

Optimización de una ruta metabólica en *Escherichia coli* para la producción de farneseno mediante el uso de biología sintética

Optimization of a metabolic pathway in *Escherichia coli* for the production of farnesene through the use of synthetic biology

Giovanni Garro-Monge¹, David García-Gómez²,
Karla Valerín-Berrocal³, Karol Jiménez-Quesada⁴

Fecha de recepción: 11 de noviembre de 2017
Fecha de aprobación: 8 de marzo de 2018

Garro-Monge, G; García-Gómez, D; Valerín-Berrocal, K; Jiménez-Quesada, K. Optimización de una ruta metabólica en *Escherichia coli* para la producción de farneseno mediante el uso de biología sintética. *Tecnología en Marcha*. Vol. 31-4. Octubre-Diciembre 2018. Pág 25-36.

DOI: <https://doi.org/10.18845/tm.v31i4.3957>



- 1 Centro de Investigación en Biotecnología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Correo electrónico: ggarro@tec.ac.cr.
- 2 Centro de Investigación en Biotecnología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Correo electrónico: dagarcia@tec.ac.cr.
- 3 Centro de Investigación en Biotecnología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Correo electrónico: kvalerin@tec.ac.cr.
- 4 Centro de Investigación en Biotecnología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Correo electrónico: kjimenez@tec.ac.cr.

Palabras clave

Biología sintética; farneseno; RFC10; ruta de mevalonato; terpenoides.

Resumen

La generación de compuestos de interés utilizando residuos orgánicos como materia prima resulta en una opción económica e industrialmente viable. Mediante el uso de biología sintética es posible rediseñar microorganismos capaces de utilizar estos residuos como fuentes de carbono en la producción de biocombustibles, vacunas, alcoholes, aceites y otros. La producción de farneseno y sus precursores se hace posible mediante la modificación de microorganismos tales como *Escherichia coli* insertando rutas metabólicas sintéticas capaces de generar estos compuestos de interés. Luego de estudiar, optimizar y sintetizar los genes que componen la ruta metabólica del mevalonato, la cual origina el farneseno, estos fueron ensamblados junto a una serie de promotores de la familia Anderson para transformar *E. coli* y generar E,E,-farneseno de forma sintética.

Keywords

Sinthetic biology; farnesene; RFC10; mevalonate pathway; terpenes.

Abstract

Interest compounds generation using organic waste as raw material results in an economically and industrially viable option. Through synthetic biology is possible the design of microorganisms capable of using these residues as carbon sources in order to produce biofuels, vaccines, alcohol, oils and other products. Farnesene production and its precursors is possible through the genetic modification of microorganisms like *Escherichia coli*, introducing metabolic pathways capable of produce the interest compounds. After studying, optimizing and synthesizing the genes that make up the metabolic pathway of mevalonate, which originates farnesene, these were assembled together with several Anderson family promoters to transform *E. coli* and generate E, E, -farnesene from synthetic form.

Introducción

Las plantas poseen una gran variedad de productos naturales para defenderse de plagas y depredadores [1]. Estos compuestos son productos del metabolismo secundario de la planta y poseen aplicaciones comerciales o de alto potencial terapéutico. Un ejemplo de estos compuestos son los terpenos, metabolitos secundarios muy diversos y que poseen diversas propiedades de interacción de la planta con el ambiente. De esta forma se relacionan con atractivos de polinizadores y repelentes de herbívoros [2]. Aquellas plantas que acumulan productos naturales específicos se han utilizado durante cientos de años como medicamentos herbarios, por ejemplo, el ajeno dulce (*Artemisia annua*) que se aplica para el tratamiento de la malaria [3]. Debido al descubrimiento de nuevas dianas de fármacos, al surgimiento de nuevas enfermedades y a la creciente tolerancia microbiana a fármacos, la industria farmacéutica necesita constantemente nuevos metabolitos para combatir estas enfermedades [3]. Uno de estos compuestos de importancia comercial es el farneseno [4]. Este sesquiterpenoide está compuesto por tres unidades de isopreno y sus precursores y compuestos derivados se han relacionado con diversas actividades de aplicación médica, tal es el caso de la artemisina [4] [5]

