



ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA



**UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS - ESPE
DEPARTAMENTO CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

Trabajo de Titulación, previo a la obtención del título de Ingeniero en Biotecnología

“Modelamiento matemático del silenciamiento de los genes Velvet, SIX1, ERG11 y SGE1 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* raza tropical 4, con ARNs de interferencia generados mediante ARNs de doble cadena sintéticos”

TORRES MOREIRA, NATALIA ELIZABETH

DIRECTOR:

ING. FLORES FLOR, FRANCISCO JAVIER, PhD.

AGOSTO 2022



Tabla de Contenido

1 Introducción

2 Objetivos

3 Metodología

4 Resultados y
Discusión

5 Conclusiones y
Recomendaciones



1

Introducción



ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS

INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

Fusarium oxysporum f. sp. *cubense* raza tropical 4 (FOC RT4)

4

Introducción

Mayor amenaza para las producciones de banano



Más de 170 mil Ha.

Se perdieron en el siglo XIX
por FOC RT1

Avanza
2-3 semanas  50 cm
2-3 días

Extensa
cantidad de
hospederos

Letalidad

Permanencia
en el suelo



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

SIX1

Secreted in xylem 1

- Posee homólogos en algunas formas especiales de FOC
- Su delección genética causa graves daños a la virulencia del hongo

SGE1

Six Gene Expression 1

- Regula la expresión de los genes SIX
- Influye en la producción estable de conidios

ERG11

*cytochrome P450
lanosterol C-14 α -demethylase*

- Vinculado en la síntesis de ergosterol (componente de la membrana celular fúngica)
- Papel en formación de conidios

Velvet

- Papel en el desarrollo de hifas conidios
- Producción de inductores de virulencia



Silenciamiento de ARN en hongos generado por dsRNA

6

Introducción



Beneficios de la aplicación de dsRNA como bioplaguicida

Raíces de banana infectada con FOC RT4

Reconocimiento de ARN objetivo

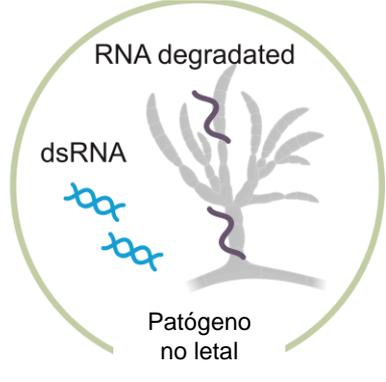
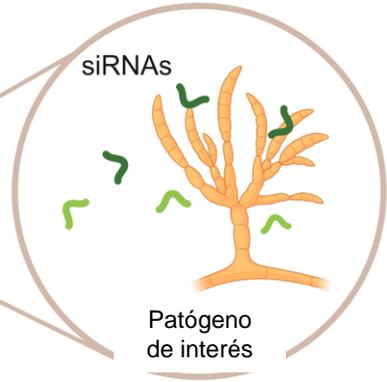
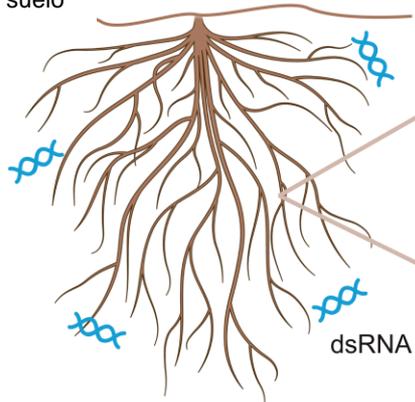
Silenciamiento de ARN

