



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

“Diseño y desarrollo de un nuevo sistema de termo inducción en *Escherichia coli* para la producción de proteínas recombinantes”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestro en Ciencias Bioquímicas

PRESENTA:

Hernán Alejandro Ortiz Maldonado

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Octavio Tonatiuh Ramírez Reivich
Instituto de Biotecnología, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Guillermo Gosset Lagarda, Instituto de Biotecnología, UNAM

Dr. Carlos Peña Malacara, Instituto de Biotecnología, UNAM

Cuernavaca, Morelos. Septiembre, 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.

Los estudios que conforman esta tesis se realizaron en el laboratorio No.10 del Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría del Dr. Octavio Tonatiuh Ramírez Reivich.

Durante la realización de este trabajo se contó con la beca para estudios de maestría de CONACyT. Además se contó con el apoyo del programa DGAPA IT-201214 y DGAPA IT-200315.

A Paola Villegas, gracias por tu inmensa paciencia e incansable apoyo. Nos quedan miles de noches juntos.

Agradecimientos

Al Dr. Tonatiuh Ramírez por brindarme la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación, por el apoyo y los recursos invertidos en mi formación y su constante búsqueda de la excelencia.

A la Dra. Laura Palomares por su apoyo en mi formación, sus recomendaciones y revisiones al trabajo experimental y por traspasar la esfera profesional y otorgarme su ayuda personal.

Al equipo del grupo Palomares-Ramírez: M. en C. Vanessa Hernández, M. en C. Ruth Pastor, M. en C. Martha Alicia Contreras por brindarme su conocimiento abiertamente y apoyarme en todo lo que les solicité. A Karin Levy por su amplio apoyo logístico de inicio a fin.

A los estudiantes del grupo por sus críticas al trabajo realizado y la ayuda brindada. En especial al LCG Enrique Paz por el constante apoyo, revisión y discusión de mi trabajo, por enseñarme técnicas utilizadas en esta tesis y por compartir conmigo su experiencia en biología sintética.

A mis padres: Miguel Angel Ortiz Ochoa y Cecilia Magdalena Maldonado Mendez, su experiencia y amor me siguen impulsando

A mis hermanos: Jessie Karolina y Miguel Angel, por siempre creer en mí.

A mi nueva familia: Pepe, Sr. José Luis Castillo, Sra. Angelina Jaraleño. Su apoyo y amor son superiores a lo que pude haber imaginado.

A mi esposa, por tu indescriptible amor.

I. Índice

<u>I. ÍNDICE</u>	V
<u>II. ÍNDICE DE TABLAS</u>	VIII
<u>III. ÍNDICE DE FIGURAS</u>	IX
<u>1. RESUMEN</u>	1
<u>2. INTRODUCCIÓN</u>	4
<u>3. ANTECEDENTES</u>	6
3.1. BIOPARTES ESTÁNDAR	6
3.2. DISEÑO DE REDES DE RRG	7
3.3. USO DE RECOMBINASAS EN BIOLOGÍA SINTÉTICA	11
3.4. USO DE ETIQUETAS DE DEGRADACIÓN EN BIOLOGÍA SINTÉTICA	12
3.5. SISTEMAS DE EXPRESIÓN EMPLEADOS EN LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNA RECOMBINANTE EN PROCARIONTES	13
3.6. SISTEMA DE EXPRESIÓN TERMOINDUCIBLE	19
SISTEMA NATURAL DEL FAGO LAMBDA	19
SISTEMA TERMO-INDUCIBLE (STI)	22
RED DE REGULACIÓN DEL SISTEMA TERMOINDUCIBLE.....	23
3.7. RESPUESTA A ESTRÉS	24
ESTRÉS POR CHOQUE TÉRMICO	24
TIEMPO DE VIDA MEDIA DE λ C1 ⁸⁵⁷ Y LOS ARNm DE <i>E. COLI</i>	26
3.8. SOLUCIONES APLICADAS PARA ABATIR EL ESTRÉS POR CHOQUE TÉRMICO	27
MODOS DE INDUCCIÓN	27
<u>4. HIPÓTESIS</u>	28
<u>5. OBJETIVO GENERAL</u>	28
<u>6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS</u>	28
<u>7. MATERIALES Y MÉTODOS</u>	29
7.1. CEPAS EMPLEADAS	29

7.2. OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS	29
7.3. BIOPARTES ESTÁNDAR UTILIZADAS	30
7.4. PLÁSMIDOS	31
7.5. TÉCNICAS MOLECULARES	31
ENSAMBLAJE DE BIOPARTES	31
EXTRACCIÓN DE ADN PLASMÍDICO.....	32
ELECTROFORESIS DE ADN EN GEL DE AGAROSA	34
EXTRACCIÓN DE ADN DE BANDAS DE GELES DE AGAROSA	34
TRANSFORMACIÓN	35
SELECCIÓN DE MUTANTES	36
PCR: COMPROBACIÓN DE MUTANTES Y OBTENCIÓN DE BIOPARTES	36
7.6. SISTEMA DE CULTIVO DE <i>E. COLI</i>	38
MEDIO DE CULTIVO UTILIZADO	38
CULTIVO EN PLACAS DE FLUORESCENCIA	38
CULTIVO EN MATRACES AGITADOS.....	39
7.7. MÉTODOS DE SEGUIMIENTO DE LOS CULTIVOS	41
DETERMINACIÓN DE BIOMASA.....	41
FLUORIMETRÍA	41
LINEALIDAD DE MEDICIÓN DE FLUORIMETRÍA.	43
CUANTIFICACIÓN DE GLUCOSA	46
7.8. CÁLCULOS CINÉTICOS.....	46
CÁLCULO DE VELOCIDAD ESPECÍFICA DE CRECIMIENTO	46
7.9. POSIBLES REDES DE REGULACIÓN QUE ABATEN EL ESTRÉS TÉRMICO	47
FACTORES CRÍTICOS	47
MODELO CLÁSICO 1	47
MODELO CLÁSICO 2.....	49
MODELO 1: INDUCIBLE POR PULSO DE TEMPERATURA	51
MODELO 2: HEREDABLE	59
<u>8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u>	<u>65</u>
8.1. SISTEMA CLÁSICO	65
CONSTRUCCIÓN DE LA VERSIÓN 1.....	65
CARACTERIZACIÓN DEL CRECIMIENTO Y PRODUCCIÓN DE FLUORESCENCIA	66
CONSTRUCCIÓN DE LA VERSIÓN 2.....	71
LIGACIÓN CON EL MÓDULO EFECTOR.....	72
8.2. MODELO 1	73
CONSTRUCCIÓN	73
SELECCIÓN ENTRE CEPAS DIVERGENTE Y CONVERGENTE.....	76
8.3. IMPACTO DEL TIEMPO DE INDUCCIÓN EN LA VELOCIDAD DE CRECIMIENTO DE LAS CEPAS CONVERGENTE Y CLÁSICA 2	79
8.4. COMPARACIÓN DE LOS MODELOS EN W3110.....	83
8.5. CULTIVOS DE W3110 EN MEDIO MINERAL	85

8.6.	EFFECTO DEL FONDO GENÉTICO.....	89
8.7.	PROLONGACIÓN DEL TIEMPO DE CRECIMIENTO	93
8.8.	CONVERGENTE CON ETIQUETA DE DEGRADACIÓN	95
8.9.	CINÉTICA DE CRECIMIENTO.....	97
8.10.	MODELO 2:HEREDABLE	98
	CONSTRUCCIÓN DEL EFECTOR	98
<u>9.</u>	<u>DISCUSIÓN</u>	<u>106</u>
<u>10.</u>	<u>CONCLUSIONES</u>	<u>110</u>
<u>11.</u>	<u>PERSPECTIVAS</u>	<u>112</u>
<u>12.</u>	<u>REFERENCIAS.....</u>	<u>113</u>
<u>13.</u>	<u>ANEXOS.....</u>	<u>125</u>
A.	ANEXO I: SECUENCIAS DE LAS BIOPARTES UTILIZADAS.....	125

II. Índice de tablas

Tabla 1. Listado de cepas de Escherichia coli usadas en el proyecto.....	29
Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados. Todos están escritos comenzando por el extremo 5', las negritas indican que parte de los oligonucleótidos no alinean con la secuencia original y son usados para agregar alguna característica (ver pie de tabla).....	29
Tabla 3. Listado de biopartes utilizadas en el proyecto	30
Tabla 4. Plásmidos utilizados en este trabajo	31
Tabla 5. Tamaño de los amplicones de los módulos y construcciones completas amplificadas con los primers prefijo forward y sufijo reverse, las longitudes están en pares de bases.	37
Tabla 6. Ciclo de PCR utilizado para la comprobación de mutantes por PCR de colonia. La flecha de lado izquierdo con el número x35 indica que el ciclo se repite 35 veces. En el alineamiento se usan 56°C para los oligonucleótidos de secuenciación y 61°C para prefijo y sufijo.....	37
Tabla 7. Ciclo de PCR utilizado para la comprobación de mutantes por PCR de colonia, la flecha de lado izquierdo con el número x35 indica que el ciclo se repite 35 veces.....	38
Tabla 8. Medios de cultivo utilizados. El medio YT2X se utilizó para preparar células electro-competentes, por esa razón se excluyó el NaCl de su formulación.	39
Tabla 9. Factores críticos y deseables del sistema.	47
Tabla 10. Condiciones probadas durante la amplificación del modelo 1 agregando una etiqueta de degradación. La flecha indica la repetición de los pasos del ciclo, x35 representa el número de repeticiones. Las condiciones mostradas se probaron sin DMSO y con 3% de DMSO.....	58
Tabla 11. Listado de fragmentos que arroja la digestión de cada modo en que se clonó el promotor.	75

III. Índice de figuras

Figura 1. Esquema de una bioparte estándar.	6
Figura 2. Simbología utilizada en este trabajo.	7
Figura 3. Diagrama de diseño de RRG.	10
Figura 4. Clasificación de recombinasas.	12
Figura 5. Esquema de la regulación de λ cI Adaptado de (Dodd et al., 2005).	21
Figura 6. Etapas de la termoinducción a escala molecular.	22
Figura 7. Representación abstracta del sistema termoinducible.	24
Figura 8. Esquema de regulación del factor transcripcional sigma 32.	25
Figura 9. Diagrama de digestiones necesarias para clonar río arriba o río abajo en un plásmido para biopartes estándar.	33
Figura 10. Cultivos en lote seriados.	40
Figura 11. Diluciones de una muestra saturada de mRFP.	44
Figura 12. Linealidad del fluorímetro.	45
Figura 13. Linealidad del fluorímetro.	45
Figura 14. Representación general de la RRG del STI clásico 1, los recuadros con líneas discontinuas delimitan los módulos.	48
Figura 15. Estrategia seguida para la construcción del STI clásico 1.	48
Figura 16. Modelo clásico 2.	49
Figura 17. Estrategia seguida para la construcción del STI clásico 2.	50
Figura 18. Representación abstracta del modelo 1.	51
Figura 19. Esquema de la RRG del modelo 1.	52
Figura 20. . Estrategia seguida para la construcción del STI modelo 1.	54
Figura 21. Diagrama de la última ligación del modelo 1.	55
Figura 22. Modelo 1 con promotores convergentes.	56
Figura 23. Modelo 2 con promotores divergentes.	57
Figura 24. Modelo 1 convergente con la etiqueta de degradación AANDENYALAA.	58
Figura 25. Representación abstracta del segundo modelo.	60
Figura 26. Sitios de recombinación de gp35.	61
Figura 27. Modelo heredable.	63
Figura 28. Modelo heredable después de la inducción.	63
Figura 29. Estrategia seguida para la construcción del STI heredable.	64
Figura 30. Análisis de restricción de las mutantes con el sistema termoinducible clásico.	65
Figura 31. Cinéticas de crecimiento (panel A) y de producción de fluorescencia (panel B) de tres colonias de E. coli cepa 53606 con la construcción clásica 1	67
Figura 32. Fluorescencia normalizada de tres colonias de E. coli cepa 53606 con la construcción clásica 1.	68
Figura 33. Velocidades máximas de crecimiento cepa clásica 1 en 53606.	69
Figura 34. Fluorescencia específica post-inducción para las tres colonias de la cepa clásica en ATCC 53606.	69
Figura 35. Evolución de la fluorescencia de la colonia 1 (construcción clásica 1 en E. coli cepa 53606).	70
Figura 36. PCR de colonia de las transformantes de J13002+C ₈ 857+B0011.	71
Figura 37. Digestiones de ADNp de las colonias 1 y 19.	72
Figura 38. Comprobación de la construcción del sistema clásico 2.	73
Figura 39. PCR de colonia del módulo efector del modelo 1 bajo el promotor Pr del fago lambda.	74
Figura 40. PCR de colonia del modelo 2 para identificar el sentido el módulo efector.	74
Figura 41. Digestiones de ADN plasmídico de las colonias de interés del modelo 2.	75

Figura 42. Cinéticas de crecimiento y producción de fluorescencia para la selección del modelo 1 en matraces agitados.	78
Figura 43. Cinética de crecimiento para los modelos 1 convergente y clásico versión dos a distintos tiempos de inducción.	79
Figura 44. Velocidades máximas de crecimiento a distintos tiempos de inducción.	80
Figura 45. Fluorescencia en los modelos 1 convergente y clásica versión dos a distintos tiempos de inducción.	81
Figura 46. Fluorescencia específica máxima a distintos tiempos de inducción.	82
Figura 47. Efecto del tiempo de inducción en la velocidad máxima de producción de fluorescencia.	82
Figura 48. Cinéticas de crecimiento de las construcciones en W3110 medio LB.	83
Figura 49. Velocidades de crecimiento post-inducción de las cepas clásica versión dos y convergente en W3110.	84
Figura 50. Cinética de fluorescencia en la cepa W3110 de E.coli empleando medio LB.	85
Figura 51. Densidades ópticas máximas de W3110 en LB enriquecido con glucosa a 30°C y 220rpm.	86
Figura 52. Densidades ópticas máximas de W3110 en medio mineral a distintas concentraciones finales de glucosa.	86
Figura 53. Cinética de crecimiento W3110 en medio mineral suplementado con 12g/L de glucosa.	88
Figura 54 Producción de proteína recombinante en la cepa W3110 de E. coli en medio mineral suplementado con 12g/L.	88
Figura 55. Fluorescencia específica (unidades de fluorescencia por unidades de absorbancia) de las construcciones en la cepa W3110 en medio mineral suplementado con 12g/L de glucosa.	89
Figura 56. Fluorescencia específica normalizada. Dos construcciones en la cepa DH5α de E. coli cultivadas en medio mineral suplementado con 12g/L de glucosa.	90
Figura 57. Fluorescencia específica normalizada. Dos construcciones en la cepa W3110 de E. coli cultivadas en medio mineral suplementado con 12g/L de glucosa.	90
Figura 58. Fluorescencia específica normalizada de cada construcción evaluada en dos cepas distintas.	92
Figura 59. Cinética en 3 ciclos de cultivos operados en modo “vaciado-llenado” las construcciones clásica y convergente en la cepa W3110 en cultivo por lote cíclico.	94
Figura 60. Velocidades de crecimiento en los tres periodos de cultivo de W3110 construcciones clásica y convergente.	95
Figura 61. Electroforesis en gel de agarosa del modelo 1 con la etiqueta de degradación AANDENYALAA.	96
Figura 62. Digestión del terminador transcripcional B0011 con EcoRI y XbaI. Carril 1	97
Figura 63. Cinética de producción de fluorescencia de la cepa convergente con etiqueta de degradación.	98
Figura 64. Gel de electroforesis de la PCR de colonia de los módulos sensado-heredable del modelo 2. 99	
Figura 65. Gel de electroforesis de la PCR de colonia del sensor del modelo heredable en DH5α.	100
Figura 66. PCR de colonia del modelo 2 en DH5α. El tamaño esperado del inserto es de 2808pb.	100
Figura 67. Alineamiento esquemático de los oligonucleótidos utilizados en el análisis del modelo heredable.	101
Figura 68. PCR de las colonias 3 y 5 del modelo heredable.	102
Figura 69. Modelo 2, PCR de colonia del modelo 2 transformado por electroporación.	103
Figura 70. Evaluación del modelo heredable en E. coli cepa 53606.	105
Figura 71. Espacio entre los promotores Ptet y TetR en el modelo 1 divergente.	106

1. Resumen

En este trabajo se desarrollaron nuevos sistemas termo-inducibles inspirados en el sistema clásico de termo-inducción de *Escherichia coli* que emplea los promotores P_R y P_L del bacteriófago lambda y una mutante termosensible del represor λCI . Los sistemas se diseñaron como redes de regulación genética, de tal forma que en las construcciones se incluyeron secuencias reguladoras y secuencias codificantes que ejercen algún tipo de control sobre la misma construcción, la aproximación está inspirada en la biología sintética y se emplearon estándares de esta naciente disciplina.

El sistema de termo-inducción (STI) para producción de proteínas recombinantes suele utilizarse en la industria bio-farmacéutica como plataforma tecnológica –el 30% de la producción mundial se basa en ella (Huang *et al.*, 2012; Overton, 2013) –. A pesar de que el STI ha probado su utilidad existen claras oportunidades de optimización, la más evidente: minimizar que el impacto del incremento de temperatura –a 42°C para producir la proteína de interés– tiene en las células y la productividad.

Para lograr lo anterior, se diseñaron, construyeron tres redes de regulación que se nombraron: i) clásica, ii) inducible por pulso y iii) heredable, todas basadas en estándares de biología sintética. Se evaluaron en las cepas DH5 α , comúnmente utilizada para clonación y W3110, considerada una cepa silvestre. Ambas tienen su origen en la cepa K-12 pero difieren, entre otras cosas, en la funcionalidad del gen *RecA*, que en W3110 no tiene alteración reportada mientras que en DH5 α esta mutado.

La red clásica se diseñó para comportarse del mismo modo que el STI clásico: se clonó la proteína mRFP río abajo del promotor P_R del bacteriófago lambda y su expresión se controló exclusivamente con el represor termosensible λCI^{857} ; del STI clásico se

construyeron dos versiones, una en la que es imprescindible que la secuencia codificante del represor se encuentre en el genoma de la bacteria y otra que puede usarse en cualquier cepa de *E. coli* pues el plásmido lleva consigo la secuencia del represor. Para construir el segundo se generó una nueva bioparte estándar clonando el represor a partir del genoma de la cepa 53606 de *E.coli*.

La red inducible por un pulso de temperatura se diseñó de manera que al iniciar la producción de la proteína de interés se reprimiera la transcripción de la secuencia codificante del represor λcI^{857} , para ello se colocó la secuencia codificante de este represor río abajo del promotor P_{Tet} y la proteína represora Tet_R río abajo del promotor P_R . De esta red se construyeron tres versiones: i) con los promotores en el mismo sentido de transcripción –convergente–, 2) con los promotores en sentidos de transcripción opuestos –divergente– y iii) con los promotores en sentidos de transcripción opuestos y con una etiqueta de degradación en el represor λcI^{857} .

La red heredable se diseñó para que, el incremento de temperatura en el cultivo fuera breve e indujera un evento de recombinación que eliminaría la necesidad de mantener la temperatura elevada. Para ello, río abajo de un promotor constitutivo se clonó la secuencia invertida de la proteína de interés que además se flanqueó con los sitios de reconocimiento de la recombinasa gp35 del micobacteriófago Bxb1 mientras que la recombinasa se clonó bajo el promotor P_R .

Durante la evaluación de las construcciones se encontró, a diferencia de lo esperado, que al inducir por dos horas las cepas control y bajar de nuevo la temperatura a 30°C, la producción de proteína recombinante continúa, incluso en algunos casos es posible alcanzar el máximo de producción de proteína recombinante.

Por otra parte, al comparar las redes convergente y divergente, se encontró que la orientación de los promotores fue suficiente para obtener control estricto sobre la producción de proteína recombinante –fluorescencia no detectable– o tener producción basal.

Además, al comparar las redes construidas en las dos cepas de *E. coli* se encontró que a pesar de existir diferencias en los valores puntuales de fluorescencia, la proporción se mantenía en ambas cepas, es decir, ambas cepas –cultivadas bajo las mismas condiciones– alcanzaban el 90% de la fluorescencia máxima en el mismo periodo de tiempo.

Del trabajo realizado se concluyó que la orientación de los promotores tiene impacto en el control de un promotor termo-inducible, la proporción de producción de proteína recombinante es constante en dos cepas con genotipos distintos derivadas de *E. coli* K-12 y que es posible, bajo algunas condiciones obtener el máximo de fluorescencia en una cepa termo-inducible con una inducción de dos horas.

2. Introducción

La producción de medicamentos biotecnológicos ha incrementado a nivel internacional de manera rápida y constante. En 2012, representó un mercado de 140 mil millones de dólares (Langer, 2012), de los cuales 100 mil millones provienen de proteínas recombinantes y anticuerpos monoclonales, se estima que al menos el 30% de estos se produce en *Escherichia coli* (Huang *et al.*, 2012; Overton, 2013). A pesar del claro incremento del uso de eucariontes como plataforma de producción, el futuro de *E. coli* es promisorio, ya que el 29% de los biofarmacéuticos aprobados en Estados Unidos y la Unión Europea en el periodo 2010 – 2014 se producen en este organismo (Walsh, 2014).

El principio activo de la mayoría de los farmacéuticos biotecnológicos producidos en bacterias es una proteína recombinante y su fabricación se puede clasificar, en función del modo de expresión del gen heterólogo, en constitutiva o inducible. Entre los diversos sistemas inducibles, el térmico es uno de los de mayor uso (Makrides, 1996) ya que no requiere el suministro de agentes químicos costosos que además son tóxicos al hospedero y al consumidor final. Es de resaltar que el control de la fase de producción de la proteína recombinante por inducción térmica se puede realizar de manera sencilla y precisa (Huang *et al.*, 2012) y no existe riesgo de contaminación pues no requiere la adición de compuestos exógenos.

El sistema tradicional de termo inducción tiene, al menos, dos etapas en el cultivo: i) una fase de proliferación celular a baja temperatura (alrededor de 30°C) para evitar la expresión basal de la proteína de interés y ii) una fase de inducción y producción de la proteína recombinante a temperatura alta, generalmente mayor a 37°C. En esta segunda fase la temperatura es sub-óptima para el crecimiento bacteriano, además de que durante la

inducción la célula puede experimentar un choque térmico que provoca cambios metabólicos detrimentales que resultan en grandes demandas energéticas, merma en la velocidad específica de crecimiento y plegamiento deficiente de la proteína recombinante (Valdez-Cruz *et al.*, 2011). Todo lo anterior causa pérdidas en productividad y calidad de la proteína de interés.

Para minimizar las desventajas del sistema de termo-inducción (STI) se han probado diversas estrategias (Valdez-Cruz *et al.*, 2010). El presente proyecto utiliza técnicas de biología molecular de un campo novedoso y en crecimiento, que comenzó a diferenciarse en el año 2000, con las publicaciones de Elowitz y Leibler quienes construyeron un circuito genético capaz de oscilar en tres estados distintos. En ese mismo año Cameron y colaboradores construyeron otro circuito que puede transitar en dos estados estables distintos en respuesta a dos señales externas. Los anteriores fueron los primeros circuitos genéticos (Cameron *et al.*, 2014).

En el presente proyecto se diseñaron sistemas termo-inducibles (STIs) con el objetivo de mantener las ventajas del tradicional y minimizar sus desventajas. Se utilizaron técnicas basadas en biología sintética con el objetivo de construir STIs responsivos a la elevación momentánea de la temperatura del cultivo y que fueran capaces de continuar la producción de proteína recombinante aún después de bajar la temperatura.

Las construcciones se probaron en dos cepas de *E.coli*: DH5 α , utilizada ampliamente en clonación y W3110.

3. Antecedentes

3.1. Biopartes estándar

Fueron diseñadas con el objetivo de minimizar la cantidad de enzimas utilizadas durante la construcción de redes de regulación genética y así simplificar el proceso, de forma tal que las regiones necesarias para las construcciones genéticas pudieran ser separadas en unidades funcionales (i.e. biopartes) con la característica de poder insertarse río arriba o río abajo mediante un proceso completamente independiente de la naturaleza de la bioparte (i.e. estandarización). Constan (Figura 1) de una secuencia de interés flanqueada río arriba por sitios de restricción EcoRI y XbaI (prefijo) y río abajo por sitios de restricción SpeI y PstI (sufijo), la secuencia de interés. Los plásmidos empleados deben estar libres de tales sitios de restricción. Además en la mayoría de las biopartes se ha homologado el codón de paro a dos codones “TAA” –de modo que la secuencia queda como TAATAA– (Knight, 2003). Existe un catálogo de partes disponible al público y que está sostenido por la *International Genetically Engineered Machines (iGEM) Foundation* (iGEM foundation, 2004), una organización sin fines de lucro dedicada a la difusión de la biología sintética a través de un concurso anual de estudiantes de licenciatura. Así, cada bioparte tiene un número de catálogo único en la colección del iGEM.

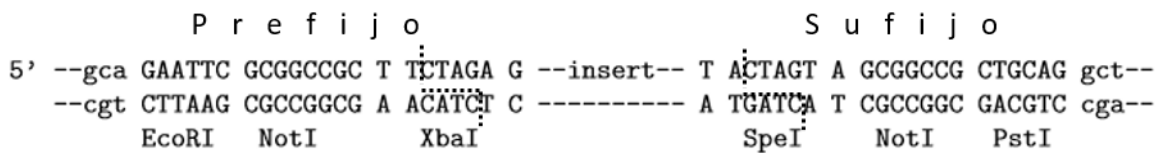


Figura 1. Esquema de una bioparte estándar, las líneas punteadas señalan el sitio de corte de las enzimas XbaI y SpeI, adaptado de Knight, 2003.

Simbología

La representación gráfica de las redes de regulación genética (RRG) está en proceso de estandarización, actualmente la versión 2.0.0 del lenguaje abierto de biología sintética – SBOL por sus siglas en inglés– es la simbología más usada (Quinn *et al.*, 2015), los símbolos utilizados en este trabajo y su significado se pueden consultar en la Figura 2.







 promotor	 elemento de estabilidad de proteínas
 secuencia codificante	 terminador transcripcional
 sitio de unión a ribosomas	 Sitio de union de oligo

Figura 2. Simbología utilizada en este trabajo, basada en (Quinn *et al.*, 2015)

3.2.Diseño de redes de RRG

La biología sintética hace uso de abstracciones para llevar a cabo el diseño de RRG. La técnica consiste en definir la RRG desde lo general hasta lo particular. Se parte de la descripción de lo que se desea realizar sin especificar detalles, en los pasos sucesivos el diseño se divide en partes más pequeñas y el nivel de detalle incrementa conforme se avanza en el proceso hasta finalizar en la construcción física.

Hay tres niveles de abstracción en este diseño (Figura 3):

- i) Especificación del sistema

Se describe únicamente lo que se quiere lograr, sin detallar ningún componente o parte de la construcción. Por ejemplo: se requiere un sistema o RRG capaz de reconocer y destruir células HeLa¹.

ii) Especificación a nivel de redes

Esta se puede dividir en los siguientes pasos:

a) Descomposición del sistema

Con la finalidad de simplificarla, la RRG puede dividirse jerárquicamente en módulos pequeños y manejables, cada uno de ellos cumple una función y puede ser construido y analizado por separado y, en algunos casos, reutilizado en otras RRG. Siguiendo el ejemplo anterior, se necesita que el sistema sea capaz de:

- Unirse a la membrana de la célula cancerígena
- Invadir la célula
- Reconocer la célula cancerígena
- Destruir la célula

Cada uno de estos módulos puede ser descrito con mayor detalle. Hasta ahora únicamente se ha dividido la RRG en sus partes esenciales, en problemas más pequeños que pueden ser abordados por separado. Siguiendo el ejemplo, para reconocer a la célula cancerígena, el sistema debe reconocer la sobreexpresión de dos miRNA y la ausencia de tres. Esto último es únicamente la descripción más detallada de ese módulo en particular.

¹ El ejemplo está inspirado en la publicación de Xie *et al.* 2011

b) Planteamiento de la interacción del sistema

Cuando el detalle de los módulos está terminado se pueden describir sus interacciones. En el caso del reconocimiento de las células se puede describir ahora con operadores lógicos, de forma que aún siendo una descripción general tiene el suficiente detalle para iniciar simulaciones y predicciones someras.

Es importante resaltar que hasta ahora no se han decidido las partes que conformaran la RRG, es decir se desconocen los promotores, represores, sitios de unión a ribosomas (SUR) y cualquier otra secuencia a utilizar. El objetivo hasta ahora es la descripción cada vez más detallada del sistema sin comprometer el uso de una u otra secuencia y que permita hacer simulaciones o predicciones que alimenten el diseño, de modo que este pueda modificarse antes de su construcción.

iii) Descripción física

Con el funcionamiento general y las interacciones descritas y analizadas se pueden tomar decisiones más acertadas sobre las secuencias a utilizar. Así en esta etapa se deciden las secuencias o partes que se utilizarán. Es preferible usar aquellas que estén bien descritas y caracterizadas en el contexto de interés, de lo contrario se identifican las que no lo estén y se caracterizan.

En este paso se describen detalladamente todas y cada una de las secuencias a utilizar. Con ello podemos hacer predicciones mucho más acertadas que en la etapa anterior, por eso es importante la caracterización. Este es el último paso del diseño. Terminada la optimización de las secuencias en este nivel se procede a la construcción.

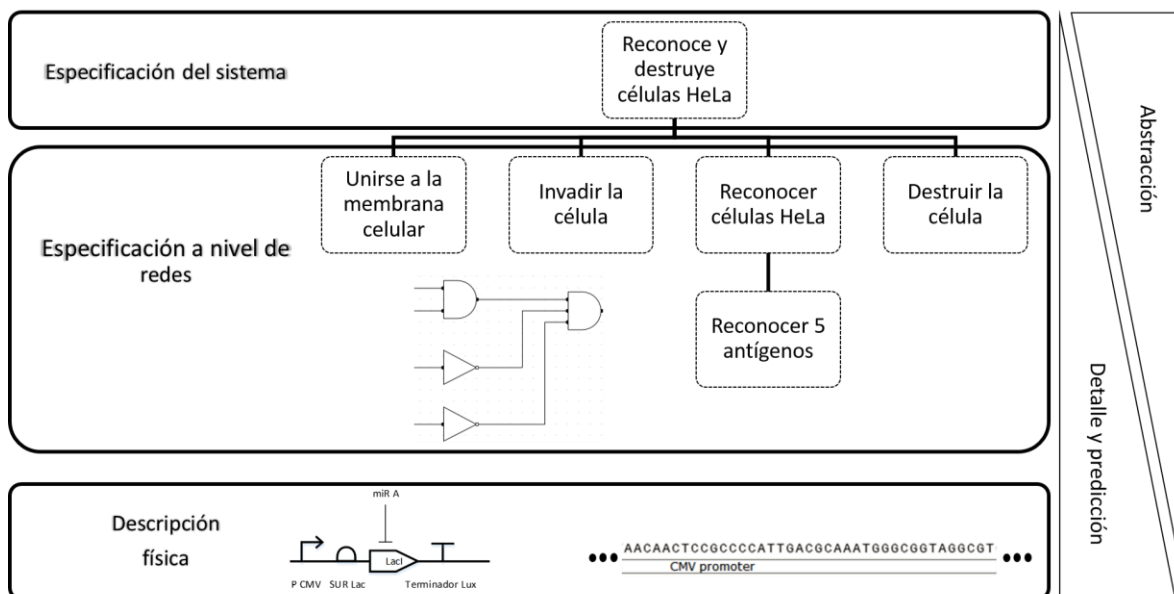


Figura 3. Diagrama de diseño de RRG. Está dividido en tres niveles de abstracción, en el primero se define la función general sin detalle alguno, en el segundo se definen los módulos y se pueden plantear circuitos de regulación con operadores lógicos, en el tercero finalmente se definen las secuencias a utilizar. El detalle del modelo y la capacidad de predicción incrementan conforme se avanza en el diseño, la abstracción es mayor al principio y disminuye en los siguientes pasos.

La visualización de los sistemas biológicos como entidades programables a través de la construcción de circuitos y redes lógicas ha permitido la elaboración, entre otros sistemas, de los llamados *toggle switch* (Gardner *et al.*, 2000) y *repressilator* (Elowitz & Leibler, 2000) que marcan un hito por ser los primeros circuitos genéticos construidos que además hacen hincapié en su parecido con circuitos lógicos. Se ha demostrado ampliamente (Khalil & Collins, 2010) la posibilidad de conferir nuevas funciones a una célula a partir del ensamblaje de entidades discretas de la maquinaria transcripcional o traduccional en circuitos novedosos de regulación y expresión.

Realizar tales diseños bajo un sistema estandarizado facilita su uso y diseminación como nuevas herramientas funcionales. La versatilidad y facilidad de uso en los casos en los que se requiere usar el mismo sistema de expresión para distintas proteínas es de interés en distintos campos, desde la bio-farmacéutica hasta la investigación.

3.3. Uso de recombinasas en biología sintética

Se han construido circuitos que tienen comportamientos análogos a operadores lógicos. Por ejemplo, Siuti *et al.*, (2000) utilizaron una recombinasa para inducir un cambio en el fenotipo del hospedero, que se heredó por lo menos durante 90 generaciones. Las recombinasas utilizadas fueron de la subfamilia de las serinas, que actúan en sitios de reconocimiento que difieren entre ellos (*attB* y *attP*), y que después de la recombinación se generan dos sitios híbridos (*attL* y *attR*) que no son reconocidos por la enzima. La reversión del cambio solamente es posible en presencia de una excisionasa (Wang *et al.*, 2011).

Las recombinasas sitio específicas fueron descubiertas en bacterias y levaduras con algunas funciones biológicas claras, entre ellas la integración de bacteriófagos en el genoma (Wang *et al.*, 2011). En su definición más estricta la recombinación sitio-específica involucra dos hebras de ADN y una enzima especializada que reconoce los sitios y rompe y vuelve a unir las hebras de ADN (Grindley *et al.*, 2006). Este proceso no requiere energía para realizarse y en función de la orientación de los sitios de reconocimiento, la recombinación puede tener tres posibles resultados: escisión, integración, o inversión. El proceso puede o no ser reversible.

Las recombinasas se dividen en dos familias (Figura 4) en función de la cadena lateral que recibe un grupo fosfato del ADN durante su rompimiento: puede ser un residuo de serina o de tirosina (Grindley *et al.*, 2006).

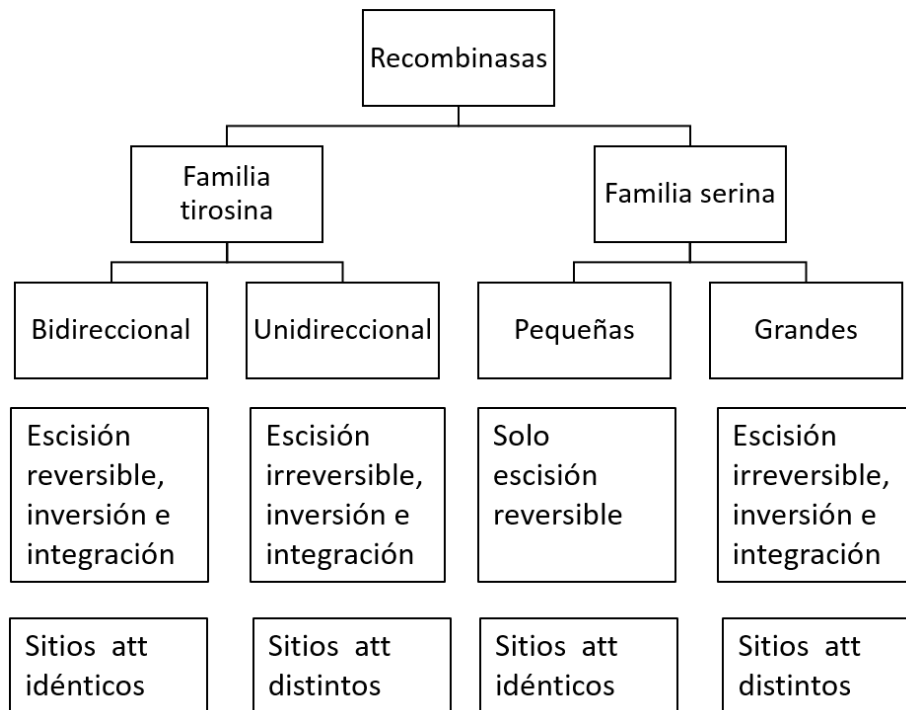


Figura 4. Clasificación de recombinasas. Los recuadros abajo del diagrama señalan algunas características importantes. Adaptado de Wang *et al.* 2011

Las recombinasas unidireccionales de la familia de la tirosina utilizan sitios de reconocimiento de ~250 pb y requieren que el hospedero exprese algunos factores de recombinación. Contrariamente, las de la familia de la serina requieren sitios de menos de 50 pb, no necesitan ningún factor codificado por el hospedero y la direccionalidad se define únicamente por la orientación de las secuencias de reconocimiento (Singh *et al.*, 2013). Por esta razón son preferidas en el diseño de RRG.

3.4. Uso de etiquetas de degradación en biología sintética

Para modificar los tiempos de respuesta de las RRG suelen utilizarse secuencias que estabilizan o desestabilizan proteínas o transcritos. Diversos autores han utilizado etiquetas de degradación de proteínas para ajustar la respuesta de osciladores genéticos (Elowitz & Leibler, 2000; Stricker *et al.*, 2008). Uno de ellos es el sistema SsrA-SmpB que es

responsable de liberar a los ribosomas que se atorán agregando un oligo-péptido a la proteína nascente (Karzai *et al.*, 2000). El péptido funciona como una etiqueta que es reconocida por las proteasas ClpXP (con el adaptador proteolítico SspB como intermediario prescindible), ClpAP, Lon y FtsH (Keiler, 2008). La secuencia consenso del péptido es AANDENYALAA y se ha demostrado que esta secuencia puede disminuir la vida media de la proteína verde fluorescente a 30 – 40 min (Andersen *et al.*, 1998).

3.5.Sistemas de expresión empleados en la producción de proteína recombinante en procariontes

Existen diversas plataformas tecnológicas para la producción de proteínas recombinantes, *Escherichia coli* es una de las más utilizadas. Se estima que el 30% de la producción mundial de biofármacos se realiza en ella (Spadiut *et al.*, 2014). La colección de promotores disponibles en *E. coli* se puede separar en inducibles y constitutivos; esto en función del control que ejerzan sobre las secuencias codificantes (Palomares *et al.*, 2004).

Los promotores constitutivos se prefieren cuando la producción de la proteína recombinante es óptima bajo las mismas condiciones de crecimiento celular, no es tóxica para la célula y representa solamente una baja carga metabólica al hospedero. De lo contrario se prefieren los promotores inducibles con los cuales se establece primero una fase de crecimiento celular, seguida de una fase de producción de proteína recombinante.

Debe tenerse en cuenta que a escala industrial la inducción debe ser simple, económica, eficiente, con poco o nulo efecto sobre la viabilidad celular y la producción de proteína recombinante. Además, las operaciones de purificación deben permanecer sin afectación y los residuos del proceso deben ser inocuos para el medio ambiente (Palomares *et al.*, 2004).

Adicionalmente, los promotores deben ser fuertemente regulados y con baja expresión basal (Terpe, 2006).

El estímulo necesario para la inducción dependerá de la naturaleza del promotor. En general un promotor tiene sitios operadores que son reconocidos por proteínas que pueden funcionar como represores o activadores. Las moléculas activadoras pueden unirse a los operadores y coadyuvar en la transcripción o pueden forzar la separación de un represor del sitio operador.

Sistemas inducibles por medios químicos

Basados en el operón Lac

El operón de Lac codifica para tres proteínas responsables del metabolismo de lactosa para su transformación en glucosa y galactosa. Normalmente está regulado por el represor lac, producto de del gen *LacI*. Cuando hay lactosa en el medio se metaboliza en alolactosa, esta se une al represor y ocurre la transcripción. También es dependiente de AMP cíclico (AMPc). Cuando los niveles de glucosa son muy bajos se incrementan los niveles de AMPc, este a su vez se une a la proteína activadora de catabolitos (CAP por sus siglas en inglés), incrementándose la afinidad de la ARN polimerasa (ARNp) al promotor (Donovan *et al.*, 1996).

