

UNIVERSIDAD DE LOS ANDES

DEPARTAMENTO DE FÍSICA

BIOLOGÍA SINTÉTICA

Proyecto

titulo

Autores:

Manuela VANEGAS FERRO

Juan David ESTUPIÑÁN MÉNDEZ

Luis Alberto GUTIÉRREZ LÓPEZ

Profesor:

Juan Manuel PEDRAZA LEAL

Mayo 21 de 2015

Índice

1. Introducción	2
2. Modelo Matemático	3
2.1. Diseño	3
2.2. Ecuaciones de Hill	4
2.3. Reacciones enzimáticas	6
2.4. Parámetros	7
2.5. Modelos determinista y estocástico	8
2.6. Análisis de sensibilidad	9

Resumen

Your abstract [4] [8] [6].

1. Introducción

Existe un mecanismo mediante el cual ciertas especies de plantas al ser atacadas por herbívoros liberan ciertos químicos volátiles que atraen otros insectos que se alimentan de dichos herbívoros [15] [18] [19] [20]. Este mecanismo provee una protección tanto directa como indirecta porque, además de atraer insectos predadores de herbívoros, también permiten la comunicación del peligro entre las plantas a largo plazo [15] [18]. En este caso específico, se usarán genes productores de *bergamoteno* de la planta *Nicotiana attenuata* para atraer insectos del género *Geocoris*, el cual es un predador generalista de aproximadamente 67 especies distintas [5].

El sistema en plantas es lo suficientemente distinguible para que los insectos *Geocoris* detecten la señal por encima de otros olores. Además, el químico es liberado sólo cuando hay daños ocasionados por herbivoría, no por daño mecánico. Esto se debe a que el sistema es naturalmente activado por la saliva de los herbívoros. Por último, la planta envía la señal inmediatamente es atacada por el herbívoro, y en horas del día en las que los predadores buscan alimento [20].

El *bergamoteno* es un sesquiterpeno que se sintetiza a partir del Farnesyl Difosfato (FPP) mediante la enzima Bergamoteno Sintetasa [17]. En las plantas, el FPP se produce a partir de dos vías distintas, la vía de DXP y la de Mevalonato [13], pero esta molécula no hace parte del metabolismo bacteriano. Por esta razón se han desarrollado numerosos diseños de vías metabólicas para producir la molécula en cantidades significativas en *Escherichia coli* [7]. Un ejemplo de estos diseños es el plásmido pAC-Mev/Scidi/AacI, el cual contiene las enzimas de la vía del mevalonato hasta la síntesis de las dos moléculas precursoras de FPP (ver figura 1). Sin embargo, es importante tener en cuenta que el FPP hace parte de una serie de isoprenos que son tóxicos para el crecimiento bacteriano [7]. Por esta razón, es vital lograr una fina sincronización entre la producción y el uso de esta molécula.

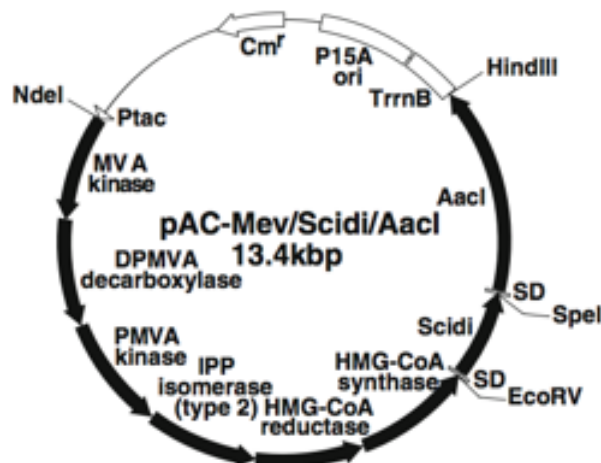


Figura 1: Esquema del plásmido pAC-Mev/Scidi/AacI. Tomado de [7].

