



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior  
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural



**UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA**

**ETSIAMN**

**TRABAJO FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA**

# Diseño y aplicabilidad de un circuito genético basado en el control antitético en la síntesis de proteínas y metabolitos

Curso académico: 2019-2020

Autora: Ana Fraile López

Tutora: Nuria Andrés Colás

Cotutora: Yadira Fernanda Boada Acosta

Valencia, Julio 2020

# Resumen y palabras clave

**Título:** Diseño y aplicabilidad de un circuito genético basado en el control antitético en la síntesis de proteínas y metabolitos.

La biología sintética toma conceptos de ingeniería para el diseño y la construcción de circuitos genéticos con un comportamiento deseado, modificando y combinando diferentes elementos genéticos que ya 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 sistemas con comportamientos cada vez más complejos, y con distintas aplicaciones en áreas como biotecnología, biomedicina, farmacéutica, ciencias biológicas, ingeniería genética, etc.

El objetivo de este trabajo es el diseño, análisis y construcción de un circuito genético llamado controlador antitético para regular la producción de una proteína de interés a nivel transcripcional en *Escherichia coli*. El sistema de control se basa en la aniquilación mutua de dos proteínas: Sigma20 y Anti-sigma20. La proteína Sigma20 es un cofactor de la ARN polimerasa, que actúa promoviendo la expresión de proteínas. La proteína Anti-Sigma20 es el factor de Sigma20 y que al unirse a ella reduce la actividad de la ARN polimerasa, y por lo tanto la producción de ARN mensajero de la proteína de interés. En este trabajo se diseña y analiza el controlador antitético partiendo de las reacciones bioquímicas involucradas. Estas reacciones fueron traducidas a un modelo matemático para la realización de simulaciones computacionales que nos pueden proporcionar guías de diseño para la selección e implementación de las partes biológicas del controlador en el laboratorio.

Una de las principales características del controlador antitético es su mecanismo de realimentación y control. Mecanismos de este tipo, existen de forma natural en las células vivas permitiendo regular muchos comportamientos celulares. Esta cualidad puede ser aprovechada en aplicaciones de la industria biotecnológica que incluyan la producción robusta y con rechazo a perturbaciones del medio extracelular de proteínas heterólogas, enzimas, o metabolitos. Destacamos una aplicación principal relacionada con la vía de síntesis del metabolito naringenina, optimizando el controlador antitético para obtener máxima producción de naringenina, y minimizar el impacto de las variaciones del medio intra y extra celular en su funcionamiento.

**Palabras clave:** Biología sintética, control antitético, síntesis de proteínas, síntesis de metabolitos, modelado, factores extracitoplasmáticos Sigma.

**Autora:** Ana Fraile López

**Tutora:** Nuria Andrés Colás

**Cotutora:** Yadira Fernanda Boada Acosta

Valencia, Julio 2020

**Title:** Design and applicability of a genetic circuit based on the antithetic control for the synthesis of proteins and metabolites.

## **Abstract**

Synthetic biology takes engineering concepts to design and build gene circuits with a desired behavior by modifying and combining different biological elements that already exist in nature. Control and regulation of protein production levels expressed by these gene circuits play an essential role, when one tries to build more complex systems. These new gene circuits have different applications in areas such as biotechnology, biomedicine, pharmaceuticals, biological sciences, genetic engineering, etc.

The aim of this work is to design, analyze and build a genetic circuit so-called antithetic controller that regulates production of a protein of interest at the transcriptional level. In *Escherichia coli*, this controller is based on the mutual annihilation of two proteins: Sigma20 and Anti-Sigma20. The Sigma20 protein is a cofactor of RNA polymerase, which promotes protein expression. Anti-Sigma20 protein binds to Sigma70 and reduces the RNA polymerase activity, as a consequence transcription of the protein of interest is also decreased. Here, the antithetic controller was designed and analyzed based on the biochemical reactions involved in its dynamic behavior. These reactions were translated into a mathematical model to perform computational simulations providing us several design guidelines for the selection and implementation of the controller's biological parts in the laboratory.

One of the main characteristics of the antithetic controller relies in its feedback mechanism. It has been shown that different types of feedback already exist in living cells and regulate many cellular behaviors. This quality can be exploited in several applications of the biotechnology industry that include rejection of extracellular disturbances and robust production of heterologous proteins, enzymes, or metabolites. We highlight one main application related to the naringenine metabolite synthesis pathway: optimizing the antithetic controller to obtain maximum production of naringenine and minimize the impact of the intra- and extra-cellular environment variations on its functioning.

**Keywords:** Synthetic biology, antithetic control, protein production, metabolite synthesis, modeling, extracytoplasmic sigma factors.

**Author:** Ana Fraile López

**Thesis director:** Nuria Andrés Colás

**Thesis co-director:** Yadira Fernanda Boada Acosta

Valencia, July 2020

# Agradecimientos

En primer lugar, me gustaría agradecerle a Yadira y Alejandro el trabajo y la confianza, desde el primer momento, me hicieron sentirme como una más dentro del laboratorio. Gracias por enseñarme tanto, no me equivoqué apostando por la Biología sintética.

Asimismo, le agradezco a Nuria su labor como tutora y a Jesús que me abriese las puertas de su laboratorio. Ha sido un placer realizar este trabajo con gente tan profesional como vosotros.

También me gustaría acordarme de mis amigos, los que me dio Valencia y los que llevan conmigo toda la vida. Han sido y serán, estoy segura, un apoyo fundamental en mi día a día. He tenido la suerte de “elegir” a gente maravillosa.

Y por último, pero no menos importante, me gustaría dedicarle este trabajo a mis padres, a mi hermano y a Alberto. Sé que siempre me han apoyado en mis decisiones, apostando por mí y ayudándome para que cada día crezca como persona.

Muchísimas gracias.

# Índice

<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Biología sintética</b>	<b>1</b>
1.1.1 Ciclo de trabajo	1
1.1.2 Circuitos genéticos	2
1.1.2.1 Partes básicas	3
<b>1.2 Controlador antitético</b>	<b>4</b>
1.2.1 Componentes	5
1.2.2 Efecto sobre la regulación de síntesis de proteínas	6
1.2.3 Propiedades	6
<b>1.3 Aplicabilidad de la biología sintética y el controlador antitético</b>	<b>7</b>
<b>2. Objetivos</b>	<b>9</b>
<b>3. Materiales y métodos</b>	<b>10</b>
<b>3.1 Diseño</b>	<b>10</b>
3.1.1 Modelado determinista	10
3.1.2 Simulación computacional	13
3.1.3 optimización de parámetros del modelo matemático	13
<b>3.2 Construcción</b>	<b>14</b>
3.2.1 Ensamblaje de ADN utilizando GoldenBraid	14
3.2.2 Transformación	17
3.2.3 Cultivos celulares	17
3.2.4 Conservación bacteriana en glicerol	18
3.2.5 PCR de colonias (cPCR)	19
3.2.6 Electroforesis en gel de agarosa	19
3.2.7 Extracción del material celular (Miniprep)	20
3.2.8 Secuenciación	20
3.2.9 Instrumentos y software	20
<b>4. Resultados y Discusión</b>	<b>21</b>
<b>4.1 Diseño del controlador antitético</b>	<b>21</b>
4.1.1 Controlador antitético activador de Anti- $\sigma^{20}$	21
4.1.2 Especies bioquímicas del controlador antitético	21
4.1.3 Estructura y funcionamiento del controlador antitético	22
4.1.4 Reacciones bioquímicas del controlador antitético	23
4.1.5 Modelo ODE del controlador antitético	25
4.1.6 Simulaciones computacionales del controlador antitético	27
<b>4.2 Construcción del controlador antitético</b>	<b>30</b>

4.2.1 Construcción de las unidades transcripcionales. Plásmidos de Nivel 1 .....	30
4.2.2 Ensamblaje de dos unidades transcripcionales. Plásmidos de Nivel 2.....	30
4.2.3 Construcción del circuito genético (nivel 3/ciclo de ensamblaje).....	31
<b>4.3 Aplicabilidad del controlador antitético .....</b>	<b>32</b>
4.3.1 Regulación de la vía metabólica de naringenina mediante el controlador antitético .....	33
4.3.2 Optimización de parámetros del modelo .....	34
<b>5. Conclusiones.....</b>	<b>39</b>
<b>6. Referencias bibliográficas.....</b>	<b>40</b>
Anexo I: Resultados de la optimización .....	<b>43</b>
Anexo II: Artículos de Revista y de Congreso derivados de este trabajo.....	<b>45</b>

# Índice de Figuras

- 1.1. Metodología cíclica de la biología sintética.
- 1.2. Un circuito genético y los eventos necesarios para la obtención de una proteína determinada.
- 1.3. Funcionamiento del controlador antitético mediante la realimentación.
- 1.4. Proteínas antitéticas y su papel en la regulación génica.
- 1.5. Respuesta del circuito sintético.
- 1.6. Adaptación perfecta del controlador con realimentación antitética.
- 1.7. Segmentos de aplicación en la biología sintética.
- 3.1 Esquema de la expresión constitutiva de los genes y la formación de proteínas.
- 3.2 Esquema del ensamblaje GoldenBraid con varios niveles.
- 4.1 Controlador antitético sin realimentación (bucle abierto).
- 4.2 Controlador antitético con realimentación (bucle cerrado).
- 4.3 Simulaciones del modelo ODE.
- 4.4 Construcciones de las unidades transcripcionales en plásmidos Nivel 1.
- 4.5 Combinación de unidades transcripcionales en plásmidos de Nivel 2.
- 4.6 Representación del plásmido final del controlador antitético.
- 4.7 Construcciones complementarias a pAFKA1F3.
- 4.8 Control de la producción del metabolito naringenina.
- 4.9 Representación gráfica de las mejores soluciones de los objetivos.
- 4.10 Simulación del sistema con las soluciones seleccionadas de la optimización multiobjetivo.
- 1. Frente Pareto obtenido de la optimización de parámetros.
- 2. Soluciones de Frente Pareto obtenidas para las variables de decisión.

# Índice de tablas

**3.1 Partes básicas usadas en ensamblaje mediante GoldenBraid.**

**3.2 Plásmidos de destino usados en los diferentes niveles.**

**3.3 Componentes de la reacción de GoldenBraid.**

**3.4 Condiciones de trabajo para las reacciones de GoldenBraid.**

**3.5 Primers utilizados en el laboratorio y sus características.**

**3.6 Componentes de la reacción cPCR.**

**3.7 Condiciones establecidas de la reacción cPCR.**

**3.8 Instrumentos utilizados en el trabajo.**

**4.1 Parámetros del modelo ODE del controlador antitético.**

**4.2 Valores de los parámetros o variables de decisión obtenidos de la optimización.**

# 1. Introducción

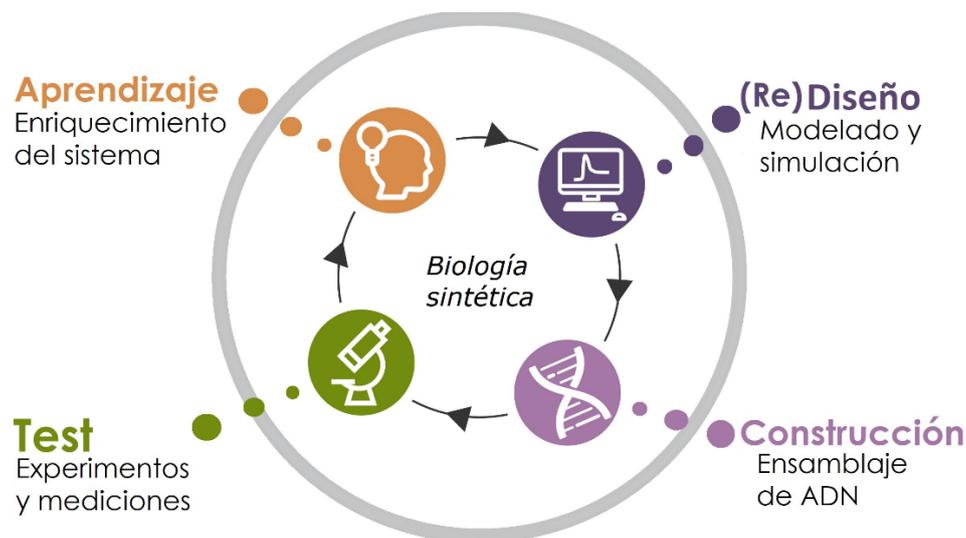
## 1.1 Biología sintética

La biología sintética es un campo de investigación con un inicio relativamente reciente, aproximadamente 20 años, y se sirve de varias disciplinas como biología, genética, ingeniería o matemáticas. Se basa en el estudio y comprensión de los sistemas biológicos, que nos permitirá rediseñarlos, o incluso, construir otros nuevos desde cero, permitiendo establecer una función relevante y provechosa (Royal Academy of Engineering, 2009).

Actualmente, la biología sintética se encuentra en constante crecimiento ya que los nuevos sistemas diseñados son potencialmente más robustos y eficaces que los que existen en la naturaleza (Purnick y Weiss, 2009), y el espectro de aplicaciones relevantes como la industria biotecnológica, producción de biocombustibles, productos químicos de alta complejidad de síntesis, computación molecular y lógica, bioinformática e ingeniería de proteínas, diagnóstico médico, comunidades microbianas artificiales, remediación ambiental, entre otras, está en aumento (Hsiao et al., 2018).

### 1.1.1 Ciclo de trabajo

Un circuito genético sintético consiste en la integración de todos los componentes de un sistema biológico diseñado para realizar determinadas funciones, de forma que se comporte de manera similar a la maquinaria natural (López, 2006). Para crear un sistema biológico sintético cuyas características y funciones sean las deseadas, seguiremos el ciclo mostrado en la Figura 1.1 de Diseño-Construcción-Test-Aprendizaje (Design-Build-Test-Learn en inglés o DBTL) de la biología sintética.



**Figura 1.1 Metodología cíclica de la biología sintética.** Los cuatro pasos fundamentales (diseño, construcción, test y aprendizaje) permiten el desarrollo de sistemas de forma más eficiente.

## **Diseño**

En primer lugar, es conveniente realizar el diseño del sistema sintético *in silico*. Este paso se basa en la descripción detallada del sistema que se requiere crear, en la elaboración de un modelo matemático del mismo y su simulación computacional. Se pretende emular el comportamiento y las interacciones de todas las especies bioquímicas del sistema genético, siendo fiel a su estructura biológica.

La adaptación más cercana a la función deseada podemos conseguirla realizando múltiples simulaciones y optimizaciones de los parámetros del modelo matemático diseñado, modificando variables de entrada y de salida, y simulando diferentes condiciones y perturbaciones del medio.

El principal beneficio del diseño *in silico* es la gran cantidad de información recabada que nos permite realizar una construcción e implementación seguras, y que se traducirán en el ahorro de recursos y tiempo en los pasos subsecuentes.

## **Construcción**

En segundo lugar, tenemos la construcción en el laboratorio del sistema diseñado. Gracias al avance de las técnicas moleculares, es posible implementar un circuito genético seleccionando sus partes biológicas básicas (promotor, RBS, y gen o genes deseados) en *Escherichia coli* (E.coli), que es el microorganismo o chasis mejor caracterizado en el laboratorio.

## **Test**

En tercer lugar, se lleva a cabo el test, que es la realización de experimentos que corroborarán el funcionamiento del sistema construido en las etapas anteriores.

## **Aprendizaje**

La última etapa se basa en el estudio y análisis de los resultados experimentales obtenidos del circuito diseñado. Tras la evaluación de los datos, se pueden generar nuevas hipótesis y hasta reconducir su utilidad. En un nuevo ciclo, podemos rediseñar el circuito genético con todo lo aprendido, con la finalidad de mejorarlo y optimizarlo.

### **1.1.2 Circuitos genéticos**

Los circuitos genéticos son sistemas sintéticos donde uno o más genes interactúan entre ellos y realizan la función específica deseada. En cada organismo vivo hay formada una compleja red genética que les permite adaptarse a cambios ambientales, señales químicas, temperatura, pH o luz (Brophy y Voigt, 2014). La biología sintética aprovecha dichas redes para implementar una nueva función programable en otro organismo (Xia et al., 2019), que generalmente regula la transcripción y traducción de una proteína codificada por un gen específico.

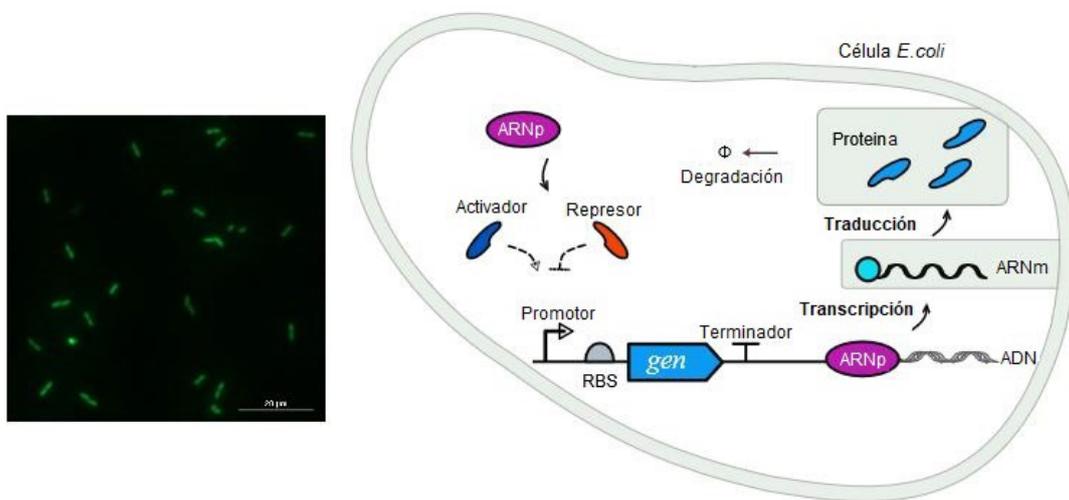
El diseño y síntesis de un circuito genético no es una tarea sencilla ya que es necesario el cumplimiento de diferentes características (Xia et al., 2019):

- Alto nivel de activación, pero un bajo ruido tras la desactivación.

- Ortogonalidad de todas sus partes, es decir, evitar la interacción de las especies bioquímicas del sistema con otras para las que no fueron diseñadas.
- Estabilidad en el chasis u hospedador del circuito diseñado para que no sea expulsado y asegurar su rendimiento a largo plazo.

### 1.1.2.1 Partes básicas

Los circuitos genéticos están integrados por unidades transcripcionales (UT) como observamos en la Figura 1.2, y estas a su vez, por partes básicas o biopartes. Cada una de las biopartes corresponde a una secuencia de ADN que se puede combinar con otras diferentes para formar unidades transcripcionales según la necesidad. A su vez, varias unidades transcripcionales se pueden también combinar para formar circuitos más complejos.



**Figura 1.2 Un circuito genético y los eventos necesarios para la obtención de una proteína determinada.** Esquema de un circuito genético con su unidad transcripcional y sus cuatro partes básicas. Además, se representan los eventos sucesivos necesarios para obtener la proteína: la transcripción modulada por activador o represor, que es iniciada por la ARNp, la traducción, que da lugar a la formación de la proteína a partir del ARNm, y la posterior degradación de la proteína. A la izquierda se representa la visualización de la proteína finalmente generada (GFP).

