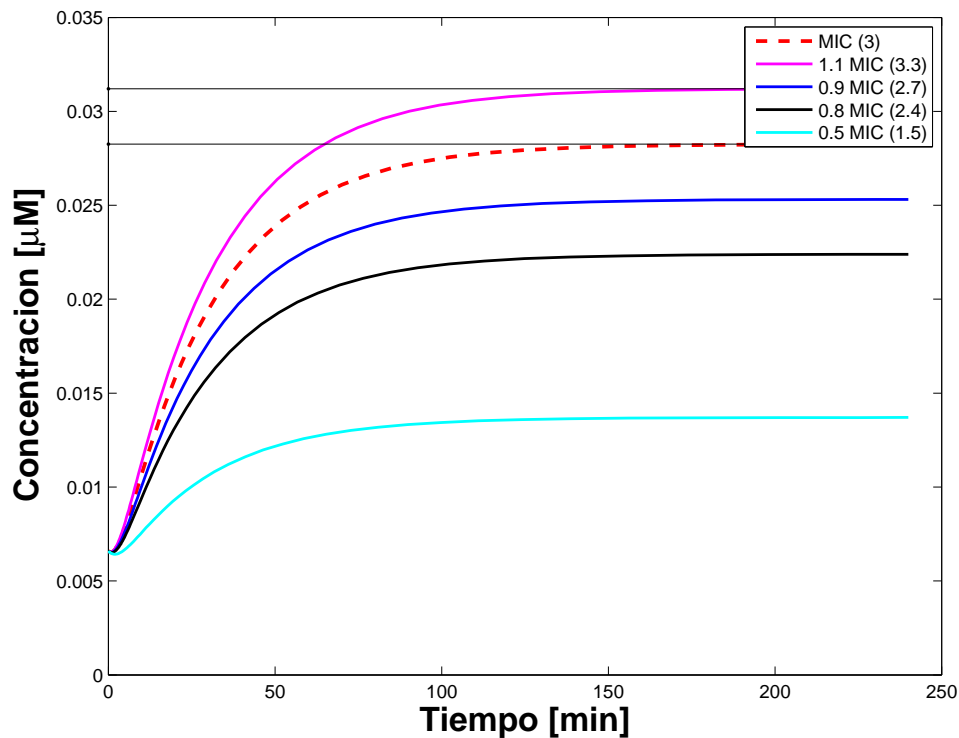
A pesar de no existir algún elemento que transporte cobre del periplasma al citoplasma, el cobre citoplasmático aumenta en el caso 2 (cobre extracelular alto e intracelular bajo). Esto se debe a que CopA, al tener reacciones reversibles, es capaz de ingresar cobre al citoplasma para ciertos casos a pesar de que su función sea la contraria. Esto ha sido reportado en los distintos mecanismos revisado para ATPasas expuestos en la Sección 5.1.1.

Tal como se plantea el modelo, es posible agruparlo como un modelo basado en ecuaciones diferenciales de predicción cuantitativa de flujos. Dentro de este grupo se observa que dos tipos de modelos son considerados para su realización. Es así como la homeostasis de cobre en bacterias fue tratada como un modelo de una célula donde se dividió en compartimientos conectados y también como un modelo de escala molecular donde se estudiaron las reacciones del cobre. Tal como se analizará en la sección de validación (Sección 5.5), el estudio de las MICs hace referencia a una población bacteriana y por tanto se ve sesgada la validación del modelo a partir de este parámetro. Es por eso que podría asociarse lo realizado a un modelo de poblaciones celulares para tener un mejor panorama global de las variables.

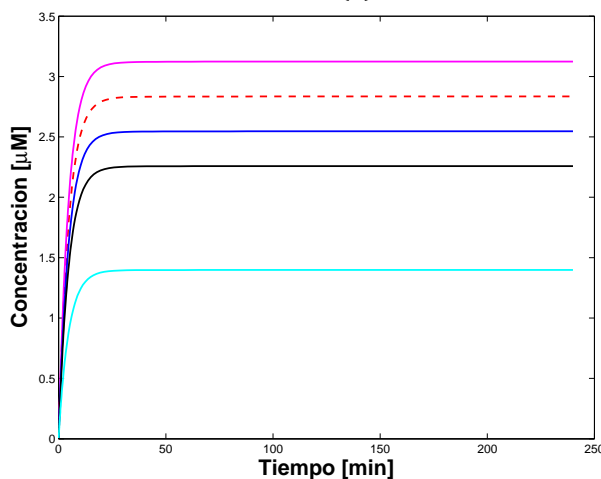
## 5.5. Validación del Modelo

A continuación se presentan los resultados de la validación del modelo mediante MICs descritos en Metodología (Sección 4).

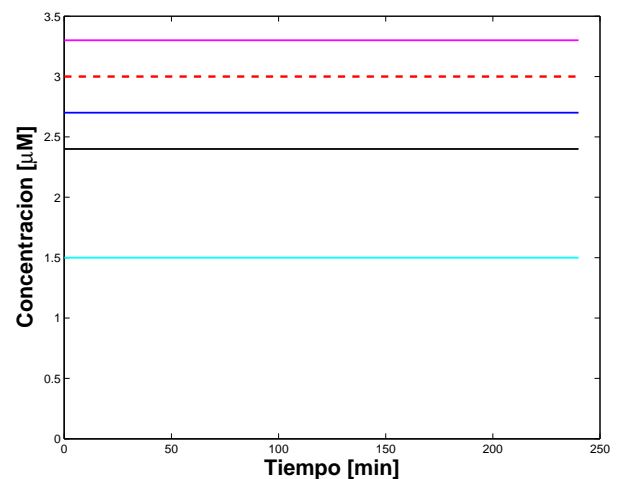
Primero se presenta el estado de control al cual se compararán los *knockdown* (Figura 5.14). Este estado define la concentración máxima de cobre citoplasmático que soporta la célula a una concentración externa igual al MIC.



(a) Cobre total en citoplasma



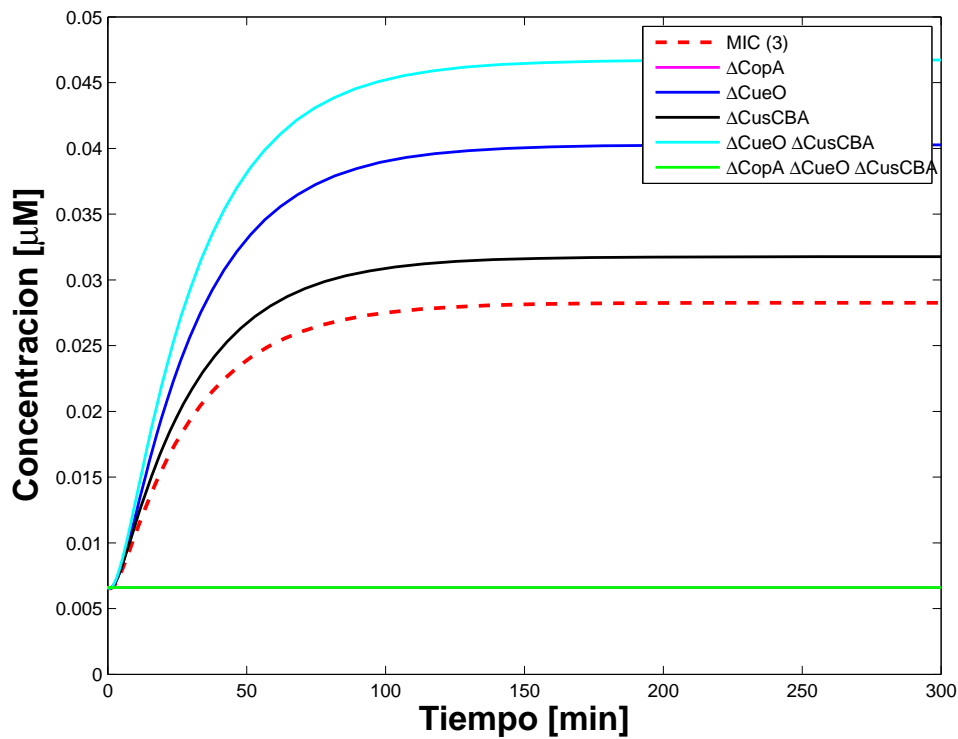
(b) Cobre total en periplasma



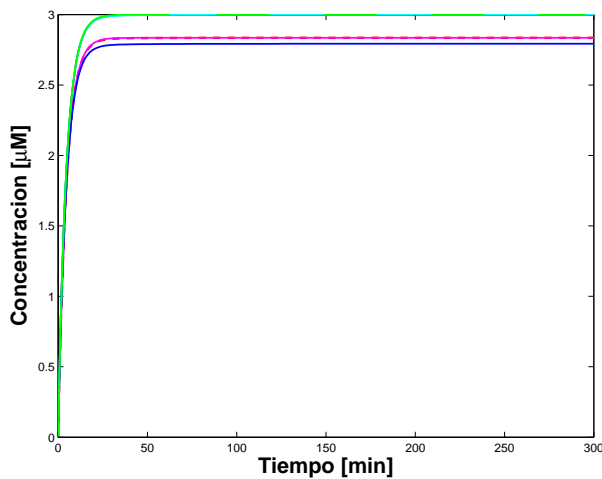
(c) Cobre total extracelular

Figura 5.14: Respuesta del modelo a distintas concentraciones de cobre, considerando concentración de cobre extracelular constante

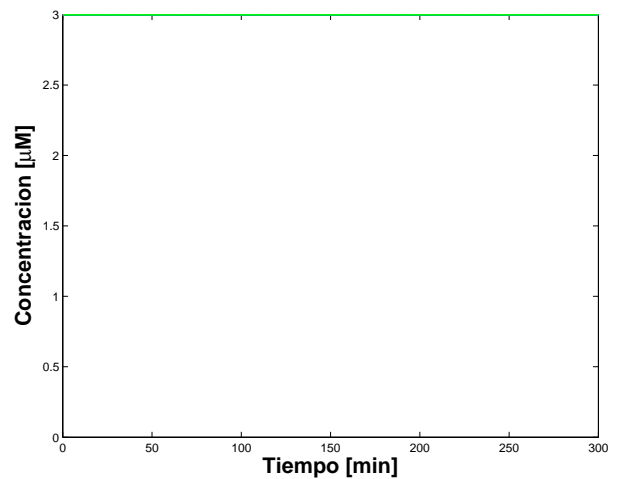
Según lo anterior, y estableciendo el número obtenido como un punto de referencia del modelo y no como una concentración real, se tiene que el rango máximo de concentración de cobre en el citoplasma que acepta la célula es de  $2,8 \cdot 10^{-2} [\mu M]$ . Es esta concentración la que se comparará a continuación con los distintos casos de *knockdown* (Figura 5.15).



