



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
CENTRO DE CIENCIAS GENÓMICAS

INGENIERIA DE SISTEMAS DE REGULACIÓN GENÉTICA EN ORGANISMOS
BACTERIANOS MEDIANTE sRNA PEQUEÑOS Y LA PROTEÍNA CHAPERONA DE RNA HFQ

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

BIÓL. ZUEMY RODRÍGUEZ ESCAMILLA

TUTOR

Dr. ENRIQUE MERINO PÉREZ

INSTITUTO DE BIOTENOLOGÍA, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. MIGUEL ÁNGEL CEVALLOS GAOS

CENTRO DE CIENCIAS GENÓMICAS, UNAM

Dr. VÍCTOR MANUEL GONZÁLEZ ZÚÑIGA

CENTRO DE CIENCIAS GENÓMICAS

CUERNAVACA, MORELOS, 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Esta Tesis se realizó en el Posgrado de Ciencias Biomédicas, de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Zuemy Rodríguez Escamilla obtuvo una beca de estudios de posgrado otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con número 232666.

Los experimentos se realizaron en el Laboratorio de Genómica Computacional, del Instituto de Biotecnología, UNAM. Bajo la tutoría del Doctor Enrique Merino Pérez, con el financiamiento del proyecto "Generando nuevos paradigmas de la Biología Sintética aplicados al estudio de estresomas bacterianos" pertenecientes a la convocatoria de "Fronteras de la Ciencia" del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, con el número de proyecto 2015-02-887

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

A mi tutor el Dr. Enrique Merino Pérez. A los miembros de mi Comité tutorial Dr. Miguel Ángel Cevallos Gaos y Dr. Victor Manuel Gonzáles Zúñiga por la guía en mi doctorado.

A los miembros de mí jurado para exámen de Doctor en Ciencias:

Dra. Elda Guadalupe Espín Ocampo

Dr. Enrique Merino Pérez

Dra. Gloria Soberón Chávez

Dr. Arturo Carlos II Becerra Bracho

Dra. Cinthia Ernestina Núñez López

A la Dra. Susana Brom por el gran apoyo ante el PDCB.

Al M. en C. Ricardo Ciria Merce por las bases de datos que maneja y a la M. en C. María Luisa Tabche por el soporte técnico del laboratorio.

A la M. en C. Karla Susana Escalante Herrera por la ayuda técnica.

A la ciencia que se realiza en el mundo y a los Bibliotecarios como Shirley Ainsworth que nos permiten conectar nuestras mentes.

Agradecimientos personales

A mis hermanos y padres, por el apoyo en la etapa final de mi doctorado.

A Quique por el apoyo y lo que me enseñó, en lo académico y en lo personal. Y sobre todo por los sueños alcanzados y por los que siguen.

A todos los miembros del Laboratorio Espín-Merino, a los amigos ganados y a los acompañantes de vida.

A Christian, Greta, Amelie, Miguel Cocotl, Adán, Getza, Mildred, Libertad, Claudia, Leydi, Betito, Carlos, Luis Felipe y Janet por los buenos momentos, sobre todo, las posadas.

A Berenice Martínez por mucho, pero sobre todo por el noveno mes.

A la UNAM.

**DEDICADO A MIS AMADOS MARIO Y KINICH,
MIS GRANDES RAÍCES**

Vaya para todos los lectores de esta tesis, la rola que me acompañó todo este tiempo, al final, ¡solo vinimos a soñar!

El ciclón

Café tacuba

Yo, flecha
flor, polen, flecha
abeja, oso, pez
Flecha, agua,
sube, nube,
llueve, árbol, flecha,
oxígeno, flecha, pulmón
Nopiltze, hija mía
acaso dios nunca muere?
a que dios te refieras
todo de eso depende.
Hay dioses que pensaron
que el mundo era infinito, y
no hay un equilibrio entre los reinos hijo mío
Yo, flecha...
Gira y da vueltas
y rueda girando
gira y da vueltas
y rueda, y rueda
Quiero hacerla un cuadrado,
deformarla en un triángulo
pero la vida siempre vuelve a su forma circular
La única que puede darnos vueltas es dios
hay tan pocas flores ya, peces, agua que pensé
que la vuelta no daría
hoy tu hijo me respira.
Si el equilibrio es dios, y el equilibrio murió,
que paso con dios?
Gira y da vueltas....

RESUMEN

Se denomina como Biología Sintética a la recientemente creada rama de la Biología que tiene como objetivo el rediseño de sistemas biológicos naturales para la generación de nuevos componentes que permitan controlar el comportamiento celular. En otras palabras, la Biología Sintética busca la creación o modificación de organismos para que se comporten como *pequeños ordenadores vivientes* que puedan ser *programados* mediante el uso de circuitos genéticos. En años recientes el uso de RNAs pequeños empezó a ser incluido en el diseño de circuitos de regulación ya que estas moléculas pueden actuar en *trans*, modulando la expresión de genes blanco localizados en diferentes partes del genoma. El complejo Hfq—sRNA reconoce al mRNA blanco mediante interacciones de puentes de hidrógeno uniéndose en sitios clave del mRNA, por ejemplo la secuencia Shine-dalgarno es un sitio de interacción entre sRNA y mRNA reprimiendo el proceso de traducción del mRNA. En esta tesis se exploraron algunos de los requerimientos necesarios para generar nuevos **antisentidos sintéticos regulatorios** de RNA (asrRNA) y los promotores que los controlan, se modelaron sistemas de riboreguladores y ribomoduladores que permiten controlar la expresión de un gen de manera transitiva y reversible, estandarizando las partes hasta llegar a la construcción del BioBrick RM. Se generaron los diferentes sistemas de regulación: i) Sistema “Kamikase”, el cual es un sistema que permite la curación de plásmidos en cepas bacterianas; ii) Sistema de sincronización del crecimiento bacteriano, basado en riboreguladores y ribomoduladores con efectos reversibles; iii) El circuito alternador dependiente del factor Sigma 70 (RpoD). Este último sistema resulta particularmente importante, porque es el primer sistema de regulación creado en Biología Sintética con propiedades epigenéticas, probando la resiliencia bacteriana en un estrés sintético y con efecto reversible mediante el uso de un asrRNA y un excludón dentro del circuito genético.

ABSTRACT

Synthetic Biology is the newly created area of Biology that aims to redesign natural biological systems for the generation of new components that allow control of cellular behavior. In other words, Synthetic Biology seeks the creation or modification of organisms to behave as small living computers that can be programmed through the use of genetic circuits. In recent years, the use of small RNAs began to be included in the design of regulatory circuits because these molecules can act in trans, modulating the expression of target genes located in different parts of the genome. The Hfq-sRNA complex recognizes target mRNA by hydrogen bonding interactions at key mRNA sites, for example the Shine-dalgarno sequence is a site of interaction between sRNA and mRNA thus repressing the mRNA translation process. In this thesis, we explored some of the necessary requirements to generate new regulatory antisense RNA (asrRNA) and the promoters that control them, we were able to model riboregulators and ribomodulators systems that allow to control the expression of a gene in a transitive and reversible way, we make standard parts until reaching the construction of the BioBrick RM. The different control systems were generated: i) "Kamikase" system, which is a system that allows the curing of plasmids in bacterial strains; ii) Bacterial growth synchronization system, based on riboregulators and ribomodulators with reversible effects; iii) The alternator circuit dependent on the Sigma 70 factor (RpoD). This last system is particularly important because it is the first regulation system created in Synthetic Biology with epigenetic properties, proving bacterial resilience in a synthetic stress and with a reversible effect through the use of an asrRNA and an exclusion within the genetic circuit alternator.

Indice

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS	3
Agradecimientos personales.....	4
RESUMEN.....	7
Abstract.....	8
INDICE.....	9
CAPÍTULO 1. LA BIOLOGÍA SINTÉTICA Y LOS SRNA.....	12
Antecedentes.....	12
Los sRNA y la proteína Hfq como reguladores de la expresión génica y de interacciones cuaternarias	14
Justificación	18
Hipótesis:.....	18
Objetivo General:.....	18
Objetivos particulares:.....	19
Modelado y síntesis de asrRNA _{lacZ}	20
Resultados del modelado de los asrRNA mimético, catalítico y plano.	21
Modelos de tres diferentes asrRNA _{lacZ}	23
Técnica de clonación para asrRNA	25
Construcción de la cepa E. coli K12 Δ Hfq	26
Cuantificación de la actividad del blanco de los asrRNA.....	27
Discusión y Conclusiones	29
CAPITULO 2. "EL CIRCUITO KAMIKASE"	30

Antecedentes.....	30
Hipótesis.....	32
Metodología	32
Metodología experimental.....	33
Discusión y Conclusiones	39
 CAPITULO 3. EL CIRCUITO ALTERNADOR Y LA EPIGENÉTICA BACTERIANA.....	 41
Antecedentes.....	41
Hipótesis.....	42
Metodología	42
Metodología del circuito alternador	45
Resultados.....	47
Discusión y Conclusiones	50
 CAPÍTULO 4. EL EFECTO TRANSITORIO DE ASRRNA: EL MODELO PREDADOR-PRESA Y EL MODELO DE COMPETENCIA	 51
Antecedentes.....	51
 CAPÍTULO5. BUSCANDO LA SINCRONIZACIÓN DEL CRECIMIENTO POBLACIONAL BACTERIANO MEDIANTE EL USO DE UN CIRCUITO SINTÉTICO.....	 54
Antecedentes.....	54
Hipótesis.....	55
Metodología y resultados	56
Circuito genético de Sincronización celular parte I	56
Circuito genético de Sincronización celular parte II	59

Discusión y conclusiones	62
CAPITULO 6. PERSPECTIVAS.....	63
GENERANDO NUEVOS PARADIGMAS DENTRO DE LA BIOLOGÍA SINTÉTICA.....	63
APLICADO AL ESTUDIO DE ESTRESOMAS BACTERIANOS.....	63
APÉNDICE1. MÉTODOS.....	73
APÉNDICE 2. TABLA DE OLIGOS	77
APÉNDICE 3. ARTICULO PUBLICADO EN LA REVISTA FEMS MICROBIOLOGY LETTERS, SELECCIONADO COMO EDITOR’S CHOICE.	81

Capítulo 1. La Biología Sintética y los sRNA

Antecedentes

Un sistema se define como un conjunto ordenado de elementos cuyas propiedades se interrelacionan e interactúan de forma armónica entre sí. El concepto de sistema tiene dos usos muy diferenciados que se refieren respectivamente a los sistemas conceptualmente ideados (sistemas ideales) y a los sistemas construidos con objetos reales (sistemas reales). Ambos sistemas establecen un ciclo de retroalimentación, pues un sistema conceptualmente ideado puede pasar a ser posteriormente construido en la realidad y a partir de los resultados de este sistema real, construir nuevos sistemas ideales; esto se aplica en estudios de Biología Sintética y en esta tesis presentamos nuevos sistemas de regulación artificial basados en partes de sistemas naturales. Se presentan nuevos elementos de Ingeniería genética cuyo uso puede regular la expresión génica de manera post-transcripcional. La base fue la descripción de un sistema real para generar sistemas conceptuales, expresados en el capítulo 1. Los capítulos sucesivos son la aplicación de los sistemas conceptuales generando sistemas novedosos de regulación post-transcripcional con diferentes aplicaciones de frontera en la ciencia.

La Biología sintética, de lo natural a lo artificial

El uso de las diferentes herramientas de Ingeniería genética para generar funciones celulares nuevas e inexistentes en la naturaleza es lo que define a la **Biología Sintética**. Los planos para generar estos nuevos sistemas biológicos se llaman modelos y muchos laboratorios abordan el problema en función de expresiones booleanas. En matemáticas, una función booleana está conformada por los valores binarios 0 ó 1 ("falso" o "verdadero") y se expresan en tablas de verdad o de manera gráfica. Uno de los objetivos de la Biología Sintética es el generar elementos biológicos combinables como promotores inducibles, secuencias Shine-Dalgarno (SD) optimas, proteínas reporteras de la expresión genética, etc., se visualizan como ladrillos de una construcción para formar edificios o sistemas; a estos elementos se le llama **Biobricks** o partes de DNA que se forman de la abstracción para generar módulos y la combinación de estos módulos formará nuevos sistemas biológicos.

La diferencia entre la Ingeniería Genética y la Biología Sintética, es que la primera no requería de generar conocimiento o herramientas para crear sistemas biológicos que reflejen la diversidad y la profundidad de conductas reguladoras que se encuentran en los organismos. Jacob y Monod con sus estudios y visión acerca de la programación de la expresión genética y el control específico en el operón Lac comienzan con los estudios de tipo Biología Sintética. Posteriormente, en los años 70's y 80's las técnicas de Ingeniería genética como clonación de elementos específicos de DNA generados a partir de la DNA polimerización in vitro (PCR), hacen posible la modificación programada de organismos mediante recombinación homóloga o clonación, comenzando el movimiento de partes Biológicas de un sistema a otro y su caracterización con la genética artificial en la era pre-genómica. En los años 90's comienza la época del Big-data con técnicas de secuenciación masiva aumentando el

conocimiento en la diversidad de elementos genéticos con los que se basaron para construir nuevos circuitos biológicos ¹.

Una de las observaciones más importantes que hacen los biólogos es el definir qué cambios en el medio circundante hacen que la célula responda a estímulos específicos y la activación de los sistemas de respuesta, los cuales sirven para contender con el estímulo específico. Esta respuesta involucra comúnmente cambios en los patrones transcripcionales que tienen como consecuencia la reorganización del flujo molecular de una ruta metabólica involucrada en la respuesta. En Biología Sintética, entre otras cosas, se utiliza la programación de la expresión genética, así como re-arreglos en los elementos involucrados en un fenotipo para integrarlos a nuevos circuitos. Dentro de los elementos de regulación con los que comúnmente cuentan los sistemas desarrollados en Biología Sintética son:

- 1) Factores transcripcionales que pueden actuar como represores (LacI, TetR, cI, LuxR, etc.,) o activadores (Ara) que responden a moléculas efectoras (IPTG, anhidro-tetraciclina, arabinosa, N-Acil homoserina lactona, etc.,) o estímulos físico-ambientales (calor, luz, etc.,).
- 2) RNA polimerasas, homóloga o heterólogas (T7 y T3 RNAPol).
- 3) Genes reporteros (*lacZ*, GFP, etc.).
- 4) RNA pequeños que actúan como riboreguladores (riboswitches sintéticos, aptazimas, etc).

Un ejemplo del uso de la información biológica integrada a circuitos de regulación genética para generar nuevos fenotipos es el que se presenta a continuación. Voight y colaboradores fusionaron un fotoreceptor de luz roja con el sistema de dos componentes EnvZ-OmpR en *Escherichia coli*. Cabe resaltar que en este organismo carece de estos fotoreceptores. Cuando en el cultivo celular se emite un estímulo lumínico rojo, el fotoreceptor lo detecta y hace que se active el dominio de cinasa de EnvZ, fosforila a OmpR y se activa la transcripción del promotor *ompC* el cual está fusionado transcripcionalmente con el ORF (por sus siglas en inglés de open reading frame o marco de lectura) de *lacZ*. Lo que este grupo de investigación reportó fue una serie de imágenes en un cultivo celular que se generaban por la actividad de la β -galactosidasa solo en las regiones donde existió el estímulo de luz ⁶. Pareciera que un juego de laboratorio quedaría ahí, pero nunca se sabe quien lo entenderá y generará nuevas aplicaciones. Hoy en día estos sensores acoplados a sistemas de transducción de señales están tanto en procariontes como en eucariontes (incluyendo el sistema nervioso) y es el campo emergente llamado optogenética⁷.

Actualmente las bacterias presentan diferentes estrategias de regulación transcripcional y post-transcripcional asociadas a diferentes tipos de estrés. Por ello se puede aprender de los elementos de respuesta que presentan las bacterias para generar nuevas aplicaciones, ya que el estrés genera una presión de selección en donde aquellas bacterias que desarrollaron mecanismos para contender con el cambio del medio y generaron una respuesta, lograron sobrevivir. En adelante abordaremos una estrategia para contender con diferentes tipos de estrés de manera post-transcripcional basada en un RNA regulatorio antisentido o small RNA (sRNA) y la proteína chaperona de RNA Hfq acoplada a estos sRNA.

Los sRNA y la proteína Hfq como reguladores de la expresión génica y de interacciones cuaternarias

El reconocimiento entre un RNA mensajero (mRNA) y la maquinaria de traducción en procariontes generalmente inicia con la unión de la secuencia Shine-Dalgarno con la secuencia antiSD de la subunidad ribosomal 16S (Fig.1). Las interacciones entre moléculas de RNA mediante el apareamiento de sus bases nucleotídicas es una manera por la cual un RNA puede regularla traducción de un mRNA. En bacterias se ha descrito la existencia de RNAs pequeños, o sRNAs, los cuales interactúan específicamente con la región del SD de sus mRNAs blanco, impidiendo el reconocimiento de los ribosomas a esta región y en consecuencia, inhibiendo el inicio de la traducción. Estos sRNAs pueden estar acoplados a proteínas chaperonas que aumenten la posibilidad de interacción entre el mRNA y el sRNA.

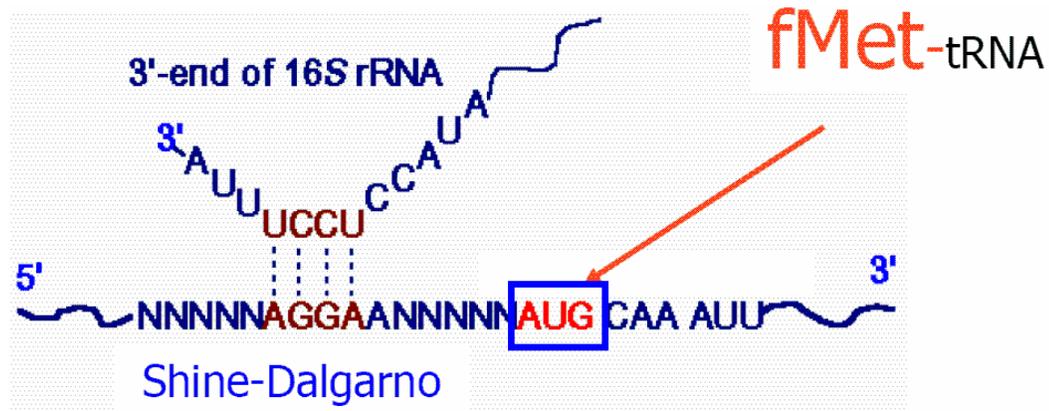


Fig. 1. Inicio de la traducción en procariontes. La secuencia SD del mRNA hibrida con la secuencia anti-SD de la subunidad ribosomal 16S para que comience el proceso de traducción. Moras, 2008, comunicación personal.

Los sRNAs se caracterizan por medir menos de 300 bases, poseer promotores específicos y ubicarse en regiones conservadas acotadas por terminadores transcripcionales Rho-independientes. Su síntesis responde a una condición celular específica relacionada con la función de los genes blanco a los que regulará⁴. Estos sRNA forman estructuras cuaternarias con la proteína Hfq (Fig. 2). Los sRNA en un contexto celular forman parte de los mecanismos de resiliencia de las bacterias, son de pronta respuesta y modifican las redes metabólicas y de regulación asociadas a su expresión.

La proteína Hfq se ha identificado como un elemento de regulación global post-transcripcional. Se sabe que actúa como una chaperona funcional de RNA, facilitando las interacciones sRNA-mRNA⁸. La unión de Hfq al complejo sRNA-mRNA puede tener un efecto regulador positivo comúnmente interfiriendo con la formación de un atenuador traduccional o bloqueando los sitios de unión del degradosoma, o un efecto represor, mediante su unión directa con el SD o mediante su unión al mRNA,

señalizándolo para su degradación por el degradosoma ⁸⁹. En la Figura 2 se muestran algunos ejemplos de sRNA cuya actividad reguladoras se ha descrito depende de Hfq.

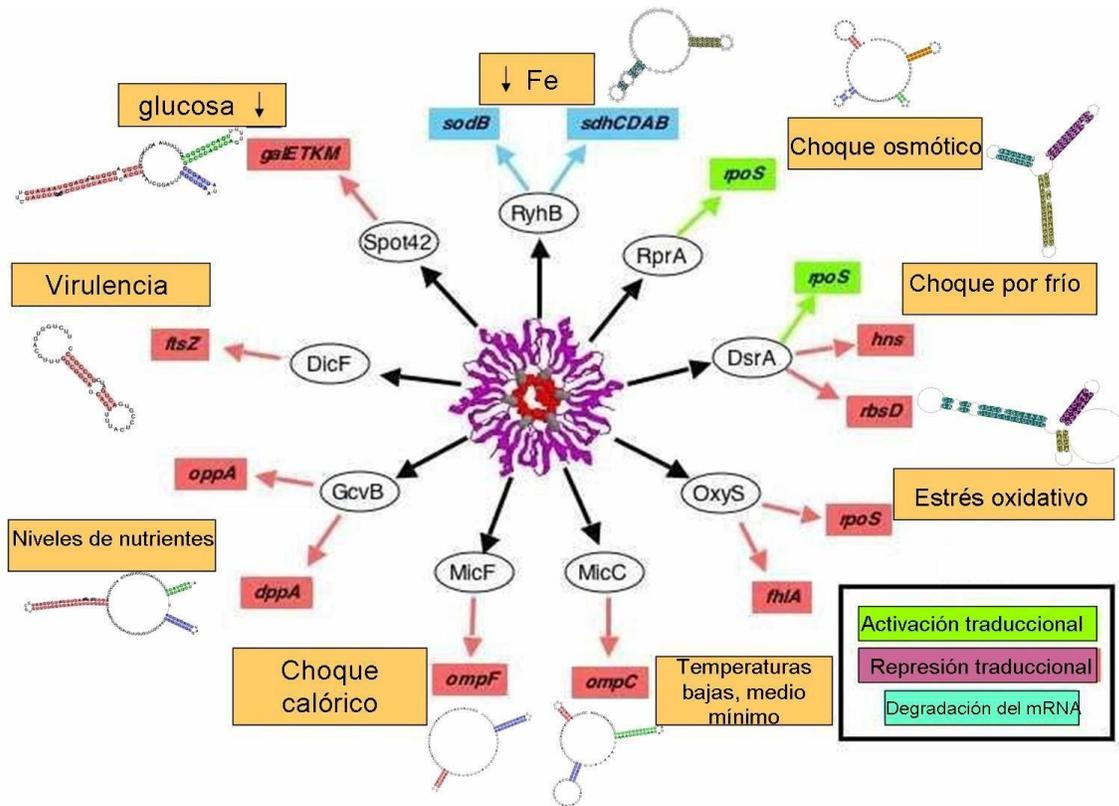


Fig. 2. Resumen de algunos modelos en los que se presenta la interacción sRNA-Hfq. Al centro se presenta la proteína chaperona de RNA Hfq, la cual puede interactuar con diferentes sRNA, los cuales se transcriben de manera estímulo específico y posteriormente pueden hibridar con mRNA específicos y regular al traducción del gen, para que en consecuencia, la célula responda al estímulo. Figura modificada de Gottesman *et al.*, 2006.

Hfq es una proteína con la capacidad de unirse al DNA¹⁰, está presente en eubacterias, se descubrió en 1968 por Fernández *et al.*, y se identifica como un factor accesorio para la replicación del fago Q β ¹¹. La inactivación de Hfq en *Escherichia coli* resulta en efectos pleiotropicos relacionados con la activación o inactivación apropiada de distintas respuestas a estrés¹²¹³. Sin embargo, en *Staphilococcus aureus* su ausencia no presenta fenotipos con efectos pleiotropicos.

La estructura tridimensional de Hfq consisten en un plegamiento del tipo Sm que se presenta en las proteínas chaperonas de RNA, forma un anillo homohexamérico a diferencia de los demás miembros de las familias de proteínas SM y LSM las cuales forman un anillo heteroheptamérico¹⁴. Interacciona con distintas proteínas como la RNasaE¹⁵, la proteína ribosomal S1¹⁶, PAPI ¹⁷, entre otras (Fig. 3).

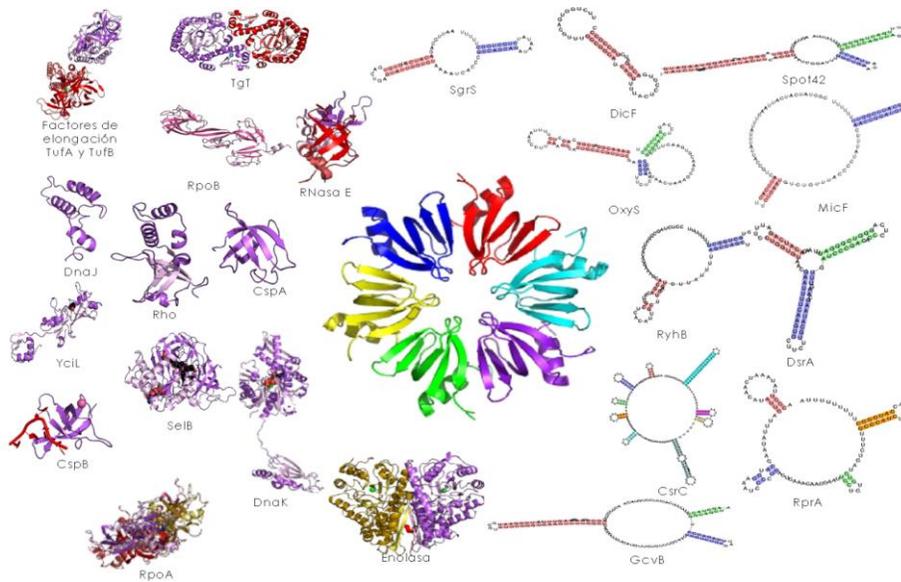


Fig. 3. Hfq interactúa no solo con sRNA, también con proteínas. Datos obtenidos de la base de datos string y Rfam.

Existen dos modelos de interacción entre los sRNA y la Hfq los cuales no son mutuamente excluyentes. 1) *Desestructurando el RNA*, aumentando las posibilidades de apareamientos entre el mRNA y el sRNA, 2) *Incrementando la concentración local del RNA*, aumentando así las probabilidades de encuentro entre el mRNA y el sRNA¹⁸.

Actualmente se conocen 138 sRNA descritos en bacteria, de los cuales se han caracterizado menos del 20%¹⁹. Esto se debe a que sólo un sRNA puede regular a más de un mRNA. Por ejemplo, en *E. coli*, OxyS regula específicamente los mRNA de *fhIA*, *gadB*, *dpS*, *mdtF*, *yhiM*, *uhpT* y *pqqL*; RyhB regula a los mRNA de *acnA*, *fuma*, *ftnA*, *bfr*, *sdhB*, *sdhD* y *sodB* (información tomada de sRNAmapper). Al parecer la presencia de los sRNA no es constitutiva, es situación específica y depende del promotor que los regula.

Las técnicas experimentales que se han utilizado para encontrar nuevos sRNA son mediante estudios genómicos de sobre-expresión de sRNA, ya que se sabe que generalmente se encuentran en regiones intergénicas de no más de 250 pb, se diseñan microarreglos con estas regiones intergénicas y con el extracto de RNA total de una condición específica se hibrida con el microarreglo y mediante análisis estadísticos de sobre-expresión se determina si existe en esa condición algún sRNA²⁰. Dentro de los experimentos de búsqueda de nuevos sRNA también se encuentran las aproximaciones de RNómica (cDNA menor a 250pb clonado y secuenciado por Sanger o secuenciación masiva) y CHIP-seq con Hfq²⁰.

Uno de los retos más importantes a resolver dada su complejidad, es el encontrar todos los blancos de los sRNA y todas las condiciones en las que están involucrados. Para la mayoría de los sRNAs, solamente se sabe la condición en la cual fue identificado el sRNA, dejando de lado otros posibles blancos de su regulación. En los últimos años se han desarrollado muchos algoritmos computacionales para la

predicción de blancos de sRNAs²¹ y para corroborar dichas predicciones se ha caracterizado el efecto de la expresión del sRNA sobre las fusiones transcripcionales del gen candidato con genes reporteros, como el gen que codifica para la proteína β -galactosidasa (*lacZ*) o la proteína verde fluorescente (GFP)²⁰.

En 1983 se describen los sRNA MicC y MicF cuya acción regula la expresión de las porinas OmpC y OmpF y a estos RNA regulatorios les llamaron micRNA; el siguiente año Coleman y colaboradores, basados en estos micRNAs sintetizan los primeros RNA regulatorios sintéticos y los llamaron de la misma manera de los naturales²². Los micRNAs sintéticos fueron construidos a partir de técnicas de ingeniería genética, básicamente amplificación por PCR del micRNA natural, uso de enzimas de restricción (*XbaI* en este caso) y clonación. El mRNA blanco que estudiaron fue el del gen *lpp*, que codifica para una lipoproteína de membrana; obtuvieron la secuencia antisentido que incluía la región no codificante (excepto la región del promotor) y parte de la región codificante, 112 nt en total. Este fragmento de DNA estaba flanqueado por el sitio de restricción *XbaI*, en un plásmido que contenía a *micF* cuyo gen contiene el sitio de *XbaI*; entre dos loops, insertaron de manera antisentido los 112nt de *lpp*, formando el gen *mic(lpp)* o el nuevo micRNA sintético codificado en el plásmido pJDC412²². Los resultados fueron bastante prometedores, en cultivos de *E. coli/pJDC412* donde se adicionó el inductor IPTG, se reportó que al extraer las proteínas de membrana de cultivos en los que se expresó *mic(lpp)*, la reducción de la lipoproteína blanco era drástica, aunque no total. El que no se haya abatido totalmente la expresión, puede deberse a que no tomaron en cuenta el mantenimiento de la estructura secundaria del micRNA molde.

Justificación

A pesar de que se ha descrito el diseño y utilización de RNA antisentido artificial (micRNA) para modular la expresión génica en organismos procariontes, la mayoría de ellos no mantiene de manera estricta la estructura secundaria de los sRNA naturales. En el presente proyecto consideramos la posibilidad de incrementar la eficiencia de nuevos sistemas de regulación artificial al considerar las interacciones potenciales del sRNA con sus respectivos RNA blanco.

Hipótesis:

- 1) Con base en la estructura de sRNA que intervienen de manera natural en la regulación genética en organismos bacterianos en respuesta a diversos tipos de estrés, es posible diseñar RNAs artificiales, pequeños y reguladores (asrRNA) para inhibirla traducción de cualquier mRNA blanco.
- 2) En Biología Sintética es posible desarrollar nuevos circuitos de regulación altamente eficientes con base en asrRNA

Objetivo General:

Desarrollar sistemas de regulación de la expresión genética transitoria en la bacteria *E. coli* con base en los asrRNA.

Objetivos particulares:

- 1) Caracterizar, mediante el análisis comparativo de los sistemas regulados por sRNA descritos en la literatura, las propiedades de estructura primaria y secundaria de los sRNAs y sus correspondientes mRNAs blanco.

- 2) Con base en las características anteriormente obtenidas, modelar un asrRNA cuyo RNA blanco pueda ser seleccionado con objetivos específicos. Nuestro modelo inicial de estudio es el mRNA de *lacZ* de *E. coli* debido a que la actividad de la β -Galactosidasa es colorimétricamente cuantificable.

- 3) Desarrollar un sistema de regulación transcripcional del asrRNA que pueda ser fácilmente controlado. Dicho sistema regulará la expresión transitoria del asrRNA de manera condición específica.

- 4) Evaluar la eficiencia del sistema de regulación propuesto en el organismo modelo *Escherichia coli*.

- 5) Generar diferentes aplicaciones de los asrRNA.

