

Anderson Basilio Beserra

Desempenho e custo da quimiotaxia através  
da modificação covalente sequencial versus  
não-sequencial

Brasil

2020





# Universidade de Brasília

Anderson Basilio Beserra

## Desempenho e custo da quimiotaxia através da modificação covalente sequencial versus não-sequencial

Estudo matemático e computacional através  
do tipo sequência da metilação

Universidade de Brasília - UNB

Programa de Pós-Graduação

Orientador: Prof. Dr. Bernardo de Assunção Mello

Brasil

2020

---

Anderson Basilio Beserra

Desempenho e custo da quimiotaxia através da modificação covalente sequencial versus não-sequencial/ Anderson Basilio Beserra. – Brasil, 2020-142 p. : il. (algumas color.) ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Bernardo de Assunção Mello

Tese (Doutorado) – Universidade de Brasília - UNB  
Programa de Pós-Graduação, 2020.

1. Descrição Teórica.
  2. Modelos Matemáticos.
  3. Método Numérico.
  4. Resultados.
  5. Considerações Finais.
- I. Prof. Dr. Bernardo de Assunção Mello.
  - II. Universidade de Brasília.
  - III. Pos-graduação de Física.
  - IV. Desempenho e custo da quimiotaxia através da modificação covalente sequencial versus não-sequencial

CDU

---

**“Desempenho e custo da quimiotaxia através da modificação covalente sequencial versus não-sequencial”**

**Por**

**Anderson Basilio Beserra**

Tese submetida ao Instituto de Física da Universidade de Brasília como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutor em Física.

Aprovado por:

Prof. Dr. Bernardo de Assunção Mello  
IF/UnB

Prof. Dr. Luiz Fernando Roncaratti Jr  
IF/UnB

Prof. Dr. Antonio Francisco Pereira de Araujo  
ICB/UnB

Prof. Dr. Diego Oliveira Nolasco da Silva  
UCB

Prof. Dr. Sebastião William da Silva  
Coordenador da Pós-graduação  
Instituto de Física



*Dedico este trabalho as pessoas que, durante essa árdua caminhada, puderam contribuir com a atenção e o respeito que precisei sentir e que assim me ajudaram a ter forças para concluir meus objetivos. Dedico a mulher que amo e aos meus filhos, que hoje podem ver o quanto a dedicação ao estudo contribui para termos uma vida plena (TAM).*





# Agradecimentos

Com o compromisso ao estudo e a dedicação que sempre foi parte de mim, agradeço a todos os envolvidos na construção deste trabalho, em especial ao meu orientador Prof. Dr. Bernardo de Assunção Mello que é o responsável por toda minha evolução.



*“O que sabemos é uma gota; o que ignoramos é um oceano”.*  
*(Isaac Newton)*



# Resumo

Muitas proteínas reguladoras importantes têm vários sítios de modificação. Na quimiotaxia bacteriana, cada quimiorreceptor possui vários sítios de metilação e a metilação/desmetilação desses sítios permitem que as células se adaptem a uma amplo fundo de concentração de ligante. No entanto, não está claro como e se a ordem de metilação/desmetilação, em diferentes sítios de metilação, afeta a adaptação. Aqui, mostramos que a adaptação perfeita ocorre apenas com a metilação/desmetilação estritamente sequencial e a precisão da adaptação diminui à medida que o número de metilação não-sequencial (aleatória) aumenta. Um compromisso (trade-off) entre precisão de adaptação e ganho de sinal é encontrado. Para o esquema de metilação não-sequencial, esse compromisso é insensível ao número de sítios de metilação e, portanto, leva a um menor ganho de sinal ou a uma baixa precisão de adaptação. Para o esquema de metilação sequencial, no entanto, esse compromisso é favorecido significativamente com um aumento no número de sítios de metilação. Nosso estudo mostra que a modificação covalente sequencial representa um mecanismo geral para alcançar uma adaptação precisa sem comprometer o ganho de resposta. Também estudamos o efeito termodinâmico dos diferentes esquemas de modificação. Descobrimos que a modificação sequencial é impulsionada por uma dissipação de energia modestamente mais alta e resulta em um tempo de adaptação mais longo. Comparações dos resultados do nosso modelo com experimentos tanto *in vitro* quanto *in vivo* mostram consistentemente que o processo de metilação na *E. coli* é quase sequencial com um componente aleatório pequeno, mas finito. São feitas previsões para testes adicionais do modelo e elucidações de possíveis mecanismos moleculares para modificação covalente sequencial em quimiorreceptores.

**Palavras-chaves:** Modificação covalente. Modificação sequencial. Compromisso (*trade-off*) ganho e precisão de adaptação. Custo energético. Comparações com experimentos. Previsões.



# Abstract

Many important regulatory proteins have multiple modification sites. In bacterial chemotaxis, each chemoreceptor has multiple methylation sites and methylation / demethylation of these sites enable the cells to adapt to a broad ligand concentration background. However, it is not clear whether and how the ordering of methylation / demethylation among different methylation sites affects adaptation. In this work, we show that perfect adaptation only occurs with strictly sequential methylation/demethylation and adaptation accuracy decreases as the degree of nonsequential (random) methylation increases. A trade-off between adaptation accuracy and signal gain is found. For the nonsequential methylation scheme, this compromise is insensitive to the number of methylation sites and thus leads to either a diminished signal gain or a low adaptation accuracy. For the sequential methylation scheme, however, this compromise is significantly favored with an increase in the number of methylation sites. Our study shows that sequential covalent modification represents a general mechanism to achieve accurate adaptation without compromising the response gain. We also study the thermodynamic effect of different modification schemes. We find that sequential modification is driven by a modestly higher energy dissipation and results in a longer adaptation time. Comparisons of our model results with both *in vitro* and *in vivo* experiments consistently show that the methylation process in *E. coli* is almost sequential with a small but finite random component. Predictions are made for further model testing and elucidation of possible molecular mechanisms for sequential covalent modification in chemoreceptors.

**Key-words:** Covalent modification. Sequential modification. Compromise between gain and adaptation accuracy (trade-off). Energy cost. Comparisons with experiments. Predictions.





# Lista de ilustrações

Figura 1.1.1-Imagem virtual da bactéria <i>E. coli</i> mostrando receptores e flagelos.[1] (com adaptações)	8
Figura 1.3.1-Comportamento do nado da <i>E. coli</i> que é dividida em corridas (run) e guinadas (tumble). A) sem estímulo; B) com estímulo [2]. . . . .	10
Figura 1.3.2-Descrição dos sítios 1, 2, 3 e 4 (Q295, E302, Q309 e E491) de um quimiorreceptor Tar da <i>E. coli</i> Tar. A) Localização dos sítios 1, 2, 3 e 4 nas hélices C-terminal, com espaçamento dos giros da hélice. Um giro da hélice conta 3.5 aminoácidos. B) Esquema de distribuição dos sítios na hélice C-terminal. Sítios 1, 2 e 3 do mesmo lado de uma hélice e sítio 4 em outra hélice. . . . .	11
Figura 1.3.3-Representação do movimento: A) das bactérias; B) e C) das células eucariontes [1]	12
Figura 1.4.1-Movimento de natação e giro das bactérias ([3], com adaptações do autor). . . . .	13
Figura 1.4.2-Esquema simplificado da interação entres os receptores, as proteínas (CheA, CheW, CheB, CheR, CheY e CheZ) e o motor flagelar (FliM) durante o processo de transdução de sinal quimiotático na Bactéria [4]. . . . .	14
Figura 1.7.1-Esquema interno da bactéria com adição e subtração dos grupos metílicos: a) receptor ativo e na ausência de nutrientes conectados, CheR adiciona e CheB retira os grupos metílicos de forma, aproximadamente, equivalente; b) com grande concentração de nutrientes, CheR metila sem a utilização de cheB; c) após adaptado Che-B retoma a retirada de grupos metílicos, a metilação se estabiliza em um número de sitios preenchidos mais alto [5] . . . . .	17
Figura 1.7.2-a) Atividade adaptada b) Atividade não adaptada [6] . . . . .	17
Figura 1.7.3-Nível de Metilação mostrando o comportamento do sistema quando substituições de glutamato (E) é feita por aspartato (D), identificando que as substituições nos sítios 1 e 4, exercem pouca eficiencia no processo da quimiotaxia [7]. . . . .	19
Figura 1.8.1-Diferença entre os modelos MWC e Ising. No modelo MWC a interação é apenas entre os receptores do mesmo grupo. No modelo de ising a interação é dada com os vizinhos mais próximos, não existe grupo [8]. . . . .	21
Figura 1.9.1-Sensibilidade da resposta em função da ocupação dos receptores ligados ao estímulo [9], com adaptação. Quando o receptor está ligado a atratores ele fica no estado inativo . . . . .	23

Figura 1.10.1	Resultado das combinações nas quais um, dois, três ou quatro resíduos de histona foram modificados para outro tipo de aminoácido (retângulo preto), mostrando a influência no nível de expressões gênicas em três tipos diferentes de genes. Na forma de estrutura (acumulativa), gene 1 e 2, sendo respectivamente as função de inibição e estimulação dos sítios, de acordo com o aumento de modificações ocorridas no processo. O gene 3 representa a modificação na forma de um código, tendo valores individuais cada local de modificação por acetilação. Retirado do trabalho de Henikoff (2005) [10], com modificação. . . . .	25
Figura 1.11.1	Esquema de metilação sequencial. . . . .	27
Figura 1.11.2	Esquema de metilação não sequencial. . . . .	27
Figura 1.11.3	Representa a capacidade quimiotática para os receptores modificados Tar, com todas as substituições possíveis de resíduos de aspartato nos sítios de metilação, incluindo os totalmente substituídos (DDDD) e os totalmente não substituídos (EEEE). A capacidade quimiotática depende do sítio metilado, sendo o sítio 3 o que tem maior influência(maior perda quando não pode ser metilado) e o sítio 4 com a menor influência (menor perda quando não pode ser metilado) [7]. . . . .	30
Figura 1.12.1	Representação do modelo sequencial. Setas escuras representam as transições preferidas e as setas cinzas as inibições. . . . .	31
Figura 1.13.1	Distribuição de metilação no estado estacionário com metilação sequencial entre os cinco estados $\in [0; 4]$ de receptores com 4 sítios metílicos. Com a concentração de ligantes dada em $\mu\text{M}$ e variando de $10^0$ a $10^5$ . A cor diferente representa a fração de receptores ativos e inativos, vagos e ocupados pelo ligante. . . . .	33
Figura 1.14.1	Comparação da sensibilidade (queda na atividade) e da adaptação entre as biomoléculas SAM (linha azul), ATP (linha vermelha) e o sistema em equilíbrio (linha preta) [11] . . . . .	35
Figura 1.14.2	Diagrama cinético representando os fluxos no sentido horário (influência termodinâmica) e anti-horário, que utilizado sozinho leva ao consumo infinito de energia. Sendo $\alpha$ , $\alpha'$ , $\beta$ e $\beta'$ as taxas de transição - $\alpha$ e $\beta$ as taxa de transição espontânea do sistema, devido o maior número de potencial químico existente, hora no estado 1, hora no estado 2. Figura retirada de Hill (2005) [12], com adaptações . . . . .	36
Figura 2.1.1	Função $\frac{[L]}{([L]+K)}$ em gráfico linear (a) e monolog (b). . . . .	43
Figura 2.8.1	Representação da diferença de energia entre dois estados. Setas pretas representam o consumo de energia proveniente da perda de grupos metílicos do estado energeticamente maior. Setas cinzas representam o consumo de energia pela adição de grupos metílicos doados pela molécula SAM, através de sua hidrólise . . . . .	55
Figura 3.0.1	Esquema simplificado da dinâmica de metilação da população de sítios metílicos. Setas cinzas claras são os fluxos de saída em $P_m$ . Setas cinzas escura são os fluxos de entrada de $P_m$ . . . . .	59

Figura 3.2.1–Taxa de metilação para adicionar e remover grupos metílicos dos receptores, obedecendo o modelo sequencial . . . . .	62
Figura 3.2.2–As curvas esboçam a atividade em função da metilação média para cada concentração de ligando $[L1] < [L2] < [L3] < [L4] < [L5]$ . Eles não foram obtidos a partir de um modelo matemático realista e são funções escolhidas para apresentar o comportamento esperado. As setas representam a dinâmica de metilação lenta descrita pela Eq. 3.7. Nas fronteiras de $m$ ( $m_0$ e $m_4$ ) observamos uma divergência da atividade adaptada devido a violações da condição 3. . . . .	65
Figura 3.2.3–Com as mesmas curvas que as da Fig. 3.2.2, um aumento súbito na concentração do ligante de $[L2]$ para $[L3]$ , provoca uma mudança rápida na atividade, representada pela seta vertical, seguida pela adaptação mais lenta, representada pela linha inclinada. . . . .	65
Figura 3.3.1–Taxas de transição do modelo de metilação não sequencial com números de sítios metílicos $M = 4$ , $\eta = 1$ na Fig. 1.11.2. A probabilidade de adicionar e remover um grupo metilo é, respectivamente, proporcional ao número de sítios vazios e ocupado. . . . .	67
Figura 3.3.2–Curvas semelhantes às da Fig. 3.2.2, agora para a metilação completamente não sequencial, que implicam na linha de atividade adaptada inclinada, a Eq. 3.18 com $k_R = k_B$ . Comparado a essa regra, as curvas $[L]$ constantes foram ajustadas para se aproximarem, visando a redução do erro de adaptação. . . . .	68
Figura 3.3.3–Um aumento súbito na concentração do ligando de $[L2]$ para $[L3]$ com as curvas da Fig. 3.3.2. Em comparação com a Fig. 3.2.3, o mesmo estímulo resulta agora em uma resposta menor, devido à proximidade das curvas $[L]$ constantes no caso presente. Além disso, os estados adaptados antes e depois do estímulo são diferentes. . . . .	69
Figura 3.4.1–Representação do fluxo de transição para a metilação e desmetilação, sendo $k^-$ e $k^+$ as taxas principais e $k_{rev}^-$ e $k_{rev}^+$ as taxas de transições contrárias. Setas vermelhas representam a energias da transição devido aos estados ativo e inativo pela ligação do ligante ao receptor. . . . .	70
Figura 3.4.2–Fluxo de transição entre os estados ativos e inativos, representando a contribuição termodinâmica nas modificações covalentes. Assumindo $\gamma = 0$ temos as taxas de transições apenas para o modelo sequencial, com o consumo infinito de energia. Com $\gamma = 1$ temos o modelo de modificação totalmente não-sequencial e o estado energético em equilíbrio. . . . .	73
Figura 3.8.1–Receptor com 2 sítios metílicos e sem a desmetilação de CheB. . . . .	79
Figura 3.8.2–Razão $p(m_1, t) / p(m_2, t)$ calculada pela Eq. 3.45-3.46 com os valores de $\eta_1$ e $\eta_2$ indicados na legenda. Os círculos pretos são os pontos mínimos. A linha tracejada preta é a proporção 0.39 encontrado na seção 6.3. . . . .	81
Figura 4.2.1–Ganho na transdução de sinal definida pela Eq. 4.1, em função da concentração do ligante, $[L]$ . As linhas tracejadas verticais são os valores de $[L]$ correspondentes a $K_0$ e $K_1$ . A unidade de $[L]$ é $\mu M$ . . . . .	89

Figura 5.2.1–Ganho em função do erro de adaptação. Os mutantes mais aptos obtidos a partir do esquema de pesquisa descrito nesta seção. Diferentes símbolos e cores são usados para cada valor de  $M$ . Símbolos sólidos e vazios representam, respectivamente, modificações sequenciais e não-sequenciais. O modelo sequencial e não-sequencial são indistinguíveis para  $M = 1$ . . . . . 97

Figura 5.3.1–Ilustração da dinâmica de resposta e adaptação para (a) processos sequenciais ( $\eta = 0$ ) e (b) e (c) aleatórios ( $\eta = 1$ ) de modificação. As linhas tracejadas mostram a dependência da atividade no  $\langle m \rangle$  para diferentes concentrações de ligantes  $[L_1] < [L_2] < [L_3] < [L_4] < [L_5]$ . As linhas contínuas mostram a atividade adaptada  $\langle a \rangle^{adapt}$  em função do  $\langle m \rangle$ . Com um aumento repentino de  $[L]$ , por exemplo, de  $[L]_1$  para  $[L]^2$ , o sistema responde rapidamente diminuindo sua atividade (seta vertical) do antigo estado adaptado para o estado máximo de resposta sem alterar o  $\langle m \rangle$ . Essa resposta inicial é seguida pela dinâmica de adaptação lenta (seta para cima) ao longo da linha pontilhada até que o novo estado adaptado seja alcançado. (a) A metilação sequencial leva à atividade adaptada aproximadamente horizontal. (b) A metilação não-sequencial produz a forte inclinação da linha de atividade adaptada, resultando em um grande erro de adaptação. (c) O erro de adaptação pode ser reduzido se as curvas de  $[L]$  estiverem mais próximas umas das outras, mas também faz com que reduza a resposta ao estímulo. O processo de modificação sequencial leva a uma precisão de adaptação muito maior do que o processo de modificação aleatória. . . . . 98

Figura 5.3.2–a) Simulação do aumento da concentração de ligantes  $[L]$ , sendo demonstrado pelo seu aumento de  $10^{-1}$  a  $10^4$  tendo os espaços onde ocorre a adaptação da atividade logo após as mudanças da concentração. b) Comportamento da atividade no modelo sequencial  $\eta = 0$ , sendo claramente com erro de adaptação baixo. c) comportamento da atividade para o modelo não sequencial  $\eta = 1$ , com a atividade apresentado o erro de adaptação capaz de fazer que a cada aumento da concentração de ligantes tenhamos um valor de atividade diferente. Todos os gráficos são em função do tempo. . . . . 99

Figura 5.3.3–A dependência da precisão de adaptação  $\zeta^{-1}$  e do ganho  $\Gamma$  com o parâmetro de energia de metilação  $|\alpha|$  para os casos de metilação sequencial ( $\eta = 0$ ), símbolos azuis, e metilação aleatória ( $\eta = 1$ ), símbolos vermelhos. (a) Precisão de adaptação versus  $|\alpha|$ . (b) Ganho de resposta versus  $|\alpha|$ . As curvas são guias para as equações 5.1 e 5.2. . . . . 102

Figura 5.4.1–Mutantes com melhor desempenho são selecionados a partir da Fig. 5.5.1a, da seção 5.5 e seus valores de  $\zeta^{-1}$ ,  $\Gamma$  e a amplitude de  $m$  são traçados como função de  $\alpha$ . 103

Figura 5.4.2—O compromisso entre a precisão de adaptação ( $\zeta^{-1}$ ) e o ganho de resposta ( $\Gamma$ ). (a) A medida que aumentamos $\eta$ , a precisão de adaptação $\zeta^{-1}$ diminui enquanto o ganho de sinalização $\Gamma$ permanece mais ou menos constante. (b) Quando sintonizamos parâmetros para manter a precisão $\zeta^{-1}$ aproximadamente constante para diferentes valores de $\eta$ , o ganho correspondente $\Gamma$ diminui com $\eta$ . Usamos $[L]_{min} = 1$ mM e $[L]_{max} = 100$ mM aqui. . . . .	104
Figura 5.5.1—O ganho de resposta $\Gamma$ versus a precisão de adaptação $\zeta^{-1}$ para diferentes parâmetros em modelos de metilação (a) sequencial ( $\eta = 0$ ) e (b) não-sequencial ( $\eta = 1$ ). Cada símbolo corresponde a uma escolha diferente de parâmetros ( $m_0, \alpha, M$ ) com cores correspondente para aos seus valores $M = 1$ (azul), 2 (roxo), 3 (amarelo), 4 (azul claro). Para cada valor de $M$ , os pontos de melhor desempenho foram ajustados com as expressões mostradas nas Eqs.( 5.3, 5.4), e os valores ajustados dos parâmetros globais de desempenho $C_0$ e $C_1$ para diferentes valores de $M$ foram plotados nas inserções dentro dos gráficos. O losango preto é obtido a partir de resultados experimentais para o receptor de Tar em resposta ao MeAsp, conforme descrito na seção 6.1. . . . .	106
Figura 5.6.1—Nível médio de $m$ dos mutantes mais aptos. A média foi tomada sobre os níveis médios $m$ do estado estacionário em cada valor de $[L_i]$ . Os símbolos são os mesmos da Fig. 5.2.1. . . . .	107
Figura 5.7.1—Distribuição dos estados metílicos para os modelos sequencial, $\eta = 0$ , e aleatório, $0 < \eta \leq 1$ , sendo (a) $\eta = 0$ , (b) $\eta = 0.25$ , (c) $\eta = 0.50$ , (d) $\eta = 0.25$ e (e) $\eta = 1$ . As faixas coloridas são as populações de cada estado da Fig.1.11.2, empilhado na mesma ordem. O eixo horizontal é o nível de metilação. . . . .	109
Figura 5.8.1—Descrição das frequência de receptores preenchidos pelo modelo aleatório $f_{rand}$ , sendo diretamente ligado ao valor de $\gamma$ . O valores maiores de $\gamma$ trás a aleatoriedade ao sistema sistema mesmo com $\eta = 0$ . . . . .	111
Figura 5.9.1—Efeito observado com o aumento de $\gamma$ e $\eta$ . a) comportamento da entropia e da resposta de energia a cada aumento de $\gamma$ e $\eta$ . b) relação entre ganho e $\Delta m_{adapt}$ , mudança de nível adaptado $m$ , quando temos uma combinação de $\gamma$ e $\eta$ . Procuramos os parâmetros que fornecem o maior ganho $\Gamma$ com o erro de adaptação limitado a $\zeta < 0,2$ . . . . .	113
Figura 5.10.1—Comparação entre precisão e o tempo de adaptação, com $0 < \eta < 1$ , com $\gamma = 0.01$ . Com exceção de $\eta$ todos os parâmetros foram mantidos contantes. . . . .	115
Figura 5.10.2—Comparação entre o tempo de adaptação $\tau_{adapt}$ para a modificação sequencial $\eta = 0$ e não-sequencial $\eta = 1$ . . . . .	115

Figura 6.0.1	Ilustração e notação para o receptor Tar com os principais resíduos marcados. O estado de metilação do sítio $n$ ( $= 1, 2, 3, 4$ ) é descrito por uma variável binária $m_n$ (1-metilada; 0 – não metilada). Os processos sequenciais de metilação e desmetilação entre os sítios 1 – 2 – 3 são mostrados pelas setas vermelhas. Os dois sítios potencializadores (316 e 288) são descritos por dois números binários $h_{3f}$ e $h_{1r}$ , que controlam a inicialização dos processos sequenciais de metilação e desmetilação: $h_{3f} = 1$ promove a metilação do sítio 3; $h_{1r}$ promove a desmetilação do sítio 1. . . . .	117
Figura 6.1.1	Gráfico que simula o experimento feito por Sourjik e Berg [13] mostrando a dependência da sensibilidade de resposta nas mudanças da concentração para Tar, no qual foi usado para estimar o valor de $\Gamma$ . . . . .	119
Figura 6.1.2	Gráfico retirado de Neumann et al. [14] de onde se consegue a aproximação experimental da precisão da adaptação $\zeta^{-1} \approx 2.3 - 3.5$ . . . . .	119
Figura 6.1.3	O mesmo que na Fig. 5.4.2a, com $\zeta^{-1}$ calculado usando $[L]_{max} = 5$ mM, o maior valor experimental confiável disponível para MeAsp em [14]. . . . .	119
Figura 6.2.1	Dinâmica de metilação prevista em resposta a um nível de saturação de atratividade para três diferentes mutantes $CheB^-$ listados na Tabela 5: (a) $0(1)xxx(0)$ ; (b) $0(1)1xx(0)$ ; (c) $0(1)0xx(0)$ . As probabilidades de serem metiladas em cada sítio de metilação são mostradas em diferentes tempos $t$ . Os parâmetros utilizados são $\eta = 0.1$ e $k^- = 0$ . . . . .	121
Figura 6.3.1	Valores mínimos da relação $p(m_1, t)/p(m_2, t)$ em função de $\eta_1$ para as razões de $\eta_2/\eta_1$ mostradas na legenda. O losango preto é o ponto $\eta_1 = 0,023$ e a relação de $p(m_1, t)/p(m_2, t) = 0,39$ . Os números 1 e 2 usados aqui são inversos dos que estão nos receptores Tar. . . . .	124
Figura 7.1.1	As distribuições do nível de metilação do estado estacionário previsto do receptor Tar para quatro mutantes diferentes em que os sítios potencializadores ( $h_{3f}$ e $h_{1r}$ ) são diferentes: (a) $0(1)xxx(0)$ ; (b) $0(0)xxx(0)$ ; (c) $0(1)xxx(1)$ ; (d) $0(0)xxx(1)$ . Os parâmetros usados foram $\eta = 0.1$ e $[L] = 100$ mM. . . . .	126
Figura 7.2.1	Simulação com $\eta = 0.1$ e o resíduo dos sítios indicam o mutante de cada gráfico, a mesma ordem da Fig. 6.0.1. . . . .	127
Figura 7.3.1	Atividades adaptadas e tempos de adaptação de diferentes tipos de mutantes definidos nas legendas. (a) Mutantes com $m_1 = 0$ fixo (barras laranja) ou fixo $m_3 = 0$ (barras verdes) em comparação com o receptor do tipo selvagem (barras azuis), com ambos os locais modificáveis. (b) Mutantes com $m_1 = 1$ fixo (barras púrpuras) ou $m_3 = 1$ (barras laranjas) em comparação com o receptor do tipo selvagem (barras azuis) igual ao de (a). As atividades adaptadas foram apresentadas para três concentrações $[L] = 10^0, 10^2, 10^3 \mu M$ . O $\tau_{up}^{max}$ e $\tau_{down}^{max}$ são os tempos máximos de adaptação para os passos up e down, respectivamente. . . . .	128
Figura 7.3.2	Efeito no tempo de adaptação substituindo os sítios $m_3$ e $m_1$ por permanentemente metilado e permanentemente desmetilado (0,1). . . . .	130

# Lista de tabelas

Tabela 1	– Tipos de modificações covalentes. Retirado de Berg (2002) [15], com adaptações . . .	24
Tabela 2	– Tipo de variáveis para cada receptor da <i>E. coli</i> utilizado neste trabalho . . . . .	46
Tabela 3	– Variáveis que descrevem o fluxo contrário ao principal, obedecendo o efeito termodinâmico. . . . .	70
Tabela 4	– Valores de $\gamma$ para os três tipo de sistema de consumo de energia (modelo ideal, equilíbrio e fora do equilíbrio) . . . . .	73
Tabela 5	– Taxa de metilação normalizada reproduzida de [16]. As quatro letras na primeira coluna são os resíduos, respectivamente, nos locais de metilação 1,2,3 e 4. A segunda coluna é a configuração utilizada para a simulação correspondente, com $m_4 = 0$ para simular a baixa taxa de metilação do sítio 4, mostrado no experimento [17]. . . . .	121





# Sumário

	Introdução . . . . .	1
I	<b>DESCRIÇÃO TEÓRICA</b>	<b>5</b>
1	INTRODUÇÃO CONCEITUAL . . . . .	7
1.1	<i>Escherichia coli</i> ( <i>E. coli</i> ) . . . . .	7
1.2	Quimiotaxia . . . . .	8
1.3	Quimiotaxia bacteriana . . . . .	9
1.4	Estrutura da quimiotaxia bacteriana . . . . .	12
1.5	Memória temporal . . . . .	14
1.6	Descrição da rota metabólica da quimiotaxia . . . . .	15
1.7	Adaptação e robustez . . . . .	16
1.8	Cooperatividade dos receptores . . . . .	19
1.9	Sensibilidade e adaptação perfeita . . . . .	22
1.10	Modificação covalente . . . . .	23
1.11	Importância da metilação . . . . .	26
1.12	Estrutura da metilação e desmetilação sequencial . . . . .	30
1.13	Condições para uma adaptação perfeita . . . . .	31
1.14	Contribuição da termodinâmica para quimiotaxia . . . . .	34
1.15	Erro de adaptação( $\zeta$ ) e Ganho de resposta ( $\Gamma$ ) . . . . .	37
II	<b>MODELOS MATEMÁTICOS</b>	<b>39</b>
2	SUORTE AO MODELO MATEMÁTICO . . . . .	41
2.1	Associação de moléculas . . . . .	41
2.2	Cooperatividades dos receptores - Modelo matemático . . . . .	43
2.3	Formulação e estrutura do modelo matemático . . . . .	45
2.4	Influência de $\alpha$ na energia do receptor . . . . .	49
2.5	Razão entre probabilidade - Modelo sequencial e não-sequencial (variável " $\eta$ ") . . . . .	50
2.6	A atividade do receptor depende de modificações acumulativas (totais) . . . . .	51
2.7	Mecanismo de retroalimentação integral para uma adaptação per- feita . . . . .	53
2.8	Consumo energético para um sistema quimiotático fechado . . . . .	54

2.9	Processo de Markov de tempo contínuo . . . . .	56
3	<b>MODELO MATEMÁTICO DA DINÂMICA DE METILAÇÃO E EFEITO TERMODINÂMICO . . . . .</b>	<b>59</b>
3.1	Dinâmica de metilação do receptor: modificação sequencial versus não-sequencial . . . . .	60
3.2	Modelo Matemático Metilação Sequencial . . . . .	62
3.2.1	Erro de adaptação . . . . .	63
3.2.2	Adaptação com metilação sequencial . . . . .	64
3.3	Modelo Matemático e dinâmica da metilação não-sequencial . . .	66
3.4	Efeito termodinâmico . . . . .	70
3.5	Fluxo termodinâmico . . . . .	74
3.6	Erro de adaptação “ $\zeta$ ” e Sensibilidade “ $\Gamma$ ”- Modelo matemático .	75
3.7	Tempo de relaxamento . . . . .	76
3.8	Mutante com CheB deletado . . . . .	79
<b>III</b>	<b>MÉTODOS NUMÉRICOS . . . . .</b>	<b>83</b>
4	<b>MÉTODOS NUMÉRICOS . . . . .</b>	<b>85</b>
4.1	Método Monte Carlo . . . . .	85
4.2	Metodologia . . . . .	86
4.2.1	Etapas da simulação Monte Carlo . . . . .	87
4.2.2	Erro de adaptação e sensibilidade . . . . .	88
<b>IV</b>	<b>RESULTADOS . . . . .</b>	<b>91</b>
5	<b>SIMULAÇÕES: RESULTADOS E ANÁLISES . . . . .</b>	<b>93</b>
5.1	Comportamento da atividade no modelo sequencial e modelo não-sequencial . . . . .	93
5.2	Mutantes mais aptos . . . . .	95
5.3	A metilação sequencial é necessária para a adaptação . . . . .	97
5.4	Um compromisso entre sensibilidade (Ganho de resposta) e erro de adaptação (precisão) . . . . .	102
5.5	A modificação sequencial melhora significativamente o desempenho com mais sítios de metilação . . . . .	105
5.6	Para um erro de adaptação fixo, aumentar o número de sítios metílicos $m$ , aumenta o ganho de resposta . . . . .	106
5.7	Efeito de $\eta$ na distribuição dos estados . . . . .	108
5.8	Efeito de $\gamma$ na distribuição dos estados . . . . .	110

5.9	Energia e Ganho . . . . .	112
5.10	Custo energético devido a sequencialidade da metilação . . . . .	114
6	COMPARAÇÃO COM EXPERIMENTOS . . . . .	117
6.1	Precisão da adaptação e ganho . . . . .	118
6.2	Perfil de metilação . . . . .	120
6.3	Valor do parâmetro $\eta$ nos mutantes <i>CheB</i> <sup>-</sup> . . . . .	122
7	PREVISÕES PARA RESULTADOS EXPERIMENTAIS . . . . .	125
7.1	Perfil de metilação do receptor adaptável . . . . .	125
7.2	Influência dos sítios potencializadores no tempo de adaptação . . . . .	126
7.3	Atividade adaptada e tempo de adaptação . . . . .	128
V	CONSIDERAÇÕES FINAIS . . . . .	131
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS . . . . .	133
	REFERÊNCIAS . . . . .	137



# Introdução

Os micro-organismos sempre estiveram presente em grande parte dos estudos mais desenvolvidos da ciência, seja na química, na biologia ou na física. Diante de milhares possibilidades de estudos, alguns tiveram papéis bem relevantes. A Química, por exemplo, busca descobertas quanto à forma da estrutura de associação/dissociação, que caracteriza cada sistema como único. Na Física, nos processos simples ou complexos, desenvolvido através da dinâmica de movimentos, se retira informações sobre seu comportamento e influência para o seu desenvolvimento. Nesse contexto, são importantes os estudos que visam solucionar os questionamentos que ainda não tem uma explicação quantitativa, como é o caso de algumas dinâmicas que estão envolvidas no processo de quimiotaxia das Bactérias.

O deslocamento dos seres vivos em direção a um ambiente mais favorável e a fuga de ambiente desfavoráveis é um fenômeno que pode ser visto em vários tipos de seres vivos. Como exemplo, podemos citar os seres humanos e os animais irracionais. Diretamente ligada a isso, está a quimiotaxia que é um fenômeno físico em que as células bacterianas têm a propriedade de sentir o ambiente químico e orientar os seus movimentos em direção aos atraentes e se afastar dos repelentes. Sendo este um dos sistemas de transdução de sinais mais bem estudados na Biologia [8].

Com o desenvolvimento da ciência e conseqüentemente da microscopia, os movimentos das bactérias começaram a ser identificados e despertaram o interesse dos pesquisadores. Assim, com essa característica de buscar nutrientes e se afastar de ambientes hostis, surge a necessidade de entender os mecanismos físicos envolvidos nesse processo.

Inúmeros estudos já foram feitos com o intuito de descrever mais objetivamente o funcionamento da quimiotaxia das bactérias, tais como: a forma de agrupamentos dos receptores; se eles trabalham de forma individual; a maneira como são identificados os nutrientes (ligantes) e o funcionamento da sensibilidade dos receptores. No entanto, alguns estudos ainda tem muitos passos a serem dados, como é o caso do processo de metilação (adição e remoção de grupos metílicos) dos receptores, que pode ser classificada em metilação sequencial e não-sequencial (modificações covalentes). Essa

modificação dos multi-sítios dos receptores podem ser divididos em três estágios. O primeiro é o mecanismo de entrada (input), momento em que se sente a mudança na concentração de ligantes no ambiente. O segundo é a alteração do estado interno do sistema, como resposta à entrada. Uma maneira de armazenar esse estado interno é pela modificação covalente dos receptores celulares, mais especificamente a metilação nos sítios metílicos dos receptores, *m*-estados, em cada instante. O terceiro é o resultado (output), ou seja, a resposta do receptor aos dois processos descritos anteriormente, como uma combinação do input com o estado da metilação na geração do output na atividade do receptor. A interação dos receptores pode ser cumulativas, opostas ou alternativas.

A atividade da quinase do receptor é controlada pelo nível total de metilação do receptor. A adaptação na quimiotaxia bacteriana é realizada por um mecanismo de retroalimentação no qual a metilação e a desmetilação dos receptores são moduladas por duas proteínas a metiltransferase CheR e a metilesterase CheB, respectivamente, dependendo da atividade do receptor em si.

Apesar do consenso geral sobre a importância de um mecanismo de "retroalimentação" negativa para uma adaptação precisa na quimiotaxia bacteriana, os detalhes da dinâmica de metilação/desmetilação do receptor permanecem pouco compreendidos.

Muito já se sabe da forma como são adicionados e removidos os grupos metílicos nos sítios dos receptores, no entanto, algumas dúvidas ainda se sobressaem nos estudos, quando o questionamento se refere à importância e à forma de sequência que a metilação deve ser efetuada. Somando a isso, temos a importância da sequencialidade da metilação no desenvolvimento da bactéria; a descrição da dinâmica de metilação, tanto sequencial como não-sequencial e a comprovação matematicamente da necessidade de condições para se obter a adaptação perfeita da atividade.

A adaptação perfeita é fundamental para a bactéria, tendo em vista que o crescimento de colônias está diretamente relacionado com a atividade dos receptores transmembranares, como demonstram resultados obtidos, quando se analisa o comportamento da bactéria envolvida por uma concentração de estímulos. É a adaptação perfeita que permite a bactéria responder a novas concentrações de estímulo, levando assim, ao seu desenvolvimento.

Neste trabalho, quantidades numéricas que representam as alterações nos re-

---

ceptores são utilizados em simulações Monte Carlo. Através de uma varredura nos parâmetros de cálculos, podemos fazer a análise do comportamento da metilação sequencial e não-sequencial. Em ambos os casos é possível avaliar a adaptação e o ganho de resposta através de dois parâmetros que quantificam características importantes para este estudo, a sensibilidade ( $\Gamma$ ) e o erro de adaptação ( $\zeta$ ). Consideramos um bom comportamento aquele que apresenta uma sensibilidade alta e um pequeno erro de adaptação.

Com a análise dos modelos de sequencialidade pudemos ter algumas conclusões importantes, tais como: ganho de resposta muito maior na metilação sequencial; existência de uma contraposição entre o ganho de resposta/adaptação e ganho com o incremento no número de sítios metílicos, observado na adaptação sequencial, mas não na adaptação não-sequencial. Dessa forma, a tradução dos resultados obtidos neste estudo, com os parâmetros utilizados, torna possível a comparação com os experimentos feitos anteriormente.

Inserimos também energias envolvidas no processo de quimiotaxia. O consumo de energia é um fator essencial para as bactérias e é através dele que ocorre o desenvolvimento estrutural de seu desenvolvimento natural. Descrever as limitações atreladas a este processo, advindas da segunda lei da termodinâmica, demonstra a necessidade de taxas de transições em sentidos opostos, para que se possa evitar o consumo de energia infinito do entendimento do modelo de metilação sequencial.

Um mecanismo biológico que não é encontrado em quimiotaxia, mas que também é baseado na modificação covalente é o comutador. O mecanismo de comutação refere-se a um comportamento em que a modificação de sítios altera abruptamente a saída de um estado para outro em um determinado nível de  $m$ . A saída, aproximadamente binária do mecanismo de comutação, é controlada por uma entrada contínua. Resultados experimentais apontam para o uso de modificação multi-sítios para implementar o comportamento de comutação, seja para estabelecer transições que dependem da concentração de um controlador ou de um intervalo de tempo [18].

A inclinação da mudança na saída, como uma função da entrada, é frequentemente descrita pelo coeficiente de Hill. Os altos coeficientes de Hill indicam transições mais acentuadas e um comportamento maior do tipo de comutador. Estudos teóricos do mecanismo de modificação demonstraram que múltiplos sítios de modificação podem

incentivar a precisão do comportamento do comutador [19]-[20].

Na parte I tratamos da descrição qualitativa, descrevendo os conceitos importantes relacionados a quimiotaxia, como por exemplo, adaptação, robustez, metilação e desmetilação de múltiplos sítios, no entanto, também descrevemos conceitos necessários e poucos explorados ajudando a introduzir novos conceitos como, por exemplo, ganho de resposta ( $\Gamma$ ) e precisão de adaptação ( $\zeta^{-1}$ ). Como suporte a estes assuntos, foram preciso introduzir assuntos, de certa forma, pouco explorados atualmente na quimiotaxia, como a necessidades de existência de taxas de transições em sentido contrário ao sentido principal, durante o processo de metilação/desmetilação, e o custo energético que existe no processo de quimiotaxia.

Na parte II apresentamos as ferramentas matemáticas necessárias para os assuntos tratados na parte I divididas em dois capítulos. O capítulo 2 serve de suporte descrevendo as equações que amparam os conceitos. O capítulo 3, a partir das equações de suporte, formula matematicamente os conceitos básicos de adaptação, assim como os novos conceitos pretendidos para este trabalho, como o efeito termodinâmico.

A parte III detalhamos a metodologia utilizada neste trabalho, descrevendo a simulação e os passos que executados para obter os dados necessário, no qual, é utilizado na construção dos gráficos, incluindo  $\Gamma$  e  $\zeta$ .

A parte IV apresenta os resultados das simulações. No capítulo, analisamos os dados fornecidos pela simulação. Trabalhamos aqui com o comportamento da atividade para os modelos de metilação sequencial e não-sequencial, envolvendo o ganho de resposta e adaptação, o nível de sequencialidade  $\eta$  e a variável termodinâmica  $\gamma$ . No capítulo 6 é feita comparações com experimentos anteriores e, no capítulo 7, apresenta as previsões para experimentos futuros.

A parte V apresenta as considerações finais do trabalho.



Parte I

Descrição Teórica



# 1 Introdução Conceitual

Esta Introdução mostra a estrutura conceitual utilizada neste trabalho e serve de suporte para o entendimento da parte matemática desenvolvida no próximo capítulo "Modelos Matemáticos".

Neste sentido, descreveremos os conceitos básicos da bactéria *Escherichia coli*, onde mencionamos suas características e importâncias para o ser humano, sob o aspecto do seu formato estrutural. Descrevemos também os conceitos de: quimiotaxia geral; rota metabólica; adaptação, robustez, cooperatividade e sensibilidade; modificação covalente; sequencialidade da metilação; memória temporal, contribuição da termodinâmica e erro de adaptação e ganho de resposta.

## 1.1 *Escherichia coli* (*E. coli*)

A *Escherichia coli* (*E.coli*) é uma enterobactéria, um organismo unicelular que tem como principal ambiente o intestino das pessoas e animais. Existem diversas cepas da *E. coli*, sendo algumas responsáveis por causar doenças, no entanto, a grande maioria é inofensiva, fazendo parte importante do trato intestinal do ser humano saudável [21]. Outra função da *E. coli* é desenvolver proteção contra outras enterobactérias [22]. A sua presença em ambientes também serve como indicadores de falta de saneamento básico do local, tendo em vista, que a sua liberação ao meio ambiente pode ser oriunda de deposição de materiais fecais [23].

Grande parte dos estudos feitos leva em conta o seu caráter mais simples referente às suas características. Devido a sua simplicidade e detalhado conhecimento científico, podemos afirmar que a *E. coli* está para a Biologia, assim como o átomo de hidrogênio está para a Física, onde, conhecer seu comportamento mais profundamente, abrirá portas para entender melhor o comportamento de outras bactérias.

Conforme mostrado na Fig. 1.1.1, a parte externa da *E. coli* é composta por flagelos que são responsáveis por seu movimento e por receptores celulares que tem o papel de se comunicar com nutrientes presente no ambiente e que são partes muito importantes para o desenvolvimento do estudo da quimiotaxia.



Figura 1.1.1 – Imagem virtual da bactéria *E. coli* mostrando receptores e flagelos.[1] (com adaptações)

## 1.2 Quimiotaxia

A quimiotaxia está diretamente ligada à evolução das bactérias. Neste contexto, podemos dizer que parte fundamental da evolução dos seres vivos está, mesmo que longinquamente, ligada à quimiotaxia das bactérias.

Diversos processos comportamentais dos seres vivos podem ser atribuídos à quimiotaxia. São exemplos da quimiotaxia: o direcionamento dos espermatozoides para o óvulo; o combate a inflamação pelo direcionamento das células brancas diretamente ao foco do problema e a busca dos microrganismos por alimentos [24].

A quimiotaxia é um movimento inerente a alguns seres vivos, que envolve um processo químico e que visa buscar o melhor lugar para a sobrevivência (atraentes químicos), ou se afastar de locais prejudiciais (repelentes químicos). São exemplos de seres com esse comportamento: os organismos unicelulares, na busca por nutriente e os insetos em sua necessidade de se agruparem em bandos, visando encontrar condições mais favoráveis para a propagação da espécie.

Uma forma de caracterizar a quimiotaxia é através do direcionamento dos seus movimentos, por um estímulo químico em organismos que possui ou não sistema nervoso central. Dizemos que a quimiotaxia é positiva, quando ela se aproxima de alguma fonte de nutrientes e chamamos de quimiotaxia negativa, quando ela se afasta de algum tipo de repelente.

Como vimos, a quimiotaxia exerce um papel importante nos mecanismos biológicos, sendo, de certa forma, o mesmo processo para espécies diferente. No entanto, mesmo após todas as características e evidências da influência da quimiotaxia sobre os seres vivos, o termo “quimiotaxia” é mais conhecido quando relacionado com os movimentos das células.

### 1.3 Quimiotaxia bacteriana

Descoberto por W. Engelmann e W. Pfeffer em 1880, a quimiotaxia bacteriana consta com um amplo estudo já bem estruturado. Grande parte dos estudos mais completos começaram em meados da década de 60, onde a parte quantitativa, genética e bioquímica foi mais investigada por J. Adler [2]. Definido como o subsistema biológico mais bem conhecido, a quimiotaxia se tornou alvo para grandes estudos envolvendo simulações computacionais [25], envolvendo Biologia, Química e Física. Para a Física, os estudos são mais voltados para cinética dos movimentos e as reações que podem ser causadas por eles.