(a) Cobre total en citoplasma



(b) Cobre total en periplasma



(c) Cobre total extracelular

Figura 5.15: Respuesta del modelo a distintos casos de *knockdown*, considerando concentración de cobre extracelular constante.

Con lo anterior, los MIC obtenidos por el modelo se muestran en la Tabla 5.8

Cabe destacar que la MIC hace relación a un estado de disminución de crecimiento o muerte de una población celular dado el estrés que se produce por algún componente del medio. En

Tabla 5.8: Comparación entre MICs reportados y MICs obtenidos por el modelo. *No se asocia un MIC del modelo al control al ser el punto de comparación para los otros casos.*

<i>Knockdown</i>	MIC	MIC modelo	referencia a MIC reportado
<i>Wild Type</i>	3	Control	Grass 2001, Navarro y Jerez 2011 <sup>a</sup>
$\Delta copA$	0.75	<sup>b</sup>	Navarro y Jerez 2011 <sup>a</sup>
$\Delta cueO$	3	2.2	Franke 2003, Grass 2001, Navarro y Jerez 2011 <sup>a</sup>
$\Delta cusCFBA$	3	2.64	Grass 2001, Navarro y Jerez 2011 <sup>a</sup>
$\Delta cueO \Delta cusCFBA$	1.25	1.8	Franke 2003, Navarro y Jerez 2011 <sup>a</sup>
$\Delta copA \Delta cueO \Delta cusCFBA$	0.5	<sup>b</sup>	Navarro y Jerez 2011 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>: C. Navarro y C. Jerez, resultados no publicados.

<sup>b</sup>: para este caso no se alcanza una MIC.

este caso, dado que el modelo representa a una célula, la MIC podría influir en el crecimiento de ésta a través de:

- Una disminución del ATP, específicamente por el gasto asociado a CopA.
- Una disminución del gradiente de protones entre el periplasma y el citoplasma o a su vez una acidificación del citoplasma, asociado al transporte de CusCBA.
- Sobrepasar una concentración de cobre en el citoplasma por un tiempo produciendo daño irreversible.

Tal como está construido el modelo, las opciones de una disminución de ATP y una disminución del gradiente de protones no sería posible de analizar al no ser variables dentro del sistema construido. Bajo el supuesto que la concentración igual al MIC es el límite al cual la célula crece normalmente, se definió esta concentración como caso control y el análisis de los resultados para el ajuste de la MIC para cada caso toma eso en cuenta.

Se observa que para las MICs comparados, no se alcanza un valor esperado para ningún caso.

Para las mutaciones por *knockdown* que bloquean la expresión de CopA ( $\Delta copA$ ), se observa que la concentración en el citoplasma no aumenta, independiente de la concentración de cobre externo que exista. Esto se debe a que el único componente que puede transportar cobre desde el periplasma al citoplasma para ciertos casos es CopA. Entonces, sin estar este transportador, no existe conexión del citoplasma con los otros compartimientos generando que la cantidad de cobre en el citoplasma sea constante y no dependa del cobre exterior, produciendo que no exista MIC para esos casos. Según lo reportado, no existe un elemento que transporte o incorpore cobre desde el periplasma al citoplasma, a pesar de esto el cobre podría entrar a la célula a través de ciertas moléculas o proteínas que lo contengan en su estructura; incorporación que no está presente en el modelo. Es así, a partir de lo anteriormente expuesto, que los resultados del modelo de homeostasis de cobre propuesto sugieren la incorporación de un transportador putativo que simule la entrada de cobre desde el periplasma hacia el citoplasma. Este transportador no sería una proteína reportada y supliría la entrada de cobre de vías no relacionadas con el sistema de regulación de este elemento.

En el caso de realizar un *knockdown* de  $\Delta cueO$  y  $\Delta cusCFBA$ , se ha reportado que la MIC no cambia a pesar de la ausencia de alguno de estos componentes. Esto puede traducirse en que el sistema puede mantenerse disminuyendo la cantidad de  $Cu^+$  en el periplasma a través de la oxidación de este o transportándolo hacia el exterior, posiblemente aumentando la cantidad de CueO en ausencia de CusCBA o en caso inverso, aumentando la cantidad de CusCBA en ausencia de CueO. Esto no se ve reflejado en el modelo dado que la cantidad de proteína no se ve afectada, y se cree que es por eso que no se correlacionan los datos reportados de MIC a los entregados por el modelo para estos casos de *knockdown*. Se observa además, que la ausencia de CueO afecta de manera distinta que CusCBA en la resistencia al cobre, siendo el primer caso más sensible a la concentración de este elemento. Esto se condice con los datos reportados de Outten, et al. (2001) donde existe una transcripción basal para CueO y no para CusCBA, estableciendo que la enzima es de mayor importancia para el sistema de homeostasis que el transportador.

Finalmente, al realizar un *knockdown* de  $\Delta cueO\Delta cusCFBA$  se observa una disminución del MIC mayor a la disminución obtenida de los *knockdown* de cada elemento por separado. Que el valor de MIC obtenido no sea igual al valor reportado, podría indicar que alguno de estos elementos se encuentra en menor cantidad o que su actividad es menor a la real y por tanto el sistema se ve menos afectado sin su presencia. Sería posible solucionar este desajuste mediante una relación que modificara los datos obtenidos por CueO y CusCBA en el sistema completo para alcanzar la MIC presentada una vez extraídos.

En esta misma línea, el *knockdown* de  $\Delta cueO\Delta cusCFBA$  fue el único valor MIC resultante mayor al valor MIC reportado. Por lo tanto, el sistema modelado es menos sensible a la pérdida de estos elementos que el sistema real. Este resultado podría indicar nuevamente que hace falta agregar un transportador putativo, dado que es posible que al incorporarlo, y sumar un término de entrada de cobre hacia el citoplasma, el sistema global se vea más afectado por el aumento de concentración de cobre en el periplasma al eliminar a CueO, CusCBA y CusF.

# Capítulo 6

## Conclusiones

La homeostasis de cobre es el estudio de la variación de la concentración de cobre dentro de la célula. En particular, este proyecto se enfocó en el sistema de control referente a *E. coli*, proponiendo mecanismos que describen distintos estados para cada componente. La cinética asociada a estos mecanismos se ajustó a datos reportados para armar los Sistemas Cue y Cus por separado; y luego el sistema global de homeostasis. Finalmente se realizó una validación por MICs.

En cuanto a los objetivos planteados, se alcanzó el objetivo general de desarrollar un modelo y con éste, poder estudiar la resistencia al cobre en bacteria. Esto se logró a partir de la identificación, estudio y caracterización de los elementos claves de la homeostasis de cobre. El modelo propuesto se basó en predicción cuantitativa de flujos a partir de mecanismos de estados.

Para la obtención de los resultados, se realizaron distintas simplificaciones relacionadas principalmente con algunos elementos vinculados a la energía (ATP y  $H^+$ ) y al oxígeno utilizado como aceptor de electrones. Estas simplificaciones pueden ser subsanadas si se requiere complejizar el modelo. Además, a pesar de las simplificaciones realizadas, los mecanismos propuestos para las proteínas no presentaron diferencias importantes a las reportadas.

Otra simplificación realizada corresponde al supuesto de proteínas constante relacionado con la inexistencia de control génico en el sistema. Se observó en los resultados que esta consideración es válida para los tiempos de respuesta con que la célula regula la concentración de cobre. Aunque la aparición de proteínas por ARNm no es considerada, pudiendo afectar la respuesta del modelo para tiempos sobre 20 minutos.

Un componente importante en la respuesta del modelo son los parámetros cinéticos utilizados. Alguno de estos, principalmente los relacionados a mecanismos simplificados, pueden modificar de gran manera el comportamiento del sistema de homeostasis con cambios en sus valores. Es por eso que el ajuste a datos experimentales se torna importante, más si estos datos pertenecen a la misma proteína estudiada y bajo las condiciones utilizadas en el modelo. En esta línea, el sistema es más sensible a perturbaciones en los parámetros asociados a CueO; mientras que es menos sensible a los parámetros asociados a CusCBA.

El modelo se validó mediante ensayos de comparación entre distintos casos de mutaciones de tipo *knockdown* y la MIC que resultaba de ellos. Según lo obtenido, de los cinco casos estudiados, dos de ellos, ambos relacionados con  $\Delta CopA$ , no fueron posible ajustar debido, posiblemente, a la falta de un componente en el sistema global que permita el paso de cobre desde el periplasma al citoplasma. Para el resto de los casos, no se obtuvo una respuesta igual al MIC reportado, aún así es posible recuperar esos valores mediante una relación que permita vincular la MIC reportado con la MIC obtenido con el modelo. Se propone que, para corregir estos resultados, se debe agregar un componente de control génico al modelo.

En cuanto a la metodología utilizada, se considera que esta ha resultado exitosa en su propósito de estudiar la resistencia de cobre en bacteria a pesar de la limitación del modelo en representar una célula y de la dependencia que se tiene de los datos experimentales existentes, que, dado el tamaño del sistema, es necesario contar con una gran cantidad de ellos.