Metodología

Modelado y síntesis de asrRNA_{lacZ}

La unión del sRNA con el mensajero puede tener como consecuencia la represión traduccional o la activación de ésta. Si un sRNA hibrida con los nucleótidos que conforman la secuencia SD, se enmascara esta región y no permite la unión del mRNA con la subunidad ribosomal 16S. Si el sRNA hibrida con represores presentes *in cis* en la región líder del mRNA, como consecuencia libera la región del SD permitiendo el proceso de traducción. También existen sRNAs como RyhB cuya función reguladora esta acoplada al complejo de Hfq-RNasa E, cuando este sRNA se une con el mRNA, el mRNA rápidamente se degrada⁹. Basados en esta información proponemos un **modelo mimético**, que asemeje a sRNAs naturales, y otro **catalítico**, cuya acción corte al mRNA y genere su degradación. Finalmente para probar nuestra hipótesis nula que es que el mimetismo basado en sRNA no se requiere para generar asrRNAs eficientes, generamos el asrRNA **plano o control** que solamente posee la secuencia antisentido del mRNA blanco y un terminador transcripcional.

Los sRNA en su estructura secundaria presentan tallos y asas de interacción con el mRNA y con la chaperona de RNA bacteriana Hfq. En el extremo 3' de sus transcritos, los sRNAs cuentan con terminadores transcripcionales que determinan la longitud del transcrito. Una notable excepción es el sRNA DicF, cuya longitud es definida por su procesamiento mediante la ribonucleasa²³

Para conocer más acerca de los sRNA proponemos la siguiente obtención de datos:

1.- Análisis de la estructura secundaria de sRNAs conocidos. Se analizó las familias estructurales de los sRNA anotados en la base de datos Rfam²⁴, buscando entender cuáles son las características en común a través de la estructura secundaria que resulta de la utilización del programa INFERNAL, el cual obtiene una estructura secundaria consenso, para que así se generalicen las características incluyentes en el sistema sRNA-Hfq.

2.- Análisis del contexto genómico del sRNAs y sus correspondientes mRNA blancos. Se analizó mediante el programa GeCont²⁵ el contexto genómico de los sRNA y de los blancos de éstos. Se ha reportado la conservación en la sintenia de los sRNA, pero no se ha analizado el contexto genómico de los blancos ni la conservación del sitio de apareamiento sRNA-mRNA blanco. Para identificarlos posibles sitios de unión de los diferentes sRNAs se analizaron aquellos genomas bacterianos que presentaban el sRNA particular, cabe mencionar que los genomas de referencia son variables, debido a que los sistemas de regulación por sRNA no se presentan de manera constante entre los diferentes genomas, su conservación depende de la historia de cada sRNA.

Posteriormente se utilizó el programa MEME para la búsqueda de secuencia de motivos conservados²⁶.

3.- En base a las características obtenidas se realizaron los modelos de asrRNA mediante el programa de plegamiento de estructuras secundarias Kinefold ²⁷. Una característica especial de este programa es que proporciona al usuario una ruta de plegamiento con la mejor entropía y otros modelos los cuales son menos favorecidos entrópicamente y la posible cinética de plegamiento del RNA *in vivo*.

4.- Al modelo basado en el sRNA o modelo mimético se le adicionó a la estructura secundaria un núcleo catalítico y en adelante lo llamaremos asrRNA catalítico.

5.- Se diseñó un RNA antisentido control, debido a que la hipótesis nula de nuestro trabajo es que no se requiere un plegamiento o estructura secundaria mimética necesaria para que la regulación de los asrRNA sea eficiente. En adelante lo mencionaremos como asrRNA plano.

6.- Se evaluó la actividad reguladora de los diferentes asrRNAs (mimético, catalítico y control o plano) en el organismo modelo *E.coli*.

Resultados

Resultados del modelado de los asrRNA mimético, catalítico y plano.

Análisis de las secuencias secundarias de los sRNA de la base de datos Pfam y en la literatura

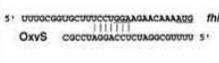
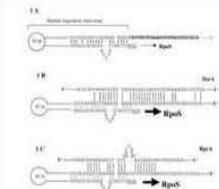
Se analizaron las diferentes familias de sRNA, para el análisis de las estructuras secundarias se utilizaron las familias MicC, MicF, DicF, SgrS, DsrA, OxyS y RyhB ya que estas presentan en conjunto las interacciones que se conocen pueden realizar los sRNA (Fig. 4).

Después de haber analizado las estructuras secundarias se encontró que los sRNA presentan un loop central el cual se encuentra abierto y marca el inicio y término del RNA. Este loop se caracteriza por la presencia de extensiones de adeninas, sin embargo, no encontramos un consenso para el sitio de unión reportado del sRNA y Hfq. Posteriormente se situaron los sitios de interacción con el mensajero en los sRNA y se observó que predominantemente se localizan en los loops del extremo 5' (Fig. 4).

Analizamos el contexto genómico y solamente en *oxyS* y *micC* encontramos la conservación de la sintenia en las diferentes genomas de las bacterias que presentan los sRNA. Se encontraron en la búsqueda de motivos en los genes blanco para el caso del gen *rpoS* en la región intergénica los dos motivos distintos para los sRNAs OxyS y DsrA, lo que implica que los sitios de regulación por sRNAs están conservados a través

de distintos grupos filogenéticos. Los genomas bacterianos analizados varían dependiendo de la presencia del sRNA, ya que la presencia de cada familia de sRNA es variable a través de la filogenia.

Documentación del tipo de interacciones que realizan los diferentes sRNA

sRNA	Blanco	Zona de interacción	Tipo de regulación	Condición experimental descrita	Ref.
RyhB	<i>sodB</i>		Degrada al mensajero	Bajas [Fe ⁺⁺]	Gottesman, et al, 2001
OxyS	<i>fliA</i>		Bloquea la traducción	Ausencia de molybdate, relacionado con la inducción de la hidrogen lyasa	Altuvia et al, 1997
OxyS RprA DsrA	<i>rpoS</i>		Activación traduccional	Estrés oxidativo. Choque osmótico. Fase Log a bajas temperaturas	Sletjeski DD, 1996 Majdalani N, et al., 2002 Zhang A, et al., 1998
DicF	<i>fliZ</i>		Bloquea la traducción	Regulación del ciclo celular	Tetart F, 1992

Estructuras secundarias de los sRNA obtenidas de la base de datos Rfam

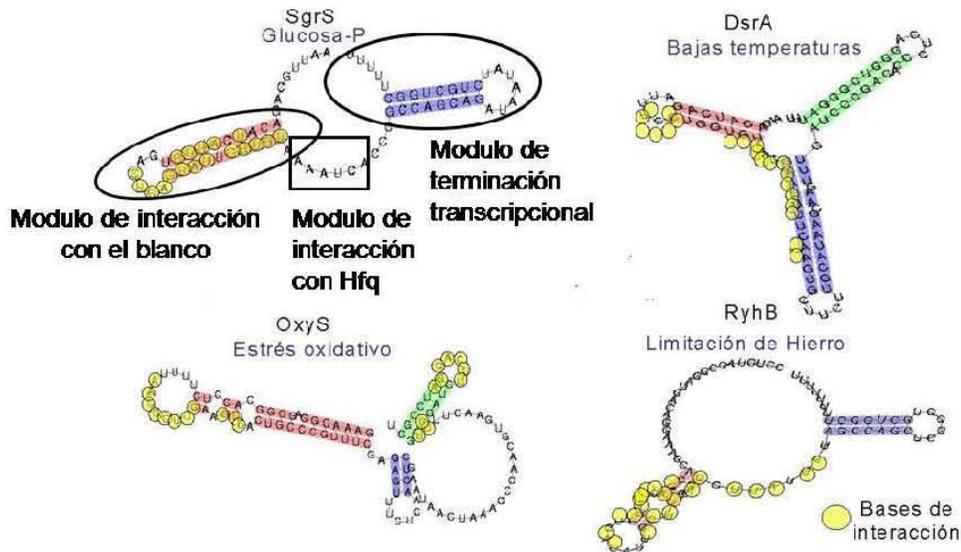


Figura4. Análisis estructural, de interacción y de conservación de los sRNA más estudiados.

Modelos de tres diferentes *asrRNA_{lacZ}*

Para realizar los modelos utilizamos como molde a los sRNAs OxyS, RyhB, SgrS, DicF, MicF y DsrA. Lo que planteamos en estos primeros intentos es mantener la estructura secundaria de los sRNAs naturales en los artificiales mediante un reemplazo de la secuencia de interacción natural con la del nuevo RNA blanco *lacZ*, tal y como se muestra en la Figura 5. Se encontró que el mantenimiento de estructuras en equilibrio en los diferentes *asrRNAs* no es tan simple como se esperaba ya que las mutaciones introducidas modificaban la estructura secundaria. Se modelaron distintos sRNAs, pero sólo se pudo equilibrar el modelo basado en el RNA pequeño SgrS(Fig.5).

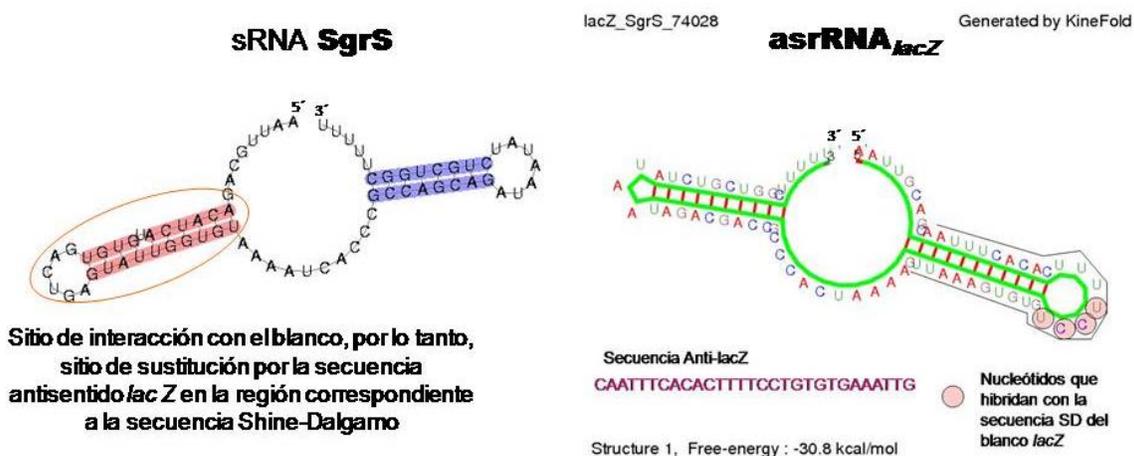
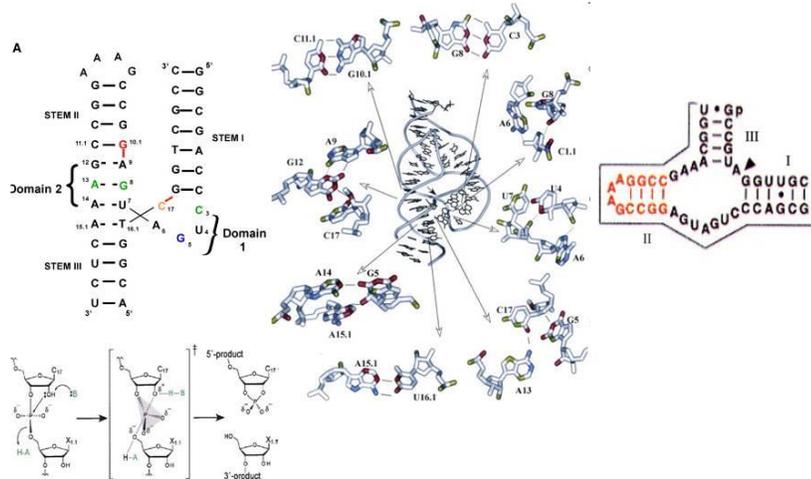


Fig. 5. Modelado del *asrRNA_{lacZ}*. Se presenta la estructura secundaria del sRNA SgrS, el cual en la hélice de interacción con el mRNA blanco fue sustituida la hélice de interacción por una nueva, ahora por la secuencia antisentido de la región intergénica de *lacZ*, resultando de este proceso el *asrRNA_{lacZ}*.

Posteriormente se diseñó un nuevo *asrRNA*, el cual estaba basado en el *asrRNA_{lacZ}* mimético surgido del molde de Sgrs, pero en este caso, el modelo incluyó en la zona de interacción un núcleo catalítico inactivo proveniente de la ribozima Hammerhead (Fig. 6). Las ribozimas cabeza de martillo o "hammerhead" son pequeños motivos de RNA catalíticos encontrados en virus de RNA en plantas, RNA satélite, viroides, y DNA satélite repetidos. Están compuestos de 250-450 nucleótidos en una sola cadena de RNA circular con un alto contenido de estructuras secundarias y sin ninguna capacidad de codificar alguna proteína. La estructura de hammerhead es la ribozima más ampliamente distribuida en virus de plantas. Estas ribozimas catalizan el corte y la ligación del RNA durante el ciclo replicativo. Están bien caracterizados los motivos catalíticos mínimos consistentes en tres hélices unidas, 11 nucleótidos conservados en el núcleo, el cual corta en un enlace fosfodiéster específico en una

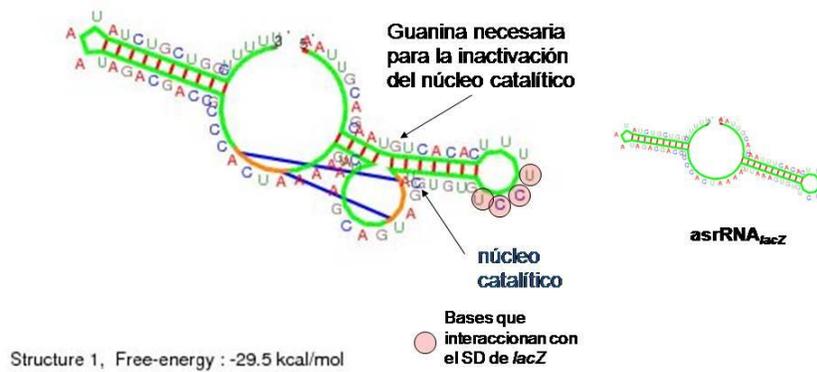
reacción Magnesio dependiente²⁸ (Fig. 6). Cuando el asrRNA se une con el mRNA blanco se reconstituirá la actividad de corte sobre el mRNA blanco (Fig. 6).

La ribozima Hammerhead y su reducción



Jennifer A. Nelson and Olke C. Uhlenbeck, 2006 y 2008

Modelo del asrRNA_{lacZ}-catalítico utilizando como molde a asrRNA_{lacZ}



Secuencia primaria

5' AATTGCAGCAATGTCACACTTTTCCTGTGTGA CUGAUGACGAACATTGAAAAT
CACCCGCCAGCAGATAATATCTGCTGGCTTTTT 3'

Fig. 6. La ribozima hammerhead y el modelado del asrRNA catalítico. La ribozima hammerhead presenta un núcleo catalítico radiado de 3 hélices de secuencia variable, lo constante es el tetrámero CUGA en el dominio y una adenina, citosina o timina en el dominio 2, cuando hay una guanina el núcleo catalítico es inactivo. Al molde del asrRNA_{lacZ} se le adicionó un núcleo catalítico mínimo en la hélice de interacción con el mRNA.

Técnica de clonación para *asrRNA*

Los genes de los diferentes *asrRNA_{lacZ}* modelados se sintetizaron mediante oligonucleótidos. La clonación de estos genes en el vector de expresión fue realizada mediante una metodología que no depende de enzimas de restricción, ya que la adición de los sitios de restricción cercanos al inicio de transcripción pudiera generar estructuras secundarias no deseadas en el RNA (Fig. 7).

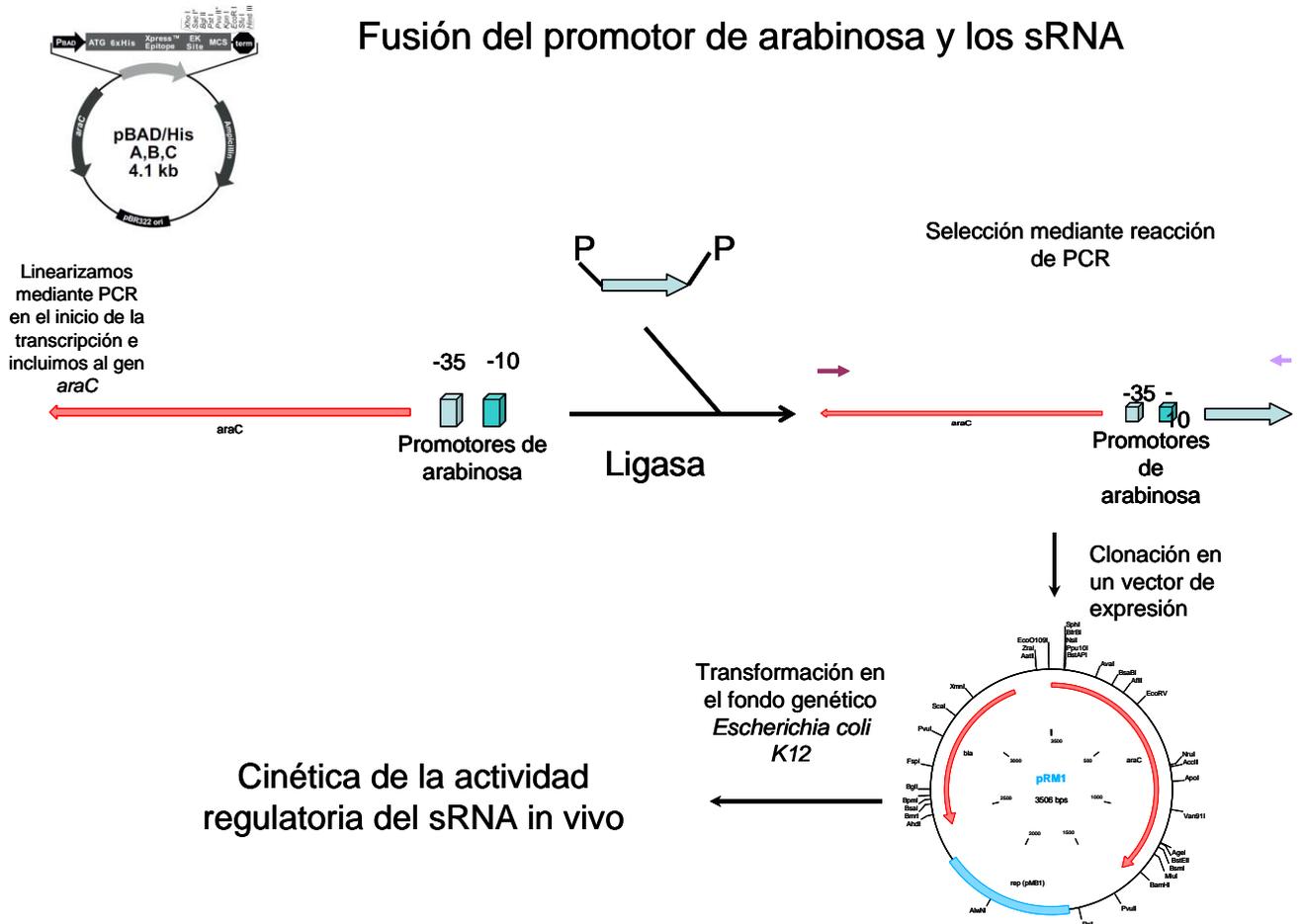


Figura 7. Estrategia de clonación para sRNAs regulados por el promotor de arabinosa.

Para este estudio se requieren características muy específicas, la primer restricción es que el extremo 5' del gen del *asrRNA* debe presentarse en el inicio +1 de la transcripción proveniente de un promotor regulable y que en el contexto no esté presente otro promotor que genere transcripción. Es por ello que seleccionamos el

vector pUC19, lo usamos como templado para un PCR inverso con oligonucleótidos que excluyen el promotor Lac y la región β del gen *lacZ*. Por otra parte, para fusionar el *asrRNA* con el promotor regulado por AraC primero amplificamos mediante PCR el DNA del gen *araC* y el promotor Ara, utilizando oligonucleótidos específicos definimos la región que necesitamos, esto es, que incluyera todo el promotor y finalice en la posición -1 donde inicia la polimerización la RNA polimerasa (previendo que en el contexto celular no se adicione nucleótidos que puedan afectar la estructura del *asrRNA*). Para sintetizar los genes de los diferentes modelos de los *asrRNA*, mediante oligonucleótidos de la cadena sentido y antisentido de cada gen, se hibridaron la pareja de oligonucleótidos correspondiente con un gradiente de temperatura que iba de 94°C, reduciendo .5°C cada 2 min hasta llegar a una temperatura de 50°C.

Estos genes, ya en doble cadena, se debían unir in vitro con el DNA de *araC::P_{ara}*, para realizar esta unión, se procedió a adicionar grupos fosfato en los extremos de nuestros diferentes genes mediante la enzima T4 polinucleotido quinasa, para posteriormente ser unidos los fragmentos de DNA de *araC::P_{ara}::asrRNA* con la enzima T4 ligasa. Consecutivamente al proceso de unión, se procedió a la selección de la dirección de cada construcción guiada por los oligos de *araC* 3' y el oligo reverse de cada *asrRNA*, con esto amplificamos mediante PCR la construcción diseñada. La construcción anterior se clonó en el vector generado a partir del pUC-sin *lacZ* mediante la fosforilación de ambos PCR y una reacción de ligación; y finalmente se transformó en el fondo genético *E. coli* K12MG1665 (Fig.7).

Construcción de la cepa *E. coli* K12 Δ Hfq.

Para demostrar que la actividad inhibitoria de nuestros *asrRNA* está acoplada a la actividad de la chaperona de RNA Hfq (ya que ésta regula a la mayoría de sRNA) se construyó una cepa *E. coli* K12 Δ Hfq.

Mediante el método de recombinación homóloga de Datsenko y Wanner²⁹ se eliminó el gen *hfq* y se reemplazó por el gen de resistencia a Kanamicina en el ORF de Hfq. Esta delección ha sido reportada previamente y se reporta que genera efectos pleiotrópicos³⁰, dos de ellos son: la presencia de células filamentosas y la alteraciones en la cinética de crecimiento. Por lo que se caracterizó la cepa mediante cinéticas de crecimiento (Fig. 8).

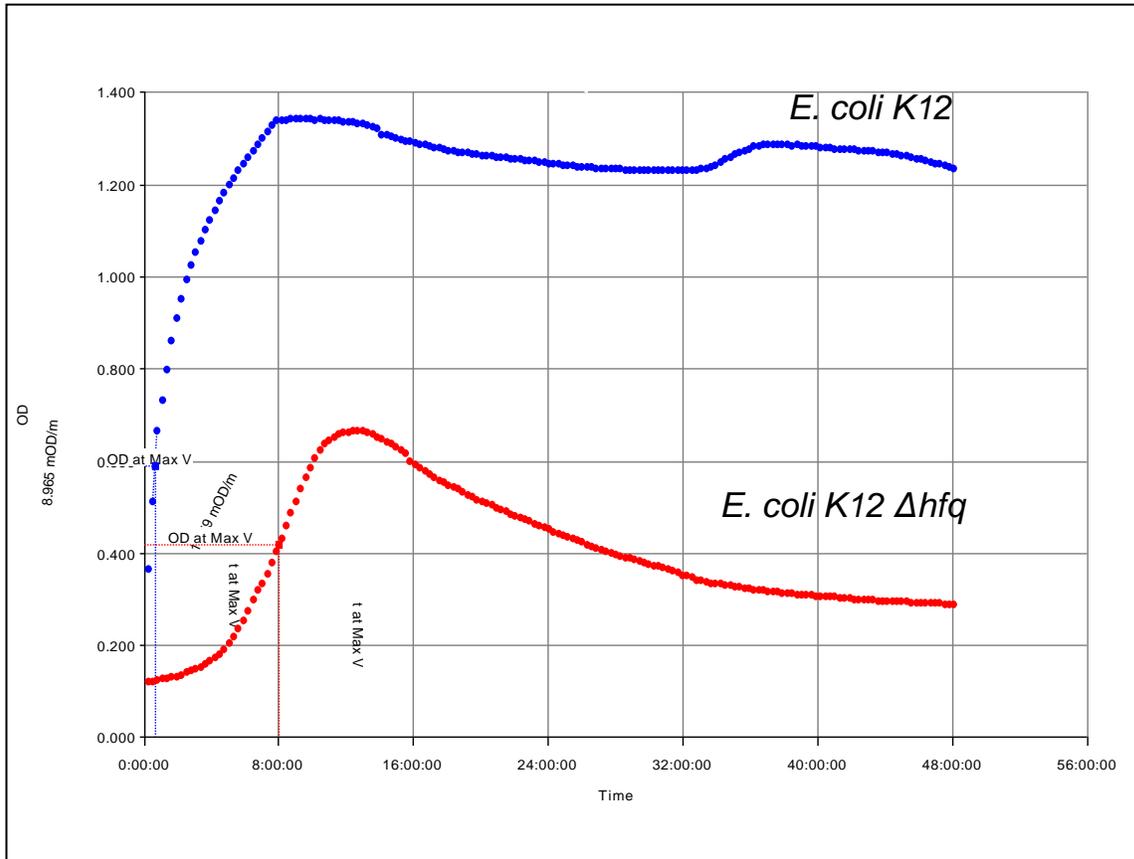


Figura 8. Cinéticas de crecimiento de *E. coli* K12 y *E. coli* K12 Δ hfq.

Cuantificación de la actividad del blanco de los asrRNA

Se cuantifico la actividad de la β -galactosidasa con las cepas que contenían los plásmidos con los diferentes asrRNA_{lacZ} (*E. coli* MG1665/pasrRNA_{lacZ}-plano, *E. coli* MG1665/pasrRNA_{lacZ} y *E. coli* K12 MG1665/pasrRNA_{lacZ}-catalítico) y *E. coli* K12 MG1665/pUC19 como control en medio RM. Se realizó por triplicado el experimento completo. Para estandarizar qué concentraciones del inductor son las ideales para este sistema, se realizaron pre-inóculos de cada cepa crecidos durante 12 horas, posteriormente estos preinóculos se diluyeron en 50 mL finales de medio RM estandarizándose a una misma OD₆₀₀ inicial de 0.02, se inocularon los medios de cultivo con diferentes concentraciones de L-arabinosa (0, 10mM y 50mM), se incubaron a 37°C a 200 rpm. Cuando las cepas en los diferentes medios de cultivo llegaron a una OD₆₀₀ 0.35 se realizó el protocolo de cuantificación de la actividad de la β -galactosidasa, al mismo tiempo se generó una curva estándar con la proteína pura para poder extrapolar los datos de absorbancia a unidades de β -galactosidasa. Los resultados se muestran en la figura 9, donde se observa que todos los asrRNAs son funcionales.

Para evaluar la dependencia de los diferentes $asrRNA_{lacZ}$ con la chaperona de RNA Hfq, se utilizaron las cepas mutantes en Hfq transformadas con los plásmidos que codifican para los diferentes modelos de los sRNA-lacZ (*E. coli* $\Delta hfq/pasrRNA_{lacZ}$ -plano, *E. coli* $\Delta hfq/pasrRNA_{lacZ}$ y *E. coli* $\Delta hfq/pasrRNA_{lacZ}$ -catalítico) y *E. coli* $\Delta hfq/pUC19$ como control; se realizó el mismo experimento anterior, solo con una concentraciones del inductor de L-arabinosa de [10mM/mL], los resultados se presentan en la Figura 9.

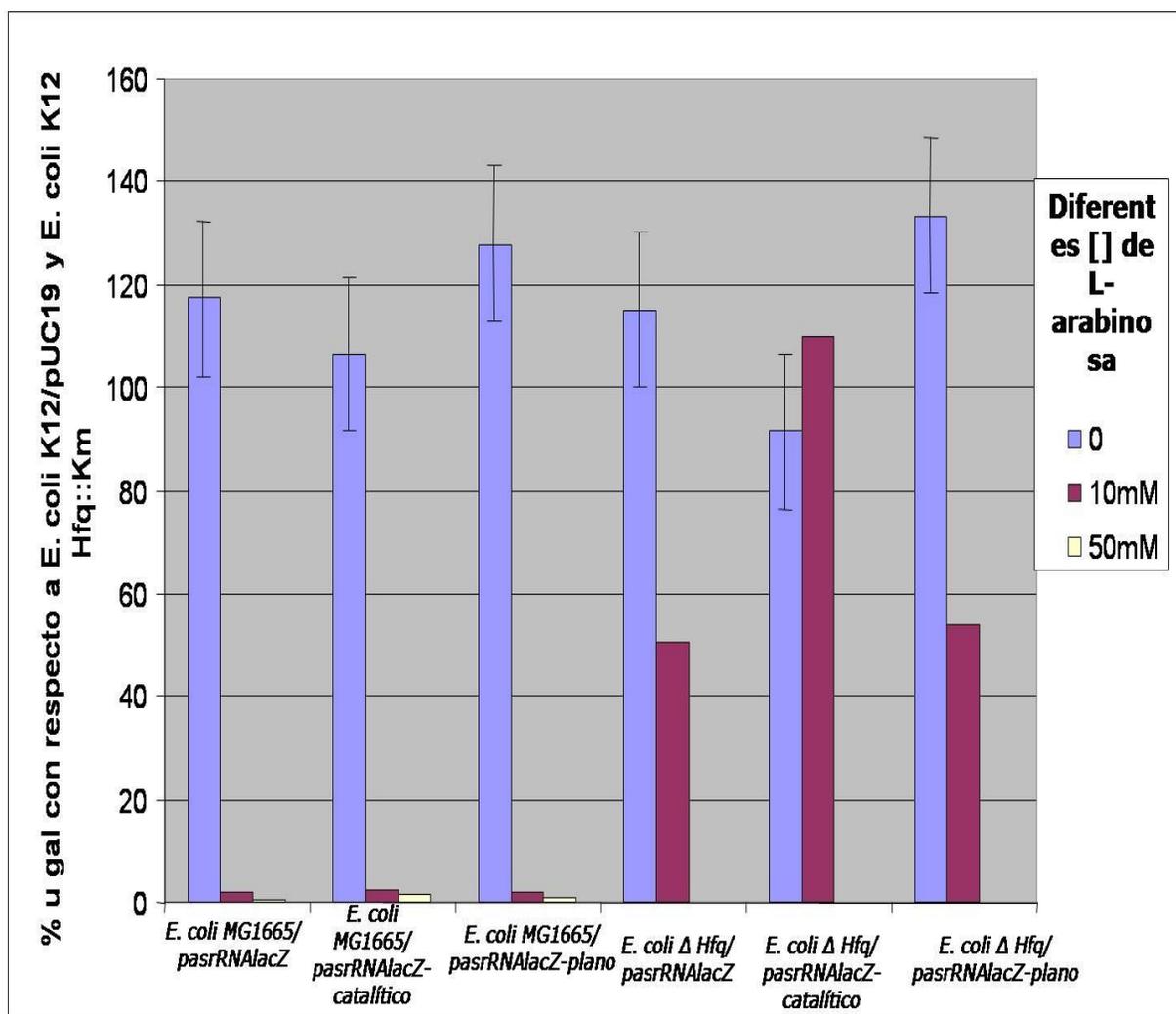


Figura 9. Evaluación de la actividad de regulación de los diferentes modelos de $asrRNA_{lacZ}$, porcentaje de inactivación de la β -galactosidasa con respecto al 100% de actividad de la cepa *E. coli* K12 MG1665/pUC19 y *E. coli* Δhfq .

Como se puede observar en la Fig. 9. los diferentes $arRNA_{lacZ}$ en medio RM llegan a abatir la expresión de la β -galactosidasa en más de un 95% comparada con el fondo de *E. coli* K12MG1665/pUC19. Por otra parte, en la mutante en Hfq se puede

observar la dependencia de los asrRNA hacia Hfq, ya que todos estos sólo llegan a abatir la expresión de la β -galactosidasa en un 50% máximo.