Con el avance tecnológico de los últimos años, se han desarrollado nuevas alternativas, tanto para el tratamiento adecuado de los residuos, así como para su reutilización mediante la transformación de sus compuestos en productos de interés. Un ejemplo claro de este avance tecnológico es la biología sintética. Esta se define como la síntesis de moléculas de manera natural que se encuentran en pequeñas cantidades en la naturaleza o del todo no se producen de forma natural. La técnica se basa en el diseño de sistemas biológicos, a manera de reestructuración *a novo* [6]. La biología sintética busca desarrollar nuevos organismos que pueda fungir como pequeñas fábricas capaces de procesar un compuesto (materia prima) y convertirlo en otro. Las principales herramientas de la biología sintética son: bioinformática, ingeniería metabólica y biología molecular [7].

Al aplicar principios de biología sintética al manejo de residuos, se obtienen una gran cantidad de aplicaciones potenciales. Una que resulta de gran interés es la generación de precursores de biocombustibles, vacunas, aceites y otros productos. Mediante el rediseño de rutas metabólicas se pueden generar microorganismos capaces de poder transformar cadenas largas de carbono como lo es la celulosa, componente estructural de gran abundancia en las plantas, en terpenos, tales como el farneseno. Este sesquiterpeno es precursor para la generación de biodiesel que puede usarse en automóviles, camiones de carga, buses o en generadores de energía. Mediante la implementación de diferentes genes las bacterias podrían ser capaces de degradar la celulosa en azúcares más simples y luego alimentarse de estos. La ruta metabólica sería direccionada a la producción de isopentil pirofosfato para luego producir directamente farneseno a través de la ruta del mevalonato [5].

Otro punto importante en la generación de terpenos de manera biosintética es la escogencia de un organismo que pueda expresar de forma idónea la ruta metabólica a insertar con el fin de poder generar de manera eficiente el compuesto deseado. Si bien *Saccharomyces cerevisiae* ha sido uno de los microorganismos por excelencia para la generación de farneseno, también se han generado diferentes investigaciones utilizando bacterias *E. coli*, la cual ha sido “ingenierizada” para poder producir alpha-farneseno insertando la ruta del mevalonato utilizando alpha farneseno sintasa proveniente de *Malus doméstica*, isopentil pirofosfato y dimetil alil pirofosfato, y farnesil difosfato sintasa [9]. En investigaciones anteriores, Zhu y colaboradores, diseñaron una ruta metabólica sintética para generar farneseno [5].

En este estudio se diseñó una ruta metabólica *in silico* la cual fue optimizada para la producción de Farneseno e insertada en *E. coli*. Un total de 8 genes fueron ensamblados juntos a promotores para iniciar la transcripción, un sitio de unión con la ribosoma para iniciar la traducción a partir del transcrito y dos terminadores para detener la traducción.

Metodología

Diseño de genes sintéticos

Los genes fueron diseñados y optimizados mediante paquetes bioinformáticos tales como *MetaCyc* para la obtención de la ruta metabólica del farneseno [8]. Posteriormente las secuencias de los genes involucrados fueron obtenidas a través de la base de datos del *Centro Nacional de Información para Biotecnología* (NCBI) de Estados Unidos. Estas secuencias fueron optimizadas para ser expresadas en *Escherichia coli* utilizando la interfase *Optimizer* [10]. Posteriormente cada gen fue diseñado para tener un prefijo corriente arriba y un sufijo corriente abajo, las cuales estarían flanqueando el gen de interés y que permiten el ensamblaje entre sí y con otras piezas genéticas incluyendo: promotor, sitio de unión a ribosoma (RBS) y doble terminador para conformar un gen funcional. Los arreglos de cada secuencia se hicieron mediante el programa *Gene Designer* [11]. Las secuencias codificantes (CDS) fueron sintetizados por la empresa *GeneScript*.

Ligación de genes para desarrollo de Bio-bloques activos

Para poder ligar los genes con promotores, un RBS y un doble terminador se utilizó el sistema de ensamblaje RFC10. Primero se unió cada uno de los genes con un doble Terminador y en paralelo un RBS con un promotor, una vez que cada una de estas piezas estaban ensambladas se acopló el Promotor+RBS con CDS+Doble terminador para tener un gen funcional. Promotores y CDSs fueron digeridas como un biobrick corriente arriba y RBS y Doble terminador como una piezas corriente abajo. Además se digirió enzimáticamente un plásmido de tal forma que pudiese recibir ambas piezas genéticas y que tuviese diferente gen de resistencia a los plásmidos que contenían las piezas mencionadas.