Debido a que este sistema es muy específico a ciertas plantas, en este proyecto se busca hacerlo más general, permitiendo que muchas especies de plantas se puedan proteger de una forma más eficiente de los hervíboros sin necesidad de usar químicos insecticidas, los cuáles son muy nocivos para el ecosistema. De esta forma, se busca modificar a la bacteria *Escherichia coli* para que produzca Bergamoteno cuando ella detecte daño por herbivoría. Este proyecto presenta el desafío de controlar la producción de Farnesil pirofosfato (FPP) porque es tóxico para *E. coli*, además se busca optimizar la producción de bergamoteno de tal forma que no sea dañino para la planta a largo plazo.

poner
mas
aqui?

hablar
de la
posibi-
lidad
de
otras?

finalmente
si?

2. Modelo Matemático

2.1. Diseño

Para el siguiente modelo consideramos 2 partes. La primera se refiere a la produce la enzima *Bergamoteno sintetasa* (E en la figura 2). La otra parte requiere del plásmido *pAC-Mev/Scidi/AacI*, que sintetiza las enzimas necesarias para llevar *Acetil CoA* a FPP. En el modelo condensamos todos los procesos enzimáticos que están mediados por las enzimas para las que el plásmido codifica en un sólo proceso enzimático donde el sustrato A presente en la célula reacciona con la enzima Z producida por el plásmido para producir FPP(F en la figura 2). Ambas partes tienen un promotor activado por la señal de daño. Naturalmente el sistema detecta sustancias que producen los herbívoros, sin embargo, dada la dificultad para encontrar promotores activados por sustancias tan específicas, se utilizará el promotor *ABRA* que se encuentra en organismos vegetales y está asociado a la recepción y señalización de ácido abscísico (ABA). Además, el circuito del plásmido presenta un sitio de inhibición de LacI, el cual es producido por este mismo circuito para generar un feedback negativo. De esta manera, se busca regular la producción de la enzima Z, y así limitar la concentración de FPP.

citar

citar

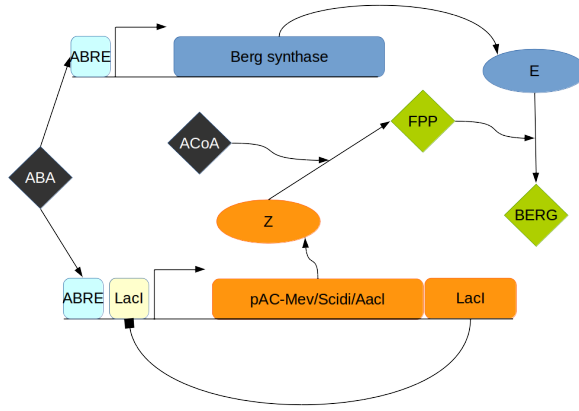


Figura 2: Interconexiones entre los genes que se van a usar en el modelo.

El modelo que se explicará a continuación tiene como objetivo principal buscar cómo se puede producir bergamoteno eficientemente manteniendo al mínimo posible la concentración de FPP en las células.

2.2. Ecuaciones de Hill

Se modeló la parte transcripcional como se ha hecho en clase y está explicado en [2]. Consideramos que el ADN total del gen a transcribir D_T es constante, es decir:

$$[D_T] = [D] + [DS] + [DI] + [DIS], \quad (1)$$

Donde $[D]$ representa el ADN libre, $[DIS]$ el ADN unido tanto al represor I como al activador S, $[DS]$ el unido al activador, y $[DI]$ el unido al represor.

Para realizar balance detallado se consideraron las siguientes ecuaciones químicas, las cuales son equivalentes al diagrama del inicio de la primera tarea del curso.



Donde las k son las constantes de las respectivas reacciones y se define la constante de disociación como $K = \frac{k_-}{k_+}$ [2]. Según las ecuaciones químicas podemos plantear las ecuaciones

diferenciales. Al evaluar tiempos mucho mayores a los tiempos en los que ocurre la unión entre el ADN y los factores de transcripción es válido suponer que se ha alcanzado el estado estacionario, obteniendo entonces de las ecuaciones anteriores:

$$[\dot{D}] = 0 = -k_{S+}[D][S] + k_{S-}[DS] = -k_{I+}[D][I] + k_{I-}[DI], \quad (6)$$