Altamente específico

Limitada persistencia ambiental

Versátil para múltiples objetivos

suelo



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

Silenciamiento de ARN en hongos generado por dsRNA

■ Quelling en hongos filamentosos con reproducción asexual

ADN repetitivo



QDE-1
QDE-3

aRNA



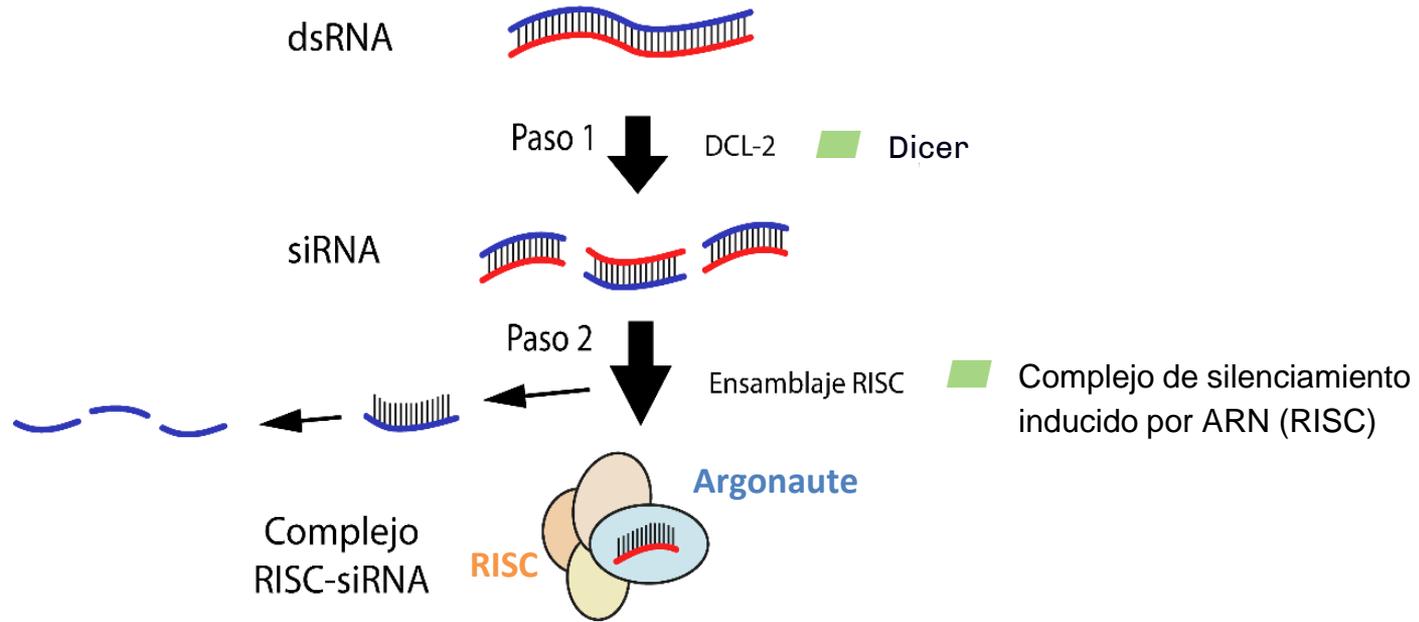
QDE-1

dsRNA



■ ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRP)

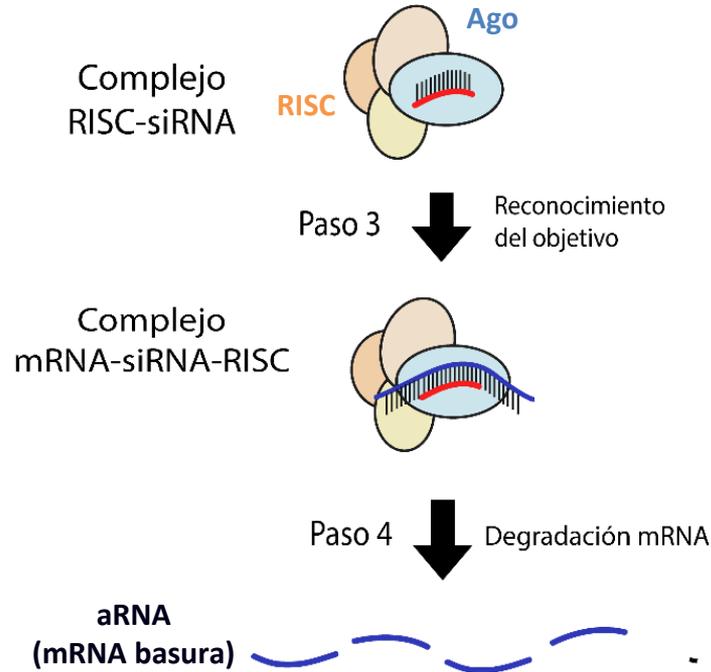
Silenciamiento de ARN en hongos generado por dsRNA



