

UNIVERSIDAD DE LOS ANDES

DEPARTAMENTO DE FÍSICA

BIOLOGÍA SINTÉTICA

Proyecto

Autores:

Manuela VANEGAS FERRO

Juan David ESTUPIÑÁN MÉNDEZ

Luis Alberto GUTIÉRREZ LÓPEZ

Profesor:

Juan Manuel PEDRAZA LEAL

Mayo 21 de 2015

Contents

1	Introducción	2
2	Modelo Matemático	2
2.1	diseño	2
2.2	Ecuaciones de Hill	3
2.3	Reacciones enzimáticas	5
2.4	Modelo determinista	5
2.5	Modelo estocástico	5

Abstract

Your abstract[?] [?] [?] [?] [?] [?] [?] [?] [?] [?].

1 Introducción

El uso de sistemas naturales en el campo de la biología sintética ha sido la principal forma de generar nuevos circuitos y comportamientos. Por ejemplo, hay sistemas que usan ciertas plantas para protegerse del ataque de herbívoros, produciendo químicos volátiles que atraen a los enemigos naturales de los herbívoros. Este es el caso de *Nicotiana attenuata*, o tabaco coyote. Esta planta, cuando siente daño por herbivoría, libera bergamoteno para atraer a insectos del género *Geocoris*, los cuales son depredadores de aproximadamente 65 especies distintas.

Debido a que este sistema es muy específico, este proyecto busca hacerlo más general, permitiendo que muchas especies de plantas se puedan proteger de una forma más eficiente de los herbívoros, sin necesidad de usar químicos insecticidas. De esta forma, buscamos 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.

2 Modelo Matemático

2.1 diseño

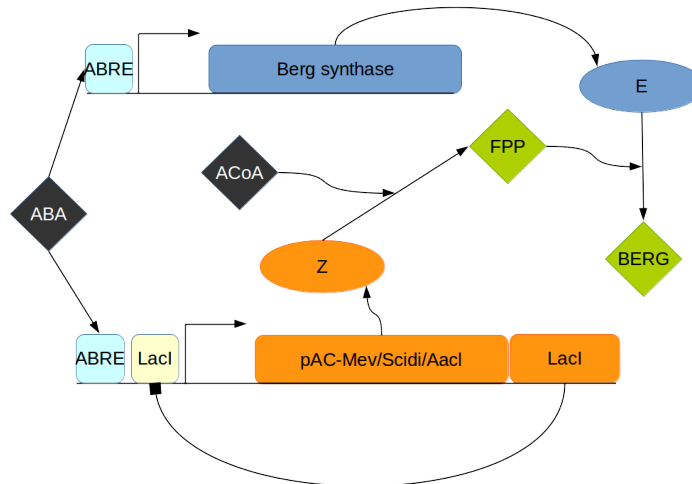


Figure 1: Interconexiones entre los genes que se van a usar en el modelo

El siguiente modelo cuenta con 2 partes. La primera se refiere a la produce la enzima *Bergamoteno sintetasa* (E en la figura 1). La otra parte requiere del plásmido *pAC-Mev/Scidi/AacI*, que sintetiza las enzimas necesarias para llevar *Acetil CoA* a FPP (Z en la figura 1). Ambas partes tienen un promotor activado por la señal de daño. Este es 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 promotor de inhibición de LacI, el cual es producido por este mismo circuito para generar un feedback negativo. De esta manera, se busca que la producción de la enzima Z sea de manera oscilatoria, y así limitar la concentración de FPP.

2.2 Ecuaciones de Hill

Se modeló la parte transcripcional como se ha hecho en clase y está explicado en [?]. 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 $K = \frac{k_-}{k_+}$ [?]. 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:

$$[D] = 0 = -k_{S+}[D][S] + k_{S-}[DS] = -k_{I+}[D][I] + k_{I-}[DI], \quad (2)$$

De donde se tiene que:

$$[D][S] = K_S[DS], \quad [D][I] = K_I[DI] \quad (3)$$

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 3 se obtiene:

$$[D] = \frac{K_S}{S}[DS], \quad [DIS] = \frac{I}{K_I}[DS], \quad [DI] = \frac{K_S}{S}[DIS] = \frac{K_S}{S} \frac{I}{K_I}[DS], \quad (4)$$

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 [?] obtenemos un resultado similar a la ec. 4, 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:

$$\frac{[DS]}{[D_T]} = \frac{1}{\left(\frac{K_S}{S}\right)^{n_S} + \left(\frac{I}{K_I}\right)^{n_I} \left(\frac{K_S}{S}\right)^{n_S} + 1 + \left(\frac{I}{K_I}\right)^{n_I}}, \quad (5)$$

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 . 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.

