



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Creación de un módulo sintético de comunicación bacteriana mediante redes artificiales de *quorum sensing*

Miguel Ángel Fernández Niño

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias-Departamento de Química

Maestría en Ciencias Bioquímica

Bogotá, Colombia

2011

Creación de un módulo sintético de comunicación bacteriana mediante redes artificiales de *quorum sensing*

Miguel Ángel Fernández Niño

Tesis de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Ciencias-Bioquímica

Directora:

Dr. Rer. Nat. Catalina Arévalo Ferro

Codirector:

PD. Dr. Ingo Dreyer

Línea de Investigación:

Biología y genética molecular de microorganismos

Grupo de Investigación:

Comunicación y comunidades bacterianas

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias-Departamento de Química

Maestría en Ciencias Bioquímica

Bogotá, Colombia

2011

A Aseneth:

A tu aristocrática vocación de mujer
y tu obrera naturaleza de madre

A Anny:

*Todos los colores del mundo caen en tu
par de ojos*

A los profes:

Miletos, Lord Henrys Wotton,
Celestinos y Yepetos

Resumen

Se diseñó una red genética sintética ensamblada de dos unidades sintéticas artificiales: “*repressilators*” acoplados por un circuito modificado de *Quorum-Sensing*. Se monitorearon grupos de células de varios tamaños en donde cada grupo oscila sincrónicamente. Esta red multicelular provee un acercamiento sistémico para explorar cómo una red genera un comportamiento específico.

Palabras clave: *Quorum-Sensing. Repressilator. Biología-Sintética. Sincronización. Fenotipo-poblacional. Vibrio fischeri. Agrobacterium tumefaciens.*

Abstract

We engineered a modular higher-order synthetic genetic network assembled from two independent synthetic units: repressilators coupled via a modified quorum-sensing circuit. We monitored clustering of cells in groups of various size where each group oscillate synchronously. Our artificial multicellular network provides a system framework for exploring how a given network generates a specific behavior.

Keywords: *Quorum Sensing. Artificial gene-regulatory networks. Sintetic Biology. Repressilator. Vibrio fischeri. Agrobacterium tumefaciens*

Contenido

1.	<i>Resumen</i>	1
2.	<i>Introducción</i>	3
3.	<i>Estado del arte y justificación</i>	7
	3.1 Ourrencia natural de osciladores genéticos	7
	3.2 Biología sintética de osciladores genéticos	10
	3.3 Sincronización y comunicación celular	17
	3.4 Modelos para la sincronización de poblaciones celulares	20
4.	<i>Objetivos</i>	23
	4.1 Objetivo general	23
	4.2 Objetivos específicos	23
5.	<i>Metodología</i>	24
	5.1 Diseño de un módulo sintético de comunicación bacteriana	24
	5.2 De <i>in silico</i> a <i>in vitro</i> : Construcción y ensamble de la red modelo	25

5.2.1	Plásmidos empleados	26
5.2.2	Ensamble de la red modelo	28
5.3	De <i>in vitro</i> a <i>in vivo</i> : Inducción de fenotipos en <i>E. coli</i> DH5 α	32
5.3.1	Análisis de la expresión genética y la actividad promotora	33
5.4	Microscopía de fluorescencia	35
6.	Resultados	38
6.1	Topología del módulo sintético de comunicación bacteriana	38
6.2	De <i>in silico</i> a <i>in vitro</i> : Construcción y ensamble de la red modelo	40
6.3	De <i>in vitro</i> a <i>in vivo</i> : Inducción de la expresión de fenotipos en <i>E. coli</i> DH5 α	52
6.4	Inducción de periodos de expresión y ritmos biológicos sintéticos	62
7.	Discusión	70
7.1	De <i>in vitro</i> a <i>in vivo</i> : Inducción de fenotipos en <i>E. coli</i> DH5 α	70
7.1.1	Inducción de la expresión en respuesta a estímulos externos	70
7.1.2	Genotipos defectuosos y fenotipos tramposos	74
7.2	Un nuevo módulo sintético: alcances y retos	76
7.3	Inducción de periodos de expresión y ritmos biológicos sintéticos	89

8.	<i>Ética, seguridad y protección</i>	95
9.	<i>Conclusiones</i>	97
10.	<i>Recomendaciones</i>	99
11.	<i>Bibliografía</i>100

Índice de figuras

Figura 1 Principales modelos para diseñar redes genéticas.	14
Figura 2 Estructura y análisis funcional del módulo " <i>repressilator</i> ".	16
Figura 3 Fenómeno de <i>Quorum Sensing</i> . Sistema de LuxR/I en <i>V. fischeri</i> .	19
Figura 4 Principales modelos para estudiar la sincronización mediante estímulos externos e internos.	21
Figura 5 Modelo de sincronización de osciladores celulares de dos unidades.	24
Figura 6 Estructura del plásmido con el sistema sensor de N-acil homoserín lactona (3-oxo-C6HSL) empleado para la transformación de una cepa de <i>E. coli</i> y creación de una cepa biosensora.	27
Figura 7 Ensayo de producción de bioluminiscencia.	34
Figura 8 Ensayos de inhibición de la bioluminiscencia.	35
Figura 9 Dispositivo empleado en el seguimiento de una población bacteriana (expresión de GFP) a lo largo del tiempo.	37

Figura 10 Modelo rediseñado de sincronización de osciladores celulares de dos unidades.	39
Figura 11 Diagrama de construcción del módulo sintético de comunicación bacteriana representado por el plásmido pCCB9.	40
Figura 12 Arquitectura del plásmido pCCB1 y pCCB5.	41
Figura 13 Creación del plásmido pCCB3 a partir de los plásmidos pCCB1 y pCCB2.	43
Figura 14 Esquema de la creación del plásmido pCCB4 sitios de empalme.	45
Figura 15 Creación del plásmido pCCB4.	46
Figura 16 Arquitectura de los plásmidos pCCB4 y pCCB6.	46
Figura 17 Creación del plásmido pCCB6.	47
Figura 18 Creación del plásmido pCCB7.	48
Figura 19 Creación del plásmido pCCB8.	49
Figura 20 Creación del plásmido pCCB9 módulo sintético de comunicación bacteriana.	50
Figura 21 Esquema del plásmido pCCB9 y diagrama de las interacciones al interior del módulo sintético.	51

Figura 22 Ensayos de bioluminiscencia cepas transformadas con pCCB1 y pCCB5.	53
Figura 23 Ensayos de bioluminiscencia cepa co-transformada con pCCB3 + repressilator.	55
Figura 24 Ensayos de bioluminiscencia cepa co-transformada con pCCB9 + repressilator.	57
Figura 25 Ensayos de inhibición de la bioluminiscencia de la cepa transformada con pCCB6.	59
Figura 26 Ensayos de inhibición de la bioluminiscencia de la cepa transformada con pCCB7.	61
Figura 27 Estandarización de los parámetros empleados en la evaluación por microscopía de fluorescencia.	63
Figura 28 Cepa biosensora pCCB2.	65
Figura 29 Variación en la expresión de proteína verde fluorescente GFP a lo largo del tiempo.	66
Figura 30 Sincronización grupal de los módulos “ <i>repressilator</i> ” y el módulo sintético de comunicación bacteriana (pCCB9).	68
Figura 31 Comparación de la estructura básica de un sistema con comportamiento rítmico y el módulo sintético de comunicación bacteriana.	78

Índice de anexos

Anexo 1 Secuencias de nucleótidos de los genes, promotores y señal para proteasas empleados en el modelo.	107
Anexo 2 Descripción de las cepas construidas.	110
Anexo 3 CD. Video 1. Monitoreo de la expresión del gen <i>gfp</i> en una población bacteriana co-transformada con el módulo sintético de comunicación bacteriana y el módulo “ <i>repressilator</i> ”.	

Abreviaturas

3-oxo-C6HSL	N-(3-Oxohexanoil)-L-homoserin lactona
AHL	N-acil-L-homoserin lactona
AI	Molécula Auto Inductora
CCB	Comunicación y Comunidades Bacterianas
<i>E. coli</i> DH5α	Genotipo cromosómico: <i>fhuA2</i> Δ (<i>argF-lacZ</i>)U169 <i>phoA glnV44</i> Φ 80 Δ (<i>lacZ</i>)M15 <i>gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17</i>
GFP	Del inglés <i>Green Fluorescent Protein</i>
H₂O_{MQ}	Agua Milli-Q
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactósido
is	Inestable, presenta señal para proteasas de <i>E. coli</i>
kpb	Kilopares de bases
LB	Louria-Bertani
MCS	Del inglés <i>Multiple Cloning Site</i>
min	Minutos
mL	Mililitro
ng	Nanogramo
pb	Pares de bases
P_{lacO1}	Promotor del operón Lac
QS	<i>Quorum Sensing</i>
rpm	Revoluciones por minuto
μL	Microlitro
μg	Microgramo

xg

Gravedades

%m/v

Porcentaje masa-volumen

%v/v

Porcentaje volumen-volumen

RESUMEN

Durante la última década un gran número de trabajos se han desarrollado en biología sintética, la mayoría de ellos se han dirigido a diseñar y modelar pequeñas redes sintéticas de baja complejidad que permiten estudiar y predecir el comportamiento de diversas rutas metabólicas complejas con base en un modelo matemático y/o la expresión de estas redes en organismos de fácil manipulación.

Sin embargo, pocos estudios se han centrado en la creación de módulos artificiales que integren componentes extracelulares, como moléculas de señalización y que permitan así estudiar los fenómenos de comunicación y sincronización celular que son de gran importancia para el funcionamiento de grupos celulares como órganos, tejidos ó poblaciones bacterianas.

Dentro de este contexto el presente trabajo tuvo como objetivo la creación de un módulo sintético de comunicación bacteriana mediante el empleo de técnicas de biología sintética que permita modelar y estudiar circuitos de *Quorum Sensing* en poblaciones bacterianas.

La construcción del módulo sintético involucró genes del sistema de *Quorum Sensing* de *Vibrio fischeri* y *Agrobacterium tumefaciens* y elementos promotores regulados por estímulos externos (como el promotor del operón Lac activado por la entrada de IPTG). Estos elementos fueron acoplados mediante sucesivas digestiones y ligaciones enzimáticas con el objetivo de ensamblar *in vitro* un

modelo teórico de comunicación bacteriana, diseñado para inducir ritmos biológicos sintéticos en una población bacteriana mediante la expresión de redes artificiales de *Quorum Sensing*.

Este constructo fue empleado en la transformación de *E. coli* DH5 α lo que permitió monitorear, estudiar y predecir el comportamiento *in vivo* de poblaciones bacterianas que expresaban este módulo de comunicación y presentaban periodos de expresión y ritmos biológicos sintéticos en respuesta a estímulos externos ó al acople con otros módulos sintéticos como el sistema *repressilator*.

INTRODUCCIÓN

Los recientes avances en investigación proteómica y genómica han permitido conocer un mapa completo de los bloques que componen muchos sistemas biológicos. Uno de los grandes retos en la investigación post-genómica es encontrar un método sencillo que permita analizar y describir las interacciones entre estos bloques (gen-proteína, gen-gen, promotor-factor de transcripción, etc.) y poder estudiar la dinámica y el comportamiento de estas redes moleculares complejas (cascadas de señalización). Varios estudios han permitido una descripción modular de estas redes, sin embargo tratar de responder a la pregunta ¿cómo una red biomolecular funciona como un sistema dinámico global? constituye un gran reto en vista de que los principios que gobiernan la dinámica del comportamiento periódico y de las interacciones entre módulos a lo largo del tiempo no han sido descubiertos aún.

Desde hace aproximadamente una década, una serie de estudios en la era “postgenómica” pretenden unir los análisis estadísticos de la información de bases de datos genómicas y proteómicas, junto al poder de análisis computacionales para crear simulaciones comprensivas del comportamiento de un gran número de redes de regulación genética. Lo anterior abrió las puertas a una nueva disciplina conocida como Biología Sintética, que constituye un marco para predecir y evaluar la dinámica de diversos procesos celulares, mediante el diseño de circuitos genéticos modelados por computadora. Incluso, varios trabajos han permitido la

creación de sistemas biológicos artificiales expresados en organismos fácilmente manipulables como bacterias y levaduras, que permiten monitorear la redes *in vivo* mediante genes reporteros cuya expresión está regulada por un circuito genético.

Este trabajo hace parte de un proyecto macro titulado: “Syn-R-Gene-Synthetic Gene Regulatory Networks in Microorganism” que se ha estado desarrollado en colaboración con el Centro de Sistemas Complejos y el Instituto de Bioquímica y Biología de Universität Potsdam (Alemania) y el Grupo de Comunicación y Comunidades Bacterianas del Departamento de Biología de la Universidad Nacional de Colombia. En el marco de esta colaboración Dr. Anetta Koseska y Dr. Catalina Arévalo-Ferro diseñaron un modelo teórico preliminar con el potencial de permitir la sincronización artificial de osciladores genéticos en poblaciones bacterianas evaluados mediante simulaciones matemáticas. Este sistema estaba compuesto por una **red sintética de comunicación bacteriana** (*Quorum Sensing*) capaz de permitir la sincronización mediante el empleo de una Acilhomoserinlactona (AHL) sintetasa que produce una molécula auto inductora AI. Esta molécula AI puede atravesar la membrana y pared celular y bajo una concentración umbral unirse al receptor LuxR incluido también en el modelo. El complejo AI-LuxR actúa como factor de transcripción estimulando la expresión de un grupo de genes bajo regulación del promotor *luxbox*. En el modelo este promotor se encuentra regulando la expresión de dos genes: (a) el gen de la proteína verde fluorescente *gfp* que actúa como gen reportero de la sincronización (b) el gen *aiiB* que codifica para una lactonasa con capacidad de hidrolizar las concentraciones de AHL. La estrategia de sincronización consistía en acoplar este

módulo sintético de comunicación bacteriana junto con el circuito “*repressilator*” reportado por Elowitz & Leibler (2000). El “*repressilator*” es una red genética empleada para inducir oscilaciones artificiales en una célula y consiste de tres genes (*tetR*, *lacI*, *λcl*) que suprimen la expresión cada uno del otro. Esta red sintética fue cedida a nuestros grupos de investigación por el Dr. Michael B. Elowitz del Departamento de Biología Molecular y Física de la Universidad de Princeton (EU).

En este trabajo se tomo el modelo diseñado previamente, se corrigieron algunas incongruencias teóricas, y se llevó a la vida mediante sucesivos pasos de ensamble *in vitro* y expresión *in vivo* generando **un módulo sintético de comunicación bacteriana**. Este nuevo módulo sintético fue usado **de forma independiente y con módulos adicionales** para inducir periodos de expresión y ritmos biológicos artificiales y evaluar sus efectos en la sincronización *in vivo* de una población bacteriana. Su construcción involucró la creación y ensamble de un plásmido que contenía todos los genes descritos en el modelo teórico y para estudiar el efecto de este módulo sintético sobre la sincronización bacteriana, se empleó un segundo plásmido que contenía el circuito “*repressilator*”. El acople de estos dos plásmidos fue llevado a cabo mediante la co-transformación y la expresión de de esta red en *E. coli* DH5α.

La co-transformación permitió hacer un monitoreo *in vivo* de una población bacteriana que expresaba **el módulo sintético de comunicación bacteriana** acoplado con un oscilador sintético. Este monitoreo permitió estudiar, en un cultivo bacteriano, la estructura global, el funcionamiento y dinámica de una red

oscilatoria de regulación de genes, en función de la variación en la expresión del gen reportero (*gfp*) en el tiempo y bajo diferentes condiciones. Nuestros resultados demuestran que es posible estudiar el comportamiento *in vivo* de un módulo sintético de comunicación bacteriana mediante el empleo de genes reporteros monitoreados en una población de *E. coli* DH5 α . A su vez, los resultados aquí obtenidos nos permiten estudiar muchos de los eventos necesarios para llevar a cabo la sincronización sintética de un conjunto de relojes biológicos (osciladores) que son introducidos artificialmente y expresados en el interior de una población de *Escherichia coli*, siendo el más relevante la existencia de extensos periodos de agrupamiento entre las células bacterianas previos al fenómeno de sincronización.

ESTADO DEL ARTE Y JUSTIFICACIÓN

3.1 Ocurrencia natural de osciladores genéticos

Los ritmos biológicos ocurren en varios niveles de organización desde las redes genéticas hasta las poblaciones animales (Goldbeter, 2002). Incluso, desde el movimiento de cilios rudimentarios en protozoos a la coordinación cronométrica requerida para la navegación de las aves por la posición del sol, las actividades biológicas repetitivas son omnipresentes a lo largo de todos los tipos de organismos, de los más simples a los más complejos (Friesen *et al.*, 1993). Debido a que las oscilaciones que suceden en células individuales son a menudo asincrónicas, la dinámica de muchos ritmos biológicos se ha observado a nivel de una célula individual. Los estudios en células individuales han mejorado nuestro entendimiento de los osciladores naturales al revelar información acerca del comportamiento rítmico que no se puede obtener por métodos tradicionales (Longo & Hasty, 2006).

A pesar de que las ventajas de muchos sistemas biológicos que son periódicos, como la organización temporal, organización espacial, predicción de eventos repetitivos, eficiencia y control de precisión han sido reportadas desde hace mucho tiempo (Rapp, 1987), una definición formal de oscilador biológico y sus propiedades aún no han sido determinadas.

Una oscilación puede ser definida como un cambio cíclico en una medida cuantitativa que exhibe una forma de onda constante y un periodo (Friesen & Block, 1984). La característica más importante de una oscilación es su periodo; que

corresponde al intervalo entre dos puntos de referencia idénticos en la onda. Si un sistema oscilatorio contiene más de una variable oscilando, surge una segunda característica conocida como la fase de relación entre dichas variables (Friesen & Block, 1984). Con base en estas características, Friesen *et al.* (1993) presentan un modelo cualitativo general de osciladores biológicos donde el requerimiento fundamental para generar oscilaciones es un “**feedback**” negativo con retraso. Según esto hay dos elementos esenciales en un oscilador biológico: (1) un *loop* de “**feedback**” negativo, que incluye una o más variables oscilando, y (2) una fuente de retraso en el *loop*, que permite a las variables en oscilación rebasar un valor de estado estacionario antes que la inhibición sea totalmente efectiva (Friesen & Block, 1984). Otras propiedades de los osciladores biológicos que han sido ampliamente descritas son la presencia de un periodo cíclico, la duración del estímulo entrante y la relación entre las fases y una salida en forma de onda (Kawato & Suzuki, 1978; Friesen & Block, 1984; Godin & Buchman, 1996; Roenneberg *et al.*, 2005; Lakin, 2006; Roenneberg *et al.*, 2008).

Gran cantidad de evidencia sugiere que el comportamiento periódico no está confinado a un número de tipos celulares sino que es una propiedad común en la regulación bioquímica de muchos sistemas biológicos. Los investigadores se han enfocado principalmente en siete temáticas: (1) Oscilaciones en reacciones catalizadas enzimáticamente (Ghosh & Chance, 1964; Fukushima & Tonomura, 1972; Kühn & Raven, 2008), (2) Oscilaciones en síntesis proteica (Boddy *et al.*, 1967; Mano, 1969; Tyson, 1979; Kaasik & Chi-Lee, 2004), (3) Oscilaciones en potencial de membrana celular (Okada *et al.*, 1979; Higuchi & Hara, 1996; Higuchi *et al.*, 2000; Düfer

et al., 2004), (4) Oscilaciones en células secretoras (Rapp & Berridge, 1981; Dolzer *et al.*, 2001), (5) Oscilaciones neuronales (Dunant *et al.*, 1977; Meiri & Rahamimoff 1978; Enyeart, 1982; Chay & Cho, 1982), (6) Oscilaciones musculares (Jewell & Ruegg, 1966; Hoyle & O'Shea, 1974; Okamura & Ishiwata, 1988) y (7) Oscilaciones en movimiento celular, crecimiento y desarrollo (Stern & Goodwin, 1977; Rauprich *et al.*, 1996; Opitz *et al.*, 2002). Varios catálogos sistemáticos y listas de referencias de literatura experimental han sido reportadas para cada una de estas áreas temáticas, estos incluyen desde un atlas de osciladores bioquímicos y biológicos publicado por Rapp (1979) hasta proyectos desarrollados en la última década enfocados a modelar diferentes clases de osciladores y redes sintéticas con base en todos los parámetros reportados en estudios experimentales. En algunos casos estas redes sintéticas han sido expresadas en modelos experimentales para estudiar el comportamiento de diversos osciladores sintéticos regulados por diferentes módulos bajo ciertos estímulos (Steuer & Junker, 2009).

Estas redes oscilatorias han surgido de concebir a los circuitos genéticos como análogos a los circuitos eléctricos, permitiendo el uso de análisis establecidos en ingeniería eléctrica para estudiar el comportamiento de las redes biomoleculares (Hasty *et al.*, 2002). Cuando se construye un circuito eléctrico se emplean herramientas matemáticas y computacionales para el análisis de un diagrama propuesto del circuito y las propiedades de sus componentes individuales (resistores, capacitores, inductores, etc. (Hasty *et al.*, 2001A)) y se brinda un marco para predecir el comportamiento que resulta de una modificación del circuito. De la misma forma ocurre con un circuito genético, en el que los componentes eléctricos

individuales para construir el circuito pueden ser promotores, factores de transcripción, genes o “*feedback loops*”. Así mismo, mediante herramientas matemáticas y computacionales, es posible estudiar el comportamiento del circuito. Esta comparación se ha hecho en cada caso debido a que muchas redes biológicas son similares en estructura a redes eléctricas complejas, así, los promotores pueden conducir y regular la transcripción de genes específicos, siendo este el método típico de las células para controlar la expresión (análogo a un interruptor eléctrico) y los “*feedback loops*” surgen cuando una proteína es capaz de interactuar con el promotor que estimula su propia producción o promotores de otros genes lo que es análogo a un circuito eléctrico cerrado (Jacob & Monod, 1961).

Como se explicó anteriormente las oscilaciones en redes genéticas y metabólicas son el resultado de varios mecanismos de regulación celular. La capacidad de modelar matemáticamente, mediante el uso de computadores, redes complejas ensambladas en módulos basándose en analogías con un circuito eléctrico, constituye una herramienta invaluable para estudiar la dinámica y el comportamiento de los componentes involucrados en redes biomoleculares que regulan diversos procesos celulares.

3.2 Biología sintética de osciladores genéticos

Existen tres razones principales para modelar redes oscilatorias: (1) la noción científica de reducir la complejidad (Hasty *et al.*, 2001B), que es inherente al acercamiento reduccionista de desacoplar una red simple de una red biológica

compleja nativa que aporta información valiosa con respecto a los principios evolutivos de su diseño (Barkai & Leibler, 2000). (2) Organizar la vasta colección de datos (bases genómicas, proteómicas, etc.) con el objetivo de obtener mayor información de interés para los investigadores, con respecto a las interacciones entre cada uno de los componentes descritos en las bases para llevar a cabo diversos procesos biológicos. Y (3) estudiar el comportamiento de diversos procesos biológicos mediante la manipulación y el monitoreo de redes simples que simulen el comportamiento natural bajo ciertos estímulos y permitan entender la lógica asociada a diversos mecanismos de control celular a nivel del ADN (Chen *et al.*, 1993).

Hoy en día, existen tres importantes modelos para diseñar redes genéticas. Los tres emplean promotores represivos (que involucran el bloqueo del sitio de unión a la polimerasa en la región promotora (Hasty *et al.*, 2001B) esto constituye el **feedback** negativo con retraso, imprescindible para generar oscilaciones como se explicó anteriormente.

El gráfico de cada uno de estos modelos se presenta en la Figura 1. El primer modelo conocido como “*único promotor auto-represivo*”, ha sido utilizado para demostrar la interacción entre un *feedback* negativo y el ruido interno presente en un sistema biológico (Becskei & Serrano, 2000). Demostrando la ganancia en la estabilidad producida por un *feedback* negativo (Figura 1A). El segundo modelo compuesto de dos promotores represivos empleados para construir un “*interruptor genético*” (Gardner *et al.*, 2000) constituye la base de un circuito genético programable para el control de la función celular dependiendo de las entradas al

sistema (Figura 1B). El tercer modelo conocido como el “*repressilator*”, constituido por tres promotores represivos empleados para exhibir oscilaciones sostenidas (Elowitz & Leibler, 2000) (Figura 1C). A continuación se realizará una descripción más detallada del “*repressilator*” el cual fue utilizado en este trabajo.

El repressilator es un *loop* cíclico con *feedback* negativo, compuesto por tres represores y sus correspondientes promotores, empleado para producir oscilaciones sostenidas (Figura 1C). El primer promotor conocido como pLtet01 está regulando positivamente la expresión del represor λcl . Este represor λcl inhibe el segundo promotor conocido como λP_R . Este promotor λP_R esta regulando positivamente la expresión de un segundo represor conocido como Lacl. Lacl es un inhibidor del tercer promotor P_{Lac01} . El promotor P_{Lac01} a su vez estimula la producción del tercer represor conocido como TetR. TetR inhibe al primer promotor P_{Ltet01} . De esta manera se cierra el circuito y se genera un sistema con la capacidad de producir oscilaciones sostenidas con el paso del tiempo (Figura 1C). Este modelo fue construido aprovechando las propiedades de auto regulación que presentan los tres represores y sus promotores, ensamblados de manera independiente.

Como un ejemplo, en la naturaleza el represor Lacl es producido continuamente como un inhibidor del promotor del operón *lac* (P_{Lac01}) inhibiendo la unión de la maquinaria necesaria para la transcripción de los genes de este operón. En presencia de lactosa o moléculas análogas (e.g IPTG) este inhibidor se desacopla de la región promotora y se permite así la expresión de los genes necesarios para la degradación de la lactosa (Shapiro *et al.*, 1969). En su modelo Elowitz & Leibler,

(2000) emplean el represor LacI y el promotor P_{LacO1} de manera independiente para controlar la expresión de otros represores y así generar un *loop* auto-represivo que constituye el “*repressilator*”.

Estos modelos nos enseñan como la ingeniería de redes genéticas ofrece una útil herramienta para extraer subsistemas cuidadosamente seleccionados a partir de organismos naturales, y emplear tanto su modelación como la información experimental previa que permita determinar el comportamiento del subsistema aislado (Hasty *et al.*, 2002).

Kaznesis (2007) trata de dar respuesta a la pregunta ¿Qué tipo de modelos son apropiados para redes oscilatorias? Argumentando que los modelos deben cumplir dos condiciones básicas: (1) Debe existir una topología de la red, donde unas biomoléculas controlen la concentración de otras. Por ejemplo las proteínas de unión a ADN regulan la expresión de genes específicos mediante su activación o represión. En el laboratorio estas redes pueden ser creadas usando librerías existentes de proteínas regulatorias y sus correspondientes sitios operadores. (2) Las interacciones a nivel molecular de los componentes deben describir la cinética y fuerza de las interacciones biomoleculares dentro del sistema global, ya que el comportamiento dinámico del sistema es una función compleja de las interacciones cinéticas de los componentes. En ese sentido, si se alteran las características de los componentes, como proteínas de unión a ADN y su blanco correspondiente, es posible modificar el comportamiento dinámico del sistema sin modificar la topología de la red (Kaznesis , 2007).

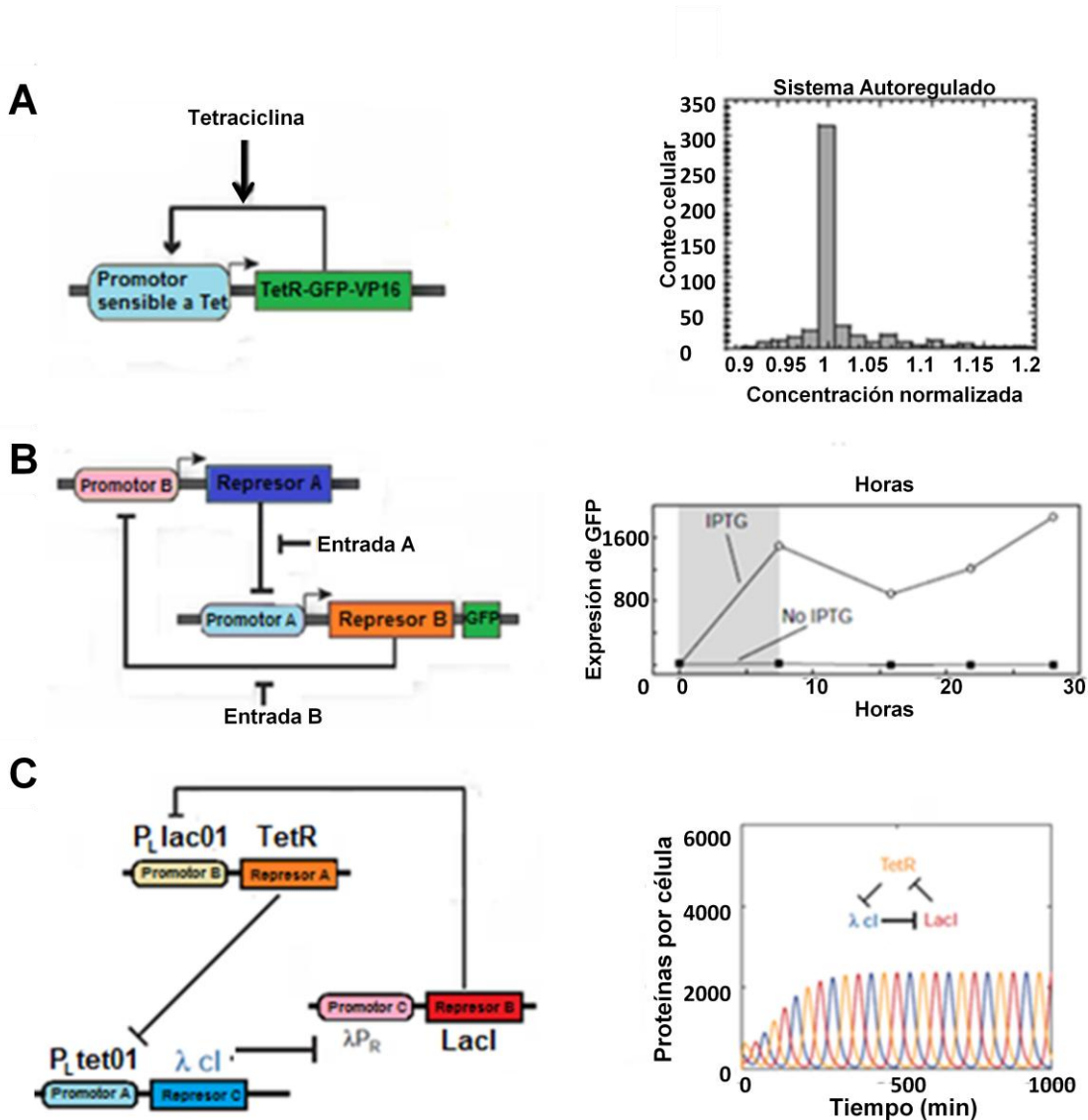


Figura 1 Principales modelos para diseñar redes genéticas. **(A) Único promotor auto-represivo. Izq.** Diagrama teórico en el cual un activador dependiente de tetraciclina (una proteína de fusión que actúa como factor transcripcional) activa su propia expresión. **Der.** Estabilidad de las propiedades del circuito genético. Para calcular el valor de estabilidad relativa, los parámetros del sistema fueron tomados de la literatura. La distribución es más estrecha en el sistema de auto-regulación debido a su alta estabilidad (Beckskei & Serrano, 2001). **(B) Interruptor genético. Izq.** Diagrama teórico que usa un motivo de represión mutuo para generar biestabilidad. Este comprende dos genes, cada uno codificando un represor transcripcional que reprime la expresión de otros genes. Existen dos entradas al sistema y una salida representada por la expresión de GFP. **Der.** Demostración de la biestabilidad a largo plazo de los estados de expresión independiente. El sombreado gris indica los períodos de inducción térmica (entrada B). El modelo se cambia entre los estados por un pulso de IPTG (entrada A) (Gardner et al., 2000). **(C) La red "repressilator". Izq.** Diseño del "repressilator". El repressilator es un loop cíclico con "feedback" negativo, compuesto por tres represores y sus correspondientes promotores, empleado para producir oscilaciones sostenidas. **Der.** Simulación del "repressilator": Oscilaciones en los niveles de las tres proteínas represoras, obtenidas por integración numérica (Elowitz & Leibler, 2000). **Figura adaptada de Drubin et al. (2007).**

Bajo los principios anteriores, si se considera la célula como un "reactor dinámico", en vista de que todos los eventos a nivel molecular pueden ser representados con

reacciones, se podría calcular el comportamiento de una red usando un conjunto de ecuaciones diferenciales ordinarias que determine los cambios en la concentración conforme a leyes cinéticas (Kaznesis, 2007).

