



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Ciencias Naturales

Construcción, clonación, expresión y caracterización de dos biopartes sintéticas (BBa\_K328003 y BBa\_K328004) del gen Csp A en *Escherichia coli* ante la respuesta a la disminución de temperatura

Tesis Individual

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Licenciada en Biología

Presenta  
Rosa Paulina Calvillo Medina



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Ciencias Naturales  
Licenciatura en Biología.

Construcción, clonación, expresión y caracterización de dos biopartes sintéticas (BBa\_K328003 y BBa\_K328004) del gen Csp A en *Escherichia coli* ante la respuesta a la disminución de temperatura

Tesis Individual

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de:  
Licenciada en Biología

**Presenta:**  
Rosa Paulina Calvillo Medina

**Codirigido por:**  
Dr. Arturo Carlos II Becerra Bracho y Dr. Juan Campos Guillén

#### SINODALES

Nombre del Sinodal Presidente	_____
	Firma
Nombre del Sinodal Secretario	_____
	Firma
Nombre del Sinodal Vocal	_____
	Firma
Nombre del Sinodal Suplente	_____
	Firma
Nombre del Sinodal Suplente	_____
	Firma

Centro Universitario  
Querétaro, Qro.  
Fecha  
**México**

## RESUMEN

La biología sintética es una rama emergente de la biología que por medio de la generación de biopartes, la estandarización, la caracterización mediante genes reporteros y el modelaje matemático, ha comenzado a revolucionar la manera en que se estudiaban los sistemas y se resolvían los problemas del entendimiento de la naturaleza. Se han generado dispositivos que mediante la combinación de partes podrían ayudar a resolver problemas humanos.

Por ejemplo en México este campo de estudio puede servir para crear una solución a la formación de cristales de hielo un problema económicamente relevante en los cultivos de *Coffea arabica* L. Mediante la unión de un promotor bacteriano constitutivo (*cspA*) y una proteína de *Zoarcetes americanus* (AFP) la cual evita la formación de cristales de hielo a -1°C. He construido una bioparte (biobrick) para evitar dicho fenómeno en *Escherichia coli*. El gen *cspA*, se activa a con el cambio de temperatura de 37°C a 15 °C en *E. coli*. Sin embargo existen varias incógnitas respecto a otras partes del mismo gen y se ha especulado que presentan actividad promotora. En el presente trabajo he construido dos biopartes (BBa\_K328003 y BBa\_K328004) para clonarlas, expresarlas y caracterizar su actividad promotora en *E. coli* usando como gen reportero GFP

**Palabras clave:** Biología sintética, Bioparte, *cspA*, BBa\_K328003, BBa\_K328004

## SUMMARY

Synthetic biology is an emerging branch of biology that through generation's bioparts, standardization, characterization using reporter genes and mathematical modeling, it has begun to revolutionize way that systems are studied and solved understanding nature problems. Several, devices have been generated by combining parts, which could help to solve human problems. A major problem in Mexico that can be analyz by synthetic biology is ice crystals formation in the cultures of *Coffea arabica L*, causing loss of millions dollars in the country. By joining together a bacterial promoter (*cspA*) and a *Zoarces americanus* protein (AFP) which prevents the formation of ice crystals at  $-1^{\circ}\text{C}$  will be possible to build a *Biobrick* to prevent this phenomenon. The *cspA* gene, is activated with the change in temperature of  $37^{\circ}\text{C}$  to  $15^{\circ}\text{C}$  in *Escherichia coli*, it has a constitutive promoter. However, there are several questions across other parts of the same gene and has been speculated that they have promoter activity. In this paper we have constructed two bioparts (BBa\_K328003 and BBa\_K328004) for cloning, expression and characterizetion them with GFP in *E. coli*

Key words: Synthetic biology, biobrick, *cspA*, BBa\_K328003, BBa\_K328004

A Maricela Medina Alcaráz y Héctor Calvillo Vega, por toda la confianza  
y el apoyo recibido, siempre han estado conmigo en la distancia.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Autónoma de Querétaro por las bases en mi formación académica.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por abrirme sus puertas y permitirme realizar este trabajo de tesis.

Al Dr. Juan Campos Guillen por enseñarme de biología molecular y a luchar por mis metas.

Al Dr. Arturo Becerra Bracho por introducirme en la biología sintética y aceptar ser mi director de tesis.

Al Dr. Marco Antonio Sánchez Ramos por hacerme ver que existen otras visiones y otras teorías.

A la M. en C. Xochitl Pastrana por el apoyo en el laboratorio.

A la M. en C. Fabiola Ramírez Corona por su apoyo y confianza en el laboratorio.

A los compañeros del equipo México-UNAM-CINVESTAV 2010 por las aportaciones en el desarrollo intelectual del proyecto.

A mis compañeros de licenciatura por convertirnos en adultos y por aprender de la vida y la ciencia juntos.

## ÍNDICE

Resumen.....	iii
Summary.....	vi
Dedicatoria.....	v
Agradecimientos.....	vi
Índice.....	vii
Índice de cuadros.....	ix
Índice de figuras.....	x
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
La biología sintética.....	3
¿Qué es la biología sintética?.....	3
Fundamentos de la biología sintética.....	5
¿Bioparte estandarizada?.....	5
Estandarizando la biología.....	6
Caracterización en biología sintética.....	8
Modelación matemática.....	13
Resolución de problemas mediante biología sintética.....	14
Problema de las heladas.....	15
Los organismos y el frío.....	16
Bacterias y su sistema contra frío.....	16
Las Csp's.....	18
Función y regulación de CspA.....	20
Adaptaciones al frío.....	23
La CspA y los efectos ribosomales al coque frío.....	23
Cambios asociados a membrana celular.....	24
III. METODOLOGÍA.....	28
Las biopartes BBa_K328003, BBa_K328004, y la caracterizar.....	28
Diseño, síntesis y elución de oligos.....	31
Métodos de laboratorio.....	31
Elución de <i>biobricks</i> .....	31
PCR.....	32
Preparación de células competentes.....	33
Transformación y crecimiento bacteriana.....	33
Miniprep y Midiprep.....	34

Birnboim y Doly (Miniprep y Midiprep).....	34
Preparación de gliceroles.....	36
Electroforesis.....	36
Digestión.....	37
Limpieza y concentración de DNA.....	38
Extracción de geles de agarosa.....	38
Ligaciones.....	38
Secuenciación.....	39
IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	40
V. REFERENCIAS.....	50

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Páginas
1	Esquemas de las biopartes usadas la caracterización	30
2	Oligos y las secuencias	31
3	Condiciones usada para el PCR	32
4	Relación entre los fragmentos y las enzimas de restricción	37
5	Condiciones para las dobles ligaciones	45
6	Condiciones para las dobles ligaciones y sus resultados	45

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Páginas
1	El gen <i>cspA</i> de <i>E. coli</i>	17
2	Diagrama de los <i>Biobricks</i> generados	28
3	Esquema del ensamblaje estándar de BBa_K328003 con E0240 (GFP) y BBa_K328004 y E0240	29
4	La construcción de la bioparte BBa_K328003	41
5	La construcción de la bioparte BBa_K328004	42
6	Comprobación de las biopartes BBa_K328003 y BBa_K328004	43
7	Construcción para la caracterización de BBa_K328003	44
8	Electroforesis de las construcciones hechas con los dos fragmentos digeridos con EcoR 1 y SpeI	48
9	Electroforesis de la digestión con EcoR1 y PstI a la construcción de: CB-UTR-SD-DB+pSB1A	49

## I.INTRODUCCIÓN

En la actualidad el enfoque que se ha dado para la resolución de algunos problemas humanos ha sido modificado en el último lustro y siendo la biología sintética parte de este cambio. En el marco de dicha disciplina, las construcciones génicas y su expresión en organismos de interés pueden ayudar a resolver necesidades humanas ya que abren la posibilidad de generar una amplia gama de proteínas codificantes.

El presente trabajo de tesis presenta las bases de una investigación que mediante la biología sintética, podría ayudar a evitar uno de los problemas que afecta a los cultivos agrícolas: las heladas. Cada año las heladas en el mundo generan pérdidas de entre 5% y 15% de la producción agrícola. Los cultivos que crecen en zonas montañosas se ven afectados por la formación de capas de hielo sobre los estomas, que impiden el intercambio gaseoso y producen la muerte de la planta (Pankow, 1991). *Coffea arabica* L es uno de los cultivos que más pérdidas registra por las heladas en México, ya que se cultiva entre los 900m y 1800m de altitud (de Camargo, 2008).

Ante los cambios ambientales varios organismos han desarrollado mecanismos para soportar las bajas en la temperatura, por ejemplo la activación de promotores y la transcripción de factores ribosomales del gen *cspA* en bacteria, permite estabilizar la síntesis de proteínas o impedir la formación de cristales de hielo por medio de proteínas anticongelantes (AFP) en animales y plantas.

Mediante el ensamblaje genético es posible construir una nueva bioparte (*biobrick*) que sea capaz de responder al cambio de temperatura de 37°C a 15°C y evitar la formación de cristales de hielo, usando el promotor o sus partes del gen *cspA* de *Escherichia coli* y la AFP del pez *Zoarces americanus* especificar al pez. Para esto es necesario poner a prueba la actividad del gen *cspA*, para elegir la combinación de partes de este gen que sea más activa en ambos sentidos y que permita la transcripción de grandes cantidades de AFP.

Los objetivos de esta investigación son: 1) Aprender a diseñar y construir partes genéticas que no existen en la naturaleza, 2) Manipular dos combinaciones del gen *cspA*,

de tal manera que puedan ser intercambiables para incluirlas en un plásmido estándar 3) Integrarlas a una colección de partes sintética combinables y 4) Analizar su actividad promotora mediante la caracterización. Este trabajo representa el punto de partida de un proyecto de investigación sobre el ensamblaje de *cspA* y AFP, para estudiar su capacidad para evitar la formación de cristales de hielo cuando la temperatura del medio desciende.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### La biología sintética

¿Qué es la biología sintética?

El diseño rápido y fiable de partes estándar, que puedan ser intercambiables y resguardadas en “bibliotecas” que al ser combinadas generen sistemas funcionales, es una manera de producir tecnología aplicada en diferentes ámbitos de las ciencias. La creación de sistemas biológicos artificiales, entendiendo claramente la interacción entre las piezas que los forman, han permitido a los biólogos, establecer las bases de una nueva disciplina, la biología sintética con estos preceptos como objetivos centrales (Canto, *et. al.*, 2008, Drubin, *et. al.*, 2007).

La biología sintética es una rama emergente del conocimiento que describe no sólo “que” hacer para resolver un problema biológico sino “como” resolverlo. La biología sintética implica, diseñar y construir complejos sistemas biológicos artificiales, mediante una cuidadosa modularización de la biología (Kolisnychenko, *et. al.*, 2002). Esta disciplina tiene como objetivo fundamental, hacer este proceso más fácil mediante la generación y estandarización de métodos y herramientas para el diseño y la construcción de sistemas moleculares; ensamblados mediante partes biológicas estandarizadas (*biobricks*) (Reshma, *et. al.*, 2008).

Usando esta disciplina se intenta “ingenierizar” (de la traducción literal de engineering) los sistemas genéticos funcionales y tangibles, implementando los conocimientos de la biología molecular básica y emulando los sistemas naturales para crear colecciones de biopartes estandarizadas. Una de estas “bibliotecas” es el Registro de Partes Biológicas Estandarizadas del MIT (<http://partsregistry.org/>). La biología sintética es un área nueva, como lo indican los trabajos realizados en la estandarización de componentes o de procesos de ensamblaje genético, que hasta el año 2000 fueron pocos (Shetty, *et. al.*, 2008). Históricamente, las investigaciones en enzimas de restricción, en los años 70’s del siglo pasado, abrieron camino para poder armar secuencias de DNA recombinante, analizar los genes individualmente, y introducir a la investigación científica en una nueva era: la de la Biología Sintética. Dentro de este nuevo paradigma, se generaran

nuevos arreglos moleculares de secuencias génicas, siendo posible construirlos y analizarlos con métodos de laboratorio (Szybalski and Skalka; 1978). En este contexto, cabe mencionar los trabajos hechos por Rebatchouk *et. al.*, (1996) sobre la implementación y desarrollo de una estrategia de clonación general para ensamblar fragmentos de ácidos nucleicos. A finales de los 90's Arkin y Endy, (1999) plantean un registro de partes biológicas utilizables y a principio de los 2000 Knight, (2003) formula el concepto de *Biobrick*, refiriéndose a una composición física (secuencias de DNA) de partes biológicas (nucleótidos) unidas por un ensamblaje estándar (uniendo partes compatibles mediante enzimas de restricción).

Sin embargo después de tres décadas de grandes éxitos en la ingeniería genética y en la biotecnología, ¿Por qué la *ingenierización* de sistemas *biosintéticos*, sigue siendo costosa, poco fidedigna, implicando un proceso de investigación *ad hoc* que hace necesaria la estandarización de métodos casi que para cada desarrollo? Quizás se deba a que todavía no sabemos suficiente sobre los procesos biológicos o tal vez porque los sistemas biológicos son demasiado complejos para *ingenierizarlos*. Otra posibilidad es que nunca se ha hecho el proceso de *ingenierización* de la biología básico, ya que no se han implementado e inventado tecnologías fundamentales (Endy, 2005). Las cuales copien o reproduzcan de manera funcional lo que el proceso evolutivo ha hecho en la naturaleza. A pesar de esto esta área emergente del conocimiento, está ayudando al entendimiento de los genomas que codifican en sistemas vivos naturales, sugiriendo que eventualmente se podrá llegar a comprender, modificar y aplicar dichos sistemas en la tecnología y en sistemas biológicos usados por la humanidad (Whitesides, 2001; Endy, 2005).

## Fundamentos de la biología sintética

Ante el problema de crear sistemas biológicos artificiales, los biólogos sintéticos han desarrollado un conjunto de criterios que resuelven las complicaciones en cuanto a diseño el diseño y construcción, haciendo rutinaria la incorporación de funciones biológicas básicas a los componentes que integran un sistema génico, Mediante protocolos de biología molecular, esperando que el sistema creado el cual responderá como se espera (Canto,*et. al.*, 2008). La construcción de sistemas biológicos artificiales, enfatiza: la síntesis y la abstracción de partes biológicas. La síntesis se refiere a la generación de biopartes modulares y reutilizables. La “abstracción” trata sobre la implementación de biopartes por su función y no por su composición (McArthur and Fong, 2009).

En la práctica la biología sintética se basa en la producción y en el entendimiento de novedosos nuevos, que se generan por medio de: 1) diseño y construcción de las biopartes “*biobricks*”, utilizando secuencias de DNA silvestre, 2) estandarización de los métodos que generan estos bloques biológicos sintéticos. Para ello se necesita, del análisis y caracterización de las rutas metabólicas implicadas en la producción de los *biobricks* que es posible entender mediante modelaje matemático (Kelly, *et. al.*, 2009). Como se ve la biología sintética es un campo que integra el entendimiento de procesos biológicos (a nivel molecular) mediante modelos matemáticos con el diseño de componentes sintéticos (biopartes) análogos a componentes de los sistemas biológicos, usando los mismos materiales (ADN) con el propósito de crear combinaciones nuevas con funciones deseadas (para la solución de problemas particulares) que no se conocen en la naturaleza.

### ¿Bioparte estandarizada?

Una partes biológica, puede ser definida como secuencia natural de ácidos nucleicos, que codifica para una función biológica específica y una bioparte estándar, es una parte biológica que ha sido modificada para ser usado con métodos estandarizados (Shetty, *et. al.*, 2008). El objetivo principal de este procedimiento, es la producción de un *biobrick* nuevo por medio de la combinación de dos o más biopartes que presente estandarizadas (Knight, 2003). En la última década el uso de ensamblaje estándar ha sido

muy utilizado por múltiples grupos. Por ejemplo, cada año cientos de estudiantes utilizan el ensamblaje *biobrick* y las biopartes estandarizadas para *ingenierizar* sistemas biológicos diseñados por ellos mismos, para participar en la competencia “International Genetically Engineered Machine” (<http://igem.org>).