Por ter um tamanho pequeno e ser um microrganismo relativamente simples, as bactérias possuem pouca capacidade de se ajustarem ao ambiente em que se encontram. Contudo, mesmo com essa limitação, a forma de locomoção das bactérias permite a elas percorrerem grandes percursos durante seu ciclo de vida e estar presente em diversos ambientes [2]. No entanto, mesmo considerando a grande amplitude de deslocamento, as bactérias são incapazes de escolher a direção que devem tomar. O comportamento das bactérias consiste em alterar a duração dos movimentos, quando se aproximam de um atrator químico (nutriente), resultando em um nado mais longo em linha reta, i.e., uma pequena frequência de mudança de direção. Contrariamente, se elas se aproximam de algum repelente químico, ou se afastam do atrator, elas tendem a aumentar a frequência de mudança de direção, buscando assim, uma nova rota para nadar, Fig. 1.3.1. Já se sabe que esta característica está ligada a um sensoriamento temporal [24], que será discutido na seção 1.5.

Os responsáveis por identificarem os tipos de atraente ou repelentes são os quimiorreceptores, também chamados de proteínas receptoras de grupos metílicos [26], ou “MCP’s” - Methyl-accepting Chemotaxis Proteins. É através dos MCP’s que as proteínas específicas de cada receptor são reconhecidas. Outros estímulos podem

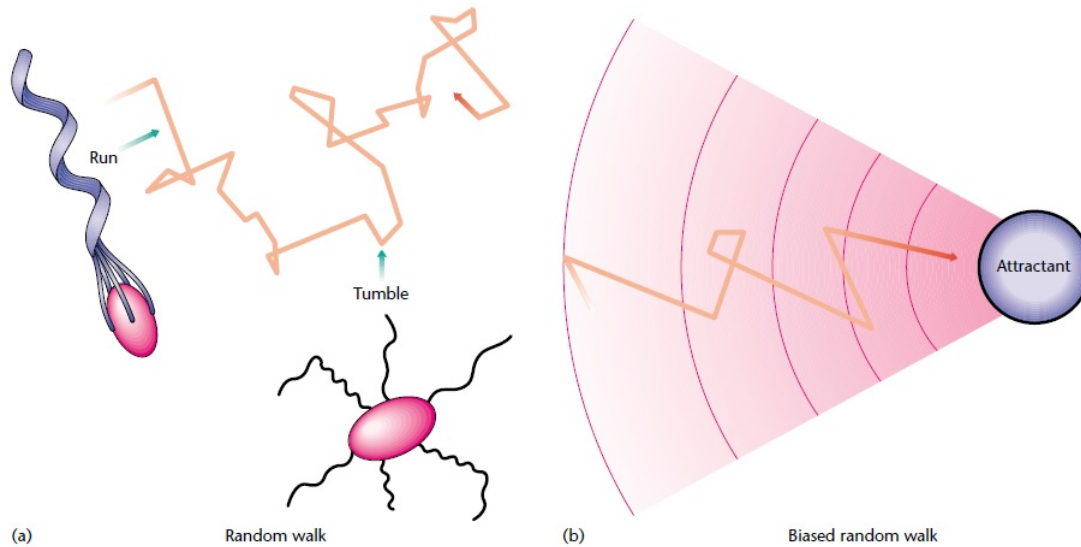


Figura 1.3.1 – Comportamento do nado da *E. coli* que é dividida em corridas (run) e guinadas (tumble). A) sem estímulo; B) com estímulo [2].

fazer um caminho maior, tendo que passar antes por um receptor principal, para apenas depois se ligarem ao receptor específico [24]. Para o nosso trabalho os MCP's são referenciados apenas como receptores.

Saber que a importância da quimiotaxia bacteriana está diretamente ligada à forma como é feita a busca por nutrientes e fuga de áreas prejudiciais pode ajudar a entender o mecanismo interno das bactérias. A detecção de áreas positivas e negativas para bactérias é realizada pelos receptores que possuem segmentos internos, responsáveis pela transdução, e segmentos externos, responsáveis pelas ligações com os nutrientes/repelentes. Cada bactéria possui capacidade de adaptação a diferentes tipos de moléculas. Na *E. coli*, estes receptores já são bem conhecidos quantitativamente. A *E. coli* possui cinco tipos de quimiorreceptores: aspartato (Tar), serina (TSR), dipetídios (TAP), ribose e galactose (TRG) e potencial redox (Aer), sendo o aspartato e a serina presentes em maior quantidade [27]. Os receptores se comunicam com o motor flagelar através de processos químicos de fosforilação, envolvendo proteínas internas da bactéria [28]. No caso específico do receptor Tar, os locais de modificações são os resíduos 295, 302, 309 e 491, identificados como sítios metílicos, indo de 1 a 4. Os resíduos 295, 302 e 309 são localizados de um mesmo lado da hélice  $\alpha$  e separados entre eles por sete resíduos de aminoácidos. O resíduo 491 é localizado em outra hélice [29], como mostrado na Fig.1.3.2. O comportamento da bactéria está diretamente relacionada à ligação de moléculas atrativas aos seus receptores, influenciando assim, o movimento

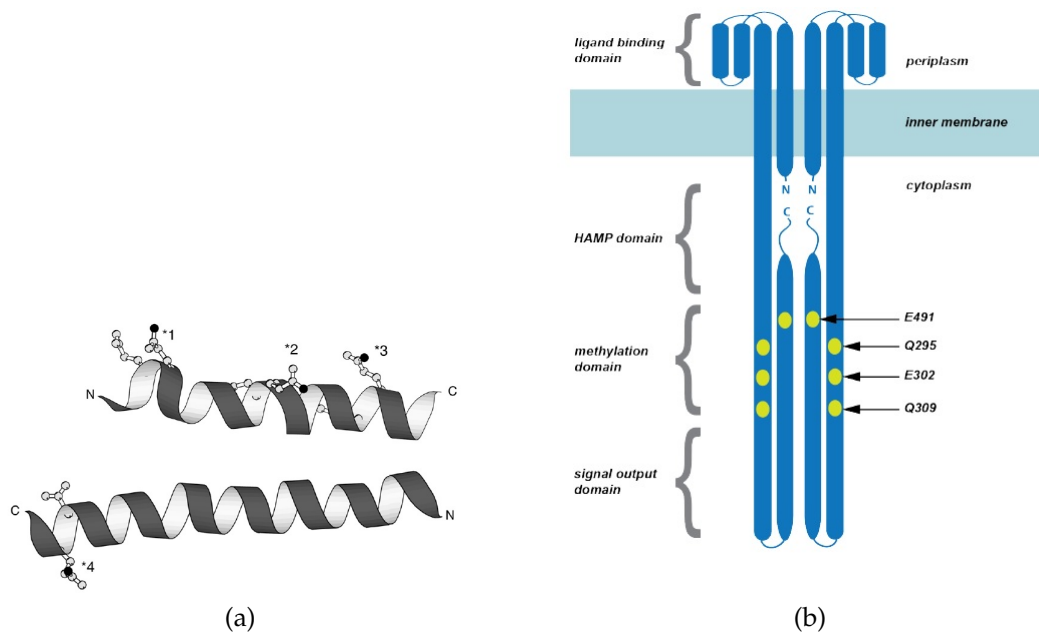


Figura 1.3.2 – Descrição dos sítios 1, 2, 3 e 4 (Q295, E302, Q309 e E491) de um quimiorreceptor Tar da *E. coli* Tar. A) Localização dos sítios 1, 2, 3 e 4 nas hélices C-terminal, com espaçamento dos giros da hélice. Um giro da hélice conta 3.5 aminoácidos. B) Esquema de distribuição dos sítios na hélice C-terminal. Sítios 1, 2 e 3 do mesmo lado de uma hélice e sítio 4 em outra hélice.

da bactéria.

A mobilidade e a quimiotaxia das bactérias podem ser medidas por várias técnicas. Uma delas é a variação temporal da concentração de ligantes, que avalia como as bactérias utilizam seus receptores para comparar a concentração de estímulo atual com a quantidade encontrada alguns segundos antes [6]. De tempo em tempo, a concentração de estímulo é alterada e os receptores irão ligar-se aos ligantes, iniciando o processo quimiotático. Por este mecanismo, ela pode aumentar ou diminuir a frequência de mudança de direção.

Mesmo sendo uma descoberta de mais de um século, conforme citado anteriormente, somente há algumas décadas o entendimento da quimiotaxia começou a ter um avanço significativo e a transdução de sinais começou a ser revelada nas células [30]. No processo de transdução de sinais, as bactérias demonstram muita sensibilidade às variações das concentrações de estímulo, no entanto, são insensíveis quando estão na presença de estímulos constantes. Evidências mostram que a adaptação precisa é importante para o processo sensorial, pois no estado adaptado o sistema compensa a estimulação contínua estando, assim, pronto para responder a novos estímulos [31]. Este assunto será melhor detalhado na seção 1.7.

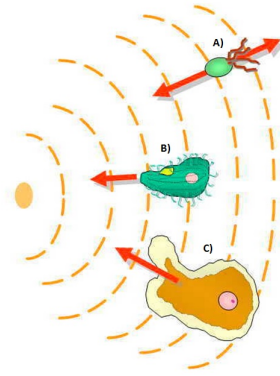


Figura 1.3.3 – Representação do movimento: A) das bactérias; B) e C) das células eucariontes [1]

O tamanho pequeno das bactérias também influencia em seu comportamento, sendo responsável por dificultar a detecção eficaz do gradiente de concentração. Para suprir essa desvantagem, as bactérias usam a técnica de se movimentar constantemente para frente ou dar guinadas (mudança de direção). Células maiores, como as eucariontes, permitem a detecção direta do gradiente de estímulo, sendo o movimento em direção ao estímulo mais preciso (Fig. 1.3.3). No entanto, a existência de um gradiente químico é essencial, tanto para as bactérias como para as células eucariontes.

## 1.4 Estrutura da quimiotaxia bacteriana

Cada espécie de bactéria tem características distintas para seu processo de locomoção, sendo seus movimentos diretamente ligados à forma como os flagelos estão distribuídos em seu corpo celular. Os flagelos fazem parte do motor flagelar, ou *FliM*, com capacidade de girar de 270 à 600 rotações por segundo [32]. Algumas espécies têm características particulares de se locomover, no entanto, a estratégia mais utilizada é o movimento impulsionado pela rotação dos flagelos que conseguem exercer força suficiente para empurrar a bactéria, fazendo ela se deslocar de forma relativamente rápida [2].

Os Flagelos são filamentos finos e helicoidal que se estendem para fora da célula, Fig. 1.1.1, fazendo o papel de propulsores para a bactéria e se movimentando em dois sentidos, horário e anti-horário. No sentido horário, o formato helicoidal dos flagelos faz com que eles se desestabilizem e impulsionem a célula, mudando sua direção (guinada) de forma aleatória com maior frequência. O movimento no sentido anti-horário faz com que ela nade mais suave, de forma quase retilínea, em direção a uma área mais propícia



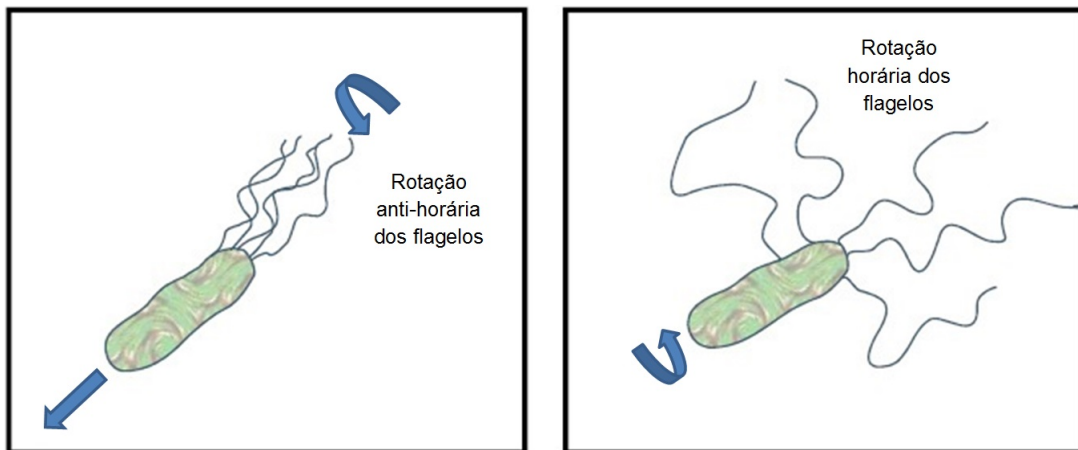


Figura 1.4.1 – Movimento de natação e giro das bactérias ([3], com adaptações do autor).

ao seu desenvolvimento, no entanto, só tem capacidade de manter esse movimento retilíneo por poucos segundos [3]. Para Bren e Eisenbach (2000) [4], os movimentos dos flagelos no sentido anti-horário formam um tipo de hélice, levando a deslocamentos mais prolongados em direção aos atratores. Portanto, a bactéria executa um passeio aleatório tendendo à maior concentração de atraente. Este mecanismo proporciona à bactéria capacidade de seguir o gradiente de concentração química [33]. A Fig. 1.4.1 representa os dois movimentos executados pela *E. coli*.

O ponto de partida para os movimentos na *E. coli* são os receptores celulares. Conforme citado na seção 1.3, são os receptores que detectam e fazem a comparação temporal do gradiente de concentração e a transdução do sinal para o interior da bactéria. Neles estão localizados os sítios onde ocorrem a metilação (adição de grupos metílicos) e desmetilação (remoção de grupos metílicos), como mostrado na Fig. 1.3.2b, numerados conforme dito na seção 1.3. Os tipos de receptores presentes em maior quantidade na *E. coli*, aspartado (Tar) e serina (Tsr), têm quatro e cinco sítios metílicos, respectivamente, [6].

Além dos flagelos e dos receptores, temos também a presença das proteínas específicas CheA, CheB, CheR, CheW, CheY, CheZ, mostradas na Fig. 1.4.2, que regulam o processo e são responsáveis pela transmissão interna das informações detectadas pelos receptores na rota metabólica da quimiotaxia, detalhada na seção 1.6.

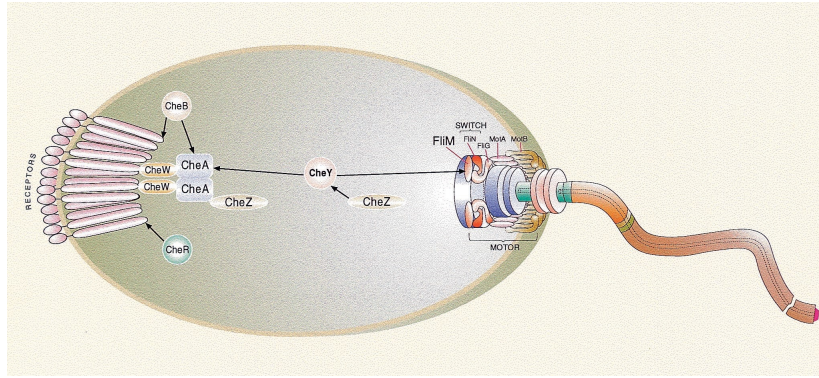


Figura 1.4.2 – Esquema simplificado da interação entre os receptores, as proteínas (CheA, CheW, CheB, CheR, CheY e CheZ) e o motor flagelar (FliM) durante o processo de transdução de sinal quimiotático na Bactéria [4].

## 1.5 Memória temporal

Na quimiotaxia bacteriana, quando se pensa na sua evolução, outra característica deve ser levada em consideração, como por exemplo, a “memória”. Macnab e Koshland (1972) [34], através dos resultados conseguidos em sua investigação, concluiu que as bactérias detectam gradientes pelo uso de um mecanismo de detecção temporal, isto é, têm algum tipo de dispositivo de memória que compara concentrações ambientais presentes e passadas. Diante disso, podemos concluir que, no processo de quimiotaxia, mesmo sendo um organismo unicelular e sem capacidade neurais, as bactérias conseguem desenvolver um sentido de memória durante os percursos por onde se desloca. Esse comportamento é indicado como sendo um importante mecanismo na sua forma de receber as alterações na concentração de estímulos.

Park et al. (1990) [35] afirma que, para uma detecção temporal do gradiente de concentração, deve haver uma medição da concentração corrente, um registro da concentração recente e um meio de comparação. Sendo a ocupação com o ligante a medição da concentração corrente, a metilação armazena as informações passadas (recentes), e, devido ser um processo mais lento, compara com a ligação do ligante, podendo evidenciar a concentração que ocupou o sítio alguns momentos antes. Quando um valor excede o outro, um sinal afeta o motor flagelar, aumentando ou diminuindo a frequência de guinadas. Diante disso, a adaptação acontece para restabelecer a balança [35]. Sendo através da metilação/desmetilação, que a memória de curto prazo é alcançada no sistema de quimiotaxia [6].

## 1.6 Descrição da rota metabólica da quimiotaxia

As rotas metabólicas descrevem uma serie de reações químicas que cumprem determinada função, cujo resultado pode ou não ser utilizado na reação subsequente. Para efeito de rota metabólica, ela pode ser uma “rota cíclica” ou linear, sendo que, na primeira, o produto final é consumido na própria via e, na segunda, o produto final é consumido em uma outra reação.

É a partir das proteínas específicas, citados na seção 1.4, Fig. 1.4.2, e do processo de transdução que as bactérias decidem qual caminho seguir. Para a *E. coli*, a proteína chave é CheA, que, através da proteína CheW, liga-se ao receptor, formando um complexo ternário (Receptor-CheW-CheA), sendo ativada pela interação com os receptores [27].

A principal função da CheA é a auto-fosforilação seguida pela transferência do grupo fosfato à proteína CheY, ou à proteína CheB. CheR e CheB têm como principal função, respectivamente, metilar e desmetilar os receptores [31]. CheW tem a função de ligar CheA ao receptor. Estudos mostram que CheW pode ter envolvimento na auto-fosforilação de CheA e na transferência de grupos fosfatos para CheY [24]. Já CheY tem como principal função sofrer a fosforilação de CheA, tornado CheY-P, fazendo a ligação entre o complexo ternário e o complexo de ativação do motor flagelar - FliM (Fig. 1.4.2), que tem como resultado a mudança de direção de rotação dos flagelos, conforme dito na seção 1.4. A proteína CheZ está presente apenas nas bactérias conhecidas como entéricas (situadas no intestino de humanos e animais), tem como função desfosforilar CheY-P, com a ressalva, ainda não explicada cientificamente, que, quando CheY-P tem baixo número de grupos fosfatos, CheZ se torna insignificante. No estado estacionário CheZ desfosforiza CheY-P no mesmo ritmo que CheA fosforiza CheY [27].

O funcionamento da rota metabólica da *E. coli* é descrito por seus movimentos em um ambiente uniforme, caracterizado por uma natação reta com pequena frequência de mudança de direção. Neste estado, a bactéria tem uma fração de receptores no estado ativo, que faz CheA se auto-fosforilar. Esses grupos fosfatos são transferidos para CheY e CheB. Com a presença de CheY-P, o motor flagelar consegue regular a orientação. Um número maior de CheY-P faz a bactéria realizar mudanças de direção com maior frequência, girando os flagelos no sentido horário. No entanto, com a regulação de CheY-P por CheZ, retirando grupos fosfatos, a bactéria começa a ter um nado mais reto

e suave, voltando a diminuir a frequência de mudança de direção, girando os flagelos no sentido anti-horário. CheB retira grupos metílicos dos receptores, tornando o receptor mais inativo e CheR adiciona grupos metílicos, tornando o receptor ativo novamente. Com este ciclo de atividade fechado, CheA volta a se auto-fosforilar e a contribuir com a produção de CheY-P e CheB-P em menor escala do que a proteína CheR, levando a bactéria a ter a mesma atividade do passado. Assim, a bactéria está sempre buscando adaptar-se ao meio em que se encontra.

## 1.7 Adaptação e robustez

A adaptação se resume basicamente no retorno da atividade ao mesmo nível anterior, após uma mudança na frequência de guinadas provocada pela alteração na concentração de estímulo [31], seja para mais ou para menos. A adaptação é um processo que faz a bactéria ter a capacidade de se recuperar de um comportamento atual, quando o estímulo ainda está presente em seu ambiente, sendo essencial para sua sobrevivência, pois permite que ela consiga detectar pequenas variações no nível de estímulo [24]. Assim, o processo de adaptação, em níveis constantes de atraentes-químicos, permite que a bactéria possa responder a novos estímulos.

Estudos mostram que a adaptação observada na quimiotaxia bacteriana é principalmente devida à modulação da atividade de sinalização dos receptores e não à afinidade com o estímulo. Tal afirmação foi demonstrada através de experimentos envolvendo um controle do número de sítios dos receptores que podiam ser metilados, utilizando uma técnica de “amidação”, que é a transformação de um sítio metílico, através da proteína CheB, permitindo que ele possa ser metilado. Com esse mecanismo é possível simular os mesmos efeitos da metilação, com a diferença que podem ser muito mais fáceis de se controlar o nível de modificação nos sítios [36]. A partir dessa técnica de controle dos sítios metilados é possível aumentar a quantidade de atrativos até o ponto que compense a queda da atividade pela mudança dos sítios, encontrando, o retorno da atividade para sua configuração inicial (natação suave).

O exposto acima, consegue demonstrar que a adaptação depende diretamente da adição e remoção de grupos metílicos nos receptores, tendo dependência direta com as proteínas CheR e CheB. Para Morton et al. (1999) [5], a adição e subtração de grupos metílicos devem ser feitos na quantidade certa, para que a bactéria consiga direcionar

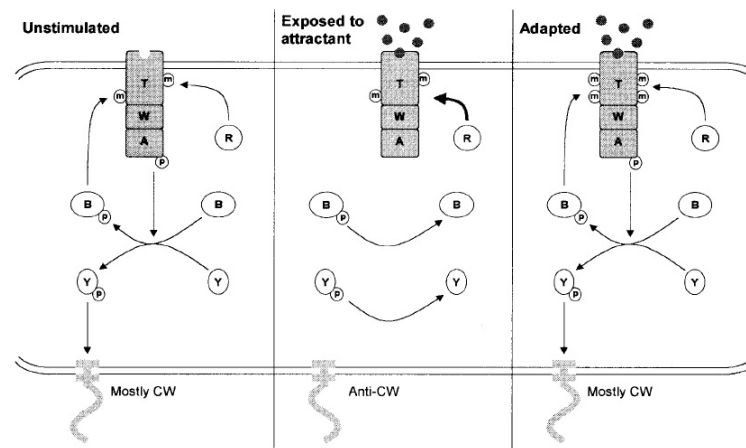


Figura 1.7.1 – Esquema interno da bactéria com adição e subtração dos grupos metílicos: a) receptor ativo e na ausência de nutrientes conectados, CheR adiciona e CheB retira os grupos metílicos de forma, aproximadamente, equivalente; b) com grande concentração de nutrientes, CheR metila sem a utilização de cheB; c) após adaptado Che-B retoma a retirada de grupos metílicos, a metilação se estabiliza em um número de sítios preenchidos mais alto [5]

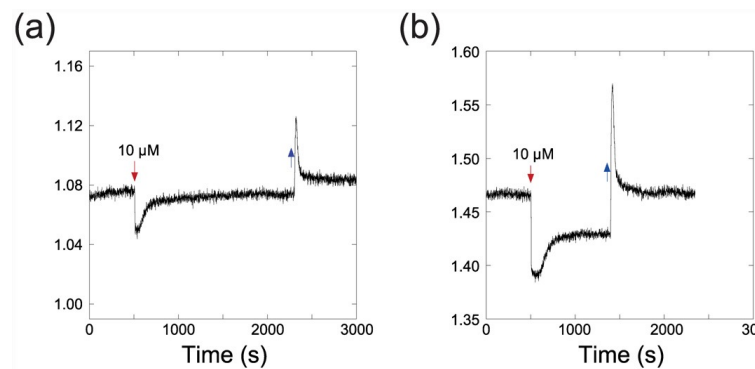


Figura 1.7.2 – a) Atividade adaptada b) Atividade não adaptada [6]

seus movimentos em direção à maior concentração de nutrientes. Assim, podemos afirmar que CheR e CheB participam na quimiotaxia como reguladores da atividade da bactéria. O processo de adaptação junto com a adição e remoção de grupos metílicos são representados pela Fig. 1.7.1, que mostra que, mesmo com o receptor preenchido por um atrator, as proteínas CheR e CheB conseguem se estabilizar de forma igual. Do mesmo modo, nas Fig. 1.7.2a e 1.7.2b vemos, respectivamente, exemplos de uma atividade adaptada e não adaptada.

Como sabemos, a adaptação ocorre após a alteração do gradiente de concentração de atrator, no entanto, existe uma diferença de tempo de adaptação para o aumento e diminuição da concentração. Macnab e Koshland (1972) [34] desenvolveram um aparelho de gradiente temporal que permitiu estudar a motilidade das bactérias e mostrar

que a quimiotaxia e o padrão de mobilidade das bactérias respondem tanto ao aumento da concentração, quanto a diminuição. No caso de concentração constante pode-se perceber um comportamento normal, tendo em vista que o nado suave continuou e as frequências de guinadas foram frequentemente percebidas. Com o aumento da concentração de atraentes, o nado ficou mais suave e melhor coordenado se comparado com a “concentração constante”, durando aproximadamente 5 minutos para retornar a atividade anterior. No caso de variação negativa, ou diminuição da concentração, se percebe o aumento da frequência de guinadas, neste caso, após 12 segundos o estado de mobilidade da bactéria voltou ao que foi encontrado com a “concentração constante”. Berg e Tedesco (1975) [37] corroboram Macnab e Koshland (1972) [34] citando que as células se adaptam lentamente a uma taxa constante à adição de um atrativo ou à subtração de um repelente, mas se adaptam rapidamente à subtração de um atrativo ou à adição de um repelente.

Outra característica da adaptação é a robustez, ou seja, a capacidade da adaptação precisa das bactérias suportarem variações substanciais em parâmetros bioquímicos da rede [31]. A robustez é referente aos ajustes a fins dos parâmetros bioquímicos envolvidos na quimiotaxia [38]. Barkai e Leibler (1997) [38] comprovaram que pode-se alterar diversas vezes uma das constantes de velocidades que mesmo assim, em média, se consegue apenas um desvio de alguns por cento da adaptação perfeita. No entanto, não são todas as propriedades que são robustas aos ajustes dos parâmetros, um exemplo é o tempo de adaptação, que exhibe variações substanciais nos sistemas alterados. Portanto, enquanto algumas propriedades são robustas, outras podem mostrar sensibilidade a mudanças nos parâmetros de rede [38].

A falta de sítios metílicos também demonstram algum grau de robustez no sistema. Estudos como o de Krembel et al. (2015) [6], onde foi feita a substituição dos sítios metílicos por alanina, impedindo assim a metilação do sítio substituído, mostra que dependendo do sítio modificado não ocorre muita perda no efeito quimiotático da bactéria. Com esse caráter robusto, o sistema de adaptação consegue parcialmente compensar a substituição de até dois sítios metílicos por alanina, no entanto, para se conseguir uma eficiente detecção logarítmica, é necessário o uso de todo o conjunto de sítios.

Carater semelhante ao da alanina é visto com a substituição dos sítios por

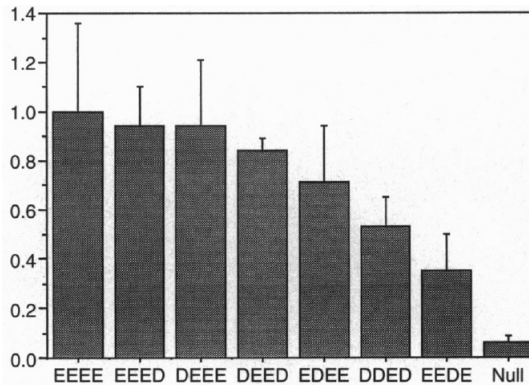


Figura 1.7.3 – Nivel de Metilação mostrando o comportamento do sistema quando substituições de glutamato (E) é feita por aspartato (D), identificando que as substituições nos sítios 1 e 4, exercem pouca eficiencia no processo da quimiotaxia [7].

aspartato, mostrado por Saphiro et al. (1995) [7], onde o nível de metilação pode ser verificado, demonstrando a robustez na pequena variação da metilação quando o sitio 1 ou 4 são substituídos individualmente, Fig. 1.7.3. No entanto, mesmo com essas substituições individuais que diminuem as possibilidades dos sítios para metilação, a necessidade de ter um número específico de sítios de metilação permanece ainda não muito caracterizada. Por outro lado, com o uso dos modelos computacionais de quimiotaxia, já é possível prever que números maiores de sítios metílicos nos receptores podem aumentar a robustez [6].

Para Alon (1999) [31] a importância da robustez se evidencia com a apresentação da adaptação perfeita, no intuito de fazer com que a rede de proteínas na quimiotaxia funcione corretamente suportando as variações naturais. Portanto, se levarmos em conta que a adaptação perfeita é importante no processo de sensibilidade e que a robustez contribui para o alcance da adaptação perfeita, ou, de certa forma, contribui para mantê-la, podemos afirmar que a robustez também tem um papel importante com a sensibilidade do sistema.

## 1.8 Cooperatividade dos receptores

Algumas propriedades da quimiotaxia têm início nos receptores, tais como a interação dos quimiorreceptores, a adaptação perfeita e a sensibilidade de resposta à mudanças na concentração dos estímulos. Tu (2013) [8], em seu trabalho, escreve que a confirmação destas informações se iniciaram por Maddock e Saphiro em 1993, quando descobriram que os quimiorreceptores formavam grandes aglomerados perto

dos polos das células juntamente com outras proteínas citoplasmáticas, CheA e CheW. Foi a partir disso que Bray et al. propuseram, pela primeira vez, que pudesse existir cooperatividade devida a aglomeração dos receptores, podendo levar à amplificação do sinal na quimiotaxia bacteriana [8]. Para alcançar estes objetivos os receptores são agrupados em forma de grandes matrizes, formando uma rede complexa de receptores [39].

Na *E. coli* os receptores estão espalhados por todo o corpo celular, tendo uma maior concentração na parte oposta ao motor flagelar. Os cinco tipos de quimiorreceptores cumprem três papéis fundamentais para a quimiotaxia: ligar ao ligante, fazer a transdução do sinal externo e participar da adaptação, por meio da metilação/desmetilação [24]. No entanto, a principal função está ligada à adaptação, pois é nos aglomerados de receptores que acontece a regulação da atividade da proteína CheA, cumprindo assim a rota metabólica descrita na seção 1.6.

Os receptores são capazes de interagir um com o outro em uma mesma célula. Estudos anteriores mostram que a interação está diretamente ligada ao ganho de sensibilidade, acreditando-se que a cooperatividade entre eles contribua para a alta sensibilidade da transdução do sinal da *E. coli* [40]. Este argumento também foi repetido por Tu (2013) [8], onde ele indica que mudanças de um quimiorreceptor podem ser moduladas por modificações dos receptores vizinhos. Brey et al. (1998) [41] argumentam que essas interações podem dar origem a uma maior sensibilidade, gerando resposta em muitos outros receptores. Mello e Tu (2003A) [42] também mostram a cooperatividade entre os receptores, onde, utilizando receptores mutantes, ficou comprovado que os dois mais abundantes tipo de quimiorreceptores da *E. coli*, Tar e Tsr, estando em situações de metilações diferentes, são capazes de cooperar entre si, mesmo quando a concentração de estímulo é o MeAsp (nutriente com mais afinidade ao quimiorreceptor Tar), indicando ainda que a interação não depende apenas do quimiorreceptor Tar, mas do estado de metilação do quimiorreceptor Tsr.

Trabalhos anteriores, ambos usando um modelo alostérico e com receptores heterogêneos, demonstraram as interações através de modelos distintos, modelo de Ising e modelo MWC (Monod, Wyman e Changeux), conforme mostrado na Fig. 1.8.1. O modelo de Ising depende basicamente da intensidade das interações dos vizinhos mais próximos, já o modelo MWC tem sua dependência no tamanho dos aglomerados



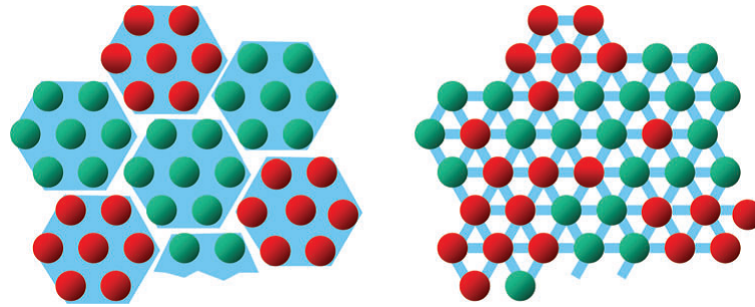


Figura 1.8.1 – Diferença entre os modelos MWC e Ising. No modelo MWC a interação é apenas entre os receptores do mesmo grupo. No modelo de Ising a interação é dada com os vizinhos mais próximos, não existe grupo [8].

de receptores (Cluster), conhecido como modelo “tudo ou nada”. Esta limitação de interação do modelo MWC é o que o diferencia do modelo de Ising, buscando evitar a complexidade que existe nas interações locais nos receptores [40]. Ainda para Mello e Tu (2005) [40] o modelo clássico do tipo MWC pode ser considerado uma versão grosseira do modelo de Ising. No entanto, as diferenças entre os dois modelos ficam mais evidentes em escalas menores que o comprimento de correlação (Ising) ou do tamanho do aglomerado de receptores (MWC). Assim, a escolha pelo uso do modelo de Ising deve-se ao fato de que ao modelar a cooperatividade de um grupo de receptores, grande parte das modelagens recentes utilizam uma rede regular com a atividade de cada receptor tendo influência de interação com os vizinhos mais próximos. Dessa forma, podemos utilizar um modelo de Ising, originado no magnetismo, com a ideia de explorar a cooperatividade dos receptores.

A interação, ou cooperatividade dos receptores, está diretamente ligada ao aumento da sensibilidade do sistema [43]. A ideia de cooperatividade entre os receptores como uma forma de aumentar o ganho foi sugerida por Bray, Levin e Morton Firth (1998) [41]. Somente mais tarde Shi e Duke (1998) [44] propuseram um modelo em que a interação deveria considerar seus vizinhos mais próximos, modelo de Ising. Diante disso, mesmo que outros modelos também sejam capazes de se trabalhar com receptores heterogêneos, atualmente o modelo mais utilizado nos experimentos é o modelo de Ising, pois além dele não restringir as interações com receptores de tipos diferentes, com ele, podemos ter a individualidade de cada receptor trabalhando em um formato de rede conhecido. Portanto, utilizando este modelo, podemos implementar passos que não foram estudados ainda profundamente, como é o caso da sequencialidade, ou não-sequencialidade das metilações/desmetilações.

## 1.9 Sensibilidade e adaptação perfeita

A capacidade de detectar alterações nos estímulos de um meio ambiente é uma característica de sistemas sensoriais. Nesse sentido, receptores que trabalham de forma acoplada, ou seja, com interação, possuem uma sensibilidade maior a estímulos extracelulares. Duke e Bray (1999) [9], mencionam em seu trabalho que o acoplamento de receptores formam um modelo ideal, porque fazem com que a célula detecte e responda a estímulos externos. Tal conceito corrobora a utilização do modelo de Ising nos estudos de interação dos receptores, descrito na seção 1.8, pois uma de suas principais características é a capacidade de analisar um sistema local considerando a influência de seus vizinhos mais próximos.

Diante desses argumento temos a *E. coli* que é capaz de se adaptar com cinco ordens de magnitude de concentração de ligantes, possuindo uma capacidade de detecção e transdução de sinal extremamente sensível, ao passo que é capaz de responder a variações de apenas 0.1% na concentração de ligantes. Dessa maneira, é capaz de responder mesmo que uma pequena fração de receptores esteja ocupado com ligantes [28], demonstrando alto grau de sensibilidade.

Tendo em vista que o número de receptores ocupados cresce com a concentração de estímulo, seção 1.1, Duke e Bray (1999) [9], em seu trabalho, conseguem mostrar a situação da sensibilidade tanto em baixa, quanto em alta ocupação dos receptores, Fig. 1.9.1. Em baixa concentração, poucos receptores ligados ficam inativos e a interação existente entre os receptores faz com que os vizinhos também fiquem inativos. O aumento da atividade até o padrão ocorre pela adição de grupos metílicos em todos os receptores que se tornaram inativos. Isso demonstra a sensibilidade existente entre os receptores mesmo em ambientes em que o nível de estímulo é pequeno.

Conforme descrevemos na seção 1.7, o mecanismo de adaptação não tem dependência direta com a concentração de estímulos, no entanto, é diretamente relacionado ao estado de atividade do receptor. Assim, excluindo o efeito da concentração de estímulo sobre a adição e remoção dos grupos metílicos, podemos relacioná-las diretamente à regulação da adaptação perfeita, no processo de quimiotaxia. Portanto, a adaptação perfeita é o retorno da atividade exatamente ao nível anterior, sendo uma propriedade estrutural do sistema obtida através do equilíbrio da atividade global  $\langle a \rangle$ , no qual, não sofre influência da concentração de estímulo  $[L]$ . Na *E. coli* a adaptação perfeita é

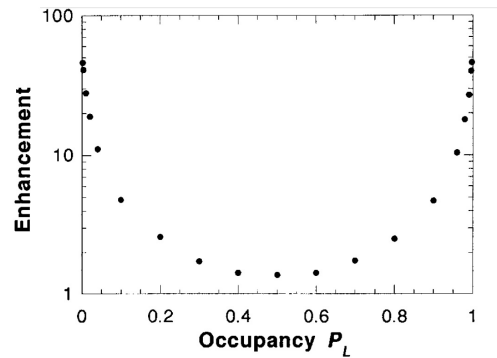


Figura 1.9.1 – Sensibilidade da resposta em função da ocupação dos receptores ligados ao estímulo [9], com adaptação. Quando o receptor está ligado a atratores ele fica no estado inativo

regulada através de ajustes internos das proteínas CheR e Che

Dessa forma, a adaptação perfeita é consequência de uma série de ajustes internos à bactéria, pelos quais ela responde de forma harmoniosa ao ambiente em que se encontra. Para Mello e Tu (2003A) [42], a adaptação pode ser considerada um mecanismo biológico que tem como responsabilidade se ajustar continuamente às respostas causadas pelas alterações na concentração de estímulos, que é conseguido pela regulação (remoção e adição) dos grupos metílicos. Com esse padrão de resposta, em busca do melhor ambiente, a adaptação dos receptores promove uma vantagem relevante às bactérias no mecanismo da quimiotaxia, que provavelmente desempenhou um papel importante durante sua evolução.

## 1.10 Modificação covalente

A modificação covalente é um processo no qual um resíduo de uma proteína é modificado por uma ligação covalente (reversível). Essa modificação pode possuir a propriedade de alterar a associação ou dissociação de algumas moléculas, sendo um meio de regular a atividade enzimática. Nesses casos, uma molécula doadora fornece uma porção funcional que modifica as propriedades da enzima. A fosforilação e desfosforilação são as mais comuns, mas não os únicos meios de modificação, como pode ser visto através da tabela 1 [15]. Neste trabalho, as modificações covalentes consistem basicamente na adição ou diminuição de grupos metílicos nos recptores, a metilação. Saphiro et al. (1995) [16] definem as modificações covalentes para a quimiotaxia bacteriana, como um mecanismo comum, pelo qual a função dos receptores transmembranares é regulada, sendo responsáveis pela adaptação da atividade.

Tabela 1 – Tipos de modificações covalentes. Retirado de Berg (2002) [15], com adaptações

MODIFICAÇÃO	MOLÉCULA DOADORA	EXEMPLO DE PROTEÍNA MODIFICADA	FUNÇÃO DA PROTEÍNA
Metilação	SAM	Sítio metílico	Controle a adaptação da atividade da bactéria
Fosforilação	ATP	Glicogênio fosforilase	ADP- ribosilação NAD RNA polimerase Transcrição.
Acetilação	Acetil CoA	Histones	Embalagem de DNA ; transcrição.
Myristoylation	Myristoyl CoA	Src	Transdução de sinal.
ADP- ribosilação	NAD	RNA	polimerase Transcrição.
Farnesilação	Pirofosfato de farnesilo	Ras	Transdução de sinal.
$\gamma$ -Carboxilação	$HCO_3$	Trombina	Coagulação sanguínea.
Sulfação	3-fosfo-adenosina-5'-fosfossulfato	Fibrinogênio	Formação de coágulo sanguíneo
Ubiquitinação	Ubiquitina	Ciclina	Controle do ciclo celular.

Um exemplo dos efeitos das modificações covalentes pode ser observado nas histonas, proteínas existente no DNA que auxiliam sua organização, funcionando como uma embalagem para o DNA e que possibilita a existência de faces mais expostas e outras menos expostas à transcrição (processo de transformação do DNA em RNA, que é um dos responsáveis pela criação das proteínas) [15]. Desta forma, as histonas são responsáveis pela regulação dos genes. Berg et al. (2002) [15] descrevem a rota metabólica das proteínas histonas pelo processo de modificação covalente, sendo rapidamente acetiladas ou desacetiladas. Assim, o processo de adição de um grupo acetil reduz modestamente a afinidade de todo o complexo de histona pelo DNA, fazendo com que exponha regiões do DNA, auxiliando na transformação de diferentes genes - conhecido como máquina de transcrição.

Os resultados das modificações covalentes nas histonas do DNA é visto no

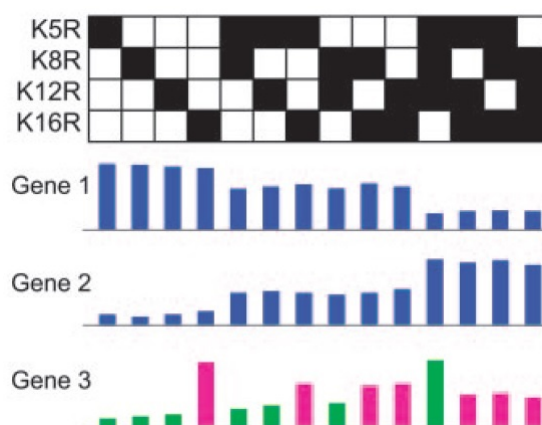


Figura 1.10.1 – Resultado das combinações nas quais um, dois, três ou quatro resíduos de histona foram modificados para outro tipo de aminoácido (retângulo preto), mostrando a influência no nível de expressões gênicas em três tipos diferentes de genes. Na forma de estrutura (acumulativa), gene 1 e 2, sendo respectivamente as funções de inibição e estimulação dos sítios, de acordo com o aumento de modificações ocorridas no processo. O gene 3 representa a modificação na forma de um código, tendo valores individuais para cada local de modificação por acetilação. Retirado do trabalho de Henikoff (2005) [10], com modificação.

estudo apresentado por Henikoff (2005) [10]. A Fig. 1.10.1 de Henikoff (2005), demonstra as alterações nas expressões gênicas promovidas pelas modificações dos resíduos de histona lisina, para o aminoácido de arginina, descrevendo em forma de um código, ou de uma estrutura acumulativa, trazendo três tipos de expressões gênicas, sendo possível perceber os resultados obtidos. Nos genes 1 e 2 ocorrem uma modificação acumulativa a cada aumento de modificação. No primeiro ocorre um efeito inibidor e no segundo um efeito estimulador da expressão, independente do local modificado, dando a ideia de uma estrutura já definida que, dependeria do número de modificações, sem atribuir uma importância diferente para cada local modificado. O gene 3 mostra o efeito de um código, trazendo a ideia de que alguns lugares que foram modificados tem mais influência do que outros no resultado final.

Para quimiotaxia na *E.coli*, a modificação covalente é a metilação e desmetilação dos receptores, sendo diretamente envolvida com o processo de fosforilação e desfosforilação, que, como já visto na seção 1.6, faz o papel de regulador das proteínas CheA e CheY. Diante disso, as modificações covalentes se tornaram importantes para o conhecimento das características dos receptores.

O papel das modificações podem ser investigado por mutantes que tem os efeitos análogos. Park et al. (1990) [35], por exemplo, estudaram um dos tipos de quimiorreceptores da bactéria *E. coli*, onde, neste tipo de receptor, alguns sítios metílicos são

automaticamente desamidados, pela própria bactéria, de glutamina (que inibe a metilação) para glutamato (que aceita a metilação). Neste caso, a presença da amida tem papel semelhante à metilação. Assim, Park criou dois genes mutantes, sendo um formado apenas por glutamato e outro formado apenas por glutamina. Em seus resultados, foram possíveis perceber que, enquanto o gene formado totalmente por glutamato não teve alterações significativas, se comparado com o gene do tipo selvagem (gene que se encontra naturalmente na bactéria), o gene formado apenas por glutamina teve resultados menos instáveis, devido o número reduzido de sítios aptos para metilação, pois, por algum motivo, alguns sítios foram aparentemente bloqueados para desamidação de glutamina para glutamato. Dessa forma, Park evidenciou a importância individual de cada sítio, demonstrando que os sítios de modificações covalente na *E. coli* estão envolvidos significativamente no processo de quimiotaxia.

Saphiro et al. (1995) [7], utilizaram uma técnica parecida, no entanto, utilizando a substituição de glutamato para aspartato (aminoácido que bloqueia a metilação no sítio modificado). Nesse trabalho, foram feitas as substituições individuais em cada sítio metílico do receptor, até que todos fossem modificados para aspartato. Como resultado, conseguiu demonstrar a importância individual de cada sítio metílico no processo de adaptação da atividade na bactéria.

Portanto, processos de modificações covalentes são responsáveis por regular as proteínas, em sua estrutura e função, sem incorrer em destruição, e sim se ajustando para que possam ser utilizadas pelo sistema.