Con base en los tres modelos anteriormente descritos y las propiedades definidas por Kaznesis (2007) varios estudios se han enfocado en el diseño y la construcción de plásmidos que codifiquen los componentes de la red junto a genes reporteros para su posterior expresión *in vivo* en modelos experimentales. Debido a que las bacterias y las levaduras son “organismos fácilmente manipulables”, han sido el modelo más común de expresión de osciladores genéticos. Diferentes cepas de *E. coli* han sido empleadas como modelo y el ejemplo principal es la expresión de la red oscilatoria “*repressilator*” (Figura 2) que se ha explicado anteriormente (Elowitz & Leibler, 2000). El “*repressilator*” ha sido utilizado en varios casos y se ha podido realizar la predicción computacional del comportamiento de la red como es el caso del “*oscilador, rápido, robusto y persistente*” con periodos de oscilación sintonizables desde 13 mín., diseñado previamente como un modelo matemático (Stricker *et al.*, 2008).

Quizás uno de los más maravillosos osciladores fue construido por Balagade *et al.* (2008) quienes diseñaron un ecosistema predador-presa entre dos poblaciones de *E. coli*, que se comunican bi-direccionalmente a través del sistema sintético de *Quorum Sensing* y regulan entre si la expresión de ciertos genes de muerte y supervivencia, permitiendo explorar la dinámica de la interacción de las poblaciones de una manera predecible (Balagadde *et al.*, 2008).

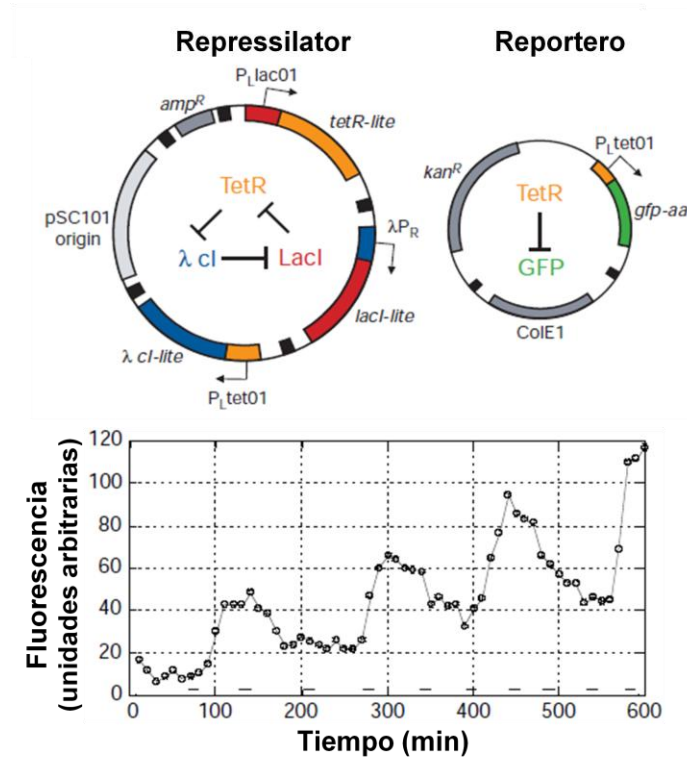


Figura 2 Figura tomada de Elowitz & Leibler (2000). Arriba: Plásmidos empleados para la transformación de *E. coli*, el plásmido con el “repressilator” y el plásmido con el gen reportero fueron empleados en la co-transformación. Abajo: Los picos a través del curso del tiempo de la densidad de GFP de las células seleccionadas.

Ellis *et al.* (2009) desarrollaron un “temporizador genético” predecible en *Saccharomyces cerevisiae* empleando el “interruptor genético” (Figura 1). Esta red fue usada para controlar el tiempo de sedimentación en levaduras modelando el tiempo de filtrado en procesos industriales. Este es un ejemplo de cómo estos diseños pueden tener importantes aplicaciones biotecnológicas (Ellis *et al.*, 2009).

El uso de otros modelos como las células de ovario del hamster chino y los oocitos de *Xenopus*, podrían constituir un campo promisorio para entender el comportamiento de redes genéticas de mayor complejidad, como el control del ciclo circadiano en mamíferos (Tigges *et al.*, 2009), control de proteínas

intracelulares y secretadas, ciclos hormonales, etc., sin embargo esta alternativa aún no se ha explorado exhaustivamente (Kramer *et al.*, 2005).

Como se explicó anteriormente, el diseño de sistemas biológicos artificiales y el entendimiento de su contraparte natural son los objetos claves de la nueva disciplina conocida como biología sintética (Drubin *et al.*, 2007). La mayoría de las investigaciones se han enfocado en el diseño, modelado y expresión de osciladores sintéticos para establecer sus propiedades como un sistema biológico y así entender la dinámica de varias redes genéticas modulares presentes “al interior” de las células de diversos organismos. Es importante resaltar “**al interior**” en vista de que muy pocos estudios se han llevado a cabo en módulos con intermediarios extracelulares, como reguladores o activadores de la expresión genética que permiten la sincronización de una **población** celular.

3.3 Sincronización y comunicación celular

A pesar de que muchas células del cuerpo demuestran procesos rítmicos espontáneos e intrínsecos, las funciones fisiológicas derivadas de las interacciones entre estas células con otras y con estímulos externos, generan los ritmos esenciales para la vida (Glass, 2001). Así, el latido del corazón es generado por el nodo sinoatrial, una pequeña región en el lado derecho del corazón, compuesta por miles de células marcapaso que interactúan entre ellas para definir el ritmo cardíaco (Wilders & Jongsma, 1993; Guevara & Lewis, 1995) y el ritmo intrínseco del sueño-vigilia suele ser sincronizado con un ciclo de luz-oscuridad

(Strogatz *et al.*, 1987). En general, las oscilaciones fisiológicas pueden ser sincronizadas con relación a un apropiado estímulo interno o externo, por consiguiente se hace importante analizar el efecto de los estímulos en los diversos ritmos fisiológicos intrínsecos (Glass, 2001).

La búsqueda de un modelo para estudiar los estímulos externos en un sistema sincronizado ha sido un gran reto para los investigadores, sin embargo recientes estudios sugieren como sistema modelo para esta clase de estudios, el uso de acil-homoserín lactonas (AHL), una de las principales moléculas de señalización del sistema usado por las bacterias Gram-negativas para comunicación inter e intra-especies, en un fenómeno conocido como *Quorum sensing* (QS).

El QS se define como la regulación de la expresión genética en respuesta a la fluctuación en la densidad de la población celular (Reading & Separandio, 2006; Fuqua *et al.*, 1994). Este fenómeno fue por primera vez descrito en *V. fischeri* y en él se conoce como el sistema LuxR/I. En este sistema, el gen *luxI* codifica para la sintetasa de una acil homoserín lactona (AHL). Esta AHL es capaz de atravesar la membrana y la pared celular y unirse al receptor LuxR bajo cierta concentración umbral dependiente de la densidad celular ó su difusión en el medio. El complejo LuxR-AHL actúa como factor de transcripción sobre el operón de la luciferasa (*luxbox*) favoreciendo la expresión de ciertos genes que se encuentran regulados por dicho complejo (Figura 3).

El estudio de estas redes de comunicación constituye una herramienta invaluable para comprender fenómenos de sincronización que están regulados por QS, como

la producción de bioluminiscencia (Reading & Separandio, 2006), la liberación de factores de virulencia, el desarrollo de cuerpos fructíferos, etc.; dando como resultado la expresión sincronizada de un fenotipo en una población celular.

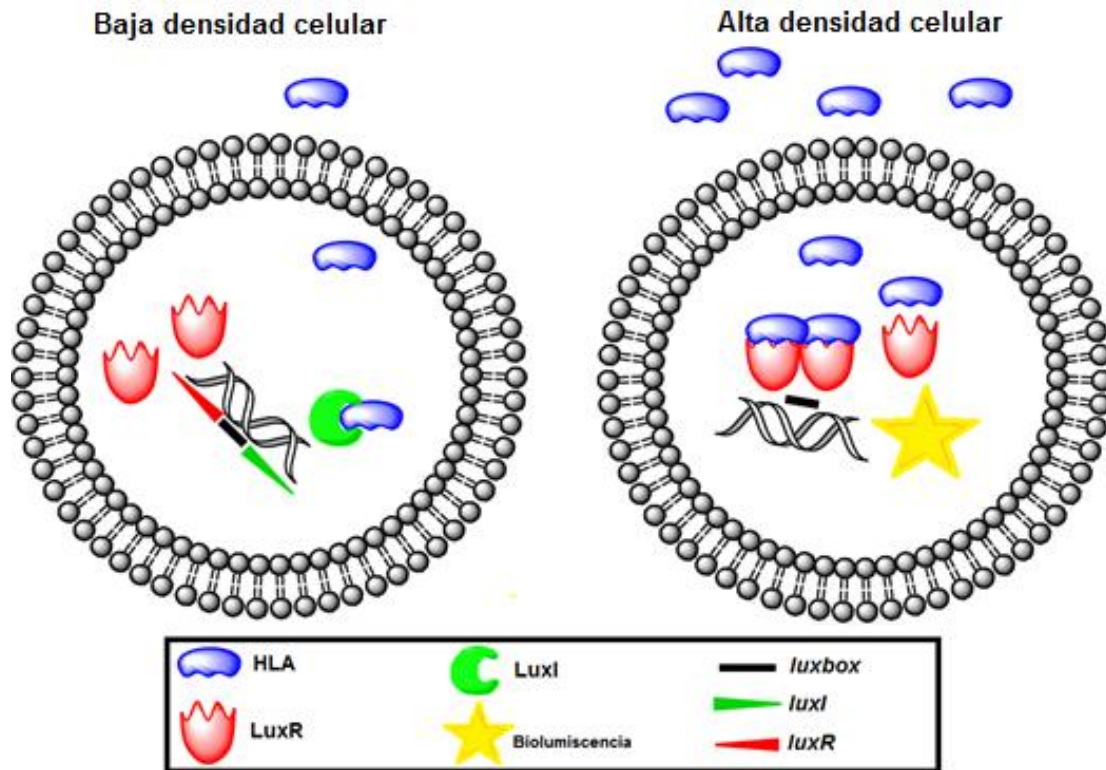


Figura 3 Sistema de LuxR/I en *V. fischeri*. Fenómeno de QS dependiente de la concentración celular. EL gen *luxI* codifica para la sintetasa de AHL. La AHL funciona como una molécula auto-inductora con la capacidad de atravesar la membrana y pared celular y cuando supera un umbral crítico unirse al receptor LuxR. El complejo LuxR-AHL actúa como factor de transcripción sobre *luxbox* para estimular la expresión de los genes bajo su regulación, en este caso aquellos involucrados en la producción de bioluminiscencia.

Un gran número de investigaciones se han realizado empelando AHLs como moléculas auto-inductoras capaces de atravesar la membrana y la pared celular activando redes genéticas entre células vecinas. La mayoría de estos estudios emplean el operón de la luciferasa (*luxbox*) para controlar la expresión de genes reporteros y así monitorear el comportamiento de las redes en una población bacteriana dependiendo de su densidad celular.

3.4 Modelos para la sincronización de poblaciones celulares

Actualmente se han desarrollado tres modelos principales de sincronización de poblaciones celulares, los cuales están esquematizados en la figura 4.

El primer modelo es conocido como “*La red modelo de regulación genética de dos genes*”, en este modelo el gen *luxR* produce la proteína receptora LuxR que forma un homodímero. La proteína LuxI sintetiza una AHL que actúa como molécula auto-inductora, que es reconocida por el receptor LuxR favoreciendo la formación de un heterotretamero LuxR-AHL. El tetrámero LuxR-AHL actúa como factor de transcripción al unirse al promotor P_{LacLuxO} para inhibir la transcripción de los genes *luxR* y *luxI*. En este modelo la AHL que es capaz de difundir al ambiente extracelular funciona como molécula señal que viaja entre las células para regular la expresión genética (Zhou *et al.*, 2004). Con base en este modelo se han llevado a cabo simulaciones matemáticas y computacionales que han permitido caracterizar teóricamente el comportamiento de este módulo sintético bajo ciertos estímulos. Sin embargo, la expresión *in vivo* de este módulo aún no se ha llevado a cabo. (Figura 4A)

El segundo modelo, construido con la arquitectura del “*repressilator*” que se ha explicado anteriormente, pretende producir oscilaciones sostenidas introduciendo una perturbación externa al sistema “*repressilator*”. El promotor P_{LacLuxO} que está regulando la expresión de la sintetasa LuxI, es inhibido por el LacI del sistema *repressilator* (Figura 4B). Cuando el “*repressilator*” oscila e inhibe a LacI, el

promotor P_{LuxO} puede regular positivamente la transcripción de *LuxI* que produce la molécula AI, esta migra a otras células se une a su receptor *LuxR* y este complejo *LuxR/AI* actúa como un factor de transcripción para estimular nuevamente la producción de *LuxI*, con lo cual se reinicia el sistema (Zhou *et al.*, 2007). Sin embargo, al igual que en el primer modelo, no existe un mecanismo de control de las concentraciones y vida media de la molécula AHL lo que teóricamente llevaría a que el sistema no produzca oscilaciones manteniéndose prendido en altas concentraciones celulares. Por lo anterior este módulo tampoco ha sido expresado en bacterias para estudiar su comportamiento *in vivo*.

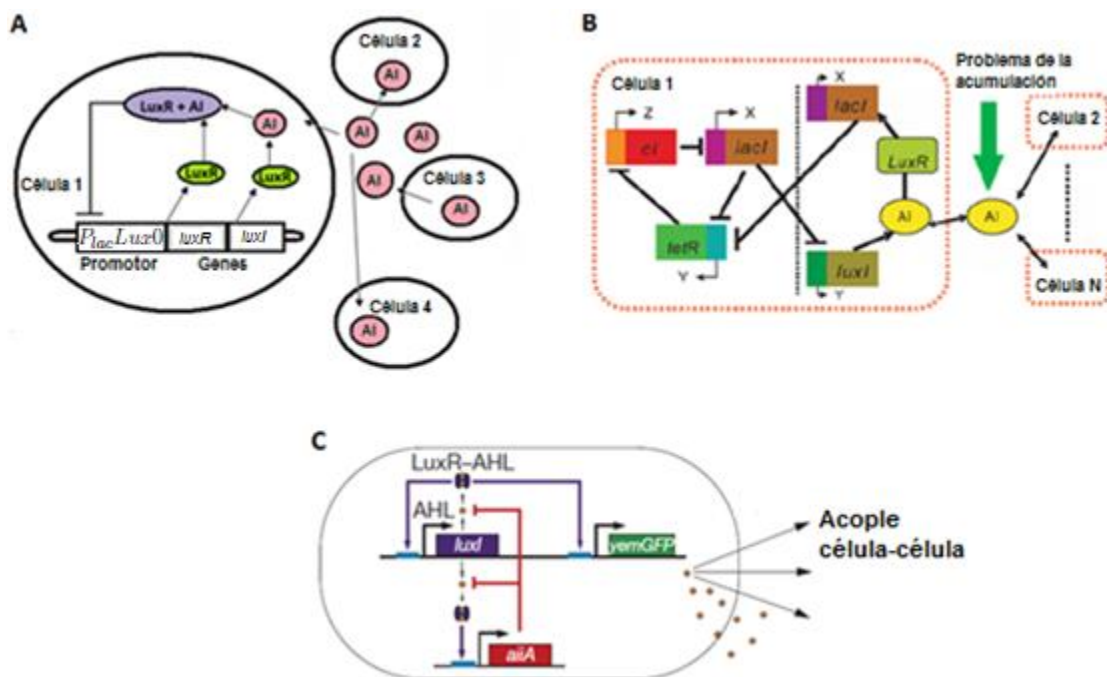


Figura 4 Principales modelos para estudiar la sincronización mediante estímulos externos e internos. **(A)** Modelo de una red de regulación genética. (Zhou *et al.*, 2004). **(B)** Modelo de red “repressilator” acoplado a un mecanismo de QS. (Zhou *et al.*, 2007). **(C)** Modelo de reloj genético sincronizado (Danino *et al.*, 2010).

En el tercer modelo, el promotor P_{luxI} regula la producción de *LuxI*, *AiiA* y *GFP* en tres módulos transcripcionales idénticos. *LuxI* sintetiza la molécula AHL que difunde fuera de la membrana celular a las células vecinas. AHL forma un

heterotetrámero con su receptor LuxR el cuál actúa como factor de transcripción para estimular la producción de los genes regulados por el promotor P_{luxl} . AiiA regula negativamente el circuito, es una lactonasa con capacidad de hidrolizar la AHL, y así evita su acumulación en el medio (Danino *et al.*, 2010). Y GFP trabaja como gen reportero de cada oscilación en toda la población bacteriana (Figura 4C). Danino *et al.* (2010) monitorearon mediante simulaciones teóricas y ensayos *in vivo* el comportamiento de este módulo en una cepa de *E. coli* mediante la variación en la expresión del gen reportero en la población celular. Lo anterior fue posible gracias a la creación de un sistema de microfluído que permitía observar el comportamiento de la población a la largo del tiempo. Si bien este modelo permite el control de la expresión del gen reportero por ciertas entradas en el sistema, no existe una congruencia entre las simulaciones teóricas y las observaciones *in vivo* y no constituye un sistema auto-inducible.

OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Generar un módulo sintético de comunicación bacteriana para ser usado de forma independiente con módulos adicionales como por ejemplo el oscilador genético “*repressilator*” lo que podría permitir la sincronización *in vivo* de una población bacteriana de *E. coli* DH5 α .

4.2 Objetivos específicos

1) Diseñar y ensamblar a partir de los genes *aiiA*, *luxR* y *luxI* bajo el control del promotor del operón lac (P_{lacO_1}) y los genes *lacl*, *gfp* y *aiiB* bajo regulación del promotor de QS (P_{luxbox}) un **módulo sintético de comunicación bacteriana**.

2) Evaluar la expresión de cada uno de los genes involucrados en el módulo empleando *E. coli* DH5 α transformada con los plásmidos intermediarios durante la construcción del módulo total, y co-transformadas con el módulo “*repressilator*” empleando los inductores respectivos (AHL e IPTG).

3) Observar los cambios en la expresión de GFP a lo largo del tiempo en poblaciones de *E. coli* DH5 α que han sido co-transformadas con el sistema “*repressilator*” y el módulo sintético de comunicación bacteriana, empleando microscopia de fluorescencia.

METODOLOGÍA

5.1 Diseño de un módulo sintético de comunicación bacteriana:

Este trabajo está basado en un modelo teórico previamente diseñado por Dr. Koseska y Dr. Arévalo-Ferro, simulado matemáticamente en el Centro de Dinámica de Sistemas Complejos de la Universidad de Potsdam (Alemania) Ver figura 5.

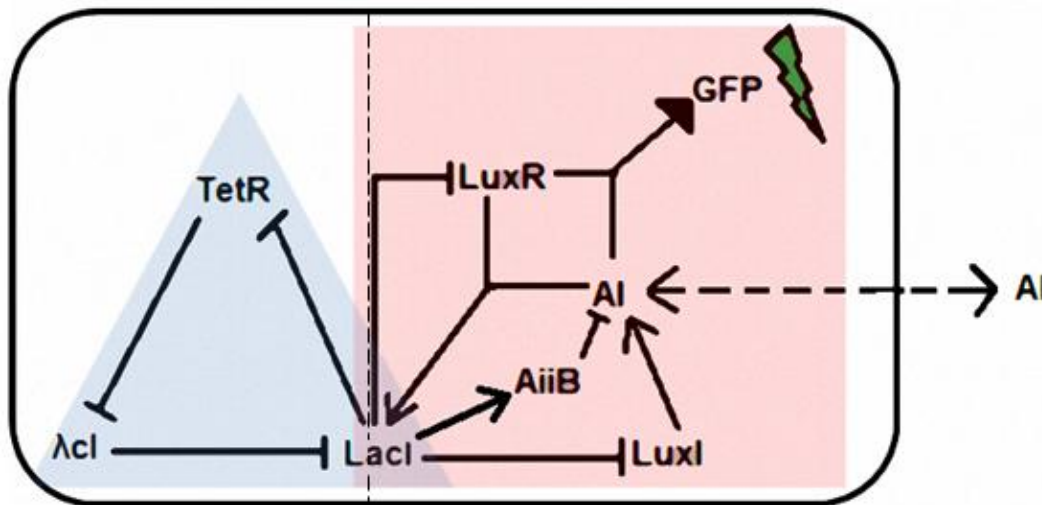


Figura 5 Modelo de sincronización de osciladores celulares de dos unidades. El “*repressilator*” (triángulo azul) es una red de tres genes (*tetR*, *lacI*, *lcl*) que suprimen la expresión cada uno del otro, esta red crea una oscilación artificial en la célula (Elowitz & Leibler , 2000). El **módulo sintético de comunicación bacteriana** (cuadrado rojo), fue originado empleando componentes del sistema de *Quorum Sensing* de *Vibrio fischeri* y *Agrobacterium tumefaciens*. La proteína **LuxI** sintetiza una molécula auto-inductora **AI** (3-oxo-C6HSL) la cual puede difundir a través de la membrana y pared celular y puede también entrar a las células vecinas. A determinada concentración umbral, AI es capaz de unirse a la proteína **LuxR** formando un heterotetrámero. El tetrámero LuxR-AI une a la región promotora *luxbox* y activa la transcripción de genes como el gen que codifica para la proteína verde fluorescente (*gfp*) y el gen *lacI* que codifica para la proteína represora del operón Lac (**LacI**) lo que permite reiniciar el sistema. El promotor del operón Lac está regulando positivamente la expresión de los genes *luxR*, *luxI* y el gen *aaiB* que codifica para una lactonasa con capacidad de hidrolizar la molécula AI disminuyendo su concentración en el sistema.

El modelo está compuesto por dos módulos: el primero (triángulo azul) consiste de un circuito de tres genes que generan un oscilador genético llamado el

“*repressilator*” como se explicó anteriormente (Elowitz & Leibler , 2000). El segundo al que llamamos el **módulo sintético de comunicación bacteriana** (cuadrado rojo) fue diseñado con base en los componentes del circuito genético de comunicación bacteriana (QS) de *Vibrio fischeri* y *Agrobacterium tumefaciens*. Este está compuesto por una acil-homoserín lactona sintetasa (LuxI) cuyo producto actúa como una molécula autoinductora AI (3-oxo-C6HSL) con capacidad de atravesar la membrana y pared celular y unirse la proteína receptora LuxR para formar un heterotretamero que actúa como factor de transcripción sobre el promotor P_{luxbox} para estimular la expresión de los genes bajo su regulación. El promotor P_{luxbox} regula la expresión de dos genes: (a) el gen que codifica para la proteína verde fluorescente (*gfp*) y (b) el gen que codifica para el represor del operón Lac (*lacI*). El gen *luxR* y el gen *luxI* se hallan bajo regulación del promotor del operón Lac P_{lacO1} , lo que permite conectar este módulo sintético con otros módulos que involucren a la molécula represora LacI, como es el caso del módulo “*repressilator*” (Figura 5). El gen que codifica para lactonasa (*aiiB*) también se halla bajo regulación de P_{lacO1} y tiene la capacidad de hidrolizar y controlar las concentraciones de AI (3-oxo-C6HSL) al interior de la célula para evitar así su acumulación en un sistema cerrado con difusión limitada.

5.2 De *in silico* a *in vitro*: Construcción y ensamble de la red modelo:

Como se explicó anteriormente el objetivo principal de este trabajo es la creación de un **módulo sintético de comunicación bacteriana** el cual está representado y contenido en un plásmido compuesto por todos los genes descritos en el modelo (cuadrado rojo) de la figura 5.

5.2.1 Plásmidos empleados

Base de plásmidos: Los genes de interés (*luxI*, *luxR*, *lacI*, *aiiB* y *gfp*) empleados en este trabajo fueron tomados de una base de plásmidos del Heisenberg-Gruppe BPMPB (BioPhysics and Molecular Plant Biology, Universidad de Potsdam, Alemania) bajo la dirección del PD Dr. Ingo Dreyer, donde cada plásmido contenía un gen flanqueado por sitios de restricción conocidos (XbaI, NheI y XhoI). Como esqueleto se empleó el plásmido vector **pZA22MCS** (A: ORI P15A; 2: gen rKan; 2: Promotor P_{lacO1}; MSC: *Multiple Cloning Site*) la resistencia a la kanamicina transferida por este plásmido, permite tener un gen de selección diferente al de la Ampicilina presente en el módulo sintético “*repressilator*”. Los genes contenidos en la base de plásmidos fueron obtenidos mediante amplificación por PCR a partir de sus organismos nativos (*Vibrio fischeri* y *Agrobacterium tumefaciens*).

Con el objetivo de construir una herramienta de expresión biológica que reflejara el modelo teórico, se llevó a cabo la amplificación de estos genes empleando *primers* que presentaban extremos codificantes para los sitios de restricción reconocidos por las enzimas de restricción XbaI (5'...T ∇ CTAGA...3'), NheI (5'...G ∇ CTAGC...3') y XhoI (5'...C ∇ TGAG...3'). Cada uno de los genes fue insertado en el plásmido vector **pZA22MCS** y posteriormente cada constructo fue verificado mediante secuenciación. Estos constructos conforman una base de plásmidos, en la que cada elemento constituye una parte del **módulo sintético de comunicación bacteriana**, que se encuentra en el laboratorio del Grupo de Comunicación y Comunidades Bacterianas del Departamento de Biología de la Universidad Nacional de Colombia.

Plásmido “*repressilator*”: El “*repressilator*” consiste de tres genes (*tetR*, *lacI*, *λcl*) que suprimen la expresión cada uno del otro. El plásmido que contiene este módulo presenta la arquitectura reportado por Elowitz & Leibler (2000). Este plásmido fue cedido a nuestros grupos de investigación por el Dr. Elowitz para ser acoplado al módulo sintético de comunicación bacteriana que se desea construir.

Plásmido biosensor pSB403: La cepa biosensora *E. coli* pSB403 que contiene el plásmido biosensor pSB403 fue cedido a nuestros grupos por Dr. Riedel del grupo Microbial Proteomics (Helmholtz-Zentrum Für Infektionsforschung-Braunschweig Alemania). La arquitectura de este plásmido fue reportada por Winson *et al.* (1998) (figura 6). La cepa biosensora fue empleada en la evaluación funcional de la expresión de la molécula AI (3-oxo-C6HSL).

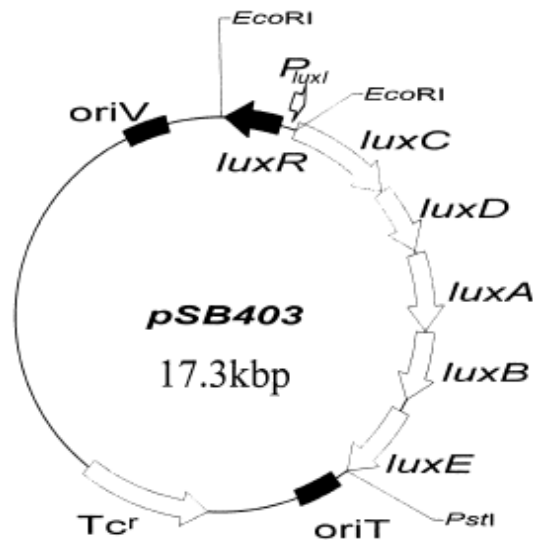


Figura 6 Tomada de Winson *et al.* (1998). Estructura del plásmido con el sistema sensor de N-acil homoserín lactona (3-oxo-C6HSL) empleado para la transformación de una cepa de *E. coli* y creación de una cepa biosensora. En el plásmido se observa el sistema *luxCDABE* encargado de la producción de biolumiscencia solo bajo la activación del receptor LuxR cuyo gen también está incluido en el biosensor. En ausencia de AHL la bacteria biosensora es incapaz de producir biolumiscencia, en presencia de AHLs se activa el receptor LuxR formando un complejo que es capaz de inducir la expresión de *luxCDABE* y producir biolumiscencia. Este biosensor presenta el gen de resistencia a tetraciclina.

5.2.2 Ensamble de la red modelo

La red modelo fue construida en varios pasos de clonaciones sucesivas con base en los plásmidos mencionados anteriormente.

Digestión enzimática de los plásmidos: Algunos de los plásmidos que contenían los genes de interés flanqueados por sitios de restricción fueron sometidos a digestión enzimática con las enzimas de restricción: XbaI, NheI y XhoI para obtener los fragmentos que fueron empleados como insertos. Otros plásmidos que contenían principalmente promotores fueron empleados como vectores conservando su esqueleto para poder así recibir el inserto e ir ensamblando la red. Estos últimos fueron digeridos con las enzimas de restricción XhoI y NheI para permitir que se acoplara el inserto por ligación. 1 μ L de cada una de las enzimas de restricción fue mezclado junto con 0.5 μ L de BSA y 2 μ L de *buffer* y el ADN de interés, los volúmenes fueron ajustados a 20 μ L con agua H₂O_{MQ}. La cantidad de ADN empleado fue determinada de acuerdo al tamaño del plásmido, teniendo en cuenta que el ADN de la base plásmidos se encontraba a una concentración de 1 μ g/ μ L y se estimó el volumen necesario para obtener una concentración final de inserto de [400ng] y [1 μ g] de vector. La reacción fue llevada a cabo a 37°C por 1 hora, temperatura a la cual se presenta mayor actividad enzimática.

El producto de cada una de las digestiones enzimáticas fue observado por electroforesis en gel de agarosa de bajo punto de fusión al 2% corrido a 100V por 30 mín. Aquellas bandas de interés obtenidas para el fragmento empleado como

inserto y el plásmido vector fueron cortadas y el ADN en cada una de ellas fue purificado siguiendo el protocolo establecido en el *kit* de purificación *NucleoSpin® Extract II* con base en la unión del ADN a una membrana de silica en presencia de sales caotropicas como la urea, la tiourea o el cloruro de guanidinio. Los productos de la purificación fueron nuevamente corridos en gel de agarosa al 1% (100V, 30 min) empleando el marcador de peso molecular *HyperLadder™ I* para estimar la concentración en ng/μL de inserto y vector con relación a la banda de 1000pb que tiene una concentración de 100 ng/μL.

Ligación de los fragmentos obtenidos por digestión: Las cantidades (ng/μL) de vector e inserto empleadas en la reacción de ligación fueron determinadas de acuerdo a la concentración (ng/μL) y longitud de cada uno (pb). Por regla general se empleó tres veces más inserto que vector y se cálculo la cantidad de inserto necesaria para una cantidad final de vector de 25ng por reacción. El ADN del inserto y el vector fue mezclado con 1μL de ligasa T4, 2μL de *buffer* y la cantidad de H₂O_{MQ} necesaria para obtener un volumen final de 20μL. La reacción fue llevada a cabo en baño maría a 25°C por una noche, los productos fueron empleados en la transformación de células competentes *E. coli* DH5α.

Cada uno de los productos de ligación en cada evento de clonación fue verificado por digestión enzimática, secuenciación y ensayos funcionales.