Cada parte generada en dicha competencia se encuentra disponible en el Registro de Partes Biológicas Estandarizadas donde los *biobrick* tiene un número de identificación único (por ejemplo BBa\_K80003), información sobre la secuencia de la parte y su función; y las experiencias de los usuarios. El DNA codificante para cada bioparte es clonado, mantenido y propagado en plásmidos de *Escherichia coli*. (Cohen, *et. al.*, 1975; Klingmuller, 1977; <http://partsregistry.org/>). Varios sistemas de clonación (plásmidos) han sido diseñados y se han desarrollado para lograr la manipulación, propagación y expresión del DNA sintético (Canto, *et. al.*, 2008, Bolivaret. *al.*, 1977, Mandecki, *et. al.*, 1990). Los plásmidos son diseñados mediante una metodología estandarizada (el ensamblaje Biobrick) al igual que las biopartes, esta inventiva necesaria para la fácil generación de *biobricks* y para su entendimiento.

### Estandarización de la biología

La estandarización es un concepto que cada día abarca más aspectos del mundo moderno (Surowiecki, 2002). En la biología actual, varios estándares han surgido y han resultado muy útiles, en investigaciones básicas y aplicadas, pues definen la esencia de las operaciones de la mayoría de los sistemas vivos. Por ejemplo existen diversos protocolos utilizados en la obtención de datos de secuencias de DNA, cristalografía de proteínas, y la medición de actividad de las enzimas y su nomenclatura (Endy, 2005, International Nucleotide Sequence Database Collaboration)

En biología sintética, ya existe una nomenclatura formal y ampliamente usada para la mayoría de funciones biológicas, las mediciones experimentales y las funciones del sistema. Ésta estandarización posibilita el intercambio de partes y la creación de sistemas biológicos sintéticos (Endy, 2005). Las partes estandarizadas deben poseer un diseño fiable que les de ciertas propiedades que las hagan intercambiables (Knight, 2002). Por

esto la producción de partes sintéticas, requiere que las materias primas tomadas de la naturaleza sean modificadas para poder producir *biobricks*, los cuales comparten características que los hacen intercambiables y acoplables entre sí. Estos segmentos deben de estar estandarizados para poder unirse entre sí, generando una bioparte,

La metodología usada para construir las biopartes es el ensamblaje *Biobrick*. Un *biobrick*, incluye secuencias sufijo y prefijo, que presentan sitios de restricción específicos de las enzimas EcoRI, XbaI, SpeI PstI y NotI (Knight, 2006). Las secuencias naturales deben pasar por un proceso de *ingenierización*, donde se eliminan otros sitios de restricción de dichas enzimas. Operativamente, la idea es unir los fragmentos digeridos por dichas enzimas, y usar señales de “entrada y salida” que activen las partes unidas en dispositivo, lo cual permite que se genere una respuesta ante los estímulos inducidos al sistema (Canton, 2008).

Existen varias metodologías desarrolladas para ensamblar nuevos *biobricks*, entre están Primero, “Silver:BB Strategy”, que consiste en unir dos partes a un vector de levadura llamado Sikorski. Segundo, el ensamblaje *Biobrick* tradicional. En el ensamblaje tradicional, se unen biopartes a un vector (e.g. plásmido), digiriendo la o las biopartes y el plásmido con las enzimas de restricción específicas, luego se extraen las bandas correspondiente de un gel de agarosa (posterior a un proceso de electroforesis que separa las bandas). Estas biopartes ligadas por efecto de la ligasa T4, una enzima que forma enlaces fosfato en las cadenas de DNA, y se transforma (se insertan) en colonias de *E. coli*. Las bacterias transformadas se siembran en cajas con medio LB agar más un antibiótico, al cual les da resistencia el plásmido, de esta forma la mayoría de colonias en la caja tendrán la nueva bioparte. Para extraer estas biopartes ligadas se realiza miniprep, (una técnica basada en selección de DNA circular de doble cadena unida covalentemente y en la desnaturalización alcalina de DNA cromosómico) y se vuelve a digerir la construcción realizada con las enzimas correspondientes, para corroborar que las partes estén correctamente ensambladas, corriendo el DNA en un gel de agarosa, y realizando PCR en colonia o secuenciando el DNA. Tercero, “3A assamble” el cual consiste en usar bioparte(s) con resistencia a distintos antibióticos, que la del vector, realizando los pasos descritos en el ensamblaje *Biobrick*, este protocolo evita la extracción de las banda en el

gel de agarosas haciendo el proceso de construcción más eficiente (Shetty, et.al.; 2008, <http://openwetware.org>).

Los protocolos mencionados permiten ensamblar biopartes que los investigadores deseen, de una manera que demanda trabajo extensivo en laboratorio, en la cual se intercambian y combinan partes para formar nuevos dispositivos. Además de la estandarización se debe desarrollar un sistema de reconocimiento de las biopartes y de los sistemas biológicos *ingenierizados* que apoye su detección, identificación y autenticidad (Graham-Rowe, 2003), es decir que permita saber que la construcción deseada si fue hecha. Adicionalmente, la generación de partes, dispositivos y sistemas también necesita generar información cuantitativa de la actividad de los *biobricks* generados, que permita saber si su rendimiento es el esperado.

#### Caracterización en biología sintética

La obtención de descripciones cuantitativas se conoce como caracterización en la ingeniería electrónica, mecánica y civil. La obtención de datos cuantitativos permite a un ingeniero determinar el comportamiento de un dispositivo y usarlo en la construcción de un sistema (Canton *et. al.*, 2008). Esta determinación es respaldada por un conjunto de características estandarizadas del dispositivo que son el producto de la teoría y la experimentación de la ingeniería (Ward *et. al.*, 1990). Las características reportadas son comunes en un amplio número de dispositivos y son: 1) la definición de de la función y de las interfaces de los dispositivos (señales de entrada y salida), 2) el contexto operativo del dispositivo y 3) las características medibles de manera cuantitativa que describan el comportamiento del dispositivo (de Silva, 2007).

Medir la función de transferencia de energía a detalle analizando las señales de entrada y de salida en un dispositivo, permite predecir en comportamiento de equilibrio en las partes que lo componen. Es útil reportar la compatibilidad en el funcionamiento entre distintos dispositivos o las diferentes condiciones de eficiencia en un contexto donde se espera que estas varíen. Asimismo es relevante cuantificar por largos periodos de tiempo, la fiabilidad o el tiempo especulado que tarda un dispositivo en fallar cuando su

rendimiento es correcto. Otra descripción importante de considerar es la energía y las materias primas consumidas por los dispositivos, pues al elegir usarlos se podrá saber cuál es la fuente de alimentación y los recursos adecuada para construir un sistema (Canton, *et. al.*, 2008).

Ante la creciente utilización de los *biobricks*, Canton *et. al.*, (2008) han propuesto implementar un sistema de caracterización, similar al descrito en el párrafo anterior para sistemas no biológicos, que describa a los dispositivos biológicos *ingenierizados*. Estos autores plantean similitudes entre las funciones de los dispositivos biológicos *ingenierizados* y los usados en ingeniería, sin tomar en cuenta los materiales y mecanismos por los cuales se realizan éstas funciones en ambos. Muchas características analizadas cuantitativamente en dispositivos de ingeniería tradicional se pueden analizar en los *biobricks*. Por ejemplo, las señales de entrada y salida mostradas en un dispositivo biológico pueden ser analizadas mediante la función de transferencia de energía. Además se pueden realizar estudios en las materias primas y la energía consumida por los dispositivos biológicos en un contexto genético o en condiciones de crecimiento. En general, la estandarización trata de que todas las biopartes y dispositivos sintetizados sean: caracterizables, reproducibles e intercambiables (McArthur and Fong; 2009). La caracterización confiable de biopartes genera datos muy eficientes para los biólogos sintéticos, ante esto, es imperativo se produzcan sistemas métricos para realizarla. Sin la estandarización, resulta difícil predecir con precisión el comportamiento de las biopartes usadas en la construcción de un sistema biológico.

La *ingenierización* de biopartes mediante la caracterización requiere de un largo periodo de pruebas en laboratorio antes de obtener y conocer detalladamente sus funciones (Purnick and Weiss; 2009). La caracterización correcta de *biobricks*, maximiza la producción y entendimiento de sistemas novedosos y complejos. Del mismo modo estandarizar permite obtener información para que a través del modelaje matemático se simule el comportamiento de los componentes de los sistemas biológicas sin realizar las pruebas físicas.

Varios protocolos han sido creados para medir la actividad de las nuevas partes (Nealson and Hastings, 1979, Winson, *et. al.*, 1998, Andersen, *et. al.*, 2001, Anderson, *et.*

*al.*, 2007) unos son más complicados de realizar en el laboratorio que otros, pero en general sirven para producir información precisa sobre la actividad de las biopartes, así como para la obtención de datos fiables. Las proteínas reporteras codificantes son una de las herramientas ampliamente usadas en la detección de la dinámica de las biopartes construidas. Estas proteínas permiten hacer la cuantificación de la actividad de un promotor, y conocer la eficiencia transcripcional así como la estabilidad, localización y tráfico de las proteínas derivadas de la expresión de la secuencia unida a dicho promotor (Bennett and Hasty, 2009). Entre las proteínas reporteras, las más usadas son las proteínas que presentan actividad enzimática y fluorescencia, como son: la  $\beta$ -galactosidasa ( $\beta$ -gal) y proteína verde fluorescente (GFP). La proteína  $\beta$ -gal reacciona ante un sustrato exógeno y genera un producto detectable en un colorímetro (o visualmente) que representa la actividad de la parte a caracterizar (Walhout and Vidal, 2001). La proteína GFP ha sido muy usada pues no requiere químicos para indicar su presencia, ya que contiene un cloróforo que emite una señal fluorescente al ser expuesta a longitudes de onda específicas (Zhang *et. al.*, 2002, Tsien, 1998). Esta expresión de la GFP permite la localización celular de las proteínas y la cuantificación de la expresión génica mediante un microscopio de fluorescencia (Tsien, 1998).

En la actualidad se están generando proteínas reporteras mejoradas en varios aspectos. Por ejemplo, 1) deben de ser compatibles con las partes a probar y funcionales dentro del ensamblaje creado, 2) tener un amplio rango de actividad medible, sin importar si se expresa fuerte o débilmente, 3) poder ser caracterizados en un rango común de expresión y 4) ser comparado con mediciones de otros reporteros. Además debe de presentar flexibilidad de análisis, esto significa que las medidas cuentan con un amplio rango de medición; desde alto rendimiento hasta las generadas por una sola célula (Martin *et. al.*, 2009)

Nuevos genes reporteros han sido creados en los últimos años, estos combinan la actividad enzimática y la fluorescencia. Por ejemplo Basu *et. al.*, (2005) diseñaron un circuito que emite un pulso de GFP en presencia de AHL, pues la construcción incluye al represor  $\lambda$  y al factor transcripcional LuxR. La AHL inhibe al represor y activa a LuxR, lo que permite la transcripción de GFP y la consecuente traducción y emisión de

luz. Martin *et. al.*, (2009) crearon un reportero novedoso, el cual combina la actividad enzimática de  $\beta$ -gal y la fluorescencia de la GFP, al unir a estos dos reporteros aumenta la credibilidad y precisión del proceso de caracterización.

Calcular la actividad de los reporteros requiere que los valores paramétricos en un modelo de expresión génica reflejen las condiciones experimentales. Así los valores de la actividad transcripcional del (os) reportero (s) de un promotor no caracterizado podrá ser comparada con los datos obtenidos de un reportero ya caracterizado. Las distintas maneras de caracterizar la expresión de reporteros, en diferentes laboratorios, se habían vuelto incomparables. Por esto se crearon, metodologías estándar que unifican la caracterización en distintos laboratorios, como son: “Polymerases Per Second” (PoPS), “Relative Promoter Units” (RPU), “Standard Promoter Units” (SPUs), “Ribosome Per Second” (RiPS).

Cuantitativamente, la actividad de un promotor es medida por el número de RNA polimerasa que pasa por el último par de bases de este y que continúa con la elongación del biobrick, a esta medida se le llama: Polimerasas Por Segundo (PoPS). Esta medida amplía el campo de la caracterización, permitiendo que los promotores sean comparados directamente con otras partes que afectan la elongación de la polimerasa (Endy; 2005). En este protocolo se mide la síntesis de GFP que se ha unido previamente al promotor. PoPS no toma en cuenta otras propiedades de los promotores como: la constante unión de la polimerasa al DNA codificante del promotor o la estructura secundaria del DNA. Estas propiedades deben de ser relevantes en los investigadores que están *ingenierizando* nuevo *biobricks*. La cuantificación de PoPS se realiza bajo condiciones implementadas por el investigador y se describe por medio de una ecuación diferencial ordinaria (Kelly *et. al.*; 2009, Martin *et. al.*; 2009), la cual se refiere a la síntesis de GFP por célula. La fórmula es la siguiente.

$$\text{Actividad absoluta del promotor (PoPS)} = \gamma M(a + \gamma I) / \rho n$$

Donde  $\gamma M$  es la tasa de degradación del mRNA,  $a$  es la tasa de maduración de GFP,  $\gamma I$  es la tasa de degradación de GFP inmaduro,  $\rho$  es la tasa de traducción de mRNA a GFP inmaduro y  $n$  es el número de copias del promotor en la célula

La caracterización por medio de PoPS requiere ser comparada con un control positivo para cuantificar. Por esto se desarrollaron las unidades relativas de promotor (RPU) para medir la actividad de los promotores. Esta metodología fue ideada para ser usada bajo diferentes condiciones y en distintos laboratorios ya que, usando un promotor común (J23101) y el reportero GFP los RPU reducen en un 50% la variabilidad en las mediciones de la actividad. Las condiciones usadas deben ser las mismas entre el nuevo *biobrick* y el control positivo. Generalmente se trabaja con GFP, sin embargo se puede usar otro reportero en el análisis, tomando en cuenta que el tiempo de maduración y degradación de las proteínas variará. La medición de RPU se define por mediante una ecuación diferencial ordinaria:

$$\text{Unidades relativas del promotor (RPU)} = \text{PoPS}_{\text{Promotor}} / \text{PoPS}_{\text{J23101}}$$

La actividad de un promotor con una actividad relativa a 1 RPU es equivalente a la del J23101. Cabe mencionar que los parámetros en la ecuación pueden volverse más específicos para delimitar las condiciones del análisis (Canton *et. al.*, 2008, Kelly *et. al.*; 2009, Martin *et. al.*, 2009).

Otra forma de cuantificar la actividad promotora es mediante: unidades estándar del promotor (SPUs) las cuales consisten en comparar la actividad de un promotor ya analizado con la de uno nuevo medidas en PoPS; ambos deben tener el mismo gen reportero y ser estudiados en condiciones de operación estándar (SOC). Para determinar la SOC se realizan distintos experimento en varias condiciones hasta encontrar las óptimas para la nueva bioparte. Por estas razones un 1 PoPS será equivalente a un 1 SPU (<http://openwetware.org>, <http://partsregistry.org>). La caracterización es una parte importante para comprender la biología sintética sin embargo es necesario utilizar otras herramientas para el entendimiento de esta rama del conocimiento.

## Modelación matemática.

Una parte importante en el entendimiento de la biología sintética es el modelaje matemático, implementado también en el diseño de circuitos génicos, en la generación de parámetros de caracterización y en el funcionamiento de los dispositivos diseñados. El modelaje se basa en una representación virtual que predice en comportamiento de las biopartes. Existen varios programas computacionales para modelar sistemas moleculares como son: CellDesigner (Rodrigo *et. al.*, 2007), GenNetDes (Funahashi *et. al.*, 2003), COPASI (Hoops *et. al.*, 2003), TinkerCell (Chandran *et. al.*, 2009) entre otros. El objetivo de estos programas es conocer el comportamiento de una secuencia de DNA diseñada. El biólogo sintético considera un fenotipo deseado y después procede a diseñar la secuencia, que lo expresará. Desde esta perspectiva, los programas pueden abordar distintos retos frente al diseño y construcción de biopartes. Estas herramientas bioinformáticas ofrecen diseños alternativos en las construcciones propuestas por el biólogo antes de que este comience a trabajar en el laboratorio. Sin embargo, existen poco programas que desarrollen modelos estandarizados que conecten a las secuencias de DNA con el comportamiento y el fenotipo específico.