## 1.11 Importância da metilação

Conforme seção 1.3, a adaptação quimiotática é conseguida por meio da adição ou remoção de grupos metílicos aos receptores. Podemos dividir basicamente em duas formas de realizar esse processo. Se a presença de grupos metílicos em sítios adjacentes é necessária, então, teremos um modelo sequencial com apenas cinco estados possíveis de metilação nos receptores, Fig. 1.11.1. No entanto, se qualquer sítio puder ser metilado ou desmetilado, independente da presença de grupos metílicos nos outros sítios, teremos um modelo não-sequencial, onde cada receptor terá  $2^M$  estados possíveis de metilação (Fig. 1.11.2), sendo  $M$  o número de sítios metílicos em cada receptor.

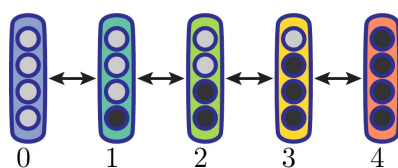


Figura 1.11.1 – Esquema de metilação sequencial.

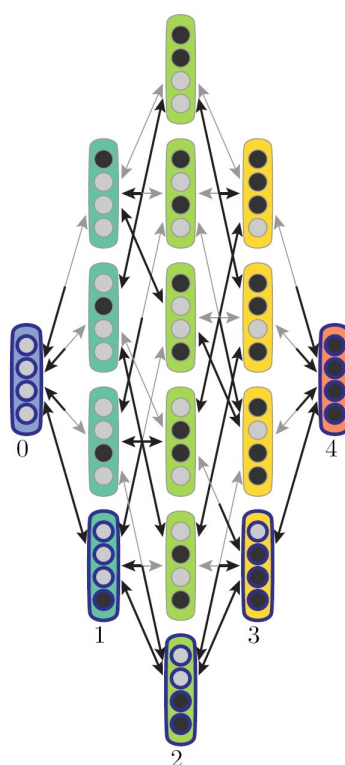


Figura 1.11.2 – Esquema de metilação não sequencial.

Conforme mostrado pela Fig. 1.3.2a, citado na seção 1.3, uma vez que um giro da hélice  $\alpha$  conta 3.5 aminoácidos, os sítios metílicos 1, 2 e 3 são distanciados por sete resíduos de aminoácidos e localizados de um lado da hélice C-terminal da proteína receptor. O sítio 4 se encontra em outra hélice, Fig. 1.3.2b. Estudos mostram que a metilação do sítio 3 é feita de forma mais rápida, o sítio 2 é o segundo a ser metilado, com a metade da velocidade que o sítio 3 e os sítios 1 e 4 são metilados com menos de um décimo da velocidade de metilação do sítio 3 [16], o que demonstra que existe uma sequencia natural a ser seguida para a metilação. Para Saphiro et al. (1995A)[16], a taxa de metilação de um sítio é influenciada por um resíduo afastado sete aminoácidos desse local. Ainda neste estudo, além de sofrer influência dos sítios vizinhos, que pode ser comprovada pelo modelo proposto em seu trabalho, foi identificado que um receptor modificado, do tipo *EEEE* (quatro glutamatos), teve sua metilação do sítio 1 influenciada pela presença da Glutamina no sítio 2, do tipo *EQEE*, causando um

aumento considerável na metilação do sítio 1 e uma diminuição nos sítios 3 e 4. Assim a presença de um sitio preenchido pode exercer tanto uma influência positiva, adicionar grupos metílicos, como uma influência negativa, remover grupos metílicos.

Perez et al. (2004) [45] justificam a diferença na taxa de metilação nos sítios de metilação de Tar. Para ele, devido a taxa de metilação ser altamente sensível à natureza do receptor, a diferença pode estar relacionada com os sítios metílicos não serem reconhecidos de forma igual pela proteína CheR. Dessa maneira, as diferenças nas taxas de metilação nos sítios individuais podem ser consideradas como a diferença de acessibilidade que cada grupo CheR tem para cada sítio. Outro ponto considerado por Perez (2004) é que, por CheR ser positivamente carregado e o receptor ser negativamente carregado, a taxa de transferência de CheR é totalmente dependente da orientação e distância do sítio.

Com relação à importância dos sítios metílicos, Dunten e Koshland (1991) [36] identificaram que o sítio 3 tem maior importância no processo de metilação, o que também pode ser comprovada por [7], [46], [6] e [26] no qual identificaram que os receptores com melhores desempenhos foram os que preservaram a sequência de metilação 1-3: EEED, DEEE, e DEED; AEQE, QEQA, e AEQA; AEEE, EEEA, e AEEA (E-glutamato, D-aspartato, A-Alanina, Q-glutamina). Assim, considerando o exposto a cima, fica evidente que o sitio 3 é o primeiro a ser metilado.

Outro ponto que corrobora com a influência dos vizinhos no processo de metilação são os experimentos feitos com receptores modificados. Por estarem próximos, a uma distância de sete resíduos de aminoácidos uns dos outros, os sítios 1, 2 e 3 existem uma dependência nas ocupações entre si. Com a utilização de Glutamina, como substituto da metilação, foi possível identificar que a metilação do sitio 2 foi aumentada pela presença da glutamina no sítio 3 e a metilação do sitio 1 foi aumentada pela presença da glutamina no sitio 2. O fato de ter o sítio 3 como o de maior importância no processo de metilação, por ser o primeiro a ser metilado, faz com que busquemos saber qual a influência sentida por ele para fazer com que seja metilado inicialmente, e para isso já se sabe que o sítio 3 também sofre uma influência de um resíduo afastado sete aminoácidos dele em direção ao C-Terminal, embora este resíduo não seja um local de metilação [16], tratamos desta influência como uma previsão de resultado na seção 7.1. Esse resultado, sugere que com a glutamina imitando a metilação, um sítio  $n$  depende da metilação do



sítio vizinho.

Ao contrário da Glutamina, Dunten (1991) e Saphiro (1994 e 1995A), mostraram que se a substituição dos sítios de glutamato forem feitos por aspartato a metilação neste sítio não consegue ser feita, tornando uma metilação não produtiva, ou seja, não alterando substancialmente a afinidade de CheR pelo receptor. Dessa forma, a substituição por aspartato tem o efeito oposto, isto é, a metilação do local  $n$  é inibida quando um resíduo de aspartato está presente no sítio. Portanto, a presença do aspartato inibe o sinal de guinada (receptor mais inativo), levando ao aumento de um nado mais suave de comprimento maior, com menos sítios metílicos para serem preenchidos. A substituição dos sítios metílicos por alanina também é conhecida por dificultar a disseminação quimiotática da bactéria [6].

Assim, em algumas experiências, Che-R e Che-B estão presentes, mas não conseguem modificar os resíduos nos sítios de metilação, quando são substituídos por aspartato [7][29] ou alanina [46][26]. Para saber a influência individual de cada sítio foram construídas variantes dos tipo de metilação do receptor Tar com todas as prováveis substituições, incluindo as que tinham apenas um local disponível para metilação (glutamato), tais como: *EDDD*, *DEDD*, *DDED* e *DDDE* e *EEEE*, sendo o receptor modificado *EEEE* equivalente ao receptor tipo-selvagem *QEQE*, pois tradicionalmente, os sítios de glutamina são transformados em glutamato através da desamidação feita por CheB. Desse modo, foi possível identificar individualmente a participação e influência de cada sítio metílico nos receptores de Tar. Neste estudo de Saphiro (1995) [7] e Nishiyama (19991) [29], ficou claro que os quatro sítios são necessários para a bactéria ter uma ótima capacidade quimiotática, no entanto revela também que as posições individuais tem grande influência na capacidade quimiotática da bactéria. Um exemplo da influência de cada sítio pode ser visto na Fig. 1.11.3, onde a mutação do sítio 3, quando não ocupado, causou uma perda considerável na capacidade quimiotática e o sítio 4, por sua vez, quando não ocupado, causou pouco dano na capacidade quimiotática da bactéria.

Outros estudos também caracterizaram a influência dos sítios vizinhos no processo de metilação, como em Perez et al. (2004) [45], onde foram construídos receptores modificados com a proteína CheR alterada verificando suas atividades de metilação.

O modelo não-sequencial não é regrado por uma preferência no preenchimento

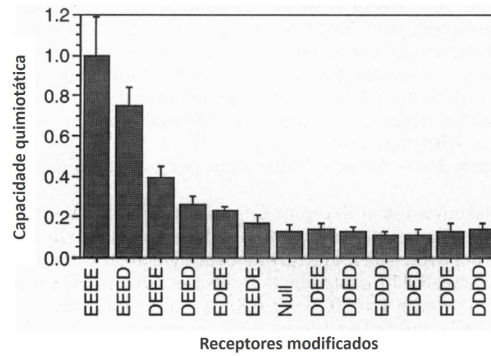


Figura 1.11.3 – Representa a capacidade quimiotática para os receptores modificados Tar, com todas as substituições possíveis de resíduos de aspartato nos sítios de metilação, incluindo os totalmente substituídos (DDDD) e os totalmente não substituídos (EEEE). A capacidade quimiotática depende do sítio metilado, sendo o sítio 3 o que tem maior influência (maior perda quando não pode ser metilado) e o sítio 4 com a menor influência (menor perda quando não pode ser metilado) [7].

dos sítios metílico e não depende da presença de grupos metílicos nos sítios vizinhos. Devido a isso, a quantidade de estados possíveis de metilação é dado por  $2^M$ , dependendo diretamente da quantidade de sítios metílicos  $M$  presente nos receptores. Por este motivo, não existe um sítio em que a metilação ocorra primeiro que as outras.

## 1.12 Estrutura da metilação e desmetilação sequencial

Com a existência de alguns experimentos citados anteriormente, referente a uma certa preferência para a metilação/desmetilação dos sítios, foi possível criar um modelo, no qual, propomos um comportamento para a proteína CheR. Por simplicidade adotamos no modelo matemático uma numeração contrária à do modelo biológico, para que a metilação se dê em ordem crescente. O modelo consiste em: se o sítio  $n - 1$  não estiver ocupado com um grupo metílico, a probabilidade do sítio  $n$  ser metilado por CheR é reduzida para uma fração  $\eta$  da taxa de metilação descrita pelas Eq. 3.6a, da seção 3.1, quando um grupo metílico está presente no sítio  $n - 1$ .

O trabalho complementar de CheR e CheB, adicionando e removendo grupos metílicos, é coerente com o fato de possuírem uma origem evolutiva comum [42]. Dessa forma, podemos definir uma regra de simetria para a desmetilação semelhante a metilação, que na presença de um grupo metílico no sítio  $n + 1$ , a probabilidade do sítio  $n$  ser desmetilado por CheB é reduzida a fração  $\eta$  da taxa de desmetilação, Eq. 3.6b da seção 3.1, quando um grupo metílico está ausente no sítio  $n + 1$ .

Estas regras de metilação são ilustradas na Fig. 1.12.1, com as setas pretas re-

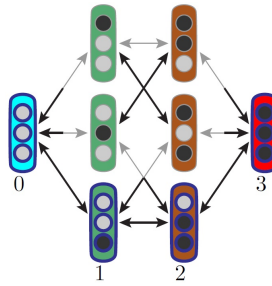


Figura 1.12.1 – Representação do modelo sequencial. Setas escuras representam as transições preferidas e as setas cinzas as inibições.

presentando transições preferidas e setas cinzas representando as menos prováveis. Se  $\eta = 0$ , apenas as transições descritas por as setas pretas são permitidas, resultando em uma dinâmica de metilação completamente sequencial.

### 1.13 Condições para uma adaptação perfeita

Inicialmente, não se tinha ao certo qual a influência que a quantidade de sítios e a forma com que eles eram preenchidos poderiam ter na quimiotaxia bacteriana. Devido a isso, diversos estudos, tais como: Terwilliger et al. (1986) [47]; Park et al. (1990) [35]; Dunten e Koshland (1990) [36]; Saphiro e Koshland (1994) [17] foram feitos com o intuito de entender a importância de se ter uma sequência na metilação, um número exato de sítios metílicos em cada receptor e a influência dos sítios vizinho. Na *E. coli*, por exemplo, pelo tipo de receptores e comportamento de seus movimentos, foram propostos diversos modelos, onde, a partir de experimentos de inibição de sítios, foram possíveis identificar uma sequência que oferecesse um melhor benefício para a bactéria, levando a adaptação perfeita.

O interesse pela adaptação perfeita vem desde sua descoberta, onde, mesmo com algum entendimento da quimiotaxia bacteriana, se fazia necessário compreender o motivo do sistema se adaptar a um aumento ou diminuição da concentração do estímulos [34] [37]. Spiro et al. (1996) [28] propuseram um modelo baseado em ajustes finos e bem detalhados para a adaptação, demonstrando os ganhos e a sensibilidade, no entanto, não soube explicar o motivo do aumento na sensibilidade, ou seja, a robustez presente no sistema biológico [31].

Como vimos na seção 1.7, a robustez está diretamente ligada a sensibilidade, pois o sistema não pode ser sensível ao extremos, devido as flutuações existente no

processo da quimiotaxia, mas também não pode ser insensível às mudanças ocorridas no ambiente em que vive. Estudos como os feitos por Barkai e Leibler (1997) [38] demonstram que não é preciso fazer um ajuste fino nos parâmetros para se conseguir a adaptação perfeita, pois, mesmo com a alteração aleatória dos parâmetros, grande parte da amostra teve uma adaptação perfeita. No entanto, como já vimos, não são todas as propriedades que são insensíveis à mudanças, um exemplo é o tempo, onde ajustes na constante de dissociação  $k$ , fez o tempo de adaptação aumentar.

Algumas questões ainda estão abertas no mecanismo da adaptação perfeita, como por exemplo, o processo de "feedback", ou retroalimentação, que consiste em uma resposta do sistema diante de um desequilíbrio. Estudos como Mello e Tu (2003A)[42] consideraram o processo de retroalimentação, afirmando que apenas CheB-P é capaz de desmetilar de forma eficiente o receptor. No entanto, Alon (1999) [31] cita que a adaptação perfeita não está relacionada com a fosforilação da proteína CheB, ou seja, com a retroalimentação, contudo, enfatiza que esse processo pode ter outro tipo de ganho para a bactéria durante a quimiotaxia. Neste estudo foi utilizado uma proteína CheB modificada, onde não possuía o domínio do grupo fosfato. Dessa forma, a retroalimentação torna um ponto ainda de interrogação no processo da adaptação perfeita.

Entretanto, análises teóricas anteriores mostram que a adaptação perfeita somente é possível se três condições forem satisfeitas [42] [48]:

- 1 - A taxa de metilação e desmetilação dependem apenas da atividade do receptor e não do estado de metilação ou do estado ligado ao ligante.
- 2 - A metilação é sequencial, implicando em um único estado de metilação para cada nível de metilação ( $\eta = 0$ ).
- 3 - Os dois termos do erro na adaptação sequencial, Eq.3.10, devem ser nulos. Essa condição é satisfeita se não existirem receptores ativos com  $m = 0$  ou receptores inativos com  $m = M$ .

A violação da condição 2, nos leva para o modelo não-sequencial, cujo a diferença está na inexistência de uma sequência para o preenchimento dos sítios metílicos nos receptores, sendo que a ocupação dos sítios vizinhos não exercem influência.

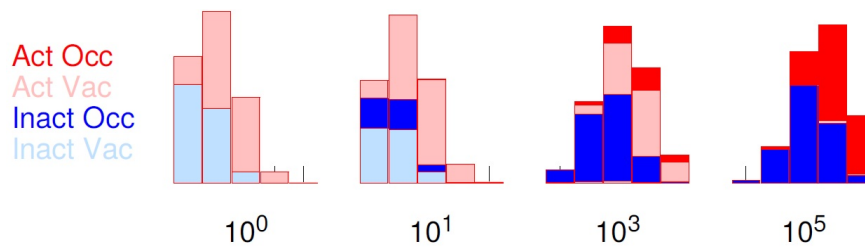


Figura 1.13.1 – Distribuição de metilação no estado estacionário com metilação sequencial entre os cinco estados  $\in [0;4]$  de receptores com 4 sítios metílicos. Com a concentração de ligantes dada em  $\mu M$  e variando de  $10^0$  a  $10^5$ . A cor diferente representa a fração de receptores ativos e inativos, vagos e ocupados pelo ligante.

Estudos mostram que alguns aspectos são responsáveis pela perda de adaptação, ou adaptação imperfeita. Meir et al. (2010) [49] mostram que, de acordo com estudos experimentais, utilizando um único tipo de receptor do tipo aspartato (Tar), a adaptação imperfeita consegue ser identificadas em concentrações muito baixas como aproximadamente  $10\mu M$  de MeAsp. Desta forma, a disponibilidade de sítios de metilação vagos pode ser um fator que leva à adaptação imperfeita [17][16]. Ao mesmo tempo, também pode ser evidenciado que para grandes concentrações de ligantes a bactéria também não consegue se adaptar, no entanto, para este caso, fica evidenciado que essa imperfeição na adaptação ocorre pela diminuição da taxa de metilação devido à escassez de sítios disponíveis para preenchimentos nos receptores. Do ponto de vista da modelagem, este fenômeno está relacionado à violação das condição 3.

A condição 3 depende dos estados de metilação do limite,  $m = 0$  e  $m = M$ . A modificação sequencial pode apresentar uma adaptação muito precisa, embora imperfeita, em um amplo intervalo de concentração de estímulo, sendo o tamanho do erro de adaptação dependente da extensão da violação da condição 3.

Existem duas maneiras de satisfazer a condição 3. A primeira é não ter receptores com grupos metílicos nos estados  $m = 0$  ou  $m = M$ ,  $P_0 = P_M = 0$ , conforme  $m = 0$  em  $[L] = 10^5\mu M$  e  $m = 4$  em  $[L] = 1\mu M$  e  $10^1\mu M$ , na Fig. 1.13.1. A segunda é ter receptores nestes estados, mas apenas receptores inativo em  $m = 0$  e somente ativos em  $m = 4$ , que é satisfeita de forma aproximada no caso de  $m = 0$  com  $[L] = 1\mu M$  e  $m = 4$  com  $[L] = 10^5\mu M$ , Fig. 1.13.1. As outras configurações de  $m = 0$  e  $m = 4$  na Fig. 1.13.1 levam à adaptação imperfeita.

Portanto, para a maioria dos modelos essas três condições limitam o alcance da adaptação perfeita. Dependendo dos valores dos parâmetros utilizados no modelo

escolhido.

## 1.14 Contribuição da termodinâmica para quimiotaxia

A termodinâmica na quimiotaxia está diretamente relacionada ao consumo de energia que é necessário para que as bactérias possam desenvolver suas funções de sobrevivência. No caso da quimiotaxia, é preciso considerar não apenas a energia que alimenta a movimentação da bactéria no espaço, como também, aquela relacionada ao processamento da informação que dirige a quimiotaxia. O balanço energético no processamento da informação é o mais relevante para nós, e resulta de dois processos quimicamente comuns na bactéria *E. coli*: o processo da hidrólise (quebra de uma molécula por ação da molécula de água) da biomolécula SAM (S-adenosilmetionina, formada a partir da adenosina tri-fosfato - ATP e metionina) em dois aminoácidos Homocisteína/Adenosina e o processo de consumo de energia, dado pela dissipação. Juntos, esses dois processos, se tornam essenciais para o entendimento da adaptação. Em seu trabalho, Lan et al. (2012) [11] descrevem a relação entre o consumo de energia e a precisão na adaptação à variações no estímulo externo.

O sistema termodinâmico tende espontaneamente ao equilíbrio, no qual temos o estado de maior entropia, no entanto, veremos que não se consegue o processo de adaptação perfeita neste estado, isso por que para se conseguir a adaptação, que é regulada pela metilação/desmetilação, é necessário que o sistema funcione fora do equilíbrio, ou seja, que exista um consumo de energia.

Lan et al. (2012) [11], fornece alguns exemplos de consumo de energia pela bactéria *E. coli* no processo de quimiotaxia, são alguns deles: os movimentos de rotação do motor flagelar, a função de apagar a memória dos últimos estados de metilação (assunto tratado na seção 1.5) e o próprio fato do processamento das informações através das proteínas internas CheA, CheW e CheY, entre outras. Esse consumo de energia, necessariamente faz com que ocorra uma redução da entropia do sistema, mostrando que a quimiotaxia ocorre em um estado fora do equilíbrio. Neste mesmo trabalho, Lan reconhece que a precisão da adaptação é conduzida pela liberação de energia proveniente da enzima SAM, pela sua hidrólise, já que é através desse processo que ocorre a doação de grupos metílicos para os quimiorreceptores. Discute também que uma alta liberação de energia, com uma eficiência energética de 20%, consegue-

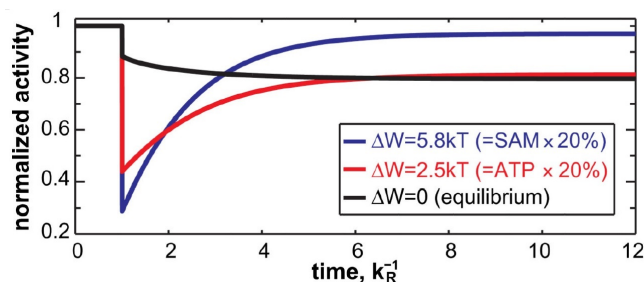


Figura 1.14.1 – Comparação da sensibilidade (queda na atividade) e da adaptação entre as biomoléculas SAM (linha azul), ATP (linha vermelha) e o sistema em equilíbrio (linha preta) [11]

se uma adaptação máxima de 99% e uma maior sensibilidade, se comparado com a biomolécula ATP, que, com a mesma eficiência, consegue uma adaptação máxima de aproximadamente 80%, conforme mostra a Fig. 1.14.1. Nesta mesma figura temos a adaptação e a sensibilidade do estado em equilíbrio, onde vemos que além da baixa adaptação, também não apresenta uma boa sensibilidade, tendo em vista que não existe um fluxo de transição energética e assim não temos um consumo de energia e o movimento da bactéria de forma necessária para se alimentar.

No processo de adaptação perfeita, através da metilação/desmetilação, a atividade consegue sempre retornar ao nível de atividade anterior, levando ao menor erro de adaptação possível. A grosso modo, esse comportamento regular e perfeito só pode acontecer se entendermos que as metilações/desmetilações obedecem uma sequência pre-definida para o modelo sequencial 1.11.1. No entanto, para o modelo sequencial é necessário que seja aceito o consumo de energia infinito o que, termodinamicamente, é inviável.

Para um melhor entendimento dos fluxos, neste trabalho, devemos diferenciar taxa de transição de fluxo de transição. O primeiro, define as transições entre dois estados de potenciais químicos diferentes, partindo do estado de maior potencial para o de menor. No estado de equilíbrio as taxas de transições podem não ser iguais. O segundo, define o fluxo líquido entre dois estados, considerando, as taxas de transições do maior potencial menos as taxas do menor potencial. O fluxo de transição no sistema em equilíbrio entre dois estados necessariamente é nulo.

Diante disso, Hill (2005) [12], em seus estudos, define que o consumo de energia, por meio da dissipação, tem início com a força termodinâmica referente a diferença de potencial químico. Na quimiotaxia, o consumo de potenciais químicos é calculado

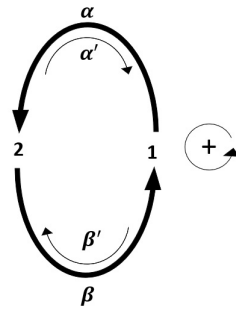


Figura 1.14.2 – Diagrama cinético representando os fluxos no sentido horário (influência termodinâmica) e anti-horário, que utilizado sozinho leva ao consumo infinito de energia. Sendo  $\alpha$ ,  $\alpha'$ ,  $\beta$  e  $\beta'$  as taxas de transição -  $\alpha$  e  $\beta$  as taxa de transição espontânea do sistema, devido o maior número de potencial químico existente, hora no estado 1, hora no estado 2. Figura retirada de Hill (2005) [12], com adaptações

através dos processos de metilação e desmetilação. Neste sentido, a diferença de potencial é responsável por determinar o sentido das taxas de transições, dentro do fluxo de transição, entre os estados de maior e menor número de potencial químico, sendo um estado mais, ou menos ativo, respectivamente. Desse modo, o consumo de energia na quimiotaxia é relacionado a metilação e desmetilação.

A indicação de apenas um sentido das taxas de transição possibilita que um processo termodinâmico possa influenciar na quimiotaxia, mostrando que, teoricamente, não se deve negligenciar os outros possíveis sentidos de taxas de transição no processo de metilação. Como exemplo, podemos citar a exigência de CheB apenas retirar grupos metílicos, mas nunca adicionar, o que seria uma relação inversa de sua função. Não negligenciar os possíveis sentidos das taxas de transição se torna necessário para impedir que exista um sistema que consuma energia infinita. Sendo assim, para evitar esse consumo infinito é preciso que exista uma taxa de transição no sentido contrário ao sentido principal (anti-horário), Fig. 1.14.2, mesmo que em proporções menores. A demonstração dessa taxa de transição, no sentido contrário, é explicada na seção 3.4, em termos das probabilidades de estado de cada população de sítios metílicos.

Hill (2005) [12] também demonstra que a força termodinâmica - diferença entre os potenciais químicos, que, operando sozinho, determina a direção dos processos em um diagrama cinético - movimenta o ciclo na direção principal. Isso corrobora a ideia de que a existência de uma taxa de transição no sentido principal também assegura que exista uma taxa de transição no sentido contrário ao principal.



## 1.15 Erro de adaptação( $\zeta$ ) e Ganho de resposta ( $\Gamma$ )

A rede de receptores é uma parte fundamental do modelo de quimiotaxia bacteriana. Os receptores recebem a entrada através dos ligantes, são modificados os *m*-estados pelo mecanismo de adaptação e fornecem a saída que controla a atividade quinase. Eles se reúnem em uma região da membrana celular, formando um cluster (aglomerado), que promove a interação entre os receptores, afetando um ao outro o nível de atividade e aumentando o ganho de resposta (sensibilidade).

Com base no que foi descrito até o momento nas seções 1.3, 1.7 e 1.8, sobre sensibilidade e adaptação, buscamos medir o comportamento da quimiotaxia, tendo como interesse a exploração dos efeitos da metilação, que obedecem os modelos sequencial e não-sequencial. Dessa forma, para caracterizarmos esse comportamento é necessário que sejam introduzidos e analisados duas propriedades-chaves, o erro de adaptação “ $\zeta$ ” e a sensibilidade, ou ganho de resposta “ $\Gamma$ ”.

O erro de adaptação ( $\zeta$ ) tem influência no comportamento das bactérias. Como vimos na seção 1.7, a adaptação é o mecanismo responsável pela capacidade que a bactéria tem de recuperar ao nível de atividade anterior após uma mudança dos estímulos, lembrando que ela consegue apenas identificar uma alteração na variação de estímulos. Esta relação direta da adaptação com a atividade mostra que quanto menor o erro de adaptação, mais a atividade caminha para a adaptação perfeita.

O ganho de resposta ( $\Gamma$ ), está diretamente relacionada com a capacidade dos estímulos de conectarem aos receptores fazendo com que diminua sua atividade, assim, o estado final do processo de ligação aos estímulos, tem como resposta a queda da atividade até imediatamente antes dela começar a retornar ao valor anterior. Quanto maior for a queda da atividade, mais sensível o sistema será. Essa ligação com a atividade faz com que possamos relacionar as duas propriedades chaves, montando um estudo mais detalhado através de equações, modelos e simulações.

Sabendo que a adaptação e o ganho de resposta são essenciais para entendermos a forma de sequência de preenchimento dos sítios (modelo sequencial e não-sequencial) foi possível mostrar, através das Fig. 3.2.3 e 3.3.3, das seções 3.2 e 3.3, o comportamento da atividade, evidenciando as diferenças de ganho de resposta e erro de adaptação em cada modelo de modificação.

Entre as duas propriedades,  $\Gamma$  e  $\zeta$ , existe uma relação de *trade-off*, ou seja, um compromisso entre as duas grandezas. Esse compromisso traz em seu conceito uma forma de concorrência na evolução dos seres vivos, tendo a ideia de que não existe um sistema que seja totalmente eficiente em todas as atividades relacionadas a sobrevivência, o que implica que um melhor funcionamento em uma característica, necessariamente, implica em um mal funcionamento em outra. Experimentalmente foi possível mostrar que esse compromisso entre as duas grandezas depende não apenas da sequencialidade, mas também da quantidade de sítios de modificação, seção 5.2.

Parte II

Modelos Matemáticos



## 2 Suporte ao Modelo Matemático

### 2.1 Associação de moléculas

Presente em todas as partes das células, as proteínas são as expressões moleculares das informações genéticas, sendo também, as biomoléculas mais presentes em uma célula [50]. As proteínas são macromoléculas fundamentalmente formadas por aminoácidos, onde, apenas 20 aminoácidos são capazes de formar qualquer proteína, independente da forma de vida [51]. Por serem moléculas dinâmicas, suas funções dependem, quase invariavelmente, de outras moléculas. Essa dependência faz com que suas funções sejam envolvidas por ligações reversíveis com outras proteínas ou moléculas, sendo essa outra molécula conhecida como "ligante"[50]. Esse processo de ligação permite que organismos possam responder às alterações ambientais de forma mais rápida e reversível.

As associações e dissociações das proteínas, na maioria das vezes, podem ser mostradas como uma expressão de equilíbrio [50], podendo ser descritas quantitativamente como:



Essa reação é caracterizada por uma constante de associação ( $K_a$ ) em equilíbrio, unidade  $M^{-1}$ , podendo ser descrita como a razão das concentrações de Proteínas-Ligantes  $[PL]$  pelo valor unitário das concentrações de Proteínas  $[P]$  e Ligantes livres em equilíbrio  $[L]$ , conforme abaixo

$$K_a = \frac{[PL]}{[P][L]}, \quad (2.2)$$

a contante  $K_a$  representa a afinidade do ligante pela proteína e quanto maior seu valor, maior será afinidade para ligação. Do mesmo modo, temos a constante de dissociação  $K$  que está definida inversamente da constante de associação. Quanto maior seu valor, maior é a incompatibilidade na ligação dos ligantes com os receptores.

Considerando  $K = \frac{1}{K_a}$  podemos ter a relação para a concentração de ligantes livres dada por

$$[L] = \frac{[PL]K}{[P]}$$

$$[PL] = \frac{[P][L]}{K}. \quad (2.3)$$

dessa forma, podemos, seguindo [50], definir a fração de proteínas ligadas ( $\theta$ ) como

$$\theta = \frac{[PL]}{[PL] + [P]}, \quad (2.4)$$

com  $[PL]$  representando o número de proteínas ligadas e  $[PL] + [P]$  o número total de proteínas (ligadas e desligadas). Usando a Eq. 2.3 na Eq. 2.4, temos:

$$\theta = \frac{[L]}{[L] + K}. \quad (2.5)$$

A Eq. 2.5 mostra que, se  $K = [L]$ , metade dos sítios de ligação estarão ocupados [50]. Esse é o valor ideal para que possamos ter uma boa sensibilidade, pois com metade dos receptores vagos existe ainda uma boa possibilidade de ocorrer a ligação dos ligantes Fig. 2.1.1a, sendo a sensibilidade relativa máxima, definida por  $[L]d\theta/d[L]$ , onde

$$\frac{d\theta}{d[L]} = \frac{K}{[L]^2} \frac{1}{(1 + K/[L])^2} = \frac{k}{([L] + k)^2}. \quad (2.6)$$

Assim, a Fig. 2.1.1b nos diz que o máximo de sensibilidade está diretamente ligada ao máximo da derivada no gráfico monolog. Desta forma, podemos dizer que a constante  $K$  tem influência direta com a capacidade de sensibilidade dos receptores, onde, para Mello e Tu (2003A) [52], a sensibilidade está relacionada diretamente com a ocupação do receptor em resposta a uma variação de  $[L]$  e que esta ocupação atinge seu valor máximo quando  $K = [L]$ .

É interessante lembrar que, para baixas concentrações,  $[L] \ll K$ , a Eq. 2.5 pode ser descrita como  $\theta = \frac{[L]}{K}$  e sendo  $K$  uma constante, o número de proteínas ligadas será proporcional à  $[L]$ , que facilmente podemos ver que teremos um crescimento linear. A medida que  $[L]$  se aproxima de  $K$ , o comportamento torna-se não linear, como pode ser visto na Fig. 2.1.1a. A Fig. 2.1.1b evidencia que  $K$  define a escala de valores de  $[L]$ .

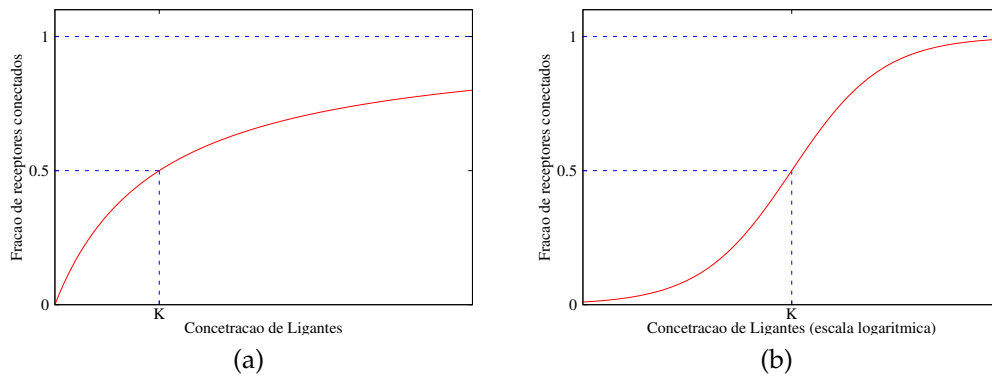


Figura 2.1.1 – Função  $\frac{[L]}{([L]+K)}$  em gráfico linear (a) e monolog (b).

## 2.2 Cooperatividades dos receptores - Modelo matemático

Como descrito na seção 1.8, a cooperatividade dos receptores pode ser demonstrada utilizando o modelo de Ising, para modelar como os receptores se comportam cooperativamente, quando estão na presença de um gradiente de estímulo. Assim, utilizando um modelo alostérico, na forma de ativo e inativo, fazemos uma comparação entre os receptores e os estados dos spins (spin-up e spin-down). Como descrito por Tu (2013) [8], as interações cooperativas receptor-receptor, entre os vizinhos mais próximos do aglomerado de receptor, pode ser modelado como ferromagnético, interação Ising spin-spin, que favorece que os receptores vizinhos tenham as mesmas conformações. Contudo, para um receptor ser considerado ativo ou inativo outros aspectos devem ser observados, tais como, se o receptor está ligado a um ligante e seu nível de metilação. Na descrição do estado de atividade, quatro estados devem ser levados em consideração, representados por  $a = 0, 1$ , respectivamente, para inativo e ativo, e  $l = 0, 1$ , respectivamente para não ligado e ligado. Devido a metilação, devemos considerar os estados ativos/inativos e ligado/não ligado à ligantes.

A atividade caracterizada por um par de variáveis binárias  $(a, l)$  é descrita considerando a população total dos receptores estarem no estado ativo e inativo, tanto com os receptores ligado ou não. Esta população é entendida como a probabilidade total, dada por  $p_{al}$  [53] e obedece o seguinte modelo matemático:

$$\frac{p_{01}}{p_{00}} = \frac{[L]}{K_i} \quad (2.7a)$$

$$\frac{p_{11}}{p_{10}} = \frac{[L]}{K_a} \quad (2.7b)$$

$$\frac{p_{10}}{p_{00}} = e^{-f_m(m)} \quad (2.7c)$$

onde  $[L]$  representa a concentração do ligante,  $K_i$  e  $K_a$  são constantes de dissociação e  $f_m(m)$  é a diferença de energia livre entre ativo e inativo na ausência de ligante, tendo dependência do estado de metilação do receptor. A relação 2.7c aplica-se apenas a receptores isolados de seus vizinhos.

A atividade média do receptor  $\langle a \rangle$  é encontrada utilizando as possibilidades dadas pela Eq. 2.7 para os estados ativos, ligados e não ligados, da seguinte forma:

$$\langle a \rangle = \sum_{a=0}^1 \sum_{l=0}^1 a p_{al} = p_{10} + p_{11} \quad (2.8)$$

$$\langle a \rangle = p_{10} \left( 1 + \frac{[L]}{K_a} \right). \quad (2.9)$$

A probabilidade  $P_{10}$ , estado ativo e não ligado, é encontrado considerando a condição de normalização  $\sum_{a,l} p_{a,l} = 1$  e substituindo de acordo com as Eq. 2.7

$$\sum_{al} p_{al} = p_{00} + p_{01} + p_{10} + p_{11} = 1, \quad (2.10)$$

$$p_{10} = \frac{1}{e^{+f_m(m)} \left( 1 + \frac{[L]}{K_i} \right) + \left( 1 + \frac{[L]}{K_a} \right)}. \quad (2.11)$$

Substituindo a Eq. 2.11 na Eq. 2.9 chegamos a:

$$\langle a \rangle = \frac{1}{1 + e^{f_m(m)} \frac{1 + \frac{[L]}{K_i}}{1 + \frac{[L]}{K_a}}}, \quad (2.12)$$

onde é analogamente comparada com o atividade média de um dipolo magnético dado por duas possibilidades de estado de energia:

$$\langle a \rangle = \frac{1}{1 + e^{-\Delta f}}. \quad (2.13)$$



Sendo  $\Delta f$  o campo magnético do dipolo, podemos compara-lo com a Eq. 2.12 encontrando o análogo do campo magnético para a atividade media de um receptor, conforme mostrado em [8]

$$e^{-\Delta f} = e^{f_m(m)} \frac{1 + \frac{[L]}{K_i}}{1 + \frac{[L]}{K_a}}. \quad (2.14)$$

$$\Delta f = -f_m(m) - \ln \left( \frac{1 + \frac{[L]}{K_i}}{1 + \frac{[L]}{K_a}} \right). \quad (2.15)$$

levando-se em conta que o tipo de contribuição de  $\Delta f$  é análogo ao campo magnético, orientando os receptores, justifica-se o uso do modelo de Ising. Portanto, por suas características internas e externas ao receptor podemos utilizar  $\Delta f_{m,[L]}$  (representando o campo externo) e  $C$  (fator de interação entre os receptores), mostrando a equação de energia como:

$$H(a) = C \sum (2a - 1)(2a - 1) - \Delta f(m_i, [L]) \sum a_i \quad (2.16)$$

Para este trabalho cada receptor é dado por  $T_{qmla}$  dependente de quatro parâmetros ( $q, l, m$  ou  $\vec{m}$  e  $a$ ), conforme descrito na tabela 2.

Para o modelo MWC, citado na seção 1.8, Mello e Tu (2005) [40] reformularam a energia (hamiltoniana) atribuída ao cluster, constituídos por  $N$  receptores, como:

$$H_{MWC} = (E + \epsilon \sum_i \sigma_i) a + \mu \sum_i \sigma_i, \quad (2.17)$$

em que cada receptor pode se ligar a uma molécula de ligante  $\sigma$  e a atividade  $a$  pode ser ativa ou inativa;  $E$  é a diferença de energia entre os estados ativo e inativo na ausência de ligante; cada receptor ocupado reduz a atividade, aumentando a energia do estado ativo em  $\epsilon > 0$ ;  $\mu$  é a energia para a ligação do ligante no estado inativo e depende da concentração do ligante  $[L]$  e de uma constante de dissociação,  $K_i$ .

## 2.3 Formulação e estrutura do modelo matemático

O modelo matemático leva em conta, assim como estudado por Mello e Tu (2003A, 2003B) e Tu (2013), duas escalas de tempo diferente: uma referente a ligação do

Tabela 2 – Tipo de variáveis para cada receptor da *E. coli* utilizado neste trabalho

VARIÁVEL	SIGNIFICADO
$q$	É um dos cinco quimiorreceptores responsáveis por detectar os estímulos, conforme seção 1.3. No nosso estudo consideramos $q = 1$ para receptores sensíveis a concentração de estímulo e $q = 2$ para todos os outros tipos de receptores.
$m$	Utilizado no modelo sequencial, Fig. 1.11.1, sendo o nível de metilação descrito por um escalar, que os quatro sítios vagos para os grupos metílicos são preenchidos de forma sequencial.
$\vec{m}$	Utilizado no modelo não-sequencial, (Fig. 1.11.2), sendo que cada componente pode ter valor 0 ou 1, existindo $2^M$ possibilidades de preencher os receptores com os grupos metílicos.
$l$	Atribui os valores $l = 0$ , ou $l = 1$ para o receptor vago ou ligado a ligante, respectivamente.
$a$	Representa a atividade do receptor, sendo $a = 1$ para o estado ativo e $a = 0$ para o estado inativo.

estímulo no receptor e da interação da atividades entre receptores, que é considerado muito rápida, e outra referente ao processo de metilação que tem uma velocidade muito menor. O processo de ligação do estímulo ao receptor, devido a maior velocidade, pode ser considerado quasi-estático (estado estacionário). O processo de metilação lento, tem influência no tempo necessário para se alcançar a adaptação.

Usando o tipo de receptor descrito na tabela 2, seção 2.2, a energia  $H_{q\vec{m}la}$  do receptor é dado por

$$H_{q\vec{m}la} = \mu_{qa}l + (E_{q\vec{m}}^M + E_q^C)a \quad (2.18)$$

que conta com as contribuições internar e externas (metilação, estímulo ligados e interação com receptores vizinhos), sendo  $\mu_{qa}l$  a afinidade de ligação entre o ligante e o receptor,  $E_{qm}^M$  (energia livre) a dependência da metilação e  $E_q^C$  a interação com receptores vizinhos. Neste trabalho consideramos que toda a energia está em unidade de  $K_B T$ .

Em termos individuais da energia dada por 2.18 temos o potencial ativo ( $\mu_q^A$ ) que é encontrado considerando os estados possíveis de ligação ( $l = 0, 1$ ) no estado

ativo, da seguinte forma:

$$H_{q\bar{m}l1} = \mu_q^A l + (E_{q\bar{m}}^M + E_q^C) \quad (2.19)$$

onde, conforme citado na seção 2.2 e com o incremento aqui da dependência do tipo de quimiorreceptor  $q$  e metilação  $m$  temos como probabilidade para o receptor ligado ao ligante, para os estados ativos,  $P_{qmla}$ , o seguinte,

$$P_{qm11} = \frac{e^{-(\mu_q^A l + (E_{qm}^M + E_q^C))}}{Z}, \quad \text{com } Z = e^{-(E_{qm}^M + E_q^C)} + e^{-(\mu_q^A l + (E_{qm}^M + E_q^C))}, \quad (2.20)$$

e assim,

$$P_{qm11} = \frac{1}{1 + e^{+\mu_q^A}}, \quad (2.21)$$

sendo  $Z$  a função partição para os dois estado possíveis de ligação do receptor.

Para  $P_{qmla}$  dependendo diretamente da concentração de estímulos no ambiente, quanto maior a concentração maior as chances de ligação de um ligante ao receptor. Sendo sua variação no tempo dada por:

$$\frac{dP_{qmla}}{dt} = -k_{q1}P_{qm1a} + k_{q0}[L_q]P_{qm0a}, \quad (2.22)$$

assim, com  $k_{q0}$  e  $k_{q1}$  sendo constantes de acoplamento e  $[L_q]$  a concentração de ligantes podemos, a partir do estado estacionário  $\frac{dP_{qmla}}{dt} = 0$ , definir ( $\mu_{qa}$ ):

$$-k_{q1}P_{qm1a} + k_{q0}[L_q]P_{qm0a} = 0. \quad (2.23)$$

Substituindo  $\frac{k_{q0}}{k_{q1}}$  por  $\frac{1}{K_q^A}$ , como constante de acoplamento, temos,

$$P_{qm1a} = \frac{1}{K_q^A}[L_q]P_{qm0a}. \quad (2.24)$$

Dessa forma, podemos encontrar a razão entre receptores ligados e não ligados Eq. 2.25. Usando a Eq. 2.20, com  $l = 0, 1$ , chegamos ao potencial de estado ativo ( $a = 1$ ) da seguinte forma:

$$\frac{P_{qm1a}}{P_{qm0a}} = \frac{[L_q]}{K_q^A} \quad (2.25)$$

$$\frac{[L_q]}{K_q^A} = \frac{P_{qm11}}{P_{qm01}} = \frac{e^{-(\mu_q^A + (E_{qm}^M + E_q^C))}}{e^{-(E_{qm}^M + E_q^C)}} = e^{-\mu_q^A} \quad (2.26)$$

$$\frac{[L_q]}{K_q^A} = e^{-\mu_q^A} \quad (2.27)$$

$$\mu_q^A = \log \frac{K_q^A}{[L_q]}. \quad (2.28)$$

Aplicando a Eq. 2.28 na Eq. 2.21, podemos mostrar a relação de afinidade com a concentração de ligante citada na seção 2.1, conforme abaixo:

$$\begin{aligned} P_{q\vec{m}11} &= \frac{1}{1 + e^{\log \frac{K_q^A}{[L_q]}}} \\ &= \frac{1}{1 + \frac{K_q^A}{[L_q]}} \\ &= \frac{1}{\frac{[L_q] + K_q^A}{[L_q]}} \\ &= \frac{[L_q]}{[L_q] + K_q^A} \end{aligned} \quad (2.29)$$

que vai ao encontro do que foi demonstrado no comportamento das proteínas na seção 2.1.