Discusión y Conclusiones

Los resultados aquí mostrados demuestran que los asrRNAs pueden ser modelados y regular a un blanco particular, sin embargo, a pesar de que nuestra hipótesis sustentaba que los asrRNA debían de mimetizar alguna estructura de sRNA natural, con el uso del asRNA_{lacZ-plano} observamos que no se requiere de este mimetismo para hacer diseños de knockdown de genes de interés, con la secuencia antisentido acotada por un terminador es suficiente. Los estudios bioinformáticos que realizamos para identificar una secuencia o estructura consenso que funcionara como módulo de interacción con Hfq revelaron que Hfq no reconoce un módulo específico, lo que observamos es que existe mucha diversidad estructural entre los sRNA, lo que nos indica que Hfq es una chaperona de RNA promiscua y que reconoce inespecíficamente a las moléculas de RNA.

La ventaja de utilizar el asrRNA_{lacZ-plano} es que al no ser parte de un molde de sRNA natural no incluye las interacciones con otros blancos no diseñados, lo que genera es una interacción específica con su correspondiente mRNA blanco a diferencia de los sRNA naturales que en su mayoría regulan a más de un blanco.

Cuando estábamos realizando este trabajo otros grupos en el extranjero también lo hacían y ellos obtuvieron resultados parecidos a los que presentamos³¹. Sin embargo, ellos hacen uso únicamente de los asrRNA miméticos ya que nunca utilizaron un control como el **asrRNA_{lacZ-plano}** y las ventajas que puede tener el uso de este.

En los siguientes capítulos se presentan diferentes asrRNA basados en el modelo plano, cuyos objetivos son el generar estrategias nuevas para diferentes estudios y aplicaciones.

Capítulo 2. “El circuito Kamikase”

Antecedentes

En esta era post-genómica el predecir un fenotipo basados en un genotipo es un tema aún limitado, ya que no conocemos en su totalidad todas las dinámicas moleculares de una bacteria o una célula eucarionte. Conociendo cada vez más los elementos que conforman a una célula, podemos intervenir en ella y adicionar nuevas partes al sistema. Es así como, una vez obtenido el sistema de regulación post-transcripcional mediante asrRNAs, sus aplicaciones dependen del estudio que se requiere, los cuales son asociaciones de cambios fenotípicos generados a partir de la regulación de la expresión de un gen en particular. Se puede explorar en nuevos ambientes o rectificar información ya obtenida. Generar nuevos fenotipos o comportamientos celulares enriquece nuestra información, por lo cual proponemos en este capítulo “el circuito *Kamikase*”.

Lo que pretendemos tener con el desarrollo del circuito *Kamikase* es contar con el primer circuito de regulación capaz de auto-eliminarse dentro de la población bacteriana y con dicho circuito, todos los elementos genéticos que adicionalmente se encuentren codificados en el mismo replicón extracromosomal. Nuestro circuito *Kamikase* fue diseñado y construido para ser activado mediante la adición de una señal al medio de cultivo que tiene como consecuencia la transcripción de un asrRNA que a su vez inhibe la traducción de proteínas, XerC, XerD, ArgR y PepA involucradas en la resolución de los plásmidos, tal y como se comenta a continuación³²⁻³⁴

Los plásmidos son elementos de DNA extracromosomal que se replica. Pueden presentarse en copias múltiples o en copias discretas; generalmente son indispensables para la célula en ambientes no xenofílicos, aunque existe una clase de plásmidos conocidos como “cromidos” los cuales pueden codificar para genes esenciales. Existe amplia evidencia experimental de que los plásmidos contribuyen de manera importante en el fenómeno de la transferencia horizontal de la información genética³⁵.

Con anterioridad, se han desarrollado diferentes metodologías para disminuir la presencia de los plásmidos dentro de una poblacional bacteriana, proceso al que se le conoce comúnmente como un proceso de curación. El término “curación” se refiere al incremento de células hijas que no presentan material extracromosomal presentes en células madre³⁶. Los compuestos empleados comúnmente para curar plásmidos en *E. coli* son agentes que se intercalan en el DNA, como el bromuro de etidio, la naranja de acridina, la acriflavina, clorpromosina, etc.³⁶. Dada su capacidad de intercalarse entre las bases del DNA, estos compuestos son mutagénicos generando efectos secundarios importantes e indeseables.

Muchos plásmidos se replican en multímeros, es decir, la DNA polimerasa sintetiza varias copias del plásmido en una sola cadena de DNA. Para que las diferentes copias se definan cada una como cadenas de DNA independiente, se requiere de un proceso conocido con el nombre de resolución. Este proceso requiere de

proteínas codificadas y sintetizadas a partir del genoma bacteriano. Los dímeros de los plásmidos ColE1 son convertidos a monómeros (lo cual maximiza el número de copias de plásmidos en las células) mediante un proceso de recombinación sitio específica, proceso que requiere un sitio llamado *cer* en el DNA del plásmido y 4 proteínas que están codificadas en el cromosoma de la bacteria: XerC, XerD, ArgR y PepA³²⁻³⁴.

Las proteínas de unión a DNA ArgR y PepA son esenciales para la resolución de los multímeros; se cree que estas proteínas son de ensamblaje para el complejo de recombinación con una geometría específica^{32,34}. DapF es una proteína cuya función se desconoce pero está relacionada con la función de PepA. XerC y XerD forman una recombinasa heterodimérica que es miembro de la familia de recombinasas λ , se unen al DNA reconociendo el sitio *cer* (CGGTGCGTACxxxxTTATGGTAAAT) el cual forma un palíndromo imperfecto³³, en cada sitio correspondiente a un futuro monómero se une el dímero y posteriormente se acerca el DNA correspondiente a dos monómeros para formarse un tetrámero de las recombinasas, el acercamiento de las cadenas de DNA se realiza mediante uniones de tipo Holliday, por lo que el DNA se rompe y después se une mediante el tetrámero de recombinasas generándose dos entidades plasmídicas (Fig. 10).

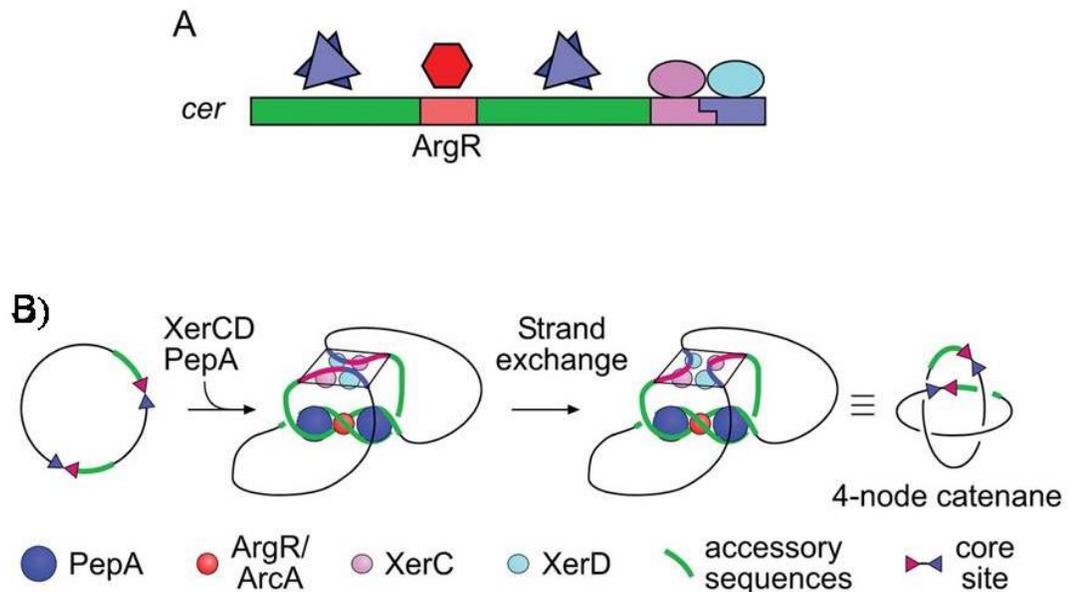


Fig. 10. Sistema de monomerización de plásmidos, el caso ColE1. A) Cada monómero de plásmido contiene la secuencia de reconocimiento y unión para ArgR, flanqueadas de sitios de unión para pepA y sitios para las proteínas de recombinación XerD y XerC. B) Cuando se reconoce mediante ArgR los sitios de unión del sistema de monomerización en dos dímeros, se une el complejo de proteínas de ArgR, pepA, XerC y XerD, las recombinasas forman un tetrámero, acercan el DNA de los dímeros en posiciones específicas formando uniones de tipo Holliday y resolviéndolas para formar entidades individuales plasmídicas o monómeros³².

Hipótesis

La inhibición de la traducción mediante asrRNA de alguno de los genes que forman el sistema de resolución de plásmidos favorecerá la formación de multímeros plasmídicos y como consecuencia una distribución asimétrica de los plásmidos en el proceso de división celular. Esta distribución asimétrica de los plásmidos favorecerá la ausencia de plásmidos en una parte de la población de las células hijas.

Metodología

Planteamiento del circuito Kamikase:

A) Estado inicial: El regulador transcripcional del asrRNA (*anti-xerD*, *anti-pepA*, *anti-argR* o *anti-dapF*) se mantiene unido al promotor.

B) Estado de transición o de inducción: Se adiciona al medio la molécula efectora para el represor transcripcional. Se comienza la síntesis del asrRNA y este comienza a hibridar con el mRNA blanco e inhibiendo su traducción. La inhibición traduccional del gen blanco tiene como consecuencia una reducción del número de copias del plásmido al inhibir el sistema de monomerización de plásmidos.

C) Estado Final: La falta de resolución de los plásmidos originan su distribución asimétrica dentro de la población bacteriana, reduciendo su presencia en las células hijas y curando a éstas del plásmido. A medida que hay un mayor número de divisiones celulares se espera que se incremente la pérdida del plásmido en la población; pudiendo llegar a perderse en la mayoría de las células, aunque es posible de que no todas ellas lo pierdan.

El sistema Kamikase

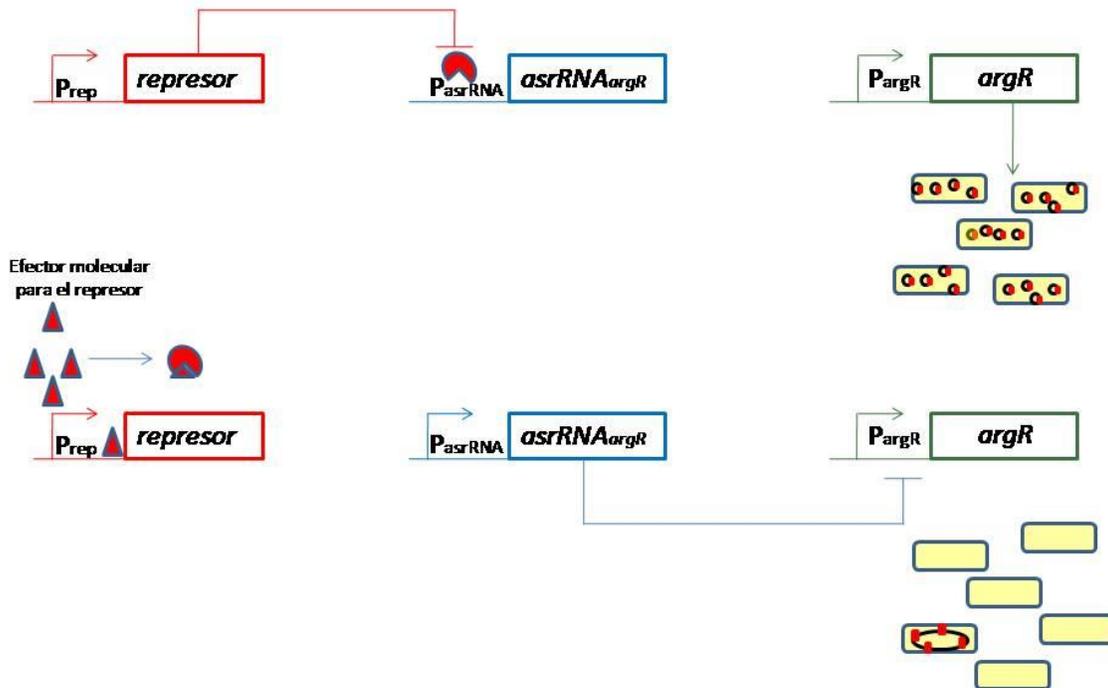


Fig. 11. El circuito Kamikase. El estado inicial de este circuito consta de un asrRNA cuyo blanco es algún elemento del sistema de monomerización de plásmidos y su expresión está inhibida por algún regulador inducible. El estado de encendido del sistema se da con la presencia en el medio del inductor, por lo que el asrRNA se expresa y comienza a regular el mRNA blanco. El estado final se presenta cuando el sistema de monomerización de plásmidos se encuentra abatido y la presencia de múltímeros de plásmidos es más común dentro de la población, resultando en una mayor proporción de células sin plásmidos.

Metodología experimental

Se sintetizaron cuatro asrRNAs para probar la hipótesis anterior: *anti-xerD*, *anti-pepA*, *anti-argR* y *anti-dapF*, los cuales estaban controlados mediante el sistema de regulación transcripcional Lac, Fig. 12. La metodología fue la siguiente:

1.- Se sintetizaron químicamente los oligonucleótidos que codifican para los 4 genes de los asrRNAs, tanto en la cadena de DNA que codifica para estos, como la cadena de DNA complementaria.

2.- Para hibridar ambos oligonucleótidos para cada gen de los asrRNAs se sometieron a un gradiente de temperatura que iba de 94°C a 70°C, cambiando la temperatura cada 30 segundos, en concentraciones equimolares de 60 fmol por oligo.

3.- El vector receptor de los diferentes asrRNA se diseño para incluir un promotor inducible (pLac) y sin la presencia de *lacZa* (para que mediante colonias blancas o azules se seleccionaran aquellas clonaciones de los asrRNA). Mediante PCR inversa con oligonucleótidos diseñados para hibridar en el sitio de inicio de la transcripción del promotor Lac, presente en el vector pUC19, eliminando al gen *lacZa*, se generó el vector Puc19 sin lacZ, el cuál sirvió de receptor para las subsecuentes clonaciones de los genes de los asrRNAs

4.- Como posterior control de la clonación de los genes de los asrRNAs se utilizó la resistencia al antibiótico tetraciclina. Se adicionaron fosfatos en los extremos del DNA resultado del paso 2 y el DNA que codifica para el gen de resistencia a tetraciclina (este se obtuvo mediante PCR con los oligos tetra 5´ y 3´ utilizando como templado el vector pBR325). Posteriormente mediante una reacción de ligación se unieron los fragmentos de DNA que codificaban para cada uno de los genes de los asrRNAs [30 fmol] y el gen de resistencia a tetraciclina [30 fmol]. Con una reacción de PCR con los oligos sentido de cada asrRNA y el oligo tetra 3´se obtuvieron los genes de los asrRNAs en la dirección correcta ya fusionados de manera continua con el gen *tet* (*asrRNA_x::tet*).

5.-Se fosforiló el DNA del vector pUC19 sin lacZ [180 fmol]obtenido en el paso 3 y el DNA del paso 4 [60fmol] y mediante reacción de ligación se clonaron los diferentes genes *asrRNA_x::tet*.

6-. Para seleccionar aquellas construcciones que contenían la orientación *Plac::asrRNAX::tet*, mediante *Una reacción de PCR* con los oligonucleótidos tet 3´ y el oligonucleótido Puc19-sin lacz se seleccionaron aquellas construcciones pUC19ΔlacZ::pLAC::*asrRNA_x::tet*. El último PCR se le adicionaron grupos fosfato y se unió el DNA, circularizandose y generando un plásmido, el cual fue transformado posteriormente en *E. coli DH5a* y recuperado en placas de medio LB adicionadas con tetraciclina [15µg/mL].

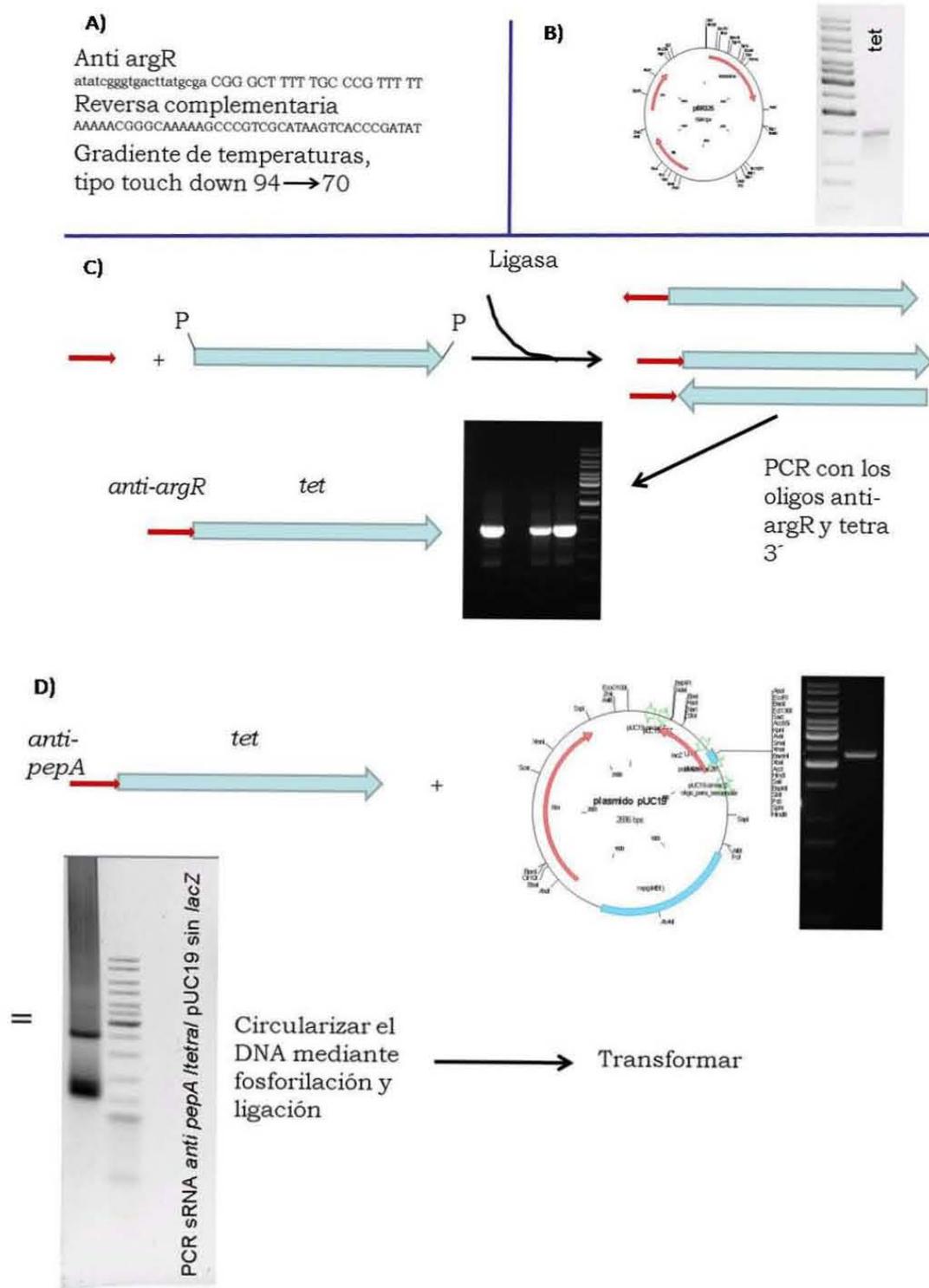


Fig. 12. Estrategia experimental para generar el Sistema Kamikase: el caso ColE1 (pUC19).
 A) Para sintetizar cada gen de los 4 *asrRNAs* (cuyos blancos son los mRNA de los genes *argR*, *pepA*, *dapF* y *XerD*) se utilizaron oligonucleótidos, para que hibridaran los oligonucleótidos de la cadena sentido y

antisentido de estos genes se realizó un gradiente de temperatura de 94°C a 70°C con [60 fmol] de cada pareja de oligos. B) Se amplificó el gen de resistencia a tetraciclina, cuyo templado fue el pBR325. C) Se unieron los fragmentos de los diferentes genes de los *asrRNA* con el gen *tet* mediante la adición de grupos fosfato en los extremos de cada uno de los genes, posteriormente se unieron mediante una reacción dependiente de ATP mediada por la enzima T4 DNA Ligasa y finalmente con los oligonucleótidos sentido de cada *asrRNA* y el oligonucleótido *tet* 3' en una reacción de PCR se seleccionaron aquellas construcciones *asrRNA_x::tet*. D) Se amplificó el vector pUC19 sin *lacZ* mediante un PCR inverso, el resultado del apartado C) se adicionó grupos fosfato en los extremos y posteriormente se unieron mediante una reacción dependiente de ATP mediada por la enzima T4 DNA Ligasa. Finalmente con los oligonucleótidos *tet* 3' y el oligonucleótido Puc19-sin *lacZ* en una reacción de PCR se seleccionaron aquellas construcciones pUC19Δ*lacZ*::pLAC::*asrRNA_x::tet*. El último PCR se le adicionaron grupos fosfato y se unió el DNA, circularizándose y generando un plásmido, el cual fue transformado posteriormente en *E. coli* DH5a.

Como puede apreciarse en la Figura 13, el proceso de clonación y transformación del gen de resistencia a tetraciclina, usado como control positivo, fue exitoso; no obstante y de manera contraria, no se obtuvo ninguna colonia transformante en los casos en donde se clonaron alguno de los *asrRNAs* diseñados para realizar la represión traduccional de los genes *xerD*, *pepA*, *argR* o *dapF*.

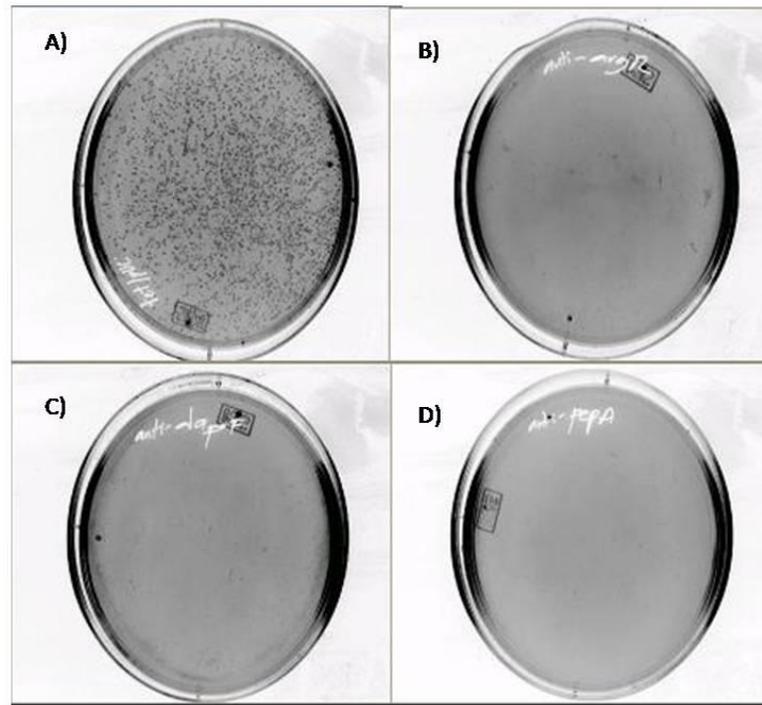


Fig. 13. Resultados de la clonación del Sistema Kamikase: el caso ColE1. Placas de LB adicionadas con el antibiótico tetraciclina [15µg/mL]. A) *E. coli* DH5a/pUC19-sin *lacZ* pLac::*tet*. B) *E. coli* DH5a/pUC19-sin *lacZ* pLac::*asrRNA_{argR}*. C) *E. coli* DH5a/pUC19-sin *lacZ* pLac::*asrRNA_{dapF}*. D) *E. coli* DH5a/pUC19-sin *lacZ* pLac::*asrRNA_{pepA}*.

El plásmido sin *asrRNA* el cual es nuestro control positivo presentó 2748 colonias en un medio de selección de resistencia a tetraciclina. Los plásmidos con *asrRNA* no presentaron ninguna colonia.

Cabe mencionar que en todos los pasos de crecimiento posteriores a la transformación, las bacterias fueron crecidas en ausencia del inductor del sistema (IPTG) y en tales condiciones, la transcripción de los *asrRNAs* es reprimida por el regulador LacI. Sin embargo, nuestros datos sugieren que la transcripción de escape de los diferentes *asrRNAs* proveniente del promotor *lacZ* fue suficiente para que se llevara a cabo la represión traduccional de los genes *xerD*, *pepA*, *argR* y *dapF*, en consecuencia, la inhibición del complejo de resolución de plásmidos. La estrategia que se siguió para lograr la expresión condicional de los *asrRNA* fue cambiar el promotor *lac* por el promotor P_{tetO} , el cual presenta la mejor represión transcripcional ya que contiene dos sitios operadores para el represor transcripcional TetR, descrita con anterioridad³⁷.

La estrategia experimental que se siguió para el cambio de promotor fue utilizar el DNA generado por el PCR de la fusión de los genes de los *asrRNA_x::tet* y fusionar esta construcción con el promotor $P_{LtetO-1}$ de la siguiente manera: Se sintetizaron los oligonucleótidos correspondientes a ambas cadenas del promotor $P_{LtetO-1}$ hasta el sitio de inicio de la transcripción, para hibridar los oligonucleótidos se procedió a un gradiente de temperatura de 94°C a 70°C en condiciones equimolares de 60 fmol y posteriormente se procedió a la reacción de fosforilación. Los fragmentos de DNA del promotor y de los genes de los *asrRNAs* y tetraciclina se unieron mediante una reacción de ligación. Para seleccionar el sentido correcto de la construcción completa se utilizó como templado para una reacción de PCR con el oligo forward del promotor y un oligo que hibrida a la mitad del gen de resistencia a tetraciclina truncando el ORF. Se clonó esta construcción en el vector comercial *pMOSBlue* (Amersham) y se transformó en el fondo genético *E. coli pmos blue cells* el cual en el genoma codifica para el regulador del promotor $P_{LtetO-1}$ -TetR. La selección de las transformantes fue por la presencia de colonias blancas y azules en medio sólido LB suplementado con IPTG [25µg/mL], X-gal [25µg/mL] y ampicilina [200µg/mL], se seleccionaron las colonias blancas (Fig. 14).

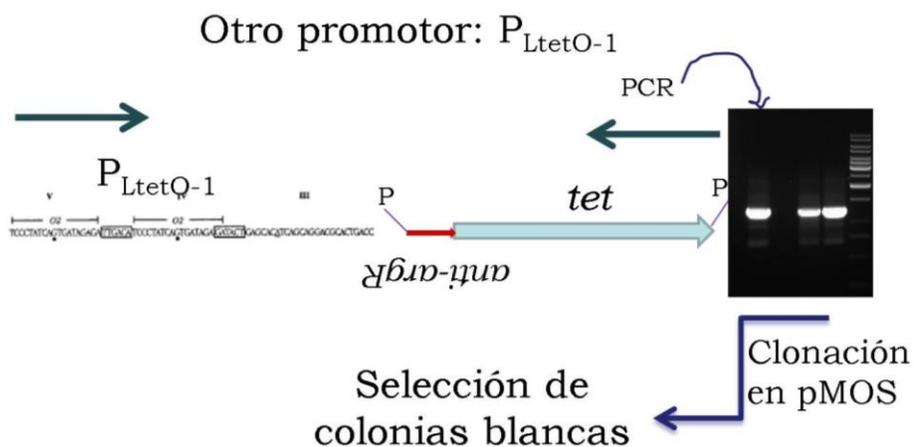


Fig.14. Estrategia experimental para fusión al gen *anti-argR* con el Promotor $P_{LtetO-1}$. Las construcciones *asrRNA::tet* fueron amplificadas con el oligo sentido del *asrRNA* y un oligonucleótido que hibrida a las mitad del gen *tet* (para eliminar el ORF *tet*). Para codificar el promotor

P_{LtetO1} se utilizaron oligonucleótidos sentido y antisentido de todo el promotor y mediante un gradiente de temperatura se alinearon para formar una doble cadena de DNA. Se adicionaron fosfatos a los dos fragmentos de PCR y se unieron mediante la enzima Ligasa, con un PCR se seleccionó la fusión $P_{LtetO1}::asrRNA$, este PCR se clonó en el vector comercial *pMOSblue* y se transformó en *pMOSBLUE* cells, estas células contienen en su genoma el gen *tetR*, regulador de P_{LtetO1} .

Posteriormente del proceso de transformación y selección se obtuvo a *E. coli pMos cell/pArgR* (nos decidimos enfocar en un solo tipo de *asrRNA* para continuar los experimentos), esta cepa contiene el plásmido que codifica para el sistema del $asrRNA_{argR}$ (*pArgR*). Falta un paso final, clonar en el vector el gen que codifica para el regulador *TetR*, lo hicimos amplificando este gen con los oligonucleótidos *tetR* 5' y *tetR* 3', posteriormente este gen se clonó en el sitio *SmaI* en *pArgR*, obteniendo *pArgR/tetR* y la cepa *E. coli MG1665/pArgR/tetR*.

Con esta cepa se procedió a realizar el siguiente experimento:

1.- Se tomó una colonia aislada de la cepa *E. coli MG1665/pArgR/tetR* y se creció en LB líquido hasta una densidad Óptica de 0.2 OD_{600} . De este cultivo se tomaron 200 μ L y se inocularon 5mL ON (toda la noche) en dos tipos de cultivo líquido, LB y LB adicionado con Anhidro tetraciclina [100 ng/mL] (ATc, inductor de $P_{LtetO-1}$) por triplicado en cada condición.

2.- Los cultivos anteriores fueron utilizados para realizar hasta 7 diluciones seriadas y plateadas con 100 μ L resultantes en medios de selección para LB y LB con ampicilina. Los resultados se muestran en la Fig. 15.

Los resultados de la inducción química de la curación de plásmidos en la cepa *E. coli MG1665/pArgR/tetR* por ATc [100 ng/mL] son, en placas en medio LB en la dilución 1×10^{-4} no se pueden obtener UFC, son demasiadas células bacterianas, en la dilución 1×10^{-6} = 214 \pm 25 UFC. En placas en medio LB sólido adicionado con ampicilina [200 μ g/mL], en la dilución 1×10^{-4} = 87 \pm 12 UFC y en la dilución 1×10^{-6} = 8 \pm 4 UFC. Lo que quiere decir, en la dilución 1×10^{-6} , el resultado de la curación del plásmido fue de alrededor del 95%.

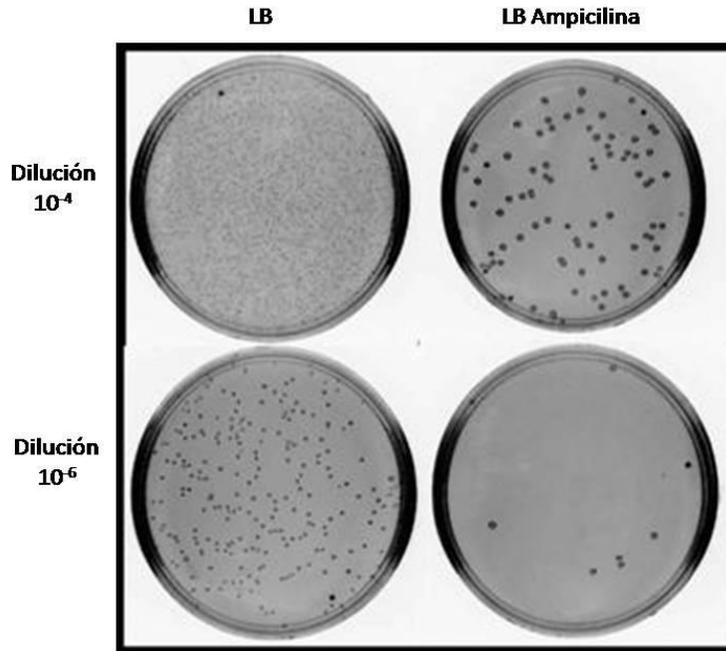


Fig.15. Resultados de la inducción química de la pérdida de plásmidos mediante el uso de $P_{LtetO1}::asrRNA_{argR}$ en *E. coli* MG1665/*pArgR/tetR* Se realizaron diluciones seriadas para poder determinar cuantitativamente el número de células viables de un cultivo en presencia del inductor Anhidro tetraciclina [100 ng/mL] con la cepa *E. coli* *pMos cell/pArgR* . Como se observa el número de UFC decrece drásticamente cuando está presente en el medio el antibiótico específico para la β -lactamasa, cuyo gen se encuentra codificado en el plásmido *pArgR*.

