



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

IMPLEMENTACIÓN DE UN NUEVO MÉTODO PARA LA
INTEGRACIÓN CROMOSÓMICA MÚLTIPLE Y
SUCESIVA DE ELEMENTOS GENÉTICOS: UN
ENFOQUE PARA LA CREACIÓN DE CIRCUITOS
EPIGENÉTICOS EN BIOLOGÍA SINTÉTICA.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A :

MARÍA DEL CARMEN SÁNCHEZ OLMOS

TUTOR

DR. ENRIQUE MERINO PÉREZ

CIUDAD UNIVERSITARIA, Cd. Mx., 2020





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.

A mi padre y madre por enseñarme que la vida es una gran aventura y que la lucha constante de la misma, reside en construir, imaginar, soñar y pensar en un ideal, aquel ideal que lleve dentro de sí, la esperanza de un cambio en nuestro tiempo y sirva de inspiración para los que vendrán.

Agradecimientos

Un especial agradecimiento a Raúl Noguez Moreno, por guiarme y enseñarme pacientemente cada una de las cosas en el ámbito técnico que hicieron posible la realización de este proyecto. Además de haberse convertido en un muy querido e invaluable amigo mío.

A mi tutor Enrique Merino Pérez, por haberme abierto las puertas de su laboratorio, por la paciencia, ayuda, cuidado y comprensión. Por insistir cada día de mi estancia en su laboratorio, a desarrollar habilidades que me permitan ser una científica de calidad.

A María Luisa Tabche, por toda la ayuda y soporte técnico que permitieron el avance de este proyecto.

A Valerie de Anda Torres por ser la primera persona dentro del campo científico en confiar en mí, en inspirarme a ser una científica con convicciones de cambio y por ser una gran amiga y maestra.

A Natali Morales por sus consejos técnicos para la realización de este proyecto.

A mi grupo de laboratorio.

Al Dr. José Luis Puente por todo el apoyo durante mi estancia en el IBt y hacer posible la realización de este proyecto.

A la UNAM por darme la oportunidad de formarme como profesional.

A mi hermano.

A Ricardo Farrera por todo el cariño, amor y cuidado.

Índice general

Agradecimientos	II
1. Resumen	1
2. Introducción	2
2.1. Biología Sintética	2
2.2. Construcción de circuitos sintéticos: Técnicas para el ensamble de regiones génicas.	4
2.3. Herramientas y elementos utilizados para la construcción de circuitos en Biología Sintética.	10
2.4. Reguladores transcripcionales: TetR y LacI	13
2.5. Sistemas de contraselección	15
2.6. Regulación genética a nivel transcripcional mediada por la interacción de RNAs polimerasas.	17
2.7. Sistema de recombinación cromosómica mediada por las recombinasas del fago lambda-red.	19
3. Justificación	22
4. Hipótesis	23
5. Objetivo general	24
5.1. Objetivos específicos	24
6. Estrategia Experimental	25

7. Resultados y Discusión	28
7.1. Construcción del módulo para integración	30
7.1.1. Extracción de DNA plasmídico para la obtención del vector pQEWT-N4-R5-YRNRV:	30
7.1.2. Extensión por PCR de los promotores que flanquean el gen de resistencia a cloranfenicol y extensión por PCR de los sitios de reconocimiento para la recombinación.	30
7.1.3. Clonación en el vector TA	31
7.1.4. Confirmación del tamaño y calidad de la construcción por restricción y secuenciación de DNA	32
7.1.5. PCR vuelta del Zero Blunt TM con la construcción completa para mutagénesis: mutaciones en las cajas -35 y -10.	34
7.1.6. PCR vuelta del Zero Blunt TM con la construcción completa para mutagénesis: mutaciones para añadir bases entre las cajas del promotor	36
7.1.7. Confirmación por secuenciación de la inserción de la mutación.	36
7.1.8. Concentración del producto de PCR	37
7.2. Prueba del funcionamiento del sistema de integración	38
7.2.1. Amplificación del represor de tetraciclina	38
7.2.2. Integración cromosómica de la construcción completa por el método de recombinación de Dansenko-Wanner.	38
7.3. Construcción de un plásmido con las recombinasas del fago lambda bajo un promotor inducible pLac.	43
7.3.1. Amplificación de las recombinasas del vector PKD46 y adición de Shine-Dalgarno.	44
7.3.2. Clonación de las recombinasas en el vector ZERO-Blunt.	45
7.3.3. Confirmación por restricción de la presencia de las recombinasas y de su orientación.	45
8. Conclusiones	46

9. Perspectivas	48
10. Anexo 1: Secuencias de Oligonucleótidos utilizados	50
11. Anexo 2: Plásmidos & Cepas utilizadas	52
11.0.1. Plásmidos	53
12. Anexo 3: Almacenamiento de cepas en glicerol	56
13. Anexo 4: Extracción de DNA con el uso de Fenol.	57
13.0.1. Equilibración de fenol:	57
13.0.2. Extracción con cloroformo:fenol:alcohol isoamílico.	58
14. Anexo 5: Protocolo Recombinación Dansenko-Wanner:	59
14.0.1. Preparación del inserto a recombinar:	59
14.0.2. Dansenko-Wanner:	59
14.0.3. Electroporación:	60
14.1. Modificaciones al protocolo convencional de integración Dansenko & Wannner	60
15. Anexo 7: Reacciones de amplificación por PCR	62
16. Anexo 8: Soluciones y Medios	67

Capítulo 1

Resumen

El campo de la Biología Sintética, tiene como uno de sus propósitos primordiales la construcción de sistemas sintéticos, ensamblando de manera múltiple y sucesiva cada uno de sus elementos, esto ha dado lugar, al desarrollo de una serie de protocolos estandarizados, dentro del campo de la Biología Molecular. Entre los protocolos más recurridos, se encuentran la restricción, ligación y clonación, el uso de ciclos sucesivos de amplificación de elementos génicos, por medio de PCR (Polimerase Chain Reaction) sobrelapado y su subsecuente integración por recombinación en el cromosoma. El objetivo del presente trabajo, consiste en permitir la integración de los elementos constituyentes de sistemas sintéticos de manera eficiente, al eliminar algunas de las restricciones más notorias de las técnicas actuales de ensamble de elementos de DNA.

La creación del sistema permitió hipotetizar la existencia de posibles eventos de interferencia transcripcional, como oclusión o *sitting duck* (baja acumulación de intermediarios en el inicio de la transcripción), los cuales previenen el silenciamiento del gen de resistencia al evitar la formación de RNA's antisentido, o que se de la colisión de RNA polimerasas, eliminando la capacidad del sistema de seleccionar por ausencia del gen de resistencia

Capítulo 2

Introducción

2.1. Biología Sintética

La elucidación del operón *lac* como circuito regulatorio de la respuesta celular ante estímulos ambientales, por Francis Jacob y Jacques Monod en 1961, aunado al desarrollo de técnicas en el campo de la Biología Molecular y más tarde, el surgimiento de las nuevas tecnologías de última generación para secuenciación de DNA y análisis cuantitativo de RNA, proteínas, lípidos y metabolitos, permitieron establecer una nueva área, la Biología de Sistemas. La cual combina la biología experimental y las tecnologías computacionales para crear, comprender y diseñar redes regulatorias en sistemas biológicos que modifiquen de manera progresiva los procesos intrínsecos de las células, como la diferenciación, señalización, división celular, entre otras. La modificación del comportamiento celular, marcó el comienzo para la generación de una célula "programable" con la finalidad de enriquecer campos biotecnológicos y médicos. Alrededor de los años 2000-2008, se crearon una gran cantidad de circuitos sintéticos, como los llamados *toggle switch*, *repressilator* (ambos construidos por el mismo grupo de elementos; es decir, promotores inducibles) y *oscillator*, además de circuitos basados en *quorum sensing* y aquellos construidos con lógica booleana en *Escherichia coli* (1).

La importancia de la construcción de estos circuitos sintéticos de manera exitosa, radica en que el uso de metodologías basadas en ingeniería, permite la construcción

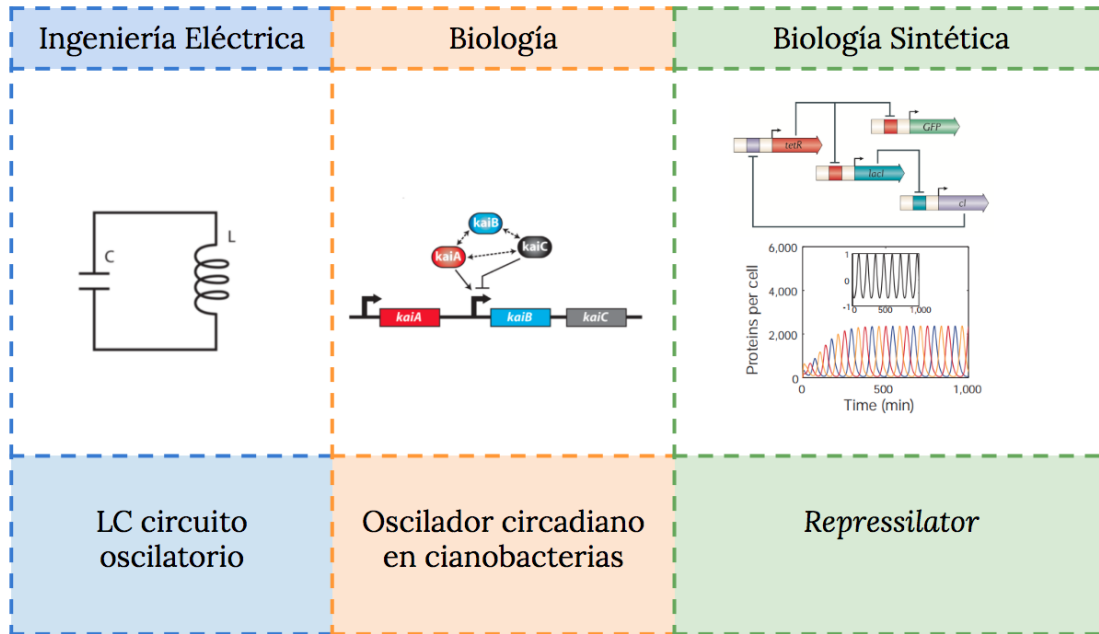


Figura 2.1: Relación entre la Ingeniería eléctrica, biología y biología sintética en la construcción de sistemas o circuitos sintéticos. Modificada de Khalil S. A y Collins J.J., 2010.

de sistemas biológicos con un comportamiento fácilmente programable. Además, es fundamental en la construcción de sistemas biológicos sintéticos resaltar la extrapolación y conjunción existente entre disciplinas como la electrónica. Por ejemplo, la construcción de *oscillators* en el área electrónica sirve para el cronometraje de tiempo, como es el caso de circuitos osciladores de tipo LC (L-inductor, C-capacitor), que generan señales electrónicas de manera periódica. El análogo biológico se encuentra representado por el reloj biológico (ritmos circadianos) en cianobacterias, el cual sincroniza procesos como la fotosíntesis y la fijación de nitrógeno. Tomando como base ambos sistemas, en el área sintética, la construcción del circuito nombrado *repressilator*, hace uso de represores para generar un asa de retroalimentación negativa en donde el primer promotor guía la expresión del segundo y así sucesivamente, de forma que la expresión genética es oscilatoria o periódica, como se esquematiza en la figura 2.1 (2).

La reprogramación de las redes de regulación genética, tanto en eucariontes como en bacterias ha permitido el desarrollo de múltiples aplicaciones biotecnológicas, co-

mo la producción de bioquímicos, biodiesel, artemisina e incluso en el campo médico, como es la creación de biosensores que detectan células cancerosas para su subsecuente eliminación. De tal forma que, el tener conocimiento de las redes de regulación genética y el comportamiento celular permiten acoplar la programación de dichas redes de regulación para crear arquitecturas que cumplan con los objetivos o tareas satisfactoriamente. (3-5).

2.2. Construcción de circuitos sintéticos: Técnicas para el ensamble de regiones génicas.

Como anteriormente se mencionó, uno de los objetivos de la Biología Sintética es comprender a profundidad el funcionamiento de los sistemas naturales, con la finalidad de reconectar y rediseñar cada uno de los componentes del sistema sintético, sin olvidar, que la célula se encuentra en un sistema dinámico, en el que se debe considerar las implicaciones del contexto genético. De tal forma, que el sistema sintético finalizado tenga modularidad, esto significa, que cada una de las partes debe funcionar independientemente de las otras sin afectarse mutuamente (6, 7).

Para solucionar el problema del contexto genético en el diseño de sistemas sintéticos, muchas veces se recurre al aislamiento de cada una de las partes para que este no afecte las funciones del propio sistema. Por ejemplo, el aislamiento de la región de unión al ribosoma de la secuencia 5'UTR, puede incrementar la expresión de la proteína codificante (8).

De igual trascendencia en el diseño de circuitos sintéticos, existe la sobrecarga en el funcionamiento de un sistema. Esto hace referencia a la existencia de múltiples sitios de respuesta a un factor de transcripción. Por ejemplo, la existencia de un gran número de operadores de un promotor, puede disminuir la tasa de reacción de la expresión del gen. Por consiguiente, para la modificación de arquitecturas en las redes regulatorias, se deben considerar ciertos parámetros, como son el número de sitios de unión a un factor de transcripción, su localización, su afinidad de unión y la concentración del

factor de transcripción

Como Brewster y colaboradores (2014) demuestran, existe una relación entre el número de sitios de unión a un determinado factor de transcripción y la tasa de decaimiento de éste. Es decir, la tasa de decaimiento del factor de transcripción es lineal cuando el sitio de unión se encuentra en monocopia en el cromosoma; mientras que, si hay múltiples sitios, el decaimiento experimenta un alentamiento antes de disminuir linealmente (Figura 2.3). Esta observación es de fundamental importancia en la construcción de circuitos sintéticos, pues el reducir la competencia de unión para un factor de transcripción derivada de la existencia de múltiples sitios de unión, que además pueden tener distintas constantes de afinidad, aumenta la robustez y control del sistema (7).

En resumen, para el diseño y construcción de sistemas sintéticos se deben considerar factores como la propia arquitectura del DNA (posición y energía de unión a secuencias regulatorias o promotoras) y la concentración de las moléculas actuantes en el sistema, ya que fluctuaciones en las concentraciones de factores de transcripción, inductores, etc., (figura 2.2) afectan directamente la respuesta biológica, reflejada en el fenotipo esperado.(9).

La construcción física, el diseño cuantitativo y/o medición cuantitativa de metabolitos (inductores y respuesta), son aspectos en el diseño de sistemas sintéticos, que derivan en la estandarización del uso de elementos genéticos para su generación y jerarquización. Sin embargo, la construcción de sistemas sintéticos tiene una serie de dificultades, sobre todo cuando se requiere incrementar la complejidad del circuito y la incorporación de elementos se convierte en un obstáculo. El surgimiento de métodos de optimización de ensamble ha permitido no sólo aumentar la complejidad de los sistemas diseñados, sino también generar procesos eficaces para el ensamble de múltiples partes, ejemplos de esto son las técnicas de BioBrick, Gibson y Golden Gate (10-12).

Es importante mencionar la existencia de una elección diferencial entre las técnicas para la construcción de circuitos regulatorios dentro del campo de la Biología Sintética, siendo los de primera elección Gibson assembly (13), Golden Gate y la reac-

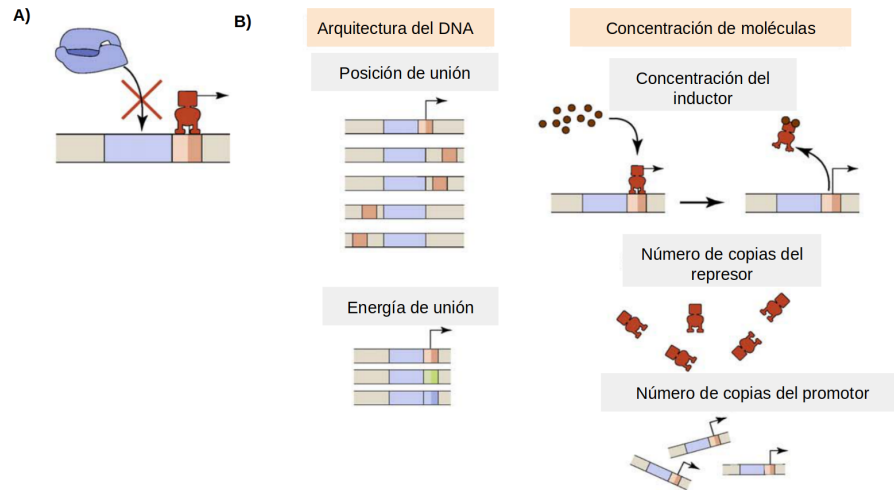


Figura 2.2: Parámetros clave a considerar durante la construcción de sistemas sintéticos. A. Representa la afinidad de la RNA polimerasa (azul) a su sitio de unión y la afinidad de un factor de transcripción (rojo) a su correspondiente sitio de unión. B. Factores que afectan el funcionamiento de un sistema sintético. 1. La arquitectura del DNA y 2. la concentración de moléculas como factores de transcripción (rojo), inductores o regiones regulatorias (promotores). Modificada de García. *et.al*, 2010. *et.al*, 2010.(9).

ción de ligasa cíclica. Sin embargo, se han creado una serie de técnicas estandarizadas como la clonación modular, Golden Braid y el ensamble a través de solapamiento de módulos con linkers (MODAL, por sus siglas en inglés). Cada uno de estos sistemas muestran ventajas y desventajas al contrastarlos entre sí (para una mejor comparación y definición de las técnicas, ver cuadro 2.1).

De manera general, aquellas estrategias que implican el uso de enzimas de restricción y subsecuente ligación presentan la ventaja de un ensamble jerarquizado de elementos, sin el uso de PCR. Sin embargo, las secuencias remanentes de las restricciones estorban para la siguiente integración de algún otro elemento genético, lo que limita el ensamble múltiple.