Assumindo que é constante o potencial químico  $\mu_{qa}$  para cada tipo de ligante  $q$  e que a metilação contribui de forma linear para a energia livre  $E_{q\vec{m}}^M$  [52], [54], temos:

$$E_{q\vec{m}}^M a = (\alpha_0 + a_q \alpha) (\vec{m}_q - m_0) \quad (2.30)$$

sendo  $\alpha_0$  a energia inicial atribuída antes da metilação subsequente,  $\alpha_q$  a diferença de energia entre os estados ativos e inativos provocada pela metilação de um sítio metílico,  $\vec{m}_q$  é o estado atual do nível de metilação,  $m_0$  é o nível médio de metilação na ausência de estímulos. Dessa forma, em  $E_{q\vec{m}}^M a$  o estado de atividade do receptor depende do nível de metilação.

Para o modelo sequencial (sem a contribuição termodinâmica) o processo de adição de grupos metílicos são feitos por CheR em sítios vazios quando os receptores estão apenas no estado inativo ( $a = 0$ ), a remoção é feita por CheB apenas em receptores ativos ( $a = 1$ ). Mais adiante veremos que com a contribuição termodinâmica essa restrição para a metilação não é observada, tendo em vista que o modelo sequencial é energeticamente inviável.

Para o efeito da interação entre receptores vizinhos dado por  $E_q^C$  na Eq. 2.18, temos:

$$E_q^C = \sum_{i \in n.n.} C_{qq_i}(a_i - 0,5) \quad (2.31)$$

sendo  $C_{qq_i}$  dependente da interação entre os receptores  $q$  e  $q_i$ . Para preservarmos a simetria temos que  $C_{qq'} = C_{q'q}$  e entre os receptores ativos e inativos usamos o termo 0,5.

$$E_q^C a = \sum_{i \in n.n.} C_{qq_i}(a_i - 0,5)a = \sum_{i \in n.n.} C_{qq_i}(a_i - 0,5)(a - 0,5) + 0,5 \sum_{i \in n.n.} C_{qq_i}a_i \quad (2.32)$$

Dessa forma, com exceção de um termo constante, representamos a contribuição dos receptores vizinho como:

$$E_q^C a = \sum_{i \in n.n.} C_{qq_i}(a_i - 0,5)(a - 0,5) \quad (2.33)$$

onde utilizando as equações 2.28, 2.30 e 2.33 a Hamiltoniana para cada receptor pode ser escrita, conforme abaixo:

$$H = (\alpha_0 + a_q \alpha)(\vec{m}_q - m_0) + l \log \frac{K_q^A}{[L_q]} + \sum_{i \in n.n.} C_{qq_i}(a_i - 0,5)(a - 0,5). \quad (2.34)$$

## 2.4 Influência de $\alpha$ na energia do receptor

Conforme citado na seção 1.7, o efeito da variação de  $L$  na atividade é compensado por uma variação de  $m$ , que faz com que a atividade retorne ao valor adaptado. Para que isso ocorra, a alteração na energia, que a mudança de  $L$  provoca na Eq. 2.34, deve ser compensada por uma mudança em  $m$ . A relação entre os valores de  $[L]$  e  $m$  que se compensam mutuamente é definida pelo parâmetro  $\alpha$ . Dessa forma, o valor de  $\alpha$  controlará a amplitude de  $m$ , que definimos como a diferença entre o valor da metilação adaptada em concentrações saturantes e na ausência de estímulo:

$$\Delta \langle m \rangle^{\text{adapt}} = \langle m \rangle_{[L]=\infty}^{\text{adapt}} - \langle m \rangle_{[L]=0}^{\text{adapt}} \quad (2.35)$$

Assim como mostramos a atividade média pela Eq. 2.12, na seção 2.2, podemos desconsiderar na Eq. 2.34 a relação de cooperatividade entre o receptor e seus vizinhos (que será aproximadamente constante devido à adaptação perfeita) e mostrar que a atividade média pode ser obtida, conforme abaixo:

$$\langle a \rangle (\langle m \rangle, [L]) = \frac{1}{\frac{1 + \frac{[L]}{K_0} e^{\alpha(\langle m \rangle - m_0)} + 1}{1 + \frac{[L]}{K_1}}}. \quad (2.36)$$

Supondo que  $\langle a \rangle$  deve ser constante,  $a(\langle m \rangle_{[L]=0}^{\text{adapt}}, [L]=0) = a(\langle m \rangle_{[L]=\infty}^{\text{adapt}}, [L]=\infty)$ , concluímos que

$$\begin{aligned} \langle a \rangle (\langle m \rangle_{[L]=0}^{\text{adapt}}, [L]=0) &= \langle a \rangle (\langle m \rangle_{[L]=\infty}^{\text{adapt}}, [L]=\infty) \\ \frac{1}{e^{\alpha(\langle m \rangle_{[L]=0}^{\text{adapt}} - m_0)}} &= \frac{1}{\frac{K_1}{K_0} e^{\alpha(\langle m \rangle_{[L]=\infty}^{\text{adapt}} - m_0)}} \\ e^{\alpha(\langle m \rangle_{[L]=0}^{\text{adapt}} - m_0)} &= \frac{K_1}{K_0} e^{\alpha(\langle m \rangle_{[L]=\infty}^{\text{adapt}} - m_0)} \\ \frac{K_0}{K_1} &= e^{\alpha(\langle m \rangle_{[L]=\infty}^{\text{adapt}} - \langle m \rangle_{[L]=0}^{\text{adapt}})} \\ \alpha(\langle m \rangle_{[L]=\infty}^{\text{adapt}} - \langle m \rangle_{[L]=0}^{\text{adapt}}) &= \log \frac{K_0}{K_1} \\ \langle m \rangle_{[L]=\infty}^{\text{adapt}} - \langle m \rangle_{[L]=0}^{\text{adapt}} &= \frac{\log \frac{K_0}{K_1}}{\alpha} \end{aligned} \quad (2.37)$$

A demonstração via simulação que o nível  $m$  é controlado pelo parâmetro  $\alpha$ , para a metilação sequencial, é mostrado na seção 5.6.

## 2.5 Razão entre probabilidade - Modelo sequencial e não-sequencial (variável “ $\eta$ ”)

Na seção 1.12, definimos que variável  $\eta$  controla as transições entre o modelo sequencial e não-sequencial. Matematicamente podemos representar as taxas de modificações sequenciais por  $k_{\text{seq}}^+$  e  $k_{\text{seq}}^-$  e as taxas de modificações não-sequenciais por  $k_{\text{random}}^+$  e  $k_{\text{random}}^-$ , representadas respectivamente pelas setas pretas e cinzentas da Fig. 1.11.2. Em um sistema completamente aleatório,  $k_{\text{seq}}^+ = k_{\text{random}}^+$  e  $k_{\text{seq}}^- = k_{\text{random}}^-$ . No modelo

parcialmente sequencial, as transições aleatórias não são proibidas, embora menos prováveis do que as modificações sequenciais. A relação entre estas duas probabilidades é a quantidade

$$\eta = \frac{k_{\text{random}}^+}{k_{\text{seq}}^+} = \frac{k_{\text{random}}^-}{k_{\text{seq}}^-} \quad (2.38)$$

As modificações sequenciais e não-sequenciais correspondem, respectivamente, a  $\eta = 0$  e  $\eta = 1$ , ou seja,  $\eta$  mede o grau de sequencialidade na qual os sítios metílicos pode ser metilados ou desmetilados, sendo os valores intermediários de  $\eta$  as modificações parcialmente sequenciais.

Por meio de simulações estudaremos como o parâmetro de sequencialidade  $\eta$  afeta o desempenho da via de quimiotaxia bacteriana para diferentes valores dos parâmetros-chave  $\alpha$ ,  $m_0$  e  $C$ . Em particular, estudamos como  $\eta$  afeta a distribuição do nível de metilação  $P_m$ , população dos sítios metílicos nos  $m$ -estado, e seus efeito na precisão de adaptação  $\zeta^{-1}$  e ganho de resposta  $\Gamma$ .

## 2.6 A atividade do receptor depende de modificações acumulativas (totais)

Uma única entrada (concentração de  $[L]$ ) pode modificar vários sítios de maneiras semelhantes, o estado  $m$  contém informações sobre a intensidade e a duração da entrada, funcionando como um acumulador do sinal de entrada, memória do sinal anterior. Considere o caso de uma quinase com concentração  $[E^+]$  (aumento da atividade) e uma fosfatase com concentração  $[E^-]$  (diminuição da atividade) operando nos sítios de metilação dos receptores. Na quimiotaxia, essas proteínas são, respectivamente, a CheR e a CheB. O número de sítios modificados é positivamente afetado pela taxa de metilação,  $k_{m,i}^+[E^+]$  e negativamente afetado pela taxa de modificação reversa,  $k_{m,i}^-[E^-]$ . Essas taxas podem ser diferentes para cada sítio alvo  $i$  e  $m$ -estado  $\vec{m}$ , resultando em um valor diferente relacionado a cada seta da Fig. 1.11.2.

O  $m$ -estado de uma proteína com  $M$  sítios de modificação é descrito pelo vetor

$$\vec{m} = [m_1, m_2, \dots, m_M] \quad (2.39)$$

onde o estado do sítio  $i$  é indicado pelo valor de  $m_i$ , que é 0 para não-modificado e 1 para modificado. Isso resulta em  $2^M$   $m$ -estados como os dezesseis  $m$  estados mostrados na Fig. 1.11.2 para  $M = 4$ . Os estados  $m$  podem, em princípio, armazenar  $2^M$  valores numéricos diferentes, como é o caso da representação binária nos computadores. Empregar este esquema para implementar processamento quantitativo requeriria maquinário celular para codificar a entrada na atualização do estado  $m$  e decodificar o estado  $m$  na saída [55]. Assim, um processamento de dados quantitativo que conseguisse entender os códigos numéricos como um computador.

A variável  $m$  escalar só pode ser usado para descrever o nível de metilização, se os quatro sítios são ocupados sequencialmente. De outro modo, a metilação deve ser descrita por um vetor  $\vec{m}$ , com quatro elementos cada um deles, assumindo o valor 0 ou 1, conforme mencionado na tabela 2 da seção 2.2. Isto não é uma questão de menor importância, tendo em vista que a adaptação perfeita (Eq. 3.13) só pode ser obtida através da ocupação sequencial dos sítios de metilação [42].

A solução provavelmente mais simples para lidar com quantidades numéricas é tornar a saída proporcional ao nível de modificação, ou nível de  $m$ , definido como

$$m = |\vec{m}| = \sum_{i=1}^M m_i. \quad (2.40)$$

Existem evidências deste efeito aditivo de modificação em diferentes sítios [10] [56], onde ocorre o efeito acumulativo das modificações.

Os modelos de dinâmica de modificação podem basear-se na evolução da distribuição  $m$ -estado nas populações de receptores, estado  $P_{\vec{m}}$ . No entanto, as descrições, usando quantidades médias, são mais simples e muitas vezes contém todas as informações relevantes. Duas médias convenientes são:

$$P_m = \sum_{|\vec{m}|=m} P_{\vec{m}}, \quad (2.41)$$

$$\langle m \rangle = \sum_{|\vec{m}|=m} m P_m, \quad (2.42)$$

$m$  é de particular interesse, porque pode funcionar como uma quantidade de pontos flutuantes para implementar mecanismos que lidam com grandezas numéricas de mesma espécie, como as concentrações químicas ou o tempo. Por ser uma média das



metilações em cada receptor e depender do tempo de exposição da concentração de atratores, esses parâmetros podem ser variáveis que controlam esse mecanismo.

## 2.7 Mecanismo de retroalimentação integral para uma adaptação perfeita

Prosseguindo a discussão iniciada na seção 1.13, o processo de retroalimentação (Feedback) é o controle exercido por um sinal no mecanismo que gera o próprio sinal [57]. Para Yi et al. (2000) [58], o controle de feedback integral é uma estratégia básica de engenharia para garantir que a saída de um sistema rastreie de maneira robusta o valor desejado, independentemente do ruído ou das variações nos parâmetros do sistema. A quimiotaxia bacteriana [34] [37] é um exemplo bem estabelecido de retroalimentação [42] [48] em caminhos biológicos.

A concentração de estímulo  $[L]$  é a entrada da via de quimiotaxia bacteriana e tem um efeito negativo na atividade  $a$  da quinase CheA. A atividade  $a$  é a saída do sistema e depende também da metilação do receptor, que é o estado  $m$ . Uma característica notável da quimiotaxia bacteriana é a adaptação perfeita da atividade CheA, após uma perturbação na atividade provocada por uma mudança em  $[L]$ . A atividade adaptada é o estado estacionário da Eq. 3.1, conforme será mostrado na seção 3.2.2,

$$k^+(1 - \langle a \rangle_{\text{adapt}}) - k^- \langle a \rangle_{\text{adapt}} = 0. \quad (2.43)$$

A atividade adaptada resultante desta expressão é perfeita porque não depende dos valores de  $\langle m \rangle$  ou  $[L]$ . A adaptação perfeita é uma propriedade estrutural do sistema e não como resultado do ajuste fino de seus parâmetros [38]. Os modelos atuais são robustos devido ao feedback integral no mecanismo de adaptação [58]. Os motivos para um sistema robusto na quimiotaxia, estão descritos na seção 1.13.

A adaptação é alcançada pelo ajuste do nível  $m$  que compensa a variação na atividade causada pela mudança de  $[L]$ . Assim, a atividade depende do nível  $m$  e da concentração do ligando  $[L]$  de forma complicada, mas seu valor médio pode ser aproximado como a função  $a(\langle m \rangle, [L])$ . Esta função pode ser usada para obter o  $m$ -nível

adaptado que compense a entrada em cada concentração  $[L]$ ,

$$a(m_{adapt}, [L]) = a_{adapt} \quad (2.44)$$

## 2.8 Consumo energético para um sistema quimiotático fechado

Pelo diagrama cinético, mostrado na Fig. 1.14.2, e pelo fluxo de transição é possível representar a relação das taxas de transições espontâneas de um sistema que consome energia com,

$$J_{1 \rightarrow 2}^{\alpha} = \alpha p_1 - \alpha' p_2 \quad (2.45a)$$

$$J_{2 \rightarrow 1}^{\beta} = \beta p_2 - \beta' p_1 \quad (2.45b)$$

No equilíbrio temos,

$$J_{1 \rightarrow 2}^{\alpha} = J_{2 \rightarrow 1}^{\beta} = 0, \quad (2.46)$$

sendo  $J$  o fluxo de transição líquido,  $\alpha$  e  $\beta$  as taxas de transições no sentido principal,  $\alpha'$  e  $\beta'$  as taxas de transições no sentido contrário e  $p_1$  e  $p_2$  as populações dos estados 1 e 2. Fora do equilíbrio temos o consumo de energia dado por:

$$\phi = X_{\alpha} J_{1 \rightarrow 2}^{\alpha} + X_{\beta} J_{2 \rightarrow 1}^{\beta}, \quad (2.47)$$

onde  $X_{\alpha}$  e  $X_{\beta}$  são, respectivamente, a energia livre consumida na reação  $\alpha_{1 \rightarrow 2}$  e  $\beta_{2 \rightarrow 1}$ .

Entende-se como espontâneo processo irreversível, que consome energia química e que move o sistema em direção ao equilíbrio. No equilíbrio, o fluxo entre dois estados é o mesmo nas duas direções de cada reação, resultando em um fluxo líquido nulo. No entanto, também é possível que as populações dos estados não sejam iguais, pois se o fluxo de transição em um dos sentidos for muito maior que o outro, neste caso, teremos necessariamente um número maior na população no estado cujo o fluxo maior se direciona. Para o sistema fora do equilíbrio o processo espontâneo (taxa de transição espontânea) é compensado necessariamente por uma taxa de transição no sentido contrário, o que é o caso deste trabalho.

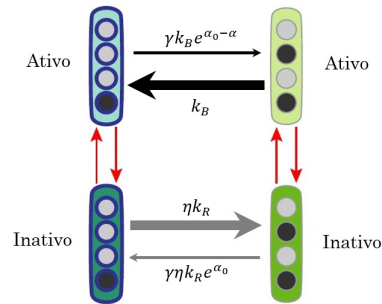


Figura 2.8.1 – Representação da diferença de energia entre dois estados. Setas pretas representam o consumo de energia proveniente da perda de grupos metílicos do estado energeticamente maior. Setas cinzas representam o consumo de energia pela adição de grupos metílicos doados pela molécula SAM, através de sua hidrólise

Portanto, com base no que descrevemos nessa seção, para a influência da termodinâmica na quimiotaxia, introduzimos o fator  $\gamma$  que varia de  $0 \leq \gamma \leq 1$  e que tem como efeito gerar um fluxo contrario a qualquer fluxo principal, evitando a existência de um consumo infinito de energia. Para este trabalho,  $\gamma$  deve ser acrescentado às equações do modelo sequencial e não-sequencial, conforme demonstrado na seção 3.5. A taxa de consumo de energia com  $\gamma = 0$  é infinita e  $\gamma = 1$  corresponde ao equilíbrio termodinâmico. Sistemas que consomem energia para desempenhar suas funções operam em uma situação intermediária, ou seja,  $0 < \gamma < 1$ .

No caso da metilação e desmetilação nos receptores, a diferença das espessuras das setas pretas e cinzas, mostrada na Fig. 2.8.1, caracteriza a diferença de energia entre as taxas de transições (sentido principal e contrário) entre os dois estados metilados. No caso das setas cinzas, a diferença de energia é causada pela hidrólise da molécula SAM no ganho do grupo metílico, discutido na seção 1.14. Para as setas pretas a diferença de energia está relacionada com a perda do grupo metílico. Em ambos os casos, a diferença de energia é responsável pelo sentido do fluxo de transição líquido entre os dois estados. Para efeito do consumo de energia no sentido contrário ao principal, a variável  $\gamma$  é considerada igual nos dois processos, tanto na perda como no ganho do grupo metílico. Para este modelo, o mais importante é o fator  $\gamma$ , tanto para metilação como para desmetilação, existente no fluxo contrário, pois, como vimos, é a partir dele que temos a restrição ao consumo infinito de energia.

## 2.9 Processo de Markov de tempo contínuo

O processo de Markov é um processo estatístico que existindo vários estados, descreve a probabilidade de transição discreta ou contínua. Assim, considerando uma matriz  $T$  um gerador infinitesimal do processo de Markov de tempo contínuo podemos descrever a evolução de um vetor  $\vec{x}$ . A propriedade  $|\vec{x}| = \sum_{i=0}^Z x_i = 1$ , para o vetor  $\vec{x}$ , garante que o autovalor seja encontrado em algum dos sítios metálicos dentro do vetor.

Para a matriz Markoviana  $T$  devemos ter as seguintes propriedades:

$$\sum_{i=0}^Z T_{ij} = 0 \quad (2.48a)$$

$$T_{ii} \leq 0, \quad (2.48b)$$

sendo  $Z$  o número total para cada modelo analisado. A propriedade 2.48a garante que o módulo de  $|\vec{x}|$  não seja alterado, fazendo com que todos os estados da coluna da matriz  $T$  somados seja iguala zero, garantindo que a taxa de transição de saída e de entrada entre os estados possíveis esteja em equilíbrio. O termo  $T_{ii}$  negativo, garante a distribuição da metilação entre os sítios, assegurando também que não haja probabilidade negativa em nenhum estado possível da matriz. Assim, o valor de  $T_{ii}$  representa a redução da população de um estado devido às transições para outros estados, enquanto  $T_{0i}, T_{1i}, T_{2i}, \dots, T_{Ni}$  são as contribuições provenientes das transições a partir de outros estados. A propriedade 2.48b também descreve a existência, ou não, de troca de transições entre os sítios metálicos, pois se  $T_{ii} = 0$  para algum valor de  $i$ , significa que não existe uma transição, o que leva todos os outros estados serem zerados, com exceção do próprio estado  $i$ .

Para uma evolução temporal dada por um vetor  $\langle \vec{x} \rangle$  definido por

$$\frac{d\langle \vec{x} \rangle}{dt} = T\vec{x}, \quad (2.49)$$

sistemas lineares, com a matriz  $T$  agindo no vetor  $\vec{x}$ , possuem soluções do tipo:

$$T\vec{\mu}_i = \lambda_i\vec{\mu}_i \quad (2.50)$$

sendo  $\lambda_i$  os autovalores e  $\mu_i$  os autovetores. Assim, utilizando as Eq. 2.49, 2.50 temos como solução, definido  $\langle \vec{x}(t) \rangle$  como

$$\langle \vec{x}(t) \rangle = \sum c_i \mu_i \implies c_i = e^{\lambda_i t}, \quad (2.51)$$

onde  $c_i$  é uma constante.

Devido a características da matriz Markoviana  $T$ , os autovalores  $\lambda_i$  da matriz são negativos, resultando em contribuição dos autovetores que decaem com o passar do tempo, exceto por um, que é nulo,  $\lambda_0$ , que corresponde ao estado estacionário. No nosso problema, a matriz  $T$  depende da atividade dos receptores, motivo pelo qual varia com o tempo. Uma vez que a matriz  $T$  não é constante os autovetores também não são e, assim, não podemos definir um único valor para o tempo de decaimento  $\tau = 1/\lambda_i$  independente da amplitude da perturbação. Nesse trabalho definiremos  $\tau$  como o limite obtido para pequenas perturbações, quando a resposta do sistema é linear. Essa resposta é obtida calculando-se  $\tau$  com o sistema no estado estacionário. O estado estacionário, corresponde ao autovetor  $\mu_0$ , que é igual a população média dos receptores encontrada na simulação de Monte-Carlo.



### 3 Modelo Matemático da Dinâmica de Metilação e Efeito Termodinâmico

A existência de dois esquemas de ordens de metilação, sequencial e não-sequencial, devem ser analisados de forma individual. Na metilação não-sequencial, as taxas de modificação  $k_m^+$  e  $k_m^-$ , Eq. 3.3, são iguais para os dois modelos. Dessa forma, não existe uma preferência de posição para metilação, ocorrendo a possibilidade de distribuição de grupos metílicos em qualquer sitio de metilação, das  $2^M$  possibilidades existentes, mostrado pelas setas cinzas da Fig. 1.11.2 da seção 1.11, sendo  $M$  o número sítios metílicos no receptor. Já a modificação sequencial segue uma sequência precisa, que depende do vizinho mais próximo, resultando em  $M + 1$ , estados, conforme ilustrado pelos cinco estados da Fig. 1.11.1 para  $M = 4$ . As taxas de transição dos modelos não-sequencial não são acessíveis para o modelo sequencial.

As equações que descrevem a dinâmica de metilação da população  $P_m$  dos sítios metílicos são mostradas na Fig. 3.0.1. As setas cinza claro indicam uma metilação de  $P_m$  para o estado subsequente  $P_{m+1}$  com uma taxa  $k_m^+$ , ou uma desmetilação por  $k_m^-$  para o estado anterior  $P_{m-1}$ . Setas cinza escuro indicam a passagem do estado  $P_{m-1}$  ou de  $P_{m+1}$  para  $P_m$ , respectivamente por  $k_m^-$  e  $k_m^+$ .

Dessa forma, considerando a dinâmica de metilação/desmetilação no tempo para cada receptor,  $\frac{dP_m}{dt}$ , assumindo  $0 \leq m \leq M$ , com  $m = 1 \dots M$ , a população de  $P_m$  obedece, para o modelo sequencial com  $\eta = 0$ ,

$$\frac{dP_m}{dt} = -k_m^+ P_m - k_m^- P_m + k_{m-1}^+ P_{m-1} + k_{m+1}^- P_{m+1}, \quad (3.1)$$

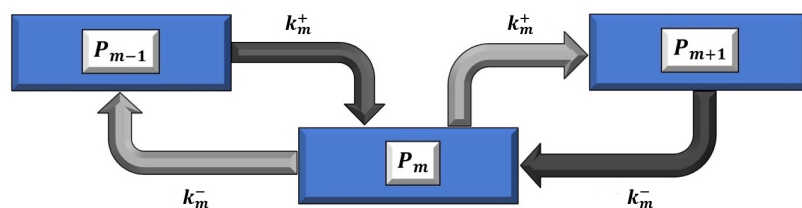


Figura 3.0.1 – Esquema simplificado da dinâmica de metilação da população de sítios metílicos. Setas cinzas claras são os fluxos de saída em  $P_m$ . Setas cinzas escuras são os fluxos de entrada de  $P_m$ .

$$\frac{dP_0}{dt} = -k_0^+ P_0 + k_1^- P_1, \quad (3.2a)$$

$$\frac{dP_M}{dt} = -k_M^- P_M + k_{M-1}^+ P_{M-1}, \quad (3.2b)$$

no entanto, para o modelo não-sequencial, com  $\eta = 1$ ,  $P_m$  segue equações diferentes:

$$\begin{aligned} \frac{dP_m}{dt} = & -(M - m)k_m^+ P_m - mk_m^- P_m \\ & + (M - m + 1)k_{m-1}^+ P_{m-1} \\ & + (m + 1)k_{m+1}^- P_{m+1}. \end{aligned} \quad (3.3)$$

$$\frac{dP_0}{dt} = -k_0^+ MP_0 + k_1^- P_1, \quad (3.4a)$$

$$\frac{dP_M}{dt} = -k_M^- MP_M + k_{M-1}^+ P_{M-1}, \quad (3.4b)$$

### 3.1 Dinâmica de metilação do receptor: modificação sequencial versus não-sequencial

No modelo de Ising para os receptores, cada receptor tem duas conformações, ativa ( $a = 1$ ) e inativa ( $a = 0$ ), sendo separadas por uma diferença de energia livre  $\Delta f(m, [L])$ , mencionada na seção 2.15, que depende do nível de modificação total do receptor  $m$  e a concentração de ligantes  $[L]$  da seguinte forma:

$$\Delta f(m, [L]) = -\ln \frac{1 + \frac{[L]}{K_I}}{1 + \frac{[L]}{K_A}} - \alpha(m - m_0), \quad (3.5)$$

onde  $K_I$  e  $K_A$  são constantes de dissociação do ligante para a forma inativa e ativa do receptor e  $\alpha$  e  $m_0$  são dois parâmetros constantes do modelo.

Como vimos na seção 1.8, os quimiorreceptores bacterianos formam aglomerados polares e as interações entre os receptores dentro do "cluster" podem ser descritas por um modelo do tipo Ising com interação com um vizinho mais próximo com força  $C$ , dado pela Eq. 2.34 da seção 2.3. Uma vez que tanto a ligação do ligante quanto as mudanças conformacionais do receptor ocorrem em escalas de tempo muito mais



rápidas que o processo de modificação do receptor, a aproximação do estado quasi-estacionário pode ser usada para calcular a atividade média do receptor  $\langle a \rangle$  para uma dada distribuição ("estável") do nível de modificação do receptor.

Para uma proteína com  $M$  sítios de modificação, temos um total de estados  $2^M$  possíveis de serem modificados, caracterizados por um vetor multidimensional  $\vec{m} = (m_1, m_2, \dots, m_M)$ , em que o número binário  $m_i = 0, 1$  representa o estado metilado e não-metilado do sítio  $i = 1, 2, \dots, M$ . O nível total de metilação do receptor é dado por:  $\vec{m} \equiv \sum_{j=1}^M m_j$ .

Para o caso geral, quando o sítio  $i$  é metilado ( $m_i = 1$ ), a taxa de metilação do sítio  $i + 1$  no  $m$ -estado é dada pela taxa de metilação sequencial  $k_m^+$ ; caso contrário, como será visto pela Fig. 3.4.2 na seção 3.5, a metilação do local  $i + 1$  ainda pode ocorrer por meio do processo de metilação não-sequencial com uma taxa menor  $k_{\text{random}}^+ = \eta k_m^+$  com  $0 \leq \eta \leq 1$ . Da mesma forma, quando o sítio  $i$  está desmetilado ( $m_i = 0$ ), a taxa de desmetilação do local  $i - 1$  no  $m$ -estado é dada pela taxa de desmetilação sequencial  $k_m^-$ ; caso contrário, a desmetilação do local  $i - 1$  ocorre através do processo de desmetilação não-sequencial com uma taxa menor  $k_{\text{random}}^- = \eta k_m^-$ .

O caso do modelo sequencial mostrado na Fig. 1.11.1 corresponde a  $\eta = 0$ . O caso do modelo não-sequencial corresponde a  $\eta = 1$ , onde a taxa de modificação de um determinado sítio é independente do estado de modificação do sítio vizinho.

Em alguns sistemas, podemos assumir uma dependência linear de uma propriedade  $a$  da molécula modificada,

$$k_m^+ = k^+(1 - \langle a \rangle_m), \quad (3.6a)$$

$$k_m^- = k^-\langle a \rangle_m, \quad (3.6b)$$

sendo  $\langle a \rangle_m$  o valor médio de  $a$ , entre moléculas com  $m$ -nível ( $m$ ).

Para a dinâmica de metilação, consideramos os fluxos de saída proporcional à população de  $P_m$  e os fluxos de entrada proveniente de  $P_{m-1}$  e  $P_{m+1}$ , sendo, respectivamente, o primeiro, segundo, terceiro e quarto termo da parte direita das equações 3.1 e 3.3.

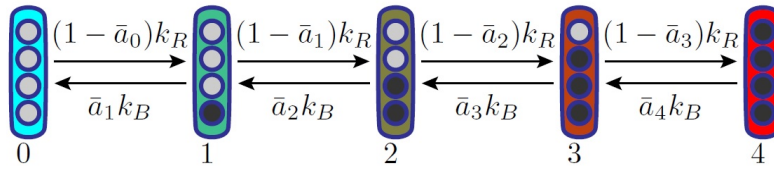


Figura 3.2.1 – Taxa de metilação para adicionar e remover grupos metílicos dos receptores, obedecendo o modelo sequencial

### 3.2 Modelo Matemático Metilação Sequencial

Dada a dependência linear de  $a$ , mostrada pela taxa de metilação na Fig. 3.2.1 e pela Eq. 3.6, substituímos a Eq. 3.1 na derivada do tempo da Eq. 2.42, da seção 2.6, conforme descrito abaixo:

$$\frac{d\langle m \rangle}{dt} = k^+(1 - \langle a \rangle) - k^-\langle a \rangle + \epsilon. \quad (3.7)$$

Assumimos também que o termo “ $\epsilon$ ” da Eq. 3.7 vem da não validade da Eq. 3.1 para  $m = 0$  e  $m = M$ , que será demonstrado na seção 3.2.1. Este termo é a principal fonte de erro do mecanismo com modificação sequencial discutido na seção 2.7.

Lembrando a divisão em três processos (entrada, alteração dos sítios metílicos e resultado) a Eq. 3.7 descreve a evolução do valor médio do nível  $\langle m \rangle$ , em termos da variável global  $\langle a \rangle$  que, neste caso, desempenha o papel de entrada. A Eq. 3.7 pode ser usada para descrever mecanismos integrais em processos celulares representados por funções matemáticas que dependem apenas do valor médio da entrada, do nível- $m$  e da saída. Esta importante propriedade não é compartilhada pelo modelo não-sequencial.

Assim, como observado na seção 1.12, a implementação da metilação sequencial exige que um sítio dependa do estado de metilação dos outros sítios. Uma maneira simples de se conseguir isso é ter duas proteínas modificadoras que detectam o estado do sítio  $i \pm 1$  ao realizar a modificação do sítio alvo  $i$ . Uma proteína só deve modificar o sítio  $i$  se o sítio  $i - 1$  já estiver modificado. Reciprocamente, uma proteína modificadora reversa só deve desmetilar o sítio  $i$  quando o sítio  $i + 1$  não é modificado. Diferentes regras aplicam-se aos sítios 0 e  $M$ , que não dependem do estado de modificação de outros sítios para serem modificados e modificados reversivelmente, respectivamente. As transições governadas pelas taxas  $k^+(1 - \langle a \rangle_m)$  e  $k^-\langle a \rangle_m$  permitidas por este mecanismo são as setas pretas na Fig. 1.11.2, resultando na dinâmica e nos  $m$ -estados da Fig.

## 1.11.1.

No entanto, conforme explicado na seção 1.14, a existência de uma molécula que atua exclusivamente em uma única direção do mecanismo de metilação não é realista do ponto de vista termodinâmico, que, como vimos, exigiria uma quantidade infinita de energia para prevenir completamente a reação das taxas de transições inversas. Na Seção 3.5, discutimos em detalhes como o modelo pode ser corrigido termodinamicamente.

## 3.2.1 Erro de adaptação

Com visto na seção 1.13, existem três condições para que se ocorra a adaptação perfeita. A condição 3 (garante que a metilação do receptor  $m = M$  e a desmetilação do receptor  $m = 0$  deve ser zero) é a aproximação que permite assumirmos a validade da Eq. 3.1 para todos os valores de  $m$ , sendo para  $m = 0$  e  $m = M$ , usadas as equações 3.2a e 3.2b, respectivamente, que resume as condições que os sítios podem ser metilados e desmetilados de acordo com a necessidade do receptor.

Ao substituir a Eq. 3.1 para  $0 < m < M$ , e considerar a Eq. 3.2 para  $m = 0$  e  $m = M$  na derivada de tempo da Eq. 2.42, podemos escrever o erro  $\epsilon$  da Eq. 3.7 conforme descrito abaixo,

$$\begin{aligned}
\frac{d\langle m \rangle}{dt} &= \sum_{m=0}^M m \frac{dP_m}{dt} \\
&= - \sum_{m=0}^{M-1} m k_m^+ P_m - \sum_{m=1}^M m k_m^- P_m + \sum_{m=0}^{M-1} (m+1) k_m^+ P_m + \sum_{m=1}^M (m-1) k_m^- P_m \\
&= + \sum_{m=0}^{M-1} k_m^+ P_m - \sum_{m=1}^M k_m^- P_m \\
&= + \left[ \sum_{m=0}^M (k_m^+ P_m) - k_M^+ P_M \right] - \left[ \sum_{m=0}^M (k_m^- P_m) - k_0^- P_0 \right]
\end{aligned} \tag{3.8}$$

Assim, usando a equação 3.6, considerando  $\sum_0^M P_m = 1$  e assumindo que  $k^+$  somente adiciona grupos metílicos à receptores no estado inativo e que  $k^-$  retira apenas de receptores ativos, temos,

$$\frac{d\langle m \rangle}{dt} = k^+ (1 - \langle a \rangle) - k^- \langle a \rangle - k^+ (1 - \langle a \rangle_M) P_M + k^- \langle a \rangle_0 P_0. \tag{3.9}$$

Dessa forma, podemos estabelecer que o erro de adaptação  $\epsilon$ , mostrado na Eq. 3.7, é definido por

$$\epsilon = -k^+ (1 - \langle a \rangle_M) P_M + k^- \langle a \rangle_m P_0. \quad (3.10)$$

Este erro é o motivo da condição 3, que matematicamente pode ser expressa como

$$k^+ (1 - \langle a \rangle_M) P_M = k^- \langle a \rangle_m P_0. \quad (3.11)$$

Portanto, a Eq. 3.7 estabelece que a adaptação perfeita depende das três condições descritas na seção 1.13. Se essas condições são violadas, a adaptação impulsiona a atividade para valores diferentes a cada mudança na concentração de estímulos  $[L]$ . No entanto, mesmo neste caso, a escolha adequada dos parâmetros pode levar a pequenos erros no nível de atividade adaptada, podendo ser indistinguível da adaptação perfeita, se a resposta do sistema global for a única propriedade avaliada. Contudo, como será mostrado na seção 3.3, um pequeno ganho na resposta pode ser o custo quando a adaptação perfeita é conseguida ajustando os parâmetros de um sistema que viole a condição 2 (modificação sequencial).

### 3.2.2 Adaptação com metilação sequencial

A atividade adaptada resulta na linha aproximadamente horizontal mostrada na Fig. 3.2.2, sendo a violação da condição 3, da seção 1.13, a causa do erro de adaptação nos valores limite do nível  $m$ . Contudo, mesmo na presença desses desvios na curva de atividade adaptada, é possível conseguir uma boa adaptação se os parâmetros dinâmicos impedirem a ocorrência desses valores extremos e a curva de atividade adaptada for interceptada pelas curvas de  $[L]$  constante somente em seu segmento quase horizontal.

A Fig. 3.2.3 representa a resposta do sistema a uma mudança repentina na concentração de estímulo. O aumento de estímulo  $[L]$  reduz instantaneamente a atividade para o valor previsto pela função  $a = (\langle m \rangle, [L])$ . Assim, a flecha vertical representa a inibição da atividade, induzida pelo aumento da concentração do ligante  $[L2]$  para  $[L3]$ . A atividade alterada desencadeará o mecanismo de adaptação e o nível médio do receptor  $m$  aumentará até atingir o nível de atividade adaptado. O processo de adaptação ocorre a uma taxa muito menor do que a resposta instantânea. A flecha inclinada

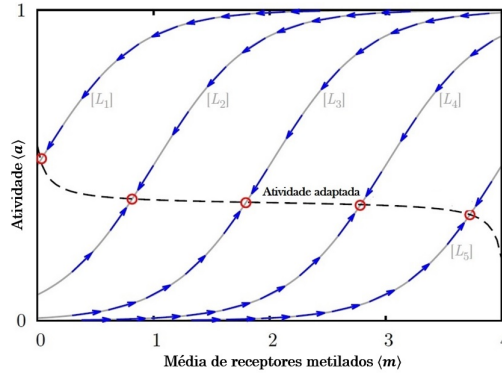


Figura 3.2.2 – As curvas esboçam a atividade em função da metilação média para cada concentração de ligando  $[L1] < [L2] < [L3] < [L4] < [L5]$ . Eles não foram obtidos a partir de um modelo matemático realista e são funções escolhidas para apresentar o comportamento esperado. As setas representam a dinâmica de metilação lenta descrita pela Eq. 3.7. Nas fronteiras de  $m$  ( $m_0$  e  $m_4$ ) observamos uma divergência da atividade adaptada devido a violações da condição 3.

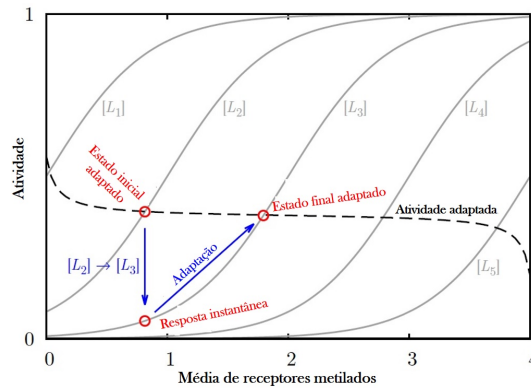


Figura 3.2.3 – Com as mesmas curvas que as da Fig. 3.2.2, um aumento súbito na concentração do ligante de  $[L2]$  para  $[L3]$ , provoca uma mudança rápida na atividade, representada pela seta vertical, seguida pela adaptação mais lenta, representada pela linha inclinada.

mostra que a adaptação leva o sistema a um estado final adaptado com um nível  $m$  mais elevado e uma atividade aproximadamente igual ao pré-estímulo  $a$ , compensando o aumento da concentração do ligante  $[L]$ .

Assim, é comum assumir que a atividade das proteínas CheR e CheB são funções lineares de  $a$  [43], dadas respectivamente pelas equações 3.6a e 3.6b, da seção 3.1, com as concentrações CheR e CheB incorporada em  $k_m^+$  e  $k_m^-$ . Portanto, assumindo  $\epsilon \approx 0$  na Eq. 3.10, a Eq. 3.7 depende somente da atividade. Em Lan (2011) [54], a condição 3, da seção 1.13, é assumida desconsiderando, na Eq. 3.9, a população dos sítios metílicos limites,  $m_0$  ( $P_0$ ) e  $m_4$  ( $P_M$ ). Desta forma, podemos escrever a adaptação da atividade no estado padrão  $\frac{d\langle m \rangle}{dt} = 0$ , como:

$$\frac{d\langle m \rangle}{dt} = k^+(1 - \langle a \rangle) - k^-\langle a \rangle + \epsilon$$

$$0 = k^+ - k^+ \langle a \rangle_{\text{adapt}} - k^- \langle a \rangle_{\text{adapt}} \quad (3.12)$$

$$\langle a \rangle_{\text{adapt}} = \frac{k^+}{k^+ + k^-}. \quad (3.13)$$

assim, a adaptação perfeita não dependendo da concentração de estímulo, caracterizando a adaptação perfeita.

O valor da constante dada pela Eq. 3.13 não é o caso geral, quando se pensa no grande número de possibilidades de reações químicas que controlam a adaptação na quimiotaxia bacteriana. Em muitos sistemas, a adaptação da atividade será uma função de outros tipos de variáveis, onde, diferentemente da adaptação perfeita, elas podem depender da concentração de estímulo  $[L]$ , conforme será visto na seção 3.3. Os desvios da modificação sequencial estrita resultam em preencher todos os estados de  $2^M$  mostrado na Fig. 1.11.2.

### 3.3 Modelo Matemático e dinâmica da metilação não-sequencial

Conforme mencionado na seção 3.2.1, alguns ajustes nos parâmetros, como a violação da condição 2 (metilação sequencial), da seção 1.13, podem levar a uma adaptação parcial, que tem como principal ponto negativo a existência de um pequeno ganho de resposta (sensibilidade). Essa consequência é evidenciada com a metilação não-sequencial discutida nessa seção, dada pela equação:

$$\frac{d \langle m \rangle}{dt} = k^+ \langle (M - m)(1 - a_m) \rangle - k^- \langle ma_m \rangle. \quad (3.14)$$

Este caso, corresponde ter a mesma taxa de transição de probabilidade de qualquer estado para qualquer  $m \pm 1$  estados de metilação, resultando na taxa de probabilidade mostrada na Fig. 3.3.1. Assim, para a dinâmica de metilação não-sequencial, devemos considerar a dependência linear de  $a$ , mostrada pela taxa de metilação na Fig. 3.3.1.

Substituindo a Eq. 3.3 na derivada do tempo da Eq. 2.42, seção 2.6, temos

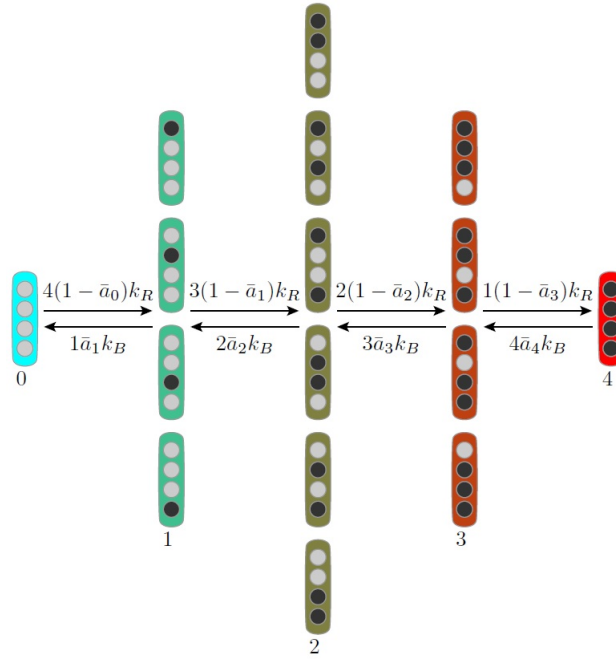


Figura 3.3.1 – Taxas de transição do modelo de metilação não sequencial com números de sítios metílicos  $M = 4$ ,  $\eta = 1$  na Fig. 1.11.2. A probabilidade de adicionar e remover um grupo metilo é, respectivamente, proporcional ao número de sítios vazios e ocupado.

$$\begin{aligned} \frac{d\langle m \rangle}{dt} = & - \sum_{m=0}^{M-1} m(M-m)k_m^+ P_m - \sum_{m=1}^M m^2 k_m^- P_m \\ & + \sum_{m=0}^{M-1} (M-m)(m+1)k_m^+ P_m \\ & + \sum_{m=1}^M m(m-1)k_m^- P_m, \end{aligned} \quad (3.15)$$

$$\frac{d\langle m \rangle}{dt} = - \sum_{m=0}^{M-1} (M-m)k_m^+ P_m - \sum_{m=1}^M m k_m^- P_m \quad (3.16)$$

Usando a Eq. 3.6 e  $\epsilon \equiv 0$  chegamos à dinâmica da metilação não-sequencial, dada

$$\begin{aligned} \frac{d\langle m \rangle}{dt} = & \langle (M-m)(1-a_m) \rangle k^+ - \langle ma_m \rangle k^- \\ = & M(1 - \langle a_m \rangle) k^+ - \langle m \rangle k^+ + \langle ma_m \rangle (k^+ - k^-). \end{aligned} \quad (3.17)$$

Enquanto no modelo sequencial a dinâmica da metilação depende apenas da atividade média  $\langle a \rangle$  (com  $\epsilon \approx 0$ ), no modelo não-sequencial, conforme visto pela Eq. 3.17, o estado padrão depende diretamente de  $\langle m \rangle$  e  $\langle ma_m \rangle$ .