Discusión y Conclusiones

El diseño de circuitos genéticos con fenotipos predecibles puede ser viable si se conoce el mecanismo y las partes relacionadas al fenotipo, y el controlar las variables que se presentan requiere de ensayos de prueba y error. Para el Sistema Kamikase se requirió el cambio de promotor de P_{Lac} a P_{LtetO1} se logró reducir la transcripción de escape para condicionar la expresión transcripcional del *asrRNA_{argR}* a la presencia del inductor ATc. En los resultados se pueden observar cambios drásticos en el número de unidades formadoras de colonias (UFC) cuando se induce la expresión del *asrRNA_{argR}* mediante la adición de ATc al medio, lo que genera que el represor TetR se desprenda de los operadores O1 y O2 del promotor P_{LtetO1} se permita la transcripción del *arRNA_{argR}*.

Si bien ya se conocía que ArgR es parte del sistema de monomerización de plásmidos, nosotros aplicamos este conocimiento para generar un nuevo sistema de curación de plásmidos a partir de la inducción química del sistema con ATc, elemento

que no es citotóxico, por lo tanto no es un agente mutagénico, como lo son los demás agentes utilizados actualmente para curar plásmidos.

Este sistema no solo puede ser utilizado para curar cepas bacterianas en el laboratorio, actualmente en el mundo se han reportado cepas bacterianas patógenas resistentes a antibióticos, como *Pseudomonas aeruginosa*. La resistencia a antibióticos se generó por alteraciones genéticas en el genoma o por transferencia horizontal de genes de resistencia a antibióticos, muchas veces presente en el material extracromosomal de las bacterias codificados en plásmidos ³⁸. Nuestros resultados permiten sentar las bases para un futuro desarrollo biotecnológico basado en el Sistema Kamikase para que, acoplado a un vector de expresión, como puede ser un fago, o bien la adición de oligos antisentidos anti-ArgR, se pueda curar cepas patógenas que portan comúnmente genes de resistencia a antibióticos. Para curar cepas in situ se requiere de un proceso de ingeniería del sistema Kamikase y bacteriofagos específicos para la cepa blanco.

Capítulo 3. El circuito alternador y la Epigenética bacteriana

Antecedentes

Diseñar y generar sistemas biológicos con nuevas partes en un fenotipo determinado es la esencia de la Biología Sintética. El desarrollo de nuevos modelos en esta área emergente ofrece oportunidades que pueden ayudar a entender los procesos biológicos presentes en los organismos actuales. Estas oportunidades han excedido las ideas originales y han transformado la Biotecnología y la Medicina. Desde los inicios de 1990, la Biología Sintética ha resultado en la incorporación de elementos y conceptos básicos en circuitos de regulación de la expresión genética basados en factores transcripcionales (ej. interruptores³⁹ y el repressilator⁴⁰), riboreguladores³ (ej. Riboswitches sintéticos), RNA antisentido, CRISPR⁴¹ y genes de quórum sensing mediadores de la comunicación célula-célula que genera patrones multicelulares⁴², entre otros. En este capítulo aplicaremos el concepto de regulación epigenética para diseñar y construir un nuevo circuito regulatorio bacteriano.

Los mecanismos de regulación epigenética son prácticamente exclusivos para los eucariontes y físicamente son cambios en el genoma como la metilación del DNA o las modificaciones de histonas. Los procesos epigenéticos están relacionados en el desarrollo embrionario, la inactivación del cromosoma X, herencia y el mantenimiento de la estabilidad del cromosoma⁴³. En organismos procariontes, la metilación de DNA está relacionada con la coordinación de diferentes procedimientos celulares, como es la replicación de DNA de cadena sencilla, la segregación cromosomal, la señalización de errores en el genoma y la regulación transcripcional asociada a movilomas⁴³. En algunos casos, los patrones de DNA hemi-metilados o no-metilados pueden ser heredados por células hijas, reflejo del estatus metabólico o la regulación del proceso de división celular, lo cual provee a las futuras generaciones habilidades para adaptarse a las condiciones de crecimiento. Esta regulación en bacterias puede considerarse de tipo epigenético pero es un tema controversial y sigue en debate ya que estos mecanismos se presentan esporádicamente y no son estables como un fenotipo heredado⁴⁴.

Hasta donde sabemos, no existen documentos donde procesos regulatorios basados en mecanismos epigenéticos en bacterias estén presentes en Biología Sintética. Así, el desarrollo de estos circuitos regulatorios podría encaminarnos a nuevas oportunidades para la construcción de novedosos y mejores sistemas sintéticos. Como primer ejemplo, hemos creado el circuito alternador, el cual permite a una población bacteriana alternar de un fenotipo a otro para generar diferentes estados celulares. Esto lo logramos afectando los cambios transcripcionales en *E. coli*, basados en riboreguladores y utilizando como blanco al Factor σ^{70} . En los siguientes párrafos definiremos el estado de arte del Factor σ^{70} .

La regulación de la expresión génica a nivel transcripcional se realiza por distintas proteínas, entre ellas se encuentran los Factores Sigma unidos a la RNA polimerasa formando la holoenzima. Los factores sigma son la parte específica de reconocimiento de la holoenzima, reconocen secuencias específicas en el cromosoma llamadas promotores⁴⁵. Al menos existen en *E. coli* siete factores sigma (σ^{70} (RpoD), σ^{19} (FecI), σ^{24} (RpoE), σ^{28} (RpoF), σ^{32} (RpoH), σ^{38} (RpoS), σ^{54} (RpoN, este último no es parálogo de RpoD)) los cuales se expresan diferencialmente. El factor sigma que es constante a través del tiempo en los cultivos celulares es Factor σ^{70} y los demás sigmas se expresan en condiciones de estrés por nitrógeno, temperatura o en fase estacionaria. *rpoD* codifica para el Factor σ^{70} ⁴⁶. Thieffry y colaboradores han identificado que al menos el 50% de los genes de *E. coli* son regulados por este Factor ⁴⁷, lo que no quiere decir que sean exclusivamente regulados por este.

La robustez es la continuidad de un fenotipo cuando hay cambios genéticos o en el medio, cambiando los patrones transcripcionales. Los Factores Sigma de un organismo son proteínas parálogas. Se cree que este sistema se duplicó para generar redundancia genética para proteger de alguna mutación deletérea⁴⁸. Cualquier función redundante puede ser evolutivamente inestable, a menos que la selección natural actúe para mantener la redundancia. Sin embargo, no se ha estudiado que es lo que ocurre cuando se elimina del medio en la población el tan importante Factor. A pesar de ser un elemento clave para la célula, mutantes en *rpoD* de la colección KEIO pueden sobrevivir en medio LB, los diferentes factores sigma tienen un origen común al ser parálogos y muchas de las regiones a regular pueden ser identificadas por más de un factor sigma. Las redes de regulación transcripcional son modulares, estas pueden ser descompuestas en subredes que son co-reguladas en respuesta a diferentes condiciones y que están involucradas a diferentes respuestas

Hipótesis

El estudio del cambio del patrón transcripcional en una población bacteriana de *E. coli* en la que, mediante Biología sintética, se ha inhibido traducción del gen *rpoD*, que codifica para el factor sigma housekeeping, permitirá evaluar la robustez de la red transcripcional de este organismo e identificar que otros factores sigmas alternativos responden frente a este estrés sintético.

Metodología

La polimerasa del Bacteriofago T7 reconoce a su propio promotor y puede llevar a cabo el proceso de transcripción por sí misma, por lo que se fusionó el promotor T7 strong con el $\text{arRNA}_{\text{rpoD}}$ (en el plásmido $\text{parRNA}_{\text{rpoD}}$). La segunda parte de la estrategia consistió en fusionar el promotor $\text{P}_{\text{T7strong}}$ con el promotor P_{LtetO1} (Fig. 16) y a su vez fusionar transcripcionalmente a estos promotores con el gen que codifica a la polimerasa T7 (plásmido pTpol). El anterior diseño de la región de regulación fue debido a que para que comience la transcripción de *T7pol* se requiere de la maquinaria celular, una vez traducido, la misma proteína puede transcribir a su propio gen sin requerir de el Factor σ^{70} .

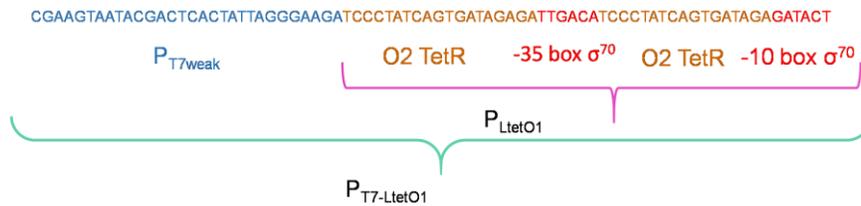


Fig. 16. Modelo del promotor $P_{T7-LtetO1}$. Este promotor contiene dos partes fusionadas, el promotor dependiente de la RNA polimerasa T7 o P_{T7weak} y de manera continua se presenta el promotor P_{LtetO1} . El segundo promotor contiene dos sitios operadores para el represor traduccional tetR, al estar el operador O2 TetR a lado del promotor P_{T7weak} , regula TetR a los dos promotores presentes.

Con el uso de la T7 polimerasa acoplada al nuevo promotor $P_{T7-LtetO1}$ y el $asrRNA_{rpoD}$ modelamos el nuevo Circuito Alternador. Estos nuevos elementos tienen una característica distintiva cuando los elementos están acoplados y encendidos, el circuito se encarga de mantener constante la transcripción dependiente de la T7 polimerasa y el $asrRNA_{rpoD}$ a través de las generaciones generando fenotipos epigenéticos, es decir, el fenotipo generado en la población por la disminución de la presencia de σ^{70} se mantiene en las generaciones sucesivas al proceso de inducción del sistema sin generar cambios en el genoma de las células hijas. Para probar que el fenotipo epigenético se genera por la acción del circuito encendido acoplamos a este un elemento de reversión, un excludón y lo explicamos de la siguiente manera.

Planteamiento del Circuito Alternador

A) Circuito apagado. El regulador transcripcional TetR se encuentra posicionado en la región intergénica 5' del gene de la T7 polimerasa en la región operadora O1.

B) Estado de transición, inducción del sistema. Después de adicionar ATc al medio, este se une al represor TetR cambiando su conformación y permitiendo la transcripción de la T7 RNAPol por la RNA polimerasa bacteriana vía holoenzima σ^{70} -RNAP. La T7 polimerasa se comienza a acumular en el citoplasma transcribiéndose a sí misma y al gen $asrRNA_{rpoD}$. Como resultado se obtiene la inhibición de la traducción del mRNA de $rpoD$ al hibridar el $asrRNA_{rpoD}$ en la secuencia Shine-Dalgarno de $rpoD$. En consecuencia, la concentración intracelular de σ^{70} comienza a disminuir.

C) Estado Final del circuito. La T7RNAP y σ^{70} llegan a sus niveles intracelulares máximos y mínimos, respectivamente. Decece la concentración de σ^{70} generando un recambio de la expresión de los factores sigma alternativos para que la bacteria pueda sobrevivir, formando de manera activa el complejo RNAP- $\sigma^?$, resultando en un patrón de transcripción alternativo. El feedback loop del circuito permanece estable.

D) Reversión de las características epigenéticas del circuito. La inducción de IPTG al medio induce la transcripción de un "long RNA o excludón"* antisentido al $asrRNA_{rpoD}$, este excludón se localiza río arriba en el extremo 3' del $asrRNA_{rpoD}$ en la cadena complementaria y se transcribe a partir del promotor P_{lacO1} . Cuando el excludón se transcribe e hibrida con el $asrRNA_{rpoD}$ comienza a titular al antisentido, por lo que la represión del $asrRNA_{rpoD}$ se inhibe permitiendo la traducción de $rpoD$. Como consecuencia las células hijas donde se indujo el excludón no presentan el fenotipo de las células madre reprogramando nuevamente al sistema para regresar al Circuito apagado y eliminar la epigenética.

*El concepto de excludón se describe como un RNA antisentido largo (long asRNA) el cuál inhibe la expresión de un gen o un grupo de genes dispuestos de manera convergente a este. Así, un solo transcrito tiene la habilidad de controlar genes convergentes mediante la síntesis de un long asRNA y el choque de polimerasas⁴⁹.

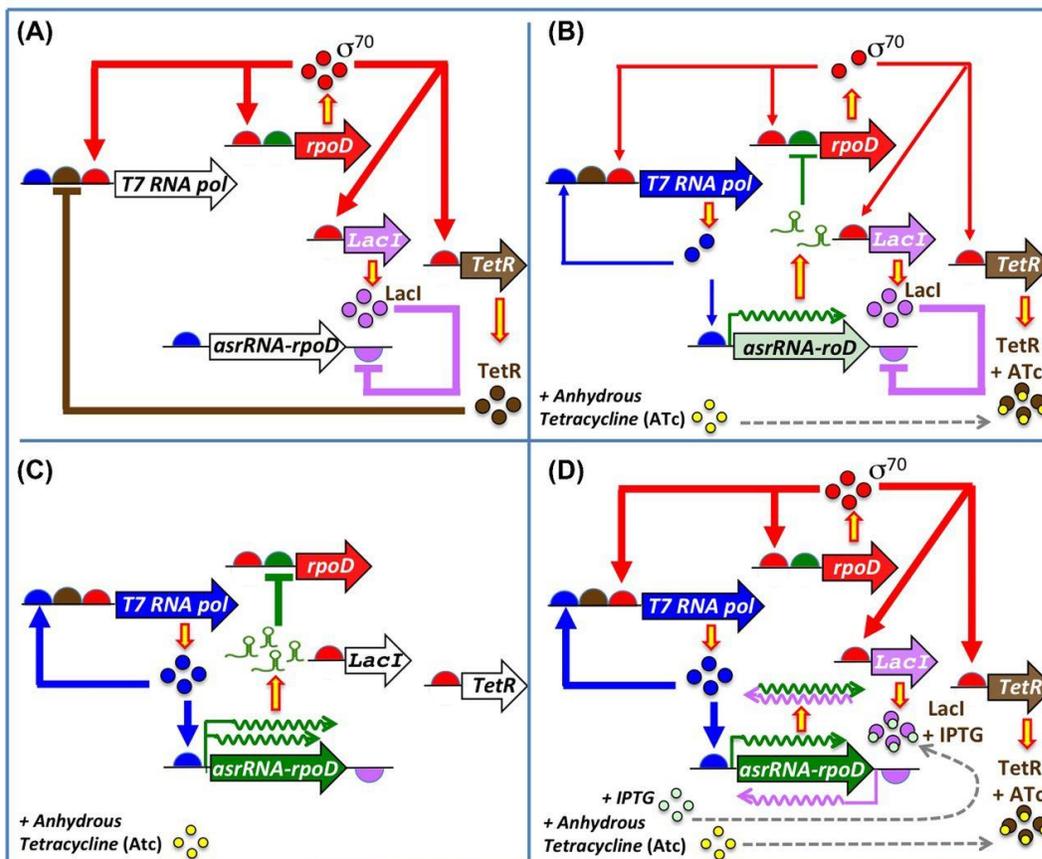


Fig. 17. El circuito Alternador. A) El circuito está apagado. B) Encendido del sistema mediante la adición del inductor ATc, se titula a TetR eliminando la represión en la región de los operadores O2 TetR en el promotor $P_{T7-LlacO1}$ comenzando la transcripción de la Polimerasa T7. C) La Polimerasa T7 se transcribe tanto por la RNA polimerasa como por la T7 polimerasa, se transcribe $asrRNA_{rpoD}$ y bloquea la expresión del mRNA de $rpoD$. D) El circuito se mantiene encendido, la T7 polimerasa se autotranscribe y se forma el feed forward loop.

Metodología del circuito alternador

Se construyeron tres cepas nuevas de *E. coli*. La cepa *E. coli* T7tetR (*setB/tetR/PT7-LtetO1::T7pol/cm/fruB*), *E. coli* *asr-rpoD* (*setB/tetR/PT7LtetO1::T7pol/cm/fruB/lacY/Km::terminator/PT7strong::asrRNArpoD::PlacO1/lacI*) y *E. coli* *asr-rpoD2/pRM6* (Fig. 18).

La cepa *E. coli* T7tetR fue construida de la siguiente manera:

- 1) Se realizaron ampliaciones de DNA mediante PCR con la enzima AccuPrimePfx Polymerasa (Invitrogen). Para obtener la construcción $P_{T7-LtetO1}::T7pol$ (Fig. 17), usamos los oligonucleótidos TetO-t7, A-tetO, pT7 weak-ptetO1 y polT7-3' (ver lista de oligos) y como templado el DNA cromosomal de *E. coli* BL21. Para amplificar el gen *tetR*, usamos los oligonucleótidos TetR-interg-5' y TetR-3' y como templado el DNA cromosomal de *E. coli* XL1 blue. Para amplificar en gen de Resistencia a cloranfenicol *cm*, usamos los oligonucleótidos Cm 5' y Cm 3' y como templado el DNA del plásmido pBR325.
- 2) Los PCR se clonaron pMOS blue vector (Amersham) y subsecuentemente se amplificaron con los oligonucleótidos FruB y SetB, los cuales contienen 50pb homólogos a la región intergénica *setB* y *fruB*, para que posteriormente esta amplificación funcionara como el DNA para el proceso de recombinación homóloga.
- 3) La construcción final fue integrada en el genoma de la cepa *E. coli* MG1665 mediante recombinación homóloga con el sistema λ red (Datsenko and Wanner 2000) (Fig. 23A).

Para la construcción de la cepa *E. coli* *asr-rpoD* se realizó el siguiente procedimiento:

- 1) El gen *Km* fue amplificado con los oligos Km 5' y Km-Terminator y como templado se utilizó el DNA del vector pKD4. Este gen fue seleccionado como marcador para la recombinación homóloga de la construcción $P_{t7strong}::arsRNArpoD$ en la cepa receptora *E. coli* T7tetR en el gen *lacZ*.
- 2) El gen de *Km* fue fusionado mediante PCR con $P_{t7strong}::arsRNArpoD$ utilizando los oligonucleótidos Km5', Term-pT7strong, arRNArpoD pt7strong y arRNArpoD 3) Posteriormente, el producto de PCR fue clonados en el vector pSRKGm para generar el plásmidos pRM4. 4) Se amplificó la construcción $Km::terminator/PT7strong::asrRNArpoD::PlacO1$ mediante PCR con los oligonucleótidos *lacY* y *lacI* con el templado pRM4, con el la amplificación de DNA resultante se procedió al proceso de recombinación homóloga con el sistema λ red en la cepa receptora *E. coli* T7tet. La integración quedó en la siguiente disposición *lacY/Km::terminator/PT7strong::asrRNArpoD::PlacO1/lacI* (Fig.23B).

El plásmido pRM5 se generó de la siguiente manera: Mediante PCR se amplificaron la región intergénica del gen *rpoD* con los oligos *rpoD*-intergenics 5' y

3' utilizando como templado el DNA genómico de *E. coli* MG1665 y el ORF del gen *lacZ* con los oligos *lacZ* 5' y 3' utilizando como templado al DNA cromosomal de la cepa *E. coli* MG1665. Para unir estos dos fragmentos de DNA se hizo un PCR anidado utilizando las dos amplificaciones anteriores, los oligonucleótidos *rpoD* 5', *lacZ* 3' y *rpoD-lacZ*-fusion. La amplificación de DNA resultante se clonó en el vector pBR322 en el sitio *EcoRV* generando el vector pRM5 (Fig. 23C). Posteriormente el vector pRM5 se transformó en la cepa *E. coli* *asr-rpoD/pRM5*

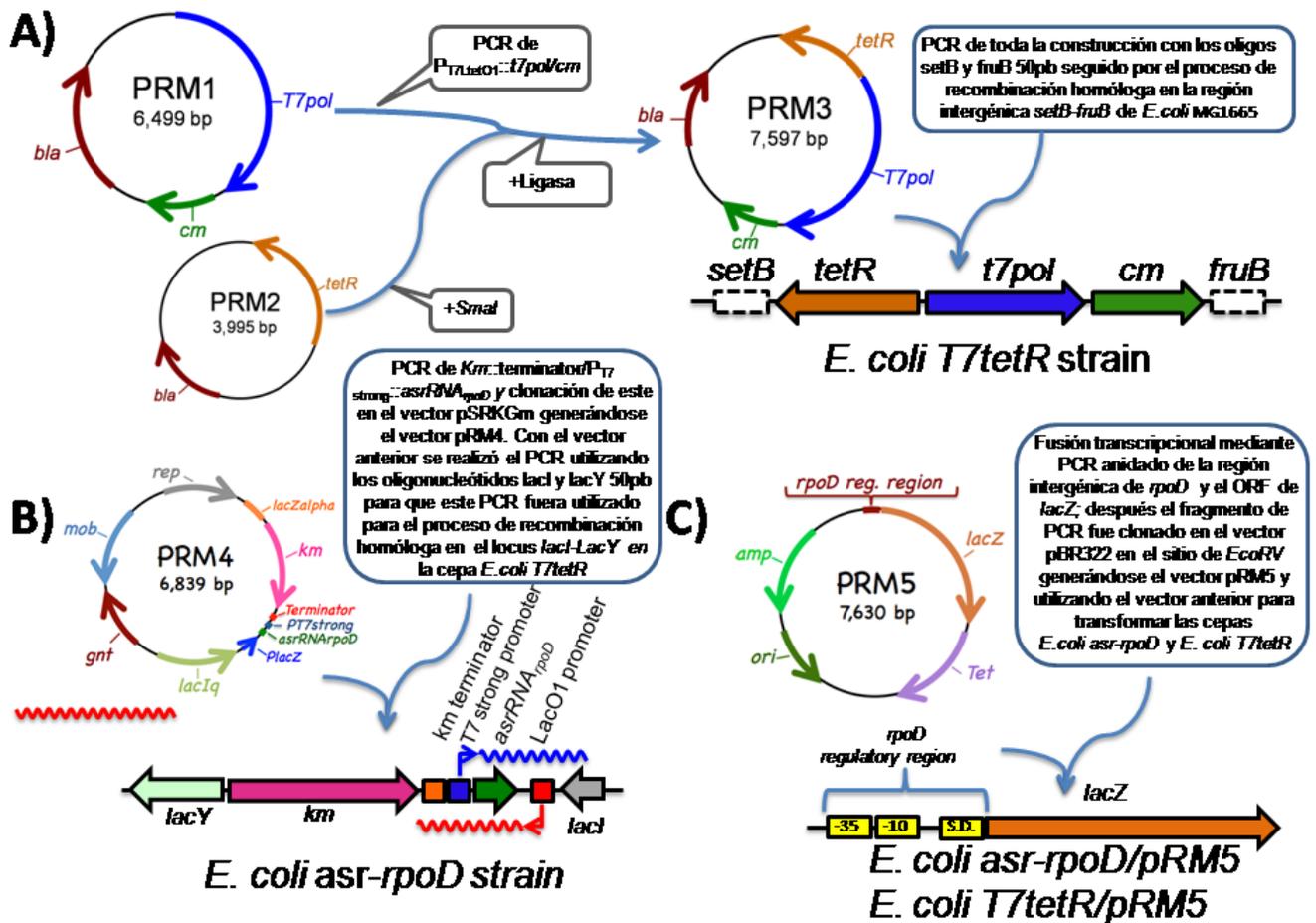


Fig. 18. Ingeniería genética requerida para la construcción del Circuito Alternador. A) Construcción de la cepa *E. coli* T7tetR, se utilizaron los plásmidos intermedios pRM1, pRM2 y pRM3. B) Construcción de la cepa *E. coli* *asr-rpoD*, se utilizó como intermediario el pRM4. C) Construcción de las cepas *E. coli* *asr-rpoD/pRM5* y *E. coli* T7tetR/pRM5.

Cultivos de crecimiento. Las cepas *E. coli T7tetR*, *E. coli asr-rpoD* y *E. coli asr-rpoD* fueron crecidas en 10 mL de LB líquido toda la noche. Al día siguiente, con 5 μ L del cultivo ON fueron inoculados en 300 μ L medio LB fresco con o sin el inductor ATc a una concentración final de 100 ng/mL. Estos cultivos fueron crecidos durante 16 horas y posteriormente fueron utilizados para inocular un segundo crecimiento en medio LB sin ATc y LB con IPTG, también se crecieron durante 16 horas. Los crecimientos se realizaron por triplicado utilizando placas de ELISA de 96 pozos e incubados en el lector de placas de ELISA Synergy de Biotek, fueron medidos los cambios en la densidad óptica cada 20 minutos y en todas las condiciones y cepas se midió la expresión del gen reportero *lacZ* mediante el uso del compuesto fluorescente fluorescein di-V-galactoside (FDG) el cual al ser hidrolizado por la β -galactosidasa emite fluorescencia a una longitud de onda 491 ex/514 em.

Resultados

Nuestro circuito alternador fue puesto a prueba y estos fueron los resultados de la cinética de crecimiento.

1) *Cultivo inicial en medio Luria-Bertani (LB) broth.* Nuestras cepas *E. coli asr-rpoD* y *E. coli T7tetR* fueron crecidas en dos medios diferentes, en LB con y sin el inductor ATc. En el medio sin ATc, TetR reprime la transcripción del gen T7pol, por lo que la polimerasa no se encuentra en el medio y no se transcribe el gen *asrRNA_{rpoD}* y el mRNA *rpoD* puede traducirse (Fig. 17A). Por lo que en el medio LB las cepas *E. coli asr-rpoD* y *E. coli T7tetR* presentan tasas de crecimiento similares (Fig. 19).

En el medio LB con la inducción de ATc, TetR se une al inductor eliminando la represión transcripcional del circuito y comenzando la transcripción del gen T7 pol y subsecuentemente del *asrRNA_{rpoD}* obteniendo como resultado la disminución de la traducción del mRNA de σ^{70} afectando la tasa de crecimiento poblacional (Fig. 19). La concentración intracelular de σ^{70} baja, por lo que otros factores sigma pueden formar complejo con el núcleo de la RNA polimerasa (RNAP), alterando los patrones de transcripción en las bacterias conduciendo a un cambio en la tasa de crecimiento (Fig. 20). Como es esperado, en el crecimiento de la cepa control *E. coli T7tetR* no se observa una baja en la tasa de crecimiento (Fig. 19)

2) Segunda cinética de crecimiento en medio LB sin el inductor ATc. Dos crecimientos fueron realizados para la cepa *E. coli asr-rpoD* en medio LB, estos fueron inoculados con los crecimientos anteriores los cuales fueron realizados en medio LB con y sin inductor. Como se muestra en la Fig. 19. Aquellos crecimientos que fueron inoculados con bacterias que nunca fueron expuestas a la inducción por ATc tienen la misma tasa de crecimiento que la cepa control. Aquellos crecimientos que fueron inoculados con bacterias expuestas a la inducción de ATc presentan una disminución en la tasa de crecimiento como era esperado. Estos dos cultivos presentan diferentes tasas de crecimiento, aunque tengan el mismo genotipo y estén en un medio sin inducción de ATc. Este resultado claramente demuestra que los componentes del circuito del Alternador se heredan de un tipo epigenético. Además, los outputs (i.e., tasas de crecimiento) de los cultivos muestran dependencia de tiempo presente (i.e.,

las condiciones del cultivo) y el input pasado (i.e., las condiciones del preinoculo), por lo que el circuito regulatorio exhibe histeresis. La **histéresis** es la tendencia de un material a conservar una de sus propiedades, en ausencia del estímulo que la ha generado (tomado de wikipedia).

Para demostrar que la reducción en la tasa de crecimiento es heredado de manera epigenética a las generaciones descendientes se reporta la actividad del gen reportero *lacZ* fusionado con la región intergénica de *rpoD*, blanco del *asrRNA_{rpoD}*; el crecimiento inicial y el secundario de las cepas transformadas con el pRM5 (este plásmido contiene la fusión traduccional *rpoD-lacZ*) fueron seguidos mediante mediciones de densidad óptica y fluorescencia 491 /514 para observar y corroborar de esta manera la veracidad de nuestro circuito. Es importante mencionar que el fondo genético de cepa *E. coli* *asr-rpoD* no contiene el gen *lacZ* ya que fue realizado un knock out a partir de la integración *Km::terminator/PT7strong::asrRNA_{rpoD}::PlacO1* en el locus *lacI* y *lacY*. Como se puede observar en la Fig. 19 D., solo aquellos cultivos que fueron inducidos por ATc y los que fueron inoculados con el pre inóculo inducido por ATc no se reporta actividad de β -galactosidasa, por lo que probamos nuestro diseño y observaciones.

Como una segunda aproximación para demostrar que las características de regulación epigenética de la cepa *E. coli* *asr-rpoD* eran el resultado de la inhibición traduccional de *rpoD* mediante el *asrRNA_{rpoD}*, se incluyó en el sistema al excludón del *asrRNA_{rpoD}*, este excludón se induce por la adición de IPTG al medio y está regulado por el promotor LacO1. Como se puede observar en la Fig. 19 B y D, al adicionar IPTG en los crecimientos secundarios inoculados con ATc en el crecimiento anterior, pueden revertir el fenotipo epigenético reflejado en la tasa de crecimiento (de 0.03 OD₆₀₀/h a 0.1 OD₆₀₀/h) y al obtener actividad de β -galactosidasa proveniente de la fusión traduccional *rpoD-lacZ*.