Estandarizar las herramientas bioinformáticas, podrá facilitar el desarrollo de más softwares que ayuden a los científicos en el diseño y construcción de sistemas biosintéticos. Uno de los programas computacionales, que utiliza un proceso algorítmico estandarizado es: SynBioSS (Weeding *et. al.*, 2010). Dicho software, trabaja con la base de datos del Registro de Partes Biológicas Estandarizadas del MIT (<http://partsregistry.org/>), generando modelos de redes de regulación con genes sintéticos y adecuando la mayoría de construcciones biosintéticas; mediante las biopartes estandarizadas (Weeding, *et. al.*, 2010).

Hasta aquí se ha expuesto que es la biología sintética, los fundamentos en que se basa, las ciencias auxiliares que la componen, la metodología básica que requiere el diseño y construcción de *biobricks*, la ayuda que ofrece para comprender los sistemas biológicos y la importancia que tiene en la biología moderna. Sin embargo no se ha mencionado la capacidad que tiene para ayudar a la resolución de problemas del mundo actual. Esta parte de aplicaciones de la biología sintética, se desarrolla a continuación.

## Resolución de problemas mediante biología sintética

Muchos trabajos de biología sintética, realizados en la última década, han ayudado a entender los sistemas naturales y a resolver necesidades humanas. Por ejemplo, el primer circuito génico, inspirado en partes naturales, fue realizado en bacterias y más reciente implementado en levaduras y en células de mamíferos. Elowitz *et. al.*, (2002) desarrollaron el oscilador o represilador, un sistema de control transcripcional *ingenierizado* para emular el comportamiento de los sistemas de oscilación naturales. Gardner *et. al.*, (2000) construyeron un “genetic toggle switch” el cual confiere biestabilidad y memoria al sistema por medio de un represor que es inhibido por una sustancia que activa al activador, para llevar a cabo la transcripción. Kobayashi *et. al.*, (2004) construyeron el “repressor toggle switch” con *lacI*/*lamnda* para conferirle memoria al DNA y evitar la transcripción del que hubiera estado dañado. Este mismo grupo, de investigadores, en 2004 creó un circuito sensor usando AHL para activar al gen *lacO* utilizando el “repressor toggle switch” de *lacI*/*lamnda* mediante quórum-sensing. Becskei *et. al.*, (2001) generaron un interruptor para levaduras en el cual se uso el activador de tetraciclina, por medio de una retroalimentación positiva las células inician el ciclo celular en presencia de tetraciclina. Todos estos ejemplos muestran como la biología sintética ha sido usada en diferentes aspectos que van de clonar genes de cualquier organismo en *E. coli*, hasta generar circuitos génicos que se activen bajo ciertas condiciones del medio.

Por otra parte, varios grupos han enfocado sus esfuerzos a la utilización de la biología sintética en la resolución de problemas humanos. En 2010 estudiantes de la universidad de Bristol, generaron *biobricks* capaces de medir la cantidad de nitratos en los campos de cultivo mediante la emisión de fluorescencia con GFP y la proteína rojo fluorescente (RFP). Ayudando así a que los agricultores supieran de una manera rápida donde sembrar las semillas. En el mismo año alumnos de “Imperial Collage of London” generaron un novedoso mecanismo en *Bacillus subtilis* para detectar una peptidasa de la cercaría de *Schistosoma* en agua. Todos estos ejemplos nos muestra la capacidad de la biología sintética para generar interruptores moleculares y construcciones genéticas en las

cuales se combinan partes de distintos organismos. Además el impacto que tiene en la formación de los biólogos modernos. El ensamblaje de *biobricks* usado en el presente estudio permitiría abordar problemas como el de la congelación por heladas que se comenta a continuación.

### **Problema de las heladas**

Utilizando como punto de partida la biología sintética y sus aplicaciones se pueden resolver problemas que afectan a la economía de los países, las bajas de temperatura ocasionan las pérdidas anuales de alimento. Los ambientes fríos y la formación de cristales de hielo causan graves problemas mundiales. Se estima que cada año se pierden entre 5% y 15% de la producción agrícola mundial por estas causas. Esto sucede por la formación de capas de hielo sobre las plantas, evitando así el intercambio gaseoso. Algunos cultivos afectados por este fenómeno son: *Fragaria vesca L.*, *Vitis vinifera*, *Citrus sinensis L.* y los cereales entre otras. (Pankow; 1991). Uno de los cultivos más afectados en la agricultura mexicana por las heladas es el café (*Coffea arabica L.*). Esta planta se cultiva en México entre los 900m y 1800m de altitud, por lo que presenta predisposición a soportar bajas temperaturas (de Camargo; 2008).

Ante el cambio de temperaturas, algunos procesos metabólicos de la célula dejan de funcionar correctamente. Por ejemplo el transporte intracelular de moléculas hacia la membrana se torna poco eficiente, la rigidez de membrana aumenta y la cinética enzimática se detiene. Conforme la temperatura descende, comienza la nucleación de cristales de hielo en el citoplasma, en membrana y medio extracelular; causando el colapso en las funciones metabólicas (D'amico, *et. al.*, 2006).

## **Los organismos y el frío**

Los organismos han desarrollado diversas proteínas que contribuyen en la transcripción y traducción del genoma uniéndose a DNA o RNA ante el estrés a frío, ayudando a que el metabolismo celular no colapse. (D'amico, *et. al.*, 2006).

Uno de los cambios ambientales que afecta a todos los seres vivos es: las fluctuaciones de temperatura. Un incremento en la temperatura resulta en una respuesta específica de síntesis de proteínas conservadas en todos los organismos, de bacterias a mamíferos (Heather *et.al.*, 1998). La respuesta celular a un decremento en la temperatura no ha sido estudiada a profundidad en todos los organismos. Sin embargo en los que se conoce, no presenta mecanismo iguales ni homologías genéticas

La adaptación de los organismos a las fluctuaciones de las condiciones ambientales es esencial para sobrevivir. Los procariontes y eucariontes presentan cambios a nivel celular ante el estrés ambiental temperatura. Las variaciones en el metabolismo celular incluyen: el pH celular, la concentración de iones, la fluidez de la membrana, la modificación en la estructura del DNA/RNA y en la transcripción y traducción de genes; lentitud o ineficiencia en el plegamiento de proteínas y el bloqueo de la función ribosomal. (Phadtare, 2004). Ante los daños causados por las bajas temperaturas, los organismos han desarrollado estrategias para sobrevivir. La mayoría de estudios sobre este tipo de mecanismos ha sido realizado en procariontes en específico en el de *Escherchia coli* y se describe a continuación.

### **Bacterias y su sistema contra frío**

Las investigaciones en procariontes demostraron, que muchas de las bacterias, que crecen a distintas temperaturas: termófilos (mesófilos, psicrófilos y psicrotrofos) tienen pequeñas proteínas (aproximadamente de 7 kDa) altamente conservada e inducible al decremento de temperatura. Los cambios adaptativos a las bajas temperaturas son comunes

en todas las bacterias. Estos procesos incluyen: alteraciones en la fluidez de la membrana y cambios en la translación de proteínas en las células (Morita, 1987; Heather, *et. al.*, 1998).

La mayoría de la investigación realizada sobre las adaptaciones a las bajas temperaturas, ha sido hecha en *E. coli*. En este microorganismo, el descenso de temperatura es censado por medio de los cambios en: membrana, ribosomas y ácidos nucleicos. Este cambio genera la expresión de varios genes (Heater *et. al.*, 1998; Phadtare, 2004).

La mayoría de los organismos cuentan con diferentes mecanismos para adaptarse a las variaciones de temperatura. Cuando ocurre un cambio de temperatura, provoca una fase *lag* larga llamada: fase de aclimatación (Jones, *et. al.*, 1987). Ante esta situación la enterobacteria *E. coli* presenta un proceso denominado “Cold Shock Response” (CSR). Esta respuesta a cambios en la temperatura (37°C a 15°C) es vital para la bacteria, pues evita los problemas ya mencionados en los párrafos anteriores en la fases de aclimatación al frío (Yamanaka; 1999). El (CSR) consiste en la drástica expresión de un grupo específico genes que codifican a proteínas llamadas “Cold shock proteins” (CSP) y “Cold Shock Inducible Proteins” (CSIP), las cuales en su mayoría tienen función de factores ribosomales o chaperonas a 15°C. Algunas de las CSP y CSIP son indispensables para el crecimiento durante la fase de aclimatación y a bajas temperatura, pues están involucradas en la “activación” de la maquinaria celular que opera en el estrés térmico (La Teana *et. al* 1991; Jones, *et. al.*, 1992; D’amico, v 2006).

Estudios realizados por varios grupos de investigación Jones, *et.al.*, 1987; Goldstein, *et.al.*, 1990; La Teana *et.al.*, 1991; Jones, *et.al.*, 1992, Lelivelt and Kawula, 1995; Etchegaray and Inouye, 1996; Jones, *et.al.*, 1996; Nakashima , *et.al.*, 1996; han demostrado que un total de 16 proteínas CSP y CSIP. Ambas inducen de dos a 10 veces ante un cambio de temperatura en *E. coli*. Algunas de ellas son: RecA, involucrada en la recombinación e inducción de la respuesta al cambio de temperatura (Walker, 1984); H-NS una proteína de unión asociada a nucleótidos del DNA (Dersch, *et.al.*, 1994); GyrA la subunidad de la topoisomerasa DNA-girasa; NusA implicada en la terminación y anti-terminación de la transcripción ribosomal 28: la PNP una exoribonucleasa (Heater *et.al.*,

1998) y Hsc66-Hsc70 (Lelivelt and Kawula, 1995). Adicionalmente existen tres proteínas implicadas en el crecimiento bacteriano a 15°C; las cuales son: IF2, CsdA y RbfA. Las proteínas funcionan como factores ribosomales y permiten la traducción del RNA mensajero a las bajas temperaturas (Jones and Inouye, 1996)

### Las Csp's

Entre las CSP, existe una familia de proteínas estructurales, en la que se han identificado nueve genes que codifican para ocho miembros: CspA a CspH y CspI. Dichas proteínas de bajo peso molecular (7kDa) y comparten de 83% a 29% de homología (Lee *et.al.*, 1994; Yamanaka *et.al.*, 1994; Goldstein *et.al.*, 1990; Nakashima *et.al.*, 1996). En 1997 Bae *et.al.*, demostraron que los nueve genes *csp* en *E. coli* son duplicado del *cspA* y poseen secuencias casi idénticas así como funciones muy similares. Probablemente esta duplicación y diversificación génica se dio a nivel adaptativo ante el estrés ambiental. La *E. coli* puede sobrevivir en diversas condiciones ambientales por ejemplo: distintas presiones osmóticas o en un amplio rango de temperatura de 49°C a 8°C (Yamanaka *et.al.*, 1994). Otros procariontes que viven en ambientes con una baja tasa de cambios ambientales como por ejemplo *Mycoplasma pneumoniae* (Himmelreich *et.al.*, 1996), *Mycoplasma genitalium* (Fraser *et.al.*, 1995), *Synechocystis* PCC 6803 (Kaneko *et.al.*, 1996), *Methanococcus jannaschii* (Bult *et.al.*, 1996) and *Helicobacter pylori* (Tomb *et.al.*, 1997) no presentan genes homólogos a *cspA*. Sin embargo, proteínas homologas a la Csp A de *E. coli* han sido identificadas en otro procariontes, sin embargo no todas son inducibles al frío, en la actualidad se conocen 50 proteínas similares a CspA (Av-Gay *et.al.*, 1992; Willimsky, *et.al.*, 1992; Schroder, *et.al.*, 1993). Por ejemplo la Csp A de algunos organismos psicrotróficos es expresada de la misma manera que la de *E. coli* (Hebraud, *et.al.*, 1994; Mayr, *et.al.*, 1996).

Las proteínas “Cold shock” de *E. coli* son agrupadas en dos grupos: clase I y II. Las de la clase I son proteínas que son poco expresadas a 37°C y su tasa aumenta drásticamente ante la baja de temperatura (15°C) entre éstas se encuentran: CspA, CspB, CspG y la CsdA (Heather *et.al.*, 1998). Las de la clase II, son proteínas que están presentes

a 37°C este grupo incluye CspC, CspD, Csp E, CspF CspH y CspL, ante un descenso de la temperatura, se forman pliegues en la estructura proteica lo que alteran su estabilidad.

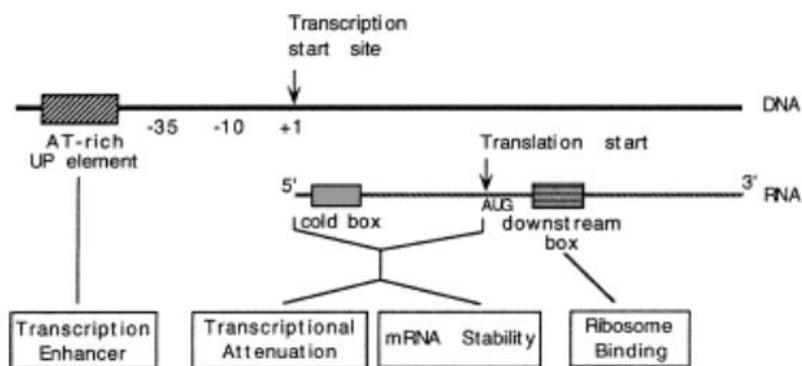
Estas proteínas pueden ser clasificadas en al menos cuatro categorías todas involucradas en los mecanismos de sobrevivencia: 1) CspA, CspB y CspG ante la respuesta a bajas temperatura (Etchegaray and Inouye, 1996); 2) CspD en el estrés nutricional; 3) CspC y CspE regulan la transcripción y la condensación de los cromosomas (Yamanaka *et.al.*, 1994; Hu *et.al.*, 1996) Csp F, Csp H y Csp L no se conoce su función. La Csp A se encuentra en niveles basales a 37°C, incrementa sus niveles considerablemente cuando la temperatura desciende a 15°C. CspA consiste en 70 residuos de aminoácido.

La estructura tridimensional de CspA y CspB ha sido estudiada de *E. coli* y *Bacillus subtilis*, mediante cristalografía de rayos X y espectroscopia nuclear de resonancia magnética se ha demostrado que ambas presentan una estructura que consiste en cinco cadenas  $\beta$  plegada anti-paralelas ( $\beta$ 1-  $\beta$ 5) que forman una estructura de una  $\beta$  plegada barril, con dos hojas  $\beta$ . La CspA es un monómero con una hoja  $\beta$  compuesta por  $\beta$ 1,  $\beta$ 2 y  $\beta$ 3, tiene siete residuos aromáticos en su estructura y dos de lisina (Schindelin *et.al.*, 1993). Cabe resaltar que en la superficie tiene dos “motivos” (de la traducción literal de motifs) de unión a RNA: RNP1 y RNP2, los cuales contribuyen en la función de RNA chaperona. Probablemente la interacción con el RNA se da mediante los aminoácidos aromáticos y las bases nitrogenadas, siendo una unión débil con un valor  $K_d$  de  $2.7 \times 10^{-5}$  11,12 (Newkirk *et al.*, 1994; Schindelin *et.al.*, 1994). Además de la actividad como chaperona; La Teane *et.al.*, (1991) y Jones *et.al.*, (1992) demostraron que la CspA actúa como activador transcripcional de por lo menos dos genes involucrados en la respuesta al frío: *hns* y *gyr*.

## Función y regulación de CspA

El RNAm de *cspA* tiene varias adaptaciones para poder ser traducido por los ribosomas en el estrés térmico. La figura 1 muestra las partes, su función y regulación en el mensajero: región promotora rica en elementos AT, 5'UTR, la “cold box” (CB) que le confiere estabilidad a RNAm y la “downstream box” (DB) que exagera la unión a los ribosomas (Heather *et.al.*, 1998).