Para digerir cada una de las piezas se mezclaron 250 ng de plásmido de cada una de las piezas y 0,5 ul de cada una de las correspondientes enzimas; *EcoRI* y *SpeI* en el caso de las piezas corriente arriba y *XbaI* y *PstI* en las piezas corriente abajo. En el caso del plásmido destino se agregaron 125 ng de ADN. Además se agregaron 5 ul de *CutSmart* y se llevó a un volumen final de 20 ul con agua libre de nucleasas. Las reacciones se incubaron a 37 °C por 3 horas. Al finalizar este lapso se colocó a 80 °C por 30 minutos para inactivar la reacción.

Posteriormente las piezas fueron ensambladas entre sí de manera enzimática. Para esto se trabajó en una relación 4:4:1 pieza corriente arriba, pieza corriente abajo y plásmido. Para obtener las cantidades correctas de cada pieza se utilizó la herramienta NEBioCalculator v1.7.1.

Transformación bacteriana con los bio-bloques obtenidos en un solo constructo

Para ensamblar los diferentes constructos se utilizó un plásmido que contenía una proteína roja fluorescente (RFP) en el sitio de clonaje. Se transformó la cepa DH5 α de *E. coli* con las piezas genéticas ensambladas. Para esto se adicionaron 5 μ l de la ligación a un tubo con 50 μ l de células competentes y se mezcló el contenido con la misma micropipeta. Las células fueron incubadas con la mezcla de transformación por 30 minutos. Luego se realizó un choque térmico transfiriéndolos primero a un baño maría e incubando a 42 °C durante 90 segundos y posteriormente en hielo por 2 minutos. Una vez realizado el choque térmico; se adicionaron 200 μ l de medio SOC líquido precalentado a 37° C en cada tubo de células a transformar y estos se incubaron por 45 min a 37 °C/120 rpm. Transcurrida la incubación, se transfirieron 75 μ l y se inocularon por extensión en placas distintas con medio LB suplementado con agar y el antibiótico correspondiente. Las placas fueron incubadas a 37° C por un lapso de 12-16 horas aproximadamente. Al día siguiente se tomaron las colonias que crecieron en el medio selectivo con antibiótico y se pasaron a un nuevo medio de cultivo en placa. De esta placa nueva se tomó 1 colonia bacteriana y se inoculó en 5 ml de medio LB con 50 ul de antibiótico en un tubo de 50 ml, esto para extraer los plásmidos que contienen las construcciones previamente hechas.

Para la extracción y purificación de plásmidos cada muestra fue incubada a 37° C/120 rpm por 12-16 horas. Transcurrido el tiempo de incubación las muestras fueron centrifugadas a 8000 rpm por 10 minutos. El pellet obtenido fue resuspendido en 250 μ l de la solución de suspensión. A esto se le agregaron 50 μ l de la solución de lisis y se mezcló hasta homogenizar. Posteriormente se agregaron 350 μ l del buffer de neutralización, se mezcló por inversión para luego inmediatamente centrifugar por 10 min a 11000 rpm. Luego, se colocó el sobrenadante en columnas de filtración y se centrifugó la mezcla por 1 min a 11000 rpm y posteriormente se descartó el líquido filtrado. Seguidamente se agregaron 500 μ l de la solución de lavado a la columna y se centrifugó nuevamente por 1 min a 11000 rpm. Finalmente, se centrifugó la columna por 2 min a 11000 rpm sin agregarle ningún reactivo. Se agregaron 30 μ l de agua libre de nucleasas y se centrifugó la columna por 1 min a 11000 rpm. Al final, los minipreps obtenidos fueron almacenados -20 C.

En paralelo, este procedimiento se repitió para el ensamblaje de promotores y RBS (*ribosomal binding site*) siendo los promotores digeridos como piezas corriente arriba y el RBS como una

pieza corriente abajo. El plásmido receptor utilizado presentaba resistencia a cloranfenicol, diferente a las piezas a ensamblar que estaban en plásmidos con resistencia a ampicilina. Para modular el sistema de expresión se utilizó el promotor inducible E-Omp R con código iGEM R0082. El RBS utilizado fue el B0034, descrito por Michael Elowitz [12].

