

Resumen

La biotecnología moderna se basa en la aplicación de una mezcla de herramientas experimentales y computacionales para llevar a cabo de forma dirigida la ingeniería genética. El objetivo es obtener células (re)programadas que implementen nuevas funciones o que sirvan como herramientas para el estudio de sistemas biológicos. En este contexto, el uso de bacterias en biotecnología está muy extendido. Sin embargo, la implementación de circuitos genéticos para el aprovechamiento de estos seres vivos puede verse limitada por procesos biológicos naturales; es decir, los circuitos diseñados (o naturales) pueden verse afectados por el transcurso del tiempo o por cambios en el entorno en el que crecen las bacterias. En esta tesis, nos propusimos seguir un enfoque integrador para estudiar cómo las bacterias responden en el tiempo y el espacio a los cambios genéticos y ambientales, que pueden afectar la funcionalidad de los circuitos de interés biotecnológico. Usamos *Escherichia coli* como organismo modelo, explotando una variedad de herramientas experimentales para trabajar con él. En primer lugar, estudiamos cómo los cambios ambientales y genéticos afectan la funcionalidad de un circuito genético sintético que implementa un comportamiento lógico sofisticado. Descubrimos que hay amplios rangos de concentración de entrada que el sistema puede procesar correctamente, que el circuito diseñado es bastante sensible a los efectos de la temperatura, que la expresión de pequeños ARN heterólogos es costosa para la célula y que una reorganización genética adecuada del sistema para reducir la cantidad de ADN heterólogo en la célula puede mejorar su estabilidad evolutiva. En segundo lugar, estudiamos el crecimiento bacteriano en entornos en los que existen materiales nanoestructurados. Descubrimos que las poblaciones bacterianas se pueden controlar en gran medida mediante el uso de marcos organometálicos, ya que estos materiales nanoestructurados pueden descomponerse lentamente en medios biológicos liberando agentes antimicrobianos (metales y compuestos orgánicos, incluidos los antibióticos). Analizamos la respuesta bacteriana espaciotemporal siguiendo un enfoque experimental y teórico combinado en un entorno tan complejo y desafiante en medios líquidos y sólidos. Además de las variaciones en el rendimiento debido a cambios ambientales, también se debe considerar que esos circuitos genéticos evolucionarán con el tiempo debido a la acumulación estocástica de mutaciones. Estas mutaciones pueden dar lugar a cambios en la funcionalidad de los circuitos reguladores. Por tanto, en tercer lugar, realizamos un experimento de evolución a largo plazo para estudiar la contribución de un sistema de chaperonas de proteínas en la modulación de la estabilidad evolutiva. En los últimos años, se ha demostrado que los sistemas de chaperonas, como GroES/EL, pueden amortiguar o purgar mutaciones. Realizamos la secuenciación del genoma completo en diferentes líneas con diferentes niveles de expresión de GroEL y también medimos la tasa de crecimiento de las células al principio y al final del experimento evolutivo. Sin embargo, nuestros resultados no fueron concluyentes, por lo que se necesita más investigación para comprender completamente el papel de GroES/EL en la evolución y evaluar su utilidad potencial en biotecnología. En conjunto, esta tesis intenta avanzar en nuestro conocimiento sobre cómo las bacterias, y *E. coli* en particular, se comportan como se espera cuando el entorno se altera, la fisiología cambia y pasa mucho tiempo, para posibles aplicaciones industriales o (pre)clínicas.