**Figura 1.** El gen *cspA* de *E. coli*



Tomado de: Heather *et. al.*, (1999)

El promotor, consiste en 50 pares de bases, es constitutivo tanto a 37°C como a 15°C, sin embargo es más eficiente que otros promotores a 15°C. Cuenta con elementos UP ricos en AT los cuales son reconocidos por subunidades de la ARN polimerasa, confiriéndole gran actividad promotora. La región rica en AT que se localiza “rio arriba” en el promotor de *cspA* desempeña un papel importante en la regulación transcripcional. Funciona como un elemento UP el cual prolonga la vida del mensajero a 15°C. (Fang *et. al.*, 1997). La 5'UTR es una región más larga que consiste de 159 pares de base y se localiza “rio abajo” del promotor confiriéndole inestabilidad al RNAm a 37°C (Phadtare *et.al.*, 1998). Esta región le confiere al mensajero a 15°C una vida media de 20 minutos permitiendo la traducción a bajas temperaturas. En contraste de la vida media a 37°C que

es en promedio de menos de 12 segundos. La 5'UTR presenta un sitio de restricción “rio arriba” para ARNasa E que probablemente lo desestabiliza a 37°C.

En contraste, todos los genes de Csp's que no se activan en frío tienen una región 5'UTR relativamente corta. A su vez, la expresión de 143 bases (de +1 a +143) de la 5'UTR en cambio de temperatura genera una síntesis prolongada de las proteínas de frío (Mitta, *et. al.*, 1997). El mensajero de *cspA* tienen un elemento importante en la parte final de la región 5'(UTR), La cual forma una estructura estable “stem-loop” y esta conservada en los genes de coque frío (Jiang *et. al.*, 1996). Posen de 11 pares de bases y se denominada “Cold box”, (Bae, *et. al.*, 1997). La CB está involucrada en la autorregulación de la expresión de CspA. La sobreexpresión de la 5'UTR o de la CB de *cspA* a 15°C provoca una síntesis prolongada de la CspA, CspB y CspG. Sin embargo la sobre expresión del mensajero en la fase de aclimatación genera una auto regulación del sistema y la transcripción de *cspA* se vuelve transitoria (Yamanaka *et.al.*, 1998). La estabilidad de RNAm es pasajera y se pierde una vez que la célula se ha adaptado a la baja temperatura (Goldenberg *et.al.*, 1996). Bae *et.al.* (1997) describieron que la secuencia “cold box” de los RNAm autoregula la transcripción y traducción de *cspA*. Esto ocurre mediante el bloqueo de la transcripción ya que el mensajero se une al gen *cspA* Por otra parte, la CB desestabiliza a sus RNAm y evita la traducción (Yamanaka *et.al.*, 1998). La producción transitoria de CspA durante el proceso de aclimatación es acoplada por autoregulación. En ausencia de CspA la transcripción del gen *cspA* es mayor (Mitta, *et. al.*, 1997).

La secuencia Shine-Delgaror y el codón de iniciación no son suficientes para iniciar el proceso de traducción de RNAm a bajas temperaturas. Los RNA mensajeros de proteínas de choque frío tienen un sitio de unión a ribosoma extra llamado “downstream box” (DB) en la región codificante del RNA mensajero (Lee, *et.al.*, 1994). La secuencia DB tiene 14 nucleótidos, complementarios a la región 16S del ARNr, llamada secuencia anti-DB, que provee un incremento en la traducción a 15°C, ya que funciona como un sitio extra de unión a ribosoma. Desde esta perspectiva, aumenta la posibilidad de que el ARNm se una al ribosoma y se traduzca en mayor cantidad (Yamanaka; 1999). Sin la DB el RNAm de CspA no puede iniciar la traducción en la fase de aclimatación; aunque los

factores ribosomales estén presentes (Tanabe *et.al.*, 1992; Goldenberg *et.al.*, 1996; Mitta *et.al.*, 1997).

Como se ha descrito en los párrafos la CspA se activa durante la fase de aclimatación mientras que la CspB y CspG son inducidas en un rango de temperaturas más bajas de los 15°C (Etchegaray and Inouye, 1996); y complementan la función de CspA (Jiang, *et. al.*, 1997). Sin embargo la actividad de CspB y CspG no es sólo de chaperonas de RNAm también sirven como factores transcripcionales y de replicación de DNA a bajas temperaturas.

En el caso de *cspA*, la transcripción del mensajero se lleva a cabo constitutivamente a 37°C. Sin embargo no puede ser traducida, debido a su inestabilidad a dicha temperatura. Es posible que a 15°C la maquinaria de degradación del mensajero no funcione correctamente. Otro factor importante es que el frío genera cambios secundarios en la estructura de mensajero, que evita la actividad catalítica de la RNAasa. Cuando un gen *cspA* esta truncado genera un RNAm “atrapa” a los ribosomas antes de que se adapten al frío. El RNAm seguirá contando con la DB, la cual puede iniciar el proceso de traducción en ribosomas no adaptados al frío. Lo que deriva en la ausencia de producción de CspA y en la traducción del truncado. Dando como resultado la no regulación de *cspA* y el bloqueo del crecimiento celular. Es efecto es llamado efecto a baja temperatura o a un antibiótico de *cspA* trunco “LACE” (Jiang, *et. al.*, 1993).

Complementariamente a este sistema de regulación, la activación (37°C) y la atenuación (15°C) transcripcional de dos proteínas: la CspC y CspE, tiene efecto en la actividad transcripcional de *cspA* La expresión de *cspA* es regulada a varios niveles, incluyendo el transcripcional, la estabilidad del RNAm, el de traducción y el de acumulación de CspA en las células. El drástico proceso de amortiguamiento celular a choque térmico en enterobacterias puede ser explicado porque están expuestas a cambios bruscos de temperatura al ser excretadas del cuerpo de sus hospederos. El mecanismo de inducción presente en *E. coli* es uno de los más rápidos y efectivos para adaptarse a las nuevas condiciones de estrés ambiental y sobrevivir (Jones and Inouye, 1996).

En resumen: el control de este sistema ocurre por auto regulación en tres puntos, el primero es un bloqueo del sistema en la “Cold Box” por medio de la proteína CspA. El segundo es la capacidad que le confiere la región 5'UTR al ARNm de ser inestable a 37°C y no traducirse. La tercera ocurre a nivel traduccional, en los dos sitios de unión de los ribosomas y la secuencia anti-DB en del ribosoma, que permiten sintetizar proteínas a 15 ° C o menos (Yamanaka, 1999).

### **Adaptaciones al frío**

#### **La CspA y los efectos ribosomales al coque frío.**

La actividad ribosomal disminuye cuando ocurre un descenso de temperatura en las bacterias. El crecimiento en estas temperaturas es afectado por la falta de traducción del RNA mensajero (Jones and Inouye, 1996). La respuesta celular a “Cold shock” es inducida cuando la función de los ribomas son inhibidas, ya que las dos subunidades ribosomales se separan, se trunca la lectura de RNA mensajero. Cuando *E. coli* pasada de 37°C a 5°C se observa una disminución de los polisomas ribosomales que resulta en la acumulación de monosomeros 70S (Yamanaka, 1999).

Ante un cambio de temperatura de 37°C a 15°C, se induce la respuesta transitoria al choque frío. Se produce un aumento temporal de los monosomas ribosomales 30, 50 y 70S, generando un bloqueo pasajero en la traducción de proteínas y en el crecimiento celular. En estas condiciones, los factores ribosomales: IF2, CsdA y RbfA, se asocian con las subunidades y los ribosomas 70S generando ribosomas estables a 15°C. Una vez ocurrido esto, los RNA mensajeros puedan ser traducidos a 15°C, la síntesis de proteínas incrementa en las células (Jones and Inouye, 1996).

Jones *et. al* en 1996 demostraron que ante un cambio de temperatura existe una síntesis preferencial de las proteínas ya mencionadas CspA. Esto sucede debido a que los RNA mensajero poseen un mecanismo para iniciar el proceso de traducción a 15°C sin necesitar factores ribosomales. La investigaciones de Jones *et. al.* (1996) demostraron que

en ausencia de la RbfA a bajas temperaturas, la formación de polisomas se llevaba a cabo únicamente en los RNA mensajeros de las proteínas de frío CspA. La presencia de los factores ribosomales es necesaria para que se produzcan el resto de proteínas celulares (Heather, *et.al.* 1998).

La CspA puede ser generada a mientras sucede el choque térmico con los recursos existentes en la célula sin necesitar ningún otro factor proteico. Por esta razón la proteína puede ser inducida ante cualquier estrés como por ejemplo: la presencia de antibiótico. La producción de CspA durante la fase de aclimatación es aproximadamente de  $10^6$  moléculas; más del 10% del total de proteínas por célula (Goldstein, *et. al.*, 1990). La generación de dicha proteína, ocurre en estas cantidades ya que se une a las cadenas sencillas de RNA (Jiang, *et. al.*, 1997). La unión ya descrita entre la CspA y el RNA facilita la traducción del RNAm en un choque térmico, evitando la formación de estructuras secundarias. Por estas razones es considerada una chaperona. Como ya se mencionó el enlace es débil, por lo que no obstaculizará la función del ribosoma sobre el RNAm (Jones and Inouye, 1994).

#### Cambios asociados a la membrana celular

Los cambios en la composición de los lípidos de membrana ante la respuesta a las bajas temperaturas ocurren en todos los seres vivos. A temperatura fisiológica, los lípidos presentan una composición líquida y cristalina. Cuando la temperatura desciende se forma una estructura gelatinosa lo que resulta en un decremento en la fluidez de membrana (Yamanaka *et.al.*, 1998).

Muchos organismos compensan este cambio modificando el grado de saturación en las cadenas de hidrocarburos de los fosfolípidos que conforman la membrana. Los fosfolípidos con ácidos grasos insaturados tienen un punto de fusión más bajo y un mayor grado de flexibilidad que los fosfolípidos con ácidos grasos saturados. Esta respuesta se denomina: adaptación homeoviscosa y se estudió por primera vez en *E. coli* (Sinensky, 1974). Otro mecanismo de respuesta en *E. coli* es la generación de *cis*-vacenato. La

síntesis de este ácido graso incrementa dramáticamente cuando se produce un choque térmico ya que la actividad de la enzima que lo genera: sintetasa II incrementa con el cambio de temperatura (Garwin and Cronan. 1980).

Los organismos eucariontes presentan un mecanismo de “Cold shock” la cual ha sido estudiada principalmente en plantas, peces e invertebrados. En eucariontes no se ha encontrado un mecanismo conservado (Phadtare *et. al.*, 1999). Esto podría suceder porque múltiples cambios fisiológicos ocurren en las células de dichos seres vivos. Por ejemplo ocurren cambios en la expresión génica y se traducen proteínas relacionadas con la fase de aclimatación. Estas proteínas incluyen: las relacionadas con la enucleación del hielo, con la histéresis térmica, proteínas anticongelantes y crioprotectora (Storey and Storey, 1988; Devries and Hew, 1990; Costanzo, *et. al.*, 1995). Los eucariontes poseen proteínas con dominios altamente conservados con la familia de la CspA, conocidas como: proteínas de la caja Y. Esta proteína posee una región llamada “dominio de choque frío” con más del 40% idéntico a la CspA de *E.coli*. (Yamanaka *et.al.*, 1998). Sin embargo no son inducibles al frío y su función es la de factores transcripcionales y de proteínas que se unen a los RNA (Wolffe, 1994). Las proteínas de la caja Y tienden a expresarse durante el proceso de estrés durante crecimiento. Interesantemente las CspA, CspB y CspG se expresan cuando la fase lag muestra un retroceso por el cambio de temperatura. Coincidiendo así con las de la caja Y en las funciones celulares de amortiguamiento de crecimiento (Ladomery and Sommerville, 1995).

A continuación se describen algunos casos de organismos que presentan mecanismos al choque frío. La levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) cuenta con varias proteínas inducibles a las bajas temperaturas, por ejemplo: la NSR, esta involucrada en la biogénesis de ribosomas a temperatura fisiológica y en choque térmico; la Tip1, Tir1 y Tir2 que son inducidas por el frío así como por el calor. El gen de *BFR2* se sobreexpresa más de cinco veces cuando la levadura se expone a un descenso de temperatura. Los tardígrados y algunos hongos, utilizan azúcares como el disacárido, trealosa. Esta ayuda a evitar los daños causados por la formación de cristales de hielo uniéndose a lípidos y proteínas. Este disacárido estabiliza las enzimas, las proteínas y deshidrata la membrana celular (Leslie, *et. al.*, 1995).

En mamíferos se han estudiado, proteínas inducidas ante el frío han sido descritas en ratones, ratas y humanos. La mejor caracterizada es Cirp, se ha propuesto que esta implicada en la estabilidad de los ribosomas durante el crecimiento celular a bajas temperaturas (Phadtare *et. al.*, 1999). Adicionalmente existe un grupo de proteínas llamadas “Antifreeze Proteins” propias de plantas, insectos y peces de género *Zoarces*. Las cuales interactúan con los puentes de hidrógeno del agua, impidiendo la típica formación de los cristales, dando como resultado un hielo amorfo que no causa daños en las estructuras celulares (Scotter, *et. al.*, 2006).

En plantas, la mayoría de la investigación realizada en plantas ha sido sobre la tolerancia a las heladas, la temperatura de aclimatación y en la reacciones de las plantas después de las heladas. En *Arabidopsis thaliana* se han estudiado miembros de la familia de genes *DREB* que son inducidos a bajas temperaturas y sirven como factores transcripcionales ante el frío. Otros genes implicados en este mecanismo de sobrevivencia son: *COR*, *RCI2A* y *RCI2B3* (Phadtare *et. al.*, 1999).

Otra estrategia de los eucariotas es insertar moléculas de colesterol en las membranas, mientras que los procariontes incrementan el contenido de lípidos con cabezas grandes en membrana. En ambos casos la fluidez de la membrana aumenta evitando los daños (Yamanaka; 1999).

Como ya se ha descrito en los textos anteriores la biología sintética por medio de la biología molecular puede ayudar a comprender mejor algunos de los problemas biológicos que afectan al hombre. Partiendo de este precepto, es posible entender mejor el mecanismo de acción de los organismos el estrés de las bajas temperaturas y utilizarlo para el beneficio humano. Mediante la estandarización y caracterización de dos segmentos del gen *cspA* con la proteína GFP se podrá analizar la actividad promotora y comprender mejor el funcionamiento de las partes.

Los objetivos principales de este trabajo son: 1) hacer cuatro construcciones las cuales son: a) CB-UTR-SD-DB+pSB1C3, b) CB-UTR-SD+pSB1C3, c) CB-UTR-SD-DB+pSB1A2-GFP y d)CB-UTR-SD+pSB1A2-GFP y 2) determinar si las dos secuencias

del gen *cspA* tienen actividad promotora. Como objetivos particulares: Cuantificar y determinar cuál de las dos biopartes tienen más actividad promotora.

### III. METODOLOGÍA

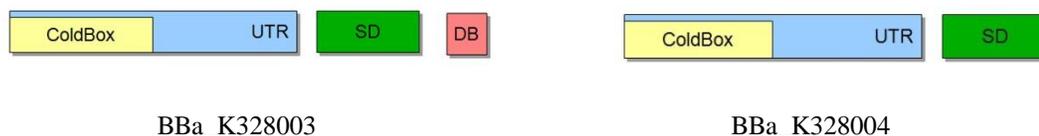
Todos los experimentos se realizaron en el laboratorio de Biología Sintética, de la Facultad de Ciencias de la UNAM y en el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Naturales de la UAQ, utilizando métodos de microbiología y de biología molecular.