Silenciamiento de ARN en hongos generado por dsRNA

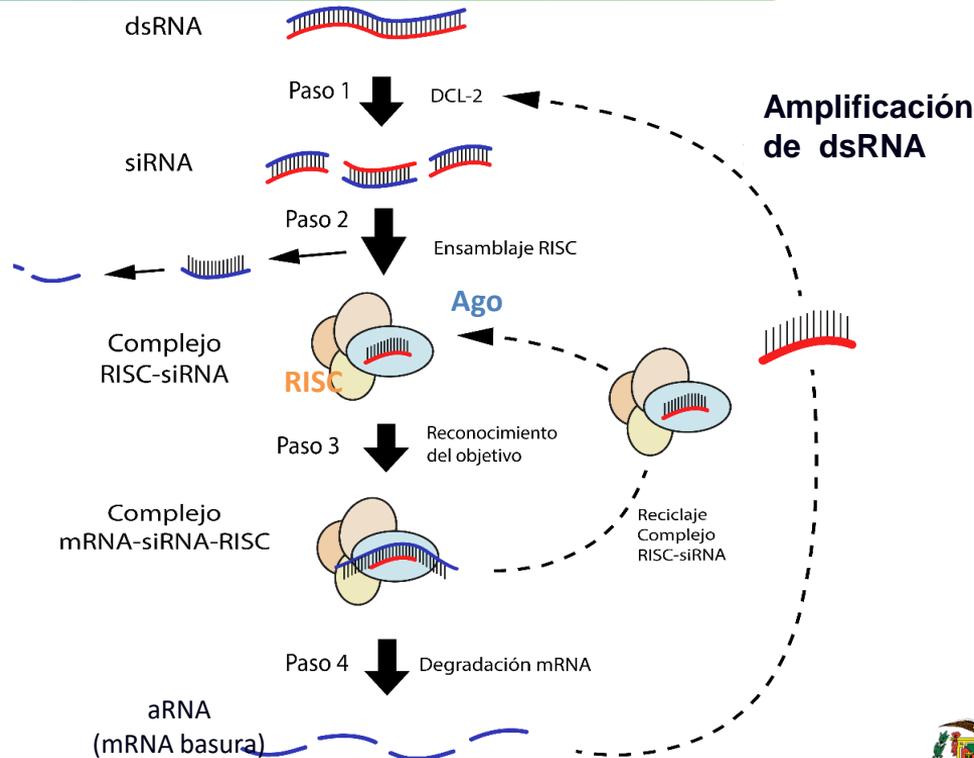
9

Introducción



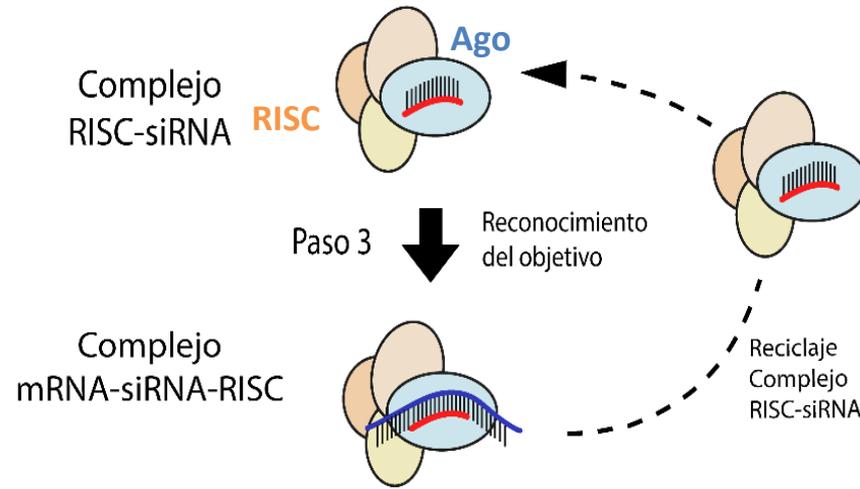
Silenciamiento de ARN en hongos generado por dsRNA

Rutas de Amplificación



Silenciamiento de ARN en hongos generado por dsRNA

Rutas de Amplificación



Modelamiento matemático determinista de sistemas biológicos

12

Introducción

Modelamiento determinista

Considera la cantidad de moléculas transformadas para cada sustancia o especie, velocidades de reacción y coeficientes estequiométricos



Sistema Biológico

Conjunto de partes similares que trabajan en armonía para cumplir alguna función fisiológica determinada

Formulación de reacciones bioquímicas

Determinación y estimación de parámetros

Validación y ajuste de modelos

Desarrollo de modelo matemático



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

2

Objetivos

**ESPE**

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS

INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

Objetivo General

Modelar matemáticamente el silenciamiento de los genes Velvet, SIX1, ERG11 y SGE1 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza tropical 4, con ARNs de interferencia generados mediante ARNs de doble cadena sintéticos



Objetivos Específicos



- Formular reacciones bioquímicas que expresen el comportamiento del mecanismo de silenciamiento de los genes Velvet, SIX1, ERG11 y SGE1 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense* raza tropical 4, por ARNs de interferencia generados con ARNs de doble cadena sintéticos.



- Desarrollar un modelo matemático para el silenciamiento de los genes especificados a partir de las reacciones bioquímicas establecidas.



- Simular *in silico* la cinética de las reacciones bioquímicas formuladas con el modelo matemático

3

Metodología



ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS

INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

Contenido

Materialles

dsRNA sintético diseñado por el equipo iGEM Ecuador para silenciar los genes objetivo: SIX1, SGE1, ERG11 y Velvet



Formulación de reacciones bioquímicas del mecanismo silenciamiento de los genes Velvet, SIX1, SGE1 y ERG11



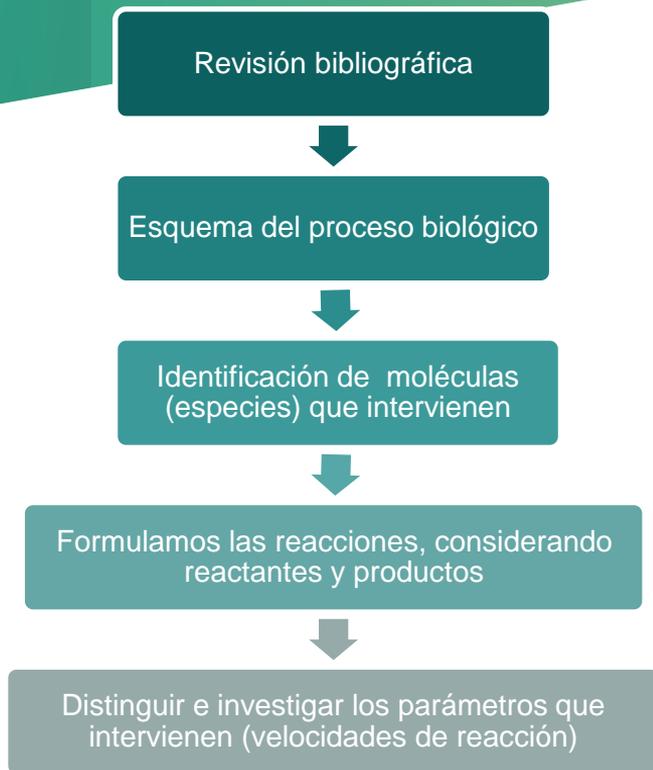
Desarrollo modelo matemático determinista



Simulación in silico de modelo matemático



Reacciones químicas



Estimar los parámetros que no se encuentran en literatura

Taza de transcripción del mRNA objetivo

siRNAs producidos por el corte de Dicer

Promedio de las siguientes fórmulas

$$km_X \min = \frac{Lm_B \times Lp_A}{CDS_{bp} \times Epol}$$

$$km_X \max = \frac{Lm_A \times Lp_A}{CDS_{bp} \times Epol}$$

$$X = \frac{pb \ dsRNA_X}{25}$$

Resultado redondeado al mínimo

Donde:

Lm_B : Limite inferior tasa de transcripción,

Lm_A : Limite superior tasa de transcripción,

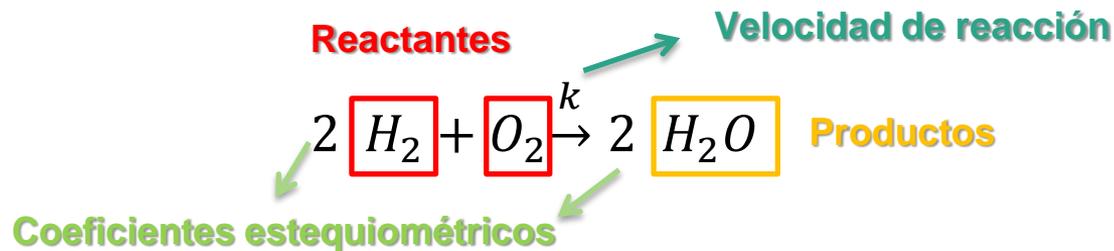
Lp_A : Limite superior tasa de traducción,