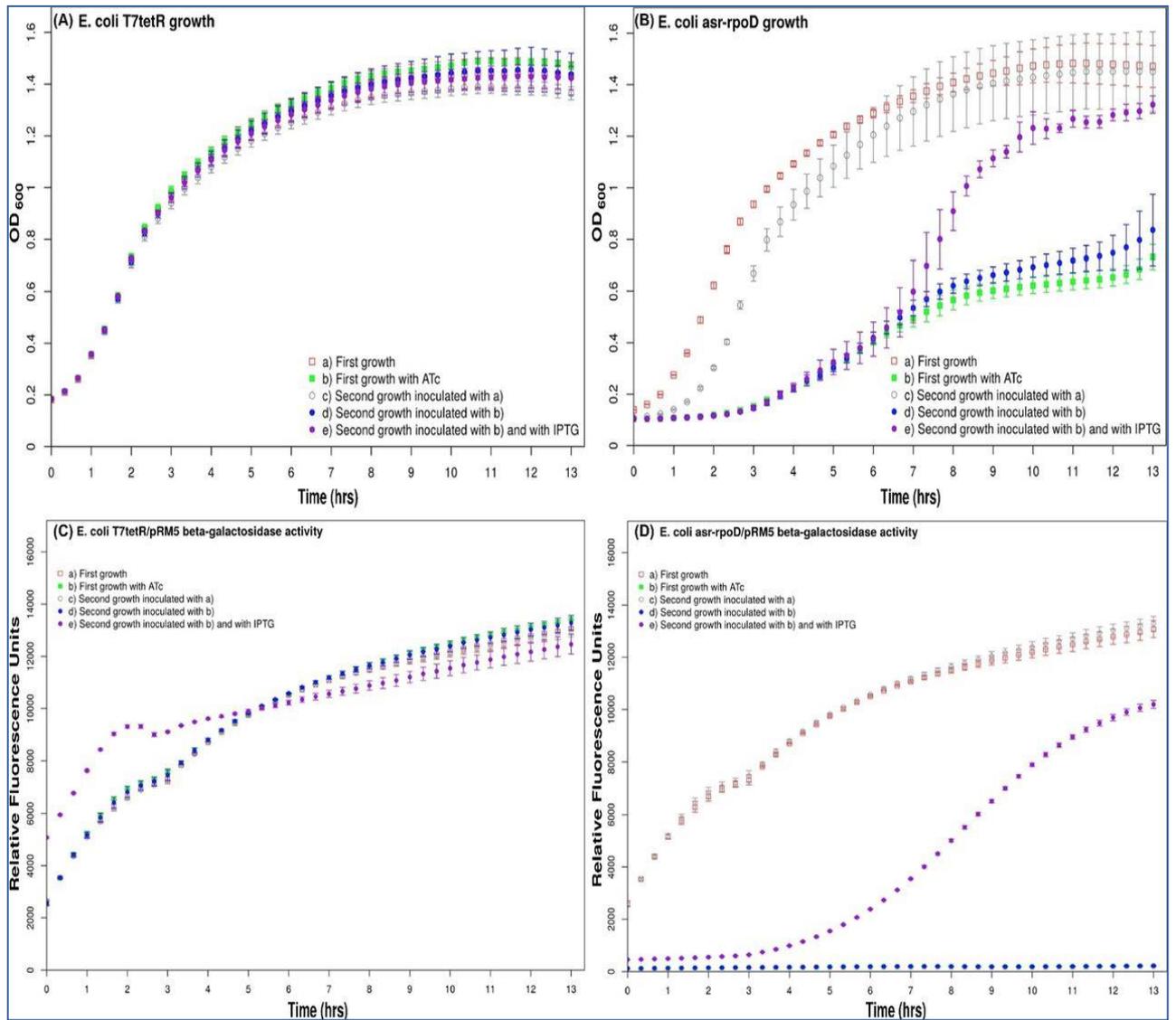


Fig. 19. Cinéticas de crecimiento y expresión del Circuito Alternador Reversible. Impacto en la regulación epigenética de σ^{70} en la tasa de crecimiento de *E. coli* y en la actividad del reportero β -galactosidasa. **A)** Las cepas *E. coli* T7tetR y **B)** la cepa derivada *E. coli* asr-rpoD fueron crecidas en el medio LB (figuras vacías) y en la presencia del inductor del sistema ATc (Figuras rellenas). El cultivo inicial (cuadrados) fue usado para inocular el segundo crecimiento (círculos). Cabe resaltar que en la cepa *E. coli* asr-rpoD la tasa de crecimiento depende del inoculo, lo cual indica una regulación epigenética. Las cepas *E. coli* T7tetR y *E. coli* asr-rpoD fueron transformadas con el plásmido pRM6 el cual contiene la fusión traduccional de rpoD-lacZ como reporteros de la expresión del Circuito Alternador Reversible. Las mismas condiciones de crecimiento se llevaron a cabo para analizar el patrón de regulación epigenética midiendo la actividad de la β -galactosidasa. **C)** No se observa patrones de regulación epigenética en la cepa *E. coli* T7tetR/pRM6. **D)** Un claro patrón de epigenética es observado en la cepa *E. coli* asr-rpoD/pRM6. Este patrón epigenético fue revertido en el segundo crecimiento mediante la adición de IPTG al medio y la inducción consecuente del excludón del antisentido asrRNA_{rpoD} a partir del promotor P_{lacO1} .

Discusión y Conclusiones

Seleccionamos al blancoal gen *rpoD* para el Sistema del Alternador debido a su importancia en el metabolismo celular. El objetivo era ilustrar como un circuito epigenético creado a partir de principios de Biología Sintética genera fenotipos diferentes, heredables y alternativos sin la necesidad de alterar el genoma. En *E. coli*, existen al menos 7 factores sigma, incluyendo el factor housekeeping σ^{70} y los 6 factores alternativos que se expresan en determinadas condiciones ambientales. Entre los diferentes factores sigma, σ^{70} presenta las mayores concentraciones intracelulares y posee la mayor afinidad por la RNAP⁵⁰; es por las razones anteriores que no es una sorpresa que σ^{70} regule la transcripción de al menos el 50% de los genes en *E. coli*⁴⁷. En ciertas condiciones metabólicas, la concentración relativa de σ^{70} con respecto a los demás factores sigma decrece, favoreciendo el reemplazo de σ^{70} con la RNA polimerasa⁴⁵. En nuestro sistema epigenético alteramos la concentración de σ^{70} mediante su inhibición traduccional de manera artificial. El resultado obtenido es el reemplazo σ^{70} por otros factores sigma alternativos, generando un estrés sintético, consecuentemente una reducción en la tasa de crecimiento. Un fenotipo similar se observa en la cepa de *E. coli* en donde se removió el gen *rpoD*⁵¹. Sin embargo, es claro que la alteración en la tasa de crecimiento generada por el knockout está asociada a modificaciones en el DNA, por lo tanto, todas las generaciones descendientes presentan el mismo fenotipo. De manera opuesta, la epigenética presenta fenotipos diferentes sin la alteración del genotipo. Esta es la primera vez que se logra diseñar y construir un circuito epigenético bacteriano mediante Biología Sintética.

Capítulo 4. El efecto transitorio de asrRNA: el modelo predador-presa y el modelo de competencia

Antecedentes

En Biología Sintética se ha generado una serie de circuitos que exploran las capacidades de nuevas partes celulares en un contexto Biológico. Existen circuitos de encendido condicionado, de expresión oscilatoria, de autorregulación, de control de splicing, basados en regulación post-transcripcional como riboswitches, el sistema CRISPR-Cas9, de siRNA, etc. Todos estos elementos dentro de su planteamiento son irreversibles sus efectos. Sin embargo, las células pueden pasar de un estado metabólico a otro cambiando los diferentes circuitos genéticos que la integran, dependiendo del requerimiento metabólico del momento⁵².

Un aspecto fundamental que ha limitado el diseño de circuitos regulatorios en Biología Sintética es el hecho de que una vez que se adiciona al cultivo celular las moléculas efectoras (IPTG, anhidro-tetraciclina, arabinosa, N-Acil homoserinalactona, etc.), la respuesta generada permanece durante el crecimiento celular ya que resulta prácticamente imposible su remoción. Por tal motivo, durante el desarrollo de esta tesis hemos desarrollado el diseño y uso de moléculas de RNA-pequeñas que modulan la actividad de los asrRNAs que se han expresado en respuesta de la adición al cultivo de moléculas efectoras. A este tipo de moléculas de RNA que modulan a los asrRNAs las hemos llamado *Ribomoduladores*. En otras palabras, el efecto de los ribomodulador es contrarrestar la actividad reguladora de los asrRNAs, consecuentemente, la inhibición traduccional del mRNA blanco termina y su producto correspondiente vuelva a expresarse en la célula. En base a estas dos moléculas de RNA, asrRNA y ribomoduladores, construimos dos tipos de sistemas de regulación, mismos que a continuación se describen:

1) Sistema de competencia. Es aquel en donde el asrRNA y el ribomodulador reconocen parcialmente a una misma región en el extremo 5' terminal del mRNA blanco y por lo tanto su unión al mRNA es mutuamente excluyente. Como fue descrito previamente, el asrRNA reconoce y se une a la secuencia Shine-Dalgarno, inhibiendo la traducción del gen blanco. La expresión del ribomodulador tiene un efecto modulador sobre el asrRNA debido a la competencia de estos dos tipos de moléculas por unirse a la región de reconocimiento que tienen en común (Fig. 20).

2) Sistema Predador-Presa. Es aquel en donde la secuencia nucleotídica del ribomodulador es totalmente complementaria a la secuencia del asrRNA. Considerando que la secuencia del riboregulador es sólo parcialmente complementaria al mRNA de su gen blanco, la energía libre del complejo ribomodulador-asrRNA será menor (complejo más estable), que la energía del complejo asrRNA-mRNA (complejo menos estable). De esta manera puede inhibirse la acción reguladora del asrRNA sobre el mRNA blanco, Fig. 20.

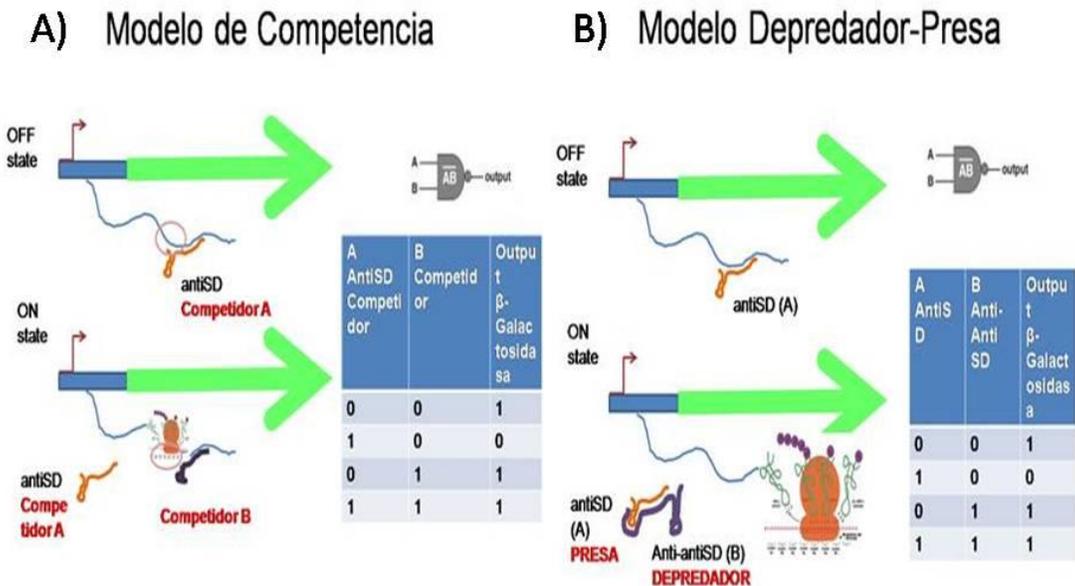


Fig.20. Los modelos de competencia y predador- presa. A) Modelo de competencia: un mRNA blanco hibrida con un asrRNA en la región SD, como resultado el mRNA blanco no es traducido, posteriormente un segundo asrRNA se expresa e hibrida en el mRNA, pero el segundo asrRNA hibrida en una región adyacente al SD permitiéndose la traducción del mRNA. El modelado entre las interacciones asrRNA A-mRNA comparadas con el asrRNA B-mRNA deben de ser mas fuertes las del asrRNA B-mRNA para favorecer el desplazamiento del asrRNA A-mRNA. B) El modelo predador presa: un asrRNA hibrida en el SD del mRNA blanco, en consecuencia el mRNA no es traducido, posteriormente se transcribe un segundo asrRNA que hibrida con el asrRNA SD, generándose una interacción predador presa y en consecuencia el mRNA queda libre para su traducción. La interacción predador-presa debe de ser termodinámicamente favorecida en comparación con la interacción asrRNA SD-mRNA

Para estos modelos construimos un módulo estandarizado para ensamblar de una manera sencilla los sistemas de regulación transactiva basados en los modelos predador-presa y el de competencia. A este módulo un Biobrick lo hemos llamado Biobrick Rodríguez-Merino(o BiobrickRM).

El primer paso fue utilizar el gen de resistencia a tetraciclina (*tet*) como un espaciador entre los promotores P_{lacO1} y P_{LtetO1} , eliminar 550 pb de su secuencia primaria y adicionar un terminador transcripcional modelado *in silico*. Este paso es debido a que *tet* es el único gen que no se puede utilizar para estos sistemas de regulación al estar controlados por el inductor ATc. Si este gen estuviera presente expulsaría al medio al inductor, ya que este gen de resistencia actúa como una bomba para sacar a la tetraciclina del citoplasma. Mediante PCR utilizando como templado el gen *tet* y oligonucleótidos diseñados para adicionar a la construcción el terminador

transcripcional que bloquearía alguna polimerasa que proviniera secuencia río arriba del promotor P_{LtetO1} . Posteriormente se prosiguió a un segundo PCR con el templado anterior y oligonucleótidos diseñados para agregar los promotores del sistema como se muestra en la Fig. 16.

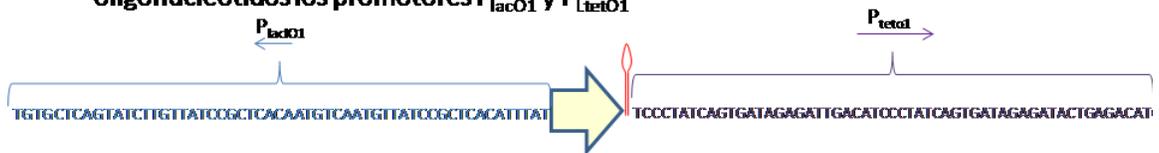
Las grandes ventajas del diseño de este BioBrick Rodríguez-Merino (RM) es que solo se requiere de un PCR para sintetizar cualquier Sistema Predador-Presa o competencia, esto es seguido a la clonación en el vector de expresión de interés que puede ser un Bacteriófago o un plásmido para que se puede integrar posteriormente al cromosoma. Adicionalmente mediante un PCR anidado se podría utilizar para fusionar genes de interés con los promotores inducibles P_{lacO1} y P_{LtetO1} , en el capítulo 5 se presentan ejemplos de la utilización de este BioBrick RM.

Diseño y construcción del BioBrick de los Modelos Depredador-presa y Competencia

1) PCR tail de *tet* trunco en la posición 550 con terminador artificial en el extremo 3'



2) PCR tail utilizando como templado el descrito en el paso anterior adicionando mediante oligonucleótidos los promotores P_{lacO1} y P_{LtetO1}



3) PCR tail utilizando como templado el descrito en el paso 2 adicionando mediante oligonucleótidos los antisentido del modelo predador-presa o de competencia

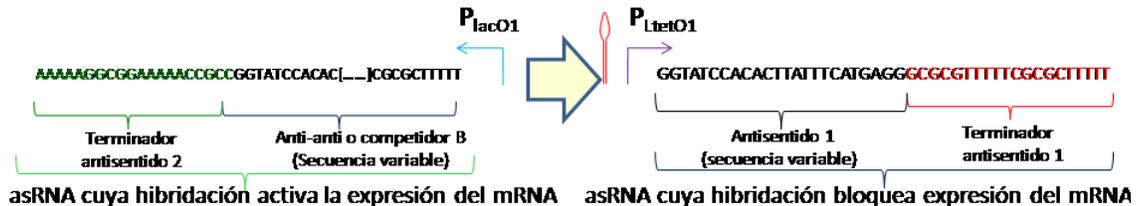


Fig. 16. BioBrick RM de los modelos Predador-Presa y Competencia. Con este BioBrick solo se requiere adicionalmente de un PCR por gen de interés.

Capítulo 5. Buscando la sincronización del crecimiento poblacional bacteriano mediante el uso de un circuito sintético

Antecedentes

El ciclo celular procarionte presenta diferentes fases, la de inicio de la síntesis de material genético acoplado a la formación del divisoma, para llegar a la fase de división celular y generar células hijas, las cuales acumularán cierta cantidad de masa, cuando esta masa llega a un punto crítico comienza la fase de inicio de la síntesis de material genético⁵³. En una población bacteriana típica el ciclo celular entre los individuos no está sincronizado, al menos que este en estrés⁵⁴. El metabolismo celular y los procesos de regulación también están asociados al ciclo celular, por lo que en una población en un momento podemos encontrar señales de diferentes fases del ciclo celular y esto genera "ruido" en estudios de tipo ómico. Es por la razón anterior que deseamos generar circuitos de regulación genética que sincronice el ciclo celular en un cultivo bacteriano.

La división celular es un proceso complejo, con alta demanda de energía y es esencial para todos los seres vivos. Cuando *E. coli* crece en un medio con glucosa como única fuente de carbono, todos los aminoácidos, purinas, pirimidinas y cofactores deben sintetizarse, es decir, cada paso requiere de la conversión de la glucosa a las biomoléculas esenciales para sobrevivir. El 35% de los genes de *E. coli* que codifican para enzimas del metabolismo central no son esenciales para el crecimiento de *E. coli* en un medio con glucosa⁵⁵. En diferentes bacterias modelo, cuando la citocinesis es inhibida, las bacterias crecen de manera cilíndrica y el cromosoma continúa replicándose y segregándose, lo cual resulta en células filamentosas con varios cromosomas⁵⁵.

En *E. coli* el origen de replicación llamado *OriC* presenta 4 cajas de unión con la proteína DnaA y su actividad se restringe a esta proteína⁵⁶. La unión de DnaA con el cromosoma genera un desenrollamiento de la región adyacente rica en secuencias AT, consecuentemente la doble cadena de DNA se abre y se lleva a cabo el reclutamiento de la helicasa DnaB mediado por DnaA para que el ensamblaje del replisoma dando lugar al inicio del proceso de replicación de DNA⁵⁷, Fig. 17. DnaA es una proteína cuya concentración es relativamente constante en los cultivos celulares de *E. coli*. Es regulada de manera post-traducciona por la proteasa Lon, cuya expresión es dependiente del factor σ^{32} presente en condiciones de estrés. Cuando existe un estrés celular y se activa Lon, las bacterias presentes en el cultivo detienen su ciclo celular, sobreviven pero no proliferan⁵⁸. Mutantes termosensibles de *dnaA* complementadas con un plásmido que contenía el gen de *dnaA* fusionado con el promotor P_{Lac}, en medios a 42°C con la presencia de IPTG [12 µg/mL] logran reiniciar el proceso de replicación de DNA y la división celular⁵⁹.

Formación del complejo replicativo

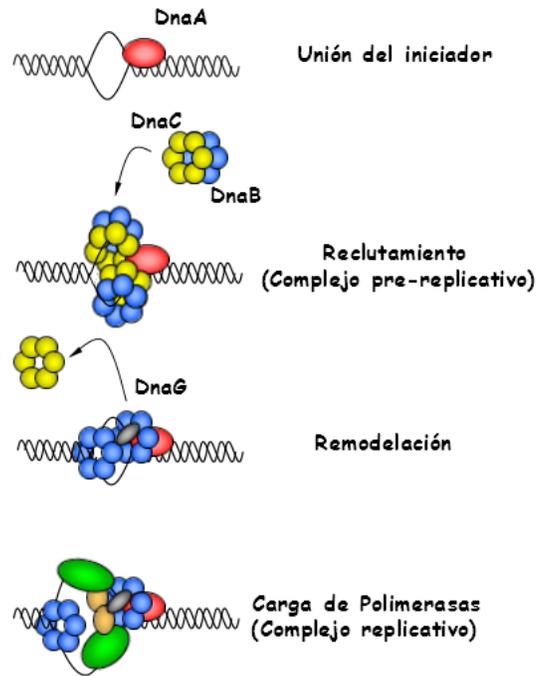


Fig. 17. Inicio de la replicación de DNA cromosomal Bacteriano. En bacterias para que inicie la replicación del DNA genómico se requiere que la proteína DnaA se una al origen de replicación, para que una vez unido DnaA-DNA se reclute el replisoma y comience la polimerización de DNA. Figura tomada de <http://slideplayer.es/slide/1721830/>

Las bacterias se dividen mediante fisión binaria, lo cual está coordinado por un complejo de proteínas llamadas divisoma. En varias bacterias modelo se ha propuesto que el divisoma se ensambla en tres fases: 1) La fase temprana donde se realiza el ensamblaje del anillo Z con FtsZ y las proteínas ZAP (proteínas asociadas al anillo Z); 2) Se unen más proteínas al anillo Z para formar un divisoma completo (FtsE/X, FtsK, FtsQ/L/B, FtsW/I/P, PBP1b); 3) La fase tardía donde el divisoma se activa para formar el septo con peptidoglicanos, este evento ocurre cuando FtsN se une al divisoma y activa a FtsI, la cual junto con PBP1b comienza la síntesis de peptidoglicanos septales (Fig. 18)⁶⁰.

Hipótesis

Se puede sincronizar el crecimiento poblacional bacteriano mediante el uso de asrRNAs y ribomoduladores diseñados para regular la traducción de los genes *dnaA* y *ftsN*. La inducción transcripcional de los *asrRNA_{dnaA}* y *asrRNA_{ftsN}* detendría los procesos de replicación cromosomal y división celular. Posteriormente, la presencia de los ribomoduladores-*dnaA* y *ftsN* reactivarían dichos procesos.

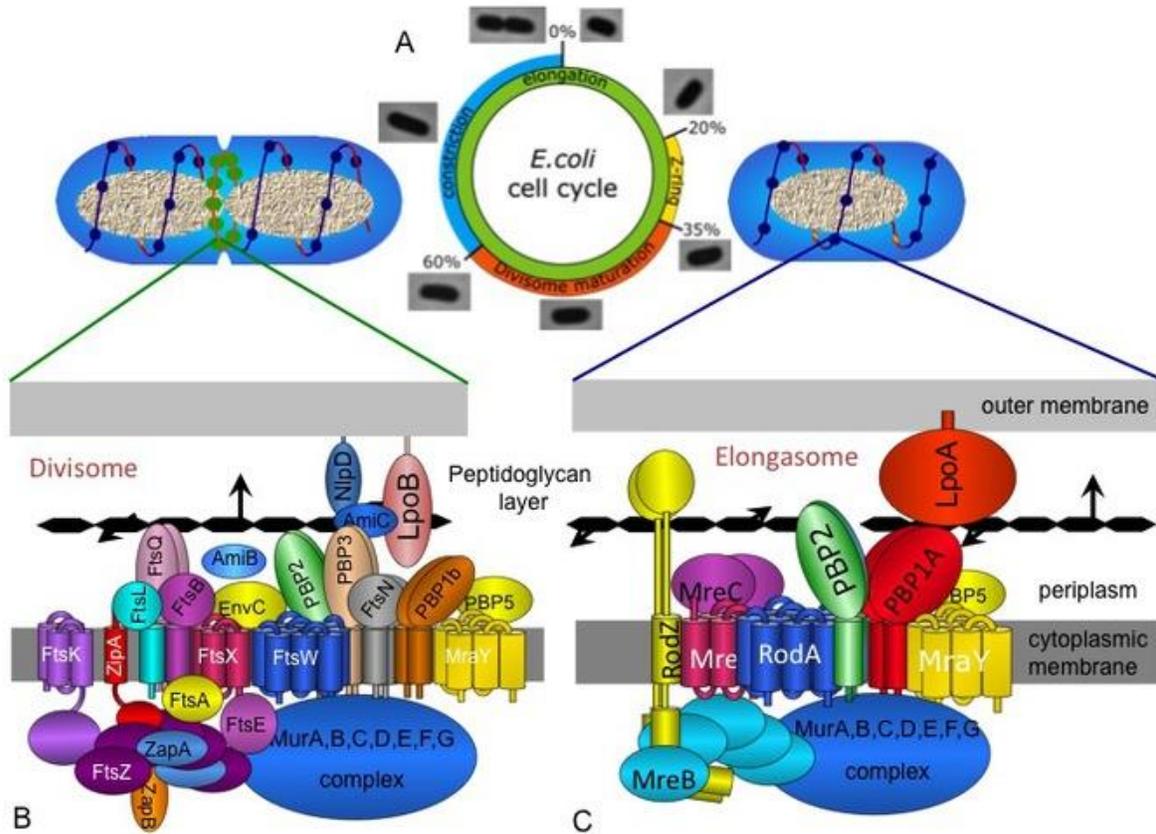


Fig. 18. El ciclo celular en E. coli. A) Esquema del ciclo celular, si las bacterias no se están dividiendo mediante el divisoma, están creciendo mediante el elongasoma. B) El divisoma forma el anillo septal y la constricción de la membrana citoplasmática, es un proceso con muchas proteínas involucradas y energía. C) El elongasoma, es presente en la fase de crecimiento del ciclo celular acumulando masa y energía. Figura tomada del grupo de investigación del Dr. T. Den Blaauwen.

Metodología y resultados

Por cuestiones de claridad, en esta sección se combina la metodología y los resultados del sistema de sincronización bacteriana I y II, los genes blanco son *ftsN* y *dnaA*, comenzaremos con aquel basado en la regulación traduccional de *ftsN*.

Circuito genético de Sincronización celular parte I

El inicio de la fase tardía de la división celular se da cuando FtsN se une a la mureína, activando posteriormente a FtsI, es por ello que FtsN es blanco de nuestro estudio con un tipo de sistema de regulación por *asrRNA*.

Basados en el modelo predador-presa explicados en el capítulo 4 de esta tesis, generamos un sistema de expresión transitoria de genes de tipo *asrRNA*. Básicamente consiste en la fusión transcripcional de los promotores P_{tetO} al $asrRNA_p$ (presa) que regulará al mRNA y P_{lacO1} fusionado con el $asrRNA_d$ (predador o ribomodulador) que regulará a la presa. Los modelos y el circuito se ejemplifican en la Fig.19).

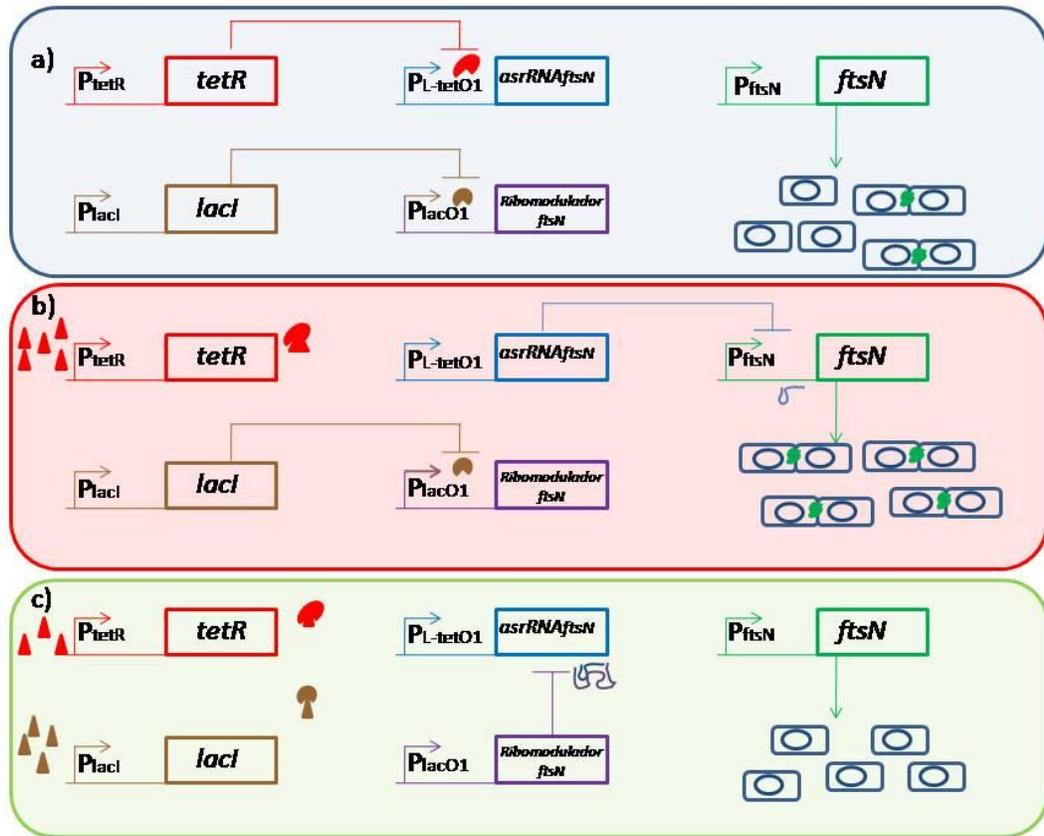


Fig. 19. Circuito genético de Sincronización celular parte I. a) El sistema está apagado, *ftsN* se traduce. b) Estado de transición. Se activa la transcripción del *asrRNA_{ftsN}* mediante la adición en el medio de ATc, se inhibe la traducción de *ftsN*, como consecuencia el proceso de maduración del divisoma. c) Estado final. Mediante la inducción de la transcripción del P_{lacO1} por la adición de IPTG al medio, el *ribomodulador-ftsN* titula al *asrRNA_{ftsN}* restableciéndose la traducción de *ftsN* y el proceso de maduración del divisoma.

Para que el ribomodulador titule al *asrRNA* en todos los casos, la hibridación entre el mRNA con el *asrRNA* debe de ser menor la T_m comparada con la que se genera entre el *asrRNA* y el ribomodulador. Se hizo el modelado con el programa de RNAfold⁶¹, los datos para la hibridación entre el mRNA de *ftsZ* y el *asrRNA_{ftsZ}* son $\Delta G = -27.7$, $\Delta H = -199.1$, $\Delta S = -552.7$ y $T_m = 71.1^\circ\text{C}$, los datos para la hibridación entre el *asrRNA_{ftsN}* y el ribomodulador-*ftsN* son $\Delta G = -75.4$, $\Delta H = -409.0$, $\Delta S = -1075.6$ y $T_m = 98.2^\circ\text{C}$. Por lo que teóricamente las interacciones entre el *asrRNA_{ftsN}* y el ribomodulador-*ftsN* son favorables y desplazan a las del mRNA de *ftsZ* y el *asrRNA_{ftsZ}*.

La Ingeniería Genética que se requirió fue la contemplada mediante el uso del BioBrick RM descrito en el capítulo 4. Mediante una reacción de PCR y con los oligonucleótidos D-*ftsN*-SD-*PlacI* y P_{tetO} -*ftsN*-SD (ver Tabla 1) y como templado se usó el BioBrick RM (ver capítulo 4), se construyó el Sistema Predador-Presa *ftsN*.

Posteriormente, se clonó en el plásmido pMOS en el sitio *EcoRV* formando el plásmido pF1 en el cual se clonó posteriormente *tetR::km* en el sitio de *SmaI* generándose el vector pFtsN. Este vector contiene la región alfa del gen *lacZ*, por lo que se utilizó como templado para un proceso de recombinación homóloga con el cromosoma de *E. coli* K12 MG1665, el templado fue linearizado mediante el uso de las enzimas de restricción *ScaI* y *XmnI*, resultando de todo es proceso la cepa *E. coli ftsN*.

La cepa bacteriana *E. coli ftsN* se creció en tres condiciones experimentales: en medio LB, LB con ATc [100ng/mL], LB con ATc [100ng/mL] e IPTG [25µg/mL] adicionado el último después de dos horas de haber iniciado la incubación de los cultivos celulares (Fig. 19). Los experimentos se realizaron en placas de ELISA por triplicado y la densidad óptica se midió con el Lector de placas de ELISA Biotek, los cambios en Densidad óptica OD₆₀₀ se realizaron cada 20 min y se graficaron los valores de la media de los triplicados biológicos de cada condición.

En los resultados se presentan en la Fig. 20, se puede observar que en aquellos cultivos inducidos con ATc al terminarse la presencia de FtsN el crecimiento se arresta a las 6 horas llegando a una OD₆₀₀ de 0.3 y aquellos cultivos con la presencia del inductor ATc y la adición del inductor IPTG el crecimiento se restablece el crecimiento celular posiblemente de una manera sincronizada. Se requiere hacer estudios de tipo Citometría de Flujo para corroborar el potencial proceso de sincronización mediante la caracterización del fenotipo de la población.