Esto
por
que

Las ecuaciones que se obtienen son las siguientes:

$$\begin{aligned} \dot{r}_Z(t) = & \alpha_{IS} + \frac{\beta_{IS_I}}{\left(\frac{K_I}{I}\right)^{n_I} + 1 + \left(\frac{S}{K_S}\right)^{n_S} \left(\frac{K_I}{I}\right)^{n_I} + \left(\frac{S}{K_S}\right)^{n_S}} \\ & + \frac{\beta_{IS_S}}{\left(\frac{K_S}{S}\right)^{n_S} + \left(\frac{I}{K_I}\right)^{n_I} \left(\frac{K_S}{S}\right)^{n_S} + 1 + \left(\frac{I}{K_I}\right)^{n_I}} + \frac{\beta_{IS_{IS}}}{\left(\frac{K_I}{I}\right)^{n_I} \left(\frac{K_S}{S}\right)^{n_S} + \left(\frac{K_S}{S}\right)^{n_S} + \left(\frac{K_I}{I}\right)^{n_I} + 1} - \gamma_{r_Z} r_Z \end{aligned} \quad (6)$$

$$\dot{Z}(t) = k_Z r_Z - \gamma_Z Z \quad (7)$$

$$\begin{aligned} \dot{r}_I(t) = & \alpha_{IS} + \frac{\beta_{IS_I}}{\left(\frac{K_I}{I}\right)^{n_I} + 1 + \left(\frac{S}{K_S}\right)^{n_S} \left(\frac{K_I}{I}\right)^{n_I} + \left(\frac{S}{K_S}\right)^{n_S}} \\ & + \frac{\beta_{IS_S}}{\left(\frac{K_S}{S}\right)^{n_S} + \left(\frac{I}{K_I}\right)^{n_I} \left(\frac{K_S}{S}\right)^{n_S} + 1 + \left(\frac{I}{K_I}\right)^{n_I}} + \frac{\beta_{IS_{IS}}}{\left(\frac{K_I}{I}\right)^{n_I} \left(\frac{K_S}{S}\right)^{n_S} + \left(\frac{K_S}{S}\right)^{n_S} + \left(\frac{K_I}{I}\right)^{n_I} + 1} - \gamma_{r_I} r_I \end{aligned} \quad (8)$$

$$\dot{I}(t) = k_I r_I - \gamma_I I \quad (9)$$

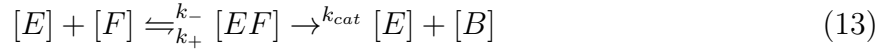
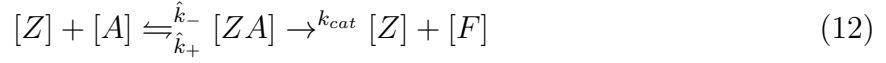
$$\dot{r}_E(t) = \alpha_S + \frac{\beta_S}{1 + \left(\frac{K_S}{S}\right)^{n_S}} - \gamma_{r_E} r_E \quad (10)$$

$$\dot{E}(t) = k_E r_E - \gamma_E E \quad (11)$$

Mirar si se ponen las condiciones iniciales aqui o que

2.3 Reacciones enzimáticas

Las ecuaciones de reacción entre enzima-sustrato son las siguientes



donde $[Z]$ y $[E]$ son las enzimas que proceden del plásmido y la que sintetiza bergamoteno, respectivamente. $[F]$ y $[B]$ son el FPP y el bergamoteno. Con las anteriores reacciones (12 y 13), 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 el otro lado, 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. 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. Dicho esto, las ecuaciones que se usarán son

$$\dot{F} = \frac{K_{cat1}[Z][A]}{K_{M1} + [A]} - K_{cat2} \frac{J - \sqrt{J^2 - 4[E][F]}}{2} \quad (14)$$

$$\dot{B} = K_{cat2} \frac{J - \sqrt{J^2 - 4[E][F]}}{2} - \gamma_B[B] \quad (15)$$

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

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.

Las ecuaciones diferenciales para F y B (14 y 15) dependen de las cantidades calculadas con el modelo estocástico para la producción de las enzimas. Que se explicará como se realizó a continuación.

2.4 Modelo determinista

decir que inicialmente se querían oscilaciones

2.5 Modelo 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.