CDS_{bp} : Tamaño de la secuencia codificante del gen objetivo,

$Epol$: Eficiencia de la polimerasa



Modelamiento de ARNi



Aplicación



Ley de Acción de Masas (LAM)

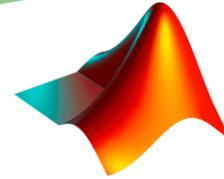
$$\frac{d[H_2]}{dt} = -2k[H_2]^2 [O_2]$$

$$\frac{d[O_2]}{dt} = -k[H_2]^2 [O_2]$$

$$\frac{d[H_2O]}{dt} = +2k[H_2]^2 [O_2]$$



Simulación *in silico*



MATLAB®

Para resolver el sistema de Ecuaciones Diferenciales Ordinarias (EDO) se utilizó la función

ode15

main.m

- Almacenamiento de parámetros generales, condiciones iniciales, rango de tiempo y matriz base para Ecuaciones Algebraicas Diferenciales (DAEs) para simular el mecanismo de silenciamiento

main_X.m

- Un script para cada uno de los genes X objetivo
- Establecimiento de parámetros específicos de cada gen objetivo, configuración de la integración definida de ode15 y almacenamiento de los resultados obtenidos

plots.m

- Funciones para graficar los comportamientos de cada especie bioquímica, gráficas comparativas de los modelamientos e interacción de dosis - respuesta



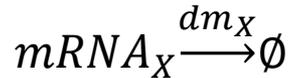
ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

4

Resultados y Discusión



- Producción de los genes de interés dentro del hongo



Donde:

km_X es la tasa de transcripción del $mRNA_X$ del gen X objetivo y dm_X es la tasa de degradación del $mRNA_X$

SIX1

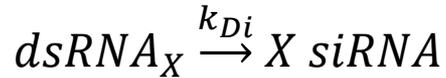
SGE1

ERG11

Velvet



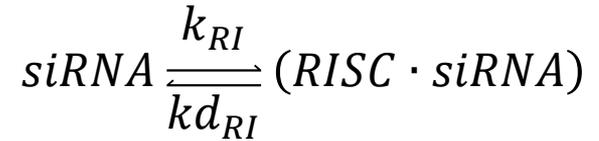
- La proteína Dicer identifica el $dsRNA_X$ y lo segmenta en X fragmentos cortos de $siRNA_X$



Donde:

k_{Di} es la tasa de escisión de Dicer

- Las moléculas de $siRNA_X$ se cargan en el complejo RISC, se separa una hebra de $siRNA$ y se degrada

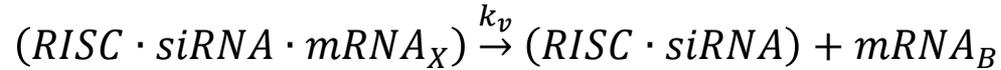
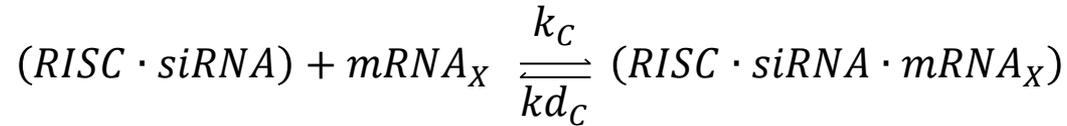


Donde:

k_{RI} es la tasa de formación del complejo ($RISC \cdot siRNA$), kd_{RI} es la tasa de disociación del complejo ($RISC \cdot siRNA$) y dsi es la tasa de degradación de $siRNA$.



- Reconocimiento del $mRNA_X$ objetivo y unión al complejo ($RISC \cdot siRNA$), escisión del $mRNA_X$ para silenciarlo, acumulación de $mRNA_B$ y posterior degradación



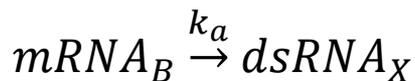
Donde:

k_C es la tasa de unión del complejo ($RISC \cdot siRNA$) con $mRNA_X$, kd_C es la tasa de disociación del complejo ($RISC \cdot siRNA \cdot mRNA_X$), k_v es la tasa de formación del $mRNA_B$ y dm_B es la tasa de degradación de $mRNA_B$



Reacciones químicas

- $mRNA_B$ es considerado $aRNA$ por RdRP, a través del cual sintetiza el $dsRNA$



Donde:

k_a es la tasa de amplificación de $dsRNA_X$ por RdRP

- Absorción de dsRNA sintético (dsX) supuesta a través de la endocitosis mediada por clatrina

$$\frac{d[dsXi]}{dt} = \frac{V'_{max} [dsX]}{K'_m + [dsX]}$$

Donde:

V'_{max} es la tasa de internalización máxima y K'_m es la concentración de dsRNA en que la velocidad de internalización es la mitad de V'_{max}

- Estimación de parámetros específicos de cada gen de interés

Parámetro	Descripción	Valor
km_{VE}	Taza de transcripción de $mRNA$ del gen Velvet	$3 \text{ molec}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$
X_{VE}	$siRNAs$ del gen Velvet	18
km_{SIX}	Taza de transcripción de $mRNA$ del gen SIX1	$5 \text{ molec}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$
X_{SIX}	$siRNAs$ del gen SIX1	19
km_{SGE}	Taza de transcripción de $mRNA$ del gen SGE1	$3 \text{ molec}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$
X_{SGE}	$siRNAs$ del gen SGE1	19
km_{ERG}	Taza de transcripción de $mRNA$ del gen ERG11	$2 \text{ molec}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$
X_{ERG}	$siRNAs$ del gen ERG11	15