Las cuatro partes básicas que forman las unidades transcripcionales son:

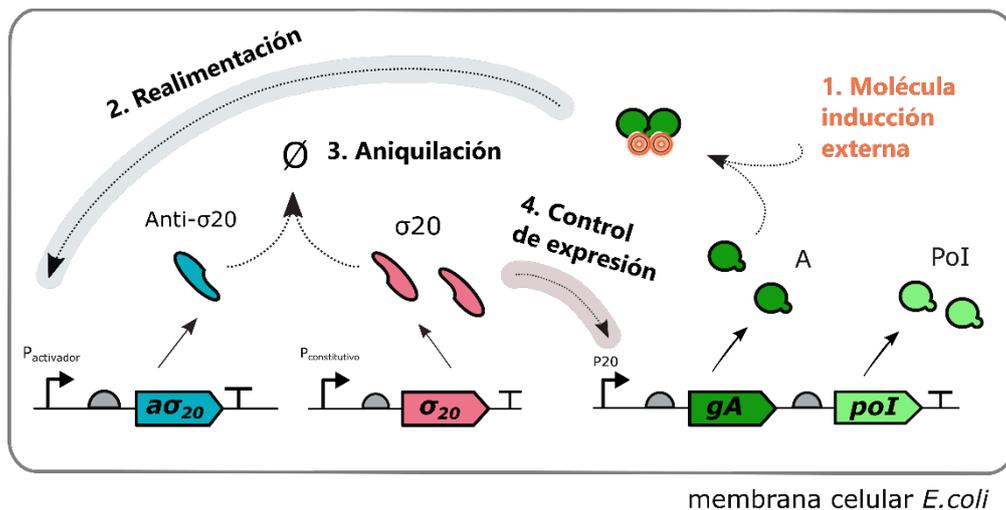
- Promotor:** secuencia de ADN que atrae y recluta a la ARN polimerasa (ARNp). Existen dos tipos de promotores: *constitutivos e inducibles*. Los constitutivos transcriben el ADN a una tasa constante y sin depender de factores externos, mientras que los inducibles dependen de factores de transcripción (FT) que modulan su tasa transcripcional. Estos factores pueden ser tanto activadores como represores, aumentando o disminuyendo la tasa de transcripción respectivamente.
- Sitio de unión ribosomal o RBS:** secuencia del ARNm de la que depende el inicio de la traducción.
- Secuencia de codificación o CDS:** secuencia de ADN que se transcribe como una molécula de ARNm, y se traduce como la proteína de interés.

- d) **Terminador transcripcional:** última secuencia del circuito, que indica el lugar donde se debe interrumpir la transcripción, disociando la ARNp del ARNm.

Estos cuatro elementos deben ser integrados en un vector (plásmido) antes de ser transformado en un microorganismo como *E. coli*. El plásmido incluye tanto el origen de replicación, que nos indicará el número de copias de ese plásmido, como la resistencia al antibiótico, necesaria para la selección de las bacterias que llevan el plásmido con el circuito diseñado.

## 1.2 Controlador antitético

Un controlador antitético sintético es un circuito genético que utiliza motivos antitéticos para la regulación de la expresión de una proteína de interés (PoI) mediante realimentación negativa (ver Figura 1.3). La estructura genética de dicho controlador, propuesto recientemente en Briat et al., (2016), permite la aniquilación mutua de dos proteínas tras su secuestro molecular (antitéticas), con la finalidad de obtener una regulación eficiente de otra proteína.



**Figura 1.3 Funcionamiento del controlador antitético mediante realimentación.** La PoI debe mantenerse a una concentración deseada, ya sea disminuyendo su sobreproducción o incrementando su expresión según se requiera. La realimentación se implementa a través de un factor de transcripción y una molécula externa de inducción. Dicho factor de transcripción activará al promotor de Anti- $\sigma_{20}$  que seguidamente secuestra a  $\sigma_{20}$ , reduciendo la actividad de la ARN polimerasa y regulando la expresión de PoI.

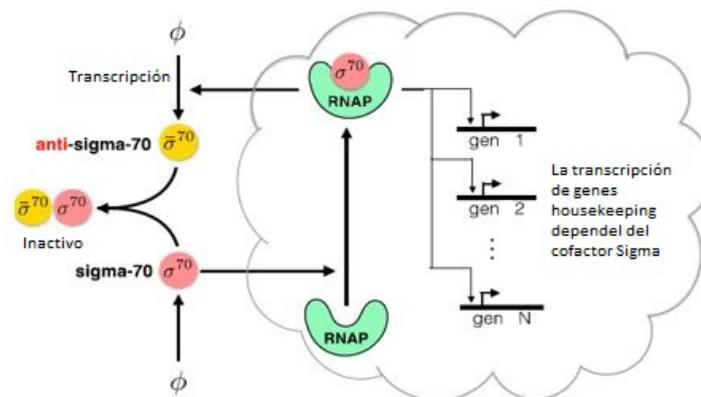
El control de síntesis de PoI viene determinado por el funcionamiento del controlador antitético, ya que Anti- $\sigma_{20}$  será activado solamente en presencia de factor de transcripción formado mediante una proteína del circuito y una molécula de inducción externa. Por ello, se establece una realimentación negativa, es decir, utilizando una proteína sintetizada por el propio circuito, se activará la síntesis de Anti- $\sigma_{20}$  para controlar la concentración de PoI. De este modo, la concentración de PoI se mantendrá en la línea base de producción establecida, variando lo mínimo posible con el tiempo y respondiendo ante perturbaciones.

### 1.2.1 Componentes

Las proteínas antitéticas se representan con los factores extracitoplasmáticos Sigma ( $\sigma$ ). Estos factores son proteínas bacterianas modulares que reconocen una secuencia específica de la ARNp ante determinadas condiciones (Rhodius et al., 2013). Por ejemplo, la percepción de estrés conduce a la unión del factor  $\sigma$  a la ARNp con la finalidad de ligarse seguidamente a un promotor  $\sigma$  inducible, permitiendo una respuesta de regulación génica mucho más rápida que lo normal (Figura 1.4).

Es posible conseguir funciones extracitoplasmáticas (ECF) de regulación con los factores  $\sigma$ . Para ello, es necesario también disponer del factor Anti-sigma complementario ( $\alpha\sigma$ ), que lo aniquile, y un promotor  $\sigma$  inducible específico, al que active. Por lo tanto, cada subgrupo de ECF está formado por los tres elementos siguientes:

- Factor  $\sigma$ :** provoca el aumento de afinidad de la ARNp por el promotor  $\sigma$ , elevando la expresión génica de la unidad transcripcional.
- Factor  $\alpha\sigma$ :** Inhibidor de la función del factor  $\sigma$ . Recluta a su complementario, formando el complejo  $\sigma\cdot\alpha\sigma$ , y se lleva a cabo la aniquilación de ambos.
- Promotor  $\sigma$ :** Mantiene su función inducida por el factor  $\sigma$  tras la unión a la ARNp.



**Figura 1. 4 Proteínas antitéticas y su papel en la regulación génica.** Los componentes del controlador se identifican con los círculos rosa y amarillo. La unión del factor Sigma a la polimerasa provoca una regulación génica, que será controlada, a su vez, por la síntesis del factor Anti-sigma, ya que aniquilará al factor Sigma. Adaptada de Briat et al. (2016).

La síntesis de los dos factores determina el funcionamiento del controlador antitético, cuya interacción y formación del complejo ( $\sigma\cdot\alpha\sigma$ ) concluye en la aniquilación de las dos proteínas. Cuando el factor  $\alpha\sigma$  ha secuestrado al factor  $\sigma$ , la unión al promotor  $\sigma$  inducible disminuirá notablemente, controlando de esta forma la expresión del gen deseado.

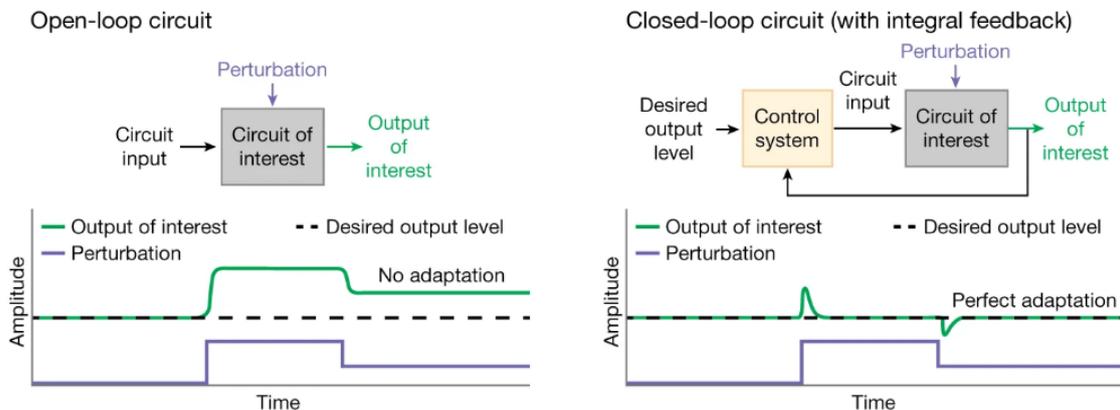
Hay un gran reservorio de factores  $\sigma$  ortogonales, propiedad indispensable para conectar diferentes circuitos programables sobre rutas metabólicas o funciones celulares. La ortogonalidad asegura que la interacción entre los factores y los componentes de la red génica sean específicos y no interfieran en la regulación, puesto que es preferible que el ruido sea mínimo (Rhodius et al., 2013). El factor  $\sigma$  seleccionado debe interactuar únicamente con su complementario  $\alpha\sigma$  y regular solamente un promotor  $\sigma$  específico, asegurando dicha propiedad.

## 1.2.2 Efecto sobre la regulación de síntesis de proteínas

El controlador antitético se sirve de motivos antitéticos para conseguir la regulación de una determinada proteína o metabolito en presencia de perturbaciones, de manera que su concentración se mantenga en la línea base establecida. En la Figura 1.5 se puede observar el funcionamiento de un circuito cuando el bucle está abierto y cuando está cerrado (Aoki et al., 2019), es decir, cuando sigue una regulación estática y una dinámica, respectivamente.

El bucle abierto no tiene el controlador antitético o no se encuentra activo, y por lo tanto, no existe regulación de la proteína de interés.

Sin embargo, el bucle cerrado tiene el controlador antitético activo, lo que hace que la proteína tenga una dinámica mucho más rápida de producción, llevando a un valor o referencia deseada, gracias a la activación/inhibición de la señal del controlador antitético.



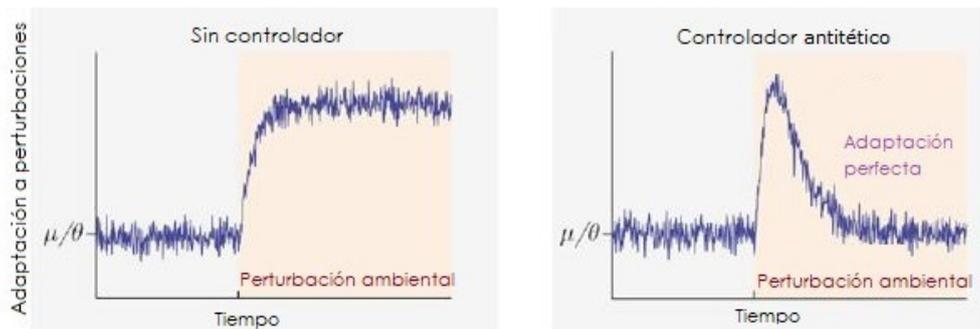
**Figura 1.5 Respuesta del circuito sintético. (izquierda)** En una salida de bucle abierto del circuito sintético se obtiene una respuesta sin adaptación ni robustez al reaccionar contra una perturbación. **(derecha)** La respuesta en el circuito con controlador antitético en bucle cerrado corresponde con las características anteriormente citadas: robustez y adaptación perfecta, demostrando su efectividad. Recuperada de: Aoki et al., 2019.

## 1.2.3 Propiedades

Un controlador antitético posee características como:

- **Adaptación perfecta** es una propiedad de los sistemas biológicos que permite a la célula reaccionar ante un estímulo, provocando un pico de respuesta, y volver al nivel de expresión anterior a la perturbación en el medio (Figura 1.6). Esta propiedad es innata en los organismos vivos y se asocia a la homeostasis celular. La realimentación mediante un controlador antitético provocaría el perfecto cumplimiento de esta característica (Briat et al., 2016).
- **Robustez** ante los estímulos tanto del medio interno como del externo (Briat et al., 2016; Agrawal et al., 2019). El control de la red genética será robusto cuando las perturbaciones del medio no afecten a la síntesis de la proteína objetivo, regulada explícitamente por el motivo antitético. El comportamiento se mantendrá

independiente de los cambios sucedidos y su respuesta permanecerá a la concentración deseada. El control antitético con realimentación está basado en calcular la integral matemática de la desviación de una variable controlada en el tiempo, y usarla para la configuración de realimentación negativa que directamente contrarresta esa desviación y la acerca a cero (Aoki et al., 2019). Mediante este control, logramos robustez incluso en sistemas dinámicos muy ruidosos como los biológicos. Esta característica está directamente ligada a la adaptación perfecta, implicadas ambas en la homeostasis.



**Figura 1. 6 Adaptación perfecta del controlador con realimentación antitética.** Gráfica de adaptación al poseer un controlador antiético en la célula (derecha) o sin controlador (izquierda). Inspirado en Briat et al. (2016).

### 1.3 Aplicabilidad de la biología sintética y el controlador antitético

La biología sintética confiere la capacidad de reprogramar seres vivos con una finalidad trascendental (May, 2015), permitiendo obtener diversas aplicaciones, en ámbitos muy diferentes, representados en la Figura 1.7.



**Figura 1.7 Segmentos de aplicación en la biología sintética.** Cada uno de los segmentos representa un área donde es provechosa la utilización de la biología sintética.

En primer lugar, es factible su uso clínico en el ámbito médico. Existe la posibilidad de construir circuitos tanto en células eucariotas, (Xie y Fussenegger, 2018), como implementar circuitos en microorganismos, por ejemplo, como terapia contra el cáncer (Wu et al., 2019). Del mismo modo, es posible la utilización de biología sintética y la construcción de redes de control en la síntesis de fármacos. La industria farmacéutica necesita de nuevas estrategias para producir de forma masiva, rápida y eficiente, como proponen diferentes estudios (Paddon y Keasling, 2014; Galanie et al., 2015; Courdavault et al., 2020) y la biología sintética puede ser una de ellas.

La agricultura y alimentación son dos ámbitos relacionados donde se está incrementando el uso de biología sintética, cuya finalidad es aumentar los rendimientos (Eleanore et al., 2019; Rogers y Oldroyd, 2014), así como el valor nutricional de alimentos, enriqueciendo los cultivos (Majer et al., 2017), entre otras. Asimismo, la producción de aditivos alimentarios es posible mediante la implementación de circuitos sintéticos (Eichenberger et al., 2017). Los biopolímeros (Moradali y Rehm, 2020) y biocombustibles (Briat y Khammash, 2018) son otro ámbito relevante de aplicación. Aumentar la eficiencia de los bioprocesos y la sostenibilidad ambiental son aspectos fundamentales actualmente, en los que la biología sintética participa.

En este trabajo concretamente, la aplicabilidad se centra en la optimización del controlador antitético para la regulación de la enzima naringenina chalcone sintasa (CHS) que sintetiza el metabolito naringenina a una concentración deseada o de referencia, y con rechazo a perturbaciones. Esta vía metabólica ha sido propuesta en (Boada et al., 2020). La naringenina se clasifica como flavonoide, es decir, una subclase importante de fenilpropanoides vegetales con diversas aplicaciones, que pueden ser utilizados como suplementos alimenticios, antioxidantes, agentes aromatizantes, medicamentos, insecticidas y colorantes. Entre sus propiedades farmacológicas destacan antidislipidémicos, antiobesidad y antidiabéticos y antifibróticos.

## 2. Objetivos

En este trabajo buscamos diseñar, construir, implementar y optimizar un circuito genético antitético capaz de controlar la producción de una proteína o metabolito de interés en *Escherichia coli*, recorriendo el ciclo DBTL de la Biología sintética.

Con el fin de lograr el objetivo principal se plantean otros objetivos específicos:

- Diseñar un circuito genético denominado controlador antitético que nos permita regular la síntesis de una proteína o metabolito de interés para que este alcance una concentración deseada.
- Crear un modelo matemático que nos permita simular y entender el comportamiento del controlador antitético implementado en *E.coli*, confiriendo directrices para la selección de sus partes biológicas.
- Construir e implementar en el laboratorio el circuito genético diseñado utilizando GoldenBraid como método de ensamblaje de ADN.
- Optimizar las partes del controlador antitético diseñado a través de la optimización multiobjetivo de los parámetros de su modelo matemático, para maximizar su rendimiento y robustez en una aplicación que es la ruta metabólica de síntesis de Naringenina.

# 3. Materiales y métodos

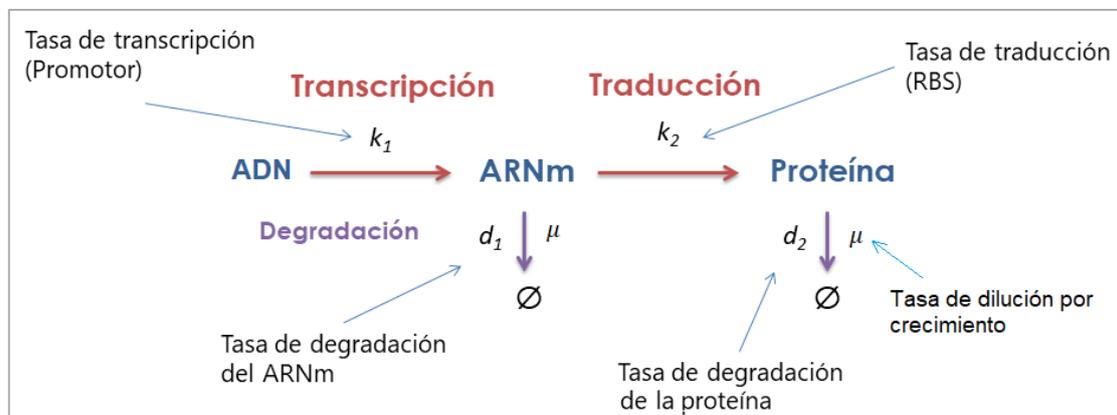
## 3.1 Diseño

### 3.1.1 Modelado determinista

El apartado de diseño se inicia examinando y considerando el tipo de circuito genético que se desea construir, las partes que lo forman y las interacciones que ocurren. Seguidamente, se procede al modelado computacional. El modelo de un sistema nos permite conocer cómo funciona el mismo e incluso formular propuestas de cambio para mejorarlo (Endler et al., 2009). Los sistemas biológicos pueden ser modelados de forma determinista o estocástica. Según (Boada Acosta, 2018) *“el modelado determinista no tiene en cuenta la naturaleza probabilística de las reacciones, pero se obtiene una buena aproximación de las dinámicas de las especies bioquímicas que intervienen en la expresión de un gen”*,

En este trabajo utilizamos un modelado determinista, aunque el modelo del circuito genético es más complejo que los establecidos en la literatura.

Para representar de forma sencilla las distintas etapas del modelado matemático, utilizaremos el siguiente ejemplo genérico, con promotor constitutivo. La Figura 3.1 representa la expresión génica y la formación de proteínas mediante el Dogma central de la biología que establece los dos eventos principales que ocurren en las células: transcripción, mediante la ARN polimerasa y traducción, gracias a los ribosomas.



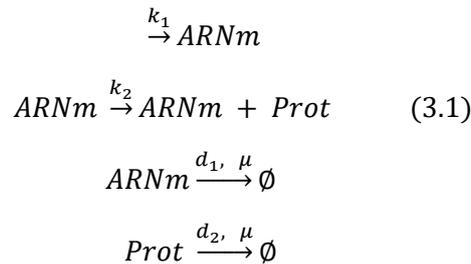
**Figura 3. 1** Esquema de la expresión constitutiva de los genes y la formación de proteínas. Representa las especies bioquímicas que intervienen (ADN, ARNm y proteína), los eventos (transcripción, traducción y degradación) y las diferentes tasas a las que se producen estos procesos. Inspirada en Vignoni, A. iGEM Webinar2020.

### Reacciones bioquímicas de un circuito genético

El primer paso en la elaboración del modelado es establecer un esquema donde intervengan todas las especies bioquímicas y sus interacciones (Figura 3.1), con el objetivo de extraer las reacciones bioquímicas para cada especie del circuito.

Las consideraciones (Boada et al., 2018) tenidas en cuenta antes de establecer las reacciones bioquímicas son: la cantidad de ARN polimerasa (ARNp) no es limitante, por tanto, capaz de transcribir todos los genes necesarios en un instante de tiempo dado; la unión de la ARNp al promotor es una reacción rápida; la transcripción y la traducción son procesos irreversibles y complejos; y la degradación de proteínas y ARNm es una reacción irreversible.

