

DINAMICA POBLACIONAL MEDIADA POR CIRCUITOS GENETICOS

Peña Herrejón G⁽¹⁾. A.; De Luna Fors A.⁽²⁾; Islas Robles A.⁽³⁾; Márquez Baños V. E.⁽⁴⁾; Sánchez Lengeling B. M.⁽⁵⁾; Paredes López E.⁽⁶⁾; Orozco Gómez D.I.⁽⁷⁾

⁽¹⁾ Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro.

⁽²⁾ Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad, CINVESTAV-Irapuato.

⁽³⁾ Facultad de Química, Universidad de Guanajuato.

⁽⁴⁾ Depto. de Ingeniería Química y Bioquímica, Inst. Tecnológico De Tuxtla Gutiérrez

⁽⁵⁾ Facultad de Matemáticas, Universidad de Guanajuato.

⁽⁶⁾ Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología, I.P.N.

⁽⁷⁾ Facultad de Biología, Universidad Autónoma de Aguascalientes.

RESUMEN

La biología sintética pretende simplificar al máximo la creación de circuitos biológicos para obtener un comportamiento deseado en un microorganismo. La idea de implementar en bacterias una conducta presente en organismos complejos como los animales ejemplifica los alcances de esta tecnología. En este trabajo se intenta simular patrones poblacionales teórica y experimentalmente, apoyándose en un modelado matemático y en técnicas de biología molecular. Se comenzó la fabricación de un circuito genético capaz de provocar un comportamiento de movimiento grupal en *E.coli*, produciendo un patrón oscilatorio mediante dos procesos principales, la quimiotaxis y el quorum sensing, utilizando la expresión del receptor Tsr, que permite la atracción hacia AHL, molécula que participa en la producción del quorum sensing, que a su vez regulara al receptor y por lo tanto a la quimiotaxis bacteriana. Se continúa procesando el modelo final para este propósito tanto teórica como experimentalmente.

INTRODUCCIÓN

El comportamiento complejo de poblaciones de organismos complejos ha sido ampliamente estudiado, como es el caso de cardúmenes de peces o el vuelo de las aves ante un predador; sin embargo la posibilidad de obtener sistemas microbianos que presenten comportamientos emergentes de auto-organización no se ha explorado en su totalidad, siendo esta una oportunidad de llevar a un nivel microscópico estas teorías aplicando técnicas de Biología sintética (Benner y Sismour, 2005).

Tomando en cuenta los algoritmos de inteligencia artificial como son los boids (Alon, 2007); donde se siguen reglas de interacción para cada individuo y emerge un comportamiento de grupo sin líder, se propone mediante la modificación genética de *Escherichia coli*, reproducir comportamientos de grupo; con el objetivo de obtener una cepa de bacterias que mediante quimiotaxis forme un conjunto organizado que siga un objetivo.

El primer acercamiento será obtener bacterias capaces de agruparse y reaccionar a un estímulo externo. El movimiento se podrá detectar debido a la emisión de una proteína fluorescente y observación al microscopio de fluorescencia.

Se implementaran dos reglas para lograr la auto-organización:

Cohesión - Cada individuo tiende a buscar asociarse con individuos cercanos, simulando la afinidad sobre expresada hacia una N-acil-homoserina lactona (AHL) y la secreción constitutiva de AHL por *E. coli*.

Imitación - Cada individuo tiende a tener la misma orientación que sus compañeros. Simulando la afinidad por AHL y glucosa que crea un sentido de orientación a *E. coli*.

MATERIALES Y METODOS

La metodología utilizada para el estudio de comportamiento poblacional se dividió en modelamiento matemático y en técnicas de biología molecular. Para la modelación se utilizó el software Cell Designer y Processing, y la implementación de ecuaciones diferenciales parciales y ordinarias las cuales describirán el movimiento poblacional. En la manipulación genética se recurrió a la metodología descrita en Sambrook y Russel, 2001 para la realización de células competentes con Cloruro de Calcio, transformación de células por choque térmico y extracción de plásmido por lisis alcalina. Se realizó doble digestión con enzimas de restricción y se purificaron las muestras mediante la técnica de purificación en gel descrito en el manual de usuario de Zymoclean gel DNA recovery kit y ligación de los genes.