#### Descripción de las biopartes BBa\_K328003, BBa\_K328004, y del chasis para caracterizar.

En este trabajo de tesis, se construyeron las biopartes, BBa\_K328003 y BBa\_K328004. Se realizó la caracterización usando a GFP como gen reportero. Este trabajo ha sido parte de mi participación en el grupo de investigación México-UNAM-CINVESTAV (<http://2010.igem.org/Team:Mexico-UNAM-CINVESTAV>). A continuación describo a detalle la bioparte que he utilizado.

La BBa\_K328003 incluye todo el sistema de regulación, excluyendo al promotor. La BBa\_K328004 que consta de la Cold Box, de la UTR y de la secuencia Shine-Dalgarno excluyendo la Downstream Box y el promotor.

**Figura 3.** Diagrama de los *Biobricks* generados



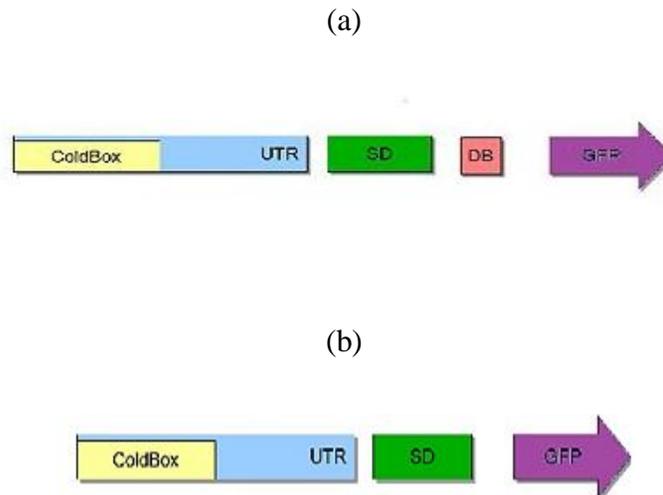
El *biobrick* BBa\_K328003 fue construida para probar si la “Cold box” tiene actividad promotora a bajas temperaturas. La BBa\_K328004 ayudo a entender el papel de la DB en la expresión de proteínas a bajas temperaturas y se analizó su capacidad como factor ribosomal. Por medio de la caracterización se evaluó la traducción de las biopartes midiendo la fluorescencia emitida por la proteína GFP para analizar si dichos *biobricks* presentan actividad promotora cuando la temperatura descienda de 37°C a 15°C. En la

caracterización la medición de PoPS se comparó con las generadas por la bioparte T9002 y la I220260 ambas presentan la proteína GFP y promotores para que se transcriba dicha proteína calculando la actividad promotora por medio de SPU's y RPU's respectivamente.

La nomenclatura usada en las dos biopartes fue otorgada por el IGEM (2010) y la construcción de esta fue hecha en el vector pSB1C3, el cual es de alta copia, posibilita la expresión citoplásmica o periplásmica, presenta un sitio "polilinker" con el ensamblaje estándar y no tiene elementos reguladores de transcripción a excepción del terminador transcripcionall (Skrli, et.al.; 2009).

Para la caracterización se realizó el ensamblaje estándar para la caracterización esquematizado en el figura 4a y4b.

**Figura 4.** Esquema del ensamblaje estándar de BBa\_K328003 y E0240 (GFP) y BBa\_K328004 y E0240 (4b)



Esta biopartes fueron unidas en pSB1A3 un plásmido de alta copia, con un sitio de replicación pUC19-derivado pMB1 y con un terminador horquillado MCS, diseñado para evitar la transcripción interna presentando <100% de eficiencia. El vector presenta resistencia a ampicilina. La otra bioparte usada fue el gen reportero E0240 codifica para la proteína GFP (Cuadro 1)

derivada de *Aequorea victoria* insertado en el plásmido de alta copia, pSB1A2 que presenta resistencia a ampicilina. La GFP tiene una excitación máxima de 501 nm y una emisión de 511nm (<http://partsregistry.org>).

**Cuadro 1.** Esquemas de las biopartes usadas la caracterización.

<i>Biobrick</i>	Esquemas
E0240	
T09002	
I20260	
Nomenclatura.	

Tomado de <http://partsregistry.org/>

Las biopartes usadas como control positivo en la caracterización fueron la T9002, un generador de GFP (E0040) controlado por LuxR, el cual es activado por la sustancia exógena, la 3OC6HSL. En el cuadro 1 se muestra un esquema de cómo es la construcción genética de T9002 que genera 6.6 PoPS por célula<sup>-1</sup> en 1 minuto (Canton, *et. al.*, 2008). El *biobrick* I20260 está formado por el promotor J23101 y E0240 (cuadro 1) este biobrick ha sido ampliamente usado en el proceso de caracterización de nuevas biopartes (<http://partsregistry.org>).

## Diseño, síntesis y elución de oligos.

El diseño de los oligos fue realizado en colaboración con el Dr. Alexander de Luna Fors en el laboratorio de Sistemas biológico génico del instituto LANGEBIO del CINVESTAV campus Irapuato. Las secuencias obtenidas se muestran en el cuadro 2.

**Cuadro 2.** Oligos y las secuencias

<b>Oligo</b>	<b>Secuencia</b>
Cryo2_pr1Rv	TACTAGTAGCGGCCGCTGCAGGAAGA ACGTCAGGAGTGATGAAGCCGAAGC
Cryo2_pr2Fw	GTTTCTTCGAATTCGCGGCCGCTTTAG AGCATCAACGGTTTGACGTACAGAC
Cryo2_pr3Rv	TACTAGTAGCGGCCGCTGCAGGAAGA AACGTGTATTACCTTTAATAATTAAC

Los oligos originales estaban liofilizados a una concentración de 0.05 mmol, fueron diluidos en 50 µl de agua estéril, destilada y desionizada (ddH<sub>2</sub>O), para así obtener una concentración de 200mM. Después de esto se hicieron alícuotas a una concentración de 10 µM, con las que se realizó la PCR.

## Métodos de laboratorio

Todo el material utilizado en este trabajo fue esterilizado por autoclave, a 20lb/Pa por 20 minutos. para evitar contaminación con microorganismos ambientales que pudiera alterar los resultados.

## Elución de *biobricks*.

Los *biobricks* usados en este trabajo fueron BBa\_T9002, BBa\_pSB1C3, BBa\_pSB1A3 y BBa\_E0240 los cuales se encontraban en las cajas IGEM 2010. Su localización era la siguiente: Caja 2 pozo 9A, Caja1 pozo 3A, Caja 1 pozo 1C y Caja 1

pozo 12M respectivamente. Fueron eluidos, agregándole 15 µl de ddH<sub>2</sub>O a cada uno. Todos los *biobricks* excepto el T9002, fueron insertados por transformación en condiciones de esterilidad, en la bacteria *Escherichea coli*, cepa Top 10 y crecidos en medio LB. La bioparte T9002 fue introducida en *E.coli* cepa MG1655 y cultivada en medio M9. En todos los protocolos donde se uso la esta cepa trabajo con medio M9 en vez de LB.

### PCR

Para amplificar los fragmentos Cold box-UTR-SD-DB y Cold box-UTR-SD se usaron el juego de oligos Cryo2\_pr1Rv ,Cryo2\_pr2Fw y Cryo2\_pr2Fw ,Cryo2\_pr3Rv respectivamente; El PCR se realizó con las cantidades descrita a continuación y condiciones mostradas en el cuadros 3, usando el Mix de Quiagen® “Taq Hot Start DNA polymerase”. Para las reacciones de PCR se usaron 2 µl del DNA templado, 5 µl de Buffer 10X, 2 µl del oligo Cryo2\_pr1Rv (10mM), 2 µl del oligo Cryo2\_pr2Fw (10mM) o Cryo2\_pr3Fw (10mM), 1 µl de dNTP’s10mM, 0.5 µl de Taq Hot Start, 10 µl de betaína, 0.3 DMSO o BSA µl de y 27.2 µl de ddH<sub>2</sub>O; obteniendo un volumen final de 50 µl.

**Cuadro 3. Condiciones usada para la PCR**

<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tiempo (minutos)</b>	<b>Ciclos</b>	<b>Fase</b>	<b>Etapa</b>
95	5	1	Desnaturalización	1°
95	1	35	Alineamiento y extensión	2°
58	1			
72	1			
72	10	1	Extensión final	3°
4			Almacenamiento	4°

El PCR se efectuó bajo las condiciones mostradas en el cuadro anterior usando un termociclador Techne, Flexigene®, modelo FFG02HSD. Una vez realizado el PCR, las secuencias amplificadas se corrieron en un gel de agarosa, (proceso descrito abajo) para corroborar la eficiencia del proceso. Después de esto se almacenaron a -20°C hasta ser usadas.

### **Preparación de células competentes.**

Para la transformación bacteriana fue necesario tener células competentes para que el plásmido de interés pudiera integrarse al microorganismo. Dicho proceso se realizó de la siguiente manera en condiciones de esterilidad. Se incubó una colonia o 200  $\mu$ l de *E. coli* cepa Top10 en 2 ml de medio LB (Amresco®) líquido estéril por ocho hrs a 37°C con 150 rpm de agitación. Pasado el tiempo, a 100 ml de LB (Amresco®) líquido estéril se le agregó el cultivo bacteriano y se dejó crecer por tres hrs a 37°C a 150 rpm o hasta que alcanzó una densidad óptica de 0.4 a 600 nanómetros, la cual se midió en un espectrofotómetro modelo BioMaTe 3, Thermo Electron Corporation®. El cultivo se dejó reposar en agua con hielo durante 10 minutos. Después se centrifugó a 3000rpm durante 15 minutos a 4°C, se desechó el eluido y se resuspendió la pastilla bacteriana en dos ml de CaCl<sub>2</sub> (100mM/Glicerol 17%) y se incubó por cuatro horas a 37°C con 150 rpm. Por último se colocaron 100  $\mu$ l en tubos estériles, se congelaron en alcohol absoluto a -80°C y se almacenaron a esa misma temperatura, hasta ser usadas en la transformación bacteriana.

### **Transformación y crecimiento bacteriano.**

Una vez obtenido el DNA a introducir en las bacterias se realizó la transformación en condiciones de esterilidad. Las células competentes (*E. coli*, cepa Top 10 o MG1655) se descongelaron en hielo por 10 minutos, en 50  $\mu$ l de células competentes se agregaron 3  $\mu$ l del DNA circular y se colocaron en hielo por 20 minutos. Después se sumergieron en baño maría a 42°C por 50 segundos y se pusieron en hielo por dos minutos. Se les añadieron 500  $\mu$ l de LB (Amresco®) líquido estéril y se pusieron a 200 rpm a 37°C por una hora y

media. Luego, se vertieron 150 µl del cultivo en cajas petri con LB agar (Amresco®) estéril con el antibiótico indicado (Ampicilina grado molecular, 100 µg/µl, IBI Scientific® o Cloranfenico 50 µg/µl), se sembraron por extensión y se dejaron crecer a 37°C toda la noche.

Una vez que crecieron las bacterias se tomó una colonia de la caja petri con el aza esteril y se introdujo en un tubo de 50ml con 30ml con LB líquido esteril y el antibiótico indicado (Ampicilina grado molecular, 100 µg/µl, IBI Scientific® o Cloranfenico 50 µg/µl); y se dejó crecer el cultivo toda la noche a 37°C con 150 rmp de agitación. Después de que proliferaron las bacterias se realizó el miniprep o midiprep.

### **Miniprep y Midiprep.**

Para obtener el DNA plasmídico se utilizaron tres metodologías.

Por medio de dos kits: Axy Prep Plasmid Mini prep kit, Axygen® y ZR Plamid Miniprep kit Classic, Zymo research®; y mediante la metodología Birnboim y Doly (1979), descrita a continuación.

#### **Mini y midi prep (Birnboim and Doly, 1979)**

Se prepararon tres soluciones utilizadas en ambos procedimientos.

Solución I: TRIS BASE pH 25mM, EDTA 10mM y glucosa 50mM. Ésta solución fue autoclaveada a 20 libras de presión por 15 minutos y separada en alícuotas de 10 ml. Antes de usarla se le agregó Lisozima (5 mg/ml) de huevo blanco grado molecular, Amresco®. La viabilidad de la mezcla de la enzima y la solución I fue de 1 hora.

Solución II: NaOH 0.2 mM y SDS 1%.

Solución III: KOAc pH 5.5.

\*Cantidades de reactivos usadas en el miniprep

\*\* Cantidades de reactivos usadas en el midiprep

Se dejó crecer una colonia o 200  $\mu$ l de las bacterias transformadas en tubos estériles de 15ml o 50ml con de medio LB líquido estéril y con el antibiótico, al cual las bacterias presentan resistencia (Ampicilina, 100  $\mu$ g/ $\mu$ l o Cloranfenicol, 50  $\mu$ g/ $\mu$ l) a 37 °C con 150 rpm toda la noche. Para el miniprep, se centrifugaron 1.5 ml del cultivo a 14000 rpm durante tres minutos y se desechó el eluido, este paso se realizó cuatro veces para obtener mayor cantidad de células bacterianas, dejando al final 20  $\mu$ l del medio líquido. En el midiprep se centrifugaron los tubos a 3000 rpm por 15 minutos y se dejaron dos ml de LB.

En ambos procedimientos, se resuspendió en el vórtex la pastilla, se agregaron 200  $\mu$ l\* ó 2.4 ml\*\* de la solución I, se agitó en el vórtex 20 segundos y se incubó en hielo por 10 minutos, se pusieron 300  $\mu$ l\* ó 2.4 ml\*\* de la solución II y se incubó de la forma anterior, se vertieron 225  $\mu$ l\* ó 2.4 ml\*\* de la solución III y se dejó reposar 10 minutos en hielo. Para el miniprep, se centrifugó 15 minutos a 13000 rpm y en el midiprep a 3000 rpm durante 20 minutos. Después de esto, se recuperó el sobrenadante se colocó 800  $\mu$ l en tubos limpios de 1.5 ml, se le añadieron 600  $\mu$ l de isopropanol frío y se almacenaron los tubos a -20°C por 10 horas o por tres horas a -80°C. Después se centrifugaron a 14000 rpm durante 20 minutos, se desechó el sobrenadante, se lavó la pastilla obtenida con 700  $\mu$ l de alcohol al 70%; se centrifugó 15 minutos a 13000 rpm y se descartó el alcohol. Los tubos con las pastillas de DNA plasmídico se colocaron a 50°C por 20 minutos o hasta que se evaporó el alcohol y se eluyeron en 30- 50  $\mu$ l de agua inyectable precalentada a 55°C. Por último se les agregó 1  $\mu$ l\*de RNAsa a cada tubo del miniprep o 2  $\mu$ l a 500  $\mu$ l del midiprep se dejó incubar por 30 minutos a 37°C con agitación (200rpm) y se almacenaron a -20 °C hasta ser usados.

## **Preparación de glicerol.**

Para preservar las bacterias transformadas se realizaron glicerol de las mismas en condiciones de esterilidad. Se colocaron calentó en baño maría el glicerol absoluto estéril para que fuera más fácil manejarlo, después sé 200 µl del glicerol en tubos de 1.5 ml, y se añadieron 800 µl del medio de cultivo bacteriano, se mezcló suavemente por inmersión y se guardo a -80°C hasta que fueron usados.

## **Electroforesis.**

Para comprobar la eficacia de los experimentos realizados en este trabajo se comprobó por electroforesis de geles de agarosa (grado molecular, Amresco®). Los geles realizados fueron a diferentes concentraciones dependiendo de lo que se quería analizar en ellos. Se hicieron geles al 0.7%, 1% y 1.5% de agarosa disueltos en TBE al 1X (TRIS BASE (0.089M), ácido bórico (0.089M) y EDTA(0.002M), los geles fueron corridos en el mismo buffer con distintos tiempos y voltajes nunca menos de 75 volts ni más de 120 volts. Cuando se requerían diagnósticos rápidos se corrían los geles a. 0.7% de agarosa a 100 o 120 voltios. Para diferenciar bandas con pesos moleculares con una diferencia de 100pb se usaron geles al 1.5% con 70 u 80 volts por periodos de tiempo más largos. Las muestras en los depositadas en los pozos de los geles, fueron mezcladas con alguno de los buffers de carga: azul de bromofenol o naranja G o con 5XGreen Got Taq Flex buffer, Promega®, usando marcadores de peso molecular de 100pb o 1kb, (Axygen®) o 1kb, dependiendo de lo que se analizó. Después de la electroforesis los geles fueron teñidos en Bromuro de etidio (0.625 mg/ml, Apex®) por 10 minutos a 50 rpm y vistos en un transiluminador o en un fotodocumentador con luz ultravioleta (OD:302nm).