Concentraciones de proteínas Dicer, complejos RISC y enzimas RdRP son lo suficientemente grandes y constantes, por lo que las fluctuaciones con el tiempo pueden descuidarse

dsRNA sintético que ingresa al hongo será la condición inicial de concentración de dsRNA que desencadena el mecanismo

Conversión de *dsRNAs* en X *siRNAs* (aproximadamente 25 nt) toma en cuenta como una reacción irreversible y rápida

X es el número de *siRNAs* que depende de la longitud del ARN diana

Una molécula de *siRNA* basta para escindir el ARN objetivo y, detrás, iniciar el mecanismo de silenciamiento del ARN

dsX son las moléculas de dsRNA del gen X , si denotará al *siRNA*, RI es el complejo *RISC*, el mRNA objetivo del gen X es m_X y m_B es el mRNA degradado

Supuestos del
modelo ODE,
diseñado para
una célula fúngica
como FOC
TR1/TR4:

mRNA
objetivo

$$\frac{d[m_X]}{dt} = km_X - k_C[m_X][RI \cdot si] + kd_C[RI \cdot si \cdot m_X] - dm_X[m_X]$$

$$\frac{d[dsX]}{dt} = -k_{Di}[dsX] + k_a[m_B]$$

Amplificación
dsRNA

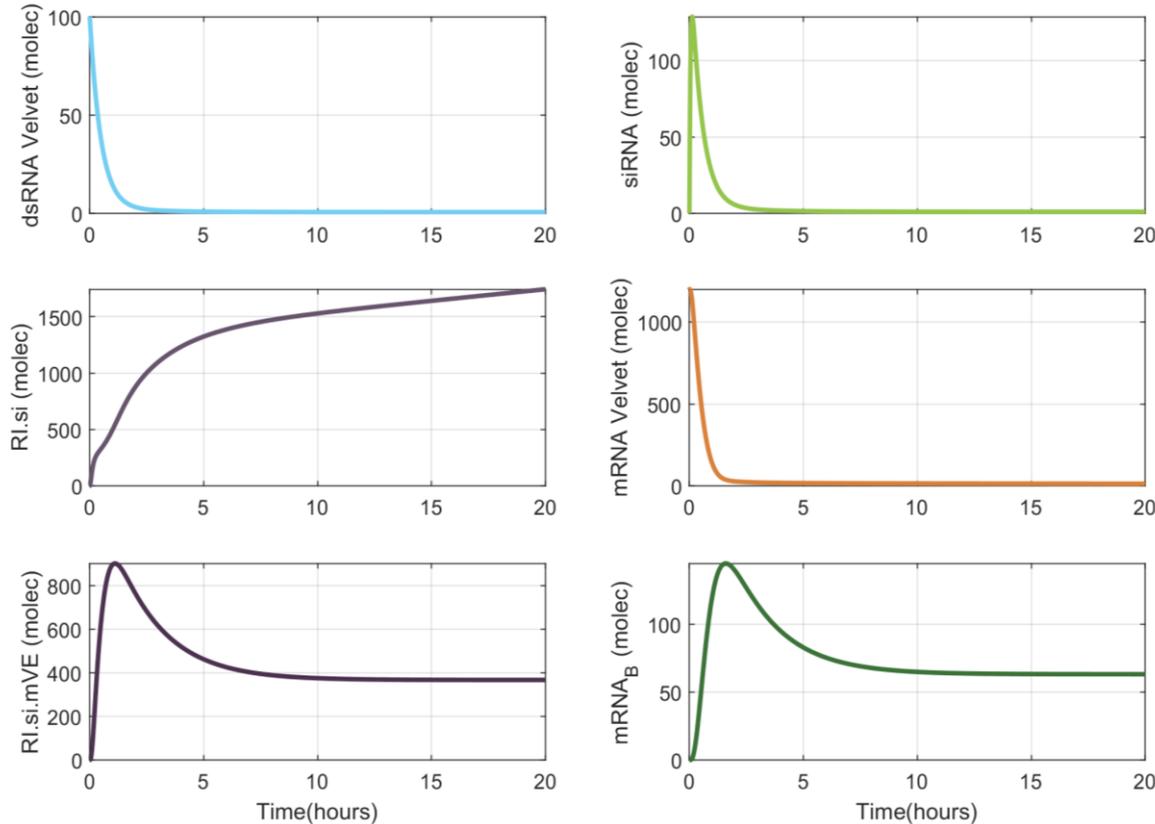
$$\frac{d[si]}{dt} = X k_{Di}[dsX] - k_{RI}[si] + kd_{RI}[RI \cdot si] - d_{si}[si]$$

$$\frac{d[RI \cdot si]}{dt} = k_{RI}[si] - kd_{RI}[RI \cdot si] - k_C[m_X][RI \cdot si] + kd_C[RI \cdot si \cdot m_X] + k_v[RI \cdot si \cdot m_X]$$