De donde se tiene que:

$$[D][S] = K_S[DS], \quad [D][I] = K_I[DI] \quad (7)$$

Ahora se busca hallar la razón entre el ADN en los distintos estados (dados por la ecuación 1), se realizará detalladamente para $[DS]$. De la ecuación 7 se obtiene:

$$[D] = \frac{K_S}{S}[DS], \quad [DIS] = \frac{I}{K_I}[DS], \quad [DI] = \frac{K_S}{S}[DIS] = \frac{K_S}{S} \frac{I}{K_I}[DS], \quad (8)$$

Para incluir los coeficientes de Hill en el modelo, se realiza el mismo análisis pero considerando la posibilidad de que varias moléculas de los factores de transcripción pueden unirse al ADN, siguiendo el procedimiento del apéndice A.2 de [2] obtenemos un resultado similar a la ec. 8, pero con las fracciones dependientes de S e I elevadas a los coeficientes de Hill n_S y n_I , respectivamente. Por lo tanto al reemplazar esto en la ec. 1 y reorganizando se tiene que:

$$\frac{[DS]}{[D_T]} = \frac{1}{\left(\frac{K_S}{S}\right)^{n_S} + \left(\frac{I}{K_I}\right)^{n_I} \left(\frac{K_S}{S}\right)^{n_S} + 1 + \left(\frac{I}{K_I}\right)^{n_I}}, \quad (9)$$

La expresión anterior representa la fracción de ADN ligado a S que hay en equilibrio, al considerar un tiempo suficientemente largo para que ocurran muchos eventos de unión y disociación de los factores de transcripción esto se puede interpretar como la probabilidad de que el ADN se encuentre en este estado y por lo tanto que la transcripción se dé en él. Así, al multiplicar por la fuerza del promotor β obtenemos la tasa de transcripción en dicho estado del ADN.

De la misma manera se pueden realizar el análisis para $[DI]$, $[D]$ y $[DIS]$ para obtener las tasas de transcripción en cada uno de los estados. La tasa total es la suma de todas las tasas, donde además se toma la tasa correspondiente al ADN libre como una constante α correspondiente a la transcripción basal. También se sigue un procedimiento similar para hallar la tasa de producción de r_E , que es mucho más sencillo pues sólo hay un promotor. Se incluye un término de degradación γ tanto de ARN como de proteínas y se incluye también una tasa de creación de proteínas k_P que tomaremos como constante y se determinará según el RBS.

Las ecuaciones que se obtienen son las siguientes:

$$\begin{aligned} \dot{r}_Z(t) = & \alpha_{IS} + \frac{\beta_{IS_I}}{\left(\frac{K_I}{I}\right)^{n_I} + 1 + \left(\frac{S}{K_S}\right)^{n_S} \left(\frac{K_I}{I}\right)^{n_I} + \left(\frac{S}{K_S}\right)^{n_S}} \\ & + \frac{\beta_{IS_S}}{\left(\frac{K_S}{S}\right)^{n_S} + \left(\frac{I}{K_I}\right)^{n_I} \left(\frac{K_S}{S}\right)^{n_S} + 1 + \left(\frac{I}{K_I}\right)^{n_I}} + \frac{\beta_{IS_{IS}}}{\left(\frac{K_I}{I}\right)^{n_I} \left(\frac{K_S}{S}\right)^{n_S} + \left(\frac{K_S}{S}\right)^{n_S} + \left(\frac{K_I}{I}\right)^{n_I} + 1} - \gamma_{r_Z} r_Z \end{aligned} \quad (10)$$

$$\dot{Z}(t) = k_Z r_Z - \gamma_Z Z \quad (11)$$

$$\begin{aligned} \dot{r}_I(t) = & \alpha_{IS} + \frac{\beta_{IS_I}}{\left(\frac{K_I}{I}\right)^{n_I} + 1 + \left(\frac{S}{K_S}\right)^{n_S} \left(\frac{K_I}{I}\right)^{n_I} + \left(\frac{S}{K_S}\right)^{n_S}} \\ & + \frac{\beta_{IS_S}}{\left(\frac{K_S}{S}\right)^{n_S} + \left(\frac{I}{K_I}\right)^{n_I} \left(\frac{K_S}{S}\right)^{n_S} + 1 + \left(\frac{I}{K_I}\right)^{n_I}} + \frac{\beta_{IS_{IS}}}{\left(\frac{K_I}{I}\right)^{n_I} \left(\frac{K_S}{S}\right)^{n_S} + \left(\frac{K_S}{S}\right)^{n_S} + \left(\frac{K_I}{I}\right)^{n_I} + 1} - \gamma_{r_I} r_I \end{aligned} \quad (12)$$