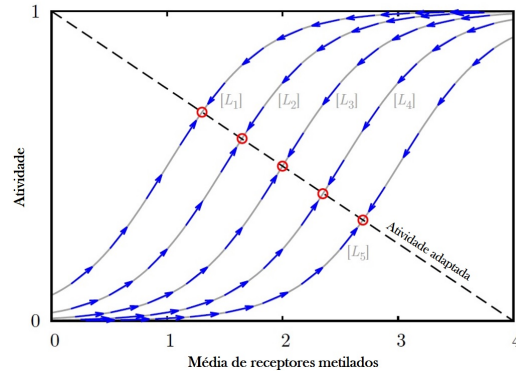


Figura 3.3.2 – Curvas semelhantes às da Fig. 3.2.2, agora para a metilação completamente não sequencial, que implicam na linha de atividade adaptada inclinada, a Eq. 3.18 com  $k_R = k_B$ . Comparado a essa regra, as curvas  $[L]$  constantes foram ajustadas para se aproximarem, visando a redução do erro de adaptação.

Se assumirmos o caso particular  $k^+ = k^-$  teremos no estado padrão  $\frac{d\langle m \rangle}{dt} = 0$ ,

$$M(1 - \langle a_m \rangle)k^+ - \langle m \rangle k^+ = 0$$

$$M(1 - \langle a_m \rangle) - \langle m \rangle = 0$$

$$\langle a_m \rangle = \frac{M - \langle m \rangle}{M}. \quad (3.18)$$

Assumindo novamente que a atividade média  $\langle a \rangle$  está escrita como uma função de  $\langle m \rangle$  e  $[L]$ , então a Fig. 3.3.2 é capaz de representar a dinâmica da atividade no modelo de metilação não-sequencial. Vemos que ao invés de ser constante, conforme mostrado para o modelo de metilação sequencial, através da Fig. 3.2.2, a atividade média do modelo não-sequencial tem dependência direta com a concentração de estímulos  $[L]$ . Com as curvas  $[L]$  mais próximas, ocorre uma redução do erro de adaptação quando variamos  $[L]$ .

Os efeitos de uma mudança repentina na concentração de estímulo pode ser visto na Fig. 3.3.3. Analogamente à metilação sequencial, a linha vertical é a resposta à mudança na concentração de estímulo. A menor distancia entre as curvas  $[L]$  gera uma linha vertical menor, dessa forma, a resposta também se torna pequena. A linha inclinada representa a adaptação, resultando em diferentes níveis de adaptação da atividade, mostrando que não existe a adaptação perfeita.

Portanto, no modelo de metilação não-sequencial, é possível ter um erro de adaptação arbitrariamente pequeno, juntando as curvas para  $[L]$  constante. No entanto,



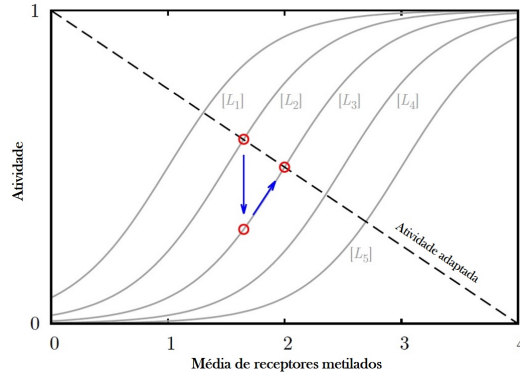


Figura 3.3.3 – Um aumento súbito na concentração do ligando de [L2] para [L3] com as curvas da Fig. 3.3.2. Em comparação com a Fig. 3.2.3, o mesmo estímulo resulta agora em uma resposta menor, devido à proximidade das curvas [L] constantes no caso presente. Além disso, os estados adaptados antes e depois do estímulo são diferentes.

ele vem com um preço de ter uma resposta reduzida, em comparação com a resposta das curvas espalhadas do caso perfeitamente sequencial. Uma análise do trade-off (compromisso) entre resposta e ruído, do ponto de vista do teorema da flutuação-dissipação pode ser encontrada em [59], que demonstra que, em sistemas com equilíbrio termodinâmico, não é possível se conseguir simultaneamente um alto ganho de sensibilidade e um pequeno erro de adaptação.

Os números inteiros que multiplicam as taxas de transição da Eq. 3.3 são os fatores entrópicos responsáveis pela adaptação menos precisa da modificação não-sequencial em comparação com a modificação sequencial. Esses fatores impedem a existência de uma equação para o nível  $m$  que dependa apenas de  $\langle a \rangle$  como é o caso da Eq. 3.7 para modificação sequencial.

Uma dinâmica de adaptação perfeita de  $m$  para a modificação não-sequencial pode ser alcançada se  $\langle a \rangle_{m^*-1} \approx 0$  e  $\langle a \rangle_{m^*} \approx 1$ , para um dado  $m$ -nível  $m^*$ . Neste caso, os dois únicos estados significativamente preenchidos são  $m^* - 1$  e  $m^*$ ,  $p_{m^*-1} + p_{m^*} \approx 1$  e  $\langle a \rangle \approx p_{m^*}$ . Nessa situação, as aproximações  $\langle m \rangle \approx m^* + \langle a \rangle - 1$  e  $\langle m^* a \rangle \approx m^* \langle a \rangle$  podem ser usadas e a Eq. 3.17 pode ser reescrita como

$$\frac{d\langle m \rangle}{dt} = (M + 1 - m^*)k^+ + m^* \langle a \rangle (k^+ - k^-) \quad (3.19)$$

que não depende de  $\langle m \rangle$ .

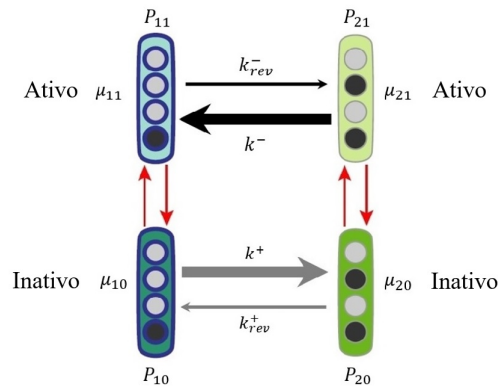


Figura 3.4.1 – Representação do fluxo de transição para a metilação e desmetilação, sendo  $k^-$  e  $k^+$  as taxas principais e  $k_{rev}^-$  e  $k_{rev}^+$  as taxas de transições contrárias. Setas vermelhas representam a energias da transição devido aos estados ativo e inativo pela ligação do ligante ao receptor.

### 3.4 Efeito termodinâmico

Devido as necessidades apontadas na seção 1.14, foi preciso adequar o modelo matemático de metilação da seção 3.2, que implica em consumo infinito de energia. Com isso, para fazer esse ajuste, é preciso que exista uma mudança conceitual nas taxas de transição mostradas na seção 3.2.2, Eq. 3.6, levando a três tipo de sistema de consumo de energia: Modelo ideal (consumo infinito), em equilíbrio e fora e equilíbrio. Com o auxílio da Fig. 3.4.1, podemos montar as novas taxas de transição para o modelo não-sequencial que garante a não existência do consumo infinito de energia.

Tabela 3 – Variáveis que descrevem o fluxo contrário ao principal, obedecendo o efeito termodinâmico.

VARIÁVEIS	DESCRIÇÃO
$P_{ma}$	Probabilidade do sítio estar no estado $m, a$ , onde $m$ é o número de sítios metilados e $a$ é a atividade do receptor, conforme descrito na seção 2.2.
$\mu_{\bar{m}a}$	Potencial químico, sendo $\bar{m}$ o sítios específico metilado.
$k^-$	Taxa de transição de CheB no sentido anti-horário (sentido principal), que retira grupo metílico.
$k_{rev}^-$	Taxa de transição de CheB no sentido horário (reverso), que adiciona grupo metílico.
$P_{ma} = \frac{e^{-\mu_{ma}}}{Z}$	Distribuição de Boltzmann com $Z$ sendo a função partição.

Considerando o fluxo de transição da parte superior da Fig. 3.4.1 em equilíbrio temos,

$$\begin{aligned} k_{\text{rev}}^- P_{11} &= k^- P_{21} \\ \frac{k_{\text{rev}}^-}{k^-} &= \frac{e^{-\mu_{21}}}{e^{-\mu_{11}}} = e^{-\mu_{21} + \mu_{11}} \end{aligned}$$

$$k_{\text{rev}}^- = k^- e^{-\mu_{21} + \mu_{11}}. \quad (3.20)$$

Sendo  $k_{\text{rev}}^-$  e  $k^-$  taxas de transições da proteína CheB que possibilitam, respectivamente, adicionar e remover grupos metílicos, obedecendo o que foi dito na seção 2.8. A Eq. 3.20 implica no fluxo de transição líquido igual a zero. Contudo, é necessário que exista quatro potenciais químicos ( $\mu_{\bar{m}a}$ ) bem definidos, que regulam a transição mostrada na Fig. 3.4.1, para que possamos dizer que o sistema está em equilíbrio.

A partir da equação de equilíbrio e considerando o fluxo de transição, seção 2.8, podemos demonstrar o modelo de consumo infinito. Para isso, devemos considerar que não exista o fluxo no sentido contrário na Eq. 3.20, ou seja, na Fig. 3.4.1  $k_{\text{rev}}^- = 0$ . Assim teremos,

$$\begin{aligned} k_{\text{rev}}^- &= k^- e^{-\mu_{21} + \mu_{11}} \\ 0 &= k^- e^{-\mu_{21} + \mu_{11}} \end{aligned} \quad (3.21)$$

para ser verdadeira essa igualdade, o termo  $-(\mu_{21} - \mu_{11})$  deve ser igual a infinito, assim,

$$\begin{aligned} -\mu_{21} + \mu_{11} &= \infty \\ \mu_{21} &= \mu_{11} + \infty, \end{aligned} \quad (3.22)$$

ou seja, para prevenir completamente o taxa de transição  $k_{\text{rev}}^-$ , no sentido contrário ao sentido  $k^-$ , o potencial químico do estado  $\mu_{21}$  deveria ser infinitamente maior do que do estado  $\mu_{11}$ . Assim, o estado  $P_{21}$  teria uma energia muito alta, se comparada com a energia média disponível, tornando-se inacessível e fazendo com que o modelo seja termodinamicamente inviável.

Essa afirmação corrobora com a ideia descrita na seção 1.14, onde, a existência de uma taxa de transição para um lado, necessariamente deve permitir que exista

uma transição no sentido contrário. Com isso, conseguimos mostrar a necessidade da existência de  $k_{\text{rev}}^-$  contrário a  $k^-$ .

No caso do sistema fora de equilíbrio devemos fazer com que a Eq. 3.20 garanta a existência de um fluxo contrário, no entanto, também devemos assegurar que o fluxo no sentido principal seja maior. Para isso temos,

$$k^- > k_{\text{rev}}^- e^{+\mu_{21}-\mu_{11}}, \quad (3.23)$$

sendo que o sinal de maior refere-se ao consumo de energia, descrito na seção 2.8. Com isso, conseguimos inserir a variável  $\gamma$  que tem como função regular o consumo de energia durante a metilação e desmetilação, fazendo a transição entre os três tipos de sistemas: modelo ideal, definido pela Eq 3.21; fora do equilíbrio e equilíbrio.

Portanto, em um sistema fora de equilíbrio, consideramos  $\gamma$  na a Eq. 3.20 da seguinte forma,

$$k^- = \frac{1}{\gamma} k_{\text{rev}}^- e^{+\mu_{21}-\mu_{11}}, \quad (3.24)$$

definindo a taxa de transição contrária ao sentido principal como

$$k_{\text{rev}}^- = \gamma k^- e^{-\mu_{21}+\mu_{11}}. \quad (3.25)$$

sendo assim, entendendo  $(\alpha_0 + a\alpha)(m_i - m_0)$ , inserida na Hamiltoniana de energia total (Eq. 2.34) da seção 2.3, como parte responsável pela contribuição energética relativa à metilação/desmetilação, podemos reescrever a Eq. 3.25 da seguinte forma:

considerando para o estado ativo ( $a = 1$ ),

$$\begin{aligned} \mu_{21} &= (\alpha_0 + a\alpha)(m_i - m_0) \\ &= (\alpha_0 + 1\alpha)2 \\ &= 2\alpha_0 + 2\alpha \end{aligned} \quad (3.26)$$

$$\begin{aligned} \mu_{11} &= (\alpha_0 + a\alpha)(m_i - m_0) \\ &= (\alpha_0 + 1\alpha)1 \\ &= \alpha_0 + \alpha \end{aligned} \quad (3.27)$$

assim, temos a equação que descreve o fluxo contrário à desmetilação, representado pela seta preta mais fina na Fig. 3.4.1, como,

$$\begin{aligned} k_{\text{rev}}^- &= \gamma k^- e^{-(2\alpha_0+2\alpha)+(\alpha_0+\alpha)} \\ &= \gamma k^- e^{-\alpha_0-\alpha}. \end{aligned} \quad (3.28)$$

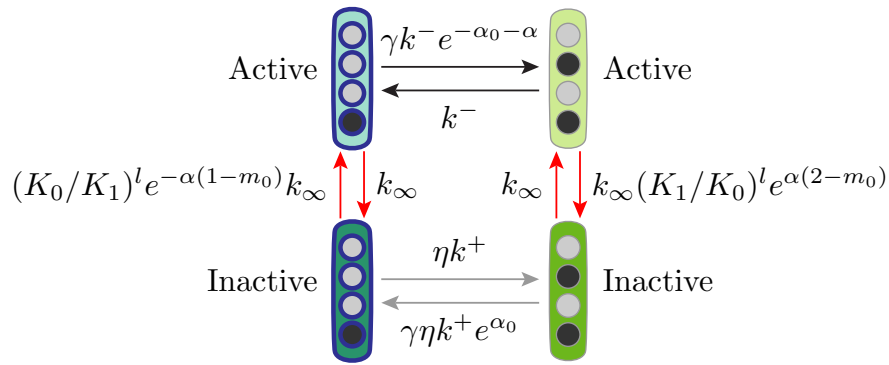


Figura 3.4.2 – Fluxo de transição entre os estados ativos e inativos, representando a contribuição termodinâmica nas modificações covalentes. Assumindo  $\gamma = 0$  temos as taxas de transições apenas para o modelo sequencial, com o consumo infinito de energia. Com  $\gamma = 1$  temos o modelo de modificação totalmente não-sequencial e o estado energético em equilíbrio.

VALORES DE “ $\gamma$ ”	TIPO DE SISTEMA DE CONSUMO DE ENERGIA
$\gamma = 0$	Modelo ideal (consumo infinito de energia)
$\gamma = 1$	Equilíbrio
$0 < \gamma < 1$	Fora do equilíbrio

Tabela 4 – Valores de  $\gamma$  para os três tipo de sistema de consumo de energia (modelo ideal, equilíbrio e fora do equilíbrio)

Para o fluxo contrário à metilação no estado inativo ( $a = 0$ ), representado pela seta cinza fina, encontramos, com o mesmo método matemático exposto a cima, a equação

$$k_{\text{rev}}^+ = \gamma k^+ e^{\alpha_0}. \quad (3.29)$$

Portanto, temos as representações matemáticas para os fluxos de transição mostrados na Fig. 3.4.1. Fazendo as devidas substituições para  $\gamma$  nas Eq. 3.28 e 3.29, conforme mostrado na tabela 4, que descreve um resumo dos valores de  $\gamma$  para cada modelo de consumo de energia, garantimos a existência dos três tipo de consumo de energia, onde claramente, para o modelo fora de equilíbrio, a variável  $\gamma$  deve ser  $0 < \gamma < 1$ . Assim a Fig. 3.4.1 pode ser representada de forma completa pela Fig. 3.4.2.

### 3.5 Fluxo termodinâmico

O mecanismo de modificação descrito pela Eq. 3.6 é adequado para uma descrição grosseira do mecanismo de metilação. No entanto, conforme explicado na seções 2.8 e 3.4, é errado do ponto de vista termodinâmico, uma vez que uma quantidade infinita de energia livre seria necessária para prevenir completamente a desmetilação de receptores inativos e a metilação de receptores ativos. Uma descrição termodinamicamente correta da dinâmica de metilação requer um hamiltoniano que descreva a diferença de energia entre os estados de metilação, conforme descrito pela Eq. 2.34.

A energia do processo de metilação dos receptores ativos e inativos são, respectivamente, os parâmetros  $\alpha$  e  $\alpha_0$  na Eq. 2.34. Ao usar essa energia, como forma dos potenciais químicos, dado pela seção 3.4, podemos descrever a relação entre as taxas de metilação em ambas as direções do caso em equilíbrio. A partir delas, reescrevemos a versão de equilíbrio das taxas de metilação média, Eq. 3.6, como

$$k_m^+ = k^+(1 - \langle a \rangle_m) + k^- \langle a \rangle_m e^{-\alpha - \alpha_0} \quad (3.30a)$$

$$k_m^- = k^- \langle a \rangle_m + k^+(1 - \langle a \rangle_m) e^{\alpha_0}. \quad (3.30b)$$

Essas equações garantem que não exista a dependência exclusiva de apenas um sentido para ser metilado/desmetilado. Em outras palavras, podem ocorrer a metilação mesmo que o receptor esteja no estado ativo e a desmetilação dos receptores no estado inativo. O que, para o modelo sequencial, é proibido.

A dinâmica fora do equilíbrio causa um desvio dos fluxos definidos pela Eq. 3.30, garantindo assim, que possa ocorrer a taxa de transição nos dois sentidos, conforme discutimos na seção 2.8. Usamos o parâmetro  $\gamma$ , para localizar o sistema entre o modelo não termodinâmico da Eq. 3.6 e em equilíbrio da Eq. 3.30, podendo escrever

$$k_m^+ = k^+(1 - \langle a \rangle_m) + k^- \langle a \rangle_m \gamma e^{-\alpha - \alpha_0} \quad (3.31a)$$

$$k_m^- = k^- \langle a \rangle_m + k^+(1 - \langle a \rangle_m) \gamma e^{\alpha_0}. \quad (3.31b)$$

O modelo de consumo de energia infinita da Eq. 3.6 corresponde a  $\gamma = 0$  e o equilíbrio corresponde a  $\gamma = 1$ .

Portanto, os fluxos relacionados às transições apontando para a direita e para a esquerda na Fig. 3.4.2 são dados, respectivamente, por:

$$J_{a\bar{m} \rightarrow a(\bar{m}+\bar{u})} = [k^+(1-a) + k^-a\gamma e^{-\alpha-\alpha_0}]P_{a\bar{m}} \quad (3.32a)$$

$$J_{a\bar{m} \rightarrow a(\bar{m}-\bar{u})} = [k^-a + k^+(1-a)\gamma e^{\alpha_0}]P_{a\bar{m}}, \quad (3.32b)$$

garantindo que, mesmo no estado ativo, possa ocorrer a adição de grupos metílicos e no estado inativo possa ocorrer a retirada de grupos metílicos dos receptores.

Na Eq. 3.32a,  $\bar{u}$  é um vetor unitário que representa o próximo local de modificação no modelo sequencial ou qualquer local de modificação disponível no modelo não-sequencial. O inverso na Eq. 3.32b. Se  $\eta$  estiver no intervalo  $0 < \eta < 1$ , as transições não-sequenciais, mostradas na Fig. 1.11.2 e detalhada pela Fig. 3.4.2, devem ser multiplicadas por  $\eta$ , sendo assim a uma taxa menor do que a transição sequencial.

### 3.6 Erro de adaptação “ $\zeta$ ” e Sensibilidade “ $\Gamma$ ”- Modelo matemático

Somente a estrutura da metilação sequencial e não-sequencial, descritas nas seções 1.6, 1.11 e 1.12, não define de forma exclusiva o desempenho do sistema. Ele depende também das taxas de transição e outros parâmetros do modelo matemático. Dessa forma, pela influência mostrada na seção 1.15, para escolher os parâmetros de cada modelo, usamos um critério que combina o ganho de resposta e o erro de adaptação, seguindo o processo de varredura que é demonstrado na parte de Métodos Numéricos, seção 4.2. Assim, a partir dos valores dos parâmetro iniciais, são encontrados novos valores, que, necessariamente, levam a um menor erro de adaptação e a uma maior sensibilidade.

As duas principais características de uma via de sinalização adaptativa são o ganho de sinal (sensibilidade) e a precisão de adaptação. Além de responder fortemente a uma mudança no estímulo, os receptores também devem responder em uma ampla faixa de concentração de estímulo de fundo. Para abordar simultaneamente estes dois aspectos, definimos a sensibilidade como,

$$\Gamma = - \int_{[L]_{\min} \rightleftharpoons [L]_{\max}} \frac{[L]}{\langle a \rangle^{\text{adapt}}([L])} \frac{\delta \langle a \rangle}{\delta [L]} \Bigg|_{m^{\text{adapt}}([L])} d \log_{10}[L], \quad (3.33)$$

sendo  $\delta \langle a \rangle$  a resposta imediata (rápida) na atividade, resultante de uma mudança infinitesimal (pequena)  $\delta [L]$  no estímulo, realizada com o sistema adaptado e com atividade  $\langle a \rangle$  no fundo de estímulo  $[L]$ . A atividade adaptada e o nível de metilação do receptor no fundo  $[L]$  são dados por  $\langle a \rangle^{\text{adapt}}([L])$  e  $\langle m \rangle^{\text{adapt}}([L])$ , respectivamente. O sinal negativo está presente para reproduzir os valores opostos de  $\delta [L]$  e  $\delta \langle a \rangle$  observados experimentalmente.

Para caracterizar a precisão da adaptação, em um amplo fundo de valores, definimos um erro geral de adaptação  $\xi$  como

$$\begin{aligned} \xi &= \int_{[L]_{\min}}^{[L]_{\max}} \frac{[L]}{\langle a \rangle^{\text{adapt}}} \left| \frac{d \langle a \rangle^{\text{adapt}}}{d [L]} \right| d \ln [L] \\ &= \ln \frac{a^{\text{adapt}}([L]_{\min})}{a^{\text{adapt}}([L]_{\max})}, \end{aligned} \quad (3.34)$$

assumindo que  $\langle a \rangle^{\text{adapt}}([L])$  é a atividade adaptada na concentração de ligantes  $[L]$ . A precisão de adaptação é definida como o inverso do erro de adaptação,  $\xi^{-1}$ . Detalhes da simulação de  $\Gamma$  e  $\xi$  são discutidos na seção 4.2.2.

Assim, temos que o desempenho do sistema, caracterizado pelo ganho  $\Gamma$  e pela precisão de adaptação  $\xi^{-1}$  depende de diferentes dinâmicas de metilação caracterizadas por  $\eta$ : sequencial ( $\eta = 0$ ), não-sequencial ( $\eta = 1$ ), ou em algum lugar intermediário ( $0 < \eta < 1$ ).

### 3.7 Tempo de relaxamento

Para calcular o tempo de relaxamento no estado estacionário de metilação definimos a distribuição  $P_{\vec{m}}$ , sendo um vetor com o mesmo número de componentes que o  $m$ -estado  $\vec{m}$ , do tipo,

$$\vec{m} = \begin{pmatrix} m_0 \\ m_1 \\ \vdots \\ m_M \end{pmatrix}_{M \times 1} \quad (3.35)$$



$$P_{\vec{m}} = \begin{pmatrix} P_0 \\ P_1 \\ P_2 \\ \vdots \\ P_n \end{pmatrix}_{2^M \times 1} \quad (3.36)$$

Os  $2^M$  estados  $\vec{m}$  podem ser referenciados por um número  $n$ , usando, por exemplo, a representação binária.

O vetor  $\vec{m}$ , Eq. 3.35, descreve as ocupações metálica dos sítios em cada estado  $m_0, m_1, \dots, m_M$ , com dependência da atividade, sendo um vetor de  $M + 1$  posições para o modelo sequencial ou não-sequencial. Já o vetor de população  $P_{\vec{m}}$ , Eq. 3.36, conta com  $M + 1$  componentes no modelo sequencial e  $2^M$  no não-sequencial.

A evolução temporal dada por um vetor  $P_{\vec{m}}$  é definida por:

$$\frac{d\vec{P}_{\vec{m}}}{dt} = T\vec{P}_{\vec{m}}. \quad (3.37)$$

A matriz  $T_{Nseq}$ ,

$$T_{Nseq} = \begin{pmatrix} T_{00} & T_{01} & T_{02} & T_{03} & T_{04} & \dots & T_{0n} \\ T_{10} & T_{11} & T_{12} & T_{13} & T_{14} & \dots & T_{1n} \\ T_{20} & T_{21} & T_{22} & T_{23} & T_{24} & \dots & T_{2n} \\ T_{30} & T_{31} & T_{32} & T_{33} & T_{34} & \dots & T_{3n} \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ T_{n0} & T_{n1} & T_{n2} & T_{n3} & T_{n4} & \dots & T_{nn} \end{pmatrix}_{16 \times 16} \quad (3.38)$$

descreve as 16 taxas de transições, mostradas na Fig. 1.11.2 para o modelo não-sequencial e inclui apenas termos que ligam estados que diferem por um único grupo metálico. A

Matriz  $T_{seq}$ ,

$$T_{seq} = \begin{pmatrix} T_{00} & T_{01} & 0 & 0 & 0 \\ T_{10} & T_{11} & T_{12} & 0 & 0 \\ 0 & T_{21} & T_{22} & T_{23} & 0 \\ 0 & 0 & T_{32} & T_{33} & T_{34} \\ 0 & 0 & 0 & T_{43} & T_{44} \end{pmatrix}_{5 \times 5} \quad (3.39)$$

descreve as 5 taxas de transições, mostradas na Fig. 1.11.1 para o modelo sequencial, pela adição ou subtração de grupos metílicos. A matriz  $T$  traz a dinâmica estocástica dos receptores nos diferentes estados  $\vec{m}$ . Por este motivo a evolução temporal dos valores da ocupação média dos estados é dada pela Eq. 3.37. Por outro lado, as taxas de transição  $T_{\vec{m}\vec{m}'}$  dependem do grau de atividade  $a_{\vec{m}}$  dos receptores do estado  $\vec{m}$ , ou seja, a matriz  $T$  não é constante e deve ser calculada em função do estado do sistema.

Para o modelo não-sequencial, a solução da Eq. 2.50, seção 2.9, gera um conjunto de 16 autovalores e autovetores que são utilizados de base para a construção do sistema  $\vec{m}(t)$ , como:

$$\langle \vec{m}(t) \rangle = \sum c_i(t) \mu_i, \quad (3.40)$$

sendo  $c_i(t)$  uma constante.

Assim, utilizando o processo de Markov para tempo contínuo, a matriz  $T$  com o estado estacionário  $\mu_0$  descreve o tempo de relaxamento para pequenas perturbações,  $\langle \vec{m}_0 \rangle$ , em torno do estado estacionário de metilação. A perturbação inicial pode ser escrita como uma combinação dos autovetores  $\vec{\mu}_i$  da matriz  $T$ ,

$$P_{\vec{m}}^0 = \sum_{i=0}^{2^M} c_i \vec{\mu}_i. \quad (3.41)$$

Com a evolução temporal da Eq. 3.37, temos sua solução:

$$P_{\vec{m}}(t) = \vec{\mu}_0 + \sum_{i=1}^{2^M} c_i \vec{\mu}_i e^{\lambda_i t}. \quad (3.42)$$

Como vimos na seção 2.9, os autovalores diferentes de  $\lambda_0$  representam a taxa com que os estados decaem, sendo que o menor  $|\lambda_i|$ , com  $i > 0$ , é o que faz o decaimento

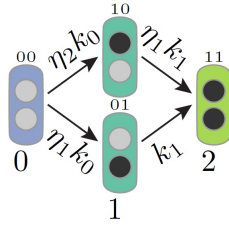


Figura 3.8.1 – Receptor com 2 sítios metílicos e sem a desmetilação de CheB.

mais lento e define o tempo de relaxamento do estado estacionário, que como vimos chamamos de  $\tau_i = -1/|\lambda_i|$ . O tempo de relaxamento pode ser obtido pela simulação Monte-Carlo para determinar os valores de  $a_{\vec{m}}$  que são usados para escrever a matriz  $T$ .

### 3.8 Mutante com CheB deletado

Os mutantes sem a metilesterase CheB, como os da Tabela 5, da seção 6.2, não são capazes de desmetilar os receptores e sua dinâmica simples pode ser descrita analiticamente. Os dois locais de metilação da Fig. 3.8.1 descrevem a dinâmica dos sítios *E-coli* 1 e 2 dos mutantes *EEDE* e *EEQE* da Tabela 5. No entanto, devido à ordem de numeração, os números 1 e 2 são invertidos nesta seção em relação a numeração usada na descrição experimental do receptor *E-coli*.

O principal modelo de simulação deste trabalho, ilustrado na Fig. 1.11.2, da seção 1.11, possui um parâmetro  $\eta$  que controla a não-sequencialidade da metilação do modelo. Nesta seção, usamos dois parâmetros,  $\eta_1$  e  $\eta_2$  na Fig. 3.8.1, para incluir a possibilidade de probabilidades distintas de modificação não-sequencial dos sítios 1 e 2, dependendo do resíduo do sítio vizinho. As duas constantes  $k_0$  e  $k_1$  expressam a possibilidade de diferentes taxas de metilação dependendo do nível de metilação.

A distribuição dos receptores entre os quatro estados de metilação da Fig. 3.8.1 obedece à equação

$$\frac{dP_{\vec{m}}}{dt} = TP_{\vec{m}}, \quad (3.43)$$

$$P = \begin{pmatrix} P_{00} \\ P_{01} \\ P_{10} \\ P_{11} \end{pmatrix} \quad \text{e} \quad T = \begin{pmatrix} -(\eta_1 + \eta_2)k_0 & 0 & 0 & 0 \\ \eta_1k_0 & -k_1 & 0 & 0 \\ \eta_2k_0 & 0 & -\eta_1k_1 & 0 \\ 0 & k_1 & \eta_1k_1 & 0 \end{pmatrix} \quad (3.44)$$

Cujo a solução é

$$\begin{aligned}
 P_{00} &= e^{-(\eta_1 + \eta_2)k_0 t} \\
 P_{01} &= \frac{\eta_1 k_0}{k_1 - (\eta_1 + \eta_2)k_0} [e^{-(\eta_1 + \eta_2)k_0 t} - e^{-k_1 t}] \\
 P_{10} &= \frac{\eta_1 k_0}{\eta_1 k_1 - (\eta_1 + \eta_2)k_0} [e^{-(\eta_1 + \eta_2)k_0 t} - e^{-\eta_1 k_1 t}] \\
 P_{11} &= \frac{k_1 B_{01} + \eta_1 k_1 B_{10}}{(\eta_1 + \eta_2)k_0} [1 - e^{-(\eta_1 + \eta_2)k_0 t}] \\
 &\quad - B_{01}(1 - e^{-k_1 t}) - B_{10}(1 - e^{\eta_1 k_1 t})
 \end{aligned} \tag{3.45}$$

sendo  $B_{01} = \frac{\eta_1 k_0}{k_1 - (\eta_1 + \eta_2)k_0}$  e  $B_{10} = \frac{\eta_1 k_0}{\eta_1 k_1 - (\eta_1 + \eta_2)k_0}$  constantes que levam ao estado inicial,  $t = 0$ , onde temos o mutante apenas no estado  $P_{00}$ .

Com estas expressões, a razão entre o nível de metilação dos sítios 1 e 2 pode ser calculada como

$$\frac{p(m_1, t)}{p(m_2, t)} = \frac{P_{01} + P_{11}}{P_{10} + P_{11}} \tag{3.46}$$

onde  $P_{01}$ ,  $P_{10}$  e  $P_{11}$  são as população que preenchem os sítios metílicos  $m_2$  e  $m_1$  da Fig 6.2.1c.

A relação de  $p(m_1, t) / p(m_2, t)$  em função do tempo é mostrada na Fig. 3.8.2 para diferentes valores de  $\eta_1$  e  $\eta_2$ . Ela será usada na análise dos resultados experimentais descritos na seção 6.3.

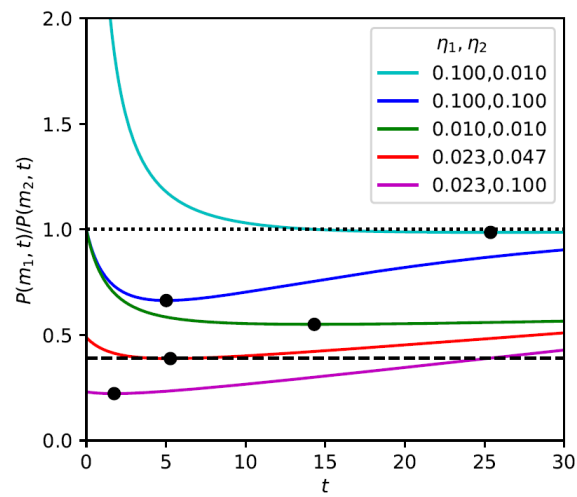


Figura 3.8.2 – Razão  $p(m_1, t)/p(m_2, t)$  calculada pela Eq. 3.45-3.46 com os valores de  $\eta_1$  e  $\eta_2$  indicados na legenda. Os círculos pretos são os pontos mínimos. A linha tracejada preta é a proporção 0.39 encontrado na seção 6.3.



Parte III

Métodos Numéricos





## 4 Métodos Numéricos

### 4.1 Método Monte Carlo

O avanço tecnológico trouxe infinitos benefícios para o desenvolvimento científico e um exemplo claro são as diversas maneiras possíveis de manipular os experimentos através das simulações. Com o aumento das complexidades descobertas nos problemas reais, a simulação está cada vez mais sendo utilizada em várias áreas do conhecimento, tornando assim, uma saída para sistemas complexos que não possuem uma resposta analítica. Para Garcia, Lustosa e Barros (2010) [60], a simulação consiste no desenvolvimento de um modelo ou representação de uma situação real, que possibilita a realização de experimentos em diversos cenários, sendo uma ferramenta de auxílio na avaliação do sistema, fornecendo uma melhor compreensão ao invés de gerar apenas uma solução. Para Andrade (1989) [61] a simulação pode ser usada para experiências com novas situações, mesmo tendo pouca, ou nenhuma informação, com o intuito de preparar para o que possa acontecer no processo real.

Existem dois tipos de modelos de simulação: o determinístico e o estocástico. O determinístico pressupõe que os dados são obtidos com certeza e o estocástico é baseado na tentativa de se encontrar a natureza probabilística envolvida nas variáveis do sistema [60].

Os modelos de simulações estocásticas são denominados métodos de Monte Carlo e tem como foco simulações de fenômenos aleatórios. Seu desenvolvimento foi iniciado em 1944, durante a Segunda Guerra Mundial, sendo ferramenta de pesquisa para o desenvolvimento da bomba atômica [60].

A primeira publicação sobre método de Monte Carlo é datada de 1949, contando-se os dias atuais mais de 23 mil publicações sobre este tema. Este crescimento se deve ao grande avanço tecnológico dos computadores que trouxeram um grande aumento na velocidade de processamento e na capacidade de armazenamento das informações [62]. Hammersley e Handscomb (1964) [63] definem o Método de Monte Carlo como a parte da matemática experimental que está preocupada em experiências com números aleatórios. Já Yariyaz (2009) [62] define como um método estatístico, no qual se utiliza

uma sequência de números aleatórios para a realização de simulações. Desta forma, vemos que a aplicação deste método é conhecida em diversas áreas, seja para descrever fenômenos físicos ou para encontrar soluções matemáticas de sistemas complexos.

Em muitas aplicações práticas do método de Monte Carlo, não existe a necessidade de se escrever as equações matemáticas que representam o sistema, sendo necessário apenas que o processo físico possa ser descrito por uma densidade de probabilidade [62]. Desta forma, este método é uma expressão geral, onde as formas de investigação estão baseadas no uso de números fortuitos com estatísticas de probabilidade [60].

No entanto, podem existir algumas dificuldades quando estamos usando o método de Monte Carlo. Uma das principais e que podem acabar impedindo o desenvolvimento do projeto, até mesmo antes de se começar a pensar na simulação, é a capacidade de memória e a velocidade de processamento da CPU. Uma simulação que requer anos para “executa” é impraticável. Da mesma forma, um cálculo que requer memória maior que o limite existente, somente poderá ser realizado com técnica de programação sofisticada e isso pode retardar a velocidade e aumentar as chances de erros [64]. Ainda para Landau e Binder (2005) [64], existem outras dificuldades que podem influenciar nos resultados das simulações, tais como: erros de truncamento e arredondamento, erros estatísticos e erros sistemáticos.

O método de Monte Carlo constitui basicamente numa grande amostragem aleatória com o intuito de obter resultados numéricos, onde quanto maior for a amostra melhor será o resultado obtido. O método é alimentado por um gerador de número aleatório utilizado para amostragem dos vários fenômenos que ocorrem durante os processos de interesse.

## 4.2 Metodologia

Os receptores celulares da quimiotaxia foram simulado com o modelo apresentado em [42], consistindo de 4096 receptores de um único tipo, dispostos em uma rede quadrada de  $64 \times 64$ . Três variáveis definem o estado de cada receptor: atividade ( $a$ ), ocupação ( $l$ ) e metilação ( $m$  ou  $\vec{m}$ ). Os estados de modificação sequencial e não-sequencial são, respectivamente, representados pela variável inteira  $m$  e pelo vetor  $\vec{m}$ , Eq. 2.39.

A simulação Monte Carlo é usada para alternar aleatoriamente a atividade e a ocupação do receptor entre os quatro estados obtidos, atribuindo 0 ou 1 a cada uma dessas duas variáveis. Para cada sítio  $i$  do "cluster" receptor, a probabilidade de cada combinação de  $a$  e  $l$  é proporcional ao  $e^{-E_i}$ , com o Hamiltoniano definido pela Eq. 2.34, separada em duas partes, uma que representa a energia de fatores externos ao receptor, tais como: concentração de estímulos, constante de dissociação e a dependência com os grupos metílicos. A outra parte da equação representa a interação existente entre os receptores, independentemente das preferências de ligação existente, isto é, não depende do tipo de receptor ou estímulo.

O processo de metilação também é simulado por Monte Carlo, com as probabilidades de transição entre os estados de metilação de cada receptor descritos pelas Eq. 3.1 e Eq. 3.2 no caso sequencial ou pelas Eq. 3.3 e Eq.3.4 no não-sequencial. As taxas  $k_m^+$  e  $k_m^-$  são função da atividade individual de cada receptor. No modelo geral, são usadas as Eq. 3.3 e Eq. 3.4 e essas taxas incluem também os parâmetros  $\eta$  e  $\gamma$  para descrever as transições não-sequencial e de energia finita.

#### 4.2.1 Etapas da simulação Monte Carlo

A energia livre depende dos parâmetros  $\alpha$  e  $m_0$ , que estão relacionados aos efeitos do nível  $m$  na atividade; das constantes de dissociação dos estados inativos ( $K_0$ ) e ativos ( $K_1$ ) e o acoplamento inter-receptor  $C$ . Usaremos os valores  $K_0 = 18\mu M$  e  $K_1 = 3000\mu M$  fornecidos em [40]. O valor de  $\alpha_0$  apenas diz respeito às transições de equilíbrio entre  $m$ -estados, discutidos na seção 3.4.

O uso de energia livre para definir a distribuição de probabilidade de  $a$  e  $l$  só é possível porque consideramos que esta variável está em equilíbrio termodinâmico. No entanto, a dinâmica de modificação não é um processo de equilíbrio [11]. Aqui, usamos um método de Monte-Carlo para simular o processo de modificação (metilação/desmetilação). Em cada etapa do modelo de Monte Carlo um receptor é aleatoriamente selecionado e alguns procedimentos são executados:

**Passo Atividade/Ligando:** Uma das variáveis de  $a$  ou  $l$  é selecionado, com a mesma probabilidade de ser trocada. Será calculada a variação de energia  $\Delta E$  entre a energia inicial e a energia do novo estado. Se  $\Delta E \leq 0$  o novo estado é aceito, caso contrário, ele é aceito com probabilidade  $e^{-\Delta E}$ .

**Passo de metilação:** Para as transições pretas da Fig. 1.11.1, os grupos metilo são adicionados aos receptores inativos ( $a = 0$ ) com probabilidade de  $k^+ \Delta t$  e removidos dos receptores ativos ( $a = 1$ ) com probabilidade de  $k^- \Delta t$ ,  $\Delta t$  é o avanço no tempo. Para as transições cinza da Fig. 1.11.2, essas taxas são multiplicadas por  $\eta \in [0, 1]$ .

Na quimiotaxia, o processo de ligação dos estímulos aos receptores e a alternância entre os estados ativo e inativo são instantâneos, sendo a adição/subtração de grupos metílicos um processo lento. Assim, para obedecer essa regra, implementamos no programa uma condição, onde para cada 10 vezes rodado o "passos atividade/ligando"(responsável por calcular a variação da energia), apenas uma vez é rodado o "passo de metilação"(responsável pelo cálculo da probabilidade de metilação). Dessa maneira, para o processo de metilação, a ligação dos estímulos comporta-se como se sempre estivesse em equilíbrio.

O uso de uma função de energia diferente da Eq. 2.34 pode potencialmente afetar a dinâmica, no entanto, não prejudicará a adaptação, desde que as três condições da seção 1.13 sejam satisfeitas. Por exemplo, a Eq. 2.34 implica que a atividade e a afinidade da ligação ao ligando são igualmente afetadas pela modificação de qualquer sítio, que é sabido não ser verdadeiro. No entanto, não há motivos para acreditar que nossas conclusões mudariam, caso a energia dependesse do nível- $m$  de uma maneira mais complicada.

#### 4.2.2 Erro de adaptação e sensibilidade

A adequação dos sistemas simulados será avaliada através da análise das duas propriedades chaves descritas nas seções 1.15 e 3.6, a precisão da adaptação (erro de adaptação) e a sensibilidade (ganho de resposta) da atividade devido às mudanças na concentração do estímulo. Elas serão obtidas a partir da simulação Monte Carlo, seções 4.2 e 4.2.1, que fornecem a média sobre os receptores das variáveis  $m(t)$ ,  $a(t)$  e  $l(t)$ .

Começamos a simulação com  $[L] = 10^{-1} \mu M$  e, após o estado estacionário ser atingido, alternamos o valor de  $[L]$  de  $\Delta[L] = 0,2[L]$ . A resposta do sistema,  $\Delta \langle a \rangle$ , é a diferença na atividade imediatamente antes e depois do aumento no estímulo.

Em seguida, mudamos a concentração de fundo para  $\sqrt{10}[L]$ , aguardamos o estado estacionário e repetimos a medida de  $\Delta a$ . O procedimento é repetido até atingir

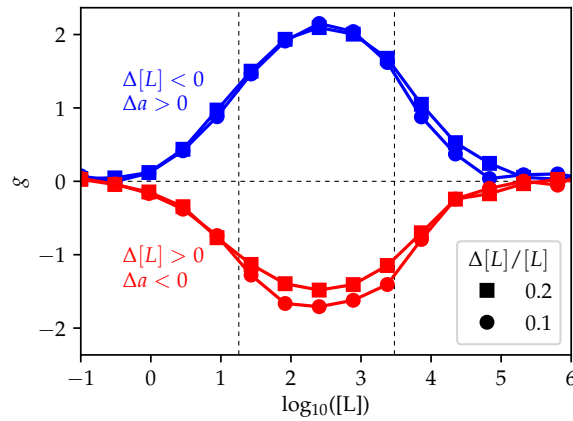


Figura 4.2.1 – Ganho na transdução de sinal definida pela Eq. 4.1, em função da concentração do ligante,  $[L]$ . As linhas tracejadas verticais são os valores de  $[L]$  correspondentes a  $K_0$  e  $K_1$ . A unidade de  $[L]$  é  $\mu M$ .

a concentração de estímulo  $10^5 \mu M$ . As etapas são então repetidas na direção oposta, isto é, com a concentração passando de  $10^5 \mu M$  a  $10^{-1} \mu M$  com  $\Delta[L] = -0.2$ .

O ganho na transdução do sinal quando a concentração do ligando muda de  $[L]$  para  $[L] + d[L]$  é

$$g = - \frac{[L]}{\langle a \rangle_{\text{adapt}}} \frac{d\langle a \rangle}{d[L]} \Big|_{m_{\text{adapt}}([L])} . \quad (4.1)$$

O efeito inibitório de  $[L]$  na atividade se traduz em sinais opostos para  $d\langle a \rangle$  e  $d[L]$ , expresso no sinal negativo da equação acima. A Fig. 4.2.1 mostra  $g$  como uma função de  $[L]$ , para finito  $\Delta[L]$  em vez do infinitesimal  $\delta[L]$ . A semelhança das curvas com  $\Delta[L]/[L] = 0.1$  e  $0.2$  demonstra que  $\Delta[L] = 0.2[L]$  é uma opção aceitável para analisar a resposta obtida.

Uma medida da sensibilidade deve refletir não apenas a resposta em um determinado  $[L]$ , mas também como ele muda ao longo do intervalo de  $[L]$ . Esses dois aspectos motivam a definição da sensibilidade como Eq. 3.33. A integral na Eq. 4.2 é a área entre as curvas superior e inferior da Fig. 4.2.1. Pode ser calculado numericamente como

$$\Gamma \approx - \sum_i \frac{[L_i]}{\langle a \rangle_{i,\text{adapt}}} \frac{\delta\langle a \rangle_i}{\delta[L_i]} \Big|_{m_{\text{adapt}}([L])} \log_{10} \frac{[L_{i+1}]}{[L_i]} \quad (4.2)$$

Vale a pena deixar claro que  $\delta[L_i]$  não é a diferença  $[L_{i+1}] - [L_i]$ , mas sim uma

mudança muito menor usada para avaliar a resposta do sistema.