El solapamiento de elementos, es otro tipo de técnica que permite clonar de manera simultánea múltiples elementos de DNA, pero dañando la integridad del mismo, además de la dificultad de mantener la orientación correcta de cada parte. Por último, la ligación cíclica de DNA se sirve de los mecanismos naturales de la célula para integrar en el cromosoma, por lo que no presenta remanentes de secuencias de corte,

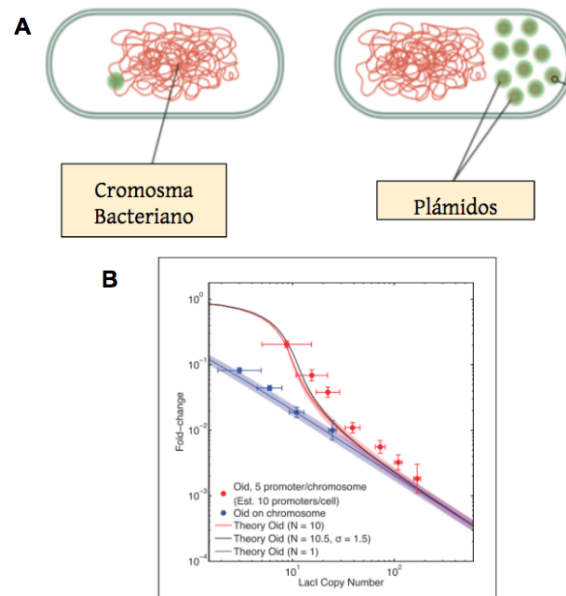


Figura 2.3: Relación entre el número de copias de una secuencia de unión a un determinado factor de transcripción y la tasa de decaimiento del factor de transcripción. A. Dos escenarios con diferente número de copias de una secuencia regulatoria. En el panel de la izquierda se ilustra un sistema con una copia única en el cromosoma y en el de la derecha, uno con múltiples copias localizadas en plásmidos. B. Gráfica de la tasa de decaimiento del factor de transcripción en relación con el número de copias de su secuencia blanco. Línea roja: cinco copias del promotor por célula, línea azul: una copia del promotor por célula. Modificado de Brewster *et al.*, 2014.

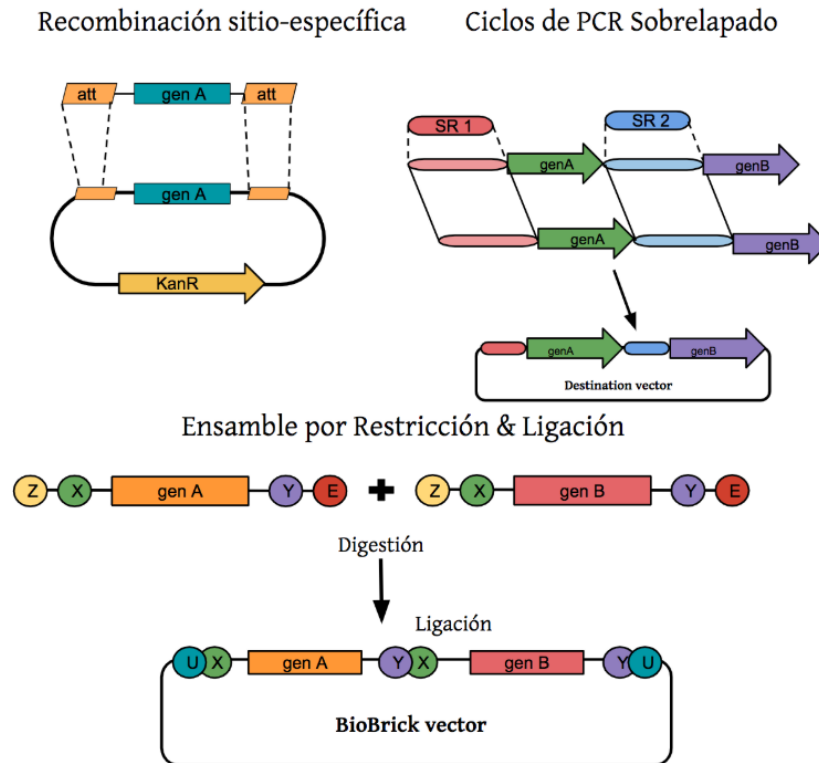


Figura 2.4: Representación de los métodos de ensamble de partes de DNA

pero para generar cada elemento en el orden correcto se necesita de hacer ciclos de PCR sobrelapado.. La figura 2.4 esquematiza cada uno de los enfoques, anteriormente mencionados.

La estandarización de estas técnicas asegura la integración de diferentes elementos de DNA en un orden definido y progresivo. La dificultad de estas técnicas mayoritariamente reside mayoritariamente en que se agotan los sitios para la clonación de nuevas regiones en los vectores de ensamble, además de la realización de múltiples ciclos de PCR para la generación de las construcciones, en la Figura 2. se esquematizan cada uno de los métodos de manera general(14). Las metodologías de ensamble tienen como finalidad común la construcción de diferentes regiones en un orden definido, permitiendo las combinación de partes de DNA, todo esto en una sola reacción o paso, muchas veces para lograr alguno de estos objetivos, es necesario la integración de diferentes técnicas estandarizadas, generando protocolos que hacen eficiente la construcción de circuitos o vías metabólicas (15).

Cuadro 2.1: Comparación de las ventajas y desventajas entre las técnicas existentes para el ensamble de regiones de DNA.

Método de ensamble	Ensamble por Restricción y Ligación	Recombinación sitio-específica y ensamble por solapamiento	Recombinación y ensamble por reconocimiento
Estandarización	BioBrick BglBrick iBrick ePath Brick Golden Gate Golden Braid MoClo MASTER	Gateway HVAS Yeast TAR Bacillus Do- mino SIRA OE-PCR CPEC SLIC Gibson NE-SLIC USER InFu- sion SLiCE MODAL PaperClip	LCR BASIC
Ventajas	Permite fusiones de proteínas. Ensamble jerarquizado. Uso de enzimas tipo IIS(I-SceI). Ensamble múltiple. El uso de enzimas de restricción tipo IIS elimina las secuencias "scar".	Ensamble múltiple. Sin uso de endonucleasas. Uso de integrasas de fagos (sitios <i>att</i>). Permite eliminar e integrar partes de DNA, reemplazamiento- (ϕ C31). Secuencias homólogas (20-40 pb de largo). Uso de maquinaria de reparación y recombinación celular.	Usa la maquinaria natural de la célula. ensamble múltiple (one-step) no existen secuencias "scar"
Desventajas	Introducción de errores por PCR. Eliminación de secuencias "scar" Limitación en la alineación y afinidad de los sticky ends durante el ensamble de partes de DNA.	Remanencia de secuencias "scar" Daño a la integridad del DNA. Dificultad para el diseño de vectores con los sitios att y en mantener la orientación correcta. Serie de PCR solapados.	Ciclos de PCR solapado

Cuadro 2.2: Contraste de las limitaciones y ventajas entre las técnicas existentes para el ensamble de regiones de DNA.

Método de ensamble	Ensamble por Restricción y Ligación	Recombinación sitio-específica y ensamble por solapamiento	Recombinación y ensamble por reconocimiento
Ejemplo	Construcción de: genetic toggle switch feed-forward loops. cromosoma completo de levadura 91 kb	Ensamble de vías metabólicas en <i>Sacharomyces cerevisiae</i> Ensamble del genoma completo de <i>Mycoplasma genitalium</i> Ensamble del genoma completo de ratón.	Ensamble de vías metabólicas
Referencias	Shetty P.R., Endy D., Knight Jr. F., 2008 (16). Anderson et al., 2010. (17) Litcofsky D et al., 2012.(18)	Hartley L.J, et al., 2000 (19). Collombs D., et al., 2013 Gibson G, et al., 2009.(11) Horton M, et al., 1989 (20) Quan J & Tian J., 2009 (21)	De Kok et al.,2014 (22)

Entre los alcances generados gracias a las técnicas de ensamble de partes de DNA, son el descubrimiento de productos naturales novedosos (23), la construcción de circuitos sintéticos, modificación de vías metabólicas (24), generación de librerías de elementos, p. ej. promotores, hasta la síntesis de genomas completos.

2.3. Herramientas y elementos utilizados para la construcción de circuitos en Biología Sintética.

Análogamente a lo que sucede en una célula en su ambiente natural, para la construcción de circuitos sintéticos la modificación de la maquinaria intrínseca de regulación del organismo, permite programar la respuesta a estímulos extrínsecos. Al

igual que en la naturaleza, el diseño debe cumplir con distintos requerimientos que permitan tener una regulación precisa para cada uno de los componentes. Por ejemplo, deben eliminarse interferencias cruzadas, sin olvidar que los reguladores deben estar funcionalmente conectados y tomar en cuenta características como, la inestabilidad del sistema a través del tiempo y la retroactividad de los elementos.

Crear módulos biológicos que desempeñen una función determinada derivada del metabolismo, como respuesta a estímulos ambientales requiere del correcto procesamiento y manipulación del flujo de información por los componentes modulares de dicho sistema. Por lo que es necesario hacer uso de una serie de elementos moleculares que permitan un alto nivel de control.(25) Para la construcción de estas redes de regulación génica, la Biología Sintética hace uso de herramientas que controlan el flujo genético de información; muchas de éstas tienen como blanco componentes transcripcionales, ya que representan el primer eslabón en el flujo de información. Además es mucho más fácil generar módulos de control en secuencias de DNA.

El control de la regulación a nivel transcripcional, puede modificarse a distintos niveles: en el inicio de la síntesis de RNA, en la modulación de la afinidad de la RNA polimerasa por su respectivo promotor y en la estabilización del complejo de inicio de transcripción. Cada uno de estos procesos ha sido ampliamente estudiado, generando así, bibliotecas de promotores con diferentes fuerzas, activadores de la transcripción que estabilizan la interacción RNA polimerasa-promotor, (por ejemplo: *LuxR*), además de factores Sigma con función extracitoplasmática (EFCs, por sus siglas en inglés). Estos sistemas han funcionado como molde para la construcción de bibliotecas de proteínas ortogonales activadoras, así como sus propios factores anti-sigma que inhiben su función y permiten un mayor grado de control dentro del propio sistema. Los elementos ortogonales tienen la bondad de eliminar el ruido que genera la interacción cruzada entre activadores, factores sigma o antisigma y promotores (26) lo cual, resulta indispensable para un mayor grado de control y robustez.

Entre los primeros elementos utilizados en la construcción de sistemas sintéticos se encuentra la polimerasa T7, ésta presenta mayores ventajas por encima del uso de la RNA polimerasa propia de *Escherichia coli*, ya que tiene altas tasas de transcripción,

se conforma de una sola unidad y es específica para su propio promotor ortogonal, por lo que no hay reconocimiento con los promotores propios de *E. coli* (27).

Los factores de transcripción, representan un grupo altamente utilizado en el diseño de sistemas sintéticos, éstos son moléculas propias del metabolismo del organismo que participan en la regulación de la expresión genética como respuesta a señales ambientales, permitiendo la adaptación fisiológica a condiciones cambiantes del exterior. Globalmente las familias de factores de transcripción se agrupan de acuerdo con su estructura y función, con cerca del 95% en el grupo particular en procariontes que comparte el motivo de unión a DNA de tipo hélice-giro-hélice (HTH, por sus siglas en inglés). Este tipo de reguladores con una estructura conformada por dos dominios (unión a DNA y unión a ligando), pueden utilizarse para la construcción de circuitos o sistemas sintéticos (28). Como ejemplos de factores de transcripción que funcionan como activadores tenemos: aquellos que encienden chaperonas de RNA polimerasa; activadores transcripcionales de fagos y proteínas que incrementan la tasa de transcripción dependientes de ATP, como HrpRS, derivado del gen *hrp* (hypersensitive response and pathogenicity) de *Pseudomonas syringae*, (29, 30)

También hay factores transcripción que funcionan como represores; es decir, bloquean el acceso de la RNA polimerasa por su respectivo promotor. Entre los más ampliamente utilizados y modificados se encuentran: TetR, LacI y sus variantes. La especificidad de cada uno de los factores de transcripción puede ser programada, como en el caso de los TALEs (transcriptional activator like-effectors), los cuales tienen un dominio de unión al DNA (surco mayor) que puede ser modificable (27).

Ahora bien, el uso de moléculas que sirven como inductores que promueven el inicio de la transcripción al eliminar del promotor proteínas de tipo represoras como TetR, ofrece la ventaja de regular los niveles de mRNA y permiten controlar externamente el sistema. Algunas moléculas que sirven para este fin son: la arabinosa, lactosa y tetraciclina, específicamente los análogos químicos IPTG y anhidrotetraciclina de los dos últimos. En células eucariontes el uso de promotores tejido-específico son una la opción para la inducción de la transcripción (31).

Finalmente, existen otros grupos de moléculas que permiten un control a nivel

transcripcional ya sea reprimiendo o activando, éstos son los *riboswitches* y los *small RNA*. Los primeros tienen la capacidad de unirse a ligandos específicos en su región 5' UTR (secuencia localizada río arriba de los genes), en el segundo caso, los *small RNAs* funcionan a través de la complementariedad de bases entre el sRNA y el mRNA blanco (27) y pueden ser utilizados para regular nuevos genes blanco nuevos o para introducirlos en organismos distintos. A pesar de que se han generado librerías de RNA's pequeños para la construcción de sistemas sintéticos, su efectividad no es tan robusta como los nativos (32). La actuación de estas moléculas puede ser *cis* o *trans*. La segunda se refiere a que un sRNA puede tener múltiples mRNAs blanco en otro sitio del cromosoma de la bacteria, a diferencia de los que actúan en *cis* los cuales son codificados en la cadena opuesta de DNA, por lo que, poseen una perfecta complementariedad de bases, estos tipos de RNAs pequeños se nombran como RNAs antisentido. El tamaño de este tipo de RNAs es muy variado, existiendo RNAs antisentido pequeños de 100 bp hasta aquellos que abarcan más de un gen (por ejemplo, operones, como en el caso de *Listeria monocytogenes*) y que han sido nombrados como: *excludon*. Este tipo de RNAs se pueden sobrelapar tanto en la región 5' como la 3' o bien, en la región central del gen o conjunto de genes. El tipo de regulación derivada de los asRNA son la represión de transposasas como las encontradas en el transposón Tn10, además del silenciamiento de genes tóxicos para la célula (ej. *TisB*), regulación de niveles de factores de transcripción y la modulación de genes relacionados con virulencia (33).

En las siguientes secciones se profundiza acerca de los conceptos esenciales que sirven como fundamento para la generación de esta nueva técnica de construcción por integración en el cromosoma de circuitos sintéticos.

2.4. Reguladores transcripcionales: TetR y LacI

La familia de reguladores transcripcionales TetR que lleva ese nombre debido a la proteína TetR que controla la transcripción de los genes *tet* (de resistencia a tetraciclina). Este factor de transcripción es ampliamente utilizado dentro de la Biología

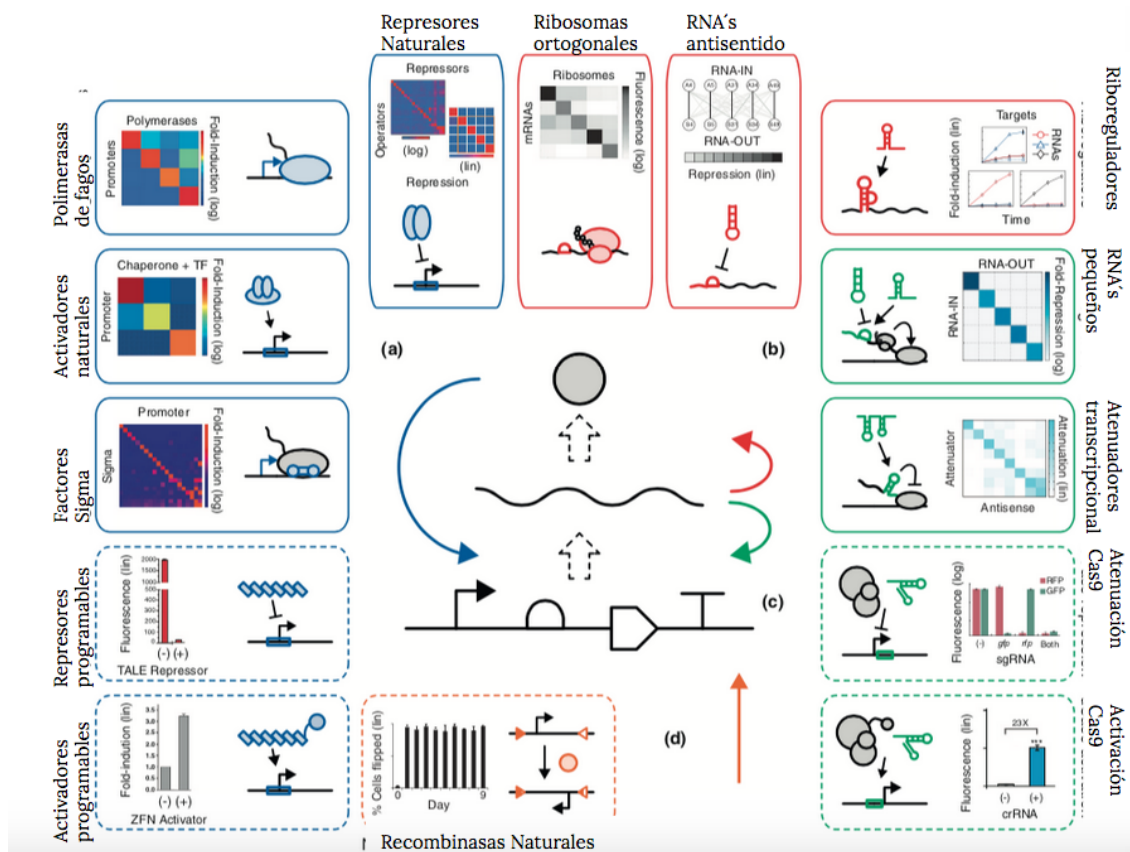


Figura 2.5: Ejemplos de herramientas utilizadas en la construcción de sistemas sintéticos. Obtenido de Nielsen *et.al* (25).