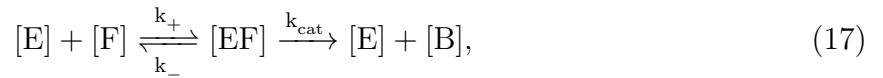
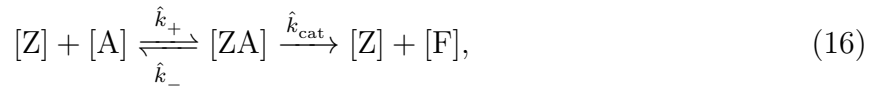
$$\dot{I}(t) = k_I r_I - \gamma_I I \quad (13)$$

$$r_E(t) = \alpha_S + \frac{\beta_S}{1 + \left(\frac{K_S}{S}\right)^{n_S}} - \gamma_{r_E} r_E \quad (14)$$

$$\dot{E}(t) = k_E r_E - \gamma_E E \quad (15)$$

2.3. Reacciones enzimáticas

Según la figura 2, las ecuaciones químicas de las reacciones entre enzima y sustrato son las siguientes



donde $[Z]$ y $[E]$ son las enzimas que proceden del plásmido y la bergamoteno sintetasa, respectivamente. $[F]$ y $[B]$ corresponden a FPP y el bergamoteno. Con las ecuaciones 16 y 17, se obtubieron las ecuaciones diferenciales para el FPP y el Bergamoteno, siguiendo el siguiente razonamiento.

Debido a que el Acetil CoA, el sustrato de la enzima que produce FPP, proviene del metabolismo constante de la bacteria, se puede suponer que su concentración $[A]$ es constante y elevada. Por lo tanto, para la producción de FPP habrá un término positivo que sigue las

ecuaciones de Michaelis-Menten.

Por otra parte, debido a que el FPP está siendo consumido a la vez para producir Bergamoteno, se requiere un término negativo en la ecuación diferencial que ilustre este proceso. Sin embargo, se usa la aproximación de la ecuación de velocidad cuadrática ilustrado en [1]. Esta ecuación es válida cuando la concentración de sustrato no es constante y es similar a la concentración de la enzima que cataliza dicho sustrato [1]. Dicho esto, las ecuaciones que se usarán son

$$\dot{F} = \frac{K_{\text{cat1}}[Z][A]}{K_{M1} + [A]} - K_{\text{cat2}} \frac{J - \sqrt{J^2 - 4[E][F]}}{2} \quad (18)$$

$$\dot{B} = K_{\text{cat2}} \frac{J - \sqrt{J^2 - 4[E][F]}}{2} - \gamma_B[B] \quad (19)$$

$$\text{Donde} \quad J = [E] + [F] + K_{M2}$$

Y K_{M1} , K_{cat1} , K_{M2} , K_{cat2} , son las constantes de las enzimas del plásmido y de la bergamoteno sintetasa, respectivamente. γ_B es el término introducido por el decaimiento del Bergamoteno debido a la difusión y división celular. Este término no es incluido en la ecuación para F pues esta sustancia es utilizada en otra reacción enzimática que ocurre mucho más rápido que el tiempo de degradación de las proteínas.

Las ecuaciones diferenciales para F y B (18 y 19) dependen de las cantidades calculadas con el modelo estocástico para la producción de las enzimas, estas cantidades siguen la dinámica ilustrada en la sección anterior.

Las ecuaciones 10 - 15, 18 y 19, junto con las condiciones iniciales para cada una, constituyen el sistema de ecuaciones que será simulado mediante los programas.

2.4. Parámetros

En la tabla 1 están listados los parámetros del modelo.