Finalmente, a partir de el modelo obtenido, es posible estudiar el comportamiento de los elementos principales de la homeostasis de cobre y aproximar su funcionamiento dinámico para distintas condiciones iniciales, tanto de concentración de cobre como de proteínas. Además, dado la conservación de estos sistemas, es posible extrapolar el modelo a otros organismos al estar construido en bloques que representan a cada componente del sistema, dando flexibilidad de incorporar, eliminar o modificar individualmente cada uno de ellos.

Es así como, siguiendo la línea de la motivación de este proyecto, es posible obtener una primera aproximación para determinar concentraciones críticas de cobre y por ejemplo, evaluar que tan buena es una superficie biocida con cierta concentración de cobre y algún elemento que bloquee a proteínas importantes del sistema de homeostasis que se encuentren en la superficie de la célula. Como también, determinar que elemento es más relevante en la absorción de cobre en cierto organismo y con esto, acotar el número de experimentos a realizar para suplir problemas metabólicos de absorción o intoxicación por este elemento.

## 6.1. Recomendaciones

En base al modelo desarrollado, que cubre los elementos claves del mecanismo de transporte y homeostasis de cobre en bacterias, posible plantear ciertas recomendaciones para el futuro desarrollo del proyecto o similares a través de nuevas investigaciones o estudios relacionados. Es así como se aconseja:

- Incorporar las variables asociadas a la energía, en este caso el ATP relacionado con el transporte de CopA y los protones relacionado con el transporte de CusCBA; y así representar de mejor manera el sistema de homeostasis en momentos de estrés de concentraciones de cobre donde se hace más relevante un control y por tanto el gasto energético es mayor.
- Incorporar la regulación génica de forma que se pueda observar el cambio del número proteínas a condiciones de cobre variables en el tiempo. Esta incorporación puede ser mediante la opción que se discutió en la Sección 5 u otra que pueda ajustarse correctamente.



- Obtener datos experimentales de la actividad de CusCBA con y sin la presencia de la chaperona CusF dada la importancia de estos elementos en el subsistema Cus. Esto podría realizarse a través de un ensayo de doble membrana invertida que solo contengan los elementos a estudiar o, dada la complejidad del primero, un ensayo a partir de una bacteria modificada que contenga gran cantidad de estos elementos expresados y donde sea posible medir la acumulación de cobre en el periplasma.
- Obtener datos experimentales de la cantidad de cobre acumulado dentro de la célula expuesta a distintas concentraciones del elemento, y así fijar de mejor manera los valores de la validación de los MICs. Con esto se podría obtener un estado control que incorporará mayor información acerca de los límites de cobre al interior de la célula. Un ensayo propuesto para esta recomendación sería medir la acumulación de cobre de una población celular y luego normalizar por el número de células para obtener un dato promedio representativo para esa muestra.
- Desarrollar un modelo de población celular al que sea posible incorporar el modelo de homeostasis desarrollado para una célula. Con esto se podría estudiar de mejor manera el efecto del MIC en el crecimiento.

# Bibliografía

- [1] D. J. Eide, "The Molecular Biology of Metal Ion Transport in *Saccharomyces cerevisiae*," 1998.
- [2] T. Lyons, E. Butler Gralla, and J. Selverstone Valentine, "Biological Chemistry of copper-zinc superoxide dimutase and its link to amyothopic lateral sclerosis," *Metal Ions in Biological Systems*, 1999.
- [3] R. J. P. Williams, "Metal ions in biological systems," *Biological Reviews*, 1953.
- [4] S. Silver and L. T. Phung, "Bacterial heavy metal resistance: new surprises.," *Annual Review of Microbiology*, 1996.
- [5] D. Magnani and M. Solioz, "How bacteria handle copper," *Molecular Microbiology of Heavy Metals*, 2007.
- [6] E.-H. Kim, D. H. Nies, M. M. McEvoy, and C. Rensing, "Switch or funnel: how RND-type transport systems control periplasmic metal homeostasis.," *Journal of Bacteriology*, 2011.
- [7] S. A. Gudipaty, A. S. Larsen, C. Rensing, and M. M. McEvoy, "Regulation of Cu(I)/Ag(I) efflux genes in *Escherichia coli* by the sensor kinase CusS.," *FEMS Microbiology Letters*, 2012.
- [8] N. Hoshino, T. Kimura, A. Yamaji, and T. Ando, "Damage to the cytoplasmic membrane of *Escherichia Coli* by catechin-copper (ii) complexes," *Free Radical Biology and Medicine*, 1999.
- [9] B. Halliwell and J. Gutteridge, "Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease," *Biochemistry*, 1984.
- [10] C. J. Kershaw, N. L. Brown, C. Constantinidou, M. D. Patel, and J. L. Hobman, "The expression profile of *Escherichia coli* K-12 in response to minimal, optimal and excess copper concentrations.," *Microbiology (Reading, England)*, 2005.
- [11] C. Rensing, M. Ghosh, and B. P. Rosen, "MINIREVIEW families of soft-metal-ion-transporting ATPases," *Journal of Bacteriology*, 1999.
- [12] P. H. Beswick, G. H. Hall, a. J. Hook, K. Little, D. C. McBrien, and K. a. Lott, "Copper toxicity: evidence for the conversion of cupric to cuprous copper in vivo under anaerobic

conditions,” *Chemico-Biological Interactions*, 1976.

- [13] F. W. Outten, D. L. Huffman, J. a. Hale, and T. V. O’Halloran, “The independent cue and cus systems confer copper tolerance during aerobic and anaerobic growth in *Escherichia coli*,” *Journal of Biological Chemistry*, 2001.
- [14] K. Y. Djoko, L. X. Chong, A. G. Wedd, and Z. Xiao, “Reaction mechanisms of the multicopper oxidase CueO from *Escherichia coli* support its functional role as a cuprous oxidase,” *Journal of the American Chemical Society*, 2010.
- [15] J. M. Argüello, E. Eren, and M. González-Guerrero, “The structure and function of heavy metal transport P1B-ATPases,” *Biometals*, 2007.
- [16] C. Rensing, T. Pribyl, and D. H. Nies, “New functions for the three subunits of the CzcCBA cation-proton antiporter,” *Journal of Bacteriology*, 1997.
- [17] J. M. Andrews, “Determination of minimum inhibitory concentrations,” *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2001.
- [18] K. Marrero, “Sistemas de homeostasis del cobre en las bacterias Gram negativas *Escherichia coli* y *Vibrio cholerae*,” *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 2009.
- [19] F. W. Outten, C. E. Outten, J. Hale, and T. V. O’Halloran, “Transcriptional activation of an *Escherichia coli* copper efflux regulon by the chromosomal MerR homologue, cueR,” *Journal of Biological Chemistry*, 2000.
- [20] C. Petersen and L. B. Møller, “Control of copper homeostasis in *Escherichia coli* by a P-type ATPase, CopA, and a MerR-like transcriptional activator, CopR,” *Gene*, 2000.
- [21] M. H. Saier, R. Tarn, A. Reizer, and J. Reizer, “Two novel families of bacterial membrane proteins concerned with nodulation, cell division and transport,” *Molecular Microbiology*, 1994.
- [22] S. Lobedanz, E. Bokma, M. F. Symmons, E. Koronakis, C. Hughes, and V. Koronakis, “A periplasmic coiled-coil interface underlying TolC recruitment and the assembly of bacterial drug efflux pumps,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007.
- [23] I. Bagai, C. Rensing, N. J. Blackburn, and M. M. McEvoy, “Direct metal transfer between periplasmic proteins identifies a bacterial copper chaperone,” *Biochemistry*, 2008.
- [24] S. Franke, G. Grass, C. Rensing, and D. H. Nies, “Molecular analysis of the copper-transporting efflux system CusCFBA of *Escherichia coli* molecular analysis of the copper-transporting efflux system CusCFBA of *Escherichia coli*,” *Journal of Bacteriology*, 2003.
- [25] G. P. Munson, D. L. Lam, F. W. Outten, and T. V. O’Halloran, “Identification of a copper-responsive two-component system on the chromosome of *Escherichia coli* K-12,” *Journal of Bacteriology*, 2000.

- [26] N. Brown, J. Camakaris, and A. Duncan, "Molecular genetics and transport analysis of the copper-resistance determinant (pco) from *Escherichia coli* plasmid pRJ1004," vol. 17, pp. 1153–1166, 1995.
- [27] S. M. Lee, G. Grass, C. Rensing, S. R. Barrett, C. J. D. Yates, J. V. Stoyanov, and N. L. Brown, "The Pco proteins are involved in periplasmic copper handling in *Escherichia coli*," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2002.
- [28] J. Navas, "Modelos Matemáticos," tech. rep., Universidad de Jaén, Jaén, 2009.
- [29] E. Curis, I. Nicolis, J. Bensaci, P. Deschamps, and S. Bénazeth, "Mathematical modeling in metal metabolism: overview and perspectives," *Biochimie*, 2009.
- [30] K. Vijayaraghavan and Y.-S. Yun, "Bacterial biosorbents and biosorption," *Biotechnology Advances*, 2008.
- [31] Center for Disease Control and Prevention, "General Information *Escherichia coli*." <<http://www.cdc.gov/ecoli/general/index.html>>, 2011.
- [32] I. M. Keseler, J. Collado-Vides, A. Santos-Zavaleta, M. Peralta-Gil, S. Gama-Castro, L. Muñoz Rascado, C. Bonavides-Martinez, S. Paley, M. Krummenacker, T. Altman, P. Kaipa, A. Spaulding, J. Pacheco, M. Latendresse, C. Fulcher, M. Sarker, A. G. Shearer, A. Mackie, I. Paulsen, R. P. Gunsalus, and P. D. Karp, "EcoCyc: a comprehensive database of *Escherichia coli* biology," *Nucleic Acids Research*, 2011.
- [33] Todar Kenneth, "Pathogenic *Escherichia coli*." <<http://www.textbookofbacteriology.net/e.coli.html>>, 2012.
- [34] R. Perkins and W. Perkins, "Microbial cell walls and membranes," *Biochemical Education*, 1980.
- [35] Biology Forums, "Cell-wall structure of gram-positive and gram-negative bacteria."
- [36] J. Ghuyssen and R. Hackenbeck, *Bacterial Cell Wall*. Bacterial Cell Wall, Elsevier, 1994.
- [37] A. K. Boal and A. C. Rosenzweig, "Structural biology of copper trafficking," *Chemical Reviews*, 2009.
- [38] M. M. O. Pen, J. Lee, and D. J. Thiele, "Critical review a delicate balance: homeostatic control of copper uptake and distribution," *The Journal of Nutrition*, 1999.
- [39] J. Camakaris, I. Voskoboinik, and J. F. Mercer, "Molecular mechanisms of copper homeostasis," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1999.
- [40] K. B. Axelsen and M. G. Palmgren, "Evolution of substrate specificities in the P-type ATPase superfamily," *Journal of Molecular Evolution*, 1998.
- [41] J. V. Stoyanov, J. L. Hobman, and N. L. Brown, "CueR (YbbI) of *Escherichia coli* is a MerR family regulator controlling expression of the copper exporter CopA," *Molecular*

*Microbiology*, 2001.