Os níveis de atividade em  $[L]_{\min} = 1\mu M$  e  $[L]_{\max} = 10^5\mu M$  são usados na Eq.3.34 para calcular  $\zeta^{-1}$ .

Parte IV

Resultados





## 5 Simulações: resultados e análises

Os receptores quimiotáticos são agrupados na membrana celular em forma de uma rede, na qual, o estado ativo de um, afeta o estado de atividade do vizinho, resultando numa amplificação da resposta. Essa sensibilidade tem a capacidade de estender os efeitos do receptor sensível ao estímulo para outros que não foram diretamente afetados pelo mesmo estímulo externo, traduzindo-se no comportamento da quimiotaxia nas bactérias. Neste capítulo, descrevemos os resultados das nossas simulações com o modelo de Ising para os receptores celulares, e analisamos suas relações com os conceitos discutidos nos capítulos anteriores.

Com essa característica, dividimos este capítulo em seções que detalham o comportamento e as influências envolvidas no processo de quimiotaxia, obtidas por simulação computacional.

### 5.1 Comportamento da atividade no modelo sequencial e modelo não-sequencial

Já discutimos na, seção 2.7, que a atividade do receptor é uma função do seu próprio estado de metilação, do nível de atividade de seus vizinho e da concentração de estímulo presente no ambiente. Dessa forma, a atividade global  $\langle a \rangle$ , que aparece na Eq. 3.7, não é uma função apenas da média da metilação, mas uma complicada função do estado de metilação de cada receptor e da concentração de estímulo. No entanto, apesar da adição de grupos metílicos aumentar a atividade, e vice-versa, a Eq. 3.7 levará o sistema para o estado de adaptação perfeita definido pela Eq. 3.13

Assim, embora a atividade global seja uma função da concentração de estímulo  $[L]$  e do estado de metilação de cada receptor na rede, para simplificar a dinâmica, escrevemos  $\langle a \rangle$  como uma função de  $\langle m \rangle$  e  $[L]$ .

A seguir, resumizamos os aspectos relevantes da discussão das seções 3.2 e 3.3, como forma de explicar os efeitos da metilação pelo modelo sequencial e não-sequencial.

Com a definição da atividade dada por  $\langle a \rangle(\langle m \rangle, [L])$ , podemos representá-la

conforme mostrado na Fig. 3.2.2. A mudança na concentração de estímulo altera imediatamente o número de moléculas de estímulo ligadas aos receptores, afetando assim sua atividade com uma resposta instantânea, mostrada pela linha vertical na Fig. 3.2.3, que é muito mais rápida do que a resposta produzida pela adição de grupos metílicos, e que é induzida pelo aumento do estímulo de  $[L2]$  para  $[L3]$ . A figura mostra também que não importa a configuração da metilação inicial, pois o sistema se move ao longo da curva definida pela concentração de estímulo constante, direcionando para a atividade adaptada, como previsto pela Eq. 3.7 e discutido na seção 3.2.2, no modelo sequencial.

Quanto a adaptação perfeita, a seção 3.2.2, Fig. 3.2.2, mostra que, no modelo de metilação sequencial, nos limites,  $m = 0$  e  $m = 4$ , não temos um padrão de adaptação, o que indica que as três condições descritas na seção 1.13 não foram estritamente obedecidas. Neste caso específico, a adaptação perfeita não foi obtida devido à violação da condição 3, que está relacionada aos valores extremos de  $m$ . No entanto, mesmo com essa discrepância na curva de atividade, uma boa adaptação pode ser conseguida se, com ajustes nos parâmetros dinâmicos, pudermos impedir a ocorrência desses valores extremos, como será visto na seção 5.6.

Para a adaptação com metilação não-sequencial, discutidas na seção 3.3, o nível adaptado da atividade diminui linearmente com o nível  $m$ , linha tracejada da Fig. 3.3.2, o que resulta em diferentes atividades adaptadas para cada valor de  $[L]$ . Contudo, o erro de adaptação pode ser reduzido, se os parâmetros da simulação forem modificados de forma que as curvas de  $[L]$  constante se aproximem uma das outras, produzindo, curvas menos espalhadas ao longo do intervalo de  $\langle m \rangle$ . Essa proximidade das curvas de  $[L]$ , resulta em uma resposta menor. Em outras palavras, o baixo erro para a metilação não-sequencial é obtido em detrimento do ganho na resposta do sistema. Graficamente, isso pode ser percebido pelo tamanho da seta conseguida nos dois modelos de metilação. No modelo sequencial a seta vertical tem um tamanho maior, o que representa uma melhor resposta, no modelo de metilação não-sequencial a seta é menor, representando uma resposta menor.

Esta relação entre o ganho de resposta ( $\Gamma$ ) e a precisão da adaptação ( $\zeta^{-1}$ ) depende do parâmetro  $\alpha$  mostrado na seção 2.4. O parâmetro  $\alpha$  é o fator de escala de  $m$  no Hamiltoniano, Eq. 2.34, que o relaciona com  $[L]$  e mede o efeito do nível de metilação na atividade da quinase do receptor. Portanto, se  $m$  fosse um número real, e a atividade

dependesse apenas dele, aumentando  $|\alpha|$  não apenas aproximaria as curvas de  $[L]$  uma das outras, como citado no parágrafo anterior, mas também as fariam passar pela mesma quantidade, resultando na mesma mudança em  $\langle a \rangle$  para uma dada mudança de  $[L]$  para  $[L]_0$ , ou seja, se a atividade for em função apenas de um número  $m$  real, mudar o  $|\alpha|$  altera apenas a escala entre  $m$  e  $[L]$  fazendo com que as curvas da Fig.3.3.2 sejam mais verticais e a atividade mude na mesma proporção. Consequentemente, a alteração de  $|\alpha|$  alteraria a precisão de adaptação sem afetar o ganho de resposta. Este é o caso do modelo computacional MWC.

No entanto, como veremos na seção 5.4, no modelo de Ising estudado neste trabalho, a precisão é aumentada pelo aumento  $|\alpha|$ , com o efeito colateral de diminuir o ganho de resposta. Essa diferença entre os modelos MWC e Ising é causada pela suposição que, no modelo MWC, o  $m$  é um número real, pois é tratado como um nível médio de metilação sobre todos os receptores no "cluster" de MWC. Para o modelo de Ising, a simulação MC define adequadamente  $m$  como um número inteiro para cada receptor. Se  $\langle m \rangle$  não é aproximadamente inteiro, grandes valores de  $|\alpha|$  resultam em uma população de receptores formada principalmente de dois níveis de  $m$ , um que é muito ativo e outro que é muito inativo. Assim, pelo fato do receptor ter sua atividade dependente da população de  $m$ , a atividade é minimamente afetada pela mudanças de  $[L]$ . Por este motivo, aumentar  $|\alpha|$  reduz o ganho de resposta no modelo Ising.

## 5.2 Mutantes mais aptos

O comportamento de um modelo matemático depende dos valores dos parâmetros, conforme descrevemos na seção 3.6. As equações e os parâmetros de um processo biológico são afetados pela informação codificada no genoma, embora outros fatores também entrem em jogo. Usaremos a palavra mutantes para nos referir a uma determinada combinação de parâmetros do modelo executado na simulação. Para determinar o papel desempenhado pela metilação sequencial na quimiotaxia bacteriana é preciso avaliar as melhorias que ela traz para a dinâmica. Isso quer dizer que o sistema precisa responder com um alto ganho ao estímulo. Por outro lado, o sinal metabólico produzido pelo receptor deve acoplar com precisão ao controle do viés rotativo do motor. A mudança no viés também faz parte da amplificação do sinal, por estar ligado aos efeitos das alterações ocorridas na atividade, através da proteína CheY-P, que, segue o que

vimos na seção 1.6. O motor flagelar é conhecido por ser ultrasensível à concentração de CheY-P [65], isso ocorre devido a proteína CheY-P se ligar a proteína FliM, que é uma das proteínas que formam o corpo do motor flagelar [66]. O significado desse processo é que procuramos, mutantes com alto ganho ( $\Gamma$ ) e baixo erro de adaptação ( $\xi$ ).

A metilação sequencial apenas oferece seus benefícios com valores de parâmetro adequados, o que implica que devemos procurar os mutantes corretos (mais aptos). Para cada mutante, determinamos  $\Gamma$  e  $\xi$  executando a varredura de estímulo, onde a simulação de Monte-Carlo fornece essas medidas. A varredura é repetida pelo menos 50 vezes para cada mutante para minimizar o erro estocástico.

O início da exploração do espaço dos parâmetros, começa com um determinado mutante, no qual fazemos que ocorra pequenas mudanças aleatórias nos parâmetros. São mantidos fixos  $K_0$ ,  $K_1$ ,  $k^-$  e modificamos aleatoriamente os valores de  $a$ ,  $m_0$ ,  $C$  e  $k^+$ , aceitando apenas mutantes com atividade média superior a  $1/3$ . Este nível de atividade é compatível com a mudança máxima no Che-Y fosforilado observado experimentalmente após a remoção do atrativo [13]. O próximo passo é substituir o mutante mais antigo pelo novo, se ele tiver um  $\Gamma$  maior e se  $\xi$  estiver abaixo de um determinado limite, que é pre-estabelecido dependendo do erro de adaptação necessário para o melhor desempenho. As informações sobre todos os mutantes testados são guardadas e utilizadas para avaliar o efeito do erro de adaptação em várias propriedades da quimiotaxia.

Durante o processo de exploração do espaço de parâmetros encontramos mutantes com menor sensibilidade do que outros mutantes, contudo, com um erro de adaptação similar entre eles. Nossa análise exclui esses mutantes mal ajustados e concentra nos mutantes mais aptos. Um mutante é considerado mais apto se ele tiver maior  $\Gamma$  do que todos os mutantes com  $\xi$  menor ou igual ao seu  $\xi$ .

Ao fixarmos um grau de sequencialidade da metilação controlado por  $\eta$ , o desempenho do sistema dependerá de outros parâmetros em nosso modelo. Cada conjunto de parâmetros leva a um par de valores de  $\Gamma$  e  $\xi$ . Para a biologia evolutiva, procuramos o mutante mais apto definido como um dado conjunto de parâmetros para uma dada dinâmica de metilação (sequencial  $\eta = 0$ , não-sequencial  $\eta = 1$  ou em algum estado entre  $0 < \eta < 1$ ).

Contudo, conforme discutido na seção 1.15, existe um compromisso entre a sensibilidade e o erro de adaptação, na medida em que, quanto maior é a sensibilidade,

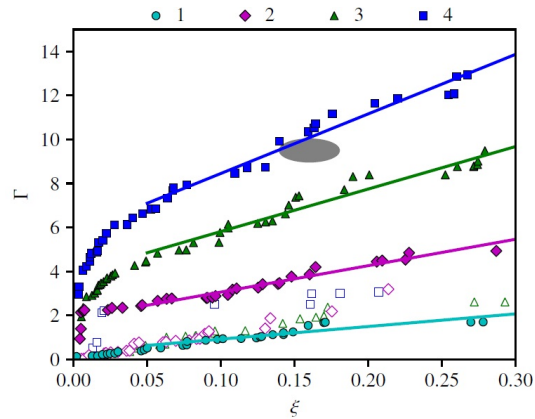


Figura 5.2.1 – Ganho em função do erro de adaptação. Os mutantes mais aptos obtidos a partir do esquema de pesquisa descrito nesta seção. Diferentes símbolos e cores são usados para cada valor de  $M$ . Símbolos sólidos e vazios representam, respectivamente, modificações sequenciais e não-sequenciais. O modelo sequencial e não-sequencial são indistinguíveis para  $M = 1$ .

maior também é o erro de adaptação obtido. Esse compromisso depende não apenas da sequencialidade, mas também da quantidade de sítios de modificação. Essa relação é ilustrada através da Fig. 5.2.1, mostrando os mutantes que fornecem o maior ganho em função do erro de adaptação para até quatro sítios metílicos dos receptores. Os detalhes das simulações que conduzem as curvas da Fig. 5.2.1 foram descritos nos primeiros parágrafos desta seção.

### 5.3 A metilação sequencial é necessária para a adaptação

Como dito na seção 5.1, em geral, o nível adaptado de atividade é  $\langle a \rangle^{\text{adapt}}(m, [L])$ . Dizemos que a adaptação é perfeita se  $\langle a \rangle^{\text{adapt}}$  não depender de  $[L]$ , Fig. 5.3.1. Conforme mostrado na seção 3.2.2, a adaptação da atividade pode ser obtida resolvendo  $d \langle m \rangle / dt|_{\langle m \rangle^{\text{adapt}}} = 0$  na Eq. 3.7.

Para o caso da metilação sequencial ( $\eta = 0$ ), o lado direito da Eq. 3.7 tem a propriedade de depender de  $\langle a \rangle$ , mas não de  $\langle m \rangle$  ou  $[L]$ , embora, exista uma dependência implícita, uma vez que  $\langle a \rangle$  é uma função de  $\langle m \rangle$  e  $[L]$ . Como resultado, a atividade adaptada  $\langle a \rangle^{\text{adapt}} \approx k^+ / (k^+ + k^-)$  independe de  $[L]$ , conforme mostrado na seção 3.2.2. Esta é a base da adaptação perfeita para a modificação que obedece o modelo sequencial de metilação.

Conforme explicado matematicamente nas seções 3.2.1 e 3.2.2, a Fig. 5.3.1a ilustra a dinâmica descrita pela Eq. 3.7. As linhas sólidas representam o nível de atividade

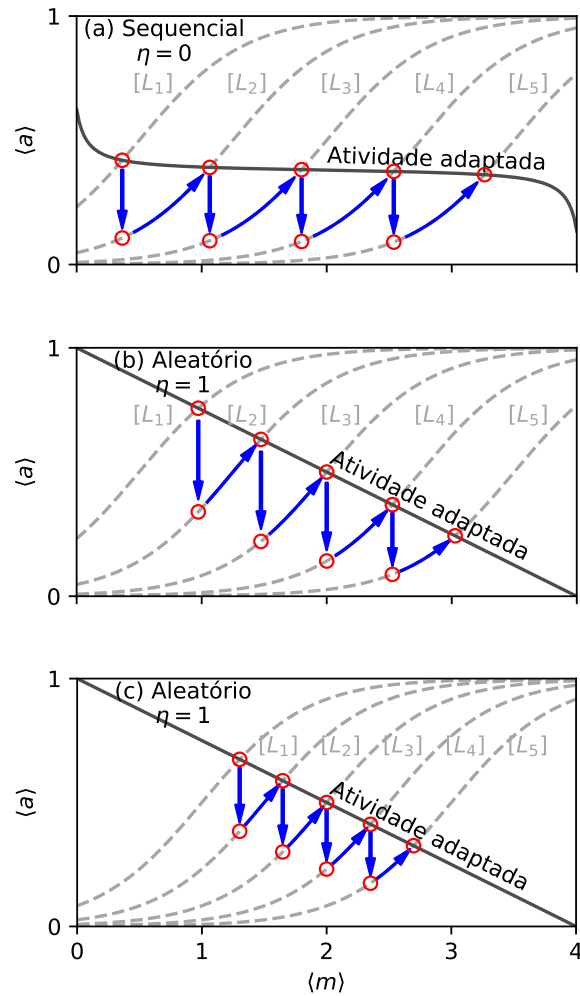


Figura 5.3.1 – Ilustração da dinâmica de resposta e adaptação para (a) processos sequenciais ( $\eta = 0$ ) e (b) e (c) aleatórios ( $\eta = 1$ ) de modificação. As linhas tracejadas mostram a dependência da atividade no  $\langle m \rangle$  para diferentes concentrações de ligantes  $[L_1] < [L_2] < [L_3] < [L_4] < [L_5]$ . As linhas contínuas mostram a atividade adaptada  $\langle a \rangle^{adapt}$  em função do  $\langle m \rangle$ . Com um aumento repentino de  $[L]$ , por exemplo, de  $[L]_1$  para  $[L]_2$ , o sistema responde rapidamente diminuindo sua atividade (seta vertical) do antigo estado adaptado para o estado máximo de resposta sem alterar o  $\langle m \rangle$ . Essa resposta inicial é seguida pela dinâmica de adaptação lenta (seta para cima) ao longo da linha pontilhada até que o novo estado adaptado seja alcançado. (a) A metilação sequencial leva à atividade adaptada aproximadamente horizontal. (b) A metilação não-sequencial produz a forte inclinação da linha de atividade adaptada, resultando em um grande erro de adaptação. (c) O erro de adaptação pode ser reduzido se as curvas de  $[L]$  estiverem mais próximas umas das outras, mas também faz com que reduza a resposta ao estímulo. O processo de modificação sequencial leva a uma precisão de adaptação muito maior do que o processo de modificação aleatória.

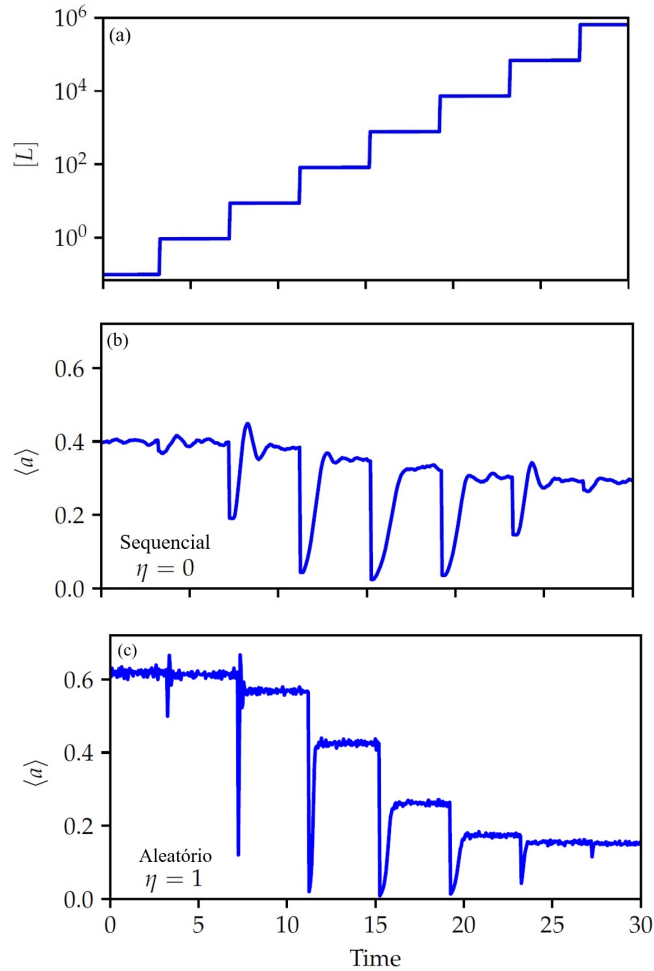


Figura 5.3.2 – a) Simulação do aumento da concentração de ligantes  $[L]$ , sendo demonstrado pelo seu aumento de  $10^{-1}$  a  $10^4$  tendo os espaços onde ocorre a adaptação da atividade logo após as mudanças da concentração. b) Comportamento da atividade no modelo sequencial  $\eta = 0$ , sendo claramente com erro de adaptação baixo. c) comportamento da atividade para o modelo não sequencial  $\eta = 1$ , com a atividade apresentado o erro de adaptação capaz de fazer que a cada aumento da concentração de ligantes tenhamos um valor de atividade diferente. Todos os gráficos são em função do tempo.

adaptada obtido como zero do lado direito da Eq. 3.7. As curvas tracejadas ilustram a atividade como uma função de  $\langle m \rangle$  para diferentes valores de  $[L]$ . A seta vertical mais à esquerda da Fig. 5.3.1a representa a inibição de atividade induzida pelo aumento súbito da concentração de ligante  $[L]$ , digamos de  $[L_1]$  para  $[L_2]$ . A alteração da atividade aciona o mecanismo de adaptação, fazendo com que o nível de  $m$  aumente lentamente e que o sistema siga a seta azul para cima até atingir o nível de adaptação da atividade.

Na Fig. 5.3.2a temos a representação do aumento de concentração de ligantes. Nessa representação, o sistema detecta a mudança de concentração e logo em seguida se adapta àquela concentração aumentada, tornando o sistema novamente capaz de responder à uma nova mudança na concentração de estímulos. A Fig. 5.3.2b e 5.3.2c,

traz os resultados obtidos da atividade para os modelos sequencial e não-sequencial, respectivamente  $\eta = 0$  e  $\eta = 1$ . No modelo de metilação não-sequencial, vemos que além do nível de atividade não se adaptar quase perfeitamente, a cada mudança da concentração de estímulos, ele ainda demonstra, aparentemente, um comportamento oscilatório amortecido antes de se adaptar àquela concentração de estímulos. Esta oscilação pode ter sido gerada devido um menor tempo gasto para se adaptar [53], tendo em vista que esse também é uma das diferenças entre os dois modelos.

O contra ponto da adaptação sequencial se encontra justamente nos extremos, ou seja, nos limites dos número de sítios metílicos. Podemos ver claramente pela Fig. 5.3.1a que o erro de adaptação é maior e conseqüentemente não mantém a adaptação perfeita.

Ao contrário da metilação sequencial, descrita no início desta seção, para o caso da metilação não-sequencial, dado pela Eq. 3.14 na seção 3.3, o nível de atividade adaptada depende explicitamente da media do nível  $\langle m \rangle^{\text{adapt}}$ , que, conforme mostrado na seção 3.18, tem uma dependência linear da metilação adaptada:  $\langle a \rangle^{\text{adapt}} = (M - \langle m \rangle^{\text{adapt}}) / M$ , representada na Fig. 5.3.1b. Uma mudança de  $[L_1]$  para  $[L_2]$ , nesta figura, é seguida por um mecanismo de adaptação que leva o sistema a um nível diferente de atividade adaptada (uma queda na atividade). Assim, o erro de adaptação resultante é maior na metilação não-sequencial. A simulação MC dessa situação é mostrada na Fig. 5.3.1b.

A grande diferença na precisão da adaptação para metilações sequenciais e não-sequenciais pode ser entendida analiticamente pela investigação das diferentes dependências do erro  $\zeta$  no parâmetro  $\alpha$ , que como vimos mede o efeito do nível de metilação na atividade da quinase do receptor.

No modelo sequencial, para assegurarmos as características atribuídas ao erro de adaptação  $\epsilon$ , discutido na seção 3.2.1, é necessário saber qual o tamanho do erro produzido. Uma maneira de calcularmos o tamanho desse erro de adaptação é supor que a população dos sítios metílicos extremos são preenchidos por um decaimento exponencial. Dessa forma, a equação que representa a probabilidade dos sítios extremos estarem preenchidos pode ser dada por  $P(M) \approx (K_0/K_1)^b e^{[-b^{-1}|\alpha|(M-m_0)]}$ , sendo  $b$  uma constante de ordem 1.

Portanto, utilizando a probabilidade  $P_M$  dos sítios extremos estarem preenchidos e sabendo que o erro é proporcional a  $P_M$  podemos descrever a equação para o tamanho



do erro por:

$$\bar{\zeta}(\eta = 0) \approx c_1 \exp[-b^{-1}|\alpha|(M - m_0)] + \zeta_0, \quad (5.1)$$

onde  $c_1$  é uma constante que representa a transição entre os sítios dado por  $K_0$  e  $K_1$  nos receptores na forma ativa e inativa, respectivamente, e  $\zeta_0$  é o erro no estado  $m = 0$ . A Eq. 5.1 mostra que  $\bar{\zeta}$  decresce exponencialmente com  $|\alpha|$  antes de  $\zeta_0$  saturar.

Para a dinâmica de  $\langle a \rangle$  na metilação não-sequencial, em resposta ao aumento da concentração de estímulos, temos a Fig. 5.3.1b que demonstra de forma clara o erro de adaptação com a atividade não retornando ao mesmo nível de atividade anterior. A principal fonte desse erro é a própria inclinação da linha de adaptação, que decresce cada vez que temos uma mudança na concentração de estímulos. No modelo de metilação não-sequencial a população nos receptores dos sítios extremos  $m = 0$  e  $m = M$  tem um efeito relativamente menor no erro de adaptação. A inclinação da dependência da adaptação da atividade pelo nível médio de metilação  $\langle m \rangle^{\text{adapt}}$  é  $\approx 1/M$ , como vimos na Eq. 3.18, da seção 3.3, e a mudança no  $\langle m \rangle^{\text{adapt}}$  para o alcance total do estímulo é  $\Delta m \approx \ln(K_0/K_1)/|\alpha|$ , dado pela Eq. 2.37 da seção 2.4, a partir dessas informações podemos estimar o erro de adaptação para o modelo não sequencial por

$$\bar{\zeta}(\eta = 1) \approx \frac{\Delta m}{M} \approx \frac{\ln(K_0/K_1)}{M} |\alpha|^{-1}, \quad (5.2)$$

que diminui algebricamente com  $|\alpha|$ .

Calculamos a precisão de adaptação  $\bar{\zeta}^{-1}$  para diferentes valores de  $\alpha$  pelas simulações de MC do nosso modelo. Como mostrado na Fig. 5.3.3, os resultados da simulação confirmaram as expressões analíticas (Eq. 5.1 e 5.2) dos casos sequenciais ( $\eta = 0$ ) e não-sequencial ( $\eta = 1$ ). Estes resultados mostraram claramente que a metilação sequencial aumenta a precisão da adaptação de forma muito mais eficiente do que a metilação não-sequencial.

Estudamos também o ganho  $\Gamma$  em nossas simulações. Como mostrado na Fig. 5.3.3b, a dependência de  $\Gamma$  em  $\alpha$  não mostra muita diferença entre a metilação sequencial e não-sequencial.

Na Fig. 5.4.2a é explorado as situações intermediárias entre  $\eta = 0$  e  $\eta = 1$ , enquanto os outros parâmetros são mantidos constantes. Para esta situação, podemos

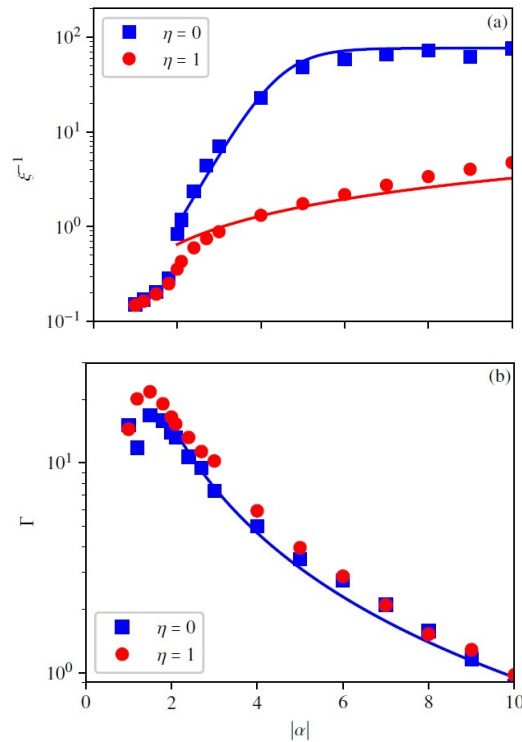


Figura 5.3.3 – A dependência da precisão de adaptação  $\zeta^{-1}$  e do ganho  $\Gamma$  com o parâmetro de energia de metilação  $|\alpha|$  para os casos de metilação sequencial ( $\eta = 0$ ), símbolos azuis, e metilação aleatória ( $\eta = 1$ ), símbolos vermelhos. (a) Precisão de adaptação versus  $|\alpha|$ . (b) Ganho de resposta versus  $|\alpha|$ . As curvas são guias para as equações 5.1 e 5.2.

notar uma diminuição significativa na precisão da adaptação ( $\zeta^{-1}$ ) e um pequeno aumento no ganho da sensibilidade quando é introduzida a metilação não-sequencial, através do aumento de  $\eta$ . Portanto, tornar o sistema mais sequencial é uma maneira eficaz de aumentar a precisão de adaptação sem comprometer fortemente o ganho de resposta. No entanto, para o modelo totalmente não-sequencial,  $\eta = 1$ , o que se consegue é uma relação de compromisso entre a precisão ( $\zeta^{-1}$ ) e o ganho de resposta ( $\Gamma$ ).

#### 5.4 Um compromisso entre sensibilidade (Ganho de resposta) e erro de adaptação (precisão)

As transições entre os  $m$  estados da metilação não-sequencial formam uma rede de transições representada pela Fig. 1.11.2. A estrutura dessa rede resulta no erro intrínseco de adaptação descrito pela Eq. 3.18 da seção 3.3 e pela Fig. 5.3.1b, já que as transições entre os estados não são dependentes apenas da atividade, que é caso do modelo sequencial. Ao contrário da metilação não-sequencial, a metilação sequencial

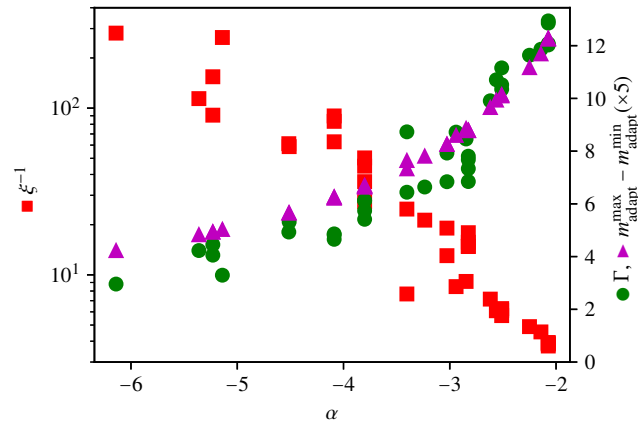


Figura 5.4.1 – Mutantes com melhor desempenho são selecionados a partir da Fig. 5.5.1a, da seção 5.5 e seus valores de  $\zeta^{-1}$ ,  $\Gamma$  e a amplitude de  $m$  são traçados como função de  $\alpha$ .

produz uma adaptação perfeita se o termo  $\epsilon$  da Eq. 3.7 for desconsiderado. Infelizmente, em geral, não é assim que o sistema se comporta, conforme pode ser visto pela curva não-horizontal da atividade adaptada na Fig. 5.3.1a.

Considerando as informações sobre o erro de adaptação e a aproximação das curvas de  $[L]$  para o modelo de metilação não-sequencial, mencionadas na seção 3.3, temos o parâmetro  $|\alpha|$  da Eq. 2.34, mostrado na seção 2.3, que é relacionado ao aumento no  $\log[L]$  e é compensado por uma mudança  $\Delta \langle m \rangle = 1$  no nível  $m$ . Assim, aumentar o valor de  $|\alpha|$  faz com que ocorra uma aproximação entre os valores de  $m$  correspondente aos valores máximo e mínimo de  $[L]$ , como mostrado pela transformação da Fig. 5.3.1b na Fig. 5.3.1c. A comparação dos dois gráficos deixa claro que essa mudança também reduz a amplitude da resposta do sistema quando temos um aumento na concentração do estímulo.

A influência do aumento de  $|\alpha|$  na precisão da adaptação  $\zeta^{-1}$  e no ganho de sensibilidade  $\Gamma$  pode ser vista através da Fig. 5.4.1 e 5.3.3. A Fig. 5.4.1, mostra que estes três valores,  $\alpha$ ,  $\zeta^{-1}$  e  $\Gamma$ , estão fortemente relacionados com a amplitude do nível de  $m$  de referência originado pela alteração de  $[L]$ , tendo em vista que o preenchimento dos grupos metílicos fazem uma compensação no aumento de  $[L]$ .

Na Fig. 5.3.3, é evidente que o aumento de  $|\alpha|$  leva a uma maior precisão, mas também resulta em um ganho de resposta reduzido. A razão é que, para um valor maior de  $|\alpha|$ , os receptores individuais do "cluster" no estado adaptado terão atividades mais distantes do valor médio adaptado  $\langle a \rangle \sim 1/2$  - estando mais próximo de 0 ou mais próximo de 1 - onde a sensibilidade (ganho) é menor, com visto na seção 5.1. Vale

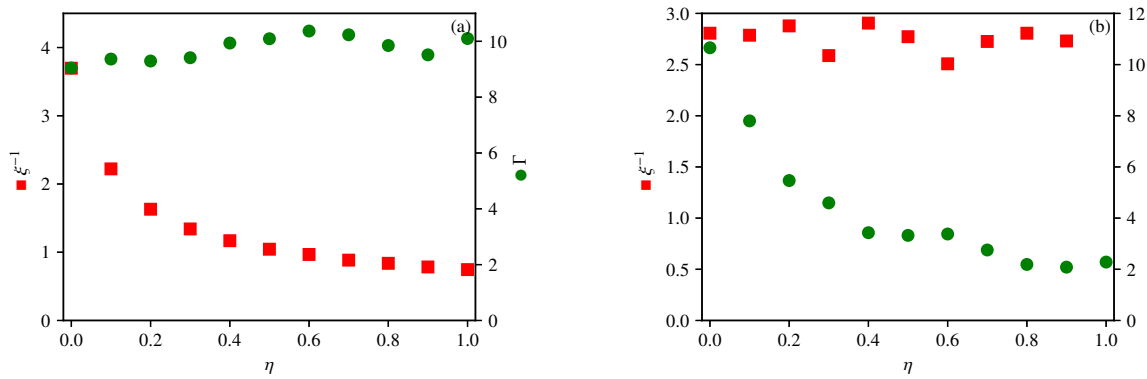


Figura 5.4.2 – O compromisso entre a precisão de adaptação ( $\zeta^{-1}$ ) e o ganho de resposta ( $\Gamma$ ). (a) A medida que aumentamos  $\eta$ , a precisão de adaptação  $\zeta^{-1}$  diminui enquanto o ganho de sinalização  $\Gamma$  permanece mais ou menos constante. (b) Quando sintonizamos parâmetros para manter a precisão  $\zeta^{-1}$  aproximadamente constante para diferentes valores de  $\eta$ , o ganho correspondente  $\Gamma$  diminui com  $\eta$ . Usamos  $[L]_{min} = 1$  mM e  $[L]_{max} = 100$  mM aqui.

a pena notar que esta dependência de  $\Gamma$  em  $|\alpha|$  é devida ao valor discreto do nível de metilação do receptor, que é capturado apenas pelo modelo de Ising, mas não no modelo simplificado de MWC, conforme explicado na seção 5.1.

Além dos casos extremos ( $\eta = 0$  e  $\eta = 1$ ) considerados até agora, o compromisso entre  $\Gamma$  e  $\zeta^{-1}$  existe para todos os casos intermediários da dinâmica de metilação com  $0 < \eta < 1$ . Quando mantemos os parâmetros constantes para diferentes valores de  $\eta$ , a precisão de adaptação diminui com  $\eta$  como mostrado na Fig. 5.4.2a. Por outro lado, quando sintonizamos os parâmetros para manter uma alta precisão (por exemplo, aumentando o  $|\alpha|$ ), o ganho correspondente diminui com  $\eta$  como mostrado na Fig. 5.4.2b. Portanto, para um esquema de metilação mais não-sequencial (um valor maior de  $\eta$ ), o compromisso entre  $\zeta^{-1}$  e  $\Gamma$  significa que só pode aumentar um deles em detrimento do outro.

O ajuste dos parâmetros, citado no parágrafo anterior, é feito pelo modelo MC, conforme descrito na seção 4.2. A Fig. 5.5.1a da seção 5.5, mostra a precisão e o ganho de sensibilidade resultante da simulação. A maioria das combinações dos parâmetros oferecem um ganho menor do que as combinações de melhor desempenho encontrado, conforme mostrado na seção 6.1, esse resultado demonstra a existência de um valor limite no ganho, que diminui com a precisão da adaptação. Contudo, uma redução na precisão  $\zeta^{-1}$  só pode ser traduzida em um aumento do ganho de resposta  $\Gamma$  se os parâmetros da simulação estiverem ajustados corretamente. Um esquema de ajuste de

parâmetros usando as simulações de Monte Carlo foi descrito na Seção 5.2, que consiste na busca dos parâmetros que fornecem o maior ganho para cada valor da precisão de adaptação.

O compromisso entre  $\zeta^{-1}$  e  $\Gamma$  também é perceptível nos limites de ganho máximo, quando exploramos exaustivamente o espaço de parâmetros mostrado na Fig. 5.5.1, da seção 5.5. Tanto para a metilação sequencial, quanto para a não-sequencial, a relação inversa entre  $\Gamma$  e  $\zeta^{-1}$  é observada no número de sítios de metilação.

## 5.5 A modificação sequencial melhora significativamente o desempenho com mais sítios de metilação

Considerando a seção 3.2.1, quanto ao erro de adaptação  $\epsilon$ , e a seção 5.3, referente aos limites de  $m = M$  para o cálculo da probabilidade  $P_M$ , estudamos o desempenho do sistema para uma dependência em  $M$ , ao calcular a sensibilidade ( $\Gamma$ ) e o erro de adaptação ( $\zeta$ ) em um conjunto aleatório de parâmetros com  $M = 1, 2, 3, 4$  e com  $\eta = 0$  e  $\eta = 1$ . Os resultados da Fig. 5.5.1, mostram claramente o compromisso (trade-off) entre ganho  $\Gamma$  e a precisão  $\zeta^{-1}$ . No entanto, existem diferenças significativas entre os casos de metilação sequencial e não-sequencial. Para a metilação sequencial ( $\eta = 0$ ), as linhas que representam o compromisso são levantadas de forma significativa à medida que  $M$  é aumentado, como mostra a Fig. 5.5.1a. De fato, as linhas de limite (linhas sólidas na Fig. 5.5.1), que são apenas ajustadas aos pontos de maior desempenho para cada valor de  $M$ , seguem uma forma aproximada:

$$\Gamma \ln(M\zeta^{-1}) = C_0(M), \quad (5.3)$$

sendo  $C_0(M)$  responsável por medir o desempenho global do sistema com metilação sequencial ( $\eta = 0$ ). Como mostrado no quadro dentro da Fig. 5.5.1a,  $C_0(M)$  aumenta significativamente (linearmente) com  $M$ . Em contraste, como mostrado na Fig. 5.5.1b, as linhas limiars dos pontos de desempenho, no caso de metilação não-sequencial, seguem uma curva muito gradual:

$$\Gamma\zeta^{-1} = C_1(M), \quad (5.4)$$

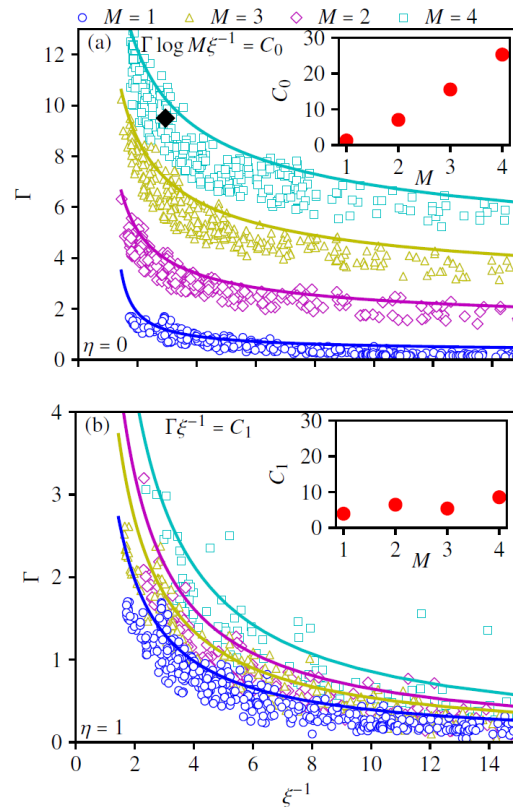


Figura 5.5.1 – O ganho de resposta  $\Gamma$  versus a precisão de adaptação  $\xi^{-1}$  para diferentes parâmetros em modelos de metilação (a) sequencial ( $\eta = 0$ ) e (b) não-sequencial ( $\eta = 1$ ). Cada símbolo corresponde a uma escolha diferente de parâmetros ( $m_0, \alpha, M$ ) com cores correspondente para aos seus valores  $M = 1$  (azul), 2 (roxo), 3 (amarelo), 4 (azul claro). Para cada valor de  $M$ , os pontos de melhor desempenho foram ajustados com as expressões mostradas nas Eqs. (5.3, 5.4), e os valores ajustados dos parâmetros globais de desempenho  $C_0$  e  $C_1$  para diferentes valores de  $M$  foram plotados nas inserções dentro dos gráficos. O losango preto é obtido a partir de resultados experimentais para o receptor de Tar em resposta ao MeAsp, conforme descrito na seção 6.1.

neste caso, o desempenho global  $C_1(M)$ , para o sistema de metilação não-sequencial ( $\eta = 1$ ), tem uma fraca dependência de  $M$  (quadro pequenos dentro da Fig. 5.5.1b). A dependência significativamente diferente de  $M$  para  $\eta = 0$  e  $\eta = 1$  mostra claramente que ter múltiplos sítios metílicos pode reduzir a precisão e melhorar o desempenho global do sistema, mas somente para dinâmicas de metilações sequenciais.

5.6 Para um erro de adaptação fixo, aumentar o número de sítios metílicos  $m$ , aumenta o ganho de resposta

Com a dependência do erro de adaptação  $\xi$ , para metilação sequencial dependendo do preenchimento dos sítios extremos do receptor, temos que o número de receptores nestes estados pode ser reduzido se o valor médio do nível  $m$  for igual a

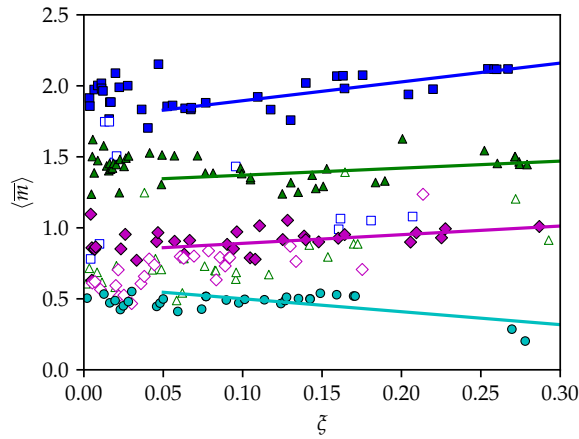


Figura 5.6.1 – Nível médio de  $m$  dos mutantes mais aptos. A média foi tomada sobre os níveis médios  $m$  do estado estacionário em cada valor de  $[L_i]$ . Os símbolos são os mesmos da Fig. 5.2.1.

$M/2$ , o que é o caso dos mutantes mais aptos, como pode ser visto pela Fig. 5.6.1. Essa distribuição da população dos receptores sobre os estados é controlada por  $\alpha$ . Para um dado erro de adaptação, o valor do  $|\alpha|$  deve ser grande se a quantidade  $M$  de sítios metílicos do receptor for pequena, a fim de concentrar a população em torno de  $M/2$ . No entanto, valores maiores de  $|\alpha|$  podem também reduzir o ganho de resposta do sistema, como pode ser visto através da Fig. 5.4.1. A mesma precisão  $\zeta^{-1}$  de adaptação pode ser alcançada com valores menores de  $|\alpha|$  se  $M$  for grande. Portanto, a existência de uma maior quantidade de sítios metílicos sequenciais pode melhorar o ganho de resposta, como pode ser visto na Fig. 5.5.1a, seção 5.5.

A representação do processo no modelo sequencial (Fig. 5.3.1a) e não-sequencial (Fig. 5.3.1b) demonstram que o nível adaptado da atividade não é uma linha perfeitamente horizontal, gerando um erro de adaptação. Conforme descrito na seção anterior, esse erro de adaptação tem uma relação direta com o ganho de resposta.

Uma vez que a metilação é responsável por compensar as flutuações na concentração do estímulo, a amplitude do nível  $m$  pode ser encontrada calculando a forma com que ela deve ser modificada para compensar os efeitos do aumento de  $[L]$ , quando ele vai de 0 a  $\infty$ , conforme visto na seção 2.4, que trata da influência de  $\alpha$  na energia do receptor. A influência de  $\alpha$  no comportamento do receptor, dado pela Eq. 2.37 da seção 2.4, pode ser vista pela Fig. 5.4.1, que demonstra que a amplitude do nível  $m$  é controlada pelo parâmetro  $\alpha$ .

Desta forma, vemos que o aumento do ganho  $\Gamma$  depende crucialmente de um amplo intervalo de  $m$ , que pode ser medido pela quantidade  $\Delta m$  definido pela Eq. 2.35,

esta relação é mostrada pela figura Fig. 5.4.1. O que faz com que os intervalos mais largos do nível  $m$  aumentem o ganho e diminuam a precisão da adaptação simultaneamente. Contudo, mais sítios com metilação sequencial, fornecem maior amplitude de  $\Delta m_{\max}$ , permitindo um maior ganho com o mesmo nível de erro de adaptação. Assim, um maior ganho é obtido se o nível  $m$  puder ajustar-se precisamente compensando o efeito das mudanças na concentração do estímulo, ou seja, para cada aumento da concentração de estímulo devemos ter um maior número de sítios. Esta é a razão pela qual aumentar  $M$  melhora o ganho de resposta

Assim, percebemos, pela Fig. 5.5.1a, que para uma precisão  $\xi^{-1}$  fixa, aumentar o número de sítios metílicos faz aumentar o ganho de resposta  $\Gamma$ , estando diretamente ligado a  $\Delta m$  por meio do  $\alpha$ , Fig. 5.4.1.