## Digestión.

En este proyecto se realizaron dos tipos de digestiones las doble y sencillas dependiendo de los buffers usados por las enzimas. La digestiones se realizaron para ligar o para linearisar los plásmidos y analizar su peso molecular. Todas las reacciones de digestiones sencillas se realizaron con 5  $\mu$ l de DNA, 2  $\mu$ l de Buffer Tango 10X (Fermentas®) o Buffer 0 10X (Fermentas®) dependiendo de las enzimas usadas, 1  $\mu$ l de enzima de restricción (PstI 10u/  $\mu$ l, EcoRI 10u/  $\mu$ l, XbaI 10u/  $\mu$ l SpeI 10u/  $\mu$ l) y 12  $\mu$ l de ddH<sub>2</sub>O DEPC para obtener un volumen de 20  $\mu$ l. Para las dobles digestiones se cambiaron los volúmenes de enzimas y de agua, poniendo 11  $\mu$ l de agua y 1  $\mu$ l cada enzima; para así mantener el volumen final. En ambas digestiones, cuando el volumen de DNA vario se ajustaron las cantidades de los otros reactivo. Todas las reacciones de digestión simples y las dobles hechas con PstI y EcoRI, y EcoRI y SpeI se incubaron a 37°C por dos horas. Las dobles realizadas con XbaI y PstI, y se incubaron a la misma temperatura por cuatro horas, todas las reacciones fueron inactivadas con calor a 65°C por 20 minutos. Las digestiones realizadas para construir las cuatro construcciones fueron las siguientes:

**Cuadro 4.** Relación entre los fragmentos y las enzimas de restricción

<b>Fragmento</b>	<b>Enzima de restricción</b>
pSB1C3+	5'EcoR1 y Pst1 3'
BBa_K328003+	5'EcoR1 y Pst1 3'
BBa_K328004+	5'EcoR1 y Pst1 3'
pSB1A2++	5'EcoR 1 y Xbal 3'
BBa_K328003++	5'EcoR1 y Spe1 3'
BBa_K328004++	5' EcoR1 y Spe1 3'

En el cuadro cuatro se muestra la relación entre las secuencias de DNA y las enzimas de restricción usada para realizar cortes cohesivos. En el cuadro se observan, las digestiones realizadas para la construcción de las biopartes y el resto ++ utilizadas en la caracterización.

### **Limpieza y concentración de DNA**

Todas secuencias utilizadas en las construcciones de las cuatro *biopartes* fueron limpiadas por medio del kit “QIAquick gel extraction kit”, Quiagen® antes de ser usada en las ligaciones. Las secuencias que se mandaron secuenciar también fueron limpiadas con este kit.

### **Extracción de geles de agarosa.**

En la construcción de BBa\_K328003 y BBa\_K328004 se extrajo del gel de agarosa el vector pSB1C3. La extracción se realizó en de gel de agarosa (0.7%) corriéndolos a 80 volts por un hora y media. Se tiñeron en BrEt y se extrajo la banda deseada cortando el gel con una navaja en el transiluminador. Se usaron dos kits de extracción de banda: “QIAquick gel extraction kit”, Quiagen® y “Gene Jet gel extraction kit” Fermentas®.

### **Ligaciones**

Para la construcción de los biobricks (BBa\_K328003, BBa\_K328004 y BBa\_K328003, BBa\_K328004 con GFP), se realizaron ligaciones simples con las dos partes de gen CspA y el vector pSB1C3 usando una relación de 3:1 con una concentración de 20ng/µl. El mix de reacción se prepararon con 3 µl de inserto y 1 µl de vector, 2 µl de Buffer de ligación 10X de Fermentas®, 14 µl de ddH<sub>2</sub>O y 1 µl de la enzima Ligasa T4 de Fermentas ®. Todas las reacciones se dejaron 4 horas a 16°C, pasado el tiempo se inactivo la enzima con calor a 65°C por 10 minutos. Después se realizó la transformación bacteriana, se picaron las colonias y se realizo el miniprep como se describe arriba.

Para las construcciones usadas en la caracterización las ligaciones se realizaron se usando el vector pSB1A2 donde se encuentra insertado E0240. En este vector se unieron las dos partes de CspA, mediante el ensamblaje estándar se realizaron las ligaciones usando el mix de reacción ya descrito así como los tiempo.

### **Secuenciación**

Las dos construcciones a las que se les unió la proteína GFP fueron mandadas a secuenciar al Instituto de Biotecnología (IBT) en Cuernavaca Morelos.

#### IV. RESULTADOS Y DISCUSION

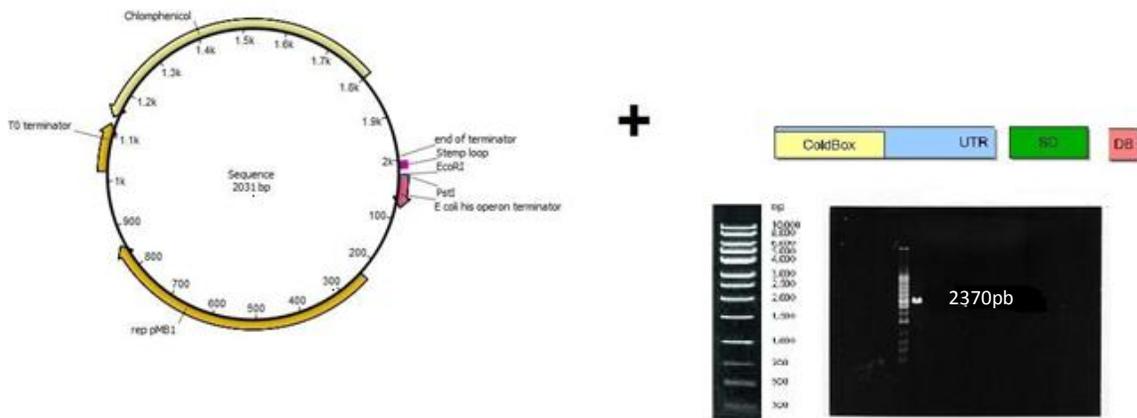
El trabajo de tesis presentado es parte del proyecto de biología sintética “A very cool *E. coli*” presentado en el concurso IGEM 2010 por el equipo México-UNAM-CINVESTAV. Los biobricks construidos forman parte de una colección realizada para dicha competencia. Los resultados presentados integran datos que obtuve durante la participación en dicho equipo así como en una serie de ensayos encaminados a caracterizar estas biopartes. Este trabajo establece las bases metodológicas de un programa de investigación más extenso que pretende estudiar el complejo BBa\_K328003 y BBa\_K328004 junto con la AFP y su utilización en la evasión celular ante la formación de cristales de hielo.

El proceso de *ingenierización* de las partes silvestres resultó en dos biopartes estandarizadas, BBa\_K328003 y BBa\_K328004; por medio del ensamblaje *biobrick* fueron unidos al plásmido pSB1C3. Esta biopartes se encuentra registradas en el Registro de Partes Biológicas Estandarizadas del MIT (<http://partsregistry.org/>). Esto constituye una contribución al programa de intercambio de biopartes estandarizadas con el resto de la comunidad científica, lo cual hace parte del espíritu colectivo que caracteriza a la biología sintética desde sus inicios (ver Introducción). La generación e integración de estas dos biopartes a un sistema global que promueve su almacenamiento y difusión, está entre los primeros pasos para establecer una línea de investigación de biología sintética en México, una disciplina que hasta hace poco era monopolio de instituciones de investigación principalmente Europeas. Los aspectos metodológicos de este trabajo no han sido sencillos, no obstante he logrado obtener competencias en el trabajo de laboratorio que me han permitido obtener dos biopartes e iniciar su caracterización. A continuación presento los resultados de este proceso.

Por medio de la amplificación con PCR de las dos partes usando los oligos descritos, se estandarizaron las dos partes naturales. Se le añadieron los sitios para las enzimas de restricción, en el extremo 5' se colocaron los de EcoR 1 y Xba1; y en el 3' los de Pst 1 y Spe1. Tras hacer las digestiones y la ligaciones se lograron generar dos secuencias *de novo*. El peso molecular de las biopartes estandarizadas: Cold box-UTR-SD-

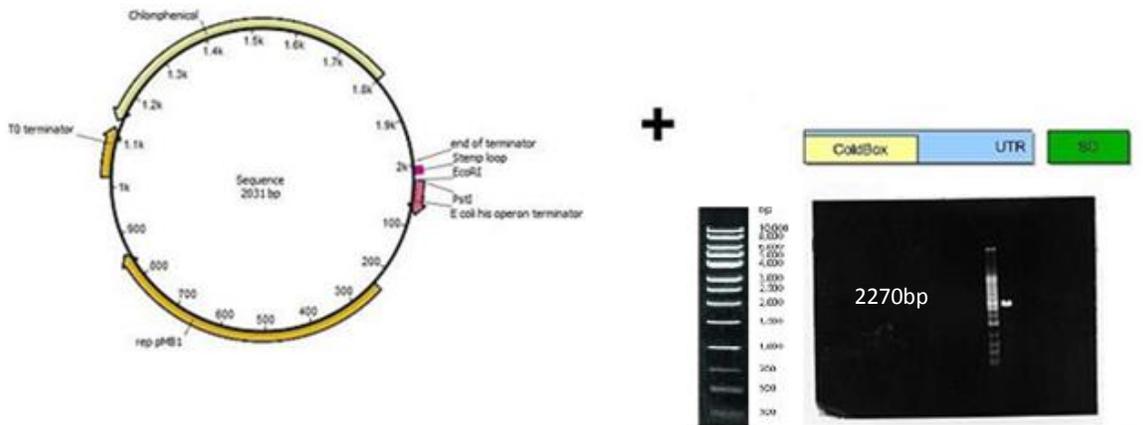
DB es de 300 pb y Cold box-UTR-SD de 200 pb. Unidas al vector fue de 2370pb y 2270 respectivamente, ya que el vector pesa 2070pb. Esto se verificó tras digerir las biopartes (hipotéticas) de la siguiente manera: BBa\_K328003 con Pst1 y BBa\_K328004 con EcoR1. A continuación se muestra la esquematización y comprobación de los *biobricks* realizados (Figura 6 – 7)

**Figura 4.** La construcción de la bioparte BBa\_K328003.



En esta imagen se muestra un diagrama de la construcción hecha, del lado izquierdo se ve el vector pSB1C3 y del derecho la parte del gen CspA usado. En la imagen del gel de electroforesis (.15% de agarosa/ 70 volts/ 3 horas) se muestra la bioparte digerida con Pst1 con su peso total. Del lado izquierdo del la imagen del gel se ve el marcador de peso molecular de 1kb.

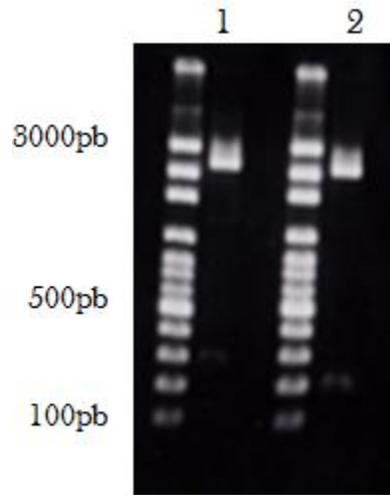
**Figura 5.** La construcción de la bioparte BBa\_K328004.



Muestra la construcción esquematizada de BBa\_K328004 en el vector pSB1C3. Del lado derecho inferior se muestran un gel de agarosa (mismas condiciones que la figura seis, el cual se usó para correr el *biobrick* previamente linearizado con la enzima EcoR1. Se observa el marcador de peso molecular de 1 kb para corroborar el peso de la bioparte.

Después de linearizar los *biobricks* y haber comprobado que las construcciones correspondían con el peso molecular, se realizó una doble digestión para verificar que el inserto dentro de vector correspondía con el peso molecular esperado. En la figura ocho podemos ver los resultados, que indican la presencia del vector con la banda de 2070 pb. La banda de carril 1 de 300 pb de peso molecular representa el segmento CB-UTR-SD-DB que pesa 300 pb. La banda inferior del carril 2 representa la secuencia CB-UTR-SD que pesa 200 pb. Con esto se comprueba la correcta digestión y ligación de las biopartes. La manipulación de las partes silvestres fue la correcta y se logró generar dos biopartes no existentes en la naturaleza (uniéndolas al plásmido).

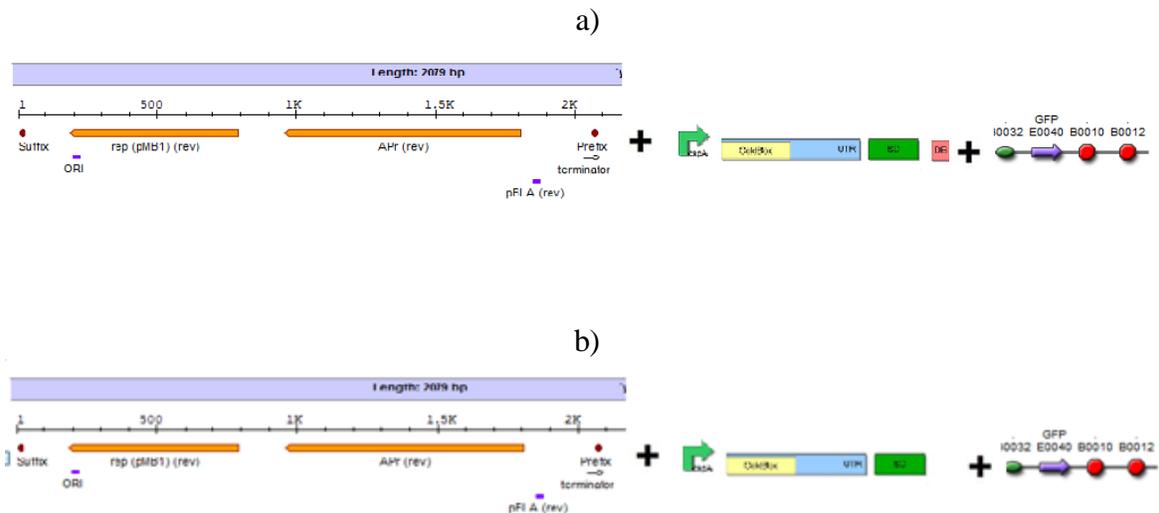
**Figura 6.** Comprobación de las biopartes BBa\_K328003 y BBa\_K328004



Fotografía de un gel de agarosa al 1.5% corrido a 80 volts por 3 horas en el cual se verifica la correcta construcción de los dos *biobricks*. En la imagen se observan BBa\_K328003 (1) y BBa\_K328004 (2) digeridas con EcoR1 y Pst1. El fragmento de arriba corresponde al plásmido pSB1C3 que pesa 2031pb. Las bandas de abajo corresponden a los insertos Cold box-UTR-SD-DB (1) que tiene 402pb y Cold box-UTR-SD (2) con 329pb.

Si bien el volver partes estándar es importante en la biología, el caracterizar es igual de imprescindible de tal manera que se formuló una metodología para caracterizar en este proyecto. En la figura nueve se muestran los esquemas usado para la construcción de dos bioprates con GFP.