- [42] K. Kataoka, H. Komori, Y. Ueki, Y. Konno, Y. Kamitaka, S. Kurose, S. Tsujimura, Y. Higuchi, K. Kano, D. Seo, and T. Sakurai, "Structure and function of the engineered multicopper oxidase CueO from *Escherichia coli* deletion of the methionine-rich helical region covering the substrate-binding site," *Journal of Molecular Biology*, 2007.
- [43] G. Grass and C. Rensing, "CueO is a multi-copper oxidase that confers copper tolerance in *Escherichia coli*," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2001.
- [44] C. Kim, W. W. Lorenz, J. T. Hoopes, and J. F. D. Dean, "Oxidation of phenolate siderophores by the multicopper oxidase encoded by the *Escherichia coli* *yacK* gene," *Journal of Bacteriology*, no. 16.
- [45] S. K. Singh, G. Grass, C. Rensing, and W. R. Montfort, "Cuprous oxidase activity of CueO from *Escherichia coli*," *Journal of Bacteriology*, 2004.
- [46] N. L. Brown, J. V. Stoyanov, S. P. Kidd, and J. L. Hobman, "The MerR family of transcriptional regulators," *FEMS Microbiology Reviews*, 2003.
- [47] I. R. Loftin, S. Franke, S. a. Roberts, A. Weichsel, A. Héroux, W. R. Montfort, C. Rensing, and M. M. McEvoy, "A novel copper-binding fold for the periplasmic copper resistance protein CusF," *Biochemistry*, 2005.
- [48] F. Long, C.-C. Su, H.-T. Lei, J. R. Bolla, S. V. Do, and E. W. Yu, "Structure and mechanism of the tripartite CusCBA heavy-metal efflux complex," *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 2012.
- [49] J. T. Kittleson, I. R. Loftin, A. C. Hausrath, K. P. Engelhardt, C. Rensing, and M. M. McEvoy, "Periplasmic metal-resistance protein CusF exhibits high affinity and specificity for both CuI and AgI," *Biochemistry*, 2006.
- [50] M. Noll, "Identification of a novel transcription regulator from proteus mirabilis, PMTR, revealed a possible role of YJAI protein in balancing zinc in *Escherichia coli*," *Journal of Biological Chemistry*, 1998.
- [51] A. Changela, K. Chen, Y. Xue, J. Holschen, C. E. Outten, T. V. O'Halloran, and A. Mondragón, "Molecular basis of metal-ion selectivity and zeptomolar sensitivity by CueR," *Science (New York, N.Y.)*, 2003.
- [52] I. Bagai, W. Liu, C. Rensing, N. J. Blackburn, and M. M. McEvoy, "Substrate-linked conformational change in the periplasmic component of a Cu(I)/Ag(I) efflux system.," *The Journal of Biological Chemistry*, 2007.
- [53] M. Goldberg, "Energetics and topology of CzcA, a cation/proton antiporter of the resistance-nodulation-cell division protein family," *Journal of Biological Chemistry*, 1999.
- [54] J. Mikolosko, K. Bobyk, H. I. Zgurskaya, and P. Ghosh, "Conformational Flexibility in the Multidrug Efflux System Protein AcrA," 2007.

- [55] S. Murakami, "Multidrug efflux transporter AcrB, the pumping mechanism.," *Current Opinion in Structural Biology*, 2008.
- [56] S. Franke, G. Grass, and D. H. Nies, "The product of the ybdE gene of the *Escherichia coli* chromosome is involved in detoxification of silver ions.," *Microbiology (Reading, England)*, 2001.
- [57] K. Yamamoto and A. Ishihama, "Transcriptional response of *Escherichia coli* to external copper.," *Molecular Microbiology*, 2005.
- [58] G. Grass and C. Rensing, "Genes involved in copper homeostasis in *Escherichia coli* genes involved in copper homeostasis in *Escherichia coli*," *Journal of Bacteriology*, 2001.
- [59] C. Rensing and G. Grass, "*Escherichia coli* mechanisms of copper homeostasis in a changing environment," *FEMS Microbiology Reviews*, 2003.
- [60] M. Zimmermann, S. R. Udagedara, C. M. Sze, T. M. Ryan, G. J. Howlett, Z. Xiao, and A. G. Wedd, "PcoE—a metal sponge expressed to the periplasm of copper resistance *Escherichia coli*. Implication of it's function role in copper resistance.," *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2012.
- [61] S. D. Gupta, B. Lee, J. Camakaris, and H. C. Wu, "Identification of cutc and cutf (nlpe) genes involved in copper tolerance in *Escherichia coli*," *Journal of Bacteriology*, 1995.
- [62] V. A. Rapisarda, L. R. Montelongo, F. R. N., and E. M. Massa, "Characterization of an nadh-linked cupric reductase activity from the *Escherichia coli* respiratory chain," *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1999.
- [63] D. Rouch, J. Camakaris, and B. Lee, "Copper transport in *Escherichia coli*," *Metal Ion Homeostasis: Molecular Biology and Chemistry*, 1989.
- [64] A. Sackmann, D. Formanowicz, P. Formanowicz, and J. Blazewicz, "New insights into the human body iron metabolism analyzed by a petri net based approach.," *Biosystems*, 2009.
- [65] A. Sackmann, D. Formanowicz, P. Formanowicz, I. Koch, and J. Blazewicz, "An analysis of the petri net based model of the human body iron homeostasis process," *Computational Biology and Chemistry*, 2007.
- [66] D. Formanowicz, A. Sackmann, P. Formanowicz, and J. Blazewicz, "Petri net based model of the body iron homeostasis.," *Journal of Biomedical Informatics*, 2007.
- [67] J. Blazewicz, D. Formanowicz, P. Formanowicz, A. Sackmann, and M. Sajkowski, "Modeling the process of human body iron homeostasis using a variant of timed Petri nets," *Discrete Applied Mathematics*, 2009.
- [68] M. Inverno and R. Saunders, "Agent-based modelling of stem cell self-organisation in a niche," 2005.
- [69] J. Beardmore, G. Rugg, and C. Exley, "An analysis of the petri net based model of the

- human body iron homeostasis process,” *Inorganic Biochemistry*, 2007.
- [70] J. Beardmore and C. Exley, “Towards a model of non-equilibrium binding of metal ions in biological systems,” *Inorganic Biochemistry*, 2009.
- [71] D. a. Iacobas, S. O. Suadicani, D. C. Spray, and E. Scemes, “A stochastic two-dimensional model of intercellular Ca(+2) wave spread in glia.,” *Biophysical Journal*, 2006.
- [72] S. Y. Cho, M. Chung, M. Park, S. Park, and Y. S. Lee, “Zifibi: Prediction of dna binding sites for zinc finger proteins,” *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2008.
- [73] J. Matis and T. Wehrly, “Generalized stochastic compartmental models with erlang transit times,” *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics*, 1990.
- [74] B. D. Beck, R. L. Mattuck, T. S. Bowers, J. T. Cohen, and E. O’Flaherty, “The development of a stochastic physiologically-based pharmacokinetic model for lead,” *Science of The Total Environment*, 2001.
- [75] G. Kahle, J. and Zauke, “Bioaccumulation of trace metals in the copepod *Calanoides acutus* from the weddel sea (antarctica): comparison of two-compartment and hyperbolic toxicokinetic models,” *Aquatic Toxicology*, 2008.
- [76] M. Dunn, M. Green, and J. Leach, “Kinetics of copper metabolism in rats: a compartmental model,” *American Journal of Physiology and Endocrinology Metabolism*, 1991.
- [77] M. Pollycove and R. Mortimer, “The quantitative determination of iron kinetics and hemoglobin synthesis in human subjects,” *Journal of Clinical Investigation*, 1961.
- [78] McLaren, Nathanson, and Saidel, “Compartmental analysis of intestinal iron absorption and mucosal iron kinetics, in: K.n.s. subramanian, m.e. wastney-pentchev,” *Kinetic Models of Trace Element and Mineral Metabolism During Development*, 1995.
- [79] Fgaier, Feher, McKellar, and Eberl, “Predictive modeling of siderphone production by pseudomonas fluorescens under iron limitation,” *Journal of Theoretical Biology*, 2008.
- [80] Franks, Ward, Tindall, King, Curtis, and Evans, “Mathematical model of the in vitro keratinocyte response to chromium and nickel exposure,” *Toxicology in Vitro*, 2008.
- [81] Kretsinger, Mann, and Simmonds, “Model of enhanced diffusion of calcium by the intestinal calcium binding protein, in: A.w. norman, k. schaefer, d.v. herrath, h.-g. grigoleit (eds.), vitamin d: Chemical, biochemical and clinical endocrinology of calcium metabolism,” *DeGruyter*, 1982.
- [82] Feher, Fullmer, and Wasserman, “Role of facilitated diffusion of calcium by calbindin in intestinal calcium absorption,” *American Journal of Physiology: Cell Physiology*, 1992.
- [83] E. Pécou, A. Maass, D. Remenik, J. Briche, and M. Gonzalez, “A mathematical model for copper homeostasis in *Enterococcus hirae*.,” *Mathematical Biosciences*, 2006.