En la producción de proteínas recombinantes (PR) se utiliza un inductor análogo no metabolizable de lactosa, el IPTG. Sin embargo, este sistema suele tener expresión basal pues el represor se une solo momentáneamente al promotor. Existen variaciones del sistema, que son construcciones sintéticas, algunas tienen combinaciones de regiones operadoras de otros promotores. Entre ellas tenemos los sistemas: LacUV5, que reduce la

dependencia de la regulación catabólica; Trc y Tac, que tienen regiones de los promotores Trp y Lac y son 10 veces más fuertes que LacUV5; T7/lac, que utiliza una combinación del promotor del fago T7, cuya secuencia sólo es reconocida por la ARNp del fago T7 (la secuencia codificante de esta última se coloca bajo una variante del promotor Lac) (Donovan *et al.*, 1996; Terpe, 2006).

Basados en ArapBAD

Codifica las proteínas que llevan a cabo el metabolismo de arabinosa. En este caso el represor AraC en ausencia de arabinosa promueve la formación de una horquilla que vuelve inaccesible al promotor de los genes estructurales (P_{BAD}), regulando también su expresión. Cuando en el medio hay arabinosa esta se une al represor y provoca un cambio conformacional. AraC entonces funciona como activador y promueve la unión de la ARNp al promotor P_{BAD} , sin embargo se necesita la unión de CAP para que la inducción sea completa. El sistema tiene expresión basal (Terpe, 2006).

Basados en el operon Tet

Confiere resistencia a tetraciclina, originalmente ubicado en el transposón *tn10*. Normalmente el promotor P_{Tet} es reprimido por el represor TetR, el cual tiene alta afinidad a tetraciclina y en su presencia se une a ella y se separa del promotor. Esto permite la expresión de TetA, un antitransportador dependiente de protones (Bertram & Hillen, 2008). Durante la producción basada en el sistema Tet se usan inductores análogos como anhidrotetraciclina, cuya afinidad es 35 veces mayor y su actividad antimicrobiana es 100 veces menor. La expresión basal es menor que en otros sistemas inducibles (Bertram & Hillen, 2008; Terpe, 2006).

Basados en el agotamiento de nutrientes

Agotamiento de fosfatos

El promotor *phoA* forma parte del regulón *PHO* que incluye al menos 31 genes que son regulados por la concentración extracelular de fosfatos, específicamente se inducen con el agotamiento del nutriente. La señalización se da en un sistema de dos componentes, la proteína sensora PhoR se autofosforila y transfiere después el fosfato al regulador de respuesta PhoB, el cual activa la transcripción de los genes del regulón (Wanner, 1993). En los sistemas utilizados en fermentaciones se ha mutado el gen del represor *phoB* para activar la transcripción cuando la concentración de fosfatos es menor a 1mM (Neubauer & Wirten 2001).

Basados en cambios fisicoquímicos

Basados en cambios de pH

Desde 1940 se sabe que la síntesis de aminoácido descarboxilasas es dependiente de pH. En el sistema propuesto por Tolentino *et al.* (1992) se utiliza la región reguladora del gen *cadA* que codifica para lisina descarboxilasa. En un trabajo posterior se añadió a la construcción el gen *cadC*. Este codifica para un factor transcripcional que mejora dramáticamente la producción de proteína recombinante al usar este sistema (Chou *et al.*, 1995). El cultivo se crece en un pH entre 7 – 8 y se induce entre 5.5 – 6, sin embargo hay expresión basal aún a pH 8.

Basados en la concentración de oxígeno disuelto

Existen sistemas de inducción activados ya sea con bajos o altos niveles de oxígeno disuelto. El promotor de la nitrito reductasa *nirB* se utiliza en anaerobiosis parcial o estricta, mientras que la región reguladora del operon de la piruvato-formato liasa (*pfl*) es inducible en anaerobiosis aunque la expresión basal es alta (Schmidt, 2004). En el otro extremo, el promotor del regulón SoxRS se utiliza para inducir la expresión de proteína recombinante a una concentración de oxígeno disuelto de 300% con respecto al valor de saturación (Baez *et al.*, 2014).

Choque térmico

Bajas temperaturas

Se ha utilizado el promotor de la proteína CspA –la proteína de respuesta a choque frío más abundante– para inducir la producción de proteínas recombinantes a 15°C (Neubauer & Winter, 2003).

Altas temperaturas

Una variante termosensible del represor λ CI del bacteriófago lambda se utiliza en el control de este sistema. El represor se une a los promotores P_R o P_L con gran afinidad, sin embargo es posible liberarlos elevando la temperatura por encima de 37°C. Este sistema tiene la ventaja de que la expresión basal es baja (Jajesniak & Seng Wong, 2015).

Cada uno de los sistemas descritos anteriormente tiene ventajas y desventajas inherentes al modo de inducción. En general los sistemas que requieren adición de algún compuesto químico, como triptófano, arabinosa o IPTG, acarrear complicaciones a escalas industriales, entre ellas: riesgos de contaminación al producto, riesgos al operador por el manejo de productos tóxicos –se ha reportado que el IPTG es tóxico (Donovan *et al.*, 1996)–, riesgos para el consumidor final y al ambiente, además se debe agregar una etapa al proceso de purificación ya que es imprescindible asegurar la remoción total del compuesto químico por ejemplo en cuanto a los riesgos físicos para el operador esto puede ocurrir por el manejo de grandes cantidades de polvo. Incluso los costos podrían ser restrictivos para procesos cuyo margen de ganancia sea bajo. Retomando el ejemplo de arabinosa, para un volumen de 1,000 litros, su costo –sólo como materia prima– sería de \$250,000 MXN o, tratándose de IPTG (1mM concentración final) costaría \$180,000 MXN. Estos son únicamente los costos y riesgos directos, sin embargo para un análisis completo hay que considerar los costos en tiempo, horas hombre, espacio físico y transporte asociados al mantenimiento y control de inventarios de la materia prima. Los sistemas que requieren agotamiento de nutrientes tienen el inconveniente de requerir con formulaciones precisas del medio de cultivo y poca caracterización de los promotores. En la inducción por pH hay que lidiar con expresión basal e incluso con heterogeneidades de pH en el punto de adición

de ácido o base usado para el control de esa variable. En lo que respecta a oxígeno disuelto, el reto depende del volumen de cultivo, Elevar la concentración de oxígeno disuelto puede llegar a ser complicado en cultivos de alta densidad celular; acercarse a anaerobiosis sería más sencillo sin embargo va en detrimento de la célula. En todos los casos, incluidos los de inducción térmica, el estrés que provoca la inducción también implica carga metabólica al hospedero, la cual tendría también que considerarse.

3.6.Sistema de expresión termoinducible

Sistema natural del fago lambda

Durante su ciclo de vida, el bacteriófago lambda puede permanecer como profago en fase lisogénica dentro del hospedero o eventualmente, bajo condiciones de estrés, iniciar su fase lítica. El cambio de fase está mediado por los reguladores transcripcionales λcI y Cro (Dodd *et al.*, 2005). El represor λcI es una proteína de 236 aminoácidos que se pliega en dos dominios (amino y carboxilo) unidos por una hebra (linker) de 40 aminoácidos, la proteína forma homodímeros por interacciones entre los dominios carboxilo. Por otra parte, Cro está compuesta por 66 aminoácidos que se pliegan en un dominio único. Ambos reguladores se unen a los mismos operadores pero con distintas afinidades.

El represor λcI cumple dos funciones, mantiene la fase lisogénica y auto regula su expresión, promoviéndola o previniéndola (Figura 5). Durante la fase lisogénica, el represor forma homodímeros que se unen por su dominio amino a los operadores 1 y 2 de los promotores P_R y P_L . La proximidad de los dímeros permite que estos interactúen por su dominio carboxilo y formen tetrámeros, lo que hace más estable la represión de los promotores de la fase lítica. Cuando la subunidad sigma se une a la región -35 del promotor P_{RM} hace contacto con el dominio amino del represor más cercano en O_R2 . Esto promueve

la transcripción de los genes bajo P_{RM} , promoviendo así la expresión de λcI . Sin embargo, una vez que se alcanzan altas concentraciones del represor este se une también al tercer operador (Dodd *et al.*, 2005). Los represores en cada región reguladora interactúan y provocan la formación de un asa en las regiones codificantes de P_{RM} reprimiendo así la transcripción del gen λcI (Dodd *et al.*, 2005; Ptashne, 2004). Se estima que en una célula lisogénica alrededor del 95% de las moléculas de represor se encuentran como homodímeros (Ptashne, 2004)

En su fase lisogénica el fago es muy estable (Dodd *et al.*, 2005; Ptashne, 2006), sin embargo cuando el hospedero sufre daño en el ADN se desata una respuesta a estrés: la respuesta SOS. Con ella la proteína de reparación RecA –repara ADN por recombinación homóloga– presenta actividad proteolítica y corta los monómeros del represor λcI por la hebra que une los dominios amino y carboxilo. Tal corte inactiva al represor; la disponibilidad y síntesis de represores funcionales decae hasta que finalmente el promotor P_R queda libre y la ARNp inicia la transcripción de *Cro* (Ptashne, 2004), que reprime la producción del represor λcI y que en última instancia promueve el establecimiento de la fase lítica .

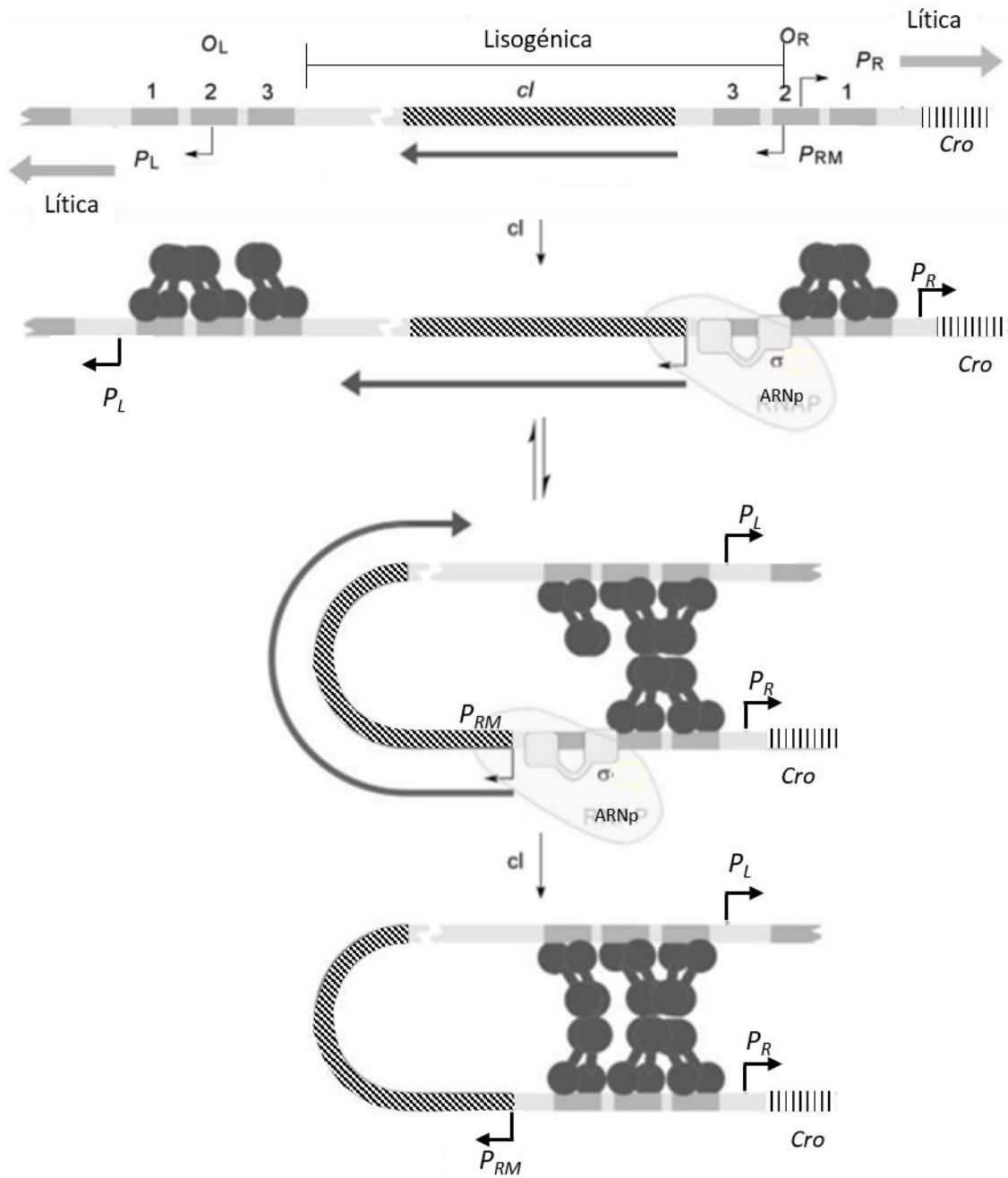


Figura 5. Esquema de la regulación de λcI Adaptado de (Dodd *et al.*, 2005). Las flechas a 90° representan promotores, los recuadros gris obscuro son los operadores, el recuadro cuadrículado representa el gen de λcI y la flecha debajo de ese gen representa el transcrito. Las figuras en forma de pesa o mancuerna representa la proteína λcI .

Sistema termo-inducible (STI)

En el sistema de termo inducción para la producción de proteínas recombinantes se utiliza la mutante termolábil λcl^{857} (Jechlinger *et al.*, 2005; Valdez-Cruz *et al.*, 2010) que comienza a disociarse de los operadores, aunque con poca eficiencia, a los 32°C y alcanza inducción total entre 42 y 45°C (Villaverde *et al.*, 1993). λcl^{857} posee una sustitución en Ala66 por Thr (Valdez-Cruz *et al.*, 2010) consecuencia de una transición en la guanina 199 del codón GCA por adenina (Lieb, 1981). Esta sustitución se encuentra en el dominio amino y puede afectar la estabilidad del homodímero por su proximidad a la interface entre los dos monómeros (Nauta *et al.*, 1997). Se ha propuesto (Hecht *et al.*, 1984; Nauta *et al.*, 1997) que Ala66 se encuentra al interior de un centro hidrofóbico y forma parte de una alfa hélice. La sustitución por threonina reduce la estabilidad, por ser un residuo polar y es poco propensa a formar hélices.

El STI puede utilizar cualquiera de los promotores de la fase lítica (P_L o P_R) y solamente son necesarios los primeros dos operadores para reprimir al promotor, la proteína de interés se coloca río abajo del promotor. Como todos los sistemas inducibles, en este se pueden separar el crecimiento celular de la producción de la proteína recombinante.

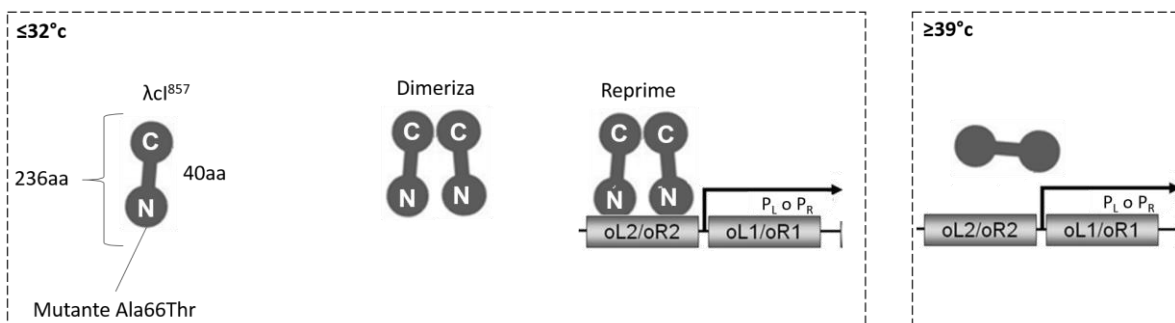


Figura 6. Etapas de la termoinducción a escala molecular. El proceso está dividido en dos etapas separadas por los recuadros punteados, la primera corresponde al crecimiento y la segunda a la fase de inducción. Las flechas a 90° representan los promotores, oL y oR representan los operadores de cada promotor, la figura en forma de pesa o mancuerna es λcl^{857} .

La etapa de crecimiento se lleva a cabo a una temperatura menor a 32°C (Figura 6), que es sub-óptima para el crecimiento celular, esto incrementa los tiempos de cultivo y el costo asociado a la operación de los equipos. A escala industrial la reducción del tiempo de proceso puede ser económicamente significativa. Durante la fase de crecimiento el represor se mantiene asociado a los operadores y forma dímeros que estabilizan la represión. Para iniciar la producción de la proteína de interés se eleva la temperatura incluso hasta 45°C, esto desata la respuesta de choque térmico en la célula (Valdez-Cruz *et al.*, 2010). A esta temperatura la inducción es completa, el represor se disocia de los operadores y permite el inicio de la transcripción del gen de interés. Típicamente, una vez que se eleva la temperatura se mantiene así hasta el final del cultivo.

El STI posee ventajas considerables para su uso sobre otras formas de inducción en la industria bio-farmacéutica ya que no requiere la adición de agentes químicos externos, con lo que se evitan problemas de contención, contaminación y seguridad del producto final. La inducción es fácilmente controlable y, a diferencia de los sistemas dependientes de agotamiento de nutrientes, permite la toma de decisión del momento de inducción en proceso. Elevar la temperatura de un reactor a altas densidades celulares es más barato que bajarla pues los cultivos generan calor, se obtienen altos niveles de productividad (se han reportado hasta 10 veces más que con la inducción con IPTG (Seeger *et al.*, 1995)) y está ampliamente caracterizado.

Red de regulación del sistema termoinducible

La inducción del STI está gobernada solamente por λcl^{857} y su respuesta a la temperatura. Tal como se describió anteriormente al elevar la temperatura el represor Ci857 se disocia del promotor pR o pL del fago lambda e inicia entonces la transcripción de la proteína

recombinante. A nivel de redes (Figura 7) el STI se puede representar con un sólo operador lógico NOT, que invierte la señal de entrada.

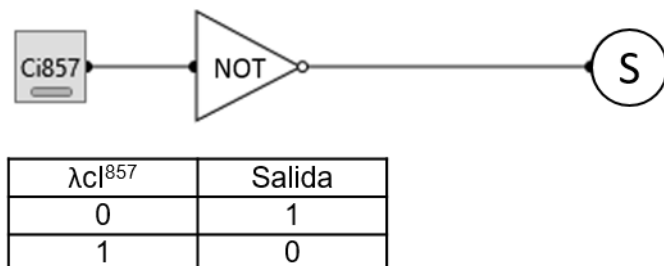


Figura 7. Representación abstracta del sistema termoinducible. El cuadro representa λcI^{857} como señal de entrada al operador lógico, el círculo es la señal de salida que en el caso del termoinductor es una proteína recombinante. El recuadro muestra todas las posibles combinaciones

3.7.Respuesta a estrés

Estrés por choque térmico

La inducción del cultivo a temperaturas superiores a 39°C desata la respuesta a choque térmico en la célula, aunque se ha reportado que el efecto del choque térmico es detectable incluso a 34°C y está en función de la temperatura previa del cultivo, es decir de la magnitud del incremento de temperatura y la tasa de calentamiento (Caspeta *et al.*, 2009; Yamamori & Yura, 1980). La respuesta a estrés está principalmente mediada por el factor transcripcional σ_{32} , codificado en el gen *rpoH*. La transcripción del gen *rpoH* está controlada por la acción de al menos cinco regiones promotoras, cuatro de ellas reconocidas por σ^{70} y una por σ^E . Este es sólo el primer nivel de regulación y tiene un efecto menor en la síntesis de σ_{32} (Arsène *et al.*, 2000; Narberhaus *et al.*, 2006). El segundo nivel de regulación es el traduccional. El mRNA de *rpoH* posee una región reguladora, un termosensor de ARN que por debajo de 42°C forma una horquilla que bloquea el acceso al sitio de unión a ribosomas (SUR) (Figura 8); a 42°C se desestabiliza la estructura terciaria y el SUR queda accesible (Arsène *et al.*, 2000; Narberhaus *et al.*, 2006). Durante la respuesta

a choque térmico σ^{32} se une a la ARNp central e induce la síntesis de proteínas de respuesta a choque térmico (HSP), muchas de ellas chaperonas y proteasas, que cierran el ciclo de regulación llevando a degradación al factor transcripcional, para llegar a un segundo estado estacionario en el que la respuesta a choque térmico ha sido establecida (Arsène *et al.*, 2000; Valdez-Cruz *et al.*, 2011).

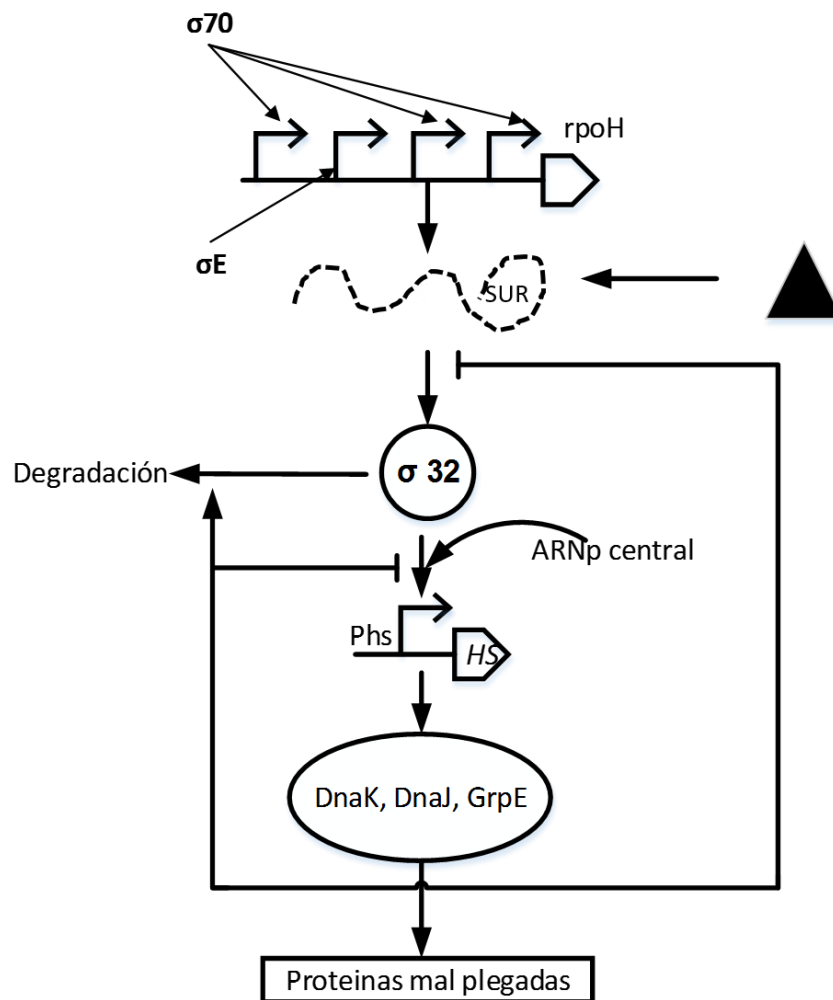


Figura 8. Esquema de regulación del factor transcripcional sigma 32. Adaptado de Arsène *et al.*, (2000). Las flecha a 90° representan promotores el triángulo al final de los promotores representa la región codificante para *rpoH*, la línea ondulada punteada representa el ARNm de *rpoH*, *SUR* es el sitio de unión a ribosomas oculto en el RNAm, el triángulo negro representa aplicación de calor, *HS* representa las codificantes para proteínas de choque térmico.

Se ha reportado que dentro de los primeros 5 min después de incrementar la temperatura de 30°C a 42°C la síntesis total de proteínas en *E. coli* puede incrementar hasta 1.5 veces, pero

el tiempo de respuesta para la inducción, síntesis y degradación del mRNA de los genes arriba citados (*dnaK*, *dnaJ* y los asociados a maquinaria transcripcional-traduccional) puede ocurrir en menos de 80 s (Caspeta *et al.*, 2009). El estrés provocado por el incremento de temperatura, aunado a la alta producción de proteína recombinante, incrementa la demanda energética del microorganismo, disminuye la velocidad específica de crecimiento al grado de cesar el crecimiento entre 1 y 2 h después de la inducción (Caspeta *et al.*, 2009) e impacta negativamente la productividad y plegamiento de proteína recombinante. Por ejemplo, en un sistema expresando prepro-insulina humana, las proteínas asociadas a respuesta a choque térmico, DnaK y DnaJ, incrementaron su expresión de 2 a 9 veces y de 1.3 a 2.4 veces, respectivamente, mientras que GroEL –proteína chaperona esencial para el plegamiento apropiado de algunas proteínas de *E. coli*– aumentó su expresión hasta en 6 veces (Caspeta *et al.*, 2009). La maquinaria transcripcional también se ve afectada, al incrementar la temperatura de 30°C a 42°C, Caspeta *et al.*, (2009) encontraron que con una tasa de calentamiento mayor a 0.4°C/min, los niveles de mRNA de genes asociados a la maquinaria transcripcional-traduccional decayeron entre 50% y 75%.

Tiempo de vida media de λ cl⁸⁵⁷ y los ARNm de *E.coli*

Como parte del diseño de las RRG es importante considerar la escala de tiempo en la que ocurren los eventos de transcripción y traducción, así como el tiempo de vida media de las proteínas involucradas.

Se ha reportado que el 80% de los mensajeros en *E. coli* tienen un tiempo de vida media que va de los 3 a 8 min y el 99% se degrada en 15 min (Bernstein *et al.*, 2002). Por otra parte, Maurizi, (1992) reportó que la mayoría de las proteínas en *E.coli* tienen vidas medias de 5 a 20 h, y una consulta en la base de datos Expasy sugiere, para el represor λ cl⁸⁵⁷ una

vida media de 10 h. Sin embargo, este represor es una proteína inestable bajo respuesta SOS, pues sufre un corte en su región *linker* por acción de RecA, lo que reduce su tiempo de vida media de 2 a 10 min (Little & Mount, 1982). Similarmente, Roberts y Roberts (1975) reportan que tras 20 min de inducción con mytomicina D el 90% del represor ha sufrido un corte proteolítico.

3.8. Soluciones aplicadas para abatir el estrés por choque térmico

Modos de inducción

Para evitar los efectos colaterales de la elevación de la temperatura se han propuesto diferentes estrategias de cultivo. En general la estrategia socorrida es variar la temperatura de crecimiento entre 28 y 32°C y la inducción entre 39 y 42°C. Existen casos en los que se baja la temperatura después de la inducción, por ejemplo Gupta *et al.* (1999) elevaron la temperatura de 30 a 42°C y después de 2 min redujeron a 37°C. En otro estudio, Chao *et al.* (2002) indujeron a 39°C durante 20 min y después bajaron la temperatura a 37°C, Tabandeh *et al.* (2004) indujeron de 30 a 42°C durante media hora y redujeron a 37°C durante 4 h. Nuestro grupo ha desarrollado una estrategia de inducción basada en oscilaciones (Caspeta *et al.*, 2013). A través de tal estrategia fue posible incrementar la productividad de proteína recombinante. Esto sugiere que disminuir el estrés térmico redundará en mejores rendimientos.

También se ha hecho la inducción sin elevar la temperatura, para ello se utiliza el represor cI silvestre y se provoca la respuesta a estrés SOS agregando ácido nalidíxico o mitomicina D. Como se describió antes (sección 0) esto desata la producción de RecA que a su vez promueve el corte de cI (Valdez-Cruz *et al.*, 2010), lo que en –este caso– desata la producción de proteína recombinante. Además, modificando el termoinductor, Jiang *et al.*

(2013) invirtieron la lógica de control; colocaron el gen de interés bajo el promotor *T7-lacO* y el gen represor *lacI* río abajo del promotor P_L . Así, a 42°C el represor lacI bloquea la transcripción del gen de interés y a 30°C cI^{857} bloquea la transcripción de lacI y por lo tanto se produce la proteína recombinante. En esta versión del STI también es posible inducir a cualquier temperatura agregando IPTG. Este modo de cultivo incrementa el tiempo que las células permanecen a 42°C, para una bacteria mesófila como *E.coli* tal condición implica estrés térmico constante. Asimismo, la adición de un inductor externo –IPTG, ácido nalidíxico o mitocina D– elimina una de las ventajas importantes del STI.

4. Hipótesis

El diseño de un nuevo sistema termo-inducible con un aumento transitorio de temperatura, tipo pulso, resultará en la producción eficiente y libre de estrés térmico de proteína recombinante, en comparación con el sistema tradicional en donde la temperatura elevada se mantiene.

5. Objetivo general

Desarrollar un nuevo sistema termo-inducible que permita la producción prolongada de proteína recombinante que minimice el estrés térmico, sin detrimento de la velocidad de crecimiento, con alto rendimiento de la proteína de interés y de fácil y versátil sustitución de genes.

6. Objetivos específicos

1. Proponer estrategias para construir sistemas termo-inducibles capaces de responder a un estímulo térmico transitorio tipo pulso y permanecer en el estado inducido a temperaturas que son óptimas para el crecimiento celular.

2. Construir cepas de *E. coli* que contengan, cada una, los sistemas termo-inducibles propuestos y el sistema termo-inducible tradicional, todas bajo el mismo contexto y utilizando como gen reportero una proteína recombinante fluorescente.

3. Evaluar el desempeño de cada uno de los sistemas propuestos y compararlos con el tradicional. Se evaluarán los rendimientos, velocidad específica de crecimiento y calidad de la proteína recombinante (fluorescencia específica), en comparación con el sistema tradicional.

7. Materiales y métodos

7.1. Cepas empleadas

Todas las cepas utilizadas provienen de la colección del laboratorio.

Tabla 1. Listado de cepas de *Escherichia coli* usadas en el proyecto.

Cepa	Genotipo
DH5 α	<i>recA1, endA1, hsdR17, lac, glnV44, thi-1, gyrA96, relA1</i>
W3110	<i>F-, λ-, IN(rrnD-rrnE)1, rph-1</i>
ATCC 53606	<i>λcI⁸⁵⁷+</i>

7.2. Oligonucleótidos utilizados

En la Tabla 2 se muestran las secuencias de los oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR, la concentración final utilizada fue de 0.2 μ M, en todos los casos.

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados. Todos están escritos comenzando por el extremo 5', las negritas indican que parte de los oligonucleótidos no alinean con la secuencia original y son usados para agregar alguna característica (ver pie de tabla).

Nombre	Secuencia
cI857 fw ^{α}	GTTTCTTCGAATTCGCGGCCGCTTCTAGATGAGCACAA AAAAGAAACC
cI857 rv ^{β}	GTTTCTTCCTGCAGCGGCCGCTACTAGTATTATTAGCC AAACGTCTCTTCAGGCCACTGACTAG
Prefijo fw	GAATTCGCGGCCGCTTCTAGA GTCAGAATTC

Sufijo rv	CTGCAGCGGCCGCTACTAGTA
Pr fw-EcoRI ^γ	GTCAGAATTC CAGTAACACCGTGCGTGTTGACTATTTTAC
CiLAA rv ^δ	ATCGACTAGTTTAAGCAGCCAGAGCGTAGTTTTTCGTC GTTAGCAGCGCCAAACGTCTCTTCAGGCCACTG
Rec fw	TGCTAGCTACTAGGTGGTTTGT
Rec rv	CGGTACAAACCCATACTAGAAAAAAAAA
Secuenciación fw	TGCCACCTGACGTCTAAGAA
Secuenciación rv	ATTACCGCCTTTGAGTGAGC
E1010 fw	GCAGAATTCTGAGCTAGCGGCGACCCTCATATGGCTTCC TCCGAAGACGTT

α: Agrega la secuencia completa del prefijo; β: agrega la secuencia completa del sufijo; γ: agrega el sitio de restricción de EcoRI y bases extra para dar espacio a la endonucleasa y facilitar el corte; δ: agrega la secuencia codificante para la etiqueta de degradación AANDEYALAA (explicada más adelante).

7.3. Biopartes estándar utilizadas

Las biopartes utilizadas en cada sistema se enlistan en la Tabla 3. Las secuencias se pueden encontrar en el Anexo I: secuencias de las biopartes utilizadas.

Tabla 3. Listado de biopartes utilizadas en el proyecto

Bioparte	Catálogo iGEM
Promotor Pr del fago lambda regulado por CI	R0051
Promotor PTet del operón de tetraciclina	R0040
Promotor sintético constitutivo	J23100
Sitio de unión a ribosoma (Elowitz y Leibler, 2000)	B0034
Proteína rojo fluorescente monomérica (mRFP)	E1010
Terminador transcripcional sintético	B1006
Terminador transcripcional T1 de rrnB de <i>E. coli</i>	B0010
Terminador transcripcional del operon Lux	B0011

Tabla 3. Continuación

Bioparte	Catálogo iGEM
Terminador transcripcional TE del bacteriófago T7	B0012
Represor TetR del operon Tet	C0040
Represor λcI^{857} (clonado de la cepa ATCC53606)	N/A
Integradora gp35 del fago Bxb1	K907000

7.4. Plásmidos

Todos los plásmidos utilizados en el presente trabajo cubren los requerimientos para ser usados en el ensamblaje de biopartes estándar, a menos que se señale lo contrario, los plásmidos utilizados se enlistan en la Tabla 4.

Tabla 4. Plásmidos utilizados en este trabajo

Plásmido	Descripción
pSB1A2	Alto número de copias, derivado de pUC18. Origen de replicación pUC/pBR322/pMB1/ColE1
Clásica-1	R0051+B0034+E1010+B0010
Clásica-2	R0051+B0034+E1010+B0010+R0040+B0034+ λcI^{857} +B0011
Divergente	B1006+C0040+B0034+E1010+B0034+R0051+R0040+B0034+ λcI^{857} +B0011
Convergente	pSB1A2:R0051+B0034+E1010+B0034+C0040+B1006+R0040+B0034+ λcI^{857} +B0011
Convergente LAA	pSB1A2:R0051+B0034+E1010+B0034+C0040+B1006+R0040+B0034+ λcI^{857} +LAA+B0011

7.5. Técnicas moleculares

Ensamblaje de biopartes

Los sitios XbaI y SpeI generan extremos cohesivos compatibles, las biopartes se unen usando estos sitios y generan una secuencia híbrida que no es reconocida por ninguna de las enzimas mencionadas, comúnmente recibe el nombre de cicatriz. Adicionalmente hay dos sitios de restricción NotI que no se utilizan en el proceso de ligación pero que permiten la escisión del inserto (Figura 9).

a) Clonación de un inserto río abajo

Un inserto a colocarse río abajo (Figura 9) en un vector se cortaría con XbaI y PstI, esto separa el inserto del plásmido y debe purificarse después de la digestión. El vector en el que se clona el inserto debe cortarse con SpeI y PstI, esto linealiza el plásmido

b) Clonación de un inserto río arriba

Un inserto a colocarse río arriba (Figura 9) en un vector se corta con EcoRI y SpeI. Esta secuencia debe separarse del plásmido y purificarse, el vector que reciba el inserto debe cortarse con EcoRI y XbaI, esto también línealiza el plásmido. La ligación de extremos cohesivos da dirección al inserto. La nueva construcción posee prefijo y sufijo idénticos a los originales, por lo tanto se pueden agregar otras biopartes estándar río abajo o río arriba siguiendo el mismo protocolo.

Extracción de ADN plasmídico

Se utilizó el kit comercial QIAprep Spin Miniprep (250) Cat. No. 27106 de Qiagen para extraer el ADN plasmídico (ADNp). El método se basa en la adsorción del ADN en una membrana de sílica. La extracción lleva dos etapas, brevemente: a) lisis alcalina, la membrana se solubiliza con dodecil sulfato de sodio en pH alcalino, la solución se neutraliza y el ADNp se renaturaliza, el resto de los componentes precipitan; b) el ADNp se adsorbe en una membrana de sílica y finalmente se eluye con una solución baja en sales.

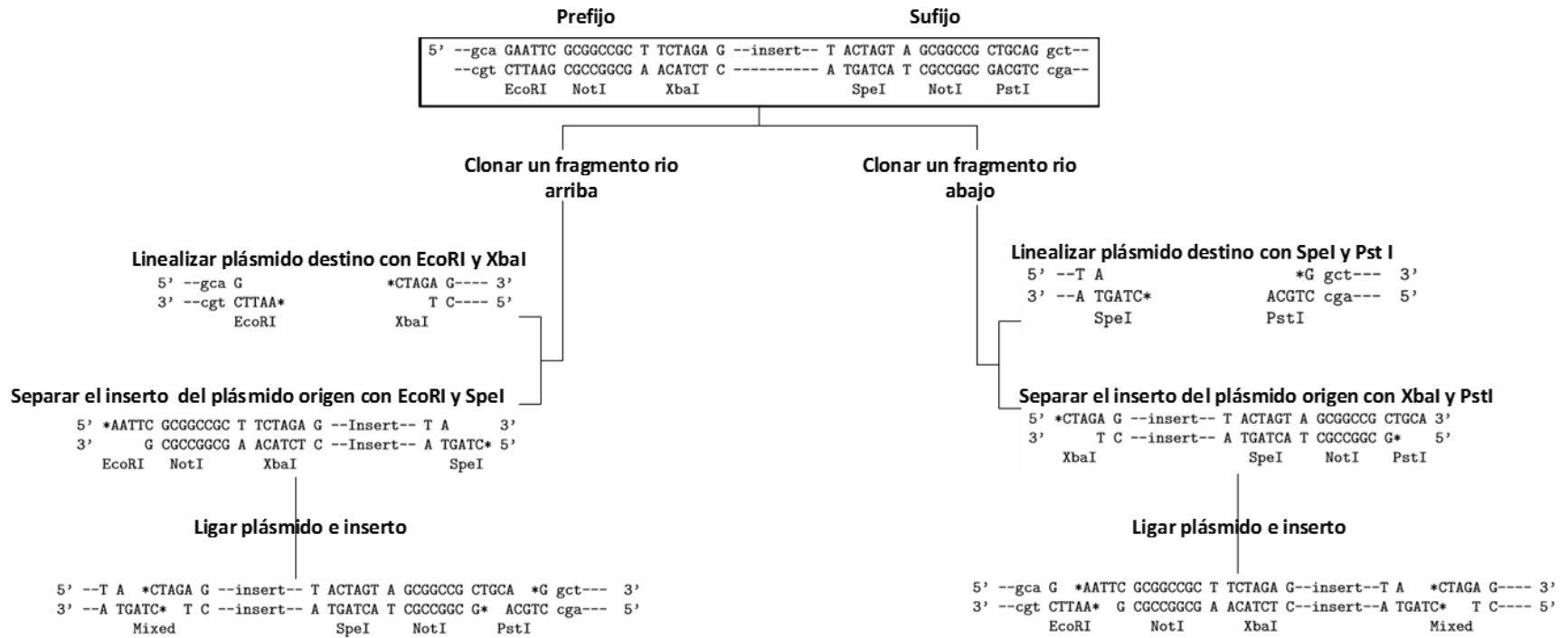


Figura 9. Diagrama de digestiones necesarias para clonar rio arriba o rio abajo en un plásmido para biopartes estándar. La unión de los extremos cohesivos XbaI y PstI dejan un sitio mixto. Basado en el método de ensamblaje de Biopartes estándar (Knight, 2003).

Electroforesis de ADN en gel de agarosa

Se utilizaron geles al 1% w/v (10 g/L) de agarosa de alta pureza (*ultrapure agarose* marca Invitrogen catálogo 16500-500) disuelta en amortiguador tris-borato-EDTA TBE 1x (90 mM tris, 90 mM borato, 2 mM EDTA), durante la polimerización del gel se agregó bromuro de etidio a una concentración final de 0.5 µg/mL. Las muestras se mezclaron directamente con amortiguador de carga 10X (50% v/v glicerol, 0.25% w/v azul de bromofenol disuelto en agua purificada grado farmacopea de los Estados Unidos (USP), justo antes de cargarlas para su análisis en gel. La separación se hizo a 100 V durante 30 – 40 min en una solución de amortiguador TBE 1x. Los geles se visualizaron en un sistema ChemiDoc™ de Biorad. Como referencia se utilizó el marcador de peso molecular O'gene ruler™ 1kb de Thermo Scientific.