Transformación de *E. coli* DH5α con los productos de la ligación: Para todas las transformaciones 5ng de DNA del producto de ligación fueron mezclados en un tubo *Eppendorf* de 1mL con 100 μL de las células competentes *E. coli* DH5α

previamente descongeladas en hielo a 4°C por 5 mín. Las células fueron sometidas a un choque térmico en un *Eppendorf Thermostat Plus* a 42°C por 1.30 mín. Luego fueron incubadas nuevamente en hielo por 5 mín. A cada tubo que contenía las células transformadas se le adicionaron 450µL de *buffer* YT (Tryptona 16g/L, extracto de levadura 10g/L y NaCl 5g/L, pH 7,0). El tubo con las células en *buffer* YT fue incubado en un *Eppendorf Thermostat Plus* a 30°C con constante agitación durante 30 mín. El volumen total posterior a la incubación fue vertido y sembrado en cajas de Petri con medio sólido Luria-Bertani (LB) (Tryptona 10g/L, extracto de levadura 5g/L y NaCl 10g/L, pH 7,5) y su respectivo marcador de selección, en este caso con una concentración final de 30µg/mL de Kanamicina por cada caja. Las cajas fueron dejadas en incubación durante toda la noche a 37°C. Las colonias capaces de crecer fueron tomadas para la obtención de DNA plasmídico.

Co-transformación: Siguiendo la misma metodología previamente descrita se llevo a cabo la co-transformación con el **módulo sintético de comunicación bacteriana** (Figura 5, cuadrado rojo) y el módulo **“repressilator”** (Figura 5). Las células co-transformadas fueron cultivadas a 37°C en 10 mL de medio LB con Kanamicina 30µg/mL /Ampicilina 50µg/mL para la selección de colonias resistentes que contengan los dos plásmidos. Las células fueron recuperadas por centrifugación (10000 xg) cuando se observó a 600nm una densidad óptica OD = 0,4, el *pellet* fue finalmente resuspendido en 2mL de LB. Estas células co-transformadas fueron empleadas en los ensayos de microscopía de fluorescencia como se describirá más adelante.

Preparación del DNA plasmídico: Aquellas colonias capaces de crecer en medio sólido Luria-Bertani (LB) con kanamicina fueron seleccionadas y crecidas a 37°C en medio líquido LB con kanamicina 30µg/mL para la preparación del ADN plasmídico. La preparación del ADN plasmídico fue llevada a cabo mediante el protocolo de extracción por lisis alcalina para *E. coli*. Para la lisis alcalina un volumen de 1.5 mL fue transferido a un tubo *Eppendorf* y centrifugado durante 2 min (14000 rpm). Posteriormente el sobrenadante fue removido por aspiración e inversión. El sedimento de bacterias fue resuspendido en 250 µl de solución GET (Glucosa 50 mM, EDTA 10 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8.0) y fue incubado por 2 min a temperatura ambiente. Luego se añadieron 250µL de la solución de desnaturalización NaOH/SDS (NaOH 0,2N, SDS 1%) y se agitó por inversión suave, posteriormente fue incubado durante 5 min a temperatura ambiente. A continuación se añadió 300µL de la solución de Acetato de potasio 29.4 %m/v y Acido acético glacial 11,5 %v/v y se mezcló el contenido del tubo observando la formación de una turbidez blanca correspondiente a las proteínas y el ADN cromosómico. La mezcla se incubó en hielo por 10 min. Posterior a la incubación se centrifugó 10 min (14000 rpm) y el sobrenadante fue transferido a un tubo *Eppendorf* nuevo. El ADN plasmídico presente en este sobrenadante fue precipitado con 2 volúmenes de etano absoluto frío, luego fue mezclado por inversión y guardado a -20°C por 20 min. Pasado ese tiempo, se centrifugó por 30 min a 14000 rpm. El sobrenadante fue eliminado por aspiración e inversión. El precipitado fue nuevamente lavado con 0,5 mL de etanol frío al 70%.

El precipitado fue secado completamente para eliminar los restos de etanol y disuelto en 25 μ L de H₂O_{MQ} estéril. Finalmente se añadió RNAasa (1 μ g/mL) y se incubó por 20 min a temperatura ambiente.

Los plásmidos extraídos en el procedimiento anterior fueron cortados siguiendo el protocolo de digestión enzimática previamente descrito con el objetivo de corroborar sus tamaños (pb) mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% empleando el marcador de peso molecular *HyperLadder*TM I como referencia.

Aquellos plásmidos que presentaban fragmentos de restricción con los tamaños deseados y su organización genética había sido confirmada por secuenciación, fueron expresados *in vivo* en células de *E. coli* DH5 α . Estas cepas se emplearon en ensayos funcionales para determinar la actividad reguladora de las regiones promotoras sobre la expresión de los genes en respuesta a estímulos externos.

5.3 De *in vitro* a *in vivo*: Inducción de fenotipos en *E. coli*:

Células de *E. coli* DH5 α fueron transformadas con cada uno de los plásmidos intermediarios siguiendo el protocolo de transformación previamente descrito.

Las colonias transformadas fueron seleccionadas en medio LB con kanamicina 30 μ g/mL. Algunos de los plásmidos fueron empleados en la co-transformación con el plásmido "*repressilator*" para posteriores análisis de expresión en microscopía de fluorescencia, estos fueron seleccionados en medio LB con kanamicina 30 μ g/mL y Ampicilina 50 μ g/mL debido a la presencia del gen de resistencia a tetraciclina en el plásmido "*repressilator*".

5.3.1 Análisis de la expresión genética y la actividad promotora

La cepa de *E. coli* biosensora construida por Winson *et al.* (1998) fue empleada para llevar a cabo la evaluación funcional de la molécula señal (3-oxo-C6HSL) y la expresión de la lactonasa AiiB, en las cepas capaces de producir estas moléculas bajo ciertos estímulos. La cepa biosensora *E. coli* pSB403 es una cepa “muda” en vista de que es capaz de censar la molécula señal AI (3-oxo-C6HSL) y producir una respuesta visible en presencia de ella (bioluminiscencia) pero es incapaz de producir por si misma AHLs. De esta manera al enfrentar a la cepa biosensora con las cepas construidas capaces de producir AI en presencia de un estímulo como el IPTG (que regula la expresión de la sintetasa LuxI) se espera la producción de bioluminiscencia observada sobre la cepa biosensora. Cada una de las cepas diseñadas fueron sembradas en cruz, en agar LB con IPTG 1,5 mM, e incubadas a 37°C durante toda la noche junto a la cepa biosensora. En la figura 7 se observa el diseño del experimento.

La evaluación de la bioluminiscencia fue reportada en fotografías tomadas después de 2 minutos de exposición de la caja en la oscuridad, con la cámara Ultrahight sensitive CCD kamera (TCC-1.4HICE). Las imágenes fueron analizadas en el programa Acuacosmos (Hamamatsu-Photonics®) mediante el empleo de un controlador de intensidad de la imagen por adquisición de conteo de fotones con una sensibilidad de 255 y un valor umbral de 30.

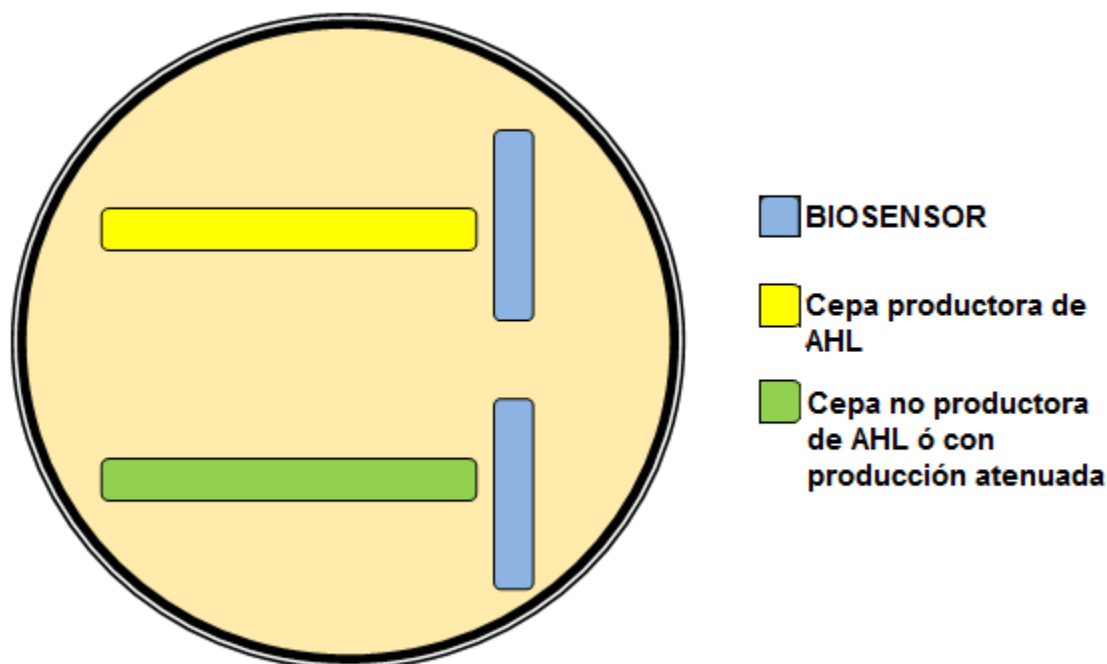


Figura 7. Ensayo de producción de bioluminiscencia. El color azul representa la estría correspondiente a la cepa biosensora *E. coli* pSB403 (Winson *et al.*, 1998). El color amarillo representa la estría correspondiente a una cepa capaz de producir molécula AI (3-oxo-C6HSL) y la estría verde corresponde a una cepa incapaz de producir AI a una tasa óptima debido a la presencia de una cola de reconocimiento para proteasas de *E. coli* que disminuye el tiempo de vida media de la sintetasa LuxI. Se esperaba que las AHLs migraran a través del medio y fueran capaces de estimular a la cepa biosensora y de esta manera fuera posible observar sobre esta la expresión de bioluminiscencia.

De igual manera para evaluar la producción de lactonasa AiiB se empleó también la cepa de *E. coli* biosensora PSB403, en un ensayo similar al descrito anteriormente. Estas cepas fueron crecidas en estría paralela según el dibujo que se observa en la figura 8. Se esperaba que la molécula AI fuera degradada antes de poder difundirse ó durante su difusión en el medio y no pudiera estimular la producción de bioluminiscencia. La figura 8 presenta el diseño del experimento para la evaluación de la actividad lactonasa.

En nuestro modelo el gen *luxI* se encuentra bajo regulación del promotor del operón Lac (P_{lacO1}) (Figura 5) en ese sentido se espera que en ausencia de IPTG no se observe la expresión de bioluminiscencia constituyendo así un control negativo.

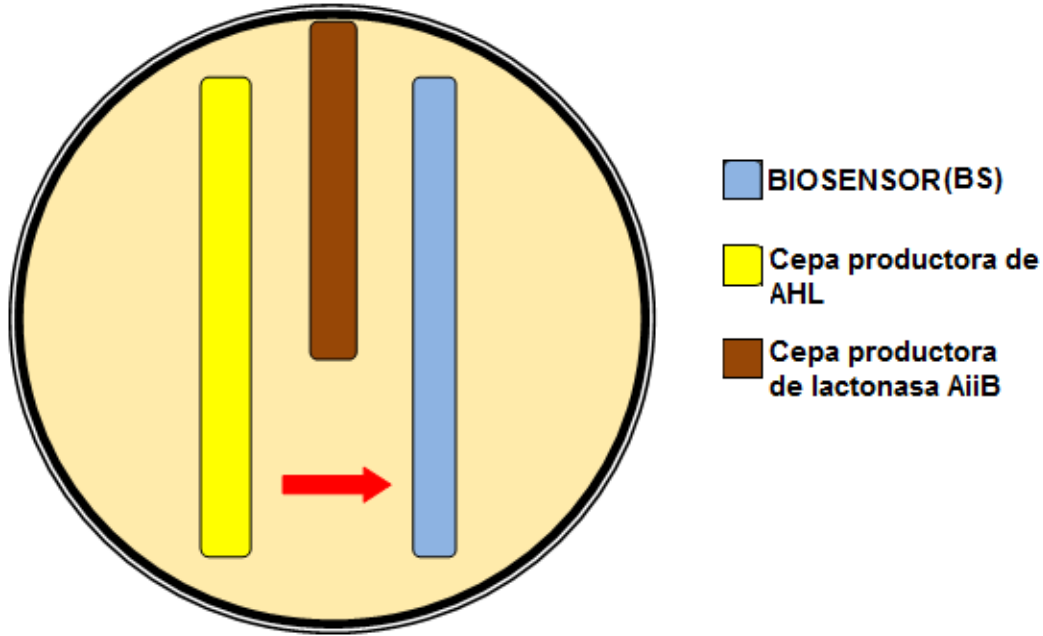


Figura 8. Ensayos de inhibición de la bioluminiscencia. La cepa representada en amarillo es capaz de producir la molécula AI. Esta molécula AI es capaz de migrar en el medio y estimular la cepa biosensora (BS) que produce bioluminiscencia. La cepa de color café que es capaz de producir AiiB (lactonasa) fue sembrada entre la cepa representada por el color amarillo y la cepa BS. Se esperaba que la bioluminiscencia solo fuera observada en la región donde es posible la migración de molécula AI sin ser hidrolizada por AiiB (Flecha roja).

A su vez, para cada uno de los ensayos de expresión de lactonasa AiiB y producción de molécula AI (3-oxo-C6HSL) se realizaron controles de la producción de bioluminiscencia, empleando la bacteria *Pseudomonas putida* isoF (cedida por Dr. Riedel) la cuál posee un sistema nativo de *Quorum Sensing* capaz de estimular la producción de bioluminiscencia en la cepa biosensora *E. coli* PSB403.

5.4 Microscopia de fluorescencia

Una población de células de *E. coli* DH5 α co-transformadas como se explicó en el capítulo 5.2.2, fue monitoreada con el fin de observar los cambios en la expresión de GFP a lo largo del tiempo. Para mantener un mismo campo visual se diseñó el

dispositivo que se muestra en la figura 9. Este montaje fue construido empleando cajas de cultivos de tejidos y laminillas con el fin de crear un pozo de 0.5cm de diámetro y 0,2cm de profundo, en el cual se sirvieron 200µL de medio LB semisólido (0,7 % agar). Una gota (50 µL) de medio de cultivo final (ver capítulo 5.2.2) fue inoculada al interior del pozo y se incubó a 37°C por 1 hora.

La variación en la expresión de proteína verde fluorescente GFP a lo largo del tiempo fue observada mediante el empleo de microscopia de fluorescencia, utilizando un microscopio Nikon Fluorescence Microscopy. La intensidad de onda para la excitación de la GFP fue de 490nm. El filtro utilizado y el tiempo de exposición fueron determinados durante la estandarización del experimento. En cada ensayo las fotografías fueron tomadas cada 30min por un periodo aproximado de 72 horas. Las imágenes fueron analizadas con el software Lucia (<http://www.lucia.cz/>).

El control positivo consistió de una cepa de *E. coli* DH5α diseñada con un plásmido que contenía el gen de la GFP bajo regulación del promotor P_{lacO1} y que en presencia de IPTG expresaba esta proteína. El control negativo fue una cepa incapaz de producir GFP al no contener el gen y que fue empleada para estandarizar la técnica y reducir la auto-fluorescencia.

Se tomaron fotografías cada 30 min por un periodo de tiempo establecido para cada experimento (aproximadamente 72 horas) para observar los cambios en la expresión del gen que codifica para la proteína verde fluorescente GFP a lo largo del tiempo. El dispositivo empleado (Figura 9) permitió garantizar la observación

del mismo campo visual durante todo el experimento al dejarlo sobre la platina del microscopio de fluorescencia sin perturbaciones.

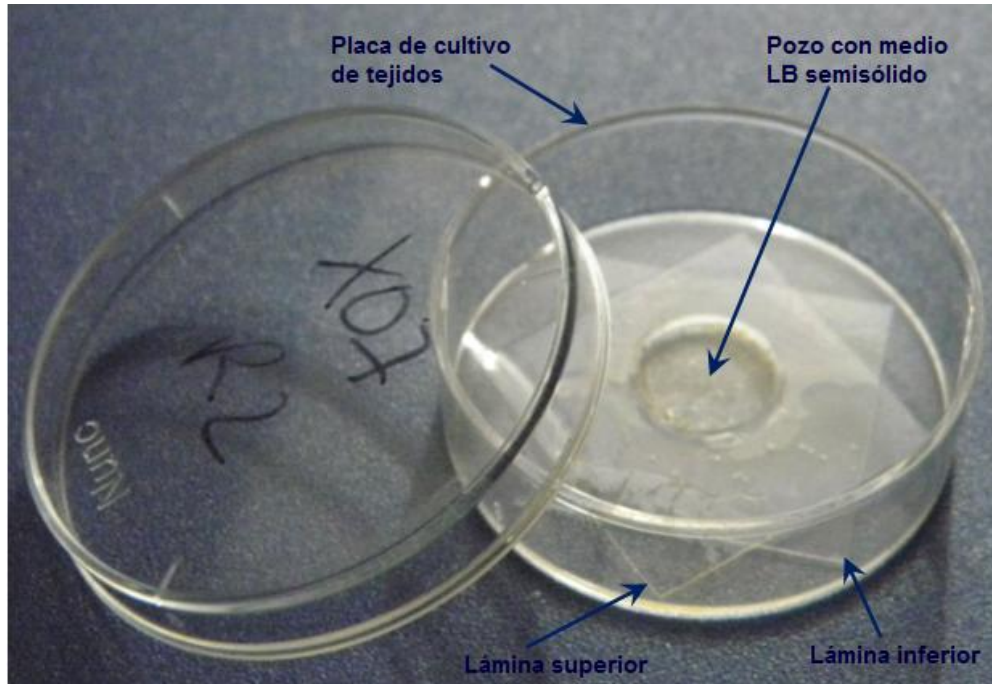


Figura 9.Dispositivo empleado en el monitoreo de un cultivo bacteriano (expresión de GFP) a lo largo del tiempo. Las bacterias transformadas únicamente con el módulo de comunicación sintético y aquellas co-transformadas junto al “*repressilator*” fueron crecidas en medio LB toda una noche a 37°C. De este medio se tomó una gota y se sembró en un pozo construido al interior de una caja de cultivo de tejidos. El pozo tenía un diámetro de 0.5cm y contenía 200ul de LB semisólido (agar 0.7%).

Para el análisis, las fotografías fueron introducidas en el software ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) con el objetivo de determinar los valores promedio de cada pixel en las fotos y de esta manera tener una medida cuantitativa de unidades arbitrarias de fluorescencia con las cuales se puede graficar la expresión con respecto al tiempo. A su vez las fotografías obtenidas fueron ensambladas en secuencia mediante el software Windows Movie Maker versión 2.6.4037.0, para obtener una secuencia en video que permitiera interpretar mejor los resultados y observar las oscilaciones en la expresión de GFP en los mismos campos visuales.

RESULTADOS

6.1 Topología del módulo sintético de comunicación bacteriana

El modelo teórico **sintético** (figura5) previamente diseñado por Dr. Koseska y Dr. Arévalo-Ferro fue analizado en este trabajo según los principios para la creación de un modelo en biología sintética definidos por Kaznesis (2007) y se encontró que no presentaba una topología de red que le permitiera exhibir un comportamiento periódico autorregulado en vista de la ausencia de un *feedback* negativo al interior del **módulo de comunicación sintético** (Figura 5, cuadrado rojo). Este problema causaría una desestabilización del sistema al ser expresado *in vivo*.

Teniendo en cuenta este análisis se rediseño el **módulo de comunicación sintético** (Figura 10, cuadrado rojo) para crear un *feedback* negativo que permitiera la ganancia de estabilidad en el sistema.

El *feedback* negativo fue diseñado como un mecanismo de regulación de las concentraciones de la molécula AI (3-oxo-C6HSL) al interior de la célula. A una determinada concentración umbral la molécula AI (3-oxo-C6HSL) es capaz de formar un complejo con el receptor LuxR y de esta manera estimular la expresión de los genes bajo regulación del promotor *luxbox*. El promotor *luxbox* se encuentra regulando la expresión del gen reportero *gfp*, y el gen que codifica para la proteína represora del promotor del operón Lac (*lacI*). A diferencia del primer modelo en el

cual el gen que codifica para la lactonasa AiiB se encontraba bajo regulación del promotor del operón Lac (ver figura 5, cuadrado rojo) en este nuevo diseño el gen *aiiB* se encuentra bajo regulación del promotor *luxbox* activado por el complejo AI-LuxR constituyendo de esta manera un *feedback* negativo (ver figura 10, cuadrado rojo).

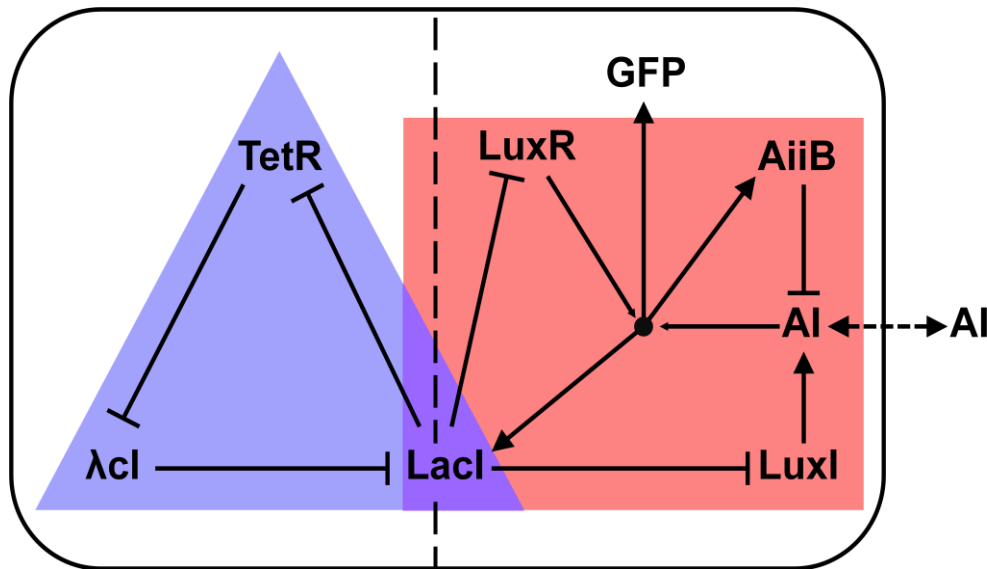


Figura 10 Modelo rediseñado de sincronización de osciladores celulares de dos unidades. El “*repressilator*” (triángulo azul) es una red de tres genes (*tetR*, *lacI*, *λcl*) que suprimen la expresión cada uno del otro, esta red crea una oscilación artificial en la célula. El **módulo sintético de comunicación bacteriana** (cuadrado rojo), fue originado empleando componentes del sistema de *Quorum Sensing* de *Vibrio fischeri* y *Agrobacterium tumefaciens*. La proteína **LuxI** sintetiza una molécula auto-inductora **AI** (3-oxo-C6HSL) la cual puede difundir a través de la membrana y pared celular y puede también entrar a las células vecinas. A determinada concentración umbral, AI es capaz de unirse a la proteína **LuxR** formando un heterotetrámero. El tetrámero LuxR-AI une a la región promotora *luxbox* y activa la transcripción de genes bajo su regulación (*gfp*, *aiiB* y *lacI*). El gen *aiiB* codifica para una lactonasa con capacidad de hidrolizar la molécula AI disminuyendo su concentración en el sistema lo que le permite a este módulo funcionar independientemente al poseer un **feedback** de autorregulación.

El diseño presentado en la figura 10 fue construido *in vitro* y expresado *in vivo*.

También, de forma paralela a este trabajo, se llevó a cabo una simulación matemática de su comportamiento en el Centro de Dinámica de Sistemas Complejos de la Universidad de Potsdam.

Este nuevo modelo permitió entender el **módulo de comunicación sintético** como un módulo independiente capaz de oscilar, autorregularse y ser acoplado con otros módulos independientes más allá del “*repressilator*”.

6.2 De *in silico* a *in vitro*: Construcción y ensamble de la red modelo

La construcción del plásmido que representa el **módulo sintético de comunicación bacteriana** (pCCB9) (CCB: Comunicación y Comunidades Bacterianas) empleó varios pasos de clonaciones a partir de plásmidos intermediarios como se ilustra en la figura 11. La organización y expresión de los genes contenidos en cada uno de los plásmidos fueron verificadas mediante digestión enzimática, secuenciación y análisis funcionales. Las secuencias de nucleótidos de los genes, promotores y señal para proteasas empleados en este trabajo se presentan en el anexo 1.

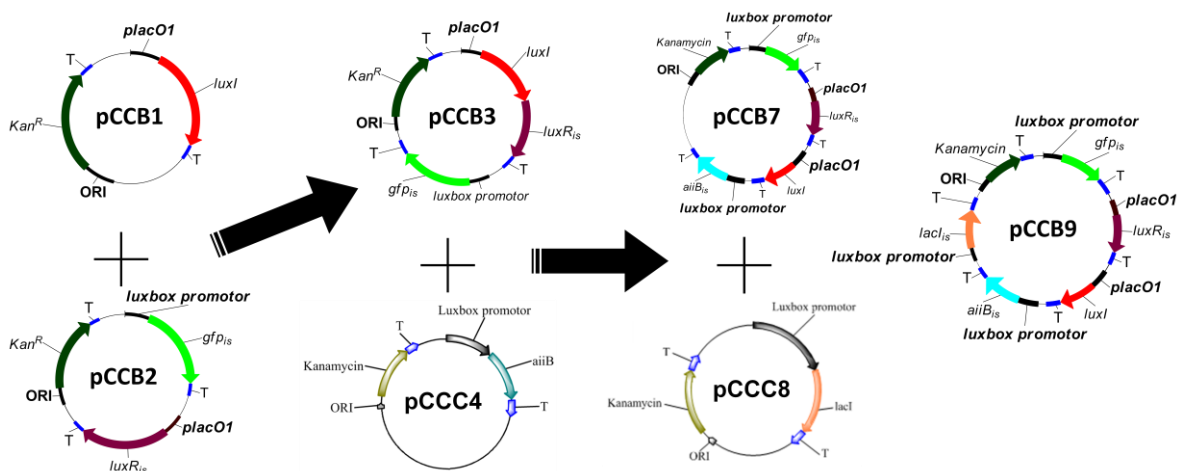


Figura 11 Diagrama de construcción del módulo sintético de comunicación bacteriana representado por el plásmido pCCB9. La construcción del plásmido pCCB9 involucró varios pasos de clonaciones a partir de plásmidos intermediarios (pCCB1, pCCB2, pCCB3, pCCB4, pCCB7 y pCCB8). Los plásmidos pCCB1, pCCB2, pCCB4 y pCCB8 a su vez fueron construidos empleando la base de plásmidos previamente descrita. Las flechas y los símbolos de suma indican eventos consecutivos de digestión enzimática y ligación. Todos los plásmidos presentan el gen de resistencia a Kanamicina.

Un diagrama en mayor detalle de la arquitectura del plásmido pCCB1 es presentado en la figura 12A. El plásmido pCCB1 presenta el gen *luxI* bajo la regulación del promotor de operón de la lactosa P_{lacO1} . El gen *luxI* codifica para una sintetasa de AHLs capaz de producir la molécula 3-oxo-C6HSL. En la naturaleza el promotor P_{lacO1} se haya inhibido por la proteína represora LacI, la cual es capaz de unir a la región promotora impidiendo la transcripción de los genes bajo regulación de P_{lacO1} . Los análogos de la lactosa como el IPTG son capaces de formar un complejo con el represor LacI y permitir la transcripción de los genes regulados por el promotor P_{lacO1} . De esta manera se esperaría que una cepa bacteriana transformada con este plásmido en presencia de IPTG, estimulara la expresión del gen *luxI* y por consiguiente aumentarían la producción de 3-oxo-C6HSL.

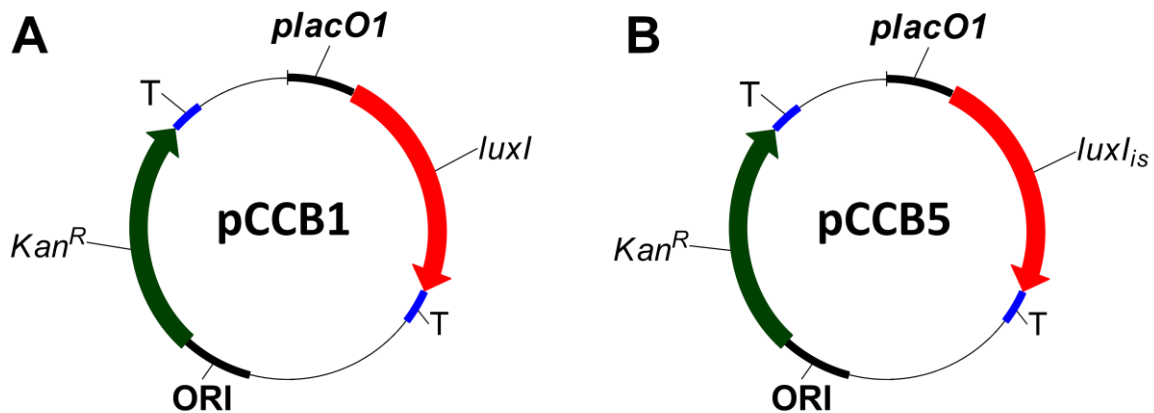


Figura 12 A: Arquitectura del plásmido pCCB1. Este plásmido posee el gen *luxI* que codifica para la sintetasa de 3-oxo-C6HSL, bajo la regulación del promotor del operón Lac (P_{lacO1}). **B:** Arquitectura del plásmido pCCB5 empleado como control de la actividad promotora y acción de proteasas de *E. coli*. Este plásmido presenta la misma arquitectura que el plásmido pCCB1 sin embargo el gen *luxI_{is}* posee en el extremo 3' una señal para proteasas de *E. coli*, lo que disminuye su vida media en la célula y atenúa su actividad. Ambos plásmidos presentan el gen de resistencia a la kanamicina.

Un segundo plásmido llamado pCCB5 (Figura 12B) fue construido. Este plásmido presenta la misma arquitectura que el plásmido pCCB1 con la diferencia que el

gen *luxI_{IS}* que codifica para la molécula AI (3-oxo-C6HSL) posee una señal en el extremo 3' de reconocimiento para proteasas de *E. coli*. Esta señal disminuye la vida media de la sintetasa LuxI y baja su concentración intracelular atenuando su actividad (ver anexo 1).

Estos plásmidos fueron ensamblados a partir de los genes presentes en la base de plásmidos, mediante digestión enzimática y posterior ligación de la secuencia promotora P_{lacO1} al marco abierto de lectura del gen *luxI* en el caso de pCCB1 y *luxI_{IS}* en el caso del plásmido pCCB5. El diseño metodológico permitió conservar secuencias de restricción flanqueando las regiones de interés en cada plásmido, lo que facilitó el empleo de estos en los posteriores eventos de clonación.

El plásmido pCCB2 (figura 11) fue previamente ensamblado siguiendo los mismos criterios enunciados para pCCB1 y pCCB5. Este plásmido contiene el gen reportero *gfp_{IS}* que codifica para la proteína verde fluorescente (GFP_{IS}) bajo el control del promotor *luxbox*. A su vez posee el gen *luxR_{IS}* que codifica para la proteína receptora LuxR_{IS} bajo el control del promotor del operón de la lactosa P_{lacO1}. Como se comentó antes, en cepas transformadas con este plásmido cultivadas en presencia de análogos de la lactosa, se podría estimular la expresión de LuxR_{IS}. Este plásmido en particular podría ser considerado como un plásmido biosensor de moléculas de comunicación bacteriana en muestras ambientales, en virtud de que es **incapaz** de producir la molécula 3-oxo-C6HSL, pero es capaz de sensorarla en un medio en presencia de un inductor de la expresión del *luxR_{IS}* como el IPTG. De esta manera se formaría un complejo LuxR_{IS}- AI (con la molécula AI

foránea) el cual activaría el promotor *luxbox* induciendo de esta manera la expresión GFP_{IS} .