- [84] A. Kowald, H. Lehrach, and E. Klipp, "Alternative pathways as mechanism for the negative effects associated with overexpression of superoxide dismutase," *Journal of Theoretical Biology*, 2006.
- [85] Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, "Kegg overview."
- [86] Braunschweig Enzyme Database, "Brenda introduction and references."
- [87] EcoCyc project, "EcoCyc project overview."
- [88] Basic Local Alignment Search Tool, "Blast help and document."
- [89] Y. Hatori, D. Lewis, C. Toyoshima, and G. Inesi, "Reaction cycle of *Thermotoga maritima* copper ATPase and conformational characterization of catalytically deficient mutants.," *Biochemistry*, 2009.
- [90] K. Tran, N. P. Smith, D. S. Loiselle, and E. J. Crampin, "A thermodynamic model of the cardiac sarcoplasmic/endoplasmic Ca(2+) (SERCA) pump.," *Biophysical Journal*, 2009.
- [91] M. González-Guerrero, D. Raimunda, X. Cheng, and J. M. Argüello, "Distinct functional roles of homologous Cu<sup>+</sup> efflux ATPases in *Pseudomonas aeruginosa*," *Molecular Microbiology*, 2010.
- [92] C. P. Fall, *Computational Cell Biology*. Interdisciplinary Applied Mathematics, New York, NY: Springer New York, 2004.
- [93] K. Nagano and H. Nikaido, "Kinetic behavior of the major multidrug efflux pump AcrB of *Escherichia coli*," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009.
- [94] The CyberCell Database, "*Escherichia coli* statistics."
- [95] H. E. Kubitschek and J. a. Friske, "Determination of bacterial cell volume with the Coulter Counter.," *Journal of Bacteriology*, 1986.
- [96] Y. Xue, A. V. Davis, G. Balakrishnan, J. P. Stasser, B. M. Staehlin, P. Focia, T. G. Spiro, J. E. Penner-Hahn, and T. V. O'Halloran, "Cu(I) recognition via cation- $\pi$  and methionine interactions in CusF," *Nature Chemical Biology*, 2008.
- [97] S. Ríos and S. García, *Modelización*. Alianza Universidad, Alianza, 1995.



# **Anexos**

# Apéndice A

## Desarrollo matemático para la expresión de velocidad de CopA

De la Ecuación 5.1 en conjunto con las velocidades de la Tabla 5.1, y suponiendo equilibrio las reacciones del estado  $2 \rightarrow 3$  y  $4 \rightarrow 1$  se tiene:

$$\begin{aligned} v_{a12} = v_{a21} &\implies a_{12} \cdot [CopA] \cdot [Cu^+_c] = a_{21} \cdot [CopA - Cu^+] \\ \implies K_1 \cdot [CopA] \cdot [Cu^+_c] &= a_{21} \cdot [CopA - Cu^+] \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} v_{a23} = v_{a32} &\implies a_{23} \cdot [CopA - Cu^+] = a_{32} \cdot [CopA^* - Cu^+] \\ \implies K_2 \cdot [CopA - Cu^+] &= [CopA^* - Cu^+] \end{aligned}$$

además, por conservación de masa:

$$V_c \cdot [CopA]_{tot} = V_c \cdot ([CopA] + [CopA - Cu^+] + [CopA^* - Cu^+] + [CopA^+])$$

entonces tenemos que:

$$\begin{aligned} V_c \cdot \frac{d[Cu^+]}{dt} &= -V_c \cdot \frac{d[CopA^* - Cu^+]}{dt} \\ \frac{d[Cu^+]}{dt} &= -(v_{a23} - v_{a32} - v_{a34} + v_{a43}) \\ \frac{d[Cu^+]}{dt} &= -v_{a34} + v_{a43} \\ \frac{d[Cu^+]}{dt} &= a_{34} \cdot K_1 \cdot K_2 \cdot [CopA] \cdot [Cu^+_i] - \frac{a_{43}}{K_4} \cdot [CopA] \cdot [Cu^+_p] \end{aligned}$$

Reemplazando el despeje de  $[CopA]$  a partir de la ecuación de  $[CopA]_{tot}$ , tenemos:

$$\frac{d[Cu^+]}{dt} = K_a \cdot \frac{[CopA]_{tot}}{K_b + [Cu^+_i]} \cdot [Cu^+_i] - K_c \cdot \frac{[CopA]_{tot}}{K_b + [Cu^+_i]} \cdot [Cu^+_p]$$

## Apéndice B

# Desarrollo matemático para la expresión de velocidad de CueO

De la Ecuación 5.3 en conjunto con las velocidades de la Tabla 5.2, y suponiendo equilibrio las reacciones del estado  $1 \rightarrow 2$  y  $2 \rightarrow 3$  se tiene:

$$\begin{aligned} v_{o12} = v_{o21} &\implies o_{12} \cdot [\text{CueO}] \cdot [\text{Cu}^+] = o_{21} \cdot [\text{CueO} - \text{Cu}^+] \\ \implies K_1 \cdot [\text{CueO}] \cdot [\text{Cu}^+] &= [\text{CueO} - \text{Cu}^+] \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} v_{o23} = v_{o32} &\implies o_{23} \cdot [\text{CueO} - \text{Cu}^+] = o_{32} \cdot [\text{CueO} - \text{Cu}^{+2}] \\ \implies K_2 \cdot [\text{CueO} - \text{Cu}^+] &= [\text{CueO} - \text{Cu}^{+2}] \end{aligned}$$

además, por conservación de masa:

$$V_p \cdot [\text{CueO}]_{tot} = V_p \cdot ([\text{CueO}] + [\text{CueO} - \text{Cu}^+] + [\text{CueO} - \text{Cu}^{+2}])$$

entonces tenemos que:

$$\begin{aligned} \frac{d[\text{Cu}^{+2}]}{dt} &= v_{o31} = o_{31} \cdot [\text{CueO} - \text{Cu}^{+2}] \\ \frac{d[\text{Cu}^{+2}]}{dt} &= o_{31} \cdot K_1 \cdot K_2 \cdot [\text{CueO}] [\text{Cu}^+] \\ \frac{d[\text{Cu}^{+2}]}{dt} &= o_{31} \cdot K_1 \cdot K_2 \cdot \frac{[\text{CueO}]_{tot}}{1 + K_1 \cdot [\text{Cu}^+]} \cdot [\text{Cu}^+] \end{aligned}$$

Finalmente, se tiene que:

$$\frac{d[\text{Cu}^{+2}]}{dt} = V_{max} \cdot [\text{CueO}]_{tot} \cdot \frac{[\text{Cu}^+]}{1 + K_m \cdot [\text{Cu}^+]}$$

# Apéndice C

## Valores de los parámetros cinéticos obtenidos de literatura

Tabla C.1: Parámetros obtenidos de literatura utilizados en el Sistema.

<sup>a</sup>: parámetros ajustados de datos experimentales. <sup>b</sup>: parámetros iguales a datos experimentales reportados.

Proteína	Parámetro	Valor	Unidad	Referencia
CopA	$K_1$	$1,06 \cdot 10^2$	$nmol/min \cdot mg$	[91] <sup>a</sup>
	$K_a$	$2,72 \cdot 10^1$	$\mu M$	[91] <sup>b</sup>
	$K_2$	$2 \cdot 10^{-1}$	$nmol/min \cdot mg$	[91] <sup>a</sup>
CueO	$K_1$	$6,51 \cdot 10^2$	$\mu mol/min \cdot mg$	[45] <sup>b</sup>
	$K_a$	$1,69 \cdot 10^2$	$\mu M$	[45] <sup>b</sup>
CusF-CusCBA	$f_{12}$	$5,00 \cdot 10^{-2}$	$1/\mu M \cdot h$	[49] <sup>a</sup>
	$f_{21}$	$1,84 \cdot 10^{-2}$	$1/h$	[49] <sup>a</sup>
	$f_{c12}$	$4,86 \cdot 10^2$	$nmol/s \cdot mg$	Propuesto
	$f_{c21}$	$5,51 \cdot 10^{-2}$	$1/s \cdot mg$	Propuesto
	$f_{c23}$	$1,97 \cdot 10^0$	$1/s \cdot mg$	[93] <sup>a</sup>
	$c_{34}$	$2,00 \cdot 10^1$	$1/s \cdot mg$	[93] <sup>a</sup>
	$c_{43}$	$3,15 \cdot 10^0$	$1/s \cdot mg$	[93] <sup>a</sup>
	$c_{41}$	$1,21 \cdot 10^1$	$1/s \cdot mg$	[93] <sup>a</sup>
	$c_{13}$	$4,86 \cdot 10^{-3}$	$nmol/s \cdot mg$	[93] <sup>a</sup>
	$c_{31}$	$5,51 \cdot 10^{-3}$	$1/min$	[93] <sup>a</sup>
Difusión Cu	$P$	$2,00 \cdot 10^{-7}$	$cm/s$	[93] <sup>a</sup>
	$A$	$6,00 \cdot 10^0$	$\mu m^2$	[94] <sup>b</sup>
Volúmenes	$V_c$	$2/3 \cdot 10^{-15}$	$L$	Propuesto
	$V_p$	$1/3 \cdot 10^{-15}$	$L$	Propuesto
	$V_e$	$1 \cdot 10^{-15}$	$L$	Propuesto

## Apéndice D

### Resultados adicionales para caso de cobre externo variable

A continuación se presenten los resultados para la concentración de cobre en sus estados de oxidación (I) y (II) de las simulaciones considerando la concentración de cobre externo variable. Las condiciones iniciales de dichas simulaciones para las concentraciones de cobre, tal como se expone en la Sección 5.4, son de:  $6,6 \cdot 10^{-3}$  y  $6,6 \cdot 10^{-4} \mu M$  para los casos de cobre alto y bajo en el citoplasma respectivamente; y de 3 y  $0,3 \mu M$  para los casos de cobre alto y bajo en el exterior respectivamente. Estos casos son representados como (+) para el caso de cobre alto, y como (-) para los casos de cobre bajo.