Sintética, no sólo en bacterias, sino también en hongos y otros eucariontes. Pertenece a la familia HTH y las funciones que regula son la biosíntesis de antibióticos y transportadores, además de la respuesta a estrés osmótico y patogenicidad en bacterias Gram negativas y positivas. La regulación por este represor, es de tipo negativa cuando se une al promotor pTet (el cual consiste en regiones de unión, es decir, operadores). La unión de tetraciclina o análogos químicos como la anhidrotetraciclina al dominio de unión a ligando, permite la existencia de un cambio conformacional en el represor lo que libera al promotor y promueve la unión del a RNA polimerasa al DNA. La regulación por este tipo de factor de transcripción es bastante precisa y casi sin ninguna fuga, Suite *et. al.*, utilizaron este tipo de regulación para la construcción de un sistema de lógica booleana de regulación (34)

El segundo represor ampliamente utilizado en la construcción de sistemas sintéticos es el represor LacI, el cual también se encuentra dentro de la familia de factores de transcripción HTH. Las funciones reguladas por este factor se refieren a la utilización de carbono. LacI actúa uniéndose a la secuencia del operador en forma de dímero en la ausencia de alolactosa (o del inductor gratuito IPTG) evitando que la RNA polimerasa se una al promotor e inicie la transcripción. La represión mediada por LacI, se ha usado ampliamente para la construcción de circuitos y una de las ventajas que ofrece es que se encuentra en el cromosoma, o bien se puede incluir en un plásmido (28).

Es importante mencionar, que para obtener un control aún más estricto y con menos probabilidad de fuga se han diseñado regiones de regulación consistentes en promotores con más de un sitio de unión para estos factores transcripcionales (35)

2.5. Sistemas de contraselección

Los sistemas de contraselección son de las herramientas más utilizadas dentro de la Microbiología molecular para generar mutantes y/o entender mecanismos de patogenicidad, entre otros procesos. Estos tienen el beneficio de seleccionar el fenotipo deseado gracias a la ausencia de cierto gene, comúnmente los genes utilizados son

tóxicos o dañinos para la célula. Los sistemas de contraselección se utilizan para microorganismos en los que existen pocas herramientas genéticas y entre los más empleados son los marcadores *sacB*, *tetAR*, *rpsL*. La tabla de genes utilizados en los sistemas de contraselección, ofrece una descripción más profunda de su mecanismo de acción. (36)

Cuadro 2.3: Genes utilizados en los sistemas de contraselección , obtenido de Reyrat, J.M., *et al.*, 1998.

Marcador de contraselección	Descripción
<i>SacB</i>	Efectivo en bacterias Gram+, como <i>Bacillus subtilis</i> , Este gene codifica para una enzima que cataliza la conversión de sacarosa a levanos, los cuales generan toxicidad al acumularse en el espacio periplásmico
<i>tetAR</i>	Confiere resistencia a tetraciclina pero es sensible a compuestos lipofílicos como el ácido fusárico o quinálico
<i>rpsL</i>	Codifica para la cual subunidad ribosomal S12, el cual es un blanco de la estreptomicina.
<i>pheS</i>	Gen que codifica para la subunidad alfa de la Phe-tRNA sintetasa, provocando que la bacteria sea sensible a la p-clorofenilalanina o algún análogo de la fenilalanina
<i>lacY</i>	Codifica para la permeasa de lactosa, que hace a la bacteria sensible a o-nitrofenil -B-D-galactopiranosido.
<i>thyA</i>	Codifica para la timidilato sintasa, generando sensibilidad a la timetroprim y análogos.
<i>gata-1</i>	Es un dedo de zinc de unión a DNA, el cual inhibe la iniciación de la replicación del DNA bacteriano
<i>ccdB</i>	Codifica para una proteína suicida que tiene como blanco a la DNA girasa.

2.6. Regulación genética a nivel transcripcional mediada por la interacción de RNAs polimerasas.

La existencia de mecanismos de regulación genética a nivel transcripcional, mediada por la interacción de RNAs polimerasas, ha sido ampliamente estudiados, identificándola como mediadoras clave en procesos fisiológicos, metabólicos y patogénicos en bacterias. De manera general, la interferencia transcripcional es un mecanismo que se da de forma asimétrica y en principio se debe a la existencia de dos promotores, en donde el primero es más fuerte, o con mayor afinidad a la RNA polimerasa que el segundo (sensible) reduciendo su expresión. Es importante resaltar que la interferencia transcripcional no se refiere a: 1) la unión de represores a operadores evitando la unión de la RNA polimerasa a su respectivo promotor, 2) modificación del promotor por metilación, 3) supresión de la elongación de la transcripción por la presencia de obstáculos en el DNA (otros que no sea una segunda RNA polimerasa), 4) inactivación de la RNA polimerasas por reguladores transcripcionales, 5) aislamiento de regiones regulatorias como potenciadores y 6) interferencia mediada por RNAs de interferencia (37).

Los procesos de regulación a nivel transcripcional se encierran en dos tipos: *interferencia y atenuación*. El mecanismo de interferencia obedece a la interacción mediada por polimerasas de RNA como resultado del posicionamiento de promotores convergentes en *cis*. Cada uno de los mecanismos de interferencia descritos son (figura 2.6):

1. La oclusión, la cual consiste en la interacción entre las fuerzas de dos promotores convergentes, en el que uno de ellos es “sensible”, generando que la RNA polimerasa del promotor más “fuerte” pase sobre el débil, silenciando la expresión del gen.
2. La colisión entre dos RNA polimerasas que se encuentran en la etapa de elongación de transcritos de genes con promotores convergentes, lo que conlleva a la terminación prematura del evento de transcripción, el tipo de interacción entre las polimerasas más que ser estérico es electrostático. Se concluye mediante mo-

delación matemática y validación experimental, que este tipo de interferencia es más efectiva cuando los promotores se encuentran a mayor distancia (>200 pb) o uno de ellos es más fuerte que el otro.

3. La *competencia por el promotor* es otro de los mecanismos descritos, en donde la ocupación de un promotor por la RNA polimerasa esconde el segundo promotor del acceso por otra RNA polimerasa.
4. Por último, la interferencia de tipo “*sitting duck*”, se refiere al evento que ocurre cuando una RNA polimerasa se une a un promotor “sensible”, existiendo otra RNA polimerasa que se une a un segundo promotor convergente y más fuerte, limitando el inicio de la elongación del promotor más débil, esto debido principalmente a la reducción en la acumulación de intermediarios de inicio de la transcripción del promotor más débil. Este tipo de mecanismo de interferencia, es común en la regulación del paso de ciclo lítico a lisogénico en bacteriofagos. El silenciamiento de tipo *sitting duck* ocurre más eficientemente cuando los promotores se encuentran cercanos uno del otro y son de fuerzas moderadas (38, 39).

De manera general, existen tres tipos de RNA's regulatorios, aquellos que se encuentran en la región 5' UTR del mRNA (p. ej. los riboswitches), RNAs pequeños en *trans* y RNAs antisentido en *cis*, por ejemplo, el excludón que abarca un mayor número de genes silenciados(40).

De manera específica, la atenuación al ser un mecanismo de silenciamiento transcripcional, requiere de un tipo específico de RNA, los RNA antisentido que alteran la transcripción de un mRNA, al ser complementarios con el transcrito de la cadena opuesta.

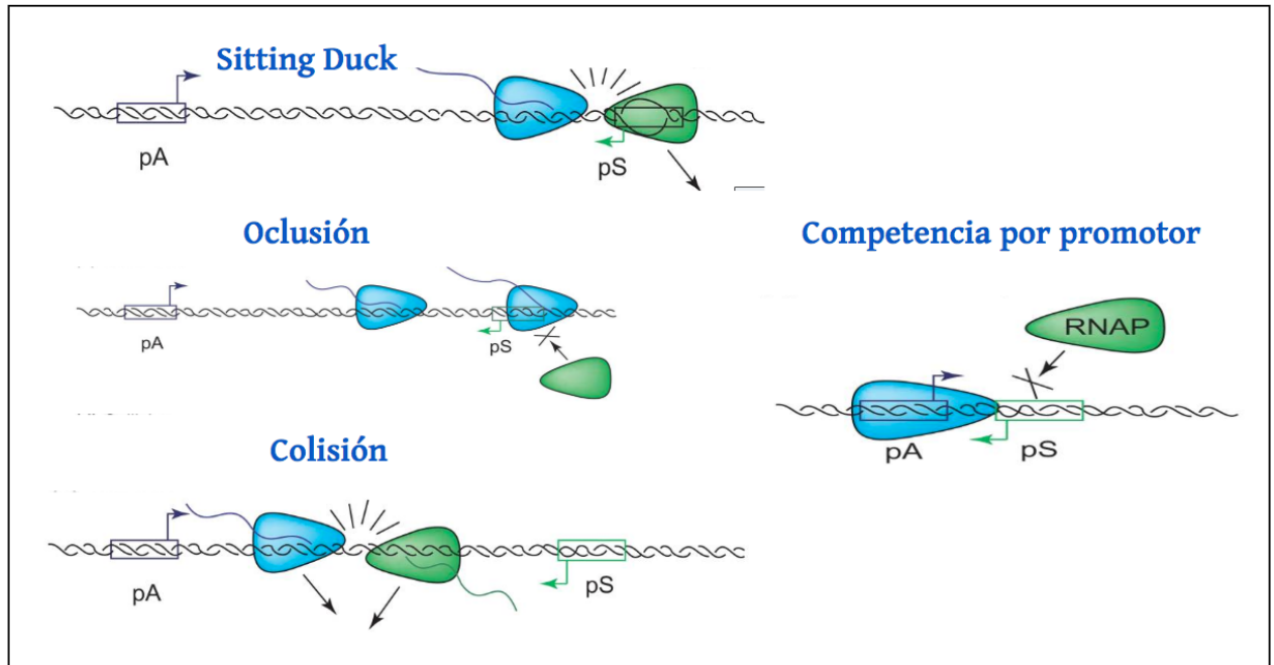


Figura 2.6: Mecanismos de interferencia debido a la interacción entre RNA polimerasas. Obtenido y modificado de Shearwin E. et al., 2005.

2.7. Sistema de recombinación cromosómica mediada por las recombinasas del fago lambda-red.

La complejidad del genoma bacteriano, así como sus propiedades y las diferencias entre especies devienen en cierto porcentaje de los profagos que se han insertado en sus cromosomas. Alrededor del 10-20% del genoma procarionte está constituido por profagos, que bajo ciertas circunstancias pueden establecer una relación estable con su hospedero. Las integraciones de los fagos al genoma de su hospedero, puede darse en un único lugar, como es el caso del fago lambda, o en múltiples como el fago P2, e incluso en lugares al azar como el fago Mu (41)

Por consiguiente, la ingeniería genética, gracias a los estudios de la interacción profago-bacteria, ha hecho uso de los eventos de recombinación mediados por la maquinaria enzimática de los profagos, por la facilidad que proporcionan para insertar, eliminar y modificar secuencias de DNA sitio-específico y con regiones de homología con la secuencia blanco de hasta 50 bp de tamaño. El sistema mediado por la maqui-

naria del bacteriofago lambda permite la inserción de secuencias bicatenarias (como productos de PCR) o monocatenarias (en forma de oligonucleótidos), las cuales deben tener regiones homólogas para poder integrarse en la región correcta del genoma del organismo.

Ahora bien, la inducción de recombinación en células mediada por fagos, es llevado a cabo por tres enzimas diferentes del fago lambda, que son productos de los genes que promueven la recombinación: *beta*, *exo* y *gamma*. La enzima γ evita que el DNA lineal sea degradado por nucleasas como RecBCD, Beta, por otra parte, permite el alineamiento del ssDNA con su secuencia complementaria. Por último, la proteína resultante del gen *exo* tiene una actividad catalítica de exonucleasa dirección 5' a 3' para dsDNA. El trabajo conjunto de estas tres enzimas permite insertar secuencias, generando recombinantes genéticos en el hospedero (42). Como se mencionó antes, entre las aplicaciones del sistema lambda-red, está principalmente la mutación de genes. Para lo cual, se han probado protocolos que resultan eficientes, como el caso del desarrollado por Dansenko y Wanner en el año 2000 (43) Para este procedimiento se utilizan las recombinasas del fago lambda bajo un promotor inducible, en un vector de bajo número de copias (pKD46). La ventaja que presenta este método, es el uso de secuencias lineales de DNA, generalmente productos de PCR, las cuales sirven para integrarse directamente en el cromosoma. Las regiones homólogas para integración y reconocimiento son extendidas por medio de reacciones de PCR, además la cantidad de recombinantes obtenidas con el sistema lambda-red es mucho mayor en comparación con mutantes del sistema RecBCD de *E. coli*, como *recBC*, *sbcB* o *recD*. De manera general, este sistema de inactivación de genes cromosómicos, se basa en la inserción de un cassette de resistencia a algún antibiótico flanqueado por las secuencias para la recombinación homóloga. Una vez que se han seleccionado, el mismo cassette puede ser eliminado usando un plásmido que expresa las recombinasas del sistema FLP, que actúan en secuencias repetidas FRT (43).

Algunas modificaciones al método desarrollado por Dansenko Wanner son las mostradas en la figura 13.1 del Anexo 5, en diferentes pasos del protocolo ya estandarizado, las cuales mejoran la técnica e incrementan la cantidad de mutantes o células con la

integración correcta en el cromosoma.

Capítulo 3

Justificación

El campo de la Biología sintética se caracteriza, entre otras cosas, por la constante necesidad de crear sistemas complejos, los cuales, en su mayoría, se encuentran conformados por un gran número de componentes genéticos. La integración a la célula de estos últimos, puede presentar una serie de dificultades, pues la capacidad de seleccionar cada integración se ve limitada por el número de marcadores disponibles en el campo de la Biología molecular.

Como solución al problema anteriormente expuesto, se construyó un sistema sintético que permite la integración cromosómica de manera eficiente, múltiple y jerarquizada. El sistema hace uso de la maquinaria de recombinación homóloga, aunado a la selección por ausencia de un sólo marcador de resistencia a antibiótico, al silenciarlo por atenuación o interferencia transcripcional (colisión).

El sistema construido, además de dar lugar a la creación de sistemas sintéticos complejos al introducir componentes genéticos de manera sucesiva, múltiple y jerarquizada, evita las dificultades derivadas de otros protocolos, como son: el uso de enzimas de restricción, los múltiples vectores de clonación, la falta de marcadores de selección y los ciclos de PCR sobrelapados, técnicas que en su mayoría tienen repercusiones notorias en la integridad del DNA.

Capítulo 4

Hipótesis

La inducción de la transcripción antisentido o la interferencia mediada por RNA polimerasas de genes de resistencia a antibióticos, permitirá el silenciamiento de estos últimos, proporcionando la capacidad de seleccionar las integraciones de elementos genéticos en el cromosoma bacteriano.

Capítulo 5

Objetivo general

Desarrollar un método de integración por recombinación homóloga en el cromosoma que permita la integración múltiple, sucesiva y eficiente de regiones de DNA para la subsecuente construcción de circuitos epigenéticos.

5.1. Objetivos específicos

1. Diseñar y construir un módulo que facilite la integración de regiones de DNA, al amplificar el gen de resistencia a cloranfenicol con la extensión de dos promotores, el segundo en antisentido e inducible, además de los sitios de recombinación correspondientes.

2. Probar *in vivo* el módulo para integración de elementos de DNA al integrarlo en el cromosoma de *E. coli* por medio del método de recombinación de Dansenko & Wanner (43).

3. Verificar el silenciamiento a nivel transcripcional del gen de resistencia a cloranfenicol al inducir el promotor antisentido por la adición de anhidrotetraciclina.

4. Construir un vector inducible que contenga las recombinasas del sistema fago lambda (exo, beta y gamma) para producir recombinaciones en el cromosoma.

Capítulo 6

Estrategia Experimental

El método para la construcción del sistema sintético consistió en la amplificación del gen de cloranfenicol, con la subsecuente extensión por PCR de los promotores convergentes flanqueando ambos extremos del gen marcador, aunado a los sitios de reconocimiento para la recombinación homóloga. La sección Construcción del módulo para integración de la sección Resultados y Discusión, muestra los protocolos utilizados con mayor detalle.