Extracción de ADN de bandas de geles de agarosa

Se utilizó el kit comercial High Pure PCR product purification de Roche. Este se basa en la adsorción de ácidos nucleicos en una membrana de fibra de vidrio en presencia de un caótropro (guanidina) para su separación y posterior elución. El proceso se divide en cuatro etapas:

- a) Solubilización del gel en una solución tampón con tiocianato de guanidina.
- b) Adsorción del material genético a la fibra de vidrio.
- c) Lavado y remoción de nucleótidos no incorporados, primers, aceites minerales, sales y polimerasa termoestable.
- d) Recuperación de DNA en buffer Tris-HCl 10 mM pH 8.5.

Transformación

Preparación de células quimio-competentes

Un cultivo de *E. coli* con una densidad óptica (DO) a 600 nm entre 0.5 y 0.6 se centrifugó 10 min a 6,000 rpm a 10°C, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en CaCl₂ 100 mM frío. Las células se mantuvieron resuspendidas en hielo durante 90 min. Se repitió la centrifugación en las mismas condiciones y el pellet se resuspendió en 2 mL (por cada 100mL de cultivo) de CaCl₂ 100 mM frío. Se alicuotaron las células y se almacenaron a -70°C.

Preparación de células electro-competentes

Se cultivaron células de *E. coli* en medio YT2X hasta una DO a 600 nm entre 0.8 y 1.1. Posteriormente se colocó el cultivo en hielo durante 20 min para después centrifugarlo a 4,000 rpm por 10 min a 10°C. Se retiró el sobrenadante y se agregó la mitad del volumen original de glicerol al 10% frío. Se repitió la centrifugación usando las mismas condiciones y se repitió el lavado con glicerol dos veces más. Finalmente las células se resuspendieron en 1 mL de medio GYT (ver Tabla 8) frío, se alicuotaron las células y se almacenaron a -70°C.

Choque térmico

Esta técnica se utiliza para insertar ADN plasmídico en células bacterianas. Se basa en la permeabilización momentánea de la membrana celular lo que permite la incorporación de material genético exógeno. Se agregaron 5 µL del plásmido (o la ligación) a 50 µL de células quimio-competentes y se colocó la mezcla en hielo (0°C) durante 20 min, luego durante 1.5 min a 42°C en un equipo *thermomixer comfort*® de Eppendorf y finalmente se

regresaron al hielo durante 5 min. Las células se recuperaron en medio SOC (Tabla 8) sin antibióticos durante 1 h a 37°C o a 30°C en caso de que tuvieran el promotor λP_R . Finalmente los tubos se cultivaron en medio LB (Tabla 8) sólido con el antibiótico de selección correspondiente.

Electroporación

En esta técnica se permeabiliza la membrana bacteriana utilizando un choque eléctrico en medio bajo en sales. Se colocaron 50 μ L de las células electro-competentes en hielo y se agregaron 1 μ L del plásmido o 2 a 5 μ L de la ligación. La mezcla se colocó en celdas BioRad frías de 1mm de espesor y se dio un pulso eléctrico de 1800 mV durante 5 ms en un equipo *Multiporator* de la marca Eppendorf. Inmediatamente después del pulso se agregó medio SOC sin antibióticos y se incubó durante 1 h a 37°C o a 30°C en caso de que tuvieran el promotor λP_R . Finalmente los tubos se cultivaron en medio LB sólido con el antibiótico de selección correspondiente.

Selección de mutantes

Cultivo selectivo

Los plásmidos utilizados poseen resistencia a ampicilina. Las transformantes fueron sembradas por extensión con varilla en placas con ampicilina a una concentración final de 50 μ g/mL e incubadas toda la noche. Las colonias presentes entre las 12 y 18 h post siembra fueron resembradas por estría masiva en placas con el mismo antibiótico.

PCR: comprobación de mutantes y obtención de biopartes

Para corroborar el tamaño de los insertos se realizó PCR de colonia con los oligonucleótidos prefijo forward y sufijo reverse (Tabla 5) en cada paso del proceso de

construcción. En la Tabla 5 se enlista la longitud de los amplicones para los módulos de cada construcción y para las construcciones completas.

Tabla 5. Tamaño de los amplicones de los módulos y construcciones completas amplificados con los primers prefijo forward y sufijo reverse, las longitudes están en pares de bases.

Bioparte	Longitud amplicón en pb	Observaciones
Convergente	2430	N/A
Convergente LAA	2456	Prefijo incompleto
Divergente	2548	Usando prefix fw y secuenciación rv
Clásico 1	959	N/A
Sensado	893	N/A
Reportero	1572	N/A
Clásica 2	1817	N/A
Efactor heredable	1691	N/A

El análisis de las colonias para confirmar la presencia y longitud de los insertos se hizo indistintamente en un termociclador PCR Sprint de Thermo Hybad o en un equipo Corbett de Corbett Life Sciences con el ciclo de la Tabla 6.

Tabla 6. Ciclo de PCR utilizado para la comprobación de mutantes por PCR de colonia. La flecha de lado izquierdo con el número x35 indica que el ciclo se repite 35 veces. En el alineamiento se usan 56°C para los oligonucleótidos de secuenciación y 61°C para prefijo y sufijo.

	Fase del ciclo	Temperatura [°C]	Tiempo
X35	Desnaturalización inicial	95	5 min
	Desnaturalización	95	45s
	Alineamiento	61 ó 56	45s
	Extensión	68	1 min/kb
	Extensión final	68	5 min

Obtención de biopartes

Se pueden construir biopartes a partir de ADN genómico o plasmídico usando PCR. A grandes rasgos, se trata de estandarizar las secuencias de interés (puede ser codificante o regulatoria) agregando prefijo y sufijo, cambiando el codón de paro por TAATAA y eliminando de la secuencia –en caso de que existan– los sitios de reconocimiento de las

enzimas SpeI, XbaI, EcorI y PstI. Para ello se utilizó la enzima Phusion High-Fidelity DNA polymerase de Thermo Fisher (catálogo F-530S) los reactivos se usaron a las concentraciones recomendadas por el fabricante incluyendo DMSO grado biología molecular al 3% v/v de concentración final. Este procedimiento se usó para obtener λ CI⁸⁵⁷ y para agregar una etiqueta de degradación al sensor del modelo 1 (ver sección 0), para lo cual se usaron los oligonucleótidos (Tabla 2) Ci857 fw/Ci857 rv y Ci857fw/CiLAA rv respectivamente usando el ciclo de la Tabla 7.

Tabla 7. Ciclo de PCR utilizado para la comprobación de mutantes por PCR de colonia, la flecha de lado izquierdo con el número x35 indica que el ciclo se repite 35 veces

Fase del ciclo	Temperatura [°C]	Tiempo
Desnaturalización inicial	98	3 min
Desnaturalización	98	10s
Alineamiento y extensión	72	30s/kb
Extensión final	72	10 min

X35

7.6. Sistema de cultivo de *E. coli*

Medio de cultivo utilizado

En la Tabla 8 se enlistan los medios de cultivo utilizados, todos se prepararon con agua grado USP.

Cultivo en placas de fluorescencia

Se utilizaron placas de la marca FluoroNunc de 96 pozos que minimizan la interferencia de la señal entre pozos aislando la fluorescencia en cada uno de ellos. Los pozos se utilizaron al 80% de su capacidad nominal, se incubaron a 200 rpm en un equipo Innova 2000 con un diámetro de agitación circular de 19 mm a 30°C hasta el fin de la fase de crecimiento exponencial, luego se subió la temperatura de la incubadora a 42°C. Para leer las placas se sacan de la incubadora y se llevan a un fluorímetro Fluostar Omega de BMG Labtech.

Tabla 8. Medios de cultivo utilizados. El medio YT2X se utilizó para preparar células electro-competentes, por esa razón se excluyó el NaCl de su formulación.

Medio de cultivo	Composición	Uso
Luria – Bertani (LB)	Triptona 10 g/L	Generación de bancos celulares, biomasa para extracción de plásmidos, ensayos en placas y selección de mutantes.
	Extracto de levadura 5 g/L	
	NaCl 10 g/L	
	Ampicilina 100 µg/mL	
	Agar bacteriológico 15 g/L	
Medio mineral	MgSO ₄ 1.2 mg/mL	Cinéticas de crecimiento y producción de fluorescencia.
	Tiamina 4.5 µg/mL	
	Glucosa 12 mg/mL	
	Ampicilina 100 µg/mL	
	KH ₂ PO ₄ 13.3 g/L	
YT2X	Triptona 16 g/L	Crecimiento para preparar células electro-competentes.
	Extracto de levadura 10 g/L	
GYT	Glicerol 100 mL/L	Banco de células electro-competentes.
	Extracto de levadura 1.25 g/L	
	Triptona 2.5 g/L	
SOC	Extracto de levadura 5 g/L	Recuperación de las células después de transformar por choque térmico o electroporación.
	Triptona 20 g/L	
	NaCl 0.584 g/L	
	KCl 0.186 g/L	
	MgSO ₄ 2.4 g/L	
	Glucosa 2M 10 mL/L	

Cultivo en matraces agitados

Los cultivos se llevaron a cabo por triplicado en matraces Erlenmeyer bafleados de 250 mL de capacidad con un volumen de operación de 50 mL a 30°C y a 42°C durante la inducción con agitación de 220 rpm en una incubadora Innova 2000 con un diámetro de agitación circular de 19mm.

Cultivos para selección del modelo 1 (ver sección 7.9)

Se utilizó medio LB incubado a 30°C para crecimiento, durante la inducción la temperatura se elevó de 30°C a 42°C con una tasa de calentamiento de 0.2°C/min después se bajó de nuevo a 30°C con la misma tasa de enfriamiento, estas proporciones solo se monitorearon, no se controlaron.

Cultivos en lote en medio mineral

Se inició cultivo a 30°C partiendo de viales a -70°C sembrados en LB líquido. Los inóculos se tomaron de estos tubos y se sembraron en medio mineral con 12 g/L de glucosa a 30°C. Alrededor de 4 DO₆₀₀ se inició la inducción a 42°C, elevando la temperatura a una tasa de 4.3°C/min, misma que se sostuvo por dos horas para luego regresar a 30°C empleando una tasa de 6.5°C/min. Estas proporciones solo se monitorearon, no se controlaron

Cultivos en lote seriados

Se realizaron cultivos en lote en medio mineral suplementado con 12g/L de glucosa (Figura 10). La inducción se inició cuando los cultivos alcanzaron 4 DO, esta se mantuvo dos horas y posteriormente se bajó la temperatura a 30°C. Los cultivos se mantuvieron hasta casi agotar la glucosa, posteriormente se tomó un inóculo de los cultivos y se sembraron de nuevo en medio fresco. El proceso se repitió sin volver a inducir.

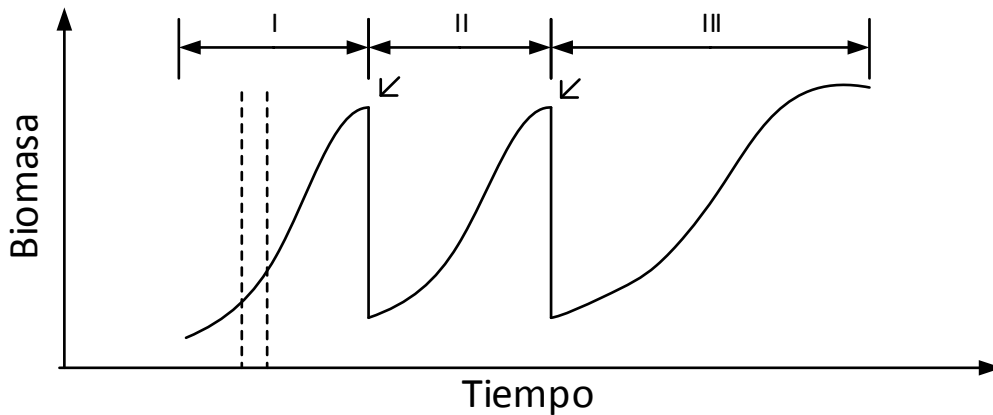


Figura 10. Cultivos en lote seriados, para facilitar su explicación se pueden dividir en ciclos: I) al llegar a 4 DO se indujeron durante dos horas a 42°C. II) siembra a partir de inóculos provenientes de la fase I, se mantuvo el cultivo a 30°C. III) siembra a partir de inóculos provenientes de la fase II, crecimiento a 30°C hasta fase estacionaria. Las líneas punteadas representan la duración de la inducción, las flechas el momento de la resiembra y las cotas con números romanos delimitan las fases del cultivo.

7.7.Métodos de seguimiento de los cultivos

Determinación de biomasa

La concentración de biomasa se determinó con base en la densidad óptica medida a una longitud de onda de 600nm en un espectrofotómetro Beckman DU650. Para esto se extrajeron muestras del matraz y se mezclaron con las cantidades de agua necesarias para mantener la lectura en un máximo de 0.8DO (diluciones entre 1:2 y 1:40). Se utilizaron celdas de polietileno de 1cm de espesor.

Fluorimetría

En este trabajo se utilizó una variante monomérica de la proteína rojo fluorescente (mRFP) cuyo pico de excitación es de 584 nm y de emisión es 607 nm (Campbell *et al*, 2002), tales longitudes de onda fueron utilizadas en la medición. Se utilizó un fluorímetro LS55 Luminiscense Spectrometer de Perkin Elmer con celdas de cuarzo con paso de luz de 10 mm de la marca Perkin Elmer (catálogo B0631124).

Fluorescencia relativa, específica y normalizada

Los valores de fluorescencia se trataron según la ecuación 1. Se les restó el fondo que genera un cultivo que no produce mRFP, en cada caso se ajustó con la cepa correspondiente (W3110 o DH5 α) en el medio correspondiente (LB o mineral). Los valores así obtenidos se reportan como unidades relativas de fluorescencia (URF).

$$f = (fc - fnd) * d \quad (1)$$

donde f es la fluorescencia, fc es el dato crudo de fluorescencia, es decir el valor leído directamente del instrumento, fnd es el valor de fluorescencia que arroja un cultivo que no produce mRFP y d es el valor de dilución de la muestra.

Para facilitar la comparación entre cepas y colonias distintas se calculó la fluorescencia específica dividiendo la fluorescencia relativa entre la biomasa calculada en densidades ópticas (ecuación 2), dando así una idea más clara de los valores de fluorescencia en función de la biomasa.

$$fe = \frac{f}{DO_{600}} \quad (2)$$

dónde fe es la fluorescencia específica, f es la fluorescencia calculada con la ecuación 1, DO₆₀₀ es la absorbancia medida a 600 nm

En algunos casos la fluorescencia se dividió entre el valor máximo obtenido en cada cinética (ecuación 3), de tal manera que los valores van de 0 a 1, siendo 1 el máximo de fluorescencia posible. En estos casos se le nombró fluorescencia normalizada.

$$fn = \frac{f}{fmax} \quad (3)$$

dónde fn es la fluorescencia normalizada, f es la fluorescencia calculada según la ecuación 1, fmax es el valor máximo de fluorescencia en esa cinética

Linealidad de medición de fluorimetría.

Para determinar el intervalo lineal del instrumento se realizó una curva a partir de una muestra saturada de mRFP proveniente de un cultivo en matraz de DH5 α con la construcción clásica 1 (ver más adelante), inducida de modo tradicional, esto es, se dejaron crecer las células hasta una DO de 2.8 y en ese momento se elevó la temperatura a 42°C y se mantuvo así el resto del tiempo de cultivo.

La muestra se midió en el fluorímetro con diluciones desde 1:2 hasta 1:100. Los datos se trataron según la ecuación 1, de la que se obtuvo la fluorescencia. Enseguida se construyó una gráfica (Figura 11) para determinar el intervalo en el que la fluorescencia es independiente de la dilución. El promedio (1382 URF) de las diluciones 1:40, 1:80 y 1:100 se usó como el valor real de fluorescencia de la muestra saturada. Con base en este valor se estimaron los valores esperados de fluorescencia que deberían obtenerse con cada dilución. Para ello, se dividió la fluorescencia de la muestra saturada entre cada dilución. Al comparar estos valores esperados con los obtenidos de la ecuación 1 se determinó el intervalo lineal del instrumento (Figura 12), que corresponde a la región en la que la fluorescencia esperada y la experimental se ajustan a la ecuación de la línea recta. Además se calculó el porcentaje de error experimental para cada par de datos como lo indica la ecuación 4 y se consideraron dentro del intervalo lineal aquellos valores cuyo porcentaje de error relativo fuera menor a 10%.

$$\%e = \frac{ft - f}{ft} \quad (4)$$

dónde %e es el porcentaje de error experimental, ft es la fluorescencia teórica obtenida de dividir la fluorescencia de la muestra saturada entre cada dilución y f es la

fluorescencia obtenida de la ecuación 1

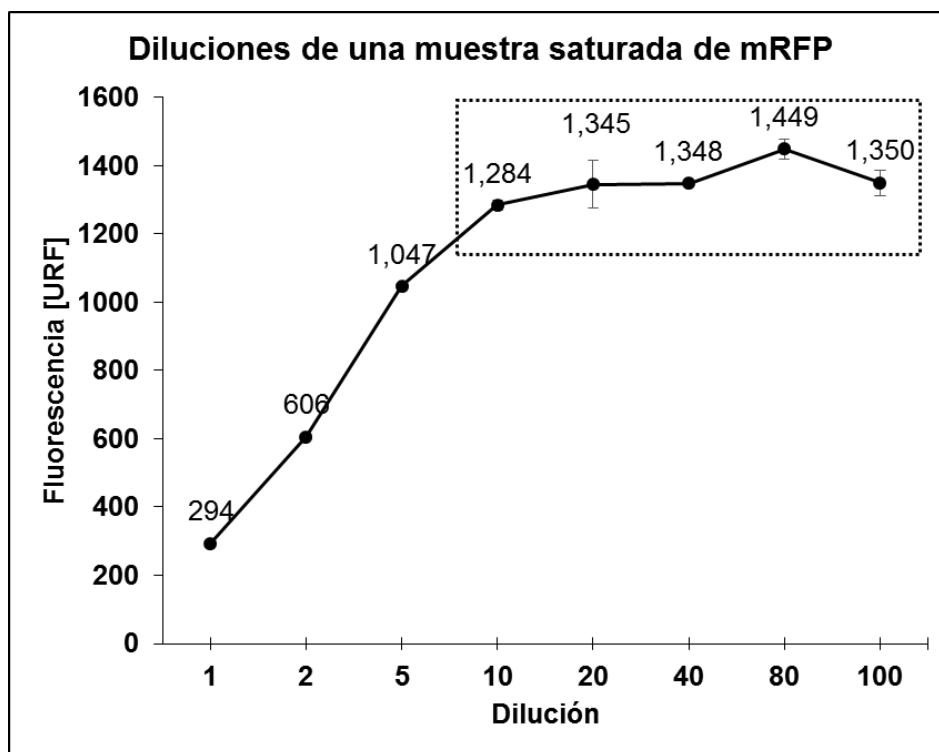


Figura 11. Diluciones de una muestra saturada de mRFP. Los valores en cada punto son el promedio de la fluorescencia obtenida según la ecuación 1 de tres diluciones hechas por separado, las barras representan la desviación estándar. El recuadro con línea punteada indica el intervalo en el que la fluorescencia es independiente de la dilución. Se anotan los valores promedio para cada dilución.

De la Figura 13 se deduce que el intervalo lineal aceptable para la medición de la proteína fluorescente de interés va de las 13 a las 138 URF, es decir, siempre que el valor de fluorescencia crudo esté dentro de ese intervalo puede obtenerse de manera confiable el valor de fluorescencia con la ecuación 1. Fuera de ese intervalo la medición no es confiable y deberán realizarse las diluciones necesarias hasta entrar en la región lineal.

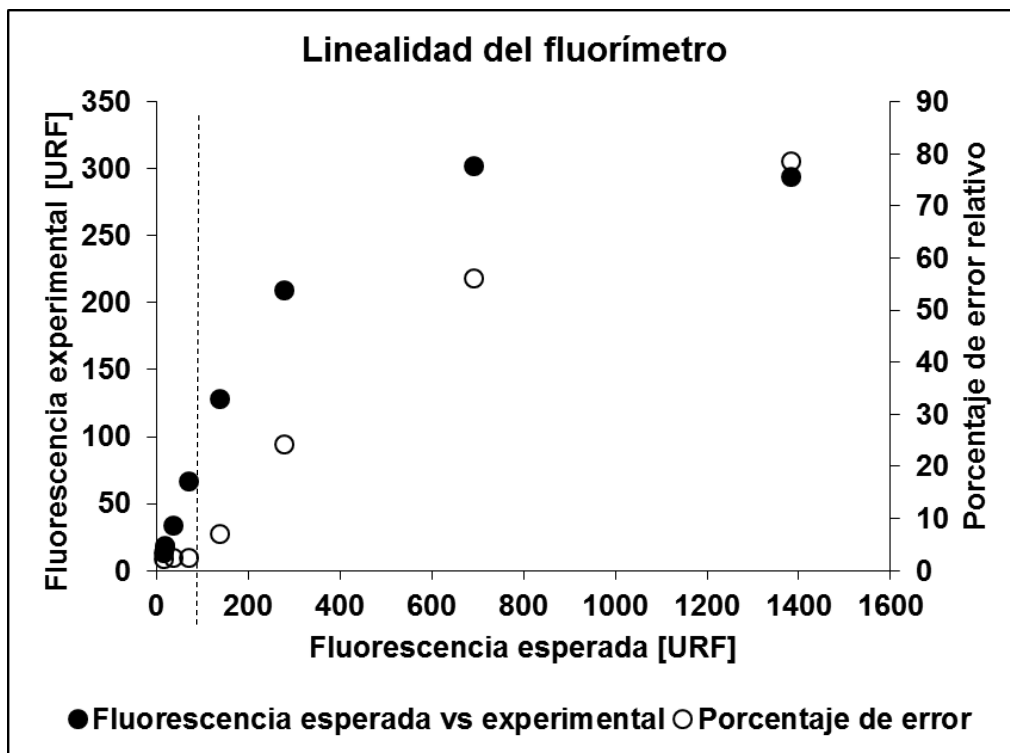


Figura 12. Linealidad del fluorímetro..La gráfica muestra la relación entre fluorescencia esperada y el valor experimental. La línea punteada marca el umbral que separa la región lineal del instrumento de la saturación, por encima del umbral el porcentaje de error es mayor al 24%

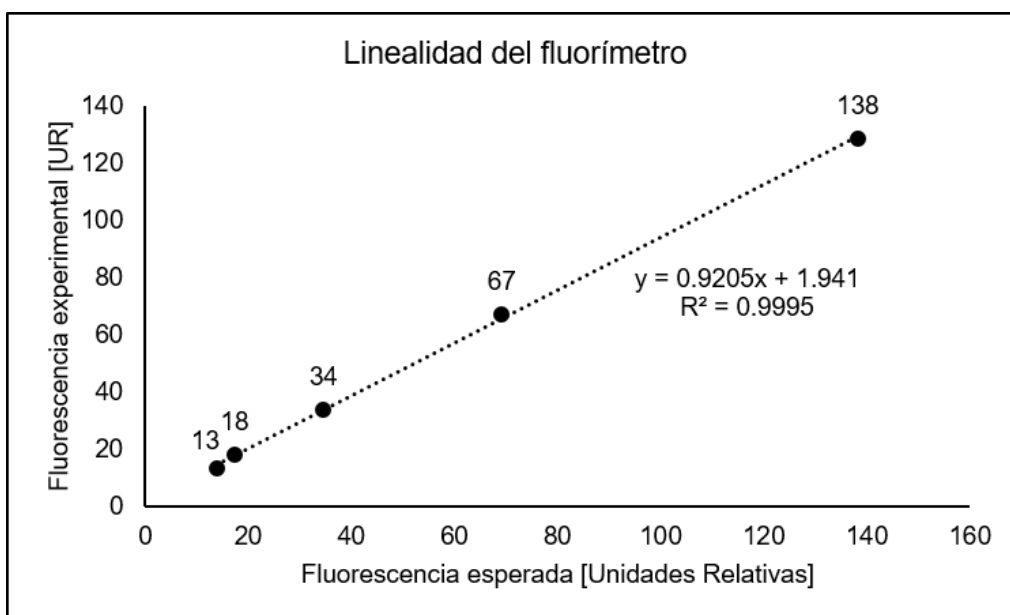


Figura 13. Linealidad del fluorímetro. Esta gráfica es un acercamiento a la región lineal en la Figura 12, los valores en cada punto son las fluorescencias obtenidas según la ecuación 1 para cada dilución. La línea punteada es el ajuste de la regresión lineal, se muestran los valores de esta en la gráfica.

Cuantificación de glucosa

Las muestras del caldo de cultivo se tomaron en condiciones de esterilidad y se centrifugaron a 14,000 rpm por 10 min para obtener un sobrenadante con el mínimo de biomasa. La concentración de glucosa se cuantificó en el analizador bioquímico YSI 2950 (Xylem Analytics) cuyo principio de detección se basa en D-glucosa oxidasa inmovilizada.

7.8.Cálculos cinéticos

Cálculo de velocidad específica de crecimiento

Bajo condiciones de crecimiento exponencial, la cinética se puede describir como lo indica la ecuación 5. Integrando la ecuación y aplicando logaritmos se puede ajustar a la ecuación de la línea recta como lo muestra la ecuación 6, de tal manera que la velocidad de crecimiento es igual a la pendiente de la línea recta en una gráfica de tiempo contra logaritmo natural de la biomasa y la ordenada al origen corresponde al logaritmo natural de la población inicial.

$$\frac{dx}{dt} = \mu x \quad (5)$$

$$\int_{x_0}^x \frac{dx}{dt} = \int_{t_0}^t \mu x$$

$$\ln \frac{x}{x_0} = \mu t + c$$

$$\ln x = \mu t + \ln x_0 \quad (6)$$

dónde x es la biomasa al tiempo t , x_0 es la biomasa inicial, μ es la velocidad de crecimiento, t es el tiempo y c es una constante.

7.9. Posibles redes de regulación que abaten el estrés térmico

Factores críticos

El diseño inició con la identificación de los factores críticos imprescindibles y los deseables en el nuevo sistema (Tabla 9), a partir de la información disponible sobre el sistema de inducción térmica clásico. El nuevo sistema deberá producir proteína recombinante a partir de termo inducción y evitar los efectos negativos causados por estrés en el sistema tradicional.

Tabla 9. Factores críticos y deseables del sistema.

Críticos	Deseables
Minimizar el estrés térmico	Versatilidad en la inclusión de genes
Inducción libre de adición de sustancias	
Minimizar expresión basal	
Alta productividad	

Modelo clásico 1

Este STI se puede separar en dos módulos, el primero encargado de sensar la temperatura y el segundo encargado de arrojar una señal. En esta versión se decidió que la secuencia codificante del represor λCI^{857} estuviera en el genoma del hospedero, para ello se utilizó la cepa 53606 de *E.coli*.

En la Figura 14 se muestra el diseño general de la red. Se decidió utilizar un sitio de unión a ribosomas sintético (Elowitz & Leibler, 2000), cuya fuerza es igual a 1, según el registro de partes del iGEM (parts.igem.org).

El gen reportero seleccionado fue una variante monomérica de la proteína roja fluorescente (mRFP) (Campbell *et al.*, 2002), por la facilidad de seguimiento durante el proceso de la producción de proteínas fluorescentes. El terminador transcripcional usado fue una

combinación de dos secuencias de terminadores de *E. coli* el terminador T1 del gen *rrnB* y el terminador de la ARNp del bacteriófago T7. El represor λcI^{857} está bajo un promotor constitutivo.

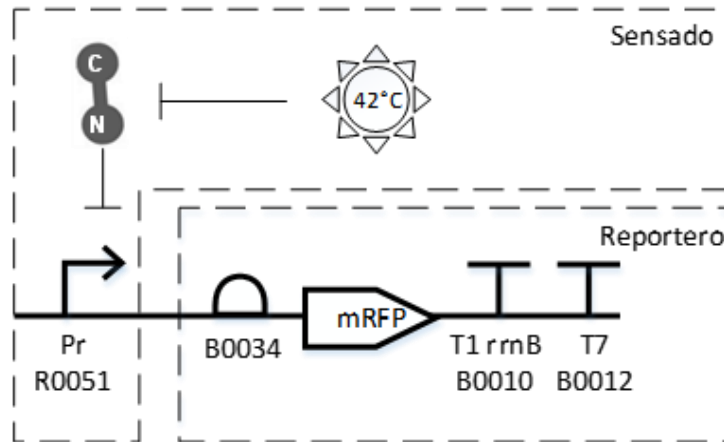


Figura 14. Representación general de la RRG del STI clásico 1, los recuadros con líneas discontinuas delimitan los módulos. La simbología se puede consultar en la Figura 2. Los códigos numéricos son los números de catálogo del iGEM.

Se insertó la construcción del sistema clásico en un plásmido pSB1A2 y se generó una construcción clásica 1, la cual posee únicamente la región codificante para mRFP bajo el promotor λP_R (Figura 15).

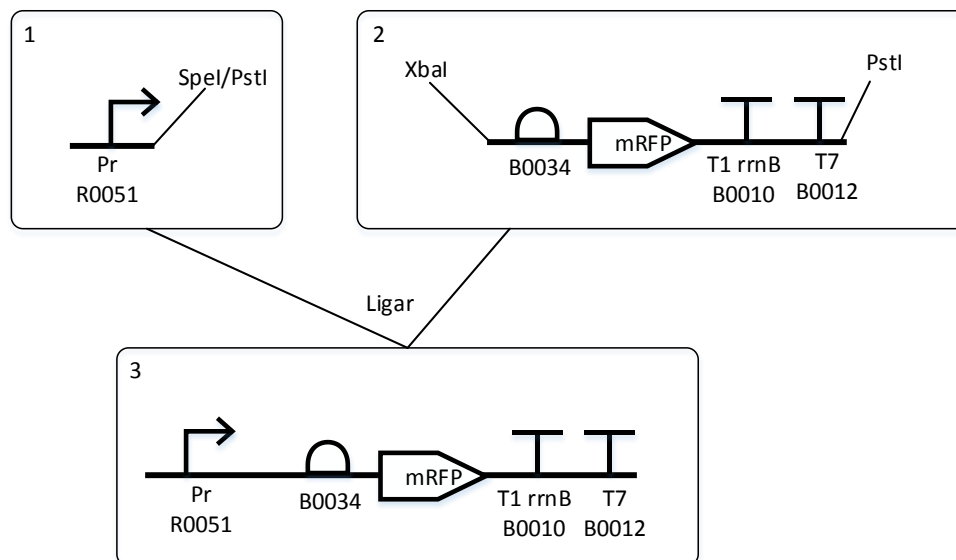


Figura 15. Estrategia seguida para la construcción del STI clásico 1, las endonucleasas anotadas a las orillas de las construcciones indican las enzimas utilizadas en las digestiones.

Modelo clásico 2

Se construyó una segunda versión del sistema clásico que puede utilizarse en cualquier cepa de *E. coli*, pues el represor termosensible se incluye en la construcción. En este caso el represor λCI^{857} está bajo control del promotor P_{Tet} , los módulos son los mismos pero físicamente el de sensado tiene secuencias distintas (Figura 16). Para construirlo se clonó la secuencia del represor λCI^{857} a partir de la cepa 53606 de *E. coli* tal como se muestra en la Figura 17.

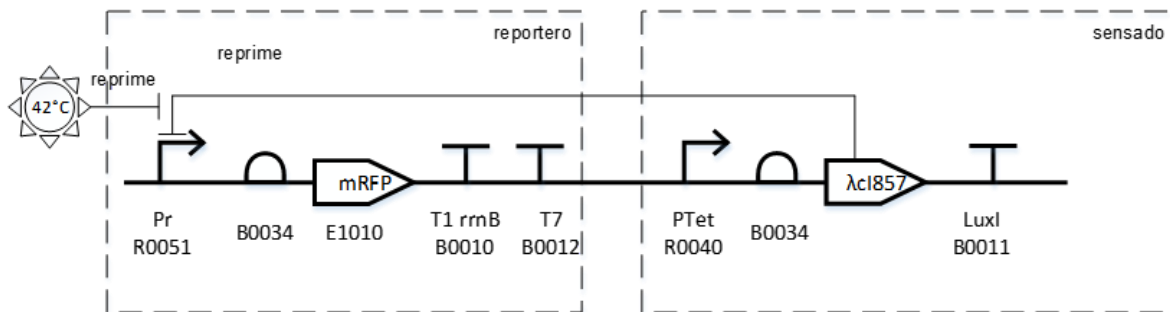


Figura 16. Modelo clásico 2. Los recuadros delimitan los módulos. La nomenclatura puede consultarse en la Figura 2. Los códigos numéricos son los números de catálogo del iGEM.

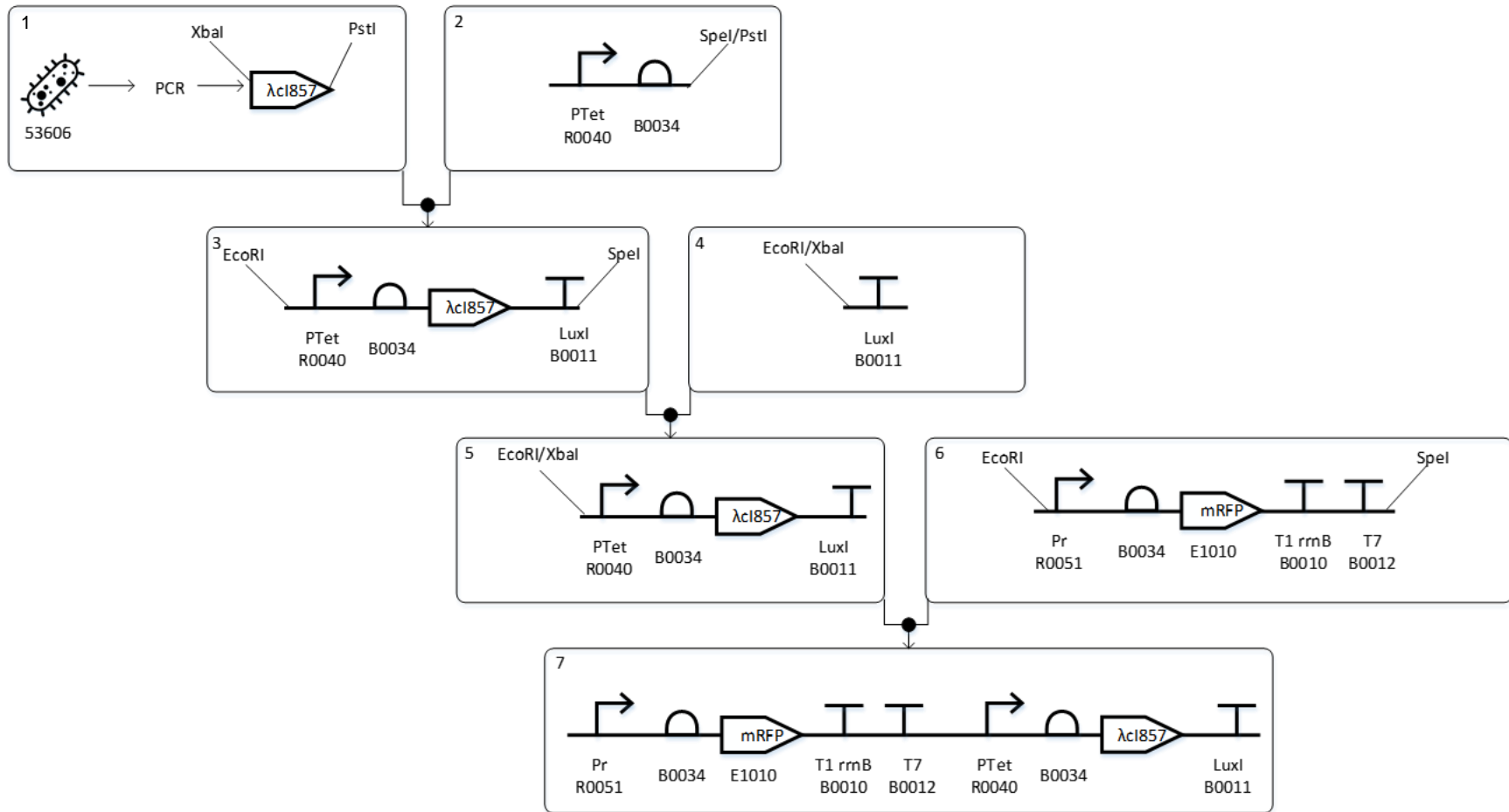


Figura 17. Estrategia seguida para la construcción del STI clásico 2. En el recuadro 1 se indica que la secuencia codificante de λI^{857} se obtuvo por PCR de la cepa 53606 de *E. coli*. Cada bioparte se digirió con las enzimas indicadas en los recuadros respectivos. Los círculos negros en la unión de los recuadros representan ligaciones. Las biopartes se purificaron y ligaron. La construcción final se muestra en el recuadro 6. Todas las biopartes mostradas se encuentran en el plásmido pSB1A2.

Modelo 1: inducible por pulso de temperatura

Se ha probado la construcción de redes en las que la producción de una proteína “A” deriva en la represión de la producción de una proteína “B” que a su vez reprime a la primera (Elowitz & Leibler, 2000). Este modelo utiliza el mismo principio, su representación en el nivel más abstracto se muestra en la Figura 18. Lo componen dos operadores lógicos NOT. La señal de entrada al primero es el represor TetR, la salida de este y entrada al segundo operador es el represor λCI^{857} . La proteína reportera se expresa cuando TetR está presente en el sistema.

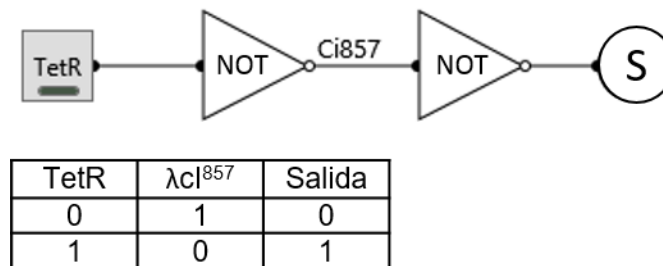


Figura 18. Representación abstracta del modelo 1. λCI^{857} se encuentra bajo un promotor controlado negativamente por TetR. El recuadro representa TetR como señal de entrada al operador lógico, el triángulo representa al operador 'NOT' y la letra S representa la salida del circuito, en este caso proteína recombinante. La tabla indica los posibles estados del circuito

Este trabajo propone elaborar una red en la que el represor λCI^{857} se encuentre regulado por otro represor. De manera que, la proteína recombinante se exprese en un operón con el represor de λCI^{857} . En este caso, la copia de λCI^{857} se encontrará en un plásmido y no en el genoma de la bacteria. Esta configuración debe permitir que un pulso de temperatura libere el promotor P_R y se produzca suficiente represor TetR para inhibir la producción de λCI^{857} .

Identificación de módulos

En esta RRG es necesario agregar un módulo responsable de mantener el estado inducido en las células, los otros dos módulos son los mismos que en los casos anteriores.

Los módulos son:

- Sensor: detecta el incremento de temperatura (inductor) e interactúa con regiones del ADN. Esto permite que la señal inductora sea interpretada por la maquinaria celular
- Reportero: realiza un cambio en el fenotipo en respuesta al estímulo inductor. Esto es, promueve la transcripción del gen de interés como consecuencia de la respuesta del termosensado.
- Mantenimiento: gracias a este el estado inducido permanece al bajar la temperatura del cultivo.

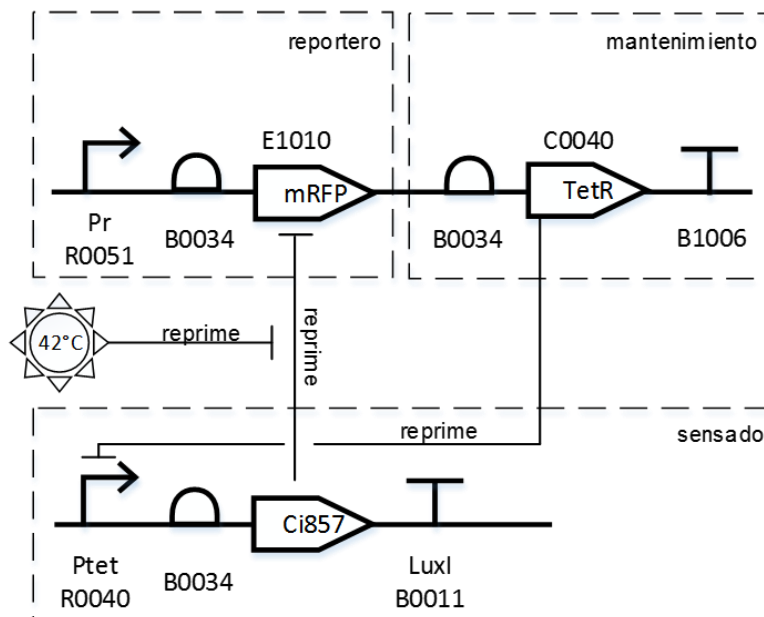


Figura 19. Esquema de la RRG del modelo 1. La simbología puede consultarse en la Figura 2. Las líneas punteadas delimitan los módulos.