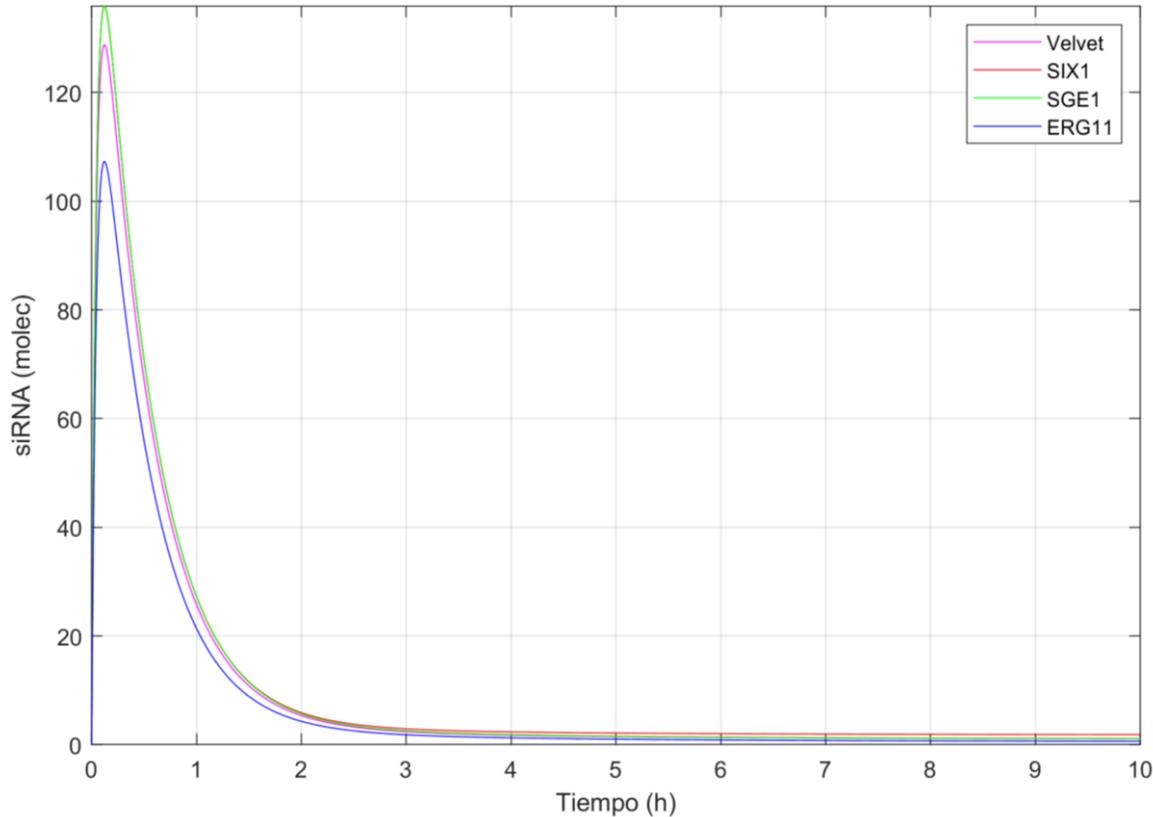
$$\frac{d[RI \cdot si \cdot m_X]}{dt} = k_C[m_X][RI \cdot si] - kd_C[RI \cdot si \cdot m_X] - k_v[RI \cdot si \cdot m_X]$$