Símbolo	Valor	Unidades	Descripción	Ref.
W	1791/RFP	-	Mutación en el promotor constitutivo	BBa_J23113
α_S	1,53/W	-	Actividad basal de S	[12]
β_S	51,2 α_S	-	Actividad de S con ABA	[9]
α_{RS}	1,53/W	-	Actividad basal de RS	[12]
β_{RS_R}	$\alpha_{RS}/620$	-	Actividad de RS con LacI	[16]
β_{RS_S}	51,2 α_{RS}	-	Actividad de RS con ABA	[9]
$\beta_{RS_{RS}}$	β_{RS_R}	-	Actividad de RS con ABA y LacI	[16]
K_S	*		Constante de disociación del ABA-ABRE	
n_S	*		Coefficiente de Hill de S	
k_E	*		Tasa de traducción de E	
K_R	$8 * 10^{-4}$	mM	Constante de disociación de LacI	[3]
n_R	1	-	Coefficiente de Hill de LacI	[11]
k_R	*		Tasa de traducción de R	
γ_R	*		Tasa de degradación de la enzima Z	
γ_E	1/30	min^{-1}	Tasa de degradación del ARN (de E y R)	
K_{MBerg}	0.0014	mM	Constante de MM para enzima E	[10]
K_{CBerg}	0.34	s^{-1}	Turnover para enzima E	[10]
K_{MFpp}	0.0048	mM	Constante de MM para enzima Z	[14]
K_{CFpp}	0.34	s^{-1}	Turnover para enzima Z	[14]

Cuadro 1: Parámetros del modelo. S hace referencia al promotor *ABRA* individual y RS al promotor *ABRA* con el sitio de *lacI*. Las tasas de degradación γ se tomaron iguales en todos los casos.

2.5. Modelos determinista y estocástico

Para realizar la simulación estocástica se utilizó el algoritmo de Gillespie. Si los eventos de producción de ARN y proteínas son considerados separadamente se tendrían 8 eventos, lo cual tomaría mucho tiempo en ejecutar. Por lo tanto, se realizó el algoritmo con ráfagas de proteínas, de tal forma que al evento de producirse un RNA, se producen $\frac{k_P}{\gamma_r}$ proteínas. Esto es lo que corresponde al promedio de proteínas que se pueden traducir de un RNA durante su tiempo de vida.

Por otra parte, las escalas de tiempo a las que ocurren las reacciones enzimáticas son mucho menores a las de la producción de RNA y proteínas, por lo tanto los efectos del ruido son despreciables en ellas y por lo tanto se pueden resolver de manera determinista. Se utilizó en este caso el método Runge-Kutta de Cuarto Orden.

En programa fué realizado utilizado IPython notebook, se puede ver el código fuente en <https://github.com/gutiloluis/Insecticida/blob/master/Sensibilidad.ipynb>.

2.6. Análisis de sensibilidad

Se realizó un análisis de sensibilidad usando las constantes que no se conocen. Éstas se pueden dividir en 2 grupos, W y γ_R que son manipulables y K_S , n_S , k_E y k_R que son las que queremos optimizar. A partir de esto, se seleccionaron 3 niveles distintos para W y γ_R , y 4 niveles posibles para las demás. Para escoger el rango óptimo, se estableció que la concentración de FPP máxima no podía superar los $0,0004mM$ y que el nivel de bergamoteno producido fuera el máximo. Esto se justifica porque no queremos una cantidad de FPP que llegue a ser tóxica muy rápidamente, y queremos la mayor cantidad posible de bergamoteno.