DISCUSION DE RESULTADOS

Aspectos a modelar: el proceso mediante el cual se regula el circuito genético y la forma como interactúa la población bajo las condiciones establecidas; para esto se propuso una dinámica celular (Figura 1).

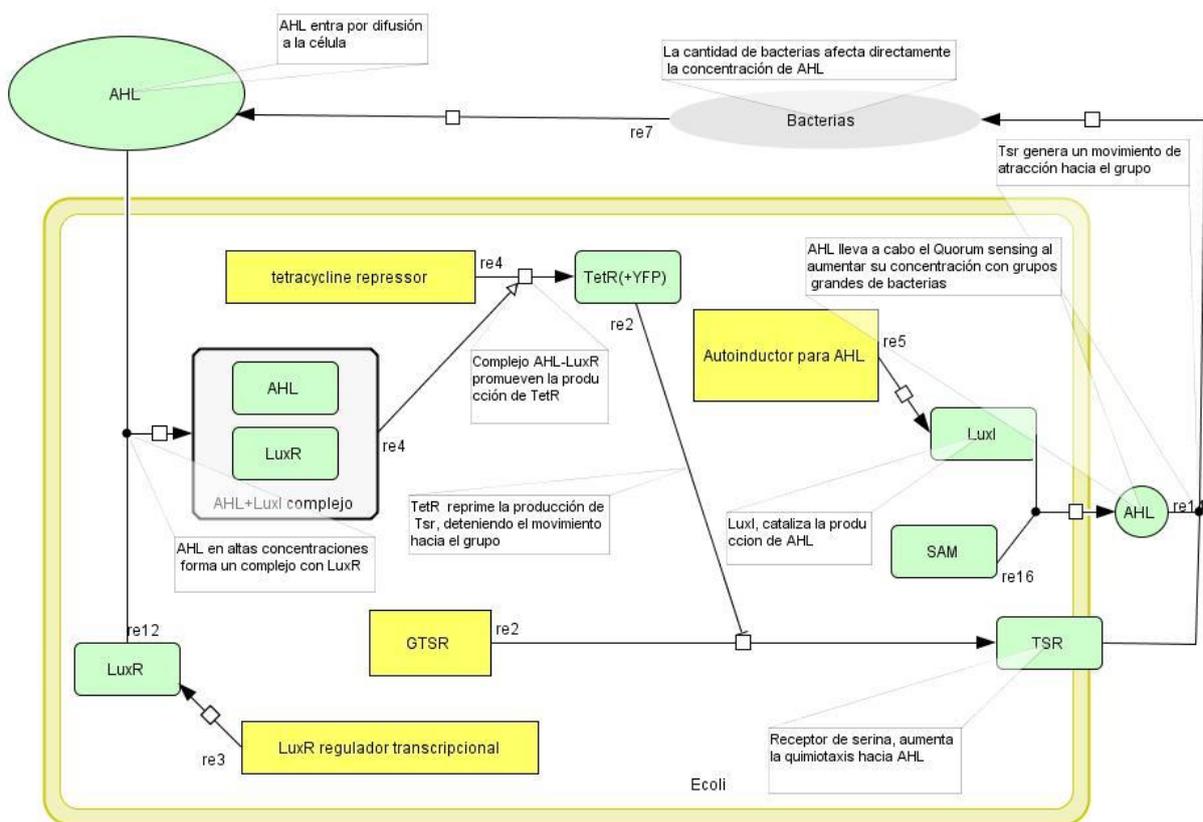


Figura 1. Circuito genético para la dinámica poblacional en *E. coli*

Se utilizaron herramientas informáticas para ejemplificar el proceso de regulación mediante el software Cell designer (Funahashi A., 2008) y así obtener una aproximación de lo que ocurrirá; para esto se tomaron en cuenta los factores externos que afectan la dinámica, lo que sugiere un sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias (Figura 2), en donde se tomaran en cuenta diferentes parámetros (Figura 3).

$$\frac{dC_{Tet}}{dt} = k_1 \frac{C_{AL}}{k_{10} + C_{AL}} - k_2 C_{Tet}$$

$$\frac{dC_{AL}}{dt} = k_4 C_{AHL} C_{LuxR} - k_3 C_{AL}$$

$$\frac{dC_{TSR}}{dt} = \frac{k_5}{(1 + \frac{Tet}{k_7})} - k_6 C_{TSR}$$

$$\frac{dB}{dt} = k_8 B \left(1 - \frac{B}{1 + C_{AHL} C_{TSR}}\right)$$

$$\frac{dC_{AHL}}{dt} = k_9 B$$

Promoción por el complejo *AHL + LuxR* y su degradación.
 Reacción y disociación entre *AHL* y *LuxR*
 Represión por *TetR* y la degradación de *TSR*.
 Presencia de quimioattractor y saturación entre *AHL* y *TSR*.
 Producción de *AHL* por las bacterias cercanas *B*.