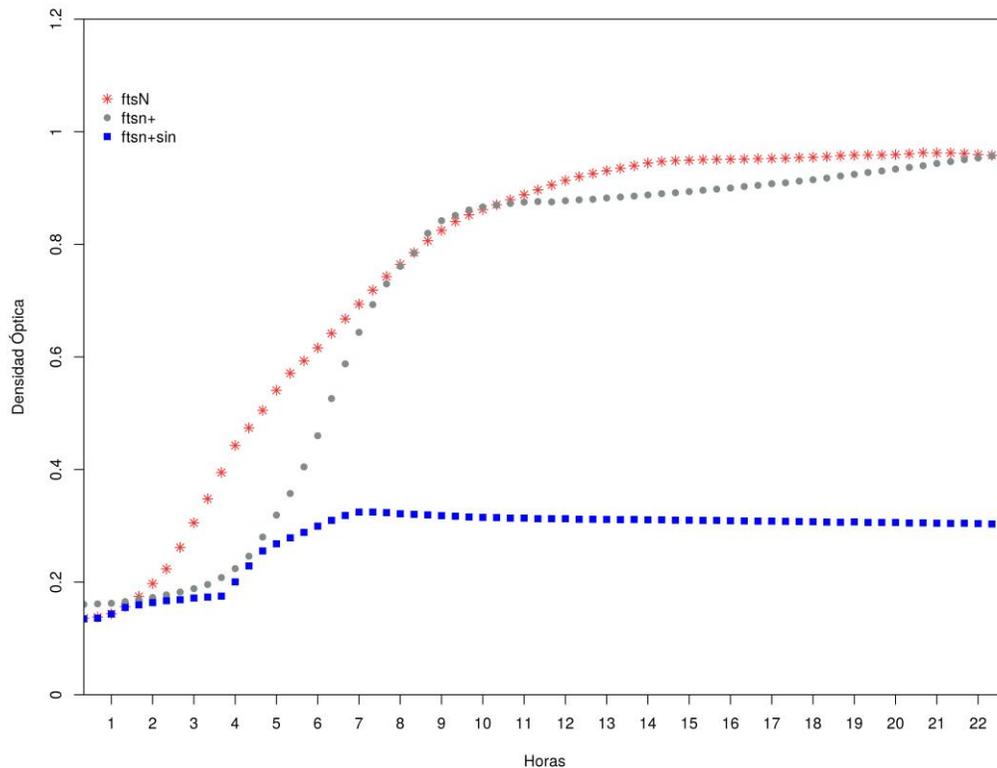


Fig. 20. Cinética de crecimiento de la cepa *E. coli ftsN* para la Sincronización de crecimiento bacteriano. La cepa *E. coli ftsN* contiene el sistema de tipo predador-presa para el mRNA blanco *ftsN*. a) Los valores rojos corresponden a la cepa *E. coli ftsN* crecida en medio LB, donde el sistema

de sincronización está apagado. b) Los valores azul corresponden a la cepa de *E. coli FtsN* crecida en medio LB adicionado con ATc [100ng/mL], en donde la traducción del gen *ftsN* se encuentra inhibida por la acción del $asrRNA_{ftsN}$. c) Los valores de color gris corresponden a la cepa *E. coli FtsN* crecida en medio LB adicionado con ATc [100ng/mL] pertenecientes al estado de transición del sistema, donde el $asrRNA_{ftsN}$ se encuentra inhibiendo el proceso de traducción del gen *ftsN*. A diferencia del cultivo anterior, a las dos horas de este crecimiento se adicionó al medio IPTG [25µg/mL] para inducir la transcripción del ribomodulador-ftsN. Estos valores corresponden al estado final del Sistema de Sincronización en donde el $asrRNA_{ftsN}$ antes de las dos horas regula la traducción de *ftsN*, posteriormente se induce la transcripción del ribomodulador-ftsN favoreciéndose las interacciones entre el $asrRNA_{ftsN}$ y el ribomodulador-ftsN, permitiéndose de esta manera la traducción del mRNA de *ftsN*.

Circuito genético de Sincronización celular parte II

Si bien el Circuito Genético de Sincronización anterior es eficiente, en diferentes bacterias modelo, cuando la citocinesis es inhibida, las bacterias crecen de manera cilíndrica y el cromosoma continúa replicándose y segregándose, lo cual resulta en células filamentosas con varios cromosomas. Previendo este fenómeno el Sistema de Sincronización acopla dos Sistemas de regulación, aquel que inhibe la fase tardía del divisoma y aquel que inhibe el proceso de replicación de DNA cromosomal en la fase temprana con la inhibición traduccional de *dnaA*, proteína clave para el inicio de la replicación.

Se procedió de la misma manera que con el Circuito genético de Sincronización celular parte I, cambiando solo una cosa; el circuito fue codificado en un plásmido (plásmido pMOS). Basados en el modelo predador-presa explicados en el capítulo anterior de esta tesis, generamos un sistema de expresión transitoria de genes de tipo $asrRNA$. Básicamente consiste en la fusión transcripcional de los promotores P_{tetO} al $asrRNA_p$ (presa) que regulará al mRNA y P_{lacO1} fusionado con el $asrRNA_d$ (predador o ribomodulador) que regulara a la presa. El circuito se ejemplifica en la Fig.21.

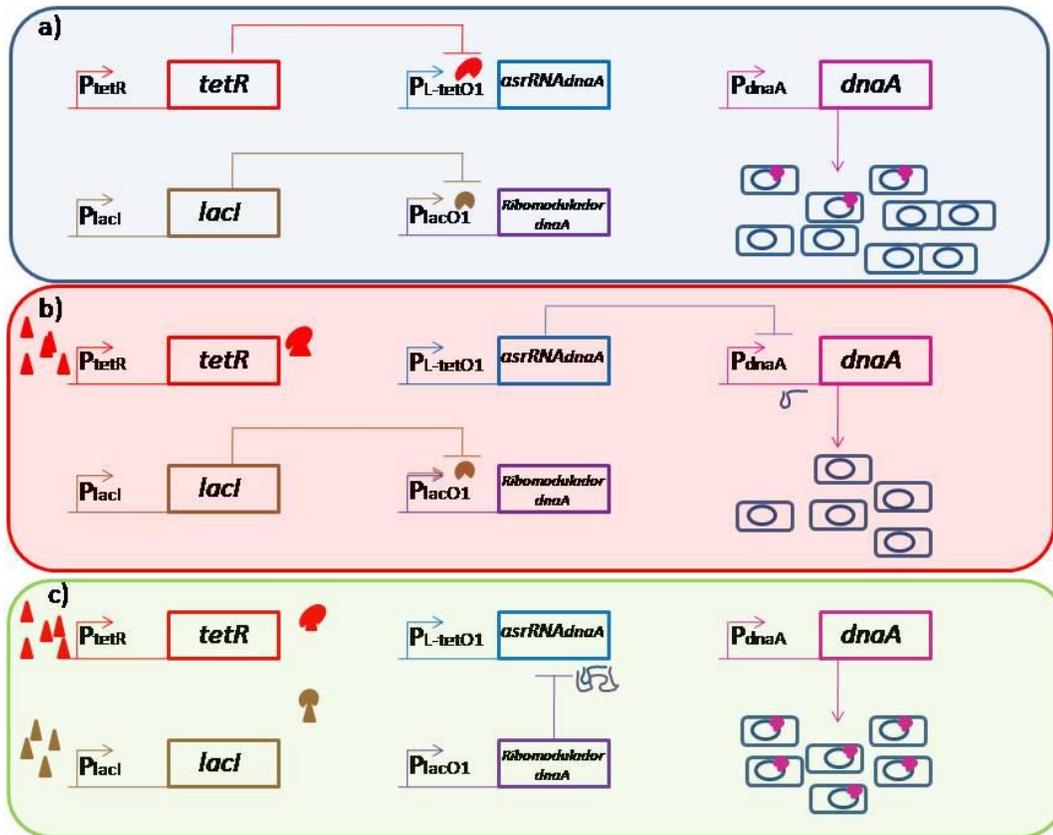


Fig. 21. Circuito genético de Sincronización de crecimiento celular parte II.a) El sistema está apagado, *dnaA* se traduce. b) Estado de transición. Se activa la transcripción del *asrRNA_{dnaA}* mediante la adición en el medio de ATc, se inhibe la traducción de *dnaA*, como consecuencia, se inhibe el proceso inicio de la replicación del DNA cromosomal. c) Estado final. Mediante la inducción de la transcripción del *P_{lacO1}* por la adición de IPTG al medio, el *ribomodulador-dnaA* titula al *asrRNA_{dnaA}* restableciéndose la traducción de *dnaA*, y el proceso replicación del DNA cromosomal se reestablece.

Mediante el uso del templado del BioBrick RM descrito en el capítulo 4 en la reacción de PCR y con los oligonucleótidos D-*dnaA*-SD-*PlacI* y *PtetO*-*dnaA*-SD (ver Tabla 1) se construyó el Sistema Predador-Presa *dnaA*. Posteriormente se clonó en el plásmido pMOS en el sitio *EcoRV* formando el plásmido pD1 en el cual se clonó posteriormente *tetR* en el sitio de *SmaI* generándose el vector pDNAa. El vector anterior se transformó en *E. coli* MG1665 generando la cepa *E. coli/pDNAa*.

Los resultados de la estrategia de regulación artificial del mRNA *dnaA* basados en el modelo predador-presa muestran que a las 6 horas después de la inducción del *asrRNA* que hibrida con la secuencia Shine-Dalgarno del mRNA de *dnaA* en *E. coli/pDNAa*, el crecimiento bacteriano se detiene y que cuando se adiciona el inductor para la expresión del predador o riborregulador de *asrRNA_{dnaA}*, el crecimiento se reinicia como se muestra en la Figura 22.

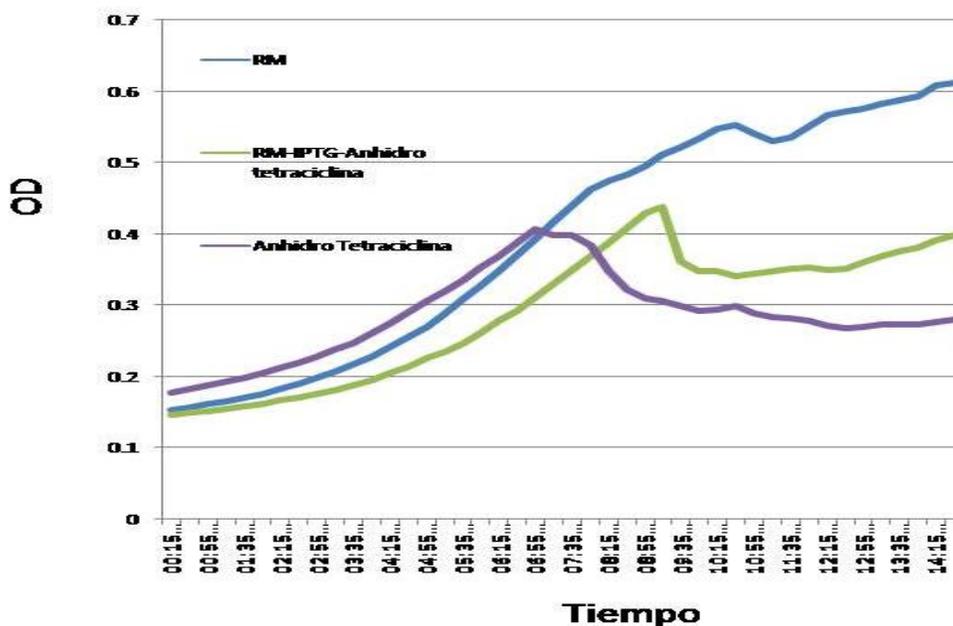


Fig. 22. Cinética de crecimiento de *E. coli/pDNAa* para la Sincronización del crecimiento bacteriano II. Las curvas de crecimiento en azul corresponden a aquellos cultivos cuyo medio no tiene inducción, por lo que el sistema de sincronización bacteriana está apagado. Las curvas en morado son aquellos cultivos celulares en donde se adicionó el inductor ATc [100ng/mL]. Estos cultivos representan el estado de transición del circuito de sincronización bacteriana II en donde el *asrRNA_{dnaA}* inhibe la traducción del mRNA *dnaA* deteniendo el proceso de replicación del DNA cromosomal. La curva en color verde corresponde al cultivo celular adicionado con el inductor ATc [100ng/mL] e IPTG [25µg/mL], deberían corresponder al estado final del circuito de sincronización bacteriana II, en donde el ribomodulador-*dnaA* debería de regular negativamente al *asrRNA_{dnaA}* liberando de la inhibición traduccional del mRNA *dnaA*. Sin embargo, el crecimiento observado de esta cultivo (gráfica verde), no corresponde al crecimiento esperado de haber existido liberación de la actividad inhibitora del *asrRNA_{dnaA}*.

El error que encontramos para el Sistema de Sincronización Bacteriana II es debido al contexto en el que se clonó la construcción genética, ya que dentro del vector *pMOSblue* se presenta el $P_{Lac}::lacZ\alpha$ y la disposición en la que se clonó la construcción quedó el ribomodulador en la cadena de DNA antisentido al promotor P_{Lac} , el ribomodulador-*dnaA* está fusionado al P_{LacO1} . Al inducir la expresión del ribomodulador-*dnaA*, también se activaba la transcripción del promotor P_{Lac} , por lo que se formaba un excludón⁴⁹-ribomodulador-*dnaA* y por tanto se cancelaba la función del ribomodulador-*dnaA*. Como perspectiva del presente proyecto se contempla cambiar el contexto genómico el cual permita la expresión y función de todas sus partes.

Por otra parte, en la Fig. 22, los valores de la curva de crecimiento del color morado donde se induce la función del *asrRNA_{dnaA}* se observa que ~6 horas después de la inducción, el cultivo llega a su máximo crecimiento y después se induce un proceso de lisis al observarse un cambio en la pendiente negativo. Estos datos son consistentes con la información donde se ha observado que daños en el material genético inducen lisis celular o también llamada apoptotic-like death⁶².

Discusión y conclusiones

El proceso de división celular que se desarrolla a partir de la fisión binaria es muy complejo. Las bacterias detectan el estatus metabólico y del medio en el que se encuentran para proliferar o parar el crecimiento poblacional interviniendo muchísimas partes del sistema de división celular, el adicionar más partes nuevas a este sistema es un tema muy complicado debido a la cantidad de variables presentes. Sin embargo, realizamos la búsqueda de los genes candidatos que podrían ser controlados de manera transitiva con nuestros diseños de circuitos genéticos artificiales. Seleccionamos el punto de inicio del proceso de replicación del DNA cromosomal y uno de los puntos finales del proceso de maduración del septum. Estos puntos de control deben de acoplarse de manera coordinada para que las bacterias que presentan el circuito logren sincronizar su ciclo celular poblacional. Esto es debido a que si solo se bloquea la síntesis de DNA cromosomal, las células filamentosas aumentan su masa de manera descontrolada y en el momento en el que se decida volver a reactivar el proceso de replicación, en la población bacteriana los tamaños entre una bacteria y otra serían diferentes, por lo que sus procesos metabólicos también. Si solo se inhibiera la maduración del septum, se seguiría sintetizando DNA cromosomal, por lo que en una célula con respecto a otra no tendrían el mismo número de cromosomas y cuando se restituyera el septum las células serían diploides, tetraploides, etc.

Capítulo 6. Perspectivas

Generando nuevos paradigmas dentro de la Biología Sintética aplicado al estudio de estresomas bacterianos

Consideramos que el empleo de nuestros asrRNAs en circuitos regulatorios constituirá un nuevo hito dentro de la Biología Sintética ya que introduce la capacidad de reversibilidad de la respuesta del circuito, una vez que éste ha sido inducido. Entre las grandes ventajas de esta propiedad de reversibilidad de respuesta que ofrecen los circuitos de regulación basados en asrRNAs está la de poder estudiar la respuesta celular de la inactivación transitoria de genes con funciones esenciales. Las perspectivas contemplan el estudio comparativo entre organismos de dicha inactivación transitoria de genes esenciales y la respuesta al estrés inducida por dichos insultos. Los organismos que hemos contemplado incluir en nuestro estudio incluyen a cinco organismos modelo filogenéticamente diferentes y que son:

- 1) *Escherichia coli* (Gamma-Proteobacteria).
- 2) *Rhodobactersphaeroides* (Alpha-Proteobacteria).
- 3) *Gemmata obscuriglobus* (Planctomycetes).
- 4) *Bacillus subtilis* (Firmicute).
- 5) *Methanococcus vannielii* (Archaeobacteria).

En una primera etapa del proyecto se contempla estudiar el estrés inducido por la inactivación transitoria de la traducción de tres proteínas esenciales que se enlistan a continuación:

1) La enzima CCA: Esta enzima, llamada también tRNA-nucleotidiltransferasa, adiciona a los tRNA en el extremo 3' los nucleótidos CCA, lo cual constituye un paso central para la maduración de los tRNA⁶³. En *E. coli* y en *B. subtilis* el gen *cca* es esencial y no tiene genes parálogos. La enzima CCA es una RNA polimerasa especializada que está conservada en todos los dominios de la vida. Consideramos que la inhibición de la traducción de esta enzima podría generar la síntesis del alarmón (guanosinapentafosfato (p)ppGpp)⁶⁴ debido a la ausencia de RNAs aminoacilados.

2) La subunidad beta de la enzima DNA polimerasa: Esta subunidad de la DNA polimerasa es esencial ya que se requiere para el proceso de replicación cromosomal. Se ha reportado que la acumulación celular de (p)ppGpp inhibe el inicio de la replicación celular⁶⁵. Proponemos que al no estar presente en el citoplasma celular la DNA polimerasa, al menos el alarmón seguiría encendido por lo cual se inhibiría la síntesis de rRNA y aumentaría la biosíntesis de aminoácidos.

3) El factor transcripcional *housekeeping sigma70*. En *E. coli* (*sigma70*) y *B. subtilis* (*sigmaA*), estos factores sigma dirigen la transcripción de la mayoría de los

genes en crecimiento exponencial. A pesar de que estas proteínas no son esenciales, debido a la presencia de sigmas parálogos que pueden reemplazar parcialmente su función, las relaciones estequiométricas de estos factores sigma parálogos y su afinidad por diversos promotores es distinta⁴⁶. Consideramos que la inhibición traduccional de este factor sigma nos permitirá estudiar las alteraciones significativas en la dinámica de las redes transcripcionales de los organismos en estudio.

Referencias

1. Cameron, D. E., Bashor, C. J. & Collins, J. J. A brief history of synthetic biology. *Nature reviews. Microbiology* **12**, 381–90 (2014).
2. Gardner, T. S., Cantor, C. R. & Collins, J. J. Construction of a genetic toggle switch in *Escherichia coli*. *Nature* **403**, 339–342 (2000).
3. Isaacs, F. J. *et al.* Engineered riboregulators enable post-transcriptional control of gene expression. *Nature biotechnology* **22**, 841–7 (2004).
4. Gottesman, S. Micros for microbes: Non-coding regulatory RNAs in bacteria. *Trends in Genetics* **21**, 399–404 (2005).
5. Zhang, F., Carothers, J. M. & Keasling, J. D. Design of a dynamic sensor-regulator system for production of chemicals and fuels derived from fatty acids. *Nature Biotechnology* **30**, 354–359 (2012).
6. Levskaya, A. *et al.* Engineering *Escherichia coli* to see light. *Nature* **438**, 441 (2005).
7. Williams, J. C. & Denison, T. From optogenetic technologies to neuromodulation therapies. *Science translational medicine* **5**, 177ps6 (2013).
8. Brennan, R. G. & Link, T. M. Hfq structure, function and ligand binding. *Current Opinion in Microbiology* **10**, 125–133 (2007).
9. Massé, E., Escorcia, F. E. & Gottesman, S. Coupled degradation of a small regulatory RNA and its mRNA targets in *Escherichia coli*. *Genes and Development* **17**, 2374–2383 (2003).

10. Takada, a, Wachi, M., Kaidow, a, Takamura, M. & Nagai, K. DNA binding properties of the hfq gene product of Escherichia coli. *Biochemical and biophysical research communications* **236**, 576–9 (1997).
11. FRANZE de FERNANDEZ, M. T. *et al.* Factor Fraction required for the Synthesis of Bacteriophage Q β -RNA. *Nature* **219**, 588–590 (1968).
12. Guillier, M., Gottesman, S. & Storz, G. Modulating the outer membrane with small RNAs. *Genes & development* **20**, 2338–48 (2006).
13. Tsui, H. C. T., Leung, H. C. E. & Winkler, M. E. Characterization of broadly pleiotropic phenotypes caused by an hfq insertion mutation in Escherichia coli K-12. *Molecular Microbiology* **13**, 35–49 (1994).
14. Mikulecky, P. J. *et al.* Escherichia coli Hfq has distinct interaction surfaces for DsrA, rpoS and poly(A) RNAs. *Nature structural & molecular biology* **11**, 1206–14 (2004).
15. Morita, T., Maki, K. & Aiba, H. RNase E-based ribonucleoprotein complexes: Mechanical basis of mRNA destabilization mediated by bacterial noncoding RNAs. *Genes and Development* **19**, 2176–2186 (2005).
16. Rajkowitsch, L. & Schroeder, R. Dissecting RNA chaperone activity. *RNA (New York, N.Y.)* **13**, 2053–2060 (2007).
17. Mohanty, B. K., Maples, V. F. & Kushner, S. R. The Sm-like protein Hfq regulates polyadenylation dependent mRNA decay in Escherichia coli. *Molecular Microbiology* **54**, 905–920 (2004).
18. Storz, G., Opdyke, J. A. & Zhang, A. Controlling mRNA stability and

translation with small, noncoding RNAs. *Current Opinion in Microbiology* **7**, 140–144 (2004).

19. Wang, J. *et al.* sRNATarBase 3.0: an updated database for sRNA-target interactions in bacteria. *Nucleic Acids Research* **44**, gkv1127 (2015).
20. Sharma, C. M. & Vogel, J. Experimental approaches for the discovery and characterization of regulatory small RNA. *Current Opinion in Microbiology* **12**, 536–546 (2009).
21. Backofen, R. *et al.* Bioinformatics of prokaryotic RNAs. *RNA biology* **11**, 470–83 (2014).
22. Coleman, J., Green, P. J. & Inouye, M. The use of RNAs complementary to specific mRNAs to regulate the expression of individual bacterial genes. *Cell* **37**, 429–436 (1984).
23. Balasubramanian, D., Rangunathan, P. T., Fei, J. & Vanderpool, C. K. A Prophage-Encoded Small RNA Controls Metabolism and Cell Division in *E. coli*. *Molecular Biology and Physiology* **1**, 1–18 (2016).
24. Griffiths-Jones, S., Bateman, A., Marshall, M., Khanna, A. & Eddy, S. R. Rfam: An RNA family database. *Nucleic Acids Research* **31**, 439–441 (2003).
25. Martinez-Guerrero, C. E., Ciria, R., Abreu-Goodger, C., Moreno-Hagelsieb, G. & Merino, E. GeConT 2: gene context analysis for orthologous proteins, conserved domains and metabolic pathways. *Nucleic acids research* **36**, (2008).
26. Bailey, T. L., Williams, N., Misleh, C. & Li, W. W. MEME: Discovering and analyzing DNA and protein sequence motifs. *Nucleic Acids*

Research **34**, (2006).

27. Xayaphoummine, A., Bucher, T. & Isambert, H. Kinefold web server for RNA/DNA folding path and structure prediction including pseudoknots and knots. *Nucleic Acids Research* **33**, (2005).
28. Blount, K. F. & Uhlenbeck, O. C. The structure-function dilemma of the hammerhead ribozyme. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **34**, 415–440 (2005).
29. Datsenko, K. A. & Wanner, B. L. One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 6640–5 (2000).
30. Tsui, H.-C. T., Leung, H.-C. E. & Winkler, M. E. Characterization of broadly pleiotropic phenotypes caused by an hfq insertion mutation in Escherichia coli K-12. *Molecular Microbiology* **13**, 35–49 (1994).
31. Na, D. *et al.* Metabolic engineering of Escherichia coli using synthetic small regulatory RNAs. *Nature biotechnology* **31**, 170–4 (2013).
32. Colloms, S. D. The topology of plasmid-monomerizing Xer site-specific recombination. *Biochemical Society transactions* **41**, 589–94 (2013).
33. Colloms, S. D., Bath, J. & Sherratt, D. J. Topological selectivity in Xer site-specific recombination. *Cell* **88**, 855–864 (1997).
34. Alén, C., Sherratt, D. J. & Colloms, S. D. Direct interaction of aminopeptidase A with recombination site DNA in Xer site-specific recombination. *EMBO Journal* **16**, 5188–5197 (1997).

35. Million-Weaver, S. & Camps, M. Mechanisms of plasmid segregation: Have multicopy plasmids been overlooked? *Plasmid* **75**, 27–36 (2014).
36. Zaman, M., Pasha, M. & Akhter, M. Plasmid Curing of *Escherichia coli* Cells with Ethidium Bromide, Sodium Dodecyl Sulfate and Acridine Orange. *Bangladesh Journal of Microbiology* **27**, 28–31 (2011).
37. Lutz, R. & Bujard, H. 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**, 1203–1210 (1997).
38. Henriques Normark, B. & Normark, S. Evolution and spread of antibiotic resistance. *Journal of Internal Medicine* **252**, 91–106 (2002).
39. Hillenbrand, P., Fritz, G. & Gerland, U. Biological Signal Processing with a Genetic Toggle Switch. *PLoS ONE* **8**, e68345 (2013).
40. Elowitz, M. B. & Leibler, S. A synthetic oscillatory network of transcriptional regulators. *Nature* **403**, 335–338 (2000).
41. Qi, L., Haurwitz, R. E., Shao, W., Doudna, J. A. & Arkin, A. P. RNA processing enables predictable programming of gene expression. *Nature Biotechnology* (2012). doi:10.1038/nbt.2355
42. Basu, S., Gerchman, Y., Collins, C. H., Arnold, F. H. & Weiss, R. A synthetic multicellular system for programmed pattern formation. *Nature* **434**, 1130–1134 (2005).
43. Goldberg, A. D., Allis, C. D. & Bernstein, E. Epigenetics: A Landscape Takes Shape. *Cell* **128**, 635–638 (2007).

44. Zhu, L. *et al.* Precision methylome characterization of *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) using PacBio single-molecule real-time (SMRT) technology. *Nucleic Acids Research* **44**, 730–743 (2016).
45. Sharma, U. K. & Chatterji, D. Transcriptional switching in *Escherichia coli* during stress and starvation by modulation of $\sigma 70$ activity. (2010). doi:10.1111/j.1574-6976.2010.00223.x
46. Sharma, U. K. & Chatterji, D. Transcriptional switching in *Escherichia coli* during stress and starvation by modulation of $\sigma 70$ activity. *FEMS Microbiology Reviews* **34**, 646–657 (2010).
47. Thieffry, D., Salgado, H., Huerta, A. M. & Collado-Vides, J. Prediction of transcriptional regulatory sites in the complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Bioinformatics* **14**, 391–400 (1998).
48. Payne, J. L. & Wagner, A. Mechanisms of mutational robustness in transcriptional regulation. *Frontiers in Genetics* **6**, (2015).
49. Sesto, N., Wurtzel, O., Archambaud, C., Sorek, R. & Cossart, P. The excludon: a new concept in bacterial antisense RNA-mediated gene regulation. *Nature Reviews Microbiology* **11**, 75–82 (2012).
50. Maeda, H., Fujita, N. & Ishihama, a. Competition among seven *Escherichia coli* sigma subunits: relative binding affinities to the core RNA polymerase. *Nucleic acids research* **28**, 3497–3503 (2000).
51. Baba, T. *et al.* Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Molecular systems biology* **2**, 2006.0008 (2006).
52. Purcell, O. & Lu, T. K. Synthetic analog and digital circuits for cellular

- computation and memory. *Current Opinion in Biotechnology* **29**, 146–155 (2014).
53. Wang, J. D. & Levin, P. A. Metabolism, cell growth and the bacterial cell cycle. *Nature microbiology reviews* **7**, 822–827 (2009).
 54. Mathis, R. & Ackermann, M. Response of single bacterial cells to stress gives rise to complex history dependence at the population level. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **113**, 4224–4229 (2016).
 55. Kim, J. & Copley, S. D. Why metabolic enzymes are essential or nonessential for growth of Escherichia coli K12 on glucose. *Biochemistry* **46**, 12501–12511 (2007).
 56. Regev, T., Myers, N., Zarivach, R. & Fishov, I. Association of the chromosome replication initiator dnaa with the escherichia coli inner membrane in vivo: Quantity and mode of binding. *PLoS ONE* **7**, (2012).
 57. Bates, D. The bacterial replisome: Back on track? *Molecular Microbiology* **69**, 1341–1348 (2008).
 58. Jonas, K., Liu, J., Chien, P. & Laub, M. T. Proteotoxic stress induces a cell-cycle arrest by stimulating lon to degrade the replication initiator DnaA. *Cell* **154**, 623–636 (2013).
 59. Chodavarapu, S., Felczak, M. M., Simmons, L. A., Murillo, A. & Kaguni, J. M. Mutant DnaAs of Escherichia coli that are refractory to negative control. *Nucleic Acids Research* **41**, 10254–10267 (2013).
 60. Lutkenhaus, J., Pichoff, S. & Du, S. Bacterial cytokinesis: From Z ring to divisome. *Cytoskeleton* **69**, 778–790 (2012).

61. Lorenz, R. *et al.* ViennaRNA Package 2.0. *Algorithms for Molecular Biology* **6**, 26 (2011).
62. Erental, A., Sharon, I. & Engelberg-Kulka, H. Two Programmed Cell Death Systems in *Escherichia coli*: An Apoptotic-Like Death Is Inhibited by the *mazEF*-Mediated Death Pathway. *PLoS Biol* **10**, e1001281 (2012).
63. Betat, H. & Mörl, M. The CCA-adding enzyme: A central scrutinizer in tRNA quality control. *BioEssays* n/a-n/a (2015). doi:10.1002/bies.201500043
64. Wu, J. & Xie, J. Magic spot: (p) ppGpp. *Journal of Cellular Physiology* **220**, 297–302 (2009).
65. Gaca, A. O., Colomer-Winter, C. & Lemos, J. A. Many means to a common end: The intricacies of (p)ppGpp metabolism and its control of bacterial homeostasis. *Journal of Bacteriology* **197**, 1146–1156 (2015).

Apéndice 1. Métodos

1. Protocolo de PCR con la DNA polimerasa AccuPrime TM Pfx.

Todas las amplificaciones de esta tesis se llevaron a cabo bajo las condiciones y los componentes que a continuación se mencionan.

Componentes:

- Agua destilada estéril.
- Mix de reacción AccuPrime TM Pfx 10X (incluye dNTPs).
- MgSO₄ 50 mM
- Templado a una concentración de 10 pg- 200 ng.
- Oligos a una concentración de 20 pmol/ μ l cada uno.
- Enzima AccuPrime 1.25 unidades.

El ciclado de cada PCR varió, ya que variaban las TM de los oligos y el tiempo de extensión está supeditado a la longitud de la cadena a amplificarse. Cabe señalar que la enzima AccuPrime TM Pfx realiza la extensión a 68°C a diferencia de la Taq polimerasa que lo realiza comúnmente a 72°C. Otra de las cualidades de dicha enzima es que posee la misma fidelidad que la enzima Pfu y tiene una rápida tasa de extensión, por lo que fue seleccionada para realizar las reacciones de PCR ya que requeríamos de la amplificación precisa de nuestros diseños (sin adeninas adicionales en los extremos).