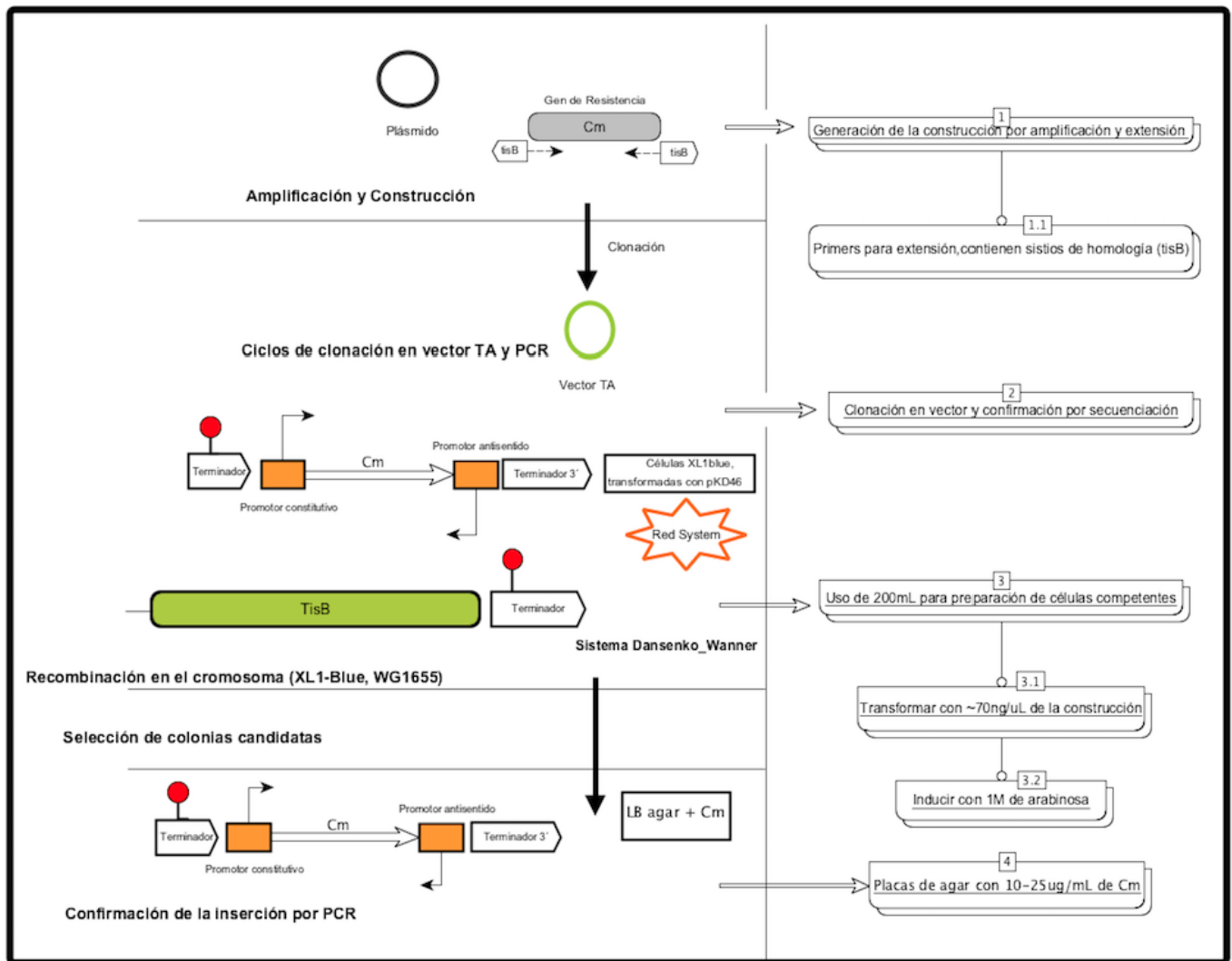
La construcción fue introducida al cromosoma de cepas silvestres de *E. coli* : XL1Blue y W3110.

El protocolo general de la construcción del sistema sintético se resume de manera visual en la figura 6.1, presentada a continuación:

La verificación a nivel de nucleótido de la construcción generada, se realizó por secuenciación y por digestiones del vector donde se clono el sistema, tal como se muestra en la sección: Confirmación del tamaño y calidad de la construcción por restricción y secuenciación de DNA, del siguiente capítulo.

Por otro lado, el funcionamiento del sistema para la integración de elementos de DNA se observa en la figura 6.2. La prueba de concepto, para obtener un silenciamiento de la expresión del gen de resistencia a antibiótico, se muestra en la sección 7.2 del siguiente capítulo, así como el protocolo necesario para la realización de cada una de las integraciones en el cromosoma.

Figura 6.1: Estrategia Experimental. Protocolo para la construcción del sistema de recombinación e integración cromosómica, por medio de recombinación homóloga en *Escherichia coli*



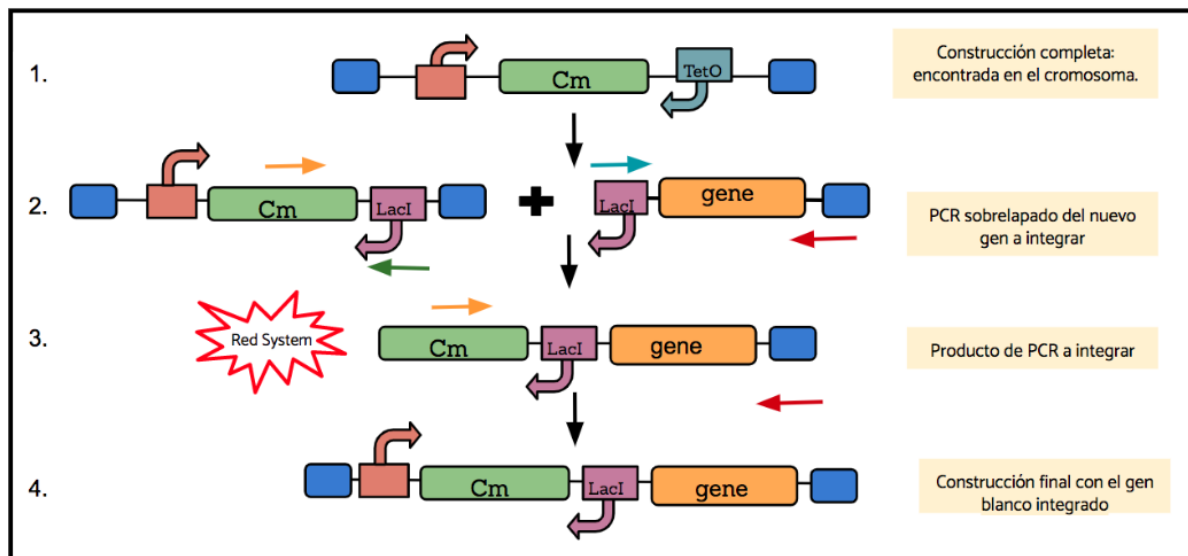


Figura 6.2: Protocolo de integración en el cromosoma de *Escherichia coli*. Código de colores de la estrategia experimental para el protocolo de integración del sistema construido. Azul: Sitios de homología para recombinación (caso específico: *tisB*). Rojo: Promotor consenso. Verde: Gen de resistencia a cloranfenicol (cloranfenicol acetil transferasa). Azul claro: Promotor inducible Tet. Amarillo: gene a insertar en el cromosoma.

Capítulo 7

Resultados y Discusión

La construcción del módulo de silenciamiento para la integración de elementos múltiples o partes de DNA, se sustenta en la ocurrencia de dos posibles eventos de silenciamiento transcripcional, el primero provocado por la elongación de dos procesos convergentes de transcripción (interferencia transcripcional: colisión) y el segundo por una posible atenuación transcripcional debida a RNA's antisentido.

El primer posible mecanismo esperado para silenciar el gen de resistencia a cloranfenicol consiste en la interferencia provocada por la elongación transcripcional de dos RNA polimerasas, provocando el silenciamiento del gen al evitar su transcripción y por ende, su expresión. Ahora bien, si no es este el mecanismo que genere el silenciamiento del gen de resistencia, se espera que el RNA antisentido generado en la cadena opuesta o complementaria cuente con la potencialidad de actuar como represor de la expresión del gen que se encuentra en la cadena opuesta, por medio de la hibridación de bases de los transcritos generados. Es importante mencionar, que los RNA's antisentido pueden actuar al hibridar ya sea en la región 5', la 3', a la mitad o con el gen completo de la cadena complementaria. La formación del dúplex de RNA se puede dar en un sólo paso o a través de un mecanismo múltiple que necesita de proteínas accesorias para la formación del híbrido. De cualquier forma, se espera que el silenciamiento del gen de resistencia a cloranfenicol se de por la formación del dúplex de RNA que altere la estabilidad de éste, provocando su degradación y evitando la traducción del gen. Así la selección del fenotipo causada por la ausencia del gen de

resistencia a cloranfenicol, es la clave en la subsecuente selección de las integraciones múltiples que se desean realizar.

Como punto clave en la construcción del sistema está el promotor en antisentido (el cual dará lugar al mRNA antisentido) que es de naturaleza inducible; es decir, es un promotor con operadores de unión al represor de tetraciclina (TetR). Esto genera un rango de control para el sistema más robusto, ya que permite el control externo al agregar el inductor al módulo (anhidrotetraciclina) y remover el represor del sitio del operador del promotor, promoviendo así la producción del transcrito y la generación del dúplex de RNA o bien, la interferencia transcripcional derivada de RNA polimerasas.

Otro aspecto fundamental, que también le brinda al sistema un nivel de control mayor, es tener la construcción en monocopia dentro del cromosoma bacteriano, pues al tener una sola secuencia blanco de unión al represor (TetR) permitirá que éste se una no sólo con precisión, sino con mayor frecuencia evitando un escape por competencia de sitios de unión del factor. Además, el represor de tetraciclina se expresa en un vector con un alto número de copias, aumentando el rango de unión a la secuencia del operador del promotor en antisentido del gen de cloranfenicol. El sistema se encuentra flanqueado por sitios homólogos a la región 3' del gen *tisB*. Esta región incluye al terminador de dicho gene, el cual tiene una energía libre de estructuración de -24.40 kcal/mol. Así este terminador Rho independiente, representa un sitio que permitirá integrar el sistema sin que la transcripción de genes río arriba, con posibles promotores fuertes, afecten la transcripción del gen de resistencia y eviten el silenciamiento por cualquiera de los mecanismos antes descritos y esperados en el presente trabajo. La construcción completa a generar se puede observar en la figura 7.1.

Como primer paso en la construcción del módulo con promotores convergentes fue el siguiente:

7.1. Construcción del módulo para integración

7.1.1. Extracción de DNA plasmídico para la obtención del vector pQEWT-N4-R5-YRNRV:

Para la extracción del plásmido se creció la cepa de *E.coli* recipiente del vector de interés, en cultivo LB/cm 25mg/mL a una temperatura de 37 °C, durante toda la noche. La extracción del plásmido se realizó con el estuche de purificación de plásmido: WizardTM Plasmid Miniprep, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se obtuvo una concentración final de 30-60 ng/mL. Además el plásmido fue analizado por medio del uso de enzimas de restricción (*Hind*III y *Eco*RI) para confirmar que tuvieran el tamaño esperado y se observó en un gel de agarosa al 1 % (Los mapas de los plásmidos utilizados se encuentran en el Anexo 1).

7.1.2. Extensión por PCR de los promotores que flanquean el gen de resistencia a cloranfenicol y extensión por PCR de los sitios de reconocimiento para la recombinación.

Se amplificó del plásmido pQEWT-N4-R5-YRNRV, por PCR con la finalidad de obtener el gen de resistencia cloranfenicol. Para este mismo gene, se extendieron por PCR, los dos promotores en los extremos (es decir, convergentes) en cada una de las hebras complementarias. El primero es un promotor en sentido 5', con las cajas -10 (TATAAT) y -35 (TTGACA) consenso y el segundo se está en la cadena complementaria del inicio del gene con sitios operadores de unión al represor de tetraciclina o TetR (TCTCTATCACTGATAGGGA). En otras palabras, el segundo promotor es inducible con tetraciclina o su análogo sin propiedades de antibiótico, anhidrotetraciclina. La construcción completa se puede observar en la figura 6.1.

Para la amplificación del gen de Cm del vector pQEWT-N4-R5-YRNRV se decidió obtener una temperatura de hibridación óptima de los oligonucleótidos, por lo que se hizo un gradiente con las siguientes de temperaturas: 56, 54, 61 y 62 °C. Los ciclos usados, para la amplificación fueron los siguientes: 95 °C por 3 min, 95 °C 30s,



Figura 7.1: Construcción completa. SR- sitios de recombinación, PC- promotor constitutivo, CmR - gen de resistencia a cloranfenicol, TetO - promotor inducible con tetraciclina.

temperatura correspondiente al gradiente, 72 °C por 1 min, 72 °C por 5 min y 12 °C por 4 por min. Los productos de PCR obtenidos fueron analizados en un gel de agarosa al 1%. La temperatura de hibridación óptima obtenida para cada una de las reacciones de PCR fue de 62 °C. (ver Anexo 2. Secuencias de oligonucleótidos utilizados).

En la figura 6.2A se muestran las amplificaciones de PCR del gen de CmR con sus respectivas regiones de extensión para recombinación en los extremos 5' y 3'. Una vez, obtenida la construcción, fue purificada por medio de un gel de agarosa al 1% usando el estuche FavorPrep™ Gel/PCR Purification, siguiendo las instrucciones del fabricante. El producto de PCR purificado, se utilizó para la extensión de los sitios de recombinación con un tamaño de 80 pb, de la región 3' del gen *tisB*.

7.1.3. Clonación en el vector TA

La construcción obtenida, fue purificada son un gel de agarosa al 1% (estuche FavorPrep™ Gel/PCR Purification) como antes se mencionó y se clonó usando el estuche del vector TA Cloning™ Kit, con el vector pCR™2.1. Las reacciones de

ligación se realizaron de acuerdo con las concentraciones requeridas por el manual del estuche, con la ligasa y buffer de la T4 DNA ligasa de Thermo Scientific™. Las reacciones de ligación se incubaron a 22 °C durante toda la noche y fueron transformadas en células competentes de la cepa DH5 α . Las células se recuperaron en medio SOC durante una hora a 37 °C. Más tarde fueron seleccionadas en medio sólido LB-agar/Cm 25mg/mL. Las colonias candidatas resistentes al antibiótico en cuestión, fueron seleccionadas para la extracción de plásmido. Es importante mencionar que cada producto de PCR de los ciclos de extensión generados, se purificó y clonó en el vector pCR™2.1 TA, para más tarde extender el resto de las secuencias faltantes y realizar una vez más la clonación en el vector antes mencionado. Esta estrategia aunque larga resultó ser más eficiente con respecto a la realización de PCR anidados, los cuales también se realizaron, pero no de manera exitosa.

7.1.4. Confirmación del tamaño y calidad de la construcción por restricción y secuenciación de DNA

Una vez, obtenido el plásmido de las colonias candidatas a tener la construcción para cada ciclo de amplificación por PCR, hasta conseguir la construcción completa, se prosiguió a confirmar la presencia de éste con un tamaño de alrededor 931 bp, esto a través de la restricción del vector con la enzima que libera los fragmentos clonados en el mismo, *EcoRI*, dichas digestiones se pueden observar en la figura número 6.2B.

También se mandaron secuenciar algunas colonias candidatas para confirmar la calidad de la secuencia, para lo cual se purificó el producto de PCR encontrado dentro del plásmido por gel de agarosa al 1% con el estuche de purificación de PCR FavorPrep™ Gel/PCR Purification.

Una vez generada la construcción y verificada por medio de secuenciación, se prosiguió a probar la efectividad del sistema. Es decir, observar en el fenotipo la sensibilidad de las células al antibiótico (cloranfenicol). Para esto, el gene que confiere resistencia deberá silenciarse al inducir el inicio de la transcripción del promotor en la hebra complementaria u opuesta y convergente al promotor consenso o en sentido,

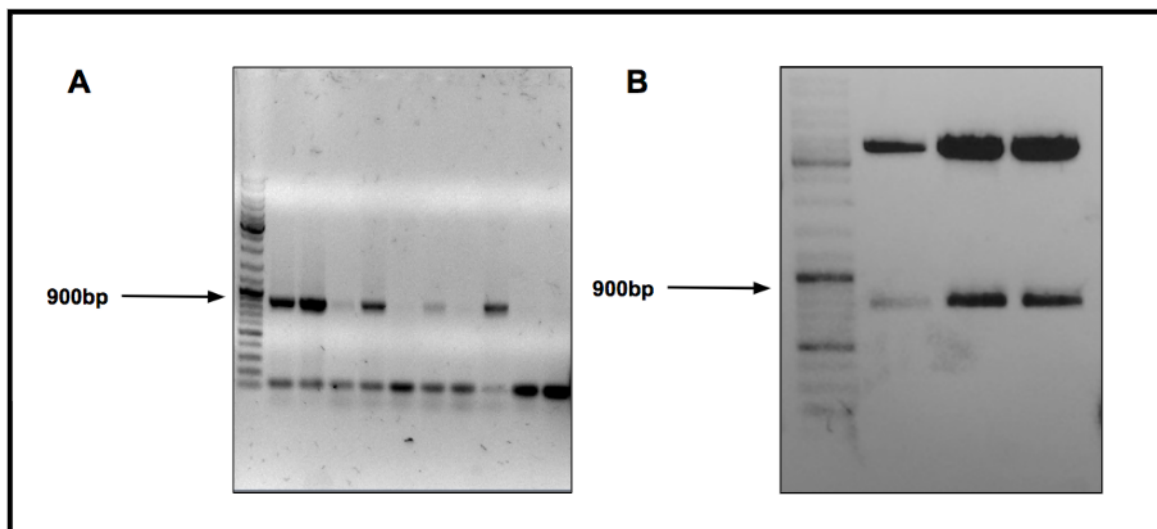


Figura 7.2: Fotografías en negativo de geles de agarosa donde se muestran A) Desde el carril 1 al 10, amplicones de colonias candidatas, de la construcción completa usando una temperatura óptima de hibridación de 62°C y B) Fragmentos de restricción con *EcoRI* del plásmido Pcr 2.1 TA, de las colonias candidatas a tener la construcción completa.

esto gracias a la adición de anhidrotetraciclina (ya que fue la primera construcción que se integró al cromosoma, compuesta por el promotor de TetO), el silenciamiento esperado puede deberse en principio a la interferencia derivada de la colisión de las RNA polimerasas o bien por la hibridación que puede existir entre los dos transcritos generados. Independientemente del mecanismo de silenciamiento que suceda, el evento que permite seleccionar el fenotipo y por lo tanto, confirmar la funcionalidad del sistema construido, es la ausencia de la función del gen silenciado. En concreto, la sensibilidad a cloranfenicol.