Las reacciones bioquímicas genéricas de transcripción, traducción y degradación de un circuito genético simple se representan en 3.1, donde el promotor se considera constitutivo y por ello, la tasa de transcripción es constante. En el siguiente capítulo, veremos que los promotores inducibles necesitan de un modelado específico. El conjunto de reacciones bioquímicas 3.1 representa la expresión constitutiva de un gen.



donde la especie ARNm corresponde con el ARN mensajero y Prot con la proteína de interés;  $k_1$  y  $k_2$  son tasas efectivas de transcripción y traducción respectivamente,  $d_1$  y  $d_2$  son las tasas de degradación de cada especie y  $\mu$  la tasa de crecimiento específico.

### **Ley de Acción de masas**

La Ley de Acción de masas recoge que, para cualquier reacción elemental, es decir, con coeficientes estequiométricos igual a uno, la tasa de reacción (velocidad) es proporcional al producto de concentraciones de los reactivos. Estos estarán elevados a una potencia, definida por la estequiometría de la reacción (Alon 2019).

Según Chellaboina et al. (2009), a partir de las reacciones bioquímicas, y gracias a la Ley de acción de masas (LAM), establecemos el balance dinámico de las especies como ecuaciones diferenciales ordinarias (ODE). Estas ecuaciones ODE deberán ajustarse estequiométricamente a través de tasas de reacción o constantes cinéticas, que pueden ser extraídas de estudios previos (como en este caso), o de técnicas experimentales.

### **Modelado de la transcripción y la traducción**

El modelado de la transcripción y traducción lo realizamos mediante ecuaciones diferenciales ordinarias (ODE) (Boada et al., 2018). Tras el establecimiento de las reacciones bioquímicas y gracias al empleo de la Ley de Acción de masas, obtenemos el modelo del circuito.

Planteamos las ecuaciones ODE del ejemplo genérico mencionado. De las reacciones mostradas en (3.1) obtenemos el siguiente conjunto de ecuaciones (3.2) que describe la dinámica de la expresión:

$$\begin{aligned}\frac{d[ARNm]}{dt} &= k_1[Gen] - (d_1 + \mu)[ARNm] \\ \frac{d[Proteína]}{dt} &= k_2[ARNm] - (d_2 + \mu)[Proteína]\end{aligned}\quad (3.2)$$

donde [ARNm] y [Proteína] representan el número de moléculas de ARNm y Prot respectivamente. Sumando aparecen los términos que dan lugar a la formación de la especie y restando los que provocan su degradación, junto a los ratios correspondientes de cada proceso.

### **Modelado del crecimiento celular en un biorreactor**

El crecimiento celular se encuentra modelado por la ecuación 3.3:

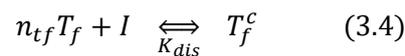
$$\frac{dN}{dy} = \mu N \left(1 - \frac{N}{N_{m\acute{a}x}}\right) \quad (3.3)$$

donde N es el número de células y  $N_{m\acute{a}x}$  la capacidad máxima o número de células máximo en el biorreactor. Por lo tanto, las ecuaciones (3.2) y (3.3) modelan la expresión de una proteína dentro de una célula de las N que viven y se multiplican en una población celular.

### **Función de Hill para modelado del promotor**

Cuando los promotores utilizados en el sistema no son constitutivos, necesitamos realizar el modelado añadiendo nuevos parámetros. En el caso de los promotores inducibles, es decir, activados o reprimidos por un factor de transcripción (FT) se utiliza la función de Hill (Hill, 1910; Alon, 2019), a la que le añadiremos el número de copias.

Como en Trabelsi et al., (2018), consideramos que un FT forma multímeros (monómeros, dímeros, etc.). Comenzaremos teniendo en cuenta el equilibrio de la ecuación 3.4.



donde  $n_{tf}$  es el número de moléculas de la especie  $T_f$  en unidades de concentración,  $I$  es la concentración del inductor,  $T_f^c$  es la concentración del multímero formado de la reacción, y  $K_{dis}$  es la constante de disociación del complejo  $T_f^c$ .

Ignorando el orden de unión de las especies, porque no es importante para el equilibrio fina del producto sino únicamente para la cinética (no considerada aquí); y dadas las rápidas escalas de tiempo, se tiene la ecuación:

$$T_f^c = \frac{I \cdot T_f^{n_{tf}}}{K_{dis}} \quad (3.5)$$

La constante de disociación  $K_{dis}$  depende del inductor y de la proteína considerada en cada reacción. La ecuación clásica de Hill (3.6) considera,  $n$  como el exponente de cooperación y representa el número de moléculas del complejo inductor FT necesarias para iniciar a transcripción, y  $Kd$  es la concentración de FT necesaria para la inducción media-máxima:

$$P_{fold} = \frac{(T_f^c)^n}{(K_d)^n + (T_f^c)^n} \quad (3.6)$$

Sin embargo, el número de copias del plásmido cambia el número de sitios de unión del FT al promotor (proporcional al número de plásmidos ( $n_{copy}$ ) en nuestra construcción, ya que existe cooperación y por lo tanto más de un sitio de unión por plásmido). La ecuación 3.6 se modifica teniendo en cuenta el hecho de que, para alcanzar la saturación media-máxima de un número mayor de sitios de unión, el número de complejos FT también tiene que ser mucho mayor:

$$P_{fold} = \frac{(T_f^c)^n}{(K_d \cdot n_{copy})^n + (T_f^c)^n} \quad (3.7)$$

Reemplazando la ecuación 3.5 en la 3.7 se obtiene la nueva función de Hill para modelar el promotor teniendo en cuenta el número de copias de un plásmido:

$$P_{fold} = \frac{I^n}{\left(\frac{K_d \cdot K_{dis} \cdot n_{copy}}{T_f^{n_{tf}}}\right)^n + I^n} \quad (3.8)$$

### 3.1.2 Simulación computacional

Utilizamos simulaciones computacionales para analizar el comportamiento de cada especie bioquímica en un circuito genético. Los materiales utilizados para el diseño, modelado matemático y simulación del circuito genético propuesto en este trabajo se basan en el *software* MATLAB®, y consta de tres archivos:

1. *Main.m* que es el ejecutable principal que contiene la configuración de la simulación y las condiciones iniciales de cada especie del controlador antitético,
2. *parameters.m* que contiene los valores de los parámetros del modelo,
3. *modelo\_antithetic.m* que contiene las ecuaciones ODE del modelo.

### 3.1.3 Optimización de parámetros del modelo matemático

A fin de cumplir los objetivos de comportamiento de un circuito genético diseñado, se pueden optimizar los valores de algunos parámetros del modelo matemático (Boada et al., 2016). El enfoque seleccionado en este trabajo es la optimización multiobjetivo (MOOD) realizada con el *software* MATLAB®, que minimiza dos o más funciones de coste simultáneamente, en función de un conjunto de variables de decisión (Miettinen, 2012).

Las funciones de coste u objetivos, generalmente, están en conflicto y tras la optimización se genera un conjunto de soluciones óptimas denominado *Frente Pareto*. Todas las soluciones del *Frente de Pareto* que representan valores de las variables de decisión son útiles, y se puede

seleccionar la mejor entre ellas según se requiera. El enfoque MOOD sigue los siguientes pasos iterativos para optimizar los parámetros de un modelo:

- i) Definir el problema multiobjetivo (definir objetivos a optimizar)
- ii) Realizar la optimización para obtener las soluciones (*Frente de Pareto*)
- iii) Seleccionar entre los resultados la mejor solución

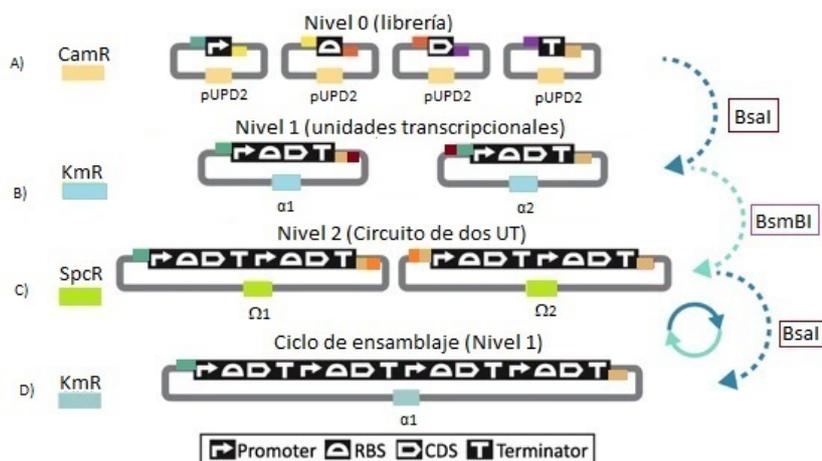
Finalmente, las variables de decisión son los valores paramétricos del modelo del circuito genético optimizados, y a su vez representan un conjunto de **directrices para seleccionar las partes del circuito** previo a su implementación *in vivo*. Por lo tanto, el promotor, RBS, u origen de replicación del plásmido escogidos serán los más eficientes para el circuito sintético diseñado.

## 3.2 Construcción

En este apartado se detallan los pasos a seguir durante la implementación en el laboratorio del controlador antitético diseñado.

### 3.2.1 Ensamblaje de ADN utilizando GoldenBraid

El circuito es diseñado y caracterizado debe sintetizarse e implementarse experimentalmente en el laboratorio, utilizando *Escherichia Coli*. Con esta finalidad utilizamos el sistema de ensamblaje GoldenBraid (Sarrion-Perdigones, 2011), una técnica de ensamblaje de ADN sencilla y eficiente (Figura 3.2). En sus inicios, GoldenBraid fue un proceso descrito en plantas, pero que puede adaptarse perfectamente a los circuitos genéticos construidos en bacterias.



**Figura 3. 2 Esquema del ensamblaje GoldenBraid con varios niveles.** Se representan los plásmidos con sus componentes, la resistencia al antibiótico y las secuencias flanqueantes esenciales para el ensamblaje de niveles posteriores. Además, aparecen a la derecha las enzimas de restricción de cada reacción. A) Vectores obtenidos de la domesticación de las partes básicas y se forma un repositorio. B) Plásmidos ensamblados de Nivel 1 ( $\alpha$ ), que facilita la formación de las unidades transcripcionales. C) Plásmidos del Nivel 2 ( $\Omega$ ). Figuran la unión de dos unidades transcripcionales. D) Plásmido que representa el ciclo de ensamblaje, la utilización de vectores  $\alpha$  para formar un circuito más complejo, con cuatro unidades transcripcionales. Adaptada de Vecchione y Fritz (2019).

Este método diseñado en 2011, y mejorado posteriormente (Sarrion-Perdigones et al., 2013; Vazquez-Vilar et al., 2017), se basa en la metodología Golden Gate (Engler et al., 2008), es decir, utiliza enzimas de restricción IIS, que cortan el material genético alejado del sitio de reconocimiento, permitiendo ensamblajes sin acumulación de sitios de reconocimiento. GoldenBraid es una estrategia de ensamblaje binaria, y permite la construcción de sistemas multigénicos, usando dos niveles de ensamblaje (Nivel 1 y 2), y dos tipos de plásmido por nivel ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  y  $\Omega_1$ ,  $\Omega_2$ , respectivamente).

Inicialmente, para llevar a cabo esta metodología, es necesaria la domesticación de las partes básicas (Nivel 0). Mediante este proceso se adapta cada parte a la estrategia GoldenBraid (Sarrion-Perdigones, 2011). El primer paso es insertar la parte básica de interés (promotor, RBS, CDS o terminador transcripcional), que corresponderá al inserto, en un plásmido pUPD2, utilizado como vector. Dichas partes estarán flanqueadas por unas secuencias determinadas, que permitirán que la nueva construcción contenga sitios de reconocimiento específicos, necesarios en ensamblajes posteriores. Además, el plásmido de destino incluye un origen de replicación pUC, y resistencia al antibiótico cloranfenicol (Figura 3.1A).

Las partes básicas empleadas en este trabajo aparecen descritas en la Tabla 3.1.

**Tabla 3.1. Partes básicas usadas en ensamblaje mediante GoldenBraid.** La referencia indica el código correspondiente en la colección de iGEM o la cita que la utilizó previamente. Todas ellas se encuentran en un plásmido con resistencia a cloranfenicol.

Nombre	Tipo	Descripción	Referencia
J23106	Promotor	Promotor constitutivo	BBa K2656004
Plux	Promotor	Promotor inducible, regulado por el dímero AHL-LuxR	BBa K2656003
P20_992	Promotor	Promotor inducible, regulado por la $\sigma_{20}$ (S20_992)	Rhodium y col. 2013
PluxR	Promotor	Promotor inducible, regulado negativamente por el dímero AHL-LuxR	BBa K199052
B0030	RBS	RBS fuerte	BBa K2656009
GFPmut3b	CDS	Proteína fluorescente verde	BBa K2656022
GFP- <i>lva</i>	CDS	Proteína fluorescente verde con degradación acelerada	BBa K082003
LuxR	CDS	Proteína LuxR	BBa K2656016
S20_992	CDS	$\sigma_{20}$ : cofactor de la ARNp	Rhodium y col. 2013
AS20_992	CDS	Proteína anti- $\sigma_{20}$	Rhodium y col. 2013
mRFP	CDS	Proteína fluorescente roja	BBa K2656026
mRFP_ <i>lva</i>	CDS	Proteína fluorescente roja con degradación acelerada	BBa E0010
B0015	Terminador	Terminador transcripcional	BBa K2656026

Tras obtener todas las partes básicas domesticadas en un vector pUPD2 (Nivel 0), se procede al ensamblaje de la unidad transcripcional (ver Figura 3.1B), correspondiente al Nivel 1 (Sarrion-Perdigones, 2011). En este caso, los insertos son todas las partes básicas correspondientes domesticadas y el vector de destino será un vector  $\alpha$ . Por su parte, dicho vector, presenta resistencia al antibiótico kanamicina y un origen de replicación pUC. El Nivel 2 se basa en la unión de dos unidades transcripcionales previamente ensambladas en el Nivel 1 (Figura 3.1C). En este caso, los insertos procederán de los plásmidos  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$ , y el vector de destino será  $\Omega$ , con resistencia al antibiótico espectinomomicina. De esta manera, obtendríamos un plásmido con dos genes distintos, es decir, que codificará dos proteínas diferentes.

Si el objetivo recae sobre la construcción de un plásmido con más de dos unidades transcripcionales, será posible unir las mediante los plásmidos  $\Omega_1$  y  $\Omega_2$ , con un vector de destino de Nivel 1 ( $\alpha$ ). Por tanto, es factible combinar tantas unidades transcripcionales como sea necesario, de forma que siempre las uniremos de dos en dos (método binario), cuando se hallen localizadas en vectores compatibles. Se constituye un ciclo de trabajo en el que dos vectores  $\alpha$  se unen en un  $\Omega$ , y seguidamente dos  $\Omega$  en un  $\alpha$  (ver Figura 3.1D), hasta que el circuito quede totalmente integrado, conforme al diseño previsto.

Existe un nivel de plásmidos adicional, constituido por los plásmidos  $\beta$  (Requena, 2019). Este nivel permite el ensamblaje de un bicistrón, es decir, un ARNm que contiene la información necesaria para traducir dos proteínas diferentes. Este caso sería parecido al Nivel 1, nos permite unir partes básicas en un plásmido, exceptuando el promotor o terminador. Es posible realizarlo si el primer vector ( $\beta_1$ ) está formado por el promotor deseado, la RBS, y la CDS, y el plásmido  $\beta_2$  contiene la RBS, la CDS y el terminador. Estos dos serán unidos en un vector  $\Omega$ .

En este trabajo se utilizan 3 niveles de ensamblaje, utilizados como vectores de destino los detallados en la Tabla 3.2.

**Tabla 3.2. Plásmidos de destino usados en los diferentes niveles.**

Nombre	Nivel	Resistencia a antibiótico
pARK $\alpha_1$	1	Kanamicina
pARK $\alpha_2$	1	Kanamicina
pARK $\beta_1$	1	Kanamicina
pARK $\beta_2$	1	Kanamicina
pRMS $\Omega_1$	2	Espectinomicina
pRMS $\Omega_2$	2	Espectinomicina
pARK $\alpha_1$	3	Kanamicina
pARK $\alpha_1$	3	Kanamicina

La ventaja del método de ensamblaje GoldenBraid reside en la posibilidad de utilizar solo dos niveles de plásmidos para construir circuitos genéticos realmente complejos. Facilita la formación de un bucle de trabajo rápido y sencillo, permitiendo el ensamblaje de varias partes en una sola reacción. Siguiendo el protocolo de GoldenBraid, se añaden todos los componentes de la reacción (detallados en la Tabla 3.3) en un mismo tubo. Sin embargo, es fundamental adaptar la reacción al plásmido que se desea ensamblar, ya que el ADN utilizado será diferente, así como la enzima de restricción. Además, existen unas condiciones de reacción establecidas, recogidas en la Tabla 3.4.

**Tabla 3.3. Componentes de la reacción de GoldenBraid.** Todos los componentes son añadidos a cada reacción, variando únicamente el ADN (en relación a los plásmidos utilizados) y la enzima de restricción (BsaI, en plásmidos  $\alpha$ , y BsmBI, en plásmidos  $\Omega$ ).

Componente	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
Enzima de restricción IIS (BsaI o BsmBI)	1
T4 DNA ligase	1
T4 DNA ligase buffer 10x	1.5
BSA 10x	1.5
ADN	75 ng de cada plásmido
dH <sub>2</sub> O	Hasta completar
Total	15

Tabla 3.4. Condiciones de trabajo para las reacciones de GoldenBraid.

Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Número de ciclos
37	10	1
37 16	3 4	25
50	10	1
80	10	1

### 3.2.2 Transformación

Los plásmidos construidos con anterioridad deben ser clonados en *Escherichia Coli*. Para ello, es necesaria la transformación de estas mediante electroporación o choque térmico.

La electroporación, que consta de la formación de poros acuosos en la membrana, fue la más usada durante los experimentos. En este caso se utiliza *E.coli* 10G<sup>®</sup> electrocompetentes (Lucigen). El primer paso señalado es mantener en frío las bacterias, que se conservan a -80°C. Se les añade 2-3 µL del plásmido ensamblado (aproximadamente 50 ng), se homogeniza y se colocan sobre una cubeta de electroporación. Seguidamente se electroporan a 1700V durante 2300 ms. Tras este shock, se añaden en la cubeta 700 µL de medio de supervivencia SOC. El volumen total de la cubeta lo traspasamos a un tubo de ensayo, que pondremos a crecer en el incubador a 37°C y 250 rpm durante 1 o 2 horas, dependiendo del tipo de antibiótico utilizado y del número de copias del plásmido. Crecerá 1 hora cuando el medio contenga kanamicina o muchas copias del plásmido, y 2 con espectinomina y cloranfenicol o pocas copias del plásmido. Finalmente, el cultivo crecido en SOC lo inoculamos sobre el medio sólido LB con Agar al 1.5%, y el antibiótico correspondiente, y crecerá overnight a 37°C.

También fue utilizado el choque térmico, con bacterias *E.coli* 10G<sup>®</sup> quimiocompetentes (Lucigen). En primer lugar, se mantienen en frío (4°C) durante 30 minutos, seguidamente, se produce un shock a 40°C durante 30 – 45 segundos. Finalmente, se añade medio de supervivencia SOC y se ponen a crecer a 37°C y 250rpm durante una hora. Del mismo modo que con el protocolo anterior, las bacterias se inoculan en un medio sólido LB con Agar al 1.5% y antibiótico para crecer overnight a 37°C.

### 3.2.3 Cultivos celulares

Podemos diferenciar dos tipos de medios de cultivo, según el estado en el que se encuentren. En este trabajo hemos utilizado tanto medios líquidos como sólidos.