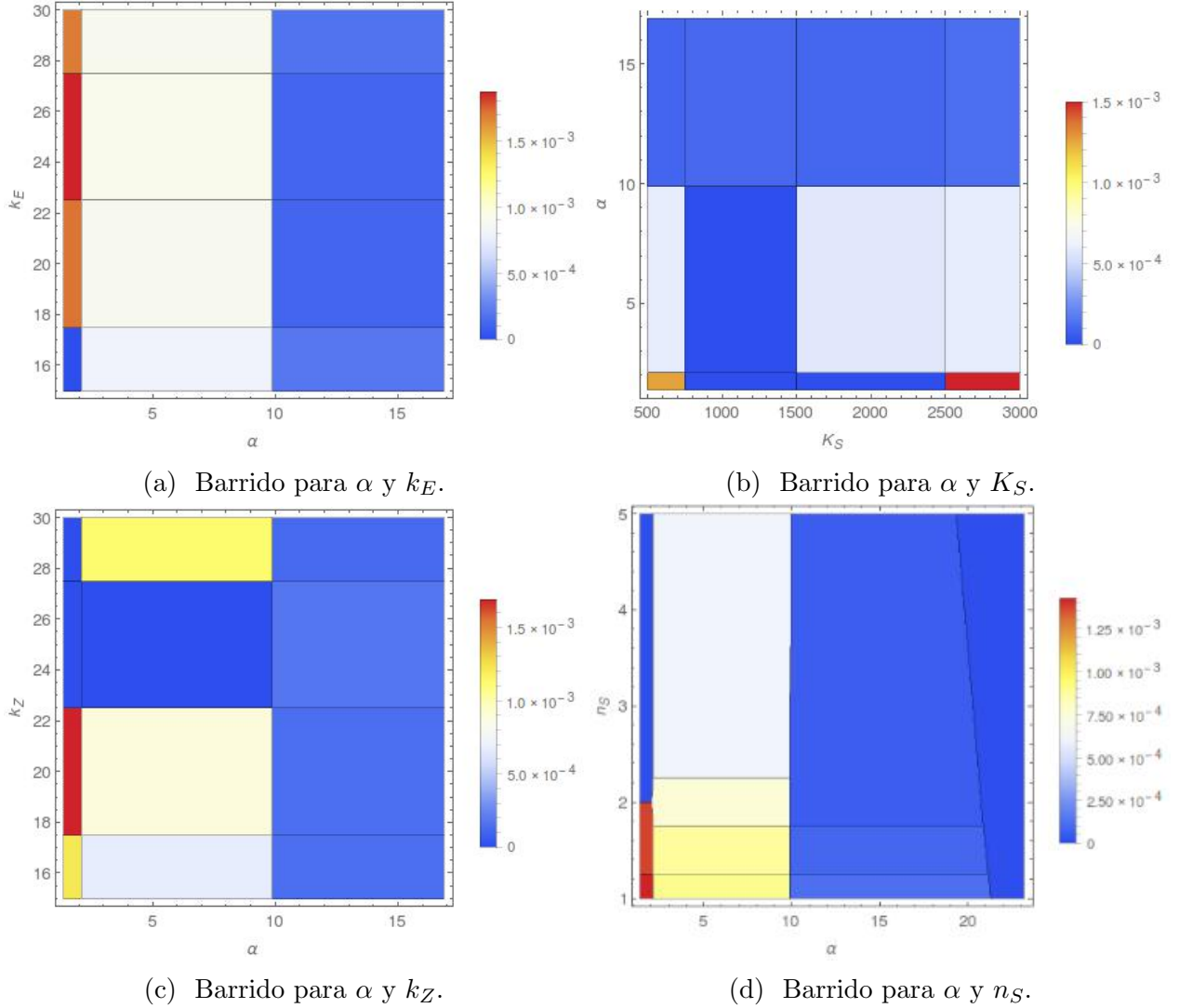


Figura 3: análisis para α

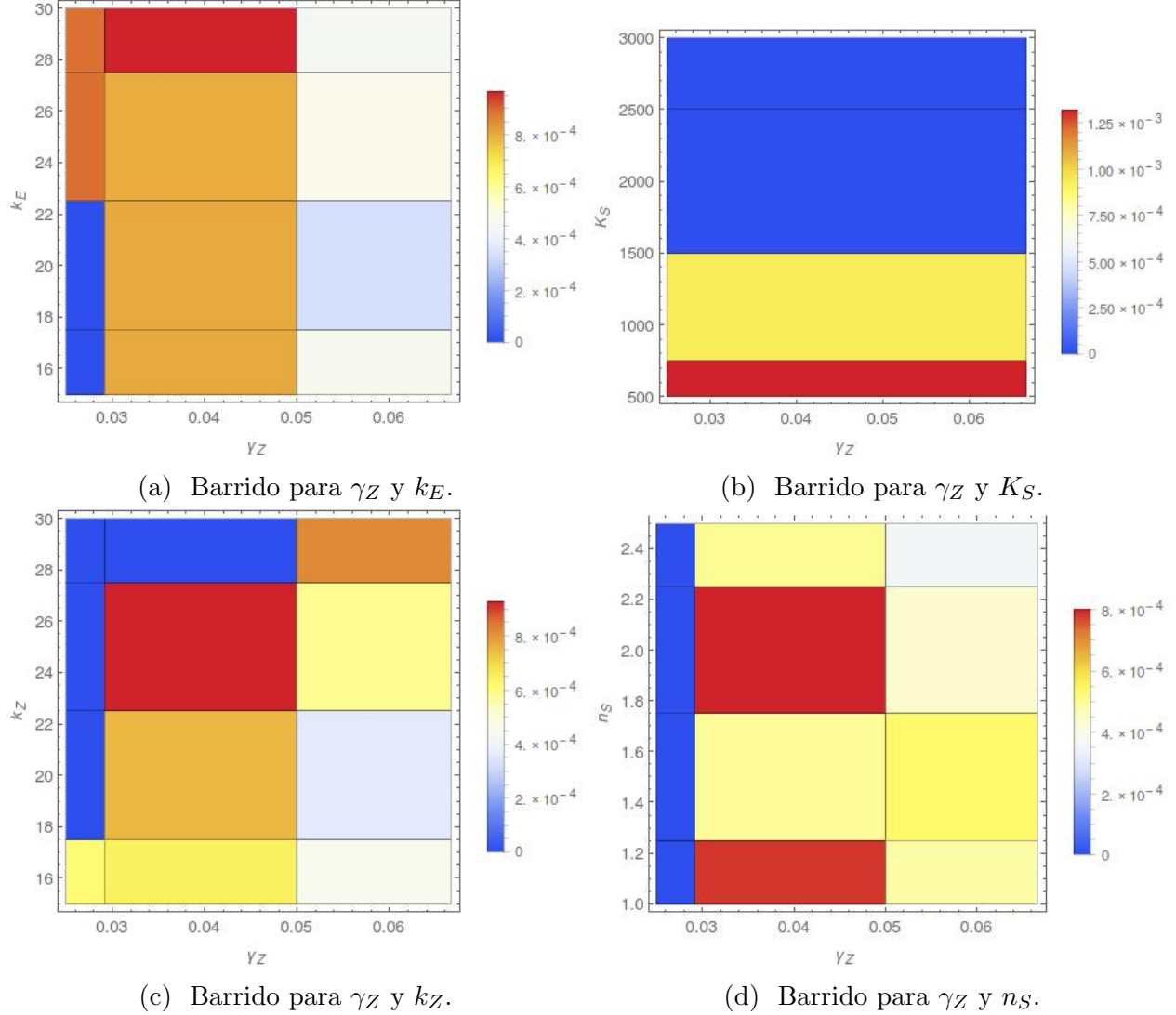


Figura 4: análisis para γ_Z

Se puede observar que para valores de $W = 6$ (ver fig.3) y de $\gamma_Z = 0,04$ (ver fig.4) se obtienen los valores más estables para las diferentes combinaciones de las demás constantes. Hay que recordar que W está relacionado inversamente con la producción basal de RNA tanto para los circuitos del plásmido como para los de la enzima del bergamoteno, por lo que un valor como este significaría una mutación no muy deleterea en el sitio del promotor. Mientras que para γ_Z se está cerca del valor promedio de degradación de una proteína.

Referencias

- [1] Michaelis-Menten Kinetics and Briggs-Haldane Kinetics. <http://web.archive.org/web/20080207010024/http://www.808multimedia.com/winnt/kernel.htm>. Fecha de acceso: 2015-05-21.