El plásmido pCCB3 (figura 11 y figura 13D) es el producto de la inserción de una región de 0,8kpb perteneciente al plásmido pCCB1 en el plásmido pCCB2 mediante una reacción de ligación. La región insertada contenía el promotor P_{lacO1} y el gen *luxI*. Un diagrama que ilustra los pasos de digestión, ligación y preparación durante la creación del plásmido pCCB3 se presenta en la figura 13.

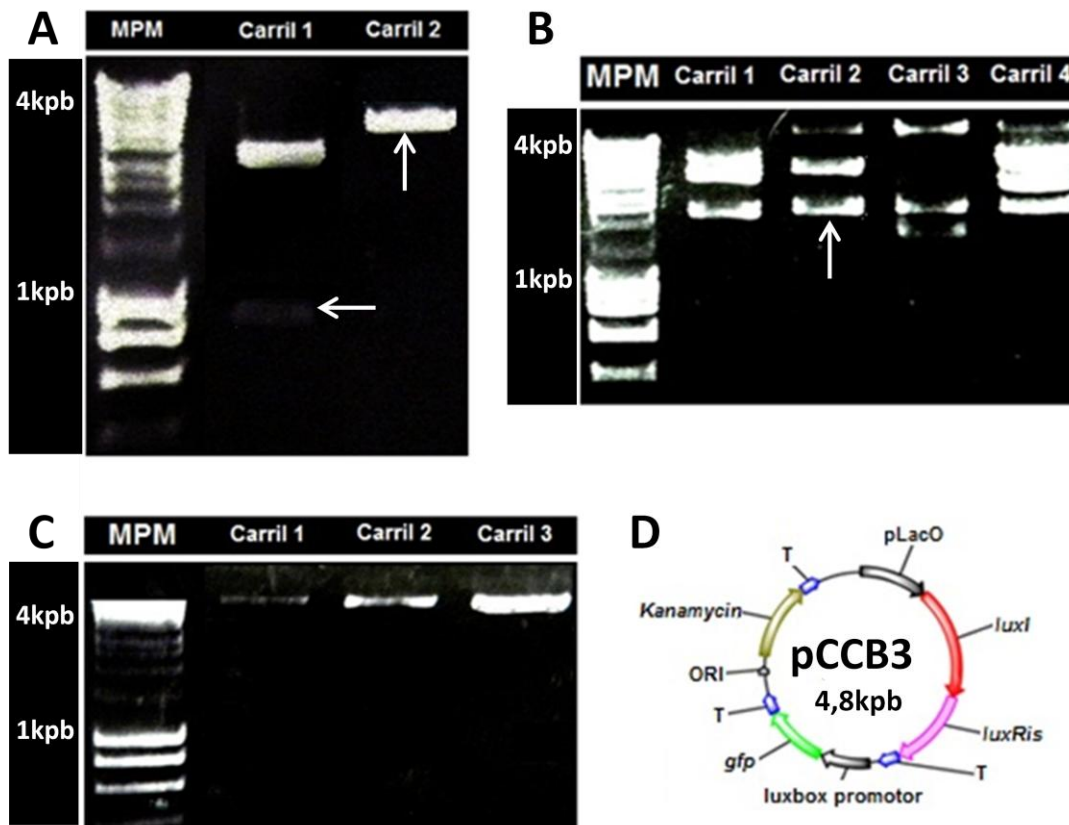


Figura 13 Creación del plásmido pCCB3 a partir de los plásmidos pCCB1 y pCCB2. **A:** Electroforesis de los productos de la digestión enzimática sobre los plásmidos pCCB1 y pCCB2. Carril 1: El plásmido pCCB1 fue digerido con las enzimas de restricción XbaI y XhoI obteniendo dos fragmentos de tamaño 0,8kpb y 3kpb. El fragmento de 0,8kpb (flecha blanca) fue empleado como inserto durante la ligación. Carril 2: El plásmido pCCB2 fue digerido con las enzimas NheI y XhoI generando un único fragmento de tamaño 4kpb el cual fue empleado como vector en la ligación. **B:** Electroforesis de los productos de la reacción de ligación digeridos con las enzimas XbaI y XhoI. Las colonias que presentaron los tamaños de plásmido deseados 2kpb/2,8kpb (carril 2, flecha blanca) fueron sometidas a preparación y digestión únicamente con XhoI para linealizar el ADN plasmídico. Los carriles 1, 3 y 4 presentan productos de ligación no deseados. **C:** como se observa en los carriles 1, 2 y 3 fue posible determinar la concentración en ng/ μ L con relación al marcador de peso molecular. **D:** Arquitectura del plásmido pCCB3.

Cómo se puede observar en la figura 13D el plásmido pCCB3 contiene tanto el gen *luxI* como el gen *luxR_{IS}* bajo el control del promotor del operón *lac* P_{lacO1}. La señal 3' para proteasas de *E. coli* reduce el tiempo de vida media de la proteína LuxR en la célula. A su vez este plásmido contiene el gen reportero *gfp_{IS}* bajo el control del promotor *luxbox*. Una cepa transformada con este plásmido en presencia de IPTG expresaría LuxR_{IS} y LuxI (que a su vez produciría la molécula 3-oxo-C6HSL) y se presentaría la consecuente formación del complejo LuxR_{IS}/AHL. Este complejo induciría la expresión de GFP_{IS} al actuar sobre el promotor *luxbox*.

El plásmido pCCB4 (figura 11 y figura 16A) fue construido a partir de los genes individuales *aiiB_{IS}* y el promotor *luxbox* contenidos en la base de plásmidos siguiendo la estrategia presentada en la figura 14. Es el producto de la ligación de una región de 1kpb del plásmido que contenía el gen *aiiB_{IS}*, con otro plásmido vector de 3kpb que contenía el promotor *luxbox* como se observa en la figura 15. La figura 16A muestra que el plásmido pCCB4 contiene el gen *aiiB_{IS}* bajo la regulación del promotor *luxbox*. No es posible evaluar la actividad promotora sobre la expresión de AiiB_{IS} en este módulo independiente, debido a que carece de los genes *luxR_{IS}* y *luxI* necesarios para la activación del promotor *luxbox* y en consecuencia su organización fue verificada por secuenciación.

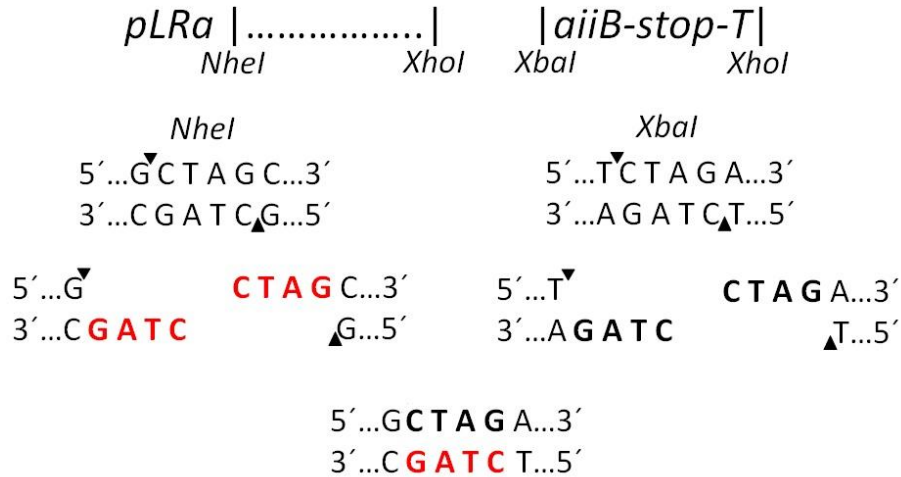


Figura 14 Esquema de la creación del plásmido pCCB4. Es posible observar el diseño y la estructura de los sitios de restricción que fueron empleados en las reacciones de digestión y ligación. El plásmido que contiene el promotor P_{LRa} ó promotor *luxbox*, posee una región 3' con secuencias de reconocimiento para las enzimas de restricción NheI y XhoI. Por otro lado el plásmido que posee el gen *aiiB_{IS}* presenta secuencias de reconocimiento de las enzimas XbaI en la posición 5' y XhoI en la 3'. Si se realiza una digestión con NheI/XhoI sobre el primer plásmido y con XbaI/XhoI sobre el segundo, se formaran sitios cohesivos que favorecerán la ligación de estos fragmentos.

Bajo los mismos principios metodológicos se llevó a cabo la construcción de un nuevo plásmido llamado pCCB6, cuya arquitectura es mostrada en la figura 16B. Este plásmido posee el gen *aiiB_{IS}* que codifica para la lactonasa AiiB_{IS} bajo regulación del promotor del operón *lac* P_{lacO1} . Una cepa transformada con este plásmido en presencia de IPTG sería capaz de expresar la lactonasa AiiB_{IS} (Esta es una de las cepas que se encuentran en estudio para ser patentadas). Este plásmido fue empleado para la creación de cepas control en los ensayos de bioluminiscencia en virtud de su capacidad para hidrolizar la molécula AI (3-oxo-C6HSL) y disminuir su concentración anulando la expresión de los fenotipos controlados por el complejo luxR_{IS}/AHL.

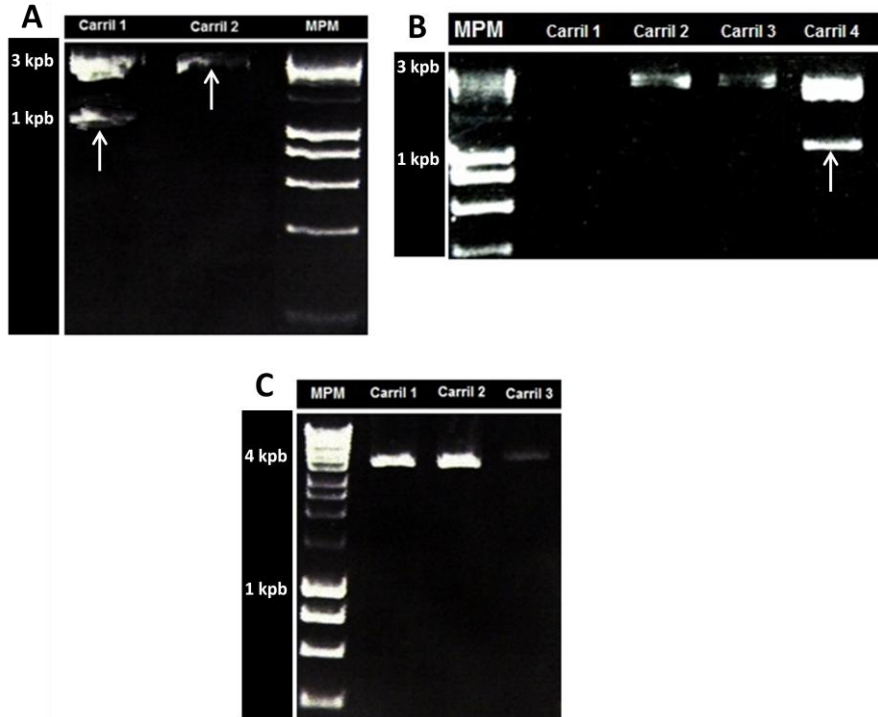


Figura 15 Creación del plásmido pCCB4 **A:** Electroforesis de los productos de la digestión enzimática sobre los plásmidos empleados. Carril 1: El plásmido que contiene el gen *aiiB_{IS}* fue digerido con las enzimas de restricción XbaI y XhoI obteniendo dos fragmentos de tamaño 1kpb y 3kpb. El fragmento de 1kpb (flecha blanca) fue empleado como inserto durante la ligación. Carril 2: El plásmido que contiene el promotor *luxbox* fue digerido con las enzimas NheI y XhoI generando un único fragmento de tamaño 3kpb el cual fue empleado como vector en la ligación. **B:** Electroforesis de los productos de la reacción de ligación digeridos con las enzimas XbaI y XhoI. Las colonias que presentaron los tamaños de plásmido deseados 1,1kpb/2,9kpb (carril 4, flecha blanca) fueron sometidas a preparación y linealización del ADN plasmídico empleando únicamente XhoI. Los carriles 1, 2 y 3 presentan productos de ligación no deseados. **C:** como se observa en los carriles 1, 2 y 3 fue posible determinar la concentración en ng/ μ L con relación al marcador de peso molecular.

El plásmido pCCB6 fue construido a partir de plásmidos que contenían el promotor

P_{lacO1} y el gen *aiiB_{IS}* independientemente conforme a los resultados que se presentan en la figura 17.

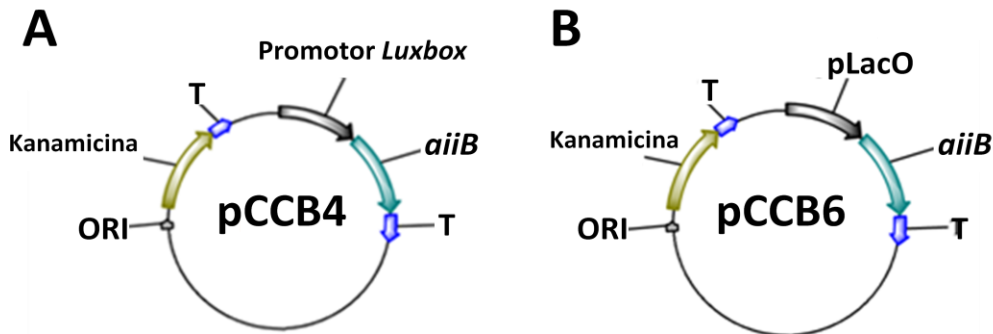


Figura 16 Arquitectura de los plásmidos pCCB4 y pCCB6. **A:** Plásmido pCCB4, este constructo posee el gen *aiiB_{IS}* que codifica para la lactonasa AiiB_{IS} bajo la regulación del promotor *luxbox*. **B:** Plásmido pCCB6, este constructo posee el gen *aiiB_{IS}* que codifica para la lactonasa AiiB_{IS} bajo la regulación del promotor del operón *lac P_{lacO1}*. Por consiguiente se espera que una cepa transformada con este plásmido en presencia de una molécula análoga a lactosa como el IPTG active el promotor P_{lacO1} favoreciendo la expresión de AiiB_{IS} capaz de hidrolizar la molécula autoinductora 3-oxo-C6HSL.

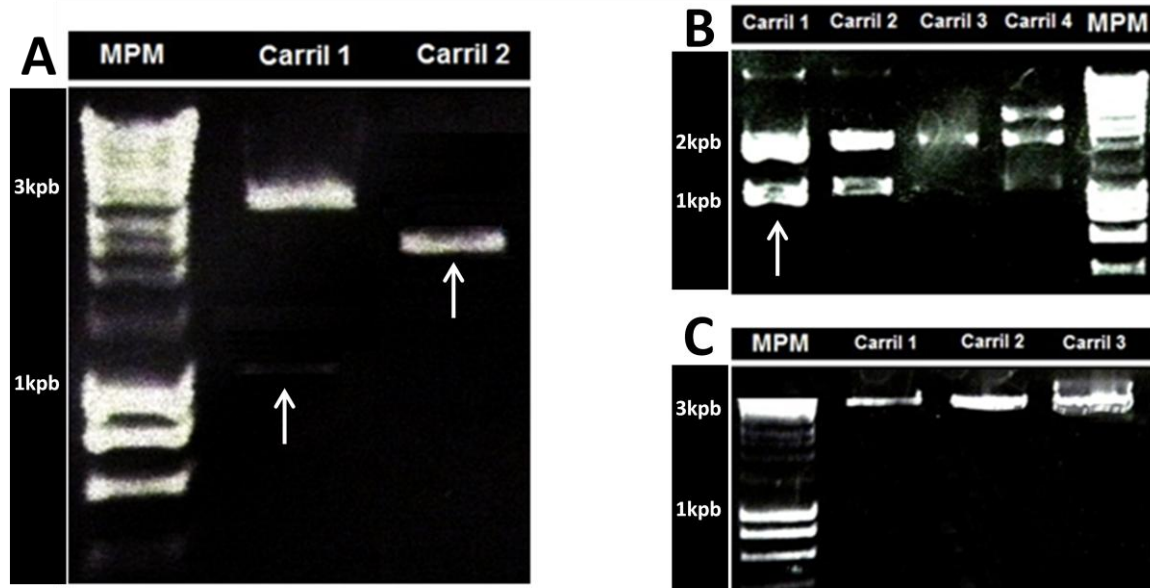


Figura 17 Creación del plásmido pCCB6 **A:** Electroforesis de los productos de la digestión enzimática sobre los plásmidos empleados. Carril 1: El plásmido que contiene el gen *aaiB_S* fue digerido con las enzimas de restricción XbaI y XhoI obteniendo dos fragmentos de tamaño 1kpb y 3kpb. El fragmento de 1kpb (flecha blanca) fue empleado como inserto durante la ligación. Carril 2: El plásmido que contiene el promotor P_{lacO1} fue digerido con las enzimas NheI y XhoI generando un único fragmento de tamaño 2,1kpb el cual fue empleado como vector en la ligación. **B:** Electroforesis de los productos de la reacción de ligación digeridos con las enzimas XbaI y XhoI. Las colonias que presentaron los tamaños de plásmido deseados 1,1kpb/2,0kpb (carril 2, flecha blanca) fueron sometidas a preparación y linealización del ADN plasmídico empleando únicamente XhoI. Los carriles 2, 3 y 4 presentan productos de ligación no deseados. **C:** como se observa en los carriles 1, 2 y 3 fue posible determinar la concentración en ng/μL con relación al marcador de peso molecular.

Una región de 1kpb que contenía el gen *aaiB_S* fue empleada como inserto en la reacción de ligación. Como vector se empleó el plásmido que contenía el promotor P_{lacO1} el cual presentaba un tamaño de 2,1kpb.

Como se puede observar en la figura 11 y 18D, un nuevo plásmido intermediario nombrado el plásmido pCCB7 fue construido con base en los plásmidos pCCB4 y pCCB3. Un fragmento de 1,1kpb del plásmido pCCB4 fue empleado como inserto y el plásmido pCCB3 fue usado como vector siguiendo la secuencia de resultados presentada en la figura 18.

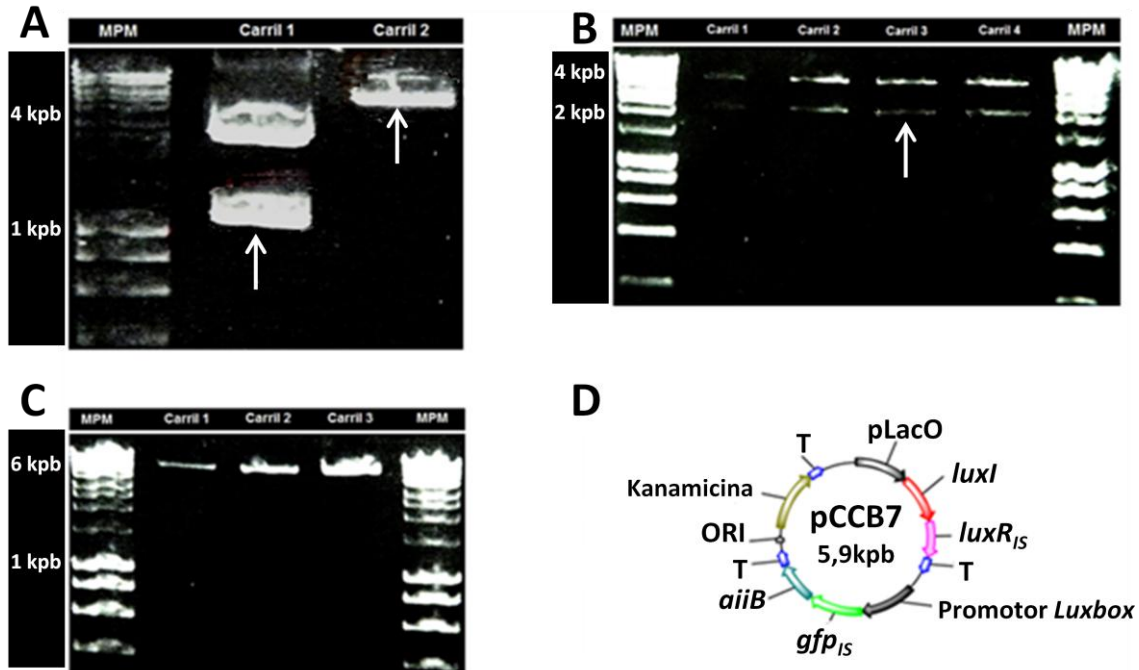


Figura 18 Creación del plásmido pCCB7 **A:** Electroforesis de los productos de la digestión enzimática sobre los plásmidos pCCB4 y pCCB3. Carril 1: El plásmido pCCB4 fue digerido con las enzimas de restricción XbaI y XhoI obteniendo dos fragmentos de tamaño 1,1kpb y 2,9kpb. El fragmento de 1,1kpb (flecha blanca) que contiene el gen *aiiB_{IS}* bajo el control de promotor *luxbox* fue empleado como inserto durante la ligación. Carril 2: El plásmido pCCB3 fue digerido con las enzimas NheI y XhoI generando un único fragmento de tamaño 4,8kpb el cual fue empleado como vector en la ligación. **B:** Electroforesis de los productos de la reacción de ligación digeridos con las enzimas XbaI y XhoI. De las colonias que presentaron los tamaños de plásmido deseados 2kpb/3,9kpb (carril 1-4) se selecciono una (carril 3, flecha blanca) para realizar la preparación y linealización del ADN plasmídico empleando únicamente XhoI. **C:** como se observa en los carriles 1, 2 y 3 fue posible determinar la concentración en ng/μL con relación al marcador de peso molecular. **D:** arquitectura del plásmido pCCB7

El plásmido pCCB7 presenta los genes *luxI* y *luxR_{IS}* bajo la regulación del promotor del operón *lac P_{lacO1}*. A su vez presenta el gen reportero *gfp_{IS}* y el gen *aiiB_{IS}* bajo regulación del promotor *luxbox*. Una cepa transformada con este plásmido en presencia de IPTG expresaría el receptor LuxR_{IS} y la sintetasa de 3-oxo-C6HSL. El complejo LuxR_{IS}/AHL podría entonces activar los genes bajo el control del promotor *luxbox*, tales como *gfp_{IS}* y *aiiB_{IS}*. La lactonasa AiiB_{IS} hidrolizaría la molécula 3-oxo-C6HSL apagando de esta manera el sistema.

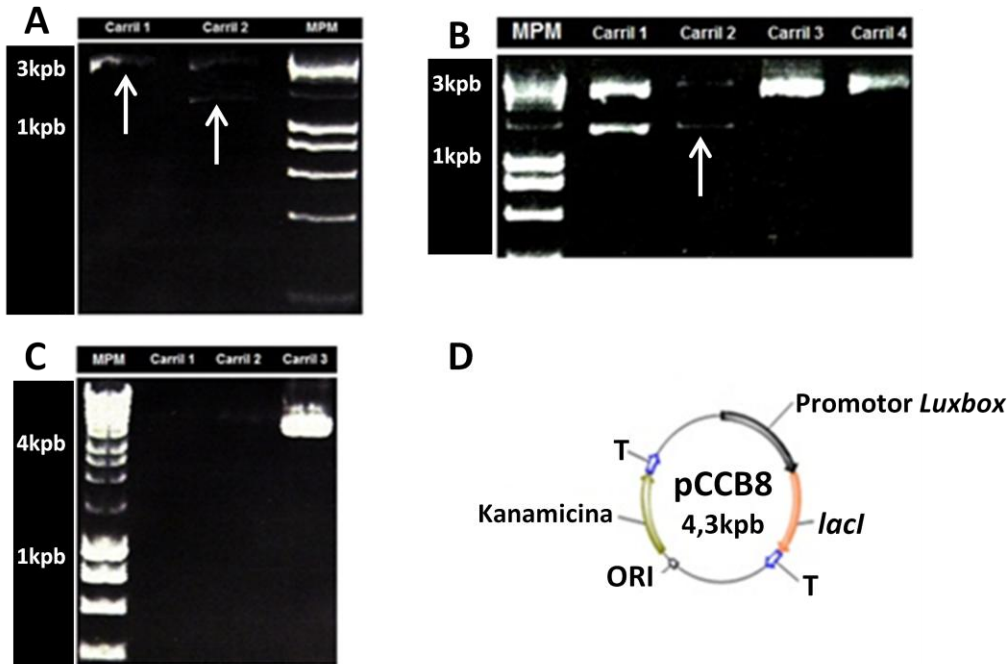


Figura 19 Creación del plásmido pCCB8 **A:** Electroforesis de los productos de la digestión enzimática sobre los plásmidos empleados. Carril 1: El plásmido que contiene el promotor *luxbox* fue digerido con las enzimas NheI y XhoI generando un único fragmento de tamaño 3kpb (flecha blanca) el cual fue empleado como vector en la ligación. Carril 2: El plásmido que contiene el gen *lacI_S* fue digerido con las enzimas de restricción XbaI y XhoI obteniendo dos fragmentos de tamaño 1,3kpb y 3kpb. El fragmento de 1,3kpb (flecha blanca) fue empleado como inserto durante la ligación. **B:** Electroforesis de los productos de la reacción de ligación digeridos con las enzimas XbaI y XhoI. Las colonias que presentaron los tamaños de plásmido deseados 1,4kpb/2,9kpb (carril 2, flecha blanca y carril 1) fueron sometidas a preparación y linealización del ADN plasmídico empleando únicamente XhoI. como se observa en **C:** como se observa en los carriles 1, 2 y 3 fue posible determinar la concentración en ng/μL con relación al marcador de peso molecular. **D:** arquitectura del plásmido pCCB8.

Con el objetivo de crear un punto de acople entre nuestro módulo sintético y otros módulos como el *repressilator* se hizo necesaria la construcción del plásmido intermediario pCCB8. El plásmido pCCB8 fue creado a partir de plásmidos que contenían el gen *lacI_S* y el promotor *luxbox* de manera independiente. Un fragmento de 1,3kpb que contenía el gen *lacI_S* fue empleado como inserto y el plásmido que contenía el promotor *luxbox* se utilizó como vector durante la reacción de ligación Figura 19.

El plásmido pCCB8 presenta el gen *lacI_S* bajo el control del promotor *luxbox*. El gen *lacI_S* codifica para la proteína represora LacI_S que es capaz de unir al promotor P_{lacO1} y bloquear la expresión de los genes bajo su regulación. A su vez

esta proteína represora es capaz de activar el sistema “*repressilator*” como se observa en la figura 2.

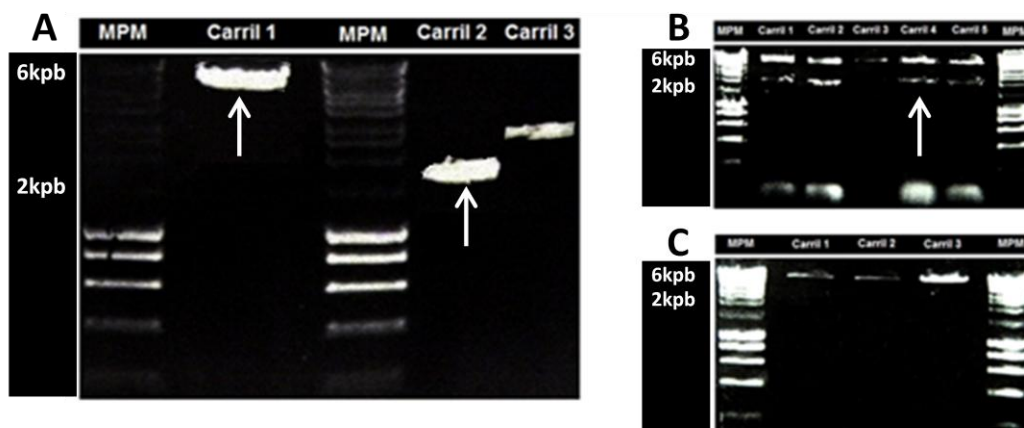


Figura 20 Creación del plásmido pCCB9 **módulo sintético de comunicación bacteriana** **A:** Electroforesis de los productos de la digestión enzimática sobre los plásmidos pCCB7 y pCCB8. Carril 1: El plásmido pCCB7 fue digerido con las enzimas NheI y XhoI generando un único fragmento de tamaño 5,9kpb el cual fue empleado como vector en la ligación Carril 2: El plásmido pCCB8 fue digerido con las enzimas de restricción XbaI y XhoI obteniendo dos fragmentos de tamaño 1,9kpb y 2,4kpb. El fragmento de 1,9kpb (flecha blanca) que contiene el gen *lacI_S* bajo el control de promotor *luxbox* fue empleado como inserto durante la ligación. **B:** Electroforesis de los productos de la reacción de ligación digeridos con las enzimas XbaI y XhoI. De las colonias que presentaron los tamaños de plásmido deseados 5,8kpb/2kpb (carril 1, 2, 4 y 5) se selecciono una (carril 4, flecha blanca) para realizar la preparación y linealización del ADN plasmídico empleando únicamente XhoI. **C:** como se observa en los carriles 1, 2 y 3 fue posible determinar la concentración en ng/μL con relación al marcador de peso molecular.

Finalmente se llevó a cabo el ensamble del plásmido pCCB9 que representa *in vitro* el **módulo sintético de comunicación bacteriana** diseñado *in silico*. Este fue construido con base en los plásmidos pCCB8 y pCCB7 (figura 11). Una región de 1,9kpb del plásmido pCCB8 que contenía el gen *lacI_S* bajo el control de promotor *luxbox* fue empleada como inserto en la reacción de ligación al plásmido pCCB7 como lo muestra la secuencia en la figura 20.

La arquitectura en detalle del plásmido pCCB9 y un esquema representando las interacciones al interior del **módulo sintético de comunicación bacteriana** se presentan en la figura 21.

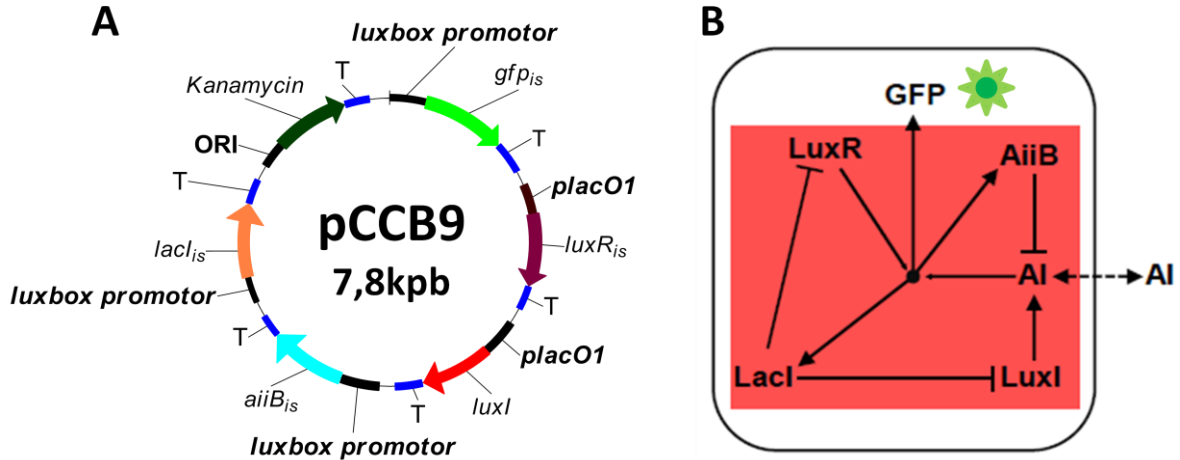


Figura 21 A: Esquema del plásmido pCCB9 correspondiente al **módulo sintético de comunicación bacteriana**. **B:** Diagrama de las interacciones al interior del módulo sintético. En presencia de IPTG ó acoplado con el sistema “*repressillator*” la proteína *Lacl_{IS}* detiene su actividad represora y se estimula la producción de *LuxR_{IS}* y la sintetasa *LuxI*. La sintetasa *LuxI* produce la molécula 3-oxo-C6HSL que a su vez es capaz de formar un heterotetrámero con el receptor *LuxR_{IS}* para estimular la expresión de la proteína reportera *GFP_{IS}*, la lactonasa *AiiB_{IS}* (que degradada la molécula de AHL) y la proteína represora *Lacl_{IS}* que vuelve a reiniciar el sistema.