#### **Medios de cultivo líquidos**

##### **- Super optimal broth with catabolite represión (SOC)**

Este medio de cultivo es el empleado durante la transformación. Su preparación se inicia con la elaboración del medio SOB, formado por 20 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 2 mL de 5M NaCl, 2.5 mL de 1 M KCl, 10 mL de 1 M MgCl<sub>2</sub> y 10 mL MgSO<sub>4</sub>. Esto se añade en un matraz y se enrasa con agua destilada hasta 1 L. Todo se homogeniza y esteriliza en autoclave. Finalmente, una vez enfriado el SOB, se le añade 20 mL de glucosa 1 M

esterilizada. En este caso utilizamos 700  $\mu$ L de medio de cultivo y se mantiene creciendo durante una hora a 37°C.

- **LB Broth**

El medio de cultivo LB se prepara añadiendo 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 5 g de NaCl y 1 L de agua destilada. También se homogeniza y esteriliza en el autoclave. Una vez enfriado y listo para la inoculación de bacterias, se añade el antibiótico correspondiente a 1000x de la solución madre, a una concentración final dependiente del tipo de antibiótico. Kanamicina y espectinomicina las utilizamos a una concentración final de 50  $\mu$ g/mL, mientras que cloranfenicol lo utilizamos a 35  $\mu$ g/mL. Generalmente, empleamos 4 mL del medio inoculado con las bacterias y 4  $\mu$ L del antibiótico 1000x conveniente, se incuba overnight a 37°C y 250 rpm.

Todos los cultivos en líquido se han realizado en este medio, excepto el cultivo durante la transformación, que requiere la utilización de SOC, y los experimentos de medición, en los que se emplea M9.

- **M9 minimal media**

Los componentes del medio de cultivo M9 son 12,5 g de Medium Broth Powder (VWR Amresco Life Science) diluidos en 1 L de agua destilada. Se homogeniza y esteriliza en autoclave. Además, en condiciones asépticas se le añaden 2 mL de 1 M MgSO<sub>4</sub>, 10 mL de glucosa al 20% y 0.1 mL de 1M CaCl<sub>2</sub> esterilizados por filtrado. Del mismo modo que en el medio LB, se añade 1000x de la solución de antibiótico cuando sea necesario, a una concentración final igual a la indicada en el medio LB. Se utiliza este medio para realizar el cultivo de una colonia individual utilizando 4 mL de medio, 4  $\mu$ L de antibiótico y se deja crecer overnight a 37°C y 250 rpm.

### **Cultivos sólidos en placa Petri**

Los cultivos sólidos en placas Petri son interesantes cuando queremos seleccionar la colonia o colonias que han insertado el plásmido mediante la transformación bacteriana. La elaboración del medio LB sólido se lleva a cabo añadiendo 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 5 g de NaCl y 20 g de Agar-agar, en un litro de agua destilada. Se homogeniza y esteriliza en el autoclave.

Del mismo modo que en los medios anteriores, se añade un volumen 1000x de solución antibiótica a una concentración final igual a la indicada en los medios anteriores. Se reparten 25 mL del de cultivo en las placas y se deja gelificar. El cultivo se realiza inoculando sobre la placa las bacterias, en condiciones asépticas, y se dejan crecer overnight a 37°C.

### **3.2.4 Conservación bacteriana en glicerol**

El glicerol es utilizado para almacenar bacterias a -80°C sin que sufran deterioro y se mantengan intactas al descongelar, con el objetivo de mantener un stock de las bacterias con el plásmido deseado. En este protocolo también se utiliza el cultivo crecido en LB líquido (1440  $\mu$ L) y se le

añaden 360  $\mu\text{L}$  de glicerol al 80%. La mezcla se introduce en un criovial en condiciones estériles, se homogeniza y conserva a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 3.2.5 PCR de colonias (cPCR)

La cPCR tiene como finalidad amplificar la región inserto del plásmido transformado en *E.Coli*. Para ello, inicialmente se selecciona una colonia aislada del cultivo sólido, con la finalidad de asegurar el crecimiento de un solo tipo celular. Esta se introduce en 50  $\mu\text{L}$  de agua desionizada estéril. La cPCR se lleva a cabo mediante el kit *Taq DNA Polymerase kit with Standard Taq buffer* (New England Biolabs). En este estudio los primers utilizados se denominan Ver\_TU\_FW y Ver\_TU\_RV (Tabla 3.5) y los demás componentes y condiciones de la reacción se encuentran en las Tabla 3.6 y 3.7. Para realizar la amplificación es necesaria la utilización de primers que flanqueen el inserto localizado en el plásmido ensamblado con GoldenBraid.

**Tabla 3.5. Primers utilizados en el laboratorio y sus características.**

Nombre	Secuencia	Temperatura hibridación
Ver_TU_FW	GCAACCTCTCGGGCTTCTGGAT	60,7°C
Ver_TU_RV	ACAGCGACTTAGTTTACCCGCCA	60,3°C

**Tabla 3.6. Componentes de la reacción cPCR.**

Componente	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
10x Standard Taq buffer	2
10 mM dNTPs	2
Cebador Directo 10 $\mu\text{M}$	0.4
Cebador Reverso 10 $\mu\text{M}$	0.4
Taq DNA polymerase	0.1
Colonia inoculada en agua	5
dH <sub>2</sub> O	10.1
Volumen total	20

**Tabla 3.7. Condiciones establecidas de la reacción cPCR.**

Nombre	Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	95	2 min	1
Desnaturalización	95	20 s	30
Alineamiento	56	1 min	
Extensión	68	1 min/kb	
Extensión final	68	5 min	1

### 3.2.6 Electroforesis en gel de agarosa

Tras la amplificación del ADN es conveniente realizar una electroforesis para comprobar que el tamaño de inserto obtenido se corresponde con el diseñado anteriormente. En este proyecto se han utilizado geles de agarosa al 1% con RedSafe™ Nucleic Acid Staining (20000x) (Intron). Una

vez establecido el gel, se cargan las muestras utilizando Loading Dye Purple (6X) (New England Biolabs) y O'GeneRuler 1 kb ADN Ladder como marcador de tamaño (Fisher Scientific).

### 3.2.7 Extracción del material celular (Miniprep)

Los cultivos en LB líquido crecidos durante la noche, son utilizados para realizar miniprep, donde se extraerá el plásmido de interés y se procederá a su secuenciación. Este método se realizó mediante el kit QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen). En primer lugar, se introduce el cultivo en tubos de microcentrífuga, donde separamos las células del medio de cultivo por medio de centrifugaciones. Estas células serán lisadas y el material genético será retenido en una columna de afinidad. Finalmente, el plásmido será eluido con tampón de elución y estará preparado para secuenciar.

### 3.2.8 Secuenciación

El último paso, es comprobar si los plásmidos ensamblados y transformados en bacterias son exactamente iguales a los diseñados. Para ello, se utiliza la secuenciación del ADN eluido en las minipreps. Al no disponer de material para realizarlo, solicitábamos el servicio a la unidad de secuenciación de la UPV.

### 3.2.9 Instrumentos y software

Durante el desarrollo del proyecto, se han utilizado los materiales básicos de laboratorio y diferentes kits explicados en los apartados anteriores. Al mismo tiempo se han empleado una serie de instrumentos indicados en la Tabla 3.8.

Además, nos hemos servido del software en la nube Benchling<sup>®</sup>, que permite generar y editar secuencias de ADN, estableciendo un ensamblaje digital tomado como referencia en los experimentos. Incluso, permite ejecutar experimentos a nivel virtual y analizar los datos.

**Tabla 3.8. Instrumentos utilizados en el trabajo.**

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

## 4. Resultados y Discusión

### 4.1 Diseño del controlador antitético

#### 4.1.1 Controlador antitético activador de Anti- $\sigma$ 20

El diseño del circuito sintético corresponde con un controlador de realimentación antitético activador de la proteína Anti- $\sigma$ 20 y su factor extracitoplasmático  $\sigma$ 20, que regulan la expresión de una proteína o metabolito de interés, de manera que su concentración se mantenga en torno a la establecida como referencia. A lo largo del trabajo nos referimos a este circuito genético como controlador antitético.

Es primordial seleccionar un subgrupo de factores Sigma, Anti-sigma y promotor sigma inducible dentro del grupo ECF en base a criterios de alta ortogonalidad y mínimo ruido, baja toxicidad y nula alteración de la expresión génica, tal y como se ha indicado en la introducción. Fijándonos en dichas propiedades, estudiadas en trabajos previos (Rhodius et al., 2013), seleccionamos el subgrupo ECF20\_992 (Anti- $\sigma$ 20,  $\sigma$ 20 y promotor P20).

Alta ortogonalidad es una característica que permite utilizar varios circuitos simultáneamente sin generar interferencias. Por ejemplo, el promotor P20 utilizado en este trabajo, debe ser activado sola y únicamente por el factor  $\sigma$ 20. Asimismo, el factor Anti- $\sigma$ 20 secuestrará al factor  $\sigma$ 20 para neutralizar su función. En Rhodius et al. (2013) ya se demostró que el subgrupo ECF20\_992 cumple esta condición, siendo uno de los más ortogonales de su clase, al no interactuar con los otros subgrupos.

Generalmente, la toxicidad viene marcada por la sobreexpresión génica, sin embargo, se ha demostrado que aún sobreexpresando los componentes del subgrupo ECF20\_992, la toxicidad medida mediante ensayos de crecimiento, no era elevada (Rhodius et al., 2013). Por lo que es factible trabajar con este grupo, interesante en la construcción de circuitos sintéticos complejos.

#### 4.1.2 Especies bioquímicas del controlador antitético

En el diseño de este circuito genético deseado, seleccionamos las 5 especies bioquímicas que intervendrán en él:

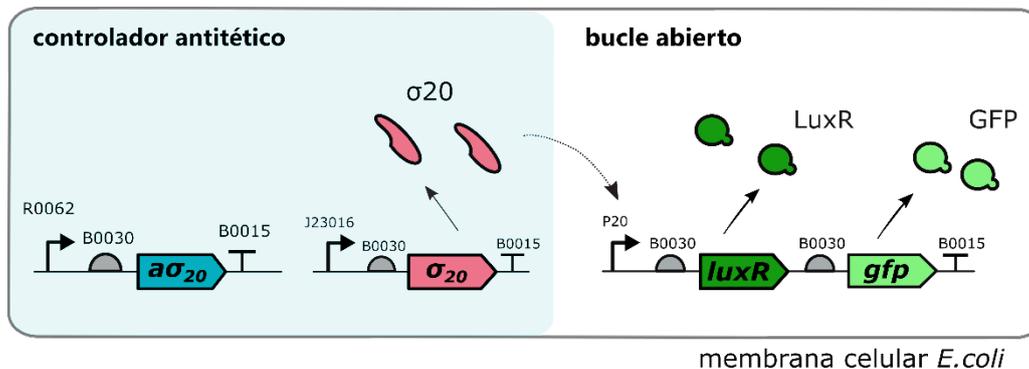
- 1) La proteína  $\sigma$ 20, cofactor de la polimerasa, sintetizado a tasa constante gracias al promotor constitutivo.
- 2) El factor Anti- $\sigma$ 20, cuyo promotor es inducido mediante el dímero formado por LuxR y AHL.
- 3) LuxR es una proteína que unida a la molécula lactona AHL forman el dímero como factor de transcripción (LuxR.AHL)<sub>2</sub> o (R.A)<sub>2</sub>.
- 4) AHL es especie intra y extracelular (toma el nombre de AHL<sub>e</sub>) que se difunde por la membrana plasmática de *E.coli* y que unida a la proteína LuxR forman el dímero (LuxR.AHL)<sub>2</sub> que actúa como factor de transcripción para activar el control antitético con la síntesis de Anti- $\sigma$ 20.

- 5) GFP es la proteína que se utiliza para monitorizar el comportamiento del controlador y, en este caso, como proteína de interés (Pol). Sería remplazada por cualquier proteína que deseemos controlar.

### 4.1.3 Estructura y funcionamiento del controlador antitético

El siguiente paso en el diseño del circuito fue establecer la estructura del controlador antitético. Está constituido por tres unidades transcripcionales que integran los elementos citados en el apartado anterior (Figuras 4.1 y 4.2).

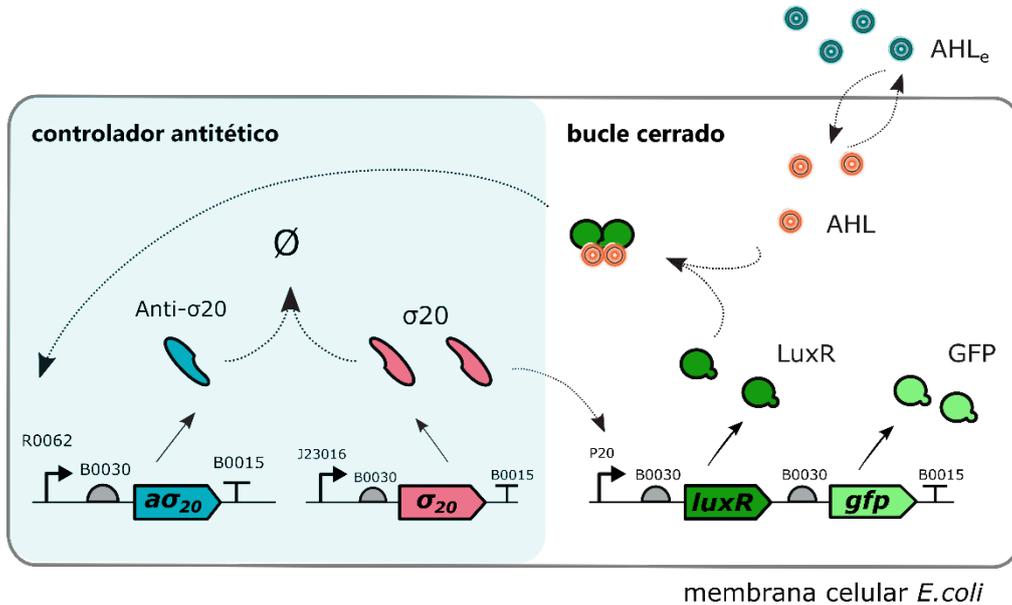
La Figura 4.1 representa la actividad de la red genética cuando el sistema está en **bucle abierto**, es decir, solo existe una regulación estática y sin presencia de AHL en el medio extracelular (AHLe). La carencia de AHL impide la formación del factor de transcripción (LuxR.AHL)<sub>2</sub> e impide la síntesis de la proteína Anti- $\sigma$ 20. En este caso, el controlador antitético no se encuentra activo y la concentración de la proteína de interés GFP incrementará continuamente sin ser regulada. Esta situación no es la óptima ni deseada.



**Figura 4.1 Controlador antitético sin realimentación (bucle abierto).** El cofactor de la ARNp  $\sigma$ 20 se expresa a una tasa constante gracias al promotor constitutivo J23016.  $\sigma$ 20 unido a la ARNp incrementa su actividad y activa al promotor inducible P20, provocando la transcripción de los genes *luxR* y *gfp*. Posteriormente, la traducción de estos genes sintetiza las proteínas correspondientes (LuxR y GFP). Asumiendo que estas proteínas se coexpresan, por lo que comparten promotor y tienen dos RBS iguales, es el mismo. En bucle abierto no existe inducción de AHL y no se produce Anti- $\sigma$ 20. De este modo,  $\sigma$ 20 no será secuestrada por Anti- $\sigma$ 20 y el controlador antitético no estará activo. Si existe sobreproducción de GFP y LuxR, el sistema no tiene la capacidad de regular sus concentraciones a niveles deseados.

El funcionamiento deseado de la red se alcanza cuando en el medio de cultivo se inducen moléculas de AHL<sub>e</sub>, como en la Figura 4.2. Esta se difunde por la membrana plasmática de *E. coli*, siguiendo la ley de difusión de Fick (Fick, 1995), y se une a LuxR para formar el factor de transcripción (LuxR.AHL)<sub>2</sub> que activa al promotor Plux. AHL<sub>e</sub> se convierte en AHL dentro de la célula y se difunde continuamente en ambas direcciones hasta equilibrar la concentración intra y extracelular. Ahora el sistema está en **bucle cerrado** y provoca una regulación dinámica de la proteína GFP. Gracias al funcionamiento del controlador antitético es posible mantener la

concentración de una proteína de interés (GFP en este caso) en niveles deseados, y sin variar incluso ante estímulos o perturbaciones del medio de cultivo o propio de la célula.

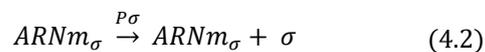


**Figura 4. 2 Controlador antitético con realimentación (bucle cerrado).** El inicio de transcripción es igual al caso anterior, la proteína  $\sigma_{20}$  se sintetiza a una tasa constante provocando la unión de la ARNp al promotor inducible P20. Seguidamente se inicia la expresión de los genes *luxR* y *gfp*. La difusión transmembranal de la molécula AHL producirá la formación de un dímero con LuxR, mientras que la proteína GFP emite señal. Este dímero es el factor de transcripción del promotor *Plux* que activa la síntesis de la proteína Anti- $\sigma_{20}$ .  $\sigma_{20}$  es secuestrada por Anti- $\sigma_{20}$  cerrando el bucle y produciendo la aniquilación de ambas. Este cierre del bucle implementa el control de realimentación mediante el motivo antitético, cumpliendo el objetivo de mantener la concentración de la proteína objetivo GFP a una concentración deseada.

#### 4.1.4 Reacciones bioquímicas del controlador antitético

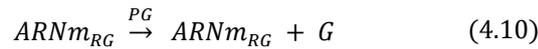
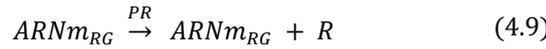
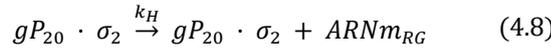
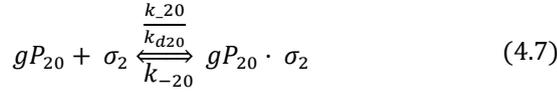
Tras establecer la estructura y funcionamiento del circuito sintético de interés (Figura 4.2), planteamos las reacciones bioquímicas teniendo en cuenta las reacciones y procesos biológicos.

**Gen  $\sigma_{20}$ :**



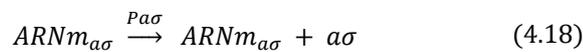
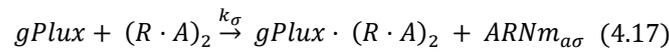
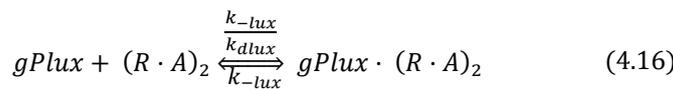
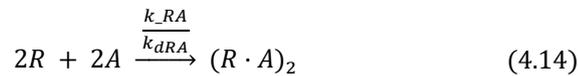
donde la reacción 4.1 corresponde a la transcripción del gen  $\sigma_{20}$ , produciendo su ARNm. Posteriormente (4.2) ocurre la traducción, sintetizando la proteína y manteniendo el ARNm. Finalmente, tanto el ARN (4.3) como la proteína (4.4) se degradan. Todas las constantes cinéticas y sus valores vienen identificadas en la Tabla 4.1.

**Genes *luxR/gfp*:**



donde la reacción 4.5 representa la formación del dímero  $\sigma_2$ . La 4.6 corresponde con la transcripción basal de los genes *gfp* y *luxR* mediante el promotor inducible P20, cuando la unión del factor  $\sigma_{20}$  no se ha producido. La reacción 4.7 figura la unión y desunión de  $\sigma_{20}$  con el promotor P20. La reacción 4.8 representa la transcripción de los genes *lux* y *gfp*. Las reacciones 4.9 y 4.10 representan la coexpresión de GFP y LuxR. Finalmente, las tres últimas, indican la degradación tanto de las proteínas (4.12, 4.13) como del ARNm (4.11).

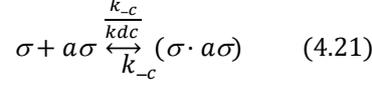
**Gen  $\alpha\sigma_{20}$ :**



donde la reacción 4.14 representa la formación del factor de transcripción activador. La 4.15 reproduce la transcripción basal a partir del promotor inducible Plux. La reacción 4.16 indica la unión del factor de transcripción con Plux y (4.17) muestra la transcripción del gen  $\alpha\sigma_{20}$ . La reacción 4.18 marca la traducción y formación de la proteína Anti- $\sigma_{20}$ . Finalmente, las reacciones 4.19 y 4.20 simbolizan la degradación de los componentes.