Sin embargo, los resultados obtenidos en esta primera prueba de concepto, sugirieron que la fuerza del promotor en sentido era mayor que el promotor en antisentido (promotor sensible). Al crecer las cepas WG1655 y W3110 con la construcción y sin el represor en medio sólido con el antibiótico, se observó crecimiento, es decir, aún en ausencia del represor y al producirse el transcrito en antisentido existió resistencia al antibiótico, lo que indica que 1. el mRNA antisentido no titula las concentraciones del transcrito del gen de resistencia o 2. no existe interferencia por la elongación de

RNA polimerasas.

Estos primeros resultados dieron lugar al planteamiento de la generación de un promotor en sentido con menor fuerza o afinidad por la RNA polimerasa para poder observar un silenciamiento notorio. Bharanikumar *et. al* (2018), mostraron que cambios en la secuencias consenso de las cajas -35 y -10 permiten disminuir la afinidad de la RNA polimerasa al promotor, esto dió la pauta para generar mutaciones en la caja Primbow y en la caja -35 que disminuyeran la fuerza del promotor en sentido. (44) Las mutaciones a realizar fueron las mostradas en la figura 7.3.

Las mutaciones en las cajas consenso del promotor escogidas en este trabajo, devienen de las predicciones que realizan Bharanikumar *et al.*, (2018) de la fuerza de promotores a los que se asocia el factor sigma 70 y la RNA polimerasa. Se mutaron las bases más conservadas de las cajas -35 y -10 que reducen la fuerza de unión de manera considerable del promotor en cuestión. En la figura 7.3 se muestra un LOGO de las bases más conservadas de las cajas, las cuales sufren mutaciones o modificaciones en este trabajo para disminuir su fuerza y por ende, obtener un silenciamiento por interferencia de RNA polimerasas o la hibridación de RNAs antisentido.

7.1.5. PCR vuelta del Zero Blunt™ con la construcción completa para mutagénesis: mutaciones en las cajas -35 y -10.

Se diseñaron oligonucleótidos que insertan la mutación sitio-específica al realizar un PCR vuelta del vector donde se encuentra la construcción (Vector Blunt PCR 2.1). Las condiciones del PCR vuelta fueron las siguientes: 98°C 3 min, 98°C 30 s, 62°C 30 s, 72 °C 2:30 s, 72 °C 10 min y 12 °C 4 min. Una vez, obtenido el fragmento del tamaño deseado 5,397 pb, se purificó con el estuche GeneJet PCR Purification Kit de Thermo Scientific, el producto purificado fue digerido con la enzima *Dpn1* para eliminar el DNA parental, la digestión fue incubada durante toda la noche a 37 °C en buffer Tango. Al siguiente día, para inactivar la enzima se incubó la reacción por 20 min a 80°C, después a 70 °C por 5 min (con la finalidad de abrir hebras de DNA) y

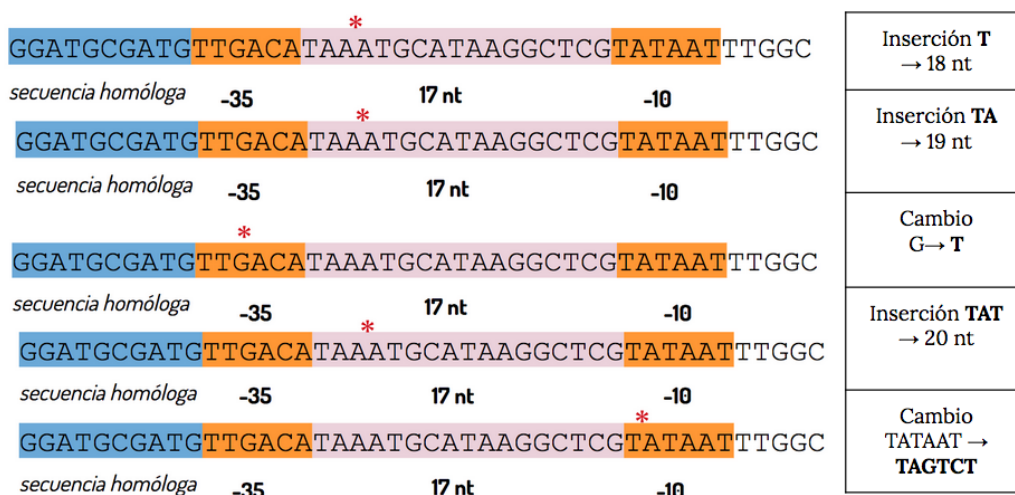


Figura 7.3: Mutaciones realizadas en el promotor consenso en sentido de la construcción completa

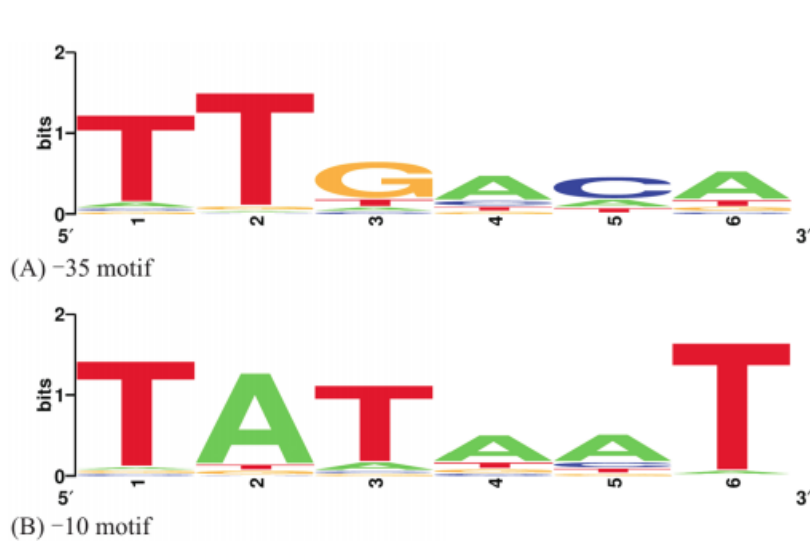


Figura 7.4: Secuencia de los hexámeros -35 y -10. Imagen obtenida de WebLogo.

se colocó en hielo, para después fosforilar los extremos del vector a 37 °C por 1 hora. La cinasa de polinucleótido se inactivó a 65 °C por 20 min. La ligación del vector fosforilado, se realizó con la ligasa T4 de DNA en las condiciones estándar planteadas por el protocolo del estuche, se incubó durante toda la noche a 22 °C.

En la figura 14.1 se esquematiza la técnica para la realización de PCR's inversos para mutagénesis sitio dirigida. Los cuales, se realizaron con la finalidad de cambiar la fuerza de los promotores en sentido. Los geles que muestran los PCR vuelta se observan en la figura 14.2 del Anexo 7.

Paralelamente a la generación de estas mutaciones, se generaron una serie de mutaciones que alejaban las cajas consenso del promotor en sentido, desde 18 hasta 20 nucleótidos de separación entre cajas, esto también con la finalidad de reducir la afinidad de la RNA polimerasa por el promotor.

7.1.6. PCR vuelta del Zero Blunt™ con la construcción completa para mutagénesis: mutaciones para añadir bases entre las cajas del promotor

Para la generación de cada una de las mutaciones al promotor en sentido del gel de cloramfenicol, se realizaron oligonucleótidos (ver secuencias en el Anexo 2). El procedimiento para mutagénesis que se realizó, fue el mismo que se explica en la sección anterior.

7.1.7. Confirmación por secuenciación de la inserción de la mutación.

Con la finalidad de confirmar la presencia de la mutación en las cajas -10, -35 y las mutaciones que alejan las cajas consenso de los promotores, se secuenció el vector con los oligos M13 *forward* y T7 *reverse* del estuche del Zero Blunt™ PCR Cloning Kit. En la figura 7.5 se muestra la secuencia de una clona candidata (no.19) a tener la construcción con la mutación en la caja Prinbow correcta, el mismo procedimiento de

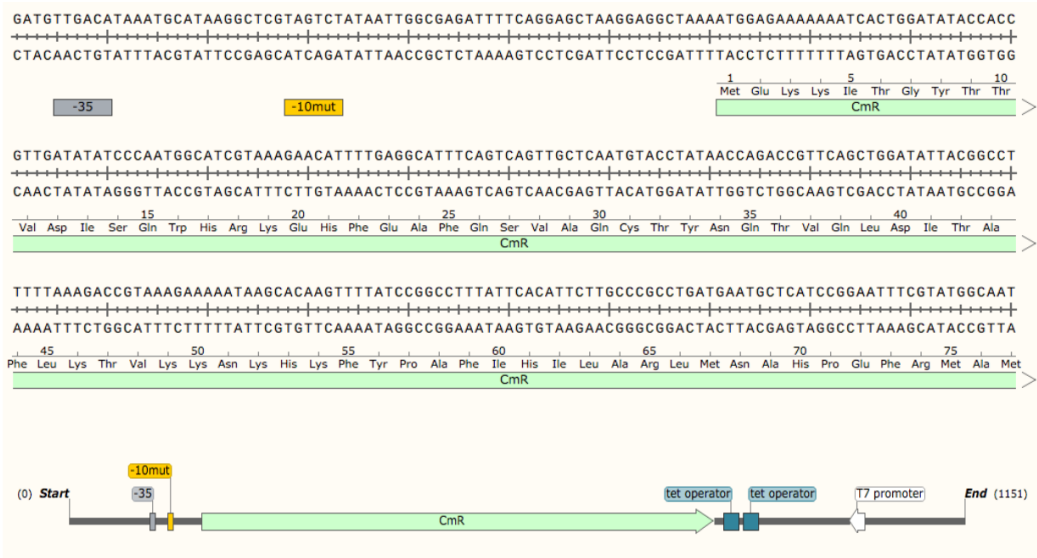


Figura 7.5: Verificación por secuenciación de una de las mutaciones realizadas: Mutación en la caja -10

verificación por secuenciación fue realizado para cada una de las mutaciones generadas.

7.1.8. Concentración del producto de PCR

Las condiciones para amplificar la construcción que se encuentra correctamente conformada y que por ende, permite su subsecuente integración en el cromosoma, son las siguientes: 98°C 3 min, 98 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 5 min, 12 °C 4 min. El producto de PCR se concentró al realizar cuatro reacciones de 100µL cada una y al eliminar el DNA parental con la enzima Dpn1 (37 °C, por toda la noche), evitando así, la existencia de falsos positivos que tengan la construcción en plásmido y no en el cromosoma. Después se prosiguió a purificar por el estuche Thermo™ PCR purification kit.

7.2. Prueba del funcionamiento del sistema de integración

7.2.1. Amplificación del represor de tetraciclina

Para la subsecuente integración de las mutaciones obtenidas y verificadas correctamente por secuenciación, se integró a una cepa silvestre el represor TetR en un plásmido multicopia, con la finalidad de comparar la tasa de unión del represor en monocopia vs. multicopia al sitio del operador del pTet y determinar si existe un cambio en el rango de control de regulación del sistema. Los resultados obtenidos mostraron la presencia de un mayor número de colonias en la cepa con el represor en multicopia que en la cepa con una copia (XL1blue). Esto obedece fundamentalmente a que la concentración de TetR en multicopia excede los sitios de unión blanco, lo que disminuye su tasa de pérdida y por ende hay mayor probabilidad de unión a su sitio blanco. En contraste, la cepa con una copia tiene una tasa de pérdida mayor. Este resultado es importante, ya que al tener un excedente del factor de transcripción, la probabilidad de unión con el sitio regulatorio (operadores) aumenta, así como el rango de control. Como uno de los resultados de lo anterior, existe un mayor número de colonias recombinantes.

Para la amplificación del represor de Tetraciclina (TetR), el cual se encuentra en episoma, se utilizó como templado el DNA genómico de la cepa XL1-Blue, su amplificación consistió en la extensión de un promotor constitutivo. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes 98 °C 3 min, 98 °C 30 s, 71 °C 30 s, 72 °C 5 min, 12 °C 4 min. La extensión y amplificación del represor de TetR se observa en la siguiente figura, con un tamaño final de 708 pb:

7.2.2. Integración cromosómica de la construcción completa por el método de recombinación de Dansenko-Wanner.

Una vez, concentrado y purificado el producto de PCR (alrededor de 75ng/ μ L) con la construcción sin errores, se integró en la región escogida del cromosoma (*tisB*). Con

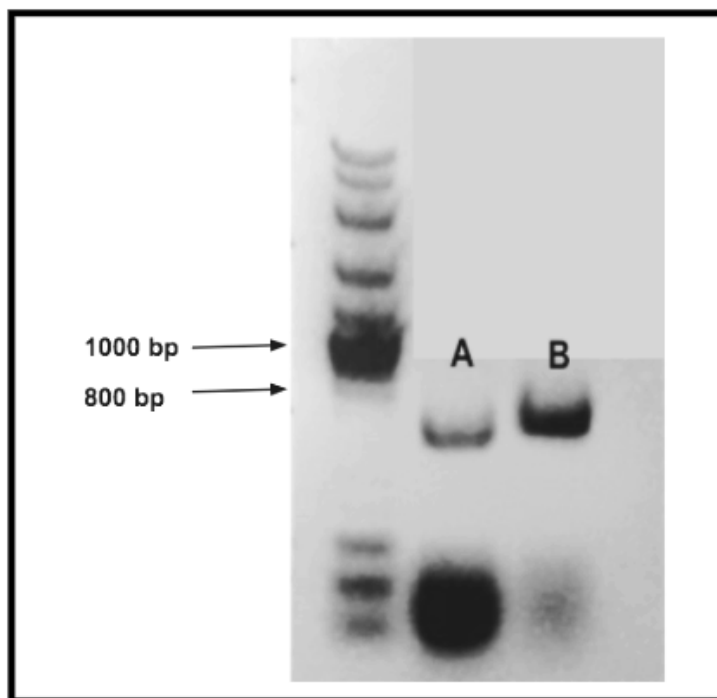


Figura 7.6: Extensión del promotor constitutivo y amplificación del gen TetR A) amplificación de TetR B) Extensión del promotor.

este objetivo se utilizó el plásmido pKD46 con las recombinasas del fago lambda-red que funcionan promoviendo la recombinación en la bacteria. El plásmido es inducible por el promotor de arabinosa, además de ser termosensible al incubar las células en un rango de 37°C a 42 °C. Para iniciar el proceso de integración, se crecieron las cepas silvestres WG1655 y W3110 con el plásmido pKD46 toda la noche, en medio líquido LB 200µg/mL de ampicilina. Al día siguiente se inoculan 1000 µL del cultivo de la noche anterior en un matraz con 200 mL con medio YENB libre de sales, con ampicilina 200 µg/mL y arabinosa 1M a una temperatura de 30°C. La cepa se creció hasta llegar a una OD600nm igual a 0.6. Se prosiguió a concentrar las células y lavarlas 2 veces con 50 mL de agua fría, es opcional y para su almacenamiento a -70°C se pueden lavar con un volumen mínimo de glicerol al 10 %. Una vez lavadas, las células se concentran en el menor volumen posible de agua (alícuotas de 60 µL), para después transformarlas con una concentración del producto de PCR a integrar de aproximadamente 75ng/µL. Las células se recuperaron en medio SOC por un periodo de 3 horas a una

noche (teniendo mejores resultados cuando las células se recuperando por un periodo de 12 horas) y se seleccionaron en medio sólido con Cm a una concentración mínima de $5\mu\text{g}/\text{mL}$. Es importante mencionar que para la determinación de la concentración mínima necesaria para una selección positiva de cloranfenicol, evitando la obtención de falsos positivos, se realizó una prueba de crecimiento en medio sólido con la cepa silvestre W3110, para una curva de aumento de concentración de antibiótico de 1, 2.5, 5, 10 y $15\mu\text{g}/\text{mL}$, lo que reflejó que la concentración mínima óptima en la que no existe crecimiento de las cepas silvestres es de $5\mu\text{g}/\text{mL}$. Así el crecer las cepas con la integración a partir de $5\mu\text{g}/\text{mL}$ de cloranfenicol, permite sustentar que las colonias que se forman son verdaderas positivas (con la integración en el cromosoma) y no posibles mutaciones en el promotor sentido del gen de resistencia que podrían surgir debido a la presión que el ambiente con antibiótico promueve, ya sea por azar o al ser oportunas en el ambiente en el que se encuentran las células.

Una vez verificada la secuencia y analizada por restricción, la integración en el lugar correcto fue analizada por medio de un PCR con oligos en regiones externas al lugar donde ocurrió la recombinación. El control negativo de la integración se realizó en cepas silvestres como se observa en la figura 7.7, las colonias con la integración en la región correcta deben tener un tamaño aproximado de 1,414bp.

Finalmente, para probar los efectos de las mutaciones en el promotor codificante para el gen de cloranfenicol, se realizó la prueba de inducción del promotor en antisentido con anhidrotetraciclina. Para lo cual, se creció la cepa silvestre y ambas cepas con el sistema (XL1-Blue y W3110) propuesto, con el objetivo de observar una diferencia marcada en el crecimiento en el antibiótico correspondiente, esperando una falta de crecimiento notorio en la cepa W3110 con el sistema y sus respectivas mutaciones, sin embargo, la sensibilidad esperada no fue observada. Dicha prueba fue realizada como se muestra en la figura 7.8.