Una vez que se obtuvieron plásmidos purificados de cada uno de los promotores ensamblados por separado con el RBS de Elowitz (promotor+RBS), se procedió a ensamblar promotores+RBS con genes más doble terminador (genes+DT). Para esto, la combinación de promotor+RBS fue digerida como una pieza corriente arriba mientras que las construcciones genes+DT fueron digeridas como piezas corriente abajo. Después de digeridas fueron ligadas entre sí y las mismas posteriormente ligadas a un plásmido previamente digerido con resistencia a ampicilina. Posteriormente la ligación fue utilizada para transformar cepas *E. coli* DH5 α como se describió previamente. Las bacterias fueron finalmente sembradas en medio con ampicilina.

Posteriormente, cada bacteria transformada fue cultivada como se describió previamente para obtener su respectivo plásmido. Una vez obtenido el plásmido se le realizó una prueba de PCR con dos juegos de imprimadores diferentes para confirmar que el gen completo estuviese presente.

Para la confirmación de los ensamblajes realizados los genes fueron amplificados mediante PCR utilizando dos juegos de imprimadores (cuadro 1). V2F y VR que amplificaron desde el plásmido y HprF y HprR que flanqueaban el constructo ya que fueron diseñados a partir del prefijo y sufijo. Los imprimadores utilizados fueron los que se anotan en el cuadro 1.

Cuadro 1. Imprimadores diseñados para la caracterización de genes sintéticos

Imprimador	Secuencia	Tamaño
HprF	Gaattcgcggccgcttag	15.8 kb aprox
HprR	Tactagtagcggccgctgcag	
VF2	Tgccacctgacgtctaagaa	16.0 Kb aprox
VR	attaccgccttgagtgagc	

Luego de verificar por PCR los genes completos, se procedió a ensamblar los genes entre sí para poder armar la ruta metabólica completa. La digestión de las diferentes piezas ser realizó según se describe en el cuadro 2.

Cuadro 2. Digestión de genes completos para el ensamblaje de la ruta del mevalonato.

Gen	Tipo de digestión
Erg10 (F1)	Corriente arriba
HMG-CoA (F2)	Corriente abajo
HMG1 (F3)	Corriente arriba
ERG12 (F4)	Corriente abajo
ERG8 (F5)	Corriente arriba
MVD1 (F6)	Corriente abajo
IDI (F7)	Corriente arriba
Erg20 (F8)	Corriente abajo

Medición de Expresión de los genes mediante PCR Tiempo Real

Para corroborar el ensamblaje de la ruta biosintética del mevalonato se midió la expresión de cada uno de los genes mediante PCR en Tiempo Real. Para esto se extrajo ARN y se transformó en ADN copia, mediante retrotranscriptasa inversa. Primero se cultivó *E. coli* en medio LB suplementado con ampicilina y se incubó a 37 °C durante 12 horas.

Para extraer ARN se utilizó el kit SV Total RNA Isolation System de la marca Promega. El ARN obtenido se almacenó a -80 °C.

Para convertir el ARN en ADN copia se siguieron las instrucciones especificadas por el kit utilizado (*GoScript Reverse Transcription System*).

Para la realización del PCR Tiempo Real se preparó la mezcla de PCR siguiendo protocolos estandarizados y el uso de la master mix provisto por la casa fabricante. Para esta mezcla se utilizó un par de cebadores para cada uno de los genes diseñados según el cuadro 3.

Para la amplificación de las muestras se utilizó la sonda *Syber Green*. La temperatura específica de anillamiento para cada par de cebadores se encuentra en el cuadro 5.

Resultados

Diseño de genes sintéticos mediante paquetes bioinformáticos

Se obtuvieron 8 genes sintéticos ensamblados en un plásmido pUC19 para su posterior transformación en *E. coli* DH5 α .

Ensamblaje de genes para generación de Bio-bloques activos.