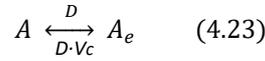
No se ha tenido en cuenta en el modelado del complejo (R.A)<sub>2</sub> formado por las especies LuxR y AHL porque ya se considera el número de moléculas que aporta cada una de las especies en la ecuación de Hill del promotor respectivo (ver sección 3.1.1) y el número de copias.

**Complejo (σ·aσ):**



donde la reacción 4.21 representa la formación del complejo formado por σ y aσ, así como la desunión de estas. Además, se indica la degradación del complejo en la reacción 4.22.

**Proceso de difusión extra/intracelular de AHL:**



donde se representa la difusión intra (A) y extracelular (A<sub>e</sub>) de AHL a una tasa de difusión D, y  $V_c = \frac{V_{cell}}{V_{ext}}$  es la relación entre del volumen de la célula y el externo del medio de cultivo.

#### 4.1.5 Modelo ODE del controlador antitético

A partir de las reacciones bioquímicas indicadas y de la aplicación de la Ley de Acción de masas explicado anteriormente, obtuvimos 8 ecuaciones diferenciales ODE (4.24 – 4.31) que representan las dinámicas de las especies bioquímicas más importantes del controlador en cada una de las células *i*, y se incluye el máximo número de parámetros modulables.

$$\frac{d[\sigma]^i}{dt} = \frac{p_\sigma C_N k_\sigma}{dm_\sigma + \mu} - \frac{k_{-c}}{k_{dc}} [\sigma][a\sigma] + k_{-c} [\sigma \cdot a\sigma] - (d_\sigma + \mu)[\sigma] \quad (4.24)$$

$$\frac{d[a\sigma]^i}{dt} = \frac{p_{a\sigma} C_N k_{a\sigma}}{dm_{a\sigma} + \mu} \left( \alpha + \frac{(1 - \alpha)[A]^2}{k_{dlux} \left( \frac{k_{dRA} C_N}{[R]} \right)^2 + [A]^2} \right) - \frac{k_{-c}}{k_{dc}} [\sigma][a\sigma] + k_{-c} [\sigma \cdot a\sigma] - (d_{a\sigma} + \mu)[a\sigma] \quad (4.25)$$

$$\frac{d[\sigma \cdot a\sigma]^i}{dt} = \frac{k_{-c}}{k_{dc}} [\sigma][a\sigma] + k_{-c} [\sigma \cdot a\sigma] - (d_c + \mu)[\sigma \cdot a\sigma] \quad (4.26)$$

$$\frac{d[R]^i}{dt} = \frac{p_R C_N k_R}{dm_R + \mu} \left( \alpha + \frac{(1 - \alpha)[\sigma]^2}{k_{d20}(k_{d\sigma} C_N) + [\sigma]^2} \right) - (d_R + \mu)[R] \quad (4.27)$$

$$\frac{d[A]^i}{dt} = D \left( \frac{V_{cell}}{V_{ext}} [A_e] - [A] \right) - (d_A + \mu)[A] \quad (4.28)$$

$$\frac{d[GFP]^i}{dt} = \frac{p_G C_N k_R}{dm_G + \mu} \left( \alpha + \frac{(1 - \alpha)[\sigma]^2}{k_{d20}(k_{d\sigma} C_N) + [\sigma]^2} \right) - (d_G + \mu)[G] \quad (4.29)$$

$$\frac{d[A_e]}{dt} = D \left( -N \frac{V_{cell}}{V_{ext}} [A_e] + \sum_{i=1}^N [A] \right) - d_{Ae} [A_e] \quad (4.30)$$

$$\frac{dN}{dt} = \mu N \left( 1 - \frac{N}{N_{max}} \right) \quad (4.31)$$

La ecuación 4.24 representa la evolución temporal del factor  $\sigma_{20}$ , indicando los procesos en los que interviene junto a los parámetros necesarios en cada paso. La ecuación del factor Anti- $\sigma_{20}$  (4.25) reproduce el comportamiento de esta molécula, donde su promotor inducible incluye la función de Hill de activación. Asimismo, las especies LuxR (4.27) y GFP (4.29) se modelan con dicha función, ya que dependen de un promotor inducible.

Además, la ecuación 4.26 expone la evolución temporal del complejo ( $\sigma_{20} \cdot a\sigma_{20}$ ). Por su parte, las ecuaciones 4.28 representa la difusión de AHL interna en una sola célula, mientras que 4.30 representa a AHL de toda la población de  $N$  células. Ambas representan la difusión pasiva de estas moléculas dentro y fuera de la célula, con un factor proporcional a sus volúmenes  $V_{cell}$  y  $V_{ext}$  respectivamente. Finalmente, la ecuación 4.31 reproduce el crecimiento celular de  $N$  células en el medio.

Todas de las ecuaciones cuentan con las tasas o ratios de transcripción, traducción, disociación, etc., pertenecientes a cada proceso y están enumeradas en la Tabla 3.1.

Asimismo, este modelo se elaboró teniendo en cuenta las siguientes asunciones:

- Se asumió que algunas reacciones ocurren mucho más rápido que otras; por ejemplo, la transcripción toma alrededor de 5 minutos en *E.coli*, mientras que la traducción dura alrededor de 30 – 50 minutos. Por lo que la transcripción es lo suficientemente rápida en comparación con la traducción, y solo se considera la dinámica de las proteínas.
- La unión/separación de moléculas que forman factores de transcripción son reacciones rápidas, por lo que no se modelaron explícitamente.
- El número de ARN polimerasa (ARNp) se considera constante. Además, la cantidad de nucleótidos añadidos por cada ARNp por unidad de tiempo también es siempre idéntico. Por lo tanto, la transcripción constitutiva consistiría en una única reacción (4.32) y una sola especie bioquímica (mARN). En la constante cinética se incluyen las demás (ADN y ARNp). Sin embargo, sin asumir estos supuestos, consistirían en tres reacciones y las tres especies bioquímicas mencionadas.



- La traducción no es un proceso simple (Alberts et al., 2009). Se modela como una reacción irreversible con una tasa de traducción media que tiene en cuenta el hecho de que la unión de los ribosomas al RBS es reversible, y varios ribosomas pueden traducir una única copia de ARN mensajero simultáneamente.
- Asimismo, se considera constante el número de ribosomas y aminoácidos y no se tienen en cuenta en la traducción, resumiendo el proceso en una sola reacción (4.33) con dos especies.



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

- La degradación y la dilución debida al crecimiento celular se consideran para todas las especies, incluido el ARNm, con las correspondientes tasas de degradación, y tasa de crecimiento específico ( $\mu$ ).
- Para cada promotor, la activación o represión de la transcripción mediada por un factor de transcripción se modela utilizando una función similar a la de Hill con la modificación propuesta en Trabelsi y otros (2018). Esto explica el hecho de que el número de FTs y los sitios de unión escalan con el número de copia del plásmido.

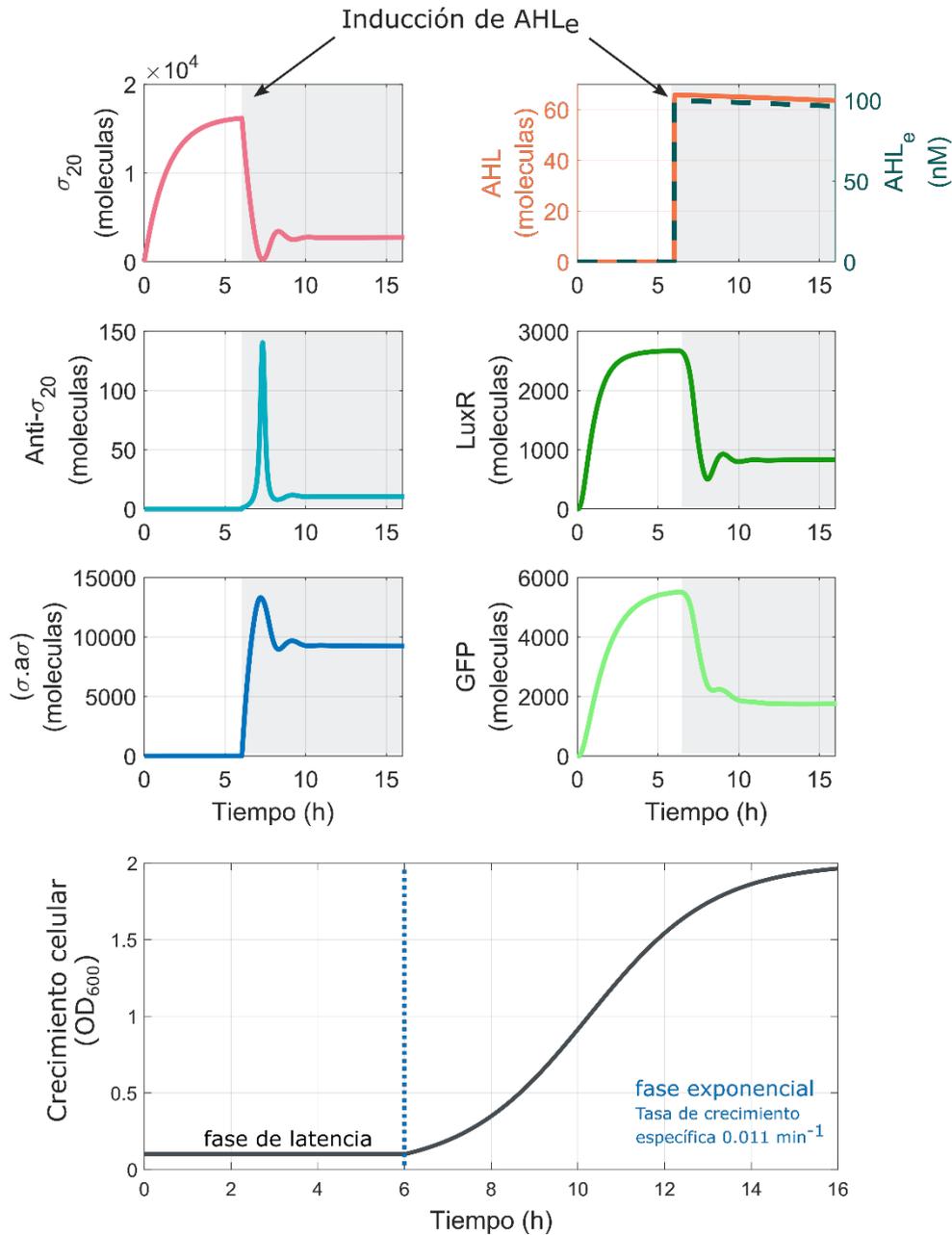
Finalmente, todos los parámetros del modelo ODE (4.24 – 4.31) se encuentran recogidos e identificados en la Tabla 4.1.

**Tabla 4.1. Parámetros del modelo ODE del controlador antitético.**

Parámetros	Descripción	Valor	Unidad	Referencia
$\mu$	Tasa de crecimiento específico	$6.9 \times 10^{-3}$	$\text{min}^{-1}$	Boada Acosta, 2018
$\alpha$	Expresión basal	0.01	adim	Boada Acosta, 2018
$\beta$	Expresión basal	1.5	adim	Boada Acosta, 2018
$C_N$	Número de copias plásmido	10	copias	Boada Acosta, 2018
$D$	Tasa difusión AHL	2	$\text{min}^{-1}$	Boada et al., 2017
$k_\sigma, k_a\sigma$	Tasa de transcripción	1.98	$\text{min}^{-1}$	Annunziata et al., 2017
$k_R, k_G$	Tasa de transcripción	0.78	$\text{min}^{-1}$	Boada et al., 2017
$p_\sigma$	Tasa de traducción	3	$\text{min}^{-1}$	Annunziata et al., 2017
$p_a\sigma$	Tasa de traducción	3.17	$\text{min}^{-1}$	Annunziata et al., 2017
$p_R$	Tasa de traducción	2.34	$\text{min}^{-1}$	Boada et al., 2017
$p_G$	Tasa de traducción	2.24	$\text{min}^{-1}$	Boada et al., 2017
$d_R$	Tasa de degradación proteica	0.02	$\text{min}^{-1}$	Boada et al., 2017
$d_G$	Tasa de degradación proteica	0.003	$\text{min}^{-1}$	Boada et al., 2017
$d_c$	Ratio de degradación ( $\sigma \cdot a\sigma$ )	0.001	$\text{min}^{-1}$	Annunziata et al., 2017
$d_A$	Tasa degradación intracelular	$4 \times 10^{-4}$	$\text{min}^{-1}$	Boada et al., 2017
$d_{Ae}$	Tasa degradación extracelular	$4.8 \times 10^{-5}$	$\text{min}^{-1}$	Boada et al., 2017
$kd_{20}$	Constante de disociación p20	200	moléc	Annunziata et al., 2017
$kd_{lux}$	Constante de disociación plux	600	moléc	Boada et al., 2017
$kd_c$	Constante de disociación $\sigma \cdot a\sigma$	2.41	moléc	Annunziata et al., 2017
$kd_{RA}$	Constante de disociación $(R \cdot A)_2$	20	moléc	Boada et al., 2017
$kd_\sigma$	Constante de disociación dímero $\sigma$	10	moléc	Annunziata et al., 2017
$K_c$	Tasa de disociación ( $\sigma \cdot a\sigma$ )	0.07	$\text{min}^{-1}$	Annunziata et al., 2017
$k_c$	Tasa de asociación ( $\sigma \cdot a\sigma$ )	0.17	$\text{min}^{-1}$	Annunziata et al., 2017
$dm_\sigma, dm_a\sigma, dm_R, dm_H, dm_Q$	Tasa de degradación ARNm	0.231	$\text{min}^{-1}$	Boada et al., 2017
$d_\sigma, d_a\sigma, d_H, d_Q$	Tasa de degradación proteica	$3 \times 10^{-4}$	$\text{min}^{-1}$	Boada et al., 2017
$V_{cell}$	Volumen de <i>E.coli</i>	$1.1 \times 10^{-15}$	L	Bionumbers
$V_{ext}$	Volumen del medio de cultivo	$200 \times 10^{-6}$	L	Boada Acosta, 2018

#### 4.1.6 Simulaciones computacionales del controlador antitético

A partir del modelo ODE generado en el apartado anterior y utilizando los valores establecidos para cada uno de los parámetros (Tabla 4.1), se obtuvieron las simulaciones computacionales del comportamiento del controlador antitético diseñado (Figura 4.3). Como se puede observar, todas las especies comienzan con una concentración inicial emulando el estado inicial de la célula pre-incubación. Las simulaciones muestran el comportamiento del controlador antitético tanto en bucle abierto (0 a 6 horas) como en bucle cerrado (6 a 16 horas).



**Figura 4.3 Simulaciones del modelo ODE.** Las primeras seis gráficas representan el comportamiento de las especies del modelo:  $\sigma_{20}$ , Anti- $\sigma$ , complejo  $\sigma$ -Anti- $\sigma$ , AHL y AHL<sub>e</sub>, LuxR y GFP; con respecto al tiempo. Tras 6h se induce AHL<sub>e</sub> emulando el comportamiento del controlador en bucle cerrado. La última gráfica representa el crecimiento celular con respecto al tiempo, partiendo de una OD inicial de 0.1.

### AHL/AHL<sub>e</sub>

La inducción de la molécula AHL provoca una variación en la dinámica de todas las especies bioquímicas ya que se inicia la regulación de bucle cerrado, activando el controlador antitético.

En la gráfica de AHL/AHL<sub>e</sub> podemos observar su aumento drástico de concentración tras la inducción. La molécula AHL<sub>e</sub> se difunde pasivamente por la membrana plasmática con la finalidad de igualar las concentraciones intra y extracelulares. Por tanto, la dinámica de ambas

especies es similar. También podemos destacar la leve bajada de concentración que sufrieron estas con el paso del tiempo, debida a la formación del complejo (LuxR·AHL)<sub>2</sub> y su degradación.

### **σ20, aσ20, complejo (σ20·aσ20)**

- El factor σ20, representado en la primera gráfica izquierda, contó con un crecimiento continuo hasta la inducción a las 6 h. Esta acumulación de σ20 libre se debe a su tasa constante de síntesis gracias al promotor constitutivo. Tras la inducción, sufrió una alteración de la dinámica, disminuyendo drásticamente su concentración. Este suceso se debe a la activación del controlador antitético, que favorece la síntesis del factor Anti-σ20, y por tanto, el secuestro molecular de σ20.
- El factor Anti-σ20 se mantuvo ausente en la etapa inicial del experimento (0 a 6 horas). Sin embargo, sufrió un aumento tras la inducción de AHL dado que el factor de transcripción (R.A)<sub>2</sub> implementa la realimentación que activa su síntesis. Su concentración volvió a bajar rápidamente y no alcanzó valores altos por la gran rapidez de formación del complejo (σ20·aσ20).
- El complejo (σ20·aσ20) comenzó a formarse con la síntesis del factor aσ20. Consiste en el reclutamiento del factor σ20 por parte del Anti-σ20, provocando la aniquilación de ambas. Por ello, en la etapa inicial hubo ausencia de complejo, aumentando rápidamente y estabilizándose tras la inducción de AHL.

### **LuxR**

La especie libre LuxR experimentó un crecimiento hasta una concentración constante, ya que el factor σ20 favorece su síntesis junto con GFP, mediante el promotor inducible P20. Tras la inducción de AHL, la concentración descendió de manera drástica debido al reclutamiento del factor σ20 y formación del complejo σ20·aσ20, dificultando la unión de σ20 al promotor, así como de la constitución del factor de transcripción (LuxR·AHL)<sub>2</sub>.

### **GFP**

Las moléculas de GFP experimentaron un comportamiento parecido al de LuxR ya que se coexpresan dado que tienen el promotor inducible por el factor σ20. En la primera etapa (hasta las 6 h) alcanzó una concentración constante. A partir de la inducción de AHL experimentó una bajada, menos acentuada que la de LuxR dado que su tiempo de maduración es mayor. Este decrecimiento solo es debido al reclutamiento del factor σ20. De este modo, la concentración de GFP (proteína objetivo o de interés) se mantiene estable a una concentración deseada tras responder al estímulo de forma rápida.

### **Crecimiento celular**

La última gráfica de la Figura 4.3 representa el típico crecimiento bacteriano. En ella se puede observar tanto la fase de latencia como la exponencial, cuya tasa específica de crecimiento corresponde con 0.011 min<sup>-1</sup>.

Tras realizar todos los pasos del diseño, observamos que el modelo reproduce el comportamiento esperado para el controlador antitético, puesto que se reflejó la aniquilación de las proteínas del grupo ECF, así como el mantenimiento de la concentración de la proteína objetivo, GFP. Por ello, se procedió a realizar la construcción del controlador.

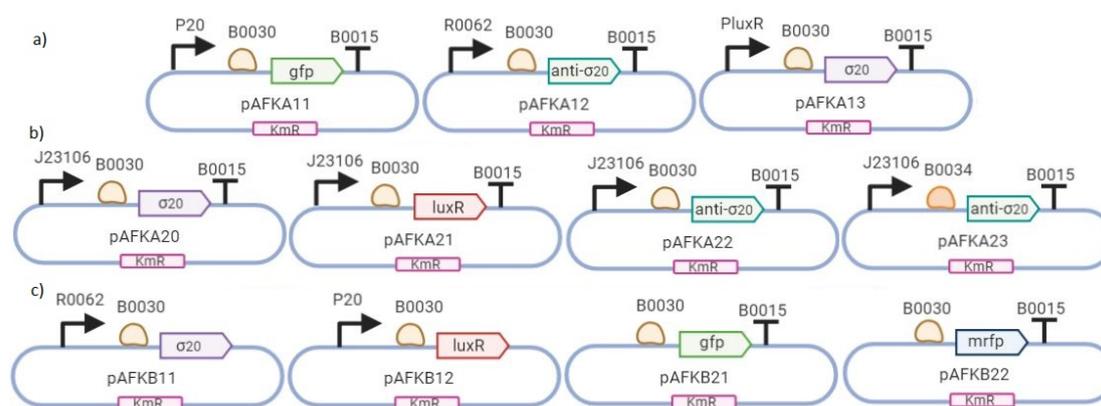
## 4.2 Construcción del controlador antitético

Una vez diseñado correctamente el circuito genético, el siguiente paso fue ensamblar las biopartes seleccionadas en *E.coli* fue el siguiente paso a seguir. Todos los plásmidos fueron ensamblados mediante la técnica GoldenBraid.