**Figura 9.** Construcciones para la caracterización de BBa\_K328003 y BBa\_K328003



En la imagen nueve, se muestra un esquema de las construcciones en la que se está trabajando para poder realizar caracterización de BBa\_K328003 (a) y BBa\_K328004 (b) por medio del gen reportero GFP en el plásmido pSB1A2.

la investigación se encontró, uno de los grandes con un gran problema: la generación de las partes mostradas en la figura 10. Para hacer frente a esta dificultad, he usado una serie de protocolos (Swords, 2003; Gross, 2003; Pashley and Kendall, 2003; Downey, 2003; Dominy, 2003) pues en al inicio se quería realizar la construcción mediante dobles ligaciones en el plásmido pSB1A3. Las condiciones para que la ligasa T4 ensamble tres fragmentos al mismo tiempo son azarosas e impredecibles en el proceso de ligación. Por estas razones se han probados varios protocolos donde se varía la temperatura y el tiempo de incubación de la reacción con el fin de reducir el azar implícito en el procedimiento. Los resultados obtenidos se observan en el cuadro seis.

En estas ligaciones se siguieron varios protocolos para la obtención de clonas las cuales se muestran en el siguiente cuadro.

**Cuadro 5.** Condiciones para las dobles ligaciones.

<b>Tiempo</b>	<b>Temperatura</b>
16°C	15 minutos
16°C	19 horas
16°C-22°C	2 horas y 20 minutos cada temperatura
22°C	15 minutos
22°C	4 horas
4°C	17 horas

**Cuadro 6.** Condiciones para las dobles ligaciones y sus resultados.

<b>Tiempo</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Colonias por caja Cold box-UTR-SD- DB+E0240+pSB1A3</b>	<b>Colonias por caja Cold box-UTR- SD+E0240+pSB1A3</b>	<b>Colonias que presentaron el plásmido con el peso correspondiente</b>
6°C	19 horas	-	3	1
6°C- 22°C	2 horas y 20 minutos cada temperatura	4	-	4
2°C	15 minutos	10	9	5
2°C	4 horas	-	-	-
°C	17 horas	-	1	1

El cuadro seis muestra las colonias que crecieron por caja en las dos construcciones, estas bacterias fueron crecidas, se les extrajo en plásmido, se digirió con EcoR1 para corroborar el peso molecular.

La construcción Cold box-UTR-SD-DB+E0240+pSB1A3 tiene un peso molecular de 3331pb que corresponde a Cold box-UTR-SD-DB 300pb, E0240 876pb y pSB1A3 2155pb. La otra construcción pesa en total 3231ya que la parte Cold box-UTR-SD pesa

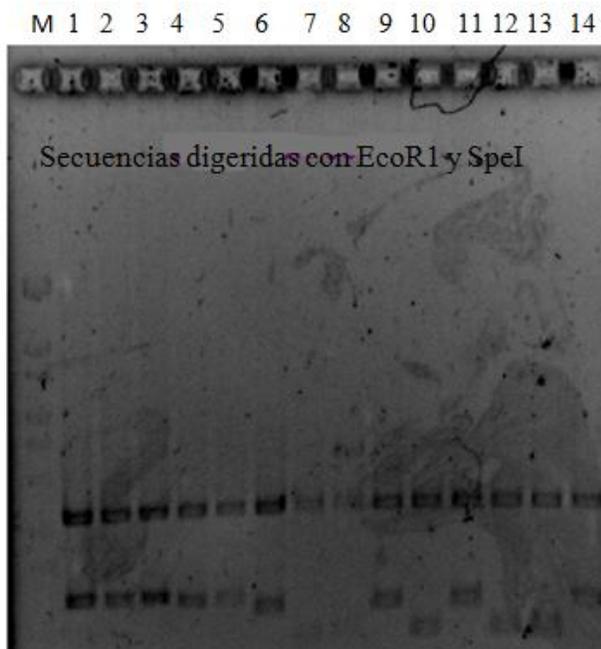
200pb. En los geles corridos para corroborar la doble ligación las colonias mostradas en el cuadro seis, en la última columna presentaron dicho peso. Sin embargo al ser digeridas con Ecor1 y Pst1 para liberar el fragmento BBa\_K328003+ E0240 (1176pb) y BBa\_K328003+ E0240 (107 pb) el peso molecular de ambas oscila entre los 1000 y 2000 pb. Para corroborar que la construcción sea la correcta es necesario encontrar otros sitios de restricción para visualizar tres bandas en el gel. Uno de los problemas que no ha permitido esto es que el sitio mixto generado por Xba1 y Spe1 deja de ser compatible con estas dos enzimas y es necesario usar enzimas de restricción distintas. Otra posibilidad contemplada para corroborar la construcción es la secuenciación de esta.

Una vez comprobada la construcción se realiza la medición de PoPS y consecuentemente de RPU's y SPU's con los controles positivos descrito en la metodología. Si bien la biología sintética abre las puertas para diseñar complejas construcciones no conocidas en la naturaleza, y permite que microorganismos, en los que se introducen las construcciones quiméricas transcriban proteína de otros seres, su estudio y aplicación requiere un conocimiento profundo de las partes que se están utilizando (Endy, 2005). Es un área de la ciencia que requiere de un montaje experimental y computacional adecuado para llevar a cabo el laborioso trabajo en el laboratorio y en el modelaje matemático, además de la colaboración de un grupo de expertos en diferentes campos. Por ejemplo en el proyecto "A very cool *E. coli*" se hizo un modelaje matemático donde se al trato al frío como una sustancia y no como un cambio en la temperatura (disponible en: <http://2010.igem.org/Team:Mexico-UNAM-CINVESTAV/Modeling/Theory>). El modelo representaba una complicada red genética donde no sólo interviene el gen CspA y sus proteínas, sino muchos más genes relacionados con la respuesta a frío en *E. coli* la cual que se trato de ejemplificar de forma virtual. A si mismo, esta representación gráfica de la realidad hechas con modelos matemáticos se limitan a ejemplificar el sistema bajo ciertas condiciones y tomando en cuenta sólo las variables que se conocen del sistema, ignorando si es que existir otros factores que lo afecten.

Otro problema que se encontró en al realizar este trabajo fue la obtención de resultados positivos con las dobles ligaciones. La mayoría de los laboratorios alrededor del mundo generan sus *biobricks* mediante la síntesis de las secuencias que desean construir, usando el servicio de compañías especializadas. Esta es una limitante importante en países donde la biología sintética comienza a ser estudiada ya que no se cuenta con laboratorios especializados y ni con especialistas en el tema que garanticen la obtención de *biobricks*. El proceso de doble ligación es azaroso y demanda gran cantidad tiempo ya es necesario realizar varios protocolos para poder obtener la construcción y analizarla en un gel de agarosa. La metodología abarca desde la reacción de ligación, pasando por la transformación, el miniprep, las digestiones simples y dobles; y la corrida del gel de agarosa hasta los resultados de la secuenciación. Sin embargo esto se podría solucionar de contar con presupuesto para sintetizar los fragmentos diseñados evitando así el paso azaroso de obtener dobles ligaciones.

Ante los resultados negativos de las dobles ligaciones se cambio la metodología y se uso el plásmido pSB1A2 en el cual esta insertada la GFP. Los resultados obtenidos de estas ligaciones se muestran en la figura 10

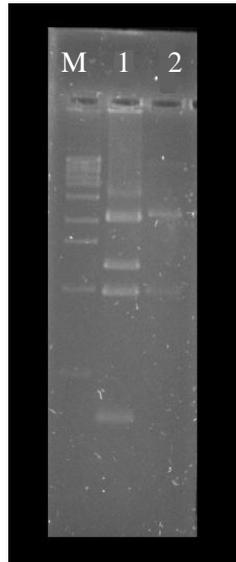
**Figura 8.** Electroforesis de las construcciones hechas con los dos fragmentos digeridos con EcoR 1 y SpeI .El primer carril es el marcador de peso molecular Lambda Sty. Los primeros cinco carriles y el sexto corresponden a ligaciones hechas con el fragmento: CB-UTR-SD-DB, en el séptimo carril está el vector pSB1A2 (banda de 2079pb) y su inserto liberado el E0240 (876pb). En el resto de los carriles esta la construcciones realizadas con CB-UTR-SD.



Con este gel se demostró la construcción de al menos nueve biopartes de la cuales, cinco pertenecen a la primera secuencia y el resto a la segunda parte.

Para corroborar la correcta inserción de las secuencias de *cspA* se realizaron las digestiones mostradas en la figura 10. Sin embargo para corroborar la primer secuencia de gen *cspA* se realizó una doble digestión con EcoR1 y PstI.

**Figura 9.** Electroforesis de la digestión con EcoR1 y PstI a la construcción de: CB-UTR-SD-DB+pSB1A2



En la figura 11 se observa en el carril de la izquierda el marcador de peso molecular Lambda Sty, en el primer se cargo la construcción digerida por las enzimas ya mencionadas. Se observan cinco bandas debido a que el sitio de restricción de PstI se religó a la construcción. La primera banda de arriba hacia abajo represente la construcción completa si digerir. La segunda el vector pSB1A2, la tercer la ligación de CB-UTR-SD-DB y E0240, la cuarta la GFP sola y la quinta en fragmento ya mencionado del gen *cspA*

Una de los objetivos de la biología sintética es hacer el proceso de diseño y construcción de dispositivos y sistemas biológicos *ingenierizados* más fácil. Varias técnicas se han diseñado para realizar esto, sin embargo en el presente trabajo hemos expuesto la problemática en la construcción. Los principios de esta disciplina son la reutilización de partes estandarizados y la caracterización y son herramienta que ayudan a disociar los sistemas y entenderlos (Canto, et.al.; 2008). Sin embargo, deja de a un lado el estudio de las interacciones que ocurren en los organismos y se enfoca en estudiar a un nivel orgánico en un contexto molecular y reduccionista donde las secuencias se comportan como piezas de rompecabezas, de manera predecible por el investigador.

La utilidad que la comunidad mundial le está dando a dicha área de la biología es la de tener la capacidad de resolver muchos de los problemas de la humanidad por medio

de quimeras genéticas (Kelly et. al.; 2009) Lo cierto es que en una década de estudios en el tema, se ha avanzado a pasos gigantescos en proponer proyectos para la la resolución de dichos problemas. Este punto se puede ejemplificar con la mayoría de los trabajos realizados para la competencia IGEM ([http://igem.org/Main\\_Page](http://igem.org/Main_Page)). Sin embargo, hasta la fecha no se tiene *biobricks* que resuelvan los problemas a los que van enfocados, lo que se ha logrado es que han ayudado al entendimiento de los mismos. Esta situación, tal vez es porque los sistemas biológicos no funcionan como micro maquinas a las cuales los investigadores les pueden programar para realizar una función. Quizá es que los sistemas biológicos son muchos más complicado de lo que se entiende actualmente y es necesario seguir estudiando los para poder comprenderlos en su totalidad. Pero entonces, ¿Cuál es el enfoque de la biología sintética actualmente? y ¿Hasta dónde llegan las capacidades humanas para poder estandarizar y caracterizar parte genéticas que han tomado miles de años en evolucionar?

De lo que se tiene certeza es que la disociación de los sistemas por medio de esta disciplina e ayuda a comprenderlos y que ha comenzado a cimentar las bases de una área de la biología que promete poder resolver problemas que afectan a la humanidad, como la malaria o la degradación de casi cualquier desecho tóxico. Es muy probable que no lleguemos a comprender los sistemas biológicos en su totalidad pero es seguro que la biología sintética nos da herramientas para poder seguir estudiándolos y continuar en el estudio del mundo biológico que nos rodea.

## REFERENCIAS

- Andersen** J. B., et al. 2001. GFP-based N-acyl homoserine-lactone sensor systems for detection of bacterial communication. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:575–585
- Anderson** J.C., Voigt C.A., and A.P. Arkin. 2007. Environmental signal integration by a modular AND gate. *Mol. Syst. Biol.* 3:133
- Arkin** A., and D. Endy. 1999. A Standard Parts List for Biological Circuitry; Technical Report (<http://hdl.handle.net/1721.1/29794>)
- Av-Gay Y., Aharonowitz, Y., and G.Cohen. 1992. Streptomyces contains a 7.0 KDa cold shock like protein. *Nucleic Acids Res.* 20:5478
- Bae W., Jones, P.G., and M. Inouye. 1997. CspA, the major cold-shock protein of *E. coli*, negatively regulates its own gene expression. *J Bacteriol.* 179:7081–7088.
- Bennett** M., and J. Hasty. 2009. Microfluidic devices for measuring gene network dynamics in single cells. *Nat. Rev. Genetics.* 10: 628–638
- Beckskei** A., Seraphin B., and L. Serrano. 2001. Positive feedback in eukaryotic gene networks: Cell differentiation by graded to binary response conversion. *EMBO J.* 20: 2528–2535
- Bolivar** F., Rodriguez R.L., Greene P.J., Betlach M.C., Heyneker H.L., and H.W.
- Boyer.** 1977. Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene.* 2(2):95-113
- Baneyx**, F., and M. Mujacic. 2002. Cold-Inducible Promoters for Heterologous Protein Expression. *Methods Mol. Biol.* Vol. 205 Humana Press Inc.
- Birnboim** H. C., and J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* 7:1513-1518
- Bult** C.J., White, O., Olsen, G.J., Zhou, L., Fleischmann, R.D., and G.G. Sutton. 1996. Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, *Methanococcus jannaschii*. *Science* 273: 1058–1073.
- Canton** B., Labno A., and D. Endy. 2008. Refinement and standardization of synthetic biological parts and devices. *Nature.* 26(7):787-793
- Chandran** D., Bergmann F.T. and H.M. Sauro. 2009. TinkerCell: modular CAD tool for synthetic biology; *J. Biol. Eng.* 3:19
- Cohen** S.N., Chang A.C., Boyer H.W., and R.B. Helling. 1973. Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 70(11):3240-4
- Costanzo** J.P., Lee., R.E., DeVries, A.L., Wang, T., and J.R. Layne. 1995. Survival mechanisms of vertebrate ectotherms at subfreezing temperatures: Applications in cryomedicine. *FASEB J.* 9:351–358.
- D'amico** S, Collins T., Marx J.C., Feller G., Gerday C., and C. Gerday. 2006. Psychrophilic microorganisms: challenges for life. *EMBO J.* 7 (4):385-389
- de Camargo**, A. P., and M.P.B. de Camargo. 2008. Frost in Coffee Crops: Frost Characteristics, Damaging Effects on Coffee and Alleviation Options, in *Coffee: Growing, Processing, Sustainable Production: A Guidebook for Growers, Processors,*

Traders, and Researchers (ed J. N. Wintgens), Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Germany. doi: 10.1002/9783527619627.ch11

**de Silva C.W.** 2007. Sensors and Actuators: Control System Instrumentation. CRC Press, Boca Raton, Florida.

**Dersch P.**, Kneip, S., and E. Bremer. 1994. The nucleoid-associated DNA-binding protein H-NS is required for the efficient adaptation of *Escherichia coli* K-12 to a cold environment. *Mol Gen Genet.* 245:255–259.

**Devries P.L.**, and C.L. Hew. 1990. Biochemistry of fish antifreeze proteins. *FASEB J.* 4:2460–2468.

**Dominy C.N.**, and **D. W. Andrews.** 2003. **Site-Directed mutagenesis by inverse PCR.** In: *Methods in Molecular Biology, Vol. 235: E. coli Plasmid Vectors.* p 328 Humana Press Inc., Totowa, NJ

**Downey N.** 2003. **Extraction of DNA from agarose gels.** In: *Methods in Molecular Biology, Vol. 235: E. coli Plasmid Vectors.* p 328 Humana Press Inc., Totowa, NJ

**Drubin D.A.**, Way J.C., and P. A. Silver. 2007. Designing biological systems. *Genes Dev.* 21: 242-254

**Elowitz M.B.**, Levine A.J., Siggia, E.D., and P.S. Swain. 2002. Stochastic gene expression in a single cell. *Science.* 297:1183–1186

**Endy D.** 2005 Adventures in synthetic biology. *Nature.* 438:449-453

**Endy D.** 2005. Foundations for engineering biology. *Nature.* 438(24):449-453

**Etchegaray J.-P.**, Jones, P.G., and M. Inouye. 1996. Differential thermoregulation of two highly homologous cold-shock genes, *cspA* and *cspB*, of *Escherichia coli*. *Genes Cells.* 1:171–178.