O mesmo não acontece para o modelo não-sequencial, tendo em vista que sua curva de atividade adaptada não apresenta a linha horizontal do modelo sequencial, como pode ser visto na Fig. 5.3.1b e 5.3.1c. Por este motivo, o aumento do número de sítios de metilação não resulta em um maior espaço para que os estados dos  $m$  possam se espalhar, pois, a cada incremento de  $[L]$  ocorre uma queda no ganho, mesmo com  $\Delta m$  maior e  $|\alpha|$  menor. Esta é a razão para a melhora muito modesta no ganho dos modelos de metilação não-sequencial, Fig. 5.5.1b.

## 5.7 Efeito de $\eta$ na distribuição dos estados

O efeito de  $\eta$  é permitir transições não-sequenciais. A Fig. 1.11.2, da seção 1.11, mostra os possíveis preenchimentos dos sítios metílicos no modelo não-sequencial. No entanto, não demonstra, de forma quantitativa, a distribuição da população em cada estado e como o sistema se comporta a medida que  $\eta$  varia entre 0 e 1. Podemos ver a dinâmica desse comportamento através dos histogramas da Fig. 5.7.1. As cores desses histogramas representam os estados de metilação da Fig. 1.11.2, com o mesmo ordenamento vertical.

A simulação é feita mantendo  $\gamma = 0$  fixo e variando o valor de  $\eta$ . A Fig. 5.7.1 é dividida por estados metílicos, sendo que, em cada estado, temos uma proporção de grupos metílicos que preenche cada sítio em uma população de receptores. Esses histogramas tem como finalidade mostrar, num tempo qualquer, qual o tipo de distri-



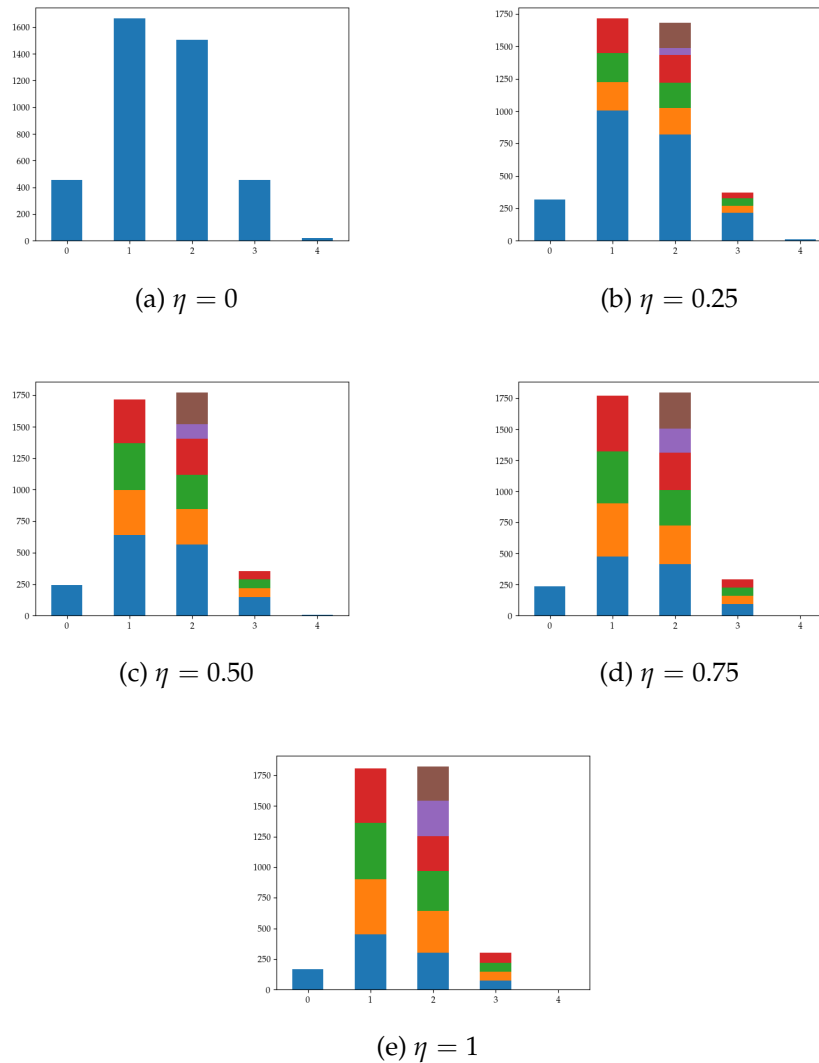


Figura 5.7.1 – Distribuição dos estados metílicos para os modelos sequencial,  $\eta = 0$ , e aleatório,  $0 < \eta \leq 1$ , sendo (a)  $\eta = 0$ , (b)  $\eta = 0.25$ , (c)  $\eta = 0.50$ , (d)  $\eta = 0.25$  e (e)  $\eta = 1$ . As faixas coloridas são as populações de cada estado da Fig.1.11.2, empilhado na mesma ordem. O eixo horizontal é o nível de metilação.

buição que é conseguida pelo sistema quando variamos a aleatoriedade da metilação através de  $\eta$ . Desta forma, o que pode ser demonstrado é que, para o modelo totalmente não-sequencial,  $\eta = 1$ , os sítios metílicos são distribuídos em uma quantidade bem próxima para cada estado de metilação, caso da Fig. 5.7.1e, onde é possível perceber uma distribuição entre os estados de cada nível de metilação.

Como era de se esperar, com  $0 < \eta < 1$ , o estado sequencial é o mais populado nas Figs. 5.7.1a, 5.7.1b e 5.7.1c. Na Fig. 5.7.1b, com a situação de  $m = 2$  preenchidos, é possível perceber uma população menor no intervalo de cor roxa. Esse é o segundo estado de cima para baixo na coluna de  $m = 2$  na Fig.1.11.2. Esta população menor

é devido à contribuição deste sítio ser proveniente apenas de setas cinzas, que são contribuições vindas dos estados que obedecem o modelo não-sequencial. Isso resulta em uma contribuição também menor se comparado com os estados para os quais apontam uma ou mais setas pretas, na qual, representa a contribuição referente ao modelo sequencial.

À medida que a distribuição de grupos metílicos se torna mais sequencial, ou seja, com  $\eta$  se aproximando de 0, percebemos que os sítios metílicos obedecem o modelo totalmente sequencial, mostrando que os estados da parte inferior da Fig. 1.11.2, da seção 1.11, ficam mais populados. O modelo totalmente sequencial, com  $\eta = 0$ , é representado pela Fig. 5.7.1a.

## 5.8 Efeito de $\gamma$ na distribuição dos estados

Nos modelos matemáticos descritos no capítulo 3, a metilação em cada direção é realizada por uma reação diferente, envolvendo diferentes enzimas, conforme vimos na seção 1.14. Em nossas simulações, até o momento, todas as reações de metilações/desmetilações foram feitas considerando apenas um único sentido. Embora essa aproximação seja conveniente para o estudo da dinâmica de adaptação, o sentido único dessas reações (taxa de transição), como aparentemente mostrado pelas Fig. 1.11.1 e 1.11.2, não é realista, pois exigiria uma taxa infinita de consumo de energia [12]. Uma descrição termodinamicamente correta deve incluir um sentido inverso de cada reação e o consumo de energia necessário para manter o equilíbrio entre as reações [11]. Tal descrição foi apresentada na Seção 3.4 que introduzimos o parâmetro  $\gamma$  proporcional às reações reversas.

Nesta seção, ao contrário que fizemos na seção anterior, verificamos o comportamento da variação de  $\gamma$ , entre 0 e 1, considerando  $\eta = 0$ . A apresentação das distribuições dos grupos metílicos nos receptores são demonstrados através da Fig. 5.8.1.

Além de ser responsável por impedir o consumo infinito de energia pelo sistema de metilação/desmetilação, a presença de  $\gamma$  também tem efeito na distribuição dos grupos metílicos nos receptores. Diante disso, podemos ver, através da Fig. 1.11.2, a existência de setas pretas e cinzas. Cada uma dessas setas devem ser entendidas como duas, tanto no estado ativo como no inativo, conforme esquematizado pela Fig. 3.4.1.

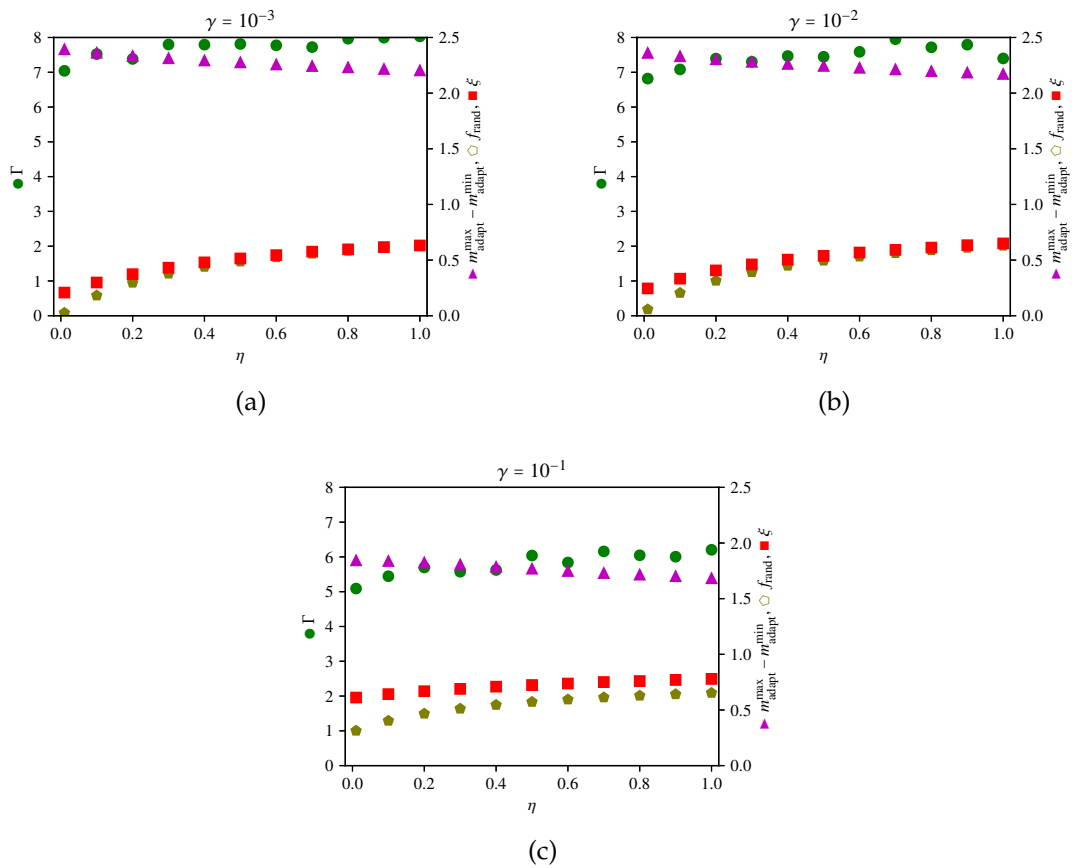


Figura 5.8.1 – Descrição das frequências de receptores preenchidos pelo modelo aleatório  $f_{rand}$ , sendo diretamente ligado ao valor de  $\gamma$ . Os valores maiores de  $\gamma$  trazem a aleatoriedade ao sistema mesmo com  $\eta = 0$ .

Para não sobrecarregar a Fig. 1.11.2, omitimos nela as transições proporcionais à da Fig. 3.4.1.

Por imposição termodinâmica cada transição da Fig. 1.11.2 pode também ocorrer no sentido contrário ao principal, no qual, essa transição é proporcional a exponencial da diferença de energia, mostrado pela Eq. 3.32. As setas contrárias possuem, para um modelo dinâmico, a variável  $\gamma$  no intervalo entre 0 e 1. O modelo perfeitamente sequencial exige  $\gamma = 0$  e um consumo infinito de energia, conforme descrito na seção 2.8. Com  $\gamma = 1$ , o sistema está em equilíbrio, não existindo o fluxo líquido no sentido anti-horário, que ocorre quando  $0 < \gamma < 1$ , conforme mostrado pela Tabela 4, da seção 3.5. Neste estado de  $\gamma$ , temos um maior fluxo no sentido anti-horário, o que faz com que a metilação dos sítios obedeaça um modelo mais sequencial, e, conseqüentemente, um consumo de energia maior, como mostrado pela Fig. 2.8.1, da seção 2.8. Assim, o efeito de  $\gamma$  é gerar um fluxo contrário a qualquer fluxo, caso contrário seria necessário o consumo infinito de energia.

A Fig. 5.8.1 mostra a dependência de  $f_{\text{rand}}$ , que é a fração da população de receptores nos estados não-sequenciais, com a variação de  $\gamma$ . Podemos notar que, mesmo com  $\eta = 0$ , que garante o preenchimento dos sítios pelo modelo sequencial, ainda temos a presença de estados metilados não-sequenciais, caracterizados por  $f_{\text{rand}} > 0$ , Fig. 5.8.1c. Em nossas simulações, foi possível verificar essa presença para valores de  $\gamma$  na ordem de grandeza de  $10^{-1}$ . Para valores menores que  $10^{-2}$  o sistema demonstra comportamento semelhante ao modelo sequencial, quanto ao preenchimento dos sítios. As Fig. 5.8.1b e 5.8.1a mostram o comportamento para um valor de  $\gamma$  muito baixo.

A razão pela qual estados aleatórios são ocupados mesmo com  $\eta = 0$  é explicado na Fig. 3.4.2, da seção 3.5, onde vemos a possibilidade do sítio ser metilado, pela taxa de transição  $\gamma k^- e^{-\alpha-\alpha}$ , mesmo não tendo  $k^+$  para metilar, devido  $\eta = 0$  (estados que possuem apenas as setas cinzas como forma de entrada). Essa forma de metilação, explica também a existência de alguns sítios terem um menor número de grupos metílicos, quando usamos o modelo de metilação parcialmente sequencial com  $0 < \eta < 1$ , pois algumas posições de transição são apenas populados pela presença do  $\gamma$ . Para  $\gamma$  com um valor muito pequeno, na ordem de  $10^{-2}$  é como se não existisse o fluxo no sentido contrário ao fluxo de transição principal.

## 5.9 Energia e Ganho

O par de setas apontando em ambas as direções de cada par de estados da Fig. 1.11.2 representam reações químicas distintas, envolvendo diferentes reagentes, e não são as reações inversas de adição e subtração de grupos metílicos. Quando  $\gamma > 0$ , há uma reação inversa adicional para cada seta preta e cinza da Fig. 1.11.2, formando, por exemplo, o par superior e o inferior de setas da Fig. 3.4.2.

Como visto na seção anterior, a presença dessas reações reversas resultam em metilações não-sequenciais mesmo com  $\eta = 0$ , fazendo com que a probabilidade de uma reação química que modifique os receptores em ordem não-sequencial aumente com  $\eta$  ou  $\gamma$ . Como resultado, valores mais altos de  $\eta$  e  $\gamma$  levam a uma fração menor do receptor nos estados sequenciais. A modificação completamente sequencial requer  $\eta = 0$  e  $\gamma = 0$ . Em virtude da aleatoriedade introduzida por  $\eta$  e  $\gamma$ , alguns dos efeitos desses parâmetros na dinâmica do sistema são semelhantes, mas esses parâmetros desempenham papéis diferentes em outros aspectos.

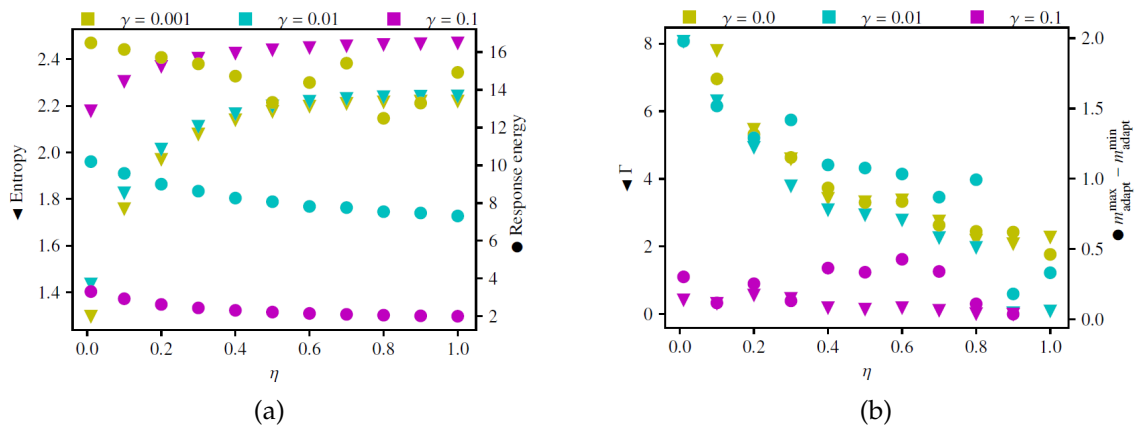


Figura 5.9.1 – Efeito observado com o aumento de  $\gamma$  e  $\eta$ . a) comportamento da entropia e da resposta de energia a cada aumento de  $\gamma$  e  $\eta$ . b) relação entre ganho e  $\Delta m_{adapt}$ , mudança de nível adaptado  $m$ , quando temos uma combinação de  $\gamma$  e  $\eta$ . Procuramos os parâmetros que fornecem o maior ganho  $\Gamma$  com o erro de adaptação limitado a  $\xi < 0,2$ .

O distúrbio introduzido por  $\eta$  e  $\gamma$  pode ser medido pela entropia. Como visto na Fig. 5.9.1, a entropia cresce monotonicamente com  $\eta$  e mostra que pequenos valores de  $\eta$  e  $\gamma$  são necessários para que os efeitos da sequencialidade, com melhor ganho, possam ser observados. A entropia também diminui com  $\gamma$  baixo, embora menos forte que com a diminuição de  $\eta$ . Assim, mais uma vez, conseguimos ver o efeito não-sequencial, um ganho ( $\Gamma$ ) menor, com o aumento de  $\gamma$  mesmo que  $\eta$  seja muito pequeno.

A energia consumida na resposta a uma mudança de estímulo pode ser estimada como o produto da taxa de consumo de energia pela escala de tempo do sistema, definida na Seção 3.7. O efeito de  $\eta$  e  $\gamma$  na energia da resposta é mostrado na Fig. 5.9.1a. Como esperado, valores pequenos de  $\gamma$  causam alto consumo de energia. A energia também aumenta com a diminuição de  $\eta$ , embora menos fortemente do que com a diminuição  $\gamma$ .

Como discutido nas seções 3.3 e 5.3, é possível uma adaptação mais precisa com a metilação não-sequencial, se a mudança no nível  $m$  for pequena, reduzindo simetricamente o ganho. A Fig. 5.9.1b mostra o resultado do ajuste dos parâmetros para alcançar o maior ganho com o erro de adaptação limitado a  $\xi < 0,2$ , para várias combinações de  $\eta$  e  $\gamma$ . A Fig. 5.9.1b, demonstra também que valores mais baixos de  $\eta$  e  $\gamma$  permitem que o nível de  $m$  cubra uma faixa mais amplas, resultando em ganhos maiores.

Sabemos pelo capítulo 3 e pelas simulações na seção 5.3 que a precisão da adaptação é prejudicada pela não-sequencialidade no mecanismo de metilação. Pelo

compromisso entre precisão de adaptação e ganho de resposta, o ganho também pode ser afetado pela não-sequencialidade, como visto pela Fig. 5.3.1b. O sistema perfeitamente sequencial requer um consumo infinito de energia ( $\gamma = 0$ ), o que não é possível. Por outro lado, valores maiores de  $\gamma$  consomem menos energia ao custo de introduzir a não-sequencialidade ao sistema.

## 5.10 Custo energético devido a sequencialidade da metilação

Nesta seção, estudamos como o custo de energia depende da ordem de metilação do sítios caracterizada por  $\eta$ . Como vimos na seção anterior, a modificação completamente sequencial requer  $\eta = 0$  e  $\gamma = 0$  quando somente os sítios possíveis de metilação "sequencial" ( $M + 1$ ) entre os sítios possíveis de  $2^M$  podem ser preenchidos. Para  $\eta > 0$ , todos os sítios, incluindo os sítios "não-sequenciais" (não ordenado) ( $2^M + (M - 1)$ ) são preenchidos. Quantitativamente, o grau de não-sequencialidade pode ser medido pela fração de receptores nos estados não-sequenciais, bem como considerando a entropia definida por

$$S = - \sum P_{\vec{m}} \log P_{\vec{m}}, \quad (5.5)$$

onde  $P_{\vec{m}}$  é a probabilidade de um receptor no estado metilado  $\vec{m} = (m_1, m_2, \dots, m_M)$  com  $m_i = 0, 1$  descrever o estado metilado e não metilado do sítio  $i = 1, 2, \dots, M$ . Tanto a fração de receptores nos estados não-sequenciais quanto a entropia  $S$  aumentam com  $\eta$ .

Dessa forma, de acordo com a segunda lei da termodinâmica, a redução da entropia  $S$  vem com o custo da dissipação de energia. Assim, em função da taxa de produção de entropia, a taxa mínima de consumo de energia do sistema ( $\dot{W}$ ) pode ser determinada por:

$$\dot{W} = \sum_{\vec{m}, \vec{m}'} (J_{\vec{m}, \vec{m}'} - J_{\vec{m}', \vec{m}}) \log \frac{J_{\vec{m}, \vec{m}'}}{J_{\vec{m}', \vec{m}}} \quad (5.6)$$

onde  $J_{\vec{m}, \vec{m}'} \equiv k_{\vec{m}, \vec{m}'} P(\vec{m})$  com  $J_{\vec{m}, \vec{m}'}$  sendo a taxa de transição em um tempo qualquer e  $k_{\vec{m}, \vec{m}'}$  a taxa de transição de um estado  $\vec{m}$  para o estado  $\vec{m}'$ . Por considerarmos em equilíbrio a ligação/desligamento de ligante e ativação/desativação que compartilham o mesmo  $m$ , neste trabalho, negligenciamos a produção de entropia muito menor nas transições mais rápidas.

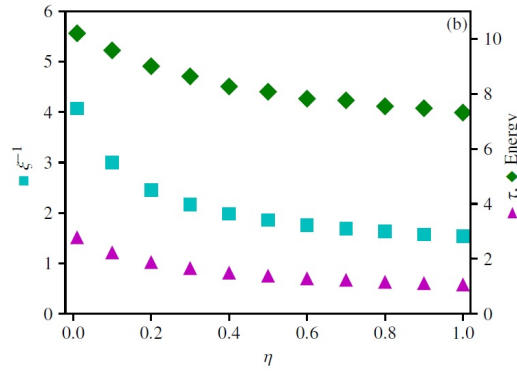


Figura 5.10.1 – Comparação entre precisão e o tempo de adaptação, com  $0 < \eta < 1$ , com  $\gamma = 0.01$ . Com exceção de  $\eta$  todos os parâmetros foram mantidos constantes.

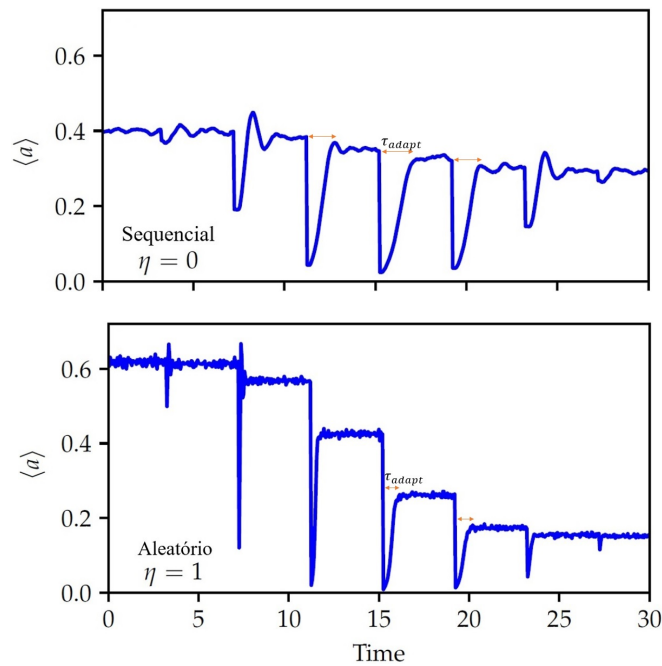


Figura 5.10.2 – Comparação entre o tempo de adaptação  $\tau_{\text{adapt}}$  para a modificação sequencial  $\eta = 0$  e não-sequencial  $\eta = 1$ .

A partir da equação que governa a dinâmica da população receptora  $P(\vec{m})$ , podemos determinar a escala de tempo para a adaptação  $\tau_{\text{adapt}}(\eta)$  (veja seção 3.7 para mais detalhes). A partir de  $\tau_{\text{adapt}}$  e  $\dot{W}$ , podemos definir um custo de energia de adaptação  $\Delta W$ :

$$\Delta W = \dot{W} \times \tau_{\text{adapt}}, \quad (5.7)$$

que caracteriza o custo energético mínimo durante o tempo de adaptação, ou a energia consumida a cada nova resposta.

O desempenho do processo de adaptação pode ser caracterizado pela sua pre-

cisão  $\zeta^{-1}$  e pelo tempo de adaptação  $\tau_{\text{adapt}}$ . A dependência de  $\zeta^{-1}$  e  $\tau_{\text{adapt}}$  em função de  $\eta$  é mostrada na Fig. 5.10.1. Nossos resultados mostram claramente que, enquanto a modificação sequencial ( $\eta = 0$ ) leva a uma adaptação mais precisa, também faz com que o processo de adaptação seja mais lento se comparado com o modelo não-sequencial ( $\eta = 1$ ), como pode ser visto pelas Fig. 5.10.1 e 5.10.2, e, portanto, tenha um custo energético  $\Delta W$  mais alto. Este compromisso (trade-off) de precisão de velocidade de energia foi descoberto pela primeira vez no modelo puramente sequencial, variando as taxas cinéticas [11]. Nossos resultados aqui mostram que a relação de compromisso da precisão de velocidade de energia é verdadeira, pois o esquema de metilação varia de puramente sequencial ( $\eta = 0$ ) a inteiramente aleatório ( $\eta = 1$ ).

Intuitivamente, é necessária uma energia adicional para o esquema de modificação sequencial, para controlar o processo de modificação ao longo do caminho preferido. Esse mecanismo de controle leva a um espaço de fase mais restrito, com uma entropia  $S$  menor e uma adaptação mais precisa; mas também diminui a dinâmica, levando a um  $\tau_{\text{adapt}}$  mais longo.



## 6 Comparação com experimentos

A comparação com experimentos já realizados, como o de Sourjik e Berg [13], no qual foi medido o nível de atividade adaptada em função da concentração de estímulo, nos permite determinar propriedades do sistema necessárias para explicar os dados experimentais. No entanto, é necessário a introdução de uma descrição precisa e real dos sítios de metilação do receptor. Para este estudo trataremos o receptor de Tar da *E. coli*.

A Fig. 6.0.1 mostra as posições dos quatro sítios metílicos no receptor, bem como os dois resíduos "potencializadores" que auxiliam a inicialização dos processos sequenciais de metilação ou desmetilação. Descrevemos o estado de metilação dos receptores por seis números binários,  $m_4(h_{3f})m_3m_2m_1(h_{1r})$ , que seguem a mesma ordem decrescente em que aparecem na sequência proteica.

A dinâmica de metilação nos sítios 3, 2, 1, considerada teoricamente na ordem inversa, tem uma relação de sequencialidade forte  $3 \rightarrow 2 \rightarrow 1$ , enquanto a metilação no sítio 4 traz uma descrição fraca e independente dos outros sítios. Em nossa notação, um sítio metílico é modificável quando é descrito por "x" e, não modificáveis, quando atribuímos os valores 0 ou 1, fixando assim uma mutação. Os resíduos potencializadores são dados por  $h_{3f}$  e  $h_{1r}$ , quando  $h_{3f} = 1$ , a metilação no sítio 3 ( $m_3$ ) torna-se aumentada; quando  $h_{1r} = 0$ , a desmetilação do sítio 1 ( $m_1$ ) fica aumentada, o que caracteriza o

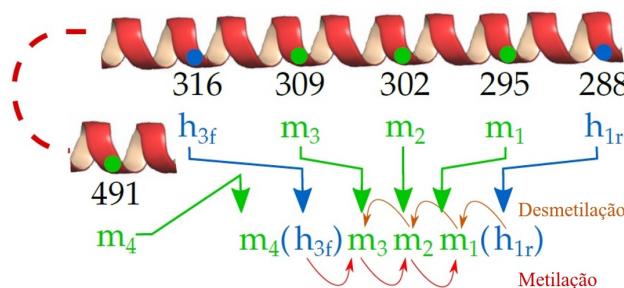


Figura 6.0.1 – Ilustração e notação para o receptor Tar com os principais resíduos marcados. O estado de metilação do sítio  $n$  ( $n = 1, 2, 3, 4$ ) é descrito por uma variável binária  $m_n$  (1-metilada; 0 – não metilada). Os processos sequenciais de metilação e desmetilação entre os sítios 1 – 2 – 3 são mostrados pelas setas vermelhas. Os dois sítios potencializadores (316 e 288) são descritos por dois números binários  $h_{3f}$  e  $h_{1r}$ , que controlam a inicialização dos processos sequenciais de metilação e desmetilação:  $h_{3f} = 1$  promove a metilação do sítio 3;  $h_{1r}$  promove a desmetilação do sítio 1.

modelo de metilação sequencial. Caso contrário, quando  $h_{3f} = 0$  ou  $h_{1r} = 1$ , a metilação inicial do sítio 3 ou a desmetilação inicial do sítio 1 são inibidas, e ocorrem apenas pelos processos de metilação ou desmetilação não-sequencial lento. Observamos que, embora a existência do sítio  $h_{3f}$  seja sustentada por experimentos [17] [16], o sítio potencializador  $h_{1r}$  para desmetilação é introduzido hipoteticamente por razões de simetria.

## 6.1 Precisão da adaptação e ganho

Existem experimentos anteriores, onde os modelos de medidas são feitas com o uso do FRET, técnica na qual é analisada a transferência de energia, capaz de fazer a medição de interação entre as proteínas alvo. No entanto, células do tipo selvagens (WT), com a funcionalidade de CheR e CheB, não existem medições diretas de metilação. Contudo, no trabalho de Sourjik e Berg [13] foram feitos experimentos detalhados da dinâmica da atividade quinase *in vivo*, em resposta a um amplo intervalo de estímulos. Para eles, a sensibilidade relativa  $S_r$  é definida pela Eq. 6.1 [13] como a mudança fracionária no sinal FRET da proteína CheY-P, dividido pela mudança fracionária no estímulo:

$$S_r = \frac{\Delta Fret / Fret}{\Delta [L] / [L]} \sim g \quad (6.1)$$

sendo  $g$  o integrando da Eq. 3.33. Usando essa aproximação, pudemos estimar o valor de  $\Gamma$ :  $9 \lesssim \Gamma \lesssim 10$  para Tar a partir do primeiro pico da Fig. 3 de [13], representado neste trabalho pela Fig. 6.1.1. A relação entre  $S_r$  e  $g$ , na Eq. 6.1, é devido a dependência de ambos à proteína CheY-P

Para a precisão da adaptação ( $\zeta^{-1}$ ) dada pela Eq. 3.34, obtemos uma estimativa experimental do seu valor considerando o trabalho de Neumann et al. [14]. A partir dos dados da Fig. 1B [14] é possível encontrar a precisão da adaptação no intervalo aproximado de:  $\zeta^{-1} \approx 2.3 - 3.5$  com  $[L]_{max} = 5$  mM, Fig. 6.1.2. Para termos um valor compatível, simulamos o valor de  $\zeta^{-1}$  com concentração  $[L]_{max} = 5$  mM e produzimos a dependência de  $\zeta^{-1} \times \eta$  mostrado na Fig. 6.1.3. Este gráfico possibilitou estimar a faixa do parâmetro  $\eta$ ,  $0.05 \leq \eta \leq 0.13$ , para uma não-sequencialidade efetiva. Nessa faixa se consegue uma boa relação entre o ganho de resposta e a precisão de adaptação.

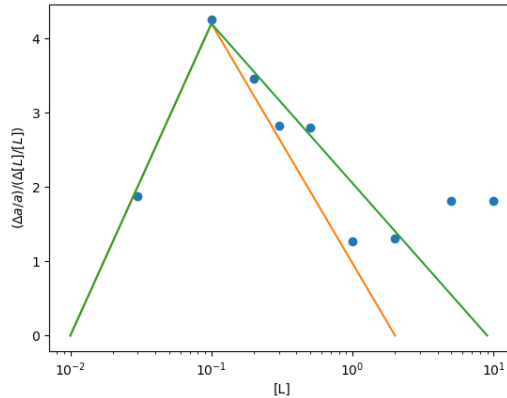


Figura 6.1.1 – Gráfico que simula o experimento feito por Sourjik e Berg [13] mostrando a dependência da sensibilidade de resposta nas mudanças da concentração para Tar, no qual foi usado para estimar o valor de  $\Gamma$ .

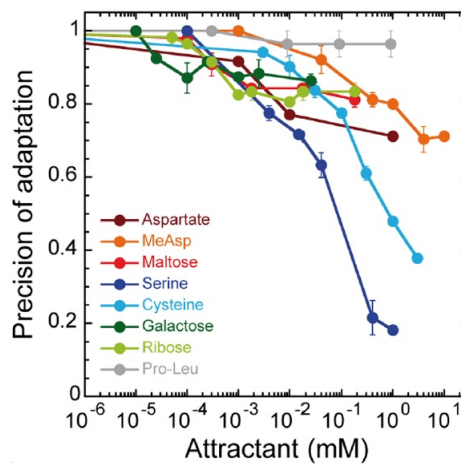


Figura 6.1.2 – Gráfico retirado de Neumann et al. [14] de onde se consegue a aproximação experimental da precisão da adaptação  $\zeta^{-1} \approx 2.3 - 3.5$ .

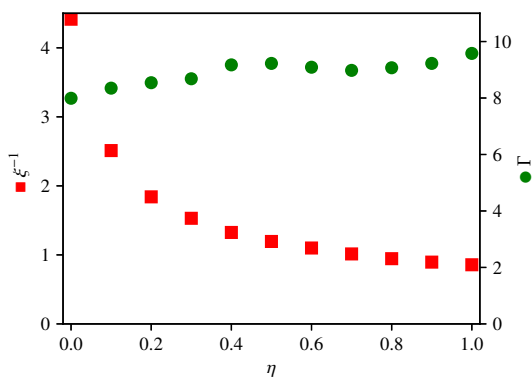


Figura 6.1.3 – O mesmo que na Fig. 5.4.2a, com  $\zeta^{-1}$  calculado usando  $[L]_{max} = 5$  mM, o maior valor experimental confiável disponível para MeAsp em [14].

Portanto, o intervalo de valores de  $\Gamma$  e  $\xi^{-1}$ , obtidos de experimentos, são representados pelo losango preto na Fig. 5.5.1a, seção 5.5. No entanto, se o modelo fosse uma descrição precisa da resposta quimiotática, os resultados observados seriam possíveis somente com  $M = 4$  e uma modificação quase sequencial, com o valor de  $\eta < 0.2$ , mostrado na Fig. 6.1.3. Assim, com a comparação dos experimentos e nosso modelo de simulação, foi possível determinar o ganho global  $\Gamma$  e a precisão da adaptação  $\xi^{-1}$ .

## 6.2 Perfil de metilação

Mostramos na seção 1.11, experimentos que medem o perfil de metilação dos diferentes sítios metílicos, trabalhando com as proteínas E-glutamato, D-aspartato, A-Alanina e Q-glutamina para o receptor do tipo selvagem (*QEQE*). Neles, a substituição destas proteínas, em diferentes locais no receptor, foi usada para analisar a importância de cada sítio. Alguns experimentos trabalham com a presença e a funcionalidade completa das proteínas CheR e CheB, possibilitando a metilação e a demetilação dos sítios metílicos. Outros, como o estudado pelo laboratório de Koshland há mais de 20 anos [17] e [16], reproduz os experimentos com a proteína CheB ausente (*CheB<sup>-</sup>*), ou seja, permite apenas que o sítio seja metilado pela proteína CheR. Diante disso, nosso objetivo no estudo do perfil de metilação é fazer a comparação entre o resultado encontrado pelo grupo de Koshland e as simulações feitas nesse trabalho.

O estudo de Saphiro e Koshland é reproduzido pela Tabela 5, no qual, o receptor do tipo selvagem está no tipo *EEEE*, devido ao processo de desamidação, citado na seção 1.11, que transforma a proteína *Q* em *E*. Nesses experimentos, além do receptor tipo selvagem, receptores mutantes, *EEDE* e *EEQE*, também foram utilizados. A substituição do sítio de metilação 3 (*E309*), Fig. 6.0.1, por Aspartato (*D*) ou Glutamina (*Q*) faz com que ele se comporte, respectivamente, como um sítio permanentemente não metilado ou permanentemente metilado. Os sítios com Glutamato (*E*) são inicialmente desmetilados, mas podem ser metilados por CheR.

O receptor de aspartato da *E. Coli*, investigado por Saphiro e Koshland (1994) [17] e Saphiro et al. (1995A) [16], é composto por três sítios metílicos vizinhos, 1, 2 e 3 e um quarto localizado mais distante. As taxas de metilação dos sítios 1, 2 e 3 nos receptores *EEEE* da Tabela 5 é coerente com a metilação sequencial, que é considerada teoricamente na ordem inversa conforme vimos na seção 6.

Mutantes	Simulação	$m_1$	$m_2$	$m_3$	$m_4$
EEEE	0(1)xxx(0)	0.03	0.28	0.64	0.05
EEDE	0(1)0xx(0)	0.044	0.017	-	0.08
EEQE	0(1)1xx(0)	0.15	0.74	-	0.10

Tabela 5 – Taxa de metilação normalizada reproduzida de [16]. As quatro letras na primeira coluna são os resíduos, respectivamente, nos locais de metilação 1, 2, 3 e 4. A segunda coluna é a configuração utilizada para a simulação correspondente, com  $m_4 = 0$  para simular a baixa taxa de metilação do sítio 4, mostrado no experimento [17].

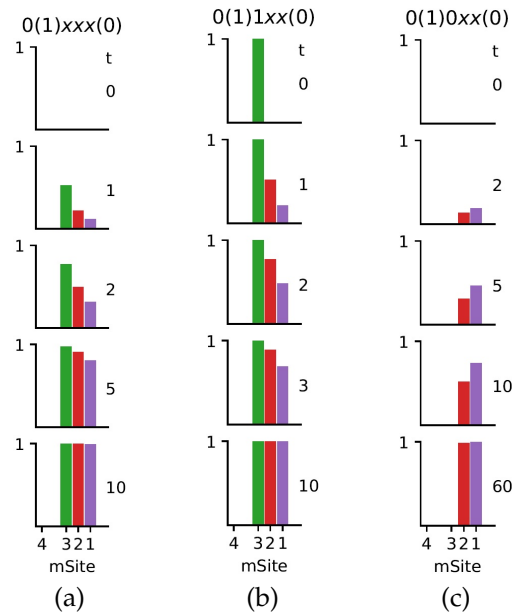


Figura 6.2.1 – Dinâmica de metilação prevista em resposta a um nível de saturação de atratividade para três diferentes mutantes  $CheB^-$  listados na Tabela 5: (a) 0(1)xxx(0); (b) 0(1)1xx(0); (c) 0(1)0xx(0). As probabilidades de serem metiladas em cada sítio de metilação são mostradas em diferentes tempos  $t$ . Os parâmetros utilizados são  $\eta = 0.1$  e  $k^- = 0$ .

Os resultados das nossas simulações, mostradas pela Fig. 6.2.1, são comparados com os experimentos citados acima, do tipo ( $CheB^-$ ). Nossa simulação considera que diferentes dinâmicas de metilação dos sítios, sequencial e não-sequencial, levam a perfis de metilação média, qualitativamente, distintos em um determinado momento, sendo  $p(m_i, t)$  a probabilidade do sítio  $i$  ser metilado, ou seja,  $m_i = 1$ , no tempo  $t$ . Assim, para uma dinâmica de metilação puramente não-sequencial toda  $p(m_i, t)$  deve ser a mesma. No entanto, para a dinâmica dominada pela metilação sequencial, o padrão de metilação entre os diferentes sítios segue ordem distinta.

Dessa forma, estudamos nas simulações a dinâmica de metilação desses tipos de mutantes  $CheB^-$ , usando um pequeno valor de  $\eta$  ( $= 0.1$ ), mas mantendo um modelo sequencial dominante. A Fig. 6.2.1a mostra a metilação sequencial de um receptor completamente desmetilado (0(1)xxx(0)). Seu processo de metilação começa pelo sítio

3, segue para o sítio 2 e por último para o sítio 1. Esta ordem  $p(m_3, t) > p(m_2, t) > p(m_1, t)$  persiste ao longo do processo de metilação, concordando com os resultados experimentais mostrado pelo receptor do tipo *EEEE* da Tabela 5. Estudamos também a dinâmica de metilação quando fixamos o nível de metilação do sítio inicial  $m_3$  em 0 e 1 para simular, respectivamente, os receptores *EEDE* e *EEQE* da Tabela 5. Para  $m_3 = 1$ , a ordem de metilação para o sítio 2 e o sítio 1 ainda persistem ao longo do processo de metilação, como demonstrado na Fig. 6.2.1b. Como resultado, temos  $p(m_2, t) > p(m_1, t)$  o que é novamente consistente com o resultado experimental.

No entanto, o resultado que mais surpreende vem do receptor *EEDE*, onde fixamos  $m_3 = 0$ . Aqui, temos as probabilidades da inversão do sítio 2 e do sítio 1:  $p(m_2, t) < p(m_1, t)$ . Esta inversão deve-se ao fato da sequência de metilação ser quebrada quando o sítio 3 não pode ser metilado. Como resultado, os sítios 1 e 2 são metilados inicialmente de forma não-sequencial, que não tem preferência e é proporcional a  $\eta$ . Com a metilação do sítio 2, o sítio 1 aumenta a taxa de metilação devido ao processo de metilação sequencial entre os dois. Portanto, a soma de contribuição na metilação do sítio 1, pelo modelo sequencial e não-sequencial, causa a inversão observada em nossa simulação, Fig. 6.2.1c, e provavelmente nos experimentos.

Para o sítio 4, diferentemente do modelo simulado, os resultados experimentais mostram que não existe nenhuma conexão de sequencialidade entre os sítios 3 e 4. Um possível motivo para isso é o sítio 4 ser localizado, na proteína, em um terminal diferente do sítio 3. Além disso, o sítio 4 é metilado a uma taxa muito mais lenta que o sítio 3, como pode ser visto na Tabela 5. Para evitar alguma influência na metilação do sítio 3, optamos por manter o sítio 4 não metilado nas simulações da Fig. 6.2.1b e Fig. 6.2.1c, assim, preservamos a comparação com o trabalho do grupo de Saphiro [16].

No geral, os resultados do nosso modelo, que são consistentes com dados experimentais, indicam que o processo de metilação para os sítios 3, 2 e 1 são na maior parte sequenciais, mas há um componente não-sequencial pequeno e finito.

### 6.3 Valor do parâmetro $\eta$ nos mutantes *CheB*<sup>-</sup>

A metilação dos sítios *E-coli* 1 e 2 foi experimentalmente mostrada (Tabela 5) com a dependência da metilação do sítio *E-coli* 3, que, como sabemos, influencia a

modificação sequencial do sítio *E-coli* 2. Isto corresponde, no modelo da Fig.3.8.1 da seção 3.8, a modificação sequencial do sítio 1, que depende do parâmetro  $\eta_1$  e que neste esquema o seu valor depende do resíduo no sítio *E-coli* 3 da Tabela 5. Consideramos  $\eta_Q = 1$  e, comparando a taxa de metilação  $m_2$  de *EEQE* e *EEDE* da Tabela 5, concluímos que  $\eta_D = 0.017/0.074 = 0.023$ . Ainda referente a Fig. 3.8.1 e a Tabela 5, os sítios de glutamato não metilados induzem a metilação não-sequencial com a mesma probabilidade usada no modelo principal,  $\eta_E \equiv \eta_2 \equiv \eta$ .

O resíduo de glutamina no sítio *E-coli* 3 implica  $\eta_1 = \eta_Q = 1$  na Fig. 3.8.1, promove a metilação sequencial do sítio 1 e leva a  $p(m_1, t) > p(m_2, t)$ . No entanto, o resíduo de aspartato no sítio *E-coli* 3 implica  $\eta_1 = \eta_D = 0.023$ , inibe a metilação sequencial do sítio 1 e leva a  $p(m_1, t) < p(m_2, t)$ .

Na seção 3.8, derivamos a dinâmica de  $p(m_1, t)/p(m_2, t)$  mostrando que a distribuição dos receptores entre os quatro estados de metilação da Fig 3.8.1 obedece a Eq. 3.37. A razão entre o nível de metilação dos sítios 1 e 2,  $p(m_1, t)/p(m_2, t)$ , obedece a Eq. 3.46.