La nomenclatura de los plásmidos se realiza como: pXXKA12, por ejemplo, donde p corresponde a plásmido, XX a las iniciales de quien los construye, K al antibiótico de resistencia, A al plásmido de destino utilizado, 1 al número de plásmido y 2 al orden de construcción. Por lo tanto, el plásmido pAFKA11 nos informa de que es un plásmido construido por Ana Fraile, que resiste al antibiótico Kanamicina (Km), implementado en un vector  $\alpha$ 1 y que fue el primero en orden de construcción. Por su parte, el que contenga la B indicará que se implementó en un plásmido  $\beta$ . Asimismo, aquel que contenga una O indica la implementación en un plásmido Omega.

### 4.2.1 Construcción de las unidades transcripcionales. Plásmidos de Nivel 1

Todos los plásmidos de Nivel 1 contruidos se recogen en la Figura 4.4 y fueron implementados en el laboratorio de forma exitosa, con la finalidad de emplearlos en los niveles posteriores. Cada uno de ellos fue diseñado y construido para obtener una unidad transcripcional provechosa en los circuitos finales, es decir, tanto el Nivel 1 como el 2, son pasos intermedios contruidos con el objetivo de obtener la UT necesaria para la construcción del último nivel. Por ejemplo, el ensamblaje de los plásmidos pAFKB12 y pAFKB21 estaba pensado para su posterior unión, que daría lugar a la formación del plásmido pAFSO13 (Figura 4.5), utilizado seguidamente en la construcción del plásmido final.



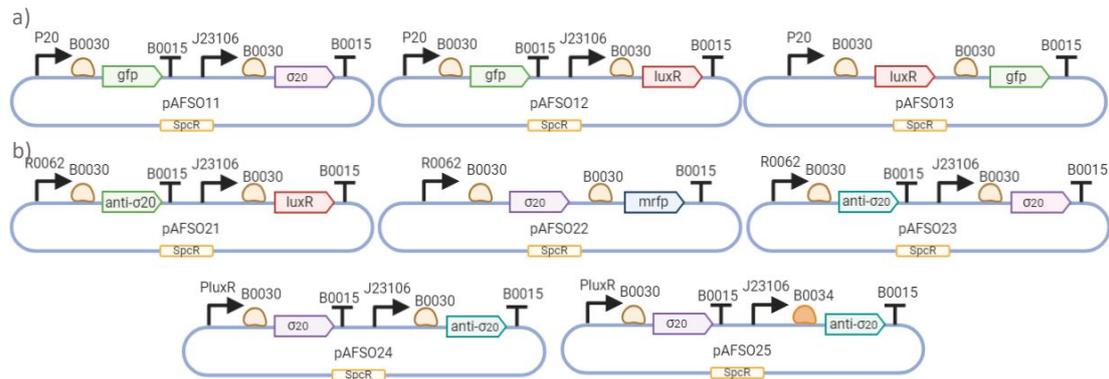
**Figura 4. 4 Construcciones de las unidades transcripcionales en plásmidos Nivel 1.** Los promotores utilizados son tanto constitutivos (J23106) como inducibles (P20 y R0062 o Plux). a) Corresponden con las unidades transcripcionales ensambladas en plásmidos de destino  $\alpha$ 1, cuyos genes son *gfp*, *anti- $\sigma$ 20* y  $\sigma$ 20, respectivamente. b) Unidades transcripcionales de Nivel 1 ensambladas en plásmidos  $\alpha$ 2, con el objetivo de poder unirse a los anteriores en el siguiente nivel. c) Construcciones correspondientes a los bicistrones, ensamblados en los plásmidos  $\beta$ 1 (dos de la izquierda) y  $\beta$ 2 (dos a la derecha).

### 4.2.2 Ensamblaje de dos unidades transcripcionales. Plásmidos de Nivel 2

Todos los plásmidos diseñados fueron contruidos de forma digital mediante el software Benchling, sin embargo, a partir del Nivel 2, la declaración extraordinaria del estado de alarma

en nuestra sociedad impidió realizar el ensamblado del ADN de manera presencial en el laboratorio tal y como estaba previsto.

Asimismo, la unión de los plásmidos de Nivel 1 en los plásmidos de destino de Nivel 2 están diseñados con la finalidad de obtener unos plásmidos de Nivel 3 cuya función sea la deseada, es decir, son pasos intermedios diseñados con el objetivo de obtener la construcción de último nivel. Por ejemplo, el plásmido pAFSO13 es una de las unidades transcripcionales del circuito final, puesto que el promotor inducible P20 regula la síntesis de *gfp* y *luxR*. Este plásmido ensamblado junto con pAFSO23, da lugar a la formación del circuito final representado en la Figura 4.5.

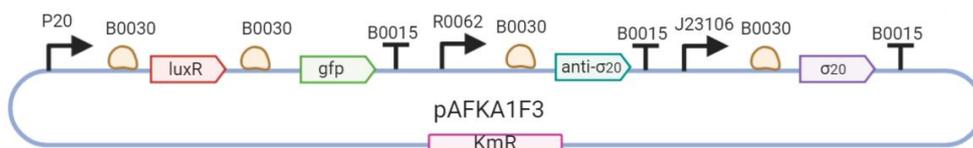


**Figura 4. 5 Combinación de unidades transcripcionales en plásmidos de Nivel 2.** a) Construcciones con plásmido de destino  $\Omega 1$ , cuya estructura recoge la unión de dos unidades transcripcionales anteriores. b) Plásmidos correspondientes al ensamblaje en  $\Omega 2$ .

### 4.2.3 Construcción del circuito genético (nivel 3/ciclo de ensamblaje)

El objetivo final de la construcción de los niveles anteriores es, definitivamente, llegar a construir el circuito cuya funcionalidad es específica del diseño planteado previamente, mediante ensamblaje de los plásmidos de Nivel 2 en un plásmido de destino de Nivel 1. Los nombres de estos plásmidos son exactamente iguales a los del Nivel 1 ya que sus características son semejantes, sin embargo, hemos añadido una F entre los dos números para indicarlo como final.

En este trabajo, perseguimos el objetivo de formar un circuito cuya función sea el control de la concentración de un metabolito o proteína. Para ello, se había explicado la necesidad de utilización de motivos antitéticos. Finalmente, el plásmido diseñado para su implementación en *E.coli* fue pAFKA1F3 (Figura 4.6).



**Figura 4. 6 Representación del plásmido final del controlador antitético.** Mediante el ensamblaje GoldenBraid se consigue la construcción con los cuatro genes y los elementos necesarios de las unidades transcripcionales en un plásmido  $\alpha 1$ . Cuenta con un promotor constitutivo que favorece la expresión constante del gen  $\sigma 20$ , un promotor inducible (P20) por dicho factor que provoca la transcripción de *luxR* y *gfp* y finalmente, un promotor inducible (R0062) por el complejo  $(LuxR-AHL)_2$  que permite la síntesis del factor Anti- $\sigma 20$ , motivo regulador.

Además de construir el plásmido pAFKA1F3, que cumple la funcionalidad deseada, se diseñaron otros plásmidos (Figura 4.7) para complementar la caracterización e incluso observar nuevos comportamientos. El circuito sintético pAFKA1F1 fue especialmente diseñado para caracterizar la relación de unión de  $\sigma_{20}$  con el promotor que regula como ligando el promotor P20. Seguidamente, el circuito pAFKA1F2 fue diseñado para caracterizar la relación de aniquilación entre las proteínas  $\sigma_{20}$  y Anti- $\sigma_{20}$ . El circuito pAFKA1F4 consta de un controlador represor de Anti- $\sigma_{20}$ , es decir, otra funcionalidad del controlador antitético también utilizada para mantener la concentración de una proteína o metabolito en los niveles deseados. Finalmente, el plásmido pAFKA1F5 es una segunda versión del pAFKA1F4, cambiando la fuerza del RBS.

Dada la interrupción de asistencia al laboratorio por el estado de alarma, la construcción plasmídica de los Niveles 3 solamente fue desarrollada a nivel virtual mediante el programa Benchling, indicando como sería su estructura a nivel experimental.

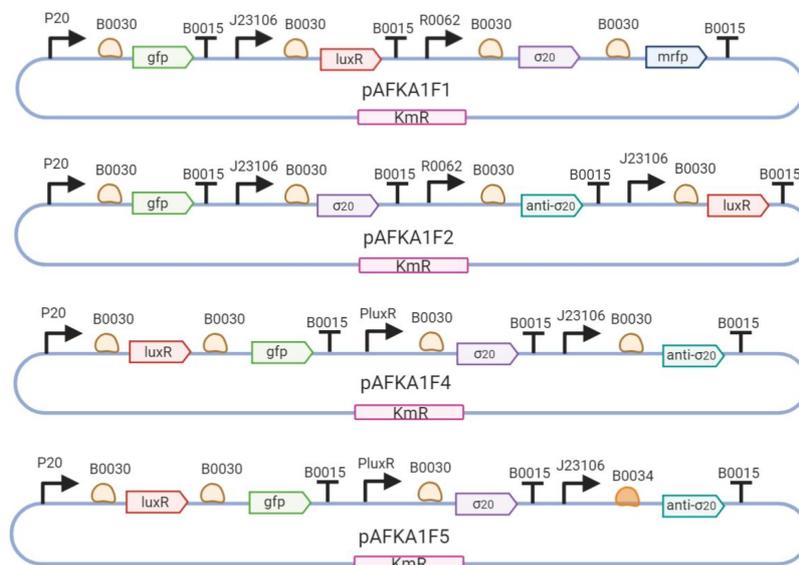


Figura 4. 7 Construcciones complementarias a pAFKA1F3. Ensamblajes de varias UT en plásmido  $\alpha 1$ .

### 4.3 Aplicabilidad del controlador antitético

En este proyecto y como aplicación del circuito genético propuesto, se desea mantener la concentración de una proteína o metabolito de interés a una concentración definida, sin afectar al crecimiento celular.

Dada la interrupción de asistencia al laboratorio por el estado de alarma, ha sido imposible construir el circuito genético completo, así como realizar de modo presencial en el laboratorio el test de los circuitos construidos para la obtención de los valores experimentales de los parámetros. Por ello, y para poder cerrar el ciclo metodológico de la biología sintética, así como intentar alcanzar nuestro objetivo de optimizar el proceso de producción de una proteína o metabolito a concentración deseada, tomaremos estos valores del ejemplo publicado recientemente en (Boada et al., 2020) sobre la regulación de naringenina mediante un controlador antitético. En primer lugar, describimos y discutimos este ejemplo de producción

de naringenina mediante controlador antitético (Boada et al., 2020). A continuación, procedemos a la optimización de los parámetros.

Se utilizó este circuito para la regulación de la producción de naringenina y de su enzima precursora CHS en su red metabólica. Concretamente, para la optimización *in silico* del controlador utilizando el enfoque multiobjetivo descrito en Materiales y métodos, se modificaron algunos de los parámetros del modelo ODE recogidos en la Tabla 4.1. Como resultado se obtuvo un controlador antitético más robusto, y que maximiza la producción de naringenina sin afectar al crecimiento celular.

### 4.3.1 Regulación de la vía metabólica de naringenina mediante el controlador antitético

La sobreproducción de metabolitos a nivel industrial se encuentra muy demandada actualmente. No obstante, la naturaleza suele optimizar sus recursos para sintetizar aquella cantidad justa que sea necesaria. Por lo cual, es imprescindible servirse de la modificación de vías de síntesis cuya producción se adapte a nuestras necesidades, aumentando su rendimiento (Liu et al., 2018).

En Boada et al. (2020), la ruta metabólica genera el metabolito naringenina (y otros sucesivos tras su derivatización). La naringenina pertenece al grupo de los flavonoides, una subclase de fenilpropanoides correspondientes a una familia importante de productos naturales de origen vegetal, y cuyas aplicaciones son variadas. Podemos destacar su papel en la industria farmacéutica ya que contiene propiedades interesantes como por ejemplo, antilipídicas, antiobesidad y antidiabéticas, así como antifibróticas (Liu et al., 2008; Rahigude et al., 2012; Zygmunt et al., 2010).

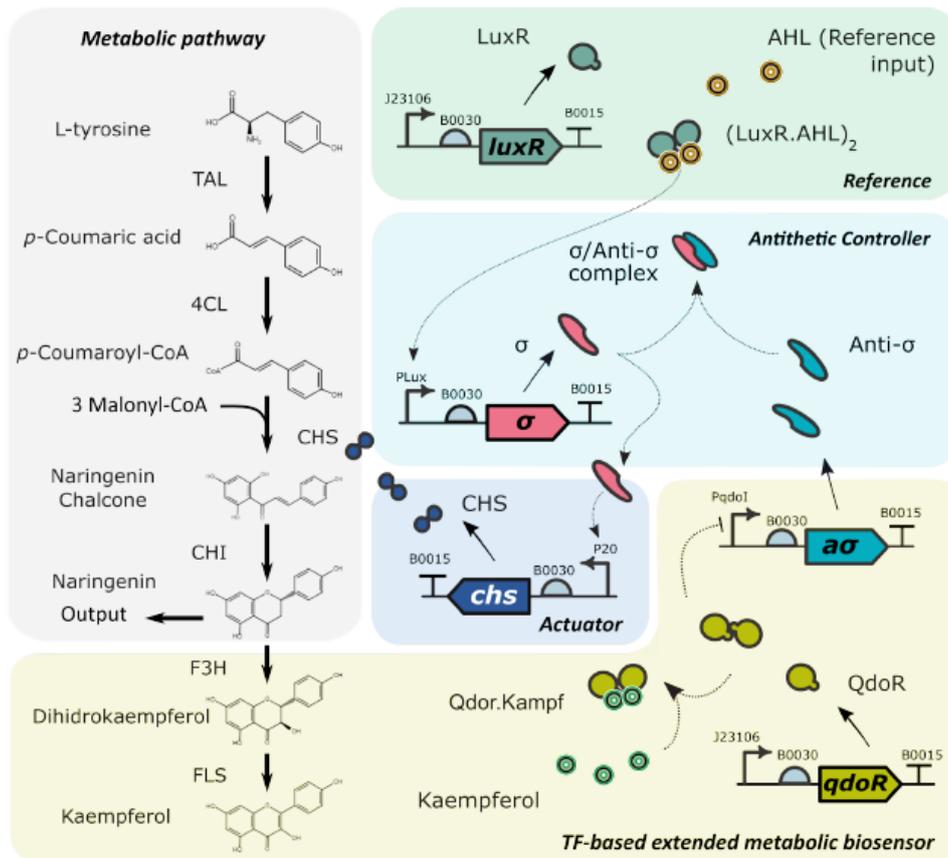
La producción y fermentación microbiana de la naringenina no es viable en cantidades industriales, dado que solamente se han alcanzado concentraciones máximas de 200 mgL<sup>-1</sup> (Zhou et al., 2019). En este estudio se propone regular y optimizar la producción de este metabolito utilizando el control de realimentación mediante motivos antitéticos para alcanzar niveles iguales o superiores a 1 gL<sup>-1</sup>.

La síntesis de naringenina consta de cuatro pasos enzimáticos de derivatización del precursor L-tirosina. El tercer paso, catalizado por la enzima naringenina chalcona sintasa (CHS) requiere malonyl-CoA, metabolito esencial utilizado en la producción de ácidos grasos y que cuenta con un papel importante en el metabolismo celular. Generalmente, las concentraciones de malonyl-CoA suelen ser bajas (4-40M en *E.coli*) y están sujetas a fluctuaciones causadas por la heterogeneidad del entorno celular (Johnson et al., 2017; Xu et al., 2014). Por ello, se presenta el objetivo de obtener una producción dinámica justo a tiempo, sin promover su acumulación que provoca toxicidad.

En Boada et al. (2020), el controlador antitético regula la síntesis del enzima CHS, y por tanto, la síntesis de naringenina, e incluye un biosensor extendido (Figura 4.8) capaz de detectar la concentración de naringenina y reestablecer un control automático de activación o inhibición de la producción de CHS frente a las fluctuaciones de malonyl-CoA, que es uno de los sustratos

necesarios para la naringenina. Es decir, el objetivo es establecer una línea base de producción de naringenina y mediante el biosensor reestablecer el control de realimentación para regular la producción del metabolito, mientras hace frente a las fluctuaciones.

El biosensor metabólico extendido de la Figura 4.8 utiliza el metabolito descendente kaempferol como sustituto de la naringenina. El kaempferol a su vez captura el factor de transcripción QdoR, que reprime la expresión de la molécula Anti- $\sigma$ 20 por medio de la región promotora qdoR-PqdoI (Siedler et al., 2014). De esta manera, el aumento de los valores de naringenina producirá un aumento de los valores de Anti- $\sigma$ 20. Así, el biosensor a partir de la naringenina genera una señal de entrada al sensor qdoR-PqdoI, y la señal de salida procedente de la Anti- $\sigma$  es realimentada al controlador, implementando en **bucle cerrado el control antitético del metabolito de interés**.



**Figura 4. 8 Control de la producción del metabolito naringenina.** El inductor externo AHL y la producción constitutiva de LuxR favorecen la formación del factor de transcripción (LuxR.AHL)<sub>2</sub>, provocando la síntesis del factor  $\sigma$ 20 gracias a su promotor inducible Plux.  $\sigma$ 20 impulsa a su vez, la producción del enzima CHS. CHS junto con malonyl-CoA permiten la síntesis de la naringenina. Esta última se derivatiza en compuestos como el Kaempferol. Por ello, el biosensor extendido detectará la cantidad de Kaempferol disminuyendo la inhibición del factor Anti- $\sigma$ 20 y favoreciendo la reacción de secuestro del factor  $\sigma$ 20. Por tanto, en presencia de Kaempferol ocurre la aniquilación de factores, disminuyendo la síntesis de naringenina, cuando este metabolito no está presente, se favorece su síntesis.

### 4.3.2 Optimización de parámetros del modelo

En Boada et al. (2020), se utilizó el circuito diseñado en este trabajo para la regulación de la producción de naringenina y de su enzima precursora CHS en su red metabólica, pero sus partes

no están optimizadas. Los parámetros del modelo del controlador antitético generado en el apartado 4.1, más el modelo de la ruta metabólica de naringenina (Boada et al. 2020) fueron optimizados utilizando el enfoque multiobjetivo, con el fin de obtener un comportamiento óptimo del nuevo sistema.

La optimización nos devolvió 26 soluciones o combinaciones de parámetros óptimas, recogidas en el Anexo I, tras la cumplimentación de las tres etapas iterativas descritas:

- i) Definir el problema multiobjetivo: planteamos tres objetivos que deseamos optimizar:
  - **J1:** Maximizar la concentración de naringenina hasta  $1 \text{ gL}^{-1}$ . Matemáticamente es el error relativo entre la concentración deseada de naringenina, y la producción actual es esta.
  - **J2:** Maximizar la estabilidad del bucle cerrado y su respuesta ante las perturbaciones. Esto es el error relativo de producción de naringenina cuando existe el 100% de malonyl-CoA necesario para su síntesis, y cuando se produce una perturbación de malonyl-CoA del 60%.
  - **J3:** Minimizar el tiempo de respuesta del sensor y controlador antitético diseñados, es decir, el tiempo de síntesis de CHS y de  $\alpha\sigma$  para que la producción de naringenina no se vea afectada.