Variables en el sistema f(t)

CTet Concentración del represor TetR.
 CAL Concentración del complejo LuxR y AHL.
 CTSR Concentración del receptor TSR.
 B Densidad de Bacterias.
 CAHL Concentración del quimioattractor AHL.

Figura 2. Sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias para la dinámica celular.

k_1 Tasa de transcripción de *TetR*, $13.2 Ms^{-1}$ k_2 Degradación de *TetR*, $1.15 \times 10^{-3} s^{-1}$
 k_3 Disociación *AHL* y *LuxR*, $10^{-5} M^{-1} s^{-1}$ k_4 Asociación *AHL* y *LuxR*,
 $3.33 \times 10^{-3} s^{-1}$
 k_5 Tasa de Transcripción de *TSR*, $33.12 Ms^{-1}$ k_6 Degradación *TSR*, $1.5 min^{-1}$
 k_7 Disociación de *TetR* y *pTetR*,
 $35 \times 10^{-10} M^{-1}$ k_8 Difusión de Bacterias, Tuneable
 k_9 Producción de *AHL* por las Bacterias k_{10} Disociación del complejo *AHL - LuxR* y
 $4.8 \times 10^{-7} nM ml h^{-1}$ promotor *LuxpR*, pendiente

Figura 3. Constantes biológicas

Se realizó un modelo de juguete para ejemplificar la interacción de la población. El modelo simula las caminatas aleatorias, atracción entre las bacterias y la glucosa, de forma muy simplificada, utilizando el software Processing (Fry B., 2001) (Figura 4).

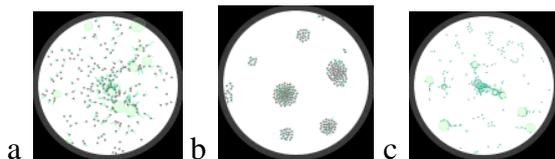


Figura 4. Simulación del software. a) inicio de secreción y atracción entre individuos, b) formación de clusters de células, c) fin de la señalización.

Se observa la formación de grupos en el modelo y a partir de la suposición del comportamiento esperado, se formulan ecuaciones diferenciales parciales (Figura 5), tomando en cuenta el movimiento de la población en tiempo y espacio dependiendo de la difusión de moléculas y microorganismos.

Cohesion en Medio Líquido

$$\frac{\partial n}{\partial t} = D_n \nabla^2 n - \nabla \left[\frac{k_1 n}{(k_2 + a)^2} \nabla a \right]$$

Crecimiento = Movimiento poblacional - quimiotaxis a *a*

$$\frac{\partial a}{\partial t} = D_a \nabla^2 a + k_5 a^2$$

Concentración = Difusión + producción

Medio Semi-Solido

$$\frac{\partial n}{\partial t} = D_n \nabla^2 n - \nabla \left[\frac{k_1 n}{(k_2 + a)^2} \nabla a \right] - \nabla \left[\frac{k_3 n}{(k_4 + g)^2} \nabla g \right] + k_8 n \left(\frac{g^2}{k_9 + g^2} - n \right)$$

$$\frac{\partial a}{\partial t} = D_a \nabla^2 a + k_5 a^2$$

$$\frac{\partial g}{\partial t} = D_g \nabla^2 g - k_6 n \frac{g^2}{k_7 + g^2}$$

Figura 5. Ecuaciones de comportamiento poblacional esperado.

Se realizó la transformación de células utilizando plásmidos liofilizados que contenían los genes de interés previamente sintetizados, se extrajo plásmido (Figura 6) y se cuantificó (Tabla 1).