El plásmido pCCB9 posee los genes *luxR_{IS}* y *luxI* bajo la regulación del promotor del operón *lac* P_{lacO1} . A su vez posee los genes *aiiB_{IS}*, *lacI_{IS}* y *gfp_{IS}* bajo la regulación del promotor *luxbox*. Una cepa co-transformada con pCCB9 y con el módulo *repressillator* es capaz de generar oscilaciones autosostenibles observadas como un cambio en la expresión del gen reportero *GFP_{IS}*, esta es una consecuencia de la fluctuación en las concentraciones de *LuxI* y *LuxR* al interior de la célula como será explicado en detalle en la discusión.

Todos los plásmidos aquí descritos y otros que fueron construidos como control en los ensayos de microscopía de fluorescencia fueron empleados expresados *in vivo* en cepas de *E. coli* DH5 α cuya descripción se presenta en el anexo 2.

6.3 De *in vitro* a *in vivo*: Inducción de la expresión de fenotipos en *E. coli* DH5 α

Como se comentó anteriormente cada uno de los plásmidos intermediarios empleados en la construcción del **módulo sintético de comunicación bacteriana** fue confirmado en sus perfiles de digestión, secuenciación y ensayos funcionales.

Los ensayos funcionales permiten determinar si existe una actividad reguladora ó inhibidora más allá de la organización genética y si esta actividad puede ser modulada por la presencia o ausencia de un estímulo externo. Por ejemplo para observar la actividad promotora en respuesta a estímulos externos del promotor P_{lacO1} sobre los genes bajo su regulación, bastaría con inducir su actividad mediante el empleo de análogos de la lactosa como el IPTG que forman un complejo con la proteína represora LacI liberando la región promotora y permitiendo así la expresión de los genes que regula.

Con base en esa estrategia se llevaron a cabo ensayos funcionales para verificar la expresión genética y la actividad promotora inducible en cepas transformadas con los plásmidos previamente descritos.

Para los ensayos funcionales con los que se verificó cada etapa, se empleó la cepa biosensora pSB403 construida por Winson *et al.* (1998) que permitió evaluar la expresión de la molécula AI (3-oxo-C6HSL) y la expresión de la lactonasa AiiB, en las cepas capaces de producir estas moléculas bajo ciertos estímulos. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado.

La figura 22A muestra los resultados obtenidos en los ensayos de bioluminiscencia para las cepas construidas a partir de los plásmidos pCCB1 y pCCB6.

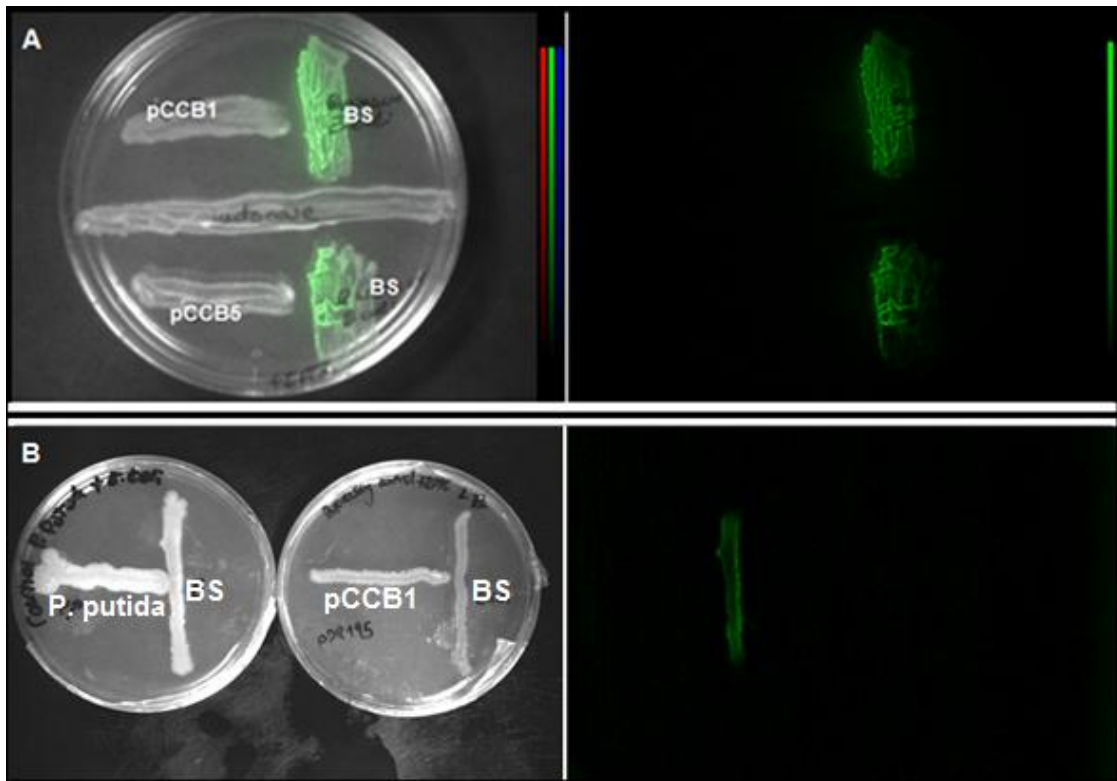


Figura 22 Ensayos de bioluminiscencia. **(A)** El gráfico muestra como las cepas transformadas con los plásmidos pCCB1 y pCCB5 son capaces de estimular la producción de bioluminiscencia en la cepa biosensora (BS) pSB403. Estas cepas expresan 3-oxo-C6HSL únicamente en presencia de IPTG. Esta molécula Auto inductora (AI) es capaz de migrar en el medio y estimular la cepa BS que produce bioluminiscencia. La cepa transformada con el plásmido pCCB5 produce una menor estimulación atribuida a la presencia de una secuencia blanco de 11 aminoácidos de reconocimiento para proteasas de *E. coli* que reduce su concentración. **(B) Caja izq.** Control positivo, una estría de la bacteria *Pseudomonas putida* fue enfrentada contra la cepa BS en ausencia de IPTG. *Pseudomonas putida* posee un sistema de QS capaz de producir la molécula AI. **Caja der.** Control negativo. Una estría de una cepa transformada con el plásmido pCCB1 fue crecida contra la cepa BS en ausencia de IPTG. Bioluminiscencia observada con 2 mín de exposición en oscuridad. Fotografías tomadas con Ultrahigh sensitive CCD Kamera con Image Intensifier Controller Hamamat Photon Counting Acquisition

Como se puede observar en la figura 22A, la cepa de *E. coli* DH5 α transformada con el plásmidos pCCB1 (figura 12A) fue enfrentada a la cepa biosensora pSB403. Esta cepa es capaz inducir la expresión de la sintetasa de 3-oxo-C6HSL en presencia de un estímulo externo como el IPTG. Lo anterior es una consecuencia de la actividad reguladora del promotor P_{lacO1} sobre el gen *luxI*. Este promotor es activado por moléculas análogas de la lactosa como el IPTG. La molécula

autoinductora (3-oxo-C6HSL) es capaz de atravesar la membrana y pared celular y difundir en el medio para entrar a la cepa biosensora y estimular la expresión de biolumiscencia.

Una cepa construida con el plásmido pCCB5 (figura 12B) fue enfrentada a la cepa biosensora pSB403. Lo anterior se realizó con el objetivo de observar el efecto de una secuencia 3' de reconocimiento para proteasas de *E. coli*, al final del gen *luxI*, en el tiempo de vida media de la sintetasa LuxI. Esta cepa también responde a IPTG y estimula la expresión de la sintetasa de 3-oxo-C6HSL que difunde en el medio para inducir a la cepa biosensora. En efecto, en la figura 22A se observa una menor inducción de biolumiscencia en la cepa biosensora en comparación con la cepa transformada con el plásmido pCCB1.

Para estar seguros de que la expresión de la sintetasa LuxI se encontraba bajo la regulación del promotor P_{lacO1} , se llevó a cabo un ensayo control como se puede observar en la figura 22B. La misma cepa de *E. coli* DH5 α transformada con el plásmido pCCB1 fue enfrentada a la cepa biosensora pSB403 en ausencia de IPTG. Como se observa en la figura 22B (caja derecha) no se indujo la producción de biolumiscencia en la cepa biosensora. Lo anterior se atribuye al hecho de que el gen *luxI* se encuentra bajo la regulación del promotor P_{lacO1} , el cual a su vez se encuentra bloqueado por la proteína represora LacI de expresión constitutiva en la bacteria *E. coli* DH5 α . En ausencia de IPTG u otro análogo de la lactosa no existe la probabilidad de inhibir la acción represora de la proteína LacI y el gen *luxI* no es expresado.

Para tener un control positivo de la expresión de bioluminiscencia por la cepa biosensora pSB403 se llevó a cabo un ensayo empleando la bacteria *Pseudomonas putida* isof que posee un sistema nativo de QS y es capaz de producir AHLs (dentro de ellas la 3-oxo-C6HSL) en ausencia de IPTG como se puede observar en la figura 22B (caja izquierda).

La figura 23 muestra el resultado obtenido en los ensayos de bioluminiscencia para una cepa de *E. coli* DH5 α co-transformada con el plásmido pCCB3 y el sistema “repressilator” (Figura 2).

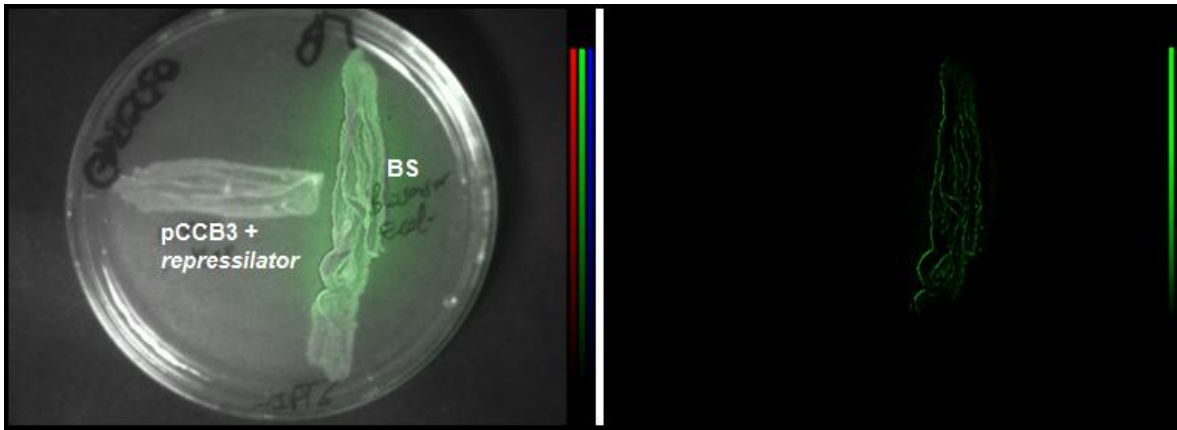


Figura 23 Ensayos de bioluminiscencia. El gráfico muestra como la cepa co-transformada con el plásmido pCCB3 y el plásmido “repressilator” es capaz de estimular la producción de bioluminiscencia en la cepa biosensora pSB403 en ausencia de IPTG. El circuito “repressilator” disminuye cíclicamente la concentración de LacI al interior de la célula, lo que permite la activación del promotor P_{lacO1} en ausencia de IPTG. La molécula AI es capaz de migrar en el medio para activar la bioluminiscencia en la cepa BS. **Caja izq:** superposición de las fotografías en luz blanca y oscuridad mostrando la expresión de bioluminiscencia en la cepa biosensora. **Caja der:** fotografía con 2 mín de exposición en oscuridad donde se puede observar la expresión de bioluminiscencia en la cepa biosensora. Tomada con Ultrahigh sensitive CCD Kamera with Image Intensifier Controller Hamamat Photon Counting Acquisition. Software Acuacosmos.

Como se puede observar en la figura 23, la cepa de *E. coli* DH5 α co-transformada con los plásmidos pCCB3 (figura 13D) y el plásmido “repressilator” (Figura 2) fue enfrentada a la cepa biosensora pSB403. Esta cepa fue capaz de inducir la expresión de la sintetasa de 3-oxo-C6HSL sin requerir alguna estimulación externa como el IPTG. Esta molécula autoinductora es capaz de atravesar la membrana y

pared celular, difundirse en el medio y entrar a la cepa biosensora para estimular la producción de biolumiscencia.

Cómo se puede observar en la figura 13D, para que se pueda expresar el gen *luxI* se requiere de alguna señal ó estímulo que inhiba la acción represora de la proteína LacI sobre el promotor P_{lacO1} . En los ensayos mostrados en la figura 22A esta inhibición de LacI fue conducida mediante el empleo del análogo de la lactosa IPTG quien forma un complejo con LacI liberando así el promotor P_{lacO1} . Sin embargo, en el ensayo descrito en la figura 23 no se empleó IPTG y la inhibición de la proteína LacI es una consecuencia del empleo del plásmido “*repressilator*” el cual disminuye cíclicamente la concentración de LacI al interior de la célula (ver anexo 2, cepa W80+R48) generando periodos de expresión de *luxI* lo que a su vez permite la acumulación de la molécula 3-oxo-C6HSL y consecuentemente la estimulación de la cepa biosensora como se observa en la figura 23.

El plásmido pCCB3 no solo posee el gen *luxI* bajo el control de P_{lacO1} sino también el gen que codifica para el receptor LuxR capaz de formar un complejo con la molécula 3-oxo-C6HSL. Este complejo es capaz de estimular la expresión de los genes regulados por el promotor *luxbox* como se observa en la figura 13D. En este caso se esperaba que una cepa co-transformada con el “*repressilator*” y el plásmido pCCB1 fuera capaz de inducir la producción tanto de molécula AI y LuxR y en consecuencia activar la expresión del gen *gfp* bajo regulación del promotor *luxbox*. Estos resultados de expresión de GFP serán presentados más adelante junto a los demás resultados de microscopía.

La figura 24 muestra el resultado obtenido en los ensayos de bioluminiscencia para una cepa de *E. coli* DH5 α co-transformada con el plásmido pCCB9 (**módulo sintético de comunicación bacteriana**) y el sistema “*repressilator*” (Figura 2). Un diagrama que muestra las interacciones genéticas en una cepa co-transformada con estos dos plásmidos se presenta en la figura 10.

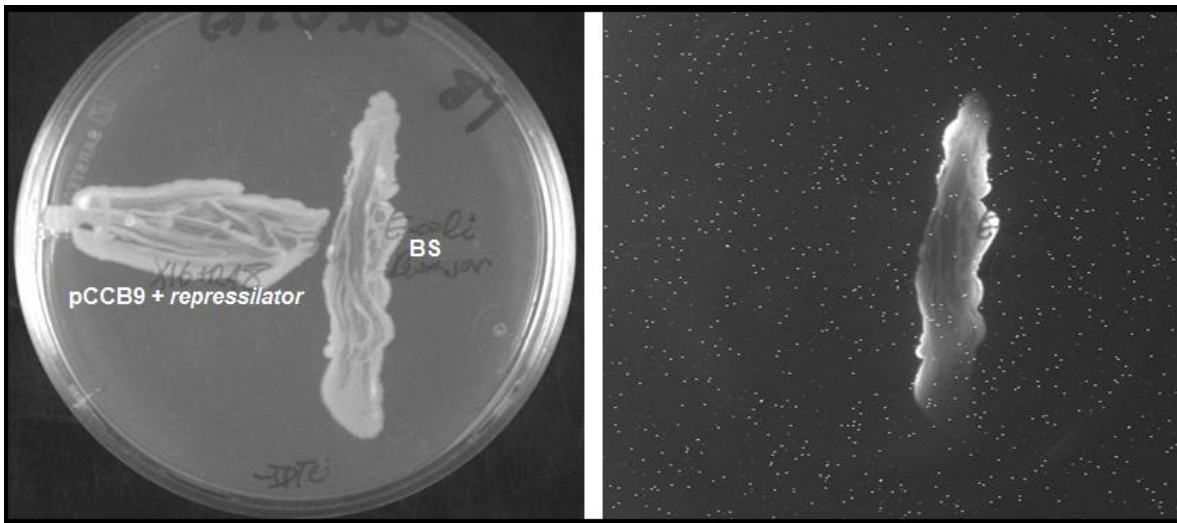


Figura 24 Ensayos de bioluminiscencia. El gráfico muestra como la cepa co-transformada con el plásmido pCCB9 correspondiente al **módulo sintético de comunicación bacteriana** y el plásmido “*repressilator*” es capaz de estimular la producción de bioluminiscencia en la cepa biosensora pSB403 en ausencia de IPTG. El circuito “*repressilator*” disminuye cíclicamente la concentración de LacI al interior de la célula, lo que permite la activación del promotor P_{lacO_1} en ausencia de IPTG. La molécula AI es capaz de migrar en el medio para activar la bioluminiscencia en la cepa BS. Bioluminiscencia observada con 3 mín de exposición en oscuridad. Fotografía tomada empleando un fotodocumentador de geles Dolphin-Doc Plus 100V.

Cómo se puede observar en la figura 10 y en la figura 24 la cepa co-transformada con el plásmido pCCB9 y el “*repressilator*” es capaz de producir 3-oxo-C6HSL en ausencia de IPTG. Como se explicó antes la inhibición de la proteína represora LacI es atribuida al complejo “*repressilator*” el cual produce oscilaciones en la concentración de LacI al interior de la célula permitiendo la creación de periodos de expresión de *luxI* que conducen a la producción de la molécula 3-oxo-C6HSL y su consecuente estimulación sobre la cepa biosensora.

Como se comentó anteriormente, el plásmido pCCB9 corresponde al **módulo sintético de comunicación bacteriana** y en consecuencia la cepa que fue co-transformada con este plásmido junto al “*repressilator*” también fue empleada en ensayos de microscopia con el objetivo de monitorear el comportamiento de estos osciladores artificiales en una población bacteriana a lo largo del tiempo. Estos resultados serán presentados más adelante.

Al igual que con los ensayos de producción de 3-oxo-C6HSL se empleó la cepa biosensora pSB403 para observar la expresión y actividad de la lactonasa AiiB en las cepas transformadas con los plásmidos que contenían el gen *aiiB*. Un esquema mostrando el montaje metodológico se presenta en la figura 8.

La figura 25 presenta los resultados obtenidos en los ensayos de inhibición de biolumiscencia realizados con una cepa de *E. coli* DH5 α co-transformada con el plásmido pCCB6 (figura 16B). Como se observa en la figura una estría de la cepa transformada con el plásmido pCCB6 fue sembrada entre las cepas biosensora pSB403 y una cepa transformada con el plásmido pCCB1 en presencia de IPTG. Una cepa transformada con el plásmido pCCB1 es capaz de producir la molécula 3-oxo-C6HSL, que puede difundir en el medio para estimular la expresión de biolumiscencia en la cepa BS (figura 22A). A su vez la cepa transformada con el plásmido pCCB6 tiene la capacidad de producir la lactonasa AiiB en presencia de IPTG. Por lo anterior al sembrar una estría de la cepa transformada con el plásmido pCCB6 entre la cepa BS y la cepa transformada con el plásmido pCCB1 solo es posible observar la inducción de biolumiscencia en aquella región donde la

molécula 3-oxo-C6HSL no fue hidrolizada como se observa en la figura 25 A (flecha blanca).

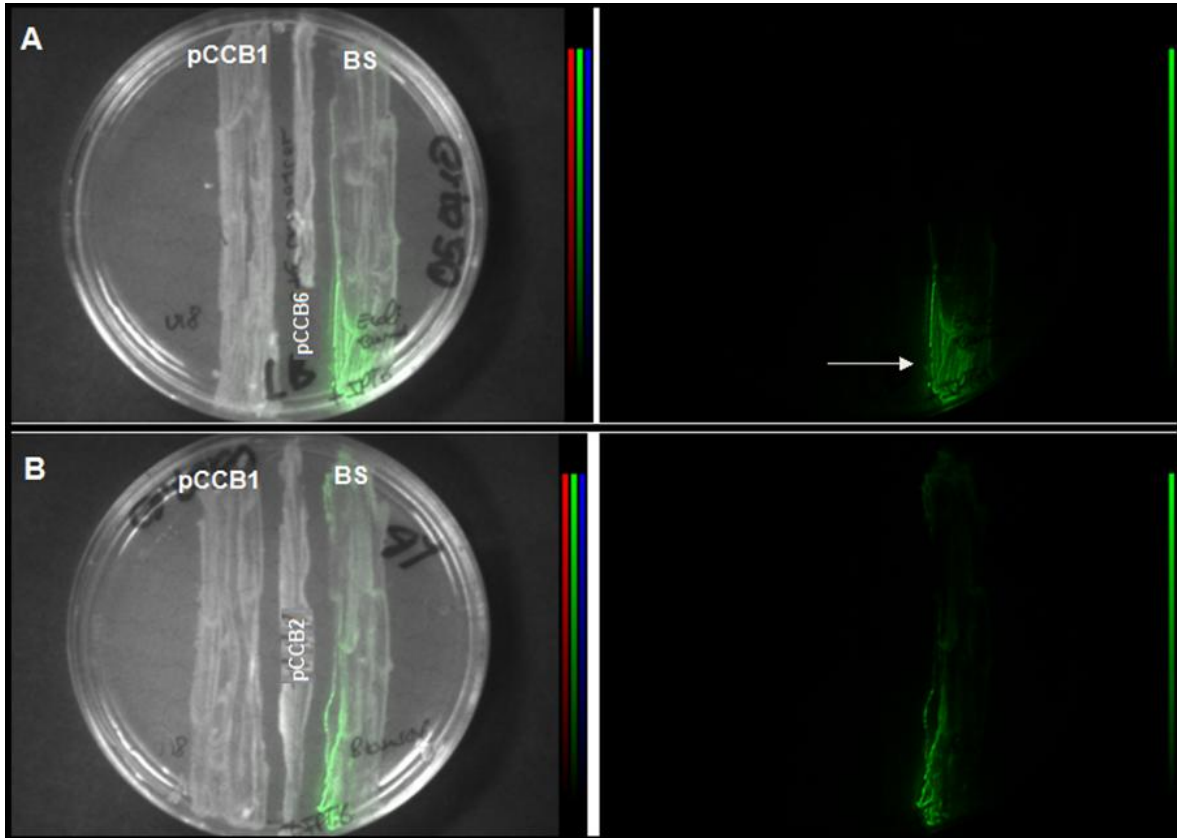


Figura 25 Ensayos de inhibición de la bioluminiscencia. La cepa transformada con el plásmido pCCB1 expresa AI únicamente en presencia de IPTG. Este AI es capaz de migrar en el medio y estimular la cepa BS que produce bioluminiscencia. **(A)** La cepa transformada con el plásmido pCCB6 que es capaz de producir AiiB (lactonasa) fue sembrada entre la del pCCB1 y la cepa BS. La bioluminiscencia solo fue observada en la región donde era posible la migración de molécula AI sin ser hidrolizada: flecha blanca. Se observó inhibición como consecuencia de hidrólisis de la molécula AI por la lactonasa AiiB. **(B)** Ensayo control. La cepa transformada con el pCCB2 (incapaz de producir AI ó lactonasa) fue sembrada entre la cepa transformada con el pCCB1 y la cepa BS. No se observó una inhibición de la difusión de molécula AI atribuida a la cepa transformada con el pCCB2. Bioluminiscencia observada con 2 min de exposición en oscuridad. Fotografías tomadas con Ultrahigh sensitive CCD Kamera con Image Intensifier Controller Hamamat Photon Counting Acquisition.

Con el objetivo de verificar que la inhibición en la expresión de la bioluminiscencia en la región adyacente a la cepa transformada con el plásmido pCCB6 era un atributo de la hidrólisis de la molécula 3-oxo-C6HSL en vez de una inhibición mecánica se llevó a cabo el experimento control que se observa en la figura 25B.

No se encontró una inhibición mecánica de la difusión de la molécula 3-oxo-C6HSL a través de la cepa transformada con el plásmido pCCB2 (incapaz de producir AiiB) como se observa en la figura 25B. Estos resultados confirman la actividad regulatoria del promotor P_{lacO1} en la expresión del gen *aiiB*.

Cómo se puede observar en nuestro modelo (figura 21) el gen *aiiB* se encuentra bajo regulación del promotor *luxbox*, por consiguiente se llevaron a cabo ensayos de inhibición de biolumiscencia en una cepa transformada con el plásmido pCCB7 con el objetivo de determinar la actividad promotora de *luxbox* inducida por el complejo LuxR-3-oxo-C6HSL.

La figura 26A presenta los resultados obtenidos para los ensayos de inhibición de la biolumiscencia por una cepa transformada con el plásmido pCCB7.

El plásmido pCCB7 (Figura 18 D) posee los genes *luxI* y *luxR* bajo el control del promotor P_{lacO1} y los genes *gfp* y *aiiB* bajo el control del promotor *luxbox*. Una cepa transformada con este plásmido en presencia de IPTG es capaz de estimular la expresión del receptor LuxR y la sintetasa LuxI su interacción regula la producción de la molécula autoinductora 3-oxo-C6HSL. Este complejo LuxR/AI activa así mismo los genes bajo la regulación del promotor *luxbox*, en este caso el gen *gfp* y el gen *aiiB* que codifica para la lactonasa AiiB capaz de hidrolizar la molécula AI e inhibir la expresión de la biolumiscencia, como se observa en los cuatro puntos de la figura 26A.

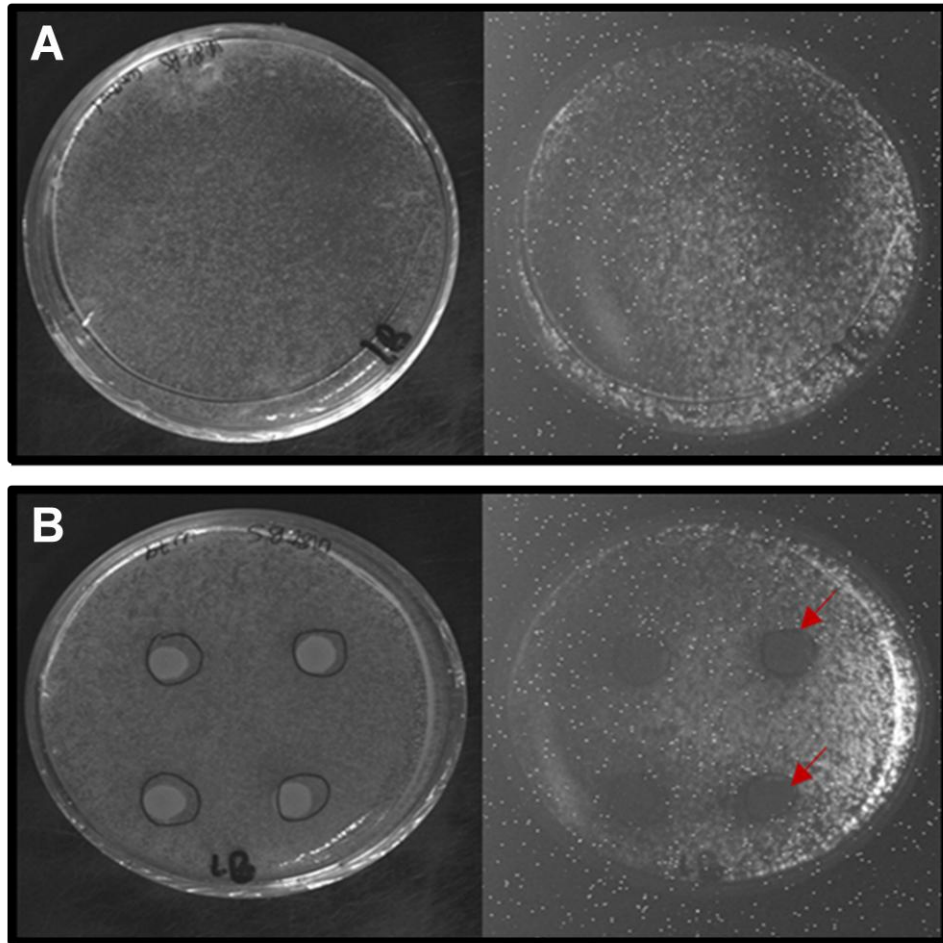


Figura 26 Ensayos de inhibición de la bioluminiscencia. La cepa biosensora pSB403 fue crecida en presencia de IPTG junto a una cepa construida con el plásmido pCCB1. Ambas cepas fueron sembradas en agar LB. Las fotografías de la derecha fueron tomadas después de 3 min de exposición a la oscuridad para observar la inhibición de la bioluminiscencia. **A** Ensayo control en el que las dos cepas fueron sembradas de forma homogénea en toda la caja como se puede ver en **A (izquierda)**. En **A derecha** se observa la bioluminiscencia de forma continua. Para el ensayo de inhibición una gota del cultivo de la cepa transformada con el plásmido pCCB7 fue sembrada sobre el agar como se observa en **A izquierda**, esta cepa es capaz de producir lactonasa (AiiB) que hidroliza la molécula 3-oxo-C6HSL inhibiendo la expresión de bioluminiscencia en su periferia como se puede observar en **B derecha (flechas rojas)**. Fotografías tomadas empleando un fotodocumentador de geles Dolphin-Doc Plus 100V.

Una cepa transformada con el plásmido pCCB1 fue crecida en presencia de IPTG junto a la cepa biosensora y luego ambas fueron sembradas en una caja con agar LB + IPTG garantizando que la siembra fuera homogénea alrededor de toda caja (figura 26B). Se pudo observar la inhibición en la producción de bioluminiscencia (figura 26A) con relación a el ensayo control (figura 26B) los puntos de inhibición fueron atribuidos a la presencia de la cepa transformada con el plásmido pCCB7

capaz de producir la lactonasa AiiB. Los anteriores resultados demuestran la actividad regulatoria del promotor *luxbox* en la producción de la lactonasa AiiB.

6.4 Inducción de periodos de expresión y ritmos biológicos sintéticos

Cómo se comentó en la metodología la variación en la expresión de proteína verde fluorescente GFP fue observada mediante el empleo de microscopia de fluorescencia, utilizando un microscopio Nikon Fluorescence Microscopy a una intensidad de onda para la excitación de la GFP de 490nm. No obstante, previo a la toma de fotografías y seguimiento de las poblaciones se estandarizó el tiempo de exposición y los filtros que se debían emplear con el objetivo de garantizar que todas las fotos tuvieran los mismos parámetros.

La observación de un mismo campo visual fue posible gracias al empleo del dispositivo previamente descrito en la figura 9.

La figura 27 muestra los resultados obtenidos de la estandarización de los parámetros empleados en el microscopio de fluorescencia. Para llevar a cabo la estandarización se emplearon dos cepas bacterianas. La primera fue construida empleando el plásmido pCCB3 cuya arquitectura se puede observar en la figura 13D. Esta cepa es capaz de producir GFP cuando es estimulada con IPTG constituyendo el control positivo para la estandarización.

La segunda cepa fue construida empleando el plásmido pCCB2 (figura 11). Esta cepa también posee el gen *gfp* pero es incapaz de estimular su expresión en presencia de IPTG al no poseer el gen *luxI* que codifica para la sintetasa de 3-oxo-C6HSL. Esta cepa fue empleada como control negativo para la estandarización.

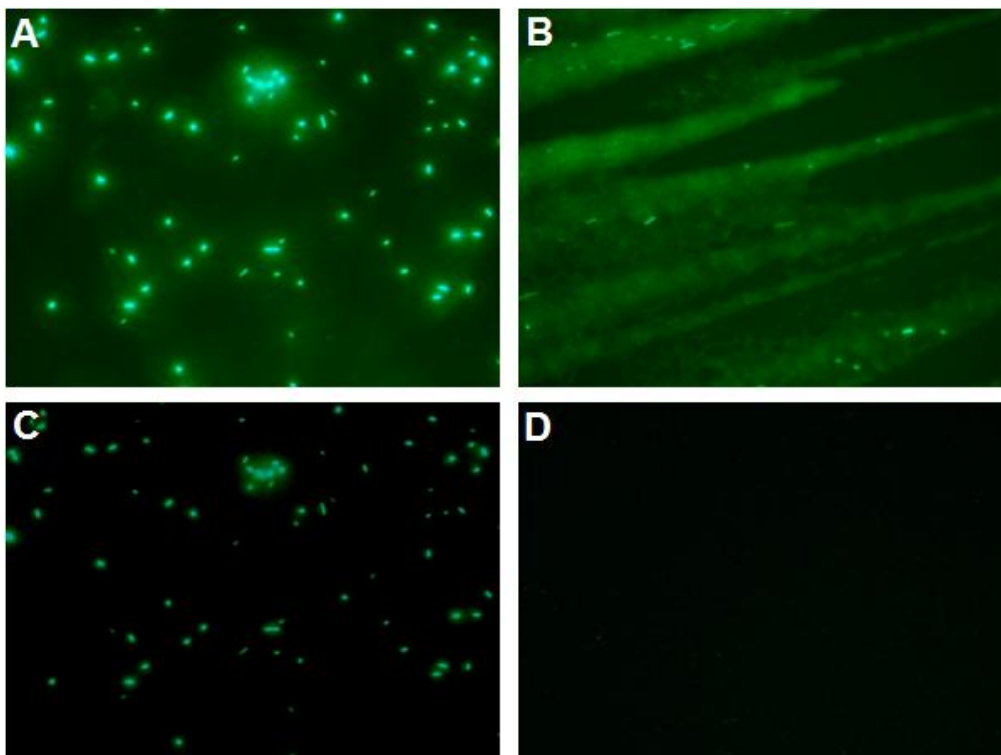


Figura 27 Estandarización de los parámetros empleados en la evaluación por microscopía de fluorescencia. **A y B:** Ambas fotografías fueron tomadas con 12 segundos de exposición a una onda de excitación de 402nm. **A:** Control positivo: Cepa construida con el plásmido pCCB3, capaz de producir GFP en presencia de IPTG. **B:** Control negativo: Cepa construida con el plásmido pCCB2 incapaz de producir GFP en presencia de IPTG, se observó auto fluorescencia. **C y D:** Ambas fotografías fueron tomadas con 7 segundos de exposición a una longitud de onda de 402nm, utilizando el filtro Ph2. **C:** Control positivo para la expresión de GFP. **D:** Control negativo para la expresión de GFP. Todas las fotografías fueron tomadas en un microscopio Nikon de fluorescencia.

Como se observa en la figura 27A y B, con doce segundos de exposición sin el empleo de ningún filtro específico ambas cepas tanto la positiva como la negativa presentan fluorescencia. Esta observación puede ser atribuida a la presencia de auto fluorescencia en *E. coli* lo cual ha sido reportado como una consecuencia de la fluorescencia intrínseca de muchos metabolitos, componentes estructurales incluyendo flavinas y lipofuscinas presentes al interior de las células. Esta auto

fluorescencia no solo ha sido reportada en bacterias sino en hongos, plantas, células de vertebrados, invertebrados marinos, etc. (Rost, 1995).

En vista de lo anterior se evaluaron diversos tiempos de exposición y se empleó el filtro Ph2 para un aumento de 40X, así se determinó que con un tiempo de 7s de exposición se podía observar fluorescencia en la cepa positiva sin observar ninguna señal de auto fluorescencia en la cepa negativa (figura 27C y D). Una vez estandarizados los parámetros en el microscopio de fluorescencia se procedió a evaluar la actividad regulatoria del promotor P_{lacO1} sobre la expresión del gen *gfp*.

Como se comentó anteriormente la cepa construida mediante la transformación de *E. coli* DH5 α con el plásmido pCCB2 (figura 11 y figura 28) es una cepa biosensora de 3-oxo-C6HSL.

En presencia de IPTG la cepa transformada con el plásmido pCCB2 es capaz de inducir la expresión del receptor LuxR (Figura 28A), sin embargo sin la presencia de alguna cepa productora de 3-oxo-C6HSL, ó de una molécula AI en el medio, sería incapaz de activar el promotor *luxbox* y no se observaría fluorescencia.

Por el contrario si esta cepa cuenta con IPTG en el medio y crece con otra cepa capaz de producir 3-oxo-C6HSL, como la cepa construida a partir del plásmido pCCB1 ó la *Pseudomonas putida* isof, sería capaz de sensar la molécula autoinductora y activar la expresión del gen *gfp* como se muestra en la figura 28B.

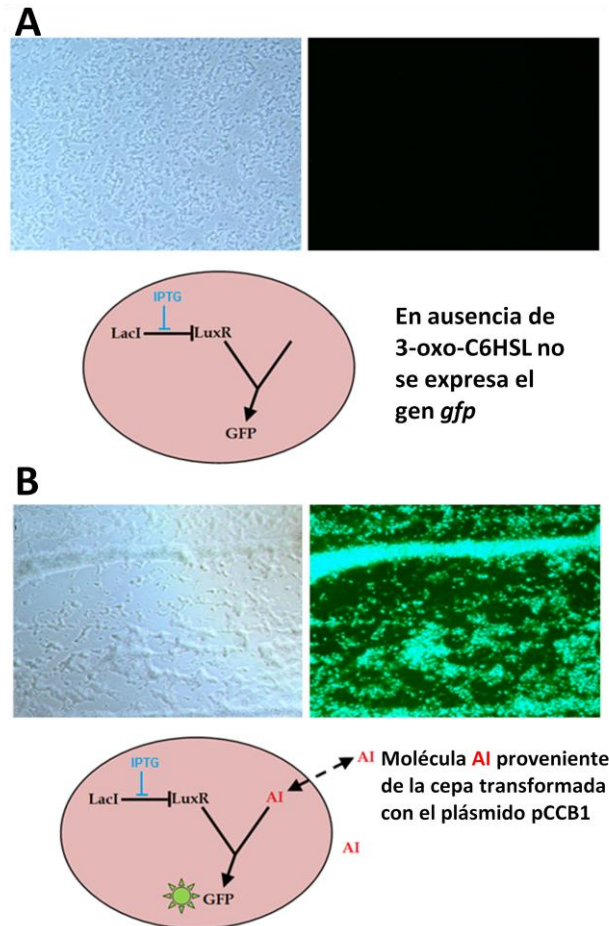


Figura 28 Cepa biosensora pCCB2. **A:** Cuando la cepa biosensora pCCB2 es crecida en presencia de IPTG, se estimula la producción del receptor LuxR. Sin embargo en ausencia de la molécula 3-oxo-C6HSL no se expresa el gen *gfp*. **Izq.** Foto observada en luz blanca. **Der.** Foto observada con una longitud de onda de 402nm **B:** Cuando la cepa biosensora se crece en presencia de IPTG y junto a otra cepa capaz de producir 3-oxo-C6HSL en el medio (cepa construida con el plásmido pCCB1) el receptor LuxR reconoce la molécula AI y activan los genes bajo regulación del promotor *luxbox* en este caso el gen *gfp*, lo que permite observar la expresión de fluorescencia. **Izq.** Foto observada en luz blanca. **Der.** Foto observada con una longitud de onda de 402nm. Todas las fotografías observadas a una longitud de onda 402nm fueron tomadas con 7 segundos exposición utilizando el filtro Ph2 en un microscopio Nikon de fluorescencia.

El modelo que se presenta en este trabajo (figura 21B) constituye uno de los primeros acercamientos que permite emplear un sistema que es totalmente independiente y auto sostenible, lo que implica que puede funcionar sin previa estimulación pero sin perder la habilidad de responder a su vez a los diversos estímulos externos que puedan entrar al sistema. Si bien es importante evaluar la activación de un módulo sintético en respuesta a un estímulo externo como el IPTG, se hace también necesario estudiar el comportamiento independiente de

módulos acoplados en una población bacteriana con respecto al tiempo. Por esta razón se monitoreó la variación en la expresión de gen *gfp* en una población bacteriana de una cepa de *E coli* DH5 α co-transformada con el plásmido pCCB3 (figura 13D) y el plásmido “*repressilator*” (figura 2) ver anexo 2 (cepa W80 + R48)

La figura 29 muestra los resultados observados durante el monitoreo de una población bacteriana co-transformada con los plásmidos previamente descritos.

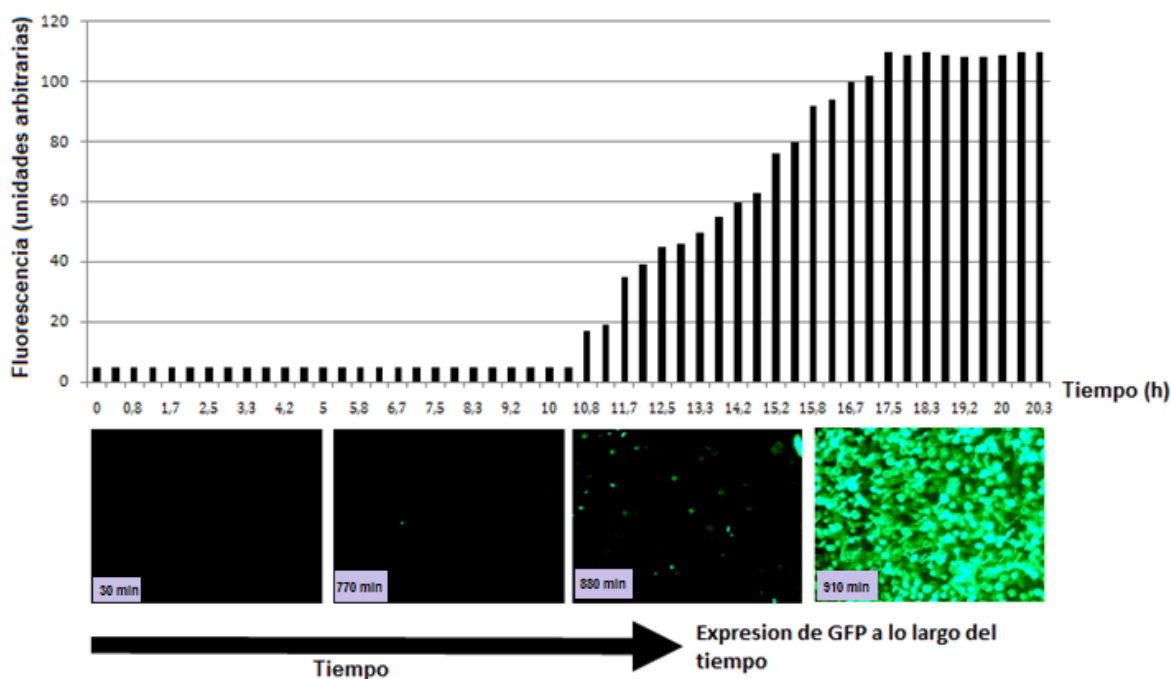


Figura 29 Variación en la expresión de proteína verde fluorescente GFP a lo largo del tiempo. La cepa co-transformada con el plásmido pCCB3 y el “*repressilator*” no posee el gen *aiiB* y se mantiene la expresión del gen *gfp* a lo largo del tiempo como consecuencia de la acumulación de molécula 3-oxo-C6HL en el medio. Se puede observar la sincronización en la expresión de GFP en una población bacteriana que expresa un sistema artificial de *Quorum Sensing* y una red oscilatoria sintética en ausencia de estímulos externos. Fotografías tomadas con 7 segundos de exposición a una longitud de onda de 402nm, utilizando el filtro Ph2 en un microscopio Nikon de fluorescencia. Las imágenes fueron analizadas con el software Lucia. Se tomaron imágenes cada 30 minutos a lo largo de 21 horas.

El “*repressilator*” es capaz de inducir oscilaciones artificiales en la concentración de la proteína represora *Lacl* al interior de la célula. Cada vez que las concentraciones de *Lacl* disminuyen el promotor P_{lacO1} queda libre para inducir la expresión de los genes *luxI* y *luxR*. El complejo formado por el producto de estos

genes LuxR/3-oxo-C6HSL es capaz de activar al promotor *luxbox* induciendo la expresión del gen *gfp*. En consecuencia se observa un aumento en la expresión de fluorescencia en el tiempo debido a un incremento de las concentraciones de la molécula autoinductora en el medio asociado con una mayor densidad celular. El sistema se enciende totalmente al llegar una concentración umbral de 3-oxo-C6HSL lo que permite observar la sincronización de la población bacteriana (Figura 29). No obstante como ninguno de estos dos plásmidos posee el gen que codifica para la lactonasa AiiB, la molécula 3-oxo-C6HSL tiende a acumularse en el medio y a dejar el sistema encendido conduciendo al desequilibrio y posterior desestabilización del sistema.

Como se puede observar en la figura 21 el **módulo sintético de comunicación bacteriana** construido en este trabajo (plásmido pCCB9) presenta el gen que codifica para la lactonasa *aiiB* generando *loop feedback* negativo que permite la ganancia de estabilidad en el sistema a lo largo del tiempo al controlar los niveles de la molécula 3-oxo-C6HSL.

La figura 30 presenta los resultados obtenidos del monitoreo de la variación en la expresión del gen *gfp* a lo largo del tiempo en una población bacteriana de *E coli* DH5 α co-transformada con el plásmido pCCB9 (**módulo sintético de comunicación bacteriana**) y el plásmido “*repressilator*” ver figura 10. Una representación más detallada del comportamiento de estos dos módulos acoplados en una población bacteriana puede ser observada en el video correspondiente al anexo 3 (ver CD, video 1). En la figura 30 y en el video 1 es posible observar periodos de oscilación (encendido y apagado) en la expresión de

la proteína GFP a lo largo el tiempo en células individuales y grupos. La tendencia en los primeros periodos de observación fue la formación de pequeños grupos celulares donde se pudo observar la sincronización de los módulos. Estos grupos varían su tamaño en el tiempo con una tendencia a incrementar con respecto a las fases iniciales de observación. El número de células dentro de un grupo varía en el tiempo debido a que las células cambian la fase de oscilación al comienzo del agrupamiento como se discutirá más adelante.

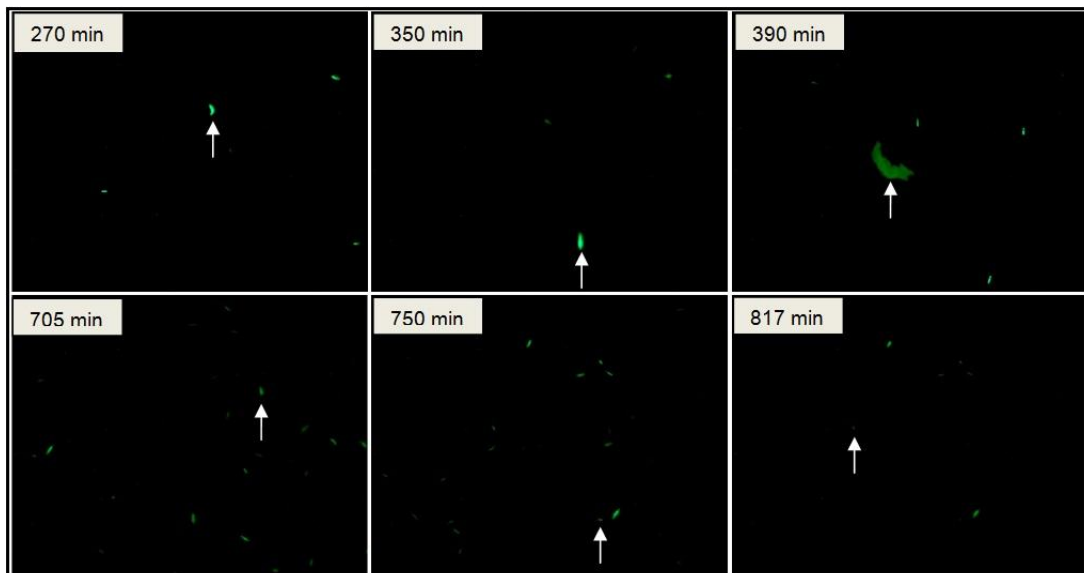


Figura 30 Sincronización grupal de los módulos “*repressilator*” y el módulo sintético de comunicación bacteriana (pCCB9). Fotografía de un cultivo bacteriano donde se observa la expresión de fluorescencia en grupos de diversos tamaños a lo largo del tiempo. Las flechas blancas indican la sincronización al interior de algunos grupos. Una representación más detallada puede ser vista en el anexo 3 (CD, video 1). Fotografías tomadas con 7 segundos de exposición a una longitud de onda de 402nm, utilizando el filtro Ph2 en un microscopio Nikon de fluorescencia. Las imágenes fueron analizadas con el software Lucia. Se tomaron imágenes cada 30 minutos a lo largo de 22,5 horas.

El comportamiento grupal observado en la figura 30 y el video 1 indica que debido a la difusión de la molécula AI al interior de un grupo, los módulos presentes en diferentes células pueden comunicarse unos con otros permitiendo de esta manera dar una respuesta global de todo el sistema. Sin embargo nuestros resultados sugieren una alta variabilidad en este fenómeno. Por un lado fue

posible observar oscilaciones de fase sincronizada en pequeños grupos de diversos tamaños, sin embargo las oscilaciones entre los grupos separados espacialmente estaban desfasadas y el número de osciladores al interior de un grupo varía con el tiempo como se puede observar en la figura 30 o el video 1.

Estos resultados nos permitieron concluir que una cepa transformada con estos dos módulos es capaz de exhibir un comportamiento sincrónico a nivel de grupo y que la sincronización de toda la población celular requiere un mayor tiempo de cultivo.

DISCUSIÓN

7.1 De *in vitro* a *in vivo*: Inducción de fenotipos en *E. coli* DH5 α

7.1.1 Inducción de la expresión genética en respuesta a estímulos externos

Como se puede observar en la figura 11 la creación del **módulo sintético de comunicación bacteriana** involucro varios plásmidos intermediarios los cuales fueron empleados en la creación de cepas de *E. coli* DH5 α .

Los resultados presentados en el capítulo 6.3 muestran como todas las cepas bacterianas fueron sometidas a un análisis de la expresión genética y de la actividad promotora en presencia de estímulos externos empleando la cepa biosensora pSB403.

Algunos de estos circuitos son capaces de responder a un estímulo específico (ejemplo: IPTG, moléculas auto inductoras, otros módulos) y producir una determinada salida (ejemplo: lactonasa, molécula autoinductora, GFP). En particular, tres cepas bacterianas construidas en este estudio presentan una arquitectura potencial en el estudio de los circuitos de *Quorum Sensing* en vista de su capacidad de responder a estímulos externos.

La primera de ellas es la cepa transformada con el plásmido pCCB1 (figura 12A). Esta cepa es capaz de producir 3-oxo-C6HSL en presencia de IPTG. Esto se debe a que el gen que codifica para la sintetasa LuxI se encuentra bajo la regulación del

promotor P_{lacO1} que a su vez es inducible por IPTG (figura 22A). Esta cepa puede ser muy útil en estudios que involucren bacterias con sistemas de *Quorum Sensing* que contengan la molécula 3-oxo-C6HSL. Se ha demostrado que una gran cantidad de fenotipos se encuentran bajo la regulación del QS, estos incluyen la expresión de factores de virulencia, la producción de pigmentos, la maduración de un *biofilm* bacteriano, entre otros (Fuqua *et al.*, 1994; Reading & Separandio, 2006). Muchas veces para inducir un determinado fenotipo es necesario esperar que la bacteria llegue a una fase de crecimiento exponencial. Esta cepa bacteriana podría ser empleada como un potenciador para inducir más rápido la expresión de ciertos fenotipos en especies bacterianas cuya producción de 3-oxo-C6HSL sea lenta ya que permite llegar a una mayor concentración de auto inductor en un tiempo menor. A su vez muchas bacterias poseen más de un sistema de QS como un mecanismo para poder interactuar con otras especies bacterianas al conformar una comunidad. La cepa construida con el plásmido pCCB1 podría ser empleada para estudiar la respuesta fenotípica de sistemas de QS en una determinada población bacteriana, utilizando como señal (o estímulo de activación) diferentes concentraciones de 3-oxo-C6HSL o de un disacárido como la lactosa el cual a su vez puede ser empleado como fuente de carbono.

La segunda cepa fue construida empleando el plásmido pCCB2 (figura 11 y figura 28). Esta cepa puede ser considerada una cepa biosensora en vista de que es incapaz de producir la 3-oxo-C6HSL u otra molécula AI, pero posee el receptor LuxR y también el promotor *luxbox* controlando la expresión del gen reportero *gfp*.

El uso de biosensores contruidos a partir del sistema de *Quorum Sensing* principalmente de bacterias gran negativas, constituye una herramienta invaluable para el análisis de los sistemas de QS presentes en una determinada especie bacteriana ó comunidad ambiental. En la actualidad los biosensores son el instrumento principal para realizar el monitoreo de circuitos de QS, en vista de que la falta de similitud entre las secuencias de nucleótidos de los genes que componen estas redes, limita su identificación mediante técnicas tradicionales como PCR ó hibridización de DNA (Winson *et al.*, 1998). En consecuencia, un gran número de biosensores han sido desarrollados como lo reportan Steindler & Venturi (2007) quienes hacen una revisión de los biosensores bacterianos disponibles que pueden ser empleados en el estudio y detección de moléculas involucradas en el fenómeno del QS. La cepa biosensora construida con el plásmido pCCB2 constituye un biosensor más con la particularidad de reconocer 3-oxo-C6HSL y producir GFP como respuesta señal tal como se observa en la figura 28.

La última de las cepas con un alto potencial en el estudio de sistemas de QS fue construida al transformar células de *E. coli* DH5 α con el plásmido pCCB6 (figura 16B). Esta cepa es capaz de producir la lactonasa AiiB en respuesta a un estímulo externo (IPTG) como se observa en la figura 25. Existen una gran cantidad de fenotipos bacterianos bajo la regulación del QS. Un ejemplo de ellos es la maduración del *biofilm* bacteriano y diversos factores de virulencia de importancia clínica como hemolisinas, lipasas, proteasas, fosfolipasas, etc. El desarrollo y maduración de un *biofilm* bacteriano es un proceso natural que puede presentar

una cara amable (por ejemplo: la microbiota natural de un organismo: oral (Marsh, 2004), tracto intestinal (Kleessen & Blaut, 2005), los *biofilms* en ambientes naturales capaces de degradar hidrocarburos (Morton & Surman, 1994)) o un efecto deletéreo (por ejemplo: *biofilms* asociados a bio-deterioración (Morton & Surman 1994), a dispositivos intra-hospitalarios (Donlan, 2001), y a resistencia crónica a antibióticos (Stewart & Costerton, 2001)). Por lo anterior, un gran número de estudios se han realizado con el objetivo de determinar estrategias que permitan controlar el desarrollo de un *biofilm* bacteriano (Simões *et al.*, 2010) y la inhibición de la expresión de factores de virulencia, constituyendo una nueva era de medicamentos anti-patogénicos que entre otras ventajas no generan el desarrollo de resistencias como los agentes bactericidas. Dentro de estas estrategias de control esta el empleo de moléculas inhibitoras del QS obtenidas de organismos en ambientes naturales (Olson *et al.*, 2002; Simões *et al.*, 2010).

La creación de la cepa de *E. coli* DH5 α transformada con el plásmido pCCB6 constituye un gran potencial en esta clase de estudios, ya que es capaz de inhibir el QS de manera controlada y en respuesta a un estímulo como el IPTG (como se mencionó esta cepa está en proceso de patente). Este tipo de acercamiento por Biología Sintética podría constituir un campo prometedor con grandes implicaciones biotecnológicas, donde las bacterias funcionen como *bio-fábricas* para la producción de sustancias inhibitoras sin necesidad de tener que realizar múltiples extracciones de los organismos naturales.

7.1.2 Genotipos defectuosos y fenotipos tramposos

Si bien es fácil observar las múltiples aplicaciones que tiene la construcción de estos módulos sintéticos, se debe anotar que este tipo de módulos truncados e inducibles también existen en la naturaleza y juegan un papel muy importante en el comportamiento social en poblaciones bacterianas. La construcción de módulos artificiales con sistemas de QS truncados permite introducirlos en estudios sobre el comportamiento de comunidades bacterianas y observar la estabilidad de un *biofilm* en presencia de genotipos defectuosos o fenotipos inducibles.

Como se comentó anteriormente un gran número de bacterias tienen la capacidad de formar agregados multicelulares anclados a una superficie conocidos como *biofilms* (Davey & O'toole, 2000). El *biofilm* bacteriano se puede definir como un agregado de microorganismos (bacterias de la misma o diferente especie) que se encuentra adherido a una superficie, las células de este agregado se encuentran embebidas en una matriz de exopolisacárido que ellas mismas producen, exhibiendo de esta manera un comportamiento de grupo con división de funciones análogo a un comportamiento "multicelular" (Olson *et al.*, 2002). Dentro de estos *biofilms* las bacterias exhiben una gran variedad de comportamientos sociales en donde es posible observar la especialización de funciones regulada, en muchos casos, por sistemas de QS. Estos sistemas han sufrido diversos eventos de selección durante la evolución como una consecuencia del balance de la competencia dentro y entre *biofilms* (Nadell *et al.*, 2008).

Al igual que en muchos grupos sociales muchas bacterias son capaces de hacer trampa y recibir beneficios del grupo sin aportar nada a cambio. Estas bacterias conocidas como *cheaters* muchas veces son el resultado de mutaciones que producen genotipos defectuosos incapaces de responder a una molécula señal (sordos) ó de producirla (mudos) y en otros casos son bacterias capaces de inhibir la producción de algún producto benéfico para el grupo beneficiándose sin dar nada a cambio (Czárán & Hoekstra, 2009). Este es el caso de las cepas U18, W19, W79 y W80 construidas en este trabajo (anexo 2).

Estos módulos truncados también permiten estudiar los mecanismos de control de *cheaters* que han sido desarrollados en comunidades bacterianas (al igual que en las sociedades humanas) no obstante muchos de estos pueden ser burlados generando un cambio brusco en la estabilidad de la comunidad (Travisano & Velicer, 2004). La presencia de *cheaters* no es únicamente perjudicial para un grupo social bacteriano, en muchos casos constituye una característica que puede ser seleccionada o puede conducir a un evento de evolución de los mecanismos que permiten estructurar un comportamiento multicelular en bacterias.

En ese sentido, los módulos aquí construidos serán empleados para estudiar su dinámica en *biofilms* bacterianos y establecer su efecto en la estructura social de una comunidad bacteriana.

7.2 Un nuevo módulo sintético: alcances y retos

En este trabajo se llevó a cabo el diseño teórico, el ensamble *in vitro* y la expresión *in vivo* de un **módulo sintético de comunicación bacteriana** empleando herramientas de Biología Sintética. A continuación se discutirán los criterios empleados en la creación del módulo sintético y sus principales diferencias y ventajas con relación a otros módulos sintéticos previamente construidos.

Criterios de diseño y fabricación: Como se presenta en los resultados nuestro primer modelo teórico (figura 5) fue rediseñado (figura 10) con el objetivo de cumplir los requerimientos y estándares definidos para un modelo en Biología Sintética (BioS). Quizás la principal diferencia entre estudios como el nuestro que usan un acercamiento por BioS y aquellos tradicionales que emplean tecnología del DNA recombinante (ingeniería metabólica, *knockout* ó sobre expresión de un gen) es que la BioS permite el rediseño aislado y controlado *de novo* de una red genética sin la incertidumbre que puede generarse cuando se hace una mutación aleatoria o dirigida y que puede afectar más de un blanco no deseado, además permite observar una respuesta a un nivel de organización mayor, el de una red genética superando así la respuesta ligada a un gen individual. Para la construcción de estas redes se han establecido un conjunto de requerimientos y procesos que se deben llevar a cabo en la construcción de un modelo por BioS y que diferencian estos acercamientos experimentales de otros cuyo objetivo también consiste en estudiar el comportamiento y dinámica de redes de regulación

genética en una célula (tecnología del ADN recombinante, doble híbrido de levadura, etc.).

Heinemann & Panke (2009) realizan una revisión exhaustiva de los procesos a seguir cuando se desea construir un modelo sintético y estos se pueden resumir en dos pasos principales: un primer paso de **diseño** y un segundo de **fabricación**

Para el **diseño** de nuestro módulo sintético de comunicación bacteriana se emplearon genes del sistema de *Quorum Sensing* (QS) de *Vibrio fischeri* y de *Agrobacterium tumefaciens* cuyos niveles de regulación, sus tasas de transcripción, sus interacciones y otros parámetros han sido ampliamente descritos (Fuqua *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 2002; Reading & Separandio, 2006).

Para el diseño del modelo que se presenta en la Figura 10 se siguieron los requisitos básicos planteados por Friesen *et al.* (1993) y Kaznesis (2007) de tal forma que exhibiera un comportamiento rítmico auto sostenible. En la figura 31 se compara un diagrama de un modelo que presenta un comportamiento rítmico auto sostenible con nuestro modelo y se puede observar que nuestro modelo cumple con los requisitos mencionados, como por ejemplo la presencia de una entrada excitadora del sistema y un retraso producido por un *feedback* negativo.

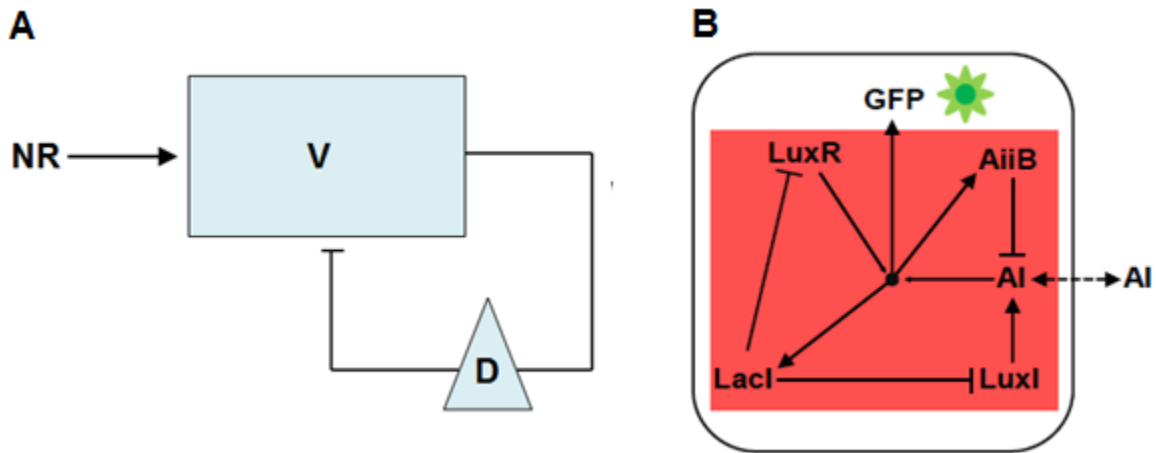


Figura 31 Comparación de la estructura básica de un sistema con comportamiento rítmico y el **módulo sintético de comunicación bacteriana**. **A:** Adaptado de Friesen *et al.* (1993). Auto inhibición con retraso. NR representa la entrada excitadora que puede o no ser rítmica. V representa las variables y D los retrasos. Las flechas indican excitación y la punta perpendicular indica inhibición. **B: Módulo sintético de comunicación bacteriana.** El promotor P_{lacO1} es el punto de entrada de los estímulos excitadores, estos pueden ser la adición de IPTG u otro análogo de la lactosa ó otro sistema como el “*repressilator*” que activarían la expresión de *luxR* y *luxI*. Se presenta un retraso producido por el *feedback* del gen *aaiB* y el sistema se reinicia mediante la inducción del gen *lacI*.

Como se puede observar en la figura 31, nuestro **módulo sintético de comunicación bacteriana** exhibe una topología de red atribuida al control que ejerce el promotor P_{lacO1} en la expresión de los genes *luxI* y *luxR*. A su vez el promotor *luxbox* controla la expresión de los genes *gfp*, *lacI* y *aaiB*. El *feedback* negativo se observa en la producción de la enzima lactonasa AiiB inducida por la molécula 3-oxo-C6HSL, esta última es hidrolizada por la enzima y de esta manera se genera el retraso del sistema. Este retraso permite sobrepasar los valores de estado estacionario antes de que la inhibición atribuida al represor LacI sobre el promotor *luxbox* sea totalmente efectiva. La anterior estrategia hace que nuestro modelo exhiba un comportamiento rítmico y auto sostenible, con la ventaja de integrar señales extracelulares capaces de incrementar la respuesta individual al nivel poblacional.

Otro elemento importante en el diseño fue la creación de puntos para acoplar nuestro módulo con otros módulos artificiales y estandarizar su expresión. Al igual

que en ingeniería, cuando se construye un nuevo programa de computador ó una nueva parte de un carro, se hace ideal que exista una independencia en la funcionalidad y finalidad del módulo pero a su vez debe existir una congruencia con el lenguaje global del sistema. Esto quiere decir que los programas ó las partes de un carro deben tener un punto de conexión que les permita ser acoplados con otros programas o códigos del sistema operativo u otras partes del carro previamente diseñadas para observar el comportamiento de cada parte en otro nivel jerárquico. El módulo construido en este trabajo cumple también este requisito ya que puede ser acoplado con otros sistemas como el “*repressilator*” y observar el efecto de oscilaciones artificiales generadas por el “*repressilator*” no únicamente a nivel de célula individual, sino a un mayor nivel jerárquico (poblacional) como se observa en la figura 30 y el video 1. Esta característica es atribuida a la presencia de elementos del sistema de *Quorum Sensing* en nuestro módulo sintético, lo le permite a las células que poseen el sistema “*repressilator*” comunicarse entre sí para sincronizar sus fenotipos como se discutirá en el capítulo 7.3.

Estandarizar los constructos permitiendo el acople entre ellos ha permitido generar un nuevo concepto de modularidad y *plug-and-play*. Este concepto hace fácil el ensamble de módulos construidos independientemente para entender el funcionamiento de un sistema a otro nivel jerárquico imposible de divisar solo con un módulo. Actualmente es relativamente fácil buscar puntos de acople gracias a la existencia de bases de datos de módulos artificiales como el MIT: Registry of Standard Biological Parts (http://partsregistry.org/Main_Page), cuya popularidad ha

venido creciendo en los dos últimos años. Sin embargo, dada la reciente consolidación de estas bases, en la construcción de nuestro módulo no se emplearon partes ya existentes y fue necesario obtenerlas una a una de las bacterias mencionadas anteriormente. Para permitir el acople de nuestro módulo con otros constructos, nuestro diseño incluyó puntos de unión comunes (represores y promotores) presentes en otros módulos sintéticos. Estos puntos de unión son la presencia del gen *lacI*, la molécula 3-oxo-C6HSL y la lactonasa AiiB que permiten acoplar este módulo con otros que presenten componentes de los sistemas de QS de *Vibrio fischeri* y *Agrobacterium tumefaciens* y a sistemas derivados del *repressilator* por ejemplo el “Modelo de una red de regulación genética” (Zhou *et al.*, 2004), el “Modelo de reloj genético sincronizado” (Danino *et al.*, 2010), el “*interruptor genético*” (Gardner *et al.*, 2000) entre otros (Becskei & Serrano, 2000; Zhou *et al.*, 2007).

Otro factor importante a evaluar en el diseño es la presencia de ortogonalidad, que hace referencia a una independencia mutua entre los elementos (genes, proteínas y promotores) empleados en el módulo (De Lorenzo & Danchin, 2008). Esta independencia permite que los elementos del módulo no interactúen con otros elementos propios de la célula generando de esta manera una perturbación en el sistema. Para aclarar mejor este concepto se puede hacer una analogía con el concepto de diafonía en las telecomunicaciones, el cual se refiere al efecto ó interferencia de las señales de un circuito (el perturbador) en otro (el perturbado). Al igual que debe suceder con los ingenieros de telecomunicaciones, un biólogo sintético debe buscar la manera de reducir el ruido debido al entrecruzamiento de

los componentes del módulo sintético con otros elementos (partes de redes genéticas nativas) al interior de la célula. Para obtener esta ortogonalidad en nuestro módulo sintético, la fabricación se llevó a cabo empleando como chasis la cepa de *E. coli* DH5 α . El chasis de clonación es un punto importante en la fabricación del módulo, en vista de que permite reducir la diafonía producida al introducir el módulo sintético en una célula. Varias cepas de *E. coli* han sido modificadas para reducir sus genomas y para generar mutaciones que minimicen el número de elementos que puedan interferir con algún componente de la red sintética, los cuales pueden estar presentes en los vectores de transformación u otros elementos moleculares (Inoue *et al.*, 1990; Kolisnychenko *et al.*, 2002; Pósfai *et al.*, 2006).

Como se comentó, el chasis que empleamos en la fabricación de nuestro módulo sintético fue la cepa *E. coli* DH5 α . Se escogió esta cepa en primer lugar porque ha perdido la maquinaria biosintética necesaria para producir algún componente del sistema de *Quorum Sensing* (Surette & Bassler, 1998). Además, esta cepa presenta mutaciones que inactivan las endonucleasas capaces de degradar el ADN plasmídico, eliminan la recombinación homóloga, reducen la formación de deleciones y la multimerización del plásmido, entre otras (Sukhija *et al.*, 2011).

El último requisito en la fabricación fue la escogencia del plásmido que sirvió como esqueleto del módulo sintético. El plásmido empleado fue el plásmido vector **pZA22MCS**. Se escogió este plásmido principalmente porque fue el mismo

plásmido empleado en la construcción de otros módulos como el “*repressilator*” y de esta manera se garantizó que no existiera un desfase al momento de acoplar los módulos (que podría ser atribuido a una diferencia en la cantidad de copias por plásmido). Este plásmido pertenece a la familia de plásmido pZ que poseen un sitio de clonación múltiple (MCS) con secuencias de reconocimiento para las enzimas de restricción XhoI, XbaI, ArrII, SpeI, SacI y AatII. A su vez este plásmido contiene el ORI P15A, que hace del vector un plásmido con bajo número de copias y la secuencia promotora P_{lacO1} que hace parte nuestro módulo. Por último el plásmido fue escogido por presentar resistencia a la Kanamicina con el objetivo de tener un gen de resistencia diferente al de la Ampicilina presente en el módulo sintético “*repressilator*” y de esta manera poder garantizar mediante selección con antibióticos que solo sobrevivieran aquellas bacterias que presentaban resistencia a ambos antibióticos, la necesidad de mantener esta resistencia permite que las bacterias no expulsen ambos plásmidos en la co-transformación.

Un novedoso módulo sintético: Los ciclos oscilatorios son procesos muy importantes para la regulación de muchos fenotipos en todos los niveles de organización. Si bien se han descrito muchos osciladores biológicos sus propiedades aún no han sido ampliamente estudiadas y los acercamientos por BioS parecen ser un campo prometedor al respecto. Sin embargo, un área dentro del estudio de los osciladores artificiales persiste como un gran reto para los investigadores, esta es: el estudio de la sincronización de osciladores artificiales al interior de una población celular. En la introducción se comentó que el empleo de moléculas de señalización derivadas de los sistemas de *Quorum Sensing* en la

creación de módulos artificiales parece constituir una posible solución a este problema. Sin embargo (sin contar este) solo tres trabajos (figura 4) se han realizado al respecto y cada uno de ellos presenta ideas, falencias y limitaciones. En este capítulo se discutirán cada uno y se explicará como el modelo que construimos representa un nuevo módulo capaz de ser empleado en el estudio de la sincronización en poblaciones celulares.

En nuestro modelo (figura 10) quisimos en primer lugar generar un sistema que fuera auto sostenible y que no dependiera de la introducción de IPTG para activarse a diferencia del propuesto por Zhou *et al.* (2004). Esto lo logramos al crear un punto de contacto con el módulo “*repressilator*” que como se discutió anteriormente es el estímulo excitador inicial para inducir oscilaciones auto sostenibles artificiales al interior de la célula. Además, nuestro modelo tendría la capacidad de responder a estímulos externos (ejemplo: flujos de lactosa) cuyo efecto puede ser monitoreado con relación a los cambios en la expresión del gen reportero *gfp* en una población bacteriana *in vivo*, sin embargo ese no fue el objetivo de este trabajo pero es importante mencionarlo por el alto potencial de aplicación de este módulo. Al igual que en nuestro módulo sintético, el modelo de Zhou *et al.* (2004) (Figura 4A) también involucra los genes *luxI* y *luxR* del sistema de QS de *Vibrio fischeri* sin embargo este nunca fue expresado *in vivo* en vista de que los resultados obtenidos por modelación matemática y computacional reflejaban que el sistema era inestable. Como se puede observar en los resultados, nuestro modelo fue expresado en *E. coli* DH5 α y se encontró una alta congruencia entre los resultados experimentales obtenidos en este trabajo y el

modelo matemático (comunicación personal de Annetta Koseska). A diferencia de nuestro modelo sintético, el propuesto por Zhou *et al.* (2004) no posee un mecanismo de control de las concentraciones de auto inductor (AI) (3-oxo-C6HSL) en el medio, lo que podría conducir a que el promotor $P_{LacLuxO}$ se mantuviera inhibido todo el tiempo apagando el sistema; en nuestro caso se introdujo el gen de la lactonasa *aiiB* de *Agrobacterium tumefaciens* el cual nos permitió tener un control interno de las concentraciones de 3-oxo-C6HSL y la posibilidad de que este módulo funcione independientemente al poseer un *feedback* de autorregulación (figura 10 y 31B).

En 2007 Zhou y colaboradores proponen un nuevo modelo acoplado al sistema *repressilator* con el objetivo de que fuera auto sostenible (Figura 4B), sin embargo nuevamente no lo reproducen *in vivo* al no existir un mecanismo que regule la concentración de AI, como se discutió anteriormente. A su vez, Zhou y colaboradores no detallan cual promotor esta regulando la expresión del gen *luxR* y se infiere que tiene una expresión constitutiva. En ese sentido si se quisiera expresar *in vivo* el modelo propuesto por Zhou y colaboradores (2007) nos hallaríamos con la necesidad de emplear como chasis una bacteria que presente el receptor LuxR de expresión constitutiva y esto podría generar una diafonía como se explicó anteriormente. En nuestro modelo incluimos al gen *luxR* bajo la regulación del promotor P_{lacO1} de tal manera que su producción se viera afectada por las oscilaciones del “*repressilator*” u otros iniciadores que posean el gen *lacI*.

El segundo modelo propuesto es el de Danino, *et al.* (2010) (Figura 4C) en este modelo no se expresan oscilaciones auto sostenibles y no hay una congruencia

entre el modelo matemático y el experimental lo cual, como ya se mencionó, se logró con el nuestro. A pesar de que el modelo de Danino y colaboradores integra varios componentes (genes y promotores) similares a los que están presentes en nuestro modelo la topología del mismo difiere del que aquí se presenta (figura 10) y además sus observaciones no son el resultado de un fenómeno oscilación auto sostenible de la población sino que es un artefacto producido por el sistema micro fluido empleado en su estudio. En detalle podemos observar (figura 4C) que en el modelo de Danino y colaboradores la activación de la sintetasa LuxI se encuentra bajo la regulación del complejo entre su propio producto: la molécula AI y el receptor LuxR (cuya concentración, en este caso, es considerada constante en la célula). Este complejo LuxR/AI también activa la expresión de la lactonasa AiiB. Esta lactonasa hidroliza la molécula AI disminuyendo su concentración y evitando así la formación del complejo LuxR/AI y en consecuencia la producción de LuxI, GFP y AiiB. Sin estas moléculas el sistema quedaría apagado (pues no habría molécula AI para encenderlo otra vez) y sería incapaz de oscilar. La solución de este problema en el modelo de Danino y colaboradores es el empleo de un sistema microfluído el cual permite que las células queden atrapadas y se acumule la molécula AI saturando el sistema y a su vez aumenta la producción de AiiB, en este momento se crea un bloqueo en el sistema. El sesgo de Danino consiste en crear un flujo, en ese momento, y un recambio en el medio que disminuye la densidad celular y elimina la molécula AiiB, cuando se elimina esta lactonasa, la molécula AI es capaz de volver a prender el sistema.

Por esta razón a diferencia de nuestro modelo, el presentado por Danino y colaboradores no es auto sostenible y depende de la inducción de flujos para hacer oscilar el sistema.

Para evitar introducir esta clase de sesgos en nuestro modelo se diseñó un sistema para observar las células (figura 9) el cual no se manipula ni el flujo de AiiB ni la concentración de la molécula AI, lo que nos permitió observar oscilaciones sostenibles no dependientes de influencias externas. Otra gran diferencia es que en nuestro modelo el gen *luxR* se encuentra bajo el control del promotor P_{lacO1} el cual está acoplado con el “*repressilator*” haciendo que los niveles de receptor LuxR también oscilen en el tiempo (ver figura 10).

Danino *et al.* (2010) modelan *in silico* un gran número de osciladores donde a cada oscilador se le permite comunicarse solo con dos osciladores vecinos uno a la izquierda y otro a la derecha, sin embargo esto no se refleja en lo reportado experimentalmente ya que la comunicación entre osciladores es de tipo “todos con todos”. En consecuencia no es posible predecir el comportamiento de este modelo mediante simulaciones *in silico* ya que los resultados experimentales y matemáticos no son congruentes. En nuestro caso la molécula autoinductora es capaz de difundirse libremente entre las células y los resultados de la simulación matemática del modelo teórico según comunicación personal de Annetta Koseska, son congruentes con los datos experimentales.

La simulación matemática en mención realizada por la Dr. Koseska del Centro de Dinámica de Sistemas Complejos de la Universidad de Potsdam (Alemania)

evaluó cuantitativamente el comportamiento por grupos observado en los experimentos *in vivo* y contrasto *in silico* el diseño de nuestra red, para esto empleó los parámetros de modelación establecidos por Garcia-Ojalvo *et al.*, (2004), mostrando la **congruencia de los acercamientos *in vitro* e *in silico***. Estos parámetros permiten estudiar la sincronización de osciladores genéticos acoplados, pero a pesar de que es posible modificar el modelo de Garcia-Ojalvo para llevar a cabo la modelación matemática de nuestra red, existen grandes diferencias con relación a nuestro modelo teórico y fue necesario introducir varias modificaciones adicionales, como la presencia de dos *loop feedback* separados, el efecto del gen de la lactonasa *aiiB* bajo el control del promotor *luxbox* y el gen *luxR* bajo el control del promotor P_{lacO1} como se observa en la figura 10.

Alcances y retos: En este trabajo presentamos un nuevo módulo sintético construido con elementos del sistema de *Quorum Sensing* de *Vibrio fischeri* y de *Agrobacterium tumefaciens*, el cuál es capaz de acoplarse a otros sistemas artificiales (*repressilator*), capaz de producir oscilaciones auto sostenibles en una población celular (por sincronización grupal), capaz de funcionar independientemente en una célula individual y de responder a perturbaciones del medio. Además se encontró una alta congruencia entre los resultados observados por Annetta Koseska en la modelación *in silico* y los experimentos *in vitro*.

Este módulo al igual que cualquier módulo construido siguiendo los principios de la Biología Sintética tiene un gran impacto tanto en ciencias como en ingeniería. En ciencias básicas la posibilidad de estudiar los fenómenos de sincronización en poblaciones bacterianas constituye un gran paso para desarrollar teorías sobre la

evolución de agregados multicelulares, tejidos, *biofilms*, etc. También es una herramienta muy útil para entender la dinámica de los sistemas de comunicación entre bacterias Gram negativas por *Quorum Sensing*, al permitir observar el efecto de una mutación puntual ó un cambio en un gen individual a un nivel de organización mayor (red genética y fenotipo expresado). Sin embargo, aún estamos frente a un gran reto en vista de que muchos de los componentes e interacciones al interior de los sistemas de QS no se han determinado y se hacen necesarios estudios que permitan caracterizar los componentes y establecer las interacciones entre cada uno de ellos. También, con el ánimo de poder simular matemáticamente e *in silico* el comportamiento de un módulo sintético de comunicación bacteriana, se requieren estudios que permitan determinar parámetros como tiempos de vida media, constantes de afinidad, etc., que permitan hacer predicciones del comportamiento *in vivo*.

Desde el punto de vista de la ingeniería, cualquier estudio que dé un paso hacia poder sincronizar una población celular es muy importante en vista del gran potencial que tiene poder programar una población celular, bien sea para producir precursores de hidrocarburos complejos (aceite, plásticos), para producir hidrógeno o etanol, para convertir desperdicios en energía, para fijar una cantidad determinada de CO₂ atmosférico, para producir medicamentos, etc. (Heinemann & Panke, 2009).

Por último, es importante comentar que nuestro **módulo sintético de comunicación bacteriana** será publicado en una base de módulos *open source* (como el MIT: Registry of Standard Biological Parts) para ampliar su libre uso por

otros investigadores. Adicionalmente, el módulo biosensor pCCB2 (figura 28) y el módulo productor de lactonasa pCCB6 (figura 16B) se encuentran sometidos al proceso de obtención de patentes con la asesoría y apoyo de la Dirección de Investigación de la Universidad Nacional de Colombia.

7.3 Inducción de periodos de expresión y ritmos biológicos sintéticos

Poder diseñar un sistema multicelular que presente un comportamiento coordinado y sincronizado es uno de los grandes retos de la Biología Sintética. Como se comentó en el capítulo 7.2 son pocos los acercamientos que se han realizado al respecto (figura 4). Si bien la Biología Sintética tuvo un enérgico comienzo en el cuál se llevó a cabo la construcción de un gran número de módulos y unidades independientes, hoy en día nos encontramos en la cúspide de la segunda ola de la BioS, donde el interés principal consiste en acoplar esos módulos o unidades separadas para poder entender el comportamiento de un sistema global a un mayor nivel de organización y complejidad, en otras palabras pasar de la construcción de módulos al ensamble de sistemas (Purnick & Weiss, 2009).

En este trabajo se llevó a cabo la construcción y análisis de un sistema sintético modular con un nivel de organización mayor (figura 10) ensamblado a partir de dos unidades independientes: el “*repressilator*” (figura 2) y el **módulo sintético de comunicación bacteriana** (figura 21B).

A pesar que nuestro modelo no fue construido con el objetivo de recrear una red natural, ofrece la posibilidad de estudiar funciones específicas de los componentes y además tratar de entender cuáles son las reglas o principios de construcción que ocurren en un entorno natural. De la misma forma en la que se comienza a armar un rompecabezas sin conocer la figura, esta clase de estudios permite ensamblar piezas con el objetivo de encontrar patrones topológicos y principios en sistemas muy complejos que son difíciles de comprender al analizar el sistema globalmente.

En este trabajo fue posible observar la inducción de ritmos biológicos sintéticos y periodos de expresión atribuidos al acople entre el módulo “*repressilator*” y el **módulo sintético de comunicación**, en una población bacteriana. El “*repressilator*” permite la producción de oscilaciones autónomas aisladas en cada célula y el **módulo sintético de comunicación** regula el acople ó conexión entre los *repressilators* de distintas células. Lo anterior conduce a una mejora global de la respuesta oscilatoria de un sistema al integrar moléculas extracelulares que permiten la conexión entre módulos aislados, como se ha sugerido en varios trabajos teóricos (Garcia-Ojalvo *et al.*, 2004). Sin embargo es importante resaltar que el hecho de acoplar osciladores no es suficiente para producir una sincronización total como ha sido previamente descrito en un trabajo teórico realizado por Winfree (1967) y como lo sugieren nuestros resultados.

En nuestro diseño experimental nosotros empleamos el dispositivo mostrado en la figura 9. Este dispositivo nos permitió garantizar la observación de un mismo campo visual y monitorear así el comportamiento de la misma población celular a lo largo del tiempo (anexo 3, video 1). En la figura 30, se pueden observar grupos

de células oscilando en un periodo de aproximadamente 425 ± 15 min (anexo 3, video 1) con una magnitud 2 a 3 veces mayor que lo reportado para el “*repressilator*” sin acoplar (figura 2). Esto se puede atribuir a que los *feedbacks* presentes en el **módulo sintético de comunicación bacteriana** generan un retraso como resultado del acople entre módulos.

Congruentemente, el análisis computacional y matemático realizado por Dr. Koseska justifica también el incremento en el periodo de cada oscilación como una consecuencia del acople de los módulos. En la simulación matemática se monitoreó por aproximadamente 425 min, y se encontró una congruencia con lo reportado en los resultados experimentales donde los periodos observados *in vivo* para los módulos acoplados son mayores que los reportados por el *repressilator* sin acoplar (figura 2) (Elowitz & Leibler, 2000). Este análisis se realizó con base en los parámetros estándar definidos en los estudios de modelación de sistemas de *Quorum Sensing* (Dockery & Keener, 2001; McMillen *et al.*, 2002; Garcia-Ojalvo *et al.*, 2004). En la simulación matemática el comportamiento del sistema fue descrito a través de un conjunto de ecuaciones diferenciales. El modelo asumió los supuestos observados en los ensayos experimentales tales como una concentración uniforme de AI en el medio de cultivo, una comunicación de tipo “todos con todos” y que la evolución dinámica de concentración intracelular de AI es afectada por degradación, síntesis y difusión.

El comportamiento grupal que se observa en la figura 30 y el video 1 indica que debido a la difusión de la molécula AI al interior de un grupo, los módulos presentes en diferentes células pueden comunicarse unos con otros permitiendo

de esta manera dar una respuesta global de todo el sistema, sin embargo esto sucede con una gran variabilidad. A pesar de que fue posible observar oscilaciones de fase sincronizada en pequeños grupos de diversos tamaños, estas oscilaciones entre los grupos separados espacialmente estaban desfasadas. Además, como se puede observar en la figura 30 o el video 1 el número de osciladores al interior de un grupo varía con el tiempo. Estas observaciones experimentales coinciden con la predicción teórica de que las células oscilan sincrónicamente en grupos de diversos tamaños y los diferentes grupos están desfasados. También se ha reportado que muchos osciladores exhiben una fase de dispersión en la que se mantienen continuamente desfasados, sin alcanzar la sincronización (Winfree, 1967). Esto ocurre usualmente cuando no se utiliza un sistema que permita el acople entre módulos independientes, este no es el caso de nuestro modelo ya que se utilizaron elementos del sistema de *Quorum Sensing* para permitir la comunicación celular.

La simulación de nuestra red sobre la misma población pero en periodos de tiempo mucho más largos predijo que la sincronización de la población celular entera no se obtiene inmediatamente; inicialmente se forman grupos de varios tamaños, donde las células al interior de cada grupo funcionan de manera sincronizada y la sincronización total se obtendría después de largos periodos de agrupamiento. Se podría especular, a pesar de que la sincronización de toda la población celular no formaba parte de los objetivos de este trabajo, que dicha sincronización no fue observada experimentalmente debido a al largo periodo de las oscilaciones y el corto de observación.

No se tienen resultados experimentales para muy largos periodos de tiempo porque el diseño metodológico no lo permite (figura 9). Encontrar una estrategia experimental que permita esta observación todavía consiste un reto para poder confirmar lo observado en las simulaciones *in silico*.

En conclusión nuestro modelo permite observar un comportamiento oscilatorio y sincrónico a nivel de grupos, pero no es posible observar la sincronización de toda la población al menos durante los tiempos de monitoreo en los que se tomaron datos. Lo anterior nos sugiere que la sincronización de un sistema biológico puede estar ocurriendo a través de una fase de agrupamiento intermedia de larga duración, como los resultados de la simulación teórica lo proponen.

Con estos resultados se pudo dar respuesta a las preguntas de investigación que nos realizamos al comienzo del trabajo. Nuestros resultados muestran que es posible estudiar el comportamiento *in vivo* de un módulo sintético de comunicación bacteriana mediante el empleo de genes reporteros monitoreados en una población de *E. coli* DH5 α , y que es posible establecer una congruencia entre los parámetros observados *in vivo* en una población bacteriana que exprese el módulo sintético de comunicación celular y los parámetros observados por medio de la modelación matemática y computacional de la misma red. Además, es evidente que el empleo de elementos del sistema de *Quorum Sensing* sirve como un mecanismo para acoplar relojes internos. Debido esta modularidad de nuestro sistema y el arreglo “*plug-and-play*”, este podría servir como base para la construcción de redes más complejas y la realización de estudios más profundos de diversos fenómenos biológicos que involucren sincronización y respuesta a

señales extracelulares como por ejemplo la diferenciación celular, acople con ritmos circadianos externos ó la especialización de funciones al interior de un *biofilm* bacteriano.

Por último, una nueva pregunta de investigación surge de nuestros resultados: ¿Cómo osciladores autónomos e intrínsecamente diversos (población de osciladores más cercana a la realidad) se las arregla para funcionar en un estado oscilatorio sincronizado?

ÉTICA, SEGURIDAD Y PROTECCIÓN

Un artículo publicado en la revista Science en 2004 por Ferber osadamente llamado "Microbes Made to Order" nos hace pensar en cómo se debe manejar los aspectos éticos y de seguridad una vez hemos adquirido la capacidad de manufacturar sistemas complejos con determinadas especificaciones.

Al ser un área reciente la Biología Sintética no posee una regulación que permita definir unos parámetros de seguridad y ética estándar. Sin embargo algunos grupos Europeos se han unido para formar portales de internet donde se describe unas normas éticas y de seguridad para todo aquel que desee trabajar con BioS (http://openwetware.org/wiki/Synthetic_Biology:SB2.0/Biosecurity_resolutions).

Dentro de las normas se detallan algunas como que las cepas y sistemas que se puedan generar deben de tener una muy baja capacidad de sobrevivir en un ambiente natural, pero que nunca deben ser liberados y que toda investigación debe ir acompañada por la revisión de un comité ético en virtud del potencial de estos acercamientos para generar armas biológicas ó causar grandes desequilibrios en poblaciones naturales.

En Colombia no existe una regulación al respecto más allá del marco legal para el manejo de sustancias con riesgo biológico (Constitución Política de Colombia 1991: en los Artículos 48, 78, 79, 80, 81, 87 y 366. Ley 09 de 1979. Código Sanitario Nacional: artículos 22 al 35. Ley 100 de 1993 El artículo 26 de la Ley 100. Decreto Ley 1295 de 1994 del Ministerio de Trabajo y Seguridad Social

Decreto 2240 de 1996: Decreto 2676 de 2000 y la Resolución 1164 de 2002). En ese sentido se hace necesario el desarrollo de un marco legal, ético y particular para entender y promover parámetros de seguridad al realizar experimentación con Biología Sintética.

Las células de *E. coli* DH5 α que fueron transformadas con los módulos construidos en este estudio se encuentran bajo responsabilidad del grupo de Comunicación y Comunidades Bacterianas. Para su manejo se ha realizado un catálogo (anexo 3) y su uso está restringido únicamente al laboratorio. Actualmente se están desarrollando procedimientos operativos que permitan a la comunidad científica entender cómo se debe llevar a cabo el manejo de cada bacteria y sus riesgos al momento de ser utilizada reduciendo al máximo su influencia sobre el medio ambiente ó la salud humana.

CONCLUSIONES

En este trabajo fue posible diseñar teóricamente, construir *in vitro* y expresar *in vivo* un **módulo sintético de comunicación bacteriana** que integra componentes de los sistemas de *Quorum Sensing* de *Vibrio fischeri* y *Agrobacterium tumefaciens*.

Es posible estudiar el comportamiento *in vivo* de un módulo sintético de comunicación bacteriana mediante el empleo de genes reporteros monitoreados en una población de *E. coli* DH5 α .

Es posible establecer una congruencia entre los parámetros observados *in vivo* en una población bacteriana que exprese el **módulo sintético de comunicación bacteriana** y los parámetros observados por medio de la modelación matemática y computacional de la misma red, permitiendo incluso predecir eventos difíciles de reproducir experimentalmente.

Nuestro modelo permite observar un comportamiento oscilatorio y sincrónico a nivel de grupos, pero no es posible observar la sincronización de toda la población mediante la observación experimental. Sin embargo los resultados de la simulación matemática nos sugieren que la sincronización de este sistema biológico puede estar ocurriendo a través de una fase de agrupamiento intermediaría de larga duración.

Debido a la modularidad de nuestro sistema y el arreglo "*plug-and-play*", este podría servir como base para la construcción de redes más complejas y la realización de estudios más profundos de diversos fenómenos biológicos, que

involucren sincronización y respuesta a señales extracelulares como por ejemplo la diferenciación celular ó la especialización de funciones al interior de un *biofilm* bacteriano.

Las cepas construidas en este trabajo empleando los plásmidos intermediarios tienen un gran potencial como herramienta para estudiar sistemas de *Quorum Sensing* que posean proteínas del sistema LuxI/LuxR y a su vez el efecto de los *cheaters* en una comunidad bacteriana.

RECOMENDACIONES

Desarrollar un acercamiento experimental que permita monitorear una población bacteriana transformada con ambos módulos por periodos muy prolongados de tiempo sin que se afecten las células ni los parámetros del medio.

Emplear los módulos aquí construidos en estudios posteriores para estudiar su dinámica en *biofilms* bacterianos y establecer su efecto en la estructura social de una comunidad bacteriana.

Aprovechar el arreglo “*plug-and-play*” del módulo construido para acoplarlo a otros osciladores diferentes al “*repressilator*” o con una población de osciladores y monitorear su comportamiento en una población celular.

Impulsar el desarrollo de un *set* de parámetros éticos y legales que regulen la investigación realizada por Biología Sintética.

BIBLIOGRAFÍA

Balagadde, F.K. Song, H. Collins, C. H. Barnet, M. *et al.* A synthetic *Escherichia coli* predator-prey ecosystem. *Mol Syst Biol* 4, (2008).

Barkai, N. & Leibler, S. Biological rhythms: Circadian clocks limited by noise. *Nature* 403, 267-268 (2000).

Becskei, A. & Serrano, L. Engineering stability in gene networks by autoregulation. *Nature* 405, 590-593 (2000).

Boddy, A., Clarke, P.H., Houldsworth, M.A. & Lilly, M.D. Regulation of Amidase Synthesis by *Pseudomonas aeruginosa* 8602 in Continuous Culture. *J Gen Microbiol* 48, 137-145 (1967).

Chay, T.R. & Cho, S.H. On exploring the basis for slow and fast oscillations in cellular systems. *Biophysical Chemistry* 15, 9-13 (1982).

Chen, W., Kallio, P.T. & Bailey, J.E. Construction and characterization of a novel cross-regulation system for regulating cloned gene expression in *Escherichia coli*. *Gene* 130, 15-22 (1993).

Czárán, T. & Hoekstra, R.F. Microbial communication, cooperation and cheating: quorum sensing drives the evolution of cooperation in bacteria. *PLoS ONE* 4, e6655 (2009).

Danino, T., Mondragon-Palomino, O., Tsimring, L. & Hasty, J. A synchronized quorum of genetic clocks. *Nature* 463, 326-330 (2010).

Davey, M.E. & O'toole, G.A. *Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 847-867 (2000).

De Lorenzo, V. & Danchin, A. Synthetic biology: discovering new worlds and new words. The new and not so new aspects of this emerging research field. *EMBO Rep* 9, 822-827 (2008).

Dockery, J.D. & Keener, J.P. A mathematical model for quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Bull. Math. Biol* 63, 95-116 (2001).

Dolzer, j., Krannich, S., Fischer, K. & Stengl, M. Oscillations of the transepithelial potential of moth olfactory sensilla are influenced by octopamine and serotonin. *J Exp Biol* 204, 2781-2794 (2001).

Donlan, R.M. Biofilms and device-associated infections. *Emerg Infect Dis* 7, 277-281 (2001).

Drubin, D.A., Way, J.C. & Silver, P.A. Designing biological systems. *Genes & Development* 21, 242-254 (2007).

Düfer, M. Haspel, D. Krippeit-Drews, P. *et al.* Oscillations of membrane potential and cytosolic Ca(2+) concentration in SUR1(-/-) beta cells. *Diabetologia* 47, 488-498 (2004).

Dunant, Y., Israël, M., Lesbats, B. & Manaranche, R. Oscillation of acetylcholine during nerve activity in the Torpedo electric organ. *Brain Research* 125, 123-140 (1977).

Ellis, T., Wang, X. & Collins, J.J. Diversity-based, model-guided construction of synthetic gene networks with predicted functions. *Nat Biotechnol* 27, 465-471 (2009).

Elowitz, M.B. & Leibler, S. A synthetic oscillatory network of transcriptional regulators. *Nature* 403, 335-338 (2000).

Enyeart, J.J. Oscillations in evoked transmitter release at the crayfish neuromuscular junction. *Brain Research* 245, 167-170 (1982).

Ferber, D. Synthetic Biology: Microbes Made to Order. *Science* 303, 158-161 (2004).

Friesen, W.O. & Block, G.D. What is a biological oscillator? *Am. J. Physiol* 246, R847-853 (1984).

Friesen, W.O., Block, G.D. & Hocker, C.G. Formal Approaches to Understanding Biological Oscillators. *Annu. Rev. Physiol.* 55, 661-681 (1993).

Fukushima, Y. & Tonomura, Y. Oscillations of the Amount of Phosphorylated Protein and the ATPase Activity of Microsomes Effects of Calcium Ions and Cyclic AMP. *J Biochem* 72, 623-634 (1972).

Fuqua, W.C., Winans, S.C. & Greenberg, E.P. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol* 176, 269-275 (1994).

Garcia-Ojalvo, J., Elowitz, M.B. & Strogatz, S.H. Modeling a synthetic multicellular clock: Repressilators coupled by quorum sensing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 10955-10960 (2004).

Gardner, T.S., Cantor, C.R. & Collins, J.J. Construction of a genetic toggle switch in *Escherichia coli*. *Nature* 403, 339-342 (2000).

Ghosh, A. & Chance, B. Oscillations of glycolytic intermediates in yeast cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 16, 174-181 (1964).

Glass, L. Synchronization and rhythmic processes in physiology. *Nature* 410, 277-284 (2001).

Godin, P.J. & Buchman, T.G. Uncoupling of biological oscillators: a complementary hypothesis concerning the pathogenesis of multiple organ dysfunction syndrome. *Crit. Care Med* 24, 1107-1116 (1996)

Goldbeter, A. Computational approaches to cellular rhythms. *Nature* 420, 238-245 (2002).

Guevara, M.R. & Lewis, T.J. A minimal single-channel model for the regularity of beating in the sinoatrial node. *Chaos* 5, 174-183 (1995).

Hasty, J., Isaacs, F., Dolnik, M., McMillen, D. & Collins, J.J. Designer gene networks: Towards fundamental cellular control. *Chaos* 11, 207 (2001B).

Hasty, J., McMillen, D. & Collins, J.J. Engineered gene circuits. *Nature* 420, 224-230 (2002).

Hasty, J., McMillen, D., Isaacs, F. & Collins, J.J. Computational studies of gene regulatory networks: in numero molecular biology. *Nat Rev Genet* 2, 268-279 (2001A)

Heinemann, M. & Panke, Sven. *Synthetic Biology: Putting Engineering Into Bioengineering*. En el libro: *Systems Biology and Synthetic Biology*. Jhon Wiley & Son, Inc. 397-405. 2009

Higuchi, A. & Hara, M. Oscillation of Membrane Potential in Chemically Modified Poly(α -amino acid) Membranes. *The Journal of Physical Chemistry* 100, 2183-2188 (1996).

Higuchi, A. Adachi, S. Imizu, T. *et al.* Oscillation of Membrane Potential in Immobilized DNA Membranes. *The Journal of Physical Chemistry B* 104, 9864-9872 (2000).

Hoyle, G. & O'Shea, M. Intrinsic rhythmic contractions in insect skeletal muscle. *Journal of Experimental Zoology* 189, 407-412 (1974).

Inoue, H., Nojima, H. & Okayama, H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96, 23-28 (1990).

Jacob, F. & Monod, J. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J. Mol. Biol* 3, 318-356 (1961).

Jewell, B.R. & Ruegg, J.C. Oscillatory Contraction of Insect Fibrillar Muscle after Glycerol Extraction. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 164, 428-459 (1966).

Kaasik, K. & Chi Lee, C. Reciprocal regulation of haem biosynthesis and the circadian clock in mammals. *Nature* 430, 467-471 (2004).

- Kawato, M. & Suzuki, R. Biological oscillators can be stopped—Topological study of a phase response curve. *Biological Cybernetics* 30, 241-248 (1978).
- Kaznessis, Y. Models for synthetic biology. *BMC Systems Biology* 1, 47 (2007).
- Kleessen, B. & Blaut, M. Modulation of Gut Mucosal Biofilms. *British Journal of Nutrition* 93, S35-S40 (2005).
- Kolisnychenko, V. Plunkett, G. Herring, C. D. *et al.* Engineering a Reduced *Escherichia coli* Genome. *Genome Res* 12, 640-647 (2002).
- Kramer, B.P., Fischer, M. & Fussenegger, M. Semi-synthetic mammalian gene regulatory networks. *Metab. Eng* 7, 241-250 (2005).
- Kühn, S. & Raven, J. Photosynthetic oscillation in individual cells of the marine diatom *Coscinodiscus wailesii* (Bacillariophyceae) revealed by microsensor measurements. *Photosynthesis Research* 95, 37-44 (2008).
- Lakin-Thomas, P.L. Transcriptional feedback oscillators: maybe, maybe not.. *J. Biol. Rhythms* 21, 83-92 (2006).
- Longo, D. & Hasty, J. Dynamics of single-cell gene expression. *Mol Syst Biol* 2, (2006).
- Mano, Y. Factors involved in cyclic protein synthesis in sea urchin cells during early embryogenesis. *J. Biochem* 65, 483-487 (1969).
- Marsh, P.D. Dental plaque as a microbial biofilm. *Caries Res* 38, 204-211 (2004).
- McMillen, D., Kopell, N., Hasty, J. & Collins, J.J. Synchronizing genetic relaxation oscillators by intercell signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 679-684 (2002).
- Meiri, H. & Rahamimoff, R. Clumping and oscillations in evoked transmitter release at the frog neuromuscular junction. *The Journal of Physiology* 278, 513-523 (1978).
- Morton, L.H.G. & Surman, S.B. Biofilms in biodeterioration -- a review. *International Biodeterioration & Biodegradation* 34, 203-221 (1994).
- Nadell, C.D., Xavier, J.B., Levin, S.A. & Foster, K.R. The Evolution of Quorum Sensing in Bacterial Biofilms. *PLoS Biol* 6, (2008).
- Okada, Y., Tsuchiya, W. & Inouye, A. Oscillations of membrane potential in L cells. *Journal of Membrane Biology* 47, 357-376 (1979).

- Okamura, N. & Ishiwata, S. Spontaneous oscillatory contraction of sarcomeres in skeletal myofibrils. *Journal of Muscle Research and Cell Motility* 9, 111-119 (1988).
- Olson, M.E., Ceri, H., Morck, D.W., Buret, A.G. & Read, R.R. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Can J Vet Res* 66, 86-92 (2002)
- Opitz, T., De Lima, A.D. & Voigt, T. Spontaneous Development of Synchronous Oscillatory Activity During Maturation of Cortical Networks In Vitro. *J Neurophysiol* 88, 2196-2206 (2002).
- Pósfai, G. Plunkett, G. Fehér, T. *et al.* Emergent properties of reduced-genome *Escherichia coli*. *Science* 312, 1044-1046 (2006).
- Purnick, P.E.M. & Weiss, R. The second wave of synthetic biology: from modules to systems. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 410-422 (2009).
- Rapp, P.E. & Berridge, M.J. The Control of Transepithelial Potential Oscillations in the Salivary Gland of *Calliphora Erythrocephala*. *J Exp Biol* 93, 119-132 (1981).
- Rapp, P.E. An atlas of cellular oscillators. *J. Exp. Biol* 81, 281-306 (1979).
- Rapp, P.E. Why are so many biological systems periodic? *Prog. Neurobiol* 29, 261-273 (1987).
- Rauprich, O. Matsushita, M. Weijer, C. J. *et al.* Periodic phenomena in *Proteus mirabilis* swarm colony development. *J. Bacteriol.* 178, 6525-6538 (1996).
- Reading, N.C. & Sperandio, V. Quorum sensing: the many languages of bacteria. *FEMS Microbiol. Lett* 254, 1-11 (2006).
- Roenneberg, T., Chua, E., Bernardo, R. & Mendoza, E. Modelling Biological Rhythms. *Current Biology* 18, R826-R835 (2008).
- Roenneberg, T., Dragovic, Z. & Mellow, M. Demasking biological oscillators: Properties and principles of entrainment exemplified by the *Neurospora* circadian clock. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 7742-7747 (2005).
- Rost, F.W.D. *Fluorescence microscopy*. (Cambridge University Press: 1995).
- Shapiro, J. Machattie, L. Eron, L. *et al.* Isolation of Pure lac Operon DNA. *Nature* 224, 768-774 (1969).
- Simões, M., Simões, L.C. & Vieira, M.J. A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT - Food Science and Technology* 43, 573-583 (2010).

- Steindler, L. & Venturi, V. Detection of quorum-sensing N-acyl homoserine lactone signal molecules by bacterial biosensors. *FEMS Microbiol. Lett* 266, 1-9 (2007)
- Stern, C.D. & Goodwin, B.C. Waves and periodic events during primitive streak formation in the chick. *Journal of Embryology and Experimental Morphology* 41, 15-22 (1977).
- Steuer, R. & Junker, B.H. Computational Models of Metabolism: Stability and Regulation in Metabolic Networks. *Advances in Chemical Physics* 142, 105-251 (2009).
- Stewart, P.S. & Costerton, W. J. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *The Lancet* 358, 135-138 (2001).
- Stricker, J. Cookson, S. Bennet, M. *et al.* A fast, robust and tunable synthetic gene oscillator. *Nature* 456, 516-519 (2008).
- Strogatz, S.H., Beersma, D.G., Enright, J.T. & Gander, P.H. The mathematical structure of the human sleep-wake cycle. *J. Biol. Rhythms* 2, 317-329 (1987).
- Sukhija, K. *et al.* Developing an Extended Genomic Engineering Approach Based on Recombineering to Knock-in Heterologous Genes to *Escherichia coli* Genome. *Mol Biotechnol* (2011).
- Surette, M.G. & Bassler, B.L. Quorum sensing in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95, 7046 -7050 (1998).
- Tigges, M., Marquez-Lago, T.T., Stelling, J. & Fussenegger, M. A tunable synthetic mammalian oscillator. *Nature* 457, 309-312 (2009).
- Travisano, M. & Velicer, G.J. Strategies of microbial cheater control. *Trends Microbiol* 12, 72-78 (2004).
- Tyson, J.J. Periodic enzyme synthesis: Reconsideration of the theory of oscillatory repression. *Journal of Theoretical Biology* 80, 27-38 (1979).
- Wilders, R. & Jongsma, H.J. Beating irregularity of single pacemaker cells isolated from the rabbit sinoatrial node. *Biophys J* 65, 2601-2613 (1993).
- Winfree, A.T. Biological rhythms and the behavior of populations of coupled oscillators. *J. Theor. Biol* 16, 15-42 (1967).
- Winson, M.K. Swift, S. Fish, L. *et al.* Construction and analysis of luxCDABE-based plasmid sensors for investigating N-acyl homoserine lactone-mediated quorum sensing. *FEMS Microbiol. Lett* 163, 185-192 (1998).

Zhang, H.-B., Wang, L.-H. & Zhang, L.-H. Genetic control of quorum-sensing signal turnover in *Agrobacterium tumefaciens*. Proceedings of the National Academy of Sciences 99, 4638 -4643 (2002)

Zhou, T., Chen, L., Wang, R. & Aihara, K. Intercellular communications induced by random fluctuations. Genome Inform 15, 223-233 (2004).

Zhou, T., Zhang, J., Yuan, Z. & Xu, A. External Stimuli Mediate Collective Rhythms: Artificial Control Strategies. PLoS ONE; 2(2): e231 (2007).

ANEXO 1

Secuencias de nucleótidos de los genes, promotores y señal para proteasas empleados en el modelo

Clave para las secuencias de reconocimiento para cada enzima de restricción:

XbaI (5'...T[▼]CTAGA...3')

NheI (5'...G[▼]CTAGC...3')

XhoI (5'...C[▼]TCGAG...3')

>Región promotora *luxbox* (P_{LRa}):

GCTAGCacctgtaggatcgctacagggttacgcaagaaaatggttggtatagtcgaataaaTCTAGA

>Región promotora del operón Lac (pLlacO1):

GCTAGCattgtgagcggataacaattgacattgtgagcggataacaagatactgagcacatcagcaggacgc
actgaccgaattcattaaagaggagaaaTCTAGA....

>Señal de marca para proteasas de *E. coli*:

GCTAGCgcagcaaacgacgaaaactacgcttagcagcttaaTCTAGA

>Gen *gfp* que codifica para la proteína verde fluorescente:

GCTAGCcatgcgtaaaggagaagaactttcactggagttgtccaattctgttgaattagatggatggttaatgg
gcacaaattttctgtcagtgaggaggggtgaagggtgatgcaacatacggaaaactacccttaaatttattgactact
ggaaaactacctgttccatggccaacactgtcactacttccggttatggtgttcaatgcttgcgagataccgatca
tatgaaacagcatgacttttcaagagtgccatgcccgaagggtatgtacaggaaagaactatattttcaaagatga
cgggaactacaagacacgtgctgaagtcaagttgaagggtatacccttgtaatagaatcgagttaaagggtattg
attttaagaagatggaaacattcttgacacaaattggaatacaactataactcacacaatgtatacatcatggca
gacaaacaaaagaatggaatcaaagttaactcaaaattagacacaacattgaagatggaagcgttcaactagc
agaccattatcaacaaaatactccaattggcgtatggccctgtcctttaccagacaaccattacctgtccacacaatc
tgcccttgcgaaagatcccaacgaaaagagagaccacatggtccttcttgagttgtaacagctgctgggattacac
atggcatggatgaactatacaagTCTAGA

>Gen *luxR* que codifica para el receptor LuxR:

GCTAGC atgaaaaacataaatgccgacgacacttacagaataattaataaaattaaagcttgtagaagcaat
aatgatattaatcaatgcttatctgatatgactaaaatggtacattgtgaatattttactcgcgatcattatcctcattcc
atggtaaactgatatttcaatcctagataattaccctaaaaaatggaggcaatattatgatgacgctaatttaataaa
atatgatcctatagtagattattctaactccaatcattaccaattaattggaatataattgaaaacaatgctgtaaataa
aaaatctccaaatgtaattaaagaagcgaaatcatcagggtcttatcactgggttagtttccctattcactgctaata
atggcttcggaatgcttagtttgcacattcagagaaagacaactatagatagtttattttacatgcatgatgaaca
taccattaattgttccttctctagttgataattatcgaaaaataaatatagcaaataataaatcaaacaacgatttaacc
aaaagagaaaaagaatgtttagcgtgggcatgcgaaggaaagagctctgggatatttcaaaaatattaggctgc
agtaagcgtacgggtcactttccatttaaccaatgcgcaaatgaaactcaatacaacaaccgctgccaagatttcc
taaagcaatttaacaggagcaattgattgccatactttaaataat TCTAGA

>Secuencia de terminación ó parada (T):

GCTAGC taatagagaggcatcaataaaacgaaaggctcagtcgaaagactgggccttctgtttatctgtgttt
gtcgggaacgctctcctgagtaggacaaatccgccgacctagaccta TCTAGAGAATTCGATATCAA
GCTTATCGATACCGTTCGAC CTGGAG

>Gen *aibB* que codifica para la lactonasa AIB:

GCTAGC atgggaaataagctgttcgttctcgacctgggtgaaattcgtgtcgacgaaaacttcatcatcgccaac
tccactttgttacgccgagaagccgacgggtgagtagtctgatcgacattccgggtctccgcctacctcatcaat
gcaccgatgccacggctcctctacgacacaggatgtcaccgggaatgcatgggaacgaatggccgatggccccgc
gcaatcgcaactgaacgcgccctatatcggggcgtcggaaatgcaatctgccggaacggctgaggcagctcggcc
tttaccggacgatatttgcacgggtgctcgtcgcacatcttcaaatgatcacgccggttgcgtcgagtattcggaaa
gtcagggctgattgcacatgaagatgaattcgcaaccgcagtcgggtatttcgacagggcgatcattcgtcgcctt
acatcgtcaaggacatcgaggcatggcttgcgaccccgcaaaactgggatctcgtcggctcgcgatgagagggaa
agagaactcgcgcccggagtgaaactgctcaactcggaaccggccatgcttcaggaatgctgggcctggctgct
aggcttgagaagcagcccgggttctgctcgttcagacgctgttacaccgccacgaactatggccccctgcccg
ccgagcaggcgttctccacgacacgatcggttacgatcggacggctcagccatatacaggcaatacggccaatccc
gttctctcacagtccttctcgggtcacgaccgggagcagtttgccagcctgatcaaatccacggacggattctatgaa
TCTAGA

>Gen *luxI* que codifica para la sintetasa LuxI:

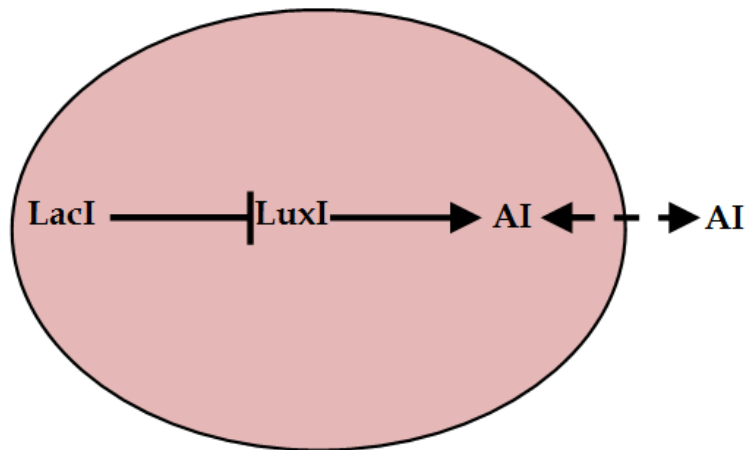
GCTAGC
atgactataatgataaaaaaatcggatTTTTGGCAATCCATCGGAGGAGTATAAAGGTATTCTAAGC
ttcgttatcaagtgttaagcaaagacttgagtgggacttagttgtagaaaataaccttgaatcagatgagatgataa
ctcaaatgcagaatataTTTATGCTTGTGATGATACTGAAAATGTAAGTGGATGCTGGCGTTATTACCTACAACAGGTG
attatatgctgaaaagtTTTTCTGAATTGCTTGGTCAACAGAGTGCTCCCAAAGATCCTAATATAGTCGAATTAAGC
gTTTTGCTGTAGGTA AAAATAGCTCCAAGATAAATAACTCTGCTAGTGAAATTACAATGAAACTATTTGAAGCTATATAT
aaacacgctgtagtcaaggattacagaatatgtaacagtaacatcaacagcaatagagcgTTTTAAAGCGTAT
taaagttccttgcacgtattggagacaaagaaattcatgtattaggtgataactaaatcggttgattgtctatgcctatt
aatgaacagtttaaaaaagcagtcctaaatTCTAGA

ANEXO 2

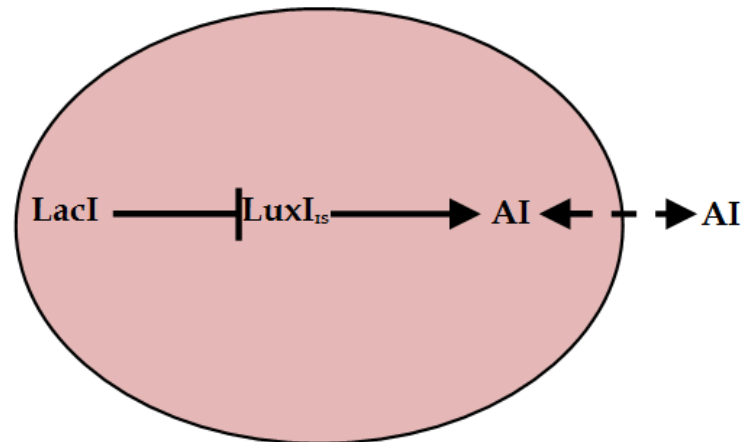
Descripción de las cepas construidas

A continuación se presenta una descripción de las cepas que fueron construidas empleando los plásmidos previamente descritos. La nomenclatura que se presenta corresponde al nombre de asignación dentro del cepario.

Cepa U18: Productora de la sintetasa de AHL (LuxI) bajo el control del promotor del operón Lac P_{lacO1} : En presencia de IPTG esta cepa es capaz de producir 3-oxo-C6 HSL que puede difundirse en el medio.

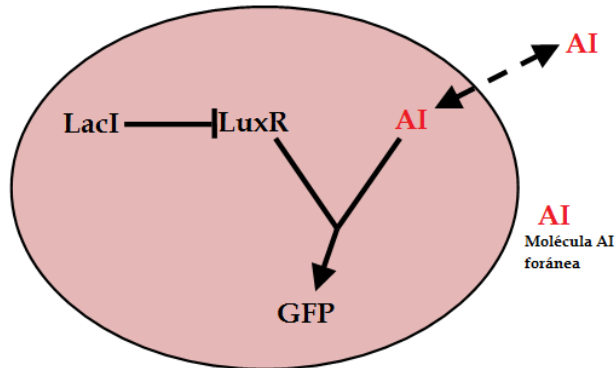


Cepa U17: Productora de la sintetasa de AHL (LuxI) bajo el control del promotor del operón Lac: Esta sintetasa presenta una señal que marca para proteasas de *E. coli*, lo que hace que disminuya la tasa de producción de 3-oxo-C6 HSL.

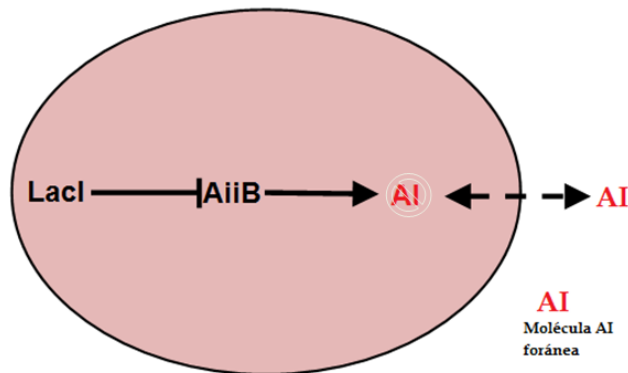


Cepa W19: Expresa al receptor LuxR bajo el control del promotor del operón Lac. Esta es una cepa biosensora ya que también posee el promotor *luxbox* que controla la expresión

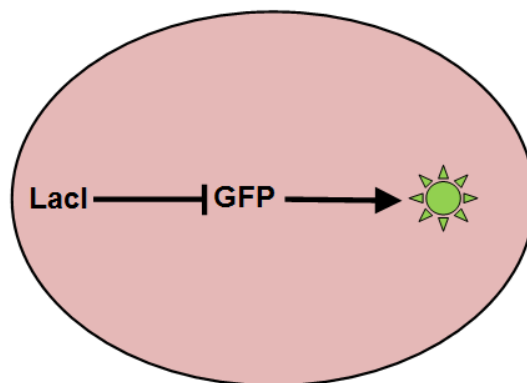
del gen reportero GFP. Esta cepa es incapaz de producir AHL. En presencia de AHL foráneas e IPTG esta cepa es capaz de producir GFP.



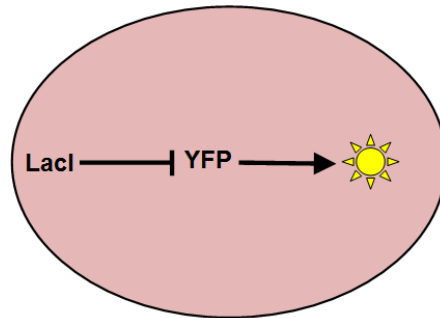
Cepa W79. Esta cepa produce la lactonasa AiiB capaz de degradar 3-oxo-C6HSL en presencia de IPTG.



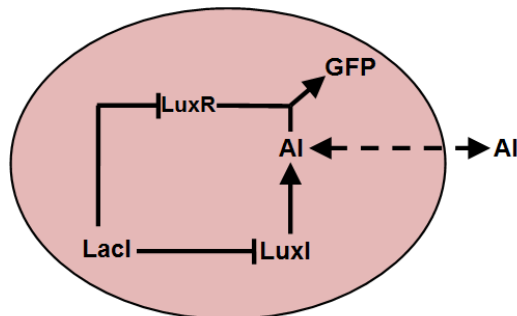
Cepa U15: Esta cepa posee el gen *gfp* bajo el control del promotor del operón Lac. Es regularmente usada como control positivo de GFP para microscopia de fluorescencia.



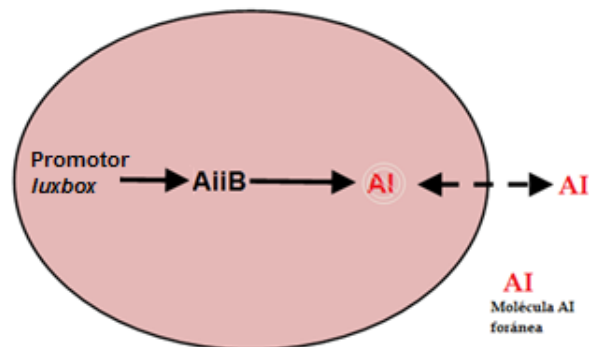
Cepa U16: Esta cepa posee el gen *yfp* bajo el control del promotor del operón Lac. Es regularmente usada como control positivo de YFP para microscopia de fluorescencia.



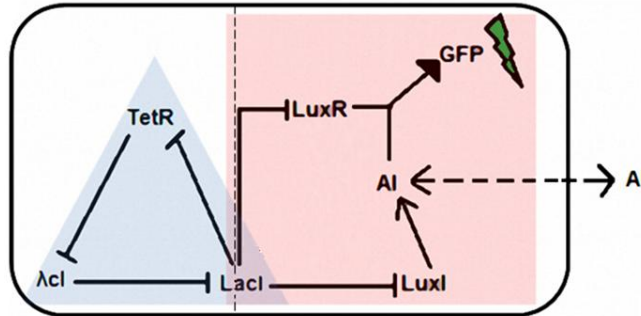
Cepa W80: Esta cepa posee los genes de *luxR* y *luxI* bajo el control del promotor del operón Lac. También presenta al gen reportero *gfp* bajo el control del promotor *luxbox*. En presencia de IPTG esta cepa es capaz de producir el receptor LuxR y la sintetasa LuxI. La sintetasa LuxI produce la molécula 3-oxo-C6HSL que es capaz de atravesar la membrana celular y entrar a otras células y formar un heterotetrámero con LuxR para activar la transcripción de los genes bajo regulación de la caja *luxbox*.



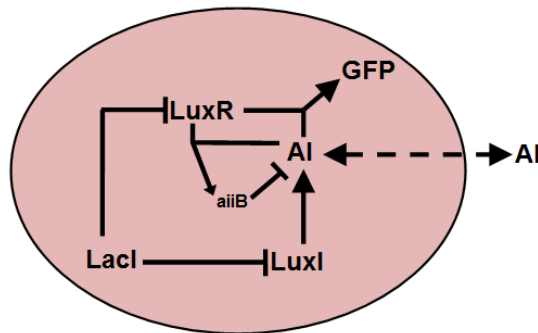
Cepa W92: Esta cepa presenta el gen de la lactonasa *aiiB* bajo el control del promotor *luxbox*.



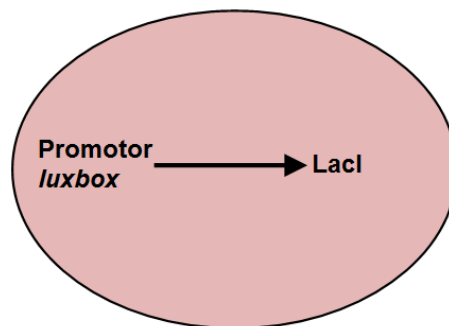
Cepa W80 + R48: Esta cepa presenta la estructura de la cepa W80 acoplada al módulo *represillator*. Es capaz de producir la expresión de GFP en ausencia de IPTG. Con el paso de cada ciclo se produce acumulación de la molécula de AHL y de esta manera la expresión de GFP tiende a permanecer activada a lo largo del tiempo.



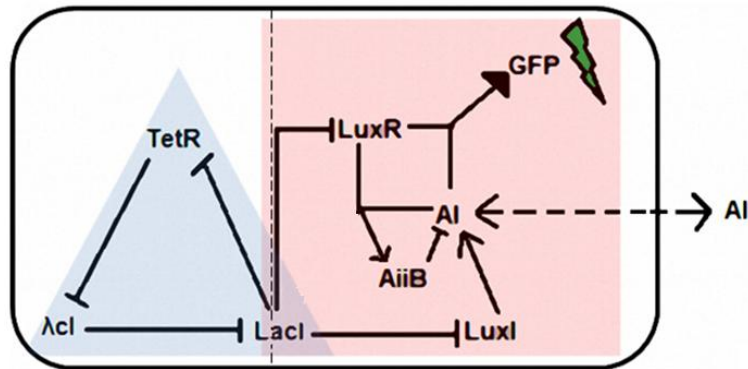
Cepa X07: Esta cepa posee a la lactonasa AiiB y la proteína GFP bajo regulación del promotor *luxbox*. Pre-estimulada con IPTG esta cepa es capaz de producir LuxR y LuxI lo que activa la expresión de los genes bajo regulación de *luxbox*. Con el tiempo este AI se degrada por la acción de AiiB y se deja de producir en vista de la inhibición del represor LacI sobre el promotor P_{lacO1} por lo que el sistema se apaga.



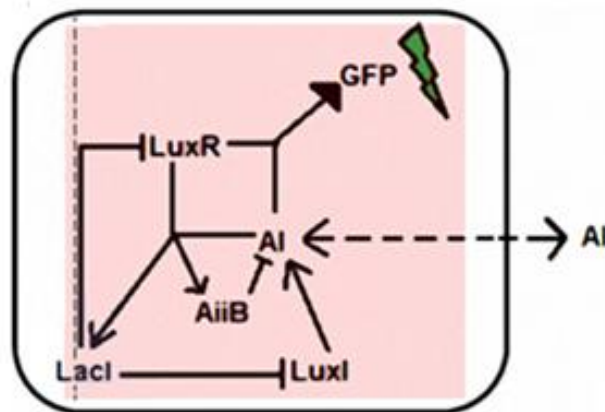
Cepa W93: Esta cepa presenta el gen que codifica para el represor LacI bajo el control del promotor *luxbox*.



Cepa X07 + R48: Esta cepa presenta la estructura de la cepa X07 acoplada al módulo *represillator*. Esta cepa es capaz de producir la expresión de GFP en ausencia de IPTG o AHL.



Cepa X16: El módulo sintético de comunicación celular.



Cepa X16 +R48: La misma cepa X16 acoplada con el represillator.