$$\frac{d[m_B]}{dt} = k_v[RI \cdot si \cdot m_X] - dm_B[m_B] - k_a[m_B]$$

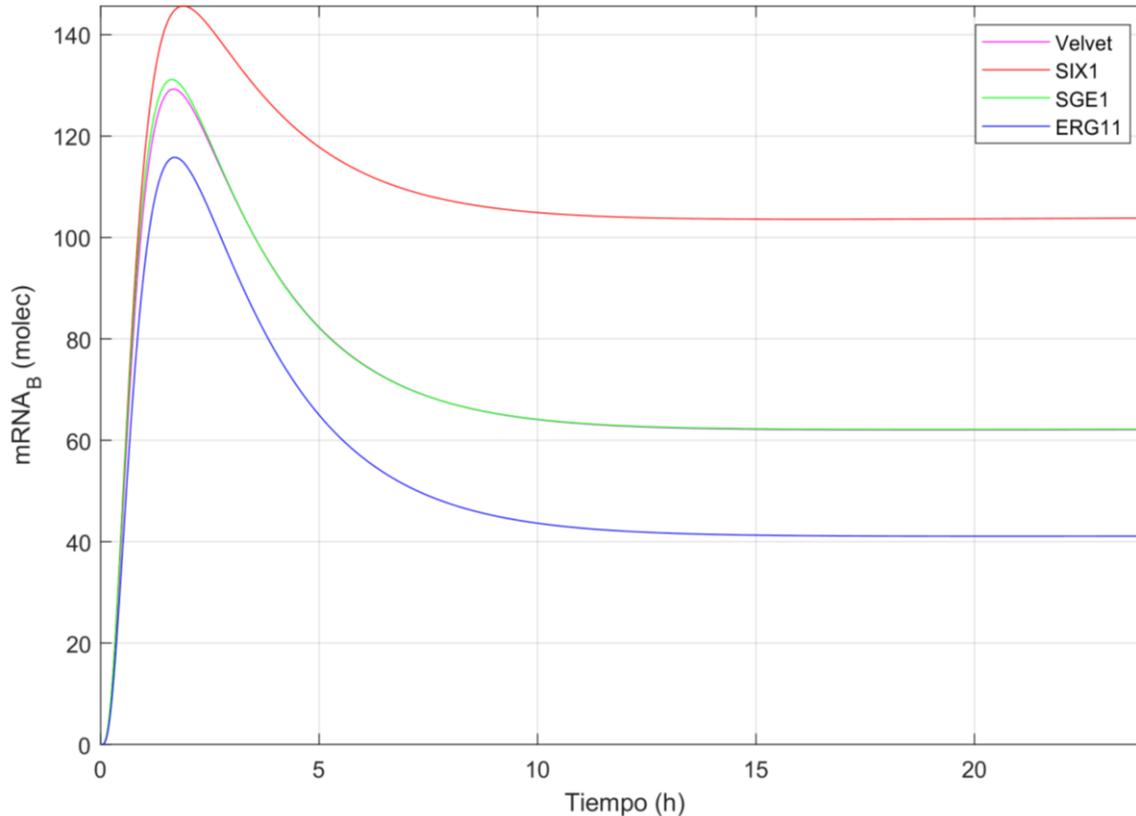




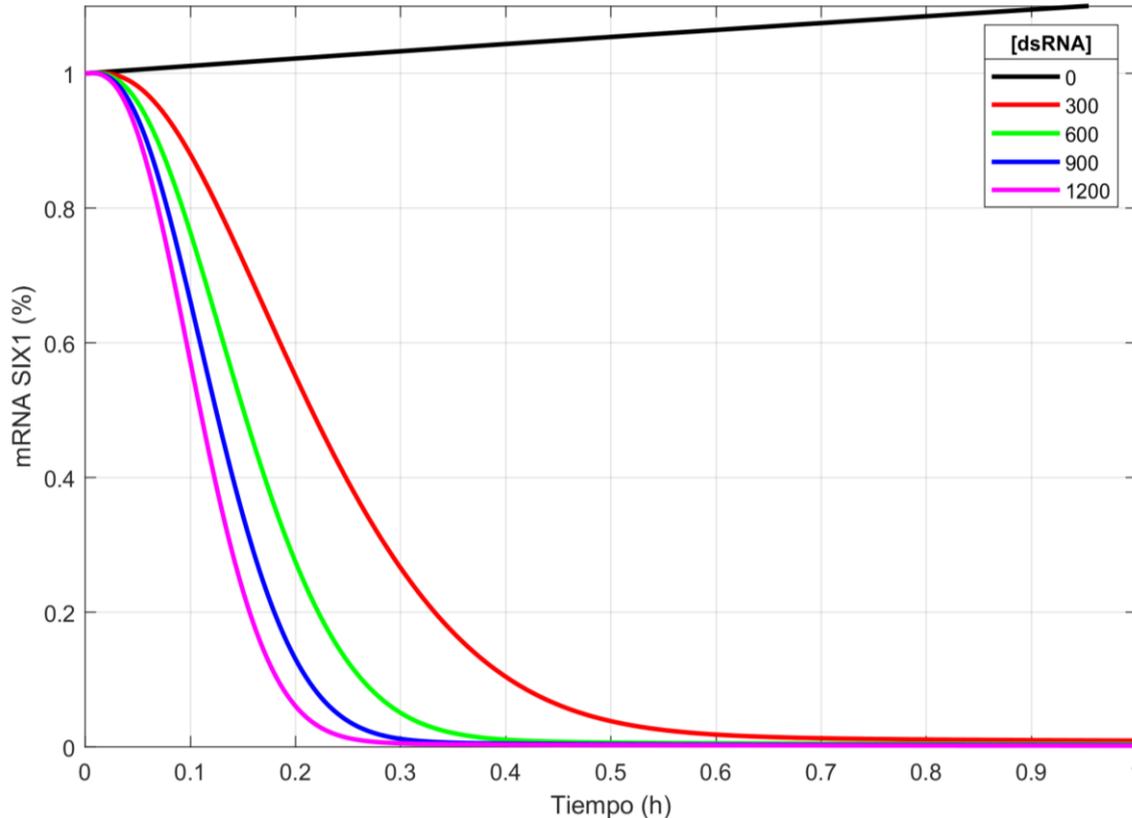
- Comportamiento de las especies bioquímicas en el modelamiento del ARNi del gen Velvet



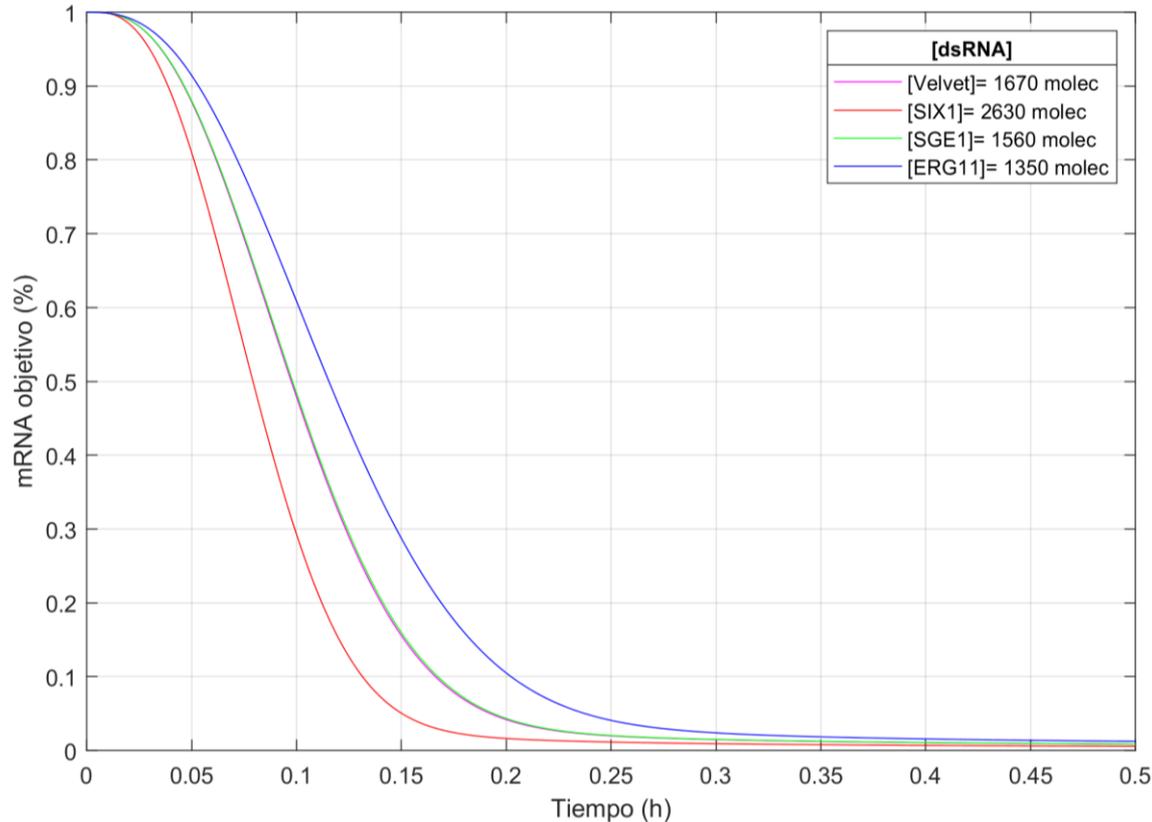
- *Comparación de modelamientos de los cuatros genes objetivo, con relación al comportamiento del siRNA vs. tiempo*