Tabla 1. Parámetros de las partes biológicas de interés

Parte	pb gen	pb (gen y plásmido)	Concentración plásmido ng/ul
1 (P0140) tetR	842	4031	1816
2 (K081022) luxr	969	3048	2464.8
3 (I751250) luxI	803	3857	2263
4 (J22005) Tsr y eyfp	2623	4703	2888.8

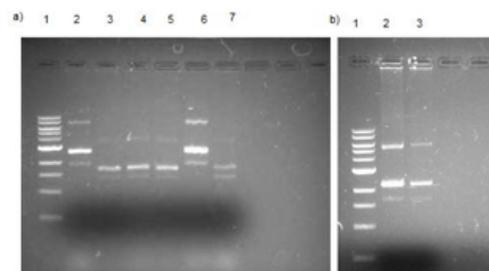


Figura 6. Electroforesis 1% agarosa 120 V y 60 min. a) 1. Marcador de peso molecular 1Kb, 2 y 6. bioparte J22005, 3 y 5. bioparte I751250 y 4 y 7. bioparte K081022. b) 1. Marcador de peso molecular 1Kb, 2 y 3 bioparte P0140.

Se linealizaron los plásmidos mediante digestión con EcoRI, posteriormente se realizó una doble digestión con las enzimas EcoRI, SpeI y XbaI. Se realizó purificación en gel de los plásmidos y las biopartes sometidos a doble digestión, una vez purificadas las muestras, se procedió a realizar reacciones de ligación y transformación de células competentes con choque térmico. No se obtuvieron clones por lo que es necesario volver a realizar todo el proceso.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

La biología sintética provee herramientas que permiten realizar circuitos biológicos siguiendo una metodología simplificada, en donde los genes se pueden manejar como partes de construcción, apoyándose en un moldeamiento matemático con el fin de predecir el comportamiento de estos circuitos biológicos.

En el modelado se tomaron en cuenta los estudios previos relacionados con quimiotaxis y comportamiento de grupos bacterianos. Con estos datos se pretende confirmar que la aproximación matemática dará resultados muy cercanos a la realidad.

En el modelo planteado se tiene una expresión de luxI el cual produce AHL, también expresa Tsr, receptor que permite la quimiotaxis hacia AHL, creando la formación de un grupo de bacterias. A la par se produce luxR, que junto con AHL activan el promotor luxPR, que favorecerá la expresión de tetR, este actuara como un inhibidor sobre el promotor p(tet), lo que evitara la expresión de Tsr, permitiendo que las bacterias pierdan su afinidad hacia AHL. Posteriormente las bacterias comenzaran a separarse hasta el momento cuando la concentración de AHL y luxR desciendan lo suficiente como para dejar de activar el promotor lux pr, permitiendo la reaparición de Tsr, y por tanto la quimiotaxis hacia AHL, donde comenzara nuevamente el proceso.

La implementación del circuito biológico planteado es un primer acercamiento hacia la comprensión de cómo controlar directamente las poblaciones bacterianas, el lograr realizar tareas simples con microorganismos permitirá que en un futuro sea posible utilizar esta tecnología en procesos que requieran mayor exactitud, evitando la propagación.

REFERENCIAS

Alon U. “An Introduction to Systems Biology: Design Principles of Biological Circuits” Chapman & Hall/CRC New York, **2007**

Benner A. S. y Sismour A. M. “Synthetic biology” *Nature Reviews Genetics* 6, 533-543, **2005**

Funahashi A., Matsuoka Y., Jouraku A., Morohashi M., Kikuchi N., Kitano H., “CellDesigner 3.5: A Versatile Modeling Tool for Biochemical Networks” Proceedings of the IEEE Volume 96, Issue 8, Page(s):1254 – 1265, Aug. **2008**

Fry B., Reas C., “Processing software” Disponible [en línea] <http://processing.org> **2001**

Sambrook and Russel. “Volumen 1. Molecular cloning: a laboratory manual.” 3ª ed.

Ed.CSHL press., New York, **2001**

Strassmann J.E., Zhu Y., Queller D.C., “Altruism and social cheating in the social amoeba, *Dictyostelium discoideum*.” *Nature*, 408:965-967, **2000**

Zymo Research Corp. “Instruction Manual, Zymoclen Gel DNA Recovery kit” catalog Nos. D4001 D4002 pp 3, **2010**