

RESUMEN THESIS

La biología sintética tiene como objetivo diseñar y construir nuevos sistemas biológicos con funciones deseadas. Los circuitos basados en el control transcripcional han tenido preponderancia en este campo tras el trabajo pionero del toggle switch y del repressilator. Sin embargo, para avanzar en la creación de tecnologías transformadoras que utilicen circuitos genéticos sintéticos, es esencial una combinación de mecanismos de control confiables en todo el flujo de la información genética. Esta combinación es necesaria para alcanzar el nivel de integrabilidad y complejidad funcional observado en la naturaleza. En tal sentido, recientemente han ganado atención los circuitos basados en regulación postranscripcional. En particular, se ha aprovechado la gran programabilidad de ARN para crear circuitos reguladores para la biodetección de señales ambientales o para controlar la vía metabólica en la bioproducción. En esta tesis, por el contrario, proponemos explotar las proteínas de unión a ARN para diseñar circuitos sintéticos que operen a nivel de traducción en la bacteria *Escherichia coli*. Esta tesis pretende estudiar como surge y se propaga el ruido cuando la expresión genética está regulada por un factor de traducción, y la ampliación de la caja de herramientas de la biología sintética con una nueva caracterización de proteínas de unión a ARN adecuadas.

Por un lado, hemos diseñado un circuito de control postranscripcional utilizando la proteína de cápside del fago MS2. Mediante una meticulosa monitorización a nivel unicelular tanto del regulador como del gen regulado, hemos cuantificado el comportamiento dinámico del sistema, así como su estocasticidad. Si bien los esfuerzos anteriores se centraron en comprender la propagación del ruido en las regulaciones transcripcionales, el comportamiento estocástico de los genes regulados a nivel de la traducción sigue siendo en gran medida desconocido. Nuestros datos han revelado que un factor de traducción de proteínas ha permitido una fuerte represión a nivel unicelular, ha amortiguado la propagación del ruido de un gen a otro y ha conducido a una sensibilidad no lineal a las perturbaciones globales en la traducción. Estos descubrimientos han mejorado significativamente nuestra comprensión de la expresión genética estocástica y han proporcionado principios de diseño fundamentales para aplicaciones de biología sintéticas.

Por otro lado, aprovechamos el motivo de reconocimiento de ARN (RRM), el dominio proteico de unión a ARN mas prevalente en la naturaleza, a pesar de su predominio en los filos eucariotas, para diseñar un sistema de control postranscripcional ortogonal en *Escherichia coli*. Aprovechando la proteína de unión a ARN de mamífero Musashi-1, que contiene dos RRM canónicos, desarrollamos un circuito sofisticado. Musashi-1 ha funcionado como represor de la traducción alostérico a través de su interacción específica con la región codificante N-terminal del ARN mensajero, mostrando capacidad de respuesta a los ácidos grasos. La caracterización integral tanto a nivel poblacional como unicelular ha destacado un cambio significativo en la expresión del reportero. Se obtuvieron conocimientos moleculares a través de la cinética de unión *in vitro* y evaluaciones de funcionalidad *in vivo* de una serie de mutantes de ARN. Este trabajo ha mostrado la adaptabilidad de la regulación basada en RRM a organismos mas simples, introduciendo una nueva capa regulatoria para el control de la traducción en procariontes y, en ultima instancia, ampliando los horizontes de la manipulación genética.