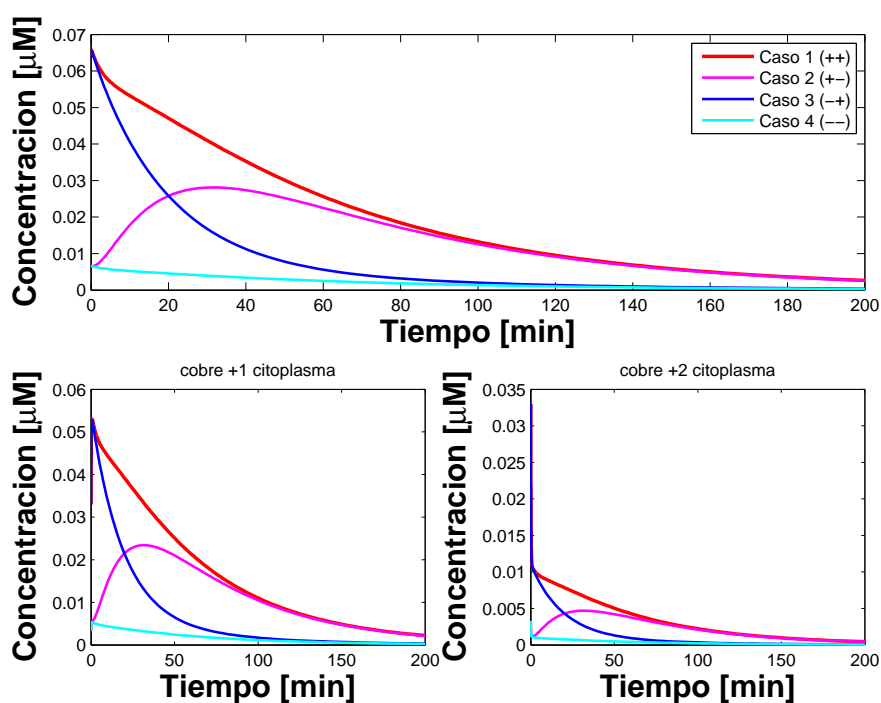


Figura D.1: Variación de la concentración de cobre citoplasmático para el caso de cobre externo variable. El gráfico principal (parte superior), representa la suma de la cantidad de cobre (I) y (II); presentados en la parte inferior de la figura.

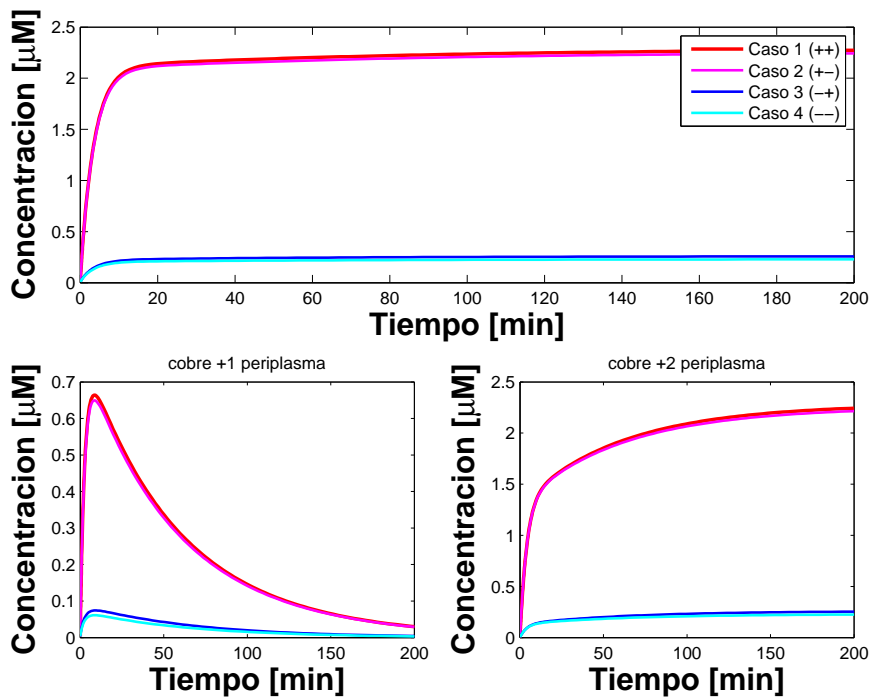


Figura D.2: Variación de la concentración de cobre periplasmático para el caso de cobre externo variable. El gráfico principal (parte superior), representa la suma de la cantidad de cobre (I) y (II); presentados en la parte inferior de la figura.

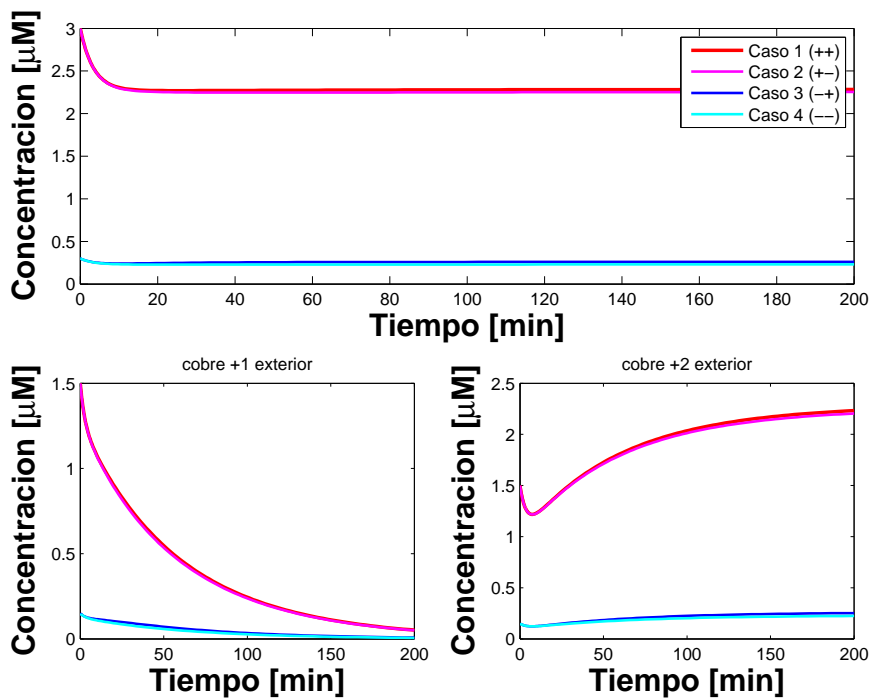


Figura D.3: Variación de la concentración de cobre extracelular para el caso de cobre externo variable. El gráfico principal (parte superior), representa la suma de la cantidad de cobre (I) y (II); presentados en la parte inferior de la figura.

# Apéndice E

## Resultados adicionales para caso de cobre externo constante

A continuación se presenten los resultados para la concentración de cobre en sus estados de oxidación (I) y (II) de las simulaciones considerando la concentración de cobre externo constante. Las condiciones iniciales de dichas simulaciones para las concentraciones de cobre, tal como se expone en la Sección 5.4, son de:  $6,6 \cdot 10^{-3}$  y  $6,6 \cdot 10^{-4} \mu M$  para los casos de cobre alto y bajo en el citoplasma respectivamente; y de 3 y  $0,3 \mu M$  para los casos de cobre alto y bajo en el exterior respectivamente. Estos casos son representados como (+) para el caso de cobre alto, y como (-) para los casos de cobre bajo.

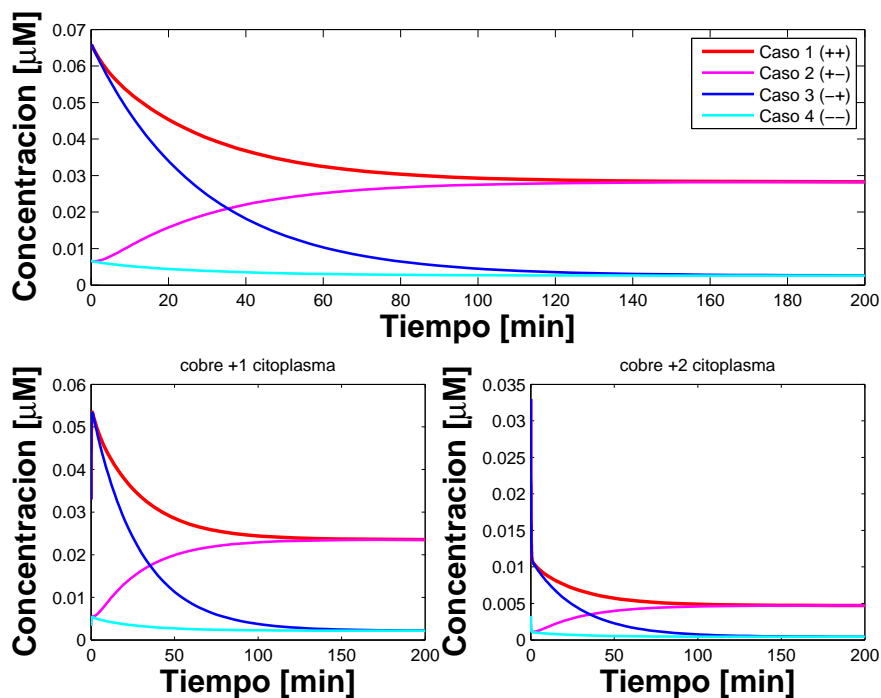


Figura E.1: Variación de la concentración de cobre citoplasmático para el caso de cobre externo constante. El gráfico principal (parte superior), representa la suma de la cantidad de cobre (I) y (II); presentados en la parte inferior de la figura.