Debido a los eventos observados en las cepa W3110 con el represor TetR en multicopia, de la figura 7.11 existe la probabilidad de que debido a que el promotor en sentido sigue siendo fuerte, 1. secuestre la maquinaria de transcripción evitando así el inicio de la transcripción en el promotor antisentido, 2. no se forme adecuadamente

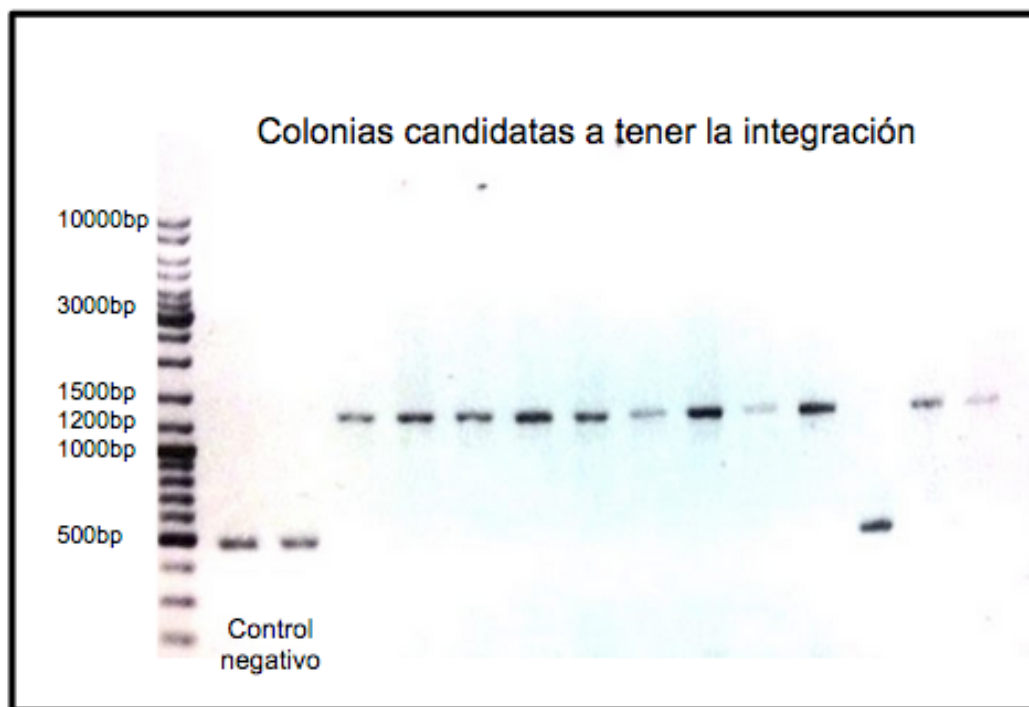


Figura 7.7: Amplificación por PCR de las colonias candidatas de haber integrado la construcción en la región 3' UTR del gen *tisB*.

el dúplex de RNA y 3. que el proceso de elongación del promotor fuerte pase por el promotor más débil evitando su transcripción, esto obedece a su vez a la existencia de una oclusión o por una colisión (*sitting duck*).

Para determinar a mayor detalle cual de los mecanismos es el causante del crecimiento en la cepa con la integración y las debidas mutaciones en el promotor sentido, sería interesante en el caso posible número 1, mencionado anteriormente, colocar ambos promotores divergentes y con ayuda de un marcador (ej. *lacZ*) medir la tasa de transcripción, de tal forma que debería pasar lo mismo o haber una mayor tasa de transcripción en el promotor en sentido con respecto al promotor en antisentido o débil, así se podría concluir que existe un secuestro en la maquinaria de transcripción.

Por otro lado, con la técnica de primer extension es posible determinar si en el sistema, esta sucediendo el fenómeno de *sitting duck*, en donde en el promotor fuerte se espera un mayor número de intermediarios de inicio de la transcripción en contraste con el promotor débil y concluir definitivamente la ocurrencia de la oclusión de un

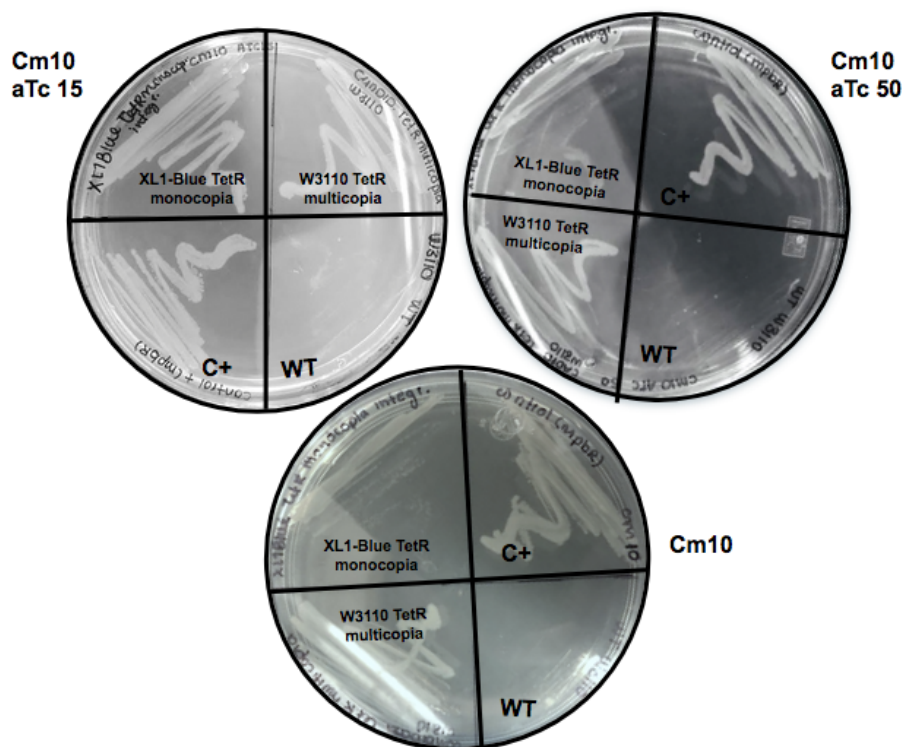


Figura 7.8: Prueba de inducción del promotor en antisentido para el silenciamiento del gen de resistencia a cloranfenicol, al agregar anhidrotetraciclina en dos concentraciones, arriba a la izquierda aTc 15 ng/ μ L, arriba derecha aTc 50 ng/ μ L, abajo control con Cm 10 mg/ μ L.

promotor sobre el otro.

Finalmente, es muy probable que el fenómeno observado no se deba a la existencia de un obstáculo estérico ya que, de acuerdo con Callen *et al* (2005) cuando la distancia entre promotores convergentes es de entre 64 a 164bp no hay obstáculos estéricos, por lo tanto, en el presente modelo donde existe una distancia de 700 pb tampoco debería existir.

7.3. Construcción de un plásmido con las recombinasas del fago lambda bajo un promotor inducible pLac.

Es importante mencionar que en el presente trabajo la aplicación del protocolo para recombinación homóloga en el cromosoma de *Escherichia coli* según Dansenko & Wanner presento una serie de complicaciones en la obtención de recombinantes verdaderas positivas para la integración en la localización correcta, lo que derivó en la creación de modificaciones que permitieron en principio obtener un mayor número de las mismas, con la construcción completa en el lugar correcto del cromosoma.

Las modificaciones de forma general se enfocaron en la concentración de DNA necesario para integrar (aproximadamente 75ng/ μ L), el volumen o cantidad de células competentes necesarias para inducir la recombinación satisfactoriamente, el manejo de las mismas durante el procedimiento de lavado (sólo con agua), además de la temperatura y tiempo de recuperación después de la electroporación de las células, la concentración de arabinosa agregada al medio, (siendo 1M la mejor concentración necesaria para inducir la expresión de las recombinasas del plásmido pKD46) y, finalmente, la concentración de antibiótico en el medio sólido para selección de colonias. En la figura 13.1 del anexo 5 se muestran las mejores condiciones que se establecieron para obtener una integración exitosa basados también en los cambios generados por Serra-Moreno *et. al.*, (45)

Ahora bien, cada uno de estos pasos en el protocolo convencional sufrieron de mo-

dificaciones que permitieron generar satisfactoriamente las recombinantes requeridas. Sin embargo, el uso de este plásmido (pKD46) presenta una serie de obstáculos que se relacionan con su termosensibilidad a 37 °C. Su origen de replicación de bajo número de copias, lo que se asocia con una dificultad en la inducción de la transcripción de las recombinasas del sistema lambda-red, resultando así, la cantidad de arabinosa fundamental en su producción esto tiene efectos directos en la tasa de producción de las enzimas cuando el inductor se encuentra saturado en el medio, ya que la subsaturación provoca la aparición de dos subpoblaciones: aquellas inducidas y sin inducir, por lo que la preferencia de carbono (es decir, glucosa) permite un mayor grado de regulación que no ofrece el promotor *araC*-pBAD, esto debido básicamente al proceso de represión de carbono por catabolito (46).

Tomando en cuenta estas dificultades, se planteo la generación de un plásmido con el sistema de recombinasas del fago lambda-red bajo el promotor de Lac, el cual es inducible por IPTG y permite un grado de control que no depende del número de copias del plásmido, además de evitar el problema relacionado con la búsqueda de la concentración mínima necesaria para inducir la expresión del sistema.

Por otro lado, la clonación de las recombinasas en un vector de mayor número de copias, no termosensible, además de ser inducible por IPTG permitiría acoplar la inducción de la recombinación cromosómica con el funcionamiento del sistema múltiple de integración, al observar la sensibilidad al antibiótico en cuestión y seleccionar el fenotipo deseado, sin perder el plásmido a través de múltiples generaciones.

7.3.1. Amplificación de las recombinasas del vector PKD46 y adición de Shine-Dalgarno.

El vector pKD46 con las recombinasas del fago lambda fue utilizado como templado para la amplificación de las mismas, la reacción de PCR consistió en 98 °C 4 min, 98°C 30 s, 62 °C 35 s, 72 °C 1:30 min, 72 °C 10 min y 12 °C 4 min. Una vez obtenidas las recombinasas del vector se purificó el producto de PCR con el uso del estuche FavorPrepTM Gel/PCR Purification. El tamaño esperado de los genes que

codifican para las enzimas es de 1,906 bp. Ahora bien, como las recombinasas purificadas carecían de la secuencia Shine-Dalgarno, ésta se incorporó por medio de PCR, con las condiciones 98 °C 3 min, 98 °C 30 s, 71 / 68 °C 30 s, 72°C 35 s, 72 ° C 10 min y 12 °C 4 min, la extensión de la secuencia de reconocimiento del ribosoma para las recombinasas se puede observar figura 14.3 del Anexo 7.

7.3.2. Clonación de las recombinasas en el vector ZERO-Blunt.

Una vez que se purificó el fragmento de la amplificación de las recombinasas del fago lambda-red con su respectiva secuencia de unión al ribosoma, lo siguiente fue en clonarlas en el vector del estuche de clonación Zero BluntTM PCR Cloning Kit, de acuerdo con las especificaciones estandarizadas, la selección se hizo en el antibiótico correspondiente, es decir; kanamicina 30 mg/mL.

7.3.3. Confirmación por restricción de la presencia de las recombinasas y de su orientación.

La confirmación de la presencia en la correcta orientación de las recombinasas en el vector Zero BluntTM, se realizó por medio de una restricción doble, con las enzimas *EcoRV* y *BamHI* con dos fragmentos de tamaño 1,936 pb para las recombinasas en la orientación esperada y 3455 pb para el resto del vector. La restricción de plásmidos candidatos se puede observar en la figura 14.4 del anexo 7.

Capítulo 8

Conclusiones

- En el presente trabajo, para la generación de un sistema que permitiera el silenciamiento del gen de resistencia a cloranfenicol, se construyó un sistema sintético en el cual, el nivel de regulación obedece a la ocurrencia de dos posibles eventos 1. la interferencia transcripcional derivada de la colisión de RNA polimerasas y/o 2. la generación de un dúplex de RNA por medio de la transcripción del RNA antisentido al gen de resistencia a cloranfenicol. Siendo ambos eventos, producto del posicionamiento de dos promotores convergentes.
- Debido a que no existió ningún silenciamiento del gen de resistencia a cloranfenicol, al inducir el sistema construido con anhidrotetraciclina, se realizaron una serie de mutaciones en el promotor que codifica para el gen de resistencia. Con la finalidad de eliminar la fuerza o afinidad del mismo a la RNA polimerasa, y así permitir que el transcrito codificado en la cadena complementaria titulara las concentraciones del transcrito del gen de cloranfenicol o bien que existiera el evento de colisión transcripcional esperado.
- Las mutaciones realizadas en el promotor en sentido o codificante para el gen de cloranfenicol se probaron en la cepa XL1-Blue obteniendo resultados negativos, por lo que, se transformó una cepa silvestre (W3110) con un plásmido multicopia con el represor de tetraciclina (TetR), evitando el escape del inductor y aumentando el rango de regulación del sistema. Resultando en una mayor

formación de colonias, debido a que a mayor cantidad del represor existe una menor tasa de escape en cuanto a su unión con su blanco (operador TetO). En contraste, la cepa XL1-BLue, la cual contiene el represor de TetR en monocopia disminuyendo el grado de control y el escape del inductor (anhidrotetraciclina) por la bomba de tetraciclina (TetA).

- Finalmente, con la intención de mejorar el protocolo estandarizado de recombinación de Dansenko & Wanner, se generó una serie de modificaciones tanto al procedimiento como al plásmido que posee las recombinasas del sistema lambda-red. Estas modificaciones al procedimiento aumentaron notablemente el número de unidades formadoras de colonia que se obtienen por evento de recombinación (ver figura 13.1 del anexo 5).

Capítulo 9

Perspectivas

Una de las principales perspectivas del presente trabajo, es el realizar las correspondientes mediciones de afinidad por la RNA polimerasa de las mutaciones creadas, para determinar aquella mutación, que reduzca significativamente el nivel de expresión debido a la atenuación o interferencia transcripcional, esto a través de ensayos de expresión (p.ej Cloranfenicol acetyl transferasa (CAT por sus siglas en inglés)). Una vez determinada la arquitectura del promotor que genera un menor nivel de expresión del gen marcador, inducir el promotor antisentido para observar el completo silenciamiento del gen marcador, y por ende, la sensibilidad al antibiótico de la cepa correspondiente.

Como se ha explicado, la construcción de sistemas sintéticos complejos (p.ej. circuitos epigenéticos) requiere de la integración de múltiples genes. Por consiguiente, para probar la capacidad del mismo de integrar regiones de manera sucesiva, múltiple, jerarquizada y eficiente, los siguientes pasos a realizar consistirían en:

1. Realizar una prueba de silenciamiento del gen marcador de antibiótico, bajo la inducción del promotor en antisentido pLac, que codifica para el transcrito en el cadena opuesta. De tal manera que se pueda establecer la concentración correspondiente de [IPTG] inducción, para el silenciamiento del gen de la cadena opuesta.

Una vez, verificadas tanto las concentraciones de inductor, como el silenciamien-

to del gen marcador de antibiótico respectivo,

2. Realizar una prueba de integración de un elemento génico determinado (marcador fluorescente Ds-RED), para comprobar la funcionalidad del sistema en la integración de elementos genéticos.

Otro aspecto fundamental del trabajo es el constante uso de la recombinación homóloga para integrar elementos genéticos e incluso sistemas completos al cromosoma, así la creación del plásmido con las recombinasas bajo un promotor inducible (específicamente pLac) facilita dicha integración, lo que hace necesario,

3. Realizar una comparación de la eficiencia de recombinación entre el plásmido pKD46 y el plásmido con las recombinasas del fago lambda-red bajo un promotor inducible (pLac), se propone medir dicha eficiencia cuantitativamente al recombinar un elemento genético en el cromosoma de *E.coli*.
4. Finalmente acoplar el uso del nuevo plásmido generado que tiene las recombinasas del sistema lambda-red con la inducción del silenciamiento del gen de resistencia, con IPTG para la construcción de un sistema sintético nuevo.

Capítulo 10

Anexo 1: Secuencias de Oligonucleótidos utilizados

Cuadro 10.1: Secuencias de oligonucleótidos utilizados en el presente trabajo

ID	Secuencia
PF_P17_OUT	AAA CCG CTC CCC TTT TAT ATT TAG CGT GCG GGT TGG TGT CGG ATG CGA TGT TGA CAT AAA TGC ATA AGG CTC GTA TAA TTT GGC GAG
PF_P171819_INN	GCA TAA GGC TCG TAT AAT TTG GCG AGA TTT TCA GGA GCT AAG GAG GCT AAA ATG GAG AAA AAA ATC ACT GGA TATA CCA CCG
PR_TETR_INN	GCG GAT AAA GTA TCT CTA TCA CTG ATAG GGA TGT CAA TCT CTA TCAC TGAT AGGG ATTA CGC CCC GCC CTA TCA GTG ATAG AGA TAC TTT ACG CCC CGC CCT GCC ACT CTG C
PR_TETR_OUT	TAAACAAAAGCG GCA ATA AAT GTT GCC GGG AGA GAT GGT AGG GCG GAT AAT CCC TA
TETR_MIDDLE	GAT GGT AGG GCG GAT AAT CCC TAT CAG TGA TAG AGA TTG ACA TCCC
PF_P18_OUT	AAA CCG CTC CCC TTT TAT ATT TAG CGT GCG GGT TGG TGT CGG ATG CGA TGTT GAC ATT AAA TGC ATA AGGC TCGT ATAA TTT GGCG AG
PF_P19_OUT	AAA CCG CTC CCC TTT TAT ATT TAG CGT GCG GGT TGG TGT CGG ATG CGA TGT TGA CAT TAT AAT GCA TAA GGC TCG TAT AAT TTG GCG AG
PF_P20_INN	AAT GCA TAAG GCT CGT ATA ATT TGG CGA GAT TTT CAG GAG CTA AGG AGG CTA AAA TGG AGAA AAA AAT CAC TGG ATA TAC CAC CG
PF_P20_OUT	AAA CCG CTC CCC TTT TAT ATT TAG CGT GCG GGT TGG TGT CGG ATGC GAT GTT GAC ATT ATT AAT GCA TAA GGC TCG TATA ATTT GG CG
PF_cm_100 8532	GCT GGC GAT TCA GGT TCA TCA TGC CG
F_SR_TisB 10362	CTT AAC CCC GCG TGA GCA C
R_SR_TisB 10363	TAA TTA GAA TAA GTC ACT ACG CAT TCC CAT AAA TGC
LACI_INN 7913	TAA ATG TGA GCG GAT AAC ATT GAC ATT GTG AGC GGA TAA CAA GAT ACT TTA CGC CCC GCC CTG CCA CTC
F_SR_80 10009	CAG ATT CAA GTC GCA CCA AAG GGG AGC GGG AAA CCG CTC CCC TTT TAT ATT TAG CG
80_SR_GOOD	CAG ATT CAA GTC GCA CCA AAG GGG AGC GGG AAA CCG CTC CCC TTT TAT ATT TAG CG

Capítulo 11

Anexo 2: Plásmidos & Cepas utilizadas

Cuadro 11.1: Cepas utilizadas en el presente trabajo.