Asimismo, establecimos cinco variables de decisión o parámetros del modelo ODE que son importantes en el proyecto. En este caso, utilizamos variables fáciles de modificar en el laboratorio, bien seleccionando otra parte básica o el medio de cultivo celular. De acuerdo al modelo del circuito antitético de las ecuaciones (4.24 – 4.31), visto en la sección 4.1.5, los parámetros escogidos para optimizar fueron:

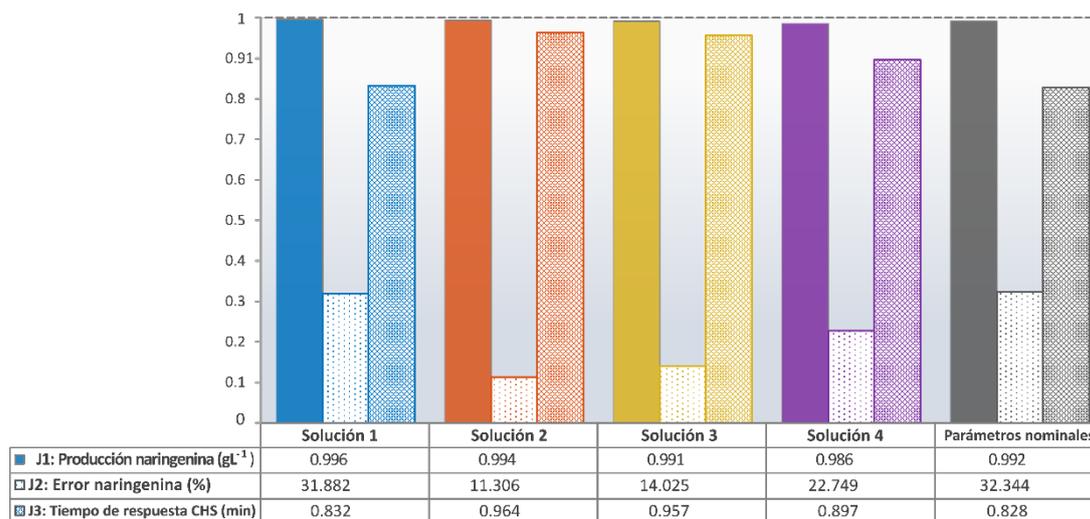
- $p_a$ : Tasa de traducción de Anti- $\sigma 20$  o fuerza del RBS
- $C_{Na}$ : Número de copias de Anti- $\sigma 20$
- $p_{chs}$ : Tasa de traducción de la enzima CHS o fuerza del RBS
- $C_{Nchs}$ : Número de copias de CHS
- $\mu$ : Tasa de crecimiento específico

ii) Realizar la optimización para obtener las soluciones del *Frente de Pareto*  
Tras definir cuáles son nuestros objetivos, se realizó la optimización mediante el programa MATLAB®; utilizando el archivo *Main.m*, que ejecuta los archivos de función de coste y parámetros.

iii) Seleccionar la mejor solución del *Frente de Pareto*  
MATLAB® generó 26 soluciones o combinaciones de parámetros, de las cuales seleccionamos 4. Los valores de las variables de decisión modulables se encuentran en la Tabla 4.2 y las soluciones seleccionadas en la Figura 4.9.

**Tabla 4.2. Valores de los parámetros o variables de decisión obtenidos de la optimización.**

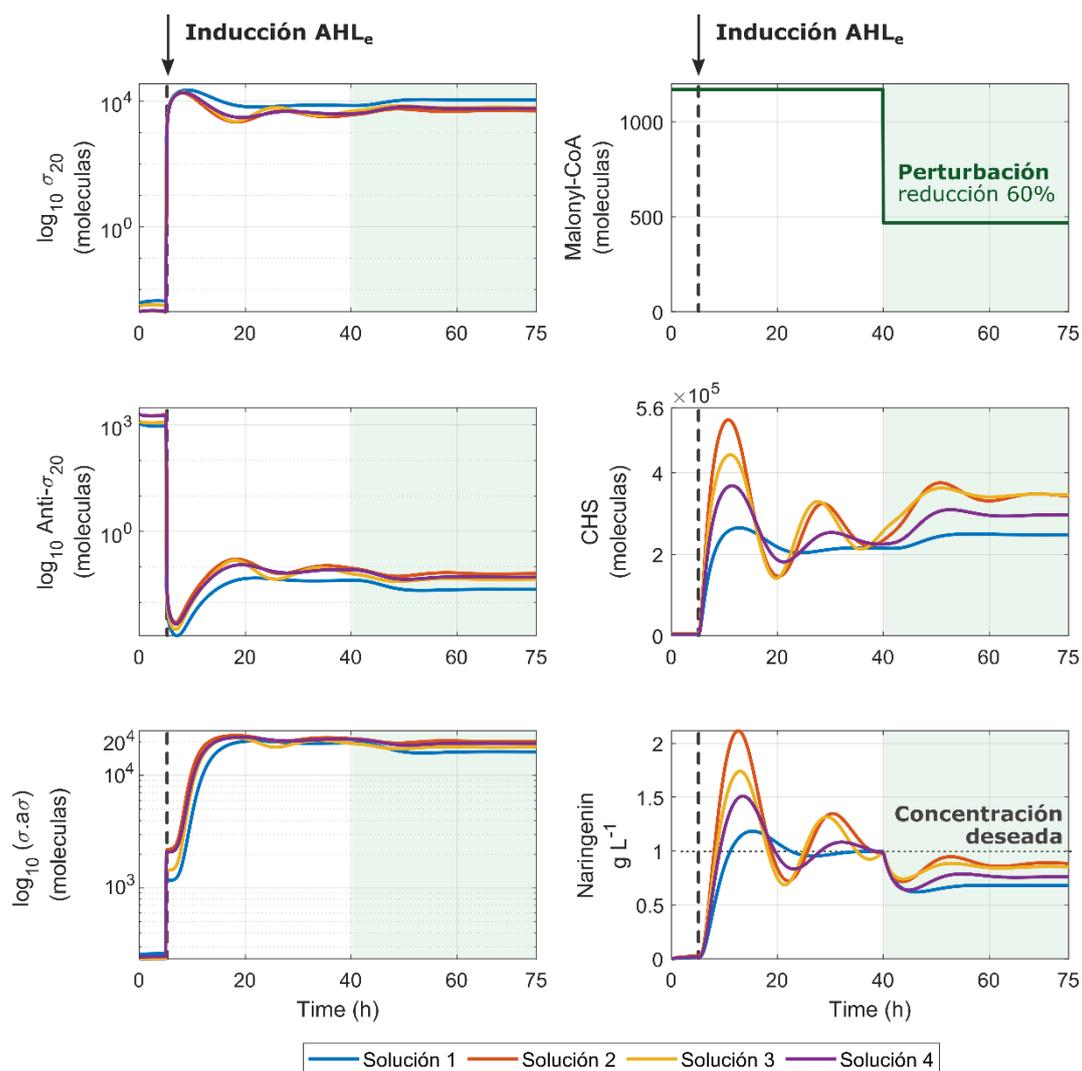
	Pa (min <sup>-1</sup> )	CNa (copias)	Pchs (min <sup>-1</sup> )	CNchs (copias)	μ (min <sup>-1</sup> )
Solución 1	3.0314	9.9920	9.6501	16.9464	0.0085
Solución 2	2.1620	13.9276	20.000	18.8045	0.0091
Solución 3	3.3019	10.0986	18.5052	17.0819	0.0094
Solución 4	2.1620	13.9276	19.8460	12.5088	0.0091



**Figura 4. 9 Representación gráfica de las mejores soluciones de los objetivos.** Las soluciones 1, 2, 3 y 4 son las seleccionadas tras la optimización, y los valores iniciales recogidos de la bibliografía se representan en las barras de parámetros nominales. Las barras representan los resultados de los objetivos en orden (1, 2 y 3).

Los objetivos obtenidos se recogieron en la Figura 4.9. Como podemos comprobar, los parámetros bibliográficos iniciales (indicados como parámetros nominales) no eran los óptimos, puesto que no se ajustaban perfectamente al objetivo general, es decir, mantener la concentración de naringenina en 1 gL<sup>-1</sup>, incluso tras la perturbación de malonyl-CoA. De las 4 soluciones óptimas, las mejores son la 2 y 3. Teniendo en cuenta ambas soluciones, nos decantamos por la **solución 2**, ya que, aunque el tiempo J3 sea mínimamente mayor, el error de naringenina J2 es menor, y la concentración deseada J1 es aproximadamente 1 gL<sup>-1</sup>. Por tanto, se demuestra que la optimización ha sido útil.

Con los valores de los parámetros del sistema optimizados, se realizó la simulación de comportamiento de las especies (Figura 4.10, que sigue el mismo código de colores que la Figura 4.9) para comprobar si este había mejorado con respecto al inicial.



**Figura 4. 10 Simulación del sistema con las soluciones seleccionadas de la optimización multiobjetivo.** Cada gráfica representa el comportamiento de una especie del circuito genético. Tras la inducción de AHL<sub>e</sub> inicia el control de la vía metabólica y reacciona a una perturbación (reducción de Malonyl-CoA) a las 40 h, cambiando el comportamiento de las diferentes especies. Las gráficas de factores antitéticos están en escala logarítmica debido a que su concentración varía hasta 4 órdenes de magnitud en muy poco tiempo.

El comportamiento del sistema observado con los valores optimizados de los parámetros es el siguiente:

### **AHLe**

El controlador antitético se pone en marcha cuando se produce la inducción de AHL<sub>e</sub>, cuya función es formar el factor de transcripción que inicia la síntesis del factor  $\sigma_{20}$ .

### **Malonyl-CoA**

La molécula malonyl-CoA es un sustrato imprescindible de la enzima CHS para sintetizar la naringenina, siendo limitante su concentración en la vía de síntesis. La perturbación a la que debe reaccionar el controlador es a la disminución de concentración de esta especie del modelo.

A las 40 h, se reduce en un 60% su cantidad, por lo que a partir de este momento se observó un cambio en todas las especies.

#### **$\sigma_{20}$ , $\alpha\sigma_{20}$ , complejo ( $\sigma_{20}\cdot\alpha\sigma_{20}$ )**

- El factor  $\sigma_{20}$  aumentó su síntesis tras la inducción de AHLe ya que promueve la formación del factor de transcripción necesario. La concentración del factor  $\sigma_{20}$  libre fue casi constante en el tiempo, aumentando un poco tras la perturbación; puesto que es necesario aumentar la cantidad de naringenina.
- El factor Anti- $\sigma_{20}$  inicia con mayor cantidad debido que su promotor no depende de la inducción, y no hay presencia de factor para formar el complejo. Sin embargo, tras inducir AHLe, bajó drásticamente por el inicio de formación del complejo ( $\sigma_{20}\cdot\alpha\sigma_{20}$ ).
- Por su parte, el complejo ( $\sigma_{20}\cdot\alpha\sigma_{20}$ ) empezó a formarse tras la inducción de AHLe, ya que requiere tanto el factor  $\sigma_{20}$  como el  $\alpha\sigma_{20}$ .

#### **CHS**

La enzima CHS aumentó su síntesis tras la inducción con AHLe debido a que su promotor inducible depende del factor  $\sigma_{20}$ , e intenta mantener a niveles deseados la producción de naringenina. Tras la perturbación con Malonyl-CoA, la síntesis de enzima se incrementó con el objetivo de aumentar la cantidad de metabolito. Por ello, tras las 40 h se experimenta un aumento, respondiendo al estímulo.

#### **Naringenina**

La concentración de naringenina es uno de los objetivos principales. Inicia su síntesis con la inducción de AHLe y se mantiene alrededor de  $1 \text{ gL}^{-1}$  aproximadamente. Tras la perturbación del Malonyl-CoA, el controlador antitético debe reaccionar y mostrar su estabilidad en bucle cerrado, manteniendo una concentración cercana a  $1 \text{ gL}^{-1}$ . Como se puede observar en la Figura 4.10, el error entre la respuesta y la referencia no es cero, sin embargo, la concentración de producción es notablemente superior a la que se consigue con otras regulaciones.

Finalmente, de la optimización y simulación podemos destacar que el controlador antitético es una buena opción para utilizar una regulación interna con un objetivo claro: regular una vía metabólica determinada. La ventaja evidente que presenta este tipo de control es que evita la producción de proteínas y metabolitos erróneos ya que presenta autorregulación celular. Asimismo, su respuesta frente a una bajada drástica de malonyl-CoA es eficiente, manteniendo la concentración en niveles cercanos a  $1 \text{ gL}^{-1}$  y en un tiempo razonable.

## 5. Conclusiones

En este trabajo, siguiendo el ciclo de la biología sintética, se ha logrado diseñar, modelar matemáticamente e implementar una parte del controlador antitético propuesto, así como optimizarlo en una vía de regulación concreta. Las conclusiones obtenidas en el trabajo son las siguientes:

- El grupo ECF20 de componentes antitéticos fue adecuado para diseñar el controlador antitético, cumpliendo la función deseada: mantener la concentración de una proteína en torno a una concentración deseada.
- El modelo matemático ODE compuesto por 8 ecuaciones, a partir de las reacciones bioquímicas de las especies involucradas explicó con más detalle las interacciones de las especies del controlador antitético, y demostró ser más preciso que los encontrados en la literatura. Por ello, logró capturar y simular mejor el comportamiento real del circuito genético.
- Se demostró mediante simulación computacional que el controlador consigue mantener la concentración de una proteína de interés en torno a valores deseados, incluso cuando existen perturbaciones en el medio.
- El sistema de ensamblaje GoldenBraid resultó ser eficaz para construir, al menos, una parte del controlador antitético utilizando las partes biológicas del repositorio del laboratorio S2bclab. Concretamente 11 plásmidos pertenecientes al primer nivel fueron construidos e implementados con éxito mediante dicho método de ensamblaje. Los plásmidos fueron transformados en *E.coli* y forman parte de la colección de partes biológicas del Laboratorio de Biología sintética Sb2clab de la UPV.
- Siguiendo el ciclo de la biología sintética se optimizó el controlador genético para una aplicación de interés biotecnológico, puesto que se consiguió maximizar la síntesis de naringenina, que es un metabolito relevante en la industria farmacéutica.
- Se demostró la optimización de los parámetros del controlador antitético mediante el enfoque de optimización multiobjetivo y simulación computacional de su modelo matemático. En concreto, se maximizó la producción de naringenina a una concentración cercana a  $1 \text{ gL}^{-1}$  minimizando el uso de recursos celulares en esta ruta metabólica como el sustrato malonyl-CoA, y que dos objetivos que aún no se han conseguido a nivel de industria biotecnológica.

Finalmente, como líneas futuras de estudio, sería conveniente incorporar al controlador antitético otro circuito genético que active y regule la producción de la lactona AHL cuando esta se esté degradando, ya que la realimentación y el bucle cerrado necesarios para el controlador antitético dependen de esta molécula. De esta forma la autorregulación de AHL estaría asegurada.

## 6. Referencias bibliográficas

- AGRAWAL, D. K.; MARSHALL, R.; NOIREAUX, V. & SONTAG, E. D. (2019). In vitro implementation of robust gene regulation in a synthetic biomolecular integral controller. *Nature communications*, 10(1), 1-12.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; HOPKIN, K.; JOHNSON, A. D.; JOHNSON, A.; ROBERTS, K.; LEWIS, J.; RAFF, M. & WALTER, P. (2009). *Essential Cell Biology*. (3rd ed.). Garland Science.
- ALON, U. (2019). *An introduction to systems biology: Design principles of biological circuits* (Second edition). CRC Press.
- ANNUNZIATA, F.; MATYJASZKIEWICZ, A.; FIORE, G.; GRIERSON, C. S.; MARUCCI, L.; DI BERNARDO, M. & SAVERY, N. J. (2017). An orthogonal multi-input integration system to control gene expression in *Escherichia coli*. *ACS synthetic biology*, 6(10), 1816-1824.
- AOKI, S. K.; LILLACCI, G.; GUPTA, A.; BAUMSCHLAGER, A.; SCHWEINGRUBER, D. & KHAMMASH, M. (2019). A universal biomolecular integral feedback controller for robust perfect adaptation. *Nature*, 570(7762), 533-537.
- BOADA ACOSTA, Y. F. (2018). *A systems engineering approach to model, tune and test synthetic gene circuits* [Universitat Politècnica de València].
- BOADA, Y., VIGNONI, A., PICÓ, J., & CARBONELL, P. (2020). Extended metabolic biosensor design for dynamic pathway regulation of cell factories. *iScience*, 101305.
- BOADA, Y.; REYNOSO-MEZA, G.; PICÓ, J. & VIGNONI, A. (2016). Multi-objective optimization framework to obtain model-based guidelines for tuning biological synthetic devices: An adaptive network case. *BMC Systems Biology*, 10(1), 27.
- BOADA, Y.; VIGNONI, A. & PICÓ, J. (2017). Engineered control of genetic variability reveals interplay among quorum sensing, feedback regulation, and biochemical noise. *ACS synthetic biology*, 6(10), 1903-1912.
- BOADA, Y.; VIGNONI, A.; ALARCON-RUIZ, I.; ANDREU-VILARROIG, C.; MONFORT-LLORENS, R.; REQUENA, A. & PICÓ, J. (2019). Characterization of gene circuit parts based on multiobjective optimization by using standard calibrated measurements. *ChemBioChem*, 20(20), 2653-2665.
- BRIAT, C. & KHAMMASH, M. (2018). Perfect adaptation and optimal equilibrium productivity in a simple microbial biofuel metabolic pathway using dynamic integral control. *ACS Synthetic Biology*, 7(2), 419-431.
- BRIAT, C.; GUPTA, A. & KHAMMASH, M. (2016). Antithetic integral feedback ensures robust perfect adaptation in noisy biomolecular networks. *Cell Systems*, 2(1), 15-26.
- BRIAT, C.; GUPTA, A. & KHAMMASH, M. (2018). Variance reduction in stochastic gene expression under integral feedback control. *2018 IEEE Conference on Decision and Control (CDC)*, 1893-1898.
- BROPHY, J. A. N. & VOIGT, C. A. (2014). Principles of genetic circuit design. *Nature Methods*, 11(5), 508-520.
- CHELLABOINA, V.; BHAT, S. P.; HADDAD, W. M. & BERNSTEIN, D. S. (2009). Modeling and analysis of mass-action kinetics. *IEEE Control Systems Magazine*, 29(4), 60-78.
- CHUBUKOV, V.; MUKHOPADHYAY, A.; PETZOLD, C. J.; KEASLING, J. D. & MARTÍN, H. G. (2016). Synthetic and systems biology for microbial production of commodity chemicals. *Npj Systems Biology and Applications*, 2(1), 16009.
- COURDAVAULT, V.; O'CONNOR, S. E.; OUDIN, A.; BESSEAU, S. & PAPON, N. (2020). Towards the microbial production of plant-derived anticancer drugs. *Trends in Cancer*, 6(6), 444-448.