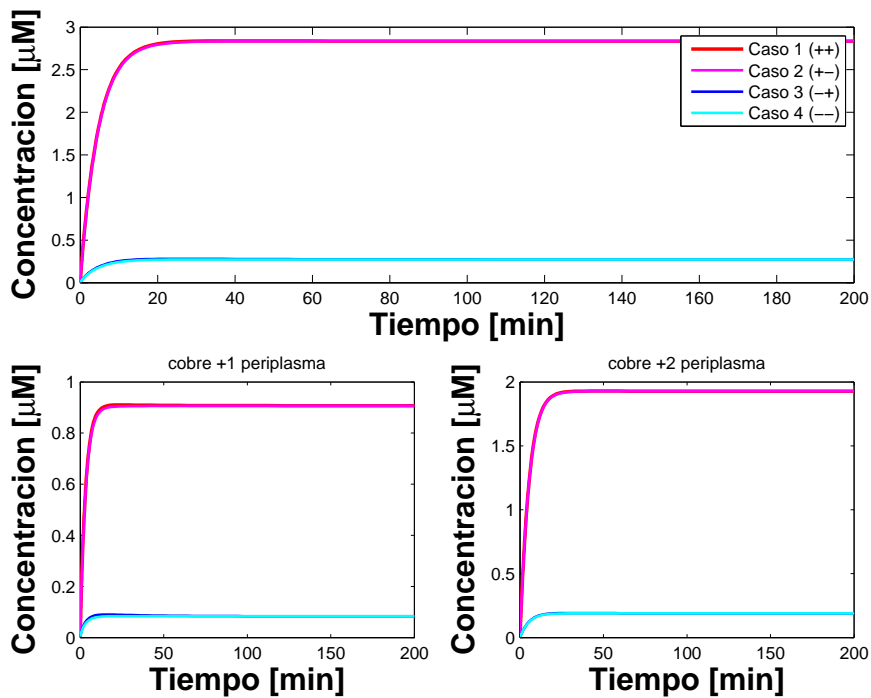


Figura E.2: Variación de la concentración de cobre periplasmático para el caso de cobre externo constante. El gráfico principal (parte superior), representa la suma de la cantidad de cobre (I) y (II); presentados en la parte inferior de la figura.

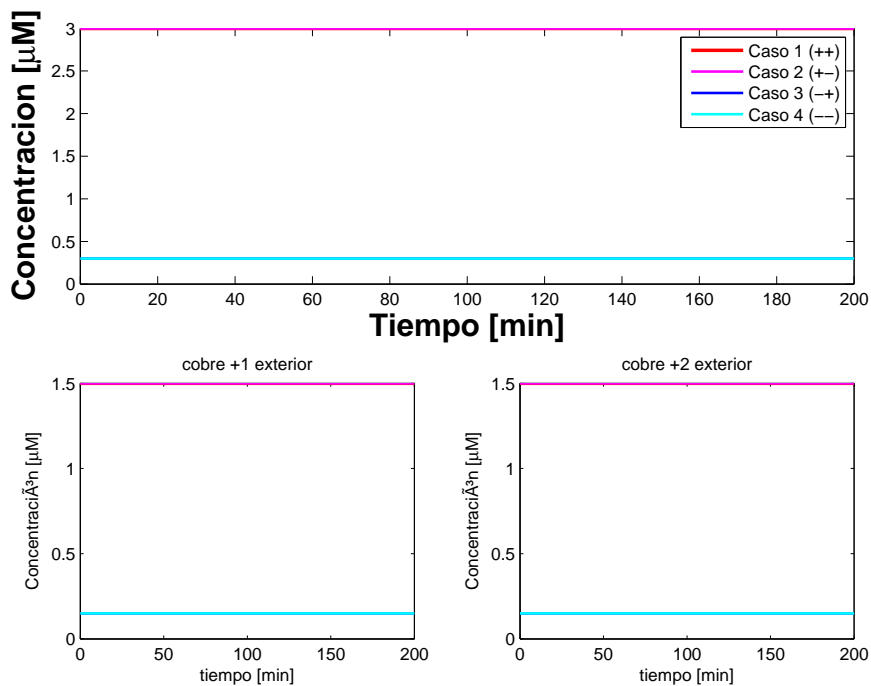


Figura E.3: Variación de la concentración de cobre extracelular para el caso de cobre externo constante. El gráfico principal (parte superior), representa la suma de la cantidad de cobre (I) y (II); presentados en la parte inferior de la figura.



# Apéndice F

## Análisis de sensibilidad de los parámetros

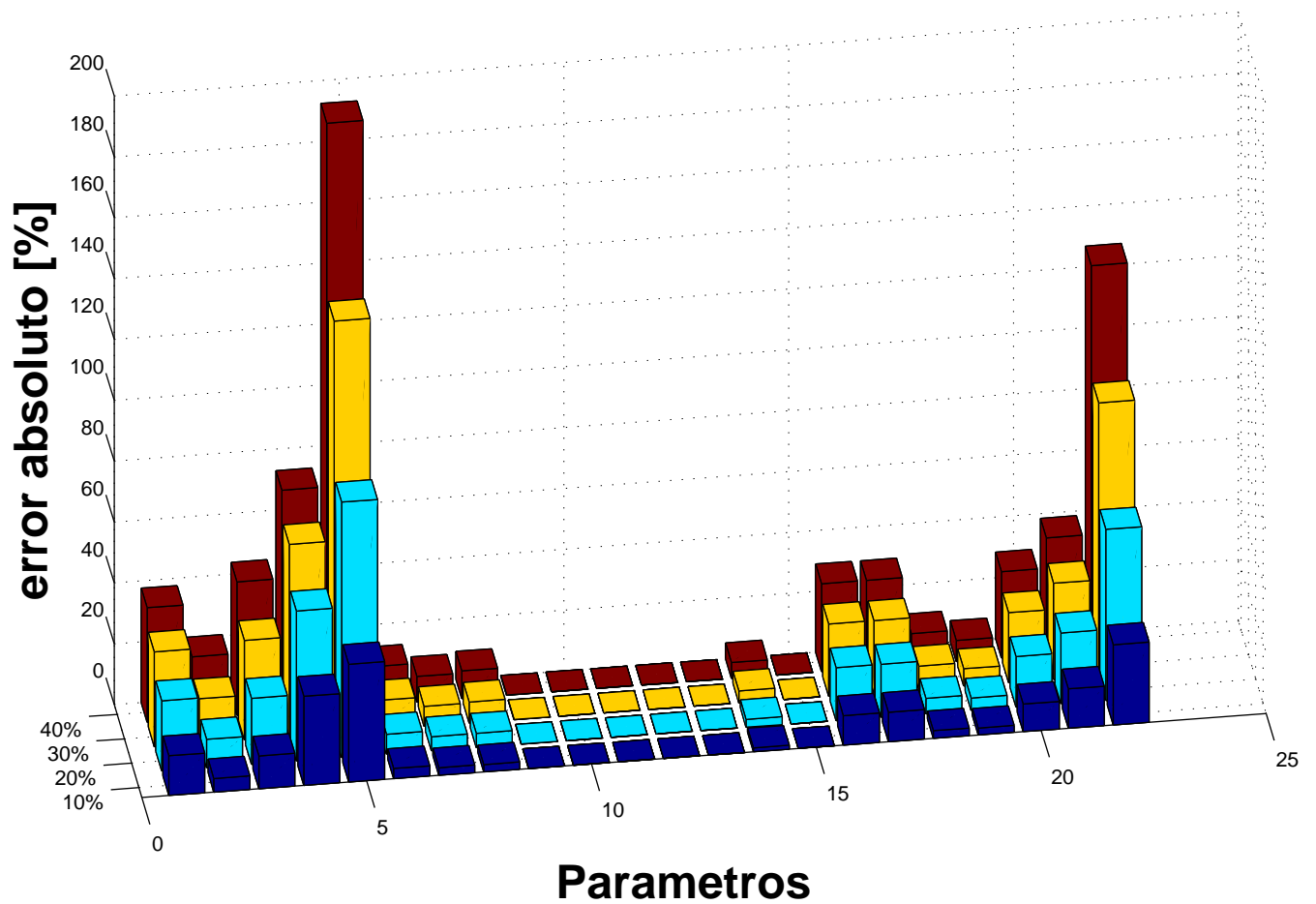


Figura F.1: Análisis de sensibilidad con variaciones positivas de los parámetros del sistema. perturbaciones del 10%, 20%, 30% y 40%. El orden los parámetros es el mismo que se presenta en la Tabla C.1.