2. Protocolo de electroforesis.

La concentración del gel de agarosa depende del tamaño de los fragmentos de ADN a separar, siendo la concentración mínima el 0.7% (fragmentos grandes de varias Kpb) y la máxima el 4% (fragmentos de 50-150 pb). Se pesó 1gr de agarosa y se disolvió en 100ml de buffer TAE (Tris-acetatos; Tris-Acetato 0.04M, EDTA 0.001M) para que quedara a una concentración del 1%. Para disolver la agarosa se calentó la solución en el horno de microondas, posteriormente se dejó enfriar y se procedió al pre-teñido del gel con bromuro de etidio (5 mg/ml) agregando 0.5 μ l por 25ml de agarosa. Se transfiere la agarosa teñida a una cubeta de electroforesis previamente preparada con el tamaño del peine requerido para la cantidad de solución objetivo y se deja enfriar. Posteriormente cuando la agarosa ha gelificado, el peine se desprendió

del gel y se transfirió a la cámara de electroforesis. Se llenó la cámara de electroforésis con buffer TAE a que cubra el gel y se cargaron las muestras previamente mezcladas con Azul de bromofenol 0.25%. La electroforesis se efectuó a 100 volts y se visualizó con la transferencia de rayos UV (365nm) en el transiluminador.

3. Protocolo de purificación de los productos de PCR

Todos los productos de PCR se purificaron mediante el Kit High Pure PCR Product Purification de la compañía Roche Applied Science, bajo el siguiente protocolo. A los PCR cuyo producto se visualizaba por electroforesis en un gel de agarosa al 1% como banda única se les consideró PCR específicos por lo que no tuvo que pasar por un gel preparativo para su purificación y se realizó la purificación de la siguiente manera: a cada 100µl de la reacción de PCR se le agregaron 500 µl de buffer de unión a DNA, posteriormente el líquido se pasó a la columna que contiene el filtro del Kit previamente conectado con el tubo colector, se centrifugó la muestra durante un minuto a 13,000 rpm. Se desechó el líquido del tubo colector y a la columna se le agregaron 500 µl del buffer lavado. La muestra se centrifugó durante un minuto a 13,000 rpm y se desechó el líquido. Se repitió este paso nuevamente cambiando el volumen del buffer de lavado a 250 µl. Finalmente se cambió el tubo colector por un tubo estéril eppendorf sin tapa, se le agregaron 100 µl de agua estéril a la columna y se centrifugó durante un minuto a 13,000 rpm. Sin embargo no todos los PCR se lograron obtener específicos, por lo que el tamaño de la banda que correspondía a la amplificación de DNA esperada fue extraído mediante el corte directo de la banda contenida en un gel preparativo de agarosa al 1%. El protocolo que se aplicó fue prácticamente el mismo, a diferencia de lo siguiente. La banda de agarosa escindida fue pesada con un tubo eppendorf (previamente pesado) en una balanza analítica, por cada 100mg de l gel de agarosa se le añadieron 300 µl del Buffer de unión y se siguieron los mismos pasos del Protocolo de purificación de productos de PCR antes expuestos.

4. Protocolo de preparación de células electrocompetentes.

Medio YENB (bacto yeast extract 0.75%, bacto nutrient Broth 0.85).

Medio RM (sales M9 10X, glucosa al 20%, MgSO₄ 1µM y casaminoácidos 2%).

Se inoculó la cepa Escherichia coli DH5α (o la de interés) mediante una azada en 5 ml de medio líquido YENB, y se incubó la muestra a 37°C en agitación constante por 12 horas. Posteriormente, a cada uno de 4 matraces erlenmeyer de 250 ml se añadieron 50 ml de medio líquido YENB y 500µl del cultivo de Escherichia coli DH5α crecido durante toda la noche (ON). Este inóculo se dejó crecer a 37°C en agitación constante; a la hora y media se comenzaron las mediciones en el espectrofotómetro

con una longitud de onda de 600nm cada 15 min para determinar la densidad óptica a la que se encontraba el cultivo, al llegar a la OD de 0.6 se transfirió cada cultivo a un tubo falcón de 50ml y se dejó enfriar en hiel o durante 10 min. Al pasar el tiempo de enfriamiento se centrifugó por 10min/5,000rpm a 4°C, se resuspendió la pastilla en 1 ml de agua fría a una temperatura ambiente de 4°C. Ya que se había resuspendido la pastilla se le agregaron 49ml de agua fría y se centrifugo por 10min/5,000 rpm a 4°C, se repitió el paso anterior pero solamente se le añadió la mitad del volumen de agua fría. A cada pastilla resultante del paso anterior se resuspendió con 1ml de glicerol al 10% frío y se centrifugó de igual manera, repitiendo dos veces. Finalmente la pastilla se resuspendió en 150µl de glicerol al 10% y se hicieron alícuotas de 40 µl en tubos eppendorf cuales fueron guardadas a -70°C.

5. Purificación de DNA plasmídico (Minipreps)

Se llevó a cabo la extracción del DNA plasmídico mediante el kit Wizard® Plus SV de Promega. Se creció un inóculo en 5ml de medio LB durante 12h a 37°C con agitación constante, posteriormente se centrifugó el cultivo a 13,000 rpm durante un minuto, se decantó el medio LB y se resuspendió la pastilla con 250µl de la solución de resuspensión del kit mediante el vortex, se lisaron las células mediante la adición al medio de 250 µl de la solución de lisis invirtiendo el tubo eppendorf cuatro veces y agregándole 10 µl de la solución de proteasa alcalina invirtiendo cuatro veces el tubo eppendorf para mezclar las soluciones, se incubó la muestra durante 5min a temperatura ambiente y posteriormente se le agregaron 350 µl de la solución de neutralización invirtiendo el tubo eppendorf cuatro veces para mezclar y se centrifugó a 13,000 rpm durante 10 min. Del resultado de los pasos anteriores se decantó el sobrenadante transparente y se transfirió a la columna que incluye el kit previamente conectada con el tubo colector, se centrifugó durante un minuto a 13 000 rpm y se decantó el líquido contenido en el tubo conector, se procedió a limpiarla muestra mediante la adición de 750 µl de la solución de lavado del kit y se centrifugó durante un minuto a 13,000 rpm decantando el líquido que pasó por la columna, se repitió el paso anterior con la reducción a 250 µl de la solución de lavado, se secó la columna decantando el líquido mediante centrifugación a 13,000 rpm durante dos minutos. Finalmente se obtuvo el DNA al añadir 100 µl de agua libre de nucleasas a la columna. Para verificar la presencia y concentración de DNA se realizó la electroforesis en gel de agarosa al 1%.

6. Protocolo de purificación de DNA cromosomal mediante lisis alcalina.

Se inoculó mediante asada 5ml de medio LB de la cepa de interés, se creció a 37oC en agitación constante por 12 horas. Se centrifugó en un tubo eppendorf el cultivo a 13,000 rpm durante 2 min, se decantó el supernadante y nos quedamos con el pellet. El pellet se resuspendió pipeteando en 567 µl de buffer TE (10 mM de Tris-HCl pH 7.5, 1mM de EDTA pH 8), se le adicionaron 30 µl de SDS al 10% y 3 µl de

proteínasa K a una concentración 20 mg/ml (concentración final de 100 µg/ml de proteínasa K en 0.5% de SDS), se mezcló mediante la agitación del Vortex y se incubó durante una hora a 37°C. Después de la incubación, se le adicionaron 100 µl de NaCl 5M y se mezcló con el vortex, se le agregaron 80 µl de la solución CTAB/NaCl mezclándose al agitarse en el vortex para posteriormente ser incubado por 10 min a 65°C. Posteriormente se le adicionó un volumen equivalente (0.7 a 0.8 ml) de 24:1 cloroformo/ isoamil alcohol, se mezcló y se centrifugó durante 5 min a 13,000 rpm y se removió la fase acuosa para transferirse a un tubo eppendorf estéril el supernadante viscoso. Se le adicionó un volumen equivalente de 25:24:1 fenol/cloroformo/alcohol isoamílico, se mezcló y se centrifugó durante 5 min a 13,000 rpm. El supernadante se transfirió a un tubo eppendorf estéril y se le adicionaron 0.6 del volumen de isopropanol para precipitar los ácidos nucleicos. Se centrifugó durante 5 min a 13,000 rpm, se desechó el supernadante y se le agregó 1 ml de etanol al 70%. Se centrifugó 1 min a 13,000 rpm, se desechó el líquido y se secó la muestra para finalmente resuspenderlo en 100 µl de agua.

Apéndice 2. Tabla de Oligos

Nombre	#bases	Secuencia
PllacO-1 RC	56	TGT GCT CAG TAT CTT GTT ATC CGC TCA CAA TGT CAA TGT TAT CCG CTC ACA TTT AT
PlacIol-tetR	47	TGT CAA TGT TAT CCG CTC ACA TTT ATC CAA CCG AAC CAC TTC ACG CG
lacI-PtetO1	49	GAT GTC AAT CTC TAT CAC TGA TAG GGA CAC CAT CGA ATG GCG CAA AAC C
D-dnaA-SD-PlacI	48	CAA AAG TCG GCG CGT TTT TCG CGC TGT GCT CAG TAT CTT GTT ATC CGC
PtetO-dnaA-SD	48	CGC CGA CTT TTG TTC GAG TGG AGG ATG TGC TCA GTA TCT CTA TCA CTG
D-dnaA-ORF-Plac	48	GAG GGC GCG TTT TTC GCG CTT TTT TGT GCT CAG TAT CTT GTT ATC CGC
PtetO-dnaA-ORF	47	CCT CGA TTG GGT ACG GGA CAA GGA TGT GCT CAG TAT CTC TAT CAC TG
PtetO-control	48	CGC GGC CAA TGT TGT GTT TGA GCG ATG TGC TCA GTA TCT CTA TCA CTG
Control arRNA	40	AAA AAG CGC GAA AAA CGC GCG GCC AAT GTT GTG TTT GAG C
D-rpoD	64	AAA AAG GCG GAA AAA CCG CCG GTA TCC ACA CTT ATT TCA TGA GGG CGC GTT TTT CGC GCT TTT T
D-rpoD-lacI	51	CAT GAG GGC GCG TTT TTC GCG CTT TTT TGT GCT CAG TAT CTT GTT ATC CGC
TetO-antirpoD	48	CCC TCA TGA AAT AAG TGT GGA TAC CGA TGT GCT CAG TAT CTC TAT CAC
anti-rpoD	44	AAA AAG CGC GAA AAA CGC GCC CTC ATG AAA TAA GTG TGG ATA CC
PROMOTORES sacB	52	Ttg aca tca caa tta tac gaa gat ata atC AAA CAG GAG GGC TGG AAG AAG C
tetO-t7	56	CTA TCA GTG ATA GAG ATA CTG AGC ACA TCa aga ggc act aaa tga aca cga tta ac
A-tetO	58	ATC CCT ATC AGT GAT AGA GAT TGA CAT CCC TAT CAG TGA TAG AGA TAC TGA GCA CAT C
T7 weak-tetO	54	cga agt aat acg act cac tat tag gga agA TCC CTA TCA GTG ATA GAG ATT GAC
t7 3?	22	TTA CGC GAA CGC GAA GTC CGA C
t7 strong	30	Taa tac gac tca cta tag gga gac cac aac
t7 weak	30	cga agt aat acg act cac tat tag gga aga
arRNArpoDt7min	53	AAA AAG CGC GAA AAA CGC GCC CTC ATG AAA TAA GTG TGG ATA CCT TCC CCT AT
arRNArpoDt7stro	47	CCC TCA TGA AAT AAG TGT GGA TAC CGT TGT GGT CTC CCT ATA GTG AG
arRNArpoDt7weak	49	CCC TCA TGA AAT AAG TGT GGA TAC CGT TGT GGT CTC CCT ATA GTG AGT C
arRNArpoD RC	44	AAA AAG CGC GAA AAA CGC GCC CTC ATG AAA TAA GTG TGG ATA CC
pms-t7-STRONG	23	GGG GAC CGA TTA ATA CGA CTC AC
pms-t7-WEAK	22	GGG GAC CGA Tcg aag taa tac g
tetOplano RC	47	GCC CGC AAT TTC ACA CAG GAA AAT GAT GTG CTC AGT ATC TCT ATC AC
tetO1 sRNA 1 RC	51	CAG GAA AAG TGT GAA ATT GCT GCA ATT TGA TGT GCT CAG TAT CTC TAT CAC
T7 Plano RC	47	GCC CGC AAT TTC ACA CAG GAA AAG TTG TGG TCT CCC TAT AGT GAG TC

T7 sRNA RC	51	CAG GAA AAG TGT GAA ATT GCT GCA ATT GTT GTG GTC TCC CTA TAG TGA GTC
Km lacZ beta 3?	45	GCG GGG AGC GTC ACA CTG AGG GAA TCG AAA TCT CGT GAT GGC AGG
lacZ beta 3? RC	49	GGT CAG ATG CGG GAT GGC GTG GGA CGC GGC GGG GAG CGT CAC ACT GAG G
fruB sacB	56	gca att agg aaa aat ggc aaa aaa ttg tGC TTT TAT ATA GTT CAT ATG GGA TTC AC
Km set B RC	50	GTT ATG AGC AAA AGT TTG ATG TGC TGC AGC ACA CGG TCA CAC TGC TTC CG
tetR sacB RC	50	CTG GCA GGA GGC GCA ACT CAA GGC TTT TAA GAC CCA CTT TCA CAT TTA AG
SACB	48	CAG TAT TAA CCT TTA CTA CCG CAC TGC TGG CAG GAG GCG CAA CTC AAG
RCparatet	48	CAG TAT TAA CCT TTA CTA CCG CAC TGC TGG CAG GAG GCG CAA CTC AAG
Tet-5?	24	GGC GTA TCA CGA GGC CCT TTC GTC
fruB	50	GAT CGC GCT GAA ACG TTT CAA GAA AGC ATA ATA CTT CTG TTT CAG CAC GC
fruB_Kana	48	GCA TAA TAC TTC TGT TTC AGC ACG Cga atc gaa atc tcg tga tgg cag
setB	52	CAG CAA TTA GGA AAA ATG GCA AAA AAT TGT GCA GCA CAT CAA ACT TTT GCT C
SDT7PROMOTER XBA	40	TCT AGA tac gac tca cta tag gga aca cac agg aaa cag c
terminador2X 5'	23	TGA AAA ACG CCC GGT ATA AGC GG
terminador2X 3'	25	TTA TAT TCA CAA AAA GAC AAC AGG C
T7polSD	53	cta tag gga aca cac agg aaa cag cta tga aca cga tta aca tcg cta aga ac
tetO-arRNAftsN	50	gaa taa ata cag cga aac gat agt gGA TGT GCT CAG TAT CTC TAT CAC TG
arRNAftsN	46	AAA AAG CGC GAA AAA CGC GCC gaa taa ata cag cga aac gat agt g
lacO1-darRNAfts	50	tcG GCG CGT TTT TCG CGC TTT Ttt gaT GTG CTC AGT ATC TTG TTA TCC GC
darRNAftsN1	48	Ccc act atc gtt tcg ctg tat tta ttc GGC GCG TTT TTC GCG CTT TTT
darRNAftsN2	45	AAA AAG GCG GAA AAA CCG CCc act atc gtt tcg ctg tat tta ttc
argR-Km	49	ggc gcc cca gct ggc aat tcc CCT AAA CTC CTT ATT ATA TTG ATA AAC T
xerD-Km	47	ggc gcc cca gct ggc aat tcc aac gta agc ttc tcg att ctg ctg tg
pepA-Km	47	ggc gcc cca gct ggc aat tcc ttt aaa tac gcc cgt aaa aac tcg tc
3«sist.recom bin	24	GGA AGG ATC TGA GGT TCT TAT GGC
5-mod-PLtetO1	57	TCT CTG TCA GTG ATA TAC ATT GAC ATC TCT GTC AGT GAT ATA GAT ACT GAG CAC ATC
3-mod-PLtetO1	57	GAT GTG CTC AGT ATC TAT ATC ACT GAC AGA GAT GTC AAT GTA TAT CAC TGA CAG AGA
Anti-lacZ atg	45	CCA GTG AAT CCG TAA TCA TGG TCA TCG GGC TTT TTG CCC GTT TTT
Anti-lacZ atg R	45	AAA AAC GGG CAA AAA GCC CGA TGA CCA TGA TTA CGG ATT CAC TGG
Anti-lacZ ORF	42	GCG CCA TTC GCC ATT CAG GCT GCG GGC TTT TTG CCC GTT TTT
Anti-lacZ ORF R	42	AAA AAC GGG CAA AAA GCC CGC AGC CTG AAT GGC GAA TGG CGC
anti-anti-PLANO	38	CAA TTT CAC ACA GGA AAA CGG GCT TTT TGC CCG TTT TT
anti-anti-Pla-R	38	AAA AAC GGG CAA AAA GCC CGT TTT CCT GTG TGA AAT TG
sin-lacZ-RC	26	GGG CTG TGG GCG GTT GTG GGC GAC TG
orf puc19	30	TCG ACA AAG GAC ACA CTT TAA CAA TAG GCG
Competidor lacZ	42	GAA ATT GTT ATC CGC TCA Caa tCG GGC TTT TTG CCC GTT TTT
Compe lacZ RC	42	AAA AAC GGG CAA AAA GCC CGA TTG TGA GCG GAT AAC AAT TTC
Competidor SD	42	TCC TGT GTG AAA TTG TTA TCC GCG GGC TTT TTG CCC GTT TTT

CompetidorSD RC	42	AAA AAC GGG CAA AAA GCC CGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GGA
Predador lacZ	62	AAA AAC GGG CAA AAA GCC CGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GGA gcg cgt tta tcg cgc ttt tt
Depreda lacZ RC	62	AAA AAG CGC GAT AAA CGC GCT CCT GTG TGA AAT TGT TAT CCG CGG GCT TTT TGC CCG TTT TT
tetO- recombinas	52	CCT ATC AGT GAT AGA GAT ACT GAG CAC ATC GAG TAC TGC ACT CGC AAC GCT G
lacZ 3? RC	29	AGC TGT TTC CTG TGT GAA ATT GTT ATC CG
LacZ 5? interge	26	GTA CAA TCT GCT CTG ATG CCG CAT AG
LacI5?	22	Cac cat cga atg gcg caa aac c
LacI3? RC	22	GTA AAG CCT GGG GTG CCT AAT G
antiSD dnaA	40	CTC CAC TCG AAC AAA AGT CGg cgc gtt ttt cgc gct ttt t
antiSD dnaA RC	40	AAA AAG CGC GAA AAA CGC GCC GAC TTT TGT TCG AGT GGA G
predaantiSDd naA	55	CGC CGA AAA ACG CGC CGA CTT TTG TTC GAG TGG AGg gcg gtt ttt ccg cct ttt t
predantiSDdn aAR	55	AAA AAG GCG GAA AAA CCG CCC TCC ACT CGA ACA AAA GTC GGC GCG TTT TTC GCG C
antiORF dnaA	42	CTT GTC CCG TAC CCA ATC GAG Ggc gcg ttt ttc gcg ctt ttt
antiORF dnaA RC	42	AAA AAG CGC GAA AAA CGC GCC CTC GAT TGG GTA CGG GAC AAG
depreORF dnaA	62	AAA AAG CGC GAA AAA CGC GCC CTC GAT TGG GTA CGG GAC AAG ggc ggt ttt tcc gcc ttt tt
depreORF dnaAR	62	AAA AAG GCG GAA AAA CCG CCC TTG TCC CGT ACC CAA TCG AGG GCG CGT TTT TCG CGC TTT TT
PLlacO-1	56	Ata aat gtg agc gga taa cat tga cat tgt gag cgg ata aca aga tac tga gca ca
PLlacO-1 RC	56	TGT GCT CAG TAT CTT GTT ATC CGC TCA CAA TGT CAA TGT TAT CCG CTC ACA TTT AT
PlacIol-tetR	47	TGT CAA TGT TAT CCG CTC ACA TTT ATC CAA CCG AAC CAC TTC ACG CG
lacI-PtetO1	49	GAT GTC AAT CTC TAT CAC TGA TAG GGA CAC CAT CGA ATG GCG CAA AAC C
D-dnaA-SD- PlacI	48	CAA AAG TCG GCG CGT TTT TCG CGC TGT GCT CAG TAT CTT GTT ATC CGC
PtetO-dnaA- SD	48	CGC CGA CTT TTG TTC GAG TGG AGG ATG TGC TCA GTA TCT CTA TCA CTG
D-dnaA-ORF- Plac	48	GAG GGC GCG TTT TTC GCG CTT TTT TGT GCT CAG TAT CTT GTT ATC CGC
PtetO-dnaA- ORF	47	CCT CGA TTG GGT ACG GGA CAA GGA TGT GCT CAG TAT CTC TAT CAC TG
PtetO- control Control arRNA	48	CGC GGC CAA TGT TGT GTT TGA GCG ATG TGC TCA GTA TCT CTA TCA CTG
D-rpoD	64	AAA AAG GCG GAA AAA CCG CCG GTA TCC ACA CTT ATT TCA TGA GGG CGC GTT TTT CGC GCT TTT T
D-rpoD-lacI	51	CAT GAG GGC GCG TTT TTC GCG CTT TTT TGT GCT CAG TAT CTT GTT ATC CGC
TetO- antirpoD	48	CCC TCA TGA AAT AAG TGT GGA TAC CGA TGT GCT CAG TAT CTC TAT CAC
anti-rpoD	44	AAA AAG CGC GAA AAA CGC GCC CTC ATG AAA TAA GTG TGG ATA CC
PROMOTORES sacB	52	Ttg aca tca caa tta tac gaa gat ata atC AAA CAG GAG GGC TGG AAG AAG C
tetO-t7	56	CTA TCA GTG ATA GAG ATA CTG AGC ACA TCa aga ggc act aaa tga aca cga tta ac
A-tetO	58	ATC CCT ATC AGT GAT AGA GAT TGA CAT CCC TAT CAG TGA TAG AGA TAC TGA GCA CAT C
T7 weak-tetO	54	cga agt aat acg act cac tat tag gga agA TCC CTA TCA GTG ATA GAG ATT GAC
t7 3?	22	TTA CGC GAA CGC GAA GTC CGA C
t7 strong	30	Taa tac gac tca cta tag gga gac cac aac

t7 weak	30	cga agt aat acg act cac tat tag gga aga
arRNArpoDt7m in	53	AAA AAG CGC GAA AAA CGC GCC CTC ATG AAA TAA GTG TGG ATA CCT TCC CCT AT
arRNArpoDt7s tro	47	CCC TCA TGA AAT AAG TGT GGA TAC CGT TGT GGT CTC CCT ATA GTG AG
arRNArpoDt7w eak	49	CCC TCA TGA AAT AAG TGT GGA TAC CGT TGT GGT CTC CCT ATA GTG AGT C
arRNArpoD RC	44	AAA AAG CGC GAA AAA CGC GCC CTC ATG AAA TAA GTG TGG ATA CC
pMos-t7- STRONG	23	GGG GAC CGA TTA ATA CGA CTC AC
pMos-t7-WEAK	22	GGG GAC CGA Tcg aag taa tac g
tetOplano RC	47	GCC CGC AAT TTC ACA CAG GAA AAT GAT GTG CTC AGT ATC TCT ATC AC
tetO1 sRNA 1 RC	51	CAG GAA AAG TGT GAA ATT GCT GCA ATT TGA TGT GCT CAG TAT CTC TAT CAC
T7 Plano RC	47	GCC CGC AAT TTC ACA CAG GAA AAG TTG TGG TCT CCC TAT AGT GAG TC
T7 sRNA RC	51	CAG GAA AAG TGT GAA ATT GCT GCA ATT GTT GTG GTC TCC CTA TAG TGA GTC
Km lacZ beta 3?	45	GCG GGG AGC GTC ACA CTG AGG GAA TCG AAA TCT CGT GAT GGC AGG
lacZ beta 3? RC	49	GGT CAG ATG CGG GAT GGC GTG GGA CGC GGC GGG GAG CGT CAC ACT GAG G
fruB sacB	56	gca att agg aaa aat ggc aaa aaa ttg tgc ttt tat ata gtt cat atg gga TTC AC
Km set B RC	50	GTT ATG AGC AAA AGT TTG ATG TGC TGC AGC ACA CGG TCA CAC TGC TTC CG
tetR sacB RC	50	CTG GCA GGA GGC GCA ACT CAA GGC TTT TAA GAC CCA CTT TCA CAT TTA AG
SACB RCparatet	48	CAG TAT TAA CCT TTA CTA CCG CAC TGC TGG CAG GAG GCG CAA CTC AAG
Tet-5?	24	GGC GTA TCA CGA GGC CCT TTC GTC
fruB	50	GAT CGC GCT GAA ACG TTT CAA GAA AGC ATA ATA CTT CTG TTT CAG CAC GC
fruB_Kana	48	GCA TAA TAC TTC TGT TTC AGC ACG Cga atc gaa atc tcg tga tgg cag
setB	52	CAG CAA TTA GGA AAA ATG GCA AAA AAT TGT GCA GCA CAT CAA ACT TTT GCT C
SDT7PROMOTER XBA	40	TCT AGA tac gac tca cta tag gga aca cac agg aaa cag c
terminador2X 5'	23	TGA AAA ACG CCC GGT ATA AGC GG
terminador2X 3'	25	TTA TAT TCA CAA AAA GAC AAC AGG C
T7polSD	53	cta tag gga aca cac agg aaa cag cta tga aca cga tta aca tcg cta aga ac
tetO- arRNAftsN	50	gaa taa ata cag cga aac gat agt gGA TGT GCT CAG TAT CTC TAT CAC TG
arRNAftsN	46	AAA AAG CGC GAA AAA CGC GCC gaa taa ata cag cga aac gat agt g
lacO1- darRNAfts	50	tcG GCG CGT TTT TCG CGC TTT Ttt gaT GTG CTC AGT ATC TTG TTA TCC GC
darRNAftsN1	48	Ccc act atc gtt tcg ctg tat tta ttc GGC GCG TTT TTC GCG CTT TTT
darRNAftsN2	45	AAA AAG GCG GAA AAA CCG CCc act atc gtt tcg ctg tat tta ttc
argR-Km	49	ggc gcc cca gct ggc aat tcc CCT AAA CTC CTT ATT ATA TTG ATA AAC T
xerD-Km	47	ggc gcc cca gct ggc aat tcc aac gta agc ttc tcg att ctg ctg tg
pepA-Km	47	ggc gcc cca gct ggc aat tcc ttt aaa tac gcc cgt aaa aac tcg tc

Apéndice 3. Artículo publicado en la revista FEMS microbiology letters, seleccionado como Editor's choice.



FEMS Microbiology Letters, 363, 2016, fnw191

doi: 10.1093/femsle/fnw191
Advance Access Publication Date: 11 August 2016
Research Letter

RESEARCH LETTER – Biotechnology & Synthetic Biology

Epigenetics knocks on synthetic biology's door

Zuemy Rodriguez-Escamilla¹, Mario A. Martínez-Núñez^{2,†}
and Enrique Merino^{1,*}

¹Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, UNAM. Av. Universidad 2001, Cuernavaca, Morelos CP 62210, México and ²Laboratorio de Ecogenómica. Unidad Académica de Ciencias y Tecnología de Yucatán. Facultad de Ciencias, UNAM. Sierra Papacal-Chuburna Km 5. Mérida, Yucatán CP 97302, México

*Corresponding author: Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, UNAM. Av. Universidad 2001, Cuernavaca, Morelos CP 62210, México. Tel: +52(777) 3291634; E-mail: merino@ibt.unam.mx

One sentence summary: First example of bacterial regulatory circuit with epigenetic traits created by Synthetic Biology.

Editor: Michael Sauer

[†]Mario A. Martínez-Núñez, <http://orcid.org/0000-0001-8907-2542>

ABSTRACT

Epigenetics is the study of heritable changes in gene expression without concomitant changes in DNA sequence. Due to its relevance in development, differentiation and human health, epigenetics has recently become an emerging area of science with regard to eukaryotic organisms and has shown enormous potential in synthetic biology. However, significant examples of epigenetic regulation in bacterial synthetic biology have not yet been reported. In the current study, we present the first model of such an epigenetic circuit. We termed the circuit the *alternator circuit* because parental cells carrying this circuit and their progeny *alternate* between distinct and heritable cellular fates without undergoing changes in genome sequence. Furthermore, we demonstrated that the *alternator circuit* exhibits hysteresis because its output depends not only on its present state but also on its previous states.

Keywords: epigenetic circuits; heritable cellular fates; hysteresis; T7 RNA polymerase; Sigma 70; Excludon

INTRODUCTION

Designing, modeling and generating complex biological systems with novel metabolic or cellular phenotypes is the essence of synthetic biology. The development of new models in this emerging area has offered unprecedented opportunities to enhance understanding of the biological processes present in living organisms. These opportunities far exceed original expectations and have shown real promise for transforming biotechnology and medicine. Since its beginnings in the early 1990s, key breakthroughs in synthetic biology have resulted from the incorporation of basic elements and concepts from molecular and cellular biology, such as the design of regulatory circuits based on transcription factors [e.g. toggle switches (Gardner, Cantor and Collins 2000) and the repressilator (Elowitz and Leibler 2000)],

riboregulators (Isaacs *et al.* 2004), antisense small RNA, CRISPR-mediated transcription silencing (Jiang *et al.* 2013) and quorum-sensing genes for cell–cell communication to enable multicellular patterning (Basu *et al.* 2005), among others. The current study utilizes, for the first time, the concept of epigenetic regulation (Burggren and Crews 2014) to design and construct a bacterial regulatory circuit.

Epigenetic-mediated gene expression is almost exclusively found in eukaryotic organisms and primarily involves changes in DNA methylation or histone modification. Epigenetic processes have central roles in numerous cellular processes, including embryonic development, X-chromosome inactivation, genomic imprinting and maintenance of chromosomal stability (reviewed in Goldberg, Allis and Bernstein 2007). In

Received: 16 March 2016; Accepted: 2 August 2016

© FEMS 2016. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

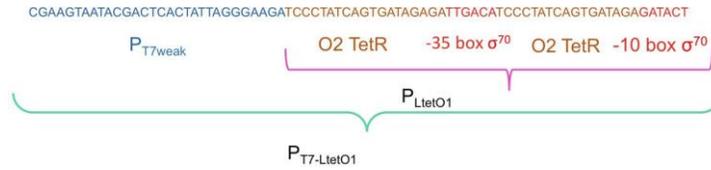


Figure 1. Construction of the $P_{T7-LtetO1}$ promoter region. The colors of the nucleotide sequence correspond to the following molecular elements: Blue: P_{T7weak} promoter; brown TetR operator O2 and red: -35 and -10 σ^{70} promoter boxes. The DNA fragment containing this regulatory region was obtained by PCR amplification.