- [2] Uri Alon. *An Introduction to Systems Biology. Design Principles of Biological Circuits*. Chapman and Hall/CRC, 1 edition, 2006.
- [3] S. Basu, Y. Gerchman, C. H. Collins, F. H. Arnold, and R. Weiss. A synthetic multicellular system for programmed pattern formation. *Nature*, 434(7037):1130–1134, 2005.
- [4] W.W. Cleland. The kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products: I. Nomenclature and rate equations. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Specialized Section on Enzymological Subjects*, 67:104–137, 1963.
- [5] Robert L. Crocker and W. H. Whitcomb. Feeding Niches of the Big-Eyed Bugs *Geocoris bullatus*, *G. punctipes*, and *G. uliginosus* (Hemiptera: Lygaeidae: Geocorinae). *Environmental Entomology*, 9(5):508–513, 1980.
- [6] Hanna Engelberg-Kulka, Boaz Sat, Myriam Reches, Shahar Amitai, and Ronen Hazan. Bacterial programmed cell death systems as targets for antibiotics. *Trends in Microbiology*, 12(2):66–71, 2004.
- [7] Hisashi Harada and Norihiko Misawa. Novel approaches and achievements in biosynthesis of functional isoprenoids in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84(6):1021–1031, 2009.
- [8] Hisashi Harada, Fengnian Yu, Sho Okamoto, Tomohisa Kuzuyama, Ryutaro Utsumi, and Norihiko Misawa. Efficient synthesis of functional isoprenoids from acetoacetate through metabolic pathway-engineered *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 81(5):915–925, 2009.
- [9] T. Hobo, M. Asada, Y. Kowyama, and T. Hattori. Aegt-containing abscisic acid response element (abre) and coupling element 3 (ce3) are functionally equivalent. *The Plant Journal*, 19(6):679–689, 1999.
- [10] C. G. Jones, J. Moniodis, K. G. Zulak, A. Scaffidi, J. A. Plummer, E. L. Ghisalberti, and J. Bohlmann. Sandalwood fragrance biosynthesis involves sesquiterpene synthases of both the terpene synthase (TPS)-a and TPS-b subfamilies, including santalene synthases. *Journal of Biological Chemistry*, 286(20), 2011.
- [11] T. Kalisky, E. Dekel, and U. Alon. Cost-benefit theory and optimal design of gene regulation functions. *Physical Biology*, 4(4):229–245, 2007.
- [12] J. R. Kelly, A. J. Rubin, J. H. Davis, C. M. Ajo-Franklin, J. Cumbers, M. J. Czar, and D. Endy. Measuring the activity of BioBrick promoters using an in vivo reference standard. *Journal of Biological Engineering*, 3(1):4, 2009.
- [13] James Kirby and Jay D. Keasling. Biosynthesis of Plant Isoprenoids: Perspectives for Microbial Engineering. *Annual Review of Plant Biology*, 60:335–355, 2009.
- [14] W. Kittleman, C. J. Thibodeaux, Y. N. Liu, H. Zhang, and H. W. Liu. Characterization and mechanistic studies of type ii isopentenyl diphosphate: dimethylallyl diphosphate isomerase from *Staphylococcus aureus*. *Biochemistry*, 46(28), 2007.

- [15] André Kressler and Ian T. Baldwin. Defensive Function of Herbivore-Induced Plant Volatile Emissions in Nature. *Science*, 291:2141–2144, 2001.
- [16] R. Lutz and H. Bujard. Independent and tight regulation of transcriptional units in *Escherichia coli* via the Lacr/o, the TetR/o and AraC/I1-I2 regulatory elements. *Nucleic Acids Research*, 25(6):1203–1210, 1997.
- [17] Christophe Sallaud, Denis Rontein, Sandrine Onillon, Françoise Jabès, Philippe Duffé, Cécile Giacalone, Samuel Thoraval, Camille Escoffier, Gaëtan Herbette, Nathalie Leonhardt, Mathilde Causse, and Alain Tissier. A Novel Pathway for Sesquiterpene Biosynthesis from Z,Z-Farnesyl Pyrophosphate in the Wild Tomato *Solanum habrochaites*. *The Plant Cell*, 21(1):301–317, 2009.
- [18] Lincoln Taiz and Eduardo Zeigler. *Plant Physiology*. Sinauer Associates, Inc., 5 edition, 2010.
- [19] Junji Takabayashi and Marcel Dicke. Plant—carnivore mutualism through herbivore-induced carnivore attractants. *Trends in Plant Science*, 1(4):109–113, 1996.
- [20] Ted C. J. Turlings, John H. Loughrin, Philip J. McCall, Ursula S. R. Röse, W. Joe Lewis, and James H. Tumlinson. How caterpillar-damaged plants protect themselves by attracting parasitic wasps. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(10):4169–4174, 1995.