**Fang, L.**, Jiang, W., Bae, W., and M. Inouye. 1997. Promoter-independent cold-shock induction of *cspA* and its derepression at 37°C by mRNA stabilization. *Mol Microbiol.* 23: 355–364.

**Fraser C.M.**, Gocayne, J.D., White, O., Adams, M.D., Clayton, R.A., and R.D. Fleischmann. 1995. The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. *Science* 270: 397–403.

**Funahashi A.**, Morohashi M., Tanimura N., and H. Kitano. 2003). CellDesigner: a process diagram editor for gene-regulatory and biochemical networks. *BIOSILICO* 1:159–62

**Goldenberg D.**, Azar, I., and A.B. Oppenheim. 1996. Differential mRNA stability of the *cspA* gene in the cold-shock response of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 19: 241–248.

**Goldstein J.**, Pollitt, N.S., and M Inouye. 1990. Major cold shock protein of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 87:283–287.

**Gardner T.S.**, Cantor C.R., and J.J. Collins. 2000. Construction of a genetic toggle switch in *Escherichia coli*. *Nature.* 403: 339–342

**Garwin J.L.**, and J.E.Jr. Cronan. 1980,. Thermal modulation of fatty acid synthesis in *Escherichia coli* does not involve de novo enzyme synthesis. *J Bacteriol* 141, 1457–459.

**Graham-Rowe D.** 2003. Britain may force DNA ‘barcodes’ for GM food. *New Sci.* <http://www.newscientist.com/article.ns?id=dn33771>.

**Gross R. H.** 2003. Using desktop cloning software to plan, track, and evaluate cloning projects. In: *Methods in Molecular Biology, Vol. 235: E. coli Plasmid Vectors.* p 328 Humana Press Inc., Totowa, NJ

- Hebraud**, M., Dubois, E., Potier, P., and J. Labadie. 1994. Effect of growth temperature on the protein levels in a psychrotropic bacterium, *Pseudomonas fragi*. *J Bacteriol.* 176: 4017–4024
- Himmelreich** R., Hilbert, H., Plagens, H., Pirkl, E., Li, B.C., and R. Herrmann. 1996. Complete sequence analysis of the genome of the bacterium *Mycoplasma pneumoniae*. *Nucleic Acids Res.* 24: 4420–4449.
- Hoops** S., Sahle S., Gauges R., Lee C., Pahle J., Simus N., Singha M., Xu L., Mendes P., and U. Kummer. 2006. COPASI — a COMplex PATHway SIMulator. *Bioinformatics.* 22(24):3067–3074
- Horn** G., Hofweber R., Kremer W., and H.R. Kalbitzer. 2007. Structure and function of bacterial cold shock proteins. *Cell. Mol. Life Sci.* Vol. 64 p. 1457 – 1470
- Hu** K.H., Liu, E., Dean, K., Gingras, M., DeGraff, W., and N.J. Trun. 1996. Overproduction of three genes leads to camphor resistance and chromosome condensation in *Escherichia coli*. *Genetics.* 143: 1521–1532.
- Jiang** W., Jones, P., and M. Inouye. (1993). Chloramphenicol induces the transcription of the major cold shock protein of *Escherichia coli*, CspA. *J Bacteriol.* 175:5824–5828.
- Jiang** W., Hou, Y., and M. Inouye. 1997. CspA, the major cold-shock protein of *Escherichia coli*, is an RNA chaperone. *J Biol Chem.* 272:196–202.
- Jones** P.G., Van Bogelen, R.A., and F.C. Neidhardt. 1987. Induction of proteins at low temperature in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 169:2092–2095.
- Jones** P.G., Krah, R., Tafuri, S.R., and Wolffe, A.P. 1992. DNA gyrase, CS7.4, and the cold shock response in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 174:5798–5802.
- Jones** P.G., Mitta, M., Kim, Y., Jiang, W., and M. Inouye. 1996. Cold shock induces a major ribosomal-associated protein that unwinds double-stranded RNA in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 93:76–80.
- Jones** P.G., and M. Inouye. 1996. RbfA, a 30S ribosomal binding factor, is a cold-shock protein whose absence triggers the cold-shock response. *Mol Microbiol.* 21: 1207–1218.
- Kaneko** T., Sato, S., Kotani, H., Tanaka, A., Asamizu, E., and Y. Nakamura. 1996. sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. *DNA Res.* 3: 109–136.
- Kelly** J. R., Rubin A., Davis J.H., Ajo-Franklin C., Cumber J., Czar M.J., de Mora K., Gliebberman A., Monie D.D., and D. Endy. 2009. Measuring the activity of BioBrick promoters using an in vivo reference standard. *J. Biol. Eng.* 3(4) 1754-1766
- Kobayashi** H., Kaern M., Araki M., Chung K., Gardner T.S., Cantor C.R., and J. Collins. 2004. Programmable cells: Interfacing natural and engineered gene networks. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101: 8414–8419
- Klingmuller** W. 1975. Bacterial resistance factors as vectors for gene manipulation and gene therapy. *Munch. Med. Wochenschr.* 117(24):1051-60
- Knight** T.F. 2003. Idempotent Vector Design for Standard Assembly of BioBricks. Technical Report, MIT Synthetic Biology Working Group Technical Reports (<http://hdl.handle.net/1721.1/21168>)
- Knight** T. F. 2002. DARPA BioComp Plasmid Distribution 1.00 of Standard Biobrick Components. MIT Synthetic Biology Working Group Reports. published online (doi:1721.1/21167).

- Kolisnychenko V.**, Plunkett III G., Herring C.D., Feher T., Posfai, J. Blattner F.R., and G. Posfai. 2002. Engineering a reduced *Escherichia coli* genome. *Genome Res.* 12: 640–647
- La Teana A.**, Brandi, A., Falconi, M., Spurio, R., Pon, C.L., and C.O. Gualerzi. 1991. Identification of a cold shock transcriptional enhancer of the *Escherichia coli* gene encoding nucleoid protein H-NS. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 10907–10911.
- Ladomery M.**, and J. Sommerville. 1995. A role for Y-box proteins in cell proliferation. *Bioessays.* 17: 9–11.
- Lee S.J.**, Xie, A., Jiang, W., Etchegaray, J.-P., Jones, P.G., and M. Inouye. 1994. Family of the major cold-shock protein, CspA (CS7.4) of *Escherichia coli*, whose members show a high sequence similarity with the eukaryotic Y-box binding proteins. *Mol. Microbiol.* 11:833–839.
- Lelivelt M.J.**, and T.H. Kawula. 1995. Hsc66, an Hsp70 homolog in *Escherichia coli*, is induced by cold shock but not by heat shock. *J Bacteriol.* 177: 4900–4907.
- Leslie S. B.**, Israeli E., Lighthart B., Crowe J.H., and L.M. Crowe. 1995. Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. *Appl Environ Microbiol.* 61(10): 3592-3597
- Martin L.**, Chen A., and D. Endy. 2009. Gemini, a bifunctional enzymatic and fluorescent reporter of gene expression. *Plos One.* 4(11):1-8
- Mandecki W.**, Hayden M.A., Shallcross M.A., and E. Stotland. 1990 A totally synthetic plasmid for general cloning, gene expression and mutagenesis in *Escherichia coli*. *Gene* 94:103-107
- Mayr B.**, Kaplan, T., Lechnerand, S., and S. Scherer. 1996. Identification and purification of a family of dimer major cold shock protein homologs from the psychrotropic *Bacillus cerus* WSBC 1021. *J Bacteriol.* 178:2916–2925.
- McArthur G.H.**, and S. Fong. 2009. Toward Engineering Synthetic Microbial Metabolism. *Journal of Biomed. Biotec.* 1-10
- Mitta M.**, Fang, L., and M. Inouye. 1997. Deletion analysis of *cspA* of *E. coli*, requirement of the AT-rich UP element for CspA transcription, and the downstream box in the coding region for its cold-shock induction. *Mol Microbiol.* 26:321–335
- Morita R.Y.** 1987. Psychrophilic bacteria. *Bacterial Rev* 29:144–167.
- Nakashima K.**, Kanamaru, K., Mizuno, T., and K. Horikoshi. 1996. A novel member of the *cspA* family of genes that is induced by cold shock in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 178: 2994–2997.
- Nealson K.H.** and J.W. Hastings. 1979. Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 43:496–518
- Newkirk K.**, Feng, W., Jiang, W., Tejero, R., Emerson, S.D., Inouye, M., and G.T. Montelione. 1994. Solution NMR structure of the major cold shock protein (CspA) from *Escherichia coli*: identification of a binding epitope for DNA. *Proc Natl Acad Sci USA.* 91: 5114–5118.
- Pashley C.**, and S. Kendall. 2003. Cloning in plasmid vectors. In: *Methods in Molecular Biology*, Vol. 235: *E. coli* Plasmid Vectors. p 328 Humana Press Inc., Totowa, NJ
- Phadtare S.**, Alsina J., and M. Inouye. 1999. Cold-shock response and cold-shock proteins. *Current Opinion in Microbiology.* 2:175-180
- Pankow J. F.** 1991. *Aquatic Chemistry Concept.* EUA CRC Press LLC. p.683

- Purnick** P. E., and P. Weiss. 2009. The second wave of synthetic biology: from modules to systems. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 10: 410–422.
- Rebatchouk** D., Daraselina N., and J.O. Narita. 1996. NOMAD: a versatile strategy for in vitro DNA manipulation applied to promoter analysis and vector design. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93(20):10891-6
- Schindelin** H., Marahiel, M.A., and U. Heinemann. 1993. Universal nucleic-acid-binding domain revealed by crystal structure of the *B.subtilis* major cold-shock protein. *Nature.* 364:164–168.
- Schindelin** H., Cordes, F., Jiang, W., Inouye, M., and U. Heinemann. 1994. Crystal structure of the major cold-shock protein of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 91:5119–5123.
- Schroder** K., Zuber, P., Willimsky, G., Wagner, B., and M.A. Marahiel. 1993. Mapping of the *Bacillus subtilis cspB* gene and cloning of its homologs in thermophilic, mesophilic, and psychrotropic bacilli. *Gene.* 136:277–280.
- Shetty** R.P., Endy D., and T.F. Knight. 2008. Engineering BioBrick vectors from BioBrick parts. *J. Biol. Eng.* 2(5):5, DOI: 10.1186/1754-1611-2-5
- Rodrigo** G., Carrera J., and A. Jaramillo. 2007. Genetdes: automatic design of transcriptional networks. *Bioinformatics.* 23(14):1857–1858
- Steele**, N.C., J.P. McMurtry, and R. W. Rosebrough. 1985. Endocrine adaptation of periparturient swine to alteration of dietary energy source. *J. Anim. Sci.* 60:1260-1269
- Scotter**, A. J., Marshall C., Graham L.A., Gilbert J.A., Garnham C.P., and Davies P.L. (2006). The basis for hyperactivity of antifreeze proteins. *Cryobiology.* 53 (2): 229–239
- Sinensky** M. 1974. Homeoviscous adaptation: A homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 71:522–525.
- Skrj** N., Erculij N., and M. Dolinar. 2009. A versatile bacterial expression vector based on the synthetic biology plasmid pSB1. *Protein Expr. Purif.* 64:198-204
- Storey** K.B., and J.M. Storey. 1988. Freeze tolerance in animals. *Physiol Rev.* 68:27–84.
- Sugino** A., Peebles, C., Kreuzer, K.N., and N.R. Cozzarelli. 1977. Mechanism of action of nalidixic acid: Purification of *Escherichia coli nalA* gene product and its relationship to DNA gyrase and a novel nickingclosing enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA.* 74: 4767–4771.
- Surowiecki** J. 2002. Turn of the century. WIRED 10.01 [khttp://www.wired.com/wired/archive/10.01/standards.html](http://www.wired.com/wired/archive/10.01/standards.html).
- Swords** W. E. 2003. Chemical transformation of *E. coli*. In: *Methods in Molecular Biology*, Vol. 235: *E. coli* Plasmid Vectors. p 328 Humana Press Inc., Totowa, NJ
- Szybalski** W., and A. Skalka. 1978. Nobel prizes and restriction enzymes. *Gene.* 4:181–182
- Tanabe** H., Goldstein, J., Yang, M., and M. Inouye. 1992. Identification of the promoter region of the *Escherichia coli* major cold shock gene, *cspA*. *J Bacteriol.* 174: 3867– 3873
- Thieringer** A. H., Jones P. G., and M. Inouye. 1998, Cold Shock and Adaptation. *Bio. Essays.* 20.1: 40-57
- Tomb** J.-F., White, O., Kerlavage, A.R., Clayton, R.A., Sutton, G.G., and R. D. Fleischmann. 1997. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature.* 388: 539–547.

**Tsien R.Y.** 1998. The green fluorescent protein. *Annu. Rev. Biochem* 67:509–544.

**Walhout A. J.,** and M. Vidal. 2001. High-throughput yeast two-hybrid assays for largescale protein interaction mapping. *Methods*. 24: 297–306

**Walker G.C.** 1984. Mutagenesis and inducible responses to deoxyribonucleic acid damage in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev.* 48: 60–93.

**Ward A.,** and R. H. Halstead. 1990. *Computation structures*. MIT Press, Cambridge, Massachusetts, USA.

**Weeding E.,** Houle J., and N.Y. Kaznessis. 2010. SynBioSS designer: a web-based tool for the automated generation of kinetic models for synthetic. *Briefings in Bioinformatics*. 11(4): 394 -402

**Willimsky G.,** Bang, H., Fischer, G., and M.A. Marahiel. 1992. Characterization of cspB, a *Bacillus subtilis* inducible cold-shock gene affecting cell viability at low temperature. *J Bacteriol.* 174: 6326–6335.

**Winson M.K.,** Swift S., Fish L., Throup J.P., Jørgensen F., Chhabra S.R., Bycroft B.W., Williams P., and G.S.A.B. Stewart. 1998. Construction and analysis of luxCDABE-based plasmid sensors for investigating N-acyl homoserine lactone-mediated quorum sensing. *FEMS Microbiol. Lett.* 163:185–192

**Whitesides G. M.** 2001. The once and future nanomachine. *Sci. Am.* 285:78-83

**Wolffe A.P.** 1994. Structural and functional properties of the evolutionary ancient Y-box family of nucleic acid binding protein. *Bioessays*. 16:245–250.

**Yamanaka K.,** L Fang, and M. Inouye. 1998. The CspA Family in *Escherichia Coli*: Multiple Gene Duplication for Stress Adaptation. *Mol Microbiol.* 27(2):247-55

**Yamanaka Y.** 1999. Cold Shock Response in *Escherichia coli*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 1(2): 193-202

**Zhang J.,** Campbell R., Ting A., and R. Tsien. 2002. Creating new fluorescent probes for cell biology. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 3: 906–918

International Nucleotide Sequence Database Collaboration. <http://insdc.org/>

<http://2010.igem.org/Team:Mexico-UNAM-CINVESTAV>

<http://2010.igem.org/Team:BCCS-Bristol/Project>

<http://ginkgobioworks.com>

<http://igem.org>

[http://openwetware.org/index.php?title=Synthetic\\_Biology:BioBricks/3A\\_assembly&oldid=78119](http://openwetware.org/index.php?title=Synthetic_Biology:BioBricks/3A_assembly&oldid=78119)

[http://openwetware.org/wiki/BioBricks\\_construction\\_tutorial](http://openwetware.org/wiki/BioBricks_construction_tutorial)

[http://openwetware.org/wiki/Endy:Measkit\\_draft](http://openwetware.org/wiki/Endy:Measkit_draft)

[http://openwetware.org/wiki/Silver:\\_BB\\_Strategy](http://openwetware.org/wiki/Silver:_BB_Strategy)

<http://partsregistry.org/>

<http://partsregistry.org/Measurement/SPU/Learn>

[http://partsregistry.org/Part:BBa\\_E0240](http://partsregistry.org/Part:BBa_E0240)

[http://partsregistry.org/Part:BBa\\_T9002](http://partsregistry.org/Part:BBa_T9002)

<http://partsregistry.org/Part:pSB1A3>

<http://partsregistry.org/Part:pSB1C3>