O valor da razão  $p(m_1, t)/p(m_2, t)$  é plotado na Fig. 6.3.1 como uma função de  $\eta_1$  para diferentes valores de  $\eta_2/\eta_1$  mostradas na legenda. A simulação com o modelo MC deste trabalho é mostrada pelos círculos ciano e concorda perfeitamente com o presente modelo analítico com  $\eta_1 = \eta_2$ .

Nestas equações, a presença de parâmetros distintos  $\eta_1$  e  $\eta_2$  para a metilação não-sequencial de diferentes sítios, pode ser usada para obter resultados mais gerais do que os obtidos em nossa simulação MC, onde usamos  $\eta_1 = \eta_2$ . Por exemplo, a razão  $p(m_1, t)/p(m_2, t) < 0.5$  requer  $\eta_2 > \eta_1$ , como pode ser visto na Fig. 6.3.1.

A razão  $p(m_1, t)/p(m_2, t) = 0.017/0.044 = 0.39$  obtida experimentalmente para *EEDE* na Tabela 5 é a linha tracejada preta da Fig. 3.8.2, da seção 3.8. Na mesma figura, com o valor  $\eta_1 = 0.023$  discutido acima, temos a curva vermelha como valor mínimo de  $p(m_1, t)/p(m_2, t)$  com  $\eta_2 = 0.047$ . Isso define o limite inferior para o parâmetro não-sequencial usado no modelo deste trabalho:  $\eta > 0.047$ , que é consistente com o intervalo dado pela seção 6.1. Em nossas simulações da dinâmica de metilação da *E-coli* usamos  $\eta = 0.1$ , a linha púrpura da Fig. 3.8.2, da seção 3.8.

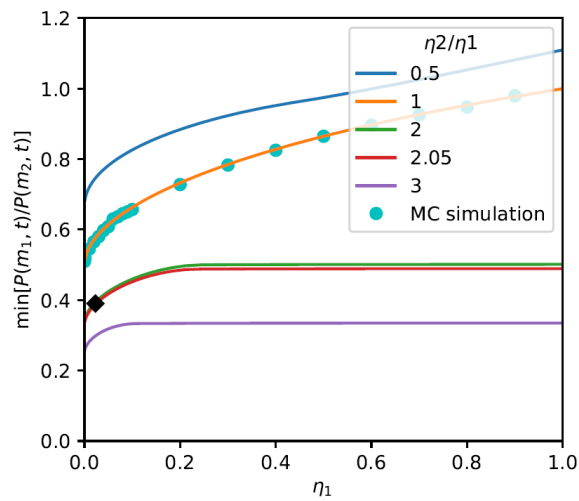


Figura 6.3.1 – Valores mínimos da relação  $p(m_1, t)/p(m_2, t)$  em função de  $\eta_1$  para as razões de  $\eta_2/\eta_1$  mostradas na legenda. O losango preto é o ponto  $\eta_1 = 0,023$  e a relação de  $p(m_1, t)/p(m_2, t) = 0,39$ . Os números 1 e 2 usados aqui são inversos dos que estão nos receptores Tar.



## 7 Previsões para resultados experimentais

A partir dos resultados do nosso modelo e da análise dos dados experimentais existentes, sabemos que a ordenação da metilação/desmetilação entre os diferentes sítios de metilação é crítica para a dinâmica de adaptação, como pode ser visto nas seções 1.11- 1.13. Por conseguinte, a mutação de sítios diferentes ao longo da sequência de metilação e os diferentes sítios potencializadores podem ter efeitos diferentes sobre a dinâmica de adaptação. Seguindo esse "insight", usamos nosso modelo com os sítios potencializadores ( $m_4(h_{3f})m_3m_2m_1(h_{1r})$ ) mostrado pela Fig. 6.0.1, para prever o perfil de metilação e a dinâmica de adaptação para diferentes mutantes.

### 7.1 Perfil de metilação do receptor adaptável

Uma descrição mais realista do receptor de aspartato da *E-coli* é a Fig. 6.0.1 da seção 6. Os sítios potencializadores ( $h_{3f}$  e  $h_{1r}$ ) foram tratados como sítios extras de metilação que não podem ser modificados espontaneamente, fazendo o papel citado na seção 6. Dessa forma, assumindo que CheR e CheB estão presentes, pretendemos analisar o perfil de metilação do receptor considerando a influência dos sítios potencializadores, Fig. 7.1.1.

Para o receptor do tipo selvagem com os sítios 1 – 3 metiláveis e ambos os sítios potencializadores configurados como:  $h_{3f} = 1$  e  $h_{1r} = 0$ , os níveis de metilação diminuem monotonicamente do sítio 3 para 1, como mostrado na Fig. 7.1.1a, caracterizando o modelo sequencial.

Para a configuração do tipo:  $h_{3f} = h_{1r} = 0$ , a presença de  $h_{3f} = 0$  reduz a metilação do sítio  $m_3$ , levando o sítio  $m_2$  a ser mais metilado que os sítios  $m_1$  e  $m_3$ , no estado estacionário. Este comportamento do sítio 2 é justificado por ainda manter características da metilação sequencial nos sítios 2 e 1, nessa ordem, mostrado pela Fig. 7.1.1b. No entanto, para a configuração do tipo:  $h_{3f} = h_{1r} = 1$ , o sítio 2 é menos metilado que os sítios 1 e 3 no estado estacionário. Nessa simulação, a característica de sequencialidade está presente nos sítios 3 e 2, no entanto, a inibição da desmetilação sequencial no sítio 1 leva ao grande número de sítios ainda preenchidos neste estado,

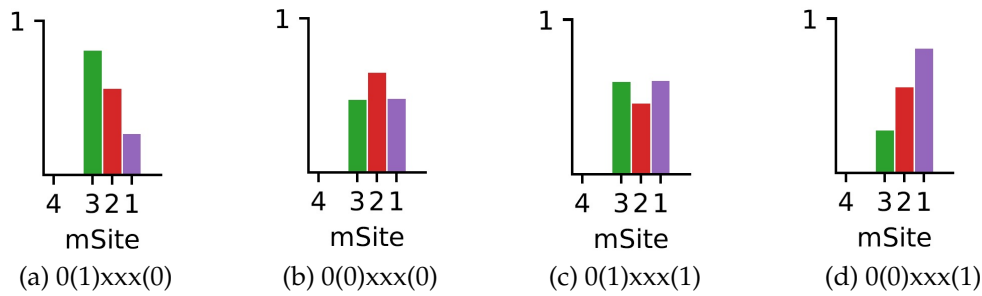


Figura 7.1.1 – As distribuições do nível de metilação do estado estacionário previsto do receptor Tar para quatro mutantes diferentes em que os sítios potencializadores ( $h_{3f}$  e  $h_{1r}$ ) são diferentes: (a) 0(1)xxx(0); (b) 0(0)xxx(0); (c) 0(1)xxx(1); (d) 0(0)xxx(1). Os parâmetros usados foram  $\eta = 0.1$  e  $[L] = 100$  mM.

como pode ser visto na Fig. 7.1.1c.

Finalmente, a configuração inversa do receptor do tipo selvagem:  $h_{3f} = 0$  e  $h_{1r} = 1$ , onde a metilação sequencial é inibida no sítio 3 e a desmetilação sequencial é inibida no sítio 1, produz, no estado estacionário, o perfil de metilação visto na Fig. 7.1.1d, que, aumenta monotonicamente do sítio 3 para o sítio 1, sendo justamente o inverso do perfil do receptor WT Fig. 7.1.1a.

## 7.2 Influência dos sítios potencializadores no tempo de adaptação

Como discutido na seção anterior, a metilação sequencial requer a configuração dos sítios potencializadores do tipo  $h_{3f} = 1$  e  $h_{1r} = 0$ . Qualquer mudança nessa configuração, a metilação e desmetilação correspondente só pode ser realizada na taxa não-sequencial proporcional a  $\eta$  fixado para o modelo simulado, sendo assim, mais lenta que a metilação sequencial, devido a redução na taxa de metilação/desmetilação no preenchimento dos sítios sequenciais. Com isso, esperamos que o tempo de adaptação seja maior. As simulações apresentadas nesta seção exploram esse comportamento.

Realizamos as simulação com a concentração de estímulo multiplicada por 10 nas subidas dos degraus e dividida por 10 nas decidas dos degraus, linha verde na Fig. 7.2.1. Vemos que o aumento da concentração tem o efeito instantâneo de reduzir a atividade (resposta/sensibilidade) e aumentar o número de receptores ocupados com ligantes, linhas vermelhas e amarelas, respectivamente. O efeito é invertido com os passos das decidas dos degraus. A resposta instantânea é seguida pela adaptação, conseguida pela mudança mais lenta no nível de metilação, esse processo reverte parcialmente a

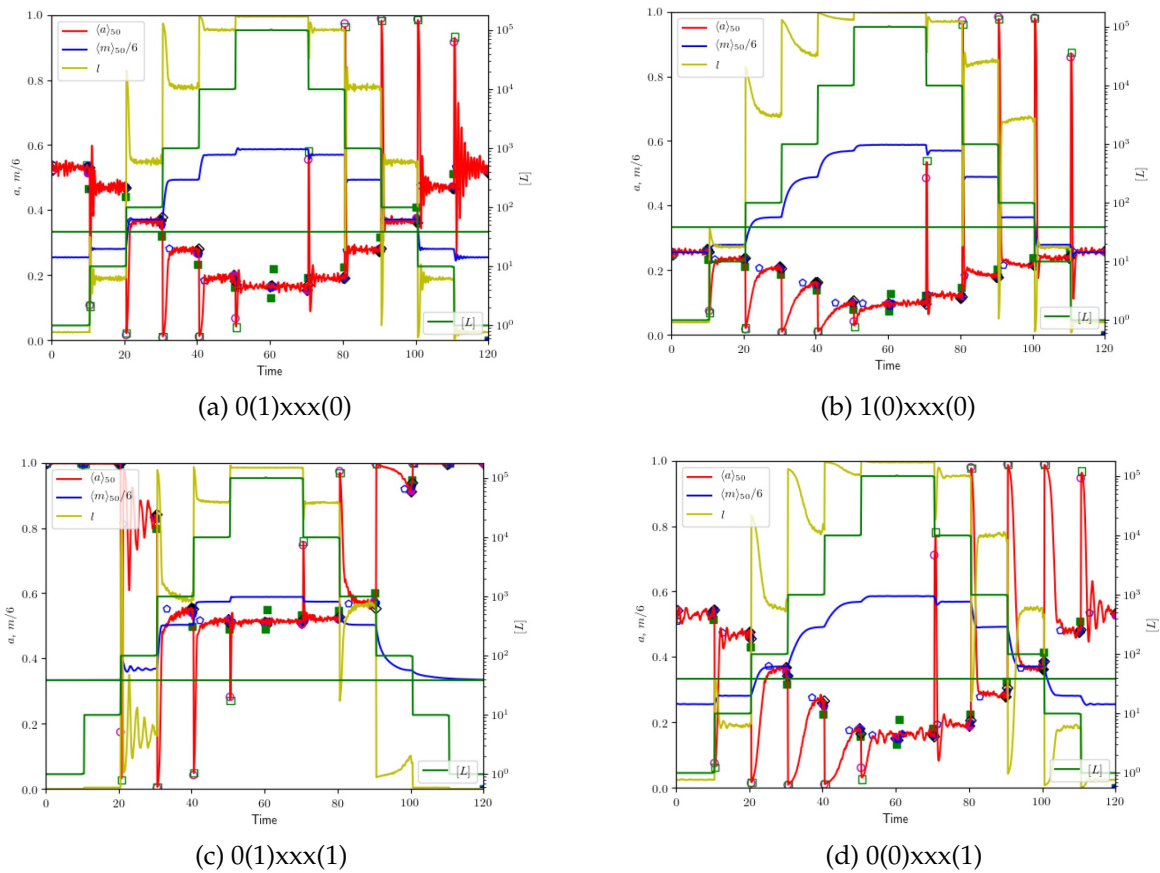


Figura 7.2.1 – Simulação com  $\eta = 0.1$  e o resíduo dos sítios indicam o mutante de cada gráfico, a mesma ordem da Fig. 6.0.1.

mudança instantânea na atividade e a ocupação dos receptores com ligantes, fazendo os receptores ficarem menos ocupados.

No receptor do tipo selvagem,  $0(1)xxx(0)$ , para o qual a dinâmica é dominada pela metilação sequencial, a adaptação é rápida em todas as etapas, Fig. 7.2.1a. No entanto, devido influência com o sítio 3, a mutação de  $h_{3f}$  de 1 para 0 reduz a taxa de metilação, mas não a taxa de desmetilação. Por essa razão, nos mutantes  $1(0)xxx(0)$  e  $0(0)xxx(1)$ , Fig. 7.2.1b e Fig. 7.2.1d, aumenta o tempo de adaptação nas subidas dos degraus que induz a metilação. Por conseguinte, devido a influência com o sítio 1, a mutação de  $h_{1r}$  de 0 para 1 aumenta o tempo de adaptação nas descidas dos degraus, pois reduz a desmetilação, como no caso dos mutantes  $0(1)xxx(1)$  e  $0(0)xxx(1)$ , Fig. 7.2.1c e 7.2.1d.

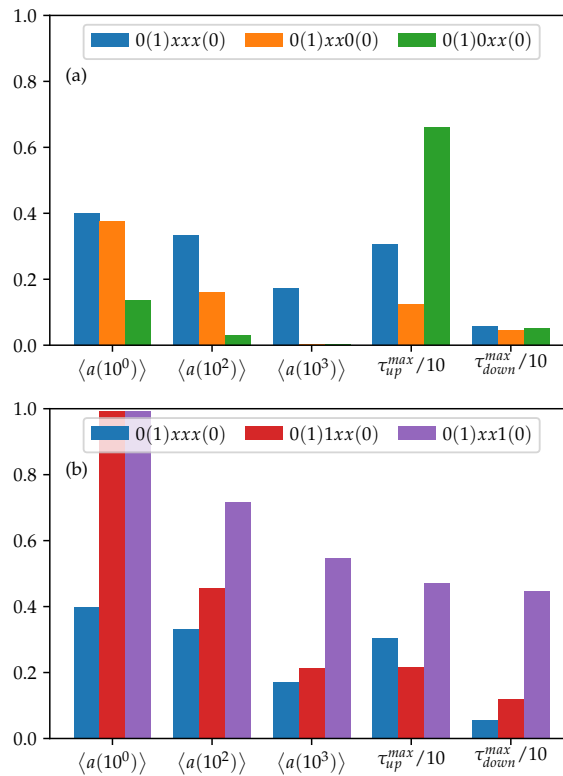


Figura 7.3.1 – Atividades adaptadas e tempos de adaptação de diferentes tipos de mutantes definidos nas legendas. (a) Mutantes com  $m_1 = 0$  fixo (barras laranja) ou fixo  $m_3 = 0$  (barras verdes) em comparação com o receptor do tipo selvagem (barras azuis), com ambos os locais modificáveis. (b) Mutantes com  $m_1 = 1$  fixo (barras púrpuras) ou  $m_3 = 1$  (barras laranjas) em comparação com o receptor do tipo selvagem (barras azuis) igual ao de (a). As atividades adaptadas foram apresentadas para três concentrações  $[L] = 10^0, 10^2, 10^3 \mu M$ . O  $\tau_{up}^{max}$  e  $\tau_{down}^{max}$  são os tempos máximos de adaptação para os passos up e down, respectivamente.

### 7.3 Atividade adaptada e tempo de adaptação

Na subseção anterior, estudamos as possíveis consequências da mutação nos sítios potencializadores ( $h_{3f}$  e  $h_{1r}$ ) para a metilação sequencial. Nesta seção, estudamos os efeitos da mutação nos sítios de metilação principais  $m_1$  e  $m_3$  referente a adaptações da atividade e o tempo de adaptação para diferentes concentrações de estímulo, conforme mostrado na Fig. 7.3.1 e detalhada nas Fig. 7.3.2. Consideramos as descrições dos sítios citados na seção 6. Nesta simulação, atribuímos  $m_4 = 0$  por conveniência, pois a taxa de metilação do sítio 4 é lenta, o que influenciaria na adaptação do receptor.

Inicialmente fixamos  $m_3 = 0$  ou  $m_1 = 0$  (sítios permanentemente não metilados) e comparamos os resultados com os do receptor do tipo selvagem ( $1(1)xxx(0)$ ), barras azuis na Fig. 7.3.1. Como mostrado na Fig. 7.3.1a, o mutante com  $m_3 = 0$  ( $0(1)0xx(0)$ , barras verdes) tem o comportamento de adaptação mais deficiente com atividades

adaptadas  $\langle a \rangle$  muito mais baixas e um tempo de adaptação  $\tau_{up}^{max}$  muito mais lento em resposta ao aumento na concentração de estímulo. Em comparação, a atividade adaptada e o tempo de adaptação no mutante com  $m_1 = 0$  ( $0(1)xx0(0)$ , barras laranja) são mais suaves. A razão é que o sítio 1 permanentemente não metilado, ainda preserva a metilação sequencial do sítio 2 pelo sítio 3. No entanto, o sítio de mutação 3, permanentemente não metilado, interrompe a metilação sequencial do sítio 2. Portanto, a adaptação sequencial ainda funciona no mutante  $0(1)xx0(0)$  embora apenas em dois sítios de metilação, mas está gravemente comprometida no mutante  $0(1)0xx(0)$ .

Em seguida, fixamos  $m_3 = 1$  ou  $m_1 = 1$  (sítios permanentemente metilados) e comparamos os resultados com os do receptor do tipo selvagem. Como mostrado na Fig. 7.3.1b, o  $m_1 = 1$  mutante ( $0(1)xx1(0)$ , barras púrpura) tem o comportamento de adaptação mais deficiente, com atividades adaptadas  $\langle a \rangle$  muito mais altas e um tempo de adaptação  $\tau_{down}^{max}$  muito mais lento em resposta a uma diminuição na concentração de atraentes. Em comparação, os efeitos da fixação  $m_3 = 1$  ( $0(1)1xx(0)$ , barras vermelhas) são muito mais suaves. A explicação é que o sítio 3 permanentemente metilado não afeta a desmetilação sequencial do sítio 2 pelo sítio 1. No entanto, o sítio 1 permanentemente metilado interrompe a desmetilação sequencial do sítio 2. Portanto, a desmetilação sequencial, que é importante para a resposta na diminuição da concentração de atraentes, permanece intacta no mutante  $0(1)1xx(0)$ , mas está gravemente comprometida no mutante  $0(1)xx1(0)$ .

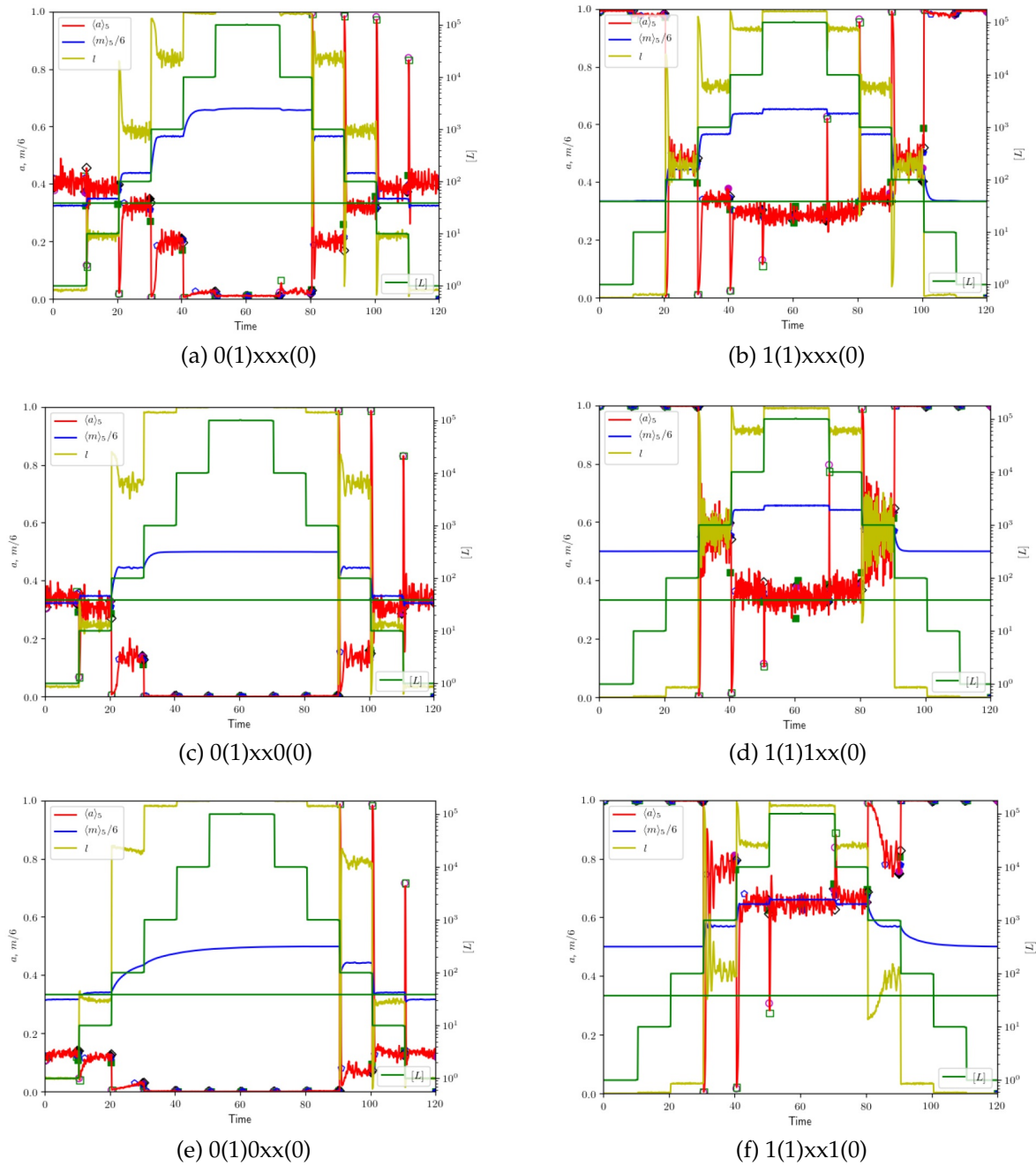


Figura 7.3.2 – Efeito no tempo de adaptação substituindo os sítios  $m_3$  e  $m_1$  por permanentemente metilado e permanentemente desmetilado (0,1).

Parte V

Considerações Finais





## 8 Considerações Finais

Nesta tese, utilizando como estudo a bactéria *E. Coli*, estudamos os comportamentos e consequências (desempenho e custo) devido o tipo de modelo de metilação (modificação), sequencial e não-sequencial, para sistemas com múltiplos sítios de metilação. estudamos os benefícios e o custo energético do controle da ordem de múltiplos sítios de modificação covalente na adaptação (metilação/desmetilação). As principais conclusões são:

- A metilação sequencial é necessária para o controle de realimentação integral, que fornece precisão de adaptação notavelmente maior do que a metilação não-sequencial.
- Existe um compromisso entre ganho de resposta (sensibilidade) e precisão de adaptação (menor erro de adaptação). Melhorar um, custa o agravamento do outro, para uma determinada ordem de metilação e número de sítios metílicos.
- Mais sítios de metilação melhoram a capacidade de desempenho para metilação sequencial, mas é insignificante para metilação não-sequencial.
- A metilação sequencial desacelera a adaptação e, portanto, custa mais energia durante o tempo de adaptação.
- Comparações com experimentos existentes confirmam que o processo de metilação para os sítios de metilação 3, 2 e 1 é principalmente sequencial com um componente não-sequencial pequeno, porém finito, que pode ser limitado pelas experiências existentes com  $0.05 \leq \eta \leq 0.13$  para Tar.

Apesar de seu aparente sucesso, nosso modelo fenomenológico não revela o mecanismo molecular da metilação sequencial. Estudos mutantes anteriores mostraram que a metilação de um determinado sítio é afetado por sete resíduos de aminoácidos no C-terminal [17]-[16], que é exatamente onde os sítios 1, 2 e 3 estão dispostos. Além disso, a metilação do sitio 3 também é afetada por um resíduo sete aminoácidos afastado no C-terminal, mesmo esse resíduo não sendo um sítio de metilação [16]. Experiências recentes utilizando mutantes com proteínas CheR alteradas [45] também confirmam

que a modificação num sítio pode afetar a metilação de um sítio vizinho. Todas essas experiências sugerem um esquema de reação em cadeia para o processo de metilação sequencial. No entanto, não é claro se o sítio predominante sequencial aumenta a afinidade de ligação do CheR ao receptor ou a taxa catalítica ou ambas as situações. Também não está claro a existência e como os diferentes receptores, no aglomerado de receptores altamente compactados, competem pelas moléculas CheR, limitadas no "cluster". Acreditamos que um modelo bioquímico detalhado, que incorpore etapas-chave da reação da transferência de grupos metílicos e medidas quantitativas *in vitro* das taxas de metilação para receptores selvagens (WT) e mutantes com múltiplos sítios de metilação, são ambos necessários para abordar essas questões. A mesma estratégia deve ser usada para estudar o processo de desmetilação que é muito menos conhecido.

Neste trabalho, usamos nosso modelo para estudar os efeitos das mutações no sítio de metilação na dinâmica de adaptação, como as mostradas nas Fig. 6.2.1 e Fig. 7.3.1. Assim, podemos fazer comparações com experimentos anteriores usando os dados obtidos do ganho  $\Gamma$  e precisão da adaptação  $\xi$ . Comparamos também as substituições dos sítios metílicos por aspartato ou glutamina, feitas por um estudo quantitativo de Saphiro e Koshland (1994) [17] e Saphiro et al. (1995A) [16], onde simulando alterações com padrão de comportamento semelhante, tanto para um modelo de metilação sequencial quanto não-sequencial, mostramos, qualitativamente, a equiparação dos nosso resultado com os resultados experimentais. Através do trabalho de Saphiro et al. (1995A) [16], foi possível encontrar o limite inferior do parâmetro  $\eta$ :  $\eta > 0.047$ . Neste trabalho simulamos o comportamentos populacionais de grupos metílicos nos sítios usando  $\eta = 0.1$ .

Como uma forma de prever resultados experimentais, simulamos às possíveis interações dos sítios potencializadores  $h_{3f}$  e  $h_{1r}$ , Fig.6.0.1 da seção 6, criados para auxiliarem a inicialização dos processos sequenciais de metilação e desmetilação. Com esse entendimento, foi possível fazer previsões de sequencialidade e tempo de adaptação. No entanto, para um melhor aproveitamento deste estudo, será altamente informativo testar estas previsões medindo a dinâmica da atividade da quinase *in vivo* nesses mutantes usando FRET [13]. Houve extensos estudos experimentais de comportamento de quimiotaxia de vários mutantes com seus sítios de metilação substituídos por Aspartato [7]-[29] ou Alanina [46]-[26]. Seria interessante incorporar os modelos de dinâmica de metilação desenvolvidos neste trabalho com modelos comportamentais desenvolvidos

em [67]-[68] para explicar esses experimentos e entender como diferentes mutações no sítio de metilação podem afetar os comportamentos de quimiotaxia bacteriana.



## Referências

- 1 FINEARTAMERICA. *E. Coli Bactéria*. 2017. [Online; accessed 20-July-2017]. Disponível em: <<https://fineartamerica.com/featured/e-coli-bacteria-pasieka.html>>. Citado 3 vezes nas páginas xi, 8 e 12.
- 2 EISENBACH, M. Encyclopedia of life sciences. *Nature Publishing Group*, Nature Publishing Group, 2001. Citado 4 vezes nas páginas xi, 9, 10 e 12.
- 3 GUZMAN, M. A. *Técnicas de otimização baseadas em quimiotaxia de bactérias*. Dissertação (Doutorado) — Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2009. Citado 2 vezes nas páginas xi e 13.
- 4 BREN, A.; EISENBACH, M. How signals are heard during bacterial chemotaxis: protein-protein interactions in sensory signal propagation. *Journal of Bacteriology*, Nature, v. 182, p. 6865–6873, dec 2000. Citado 3 vezes nas páginas xi, 13 e 14.
- 5 MORTON-FIRTH C. J.; SIMIZU, T. S.; BRAYD. A free-energy-based stochastic simulation of the tar receptor complex. *J. Mol. Biol.*, J. Mol. Biol, p. 1059–1074, 1999. Citado 3 vezes nas páginas xi, 16 e 17.
- 6 KREMBEL A. K.; COLIN, R.; SOURJIK, V. *Importance of Multiple Methylation Sites in Escherichia coli Chemotaxis*. Dissertação (Mestrado), dec 2015. Citado 9 vezes nas páginas xi, 11, 13, 14, 17, 18, 19, 28 e 29.
- 7 SAPHIRO M. J.; CHAKRABARTI, I.; KOSHLAND, D. E. J. Contributions made by individual methylation sites of the escherichia coli aspartate receptor to chemotactic behavior. *Proc. NatL Acad ScL USA*, Proc. NatL Acad ScL USA, v. 92, p. 1053–1056, 1995. Citado 8 vezes nas páginas xi, xii, 19, 26, 28, 29, 30 e 134.
- 8 TU, Y. Quantitative modeling of bacterial chemotaxis: Signal amplification and accurate adaptation. *Annual Review of Biophysics*, Annual Review of Biophysics, v. 42, p. 337–359, fev 2013. Citado 7 vezes nas páginas xi, 1, 19, 20, 21, 43 e 45.
- 9 DUKE, T. A. J.; BRAY, D. Heightened sensitivity of a lattice of membrane of receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci*, Proc. Natl. Acad. Sci, v. 96, p. 10104–10108, 1999. Citado 3 vezes nas páginas xi, 22 e 23.
- 10 HENIKOFF, S. Histone modifications: Combinatorial complexity or cumulative simplicity? *Proceeding of the National Academy of Sciences-PNAS*, Proceeding of the National Academy of Sciences-PNAS, v. 102, p. 5308–5309, 2005. Citado 3 vezes nas páginas xii, 25 e 52.
- 11 LAN G.; SARTORI, P. N. S. S. V.; TU, Y. The energy-speed-accuracy tradeoff in sensory adaptation. *Nat Phys*, Nat Phys, maio 2012. Citado 6 vezes nas páginas xii, 34, 35, 87, 110 e 116.
- 12 HILL, T. L. *Fre Energy Transduction and Biochemical Cycle Kinetics*. New York: Dover, 2005. Citado 4 vezes nas páginas xii, 35, 36 e 110.

- 13 SOURJIK, V.; BERG, H. C. Receptor sensitive in bacterial chemotaxis. *Proceeding of the National Academy of Sciences-PNAS*, Proceeding of the National Academy of Sciences-PNAS, v. 99, p. 123–1273, 2002. Citado 6 vezes nas páginas xvi, 96, 117, 118, 119 e 134.
- 14 NEUMANN S.; VLADIMIROV, N. K. A. K. W. N. S.; SOURJIK, V. Imprecision of adaptation in escherichia coli chemotaxis. *PLOS-ONE*, PLOS-ONE, v. 9, p. e84904, 2014. Citado 3 vezes nas páginas xvi, 118 e 119.
- 15 BERG J. M ; TYMOCZKI, J. L.; STRYER, L. *Biochemistry*. New York: WH Freeman, 2002. Citado 3 vezes nas páginas xvii, 23 e 24.
- 16 SAPHIRO M. J.; PANOMITROS, D.; KOSHLAND, D. E. J. Interaction between the methylation site of the escherichia coli aspartate receptor mediated by the methyltransferase. *Journal of Biological Chemistry*, Journal of Biological Chemistry, v. 270, n. 2, p. 751–755, 1995. Citado 11 vezes nas páginas xvii, 23, 27, 28, 33, 118, 120, 121, 122, 133 e 134.
- 17 SAPHIRO, M. J.; KOSHLAND, D. E. J. Mutagenic studies of the interaction between the aspartate receptor and methyltransferase from escherichia coli\*. *Journal of Biological Chemistry*, Journal of Biological Chemistry, v. 269, n. 15, p. 11054–11059, 1994. Citado 8 vezes nas páginas xvii, 31, 33, 118, 120, 121, 133 e 134.
- 18 NASH P.; TANG, X. O. S. C. Q. G. F. B. M. M. D. S. F. P. T.; TYERS, M. Multisite phosphorylation of a cdk inhibitor sets a threshold for the onset of dna replication. *Nature*, Nature, v. 414, p. 514–521, 2001. Citado na página 3.
- 19 L., S. S.; E., B. B. Signaling network model of chromatin. *Cell*, Cell, v. 111, p. 771–778, 2002. Citado na página 4.
- 20 SADREEV I. I.; CHEN, M. Z. Q. W. G. L. U. Y.; KOTOV, N. V. A systems model of phosphorylation for inflammatory signaling events. *PLOS-ONE*, PLOS-ONE, v. 9, 2014. Citado na página 4.
- 21 CONTROL, C. C. for D.; PREVENTION. *E.coli (Escherichia coli)*. 2018. [Online; accessed 27-march-2018]. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/ecoli/general/index.html>>. Citado na página 7.
- 22 HUDAULT S.; GUIGNOT, J.; SERVIN, A. L. Escherichia coli strains colonising the gastrointestinal tract protect germfree mice against salmonella typhimurium infection. *BMJ Journals - GUT*, BMJ Journals - GUT, v. 49, p. 47–55, jul 2001. Citado na página 7.
- 23 ISHII S.; SADOWSKY, M. J. Escherichia coli in the environment: Implication for water quality and human health. *Microbes and Environments*, Microbes and Environments, v. 23, p. 101–108, 2008. Citado na página 7.
- 24 EISENBACH, M. *Chemotaxis*. London: Imperial College Press – ICP, 2004. Citado 6 vezes nas páginas 8, 9, 10, 15, 16 e 20.
- 25 KUGLER H.; LARJO, A.; HAREL, D. Biocharts: a visual formalism for complex biological systems. *Journal of the Royal Society Interface-Published online*, Journal of the Royal Society Interface-Published online, 2009. Citado na página 9.

- 26 KREMBEL, A. K. *Adaptation and methylation kinetics in Escherichia coli chemotaxis*. Dissertação (Doutorado) — Faculdades Combinadas de Ciências Naturais e Matemática da Universidade Ruperto-Carola de Heidelberg, Alemanha, 2014. Citado 4 vezes nas páginas 9, 28, 29 e 134.
- 27 SOURJIK, V. Receptor clustering and signal processing in e. coli chemotaxis. *TRENDS in Microbiology*, *TRENDS in Microbiology*, v. 12, n. 12, dec 2004. Citado 2 vezes nas páginas 10 e 15.
- 28 SPIRO P. A.; PARKINSON, J. S.; OTHEMER, H. G. A model of excitation and adaptation in bacterial chemotaxis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 94, p. 7263–7268, 1997. Citado 3 vezes nas páginas 10, 22 e 31.
- 29 NISHIYAMA S. I.; UMEMURA, T. N. T. H. M.; KAWAGISHI, I. Conversion of a bacterial warm sensor to a cold sensor by methylation of a single residue in the presence of an attractant. *Molecular Microbiology*, *Molecular Microbiology*, n. 2, p. 357–365, 1999. Citado 3 vezes nas páginas 10, 29 e 134.
- 30 EISENBACH, M.; CAPLAN, S. R. Bacterial chemotaxis: Unsolved mystery of the flagellar switch. *Current Biology*, *Current Biology*, v. 8, p. 444–446, 1998. Citado na página 11.
- 31 ALON, U. et al. Roburtness in bacterial chemotaxis. *Nature*, *Nature*, v. 397, jan 1999. Disponível em: <<http://www.nature.com>>. Citado 7 vezes nas páginas 11, 15, 16, 18, 19, 31 e 32.
- 32 KUDO S.; MAGARIYAMA, Y.; AIZAWA, S. Abrupt change in flagellar rotation observed by laser dark-field microscopys. *Nature*, *Nature*, v. 346, p. 677–680, 1990. Citado na página 12.
- 33 BERG, H. C. Motile behavior of bacteria. *physics Today*, *physics Today*, p. 24–29, 2000. Citado na página 13.
- 34 MACNAB, R. M.; KOSHLAND, J. D. E. The gradient-sensing mechanism in bacterial chemotaxis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 69, p. 2509–2512, 1972. Citado 5 vezes nas páginas 14, 17, 18, 31 e 53.
- 35 PARK C.; DUTTON, P. D.; HAZELBAUER, G. L. Effects of glutamines and glutamates at sites of covalent modification of a methyl-accepting transducer. *Journal of Bacteriology*, *Journal of Bacteriology*, v. 172, n. 12, p. 7179–7187, 1990. Citado 3 vezes nas páginas 14, 25 e 31.
- 36 DUNTEM, P.; KOSHLAND, E. D. Tuning the responsiveness of a sensory receptor via covalent modification\*. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, v. 266, n. 03, p. 1491–1496, 1991. Citado 3 vezes nas páginas 16, 28 e 31.
- 37 BERG, H. C.; TEDESCO, P. M. Transient response to chemotactic stimuli in escherichia coli. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, p. 3235–3239,, 1975. Citado 3 vezes nas páginas 18, 31 e 53.
- 38 BARKAI, N.; LEIBLER, S. Robustness in simple biochemical networks. *Nature*, *Nature*, v. 387, 1997. Citado 3 vezes nas páginas 18, 32 e 53.

- 39 ENDRES R. G.; FALKE, J. J.; WINGREEN, N. S. Chemotaxis receptor complex: From signaling to assembly. *Plos Computation Biology*, Plos Computation Biology, v. 3, p. 152–173, dec 2010. Citado na página 20.
- 40 MELLO, B. A.; TU, Y. An allosteric model for heterogeneous receptor complexes: understanding bacterial chemotaxis response to multiple stimuli. *Proc. Natl. Acad. Sci*, Proc. Natl. Acad. Sci, p. 17354–59, 2005. Citado 4 vezes nas páginas 20, 21, 45 e 87.
- 41 BRAY D.; LEVIN, M. D.; MORTON-FIRTH, C. J. Receptor clustering as a cellular mechanism to control sensitivity. *Nature*, Nature, v. 393, 1998. Citado 2 vezes nas páginas 20 e 21.
- 42 MELLO, B. A.; TU, Y. Perfect and near perfect adaptation in a model of bacterial chemotaxis. *Biophysical Journal*, Biophysical Journal, v. 84, p. 2493–56, 2003A. Citado 7 vezes nas páginas 20, 23, 30, 32, 52, 53 e 86.
- 43 MELLO, B. A.; TU, Y. Effects of adaptation in maintaining high sensitivity over a wide range of backgrounds for e. coli chemotaxis. *Biophysical Journal*, Biophysical Journal, p. 2329–37, 2007. Citado 2 vezes nas páginas 21 e 65.
- 44 SHI, Y.; DUKE, T. Cooperative model of bacterial sensing. *The American Physical Society*, The American Physical Society, v. 58, p. 6399–6406, 1998. Citado na página 21.
- 45 PEREZ E.; WEST, A. H.; DJORDJEVIC, S. Discrimination between different methylation states of chemotaxis receptor tar by receptor methyltransferase cher. *Biochemistry*, Biochemistry, p. 953–961. Citado 3 vezes nas páginas 28, 29 e 133.
- 46 NISHIYAMA S. I.; NARA, T. H. M. I. Y.; KAWAGISHI, I. Thermosensing properties of mutant aspartate chemoreceptors with methyl-accepting sites replaced singly or multiply by alanine. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, JOURNAL OF BACTERIOLOGY, n. 21, p. 6573–6580, 1997. Citado 3 vezes nas páginas 28, 29 e 134.
- 47 TERWILLIGER T. C.; WANG, J. Y.; KOSHLAND, J. D. E. Surface structure recognized for covalent modification of the aspartate receptor in chemotaxis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 83, p. 6707–6710, 1986. Citado na página 31.
- 48 HANSEN H. C.; ENDRES, R. G.; WINGREEN, N. S. Chemotaxis in escherichia coli: A molecular model for robust precise adaptation. *PLOS - Computation Biology*, PLOS - Computation Biology, v. 4, jan 2008. Citado 2 vezes nas páginas 32 e 53.
- 49 MEIR Y.; JAKOVLJEVIC, V. O. O. S. V.; WINGREEN, N. S. Precision and kinetics of adaptation in bacterial chemotaxis. *Biophysical Journal*, Biophysical Journal, p. 2766–2774, 2010. Citado na página 33.
- 50 NELSON, D. L.; COX, M. *Princípios de Bioquímica*. 3º ed.. ed. São Paulo: Springer, 2002. Citado 2 vezes nas páginas 41 e 42.
- 51 JUNIOR, W. E. Proteínas: Hidrolise, precipitação e um tema para o ensino de química. *Química Nova Escola*, Química Nova Escola, v. 24, nov 2006. Citado na página 41.



- 52 MELLO, B. A.; TU, Y. Quantitative modeling of sensitivity in bacterial chemotaxis: the role of coupling among different chemoreceptor species. *Proc. Natl. Acad. Sci, Proc. Natl. Acad. Sci*, p. 8223–28, 2003B. Citado 2 vezes nas páginas 42 e 48.
- 53 MELLO B. A.; SHAW, L.; TU, Y. Effects of receptor interaction in bacterial chemotaxis. *Biophysical Journal*, *Biophysical Journal*, v. 87, p. 1578–1595, set 2004. Citado 2 vezes nas páginas 43 e 100.
- 54 LAN G.; SCHULMEISTER, S. S. V.; TU, Y. Adapt locally and act globally: strategy to maintain high chemoreceptor sensitivity in complex environments. *Mol. Syst. Biol.*, *Mol. Syst. Biol.*, 2011. Citado 2 vezes nas páginas 48 e 65.
- 55 FEALA J. D.; CORTES, J. D. P. M. M. A. D. P. C.; PATERNOSTRO, G. Statistical properties and robustness of biological controller-target networks. *PLOS-ONE*, *PLOS-ONE*, v. 7, 2012. Citado na página 52.
- 56 YANG, X.-J. Multisite protein modification and intramolecular signaling. *Oncogene*, *Oncogene*, v. 24, p. 1653–1662, 2005. Citado na página 52.
- 57 SOMVANSHI R. P.; PATEL, K. A. B. S.; VENKATESH, K. Implementation of integral feedback control in biological systems. *Systems Biology of Medicine*, *Systems Biology of Medicine*, v. 7, p. 301–316, 2015. Citado na página 53.
- 58 YI T.-M.; HUANG, Y. S. L. D. J. Robust perfect adaptation in bacterial chemotaxis through integral feedback control. *Proceeding of the National Academy of Sciences-PNAS*, *Proceeding of the National Academy of Sciences-PNAS*, v. 97, p. 4649–4653, 2000. Citado na página 53.
- 59 SARTORI, P.; TU, Y. Free energy cost of reducing noise while maintaining a high sensitivity. *APS Physics*, *APS Physics*, v. 115, 2015. Citado na página 69.
- 60 GARCIA S.; LUSTOSA, P. R. B.; BARROS, N. R. Aplicabilidade do método de simulação de monte carlo na previsão dos custos de produção de companhias industriais: O caso da companhia vale do rio doce. *RCO – Revista de Contabilidade e Organizações – FEA-RP/USP*, *Plos Computation Biology*, v. 4, 2007. Citado 2 vezes nas páginas 85 e 86.
- 61 ANDRADE, E. L. *Introdução à Pesquisa Operacional – Métodos e Modelos para a Análise de Decisão*. Rio de Janeiro: LTC - Livros Técnicos e Científicos, 1989. Citado na página 85.
- 62 YORIYAZ, H. Método de monte carlo: princípios e aplicações na física médica. *Revista Brasileira de Física Médica*, *Revista Brasileira de Física Médica*, v. 3, p. 141–149, 2009. Citado 2 vezes nas páginas 85 e 86.
- 63 HAMMERSLEY, J. M.; HANDSCOMB, D. C. *Monte Carlo methods*. London: Methuen, 1964. Citado na página 85.
- 64 LANDAU, D. P.; BINDER, K. *A Guide to Monte Carlo Simulation in Statistical Physics*. EUA: [s.n.], 2005. Citado na página 86.
- 65 CLUZEL P.; SURETTE, M.; STANISLAS, L. An ultrasensitive bacterial motor revealed by monitoring signaling proteins in single cells. *Science*, *Science*, p. 1652–1655, 2000. Citado na página 96.

- 66 MAYUKH K. S.; KOU SHIK, P.; DAVID, B. Chemotaxis signaling protein cheY binds to the rotor protein flin to control the direction of flagellar rotation in escherichia coli. *Proceeding of the National Academy of Sciences-PNAS*, Proceeding of the National Academy of Sciences-PNAS, p. 9370–9375, 2010. Citado na página 96.
- 67 JIANG L.; OUYANG, Q.; TU, Y. Quantitative modeling of escherichia coli chemotactic motion in environments varying in space and time. *PLOS*, PLOS, v. 6, 2010. Citado na página 135.
- 68 SI G.; WU, T. O. Q.; TU, Y. A pathway-based mean-field model for escherichia coli chemotaxis. *Physical review letters*, Physical review letters, v. 109, 2012. Citado na página 135.