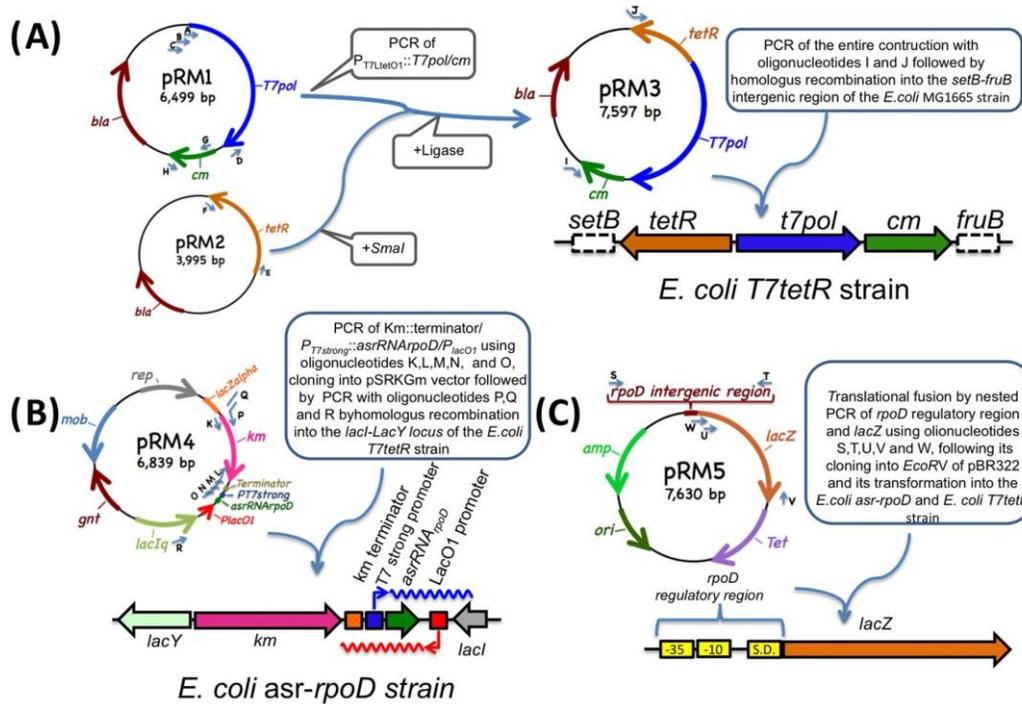


Figure 2. Genetic engineering required for the construction of strains and plasmid used in our study. (A) Construction of the *E. coli* T7tetR strain (*setB/tetR/P_{T7-LtetO1}::T7pol/cm/fruB*). This strain was used as a receptor strain for posterior integrations of the *asrRNA* gene. (B) Construction of the *E. coli* asr-rpoD strain (*setB/tetR/P_{T7-LtetO1}::T7pol/cm/fruB/lacY/Km::terminator/P_{T7strong}::asrRNArpoD::P_{lacO1}/lacI*). (C) Construction of the pRM5 plasmid. This plasmid carries the *rpoD-lacZ* translational fusion of the plasmid pBR322.

bacterial organisms, DNA methylation-mediated gene regulation has been shown to play an important role in coordinating different cellular processes, such as sDNA replication, chromosomal segregation, mismatch repair and gene transcription regulation associated with virulence and pathogenesis (reviewed in Casadesús and Low 2006). In some cases, hemimethylated or non-methylated DNA patterns can be inherited by daughter cells, reflecting the metabolic state of a cell prior to its undergoing division and providing future generations with enhanced abilities to adapt to growth conditions. Whether such regulation by bacterial DNA methylation can be considered epigenetic regulation remains controversial because it is only present in the short term and is not a stable, heritable phenotype (Zhu *et al.* 2016).

To the best of our knowledge, there are no documented examples of regulatory processes based on epigenetic mechanisms in bacterial synthetic biology. Thus, the development of such regulatory circuits could provide unprecedented opportunities

for the construction of new and better types of synthetic systems. As a first example of the design of a control circuit based on epigenetic traits in bacteria, we have created a regulatory circuit that we termed the *alternator circuit* because it allows the bacteria carrying it to alternate between different cellular states.

MATERIALS AND METHODS

Plasmids and strain construction

Three different *Escherichia coli* strains were constructed. The first was the *E. coli* T7tetR (*setB/tetR/P_{T7-LtetO1}::T7pol/cm/fruB*) (see Figs 1 and 2A), which was used as a receptor strain for the integration of the *asrRNArpoD* gene between the *lacI* and *lacY* genes, generating the *E. coli* asr-rpoD strain (*setB/tetR/P_{T7-LtetO1}::T7pol/cm/fruB/lacY/Km::terminator/P_{T7strong}::asrRNArpoD::P_{lacO1}/lacI*) (Fig. 2B).

The *E. coli* T7tetR strain was constructed using the following procedure: (1) PCR amplification of genes and specific

Table 1. Oligonucleotides used for amplification of DNA. The letter ID, name and 5¹-3¹ nucleotide sequence of the oligonucleotides used for the PCR DNA amplifications used in our study are indicated.

ID	Name	Sequence
A	tetO-t7	CTA TCA GTG ATA GAG ATA CTG AGC ACA TCA AGA GGC ACT AAA TGA ACA CGA TTA AC
B	A-tetO	ATC CCT ATC AGT GAT AGA GAT TGA CAT CCC TAT CAG TGA TAG AGA TAC TGA GCA CAT C
C	pT7-weak-ptetO1	CGA AGT AAT ACG ACT CAC TAT TAG GGA AGA TCC CTA TCA GTG ATA GAG ATT GAC
D	polT7-3 ¹	TTA CGC GAA CGC GAA GTC CGA C
E	tetR-interg-5 ¹	CCA ACC GAA CCA CTT CAC CCG T
F	tetR-3 ¹	GCT TTT AAG ACC CAC TTT CAC ATT TAA G
G	cm-5 ¹	GAG ACG TTG ATC GGC ACG TAA G
H	cm-3 ¹	AGC ACA CGG TCA CAC TGC TTC C
I	fruB	GAT CGC GCT GAA ACG TTT CAA GAA AGC ATA ATA CTT CTG TTT CAG CAC GC
J	setB	CAG CAA TTA GGA AAA ATG GCA AAA AAT TGT GCA GCA CAT CAA ACT TTT GCT C
K	km-5 ¹	GGA CAG CAA GCG AAC CCG AAT TG
L	km-Terminator	AAA AAC GCA TCA ATC AAA TTG ATG CCG AAT CGA AAT CTC GTG ATG GCA GG
M	Term-pT7strong	GTT GTG GTC TCC CTA TAG TGA GTC GTA TTA AAA ACG CAT CAA TCA AAT TGA TGC
N	arRNArpoDpt7stro	CCC TCA TGA AAT AAG TGT GGA TAC CGT TGT GGT CTC CCT ATA GTG AG
O	arRNArpoD	AAA AAG CGC GAA AAA CGC GCC CTC ATG AAA TAA GTG TGG ATA CC
P	km-lacY	CAA AAA TAA TAC CCG TAT CAC TTT TGC GGA CAG CAA GCG AAC CCG AAT TG
Q	lacY	GCG AGA ACA GAG AAA TAG CGG CAA AAA TAA TAC CCG TAT CAC TTT TGC
R	lacI	GGG CGC AAT GCG CGC CAT TAC C
S	rpoD-intergenic-5 ¹	TTT AAC GGC TTA AGT GCC GAA GAG
T	rpoD-intergenic-3 ¹	AAG ACG GTA TCC ACA CTT ATT TCA TG
U	lacZ-5 ¹	ATG ACC ATG ATT ACG GAT TCA CTG G
V	lacZ-3 ¹	TTA TTT TTG ACA CCA GAC CAA CTG G
W	rpoD-lacZ-fusion	CAT GAA ATA AGT GTG GAT ACC GTC TTA TGA CCA TGA TTA CGG ATT CAC TGG

intergenic regions using AccuPrime *Pfx* Polymerase (Invitrogen). To obtain the *P_{T7-LtetO1}::T7pol* fusion gene (Fig. 1), we used oligonucleotides A, B, C and D, shown in Table 1, and *E. coli BL21* chromosomal DNA as a template. To amplify the *tetR* gene, we used the oligonucleotides E and F and *E. coli XL1 blue* chromosomal DNA as a template. To amplify the *cm* gene, we used the oligonucleotides G and H and pBR325 DNA as a template. (2) The PCR-amplified fragments were cloned into a pMOS blue vector (Amersham) and subsequently amplified using oligonucleotides I and J, which carried extra 50 bp long fragments with sequences identical to the intergenic regions of *setB* and *fruB*, respectively, for subsequent homologous recombination. (3) The final construct was integrated into the *E. coli* MG1665 genome by homologous recombination using the λ red system (Datsenko and Wanner 2000).

The *E. coli asr-rpoD* strain was constructed using the following procedure: (1) The *Km* gene was amplified using oligonucleotides K and L and pKD4 DNA as a template. This gene was chosen as a selection marker for homologous recombination to integrate the *P_{T7strong}::asrRNArpoD* locus into the *E. coli T7tetR* receptor strain between the *lacI* and *lacY* genes of the *E. coli* MG1665 strain (Fig. 2A). (2) The *Km* gene was fused to the *P_{T7strong}::asrRNArpoD* locus by PCR amplification using the K-M-N-O oligonucleotides. (3) Subsequently, the PCR-amplified product was cloned into the *SmaI* site of the pSRKGm plasmid (Khan *et al.* 2008) to generate the pRM4 plasmid. (4) The plasmid pRM4 was subsequently used as template for a PCR amplification of the *Km::terminator/P_{T7strong}::asrRNArpoD::P_{lacO1}* locus (see Fig. 2B) using the P, Q and R oligonucleotides (see Table 1). The resulting DNA amplified fragment is flanked by *lacY* and *lacI* sequences required for a posterior homologous recombination in the recipient *E. coli T7tetR* strain using the λ red system (Datsenko and Wanner 2000) to generate the *E. coli asr-rpoD* strain (Fig. 2B).

To evaluate the inhibition efficiency of the *asrRNArpoD* gene on *rpoD* translation, a *rpoD-lacZ* translational fusion was

constructed using the following procedure: (a) The *rpoD* regulatory region and the *lacZ* gene were PCR amplified from the *E. coli* MG1665 strain using the S-T and U-V oligonucleotides, respectively (see Table 1). (b) These two fragments were used as templates and fused by a PCR amplification using the S, V and W oligonucleotides and subsequently cloned into the pBR322 *EcoRV* site. The resulting plasmid was the pRM5 (see Fig. 2C). This plasmid was used to transform the *E. coli T7tetR* and *E. coli asr-rpoD* strains to obtain their corresponding derivatives, the *E. coli T7tetR/pRM5* and *E. coli asr-rpoD/pRM5* strains, respectively.

Growth cultures

The *E. coli T7tetR*, *E. coli asr-rpoD* and their derivative strains transformed with the pRM5 plasmid were grown in 10 mL of LB liquid medium overnight (ON). Subsequently, 5 μ L of the ON cultures were used to inoculate 280 μ L of fresh LB medium with and without the addition of anhydrous tetracycline (ATc) to a final concentration of 100 ng mL⁻¹. These cultures were grown for 13 h, washed with an isotonic saline solution and then used to inoculate a second set of cultures that were grown in LB medium without ATc. The second set of cultures was also grown for 13 h. Changes in optical density or fluorescence were assessed in triplicates. Measurements were performed every 20 min in an ELISA plate reader (Synergy BioTek). The β -galactosidase activities of the different strains were measured by the hydrolysis of fluorescein di-D-galactopyranoside that was added to a final concentration of 50 ng mL⁻¹. A *P_{lacO1}* promoter was introduced downstream and in the complementary strand of the *asrRNArpoD* gene (see Fig. 2). The transcription induction from this *P_{lacO1}* promoter was obtained by the addition of Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) to a final concentration of 25 μ g mL⁻¹.

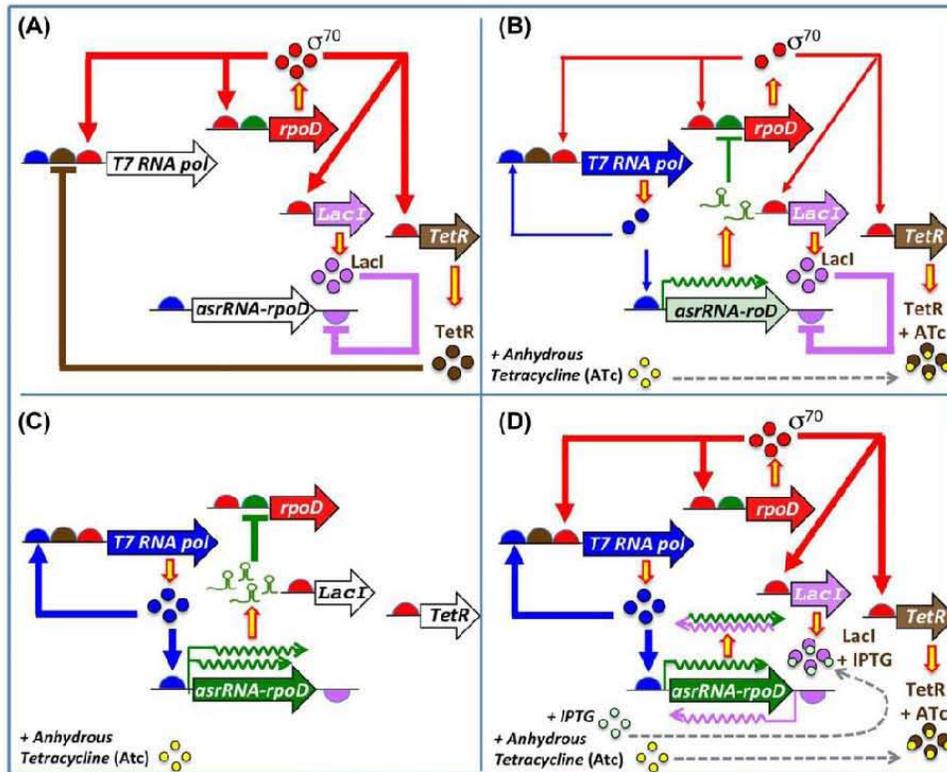


Figure 3. The alternator circuit. (A) *Circuit at baseline.* TetR is attached to the *T7pol*^{S1} regulatory region, blocking its transcription. (B) *Circuit after induction and transition state.* After ATc is added to the medium, it interacts with TetR, triggering a conformational change to a non-repressible form. Following this, the *tetR* operator region is released, and transcription of the *T7pol* gene occurs via the σ^{70} -RNAP holoenzyme, T7pol begins to accumulate in the cytoplasm and direct the transcription of both the *asrRNArpoD* gene and of its own gene. As result of this transcription, the translation of *rpoD* mRNA starts to be blocked by asrRNArpoD, and the intracellular concentration of σ^{70} starts to decrease. (C) *Final stage of the circuit.* T7 RNAP and σ^{70} reach their maximum and minimum intracellular levels, respectively. The decrease in σ^{70} concentration leads alternative sigma factors, such as σ^{32} , to interact with RNAP to form active RNAP- σ complexes, resulting in an alternative transcription pattern. The feedback loop of the circuit remains stable. (D) *Reversion of the epigenetic traits.* The addition of IPTG to the medium induces the transcription of long antisense asrRNArpoD from an inducible P_{LacO1} promoter located at the 3' end of this locus and in the complementary strand. These long antisense RNAs bind the asrRNArpoD transcripts and block their inhibitory activity on the *rpoD* translation. Consequently, the epigenetic traits of the strain are reversed.

Statistical analysis

We used a nested sampling Bayesian approach to compare bacterial growth cultures as described by Rickett *et al.* (2015). The Bayes' factor (B13) was calculated using the four-parameter Baranyi model (Baranyi, Roberts and McClure 1993) to test hypothesis 1 (H1), i.e. 'data curves are replicates', versus hypothesis 3 (H3), i.e. 'all data curve parameters are different', in the *babar* R package. Jeffreys' scale was used to interpret the Bayes' factor by calculating $2\ln(B13)$ for H1 versus H3.

RESULTS AND DISCUSSION

Our *alternator circuit* is comprised of the following elements, which are shown in Fig. 3.

- (1) The RNA polymerase (RNAP) gene from bacteriophage T7 (T7pol). Due to the interactions of the elements involved in our regulatory circuit, *T7pol* gene transcription depends on both the P_{LacO1} (Lutz and Bujard 1997) and the P_{T7weak} (bacteriophage T7—parts.igem.org) promoters, the transcription of which depends on σ^{70} and T7pol, respectively (see the Materials and methods section). There are two TetR

operators in the synthetic regulatory region of this gene: one located between and the other located in front of the P_{LacO1} and P_{T7weak} promoters (for details, see Fig. 1 and the Materials and methods section). This configuration ensures that *T7pol* gene transcription in the context of the circuit is under the control of TetR, regardless of which promoter transcribes the gene.

- (2) The wild-type *rpoD* gene, which encodes the housekeeping factor σ^{70} .
- (3) An artificial small regulatory RNA (asrRNA) gene designed to bind to a region within *rpoD* mRNA that overlaps with the Shine-Dalgarno sequence, thus inhibiting the synthesis of σ^{70} . Due to the nature of its regulatory target, the transcription of the *asrRNArpoD* gene was designed to depend on the *T7pol* promoter ($P_{T7strong}$ (bacteriophage T7—parts.igem.org)) and not on a *bonafide* σ^{70} promoter. This construction was integrated between the *lacI* and *lacY* genes of the *Escherichia coli* MG1665 strain by double homologous recombination. The resultant strain was designated *E. coli asr-rpoD* (for details, see Fig. 2 and the Materials and methods section).
- (4) In this strain, immediately downstream and in the complementary strand of this *asrRNArpoD* gene, we have

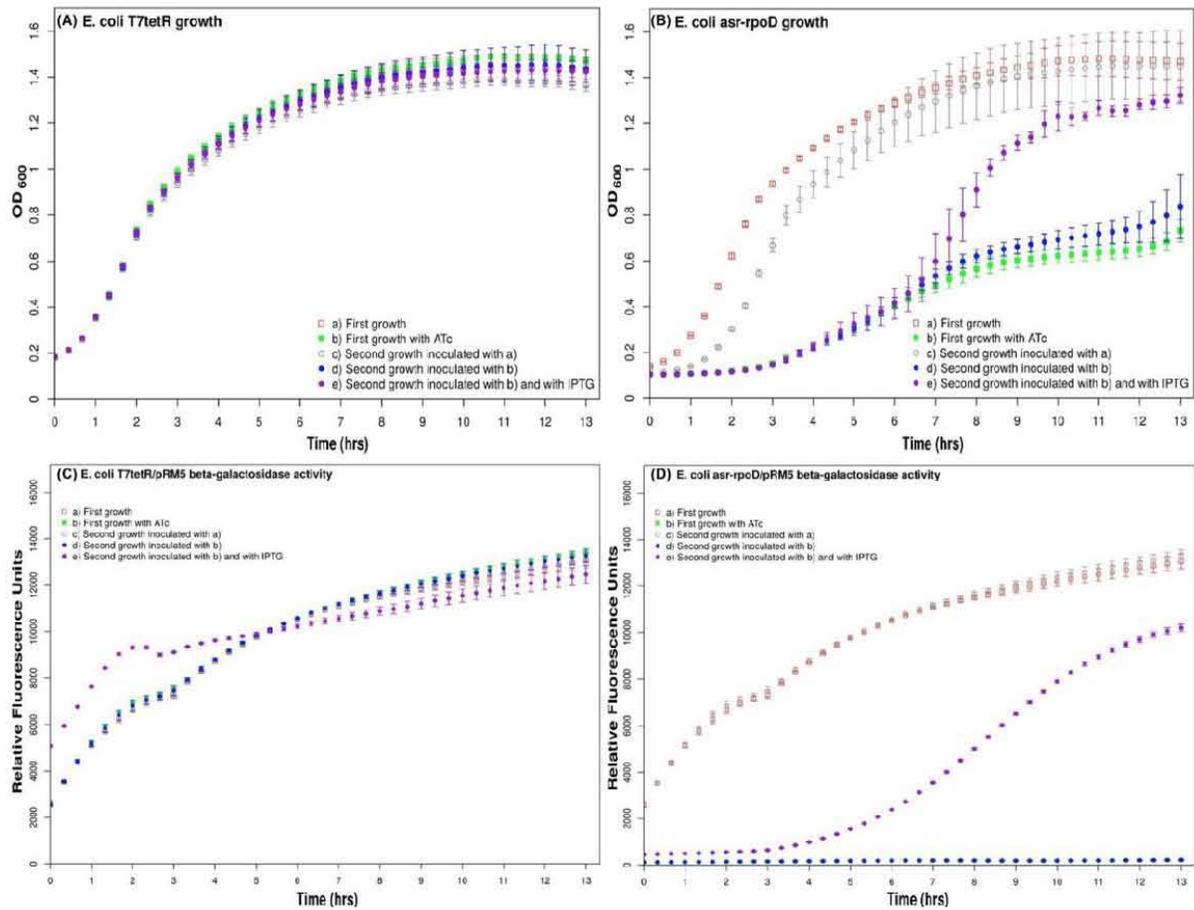


Figure 4. Impact of the epigenetic regulation of σ^{70} on *E. coli* growth rate and on the β -galactosidase activity of a *E. coli* strain carrying an *rpoD-lacZ* translation fusion. (A) The *E. coli T7tetR* strain and (B) its derivative *E. coli asr-rpoD* strain were grown in LB medium in the absence (empty shapes) and presence (filled shapes) of ATc as a TetR inducer. An initial set of cultures (squares) was used to inoculate a second set of cultures (circles). Note that the growth rates of the *E. coli asr-rpoD* strains depend on the growth conditions of their inoculum, which indicates an epigenetic trend. The *E. coli T7tetR* strain used as a control was subjected to the same conditions as above. Nevertheless, in this case, no epigenetic regulation was observed. The *E. coli T7tetR* and *E. coli asr-rpoD* strains were transformed with the pRM5 plasmid that carries an *rpoD-lacZ* translation fusion as a reporter gene. The same growth procedure was carried out with these strains to analyze the epigenetic regulatory activity of our *asrRNArpoD* on the translation of the *rpoDlacZ* reporter gene measured by the β -galactosidase activities of the strains. (C) No epigenetic trait is observed in the *E. coli T7tetR/pRM5* strain. (D) A clear epigenetic trait is observed in our *E. coli asr-rpoD/pRM5* strain. This epigenetic trait is reversed by the addition of IPTG to the media that induces the transcription of a long antisense *asrRNArpoD* from a *P_{lacO1}* promoter.

integrated a *P_{lacO1}* promoter (see Fig. 2). In the presence of the gratuitous inducer IPTG, long *asrRNArpoD* antisense RNAs are transcribed and block the regulatory activity of the *asrRNArpoD* sense RNAs. This kind of long antisense RNAs that spans divergent genes or operons with opposing functions has been termed *Excludon* (Sesto *et al.* 2012).

- (1) A gene encoding the TetR regulator that required a constitutive promoter recognized by the RNAP- σ^{70} holoenzyme of *E. coli* for successful transcription.

Our experimental procedure involved two consecutive growth conditions

- (1) *Initial bacterial culture in Luria-Bertani (LB) broth.* Our *E. coli asr-rpoD* and its parental *E. coli T7tetR* strain were initially grown in two different media. The first was composed of LB broth without ATc, and the second, which was used for induction,

was composed of LB broth with the addition of ATc (for details, see the Materials and methods section).

In the LB medium without ATc, TetR repressed the transcription of the *T7pol* gene. As such, *T7pol* was not available to transcribe the *asrRNArpoD* gene, and *rpoD* mRNA was fully translated (Fig. 3A). As a result, the growth rate of this strain was similar to that of the *E. coli T7tetR* control strain (Fig. 4A and B).

In the LB induction medium with ATc, the TetR-mediated repression of *T7pol* gene transcription was eliminated due to circuit activation. Therefore, the *asrRNArpoD* gene was transcribed, and the resultant RNA product blocked the translation of σ^{70} mRNA (Fig. 3B and C). As the intracellular concentration of σ^{70} decreases, other sigma factors may form transcriptional complexes with the RNAP core, altering the transcriptional pattern of the bacteria and leading to a concomitant reduction in growth rate (Fig. 4B).

- (2) *Secondary bacterial culture in LB medium without ATc.* Two *E. coli asr-rpoD* cell cultures were grown in non-induction LB

media. The first culture was inoculated with a culture never exposed to induction medium, and the second culture was inoculated with a culture previously exposed to induction medium. As shown in Fig. 4A and B and based on statistical analysis (for details, see the Materials and methods section), the second cultures presented different growth rates, despite that they were grown in the same non-induction media and possessed identical genotypes. A growth rate close to 0.1 OD₆₀₀/h was observed in all of the *T7tetR* strains regardless the growth conditions of their inoculum, and also in the *E. coli asr-rpoD* strains whose inoculum were not exposed to ATc, were close to 0.1 OD₆₀₀/h; on the other hand, a much more smaller growth rate of 0.03 OD₆₀₀/h was observed in the *E. coli asr-rpoD* strain whose inoculum was exposed to ATc. Therefore, these results clearly demonstrate the inheritance of an epigenetic trait. Furthermore, because the alternative outputs (i.e. growth rates) of these cultures showed time-based dependence on both present (i.e. growth conditions of the culture) and past (i.e. growth conditions of the inocula) inputs, our regulatory circuit exhibited hysteresis.

In order to demonstrate that the observed reduction growth rates epigenetically inherited to the offspring generations was due to the translation inhibition of *rpoD* by our *asrRNArpoD* gene; the initial and secondary bacterial cultures described above were repeated. In this second occasion, the *E. coli T7tetR* and *E. coli asr-rpoD* strains were transformed with the pRM5 plasmid. This plasmid carries an *rpoD-lacZ* translational fusion as a reporter gene (see Fig. 2C). It is important to note the *E. coli asr-rpoD* strain does not have detectable β -galactosidase activities since their corresponding chromosomal *lacZ* genes were deleted by the integration of the *Km::terminator/P_{T7strong}::asrRNArpoD::P_{lacO1} locus* the *lacI* and *lacY* genes. As it can be seen in Fig. 4, the epigenetic trait observed as differences in the growth rates of the *E. coli asr-rpoD* strains can also be clearly observed as a drastic change in the β -galactosidase activity of the *E. coli asr-rpoD*/pRM5 strain when inoculated with differently induced cultures.

As a second approach to demonstrate that the epigenetic traits observed in our *E. coli asr-rpoD* strain were due to the translation inhibition of *rpoD*, we included an inducible LacO1 promoter at the 3' end of the *asrRNArpoD* locus. This promoter is located in the complementary strand, therefore, its induction by the addition of IPTG to the medium results in the transcription of a long antisense *asrRNArpoD* that binds and blocks the regulatory effect of the *asrRNArpoD* on the *rpoD* translation. In Fig. 4B and D, it can be seen that the IPTG induction of the antisense *asrRNArpoD* reverts the epigenetically acquired phenotypes of the *E. coli asr-rpoD* strains reflected in their growth rate (from 0.03 OD₆₀₀/h to 0.1 OD₆₀₀/h) and β -galactosidase activity of our *rpoD-lacZ* translational fusion.

We selected *rpoD* as the main regulatory target of our epigenetic system due to its important role in cellular metabolism. Our aim was to illustrate how epigenetic circuits created in synthetic biology can generate alternative, distinctive and heritable cellular fates without the need to alter DNA genome sequences. In *E. coli*, there are seven sigma factors, including the housekeeping σ^{70} as well as six alternative sigma factors that are required under specific physiological conditions. Among the different sigma factors, σ^{70} is maintained at the highest intracellular concentration and possesses the highest affinity for RNAP (Maeda, Fujita and Ishihama 2000); therefore, it is unsurprising that σ^{70} regulates at least 50% of all *E. coli* genes (Thieffry *et al.* 1998). However, in certain metabolic conditions, the relative

concentration of σ^{70} with respect to the concentrations of the alternative sigma factors may decrease, favoring the replacement of σ^{70} in RNAP (Sharma and Chatterji 2010). In our epigenetic system, we altered the intracellular concentration of σ^{70} by artificial inhibition of *rpoD* translation. This resulted in the replacement of σ^{70} in RNAP with alternative sigma factors, generating stress and concomitantly reducing cell growth rate. A similar phenotype of arrested growth rate has been observed in the *rpoD* knockout *E. coli* strain reported by Keio (Baba *et al.* 2006). However, it is notable that the slow growth rate phenotype is associated with DNA modification in this case (i.e. the deletion of the chromosomal *rpoD* gene); therefore, all descendant cells would exhibit the same phenotype. On the contrary, epigenetically governed traits can alternate between phenotypes without new genotype alterations. For example, in the current study, phenotypic alterations were induced simply by changing the intracellular concentration of σ^{70} .

Unlike canonical epigenetic processes, our synthetic biology model does not depend on DNA methylation or histone modifications. Rather, this model relies on the establishment of a regulatory feedback loop that begins with the transcriptional activation of the T7 RNAP gene. To illustrate the significant phenotypic changes that can be obtained using this epigenetic system, our design included translation regulation of the housekeeping σ^{70} factor via the use of *arsRNA*. This set-up results in clear changes in metabolic responses. Although our *regulator circuit* was developed for basic research purposes, the current work establishes the principles needed to develop novel regulatory circuits that are under epigenetic control and exhibit hysteresis. Such a design can be applied to produce changes in the transcriptional patterns of organisms to promote the overproduction of specific biological products. It will be interesting to witness the evolution of epigenetic circuits in synthetic biology in the future.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank Ricardo Ciria for computer support, Karla S. Escalante-Herrera, Diana X. Sahonero-Canavesi and Maria Luisa Tabche for experimental support and Shirley Ainsworth for bibliographical assistance. Eugenio López, Santiago Becerra, Paul Gaytán, and Jorge Yáñez from the Unidad de Síntesis y Secuenciación of the Instituto de Biotecnología, UNAM. Zuemy Rodríguez-Escamilla is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and received fellowship 232666 from CONACyT.

FUNDING

This work was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACyT [grant FC2015-2887].

Conflict of interest. None declared.

REFERENCES

- Baba T, Ara T, Hasegawa M *et al.* Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol Syst Biol* 2006;2:2006.0008. DOI: 10.1038/msb4100050.
- Baranyi J, Roberts Ta, McClure P. A non-autonomous differential equation to model bacterial growth. *Food Microbiol* 1993; 10:43–59.

- Basu S, Gerchman Y, Collins CH *et al.* A synthetic multicellular system for programmed pattern formation. *Nature* 2005;**434**:1130–4.
- Burggren WW, Crews D. Epigenetics in comparative biology: why we should pay attention. *Integr Comp Biol* 2014;**54**:7–20.
- Casadesús J, Low D. Epigenetic gene regulation in the bacterial world. *Microbiol Mol Biol R* 2006;**70**:830–56.
- Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products. *P Natl Acad Sci USA* 2000;**97**:6640–5.
- Elowitz MB, Leibler S. A synthetic oscillatory network of transcriptional regulators. *Nature* 2000;**403**:335–8.
- Gardner TS, Cantor CR, Collins JJ. Construction of a genetic toggle switch in Escherichia coli. *Nature* 2000;**403**:339–42.
- Goldberg AD, Allis CD, Bernstein E. Epigenetics: a landscape takes shape. *Cell* 2007;**128**:635–8.
- Isaacs FJ, Dwyer DJ, Ding C *et al.* Engineered riboregulators enable post-transcriptional control of gene expression. *Nat Biotechnol* 2004;**22**:841–7.
- Jiang W, Bikard D, Cox D *et al.* RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. *Nat Biotechnol* 2013;**31**:233–9.
- Khan SR, Gaines J, Roop RM *et al.* Broad-host-range expression vectors with tightly regulated promoters and their use to examine the influence of TraR and TraM expression on Ti plasmid quorum sensing. *Appl Environ Microb* 2008;**74**:5053–62.
- Lutz R, Bujard H. 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 Res* 1997;**25**:1203–10.
- Maeda H, Fujita N, Ishihama A. Competition among seven Escherichia coli sigma subunits: relative binding affinities to the core RNA polymerase. *Nucleic Acids Res* 2000;**28**:3497–503.
- Rickett L, Pullen N, Hartley M *et al.* Incorporating prior knowledge improves detection of differences in bacterial growth rate. *BMC Syst Biol* 2015;**9**:60.
- Sesto N, Wurtzel O, Archambaud C *et al.* The excludon: a new concept in bacterial antisense RNA-mediated gene regulation. *Nat Rev Microbiol* 2012;**11**:75–82.
- Sharma UK, Chatterji D. Transcriptional switching in Escherichia coli during stress and starvation by modulation of σ 70 activity. *FEMS Microbiol Rev* 2010;**34**:646–57.
- Thieffry D, Salgado H, Huerta AM *et al.* Prediction of transcriptional regulatory sites in the complete genome sequence of Escherichia coli K-12. *Bioinformatics* 1998;**14**:391–400.
- Zhu L, Zhong J, Jia X *et al.* Precision methylome characterization of Mycobacterium tuberculosis complex (MTBC) using PacBio single-molecule real-time (SMRT) technology. *Nucleic Acids Res* 2016;**44**:730–43.