Cepa	Genotipo	Uso
XL1-Blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [FproAB lacIq Z δ M15 Tn10 (Tetr)].	Esta cepa fue utilizada para la integración de la construcción y también para la amplificación del gen TetR.
WG1655	K-12 F ⁻ λ ⁻ ilvG ⁻ rfb-50 rph-1	Cepa utilizada para las integraciones control y la inserción de vectores. Integración de TetR
W3110	F ⁻ λ ⁻ rph-1 INV(rrnD, rrnE)	Cepa utilizada para las integraciones control y la inserción de vectores. Integración de TetR
DH5 α	F ⁻ endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG purB20 ϕ 80dlacZ δ M15 δ (lacZYA-argF)U169, hsdR17(rK ⁻ mK ⁺), λ ⁻	Cepa utilizada para las integraciones control y la inserción de vectores.

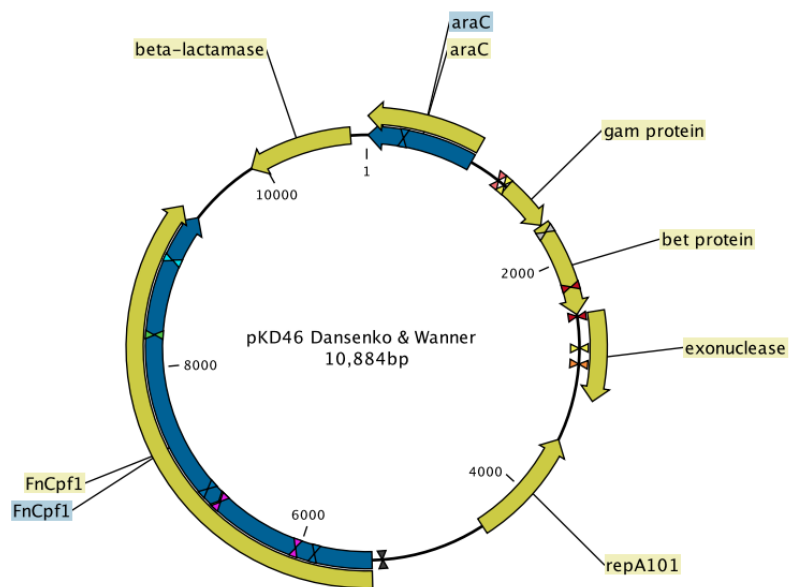


Figura 11.1: Vector pKD46 con el sistema de recombinasas del fago lambda-red.

11.0.1. Plásmidos

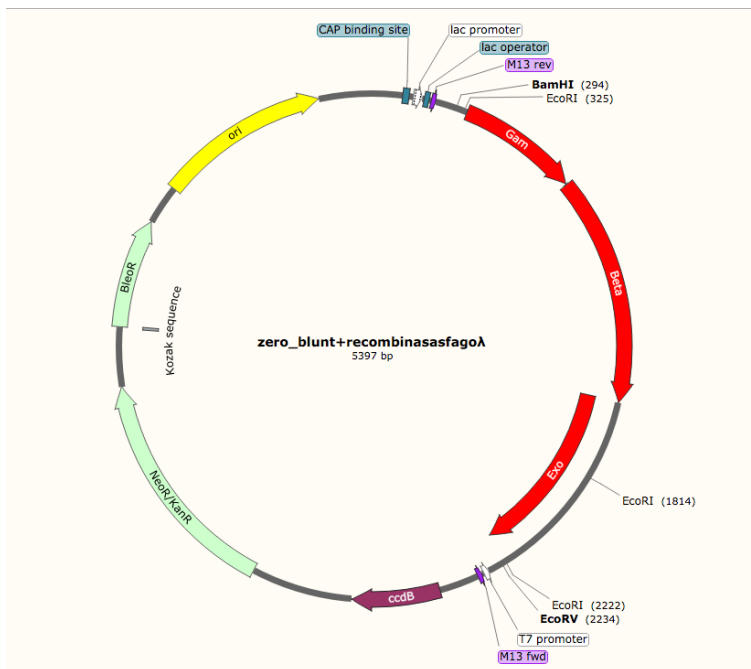


Figura 11.2: Plásmido :PCR Zero blunt con las recombinasas del fago lamnda-red

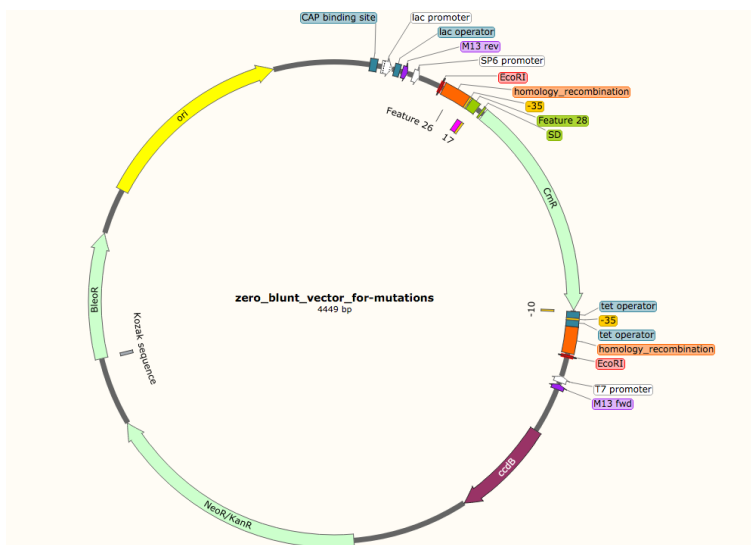


Figura 11.3: Vector PCR Zero blunt para generación de mutaciones en el promotor sentido

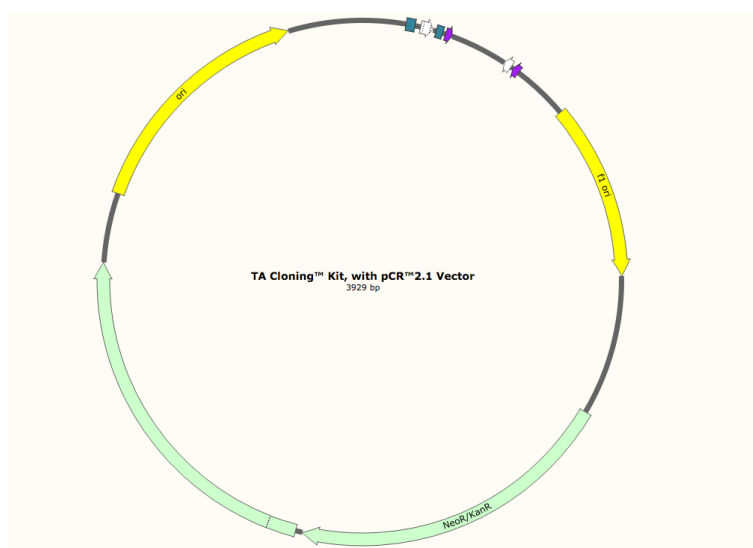


Figura 11.4: Vector TA Cloning™ Kit, with pCR™2.1 para la clonación durante la construcción del módulo antisentido

Capítulo 12

Anexo 3: Almacenamiento de cepas en glicerol

En condiciones de completa esterilidad:

1. A 1.5 mL de cultivo bacteriano, añadir 0.5mL de glicerol estéril al 60 %.
2. Para asegurar que el glicerol se mezcle con el cultivo correctamente agitar con vórtex.
3. Transferir el cultivo con glicerol a un tubo especial para congelamiento a -70°C .
4. Congela el tubo con hielo seco o nitrógeno líquido y transferir a -70°C para su almacenamiento.
5. Para recuperar el cultivo, con un asa de cultivo, después de descongelar, tomar una pequeña porción del tubo y estriar en una caja petri con LB y el antibiótico apropiado e incubar a 37°C . Regresar el cultivo a almacenamiento de -70°C .

Capítulo 13

Anexo 4: Extracción de DNA con el uso de Fenol.

13.0.1. Equilibración de fenol:

Antes de usar fenol es importante que este equilibrado a un pH >7.8 , pues el DNA tiende a particionarse en la fase orgánica cuando el pH es ácido. Es importante usar lentes y guantes como protección.

1. Almacenar el fenol a -20°C , cuando sea necesario usarlo colocarlo a temperatura ambiente. Añadir hidroxiquinolina a 0.1%. Este compuesto actúa como antioxidante y es un inhibidor parcial de RNasa, además también puede funcionar como quelante de metales. El color amarillo del mismo permite distinguir entre la fase orgánica e inorgánica.
2. Añadir un volumen de 0.5 M Tris-Cl (pH 8.0), mezclar la solución con un magneto. Cuando se termine de mezclar, dejar reposar la solución y cuando se distingan ambas fases, tomar la superior del fenol.
3. Añadir un volumen de 0.1M Tris-Cl (pH 8.0), al fenol. Mezclar con un magneto por aproximadamente 15 min y remover la fase superior de la mezcla con fenol, repetir las extracciones hasta que el fenol este equilibrado a un pH >7.8 .

4. Después de que el fenol este equilibrado y que la fase acuosa se haya removido, añadir 0.1 volmen de 0.1M Tris-Cl (pH 8.0) + 0.2% de mercaptoetanol. Se debe almacenar en una botella obscura a 4°C por periodos de hasta 1 mes.

13.0.2. Extracción con cloroformo:fenol:alcohol isoamílico.

La mezcla debe contener partes iguales de fenol:cloroformo y una propoción 24:1 de cloroformo:alcohol isoamílico, el cual es frecuentemente utilizado para remover proteínas de preparaciones de ácidos nucleicos. El cloroformo desnaturaliza las proteínas y facilita la separación de la fase orgánica y el alcohol isoamílico evita que se genere espuma en la solución.

Capítulo 14

Anexo 5: Protocolo Recombinación Dansenko-Wanner:

14.0.1. Preparación del inserto a recombinar:

- Preparar 10 reacciones de PCR de $100\mu\text{L}$ c/u para tener una mayor concentración de DNA.
- Mezclar el contenido de los 10 tubos de PCR en 2 tubos eppendorf (1.5mL).

14.0.2. Dansenko-Wanner:

1. Dos días antes estriar la cepa receptora con el pKD46 para la recombinación en cajas de LB con ampicilina, incubar a 30 C (es importante que la cepa este fresca).
2. Inocular una colonia en 5mL de LB + amp a 30 C.
3. Inocular $500\mu\text{L}$ del preinoculo en 100mL de SOB+ amp a 30 C + 7.5mL de L-arabinosa 1M.
4. Incubar a 30 C hasta una $\text{OD}_{600_n_m} = 0.6-0.7$
5. Centrifugar las células 10 min a 8 000 rpm 4°C

6. Lavar 2 veces con 50 mL de agua fría
7. Lavar 1 vez con glicerol 10 % frío.
8. Resuspender las células en 1000 μ L de glicerol al 10 % frío y transferir a un tubo eppendorf de 1.5 mL
9. Centrifugar 3 minutos a 13 000 rpm y resuspender en 360 μ L (agua)
10. Hacer alícuotas de 60 μ L.

14.0.3. Electroporación:

1. A partir de la alícuota de células competentes agregar de 3-5 μ L del fragmento de PCR previamente concentrado.<https://es.overleaf.com/project/5dd553be342db200018fad18>
2. Añadir 1mL de medio SOC y recuperar después de 3hr a 30°C (opcionalmente dejar ON a 30°C).
3. Concentrar las células y plaquear todo en placas de LB con el antibiótico correspondiente e incubar a 42°C
4. Picar 100 colonias en placas de LB con el antibiótico correspondiente e incubar a 42°C
5. Dar 2 pases de 42°C en placas de LB con el antibiótico específico con la finalidad de perder el pKD46.
6. Incubar una colonia candidata en un 5mL de LB con antibiótico a 37°C y una colonia de la cepa WT sin el antibiótico como control.

14.1. Modificaciones al protocolo convencional de integración Dansenko & Wannner

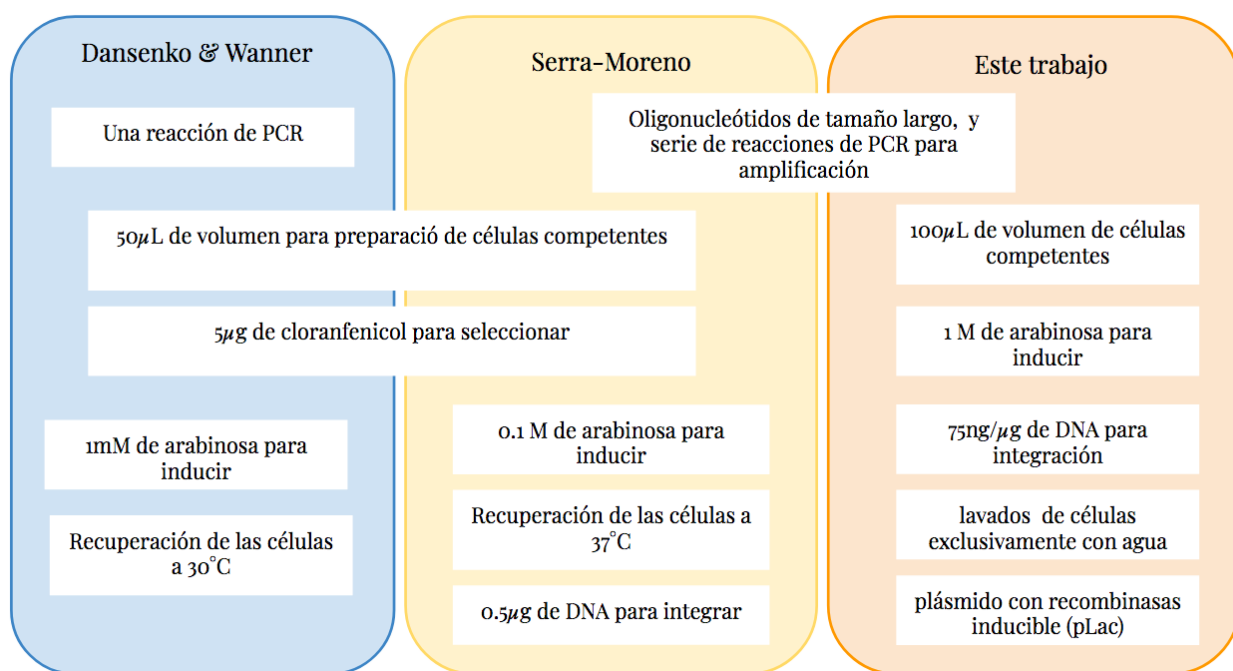


Figura 14.1: Cambios al protocolo de integraci3n crom3s mica de Dansenko & Wanner, (43) en el panel amarillo se muestran las modificaciones correspondientes al grupo de Serra-Moreno (45). Finalmente en el panel naranja los cambios al protocolo realizados en el presente trabajo.

Capítulo 15

Anexo 7: Reacciones de amplificación por PCR

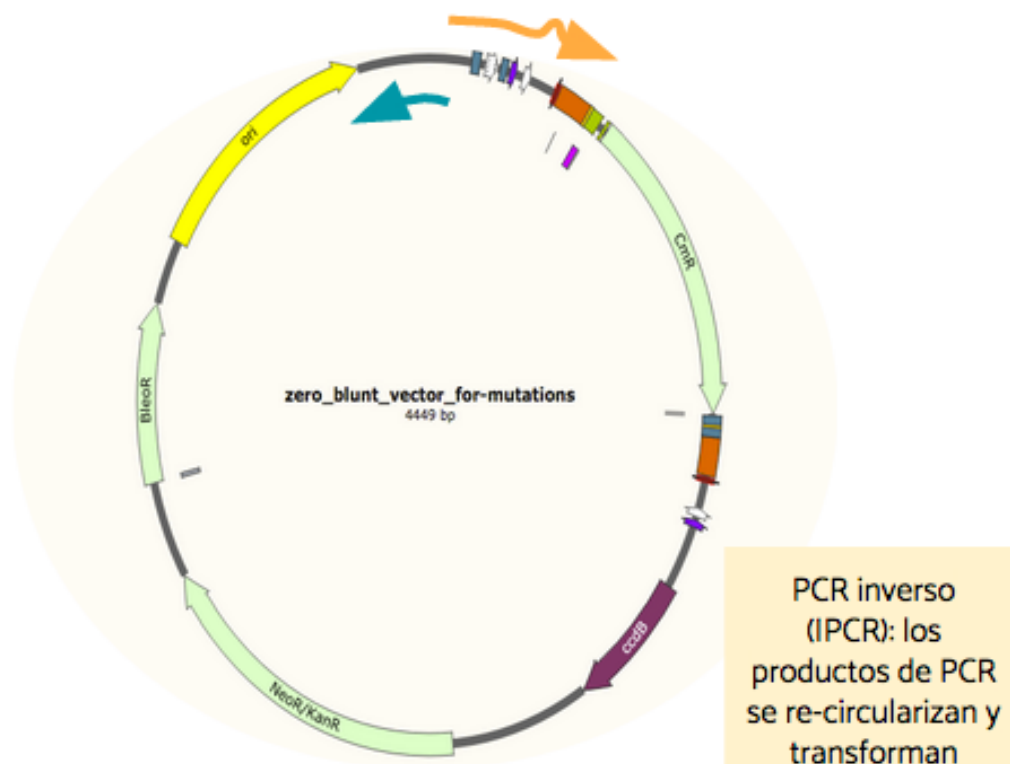


Figura 15.1: Representación del método y el vector utilizado para la generación de mutaciones puntuales en el promotor en sentido, por medio de amplificación por PCR inversa o vuelta del vector (uso de oligos que se encuentran en los dos extremos terminales), para después re-circularizar el vector y transformarlo en células competentes.