Versiones del modelo 1

Para su construcción se probaron dos versiones, cuyas estrategias de construcción se muestran en las figuras 20 y 21. En la primera versión el módulo del reportero y de mantenimiento se encuentran en la misma hebra de ADN que el de sensado y, por lo tanto, en el mismo sentido de transcripción, por lo que se le nombró convergente (Figura 22). La segunda versión tiene los módulos del reportero y mantenimiento en la hebra complementaria, es decir la transcripción ocurre en sentido opuesto, por lo que a esta se le nombró divergente (Figura 23).

Para lograr lo anterior se colocaron los módulos de mantenimiento y del reportero en un plásmido y el módulo de sensado en otro. El primer plásmido se digirió con las enzimas XbaI y SpeI mientras que el de sensado se digirió únicamente con XbaI. Dado que XbaI y SpeI generan extremos cohesivos idénticos, el reportero y mantenimiento se pueden ligar en cualquiera de los dos sentidos y depende de este la distancia que habrá entre EcoRI y XbaI (Figura 21). Durante la ligación no hay control de la dirección en la que el sensor se ligará, así que las colonias se evaluaron por PCR con primers que amplifican solo en un sentido o en otro.

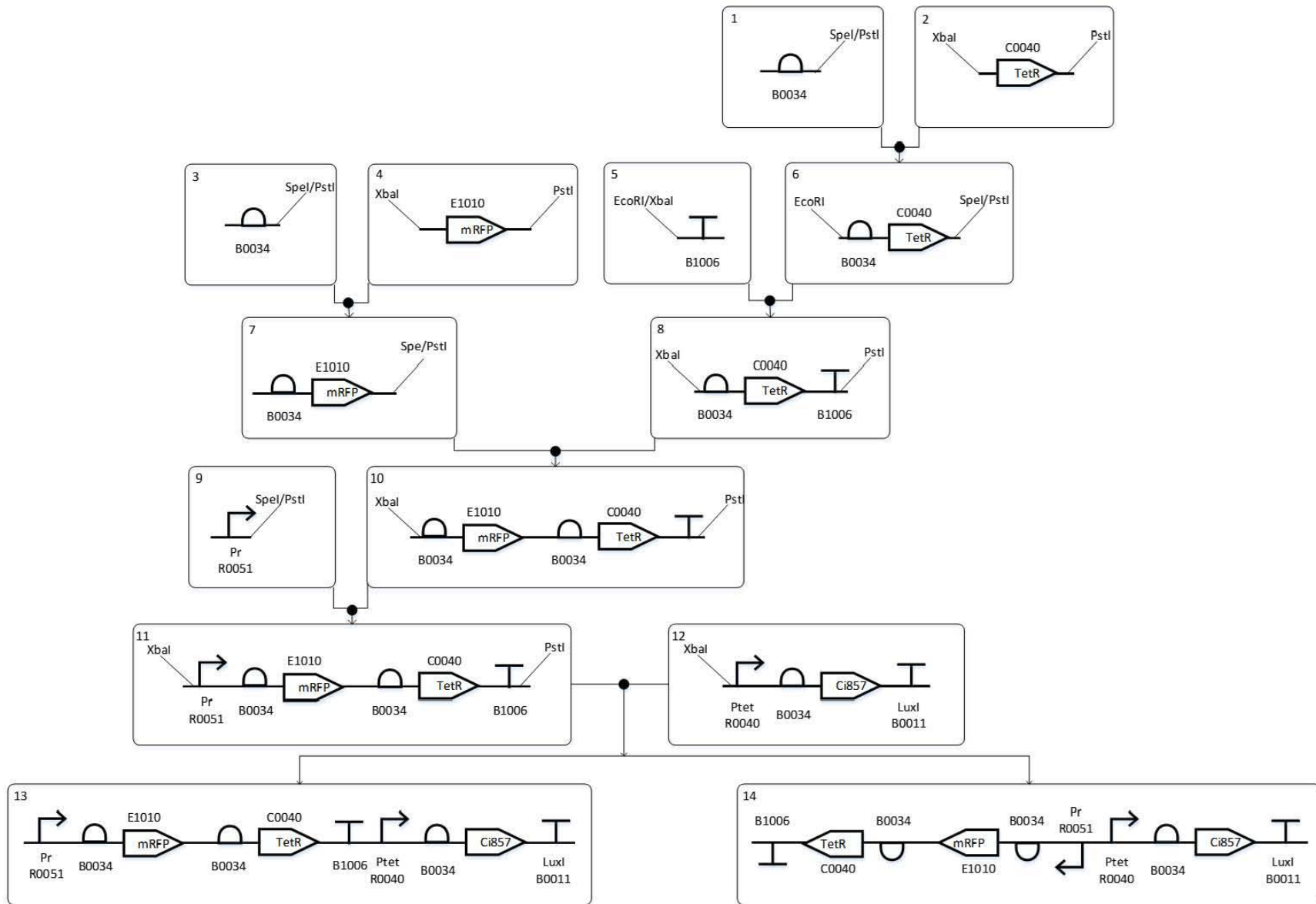


Figura 20. . Estrategia seguida para la construcción del STI modelo 1. Cada bioparte se digirió con las enzimas indicadas en los recuadros respectivos. Los círculos negros en la unión de los recuadros representan ligaciones. Las biopartes se cortaron, purificaron y ligaron como se indica en secciones previas. El recuadro 11 muestra los módulos del reportero y mantenimiento y el 12 muestra el sensor. Existen dos posibles resultados de la última ligación: convergente (recuadro 13) o divergente (recuadro 14).

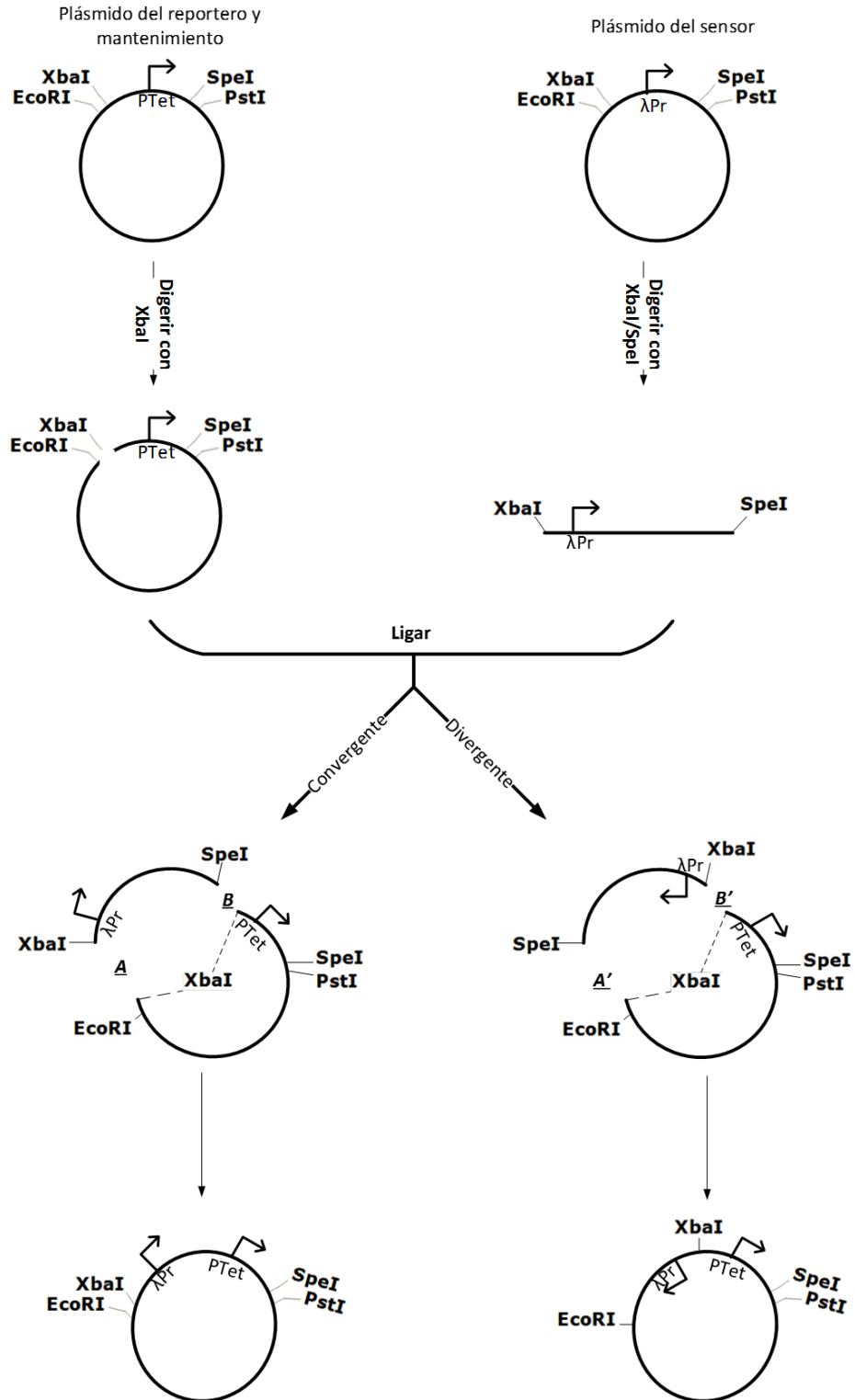


Figura 21. Diagrama de la última ligación del modelo 1. En la versión convergente en la unión marcada A se regenera el sitio $XbaI$, en B se genera una cicatriz. En la divergente en A' se genera una cicatriz y en B' se regenera $XbaI$. Al finalizar el sitio de reconocimiento de $XbaI$ se regenera en sitios distintos.

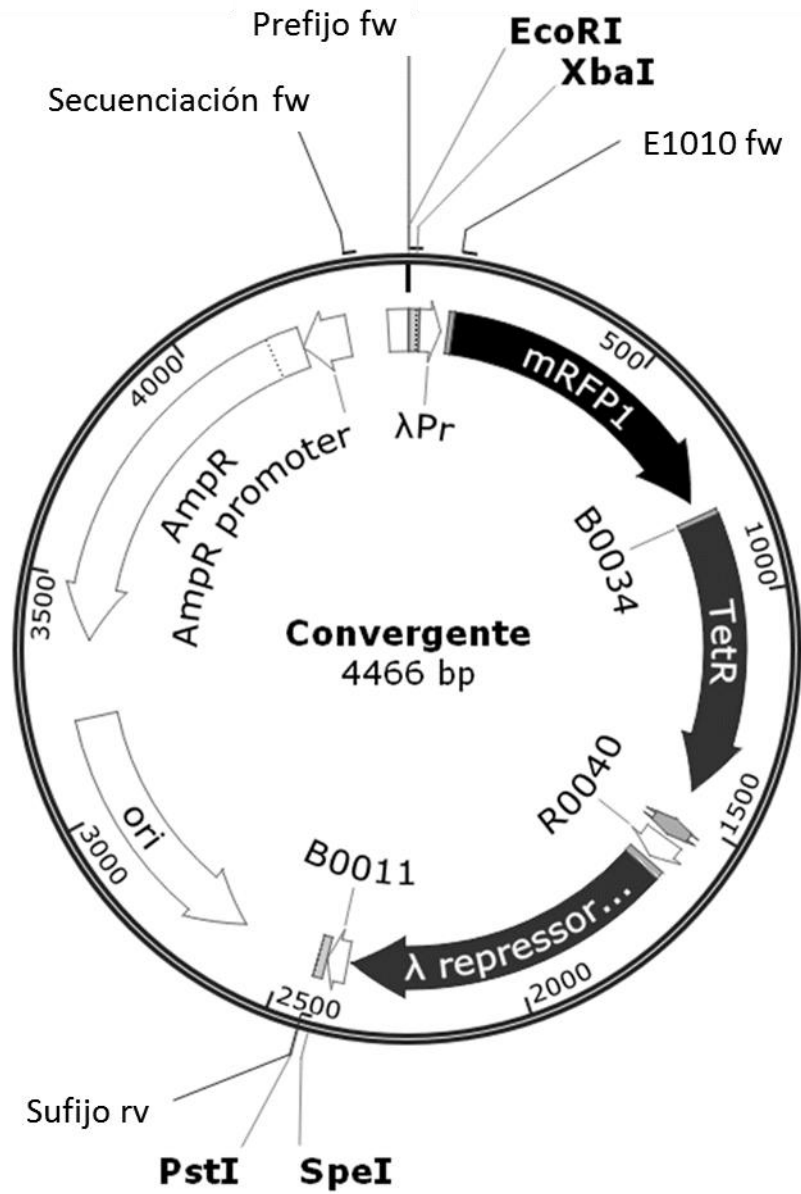


Figura 22. Modelo 1 con promotores convergentes. Los promotores λ Pr y PTet y el resto de las secuencias codificantes se encuentran en la misma hebra y se transcriben en el mismo sentido. Los sitios de restricción en el prefijo se mantienen intactos (XbaI y EcoRI). Los primers prefijo (Pref FWD) y sufijo (sufix REV) amplifican una región de 2,500pb, que corresponde a la construcción completa. Sin el inserto el amplicón es de 900pb.

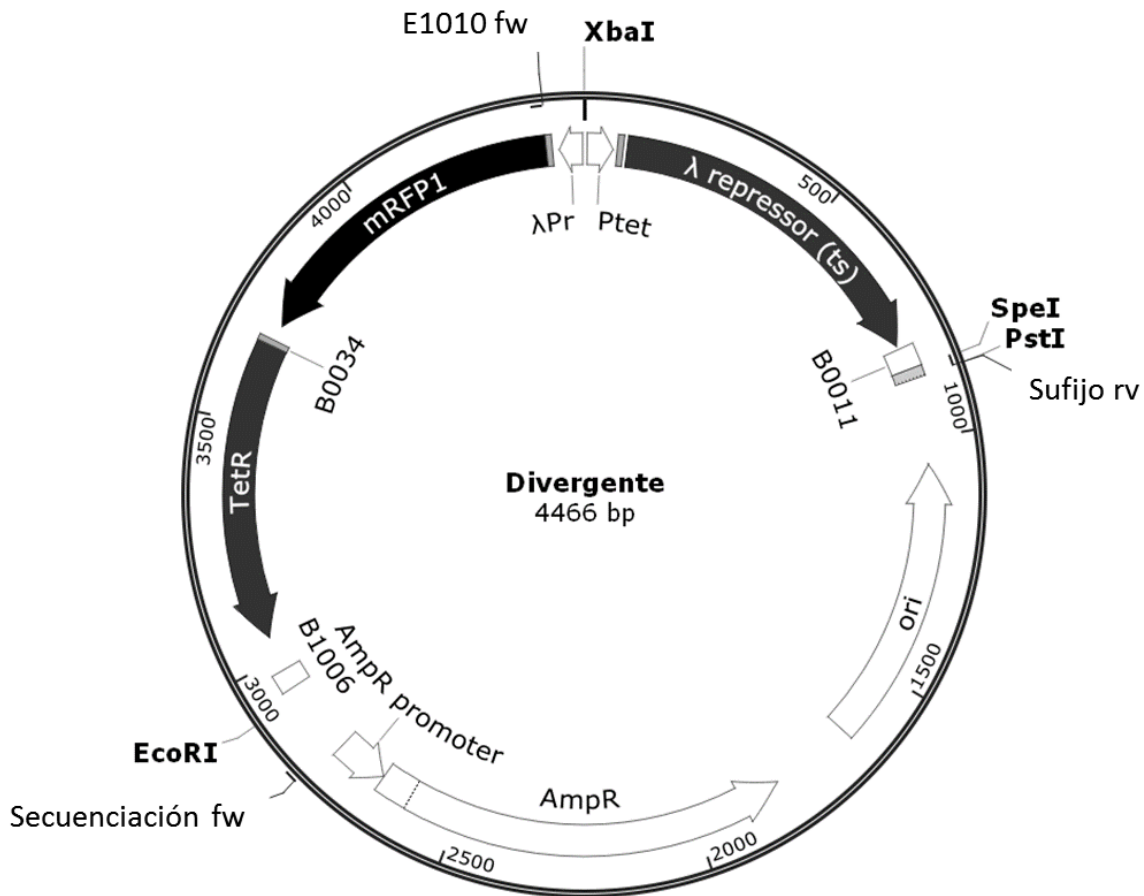


Figura 23. Modelo 2 con promotores divergentes. El sufijo pierde el sitio de restricción XbaI y este se reubica entre los promotores de cada módulo. El oligonucleótido para prefijo ya no alinea en el plásmido, por eso no se muestra. Como primer forward se utilizó una secuencia constante en el plásmido (VRF2). El primer forward de la mRFP (FWD E1010) funciona como "reverse" en este par ya que su secuencia está codificada en la cadena complementaria comparada con VRF2.

Convergente con etiqueta de degradación

Al represor λcI^{857} se le agregó el polipéptido AANDENYALAA (en lo sucesivo LAA) al extremo carboxilo (Figura 24) usando un oligonucleótido antisentido con la secuencia codificante en el extremo 5'. Esta secuencia es una etiqueta de degradación reconocida por el sistema SsrA que reduce la vida media de la proteína a cerca de 5 minutos (Elowitz & Leibler, 2000).

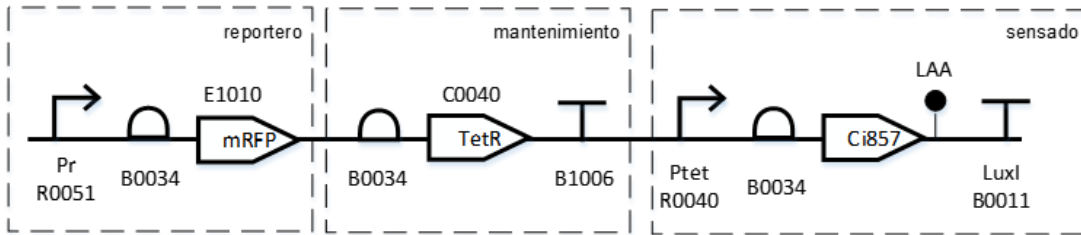


Figura 24. Modelo 1 convergente con la etiqueta de degradación AANDENYALAA, la simbología puede consultarse en la Figura 2.

Para ello, el modelo 1 se amplificó con primers que alinean en el promotor λ Pr (Tabla 2) en sentido y en la secuencia codificante del represor λ Ci⁸⁵⁷ en antisentido. Al primero se le añadió un sitio de EcoRI mientras que al segundo se le añadió la etiqueta de degradación AANDENYALAA y un sitio SpeI. Se utilizó una versión de alta fidelidad de la Taq polimerasa obtenida de *Thermo Scientific*. Se probaron cuatro temperaturas de alineamiento con 3% de DMSO y sin DMSO, con el objetivo de encontrar las condiciones óptimas.

Tabla 10. Condiciones probadas durante la amplificación del modelo 1 agregando una etiqueta de degradación. La flecha indica la repetición de los pasos del ciclo, x35 representa el número de repeticiones. Las condiciones mostradas se probaron sin DMSO y con 3% de DMSO.

Fase del ciclo		Temperatura [°C]				Tiempo
X35	Desnaturalización inicial	98				3 min
	Desnaturalización	98				10 s
	Alineamiento	62	63	68	72	45 s
	Alineamiento y extensión	72				30 s/kb
	Extensión final	72				10 min

El amplicón de interés y un plásmido pSB1A2 con el terminador transcripcional B0011 se digirieron con las enzimas de restricción SpeI y EcorI y XbaI/EcorI respectivamente, el primero se defosfató. Después del análisis electroforético se purificaron por columna.

Modelo 2: heredable

Esta versión del STI debe ser inducible por un incremento momentáneo de temperatura y la producción de la proteína recombinante debe seguir aún después de bajarla, además la progenie de la célula debe sintetizar la proteína recombinante sin someterse al incremento de temperatura. Para su funcionamiento se identificaron los módulos siguientes:

- d) Sensor: detecta el incremento de temperatura (inductor) e interactúa con regiones del ADN. Esto permite que la señal inductora sea interpretada por la maquinaria celular.
- a) Memoria: la progenie presenta el comportamiento de las células inducidas sin someterse al incremento de temperatura.
- e) Reportero: realiza un cambio en el fenotipo en respuesta al estímulo inductor. Esto es, promueve la transcripción del gen de interés como consecuencia de la respuesta del termosensado.
- f) Mantenimiento: el estado inducido permanece al bajar la temperatura del cultivo, pero no opera a temperaturas altas.

Al igual que en el anterior, este modelo puede representarse en abstracto (Figura 25). Dos operadores lógicos lo describen: OR, la salida del operador es verdadera cuando una de las dos o ambas señales de entrada son verdaderas y NOT, descrito previamente.

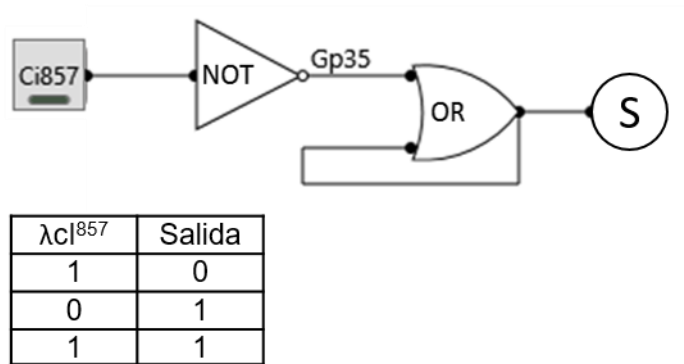


Figura 25. Representación abstracta del segundo modelo, la tabla indica los posibles estados del circuito la 'S' al final indica la señal de salida, es decir la proteína recombinante. El recuadro representa TetR como señal de entrada. El triángulo representa al operador 'NOT'. El segundo símbolo parecido a un triángulo con bordes redondeados representa el operador 'OR'. El círculo al final con la letra S representa la señal de salida, que en el STI heredable es la síntesis de la proteína mRFP

Para construir el módulo de memoria se utilizó la recombinasa Gp35 del micobacteriófago Bxb1, la cual pertenece al grupo de las recombinasas de serina y cataliza la recombinación únicamente en presencia de dos secuencias conocidas como attB (por su nombre en inglés *attachment bacteria*) y attP (por su nombre en inglés *attachment phage*) que después del evento se mezclan y generan los sitios attL (por su nombre en inglés *attachment left*) y attR (por su nombre en inglés *attachment right*) (Figura 26), la recombinación es irreversible en ausencia de la proteína Gp47. Una vez provocada la recombinación que deriva en la expresión de una proteína heteróloga, las siguientes generaciones la deberán expresar constitutivamente.

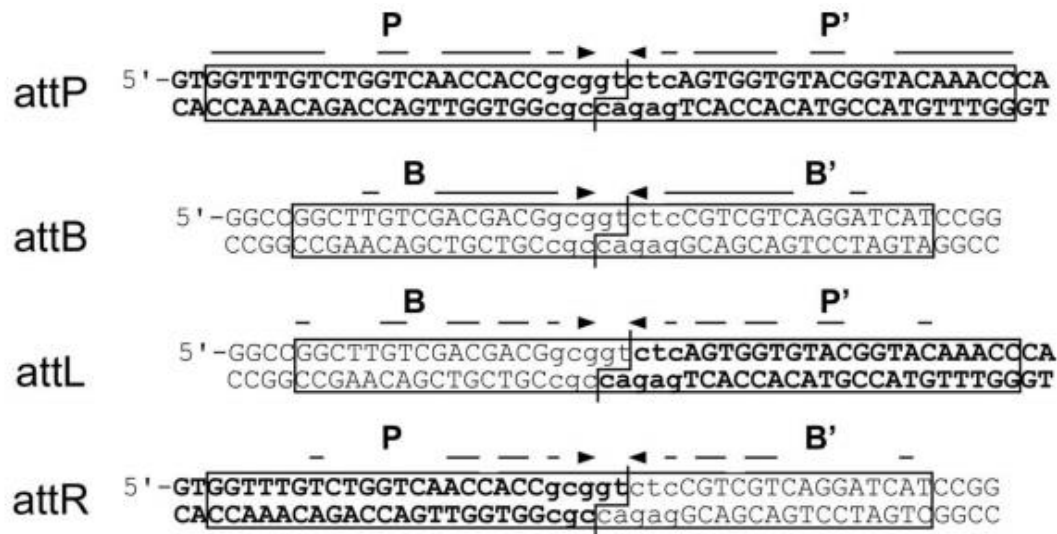


Figura 26. Sitios de recombinación de gp35, para su mejor compresión están divididos en dos partes i.e. P y P'. Por ejemplo, la marca a la mitad de las secuencias indica el sitio en el que se realiza el corte y por el cual se unen de nuevo la región recombinada. Como puede verse en L y R una vez que ocurre la recombinación los sitios resultantes son una mezcla de los sitios originales P y B. Tomada de (Ghosh *et al.*, 2005)

Diseño

En este modelo (Figura 27) se utiliza el promotor λP_R , el sitio de unión a ribosomas B0034 (Elowitz & Leibler, 2000) que es un promotor sintético fuerte, la recombinasa Gp35 del bacteriófago Bxb1, el terminador de LuxI que es altamente eficiente, el promotor sintético constitutivo y fuerte J23100 (Anderson, 2006), el terminador transcripcional sintético B1006 que es bidireccional así que provoca terminación de la transcripción independientemente de su orientación –por su ubicación en la construcción minimiza la transcripción del reportero antes de la recombinación–, como proteína reportera se utilizó mRFP (Campbell *et al.*, 2002) y los sitios de reconocimiento de la recombinasa Gp35 (attP y attB).

Se utilizaron las herramientas de predicción de terminadores transcripcionales Arnold² del instituto de genética y microbiología de la Universidad de Paris-Sur y FindTerm³ de Softberry para analizar la secuencia después de la recombinación. Arnold predice un terminador en la cadena complementaria de la secuencia codificante de mRFP, su presencia no impacta el diseño de la RRG; ningún otro terminador transcripcional independiente de Rho fue identificado. La misma estrategia se aplicó para la predicción de promotores. En este caso se utilizó la herramienta BPROM³ de Softberry y el Neural Network Promoter Predictor⁴ del proyecto del genoma de Drosophila de Berkeley. Ambos detectan un promotor en el extremo 5' de la secuencia codificante de mRFP en la hebra complementaria. El efecto de tal promotor en la RRG, aunque desconocido, se estima despreciable pues está al final del módulo reportero –antes de la recombinación–, después de ella se encontraría como en las construcciones anteriores justo después del SUR en sentido opuesto al promotor. Esta condición es inevitable y siempre está presente en una construcción expresando mRFP. Las secuencias de todas las biopartes utilizadas se pueden consultar en el anexo1.

Control de la RRG

La secuencia codificante de mRFP está en sentido opuesto al promotor J23100, el terminador bidireccional B1006 evita la transcripción de la secuencia invertida del reportero. Antes de la inducción, λ CI⁸⁵⁷ deberá reprimir la producción de la recombinasa (Figura 27). Después de la inducción (Figura 28) Gp35 deberá invertir irreversiblemente al reportero y comienza la traducción de mRFP. El resultado de la recombinación se deberá

² <http://rna.igmors.u-psud.fr/toolbox/arnold/index.php>

³ <http://www.softberry.com/berry.phtml?topic=index&group=programs&subgroup=gfindb>

⁴ http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html

transferir a la progenie, y esta deberá producir mRFP constitutivamente. A partir de la recombinación la expresión de la proteína recombinante deberá ser independiente de la temperatura y se podrá subir o bajar según lo requiera el proceso.

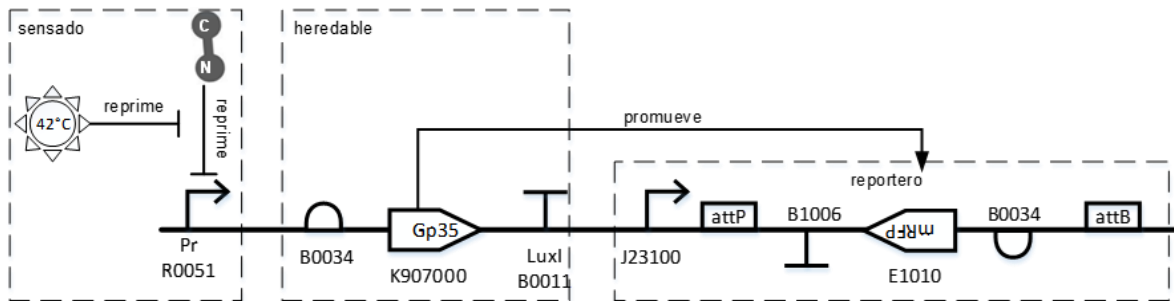


Figura 27. Modelo heredable. La simbología se puede consultar en la Figura 2. Los códigos que acompañan a las biopartes son los números de catálogo del iGEM. Los recuadros marcados attP y attB son los sitios de reconocimiento de la recombinasa Gp35.

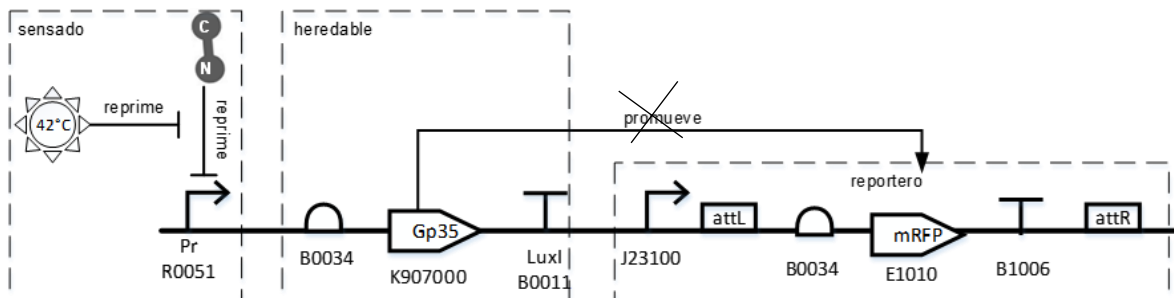


Figura 28. Modelo heredable después de la inducción. La marca sobre la leyenda "promueve" indica que Gp35 no tiene la capacidad de recombinar por que los sitios de reconocimiento son distintos.

Construcción

Debido a la complejidad de las secuencias de reconocimiento attP y attB, se diseñó el módulo del reportero y se sintetizó en la empresa Genscript y se recibió en un plásmido pUC57 secado en papel filtro. Los módulos de sensado y el heredable se construyeron con la técnica de ensamblaje de biopartes, la estrategia para la construcción se muestra en la

Figura

29.

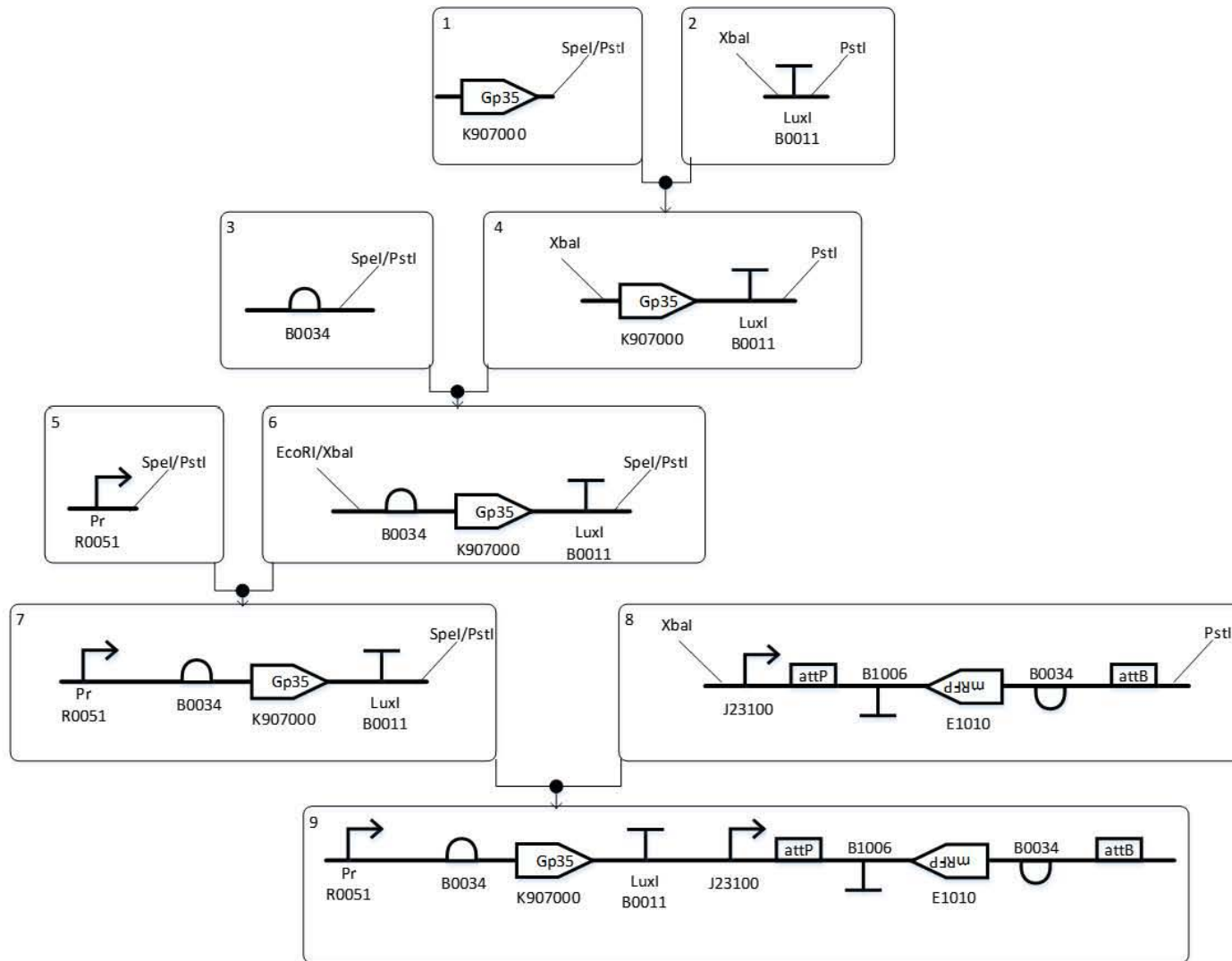


Figura 29. Estrategia seguida para la construcción del STI heredable. Cada bioparte se digirió con las enzimas indicadas en los recuadros respectivos. Los círculos negros en la unión de los recuadros representan ligaciones. Las biopartes se cortaron, purificaron y ligaron como se indica en secciones previas.

8. Resultados y discusión

8.1. Sistema clásico

Construcción de la versión 1

Se construyó la cepa siguiendo el protocolo de ensamblaje de biopartes estándar y se transformó en *E. coli* cepa 53606. Las colonias obtenidas se colocaron en un cultivo en medio LB sólido a 42°C toda la noche. Se seleccionaron 4 colonias que se veían evidentemente rojas –producción de mRFP. De estas 4, se extrajo ADNp y se hicieron digestiones con XbaI y SpeI, las colonias evaluadas tienen el inserto del tamaño esperado de 950 pb (Figura 30).

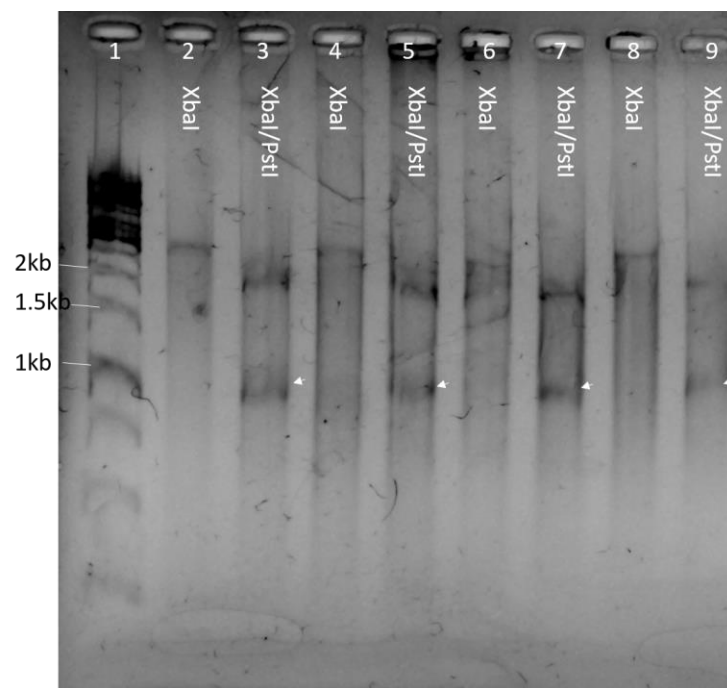


Figura 30. Análisis de restricción de las mutantes con el sistema termoinducible clásico. 1) Marcador de peso molecular, 2 y 3) colonia 1 en la figura se indican las enzimas usadas, 4 y 5) colonia 2 en la figura se indican las enzimas usadas, 6 y 7) colonia 3 en la figura se indican las enzimas usadas, 8 y 9) colonia 4 en la figura se indican las enzimas usadas. Las flechas blancas indican el inserto, que es del tamaño esperado 950pb

Con la confirmación del tamaño del inserto se prosiguió con la selección de la colonia óptima probando el desempeño en placas.

Caracterización del crecimiento y producción de fluorescencia

Selección en placas de 96 pozos

Con las mutantes seleccionadas se realizó una cinética en cultivo en lote en placas de 96 pozos, se incluyen como controles la misma cepa sin plásmido y medio de cultivo sin inocular. Los valores de los controles se utilizaron para definir la línea base y con ello obtener la fluorescencia relativa. Como puede apreciarse en la Figura 31 ni el medio de cultivo sin inocular ni las células en crecimiento alteran las mediciones de fluorescencia a las longitudes de onda utilizadas. De este resultado se deduce que utilizar medio LB no afecta las mediciones de fluorescencia en las longitudes de onda requeridas para cuantificar mRFP. Asimismo, las células –hasta una densidad óptica de 3.5– no interfieren con la medición, por lo que es factible medir las muestras de cultivo directamente sin necesidad de separar la biomasa del medio de cultivo. Por otra parte, la dinámica de producción de fluorescencia normalizada es equivalente en las tres cepas (Figura 32). Además las velocidades de crecimiento (Figura 33) en todas las colonias es la misma, comienza a detectarse dos horas después de la inducción y alcanza el máximo en 10 h. Además, en la Figura 31 se aprecia claramente que a 30°C la fluorescencia es indetectable en todas las cepas, solamente es visible después de dos horas de inducción, esto sugiere que el STI clásico es funcional.

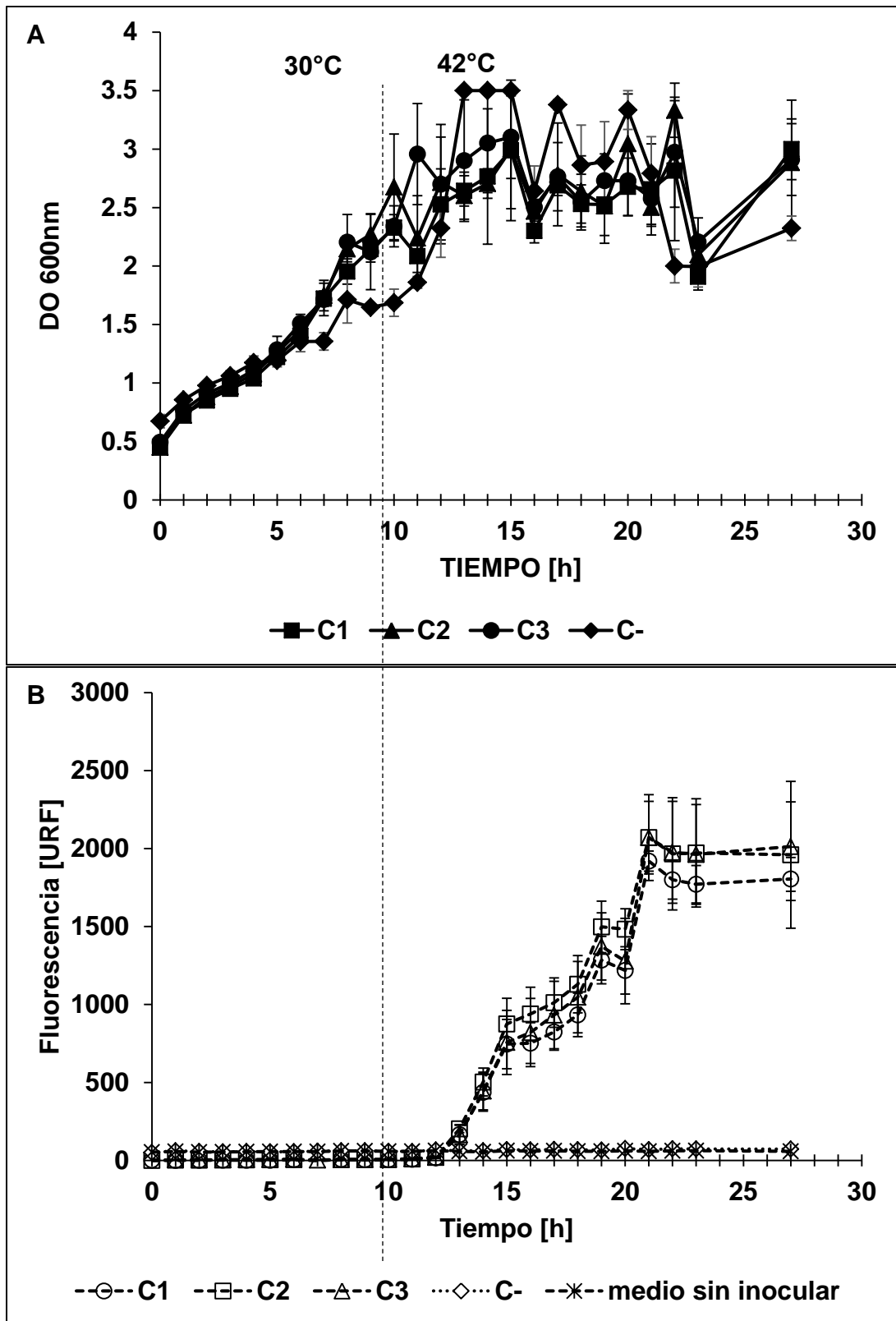


Figura 31. Cinéticas de crecimiento (panel A) y de producción de fluorescencia (panel B) de tres colonias de *E. coli* cepa 53606 con la construcción clásica 1. C1, C2 y C3 corresponden a cada colonia de las transformantes, C- es la misma cepa sin plásmido, las cruces representan medio de cultivo sin inocular. La línea punteada marca el momento de la inducción a 42°C, previo a la inducción el cultivo se mantuvo a 30°C.

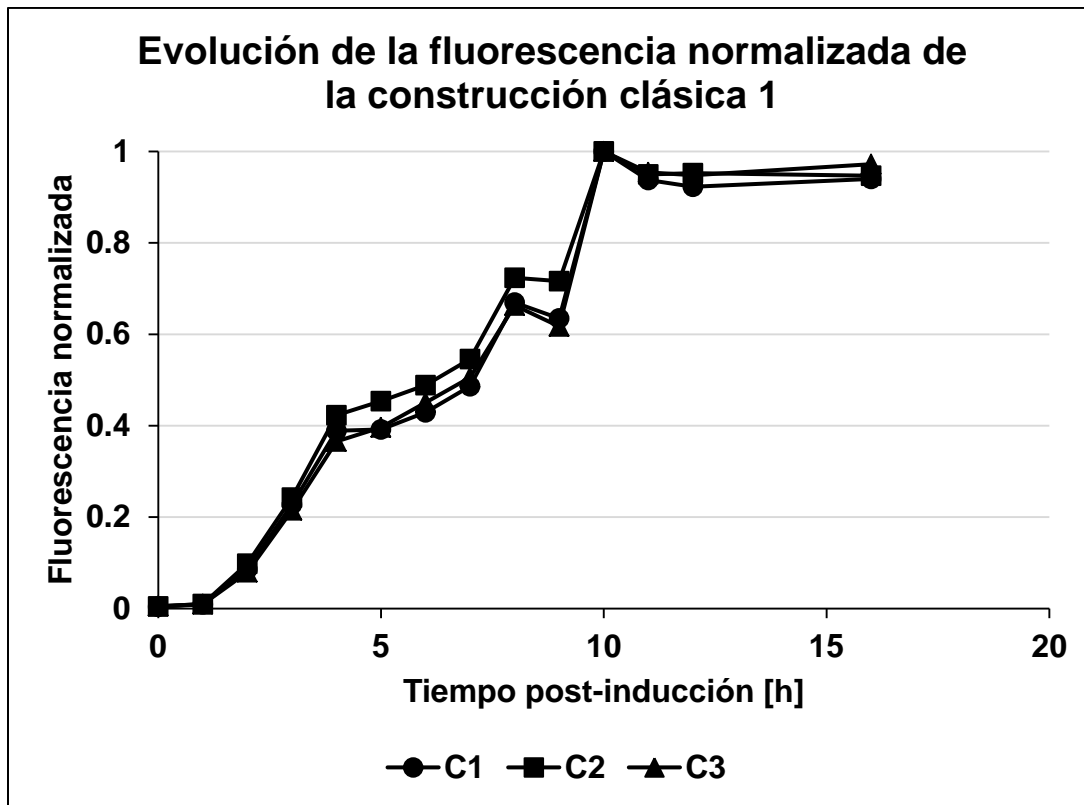


Figura 32. Fluorescencia normalizada de tres colonias de *E. coli* cepa 53606 con la construcción clásica 1. Las colonias están representadas como C1, C2 y C3.

Las tres colonias evaluadas tienen cinéticas de crecimiento idénticas, el control negativo (sin plásmido) tiene un crecimiento menor entre las 7 y 12 h, sin embargo la amplitud de las barras de error dificulta llegar a una conclusión, es posible que se deba a un error experimental en el control negativo.

No existe diferencia entre las colonias 1, 2 y 3 en la cepa 53606 de *E.coli*, cuando se analiza la fluorescencia específica (Figura 34) la similitud entre las tres colonias es muy clara. En este nivel de análisis cualquiera de las cepas es elegible para continuar, pues no se detectan diferencias, por lo que se decidió continuar con la colonia 1.

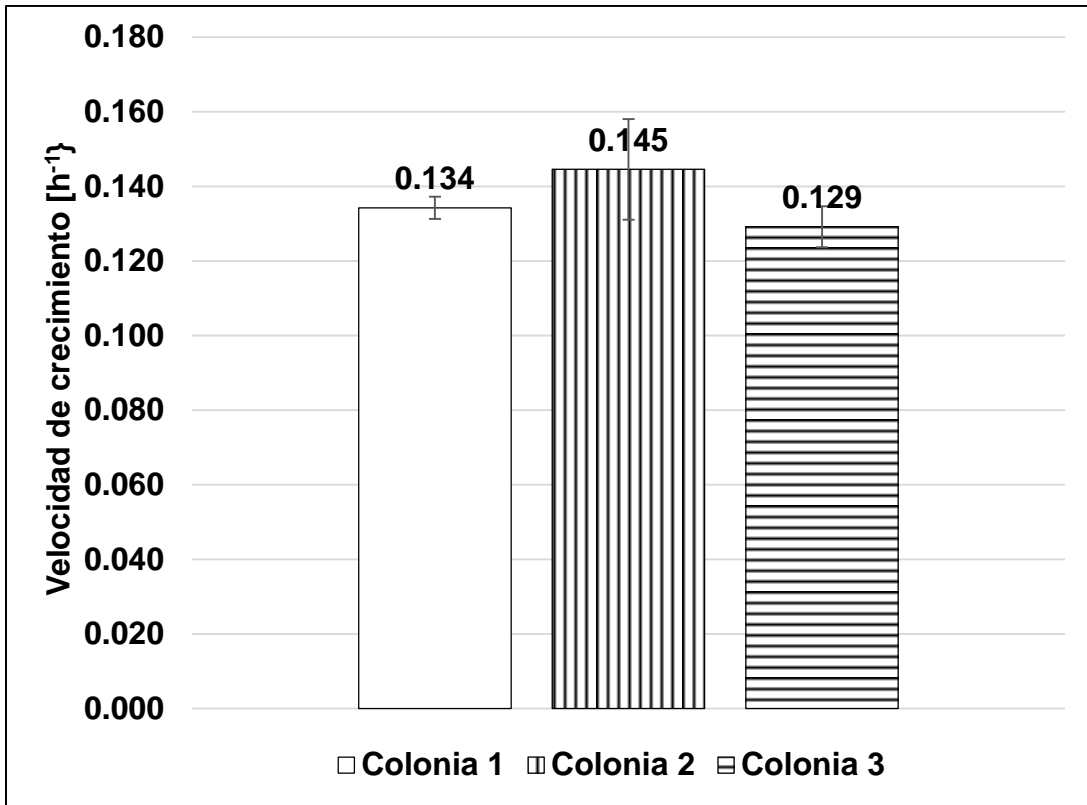


Figura 33. Velocidades máximas de crecimiento cepa clásica 1 en 53606.

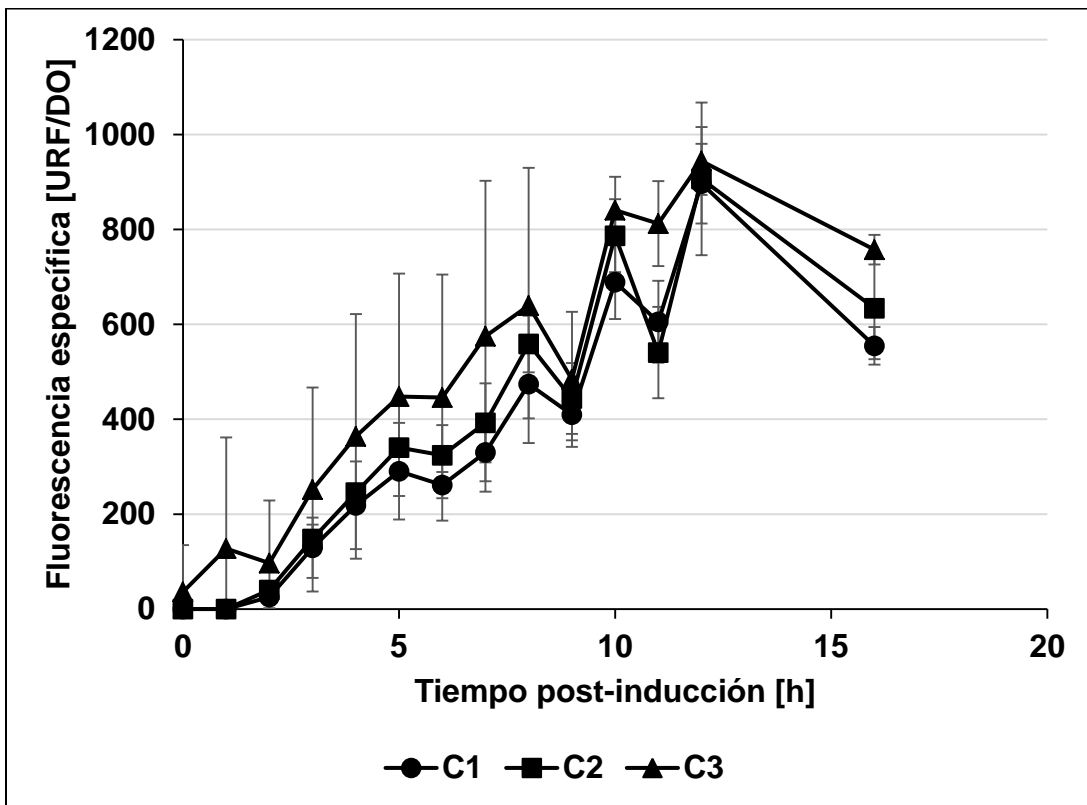


Figura 34. Fluorescencia específica post-inducción para las tres colonias de la cepa clásica en ATCC 53606.

Para corroborar que la cepa seleccionada es inducible incrementando la temperatura se corrió una cinética rápida en matraz colocando un matraz sin inducción y otro con inducción de una hora (Figura 35). En las cinéticas corridas en placas la fluorescencia es apreciable dos horas después de la inducción, en matraces la respuesta se observa una hora antes. La diferencia en la velocidad de la respuesta se debe a la diferencia en la escala de las gráficas previas. Los máximos de fluorescencia para cada caso (inducido y no inducido) son de 6.3 y 83.4, de esto se concluye que bajo las condiciones utilizadas, el STI clásico 1 tiene una expresión basal del 7% de la fluorescencia máxima posible. Además se confirmó que la cepa es inducible subiendo la temperatura a 42°C.

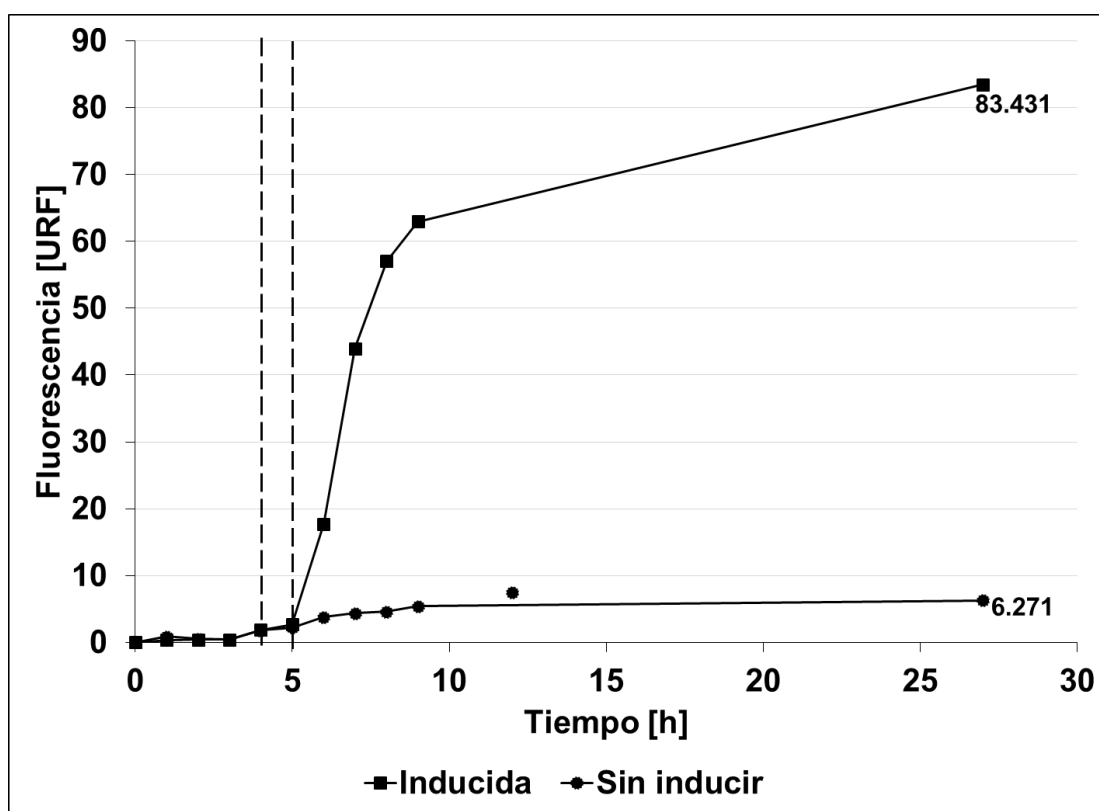


Figura 35. Evolución de la fluorescencia de la colonia 1 (construcción clásica 1 en *E. coli* cepa 53606). Las líneas punteadas indican el periodo de inducción. Las temperaturas del cultivo están señaladas en cada región para la colonia inducida (cuadros negros). En el caso del cultivo no inducido este se mantuvo siempre a 30°C.

Construcción de la versión 2

Comprobación del tamaño de los módulos

E.coli DH5 α quimicompetente se transformó con la construcción del módulo sensor (descrita con anterioridad en la Figura 16). Se confirmaron las transformantes por PCR de colonia con primers para prefijo y sufijo (Tabla 2). Como se muestra en la Figura 36, de 23 colonias evaluadas 20 contienen el inserto (amplicón esperado 900pb)

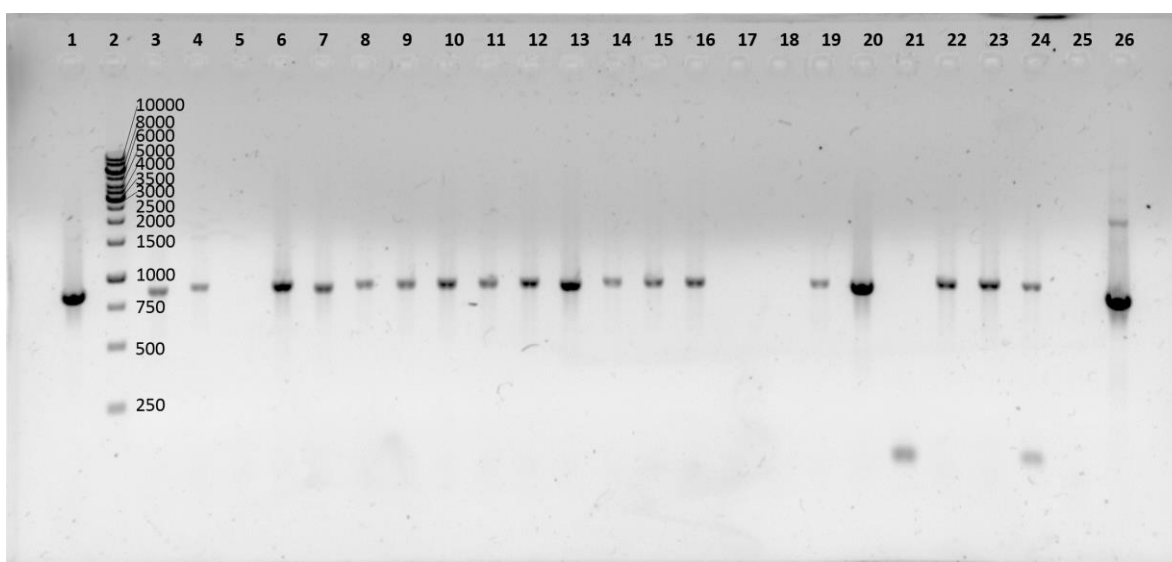


Figura 36. PCR de colonia de las transformantes de J13002+C₁857+B0011. Carril 2, marcador de peso molecular; carril 1, colonia uno; carriles 3 al 23 colonias dos a la veintidós; carril 24 colonia veintitrés; carril 25 control negativo; carril 26 control positivo (TetR 693bp)

De este tamizaje se recuperaron las colonias 1 y 19 (carriles 1 y 20 de la Figura 36). Se realizaron digestiones dobles y sencillas a ADN plasmídico, las digestiones confirman el tamaño del inserto (Figura 37). Con esto se finaliza la construcción del sensor.

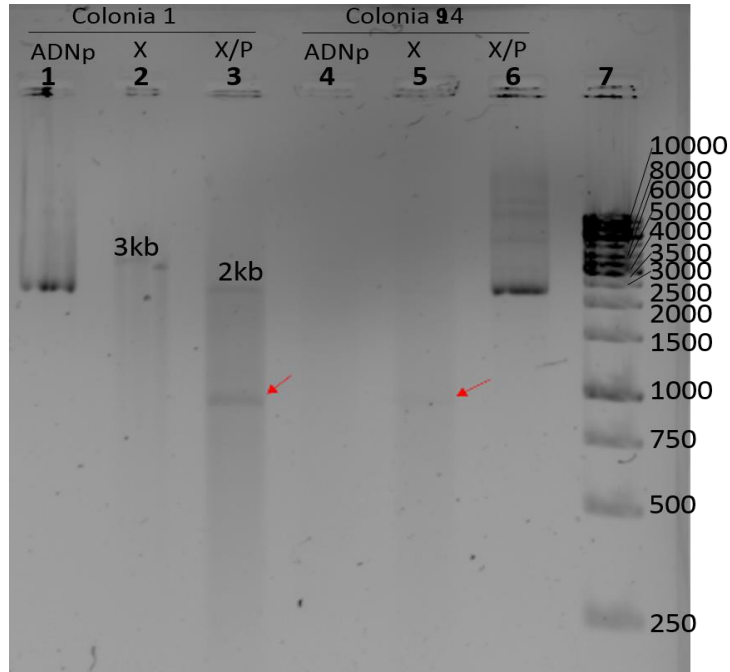


Figura 37. Digestiones de ADNp de las colonias 1 y 19. De la digestión sencilla se espera una banda de alrededor de 3kb, de la digestión doble se esperan dos bandas una de 2kb del plásmido y otra de 850 del inserto (señalada con una flecha en el gel). X=XbaI, P=PstI, ADNp= ADN plasmídico sin digerir.

Ligación con el módulo efector

En este caso, el efector es el modelo clásico 1, el cual se ligó con el módulo sensor y se corroboró el tamaño del inserto (Figura 38) de dos colonias seleccionadas por PCR de colonia y digestión con NotI. Los amplicones y el resultado de las digestiones son los esperados (Tabla 5). Las bandas menos intensas entre 3.5 y 4kb coinciden con el tamaño del plásmido linealizado. Su presencia en la digestión con endonucleasas es resultado de una digestión parcial. En principio cualquiera de las dos colonias tiene el inserto deseado, sin embargo las bandas de interés son más intensas en la colonia 1. Por lo tanto, después de esta evaluación se seleccionó la colonia 1 para continuar con los experimentos.

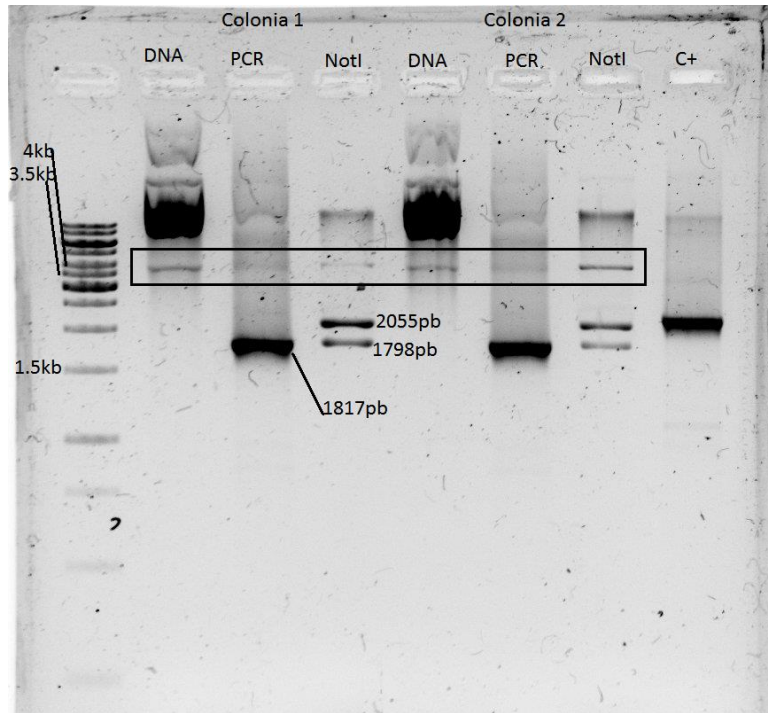


Figura 38. Comprobación de la construcción del sistema clásico 2. El primer carril contiene el marcador de peso molecular. Las columnas marcadas como DNA contienen ADN plasmídico sin digerir. Las marcadas como PCR muestran los amplicones para cada colonia. Las marcadas como NotI muestran el resultado de las digestiones enzimáticas. El recuadro negro señala el plásmido linealizado. Los fragmentos esperados son de 1827 pb para la PCR y 2055 y 1798pb para la digestión enzimática. c+ es el control positivo

8.2.Modelo 1

Construcción

Las biopartes que conforman este modelo se ligaron paso a paso como lo indica la Figura 20. En esta sección solo se muestran la comprobación de las mutantes con los módulos por separado –el sensor ya fue evaluado en la construcción del modelo clásico 1– y las construcciones finales. La Figura 39 muestra la PCR de colonia del efector de 18 colonias, de ellas 10 tienen el inserto del tamaño esperado (ver Tabla 5). De estas colonias se seleccionó la número 18 para continuar con el proceso de construcción.

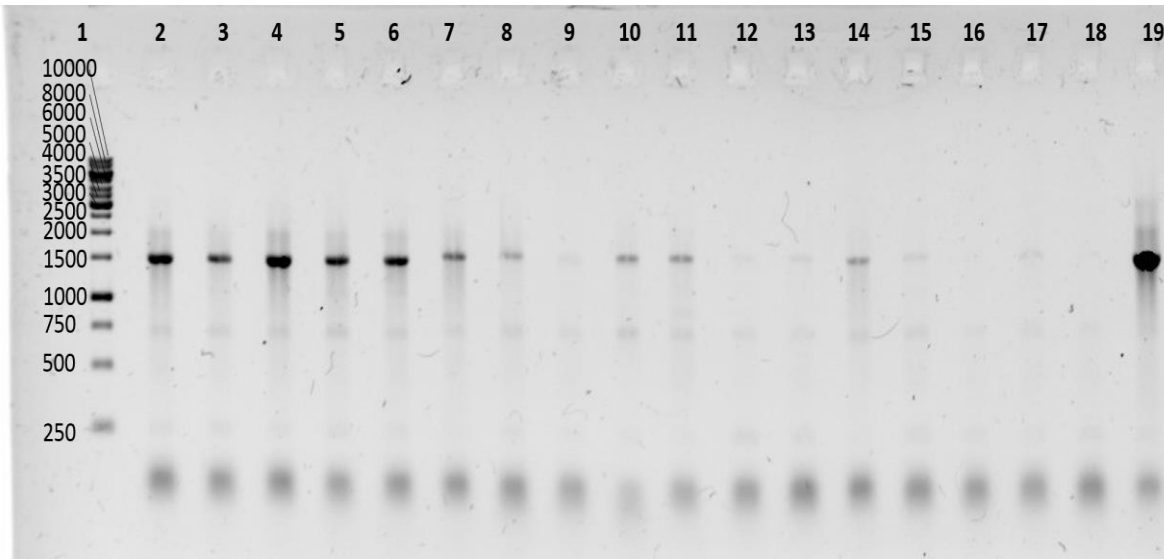


Figura 39. PCR de colonia del módulo efector del modelo 1 bajo el promotor Pr del fago lambda. Los carriles 2 al 19 muestran el resultado de las colonias 1 a la 18 respectivamente.

Unión de los módulos sensor y efector

Los módulos se ligaron como se indica en la sección 7.9. y se comprobó con PCR de colonia (Figura 40) el sentido en el que se ligó el efector. De 12 colonias evaluadas 2 contienen los insertos en sentido convergente y 3 en sentido divergente, las cinco colonias se evaluaron con digestiones enzimáticas.

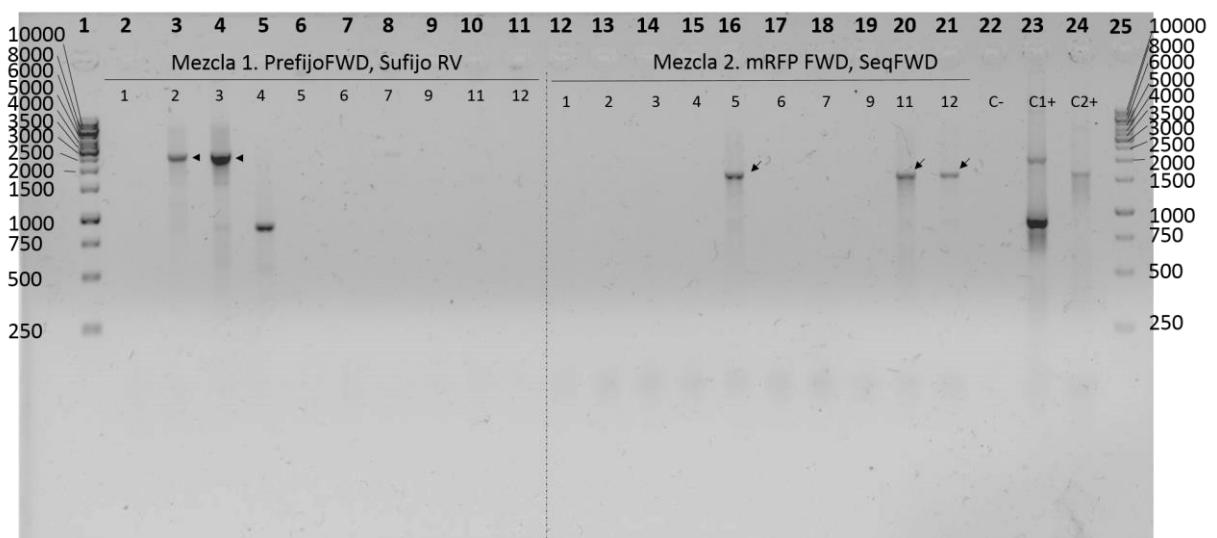


Figura 40. PCR de colonia del modelo 2 para identificar el sentido el módulo efector. Las colonias 2 y 3 (puntas de flecha) tienen el promotor en sentido convergente (2500pb). Las colonias 5, 11 y 12 tienen el promotor en sentido divergente (1600pb). La colonia 4 sólo tiene el módulo sensor. Mientras que para las colonias 1, 6, 7 y 9 no se puede concluir, aparentemente poseen plásmidos vacíos. Control negativo sin templado, control positivo uno amplifica a 800pb, control positivo dos amplifica a 1580pb.

A las colonias seleccionadas se les extrajo el ADNp y se realizaron ensayos de restricción con dos combinaciones de enzimas: 1) EcoRI y XbaI; 2) PstI y XbaI. El resultado de las digestiones es diferente y característico para cada modo de los promotores (Tabla 11) i.e. convergente o divergente, como resultado del cambio del sitio de reconocimiento XbaI

Tabla 11. Listado de fragmentos que arroja la digestión de cada modo en que se clonó el promotor.

Modo del promotor	Tamaño de los fragmentos [pb] digerido con EcoRI/XbaI		Tamaño de los fragmentos [pb] digerido con PstI/XbaI	
	Convergente	4451	15	2413
Divergente	2914	1552	3590	876

El análisis del gel de electroforesis (Figura 41) muestra los patrones de bandeos característicos para cada modo del promotor. Las colonias 2 y 3 tienen los patrones correspondientes para promotores convergentes, mientras que las colonias 5, 11 y 12 exhiben el patrón característico para los promotores divergentes.

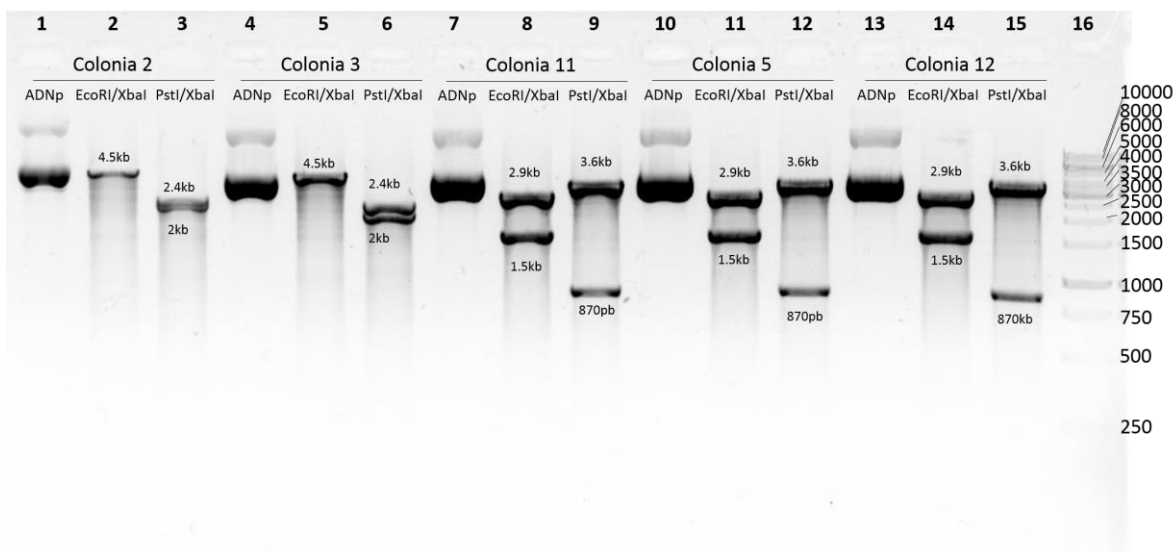


Figura 41. Digestiones de ADN plasmídico de las colonias de interés del modelo 2. Los patrones de bandeos para las colonias 2 y 3 corresponden a una construcción con promotores convergentes. Los patrones de bandeos para las colonias 5, 11 y 12 corresponden a una construcción con promotores divergentes.

De esta evaluación se concluye con seguridad que las colonias 2 y 3 son convergentes y las colonias 5, 11 y 12 son divergentes, de ellas se continuó con la colonia 2 y la colonia 5.

Selección entre cepas divergente y convergente

En la Figura 42 muestra las cinéticas en matraces agitados para las colonias divergente y convergente con una hora de inducción (recuadro). En los dos casos hubo crecimiento después de la inducción, además no se observaron diferencias en el crecimiento de las cepas con las dos construcciones y el control negativo (DH5 α sin transformar). En la misma figura se muestra que la cepa divergente presenta fluorescencia incluso antes de la inducción, que además incrementa proporcionalmente con el aumento de la biomasa. Lo anterior se puede ver claramente analizando la fluorescencia específica. λP_R es un promotor mas fuerte que P_{Tet} y la separación entre ambos en esta cepa es de 6 pares de bases, es posible que la cercanía entre los promotores ocasione impedimentos estéricos cuando la ARNpol transcribe desde P_{Tet} . Si lo anterior impide el acceso del represor λcI^{857} podría permitir que la ARNpol transcribiera en el sentido de λP_R , o bien, que la unión del represor λcI^{857} entorpezca el reconocimiento del promotor P_{Tet} , ocasionando así una suerte de autoregulación del represor. En cualquiera de los dos casos se podría alcanzar un estado estable, mismo que es sugerido por la fluorescencia específica. La construcción divergente se descartó, pues uno de los requisitos en el diseño de los nuevos STI es el control de la expresión (Tabla 9).

Por otra parte, la colonia convergente exhibe mejor control sobre la producción de la proteína recombinante. Antes de inducir la fluorescencia es indetectable y una hora después de la inducción su incremento es claro y persistente durante poco más de 3 h, alcanza un máximo a las 10 h después de la inducción y después decae lo que hace inferir la

probable pérdida del plásmido pues la fluorescencia específica decae mientras la biomasa permanece constante. De aquí en adelante los resultados descritos corresponden al modelo 1 en su variante convergente.

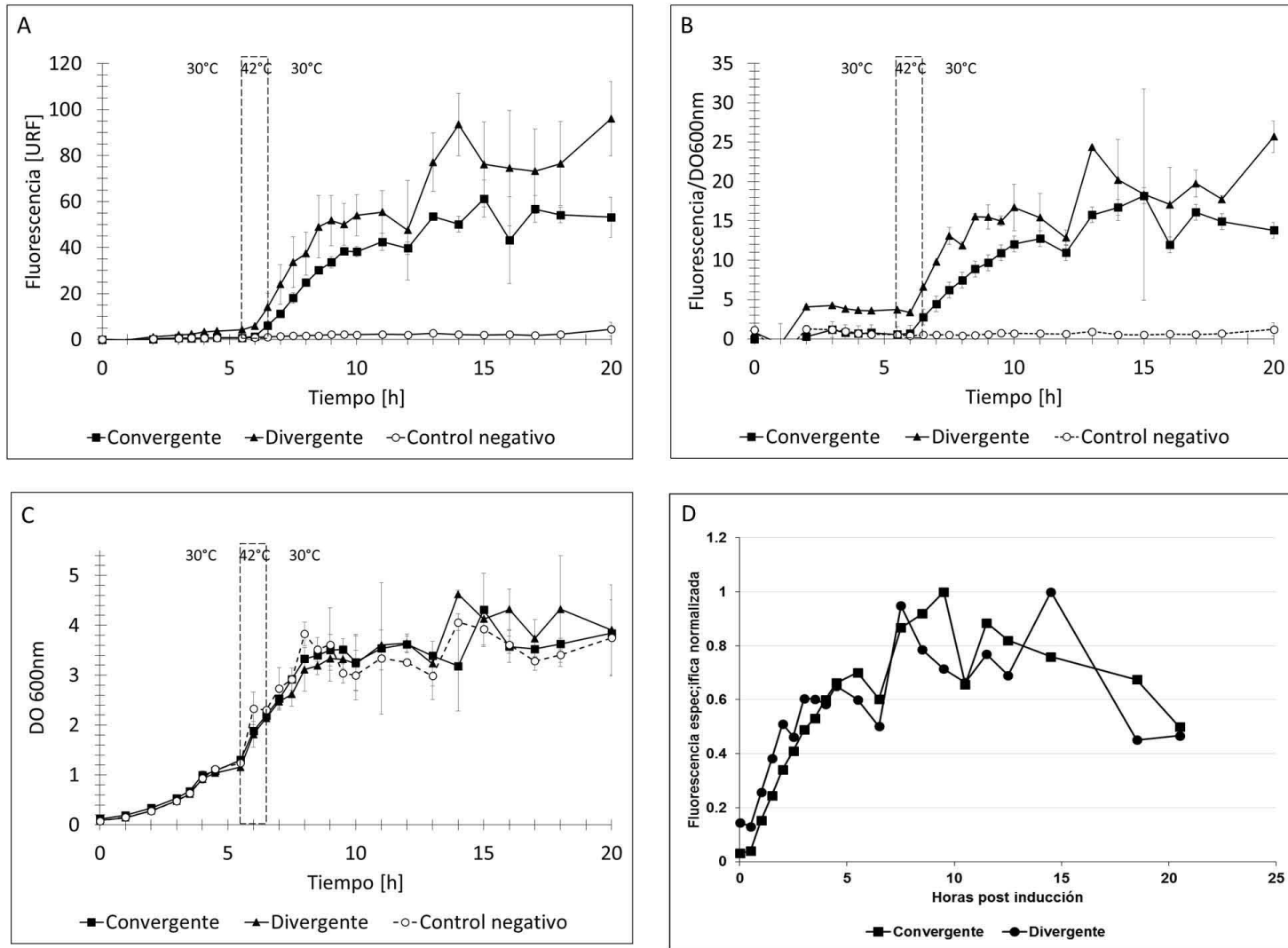


Figura 42. Cinéticas de crecimiento y producción de fluorescencia para la selección del modelo 1 en matraces agitados. Panel A: cinética de producción de fluorescencia, panel B: fluorescencia específica, panel C: cinética de crecimiento, panel D: fluorescencia específica normalizada. El recuadro marca el periodo de inducción. Control negativo corresponde a la cepa DH5a sin transformar.

8.3. Impacto del tiempo de inducción en la velocidad de crecimiento de las cepas convergente y clásica 2

Un cultivo de *Escherichia coli* DH5a en fase de crecimiento exponencial se indujo con un incremento de temperatura de 30 a 42°C (con una tasa de 4.3°C/min) durante un tiempo definido en matraces con medio LB. Transcurrido este tiempo se bajó la temperatura con un cambio de 42 a 30°C (con una tasa de 6.5°C/min).

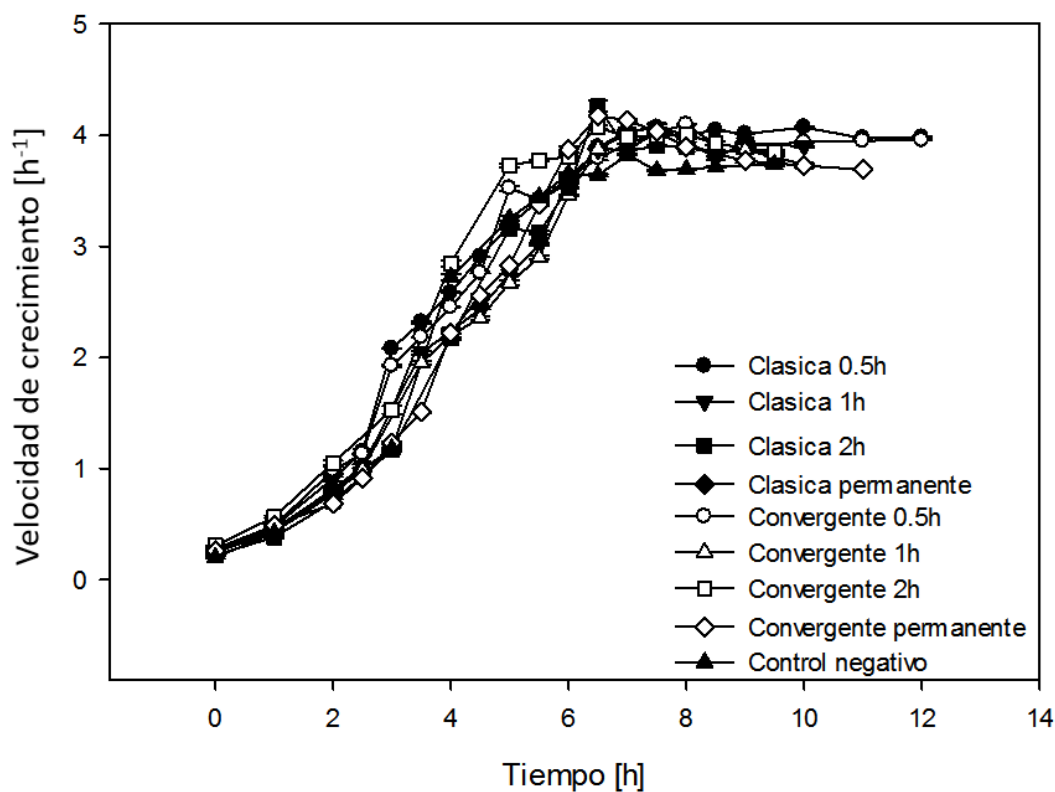


Figura 43. Cinética de crecimiento para los modelos 1 convergente y clásico versión dos a distintos tiempos de inducción.

Aparentemente los distintos tiempos de inducción evaluados, no tienen impacto en la densidad óptica máxima alcanzada (Figura 43) y tienen el mismo impacto sobre la velocidad máxima de crecimiento (Figura 44), en el caso de la clásica con inducción permanente parece no tener impacto en la velocidad de crecimiento.

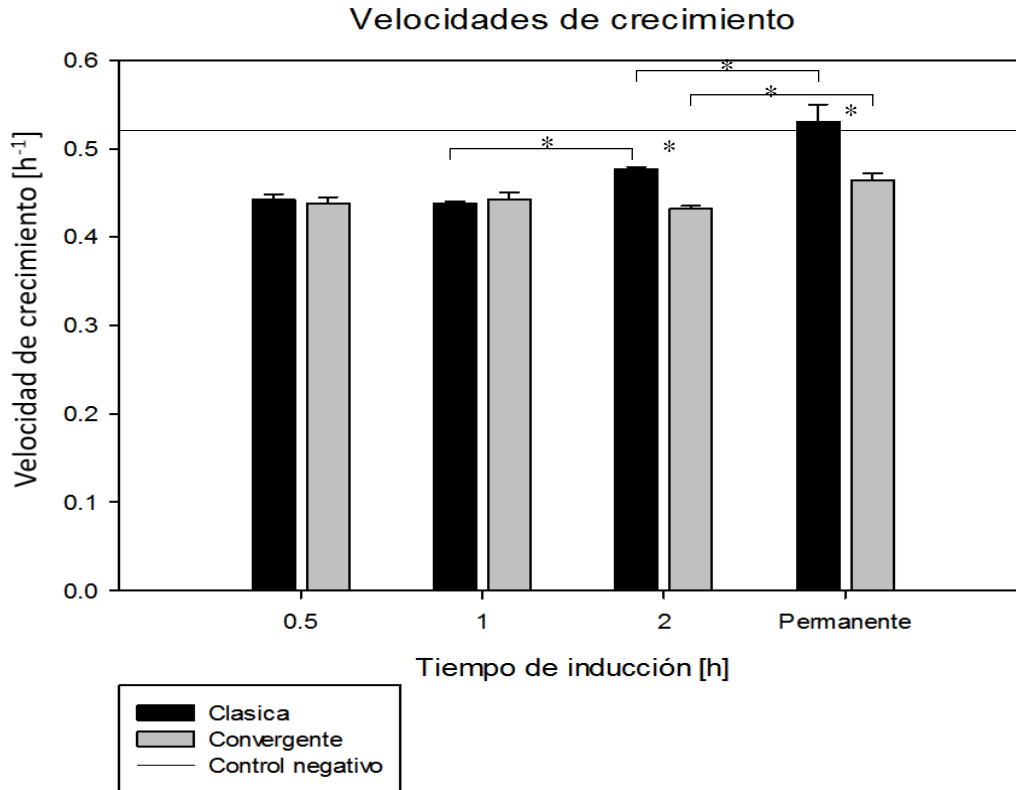


Figura 44. Velocidades máximas de crecimiento a distintos tiempos de inducción. En la inducción permanente se mantuvo la temperatura elevada por toda la duración del cultivo una vez iniciada la inducción. Se evaluó la construcción clásica 2. Para las barras con (*) $P > 0.05$

Por otro lado, conforme aumenta el tiempo de inducción incrementa también la fluorescencia máxima (Figura 45 y Figura 46). El incremento en fluorescencia se debe a mayor producción de proteína recombinante por célula, no solamente a un efecto del incremento de la concentración celular. Así pues, se deduce que ambas construcciones exhiben respuesta dependiente del tiempo de inducción.

A partir de una hora de inducción, las cepas evaluadas presentan diferencias en la fluorescencia específica máxima (Figura 46), así como en la velocidad de producción de fluorescencia (Figura 47). Estas diferencias son más evidentes a partir de las 2 h; sin embargo, por encima de 128 URF el equipo alcanzó la saturación y no se posible determinar la cantidad exacta.

Es importante notar que en todos los casos, la velocidad de producción de fluorescencia (Figura 46) de la cepa clásica es mayor que la de la cepa convergente, posiblemente debido a la carga metabólica que implica la proteína represora TetR. Adicionalmente, aunque el incremento de la biomasa es equiparable, la fluorescencia específica tiende también a ser mayor en la cepa clásica.

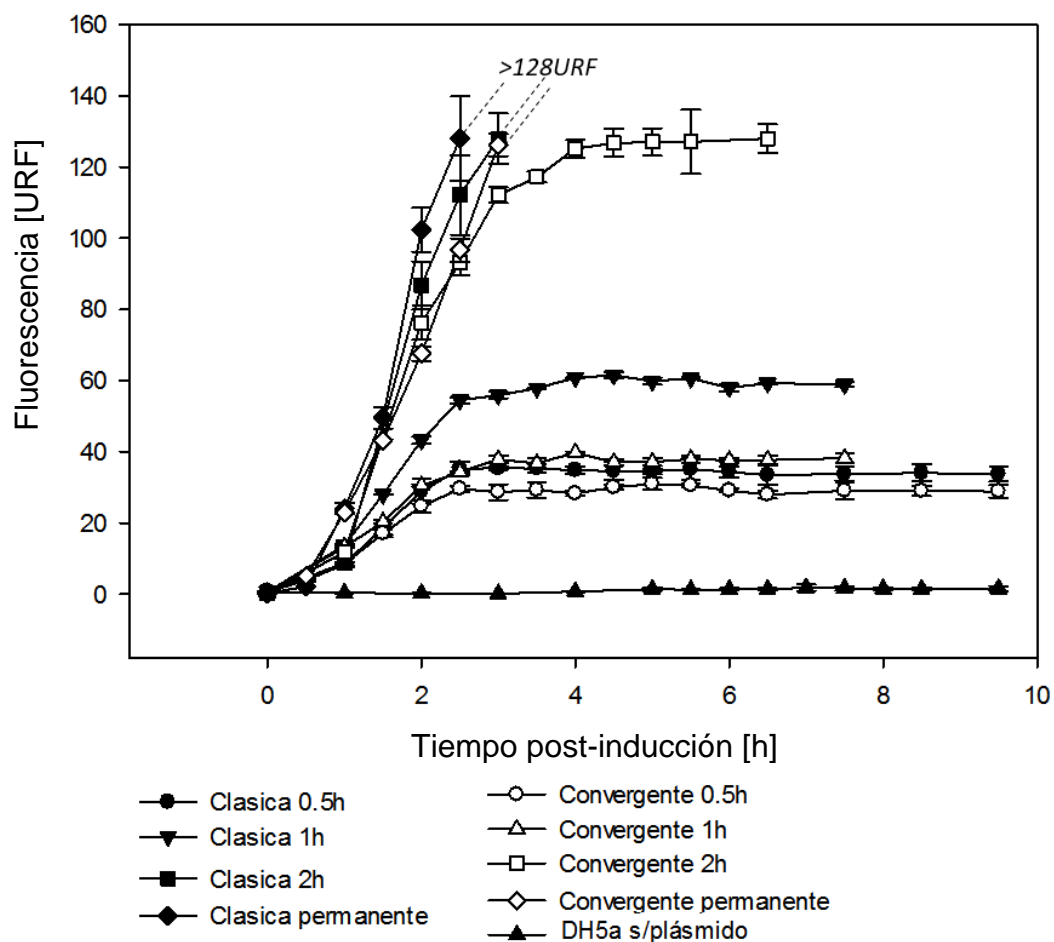


Figura 45. Fluorescencia en los modelos 1 convergente y clásica versión dos a distintos tiempos de inducción. Las líneas punteadas indican que la producción de fluorescencia continuó pero no fue determinada y es mayor a 128 URF.

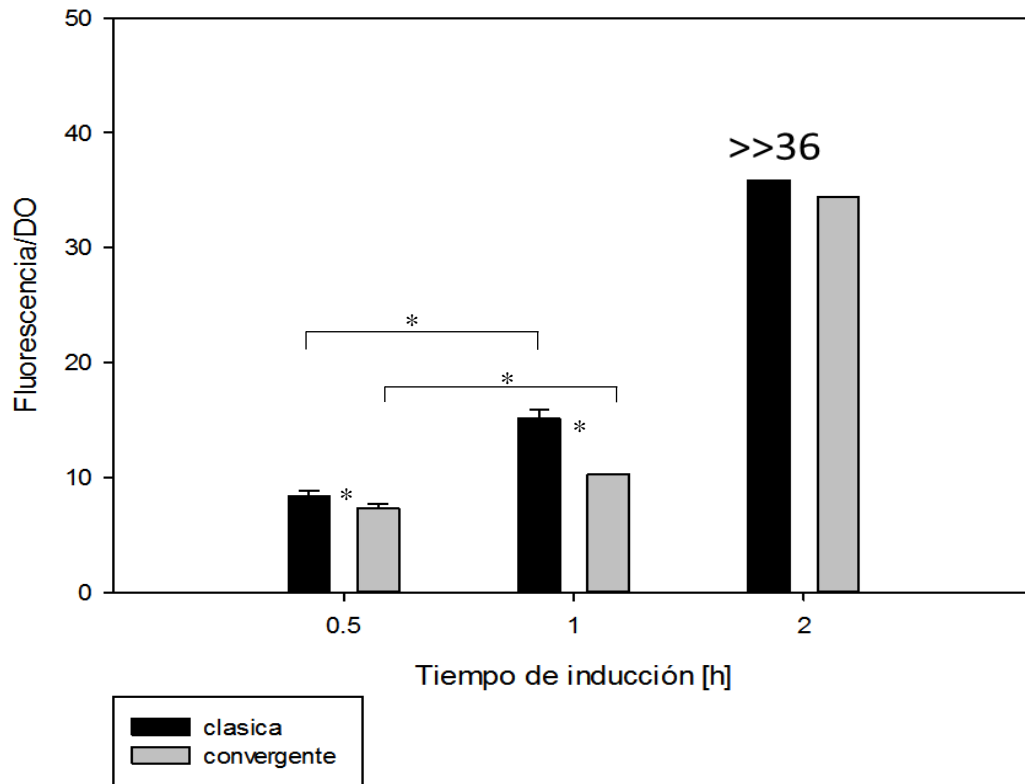


Figura 46. Fluorescencia específica máxima a distintos tiempos de inducción. La fluorescencia específica de la colonia clásica en dos horas de inducción se determinó hasta 36 URF/DO, es el límite superior de detección de la técnica utilizada. Para las barras con (*) $P > 0.05$

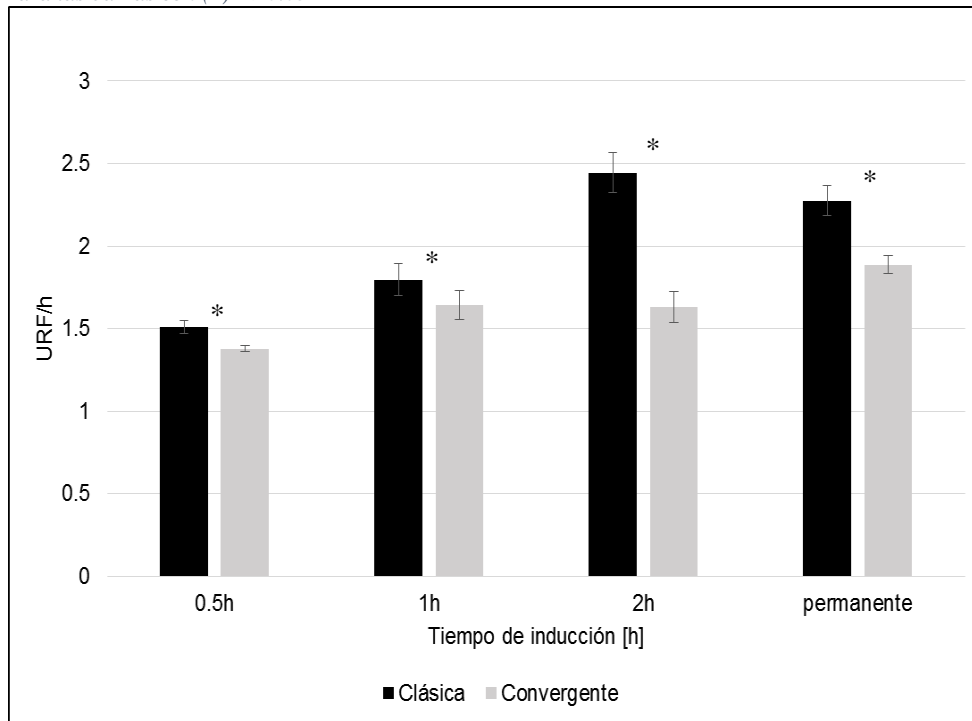


Figura 47. Efecto del tiempo de inducción en la velocidad máxima de producción de fluorescencia. Para las barras con (*) $P > 0.05$

8.4. Comparación de los modelos en W3110

Como se mencionó anteriormente, RecA juega un papel importante en la regulación mediada por λcI . En función de los resultados en DH5 α se realizó otro experimento, ahora con la cepa W3110 cuya copia del gen λcI es funcional y no tiene mutaciones. Los resultados se muestran a continuación.

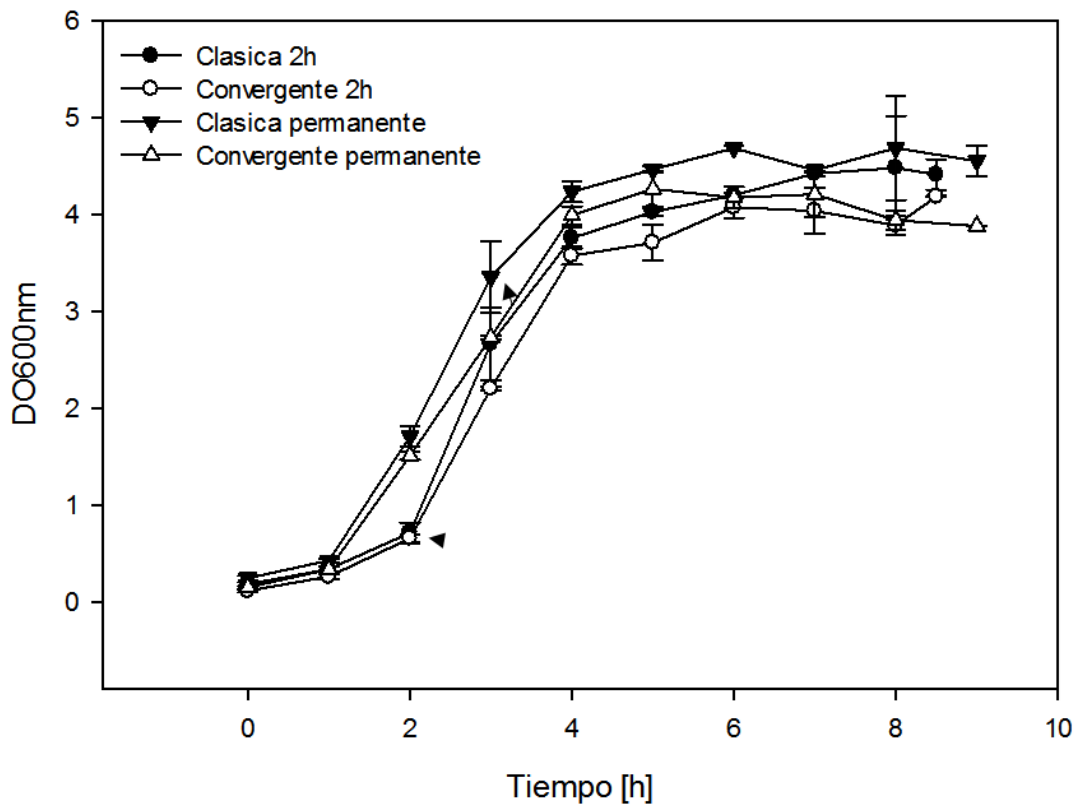


Figura 48. Cinéticas de crecimiento de las construcciones en W3110 medio LB. Las puntas de flecha indican el momento de la inducción.

Se probaron dos tiempos de inducción: dos horas e inducción permanente. En ambos casos se empleó una tasa de calentamiento de $4.3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ y de enfriamiento de $6.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Cuando se indujeron permanentemente, ambas cepas crecieron a menor velocidad que cuando se usaron solamente dos horas (Figura 49). En promedio la velocidad específica de crecimiento –con dos horas de inducción– fue 34.5% mayor, sin embargo la máxima densidad óptica alcanzada es similar en las dos cepas en los dos condiciones de inducción.

La producción de fluorescencia en esta cepa también dependió del tiempo de inducción, asimismo en el caso de la cepa DH5 α se observa el mismo comportamiento. Por otra parte, a diferencia de lo ocurrido en DH5 α , W3110 produce la misma fluorescencia (Figura 50) cuando se inducen las dos construcciones durante dos horas, la fluorescencia específica lo confirma. Este comportamiento hace suponer que un estudio más amplio vale la pena en esta cepa.

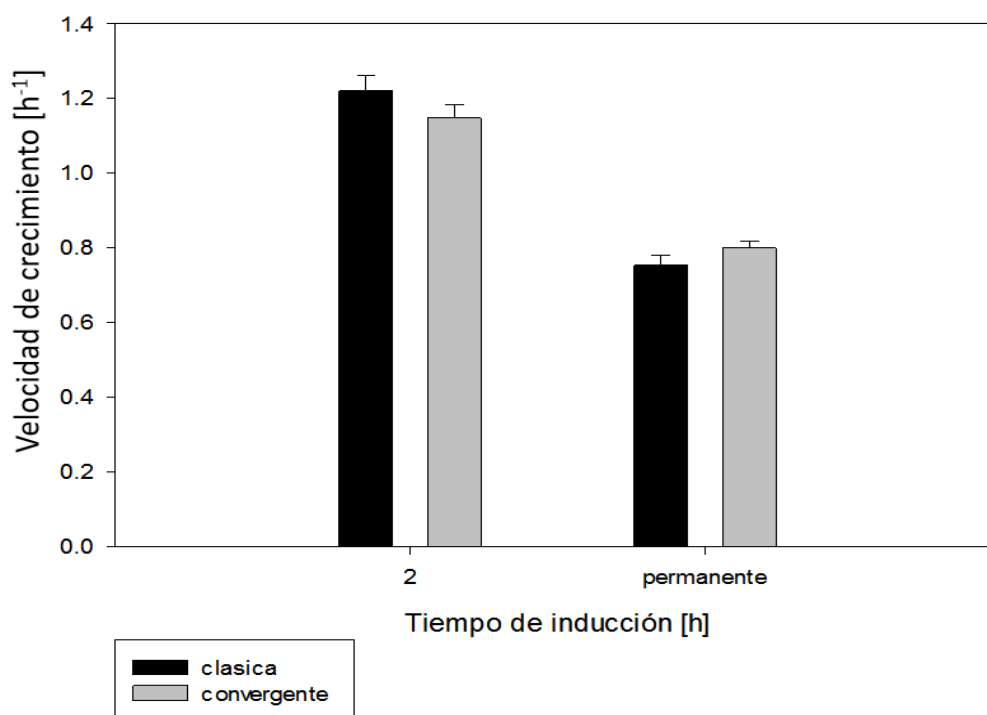


Figura 49. Velocidades de crecimiento post-inducción de las cepas clásica versión dos y convergente en W3110. En ambos casos $P > 0.05$

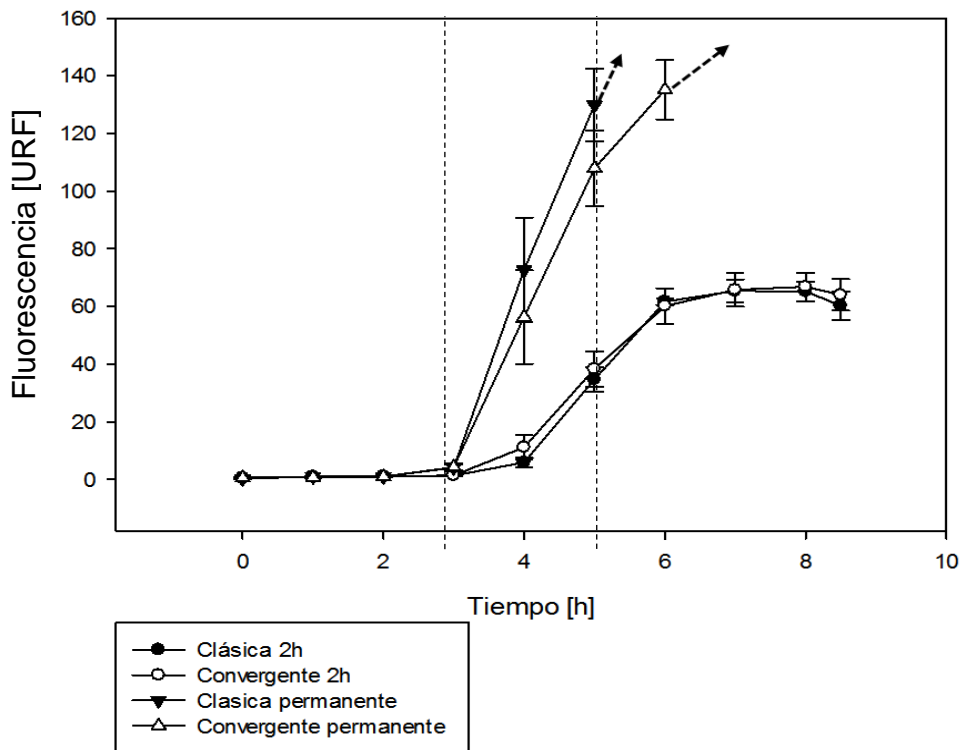


Figura 50. Cinética de fluorescencia en la cepa W3110 de *E.coli* empleando medio LB. Las líneas punteadas verticales indican el inicio y el término de la inducción. Las líneas punteadas indican que la producción de fluorescencia continúa pero no fue determinada y es mayor a 140 URF.

8.5. Cultivos de W3110 en medio mineral

Dados los resultados anteriores se decidió probar la respuesta de la cepa dándole la posibilidad de alcanzar densidades celulares más altas y determinar así, si el desempeño de las distintas construcciones se diferenciaba. La primera aproximación fue enriquecer el medio LB con distintas concentraciones de glucosa (Figura 51), como puede observarse el incremento en unidades de absorbancia fue mínimo, de hecho a concentraciones de glucosa mayores a 1g/L, la absorbancia máxima decreció. Por lo tanto se repitió el experimento pero con medio mineral a distintas concentraciones de glucosa (Figura 52). De este experimento se seleccionó la concentración de 12g/L de glucosa en medio mineral para los experimentos subsecuentes.

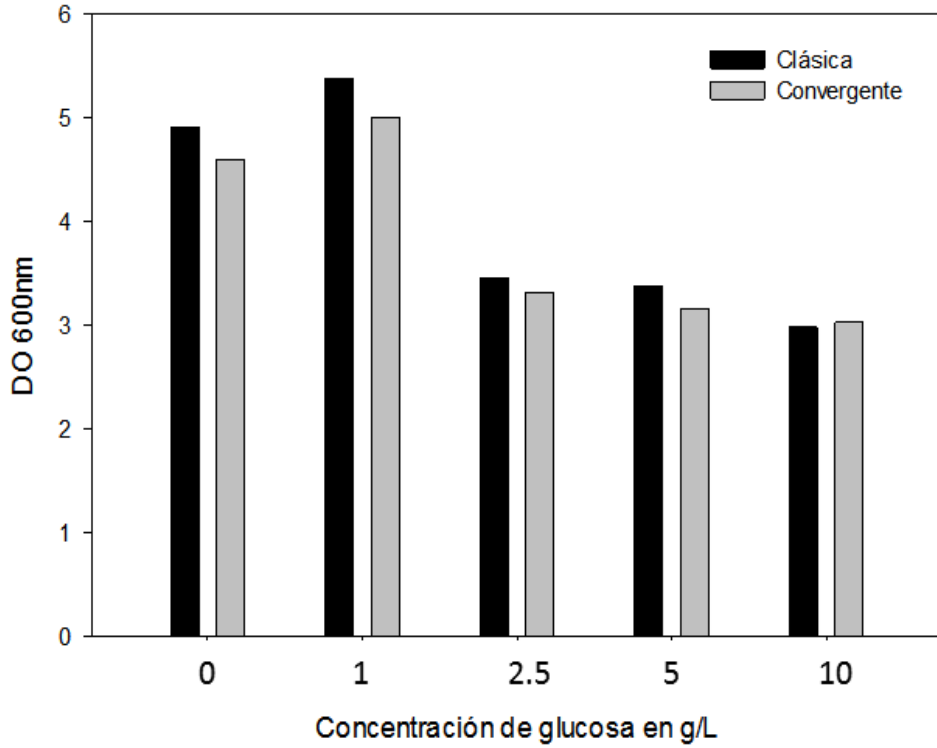


Figura 51. Densidades ópticas máximas de W3110 en LB enriquecido con glucosa a 30°C y 220rpm. No hay repeticiones.

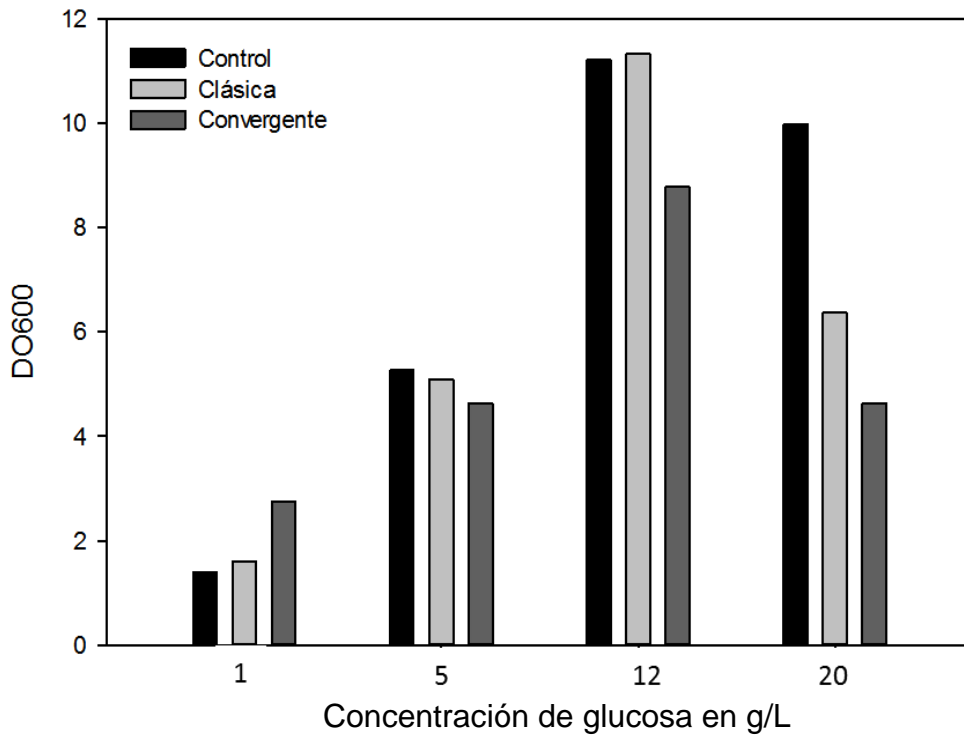


Figura 52. Densidades ópticas máximas de W3110 en medio mineral a distintas concentraciones finales de glucosa. No hay repeticiones.

Las tres cepas evaluadas alcanzan el máximo de densidades ópticas en medio mineral suplementado con 12g/L de glucosa. Sin embargo, la cepa convergente alcanza menores densidades ópticas que el resto. Aparentemente, dos horas de inducción no tienen impacto negativo sobre la velocidad de crecimiento en ambas cepas (Figura 53). En ambas cepas la producción de fluorescencia está bien controlada antes de la inducción, en los datos mostrados la inducción duró dos horas.

Induciendo dos horas, la fluorescencia máxima producida por W3110 clásica y convergente en medio LB es de 60 URF, mientras que al cambiar a medio mineral la convergente alcanzó solamente el 30% de la clásica (Figura 54). Se obtuvo mayor fluorescencia específica en el modelo clásico (Figura 55), las curvas comienzan a caer dos horas después de terminada la inducción, lo que indica que no hay más producción de fluorescencia pero si de biomasa para ambas construcciones.

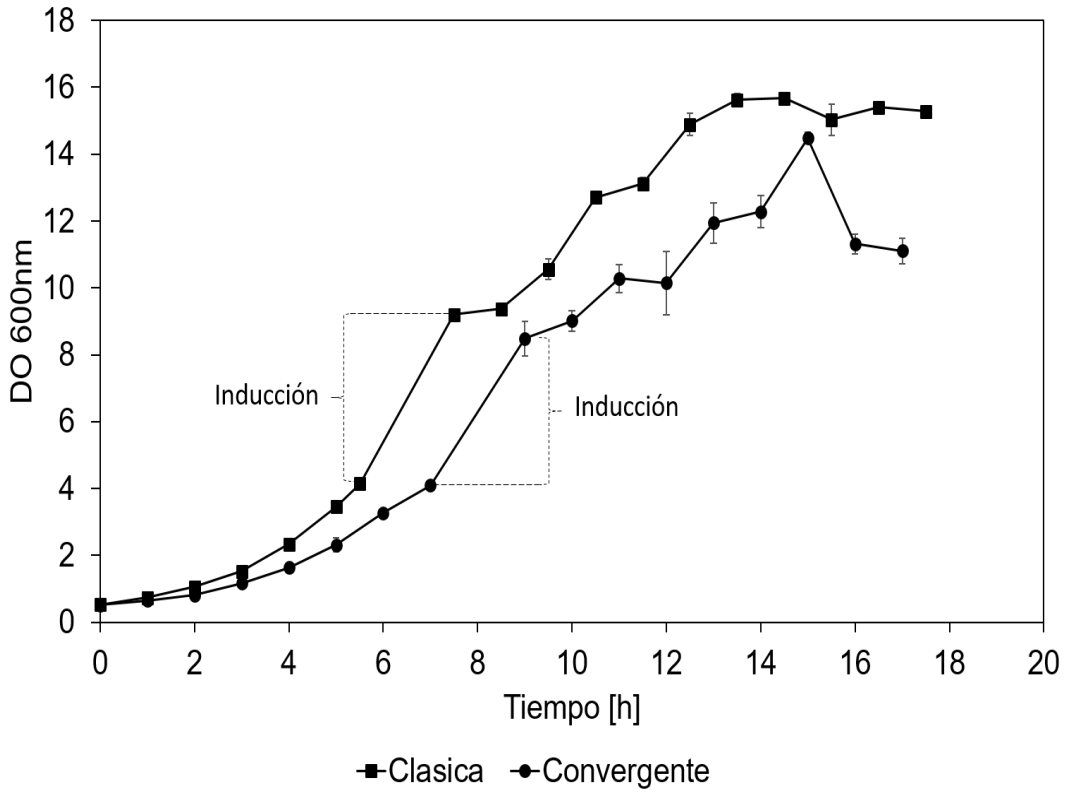


Figura 53. Cinética de crecimiento W3110 en medio mineral suplementado con 12g/L de glucosa, las líneas delimitan el tiempo de inducción.

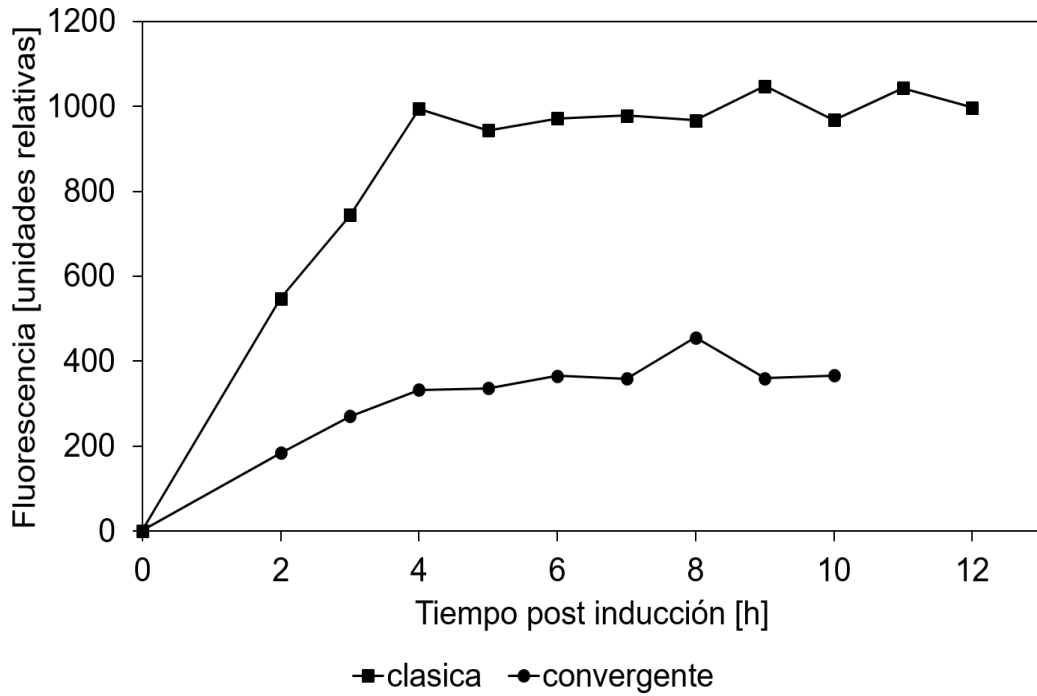


Figura 54 Producción de proteína recombinante en la cepa W3110 de E. coli en medio mineral suplementado con 12g/L.

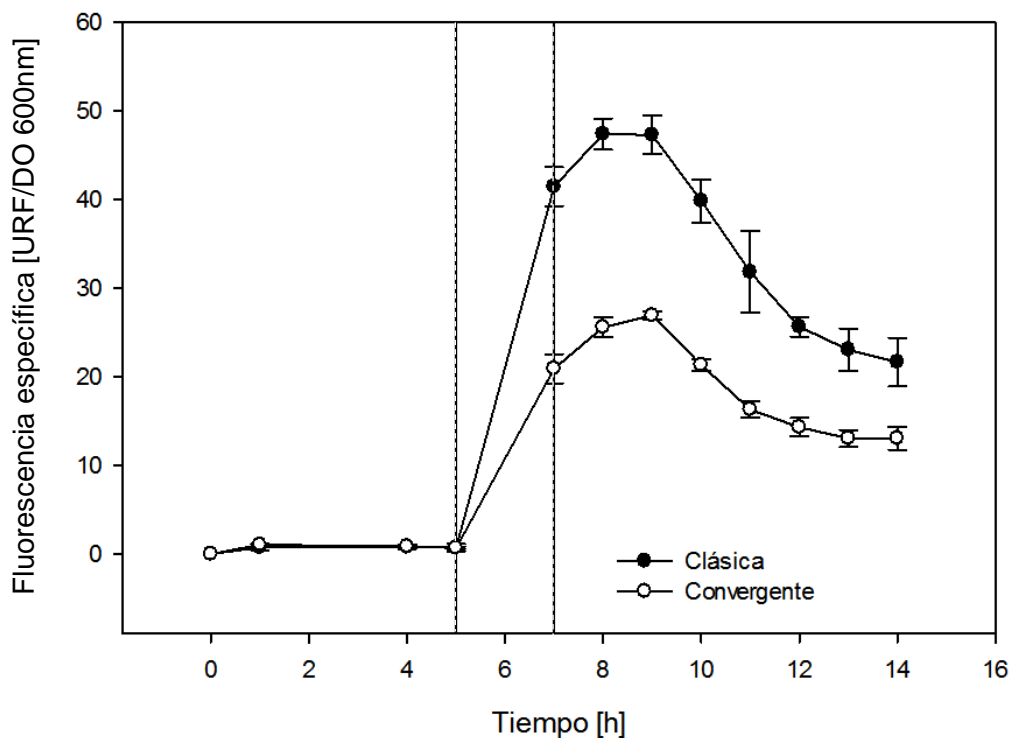


Figura 55. Fluorescencia específica (unidades de fluorescencia por unidades de absorbancia) de las construcciones en la cepa W3110 en medio mineral suplementado con 12g/L de glucosa.

8.6.Efecto del fondo genético

Las construcciones clásica y convergente se probaron en dos cepas distintas. Se evaluó la fluorescencia específica normalizada (i.e. la fluorescencia en cada punto dividida entre el valor máximo) de ambas construcciones en las cepas DH5 α (Figura 56) y W3110 (Figura 57). Dos horas después de la inducción ambas cepas alcanzan entre el 50 – 60% del máximo de fluorescencia, alrededor de una hora después llegan al 90% de la fluorescencia, en ambos cepas la construcción convergente continúa produciendo fluorescencia una hora más. Ambas construcciones tienen el mismo comportamiento aún en cepas distintas. Esto sugiere que la dinámica con la que producen fluorescencia, y en última instancia la proteína recombinante es, al menos, similar entre cepas.

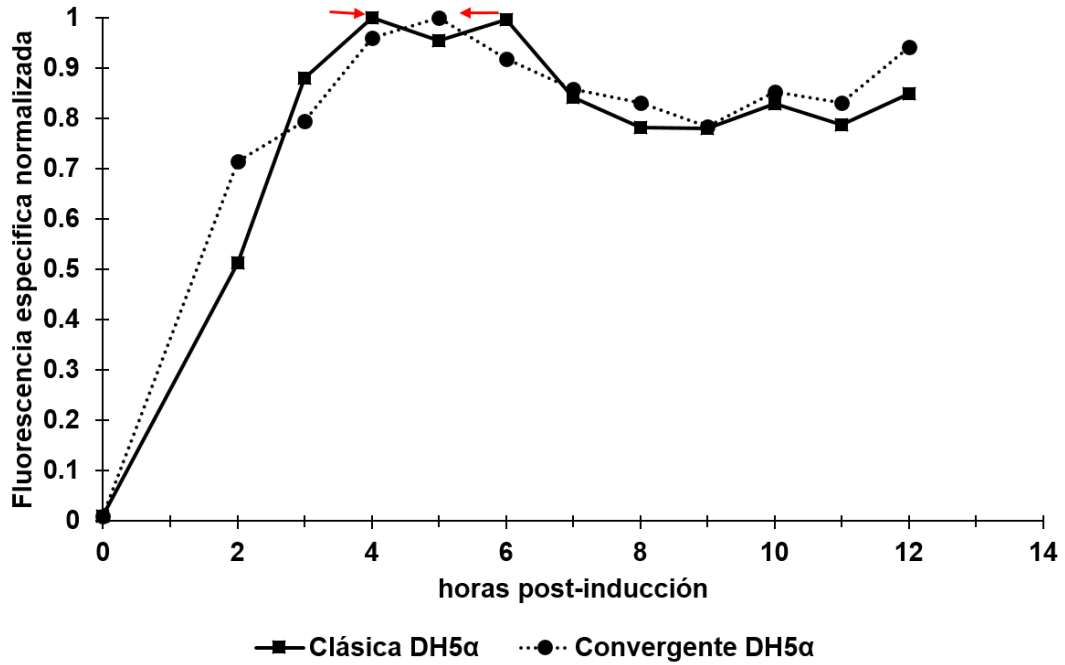


Figura 56. Fluorescencia específica normalizada. Dos construcciones en la cepa DH5α de *E. coli* cultivadas en medio mineral suplementado con 12g/L de glucosa. La línea vertical punteada indica el fin de la inducción, las flechas indica el 100% de la respuesta.

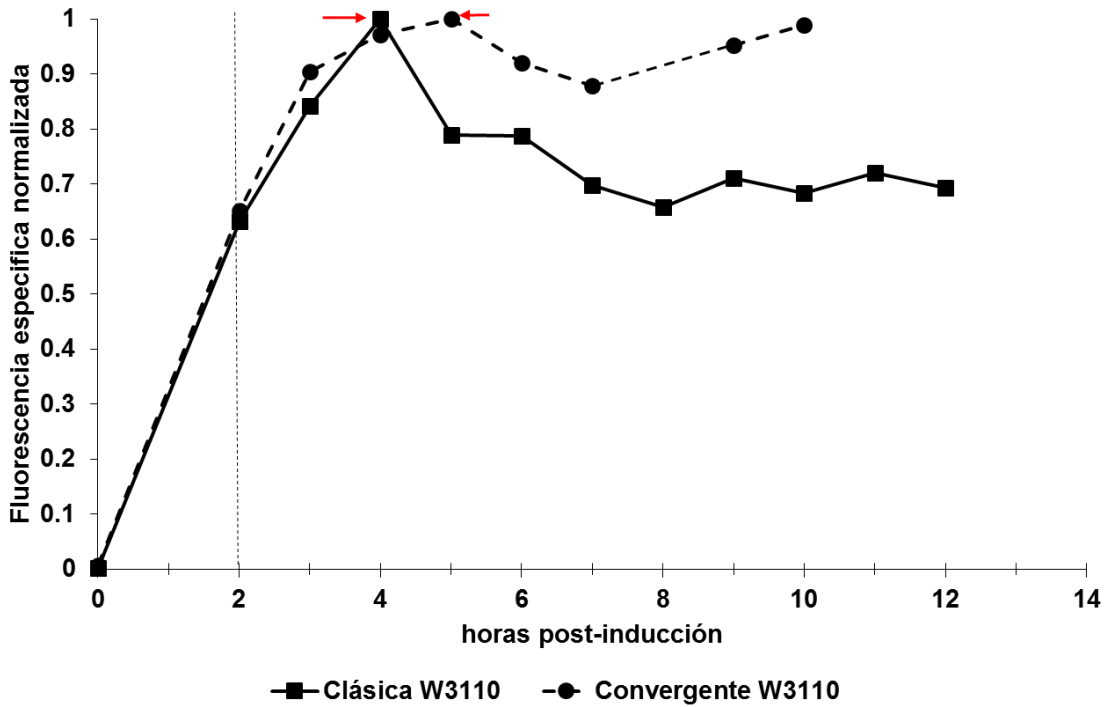


Figura 57. Fluorescencia específica normalizada. Dos construcciones en la cepa W3110 de *E. coli* cultivadas en medio mineral suplementado con 12g/L de glucosa. La línea vertical punteada indica el fin de la inducción, las flechas indica el 100% de la respuesta.

En la Figura 58 se aprecian más fácilmente las similitudes de las construcciones en las distintas cepas. En los paneles se muestra claramente que el máximo de fluorescencia se alcanza exactamente al mismo tiempo en las cepas probadas. Además, las diferencias en cuanto a las cinéticas de fluorescencia son imputables al diseño de cada STI.

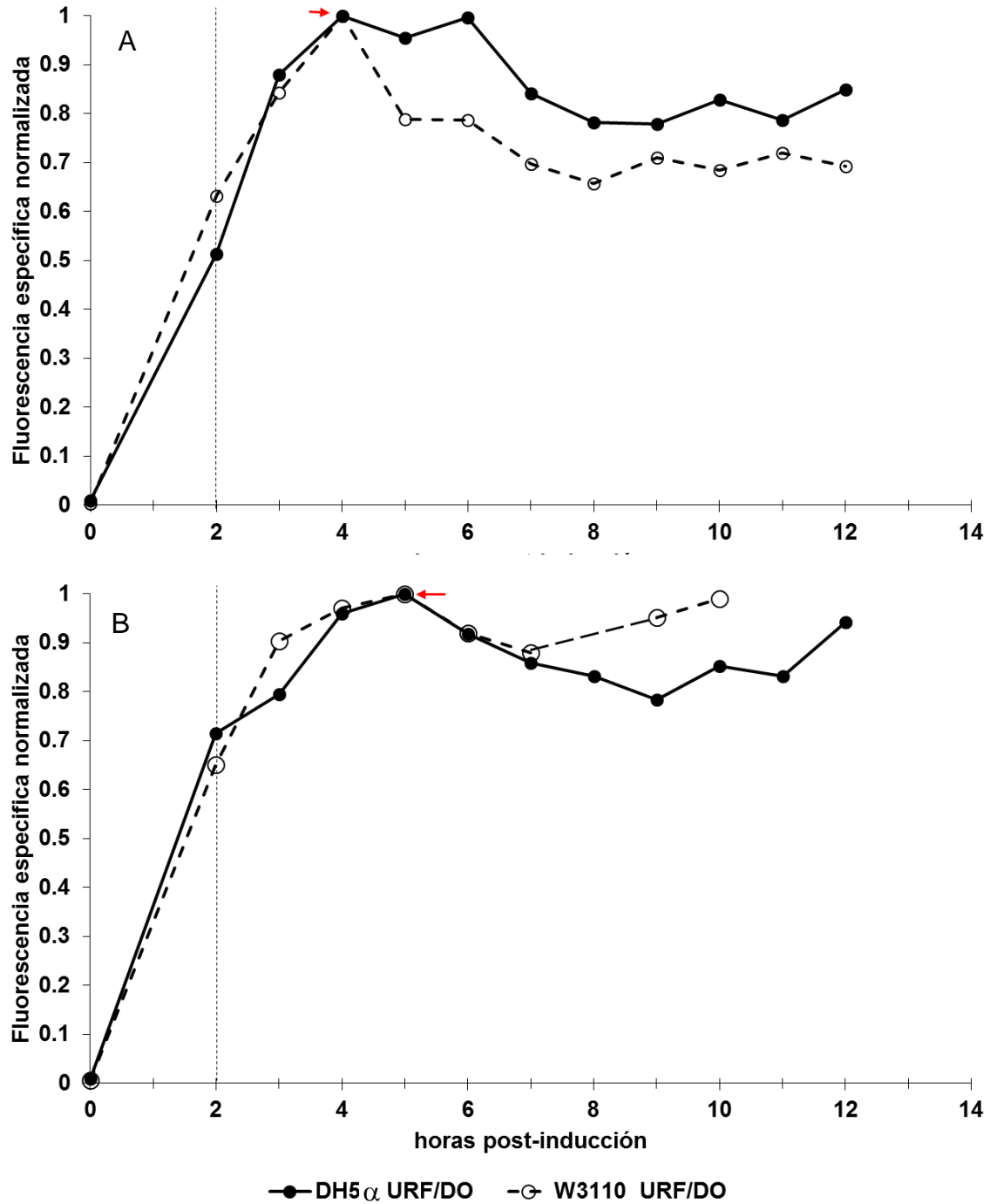


Figura 58. Fluorescencia específica normalizada de cada construcción evaluada en dos cepas distintas. La línea vertical punteada indica el fin de la inducción, las flechas indican el 100% de la respuesta. Panel A: clásica, panel B: convergente. Los datos corresponden a cultivos en medio mineral suplementado con 12g/L de glucosa.

8.7.Prolongación del tiempo de crecimiento

A partir de los resultados previamente descritos se decidió probar un cultivo de mayor duración (Figura 59), por ello se extendió el tiempo de cultivo después de la inducción con la finalidad de evaluar el comportamiento de las construcciones. Para esto, se implementó un cultivo cíclico de “vaciado-llenado”, los periodos señalados se describieron previamente en la sección 7.6.

Primer ciclo

Una vez que las cepas clásica y convergente alcanzaron 4 unidades de absorbancia se indujeron durante dos horas. La fluorescencia máxima para ambas construcciones se alcanzó 4 horas después de la inducción, también coincide con el nivel más bajo de glucosa en este ciclo (1.2g/L), comparando ambas construcciones se encontró que la fluorescencia máxima de la convergente es el 25% de la clásica.

Segundo ciclo

Antes del agotamiento de la fuente de carbonos se inocularon nuevos matraces partiendo de los mismos cultivos, la biomasa se llevó a una densidad óptica de 0.5 unidades de absorbancia. Ambas cepas continuaron creciendo, sin embargo la fluorescencia permaneció constante. La gráfica de la Figura 59 panel C muestra la disminución de la fluorescencia específica en concordancia con el incremento de bioamasa.

Tercer ciclo

El cultivo se vació parcialmente y llenó de medio fresco de nuevo antes del agotamiento de glucosa, la densidad óptica se llevó a 0.5 unidades de absorbancia. Ambas cepas crecieron con la misma velocidad, sin embargo la clásica alcanzó mayor concentración de biomasa. No se detectó generación de fluorescencia durante este ciclo, la que se detecta es resultado de la dilución del cultivo durante su siembra, de igual manera la

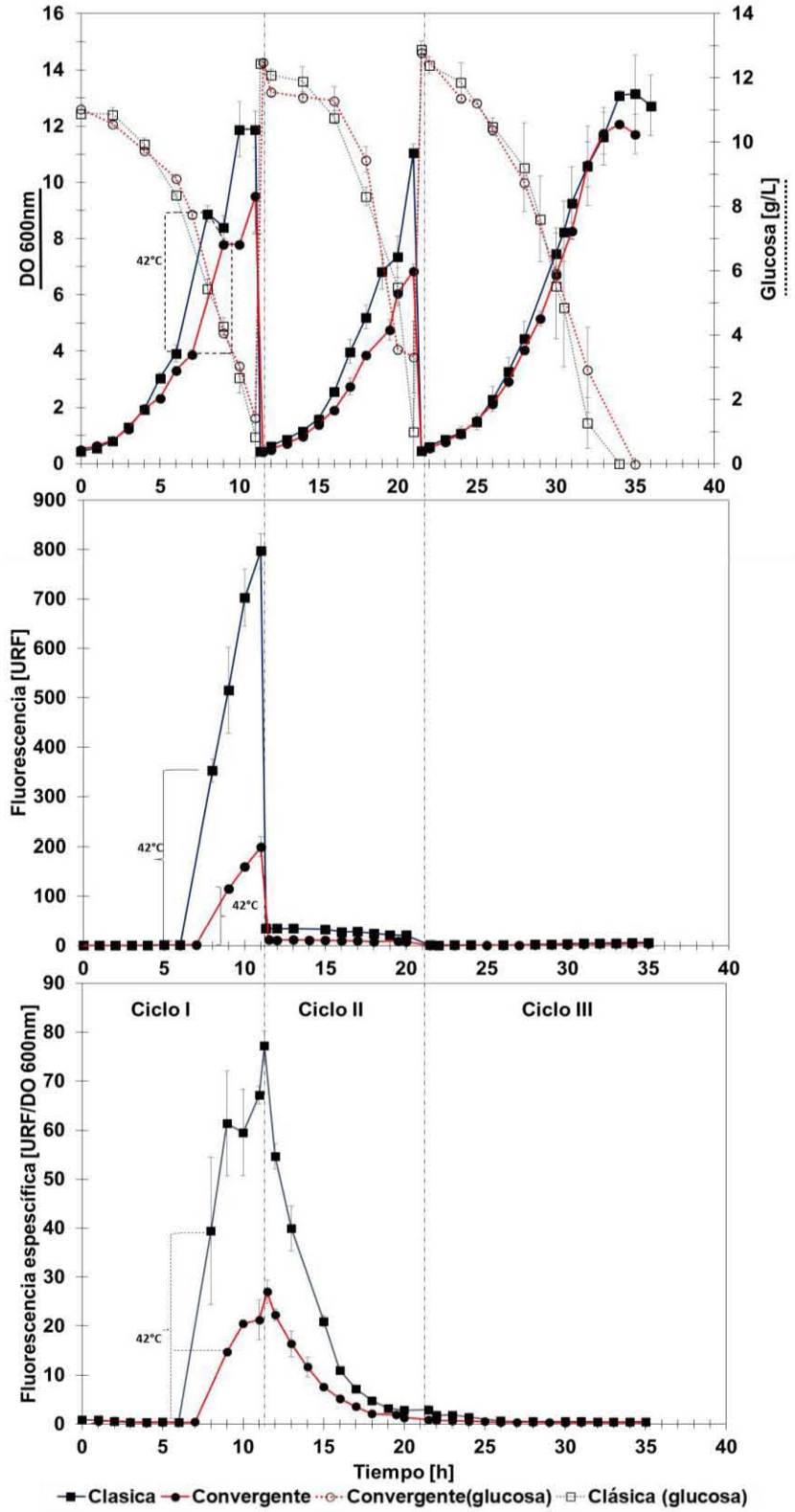


Figura 59. Cinética en 3 ciclos de cultivos operados en modo “vaciado-llenado” las construcciones clásica y convergente en la cepa W3110 en cultivo por lote cíclico.

fluorescencia específica disminuye conforme aumenta la densidad óptica. El crecimiento cesa hasta poco después del agotamiento de la glucosa.

En cada uno de los ciclos, la velocidad de crecimiento (Figura 60) de la cepa clásica fue ligeramente mayor que en la cepa convergente, esta diferencia es aún menor en el tercer ciclo.

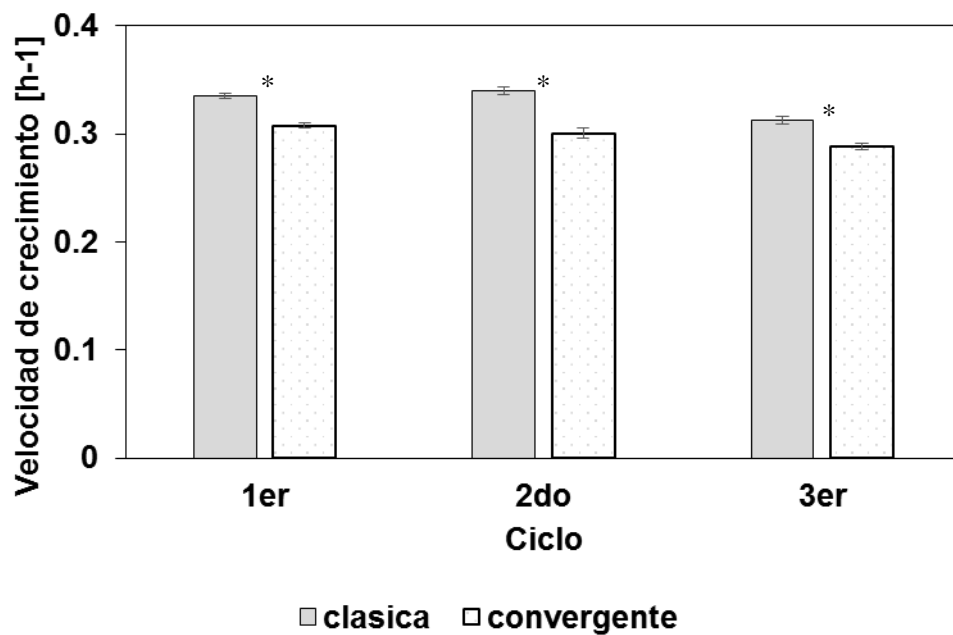


Figura 60. Velocidades de crecimiento en los tres periodos de cultivo de W3110 construcciones clásica y convergente. Para las barras con (*) $P > 0.05$

8.8. Convergente con etiqueta de degradación

Considerando los resultados anteriores se sugirió la posibilidad de que el represor λcI^{857} permaneciera durante mucho tiempo en el sistema, por lo que se buscó reducir la vida media de la proteína añadiendo una etiqueta de degradación (descrito previamente). Brevemente, se amplificó la construcción convergente usando PCR y empleando un primer con la etiqueta de degradación.

Amplicones obtenidos por PCR

Se probaron tres temperaturas de alineamiento con 3% DMSO y sin este, los amplicones obtenidos según se describió en la sección 7.5 se evaluaron por electroforesis en gel de agarosa (Figura 61). La condición que más enriqueció la banda esperada fue la de 72°C con 3% de DMSO. Esta banda se separó del gel, se purificó y se ligó en un plásmido con el terminador transcripcional B0011 digerido con las enzimas EcoRI y XbaI (Figura 62) (descrito previamente). La presencia de la secuencia codificante de la etiqueta de degradación se corroboró por secuenciación.

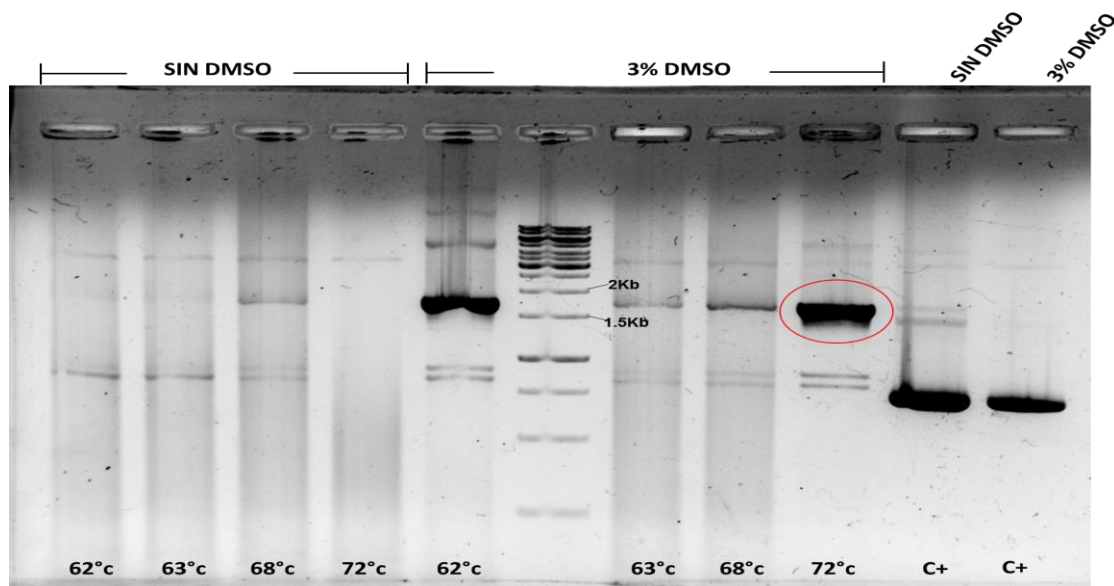


Figura 61. Electroforesis en gel de agarosa del modelo 1 con la etiqueta de degradación AANDENYALAA. Las temperaturas anotadas al pie de cada carril representan las temperaturas de alineamiento utilizadas, en la parte superior del gel están señalados los carriles en los que se utilizó DMSO. Se utilizó como control positivo (c+) el modelo 1 en el plásmido pSB1A2 amplificando únicamente la secuencia codificante del represor λ cl⁸⁵⁷.

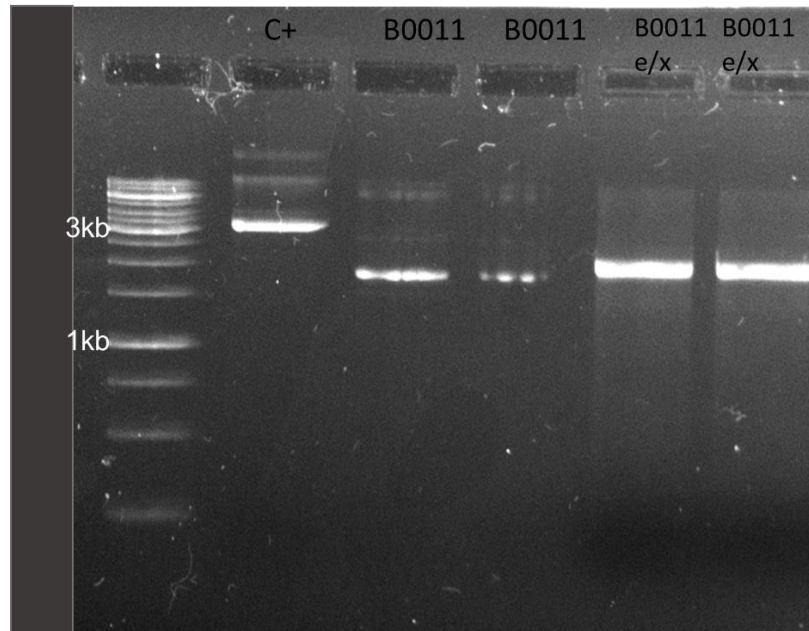


Figura 62. Digestión del terminador transcripcional B0011 con *EcoRI* y *XbaI*. Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2 control positivo (plásmidos linealizado de 3.5kb), carriles 3 y 4 plásmido pSB1A2 sin digerir, carriles 5 y 6, plásmido digeridos con *EcoRI* y *XbaI*.

8.9. Cinética de crecimiento

Al someter la cepa generada a una prueba rápida de fluorescencia se encontró que no había diferencia en la fluorescencia específica en las distintas cepas, una segunda selección de la clona demostró que la expresión de la proteína es constitutiva (Figura 63). Es posible que el péptido que compone la etiqueta de degradación intervenga en el plegamiento del represor lo que evitaría que actuara sobre el promotor P_R .

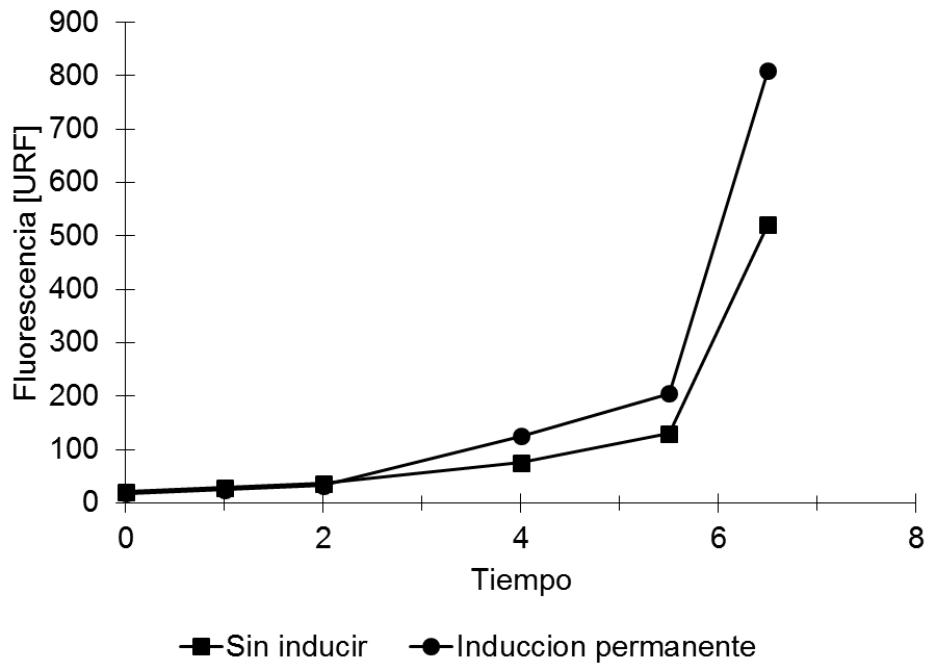


Figura 63. Cinética de producción de fluorescencia de la cepa convergente con etiqueta de degradación.

8.10. Modelo 2:heredable

Construcción del efector

Las biopartes del efector se ligaron como se indicó en la Figura 29, se comprobó la presencia de los insertos por PCR de colonia (Figura 64). De ocho colonias evaluadas sólo la colonia siete tiene el inserto.

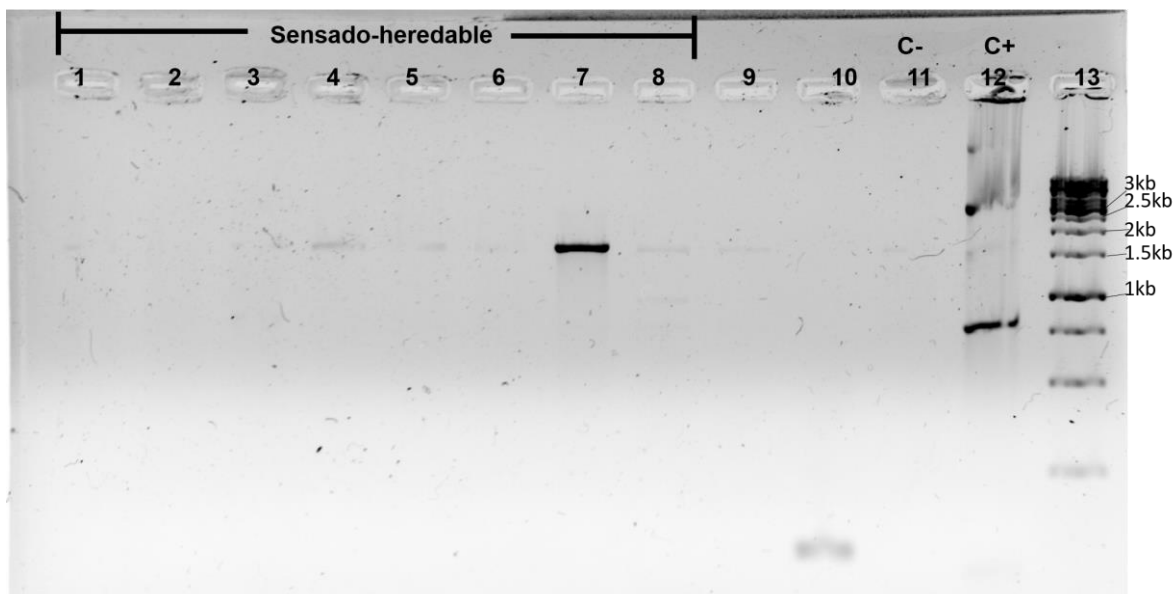


Figura 64. Gel de electroforesis de la PCR de colonia de los módulos sensado-heredable del modelo 2. Se espera un amplicón de 1670pb. Los carriles 1 a 8 son las colonias a evaluar, los carriles 9 y 10 tienen el plásmido B0011, el carril 11 es un control negativo de la PCR sin ADN molde, el carril 12 el control positivo con la bioparte E1010 el amplicón esperado es de 750pb.

El módulo del reportero se clonó en DH5 α . El tamaño del módulo se comprobó con PCR de colonia (Figura 65). De las diez colonias evaluadas las diez presentaron el inserto del tamaño esperado.

Ambos módulos se ligaron y se clonaron en DH5 α por electroporación. Se comprobó el tamaño del inserto con PCR de colonia con oligonucleótidos de secuenciación (Tabla 2). Se evaluaron seis colonias, de ellas cinco presentaron el inserto del tamaño esperado.

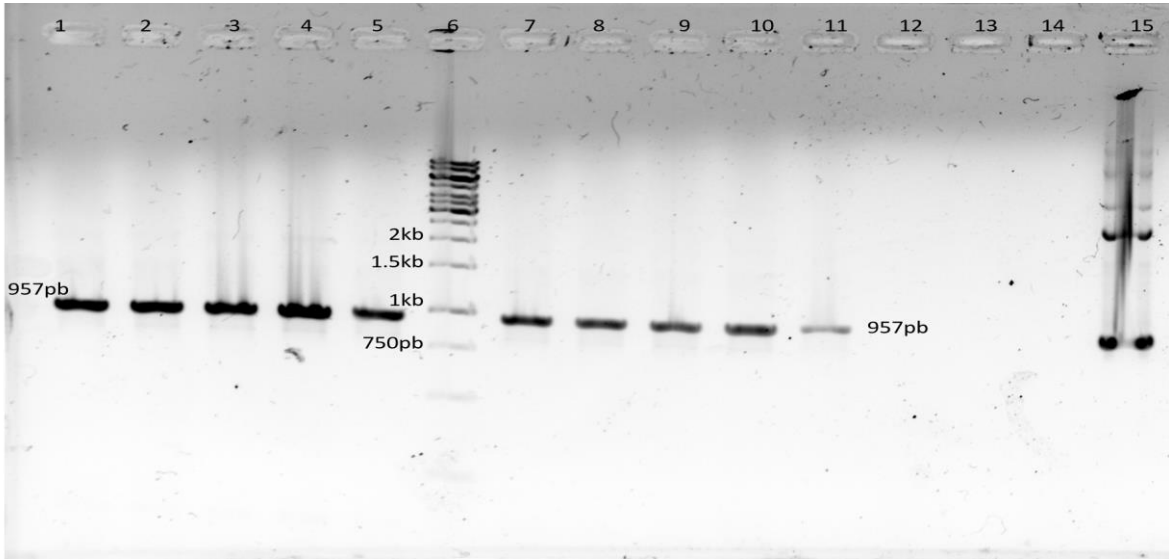


Figura 65. Gel de electroforesis de la PCR de colonia del sensor del modelo heredable en DH5a. Carriles 1-5 y 7-11 corresponden a las colonias 1 a 10, carril 13 control negativo PCR sin ADN molde, carril 15 control positivo, carriles 12 y 14 están vacíos.

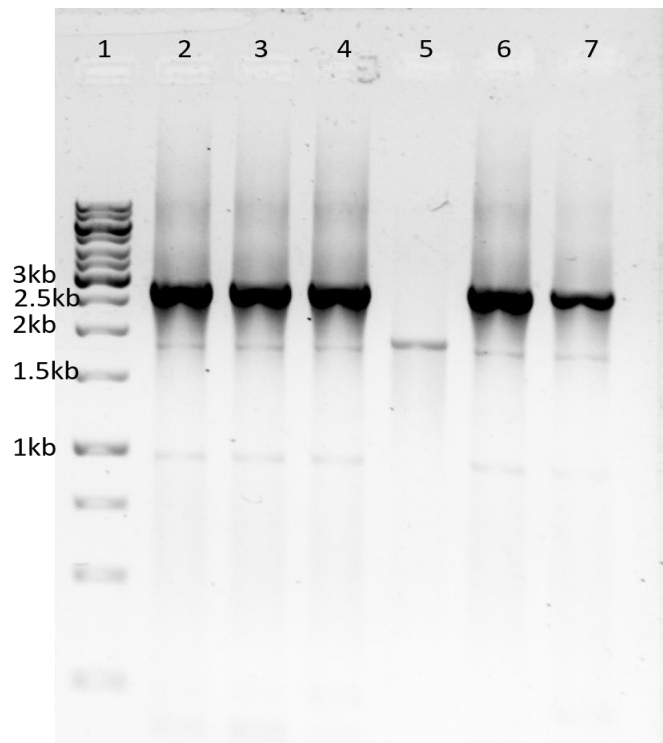


Figura 66. PCR de colonia del modelo 2 en DH5a. El tamaño esperado del inserto es de 2808pb. Carril 1: marcador de peso molecular, carriles 2-7: colonias 1 a 6.

Para corroborar la presencia y el sentido en el que se clonó el inserto en el plásmido, se realizó un ensayo de PCR con oligonucleótidos que amplifican (Figura 67): a) sólo en caso de que exista recombinación: Rec FW/RV; b) sólo en caso de que no exista recombinación

(E1010 FW/Prefijo FW); y c) la secuencia completa de la construcción independientemente de los eventos de recombinación (Secuenciación FW/RV).

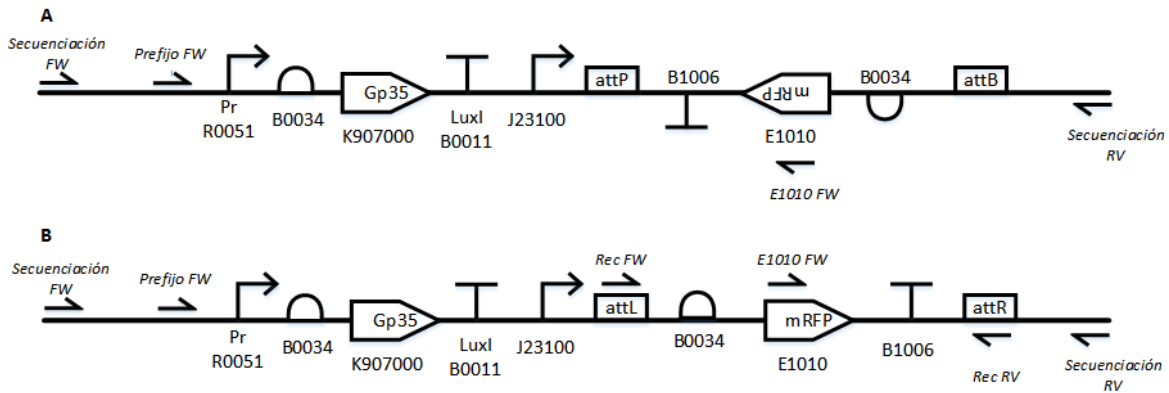


Figura 67. Alineamiento esquemático de los oligonucleótidos utilizados en el análisis del modelo heredable. En cursivas el nombre de cada oligonucleótido utilizado, se anotan en la región y sentido en el que amplifican, panel A) modelo heredable sin recombinación, panel B) modelo heredable recombinado. No se muestra el alineamiento de Rec FW y Rec RV en el primer panel porque esas secuencias solo existen después de la recombinación.

El análisis de los amplicones en gel de electroforesis (Figura 68), muestra resultados contradictorios pues las reacciones A y B son positivas para ambas colonias, cuando deberían ser mutuamente excluyentes, además ninguna de las colonias había sido sometida a inducción térmica, por lo que se esperaba que la reacción A no rindiera amplicones y la reacción B si lo hiciera. Es posible que, a pesar de que los ensayos se hicieron a partir de cultivos propagados de una sola colonia aislada, existan subpoblaciones. Por otra parte, solamente la colonia cinco tiene el tamaño esperado de la construcción completa.

La secuenciación de la colonia cinco confirmó el evento de recombinación, los datos de los cromatogramas no mostraban ambigüedad en las regiones involucradas con la recombinación. Basado en los resultados anteriores se sugirió que la fase de calentamiento durante la transformación de *E. coli* quimicompetentes pudo ocasionar la recombinación. Por lo tanto, se decidió repetir el experimento con *E. coli* electrocompetentes.

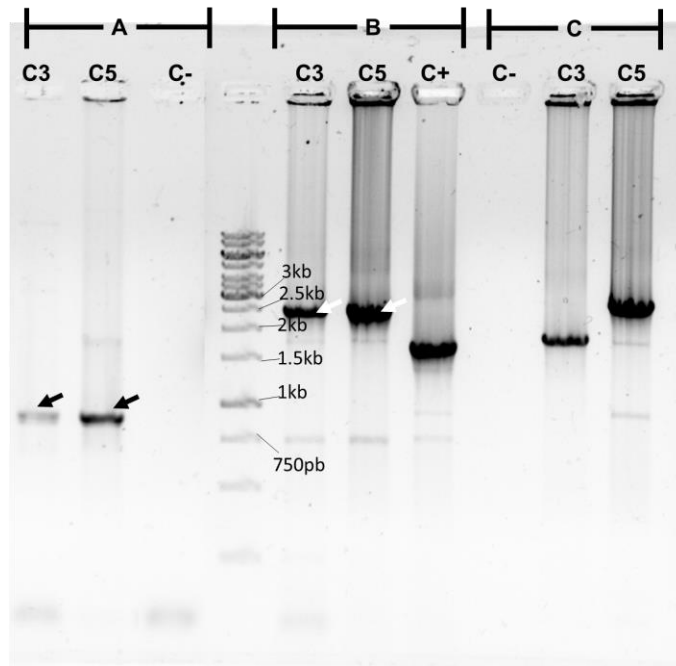


Figura 68. PCR de las colonias 3 y 5 del modelo heredable. Las reacciones se dividen en: A) prueba de recombinación con oligonucleótidos recombinación FW/RV amplicón esperado de 850pb; B) prueba de ausencia de recombinación con oligonucleótidos E1010 FW/Prefijo FW amplicón esperado de 2506pb; C) comprobación del tamaño del modelo heredable. C3: colonia tres, C5: colonia cinco, C- control negativo que en la reacción A es el plásmido pSB1A2 con el efector y en la reacción C es una preparación de PCR sin DNA molde, C+: control positivo. Las flechas negras indican amplicones positivos para recombinación, las flechas blancas indican amplicones positivos para ausencia de recombinación.

Una vez obtenidas las nuevas mutantes por electroporación se evaluaron tres colonias por ensayos de PCR con tres juegos de oligonucleótidos: mRFP, que amplifican la región codificante de mRFP; secuenciación, que amplifican la construcción completa y recombinación, que amplifican cuando la recombinación ha ocurrido.

Los amplicones son de los tamaños esperados (Figura 69), sin embargo hay bandas muy tenues en los carriles de recombinación, una secuenciación de la colonia marcada con el número 15 confirmó la recombinación. Este mismo resultado se presentó en diversas ocasiones que se realizó la construcción

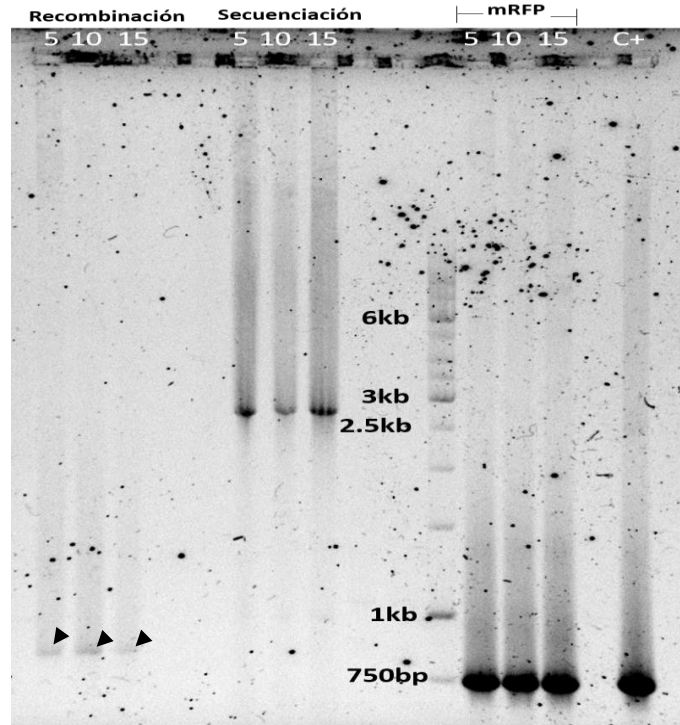


Figura 69. Modelo 2, PCR de colonia del modelo 2 transformado por electroporación, los rótulos abarcando tres carriles indican que reacciones se cargaron en los carriles, las puntas de flecha indican los amplicones de recombinación, el control positivo es el modelo clásico 1 de este solo se amplificó mRFP. Los número en blanco (5,10,15) son los números asignados a las tres colonias evaluadas.

Se realizó una cinética con la colonia quince en matraces agitados con medio mineral sin inducción y con dos horas de inducción (Figura 70). El impacto a la velocidad de crecimiento es claro, con dos horas de inducción la velocidad decae un 25%. En la cepa no inducida la fluorescencia aumenta paulatinamente conforme aumenta la biomasa, sigue pues una cinética de producción parcialmente asociada al crecimiento.

Por otra parte, la fluorescencia específica parece seguir un comportamiento distinto, al principio es muy alta y decae paulatinamente hasta un nivel mínimo, que coincide con el inicio de la inducción –cuando se induce por dos horas–. La fluorescencia en el cultivo sin inducir se extiende hasta el inicio de la fase estacionaria. Dado que la producción está parcialmente asociada al crecimiento la producción de fluorescencia continúa después de haber alcanzado la fase estacionaria, lo que puede deberse a dos razones: 1) producción de

proteína recombinante ó 2) maduración de las proteínas producidas. Campbell *et al.*, (2002) reportó que el tiempo de maduración de la variante mRFP utilizada en este estudio es menor a 1 h a 37°C, cuando la cepa se cultivó a 30°C –sin inducción–, la producción de fluorescencia continuó dos hora después de alcanzada la fase estacionaria. Este comportamiento bien puede ser consecuencia de una mezcla de ambos efectos, es decir continúa la producción de proteína recombinante y maduran las proteínas previamente producidas, o bien solamente un retraso en el tiempo de maduración a consecuencia de la temperatura.

Cuando la cepa se induce durante dos horas la velocidad máxima de producción de fluorescencia incrementa, sin inducción es de 0.13h^{-1} , mientras que con inducción llega a 0.36h^{-1} . Esto sugiere que elevar la temperatura si induce mayor producción de proteína recombinante ya que –cuando hay inducción– la fluorescencia incrementa más rápidamente que la biomasa. Sin embargo una vez terminado el efecto de la inducción la fase de crecimiento celular se extiende 7 h más y no se alcanzan los niveles máximos de fluorescencia del cultivo no inducido. Finalmente al comparar los máximos de fluorescencia específica podemos ver que, aún sin inducción la cepa heredable produce el 75% de lo que produce con inducción, por lo que se concluye que la cepa no es útil como inducible.

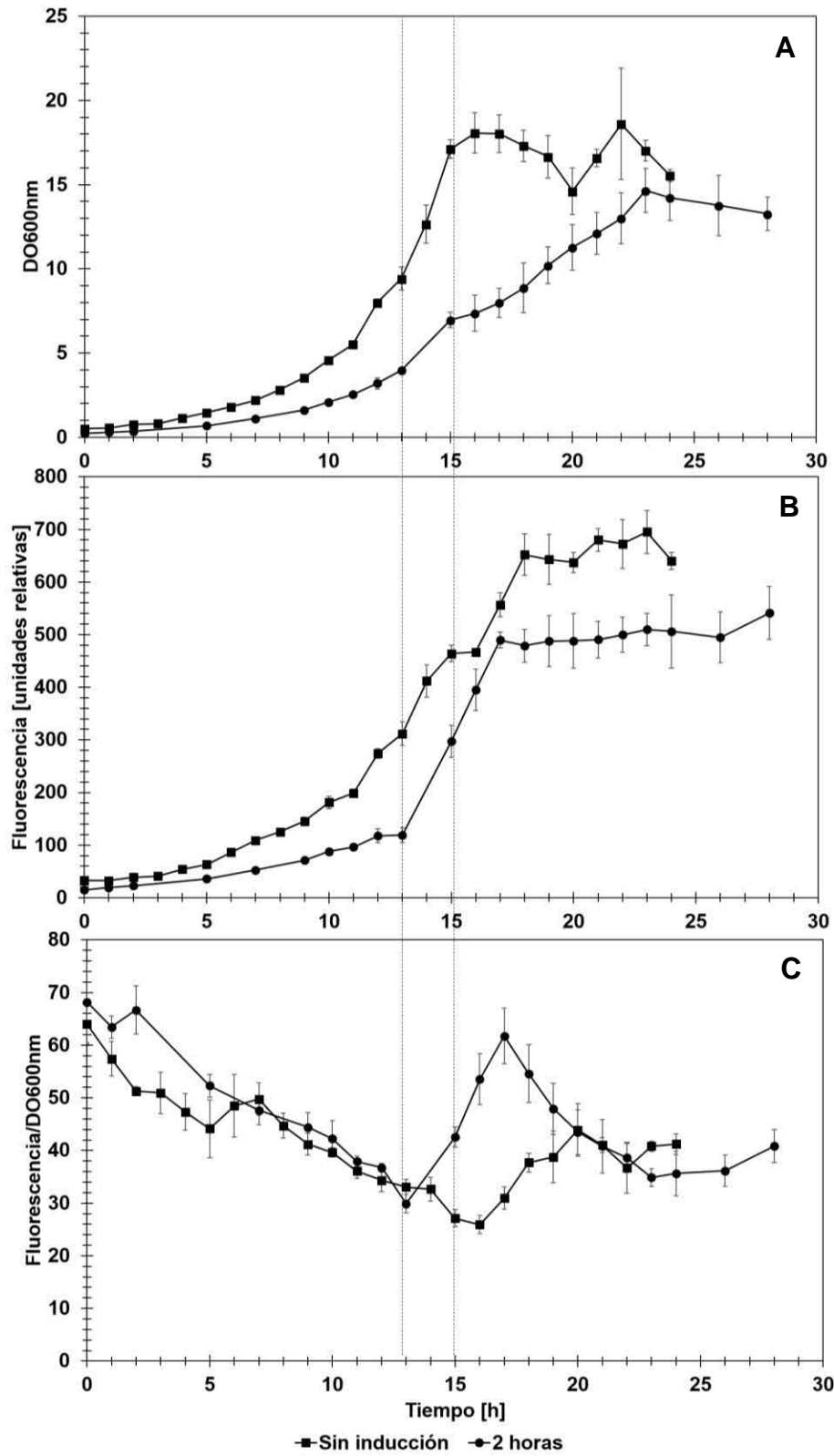


Figura 70. Evaluación del modelo heredable en *E. coli* cepa 53606. Se muestran resultados de la cepa sin inducción (cuadros) y con dos horas de inducción (círculos), las líneas punteadas verticales indican el periodo de inducción. Panel A) Cinética de crecimiento, panel B) cinética de producción de fluorescencia, panel C) cinética de fluorescencia específica.

9. Discusión

Todas las RRG propuestas se diseñaron para que la proteína siguiera produciéndose aún después de bajar la temperatura a 30°C, los resultados varían con cada una. Se construyeron tres versiones del modelo 1, la primera disyuntiva fue elegir entre una versión con los módulos de sensado, mantenimiento y del reportero en el mismo sentido –en la misma hebra de DNA– designada convergente y otra versión con transcripción de los módulos en sentidos opuestos, llamada divergente.

Modelo uno, versión divergente

Los resultados indican que ambas cepas son inducibles elevando la temperatura, sin embargo en la divergente se aprecia expresión basal, también llamada fuga, aún a 30°C. Una posible explicación del tal comportamiento sería un impedimento estérico. El espacio entre ambos promotores (λP_R y P_{Tet}) es de 9 bases (Figura 71), por lo que es posible que la unión de TetR al operador evita que λCI^{857} se pueda unir a OR2, lo que disminuiría la efectividad de la represión y podría explicar la producción de fluorescencia aún sin inducción. En caso de ser esto cierto, una posible solución a esto sería espaciar los promotores.

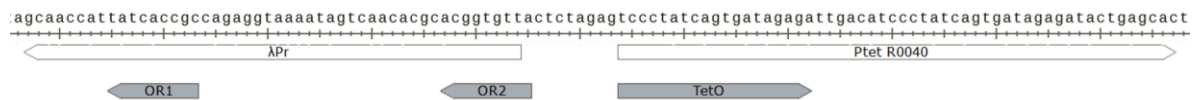


Figura 71. Espacio entre los promotores $Ptet$ y $TetR$ en el modelo 1 divergente, $OR1$ y $OR2$ son los operadores del promotor termo inducible λPr , $TetO$ es el operador del promotor P_{Tet} .

Dos modelos podrían explicar el comportamiento de la cepa divergente, en función de lo sugerido en el párrafo anterior: 1) λCI^{857} impide la unión de la RNAP al promotor P_{tet} , esto indirectamente reprimiría la transcripción de λCI^{857} y por lo tanto existirían pocas copias

capaces de reprimir al promotor λP_R , el cual eventualmente se liberaría y se establecería un ciclo de producción y represión que daría como resultado una breve pero constante producción de fluorescencia; 2) la RNAP se une al operador TetO e impide la unión de λcI^{857} a OR2, así la represión sobre λP_R sería aún posible pero más débil, pues solo hay un sitio operador para ejercer la represión, esto provocaría expresión basal y se ajusta al fenómeno observado.

Modelo uno, versión convergente

Por otra parte, la versión convergente responde sobre la expresión de la proteína fluorescente igual que la cepa clásica, pero produce menor fluorescencia, posiblemente debido a la carga metabólica extra que implica la producción del represor de tetraciclina.

Cuando se transformó *E. coli* cepa DH5 α , la producción de fluorescencia cesó poco tiempo después de bajar la temperatura a 30°C. Este no es el comportamiento esperado y podría ser consecuencia de la mutación que esta cepa tiene en RecA, pues –en el ciclo de vida del fago lambda– durante la respuesta SOS RecA realiza un corte proteolítico al represor λcI en la región *linker* y promueve la entrada del profago a fase lítica. Entonces, es posible que la mutante de RecA fuese ineficiente para inactivar la mutante termosensible λcI^{857} , de ser así elevar la temperatura a 42°C liberaría la mayoría de los operadores en el promotor P_R durante la inducción pero λcI^{857} volvería a unirse una vez que se baja la temperatura a 30°C.

En el afán de sobrepasar este inconveniente se transformó con el modelo convergente la cepa de *E. coli* W3110, que posee una copia nativa del gen *RecA*. Se encontró que cuando se cultivaban el modelo clásico y el convergente transformados en *E. coli* W3110 en medio LB con dos horas de inducción, la fluorescencia máxima era la misma. Sin embargo una

vez que se incrementó la biomasa –cultivando para ello en medio mineral–, se observó un comportamiento similar al descrito previamente para la cepa DH5 α . Por otra parte, cuando se normalizan los datos de fluorescencia específica se observa una ligera diferencia que no logra confirmarse en los experimentos subsecuentes. Es posible que el switch construido no este deteniendo la transcripción de cI^{857} . Colocar un segundo promotor λPr justo antes de TetR podría solucionarlo, ya que quizás la distancia del gen codificante al promotor disminuye su eficiencia transcripcional.

Después de un ciclo de optimización se construyó el modelo 1 en su versión convergente con una etiqueta de degradación en el represor λcI^{857} , que debería disminuir el tiempo de vida media de la proteína. El resultado fue inesperado, a pesar de que la etiqueta está en el extremo carboxilo y no en el amino –este es el usado para la unión al operador– el represor λcI^{857} fue incapaz de bloquear efectivamente la producción de la proteína recombinante a 30°C. Agregar esta etiqueta volvió la expresión constitutiva

Para llevar a buen término las construcciones que aspiran a funcionar como circuitos es importante considerar el balance de las moléculas directamente involucradas, así como los tiempos de vida media de cada una de ellas y la velocidad con la que se pliegan los represores o inductores actuantes. Lo anterior debe usarse para definir el marco de tiempo en el que ocurren los fenómenos que definen el funcionamiento del circuito. En ese sentido, es posible que el comportamiento observado sea consecuencia del balance de represores, la fuerza de estos y de los promotores, por lo que probablemente sea necesario colocar una etiqueta de degradación al represor Tet_R para que los tiempos de vida media de ambos se encuentren en el mismo orden de tiempo y sea posible inducir de manera efectiva. Sin embargo, existe la posibilidad de que el represor λcI^{857} -LAA no sea capaz de unirse a las

regiones operadoras con efectividad. Por ejemplo, la etiqueta se colocó en el extremo carboxilo y este dominio es el que permite a la proteína formar dímeros para ejercer mejor represión sobre el promotor pero su unión al promotor ocurre por el extremo amino. Si el represor se une al operador como monómero es menos estable que al unirse como dímero (Ptashne, 2004). Aunque es importante señalar que el uso de etiquetas de degradación en el represor del fago lambda ya se ha hecho con éxito (Elowitz & Leibler, 2000).

Modelo heredable

El segundo modelo se diseñó con la expectativa de que al tener la secuencia codificante en sentido opuesto a los promotores no habría expresión basal, además una vez inducido el cultivo ocurriría un evento de recombinación que aseguraría que en lo posterior la expresión de la proteína sería constitutiva. A pesar de haber usado dos métodos de transformación siempre se obtuvieron cepas en las que el evento de recombinación ya había ocurrido, aunque la recombinasa está bajo control del promotor λP_R que se reprime muy efectivamente. Se disciernen dos posibles razones para que esto ocurra: 1) la poca transcripción basal que tiene el promotor λP_R es suficiente para que ocurra la recombinación; 2) el tiempo de maduración del represor λCI^{857} permite la existencia de una ventana de tiempo suficiente para que el gen codificante de la recombinasa se transcriba.

Es necesario cambiar la estrategia y minimizar la expresión basal de la recombinasa. El sistema diseñado puede funcionar, si se controla efectivamente, la producción basal de la recombinasa.

Efecto del fondo genético

Los datos de fluorescencia específica normalizada sugieren, que en el caso de DH5 α y W3110, ambas derivadas de K-12, el fondo genético es irrelevante en el comportamiento de la construcción, en lo que a producción de fluorescencia se refiere. Los valores puntuales pueden ser distintos, sin embargo las proporciones y los tiempos de producción en las condiciones probadas son los mismos (ver Figura 56 aFigura 58). Es claro que en distintas cepas se obtendrán distintos rendimientos de proteínas, sin embargo es relevante observar que, en este caso, a partir de la descripción de la dinámica de producción de fluorescencia en una cepa se puede predecir el comportamiento de la otra que estaba relacionada.

10. Conclusiones

En el presente trabajo se realizaron diferentes versiones de un sistema de producción de proteína heteróloga por termoinducción en una RRG y se evaluaron en dos fondos genéticos distintos. La regulación y construcción de estos circuitos ha probado requerir un análisis adicional en función del balance de represores y los tiempos en los que ocurren los fenómenos.

Se construyeron dos modelos clásicos con técnicas de biología sintética, uno con funcionamiento delimitado a cepas que expresen constitutivamente el represor λcl^{857} y otro independiente del fondo genético de la cepa.

La orientación de los promotores en una construcción con las mismas biopartes y diseñada para el mismo fin tuvo un impacto en la respuesta de la RRG. Además, los resultados sugieren que el espacio entre dos promotores regulados mutuamente es importante para el correcto funcionamiento del sistema.

Los modelos generados mostraron el mismo comportamiento, en términos de proporción, en dos derivadas de *Escherichia coli* K-12, una cercana a la silvestre (W3110) y una ampliamente usada en laboratorio (DH5 α). Esto sugiere que la producción de la proteína recombinante siguió, en proporción, la misma dinámica de producción en dos cepas bacterianas relacionadas a pesar de que existan diferencias en los rendimientos.

Se generaron tres mutantes con el sistema termoinducible clásico –dos construcciones distintas, una de ellas en dos cepas distintas de *E. coli*– con estándares de biología sintética y biopartes estándar que se suman a la colección del laboratorio.

Esta es la primera tesis del grupo que involucra a la biología sintética desde la concepción del proyecto y sienta las bases en el laboratorio para un posterior desarrollo en este derrotero.

11. Perspectivas

Para mejorar la regulación en la cepa convergente debería explorarse agregar una etiqueta de degradación al represor Tet_R y llevar ambos represores a la misma escala de tiempo de vida media, que por ser más corta debería dar respuestas más rápidas a la inducción.

En el caso del segundo modelo debería explorarse el control de la expresión basal de la recombinasa, en caso de que exista, agregando otro nivel de regulación que impidiera la traducción de los transcritos generados. Esto se puede lograr colocando un riboswitch en la secuencia líder, si se coloca un termosensor de ARN como el de la represión de los genes de respuesta a choque térmico (ROSE por sus siglas en inglés). Bastaría una sola señal inductora para controlar dos elementos reguladores, la represión del promotor por $\lambda C1^{857}$ y la represión de la traducción por el riboswitch y no se altera el modo de inducción del sistema que es muy valioso a escala industrial.

Para mejorar el diseño inicial es recomendable utilizar simulaciones computacionales. Existen ejemplos y aunque su desarrollo no es trivial, puede ayudar mucho a la optimización del diseño antes de su construcción física.

El presente trabajo sugiere rutas de investigación para desarrollar. Lo más valioso de la biología sintética trasciende al uso de biopartes, pues es posible diseñar comportamientos complejos en las células, por ejemplo volverlas responsivas únicamente en presencia de tres condiciones y controlar la población de las mutantes bajo dos condiciones distintas o programar células más allá de la sobreproducción de un metabolito.

12. Referencias

- Andersen, J. B. O., Sternberg, C., Poulsen, L. K., Bjørn, S. P., Givskov, M., & Molin, S. (1998). “New unstable variants of green fluorescent protein for studies of transient gene expression in bacteria”. *Applied and Environmental Microbiology*, **64**(6), 2240–2246.
- Anderson, J. C. (2006). “Anderson promoter library registry of standard biological parts”.
- Arsène, F., Tomoyasu, T., & Bukau, B. (2000). “The heat shock response of escherichia coli.” *International Journal of Food Microbiology*, **55**(1–3), 3–9.
- Baez, A., Majdalani, N., & Shiloach, J. (2014). “Production of recombinant protein by a novel oxygen-induced system in escherichia coli.” *Microbial Cell Factories*, **13**(1), 1–7.
- Bernstein, J. a, Khodursky, A. B., Lin, P.-H., Lin-Chao, S., & Cohen, S. N. (2002). “Global analysis of mrna decay and abundance in escherichia coli at single-gene resolution using two-color fluorescent dna microarrays.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **99**(15), 9697–9702.
- Bertram, R., & Hillen, W. (2008). “The application of tet repressor in prokaryotic gene regulation and expression”. *Microbial Biotechnology*, **1**(1), 2–16.
- Cameron, D. E., Bashor, C. J., & Collins, J. J. (2014). “A brief history of synthetic biology.” *Nature Reviews. Microbiology*, **12**(5), 381–390.
- Campbell, R. E., Tour, O., Palmer, A. E., Steinbach, P. a, Baird, G. S., Zacharias, D. a, & Tsien, R. Y. (2002). “A monomeric red fluorescent protein.” *Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America*, **99**(12), 7877–7882.

- Caspeta, L., Flores, N., Pérez, N. O., Bolívar, F., & Ramírez, O. T. (2009). "The effect of heating rate on escherichia coli metabolism, physiological stress, transcriptional response, and production of temperature-induced recombinant protein: a scale-down study." *Biotechnology and Bioengineering*, **102**(2), 468–482.
- Caspeta, L., Lara, A. R., Pérez, N. O., Flores, N., Bolívar, F., & Ramírez, O. T. (2013). "Enhancing thermo-induced recombinant protein production in escherichia coli by temperature oscillations and post-induction nutrient feeding strategies." *Journal of Biotechnology*, **167**(1), 47–55.
- Chou, C. H., Aristidou, a a, Meng, S. Y., Bennett, G. N., & San, K. Y. (1995). "Characterization of a ph-inducible promoter system for high-level expression of recombinant proteins in escherichia coli." *Biotechnology and Bioengineering*, **47**(2), 186–192.
- Dodd, I. B., Shearwin, K. E., & Egan, J. B. (2005). "Revisited gene regulation in bacteriophage lambda." *Current Opinion in Genetics & Development*, **15**(2), 145–152.
- Donovan, R. S., Robinson, C. W., & Click, B. R. (1996). "Review: optimizing inducer and culture conditions for expression of foreign proteins under the control of the lac promoter". *Journal of Industrial Microbiology*, **16**, 145–154.
- Elowitz, M. B., & Leibler, S. (2000). "A synthetic oscillatory network of transcriptional regulators." *Nature*, **403**(6767), 335–338.
- Gardner, T., Cantor, C., & Collins, J. (2000). "Construction of a genetic toggle switch in escherichia coli". *Nature*, **403**(6767), 339–342.
- Ghosh, P., Pannunzio, N. R., & Hatfull, G. F. (2005). "Synapsis in phage bxb1 integration: selection mechanism for the correct pair of recombination sites." *Journal of Molecular Biology*, **349**(2), 331–348.
- Grindley, N. D. F., Whiteson, K. L., & Rice, P. A. (2006). "Mechanisms of site-specific

- recombination*". *Annual Review of Biochemistry*, **75(1)**, 567–605.
- Hecht, M. H., Sturtevant, J. M., & Sauer, R. T. (1984). "Effect of single amino acid replacements on the thermal stability of the NH₂-terminal domain of phage λ repressor". *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **81(September)**, 5685–5689.
- Huang, C.-J., Lin, H., & Yang, X. (2012). "Industrial production of recombinant therapeutics in escherichia coli and its recent advancements." *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **39(3)**, 383–399.
- iGEM foundation. (2004). "Registry of standard biological parts". sitio web: parts.igem.org. Consultado en enero 2016.
- Jajesniak, P., & Seng Wong, T. (2015). "From genetic circuits to industrial-scale biomanufacturing: bacterial promoters as a cornerstone of biotechnology". *AIMS Bioengineering*, **2(3)**, 277–296.
- Jechlinger, W., Glocker, J., Haidinger, W., Matis, A., Szostak, M. P., & Lubitz, W. (2005). "Modulation of gene expression by promoter mutants of the lambda_{ci}857/prm/pr system." *Journal of Biotechnology*, **116(1)**, 11–20.
- Jiang, X., Zhang, H., Yang, J., Liu, M., Feng, H., Liu, X., Cao Y., Feng D., Xian, M. (2013). "Induction of gene expression in bacteria at optimal growth temperatures." *Applied Microbiology and Biotechnology*, **97(12)**, 5423–5431.
- Karzai, a W., Roche, E. D., & Sauer, R. T. (2000). "The ssra-smpb system for protein tagging, directed degradation and ribosome rescue." *Nature Structural Biology*, **7(6)**, 449–455.
- Keiler, K. C. (2008). "Biology of trans-translation." *Annual Review of Microbiology*, **62(1)**, 133–151.
- Khalil, A. S., & Collins, J. J. (2010). "Synthetic biology: applications come of age." *Nature Reviews. Genetics*, **11(5)**, 367–379.

- Knight, T. (2003). "Idempotent vector design for standard assembly of biobricks standard biobrick sequence interface". *MIT Artificial Intelligence Laboratory; MIT Synthetic Biology Working Group*, 1–11.
- Langer, E. S. (2012). "Biomanufacturing outsourcing outlook". *BioPharm International*, **25(2)**, 15–16.
- Lieb, M. (1981). "A fine structure map of spontaneous and induced mutations in the lambda repressor gene, including insertions of is elements." *Molecular & General Genetics : MGG*, **184(3)**, 364–371.
- Little, J. W., & Mount, D. W. (1982). "The sos regulatory system of *escherichia coli*". *Cell*, **29(1)**, 11–22.
- Makrides, S. C. (1996). "Strategies for achieving high-level expression of genes in *escherichia coli*". *Microbiological Reviews*, **60(3)**, 512–538.
- Maurizi, M. R. (1992). "Proteases and protein degradation in *escherichia coli*." *Experientia*, **48(2)**, 178–201.
- Narberhaus, F., Waldminghaus, T., & Chowdhury, S. (2006). "Rna thermometers." *FEMS Microbiology Reviews*, **30(1)**, 3–16.
- Nauta, A., van den Burg, B., Karsens, H., Venema, G., & Kok, J. (1997). "Design of thermolabile bacteriophage repressor mutants by comparative molecular modeling." *Nature Biotechnology*, **15(10)**, 980–983.
- Neubauer, P., & Winter, J. (2003). *Methods in molecular biology: E. coli gene expression protocols*. (P. E. Vaillancourt, Ed.) (1ra ed., Vol. 205). Humana Press.
- Overton, T. W. (2013). "Recombinant protein production in bacterial hosts." *Drug Discovery Today*, **19(5)**, 590–601.

- Palomares, L. A., Estrada-Mondaca, S., & Ramírez, O. T. (2004). "Production of recombinant proteins: challenges and solutions." *Methods In Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, **267**, 15–52.
- Ptashne, M. (2004). *A genetic switch* (3rd ed.). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Ptashne, M. (2006). "Lambda's switch: lessons from a module swap". *Current Biology*, **16(12)**, R459–R462.
- Quinn, J. Y., Cox, R. S., Adler, A., Beal, J., Bhatia, S., Cai, Y., Chen J., Clancy K., Galdzicki M., Hillson N. J., Le Novère N., Maheshwari A. J., Mclaughlin J. A., Myers C. J., Umesh P., Pocock M., Rodríguez C., Soldatova L., Stan G. B., Swainston N., Wipat A., Sauro, H. M. (2015). "Sbol visual: a graphical language for genetic designs". *PLoS Biology*, **13(12)**, 1–9.
- Roberts, J. W., & Roberts, C. W. (1975). "Proteolytic cleavage of bacteriophage lambda repressor in induction", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **72(1)**, 147–151.
- Schmidt, F. R. (2004). "Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry." *Applied Microbiology and Biotechnology*, **65(4)**, 363–372.
- Seeger, A., Schneppe, B., McCarthy, J. E. G., Deckwer, W.-D., & Rinas, U. (1995). "Comparison of temperature- and isopropyl- β -d-thiogalacto-pyranoside-induced synthesis of basic fibroblast growth factor in high-cell-density cultures of recombinant escherichia coli". *Enzyme and Microbial Technology*, **17(10)**, 947–953.
- Singh, S., Ghosh, P., & Hatfull, G. F. (2013). "Attachment site selection and identity in bxb1 serine integrase-mediated site-specific recombination." *PLoS Genetics*, **9(5)**, 1–14.
- Spadiut, O., Capone, S., Krainer, F., Glieder, A., & Herwig, C. (2014). "Microbials for the production of monoclonal antibodies and antibody fragments." *Trends in Biotechnology*, **32(1)**, 54–60.
- Stricker, J., Cookson, S., Bennett, M. R., Mather, W. H., Tsimring, L. S., & Hasty, J. (2008). "A

- fast, robust and tunable synthetic gene oscillator”. *Nature*, **456(7221)**, 516–519.
- Terpe, K. (2006). “Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems.” *Applied Microbiology and Biotechnology*, **72(2)**, 211–222.
- Tolentino, G. J., Meng, S.-Y., Bennett, G. N., & San, K.-Y. (1992). *Biotechnology Letters*.
- Valdez-Cruz, N. a, Caspeta, L., Pérez, N. O., Ramírez, O. T., & Trujillo-Roldán, M. A. (2010). “Production of recombinant proteins in e. coli by the heat inducible expression system based on the phage lambda pl and/or pr promoters.” *Microbial Cell Factories*, **9(18)**, 1–16.
- Valdez-Cruz, N. a, Ramírez, O. T., & Trujillo-Roldán, M. a. (2011). “Molecular responses of escherichia coli caused by heat stress and recombinant protein production during temperature induction.” *Bioengineered Bugs*, **2(2)**, 105–110.
- Villaverde, A., Benito, A., Viaplana, E., & Cubarsi, R. (1993). “Fine regulation of ci857-controlled gene expression in continuous culture of recombinant escherichia coli by temperature”. *Applied and Environmental Microbiology*, **59(10)**, 3485–3487.
- Walsh, G. (2014). “Biopharmaceutical benchmarks 2014”. *Nature Biotechnology*, **32(10)**, 992–1002.
- Wang, Y., Yau, Y.-Y., Perkins-Balding, D., & Thomson, J. G. (2011). “Recombinase technology: applications and possibilities.” *Plant Cell Reports*, **30(3)**, 267–285.
- Wanner, B. L. (1993). “Gene regulation by phosphate in enteric bacteria”. *Journal of Cellular Biochemistry*, **51(1)**, 47–54.
- Xie, Z., Wroblewska, L., Prochazka, L., Weiss, R., & Benenson, Y. (2011). “Multi-input rnaï-based logic circuit for identification of specific cancer cells”. *Science*, **333(6047)**, 1307–1311.
- Yamamori, T., & Yura, T. (1980). “Temperature-induced synthesis of specific proteins in

escherichia coli : evidence for transcriptional control". *Journal of Bacteriology*, **142(3)**, 843–851.

13. Anexos

a. Anexo I: secuencias de las biopartes utilizadas

Bioparte	Secuencia (5'-3')
R0051	TAACACCGTGCGTGTTGACTATTTTACCTCTGGCGGTGATAATGGTTGC
B0034	AAAGAGGAGAAA
E1010	ATGGCTTCCTCCGAAGACGTTATCAAAGAGTTCATGCGTTTCAAAGTTCGTATG GAAGGTTCCGTTAACGGTCACGAGTTCGAAATCGAAGGTGAAGGTGAAGGTCCG TCCGTACGAAGGTACCCAGACCGCTAAACTGAAAGTTACCAAAGGTGGTCCGC TGCCGTTTCGTTGGGACATCCTGTCCCCGCAGTTCAGTACGGTTCCAAAGCTT ACGTTAAACACCCGGCTGACATCCCGGACTACCTGAAACTGTCCTTCCCGGAA GGTTTCAAATGGGAACGTGTTATGAACTTCGAAGACGGTGGTGTGTTACCGTT ACCCAGGACTCCTCCCTGCAAGACGGTGAAGTTCATCTACAAAGTTAAACTGCG TGGTACCAACTTCCCGTCCGACGGTCCGGTTATGCAGAAAAAACCATGGGTT GGGAAGCTTCCACCGAACGTATGTACCCGGAAGACGGTGTCTGAAAGGTGAA ATCAAATGCGTCTGAAACTGAAAGACGGTGGTCACTACGACGCTGAAGTTAA AACCACCTACATGGCTAAAAAACCGGTTACAGCTGCCGGGTGCTTACAAAACCG ACATCAAAGTGGACATCACCTCCACAACGAAGACTACACCATCGTTGAACAG TACGAACGTGCTGAAGGTGCTCACTCCACCGGTGCTTAATAACGCTGATAGTG CTAGTGTAGATCGC
B0010	CCAGGCATCAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCCTTTCGTTTT ATCTGTTGTTTGTTCGGTGAACGCTCTC
B0012	TCACACTGGCTCACCTTCGGGTGGGCCTTCTGCGTTTATA
CI857	ATGAGCACAAAAAAGAAACCATTAACACAAGAGCAGCTTGAGGACGCACGTC GCCTTAAAGCAATTTATGAAAAAAGAAAAATGAACTTGGCTTATCCAGGAA TCTGTGCGCAGACAAGATGGGGATGGGGCAGTCAGGCGTTGGTGTCTTATTTAA TGGCATCAATGCATTAATGCTTATAACGCCGCATTGCTTACAAAAATTCTCAA AGTTAGCGTTGAAGAATTTAGCCCTTCAATCGCCAGAGAAATCTACGAGATGT ATGAAGCGGTTAGTATGCAGCCGTCACCTAGAAGTGAGTATGAGTACCCTGTT TTTTCTCATGTTTCAGGCAGGGATGTTCTCACCTAAGCTTAGAACCTTACCAA GGTGTATGCGGAGAGATGGGTAAGCACAACCAAAAAAGCCAGTGATTCTGCATT CTGGCTTGAGGTTGAAGGTAATTCCATGACCGCACCAACAGGCTCCAAGCCAA GCTTTCCTGACGGAATGTTAATTCTCGTTGACCCTGAGCAGGCTGTTGAGCCAG GTGATTTCTGCATAGCCAGACTTGGGGGTGATGAGTTTACCTTCAAGAACTG ATCAG
GP35 BxB1	CGCGCTTATGGGAACGGTGGCGCAGATGGAATTAGAAGCGATCAAAGAGCGG AACCGTTCGGCTGCGCATTTCAATATCCGCGCCGGAAATACCGAGGATCCCT GCCCGCGTGGGGATACCTGCCTACGCGCGTGGACGGGGAGTGGCGGCTGGTGC CGGACCCTGTGCAGCGAGAGCGCATCCTCGAGGTGTATCACCGCGTCGTCGAC AACCACGAGCCGCTGCACCTGGTGGCCACGACCTGAACCGGCGTGGTGTCTCT GTCGCCGAAGGACTACTTCGCGCAGCTGCAAGGCCGCGAGCCGCAGGGCCGG GAGTGGTTCGGCTACCGCGCTGAAGCGATCGATGATCTCCGAGGCGATGCTCGG GTACGCGACTCTGAACGGTAAGACCGTCCGAGACGACGACGGAGCCCCGCTGG TGCGGGCTGAGCCGATCCTGACCCGTGAGCAGCTGGAGGCGCTGCGCGCCGAG CTCGTGAAGACCTCCCGGGCGAAGCCCGCGGTGTCTACCCCGTCTGCTGCTGCT GCGGGTGTGTTCTGCGCGGTGTGCGGGGAGCCCGCGTACAAGTTCGCCGGGG GAGGACGTAAGCACCCGCGCTACCGCTGCCGCTCGATGGGGTTCGGAAGCAC TGCGGGAACGGCACGGTGGCGATGGCCGAGTGGGACGCGTCTGCGAGGAGC AGGTGCTGGATCTGCTCGGGGACGCGGAGCGTCTGGAGAAAGTCTGGGTAGCC GGCTCGGACTCCGCGGTGCAACTCGCGGAGGTGAACGCGGAGCTGGTGGACCT GACGTCGCTGATCGGCTCCCCGGCCTACCGGGCCGGCTCTCCGACGCGAGAAG CACTGGATGCCCCGTTGCGGGCGCTGGCCGCGCGGCAAGAGGAGCTGGAGGGC CTAGAGGCTCGCCCGTCTGGCTGGGAGTGGCGCGAGACCGGGCAGCGGTTCCGG

	GGACTGGTGGCGGGAGCAGGACACCGCGGCAAAGAACACCTGGCTTCGGTGC ATGAACGTTTCGGCTGACGTTTCGACGTCCGCGGGCGGGCTGACTCGCACGATCGA CTTCGGGGATCTGCAAGAGTACGAGCAGCATCTCAGGCTCGGCAGCGTGGTGC AACGGCTACACACCGGGATGTCGTAG
B1006	AAAAAAAAACCCCGCCTGTCAGGGGCGGGGTTTTTTTTT
ATTB	TCGGCCGGCTTGTGACGACGGCGGTCTCCGTCGTCAGGATCATCCGGGC
AATP	GTCGTGGTTTTGTCTGGTCAACCACCGCGGTCTCAGTGGTGTACGGTACAAACCC CGAC
C0040	ATGTCCAGATTAGATAAAAAGTAAAGTGATTAACAGCGCATTAGAGCTGCTTAA TGAGGTCGGAATCGAAGGTTTAAACAACCCGTAAACTCGCCAGAAGCTAGGTG TAGAGCAGCCTACATTGTATTGGCATGTAAAAAATAAGCGGGCTTTGCTCGAC GCCTTAGCCATTGAGATGTTAGATAGGCACCATACTCACTTTTGCCTTTAGAA GGGAAAGCTGGCAAGATTTTTTACGTAATAACGCTAAAAGTTTTAGATGTGC TTTACTAAGTCATCGCGATGGAGCAAAAGTACATTTAGGTACACGGCCTACAG AAAAACAGTATGAACTCTCGAAAATCAATTAGCCTTTTTATGCCAACAAGGT TTTTACTAGAGAATGCATTATATGACTCAGCGCTGTGGGGCATTTTACTTTA GGTTGCGTATTGGAAGATCAAGAGCATCAAGTCGCTAAAGAAGAAAGGGAAA CACCTACTACTGATAGTATGCCGCCATTATTACGACAAGCTATCGAATTATTTG ATCACCAGGTGCAGAGCCAGCCTTCTTATTCGGCCTTGAATTGATCATATGCG GATTAGAAAAACAACCTTAAATGTGAAAGTGGG
R0040	TCCCTATCAGTGATAGAGATTGACATCCCTATCAGTGATAGAGATACTGAGCA C
cl ⁸⁵⁷	ATGAGCACAAAAAAGAAACCATTAACACAAGAGCAGCTTGAGGACGCACGTC GCCTTAAAGCAATTTATGAAAAAAGAAAAATGAACTTGGCTTATCCCAGGAA TCTGTGCGAGACAAGATGGGGATGGGGCAGTCAGGCGTTGGTGTCTTATTTAA TGGCATCAATGCATTAATGCTTATAACGCCGCATTGCTTACAAAAATTCTCAA AGTTAGCGTTGAAGAATTTAGCCCTTCAATCGCCAGAGAAATCTACGAGATGT ATGAAGCGTTAGTATGCAGCCGTCACCTAGAAGTGAGTATGAGTACCCTGTT TTTTCTCATGTTACAGGCAGGGATGTTCTCACCTAAGCTTAGAACCTTTACCAA GGTATGCGGAGAGATGGGTAAGCACAAACAAAAAAGCCAGTGATTCTGCATT CTGGCTTGAGGTTGAAGGTAATTCCATGACCGCACCAACAGGCTCCAAGCCAA GCTTTCTGACGGAATGTTAATTCTCGTTGACCCTGAGCAGGCTGTTGAGCCAG GTGATTTCTGCATAGCCAGACTTGGGGGTGATGAGTTTACCTTCAAGAACTG ATCAGGGATAGCGGTCAGGTGTTTTTACAACCACTAAACCCACAGTACCCAAT GATCCCATGCAATGAGAGTTGTTCCGTTGTGGGGAAAGTTATCGCTAGTCAGT GGCCTGAAGAGACGTTTGGC
K907000	ATGAGAGCCCTGGTAGTCATCCGCCTGTCCCAGTCACCGATGCTACGACTTCA CCGGAGCGTCAGCTGGAGTCTTGCCAGCAGCTCTGCGCCCAGCGCGGCTGGGA CGTCGTCGGGGTAGCGGAGGATCTGGACGTCTCCGGGGCGGTGCATCCGTTTCG ACCGGAAGCGCAGACCGAACCTGGCCCGGTGGCTAGCGTTCGAGGAGCAACC GTTTCGACGTGATCGTGGCGTACCGGGTAGACCGGTTGACCCGATCGATCCGGC ATCTGCAACAGCTGGTCCACTGGGCCGAGGACCACAAGAAGCTGGTCGTCTCC GCGACCGAAGCGCACTTCGATACGACGACGCCGTTTTCGGCGGGTTCGTCATCGC GCTTATGGGAACGGTGGCGCAGATGGAATTAGAAGCGATCAAAGAGCGGAAC CGTTCCGGCTGCGCATTTCATATCCGCGCCGGGAAATACCGAGGATCCCTGCC GCCGTGGGGATACCTGCCTACGCGGTGGACGGGGAGTGGCGGCTGGTGGCCG ACCCTGTGCAGCGAGAGCGCATCTCGAGGTGTATACCGCGTCGTCGACAAC CACGAGCCGCTGCACCTGGTGGCCACGACCTGAACCGGCGTGGTGTCTCTGTC GCCGAAGGACTACTTCGCGCAGCTGCAAGGCCGCGAGCCGCAGGGCCGGGAG TGGTCCGGTACCGCGCTGAAGCGATCGATGATCTCCGAGGCGATGCTCGGGTA CGCGACTCTGAACGGTAAGACCGTCCGAGACGACGACGGAGCCCCGCTGGTGC GGGCTGAGCCGATCCTGACCCGTGAGCAGCTGGAGGCGCTGCGCGCCGAGCTC GTGAAGACCTCCCGGGCGAAGCCCGCGGTGTCTACCCCGTCGCTGCTGCTGCG GGTGTGTTCTGCGCGGTGTGCGGGGAGCCCGCGTACAAGTTCGCCGGGGGAG GACGTAAGCACCCGCGCTACCGCTGCCGCTCGATGGGGTTCCCGAAGCACTGC

	GGGAACGGCACGGTGGCGATGGCCGAGTGGGACGCGTTCTGCGAGGAGCAGG TGCTGGATCTGCTCGGGGACGCGGAGCGTCTGGAGAAAGTCTGGGTAGCCGGC TCGGACTCCGCGGTCTGAACCTCGCGGAGGTGAACGCGGAGCTGGTGGACCTGAC GTCGCTGATCGGCTCCCCGGCCTACCGGGCCGGCTCTCCGCAGCGAGAAGCAC TGGATGCCCCTATTGCGGGCTGGCCGCGCGCAAGAGGAGCTGGAGGGCCTA GAGGCTCGCCCGTCTGGCTGGGAGTGGCGGAGACCGGGCAGCGGTTCCGGGG ACTGGTGGCGGGAGCAGGACACCGCGGCAAAGAACACCTGGCTTCGGTCGAT GAACGTTCCGGCTGACGTTTCGACGTCCGCGGGCGGGCTGACTCGCACGATCGACT TCGGGGATCTGCAAGAGTACGAGCAGCATCTCAGGCTCGGCAGCGTGGTCGAA CGGCTACACACCGGGATGTCGTAG
B0011	AGAGAATATAAAAAGCCAGATTATTAATCCGGCTTTTTTATTATTT
LAA	GCTGCTAACGACGAAAACCTACGCTCTGGCTGCT
ATTB	GGCCGGCTTGTCGACGACGGCGGTCTCCGTCGTCAGGATCATCCGG
ATTP	GTGGTTTGTCTGGTCAACCACCGCGGTCTCAGTGGTGTACGGTACAAACCCA
J23100	TTGACGGCTAGCTCAGTCCTAGGTACAGTGCTAGC