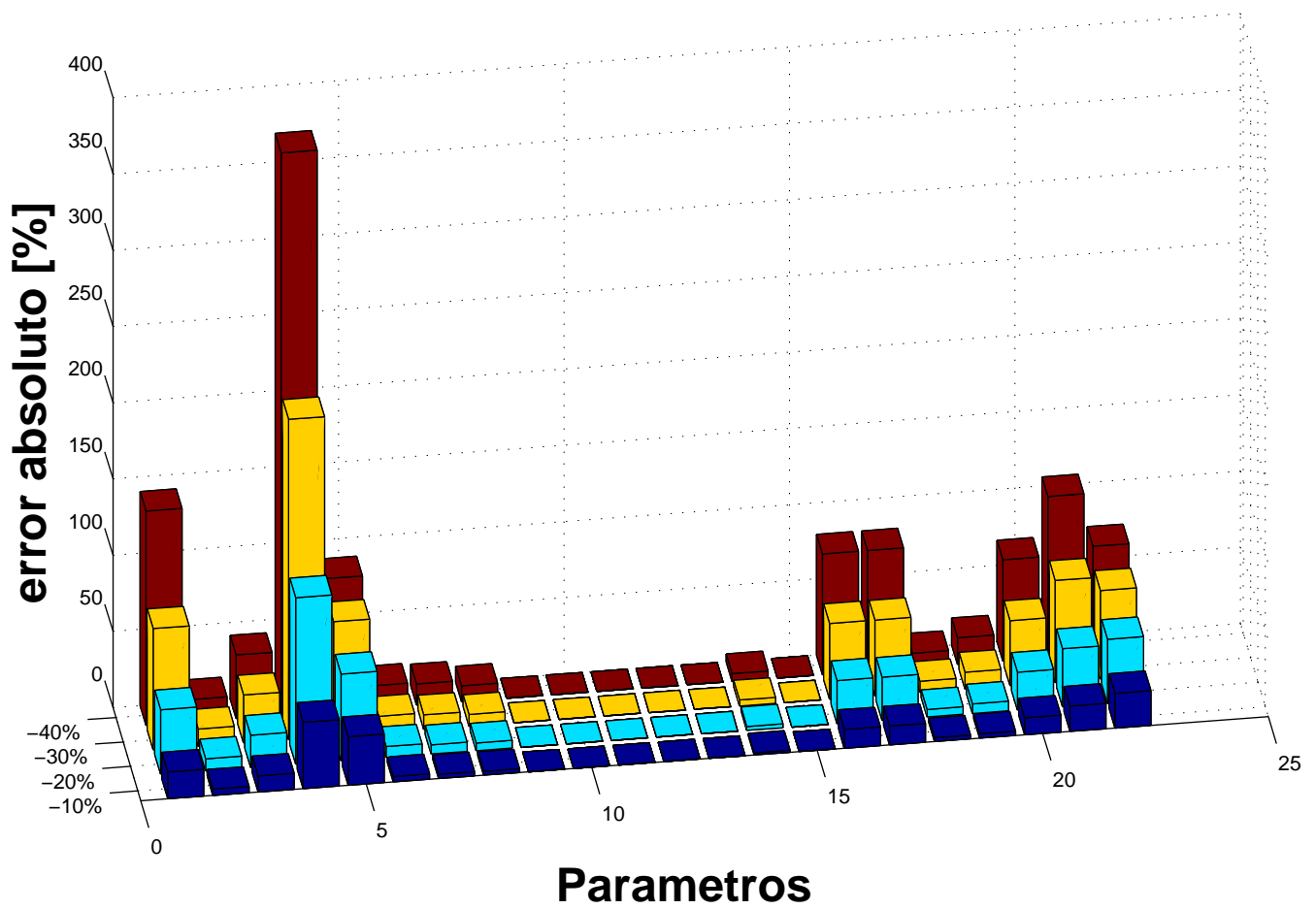


Figura F.2: análisis de sensibilidad con variaciones negativas de los parámetros del sistema. perturbaciones del -10%, -20%, -30% y -40%. El orden los parámetros es el mismo que se presenta en la Tabla C.1.

# Apéndice G

## Código del sistema de ecuaciones utilizado

A continuación se presenta el código del sistema de ecuaciones del sistema general realizado en MATLAB para el caso de cobre exterior variable. Para obtener el sistema del caso de cobre exterior constante, se debe igualar en la línea 199 del código, el valor de la variable dCu2e a cero.

```
function [dx]= sist_global (t,x,b)
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%
5 % Funcion de los mecanismos del sistema global de homeostasis de cobre que
% engloba sistema Cue, Sistema Cus y difusion del cobre por membranas.
%
% Los mecanismos se rigen por ecuaciones de primer orden parcial
% dependientes de las concentraciones.
10 %
% Las variables de entrada son:
% t: tiempo [s]
% x: vector concentraciones [uM]
% b: vector de parametros cineticos
15 %
%
% Waldo Aracena Perez
% waracena@ing.uchile.cl
%
20 % v2
%
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
25 %% variables

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%% Sistema Cue %%%%%%%%%
CopA = x(1);      % CueA total
CueO = x(2);      % CueO total
30 CueR = x(3);      % CueR
```

```

%%%%%% Sistema Cus %%%%%%%%%
% CusF - CusCBA
35 CusF1 = x(4); % CusF
CusF2 = x(5); % CusF-Cup
CusFC2 = x(6); % CusCBA-Cup-CusF
CusCBA1 = x(7); % CusCBA
CusCBA3 = x(8); % CusCBA-Cup
40 CusCBA4 = x(9); % Cup*-CusCBA

% CusS - CusR
CusS1 = x(10); % CusS
CusSR2 = x(11); % CusS-CusR
CusSR3 = x(12); % CusS-CusR*
45 CusR1 = x(13); % CusR
CusR4 = x(14); % CusR*

%%%%%% Sistema Cobre %%%%%%%%%
% Cu+ : interno; periplasma; externo
50 Culi = x(15);
Culp = x(16);
Cule = x(17);

%Cu2+ : interno; periplasma; externo
55 Cu2i = x(18);
Cu2p = x(19);
Cu2e = x(20);

60 %% Parametros cineticos

%%%%%% Sistema Cue %%%%%%%%%
% CopA
65 K1a = b(1);
Kma = b(2);
K2a = b(3);

% CueO
70 K1o = b(4);
Kmo = b(5);

% CueR
% sin parametros

75 % genes Cue (sin uso en este sistema)
gA12 = b(6);
gA21 = b(7);
gO12 = b(8);
gO21 = b(9);
80 gR12 = b(10);
gR21 = b(11);

%%%%%% Sistema Cus %%%%%%%%%
% CusF CusCBA
85 f12 = b(12);
f21 = b(13);

```

```

fc12 = b(14);
fc21 = b(15);
90 fc23 = b(16);
c34 = b(17);
c43 = b(18);
c41 = b(19);
c13 = b(20);
95 c31 = b(21);

% CusS CusR
sr12 = b(22);
sr21 = b(23);
100 sr23 = b(24);
r34 = b(25);
s31 = b(26);
r41 = b(27);

105 % genes Cus (sin uso en este sistema)
gC12 = b(28);
gC21 = b(29);
gRS12 = b(30);
gRS21 = b(31);

110 %%%%%%%%% Sistema Cobre %%%%%%%%%
P = b(32);
A = b(33);
cu_i12 = b(34);
115 cu_i21 = b(35);

%%%%%%%% Volumen %%%%%%%%%
Vc = b(36);
Vp = b(37);
120 Ve = b(38);

%% Velocidades

125 %%%%%%%%% Sistema Cue %%%%%%%%%
% CopA
vCu_CopA1 = CopA*K1a*(Culi/(Kma + Culi));
vCu_CopA2 = CopA*K2a*(Culp/(Kma + Culi));

130 % CueO
vCu_CueO1 = CueO*(K1o*(Culp/(Kmo + Culp)));

% CueR
% no hay velocidades asociadas a esta proteina para el sistema planteado
135 %%%%%%%%% Sistema Cus %%%%%%%%%
vF12 = f12*(CusF1 * Culp);
vF21 = f21*(CusF2);

140 vFC12 = fc12*(CusCBA1 * CusF2);
vFC21 = fc21*(CusFC2);
vFC23 = fc23*(CusFC2);

```

```

vC34 = c34*(CusCBA3);
vC43 = c43*(CusCBA4);
145 vC41 = c41*(CusCBA4);
vC13 = c13*(CusCBA1 * Culp);
vC31 = c31*(CusCBA3);

vSR12 = sr12*(CusS1 * CusR1);
150 vSR21 = sr21*(CusSR2);
vSR23 = sr23*(CusSR2 * Culp);
vSR31 = s31*(CusSR3);
vSR34 = r34*(CusSR3);
vSR41 = r41*(CusR4);

155 vR41 = r41*(CusR4);

%%%%%% Sistema Cobre %%%%%%%%%
% difusion
160 vCu1 = (P*A)*(Cule - Culp);
vCu2 = (P*A)*(Cu2e - Cu2p);

% equilibrio
vCui12 = cu_i12*(Cui1);
165 vCui21 = cu_i21*(Cui2);

%% Sistema de ecuaciones

%%%%%%%% Sistema Cue %%%%%%%%%
170 dCopA = 0; % CopA
dCueO = 0; % CueO
dCueR = 0; % CueR

%%%%%%%% Sistema Cus %%%%%%%%%
175 % CusF - CusCBA
dCusF1 = - vF12 + vF21 + vFC23; % CusF
dCusF2 = vF12 - vF21 - vFC12 + vFC21; % CusF-Cup
dCusFC2 = - vFC23 + vFC12 - vFC21; % CusCBA-CusF-Cup

180 dCusCBA1 = - vFC12 + vFC21 - vC13 + vC31 + vC41; % CusCBA
dCusCBA3 = vFC23 - vC34 + vC43 + vC13 - vC31; % CusCBA-Cup
dCusCBA4 = vC34 - vC43 - vC41; % CusCBA-Cup*

% CusSR
185 dCusS1 = - vSR12 + vSR21 + vSR31; % CusS
dCusSR2 = vSR12 - vSR21 - vSR23; % CusS-CusR
dCusSR3 = vSR23 - vSR31 - vSR34; % CusS-CusR*
dCusR1 = - vSR12 + vSR21 + vR41; % CusR
dCusR4 = vSR34 - vSR41; % CusR*

190 %%%%%%% Sistema Cobre %%%%%%%%%
dCui1 = - vCu_CopA1 + vCu_CopA2*(Vp/Vc) - vCui12 + vCui21;
dCulp = vCu_CopA1*(Vc/Vp) - vCu_CopA2 - vCu_CueO1 - ...
vF12 + vF21 - vC13 + vC31 + vCu1*(Ve/Vp);
195 dCule = vC41*(Vp/Ve) - vCu1;

dCu2i = vCui12 - vCui21;
dCu2p = vCu_CueO1 + vCu2*(Ve/Vp);

```

```

dCu2e = - vCu2;
200 %% vectores solucion

dCusF = [dCusF1; dCusF2; dCusFC2];
dCusCBA = [dCusCBA1; dCusCBA3; dCusCBA4];
205 dCusS = [dCusS1; dCusSR2; dCusSR3];
dCusR = [dCusR1; dCusR4];

dCu = [dCuli; dCulp; dCule; dCu2i; dCu2p; dCu2e];
210 dx = [dCopA; dCueO; dCueR; dCusF; dCusCBA; dCusS; dCusR; dCu];

```