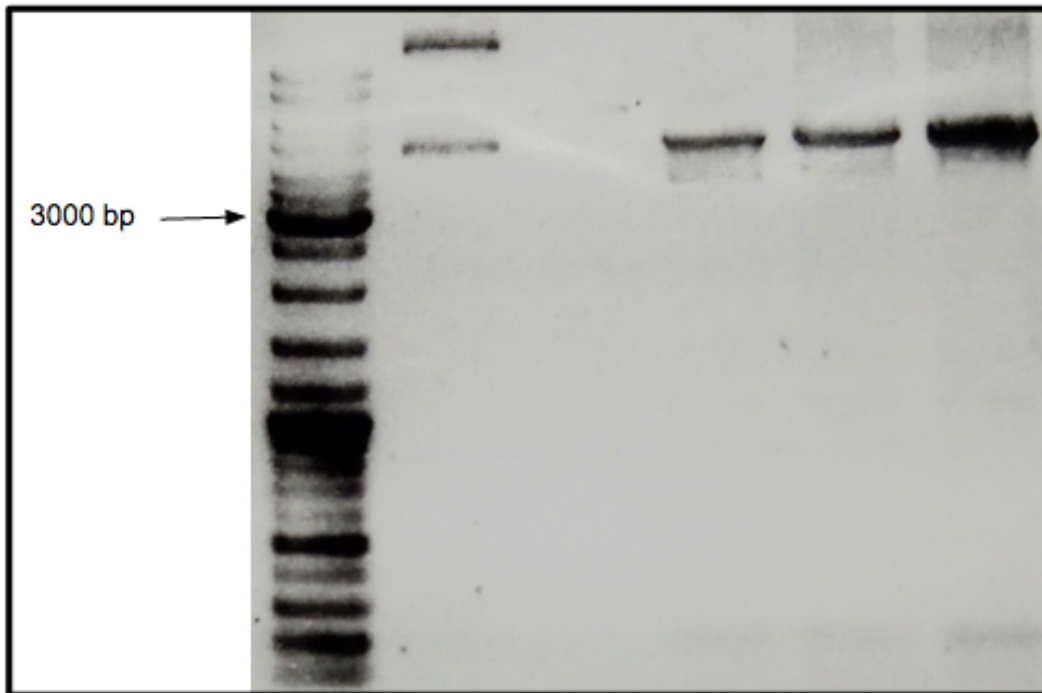


Figura 15.2: Gel de agarosa al 1 % en donde se muestran los productos de PCR vuelta para mutagénesis de las cajas -10, -10, -35 (desde el carril no.3, respectivamente) del promotor sentido, el PCR se realizó en el vector blunt con la construcción clonada

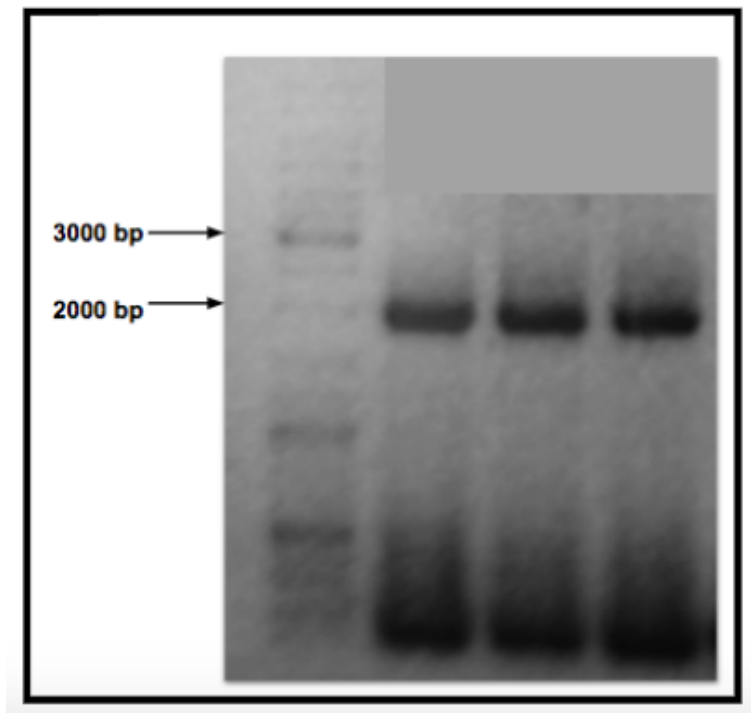


Figura 15.3: Gel de agarosa 1 % que muestra los productos de PCR con la extensión del Shine Dalgarno para las recombinasas del vector del fago lambda.

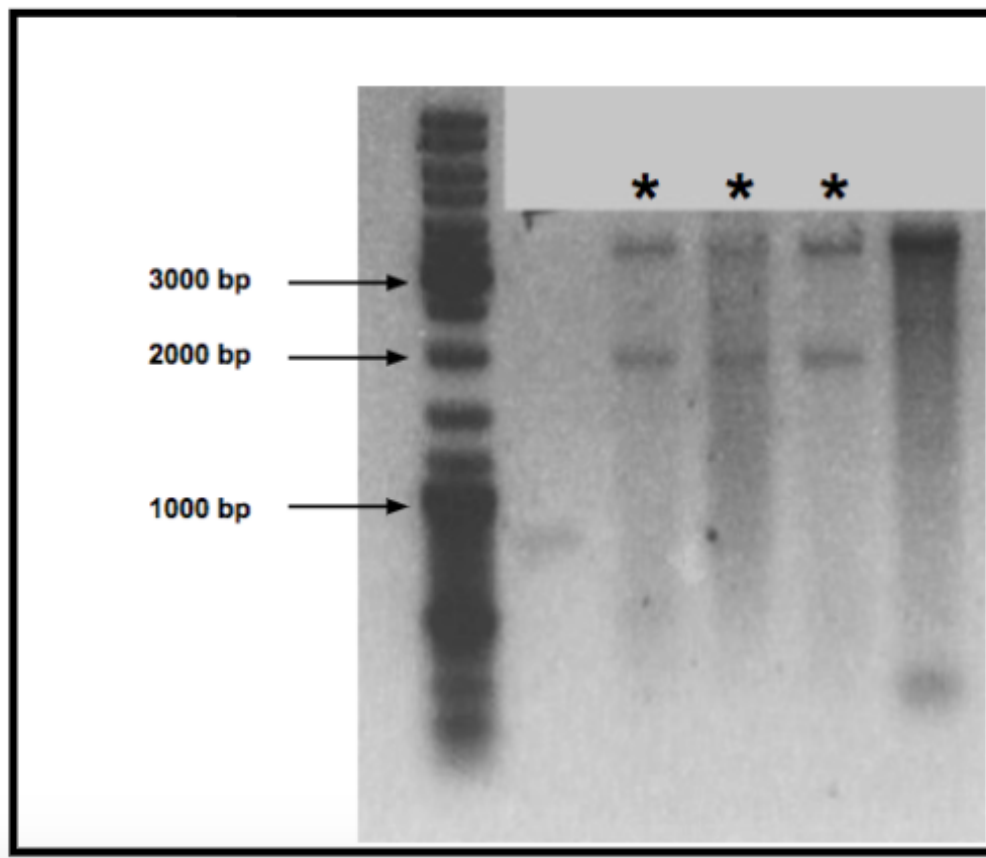


Figura 15.4: Gel de agarosa al 1%. Muestra los fragmentos de doble digestión del vector Zero Blunt™ con las recombinasas del fago lambda, los asteriscos sobre los carriles señalan aquellas clonas, en donde el plásmido tiene la correcta orientación de las recombinasas (después del promotor pLac)

Capítulo 16

Anexo 8: Soluciones y Medios

LB

10g NaCl

5g Extracto de levadura.

10g Triptona

1L agua miliQ

Esterilizar en autoclave

SOC (Super Optimal broth with Catabolic repressor)

2g Bacto Triptona

0.5 g Extracto de levadura

0.05g NaCl

Disolver en 75ml de H₂ O

1mL de KCl 250 mM

Ajustar pH 7 - NaOH 4M

Aforar con 100mL de agua miliQ

Esterilizar en autoclave

YENB

Extracto de levadura

Nutrient Broth

NaOH

Reactivos:

1. IPTG 25mg/mL
2. X-GAL 25mg/mL
3. Anhidrotetraciclina 50mg/ μ L

La realización de esta tesis recibió el apoyo técnico de la M. B. Maria Luisa Tabche, Técnica Académica del Instituto de Biotecnología - UNAM

Bibliografía

- (1) Cameron, D. E., Bashor, C. J. y Collins, J. J. (2014). A brief history of synthetic biology. *Nature Reviews Microbiology* 12, 381.
- (2) Khalil, A. S. y Collins, J. J. (2010). Synthetic biology: applications come of age. *Nature Reviews Genetics* 11, 367.
- (3) Elowitz, M. B. y Leibler, S. (2000). A synthetic oscillatory network of transcriptional regulators. *Nature* 403, 335.
- (4) Nandagopal, N. y Elowitz, M. B. (2011). Synthetic biology: integrated gene circuits. *science* 333, 1244-1248.
- (5) Brophy, J. A. y Voigt, C. A. (2014). Principles of genetic circuit design. *Nature methods* 11, 508.
- (6) Gyorgy, A. y Del Vecchio, D. (2014). Modular composition of gene transcription networks. *PLoS computational biology* 10, e1003486.
- (7) Brewster, R. C., Weinert, F. M., Garcia, H. G., Song, D., Rydenfelt, M. y Phillips, R. (2014). The transcription factor titration effect dictates level of gene expression. *Cell* 156, 1312-1323.
- (8) Del Vecchio, D., Qian, Y., Murray, R. M. y Sontag, E. D. (2018). Future systems and control research in synthetic biology. *Annual Reviews in Control* 45, 5-17.
- (9) Garcia, H. G., Sanchez, A., Kuhlman, T., Kondev, J. y Phillips, R. (2010). Transcription by the numbers redux: experiments and calculations that surprise. *Trends in cell biology* 20, 723-733.

- (10) Engler, C., Kandzia, R. y Marillonnet, S. (2008). A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability. *PloS one* 3, e3647.
- (11) Gibson, D. G., Young, L., Chuang, R.-Y., Venter, J. C., Hutchison III, C. A. y Smith, H. O. (2009). Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature methods* 6, 343.
- (12) Engler, C. y Marillonnet, S. en *DNA cloning and assembly methods*; Springer: 2014, págs. 119-131.
- (13) Kahl, L. J. y Endy, D. (2013). A survey of enabling technologies in synthetic biology. *Journal of biological engineering* 7, 13.
- (14) Casini, A., Storch, M., Baldwin, G. S. y Ellis, T. (2015). Bricks and blueprints: methods and standards for DNA assembly. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 16, 568.
- (15) Chao, R., Yuan, Y. y Zhao, H. (2015). Recent advances in DNA assembly technologies. *FEMS yeast research* 15, 1-9.
- (16) Lee, T. S., Krupa, R. A., Zhang, F., Hajimorad, M., Holtz, W. J., Prasad, N., Lee, S. K. y Keasling, J. D. (2011). BglBrick vectors and datasheets: a synthetic biology platform for gene expression. *Journal of biological engineering* 5, 12.
- (17) Anderson, J., Dueber, J. E., Leguia, M., Wu, G. C., Goler, J. A., Arkin, A. P. y Keasling, J. D. (2010). BglBricks: A flexible standard for biological part assembly. *Journal of biological engineering* 4, 1.
- (18) Litcofsky, K. D., Afeyan, R. B., Krom, R. J., Khalil, A. S. y Collins, J. J. (2012). Iterative plug-and-play methodology for constructing and modifying synthetic gene networks. *Nature methods* 9, 1077.
- (19) Hartley, J. L., Temple, G. F. y Brasch, M. A. (2000). DNA cloning using in vitro site-specific recombination. *Genome research* 10, 1788-1795.
- (20) Horton, R. M., Hunt, H. D., Ho, S. N., Pullen, J. K. y Pease, L. R. (1989). Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene* 77, 61-68.

- (21) Quan, J. y Tian, J. (2009). Circular polymerase extension cloning of complex gene libraries and pathways. *PloS one* 4, e6441.
- (22) Kok, S. d., Stanton, L. H., Slaby, T., Durot, M., Holmes, V. F., Patel, K. G., Platt, D., Shapland, E. B., Serber, Z., Dean, J. y col. (2014). Rapid and reliable DNA assembly via ligase cycling reaction. *ACS synthetic biology* 3, 97-106.
- (23) Shao, Z., Rao, G., Li, C., Abil, Z., Luo, Y. y Zhao, H. (2013). Refactoring the silent spectinabilin gene cluster using a plug-and-play scaffold. *ACS synthetic biology* 2, 662-669.
- (24) Du, J., Yuan, Y., Si, T., Lian, J. y Zhao, H. (2012). Customized optimization of metabolic pathways by combinatorial transcriptional engineering. *Nucleic acids research* 40, e142-e142.
- (25) Nielsen, A. A., Segall-Shapiro, T. H. y Voigt, C. A. (2013). Advances in genetic circuit design: novel biochemistries, deep part mining, and precision gene expression. *Current opinion in chemical biology* 17, 878-892.
- (26) Rhodius, V. A., Segall-Shapiro, T. H., Sharon, B. D., Ghodasara, A., Orlova, E., Tabakh, H., Burkhardt, D. H., Clancy, K., Peterson, T. C., Gross, C. A. y col. (2013). Design of orthogonal genetic switches based on a crosstalk map of σ s, anti- σ s, and promoters. *Molecular systems biology* 9.
- (27) Bradley, R. W., Buck, M. y Wang, B. (2016). Tools and principles for microbial gene circuit engineering. *Journal of molecular biology* 428, 862-888.
- (28) Ramos, J. L., Martinez-Bueno, M., Molina-Henares, A. J., Terán, W., Watanabe, K., Zhang, X., Gallegos, M. T., Brennan, R. y Tobes, R. (2005). The TetR family of transcriptional repressors. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 69, 326-356.
- (29) Wang, B., Kitney, R., Buck, M., Jovanovic, M., Joly, N. y James, E. en *World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering, September 7-12, 2009, Munich, Germany, 2009*, págs. 289-292.

- (30) Wang, B., Barahona, M. y Buck, M. (2014). Engineering modular and tunable genetic amplifiers for scaling transcriptional signals in cascaded gene networks. *Nucleic acids research* 42, 9484-9492.
- (31) Purnick, P. E. y Weiss, R. (2009). The second wave of synthetic biology: from modules to systems. *Nature reviews Molecular cell biology* 10, 410.
- (32) Villa, J. K., Su, Y., Contreras, L. M. y Hammond, M. C. (2018). Synthetic Biology of Small RNAs and Riboswitches. *Microbiology spectrum* 6.
- (33) Thomason, M. K. y Storz, G. (2010). Bacterial antisense RNAs: how many are there, and what are they doing? *Annual review of genetics* 44, 167-188.
- (34) Engstrom, M. D. y Pflieger, B. F. (2017). Transcription control engineering and applications in synthetic biology. *Synthetic and systems biotechnology* 2, 176-191.
- (35) Lutz, R. y Bujard, H. (1997). Independent and tight regulation of transcriptional units in Escherichia coli via the LacR/O, the TetR/O and AraC/I1-I2 regulatory elements. *Nucleic acids research* 25, 1203-1210.
- (36) Reytrat, J.-M., Pelicic, V., Gicquel, B. y Rappuoli, R. (1998). Counters selectable markers: untapped tools for bacterial genetics and pathogenesis. *Infection and immunity* 66, 4011-4017.
- (37) Shearwin, K. E., Callen, B. P. y Egan, J. B. (2005). Transcriptional interference—a crash course. *TRENDS in Genetics* 21, 339-345.
- (38) Georg, J. y Hess, W. R. (2011). cis-antisense RNA, another level of gene regulation in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 75, 286-300.
- (39) Sneppen, K., Dodd, I. B., Shearwin, K. E., Palmer, A. C., Schubert, R. A., Callen, B. P. y Egan, J. B. (2005). A mathematical model for transcriptional interference by RNA polymerase traffic in Escherichia coli. *Journal of molecular biology* 346, 399-409.

- (40) Sesto, N., Wurtzel, O., Archambaud, C., Sorek, R. y Cossart, P. (2013). The excludon: a new concept in bacterial antisense RNA-mediated gene regulation. *Nature Reviews Microbiology* 11, 75.
- (41) Casjens, S. (2003). Prophages and bacterial genomics: what have we learned so far? *Molecular microbiology* 49, 277-300.
- (42) Sharan, S. K., Thomason, L. C., Kuznetsov, S. G., Court, D. L. y col. (2009). Recombineering: a homologous recombination-based method of genetic engineering. *Nature protocols* 4, 206.
- (43) Datsenko, K. A. y Wanner, B. L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, 6640-6645.
- (44) Bharanikumar, R., Premkumar, K. A. R. y Palaniappan, A. (2018). Promoter-Predict: sequence-based modelling of Escherichia coli $\sigma 70$ promoter strength yields logarithmic dependence between promoter strength and sequence. *PeerJ* 6, e5862.
- (45) Serra-Moreno, R., Acosta, S., Hernalsteens, J. P., Jofre, J. y Muniesa, M. (2006). Use of the lambda Red recombinase system to produce recombinant prophages carrying antibiotic resistance genes. *BMC molecular biology* 7, 31.
- (46) Kremling, A., Geiselmann, J., Ropers, D. y de Jong, H. (2015). Understanding carbon catabolite repression in Escherichia coli using quantitative models. *Trends in microbiology* 23, 99-109.