- Comparación de modelamientos de los cuatros genes objetivo, con relación al comportamiento del mRNA basura vs. tiempo



■ *Relación de la expresión del mRNA del gen SIX1 frente a varias concentraciones de dsRNA (Relación Dosis – Efecto)*



- *Relación de la dosis necesaria de dsRNA de cada gen objetivo hasta alcanzar un máximo nivel de inhibición en un tiempo definido (Relación Dosis – Efecto)*



5

Conclusiones y Recomendaciones



Conclusiones



- Las reacciones bioquímicas formuladas del mecanismo de silenciamiento “Quelling”, se aproximan al mecanismo supuestamente utilizado por *F. oxysporum* para degradar los genes Velvet, SIX1, ERG11 y SGE1 por medio de dsRNA.



- A partir de las reacciones bioquímicas, se desarrolló un modelo matemático base en forma de un sistema de ODEs y se lo adaptó para cada gen de interés, aplicando los parámetros específicos correspondientes.



- En la simulación computacional de cada modelo matemático resultante, se identificó el mismo efecto de saturación encontrado en experimentación *in vivo*. Y se encontró que los parámetros; km_x y X , si influyen en el silenciamiento de ARN en hongos.
- Se necesita una ínfima concentración para silenciar el gen objetivo en 5 días.



Recomendaciones

Conclusiones y Recomendaciones

Definir experimentalmente los parámetros los siguientes procesos y con ellos ajustar el modelo

Reducir el modelo matemático por medio de *Aproximación Quasi-Estacionaria* (QSSA)

Modelar a través de la reacción enzimática de Michaelis – Menten el siguiente proceso

Endocitosis mediada por clatrina

Producción de mRNA de interés por parte de *FOC RT1/RT4*

Producción del siRNA

Formación del complejo RISC-siRNA-mRNA

Formación del complejo RISC-siRNA-mRNA



Referencias

- Boada, Y., Vignoni, A., Alarcon-Ruiz, I., Andreu-Villarraig, C., Monfort-Llorens, R., Requena, A., & Picó, J. (2019). Characterization of Gene Circuit Parts Based on Multiobjective Optimization by Using Standard Calibrated Measurements. *ChemBioChem*, 20(20), 2653–2665. <https://doi.org/10.1002/CBIC.201900272>
- Cuccato, G., Polynikis, A., Siciliano, V., Graziano, M., di Bernardo, M., & di Bernardo, D. (2011). Modeling RNA interference in mammalian cells. *BMC Systems Biology*, 5. <https://doi.org/10.1186/1752-0509-5-19>
- Dang, Y., Yang, Q., Xue, Z., & Liu, Y. (2011). RNA Interference in Fungi: Pathways, Functions, and Applications. *Eukaryotic Cell*, 10(9), 1148–1155. <https://doi.org/10.1128/EC.05109-11>
- iGEM Ecuador. (2021). *Team:Ecuador - 2021.igem.org*. International Genetically Engineered Machine (IGEM) Foundation. <https://2021.igem.org/Team:Ecuador>
- Makeyev, E. v., & Bamford, D. H. (2002). Cellular RNA-dependent RNA polymerase involved in posttranscriptional gene silencing has two distinct activity modes. *Molecular Cell*, 10(6), 1417–1427. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00780-3/ATTACHMENT/46D7C603-8719-4F27-B4FE-C003DFC36FC1/MMC4.JPG](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00780-3/ATTACHMENT/46D7C603-8719-4F27-B4FE-C003DFC36FC1/MMC4.JPG)
- Picó, J., Vignoni, A., Picó-Marco, E., & Boada, Y. (2015). Modelado de sistemas bioquímicos: De la Ley de Acción de Masas a la Aproximación Lineal del Ruido. *Revista Iberoamericana de Automática e Informática Industrial RIAI*, 12(3), 241–252. <https://doi.org/10.1016/J.RIAI.2015.06.001>
- Vignoni, A. (2021). *Modeling I: ODEs and Hill Functions - 2021 iGEM Engineering Webinars*. IGEM Video Universe. <https://video.igem.org/w/kC1X3vhSxvZMqidkPKtRSZ>
- Wytinck, N., Manchur, C. L., Li, V. H., Whyard, S., & Belmonte, M. F. (2020). dsRNA uptake in plant pests and pathogens: insights into RNAi-based insect and fungal control technology. *Plants*, 9(12), 1780.



Agradecimientos



**Francisco Flores
Flor Ph.D.**

Director de proyecto de tesis
Universidad de las Fuerzas
Armadas ESPE



**Ing. Yadira Boada
Acosta**

Docente
Universitat Politècnica de
València



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA