



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



ESCUELA TÉCNICA
SUPERIOR INGENIEROS
INDUSTRIALES VALENCIA

TRABAJO FIN DE GRADO EN INGENIERÍA BIOMÉDICA

DISEÑO E IMPLEMENTACIÓN DE UN CONTROLADOR PROPORCIONAL-INTEGRAL (PI) PARA EL CONTROL DE LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS

AUTOR: ROGER MONFORT LLORENS

TUTOR: ALEJANDRO VIGNONI

COTUTORA: YADIRA FERNANDA BOADA ACOSTA

Curso Académico: 2018-19

Agradecimientos

Cuando miro atrás en estos cuatro años, lo primero que pienso es que no tengo constancia de haber vivido ese tiempo, ha pasado tan rápido... y eso en parte es mala señal. Ya lo dijo David Moratal en una reunión que tuve con él:

"Se olvidan de lo más importante, la experiencia universitaria".

Se refería a nosotros, los estudiantes. Estamos tan centrados en nuestros estudios, en nuestros objetivos, en ser lo mejor, que nos olvidamos de disfrutar del camino. Justo por eso, este trabajo está dedicado a todas aquellas personas que durante estos años me han hecho disfrutar de él.

Se lo dedico a Alejandro y Yadira, que han sido el motor principal de mis éxitos durante la carrera y que además siempre me han tratado con el amor de una familia.

Se lo dedico a Carlos Andreu, que siempre ha estado en los peores momentos, levantándose y encuchándose cuando lo necesitaba. Nunca estaré lo suficientemente cerca de ser tan buen amigo como tú.

Se lo dedico a Alejandro Costoya, al que le debo una disculpa por no haber sido el amigo que él esperaba, debería haber estado más a su lado. Junto a Carlos, es uno de los gigantes en los que me he apoyado y no estaría hoy aquí escribiendo si no fuera por él.

Se lo dedico a Adrián Requena. Pese al poco tiempo que nos hemos conocido, hemos construido grandes proyectos y hemos establecido una relación muy fuerte entre nosotros de la cual estoy orgulloso. Ojalá pueda ver sus sueños hechos realidad porque eso significará que yo seré rico.

Finalmente y no por ello menos importante se lo dedico a mi familia. A mi madre, que es mi ejemplo a seguir y que siempre está dispuesta a sacrificarlo todo por mi y por mi hermano. A mi padre, al cual le agradezco que me transmitiera su amor por las ciencias de la vida y a mi hermano que es todo un ejemplo de superación y valentía.

Gracias.

Resumen

La Biología Sintética permite la construcción de circuitos genéticos con un comportamiento deseado, modificando y combinando diferentes elementos genéticos que existen en la naturaleza. El control y la regulación de los niveles de producción de proteínas expresadas por estos circuitos genéticos, juegan un papel esencial cuando se intenta construir circuitos genéticos con comportamientos cada vez más complejos.

El objetivo de este trabajo es el diseño y la implementación experimental de un sistema de control proporcional-integral (PI) para controlar la producción de una proteína de interés. El sistema de control se basa en la aniquilación mutua de dos proteínas que controlan el circuito, las proteínas σ_{20} y Anti- σ_{20} . La proteína σ_{20} es un cofactor de la Polimerasa del Ácido ribonucleico mensajero (ARNp), que actúa promoviendo la producción algunas proteínas presentes en la célula. La proteína Anti- σ_{20} se une a la σ_{20} para reducir la actividad de la ARNp, y por tanto la producción de proteínas. Este sistema se conoce como Control Antitético PI, y en este trabajo se propone su diseño, modelado matemático basado en primeros principios y su implementación en el laboratorio dentro de un microorganismo vivo.

En primer lugar, se ha realizado el diseño del controlador PI a partir del modelado matemático de las reacciones bioquímicas involucradas. A partir de los modelos matemáticos creados, se han analizado los diseños de los controladores PI propuestos por medio de simulaciones computacionales. Los resultados obtenidos de las simulaciones muestran un buen comportamiento de las especies bioquímicas involucradas cuando el controlador PI actúa, regulando efectivamente la producción de la proteína de interés. Ambos controladores diseñados muestran buenas posibilidades de ser configurados externamente modificando la concentración de una determinada molécula denominada AHL.

En base a estos diseños, se han seleccionado las partes biológicas necesarias para la implementación de dicho controlador antitético PI en microorganismos vivos. Como resultado de la implementación se han obtenido bacterias *Escherichia Coli* capaces de producir una proteína de interés de manera regulada gracias al controlador antitético PI diseñado en este trabajo. Asimismo, se ha generado una biblioteca de partes biológicas compatibles para la clonación de genes en la sintaxis *GoldenBraid*. Algunos elementos particulares de esta biblioteca, son combinaciones específicas de partes biológicas que permitirán en un futuro caracterizar las partes

biológicas básicas creadas y así permitir una nueva iteración del proceso diseño, construcción y experimentación para mejorar los resultados obtenidos.

Palabras Clave: Biología Sintética, control antitético, factores extracitoplasmáticos, modelado, *GoldenBraid*, *Escherichia Coli*.

Resum

La Biologia Sintètica permet la construcció de circuits genètics amb un comportament desitjat, modificant i combinant diferents elements genètics que existeixen en la naturalesa. El control i la regulació dels nivells de producció de proteïnes expressades per aquests circuits genètics, juguen un paper essencial quan s'intenta construir circuits genètics amb comportaments cada vegada més complexos.

L'objectiu d'aquest treball és el disseny i la implementació experimental d'un sistema de control proporcional-integral (PI) per a controlar la producció d'una proteïna d'interés. El sistema de control es basa en l'anihilació mútua de dues proteïnes que controlen el circuit, les proteïnes σ_{20} i Anti- σ_{20} . La proteïna σ_{20} és un cofactor de la ARNp, que actua promovent la producció algunes proteïnes presents en la cèl·lula. La proteïna Anti- σ_{20} s'uneix a la σ_{20} per a reduir l'activitat de la ARNp, i per tant la producció de proteïnes. Aquest sistema es coneix com a Control Antitètic PI, i en aquest treball es proposa el seu disseny, modelatge matemàtic basat en primers principis i la seua implementació en el laboratori dins d'un microorganisme viu.

En primer lloc, s'ha realitzat el disseny del controlador PI a partir del modelatge matemàtic de les reaccions bioquímiques involucrades. A partir dels models matemàtics creats, s'han analitzat els dissenys dels controladors PI proposats per mitjà de simulacions computacionals. Els resultats obtinguts de les simulacions mostren un bon comportament de les espècies bioquímiques involucrades quan el controlador PI actua, regulant efectivament la producció de la proteïna d'interés. En particular un dels controladors dissenyats mostra bones possibilitats de ser configurat externament modificant la concentració de determinada molècula.

Sobre la base d'aquests dissenys, s'han seleccionat les parts biològiques necessàries per a la implementació d'aquest controlador antitètic PI en microorganismes vius. Com a resultat de la implementació s'han obtingut bacteris *Escherichia coli* que poden produir una proteïna d'interés de manera regulada gràcies al controlador antitètic PI dissenyat en aquest treball. Així mateix, s'ha generat una biblioteca de parts biològiques compatibles amb la sintaxi de *GoldenBraid*). Alguns elements particulars d'aquesta biblioteca, són combinacions específiques de parts biològiques que permetran en un futur caracteritzar les parts biològiques bàsiques creades i així permetre una nova iteració del procés disseny, construcció i experimentació per a millorar els resultats obtinguts.

Paraules Clau: Biologia Sintètica, control antitètic, factors extracitoplasmàtics, modelatge, *GoldenBraid*, *Escherichia coli*.

Abstract

Synthetic Biology allows the construction of genetic circuits with a desired behavior, modifying and combining different genetic elements that exist in nature. The control and regulation of the levels of protein production expressed by these genetic circuits play an essential role when trying to build genetic circuits with increasingly complex behaviors.

The objective of this work is the design and experimental implementation of a proportional-integral control (PI) system to control the production of a protein of interest. The control system is based on the mutual annihilation of two proteins that control the circuit, the proteins σ_{20} and Anti- σ_{20} . The protein σ_{20} is a cofactor of the Polimerasa del Ácido ribonucleico mensajero (ARNp), which acts promoting the production of some proteins present in the cell. The Anti-Sigma protein joins the σ_{20} to reduce the activity of the ARNp, and therefore the production of proteins. This system is known as IP Antithetic Control, and in this work we propose its design, mathematical modeling based on first principles and its implementation in the laboratory within a living microorganism.

Firstly, the design of the controllers has been made from the mathematical modeling of the biochemical reactions involved. From the mathematical models created, the proposed controller designs have been analyzed by means of computational simulations. The results obtained from the simulations show a good behavior of the biochemical species involved when the PI controller acts, effectively regulating the production of the protein of interest. In particular one of the designed controllers shows good possibilities of being configured externally by changing the concentration of an external molecule.

On the basis of these designs, the biological parts necessary for the implementation of such an IP antithetic controller in living microorganisms have been selected. As a result of the implementation, bacteria *Escherichia Coli* capable of producing a protein of interest in a regulated way have been obtained thanks to the PI antithetic controller designed in this work. A library of biological parts (compatible with the gene cloning protocol *GoldenBraid*) has also been generated. Some particular elements of this library are specific combinations of biological parts that will allow in the future to characterize the basic biological parts created and thus allow a new iteration of the process design, build and test to improve the results obtained.

Keywords: Synthetic Biology, antithetic control, extracitoplasmatic factors, modeling, *GoldenBraid*, *Escherichia Coli*.

Índice de figuras

2.1. Ciclo metodológico de la Biología Sintética. Se reconocen tres etapas cíclicas: Diseño, Construcción y Test. Imagen tomada de (Boada Acosta 2018).	6
2.2. Expresión genética o producción de una proteína. Durante la expresión genética, una ARNp leerá la información codificada en un segmento de ADN para generar un producto intermediario denominado mARN. Posteriormente un ribosoma se unirá al mARN para decodificar la información que contiene y generar a partir de el, una cadena polipeptídica formada a partir de aminoácidos. Esta cadena, tras un proceso de maduración, se convertirá en una proteína funcional. Imagen tomada de (Boada Acosta 2018).	7
2.3. Escalas de tiempo en bacterias <i>E. coli</i>. Nótese que el proceso de transcripción es mucho más rápido que el de la traducción. Inspirada en (Boada Acosta 2018).	8
2.4. Estructura de una bacteria. <i>Vibrio Cholerae</i> (Alberts y col. 2007).	8
2.5. Estructuras comunes de un plásmido. A) Plásmido superenrollado. Forma en la que normalmente se encuentran los plásmidos dentro de la célula. Esta estructura les confiere estabilidad pero impide que cualquiera de sus genes sea expresado. B) Plásmido relajado. Estructura que adopta el plásmido cuando la expresión de alguna de sus partes se necesita.	9
2.6. Estructura genética de un plásmido y su representación en SBOL. A la derecha, la representación de una TU en un plásmido. A la izquierda, la misma representación pero en ADN.	10
2.7. Diagrama de bloques de un bucle cerrado.	11
2.8. Estrategias de realimentación en microorganismos. El gen amarillo se genera de manera constitutiva. Los genes rojo y verde están en lazo cerrado y presentan realimentación negativa y positiva. La realimentación negativa se consigue con promotores represores mientras que la positiva se consigue con activadores. Imagen tomada de (Boada Acosta 2018).	12

2.9. Maneras de establecer estrategias de control en entornos biológicos. A) Diseñar el controlador dentro de cada célula de manera individual. B) Establecer el controlador a nivel poblacional. Figura tomada de de (Del Vecchio, Dy y Qian 2016)	14
2.10. Esquema de control integral Antitético. El circuito genético sintético de interés está implementado en una célula viva que constituye un espacio ruidoso y perturbado. De ese circuito se obtiene una salida de interés X_L que es sensada por una reacción que produce Z_2 en respuesta y de forma proporcional (θX_L). La especie bioquímica Z_1 se produce a una tasa constante de μ y se une (aniquila) de manera cuasi irreversible con Z_2 , esta es una operación central para la acción integral. Z_1 funciona como un actuador que aumenta la producción de la(s) especie(s) de interés X_L , cerrando así el circuito de retroalimentación. Figura tomada de (Aoki y col. 2019).	15
3.1. Esquema de un circuito genético constitutivo. Bacteria conteniendo un plásmido con una sola TU la cual se transcribe de forma constitutiva. Primero se transcribe el mRNA, y este se traduce en una proteína de interés o PoI en inglés. Ambas especies bioquímicas finales se degradan con el tiempo.	20
3.2. Simulación del modelo. Tanto la concentración de moléculas de mRNA como de la proteína PoI siguen un crecimiento exponencial (fase de transitorio) hasta estabilizarse en un valor de equilibrio (fase estacionaria) dependiente de la tasa de degradación de cada especie.	22
3.3. Simulación del modelo reducido. El modelo reducido ha sido simulado bajo las mismas condiciones iniciales que el modelo original y presenta un comportamiento muy similar.	23
4.1. Ortogonalidad de los 20 subgrupos σ más ortogonales. Los 20 subgrupos ECF más ortogonales son probados de manera independientemente en un circuito sintético donde la producción del factor σ está controlada por inducción de Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) de manera directamente proporcional. El cofactor σ generado, induce la formación de una proteína fluorescente verde (GFP) que es medida por citometría de flujo. La actividad de los promotores σ es calculada como la fluorescencia medida por citometría de flujo, dividida entre el valor de la actividad basal del promotor. Imagen tomada de (Rhodius y col. 2013).	32

- 4.2. **La sobreexpresión del subgrupo ECF20.992 tiene efectos mínimos en el genoma del huésped.** El subgrupo ECF20.992 se induce con 20 mM de Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) con el circuito detallado anteriormente en la descripción de la Figura (4.1) y la transcripción de todo el ADN de la bacteria se mide mediante secuenciación del mARN. Nótese la producción de GFP en el gráfico como la única expresión génica producida por el circuito sintético que incluye el subgrupo ECF20.992. Las unidades son rpkM o *reads per kilo base per million mapped reads*. El control negativo carece del circuito detallado anteriormente y por tanto no presenta dicha actividad. Figura tomada de (Rhodius y col. 2013). 33
- 4.3. **Topología del CA-A σ_{20}** El cofactor σ_{20} se transcribe de manera constitutiva gracias al promotor constitutivo J23106. Al unirse a la ARNp, esta se ve atraída hacia sitios de unión específicos en el promotor P_{20} . Al unirse, la producción de LuxR y GFP se incrementa de la misma manera pues están gobernadas por un mismo promotor y un mismo RBS por tanto podemos asumir que se co-expresan. La inducción por AHL genera la formación de dímeros $(R \cdot A)_2$ que actúan como factores de transcripción activadores del promotor Flux (R0062) generando de esta manera una mayor cantidad de Anti- σ_{20} . La unión de σ_{20} y Anti- σ_{20} disminuye la cantidad de σ_{20} en el medio y por tanto la producción de los genes dependientes del promotor P_{20} . En color gris se denota la estrategia de *realimentación*. El circuito sintético estará en lazo abierto cuando no haya AHL en el medio, mientras que cuando haya presencia de este, la salida será sensada por la TU que contiene al Anti- σ_{20} gracias a la producción de dímero $(R \cdot A)_2$, de esta manera, somos capaces de cerrar el lazo. Por otro lado, la acción integral aquí sombreada en beige se produce en la aniquilación mutua de las especies σ_{20} y Anti- σ_{20} 34
- 4.4. **Primera llamada** En esta primera llamada se simulan dos etapas. La **primera etapa** corresponde a una simulación de 150 minutos en las condiciones iniciales de la Tabla (4.5) hasta que se alcanzan valores estacionarios de las especies. Luego en una **segunda etapa**, se se simula durante 420 minutos hasta que alcanza el estado estacionario (donde se corta el gráfico) de nuevo pero con nuevas condiciones. En este caso se induce el sistema con 500 nM de AHL y se parte de los valores estacionarios de las especies anteriormente simuladas en la primera etapa. 42
- 4.5. **Segunda llamada** Partiendo de las especies de la simulación anterior de 150 minutos, se realizan sucesivas simulaciones de 420 minutos cada una en las cuales se induce con un valor diferente de AHL cada vez mayor que viene dado por un vector equiespaciado logarítmicamente de 100 puntos que inicia su valor en 0 nM y finaliza en 5000 nM. Las gráficas de las especies se construyen con el valor en moléculas del último paso de cada simulación, donde se encuentran ya en estado estacionario. 43
- 4.6. **Tercera llamada** Se ha realizado la misma estrategia que en la segunda llamada excepto que el vector equiespaciado logarítmicamente de 100 puntos, inicia su valor en 0 nM y finaliza en 5 nM. 44

4.7. Topología del CA-Rσ_{20} En este circuito sintético, el cofactor σ_{20} se transcribe a una tasa basal marcada por el promotor represor P_{luxR} y que por tanto es la máxima que puede alcanzar cuando no existe inducción esterna de AHL. Por otro lado, Anti- σ_{20} se transcribe de manera constitutiva. Las proteínas LuxR y GFP se producen a su máximo hasta que ocurre la inducción con AHL que activa la acción represora de P_{luxR} . De esta manera, se consigue reducir la cantidad de σ_{20} aún más que cuando sólo Anti- σ_{20} estaba formado complejo con esta. Por ende, la cantidad de LuxR y de GFP se reduce. Como se comentó anteriormente, existe una acción de control en la zona beige controlada por la aniquilación de σ_{20} con Anti- σ_{20} y realimentación negativa efectiva al inducir con AHL. La diferencia con CA-A σ_{20} es que esta vez es σ_{20} el encargado de sensar la salida dirigida por $(R \cdot A)_2$ cuando se produce la inducción.	45
4.8. Primera llamada del modelo CA-Rσ_{20}.	47
4.9. CA-Rσ_{20}: Segunda llamada	48
4.10. CA-Rσ_{20}: Tercera llamada	48
4.11. Circuito sintético pRMKA1C2	51
4.12. Circuito sintético pRMKA1C3	51
4.13. Circuito sintético pRMKA1C4	52
4.14. Circuito sintético pRMKA1C5	52
4.15. Circuito sintético pRMKA1C6	52

Índice de tablas

3.1. Variables del modelo.	21
3.2. Parámetros del modelo.	21
3.3. Especificaciones del equipo hardware para la simulación de los modelos.	24
3.4. Partes básicas adaptadas a la sintaxis de <i>GoldenBraid</i>	25
3.5. Vectores de destino utilizados en este trabajo.	26
3.6. Componentes de una reacción de <i>GoldenBraid</i> . Se utilizará la encima BsaI cuando el vector de destino sea de tipo α . De la misma manera se utilizará la enzima BsmBI cuando el vector de destino sea un Ω	26
3.7. Condiciones para llevar a cabo una reacción de <i>GoldenBraid</i>	26
3.8. Componentes para una PCR de colonias.	27
3.9. Condiciones para realizar una PCR de colonias.	28
3.10. Especificaciones del equipo hardware para la simulación de los modelos.	30
4.1. Parámetros asociados al grupo ECF20_992 según Aoki y col. 2019	31
4.2. Especies bioquímicas para el modelo matemático determinista y su símbolo asociado.	36
4.3. Especies del modelo reducido CA-AA σ_{20}	39
4.4. Parámetros del modelo ODE de CA-AA σ_{20}	40
4.5. Parámetros iniciales de la simulación	41
5.1. Costes asociados a la mano de obra.	59
5.2. Costes asociados a hardware y software.	60
5.3. Costes asociados a reacciones.	60
5.4. Costes asociados a material de laboratorio y amortizados de laboratorio.	61
5.5. Costes asociados a reacciones.	61

Lista de acrónimos

- ADN** Ácido desoxirribonucleico. 7–11, 23, 33
- AHL** *acyl homoserine lactone*. 25, 34, 42–45, 48, 51, 55, 56
- ARN_p** Polimerasa del Ácido ribonucleico mensajero. 7, 10, 11, 15, 16, 23, 25, 34, 38
- BS** Biología Sintética. 3–6, 11
- CDS** secuencia codificada. 52
- ECF** Factores extracitoplasmáticos. 15, 16, 31, 32, 56
- EDO** Ecuaciones diferenciales ordinarias. 4, 21, 37, 41
- FT** Factores de Transcripción. 10, 12
- GB** *GoldenBraid*. 3, 25–27, 30, 49
- iGEM** *International Genetically Engineered Machine*. 6
- LAM** Ley de acción de masas. 22
- mARN** Ácido ribonucleico mensajero. 7, 8, 10, 20–23, 33, 37, 38
- PI** proporcional-integral. 3, 8, 17, 56
- PoI** *Proteína de interés*. 20, 21, 56
- QSSA** Aproximación Cuasi-estacionaria. 22, 38
- RBS** *Ribosome binding sites*. 8, 34, 52
- SBOL** *Synthetic biology Open language*. 9, 10

TU Unidad de transcripción. 10, 11, 20, 25, 33, 34, 49, 55

Índice general

Agradecimientos	III
Resumen	V
Resum	VII
Abstract	IX
Lista de acrónimos	XVII
Índice general	XIX
I Memoria	1
1 Objetivos	3
1.1 Objetivos generales	3
1.2 Objetivos específicos	3
2 Introducción	5
2.1 Biología Sintética	5
2.2 Aplicaciones	6
2.3 Teoría de control en Biología Sintética	11
2.4 Motivación y justificación	17
3 Materiales y métodos	19
3.1 Diseño	19
3.2 Construcción	24

4 Resultados y discusión	31
4.1 Diseño	31
4.2 Construcción	49
5 Conclusiones y líneas futuras	55
II Presupuesto	57
5.1 Introducción y objetivo	59
5.2 Presupuesto desglosado	59
5.3 Presupuesto total	61
Bibliografía	63

Parte I

Memoria

Capítulo 1

Objetivos

El siguiente capítulo define el objetivo general del proyecto y los objetivos específicos que se han pretendido alcanzar durante su desarrollo.

1.1 Objetivos generales

El presente proyecto se enmarca en el área de la Biología Sintética que se define como la ingeniería de la microbiología. El propósito del proyecto es diseñar e implementar en un microorganismo, un controlador biomolecular de tipo proporcional-integral (PI) que permita regular la producción de una proteína de interés. Para ello se modelará matemáticamente el comportamiento del sistema y una vez validado su comportamiento, se implementará este sistema biológico en el laboratorio.

1.2 Objetivos específicos

A parte del objetivo principal se pretenden alcanzar los siguientes objetivos específicos:

- Diseñar diferentes topologías para implementar un controlador biomolecular de tipo proporcional-integral (PI) que permita regular la producción de una proteína de interés.
- Verificar que los diseños de los controladores propuestos son capaces de llevar una proteína de interés a una concentración deseada a través de simulaciones computacionales.
- Evaluar las posibilidades de configurar externamente a los controladores proporcional-integral (PI) diseñados.
- Generar una librería de las partes genéticas necesarias listas para ensamblar mediante *GoldenBraid* (GB).
- Construir en el laboratorio los controladores diseñados utilizando técnicas de ensamblaje de partes genéticas como *GoldenBraid*.
- Construir circuitos genéticos que permitan la caracterización de las partes biológicas básicas creadas.

Durante el desarrollo del proyecto, además de los objetivos específicos del trabajo en si, se pretenden alcanzar los siguientes objetivos transversales:

- Obtener nuevos conocimientos en el área de la Biología Sintética, tanto en métodos de laboratorio o *wet-lab* como en modelado matemático de sistemas biológicos, conocido como *dry-lab*.
- Aprender a utilizar el software MATLAB[®] para la resolución de ecuaciones diferenciales ordinarias u EDOs.
- Afianzar los conocimientos de planificación y gestión de proyectos de ingeniería, integrando los conocimientos obtenidos durante la carrera.
- Reforzar las capacidades y habilidades de comunicación técnica tanto oral como escrita en un ámbito multidisciplinar como la Ingeniería Biomédica, y en particular en la Biología Sintética.

Capítulo 2

Introducción

El siguiente capítulo definen las bases teóricas sobre las que se sustenta el proyecto. En primer lugar se expondrán conceptos básicos de biología molecular. Luego, una breve explicación sobre la Teoría de control en el área de Biología Sintética. Finalmente se expondrán las motivaciones del trabajo y su justificación.

2.1 Biología Sintética

La Biología Sintética es un campo multidisciplinar que se sirve de diferentes conocimientos provenientes de disciplinas como Biología, Genética, Ingeniería de control, Matemáticas y Computación. La *Royal Academy of Engineering* la define como:

«La Biología Sintética trata de diseñar y desarrollar piezas biológicas, nuevos dispositivos y sistemas, así como rediseñar los sistemas biológicos naturales existentes.»

(The Royal Academy of Engineering, 2009)

En efecto, su principal objetivo consiste en generar nuevos microorganismos con características y funciones que no necesariamente han de estar presentes en la naturaleza.

La Biología Sintética se caracteriza y se diferencia por su metodología. Como se puede observar en la Figura 2.1, su ciclo consta de tres partes que discurren además en el orden en el que se citan: **Diseño**, **Contrucción** y **Experimentación**.

1. Diseño

Es la parte *in silico* de la Biología Sintética. En ella se modela matemáticamente el sistema genético, es decir, un conjunto de genes con un objetivo pre-establecido por el diseñador y que será implementado en un microorganismo vivo. Con estos modelos y sus correspondientes simulaciones computacionales, podemos predecir el comportamiento del mismo y dilucidar su funcionamiento.

La ventaja de diseñar, simular y analizar la dinámica de un sistema antes de construirlo en microorganismos vivos es lógica, pues supone un ahorro de recursos y de tiempo en caso de no obtener la función esperada del circuito genético.

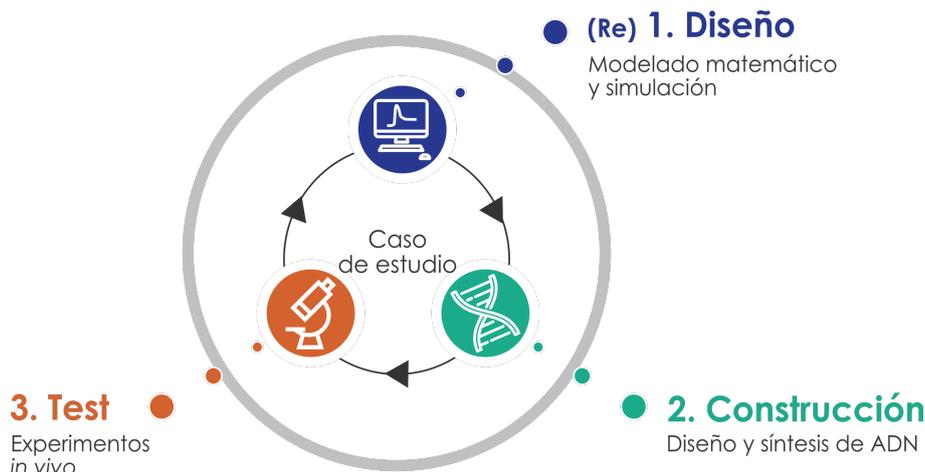


Figura 2.1: Ciclo metodológico de la Biología Sintética. Se reconocen tres etapas cíclicas: Diseño, Construcción y Test. Imagen tomada de (Boada Acosta 2018).

2. Construcción

Es la parte *in vivo* de la Biología Sintética. Incluye la implementación del sistema genético en el microorganismo seleccionado. Se realiza en un entorno de laboratorio.

3. Experimentación

En esta etapa, se realizan experimentos y se ponen a prueba los sistemas genéticos construidos. De este análisis se pueden obtener nuevas guías de diseño, empezando nuevamente con el ciclo de la Biología Sintética.

En adelante y como se puede comprobar en el índice, esta es la metodología que se ha seguido para la realización de este trabajo, que abarca las primeras etapas de Diseño y de Construcción.

2.2 Aplicaciones

Las aplicaciones de la Biología Sintética se dirigen principalmente a los campos de salud (sensores biológicos o medicamentos personalizados), energía (biocombustibles o nuevas enzimas), medio ambiente (sensores de emisiones o envases biodegradables) y de la agricultura (producción optimizada de alimentos o cultivos multirresistentes), entre otros. En 2005, la mayoría de los centros de investigación de Biología Sintética estaban situados en las costas este y oeste de los Estados Unidos. Posteriormente, el Reino Unido ocupó su lugar, seguido de Alemania, China y Japón (The Royal Academy of Engineering, 2009). Hoy en día casi todas las universidades tienen su propio espacio para hacer Biología Sintética tal y como muestra la *International Genetically Engineered Machine* (iGEM) donde universidades de todo el mundo están invitadas a presentar sus proyectos de Biología Sintética cada Octubre en Boston, Estados Unidos.

En 2018, España fue galardonada con el máximo galardón que otorga la competición (*GrandPrize*) y 5 premios especiales más gracias al esfuerzo realizado por el equipo Valencia UPV iGEM, del cual formé parte (Valencia UPV iGEM 2018).

2.2.1 Dogma Central de la Biología Molecular: producción de proteínas

Entender cómo los microorganismos vivos son capaces de decodificar la información contenida en su Ácido desoxirribonucleico (ADN) para generar proteínas, es un concepto clave para entender el funcionamiento y regulación de la vida orgánica. Tras el descubrimiento del ADN por parte de Watson y Crick en 1953, Crick estableció un marco conceptual de tres etapas al que denominó **expresión genética** (Figura 2.2) para entender la transformación del ADN en proteínas.

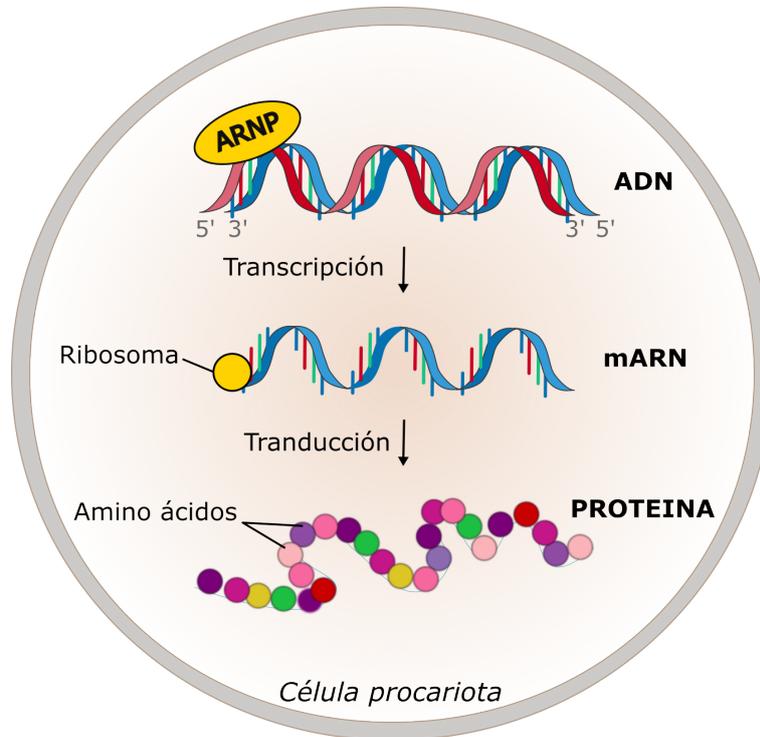


Figura 2.2: Expresión genética o producción de una proteína. Durante la expresión genética, una ARNp leerá la información codificada en un segmento de ADN para generar un producto intermediario denominado mARN. Posteriormente un ribosoma se unirá al mARN para decodificar la información que contiene y generar a partir de él, una cadena polipeptídica formada a partir de aminoácidos. Esta cadena, tras un proceso de maduración, se convertirá en una proteína funcional. Imagen tomada de (Boada Acosta 2018).

La expresión genética en un microorganismo procariota como los que tratamos en este trabajo, consta de dos etapas diferenciadas que transcurren unidireccionalmente en el orden que se describe a continuación:

1. Transcripción

Proceso en el cual se decodifica la información contenida en un segmento del ADN en un producto intermediario que se denomina Ácido ribonucleico mensajero (mARN) y que contiene la información necesaria para sintetizar la proteína final. Como se observa en la Figura (2.2), este proceso está catalizado por una enzima denominada Polimerasa del Ácido ribonucleico mensajero (ARNp) que se une a regiones específicas del ADN denominadas promotores para empezar la transcripción. Según el tipo de promotor, la transcripción puede ser constitutiva o inducible.

2. Traducción

Proceso en el que se decodifica la información contenida en el mRNA para generar una cadena polipeptídica de aminoácidos. Dicha cadena se plegará sobre sí misma debido a interacciones electroquímicas entre sus aminoácidos formando la correspondiente proteína ahora ya, con la función que le corresponde. Este proceso está catalizado por los ribosomas. Los ribosomas también se unen a regiones específicas del mRNA denominadas *Ribosome binding sites* (RBS) (Alberts y col. 2007).

En las células procariontas como las bacterias, una misma región del ADN puede codificar para varias proteínas a la vez lo que se transcribe en el denominado **mARN policistrónico**. En este, varios ribosomas se unirán a la vez para sintetizar las diferentes proteínas. En el laboratorio se trabaja especialmente con bacterias *Escherichia coli* (*E.coli*), porque son células muy bien estudiadas y caracterizadas. Adicionalmente, una de sus ventajas es que tienen una tasa de reproducción mucho más rápida que otros microorganismos (Figura 2.3).

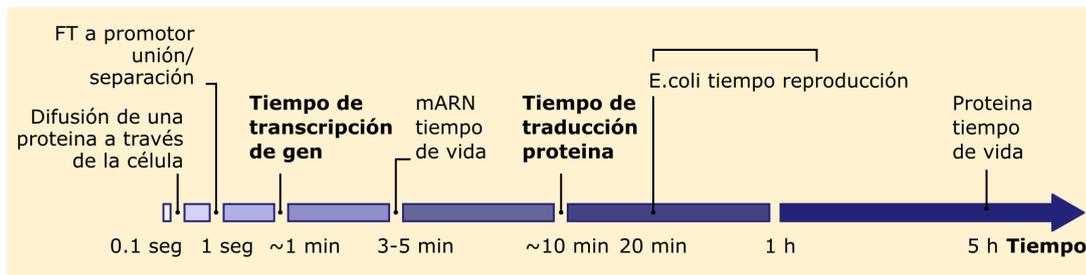


Figura 2.3: Escalas de tiempo en bacterias *E.coli*. Nótese que el proceso de transcripción es mucho más rápido que el de la traducción. Inspirada en (Boada Acosta 2018).

2.2.2 Circuitos genéticos sintéticos

Para entender cómo somos capaces de introducir un controlador PI genético dentro de una bacteria hemos de entender el funcionamiento y la estructura de lo que posibilita tal modificación genética. En las bacterias (Figura 2.4) el ADN se encuentra disperso por todo su citoplasma. Además se encuentra en dos formas distintas (Betancor, Gadea y Flores 2008) que se denominan cromosoma bacteriano y plásmido:

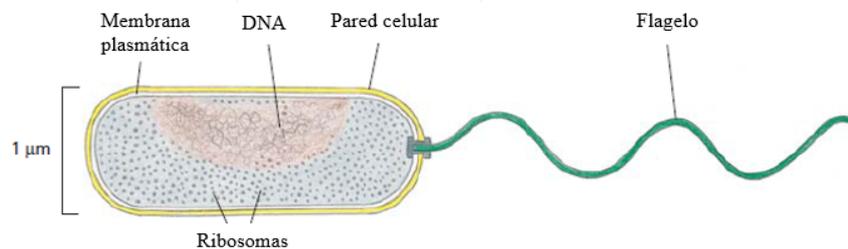


Figura 2.4: Estructura de una bacteria. *Vibrio Cholerae* (Alberts y col. 2007).

- **Cromosoma bacteriano:** Contiene casi toda la información genética del microorganismo, especialmente aquella que es necesaria para las funciones vitales. Se encuentra parcialmente aglomerado.

- **Plásmido:** Los plásmidos (Figura 2.5) son estructuras circulares de ADN extracromosómico que llevan codificadas proteínas cuya función no es crítica (resistencias a antibióticos). Las bacterias, tienen la capacidad de compartir y transferir plásmidos de manera natural en un proceso que se denomina **conjugación bacteriana**. De esta manera comparten funciones no críticas pero que pueden jugar un papel importante en la supervivencia del microorganismo bacteriano.

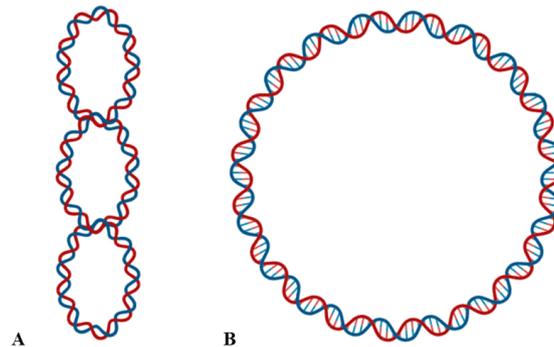


Figura 2.5: Estructuras comunes de un plásmido. A) **Plásmido superenrollado.** Forma en la que normalmente se encuentran los plásmidos dentro de la célula. Esta estructura les confiere estabilidad pero impide que cualquiera de sus genes sea expresado. B) **Plásmido relajado.** Estructura que adopta el plásmido cuando la expresión de alguna de sus partes se necesita.

El objetivo, es crear **circuitos genéticos sintéticos** que son plásmidos donde uno o más genes interactúan entre ellos y realizan una función dada. Estos circuitos sintéticos se generan normalmente a partir de **partes biológicas estándar** también denominadas **bioparts** que son segmentos de ADN cuya función biológica es conocida. Además, su introducción artificial dentro de bacterias es muy sencilla y se puede hacer tanto de manera física como química. Estas **bioparts** se representan mediante el lenguaje *Synthetic biology Open language* (SBOL) (Cox y col. 2018).

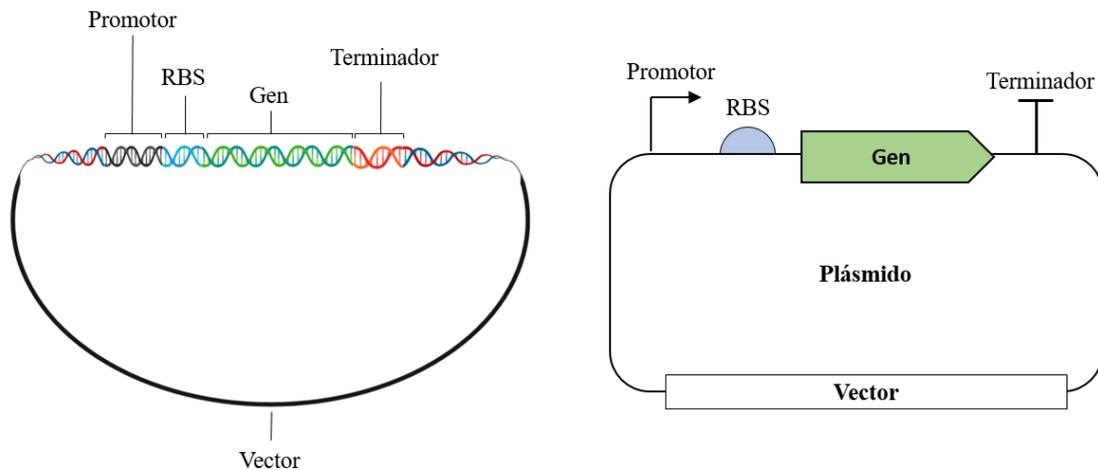


Figura 2.6: Estructura genética de un plásmido y su representación en SBOL. A la derecha, la representación de una TU en un plásmido. A la izquierda, la misma representación pero en ADN.

En la Figura (2.6) se muestra una **Unidad de transcripción (TU)**, que es la unidad mínima de ADN que puede producir una proteína de interés. Se compone de 4 partes esenciales que se detallan a continuación:

1. Promotor

Como se comentó anteriormente, esta región del ADN posee sitios de unión para la ARNp. En la naturaleza existen dos tipos de promotores en función de cómo regulan la transcripción.

- **Constitutivos:** La transcripción es constante y no depende factores externos.
- **Inducibles:** La transcripción es variable y depende de la unión al promotor de ligandos conocidos como Factores de Transcripción (FT). Podemos hablar de dos tipos de FT:
 - a) **Activadores:** Inician la transcripción al unirse al promotor. El promotor inducible activador tiene una tasa basal que es incrementada hasta un límite máximo al unirse el FT.
 - b) **Represores:** Inhiben la transcripción al unirse al promotor. El promotor inducible represor tiene una tasa basal que es reducida hasta un límite mínimo al unirse el FT.

2. Sitio de unión ribosómico (RBS)

Es una secuencia o región en el mRNA, donde los ribosomas se unirán para iniciar la traducción. Los RBS se caracterizan por la afinidad que poseen para unirse a los ribosomas, y dicha afinidad es proporcional al ratio de traducción.

3. Región codificante (CDS) o gen

Es normalmente la parte de la TU más larga de las cuatro, pues es la secuencia de ADN que codifica para la proteína de interés.

4. Terminador

Es una región del ADN que es capaz de reconocer la ARN_p, en ese instante, se desancla de la cadena de ADN e interrumpe la transcripción.

5. Vector

También llamado *backbone*, es la parte que contiene a una o varias TUs y tiene el origen de replicación del plásmido así como los genes de las resistencias o antibióticos.

2.3 Teoría de control en Biología Sintética

Uno de las aplicaciones de Biología Sintética es conseguir regular la expresión genética de un microorganismo mediante una acción externa. Siendo más específicos, lo que se desea es que una proteína de interés (en términos de concentración intracelular) llegue a una determinada referencia.

La Teoría de control ya ha resuelto estos problemas en otras áreas mediante el uso de realimentación y de controladores. De hecho, los sistemas de control están omnipresentes en el ADN de los microorganismos tanto procariotas como eucariotas (Kelly y col. 2018) y existen ejemplos implementados como lo son: el *toggle swich* (Gardner, Cantor y Collins 2000), el *repressilator* (Elowitz y Leibler 2000), osciladores autosostenidos (Gutiérrez 2019), o un seguidor de concentración (Hsiao, Swaminathan y Murray 2018).

2.3.1 Realimentación negativa. Bucle cerrado

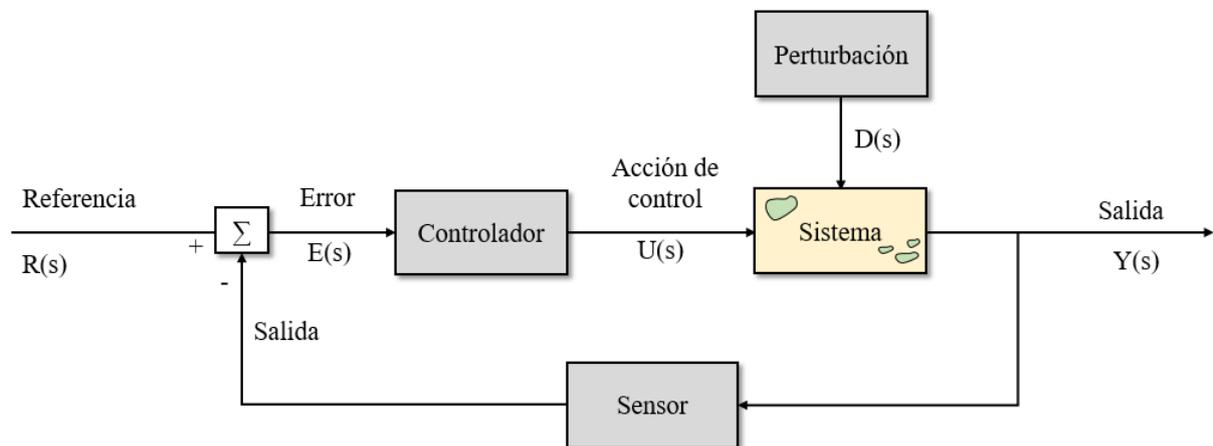


Figura 2.7: Diagrama de bloques de un bucle cerrado.

En la Figura (2.7) podemos ver el clásico **diagrama de bloques** que representa el funcionamiento de un sistema que en el caso de ser biológico puede ser tanto un cultivo como una sola célula. Como podemos observar, la salida del sistema o *Output* es sensada y restada a la referencia. Este lazo cerrado constituye lo que se denomina **realimentación**. La resta entre referencia y salida es lo que se denomina en teoría de control como **error** y es la señal de entrada del

controlador. Este último, genera una acción de control en función de la magnitud del error para que este sea lo más pequeño posible, pese a las perturbaciones que pueda sufrir el sistema.

Los promotores desempeñan un papel importante en la constitución de estrategias de realimentación a nivel del ADN (Figura 2.8). Cuando el promotor es constitutivo, se dice que el sistema está en un lazo abierto y no existe ninguna estrategia de realimentación (gen amarillo Figura 2.8). Si en caso contrario nos encontramos con promotores activadores o represores nos encontramos en lazo cerrado. Existen dos estrategias posibles de realimentación.

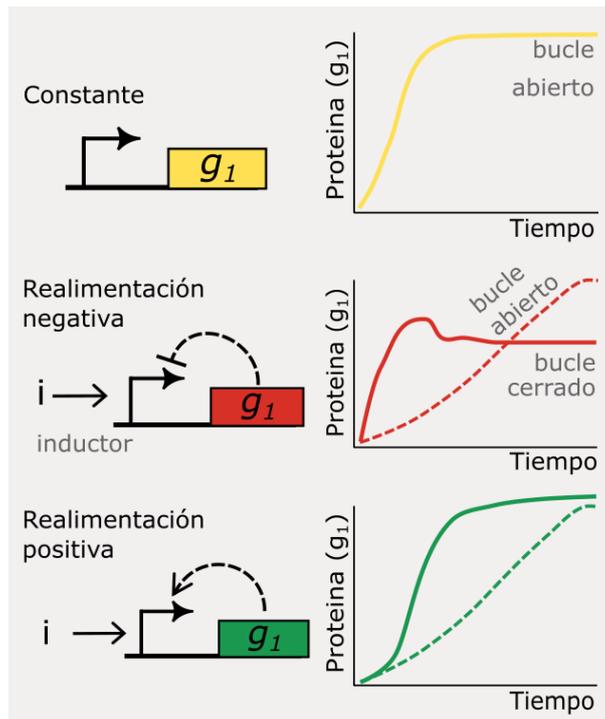


Figura 2.8: Estrategias de realimentación en microorganismos. El gen amarillo se genera de manera constitutiva. Los genes rojo y verde están en lazo cerrado y presentan realimentación negativa y positiva. La realimentación negativa se consigue con promotores represores mientras que la positiva se consigue con activadores. Imagen tomada de (Boada Acosta 2018).

- **Realimentación positiva:** lograda con promotores activadores y sus correspondientes FT. A mayor concentración de un FT, mayor producción de proteína (gen verde Figura 2.8).
- **Realimentación negativa:** lograda con promotores represores. A mayor concentración de un FT, menor producción de proteína (gen rojo Figura 2.8).

2.3.2 Controladores

Para que en un sistema de control, la salida siga a la referencia, necesitamos la ayuda de controladores. Hay tres tipos básicos de controladores (Aström y Murray 2010) que se caracterizan por su acción de control $U(s)$ (Figura 2.7):

■ Proporcional (P)

La acción de control $U(s)$ en la ecuación (2.1) es proporcional al error en el instante de tiempo actual. La magnitud de la constante de proporcionalidad K_p indicará la velocidad con la cual nos acercamos a la referencia. Constantes de proporcionalidad grandes aseguran una rápida llegada a la referencia pero pueden superarla.

$$\begin{aligned}U(s) &= K_p(R(s) - Y(s)) \\ &= K_p E(s)\end{aligned}\tag{2.1}$$

■ Integral (I)

En este caso, el controlador tiene en cuenta tanto el error en el instante de tiempo actual como el error en instantes pasados. La característica más importante de este tipo de controlador es que permite que la salida alcance y siga a la referencia, consiguiendo error nulo. La velocidad con la que lo hace se puede modificar la acción de control $U(s)$ se denomina K_i :

$$U(s) = K_i \int_0^s E(\tau) ds\tag{2.2}$$

■ Derivativo (D)

Con un controlador derivativo podemos proporcionar al controlador la habilidad de predecir el error de manera aproximada por extrapolación lineal. La constante de tiempo derivativo T_d se puede modificar para cambiar la magnitud del salto en el tiempo.

$$E(s + T_d) \approx E(s) + T_d \frac{E(s)}{dt}\tag{2.3}$$

Estas estrategias de control pueden combinarse para generar otras nuevas que combinen sus características. Es el caso de la acción proporcional-integral (PI) que permite que la salida del sistema alcance rápidamente a la referencia (efecto proporcional) y además lo hace con error nulo cuando el tiempo tiende a infinito (efecto integral). Combinando las ecuaciones (2.1) y (2.2) se tiene:

$$U(s) = K_p E(s) + K_i \int_0^s E(\tau) ds\tag{2.4}$$

Existen actualmente dos maneras de establecer y diseñar controladores para el manejo de redes genéticas sintéticas como muestra la Figura (2.9).

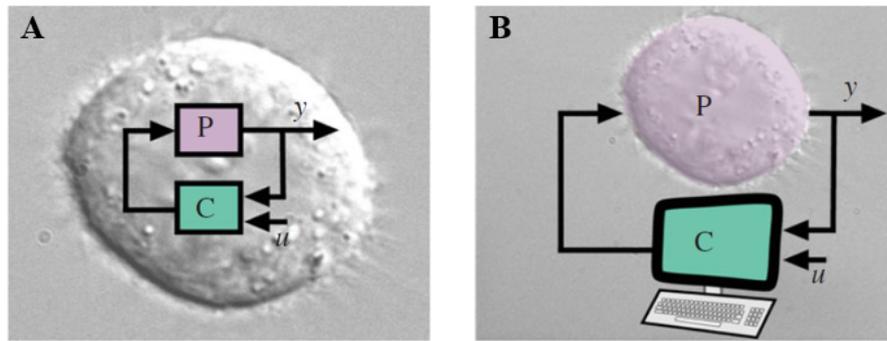


Figura 2.9: Maneras de establecer estrategias de control en entornos biológicos. **A)** Diseñar el controlador dentro de cada célula de manera individual. **B)** Establecer el controlador a nivel poblacional. Figura tomada de de (Del Vecchio, Dy y Qian 2016)

La primera forma (A en Figura 2.9) es la seleccionada en este trabajo y consiste en diseñar el **controlador como un circuito genético en las células individuales**, esto es, que cada una posea un controlador dentro de ellas en forma de plásmido (Hsiao, Swaminathan y Murray 2018 ; Menolascina, Di Bernardo y Di Bernardo 2011). Esta forma resulta fácil de implementar no obstante, está limitada a las *bioparts* disponibles. Además, las especies y reacciones bioquímicas que se produzcan están sujetas a fluctuaciones estocásticas.

La segunda forma (B en Figura 2.9) es que el **controlador sea implementado a nivel poblacional** en un ordenador y su actuación será a nivel de la población celular mediante especies bioquímicas externas (Menolascina y col. 2014). Esto resuelve los problemas anteriores en buena medida pero no permite un control a nivel individual.

2.3.3 Controlador antitético PI

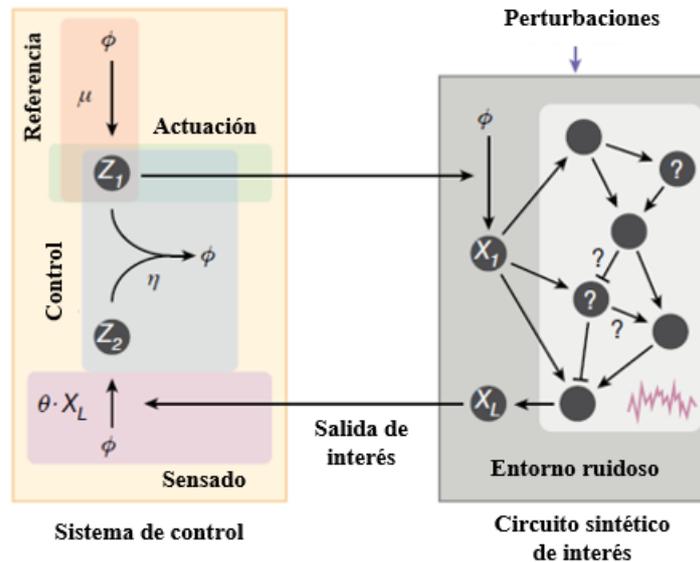


Figura 2.10: Esquema de control integral Antitético. El circuito genético sintético de interés está implementado en una célula viva que constituye un espacio ruidoso y perturbado. De ese circuito se obtiene una salida de interés X_L que es sensada por una reacción que produce Z_2 en respuesta y de forma proporcional (θX_L). La especie bioquímica Z_1 se produce a una tasa constante de μ y se une (aniquila) de manera cuasi irreversible con Z_2 , esta es una operación central para la acción integral. Z_1 funciona como un actuador que aumenta la producción de la(s) especie(s) de interés X_L , cerrando así el circuito de retroalimentación. Figura tomada de (Aoki y col. 2019).

A pesar de sus beneficios, la implementación de las acciones proporcional e integral en las células vivas ha sido difícil de lograr dada la escasez de *bioparts* que actúen como sensores y controladores requeridos para este tipo de sistema. El **Controlador Antitético PI**, es una topología biomolecular que implementa estas acciones de control y logra una adaptación robusta de la salida o proteína de interés (Aoki y col. 2019). Esta topología ha sido probada en diversos circuitos sintéticos tanto *in silico* como *in vivo* en E.Coli.

El controlador antitético (Figura 2.10) se basa en la existencia de dos especies que se aniquilan entre ellas y que son capaces de regular de esta manera una proteína de interés. Existen en la filogenia bacteriana una serie de pequeñas proteínas reguladoras organizadas en subgrupos denominados **Factores extracitoplasmáticos (ECF)**. Cada subgrupo de ECF tiene tres componentes:

- **Cofactor σ**

Un cofactor es una molécula pequeña orgánica o inorgánica que participa con otras enzimas y modifica su actividad enzimática. En este caso σ es un cofactor orgánico de la ARNp y provoca que esta tenga mayor afinidad de unión al promotor σ para empezar la transcripción de una proteína.

■ **Factor Anti- σ**

Proteína que tiene la capacidad de secuestrar al cofactor σ ya sea en el medio intracelular o cuando este está unido a la ARNp. Al unirse, forman un complejo sin ningún tipo de actividad ni función.

■ **Promotor σ**

Promotor que tiene sitios de reconocimiento especiales para aquellas ARNp que tiene como cofactor a la proteína σ .

Se ha demostrado que existen 20 subgrupos de ECF que son **ortogonales** entre ellos (Rhodius y col. 2013). La ortogonalidad es una propiedad de los subgrupos de ECF por la cual aunque se de el caso de que existan varios subgrupos juntos en el mismo microorganismo, los cofactores σ unidos a la ARNp no se unirán a promotores que no sean de su subgrupo, ni serán secuestrados aquellos σ s por Anti- σ s que no pertenezcan al mismo subgrupo. Esta es una propiedad interesante a tener en cuenta para evitar interacciones indeseadas en el controlador.

A partir de la Figura 2.10 podemos extraer las siguientes dinámicas temporales de las especies bioquímicas σ (Z_1) y Anti- σ (Z_2) (Aoki y col. 2019):

$$\begin{aligned}\dot{Z}_1 &= \mu - \eta Z_1 Z_2 \\ \dot{Z}_2 &= \theta X_L - \eta Z_1 Z_2 \\ \dot{X}_L &= K Z_1 - d X_L\end{aligned}\tag{2.5}$$

Si en este sistema calculamos la resta entre Z_1 y Z_2 obtenemos:

$$\dot{Z}_1 - \dot{Z}_2 = \mu - \eta Z_1 Z_2 - \theta X_L + \eta Z_1 Z_2$$

y luego de reordenar los términos:

$$\dot{Z}_1 - \dot{Z}_2 = \mu - X_L$$

Y donde integrando a ambos lados de la ecuación obtenemos la acción integral:

$$(Z_1 - Z_2)(t) = \int_0^t (\mu - X_L(\tau)) d\tau$$

Como puede observarse, el modelo (2.5) es un modelo general que solamente tiene en cuenta la variable de salida X_L . Sin embargo, para aplicar la metodología de diseño, construcción y experimentación de la Biología sintética presentada anteriormente, es necesario contar con un **modelo más realista** para que la implementación biológica del sistema en el laboratorio pueda relacionar directamente los parámetros del modelo con partes biológicas.

En este trabajo se ha optado por representar al Controlador Antitético PI con modelos matemáticos basados en primeros principios que sean capaces de capturar todas las dinámicas relevantes y mantengan la relación entre los parámetros del modelo y las partes biológicas disponibles en el laboratorio.

2.4 Motivación y justificación

La biología sintética permite la generación de nuevos microorganismos con características no existentes en la naturaleza. Esto es de gran interés para generar nuevas soluciones en campos como la salud, energía, agricultura, medio ambiente o industria biotecnológica. Uno de los intereses principales es el de ser capaces de controlar la producción de proteínas de interés. Pese a lo sencillo de esta afirmación, el entorno biológico está sometido a un gran número de perturbaciones que, junto a la escasez de partes biológicas necesarias para la implementación, hacen de la regulación de dichas proteínas un proceso complejo.

En este sentido, los controladores PI juegan un papel crucial al ser robustos ante las perturbaciones y conseguir minimizar el error de seguimiento o regulación. Este reto ya ha sido abordado por Aoki y col. 2019, no obstante aún resta conseguir modelar el comportamiento del sistema PI de una manera más realista y generar nuevos circuitos genéticos que mejoren los existentes. Este es el objetivo principal de este trabajo.

Materiales y métodos

La Biología Sintética se puede abordar siguiendo una metodología cíclica: Diseño, Construcción y Test. A continuación se explicará la generación de modelos matemáticos deterministas utilizados en la etapa de Diseño, así como todas las metodologías de laboratorio para construir los nuevos circuitos genéticos sintéticos de este trabajo.

3.1 Diseño

El modelado matemático de un sistema proporciona una abstracción del comportamiento del mismo que nos es de utilidad para comprobar hipótesis y generar nuevas estrategias de actuación en base a los resultados (Boada Acosta 2018). Un sistema biológico se puede modelar de dos maneras: **determinista** o **estocástica**. La primera no tiene en cuenta la naturaleza probabilística de las reacciones bioquímicas, simplemente tiene en cuenta la cantidad actual de sustrato que hay, las velocidades a las que se producen las reacciones bioquímicas con dichos sustratos, y la estequiometría de las mismas. Esta aproximación, aunque sencilla no debe subestimarse ya que resulta de gran utilidad cuando se desean testar sistemas de control PI en los que el ruido tiene un efecto limitado.

Los modelos implementados en MATLAB[®] para este trabajo son de índole determinista aunque se les ha añadido código adicional para que el cambio a estocástico sea sencillo.

3.1.1 Modelado matemático determinista

Para ilustrar la metodología de construcción de un modelo determinista de un circuito genético, se expondrá un ejemplo donde un gen expresa una proteína de forma constitutiva.

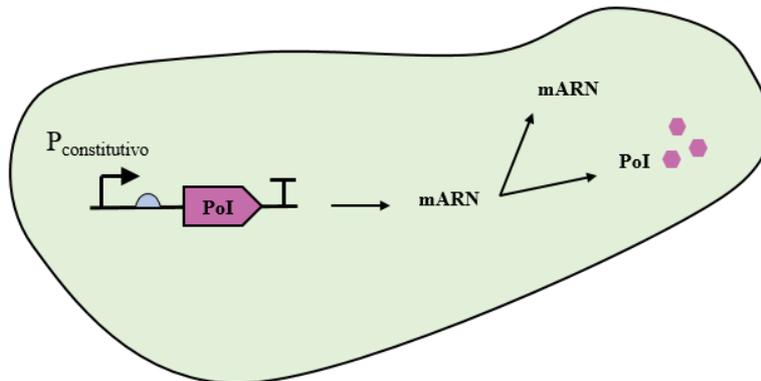
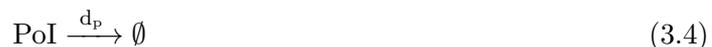


Figura 3.1: Esquema de un circuito genético constitutivo. Bacteria conteniendo un plásmido con una sola TU la cual se transcribe de forma constitutiva. Primero se transcribe el mARN, y este se traduce en una proteína de interés o PoI en inglés. Ambas especies bioquímicas finales se degradan con el tiempo.

1. Especies y reacciones bioquímicas de un circuito genético

En primer lugar, debemos reflejar en un esquema como el de la Figura (3.1) el comportamiento bioquímico de nuestro circuito genético. Podemos incluir tantos procesos como queramos (transcripción, traducción, unión de ribosomas, formación de complejos, etc...) pero debemos tener en cuenta que cuantos más procesos queramos incluir, más especies bioquímicas estaremos incluyendo en el sistema, y por tanto el modelo matemático tendrá más estados, uno por cada especie bioquímica que representará su dinámica temporal.

A continuación, debemos extraer de nuestro esquema bioquímico las ecuaciones bioquímicas que intervienen en el proceso.



Donde \emptyset significa la desaparición de la especie bioquímica del sistema y μ es la tasa de dilución de la bacteria, con la que se expresa el tiempo entre divisiones celulares que producen una repartición de las especies bioquímicas entre las nuevas células.

Como podemos observar, en (3.1) la región codificante de la TU se transcribe mARN de manera constitutiva a una tasa constante C_R . Dicho mARN se traduce en (3.2) en una proteína de interés o PoI a una tasa p . Nótese que el mARN vuelve a aparecer como producto en la reacción indicando que ha quedado libre tras la traducción. Finalmente en (3.3) y

(3.4) el mRNA se degrada a una tasa d_m y la proteína de interés a una tasa d_p .

2. Ley de acción de masas (LAM)

La Ley de acción de masas postula:

“Para una reacción elemental, es decir, toda aquella reacción donde todos los coeficientes estequiométricos de los reactivos son uno, la tasa de reacción (velocidad con la que ocurre la reacción) es proporcional al producto de las concentraciones de los reactivos, elevados a una potencia que viene definida por la estequiometría de la reacción”.

(Alon 2006)

De esta manera, a partir de las reacciones bioquímicas podemos establecer matemáticamente el balance dinámico de las especies como Ecuaciones diferenciales ordinarias (EDO) a las que se hace referencia a veces con el nombre de ecuaciones cinéticas. De esta manera y haciendo el cambio de variables que se indica en la Tabla (3.1) las dos especies involucradas PoI y mRNA quedan descritas con el siguiente sistema de ecuaciones diferenciales:

Tabla 3.1: Variables del modelo.

Símbolo	Especie bioquímica	Unidades
n_1	mRNA	moléculas
n_2	PoI	moléculas

$$\dot{n}_1 = C_R - d_m n_1 \quad (3.5)$$

$$\dot{n}_2 = p n_1 - d_p n_2 \quad (3.6)$$

Una vez se tiene el modelo, se debe proceder a obtener valores para las tasas o parámetros correspondientes. Con el fin de realizar la integración numérica utilizaremos el software MATLAB[®] con los parámetros de la Tabla 3.2.

Tabla 3.2: Parámetros del modelo.

Parámetro	Descripción	Valor	Unidades	Referencia
C_R	Tasa de transcripción constitutiva	7.9	moléculas.min ⁻¹	Boada, Vignoni y Pico 2017
p	Ratio de traducción	2.4	min ⁻¹	Boada, Vignoni y Pico 2017
d_m	Ratio de degradación del mRNA	0.247	min ⁻¹	Boada, Vignoni y Pico 2017
d_p	Ratio de degradación de la PoI	0.156	min ⁻¹	Boada, Vignoni y Pico 2017

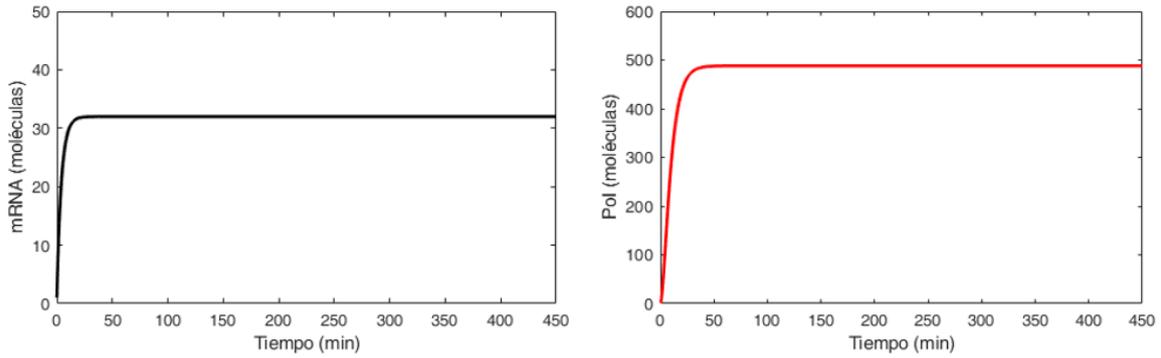


Figura 3.2: Simulación del modelo. Tanto la concentración de moléculas de mRNA como de la proteína Pol siguen un crecimiento exponencial (fase de transitorio) hasta estabilizarse en un valor de equilibrio (fase estacionaria) dependiente de la tasa de degradación de cada especie.

3. Reducción de orden de un modelo. Aproximación Cuasi-Estacionaria (QSSA)

Uno de los problemas de aplicar la LAM es que, si se desea simular el comportamiento de muchos procesos, el número de especies aumenta y por tanto también el orden del modelo y el número de parámetros. La **reducción** de modelos tiene como objetivo reducir la complejidad (número de estados) del modelo y los parámetros que posee. Intentando siempre que tanto el modelo reducido resultante como el original tengan dinámicas parecidas.

Una de las maneras más comunes para reducir los modelos es aplicar la **Aproximación Cuasi-estacionaria (QSSA)**. La QSSA considera que en un modelo hay separación en las escalas temporales entre las diferentes dinámicas de las especies bioquímicas. De esta manera, se puede asumir que procesos como uniones, separaciones, transcripción o traducción ocurren rápidamente en comparación con otros procesos. Esto permite considerar que la evolución temporal de las especies bioquímicas en el tiempo es nula, es decir, que se generan y se destruyen con gran celeridad (Boada Acosta 2018).

Considerando las reacciones bioquímicas del esquema (3.1 hasta 3.4) y teniendo en cuenta las tasas de dichas reacciones (Tabla 3.2) se puede considerar que el mRNA se produce y se degrada de manera más rápida que la Pol tal y como indican los valores de la Tabla 3.2. De esta manera al aplicar QSSA podemos asumir la variación temporal de mRNA nula y despejar la variable n_1 de la ecuación (3.5) para poder sustituirla en (3.6).

$$\dot{n}_1 \approx 0 \quad (3.7)$$

Por tanto, despejando su valor se tiene:

$$n_1 = \frac{C_R}{d_m} \quad (3.8)$$

Sustituyendo (3.8) en (3.6) obtenemos el modelo reducido siguiente:

$$\dot{n}_2 = p \frac{C_R}{d_m} - d_p n_2 \quad (3.9)$$

Simulando el comportamiento dinámico de este modelo reducido obtenemos los resultados de la figura (3.3). Comparando ambas Figuras (3.2) y 3.3) se observa que para la proteína PoI el comportamiento del modelo reducido es similar al modelo completo.

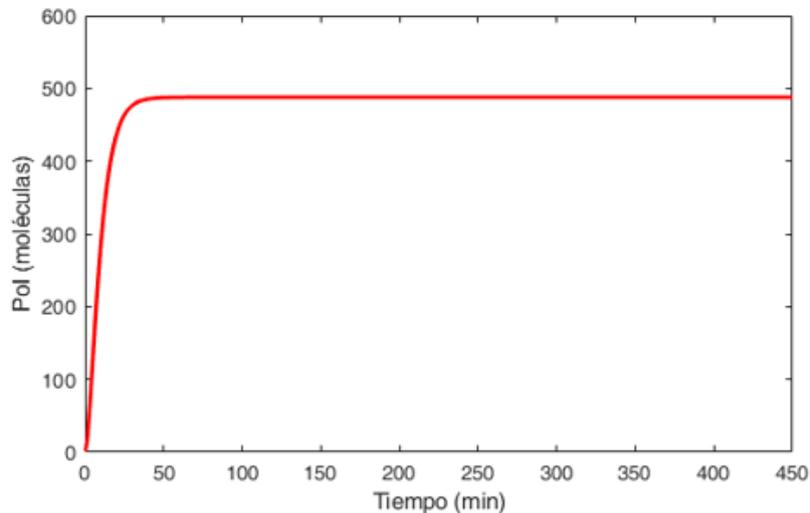


Figura 3.3: Simulación del modelo reducido. El modelo reducido ha sido simulado bajo las mismas condiciones iniciales que el modelo original y presenta un comportamiento muy similar.

3.1.2 Presunciones especiales

Para la generación y simulación de los modelos se han tenido en cuenta ciertos supuestos que cabe comentar.

1. Se considera que el volumen celular es constante, por lo que su variación a lo largo del ciclo celular no se tiene en cuenta para el cálculo de las relaciones de transporte a través de la membrana celular.
2. Se considera que el número de ARN_p y el número de copias de cada plásmido permanecen constantes. Además, se considera que el número de nucleótidos añadidos por ARN_p por unidad de tiempo durante la transcripción es siempre el mismo. Por lo tanto, los procesos de transcripción constitutivos que sin estos supuestos consistirían en dos reacciones (unión del ARN_p al ADN y producción de mRNA) y tres especies bioquímicas (ARN_p, ADN y mRNA) (Picó y col. 2015), consisten en una sola reacción con una sola especie mRNA. El ADN y la ARN_p se incluyen en la constante cinética tal y como se muestra en (3.10).



3. Del mismo modo, el número de ribosomas y aminoácidos se considera constante, por lo que estas especies bioquímicas no se tienen en cuenta en las reacciones de traducción, dejando este proceso como una sola reacción con dos especies como se muestra en (3.11).



4. La maduración proteica se incluye dentro de las tasas de traducción.

3.1.3 Materiales

Los materiales necesarios para llevar a cabo la parte de diseño se pueden separar en hardware y en software.

Hardware

Para llevar a cabo las simulaciones de los modelos matemáticos se ha utilizado un equipo de sobremesa cuyas características se relatan en la Tabla 3.3.

Tabla 3.3: Especificaciones del equipo hardware para la simulación de los modelos.

Especificaciones	Características
Procesador	Intel(R) Core(TM) i5-3330, CPU 3.00GHz
Memoria RAM	6.00 GB
Sistema operativo	Microsoft Windows 10 Home (64bits)
Almacenamiento en disco mecánico	438 GB

Software

El lenguaje de programación utilizado para el desarrollo de código ha sido **M**, que es el lenguaje utilizado el entorno de desarrollo integrado MATLAB[®] donde se han ejecutado todas las simulaciones. Cada modelo consta de tres archivos: Un ejecutable, un archivo que almacena los parámetros de la simulación y una función. El funcionamiento será detallado en el capítulo cuarto.

3.2 Construcción

En esta sección explicaremos todos aquellos protocolos de laboratorio realizados para conseguir las implementaciones del controlador antitético propuestas así como las *bioparts* utilizadas en cada uno de ellos a fin de asegurar las repetibilidad de los experimentos.

3.2.1 Ensamblaje *GoldenBraid*

GoldenBraid es una **metodología de ensamblaje binario** basada en enzimas de restricción de tipo IIS que permite generar circuitos sintéticos multigénicos de manera robusta (Sarrion-Perdigones y col. 2011). Para poder utilizar este estándar es necesario tener las *bioparts* o partes genéticas que se deseen unir adaptadas a su sintaxis. Todas las partes genéticas que se van a utilizar en este trabajo y que se presentan en la Tabla (3.4) se han ensamblado previamente en plásmidos pUPD2. Debido al diseño de este plásmido, las partes ensambladas en él quedan adaptadas a la sintaxis de ensamblaje *GoldenBraid* y están listas para combinarse.

Tabla 3.4: Partes básicas adaptadas a la sintaxis de *GoldenBraid*.

Nombre	Tipo	Descripción	Fuente
J23106	Promotor	Promotor constitutivo	BBa_K2656004
PLux	Promotor	Promotor inducible: Regulado por LuxR en presencia de AHL	BBa_K2656003
P20_992	Promotor	Promotor inducible: Regulado de manera positiva por acción de σ_{20} . También denominado P20_922.	Rhodium y col. 2013
PLuxR	Promotor	Promotor inducible: Regulado negativamente por LuxR en presencia de AHL	BBa_K199052
B0030	RBS	RBS fuerte	BBa_K2656009
GFPmut3b	CDS	Proteína fluorescente verde	BBa_K2656022
GFP-lva	CDS	Proteína fluorescente verde con degradación acelerada	BBa_K082003
LuxR	CDS	Proteína LuxR	BBa_K2656016
S20_992	CDS	Cofactor σ_{20} de la ARNp	Rhodium y col. 2013
AS20_992	CDS	Factor Anti- σ_{20}	Rhodium y col. 2013
mRFP-lva	CDS	Proteína fluorescente roja con degradación acelerada	BBa_K2656026
mRFP	CDS	Proteína fluorescente roja	BBa_E0010
B0015	Terminator	Terminador transcripcional doble	BBa_K2656026

Cuando se realiza un ensamblaje se necesitan dos partes: vector e inserto. El **inserto** es la parte o partes que nos interesa ensamblar ya que posee una función especial en el futuro plásmido. El **vector** dotará al futuro plásmido de un nivel en la jerarquía de *GoldenBraid* además de una resistencia dada. Los vectores utilizados (Tabla 3.5) tienen además de un gen selector, una resistencia a un antibiótico determinado. El gen selector tiene la función de informar mediante color rojo de que el ensamblaje no ha surgido satisfactoriamente. Esto es debido a que durante la reacción de ensamblaje el inserto ocupará el lugar que ocupa el gen selector en el vector, de manera que si no surgiera satisfactoriamente, el gen selector seguiría en el vector de destino y las colonias resultantes de la electroporación serían de color rojo, por tanto quedarían descartadas.

Para ensamblar una TU a partir de *bioparts* de la Tabla (3.4) se debe escoger un vector de destino de nivel 1 que son los denominados pARK $\alpha 1$ y pARK $\alpha 2$ y realizar la reacción de ensamblaje *GoldenBraid* con los componentes y cantidades que se detallan en la Tabla (3.6) y con las condiciones que se detallan en la Tabla (3.7). De la misma manera, la metodología de ensamblaje *GoldenBraid* permite unir dos insertos que se encuentren en plásmidos de nivel 1 en un vector de nivel 2 siempre y cuando un inserto provenga de un pARK número 1 y otro de un pARK número 2, de ahí el concepto de ensamblaje binario. Esta estrategia se extiende de la misma manera a los de nivel 3 que son los mismos vectores pARK anteriores y las de nivel 4 que serían los mismos vectores pRMS de nivel 2. Así, se genera un ciclo donde podemos combinar insertos de niveles más bajos en vectores niveles más altos de forma indefinida, incrementando cada vez más el tamaño del circuito sintético.

Tabla 3.5: Vectores de destino utilizados en este trabajo.

Nombre	Nivel	Resistencia a antibiótico	Gen selector	Fuente
pARK $\alpha 1$	1	Kanamicina	RFP	Gutiérrez 2019
pARK $\alpha 2$	1	Kanamicina	RFP	Gutiérrez 2019
pRMS $\Omega 1$	2	Espectinomicina	RFP	Gutiérrez 2019
pRMS $\Omega 2$	2	Espectinomicina	RFP	Gutiérrez 2019
pARK $\alpha 1$	3	Kanamicina	RFP	Gutiérrez 2019
pARK $\alpha 2$	3	Kanamicina	RFP	Gutiérrez 2019
pRMS $\Omega 1$	4	Espectinomicina	RFP	Gutiérrez 2019
pRMS $\Omega 2$	4	Espectinomicina	RFP	Gutiérrez 2019

Tabla 3.6: Componentes de una reacción de *GoldenBraid*. Se utilizará la enzima BsaI cuando el vector de destino sea de tipo α . De la misma manera se utilizará la enzima BsmBI cuando el vector de destino sea un Ω .

Componente	Volumen (μL)
Ezima de restricción IIS (BsaI o BsmBI)	1
T4 DNA ligase	1
T4 DNA ligase buffer 10x	1.5
BSA 10x	1.5
DNA	75 ng de cada plásmido
ddH ₂ O	hasta 15 μL
Total	15

Tabla 3.7: Condiciones para llevar a cabo una reacción de *GoldenBraid*.

Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tiempo (min)	Número de ciclos
37	10	1
37	3	25
16	4	
50	10	1
80	10	1

Todos los plásmidos ensamblados, se introdujeron mediante electroporación en bacterias *E. coli* de cepa 10G[®] electrocompetentes y se verificó mediante PCR de colonia y mediante secuenciación que el plásmido introducido era el correcto.

3.2.2 Transformación

Objetivo: Insertar un plásmido de interés en una bacteria.

Todas las transformaciones se realizaron por electroporación utilizando *E. coli* 10G[®] electrocompetentes (Lucigen). Para transformar bacterias por electroporación, debemos enfriar una alícuota de 50 μ L células electrocompetentes a -80 °C en hielo y añadir de 1 a 5 mL de plásmido resultante de un ensamblaje. Homogeneizar y colocar las células en una cubeta de electroporación fría y seca. Colocar la cubeta en el electroporador y electroporar las cubetas con 1700V. En lo que sigue, extraer la cubeta del electroporador y añadir 700 mL de medio de supervivencia SOC a la cubeta. Colocar el contenido de la cubeta en un tubo de cultivo e incubar a 37° C y 250 rpm durante 1 hora. Por último, cultivar en medio sólido con el antibiótico adecuado e incubar durante la noche a una temperatura de 37 °C.

3.2.3 PCR de colonias o cPCR

Objetivo: Amplificar una región de interés del bacteriano de una colonia que ha crecido en un medio de cultivo.

Para hacer una cPCR, el primer paso es seleccionar una colonia aislada en un cultivo (normalmente de tipo sólido) e introducirla en 50 mL de agua desionizada estéril. Todas las cPCRs realizadas para este trabajo se llevaron a cabo con un kit denominado *Taq DNA polymerase kit with Standard Taq buffer* (New England Biolabs). La composición de una cPCR se encuentra en la Tabla 3.8 y las condiciones utilizadas para realizar la cPCR se encuentran en la Tabla (3.9). Los cebadores utilizados para cada uno de los cPCR realizados son VerTUDir y VerTUrev que están diseñados para unirse a los vectores pARK y pRMSO comentados anteriormente en la Tabla (3.5). Con estos cebadores se amplifica la región en la que se encuentra el inserto de los vectores de destino de *GoldenBraid*.

El proceso siguiente a una PCR de colonias es realizar un gel de electroforesis para correr las muestras y poder identificarlas según el tamaño de los insertos amplificados.

Tabla 3.8: Componentes para una PCR de colonias.

Componente	Volumen (μ l)
10x Standard Taq buffer	2
10 mM dNTPs	2
Cebador Directo 10 μ M	0.4
Cebador Reverso 10 μ M	0.4
Taq DNA polymerase	0.1
Colonia inoculada en agua	5
ddH ₂ O	10.1
Volumen total	20

Tabla 3.9: Condiciones para realizar una PCR de colonias.

Nombre	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	2 min	1
Desnaturalización	95°C	20 sec	30
Alineamiento	56°C	1 min	
Extensión	68°C	1 min/kb	
Extensión final	68°C	5 min	1

3.2.4 *Electroforesis en gel de agarosa*

Objetivo Separar muestras de DNA por tamaño.

Para preparar 80 mL de gel a una porosidad del 1% es necesario juntar en un matraz erlenmeyer 0,8 gramos de agarosa con 80 mL de buffer SB. Introducir a continuación el matraz en el microondas y llevar a ebullición. Cuando el gel se vuelva cristalino, sacarlo del microondas y dejarlo enfriar hasta los 50 °C. Luego, colocar el gel en la cubeta de electroforesis con los peines adecuados y dejar reposar hasta que adquiera consistencia de gel. Una vez listo cargar las muestras en el gel utilizando Loading Dye Purple (6X) (New England Biolabs) y O'GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Fisher Scientific). Correr el gel al voltaje deseado y visualizar en un transiluminador UV.

3.2.5 *Cultivos celulares*

Objetivo: Proveer a las células de interés un medio nutritivo y selectivo donde crecer.

Podemos diferenciar según su estado, dos tipos de medios de cultivo utilizados en este trabajo: medios de cultivo líquidos y medios de cultivo sólidos.

■ Medios de cultivo líquidos

● **LB Broth**

Para preparar este medio de cultivo, añadir 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 5 g de NaCl y 1 L de agua destilada a una botella. Homogeneizar y esterilizar en autoclave. Dejar enfriar. Para hacer el medio LB selectivo, añadir tantos μL de solución antibiótica 1000x.

● ***Super optimal broth with catabolite repression (SOC)***

Para preparar este medio de cultivo, el primer paso es preparar SOB. Para preparar SOB, añadir 20 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 2 mL de 5M NaCl, 2.5 mL de 1M KCl, 10 mL de 1M MgCl₂, 10 mL de 1M MgSO₄ en una botella. Ajustar a 1 L con agua destilada, homogeneizar y esterilizar en autoclave. Para hacer SOC con SOB, deje que SOB enfríe y, en condiciones asépticas, añada 20 mL de glucosa 1M esterilizada.

● **M9 minimal media**

Para preparar M9, disolver 12.5 g de M9 Medium Broth Powder (VWR Amresco Life Science) en 1 L de agua destilada y desionizada. Homogeneizar y esterilizar en autoclave.

ve. Dejar enfriar y, en condiciones asépticas, añadir 2 mL de 1M MgSO₄ esterilizado, 10 mL de glucosa esterilizada al 20 % y 0,1 mL de 1M CaCl₂ esterilizado. Si se usa con bacterias con un plásmido que da resistencia a un antibiótico, agregar 1 mL de solución madre de 1000x de ese antibiótico.

■ Medios de cultivo sólidos

● Medio de cultivo en placa petri

Todos los cultivos en placas de Petri se realizaron con LB (Lennox) y agar como medio de cultivo. Adicionalmente, para hacerlos selectivos se utilizaron soluciones madre de 1000x de los diferentes antibióticos utilizados.

Para hacer este medio de cultivo, añadir 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 5 g de NaCl, 20 g de Agar-agar y 1 L de agua destilada a una botella. Homogeneizar y esterilizar en autoclave. Dejar enfriar y añadir 1 mL 1000x solución antibiótica. Finalmente, en condiciones asépticas, extender 25 mL del contenido de la botella en cada placa petri. Dejar reposar hasta que el medio gelifique.

3.2.6 *Glicerinado bacteriano*

Objetivo: Almacenar bacterias en un medio seguro y que las proteja de las temperaturas inferiores a 0 °C. Así, conseguimos almacenar dentro de ellas un plásmido de interés.

Añadir 1440 µL de cultivo bacteriano de interés que haya estado creciendo durante la noche y 360 de glicerol al 80 % en un criovial, manteniendo siempre condiciones de esterilidad. Homogeneizar la mezcla y almacenar a -80°C.

3.2.7 *Extracción de plásmido: miniprep*

Objetivo: Extraer un plásmido de interés de un cultivo bacteriano.

Todas las purificaciones de plásmidos se realizaron utilizando el *QIAprep Spin Miniprep Kit* (Qiagen). Para utilizar este kit, se parte de un cultivo bacteriano que posee un plásmido de interés y que haya crecido durante la noche en LB. Los cultivos se colocan en tubos de microcentrífuga donde las células son aisladas del medio de cultivo y luego son lisadas. Tras la lisis de las células se clarifica el contenido gracias a una columna de afinidad que consigue contener el plásmido de interés. Finalmente se eluye el ADN con tampón de elución quedando el plásmido aislado.

3.2.8 *Materiales*

En cuanto a materiales de laboratorio podemos establecer una separación entre materiales físicos (máquinas, materiales de laboratorio...) y software.

Físicos

Los materiales que se requieren en el laboratorio a nivel físico son numerosos y muchos de ellos se encuentran fácilmente en laboratorios de biología molecular ya sea microbiana, de plantas o animal. Es por ello que nos limitaremos a nombrar en la Tabla (3.10) sólo aquellos que son imprescindibles para la realización de este trabajo de manera completa.

Software

Tabla 3.10: Especificaciones del equipo hardware para la simulación de los modelos.

Intrumental	Modelo utilizado
Lector multi-modo de imágenes celulares	Biotek Cytation™ 3
Incubadora	Memert™ IN 110
Capana de flujo clase 10 ISO 14644-1	TDI™ EuroAire
Termocicladora	Techne™ Primer thermal cycler
Espectrofotómetro	Zuzi™ 4101
Incubadora orbital	Stuart® S1500
Congelador (-80°C)	Fryka Kältetechnik™
Electroporador	Eppendorf® Eporator
Sistema de electroforesis	OWL EasyCast® B1

Para el ensamblaje digital de los plásmidos se ha utilizado la herramienta **Benchling®**. Es un software en la nube que permite generar y editar secuencias digitales de ADN, diseñar y ejecutar experimentos de manera virtual, analizar datos como resultados de secuenciaciones y compartir los diseños y trabajos con otros investigadores.

Para la generación de los plásmidos se ha utilizado una nomenclatura especial que indica el nombre del creador, el nivel de *GoldenBraid* del plásmido, el antibiótico que posee y el número identificador. De esta manera los plásmidos tienen la siguiente estructura: pXX₁X₂XX₃X₄.

- XX₁: Inicial del nombre del creador e inicial del apellido del creador.
- X₂: Inicial del antibiótico que posee el plásmido (C para Cloramfenicol, K para Kanamicina y S para Espectinomicina).
- XX₃: Nivel y número de nivel de *GoldenBraid* del plásmido (α s A1 y A2, ω s O1 y O2).
- X₄: Número identificativo de la serie.

Así pues, un plásmido creado por Roger Monfort, que sea de nivel α 2, que tenga resistencia a Kanamicina y que sea el tercero de esa serie que se construye se denominará pRMKA23.

su

Resultados y discusión

En este capítulo se presentarán e interpretarán los resultados obtenidos en las etapas de diseño y de construcción. En primer lugar, se expondrán los modelos de los dos controladores antitéticos PI planteados, así como los resultados obtenidos de su análisis. En segundo lugar, se describirán los plásmidos generados para la construcción de ambos circuitos genéticos.

4.1 Diseño

En esta sección se presentan las dos topologías de controlador antitético propuestas: **Activador Anti- σ_{20}** (CA-A σ_{20}) y **Represor σ_{20}** (CA-R σ_{20}). Adicionalmente se expondrán las razones por las que se ha seleccionado el subgrupo de ECF número 20 para realizarlas.

4.1.1 Subgrupo ECF20_992

En la elección de las *bioparts* pertenecientes al subgrupo de Factores extracitoplasmáticos ECF20_992 se ha tenido en cuenta atendiendo a cuatro factores que podrían afectar a la implementación matemática y biológica del controlador antitético. Los cuatro factores son:

1. Existencia de valores de parámetros

Para implementar el modelo matemático del circuito antitético utilizando las *bioparts* del subgrupo ECF es necesario medir ciertos parámetros como tasas de transcripción, traducción o degradación de proteínas. La Tabla (4.1) enumera alguno de estos parámetros que han sido tomados de la literatura, y que permiten describir las reacciones bioquímicas que se producen con estas *bioparts*.

Tabla 4.1: Parámetros asociados al grupo ECF20_992 según Aoki y col. 2019

Parámetro	Descripción	Valor	unidades
$K_{d\sigma}$	Tasa de disociación con el promotor P_{20}	3000	moléculas
n_{σ}	Coefficiente de Hill el promotor P_{20}	2	adimensional
$K_{b\sigma}$	Ratio de unión de σ_{20} con anti- σ_{20}	0.018	$\text{min}^{-1} \text{moléculas}^{-1}$
$K_{u\sigma}$	Ratio de separación de σ_{20} con anti- σ_{20}	0.00018	min^{-1}

2. Baja toxicidad

La toxicidad en las *bioparts* ECF proviene de la sobreexpresión de ciertos componentes celulares que dan lugar a un crecimiento desequilibrado, que acaba provocando la lisis celular (Nitta y col. 2000). Así como el subgrupo ECF02_2817 es el que presenta más toxicidad, el ECF20_992 y ECF34_1384 son los que menos toxicidad tienen.

3. Alta ortogonalidad

Tal y como se muestra en la Figura (4.1), junto al ECF11_3726, el ECF20_992 es el que menos *crossstalk* entre subgrupos ECF ofrece. Es decir, que sus componentes no interaccionan con otros componentes de subgrupos que no sean el suyo propio.

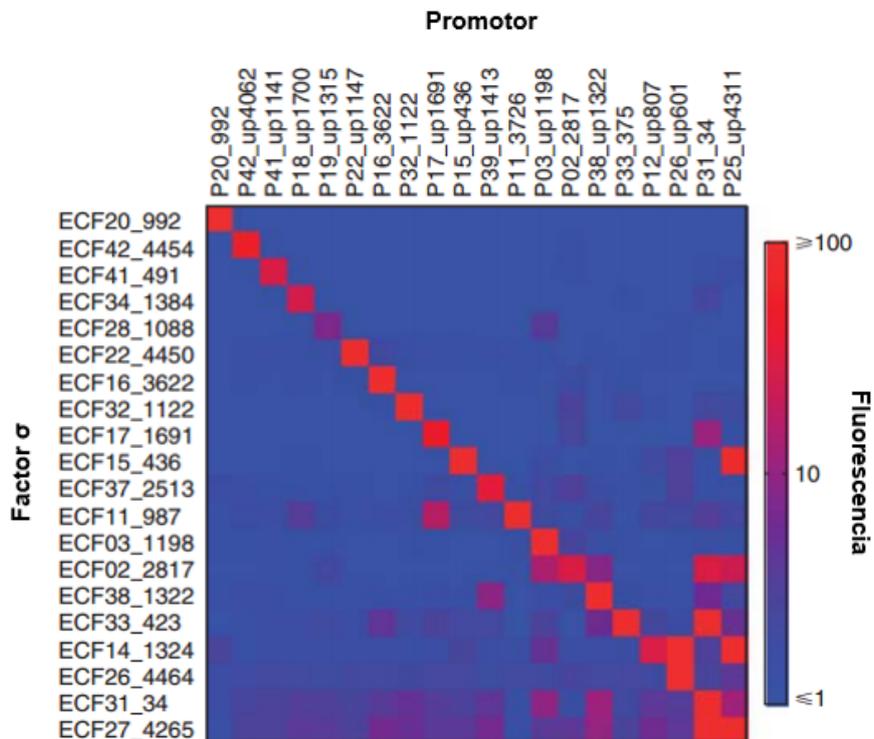


Figura 4.1: Ortogonalidad de los 20 subgrupos σ más ortogonales. Los 20 subgrupos ECF más ortogonales son probados de manera independientemente en un circuito sintético donde la producción del factor σ está controlada por inducción de Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) de manera directamente proporcional. El cofactor σ generado, induce la formación de una proteína fluorescente verde (GFP) que es medida por citometría de flujo. La actividad de los promotores σ es calculada como la fluorescencia medida por citometría de flujo, dividida entre el valor de la actividad basal del promotor. Imagen tomada de (Rhodius y col. 2013).

4. Nula alteración de la expresión génica

Los estudios de Rhodius y col. (Figura 4.2), muestran que el subgrupo ECF20_992 no presenta alteración en la expresión génica del microorganismo en el que se introduce.

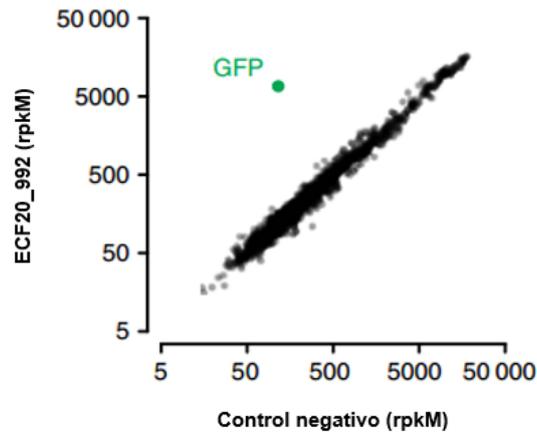


Figura 4.2: La sobreexpresión del subgrupo ECF20.992 tiene efectos mínimos en el genoma del huésped. El subgrupo ECF20.992 se induce con 20 mM de Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) con el circuito detallado anteriormente en la descripción de la Figura (4.1) y la transcripción de todo el ADN de la bacteria se mide mediante secuenciación del mARN. Nótese la producción de GFP en el gráfico como la única expresión génica producida por el circuito sintético que incluye el subgrupo ECF20.992. Las unidades son rpKM o *reads per kilo base per million mapped reads*. El control negativo carece del circuito detallado anteriormente y por tanto no presenta dicha actividad. Figura tomada de (Rhodius y col. 2013).

4.1.2 Controlador antitético Activador Anti- σ_{20} (CA- $A\sigma_{20}$)

A continuación describiremos la topología del controlador antitético denominado Activador Anti- σ_{20} , así como sus reacciones bioquímicas y modelado matemático. Finalmente se presentan las simulaciones obtenidas, comentando los aspectos más relevantes.

Topología del CA- $A\sigma_{20}$

En la figura (4.3) se muestra la topología del CA- $A\sigma_{20}$ que consta de 3 TU y donde la proteína de interés es la GFP. Para visualizar mejor las diferentes partes del sistema está la Figura (4.3), que muestra en diferentes colores donde se encuentra el controlador y el lazo cerrado del sistema.

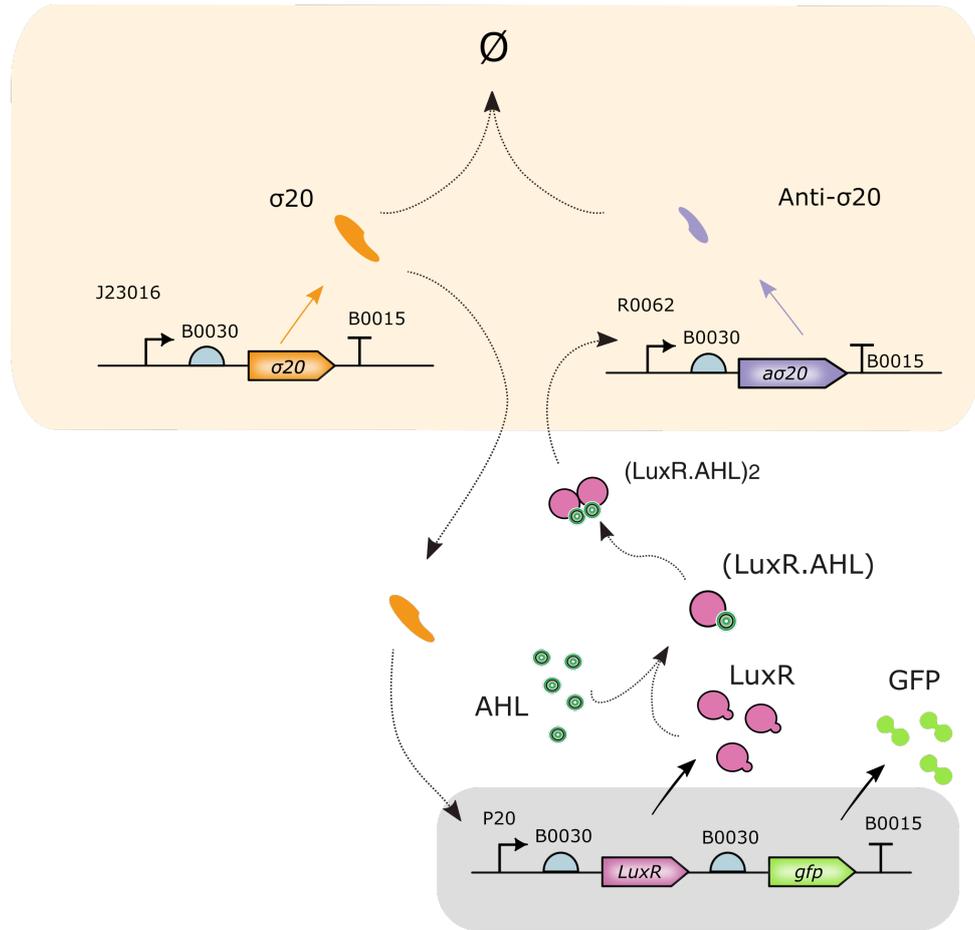
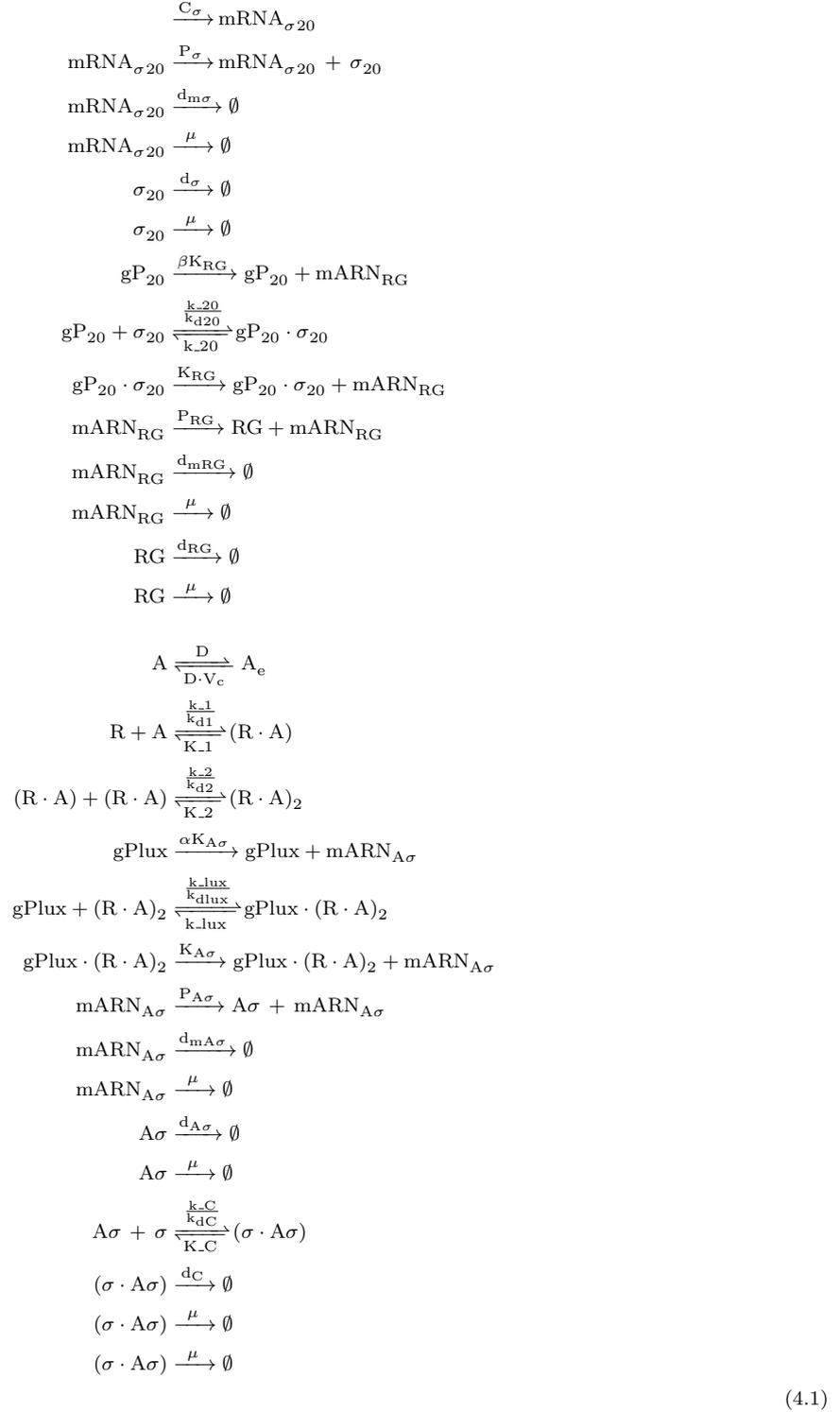


Figura 4.3: Topología del CA- $A\sigma_{20}$ El cofactor σ_{20} se transcribe de manera constitutiva gracias al promotor constitutivo J23106. Al unirse a la ARNp, esta se ve atraída hacia sitios de unión específicos en el promotor P_{20} . Al unirse, la producción de LuxR y GFP se incrementa de la misma manera pues están gobernadas por un mismo promotor y un mismo RBS por tanto podemos asumir que se co-expresan. La inducción por AHL genera la formación de dímeros $(R \cdot A)_2$ que actúan como factores de transcripción activadores del promotor P_{lux} (R0062) generando de esta manera una mayor cantidad de Anti- σ_{20} . La unión de σ_{20} y Anti- σ_{20} disminuye la cantidad de σ_{20} en el medio y por tanto la producción de los genes dependientes del promotor P_{20} . En color gris se denota la estrategia de *realimentación*. El circuito sintético estará en lazo abierto cuando no haya AHL en el medio, mientras que cuando haya presencia de este, la salida será sensada por la TU que contiene al Anti- σ_{20} gracias a la producción de dímero $(R \cdot A)_2$, de esta manera, somos capaces de cerrar el lazo. Por otro lado, la acción integral aquí sombreada en beige se produce en la aniquilación mutua de las especies σ_{20} y Anti- σ_{20} .

Reacciones bioquímicas del CA- $A\sigma_{20}$

Teniendo en cuenta la topología del controlador CA- $A\sigma_{20}$ (Figura (4.3) podemos establecer las siguientes ecuaciones bioquímicas concorde a la metodología descrita en el capítulo tercero sección tercera de Materiales y métodos. Debemos tener en cuenta que se ha asumido co-expresión de las proteínas luxR y GFP y que por tanto forman una única especie bioquímica (RG). Además la difusión de AHL se ha expresado como una pseudo-reacción donde se realiza un intercambio de moléculas siguiendo la Ley de Fick. Más tarde, en el modelo (4.2) se tendrán en cuenta tanto el volumen celular como el número de células para realizar el cálculo.



Modelado determinista del CA-A σ_{20}

Aplicando la Ley de acción de masas sobre las reacciones bioquímicas en (4.1) obtenemos el modelo (4.2) que cuenta con 17 estados que representan las 17 especies bioquímicas. Adicionalmente en la Tabla (4.2) se renombra cada uno de los estados.

Tabla 4.2: Especies bioquímicas para el modelo matemático determinista y su símbolo asociado.

Símbolo	Especie bioquímica	Símbolo	Especie bioquímica
x_1	Cofactor σ_{20}	x_{10}	mARN $_{\sigma_{20}}$
x_2	Factor Anti- σ_{20}	x_{11}	Promotor libre P $_{20}$
x_3	LuxR	x_{12}	Promotor P $_{20}$ ocupado por σ_{20}
x_4	Dímero $(R \cdot A)_2$	x_{13}	Promotor libre P $_{\text{luxR}}$
x_5	Complejo $(\sigma \cdot A\sigma)$	x_{14}	Promotor P $_{\text{luxR}}$ ocupado por Dímero $(R \cdot A)_2$
x_6	AHL intracelular	x_{15}	mARN $_{A\sigma}$
x_7	GFP	x_{16}	mARN $_{\text{RG}}$
x_8	Monómero $(R \cdot A)$	x_{17}	RG
x_9	AHL extracelular		

En las reacciones bioquímicas de (4.1), la constante V_c es el ratio entre el volumen externo típico de una célula que es de aproximadamente $1.1 \cdot 10^{-15} \mu\text{l}$, y el volumen externo normal en un sistema de microfluídica, en este caso $1 \cdot 10^{-9} \mu\text{l}$. Se ha asumido que el dímero $(R \cdot A)_2$ es una unión estable y por tanto se puede eliminar el término de degradación asociado.

$$\begin{aligned}
\dot{x}_1 &= P_\sigma x_{10} + k_{-20}x_{12} - \frac{k_{-20}}{k_{d20}}x_{11}x_1 - \frac{k_{-c}}{k_{dc}}x_1x_2 + k_{-c}x_5 - (d_\sigma + \mu)x_1 \\
\dot{x}_2 &= P_{A\sigma}x_{15} - \frac{k_{-c}}{k_{dc}}x_1x_2 + k_{-c}x_5 - (d_{A\sigma} + \mu)x_2 \\
\dot{x}_3 &= P_{RG}x_{16} + k_{-1}x_8 - \frac{k_{-1}}{k_{d1}}x_3x_6 - (d_{RG} + \mu)x_{17} - k_1x_3x_6 + k_{-1}x_8 \\
\dot{x}_4 &= \frac{k_{-2}}{k_{d2}}x_8^2 - k_{-2}x_4 + k_{-lux}x_{14} - \frac{k_{-lux}}{k_{dlux}}x_{13}x_4 - \mu x_4 \\
\dot{x}_5 &= \frac{k_{-c}}{k_{dc}}x_1x_2 - k_{-c}x_5 - (d_c + \mu)x_5 \\
\dot{x}_6 &= k_{-1}x_8 - \frac{k_{-1}}{k_{d1}}x_3x_6 + D(V_c x_9 - x_6) - (d_A + \mu)x_6 \\
\dot{x}_7 &= P_{RG}x_{16} - k_{-1}x_8 - \frac{k_{-1}}{k_{d1}}x_3x_6 - (d_{RG} + \mu)x_{17} \\
\dot{x}_8 &= \frac{k_{-1}}{k_{d1}}x_3x_6 - k_{-1}x_8 - 2\frac{k_{-2}}{k_{d2}}x_8^2 + 2k_{-2}x_4 - (d_{RA} + \mu)x_8 \\
\dot{x}_9 &= D \left(-NV_c x_9 + \sum_{i=1}^N x_6 \right) - (d_{Ae})x_9 \\
\dot{x}_{10} &= C_\sigma - (d_{m\sigma 20} + \mu)x_{10} \\
\dot{x}_{11} &= k_{-20}x_{12} - \frac{k_{-20}}{k_{d20}}x_{11}x_1 \\
\dot{x}_{12} &= \frac{k_{-20}}{k_{d20}}x_{11}x_1 - k_{-20}x_{12} \\
\dot{x}_{13} &= k_{-lux}x_{14} - \frac{k_{-lux}}{k_{dlux}}x_{13}x_4 \\
\dot{x}_{14} &= -k_{-lux}x_{14} + \frac{k_{-lux}}{k_{dlux}}x_{13}x_4 \\
\dot{x}_{15} &= \alpha k_{A\sigma}x_{13} + k_{A\sigma}x_{14} - (d_{mA\sigma} + \mu)x_{15} \\
\dot{x}_{16} &= \beta k_{RG}x_{11} + k_{RG}x_{12} - (d_{mRG} + \mu)x_{16} \\
\dot{x}_{17} &= P_{RG}x_{16} + P_1x_8 - \frac{k_1}{k_{d1}}x_3x_6 - (d_{RG} + \mu)x_{17}
\end{aligned} \tag{4.2}$$

Como puede observarse, el modelo EDO (4.2) está sobreparametrizado y posee especies que no son medibles en el laboratorio (gP₂₀ y las especies de mARN). Además, su simulación es costosa en tiempo si tenemos en cuenta que el modelo (4.2) representa la dinámica en cada una de las células que forman parte de la población. Así pues, es necesario realizar una **reducción** del modelo tal y como se comentó en el Capítulo tercero, Sección tercera.

La primera asunción para la reducción concierne a los **invariantes del sistema**. Podemos asumir que la cantidad de plásmido en la célula se mantiene constante. Por lo tanto, la cantidad de promotores libres y ocupados es constante e igual al número de plásmidos existentes en la célula, denominado como P_N. Esto se traduce en que la suma de la variación temporal de los promotores libres y ocupados sea nula (4.3).

$$\begin{aligned}
\dot{x}_{11} + \dot{x}_{12} &\approx 0 \\
\dot{x}_{13} + \dot{x}_{14} &\approx 0
\end{aligned} \tag{4.3}$$

Integrando a ambos lados obtenemos que la suma de plásmidos libre y ocupados en la célula es constante. Denominaremos a esta constante como P_N (4.4).

$$\begin{aligned}x_{11} + x_{12} &= P_N \\x_{13} + x_{14} &= P_N\end{aligned}\tag{4.4}$$

La segunda aproximación se basa en asumir que la unión y separación de la ARN_p a los promotores P_{20} y $P_{A\sigma}$ es más rápida que la transcripción y degradación de mARN y por tanto puede asumirse como un estado cuasi estático. De esta manera, aplicando la **Aproximación Cuasi-estacionaria (QSSA)** a las especies x_{11} , x_{12} , x_{13} y x_{14} (4.5) y dividiendo a ambos lados por la tasa de unión de la ARN_p con cada uno de los promotores para así hacer aparecer la constante de unión de cada uno de los promotores (k_{d20} y k_{lux}). Estos se hace porque es más fácil encontrar esta constante en la bibliografía que las tasas de unión y separación, ya que el cálculo de estas últimas resulta complicado.

$$\begin{aligned}\frac{1}{k_{20}}x_{11} &\approx 0 \\ \frac{1}{k_{20}}x_{12} &\approx 0 \\ \frac{1}{k_{lux}}x_{13} &\approx 0 \\ \frac{1}{k_{lux}}x_{14} &\approx 0\end{aligned}\tag{4.5}$$

Sustituyendo las variables despejadas en (4.5) en las ecuaciones de los invariantes (4.4) obtenemos las siguientes expresiones:

$$\begin{aligned}x_{11} &= P_N \left(\frac{k_{d20}}{k_{d20} + x_1} \right) \\ x_{12} &= P_N \left(\frac{x_1}{k_{d20} + x_1} \right) \\ x_{13} &= P_N \left(\frac{k_{dlux}}{k_{dlux} + x_4} \right) \\ x_{14} &= P_N \left(\frac{x_4}{k_{dlux} + x_4} \right)\end{aligned}\tag{4.6}$$

Estas expresiones corresponden a funciones de **Hill** que son comunes en aquellos procesos donde hay unión de ligandos (Hill 1910). En general, una función de Hill de un promotor activador tiende a 1 cuando la cantidad de activador es alta y a 0 en caso contrario. Cuando nos encontramos con un promotor de tipo represor esta regla se invierte, tenderá a uno cuanto más baja sea la concentración de ligando. Así pues mediante el uso de funciones de **Hill** conseguimos modelar el comportamiento de los promotores P_{20} y P_{lux} .

La última aproximación cuasi-estática que podemos tomar es que la transcripción de mARN para las especies σ_{20} , Anti- σ_{20} y RG es mucho más rápida que la de las proteínas. De este modo y aplicando QSSA a dichas especies bioquímicas (x_{10} , x_{15} y x_{16}) tenemos que su variación temporal es nula (4.7):

$$\begin{aligned} \dot{x}_{10} &\approx 0 \\ \dot{x}_{15} &\approx 0 \\ \dot{x}_{16} &\approx 0 \end{aligned} \tag{4.7}$$

Despejando las especies de (4.7) obtenemos:

$$\begin{aligned} x_{10} &= \left(\frac{C_\sigma}{k_{m\sigma 20} + \mu} \right) \\ x_{15} &= \left(\frac{\alpha k_{A\sigma} x_{13} + k_{A\sigma} x_{14}}{d_{mA\sigma} + \mu} \right) \\ x_{16} &= \left(\frac{\beta k_{RG} x_{11} + k_{RG} x_{12}}{d_{mRG} + \mu} \right) \end{aligned} \tag{4.8}$$

Finalmente, haciendo las sustituciones pertinentes en (4.6) y teniendo en cuenta las constantes de la Tabla (4.4) podemos obtener el modelo de ecuaciones diferenciales ordinarias de orden reducido (4.9). Las especies que tiene se enumeran en la Tabla (4.3).

Tabla 4.3: Especies del modelo reducido CA-AA σ_{20} .

Símbolo	Especie bioquímica
x_1	Cofactor σ_{20}
x_2	Factor Anti- σ_{20}
x_3	LuxR
x_4	Dímero (R·A) ₂
x_5	Complejo ($\sigma \cdot A\sigma$)
x_6	AHL intracelualr
x_7	GFP
x_8	Monómero (R·A)
x_9	AHL extracelular

Tabla 4.4: Parámetros del modelo ODE de CA-AA σ_{20} .

Parámetro	Descripción	Valor	Unidades	Referencia
Generales				
τ	Tiempo medio de división celular	30	min	Boada Acosta 2018
μ	Tasa de crecimiento	$\log(2)/\tau$	min^{-1}	Boada Acosta 2018
V_{cell}	Volumen celular de E.coli	1.1e-15	$\mu\text{l}/\text{cell}$	Bionumbers
V_{ext}	Volumen medio de un cultivo de microfluídica	1e-9	μl	Boada Acosta 2018
Cofactor σ_{20}				
ks	Ratio de transcripción	1.98	min^{-1}	Boada Acosta 2018
ps	Ratio de traducción	4.47	min^{-1}	Boada Acosta 2018
ds	Ratio de degradación de σ_{20}	0.003	min^{-1}	Burgess 2001
dms	Ratio de degradación de $mARN_{\sigma_{20}}$	0.213	min^{-1}	Boada Acosta 2018
kd20	Constante de disociación a promotor P_{20}	1000	moléculas	Annunziata y col. 2017
Factor Anti-σ_{20}				
ka	Ratio de transcripción	13.2	min^{-1}	Boada Acosta 2018
pa	Ratio de traducción	7.92	min^{-1}	Boada Acosta 2018
da	Ratio de degradación de $A\sigma_{20}$	0.003	min^{-1}	Boada Acosta 2018
dma	Ratio de degradación de $mARN_{\sigma_{20}}$	0.231	min^{-1}	Boada Acosta 2018
β	Expresión basal del promotor P_{lux}	0.01	Adimensional	Boada Acosta 2018
LuxR				
kR	Ratio de transcripción	3.9	min^{-1}	Boada Acosta 2018
pR	Ratio de traducción	2.34	min^{-1}	Boada Acosta 2018
dR	Ratio de degradación de σ_{20}	0.2	min^{-1}	Boada Acosta 2018
dmR	Ratio de degradación de $mARN_{luxR}$	0.231	min^{-1}	Boada Acosta 2018
β_1	Expresión basal del promotor P_{20}	0.01	Adimensional	Boada Acosta 2018
Dímero $(R \cdot A)_2$				
kd2	Constante de disociación	20	moléculas	Northrup y Erickson 1992
k _{.2}	Ratio de disociación	1	min^{-1}	Boada Acosta 2018
k2	Ratio de unión de AHL con luxR	$k_{.2}/kd2$	$\text{min}^{-1} \text{moleculas}^{-1}$	Boada Acosta 2018
kdlux	Constante de disociación de $(R \cdot A)_2$ con P_{20}	50	nM	Northrup y Erickson 1992
Complejo $(\sigma \cdot A\sigma)$				
kdc	Constante de disociación	0.01	moléculas	Annunziata y col. 2017
k _{.c}	Ratio de disociación	1.8e-4	min^{-1}	Annunziata y col. 2017
kc	Ratio de unión de σ_{20} con $A\sigma_{20}$	$k_{.c}/kdc$	$\text{min}^{-1} \text{moleculas}^{-1}$	Annunziata y col. 2017
dc	Ratio de degradación del complejo $(\sigma \cdot A\sigma)$	0.001	min^{-1}	Annunziata y col. 2017
AHL				
D	Ratio de difusión a través de la membrana	2	min^{-1}	Boada Acosta 2018
dA	Degradación AHL interno	0.004	min^{-1}	Bionumbers
dAe	Degradación del AHL externo	0.000418	min^{-1}	Horswill y col. 2007
GFP				
dG	Ratio de degradación	0.2	min^{-1}	Boada Acosta 2018

Modelo reducido:

$$\begin{aligned}
 \dot{x}_1 &= \frac{p_\sigma C_N k_{m\sigma}}{dm_\sigma + \mu} - \frac{k_{-c}}{k_{dc}} x_1 x_2 + k_{-c} x_5 - (d_\sigma + \mu) x_1 \\
 \dot{x}_2 &= \frac{p_{a\sigma} C_N k_{ma\sigma}}{dm_{a\sigma} + \mu} \left(\frac{\beta_0 k_{dlux} + x_4}{k_{dlux} + x_4} \right) - \frac{k_{-c}}{k_{dc}} x_1 x_2 + k_{-c} x_5 - (d_{a\sigma} + \mu) x_2 \\
 \dot{x}_3 &= \frac{p_R C_N k_{mR}}{dm_R + \mu} \left(\frac{\beta_1 k_{d20} + x_1^2}{k_{d20}^2 + x_1^2} \right) + k_{-1} x_8 - \frac{k_{-1}}{k_{d1}} x_3 x_6 - (d_R + \mu) x_3 \\
 \dot{x}_4 &= \frac{k_{-2}}{k_{d2}} x_8^2 - k_{-2} x_4 - \mu x_4 \\
 \dot{x}_5 &= \frac{k_{-c}}{k_{dc}} x_1 x_2 - k_{-c} x_5 - (d_c + \mu) x_5 \\
 \dot{x}_6 &= D (V_c x_9 - x_6) + k_{-1} x_8 - \frac{k_{-1}}{k_{d1}} x_3 x_6 - (d_A + \mu) x_6 \\
 \dot{x}_7 &= \frac{p_G C_N k_{mR}}{dm_R + \mu} \left(\frac{\beta_1 k_{d20} + x_1^2}{k_{d20}^2 + x_1^2} \right) - (d_G + \mu) x_7 \\
 \dot{x}_8 &= \frac{k_{-2}}{k_{d2}} x_8^2 - k_{-2} x_4 - \mu x_4 \\
 \dot{x}_9 &= D \left(-N V_c x_9 + \sum_{i=1}^N x_6 \right) - d_{A_e} x_9
 \end{aligned} \tag{4.9}$$

Simulaciones del CA-A σ_{20}

Para las simulaciones del modelo reducido (4.9) se han utilizado dos archivos y una función, los tres implementados en MATLAB[®]. Uno de los archivos es el ejecutable que genera **tres llamadas** al *solver* EDO23 para cargar los parámetros en otro archivo que los contendrá a todos y que será utilizado por el archivo función, que posee el modelo reducido. Las tres simulaciones (llamadas) parten de los mismos parámetros iniciales y condiciones iniciales presentados en la Tabla (4.5).

Tabla 4.5: Parámetros iniciales de la simulación

Variable	Descripción	Valor	Unidades
Ncell	Número de células a modelar	1	Células
Variance	Establece la variabilidad de los parámetros	0	adimensional
tfin	Tiempo de simulación hasta estado estacionario	150	min
Step	Paso de simulación	0.1	min
AbsTol	Tolerancia absoluta del ODE23	1×10^{-8}	adimensional
RelTol	Tolerancia relativa del ODE23	1×10^{-6}	adimensional
Initial	Vector con el valor inicial de todas las especies	0	moléculas

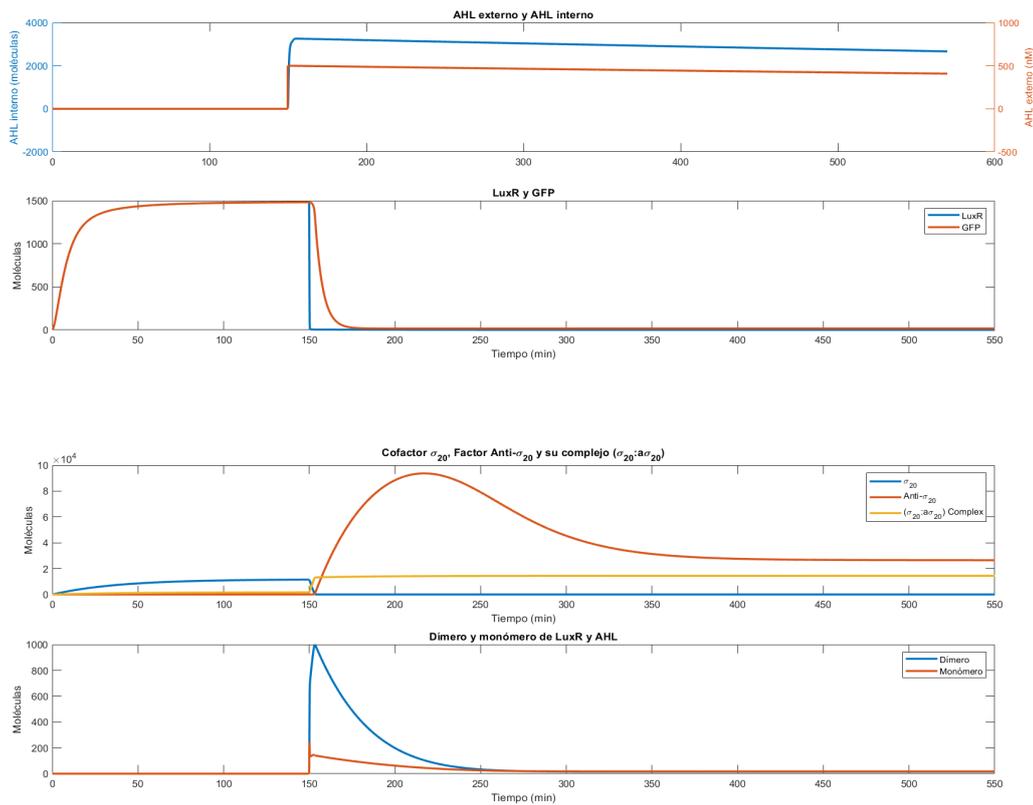


Figura 4.4: Primera llamada En esta primera llamada se simulan dos etapas. La **primera etapa** corresponde a una simulación de 150 minutos en las condiciones iniciales de la Tabla (4.5) hasta que se alcanzan valores estacionarios de las especies. Luego en una **segunda etapa**, se se simula durante 420 minutos hasta que alcanza el estado estacionario (donde se corta el gráfico) de nuevo pero con nuevas condiciones. En este caso se induce el sistema con 500 nM de AHL y se parte de los valores estacionarios de las especies anteriormente simuladas en la primera etapa.

En la **primera llamada** (Figura 4.4) del modelo reducido (4.9) se puede observar que a partir del minuto 150 todas las especies sufren cambios en su magnitud debido a la inducción con AHL extracelular e ese instante. Resaltamos algunos aspectos de cada una de las representaciones:

- **AHL extracelular y AHL intracelular:** En este caso tras un rápido ascenso de ambas especies en el minuto 150 por la inducción, ambas decrecen en el tiempo debido a que las moléculas de AHL interno se están consumiendo junto con LuxR para generar monómero ($R \cdot A$) y el subsecuente dímero ($(R \cdot A)_2$). El AHL extracelular, está difundándose hasta el interior de la célula intentando que las concentraciones a ambos lados de la membrana celular sean las mismas.
- **Cofactor σ_{20} , Anti- σ_{20} y su complejo ($\sigma_{20} \cdot A\sigma_{20}$):** Como era de esperar la inducción con AHL activa la transcripción de Anti- σ_{20} , gobernada por el promotor P_{lux} . En ese momento, la cantidad de σ_{20} que se produce de manera constante, decrece rápidamente al aniquilarse con Anti- σ_{20} y formar su complejo que crece poco debido a la poca cantidad de σ_{20} disponible.
- **LuxR y GFP:** La rápida disminución de cofactor σ_{20} disminuye a su vez la coproducción de LuxR y GFP pues están gobernados por el promotor P_{20} . Las dinámicas decrecen de

manera diferente porque así como la GFP simplemente se degrada con el tiempo y se diluye, la proteína LuxR se ve involucrada en otros procesos como la formación de monómero ($R \cdot A$) y dímero $(R \cdot A)_2$. Esto explica su rápida disminución tras la inducción con AHL.

- **Dímero y monómero de LuxR y AHL intracelular:** En este caso, la inducción con AHL provoca la generación del monómero ($R \cdot A$) el cual, al unirse entre ellos pasan a formar dímeros de $(R \cdot A)_2$.

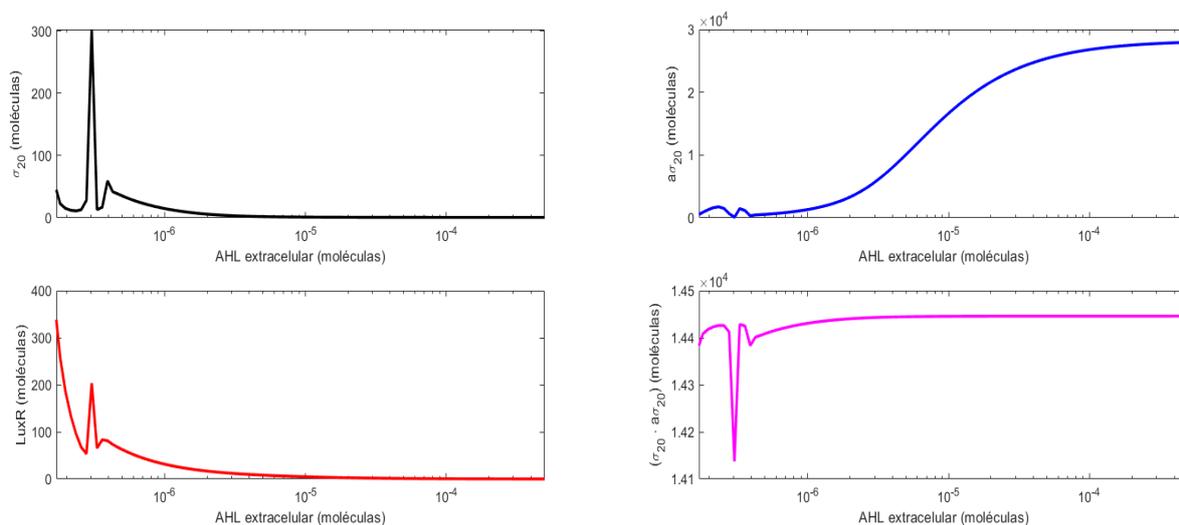


Figura 4.5: Segunda llamada Partiendo de las especies de la simulación anterior de 150 minutos, se realizan sucesivas simulaciones de 420 minutos cada una en las cuales se induce con un valor diferente de AHL cada vez mayor que viene dado por un vector equiespaciado logarítmicamente de 100 puntos que inicia su valor en 0 nM y finaliza en 5000 nM. Las gráficas de las especies se construyen con el valor en moléculas del último paso de cada simulación, donde se encuentran ya en estado estacionario.

La **segunda llamada** corresponde a la Figura (4.5). En este caso se ha estudiado el efecto de la magnitud de la inducción de AHL extracelular en las especies LuxR, σ_{20} , Anti- σ_{20} y complejo ($\sigma_{20} \cdot A\sigma_{20}$). Como puede observarse, todas las especies parecen mantener una relación directa o indirecta con la inducción de AHL y los valores estáticos de equilibrio. No obstante, cuando estas inducciones son bajas en magnitud parece haber un comportamiento no monótono. Para estudiar estos efectos se realiza una tercera llamada (Figura 4.6).

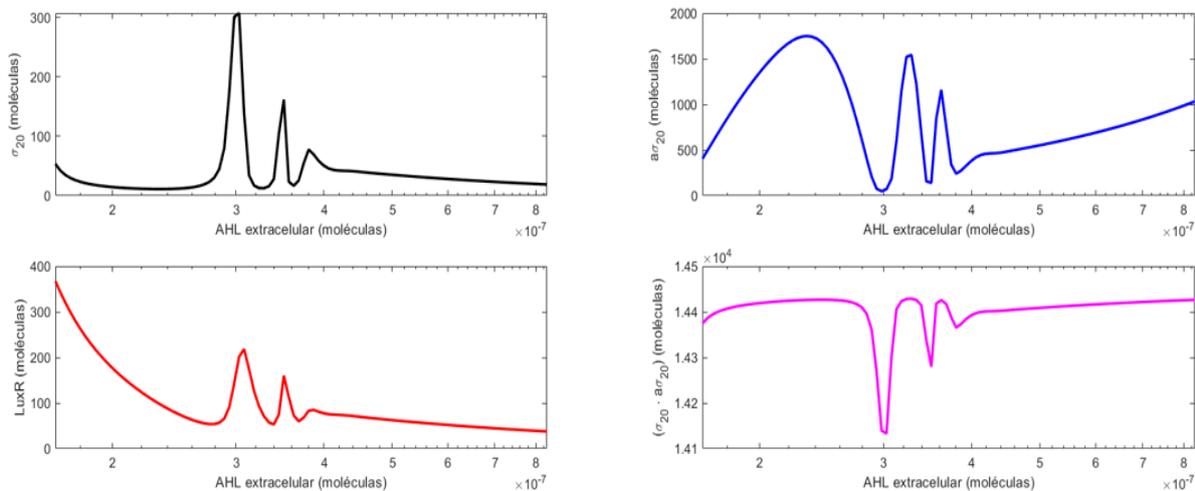


Figura 4.6: Tercera llamada Se ha realizado la misma estrategia que en la segunda llamada excepto que el vector equiespaciado logarímicamente de 100 puntos, inicia su valor en 0 nM y finaliza en 5 nM.

El objetivo de esta simulación es analizar los comportamientos no monótonos de las 4 especies a bajas inducciones de AHL extracelular. Como podemos observar, inducir con valores por debajo de $4e-7$ moléculas de AHL (equivalentes a 2.41 nM) provoca un comportamiento no monótono en el circuito sintético. Así pues para que cuando se lleve a cabo la inducción se produzcan cambios apreciables en las especies, es necesario sobrepasar dicho límite.

4.1.3 Controlador antitético Represor σ_{20} (CA-R σ_{20})

A continuación se describirá la topología del controlador antitético Represor σ_{20} , así como sus reacciones bioquímicas y modelado matemático determinista. Finalmente se mostrarán las simulaciones obtenidas y los resultados analizados.

Topología del CA-R σ_{20}

CA-R σ_{20} se diferencia del CA-A σ_{20} en los promotores que gobiernan la traducción de las proteínas σ_{20} y Anti- σ_{20} , puesto que son diferentes. En este caso y como se podrá observar en la Figura (4.7) la traducción de Anti- σ_{20} es constitutiva, mientras que la traducción de σ_{20} está gobernada por el promotor P_{LuxR} que es un promotor represor en presencia de dímero $(R \cdot A)_2$. Debido a estos leves cambios se considera innecesario volver a mostrar las reacciones bioquímicas de este controlador.

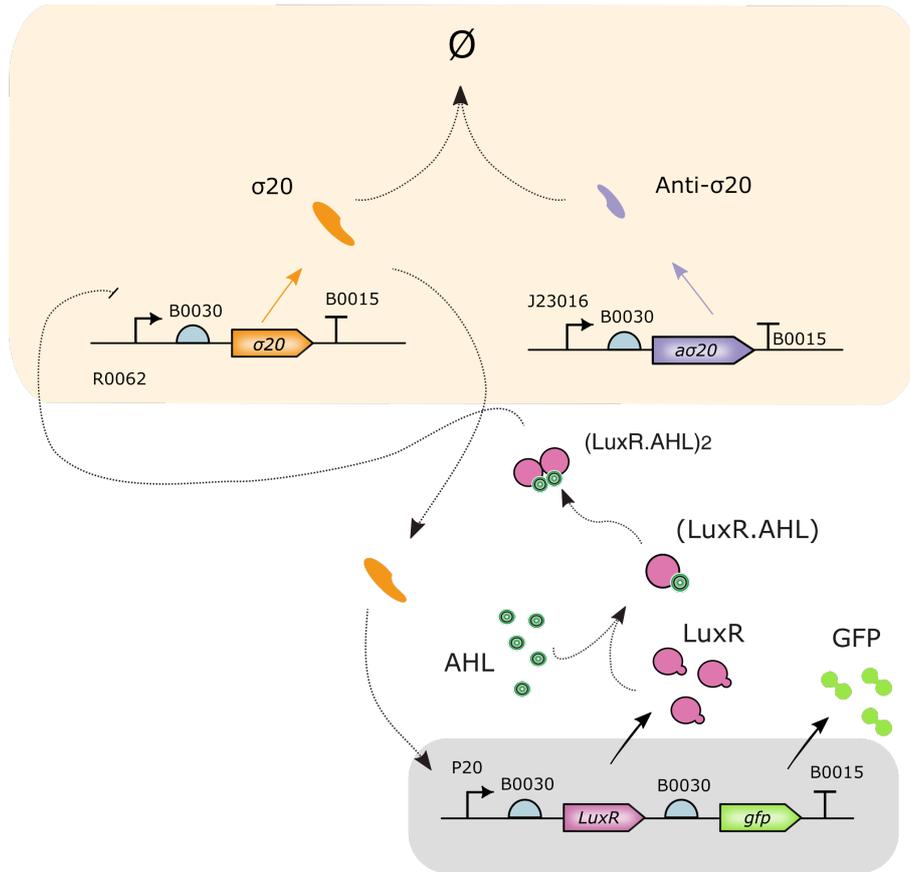


Figura 4.7: Topología del CA- $R\sigma_{20}$ En este circuito sintético, el cofactor σ_{20} se transcribe a una tasa basal marcada por el promotor represor P_{luxR} y que por tanto es la máxima que puede alcanzar cuando no existe inducción externa de AHL. Por otro lado, Anti- σ_{20} se transcribe de manera constitutiva. Las proteínas LuxR y GFP se producen a su máximo hasta que ocurre la inducción con AHL que activa la acción represora de P_{luxR} . De esta manera, se consigue reducir la cantidad de σ_{20} aún más que cuando sólo Anti- σ_{20} estaba formado complejo con esta. Por ende, la cantidad de LuxR y de GFP se reduce. Como se comentó anteriormente, existe una acción de control en la zona beige controlada por la aniquilación de σ_{20} con Anti- σ_{20} y realimentación negativa efectiva al inducir con AHL. La diferencia con CA- $A\sigma_{20}$ es que esta vez es σ_{20} el encargado de sensar la salida dirigida por $(R \cdot A)_2$ cuando se produce la inducción.

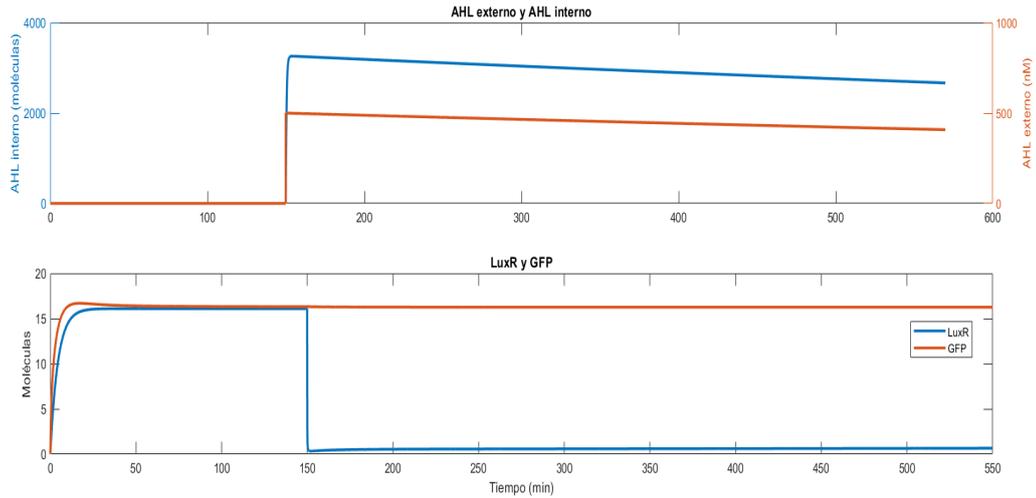
Modelado determinista del CA- $R\sigma_{20}$

En este caso, al cambiar sólo los promotores que regulan la transcripción de σ_{20} y Anti- σ_{20} basta con cambiar los términos que los regulan en las ecuaciones sus especies bioquímicas correspondientes (x_1 y x_2). Adicionalmente como P_{luxR} es un promotor represor la función de Hill pasa de ser de activadora a represora. Llevando a cabo dichos cambios y siguiendo la misma nomenclatura de la Tabla (4.3) tenemos el modelo reducido que se presenta a continuación:

$$\begin{aligned}
 \dot{x}_1 &= \frac{p_\sigma C_N k_{m\sigma}}{dm_\sigma + \mu} \left(\frac{\beta_0 x_4 + k_{dlux}}{k_{dlux} + x_4} \right) - \frac{k_{-c}}{k_{dc}} x_1 x_2 + k_{-c} x_5 - (d_\sigma + \mu) x_1 \\
 \dot{x}_2 &= \frac{p_{a\sigma} C_N k_{ma\sigma}}{dm_{a\sigma} + \mu} - \frac{k_{-c}}{k_{dc}} x_1 x_2 + k_{-c} x_5 - (d_{a\sigma} + \mu) x_2 \\
 \dot{x}_3 &= \frac{p_R C_N k_{mR}}{dm_R + \mu} \left(\frac{\beta_1 k_{d20} + x_1^2}{k_{d20}^2 + x_1^2} \right) + k_{-1} x_8 - \frac{k_{-1}}{k_{d1}} x_3 x_6 - (d_R + \mu) x_3 \\
 \dot{x}_4 &= \frac{k_{-2}}{k_{d2}} x_8^2 - k_{-2} x_4 - \mu x_4 \\
 \dot{x}_5 &= \frac{k_{-c}}{k_{dc}} x_1 x_2 - k_{-c} x_5 - (d_c + \mu) x_5 \\
 \dot{x}_6 &= D(V_c x_9 - x_6) + k_{-1} x_8 - \frac{k_{-1}}{k_{d1}} x_3 x_6 - (d_A + \mu) x_6 \\
 \dot{x}_7 &= \frac{p_G C_N k_{mR}}{dm_R + \mu} \left(\frac{\beta_1 k_{d20} + x_1^2}{k_{d20}^2 + x_1^2} \right) - (d_G + \mu) x_7 \\
 \dot{x}_8 &= \frac{k_{-2}}{k_{d2}} x_8^2 - k_{-2} x_4 - \mu x_4 \\
 \dot{x}_9 &= D \left(-N V_c x_9 + \sum_{i=1}^N x_6 \right) - d_{A_e} x_9
 \end{aligned} \tag{4.10}$$

Simulaciones del CA-R σ_{20}

Las simulaciones del modelo Represor Anti- σ_{20} se han realizado con los mismos archivos utilizados para CA-A σ_{20} excepto en que el archivo del modelo ha cambiado. Se ha utilizado las mismas condiciones iniciales de la Tabla (4.5) en las simulaciones de esta configuración. La primera llamada al *solver* corresponde a la Figura (4.8), la segunda a la Figura (4.9) y la tercera a la Figura (4.10).



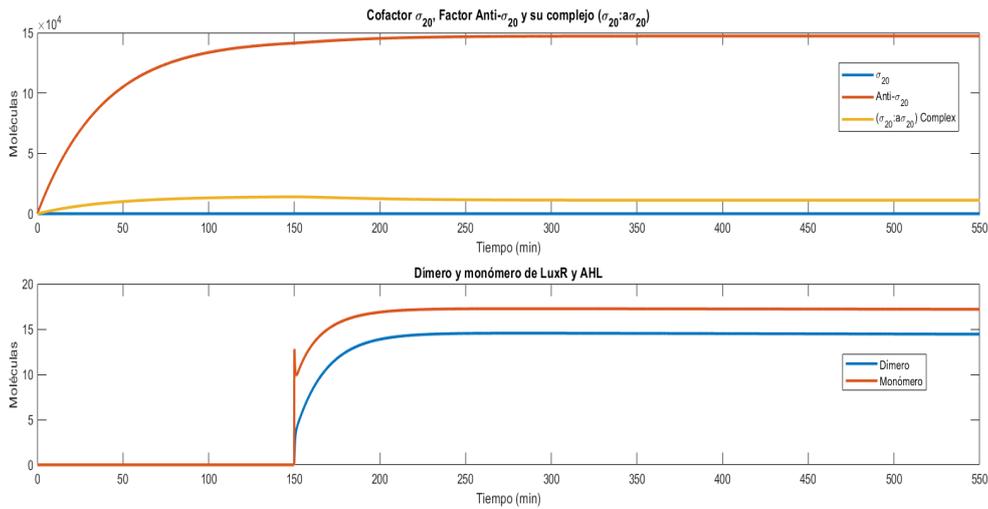


Figura 4.8: Primera llamada del modelo CA-R σ_{20} .

A continuación se comentarán algunos aspectos relevantes sobre las simulaciones y se compararán los resultados:

- **AHL extracelular y AHL intracelular:** Esta simulación es exactamente igual a la del Activador σ_{20} .
- **Cofactor σ_{20} , Anti- σ_{20} y su complejo:** En este caso, a diferencia del modelo CA-A σ_{20} , aquí puede observarse como Anti- σ_{20} tiene una dinámica de producción constitutiva a lo largo de toda la simulación llegando rápidamente a su punto de equilibrio.
- **LuxR y GFP:** Tal y como se esperaba, el valor de LuxR se reduce considerablemente tras la inducción, y además su valor de equilibrio es bastante bajo, esto es debido a que ahora el cofactor σ_{20} que activa la producción de LuxR es aniquilado por Anti- σ_{20} . Destacar ahora que la magnitud de ambas especies es de casi dos órdenes menor con CA-R σ_{20} .
- **Dímero y monómero de LuxR y AHL:** En este caso, cabe resaltar que si en CA-A σ_{20} la cantidad de dímero era mayor que la de monómero, aquí esta situación se invierte y tienen ambas dinámicas muy parecidas.

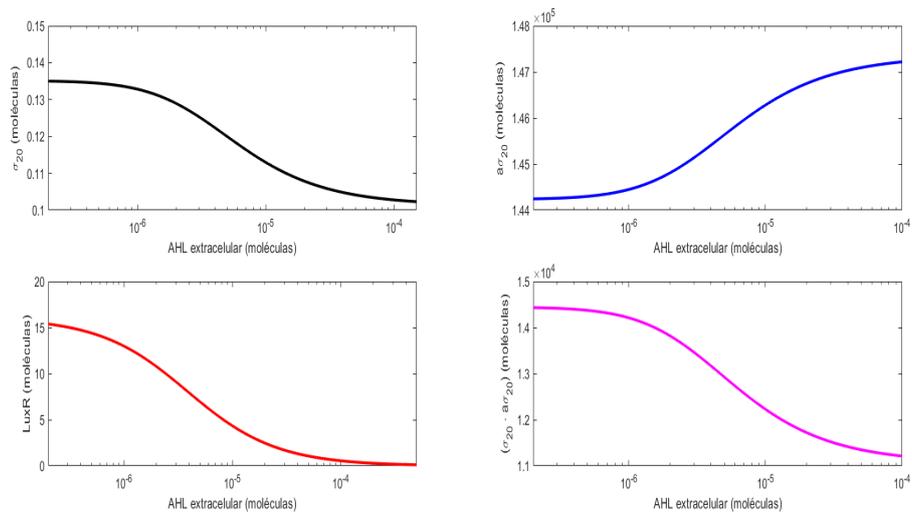


Figura 4.9: CA-R σ_{20} : Segunda llamada

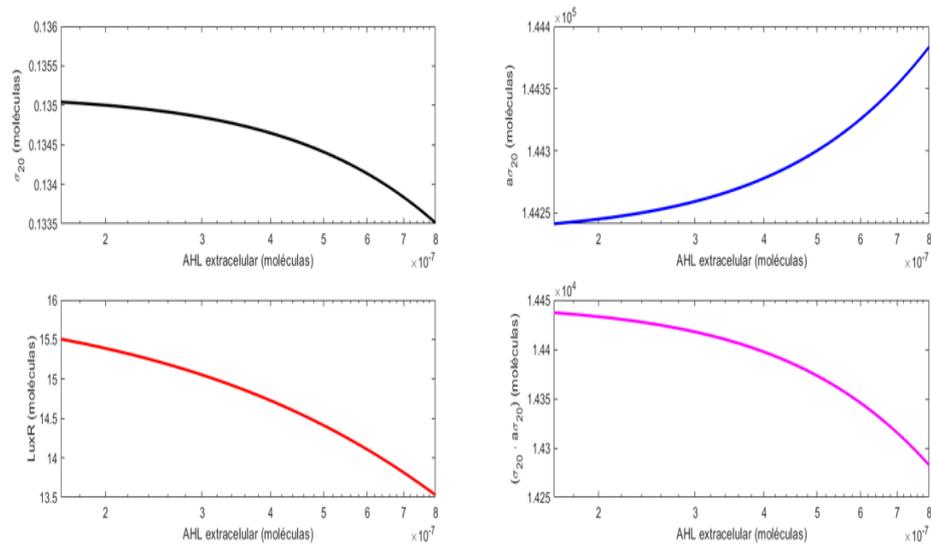


Figura 4.10: CA-R σ_{20} : Tercera llamada

Las simulaciones de las Figuras (4.9 y 4.10) no muestran ningún tipo de comportamiento no monótono, por tanto todo el rango de inducciones de AHL simulado es utilizable.

4.2 Construcción

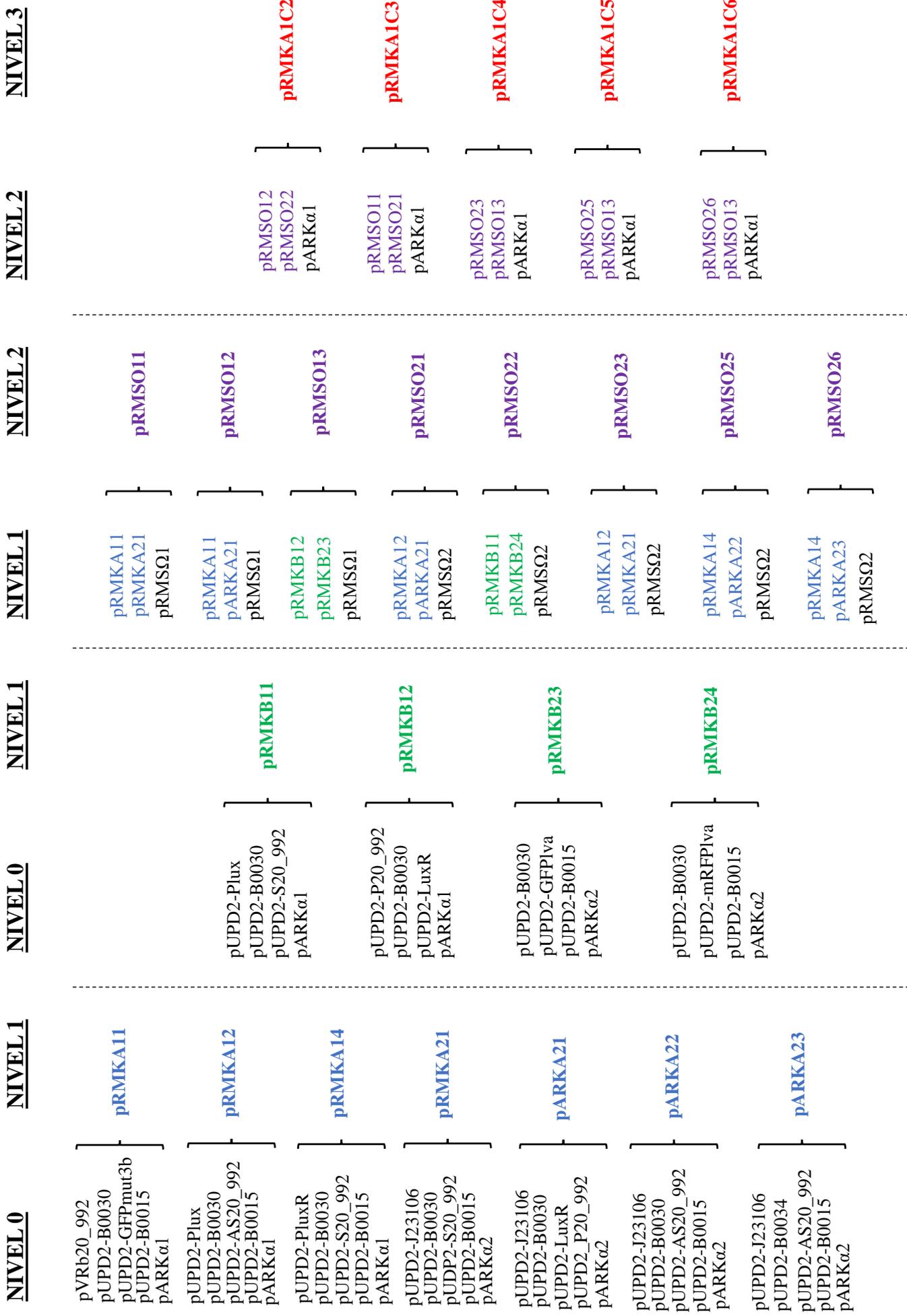
En esta sección se pretende mostrar y describir todo el trabajo de laboratorio que se ha realizado para construir físicamente los circuitos sintéticos CA-A σ_{20} y CA-R σ_{20} además de ciertos plásmidos especiales que servirán para caracterizar el circuito sintético en trabajo futuro. Dichos plásmidos están implementados en bacterias E. coli.

4.2.1 Contrucción *Bottom-up* de los controladores antitéticos PI

En el Capítulo tercero Sección segunda se describió la metodología de ensamblaje *GoldenBraid* mediante la cual se unen diferentes circuitos sintéticos en una reacción enzimática. Utilizando esta metodología *bottom-up* se han ensamblado desde las partes biológicas más simples (*bioparts*) hasta las correspondientes TUs en construcciones cada vez más complejas.

En la Figura que aparece a continuación se detallan todas las contrucciones que se han realizado para implementar los dos controladores genéticos de interés: CA-A σ_{20} y CA-R σ_{20} . De izquierda a derecha se parte de *bioparts* detalladas en la Tabla (3.4) y de los plásmidos de destino α para formar TUs simples en plásmidos de Nivel 1 (α , una TU) denominados pRMKA. A partir de partes básicas también se construye una colección de plásmidos pRMKB, que forman ya sea la parte inicial de una TU (Promotor, RBS y CDS, en pRMKB1) o la parte final de una TU (RBS, CDS y Terminador Transcripcional en pRMKB2). Combinando 2 plásmidos β se obtiene un plásmido de Nivel 2 en un plásmido de destino Ω que contiene una TU capaz de expresar 2 proteínas distintas controladas por el mismo promotor (policistrón o co-expresión de proteínas). De la combinación de dos plásmidos de Nivel 1 se generan plásmidos de Nivel 2 llamados pRMSO (Ω , 2 TUs o una TU de co-expresión).

Finalmente uniendo dos plásmidos de Nivel 2, se obtienen circuitos genéticos finales de Nivel 3 aquí denominados pRMKA1C (α , 4 TUs o 2 TU simples y una de co-expresión).



4.2.2 Plásmidos de nivel 3 pRMKA1C1: Utilidad

Además de los controladores sintéticos CA-A σ_{20} (pRMKA1C4) y CA-R σ_{20} (pRMKA1C5 y pRMKA1C6) se han ensamblado otros pRMKA1C1 cuya finalidad es la de servir para caracterizar las partes biológicas en futuros trabajos. A continuación se detalla la función y la representación SBOL de cada unidad pRMKA1C1.

pRMKA1C2

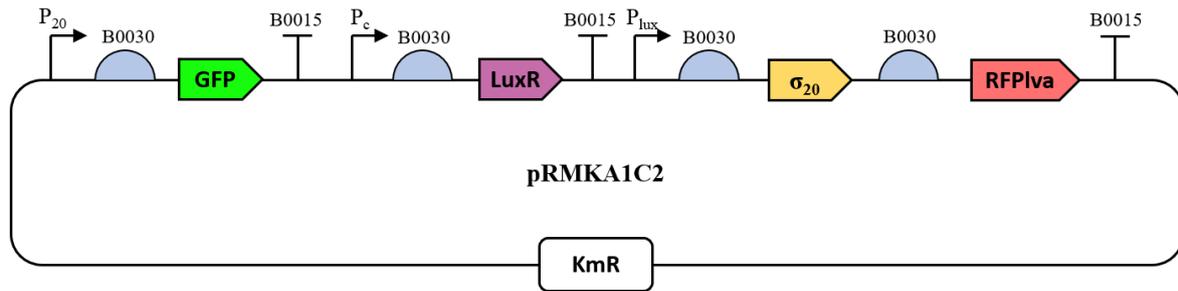


Figura 4.11: Circuito sintético pRMKA1C2

El circuito sintético pRMKA1C2 fue especialmente diseñado para poder caracterizar la relación de σ_{20} con el promotor que regula como ligando, el P_{20} . Al inducir con AHL incrementamos la producción de σ_{20} y la hacemos medible mediante RFPIva ya que ambas proteínas se co-expresan. Una vez se conoce cuanta σ_{20} hay, se puede ver cómo actúa sobre P_{20} pues de él se transcribe otra proteína medible mediante fluorescencia, la GFP.

pRMKA1C3

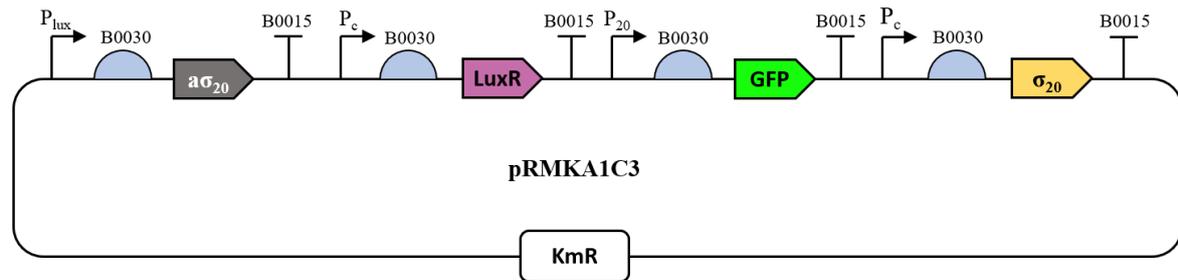


Figura 4.12: Circuito sintético pRMKA1C3

El circuito sintético pRMKA1C3 también fue especialmente diseñado para caracterizar una relación, en ese caso la de unión de las proteínas σ_{20} y Anti- σ_{20} . En este caso, el cofactor σ_{20} es producido de manera constitutiva y la cantidad de Anti- σ_{20} puede regularse mediante la inducción de AHL.

pRMKA1C4

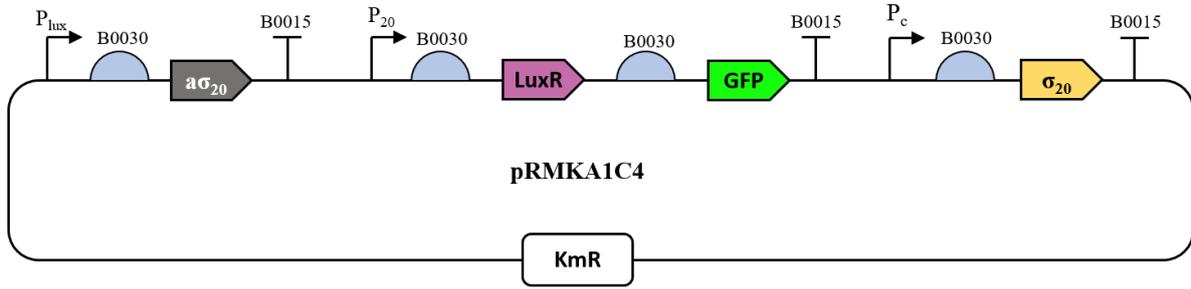


Figura 4.13: Circuito sintético pRMKA1C4

Este circuito sintético corresponde al diseño CA-A σ_{20} que ha sido modelado y simulado en la sección primera de este mismo capítulo.

pRMKA1C5

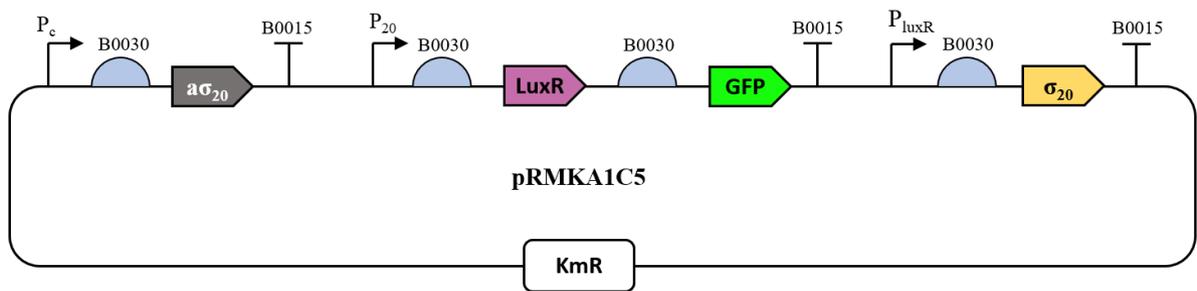


Figura 4.14: Circuito sintético pRMKA1C5

El pRMKA1C5 es el diseño CA-R σ_{20} que ha sido también modelado y simulado en la sección 1 de este mismo capítulo.

pRMKA1C6

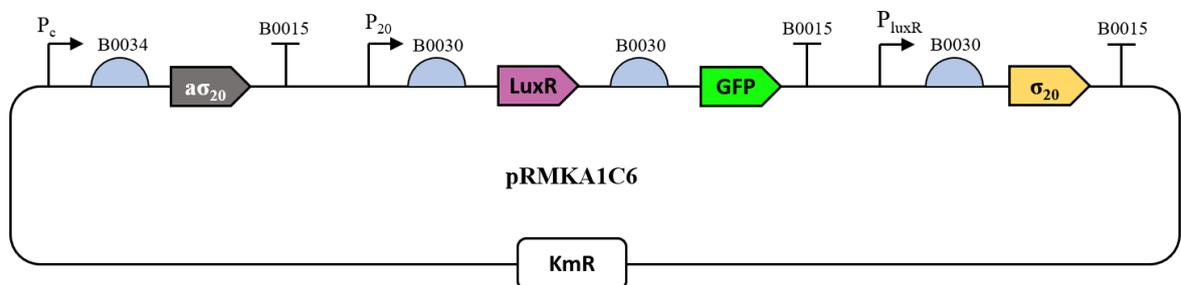


Figura 4.15: Circuito sintético pRMKA1C6

El pRMKA1C6 es una versión del pRMKA1C5 donde cambia el CDS que regula la traducción de Anti- σ_{20} . En vez de estar el RBS B0030 aparece el B0034 que es una versión más afín a los

ribosomas. En este caso se quiere experimentar que ocurriría si se aumentara la producción de Anti- σ_{20} en el medio.

Conclusiones y líneas futuras

En este capítulo se expondrán los objetivos alcanzados, las conclusiones obtenidas, y las líneas futuras para la continuidad del proyecto.

En este trabajo se han diseñado, modelado matemáticamente y construido en el laboratorio dos nuevas topologías del denominado Controlador Antitético PI: (1) Activador Anti- σ_{20} (CA-A σ_{20}) y (2) Represor σ_{20} (CA-R σ_{20}). En particular se pueden resaltar los siguientes puntos:

- Se han obtenido dos modelos EDOs basados en primeros principios para cada una de las topologías del controlador PI. Estos modelos representan las reacciones bioquímicas entre las especies involucradas. Los modelos bioquímicos presentan hasta 17 estados incluyendo dinámicas no lineales. Debido a esto y para disminuir la complejidad de dichos modelos, se ha realizado una reducción basada en el principio de aproximación de cuasi-estado estacionario, y especies invariantes del sistema. El resultado de este tipo de reducción, son modelos con menor número de estados y a su vez menor número de parámetros, disminuyendo así el de coste computacional. Los modelos reducidos demostraron ser capaces de simular las dinámicas de las especies involucradas de manera similar a las del modelo original.
- Tanto el modelo CA-A σ_{20} como el CA-R σ_{20} fueron testados a diferentes concentraciones de AHL demostrándose la sensibilidad a estímulos o entradas externas a los mismos.
- Se ha generado una librería tanto de partes básicas como de TUs adaptadas al protocolo *GoldenBraid*. Dicha librería ha sido creada mediante los métodos de laboratorio que se citan en el Materiales y Métodos, y ha hecho posible la implementación final de los dos diseños CA-R σ_{20} y CA-A σ_{20} .
- Adicionalmente, se han construido circuitos genéticos que no son directamente los controladores CA-A σ_{20} ni CA-R σ_{20} pero que son útiles en futuros experimentos para caracterizar las partes básicas que poseen los dos anteriores y así obtener parámetros más ajustados a su comportamiento.

Las líneas futuras que se desprenden de este trabajo se pueden resumir como:

- Es necesaria la caracterización de las partes básicas de los circuitos genéticos de Nivel 3 ensamblados en el laboratorio. De esta manera, se puede tener información cuantitativa precisa del comportamiento del Controlador Antitético PI ante distintos niveles de la entrada AHL.
- La identificación de este tipo de sistemas sigue siendo un reto. En el grupo de investigación se propone la utilización de algoritmos de optimización multi-objetivo para la estimación de parámetros de los modelos de estos sistemas, y en particular del subgrupo ECF20_992.
- A partir de los modelos deterministas obtenidos para este controlador, se propone diseñar modelos estocásticos para reflejar mejor el carácter aleatorio de las reacciones bioquímicas que tienen lugar en sistemas biológicos.
- Aplicar el sistema para la producción de una PoI real que tenga interés industrial, ya sea un bioplástico o un metabolito de alto valor añadido.

Finalmente, esperamos haber contribuido en la investigación de controladores biomoleculares de tipo proporcional-integral, ya que las aplicaciones que poseen en las áreas médicas, medioambientales y en particular en la industria biotecnológica son de gran interés y utilidad.

Parte II

Presupuesto

Presupuesto

5.1 Introducción y objetivo

Como todo proyecto de ingeniería, es necesario presentar una valoración económica del trabajo realizado. En el presente documento han de tenerse en cuenta las asunciones que se relatan en cada sección.

5.2 Presupuesto desglosado

5.2.1 Costes de mano de obra

La mano de obra se subdividirá en dos componentes, la realizada por un ingeniero biomédico *junior* y la del tutor como ingeniero *senior*. Si bien es cierto que el presente trabajo tiene dos vertientes, una biológica y la otra ingenieril, sería de esperar que una se adjudique a un ingeniero y la otra a un técnico de laboratorio. No obstante, como durante el trabajo se han adquirido los conocimientos necesarios en metodologías de laboratorio, todas las horas de este último serán imputadas al ingeniero *junior*. Se ha considerado como sueldo base del ingeniero *junior* 1.200 €/mes y del ingeniero *senior* 2.500 €/mes. Considerando una jornada laboral para ambos de 8 horas que va de lunes a viernes y que todos los meses tienen 5 semanas, obtenemos que el coste por hora del ingeniero *junior* es de 6 €/hora y el del ingeniero *senior* de 12.5 €/hora (**PyF**).

Adicionalmente cabe tener en cuenta que la duración del proyecto ha abarcado 3 meses aproximadamente. Los primeros 15 días del primer mes fueron de instrucción acompañada por el tutor y los últimos 15 de revisión del proyecto. Es por ello que al alumno se le imputan un total de 600 horas y al tutor de 200.

Tabla 5.1: Costes asociados a la mano de obra.

Nombre	Precio unitario (€/h)	Cantidad (h)	Coste total (€)
Ingeniero <i>junior</i>	6	600	3600,00
Ingeniero <i>senior</i>	12,5	200	2500,00
Total			6100,00

El coste total de la mano de obra de este proyecto ha sido de **seis mil cien euros**.

5.2.2 Costes de hardware y software

Los costes asociados a equipo hardware y software no se han tenido en cuenta como precio de compra sino como amortización durante el periodo de tiempo que ha durado el proyecto (3 meses) y por tanto se les imputa un factor de amortización. La computadora utilizada fue descrita en su momento en la Tabla (3.3) y se le supondrá una vida útil de 5 años (60 meses) por tanto se le imputará un factor de amortización de 3/60. A las licencias de los programas informáticos se les supondrá un periodo de compra de 12 meses con el correspondiente factor de amortización de 3/12.

Tabla 5.2: Costes asociados a hardware y software.

Nombre	Precio €	Cantidad (u)	F.A	Coste total (€)
Ordenador de sobremesa Lenovo	850	1	3/60	42,50
Microsoft Windows 10 Home	145,00	1	3/12	36,25
MATLAB2018a	250,00	1	3/12	62,50
Overleaf	0	1	-	0,00
Benchling	0	1	-	0,00
Total				144,25

Finalmente el coste total asociado a los servicios de hardware y software es de **ciento cuarenta y cuatro euros con veinticinco céntimos**.

5.2.3 Coste de materiales e instrumentos de laboratorio

En el caso de los materiales para el laboratorio cabe diferenciar entre dos costes diferentes, los asociados a reactivos y los asociados a la amortización de los dispositivos durante la duración del proyecto. Los asociados a reactivos se van a tratar por reacción (sustratos para reacciones) y por material desechable (guantes, puntas, eppendorfs...). Para ello se presupondrá que todos los procedimientos de laboratorio ocurren satisfactoriamente y no es menester repetir ninguno. Los costes unitarios para las dos reacciones principales (ensamblajes y PCRs) se describen en la Tabla (5.3) y han sido calculados aproximadamente a partir de los reactivos necesarios que se muestran en la Tabla (3.6). Así mismo, dado que al inicio de este proyecto se hizo una compra de materiales desechables por valor de 700 €, se ha supuesto su uso total durante el trabajo. La vida útil de las tecnologías de laboratorio se ha supuesto en 4 años.

Tabla 5.3: Costes asociados a reacciones.

Reacción	Precio unitario (€)	Cantidad (reacciones)	Coste total (€)
Ensamblaje GoldenBraid	28,60	24	686,4
PCR de colonia	15,20	24	364,8
Total			1051,2

Por tanto el coste total de materiales e instrumentos de laboratorio asciende a 4561.95€. En letra, **cuatro mil quinientos sesenta y un euros con noventa y cinco céntimos**.

Tabla 5.4: Costes asociados a material de laboratorio y amortizados de laboratorio.

Nombre	Precio €	Cantidad (h)	F.A	Coste total (€)
Materiales	700	1	-	700
Lector multi-modo	95.000	1	3/48	5937,5
Incubadora	5.300	1	3/48	331,25
Campana de flujo	1.200	1	3/48	75
Espectrofotómetro	460	1	3/48	28,75
Incubadora orbital	375	1	3/48	23,43
Congelador (-80°C)	8.500	1	3/48	531,25
Electroporador	3.200	1	3/48	200
Sistema de electroforesis	180	1	3/48	11,25
Total				7838,43

5.3 Presupuesto total

5.3.1 Presupuesto de ejecución de material

Teniendo en cuenta todos los costes parciales de cada unidad de obra podemos obtener el **presupuesto de ejecución de material** que asciende hasta la cifra de 15.133,88. En texto, **quince mil ciento treinta y tres euros con ochenta y ocho céntimos**.

5.3.2 Presupuesto de ejecución por contrata

Para obtener el presupuesto de ejecución por contrata hay que añadir: los gastos generales o indirectos que ascienden a un 13% del presupuesto de ejecución del material conforme al Reglamento General de la Ley de Contratos de las Administraciones Públicas, el beneficio industrial que se estima del 6% del presupuesto de ejecución de material en proyectos de ingeniería y finalmente el IVA sobre el total antes de impuestos. En la Tabla (5.5) pueden visualizarse los resultados.

Tabla 5.5: Costes asociados a reacciones.

Denominación	Coste total (€)
Presupuesto de ejecución del material	15.133,88
Gastos indirectos	1967,4
Beneficio industrial	908,03
Total antes de impuestos	18.009,31
Impuesto IVA	3781,95
Presupuesto de ejecución por contrata	21791,26

Finalmente el presupuesto de ejecución por contrata asciende a **veintiún mil setecientos noventa y un euros con veintiséis céntimos**

Bibliografía

- Alberts, B y col. (2007). «Molecular Biology of the Cell, 5th edn, Garland Science, New York». En: *ISBN 1174808063*, pág. 1392 (vid. pág. 8).
- Alon, Uri (2006). *An introduction to systems biology: design principles of biological circuits*. Chapman y Hall/CRC (vid. pág. 21).
- Annunziata, Fabio y col. (2017). «An orthogonal multi-input integration system to control gene expression in *Escherichia coli*». En: *ACS synthetic biology* 6.10, págs. 1816-1824 (vid. pág. 40).
- Aoki, Stephanie K y col. (2019). «A universal biomolecular integral feedback controller for robust perfect adaptation». En: *Nature*, pág. 1 (vid. págs. 15-17, 31).
- Aström, Karl Johan y Richard M Murray (2010). *Feedback systems: an introduction for scientists and engineers*. Princeton university press (vid. pág. 13).
- Betancor, Laura, MP Gadea y Karina Flores (2008). «Genética bacteriana». En: *Instituto de Higiene, Facultad de Medicina (UDELAR). Temas de Bacteriología y Virología Médica. 3ra Ed. Montevideo: Oficina del Libro FEFMUR*, págs. 65-90 (vid. pág. 8).
- Boada, Yadira, Alejandro Vignoni y Jesus Pico (2017). «Engineered control of genetic variability reveals interplay among quorum sensing, feedback regulation, and biochemical noise». En: *ACS synthetic biology* 6.10, págs. 1903-1912 (vid. pág. 21).
- Boada Acosta, Yadira Fernanda (2018). «A systems engineering approach to model, tune and test synthetic gene circuits». Tesis doct. (vid. págs. 6-8, 12, 19, 22, 40).
- Burgess, Richard (2001). «Sigma Factors». En: págs. 1831-1834. ISBN: 9780122270802. DOI: 10.1006/rwgn.2001.1192 (vid. pág. 40).
- Cox, Robert Sidney y col. (2018). «Synthetic biology open language visual (SBOL visual) version 2.0». En: *Journal of integrative bioinformatics* 15.1 (vid. pág. 9).

- Del Vecchio, Domitilla, Aaron J Dy y Yili Qian (2016). «Control theory meets synthetic biology». En: *Journal of The Royal Society Interface* 13.120, pág. 20160380 (vid. pág. 14).
- Elowitz, M y S Leibler (2000). «A synthetic oscillatory network of transcription regulators». En: *Nature* 403, págs. 335-338 (vid. pág. 11).
- Gardner, Timothy S, Charles R Cantor y James J Collins (2000). «Construction of a genetic toggle switch in *Escherichia coli*». En: *Nature* 403.6767, pág. 339 (vid. pág. 11).
- Gutiérrez, Adrian Requena (2019). «Design and optimization of a genetic circuit for the internal control of the population density of an *Escherichia coli* culture». En: *UPV riunet* (vid. págs. 11, 26).
- Hill, Archibald Vivian (1910). «The possible effects of the aggregation of the molecules of haemoglobin on its dissociation curves». En: *j. physiol.* 40, págs. 4-7 (vid. pág. 38).
- Horswill, Alexander R y col. (2007). «The effect of the chemical, biological, and physical environment on quorum sensing in structured microbial communities». En: *Analytical and bioanalytical chemistry* 387.2, págs. 371-380 (vid. pág. 40).
- Hsiao, Victoria, Anandh Swaminathan y Richard M Murray (2018). «Control theory for synthetic Biology: Recent advances in system characterization, control design, and controller implementation for synthetic biology». En: *IEEE Control Systems Magazine* 38.3, págs. 32-62 (vid. págs. 11, 14).
- Kelly, Ciarán L y col. (2018). «Synthetic negative feedback circuits using engineered small RNAs». En: *Nucleic acids research* 46.18, págs. 9875-9889 (vid. pág. 11).
- Menolascina, Filippo, Mario Di Bernardo y Diego Di Bernardo (2011). «Analysis, design and implementation of a novel scheme for in-vivo control of synthetic gene regulatory networks». En: *Automatica* 47.6, págs. 1265-1270 (vid. pág. 14).
- Menolascina, Filippo y col. (2014). «In-vivo real-time control of protein expression from endogenous and synthetic gene networks». En: *PLoS computational biology* 10.5, e1003625 (vid. pág. 14).
- Nitta, Takeshi y col. (2000). «Function of the ζ E regulon in dead-cell lysis in stationary-phase *Escherichia coli*». En: *Journal of bacteriology* 182.18, págs. 5231-5237 (vid. pág. 32).
- Northrup, Scott H y Harold P Erickson (1992). «Kinetics of protein-protein association explained by Brownian dynamics computer simulation.» En: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89.8, págs. 3338-3342 (vid. pág. 40).
- Picó, Jesús y col. (2015). «Modelado de sistemas bioquímicos: De la ley de acción de masas a la aproximación lineal del ruido». En: *Revista Iberoamericana de Automática e Informática Industrial RIAI* 12.3, págs. 241-252 (vid. pág. 23).

Rhodijs, Virgil A y col. (2013). «Design of orthogonal genetic switches based on a crosstalk map of σ s, anti- σ s, and promoters». En: *Molecular systems biology* 9.1 (vid. págs. 16, 25, 32, 33).

Sarrion-Perdigones, Alejandro y col. (2011). «GoldenBraid: an iterative cloning system for standardized assembly of reusable genetic modules». En: *PloS one* 6.7, e21622 (vid. pág. 24).

Valencia UPV iGEM (2018). *Printeria*. www.printeria.es. [Consulta: 4 de Agosto de 2019] (vid. pág. 6).