- EICHENBERGER, M.; LEHKA, B. J.; FOLLY, C.; FISCHER, D.; MARTENS, S.; SIMÓN, E. & NAESBY, M. (2017). Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for de novo production of dihydrochalcones with known antioxidant, antidiabetic, and sweet tasting properties. *Metabolic Engineering*, 39, 80-89.
- ENDLER, L.; RODRIGUEZ, N.; JUTY, N.; CHELLIAH, V.; LAIBE, C.; LI, C. & LE NOVÈRE, N. (2009). Designing and encoding models for synthetic biology. *Journal of The Royal Society Interface*, 6(suppl\_4).
- ENGLER, C.; KANDZIA, R. & MARILLONNET, S. (2008). A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability. *PLoS ONE*, 3(11), e3647.
- FICK, A. (1855). On liquid diffusion. *Annalen der Physik und Chemie*. 94, 59. – reprinted in FICK, A. (1995). On liquid diffusion. *Journal of Membrane Science*. 100(1), 33–38.
- GALANIE, S.; THODEY, K.; TRENCHARD, I. J.; FILSINGER INTERRANTE, M. & SMOLKE, C. D. (2015). Complete biosynthesis of opioids in yeast. *Science*, 349(6252), 1095-1100.
- HILL A. V. (1910). The possible effects of the aggregation of the molecules of haemoglobin on its dissociation curves. *J Physiol (Lond)*, 40, 4-7. URL <https://ci.nii.ac.jp/naid/10008305829/en/>.
- HSIAO, V.; SWAMINATHAN, A. & MURRAY, R. M. (2018). Control theory for synthetic biology: Recent advances in system characterization, control design, and controller implementation for synthetic biology. *IEEE Control Systems*, 38(3), 32-62.
- JOHNSON, A. O.; GONZALEZ-VILLANUEVA, M.; WONG, L.; STEINBÜCHEL, A.; TEE, K. L., XU, P. & WONG, T. S. (2017). Design and application of genetically-encoded malonyl-CoA biosensors for metabolic engineering of microbial cell factories. *Metabolic Engineering*, 44, 253-264.
- KIM, J.; KHETARPAL, I.; SEN, S. & MURRAY, R. M. (2014). Synthetic circuit for exact adaptation and fold-change detection. *Nucleic Acids Research*, 42(9), 6078-6089.
- LIU, D.; MANNAN, A. A.; HAN, Y.; OYARZÚN, D. A. & ZHANG, F. (2018). Dynamic metabolic control: Towards precision engineering of metabolism. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 45(7), 535-543.
- LIU, L.; SHAN, S.; ZHANG, K.; NING, Z.-Q.; LU, X.-P. & CHENG, Y.-Y. (2008). Naringenin and hesperetin, two flavonoids derived from *Citrus aurantium* up-regulate transcription of adiponectin. *Phytotherapy Research*, 22(10), 1400–1403.
- LÓPEZ, M. (2006). *Biología sintética: Informe de vigilancia tecnológica*. Genoma España.
- MAJER, E.; LLORENTE, B.; RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN, M. & DARÒS, J.-A. (2017). Rewiring carotenoid biosynthesis in plants using a viral vector. *Scientific Reports*, 7(1), 41645.
- MAY, M. (2015). Synthetic biology's clinical applications. *Science*, 349(6255), 1564-1566.
- MIETTINEN, K. (2012). Nonlinear multiobjective optimization (Vol. 12). *Springer Science & Business Media*.
- MORADALI, M. F. & REHM, B. H. A. (2020). Bacterial biopolymers: From pathogenesis to advanced materials. *Nature Reviews Microbiology*, 18(4), 195-210.
- PADDON, C. J. & KEASLING, J. D. (2014). Semi-synthetic artemisinin: A model for the use of synthetic biology in pharmaceutical development. *Nature Reviews Microbiology*, 12(5), 355-367.
- PURNICK, P. E. M. & WEISS, R. (2009). The second wave of synthetic biology: From modules to systems. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(6), 410-422.
- RAHIGUDE, A.; BHUTADA, P.; KAULASKAR, S.; ASWAR, M. & OTARI, K. (2012). Participation of antioxidant and cholinergic system in protective effect of naringenin against type-2 diabetes-induced memory dysfunction in rats. *Neuroscience*, 226, 62–72.

REQUENA, A. (2019). Design and optimization of a genetic circuit for the internal control of the population density of an Escherichia coli culture. Bachelor's Degree Final Project.

RHODIUS, V. A.; SEGALL-SHAPIRO, T. H.; SHARON, B. D.; GHODASARA, A.; ORLOVA, E.; TABAKH, H.; BURKHARDT, D. H.; CLANCY, K.; PETERSON, T. C.; GROSS, C. A. & VOIGT, C. A. (2013). Design of orthogonal genetic switches based on a crosstalk map of  $\sigma_s$ , anti- $\sigma_s$ , and promoters. *Molecular Systems Biology*, 9(1), 702.

ROGERS, C. & OLDROYD, G. E. D. (2014). Synthetic biology approaches to engineering the nitrogen symbiosis in cereals. *Journal of Experimental Botany*, 65(8), 1939-1946.

SARRION-PERDIGONES, A.; FALCONI, E. E.; ZANDALINAS, S. I.; JUÁREZ, P.; FERNÁNDEZ-DEL-CARMEN, A.; GRANELL, A. & ORZAEZ, D. (2011). Goldenbraid: An iterative cloning system for standardized assembly of reusable genetic modules. *PLoS ONE*, 6(7), e21622.

SARRION-PERDIGONES, A.; VAZQUEZ-VILAR, M.; PALACI, J.; CASTELIJNS, B.; FORMENT, J.; ZIARSOLO, P.; BLANCA, J.; GRANELL, A. & ORZAEZ, D. (2013). Goldenbraid 2. 0: A comprehensive dna assembly framework for plant synthetic biology. *PLANT PHYSIOLOGY*, 162(3), 1618-1631.

SIEDLER, S.; STAHLHUT, S. G.; MALLA, S.; MAURY, J. & NEVES, A. R. (2014). Novel biosensors based on flavonoid-responsive transcriptional regulators introduced into Escherichia coli. *Metabolic Engineering*, 21, 2-8.

THE ROYAL ACADEMY OF ENGINEERING (Great Britain). (2009). *Synthetic biology: Scope, applications and implications*. Carlton House.

TRABELSI, H.; KOCH, M. & FAULON, J. L. (2018). Building a minimal and generalizable model of transcription factor-based biosensors: Showcasing flavonoids. *Biotechnology and bioengineering*, 115(9), 2292-2304.

VAZQUEZ-VILAR, M.; QUIJANO-RUBIO, A.; FERNANDEZ-DEL-CARMEN, A.; SARRION-PERDIGONES, A.; OCHOA-FERNANDEZ, R.; ZIARSOLO, P.; BLANCA, J.; GRANELL, A. & ORZAEZ, D. (2017). GB3.0: A platform for plant bio-design that connects functional DNA elements with associated biological data. *Nucleic Acids Research*, 45(4), 2196–2209.

VECCHIONE, S. & FRITZ, G. (2019). CRIMoClo plasmids for modular assembly and orthogonal chromosomal integration of synthetic circuits in Escherichia coli. *Journal of Biological Engineering*, 13(1), 92.

WU, M.-R.; JUSIAK, B. & LU, T. K. (2019). Engineering advanced cancer therapies with synthetic biology. *Nature Reviews Cancer*, 19, 187–195.

XIA, P.-F.; LING, H.; FOO, J. L. & CHANG, M. W. (2019). Synthetic genetic circuits for programmable biological functionalities. *Biotechnology Advances*, 37(6), 107393.

XIE, M. & FUSSENEGGER, M. (2018). Designing cell function: Assembly of synthetic gene circuits for cell biology applications. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(8), 507-525.

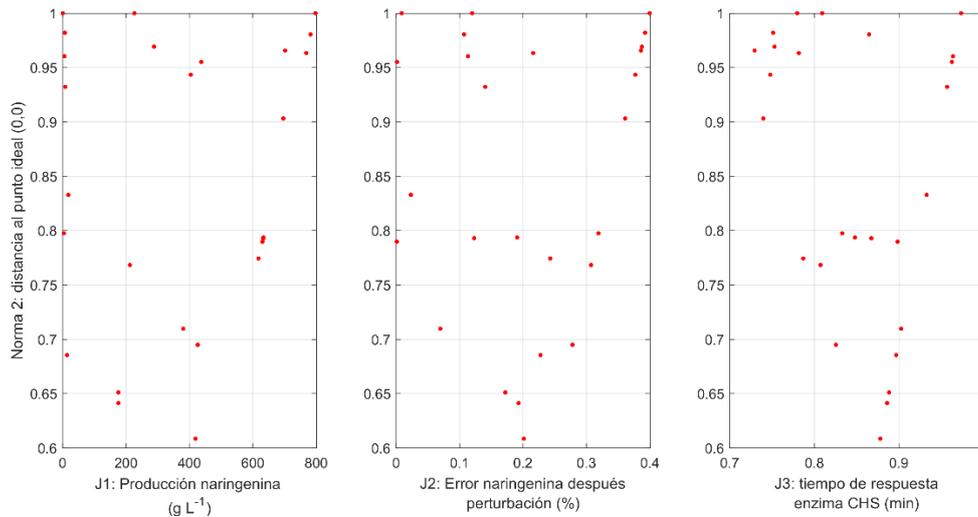
XU, P.; LI, L.; ZHANG, F.; STEPHANOPOULOS, G. & KOFFAS, M. (2014). Improving fatty acids production by engineering dynamic pathway regulation and metabolic control. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(31), 11299-11304.

ZHOU, S.; LYU, Y.; LI, H.; KOFFAS, M. A. G. & ZHOU, J. (2019). Fine-tuning the (2S)-naringenin synthetic pathway using an iterative high-throughput balancing strategy. *Biotechnology and Bioengineering*, 116(6), 1392-1404.

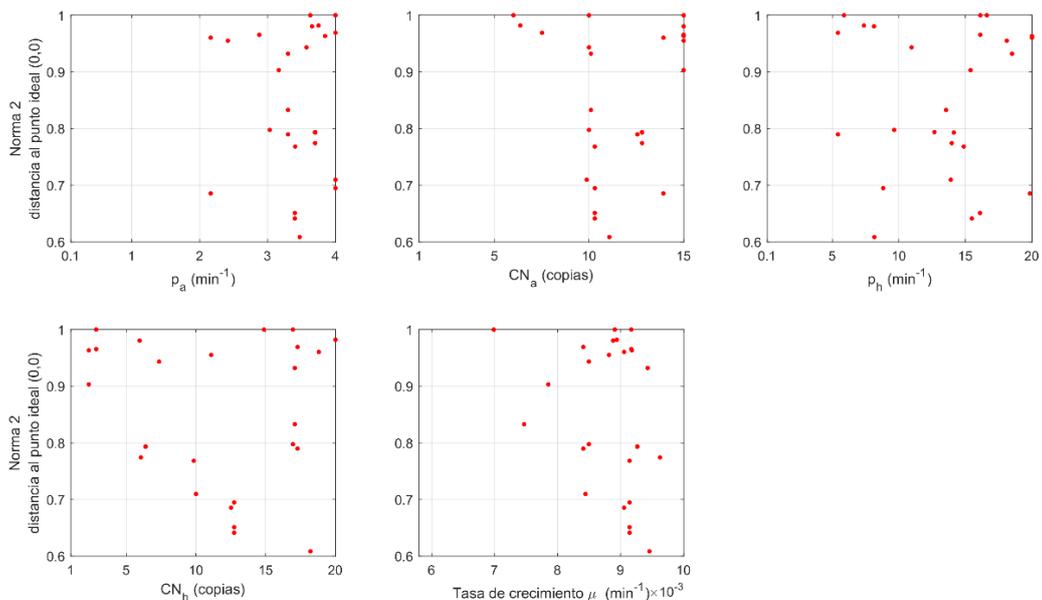
ZYGMUNT, K.; FAUBERT, B.; MACNEIL, J. & TSIANI, E. (2010). Naringenin, a citrus flavonoid, increases muscle cell glucose uptake via AMPK. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 398(2), 178–183.

# Anexo I: Resultados de la optimización

La optimización fue llevada a cabo para obtener las mejores soluciones de tres objetivos concretos: (J1) la producción de naringenina, (J2) el error de naringenina tras la producción y (J3) el tiempo de respuesta del enzima. Asimismo, se propusieron 5 variables de decisión que serían fáciles de modificar en el laboratorio. Las gráficas Frente Pareto de las 26 soluciones se encuentran en las Figuras 1 y 2. De ellas, 4 fueron seleccionadas como las mejores (sección 4.3.2).



**Figura 1. Frente Pareto obtenido de la optimización de parámetros.** Cada punto representa una de las soluciones de las 26 obtenidas para cada objetivo, siendo mejor aquella que aumente la producción de naringenina y se aleje menos del punto ideal (0,0).



**Figura 2. Soluciones de Frente Pareto obtenidas para las variables de decisión.** Cada variable de decisión ( $p_a$ ,  $CN_a$ ,  $p_{ch}$ ,  $CN_{ch}$ ,  $\mu$ ) presenta un valor para cada solución de los objetivos.

# Anexo II: Artículos de Revista y de Congreso derivados de este trabajo

## Dynamic pathway regulation: extended biosensor and controller tuning with multiobjective optimization

Yadira Boada<sup>1</sup>, Alejandro Vignoni<sup>1</sup>, Ana Fraile<sup>2</sup>, Jesús Picó<sup>1</sup>, Pablo Carbonell<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Synthetic Biology and Biosystems Control Lab, Instituto de Automática e Informática Industrial, Universitat Politècnica de València, <sup>2</sup>Escuela Téc. Sup. de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural, Universitat Politècnica de València {yaboa,alvig2,anfrlo,jpico,pjcarbon}@upv.es

### 1 BACKGROUND

Natural cells preserve robust growth and endure environmental changes by dynamically adapting cell metabolism by means of complex regulatory networks [6]. However, these complex regulation strategies are the result of years of evolution and they are not compatible with production levels demanded by the industry. Major improvements in yield, titer, and productivity can be achieved by balancing pathway gene expression. There are mainly two different ways of doing this balancing: static control, and dynamic pathway regulation.

Static pathway regulation strategies (Figure 1A) are optimized for a particular situation, and therefore they are incapable of responding to growth and environmental changes that occur during fermentation in a bioreactor [10]. Dynamic balancing addresses the robustness pitfalls of static control through the application of feedback and feedforward regulation (Figure 1B). This makes it possible to obtain higher titers as compared to static regulation [9]. Despite a growing number of success stories, engineering dynamic control remains extremely challenging [5]. Moreover, the performance specifications for synthetic gene circuits and components change significantly with variations in parameters such as temperature, host organism, growth media formulation, and position of the genes in the genome [8]. Model-based design relying on the principles of control engineering can provide a powerful formalism to engineer dynamic control circuits and address these challenges. These, together with the tools of synthetic biology, can lead to robust and efficient microbial production at industrial levels [6, 8].

### 2 METHODS

In this work, we propose using a multiobjective optimization (Figure 1C) approach to optimally tune a recently developed dynamic pathway regulation strategy [4]. The metabolic pathway is a phenylpropanoid pathway to produce the metabolite Naringenin (Figure 1A). The controller used to regulate the pathway is the novel antithetic controller [1] in combination with our recently proposed extended metabolic biosensor [4] (Figure 1B). These two pieces together imply a complexity that needs several objectives to be fulfilled simultaneously (i.e. low titer error, fast response to perturbations,

parametric robustness, and closed-loop stability among others). In general, these objectives are in conflict and a trade-off must be reached. Multiobjective optimization has shown to be a valuable tool in these situations [3]. With the dynamic system model at hand (developed in [4]), the following steps are necessary for a successful multiobjective optimization: i) define the multiobjective problem (objectives to be optimized), ii) perform the optimization to obtain the solutions (Pareto Front and Pareto Set), and iii) select among the resulting solutions the ones that fulfill the requirements of the design. The result of this optimization is a set of guidelines for the implementation of the biosensor and the controller *in vivo*. Then, when this approach is combined with a collection of parts previously characterized, the results can be interpreted as suggestions about how to select parts like RBS, promoter, plasmid, or enzyme (gene variant) from the collection.

### 3 DISCUSSION

Several authors have recently explored approaches to help in the tuning of the antithetic controller [2, 7]. Nevertheless, these models and their level of detail are not enough to assist in the *in vivo* implementation of the system.

### REFERENCES

- [1] AOKI, S. K., LILLACCI, G., GUPTA, A., BAUMSCHLAGER, A., SCHWEINGRUBER, D., AND KHAMMASH, M. A universal biomolecular integral feedback controller for robust perfect adaptation. *Nature* 570, 7762 (jun 2019), 533–537.
- [2] BAETICA, A.-A., LEONG, Y. P., AND MURRAY, R. M. Guidelines for designing the antithetic feedback motif. *Physical Biology* (2020).
- [3] BOADA, Y., REYNOSO-MEZA, G., PICÓ, J., AND VIGNONI, A. Multi-objective optimization framework to obtain model-based guidelines for tuning biological synthetic devices: an adaptive network case. *BMC systems biology* 10, 1 (2016), 27.
- [4] BOADA, Y., VIGNONI, A., PICÓ, J., AND CARBONELL, P. Extended metabolic biosensor design for dynamic pathway regulation of cell factories. *iScience In press* (2020).
- [5] GAO, C., XU, P., YE, C., CHEN, X., AND LIU, L. Genetic Circuit-Assisted Smart Microbial Engineering. *Trends in Microbiology* (aug 2019).
- [6] LIU, D., MANNAN, A. A., HAN, Y., OYARZÚN, D. A., AND ZHANG, F. Dynamic metabolic control: towards precision engineering of metabolism. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 45, 7 (jan 2018), 535–543.
- [7] OLSMAN, N., XIAO, F., AND DOYLE, J. C. Architectural principles for

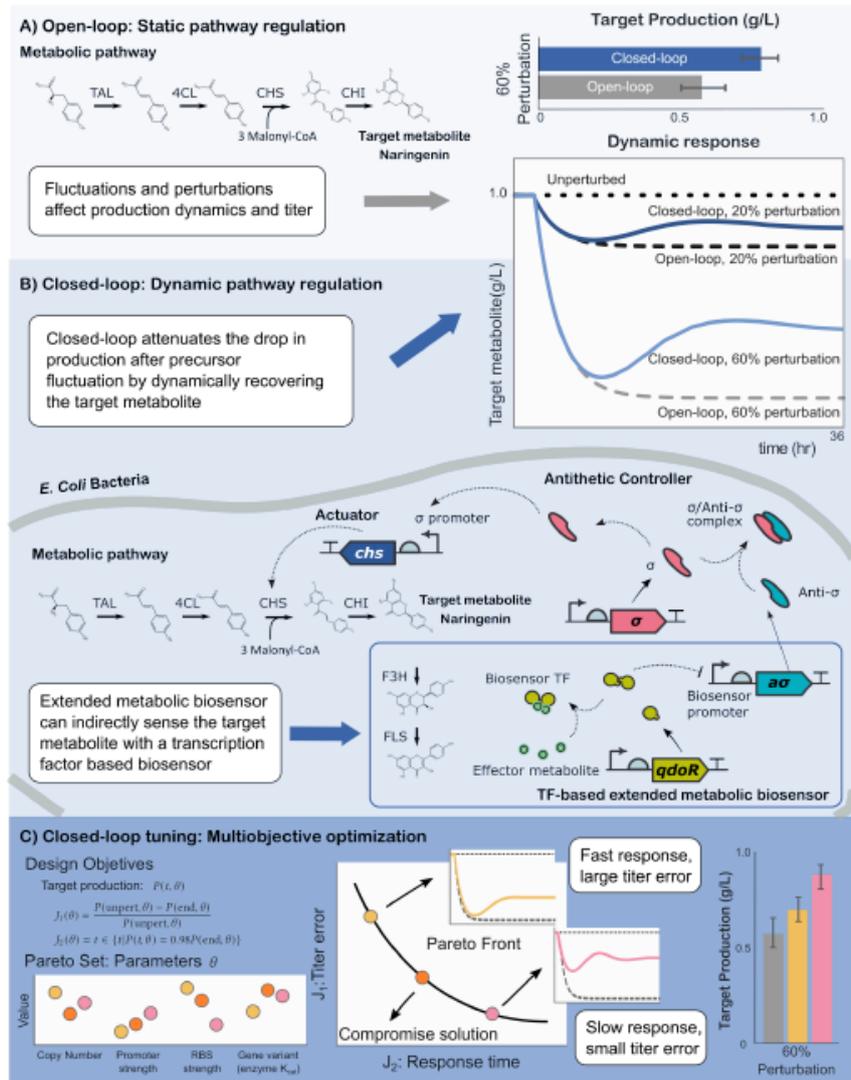


Figure 1: Dynamic pathway regulation: Biosensor and controller parameter tuning.

- characterizing the performance of antithetic integral feedback networks. *iScience* 14 (2019), 277–291.
- [8] SEGALL-SHAPIRO, T. H., SONTAG, E. D., AND VOIGT, C. A. Engineered promoters enable constant gene expression at any copy number in bacteria. *Nature Biotechnology* 36, 4 (mar 2018), 352–358.
- [9] STEVENS, J. T., AND CAROTHERS, J. M. Designing RNA-Based Genetic Control Systems for Efficient Production from Engineered Metabolic Pathways. *ACS Synthetic Biology* 4, 2 (feb 2015), 107–115.
- [10] WEHRS, M., TANJORE, D., ENG, T., LIEVENSE, J., PRAY, T. R., AND MUKHOPADHYAY, A. Engineering Robust Production Microbes for Large-Scale Cultivation. *Trends in Microbiology* 27, 6 (jun 2019), 524–537.