Los genes diseñados y sintetizados fueron todos ensamblados con diferentes promotores con el fin de poder evaluar la posible respuesta de *E. coli* ante la expresión de proteínas recombinantes y así mejorar los rendimientos de producción de farneseno. Los tamaños de los diferentes genes dependiendo del promotor utilizado se pueden observar en el cuadro 4.

Cuadro 3. Genes obtenidos mediante diseño bioinformático, sintetizados a través de Genescript.

Gen	Función	Origen
Erg10 (F1)	Acetoacetil-CoA sintetasa	<i>S. cerevisiae</i>
HMG-CoA (F2)	Hidroximetilglutaril-CoA sintasa	<i>Malus sp.</i>
HMG1 (F3)	HMG-CoA reductasa	<i>Malus sp.</i>
ERG12 (F4)	Mevalonato kinasa	<i>S. cerevisiae</i>
ERG8 (F5)	Fosfomevalonato kinasa	<i>S. cerevisiae</i>
MVD1 (F6)	Isopentenil difosfato	<i>S. cerevisiae</i>
IDI (F7)	Isopentenil difosfato	<i>Malus sp.</i>
Erg20 (F8)	E,E-alpha-farneseno	<i>Malus sp.</i>

Cuadro 4. Tamaño esperado de genes construidos en Gene Designer

Gen	Tamaño (pb)	Gen	Tamaño (pb)	Gen	Tamaño (pb)
AF1	1525	AF3	3497	AF6	1523
CF1	1434	EF3	3455	BF6	1573
EF1	1487	AF4	1528	BF7	1249
AF2	1808	BF4	1578	AF8	3143
CF2	1713	BF5	1738	BF8	3193
EF2	1766	DF5	1593		

Transformación bacteriana con los bio-bloques obtenidos en un solo constructo

El uso de la proteína RFP como indicador de transformación, permitió que posterior a la digestión del plásmido para introducir el nuevo constructo, este remplazará a la RFP, así cuando los plásmidos se recircularon sin tener el constructo insertado le dieron una tonalidad roja a la bacteria. Cuando el plásmido y el constructo se ligaron de forma correcta este no dio coloración roja.



Figura 1. Transformación de *E. coli* DH5 α . Izquierda, control positivo de transformación. Derecha, Ligación gen y doble terminador.

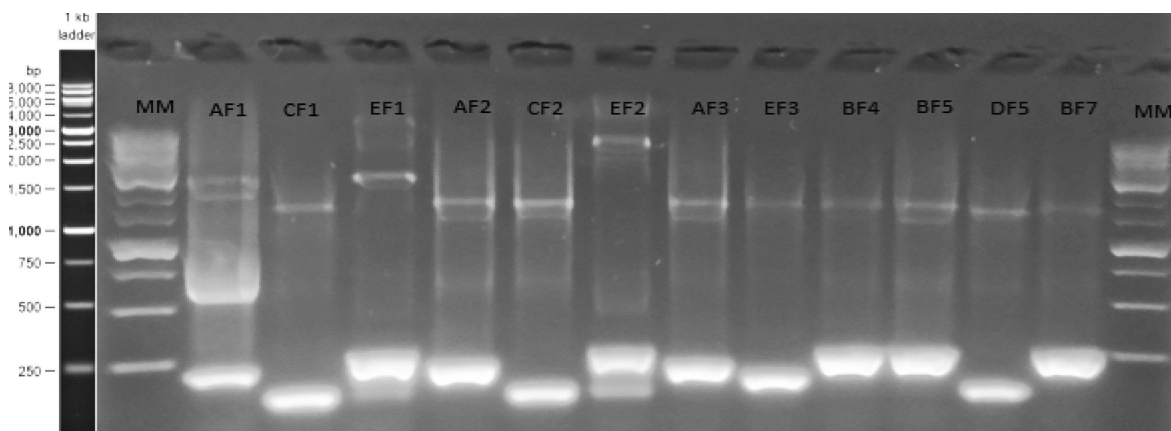


Figura 2. PCR de genes completos utilizando los imprimadores HprF y HprR.

Según los resultados obtenidos con los PCR realizados, se verificó la presencia de los genes ensamblados, ya que los tamaños de las bandas de los amplicones coinciden con el tamaño esperado para cada uno y según los imprimadores utilizados (figuras 2 y 3).

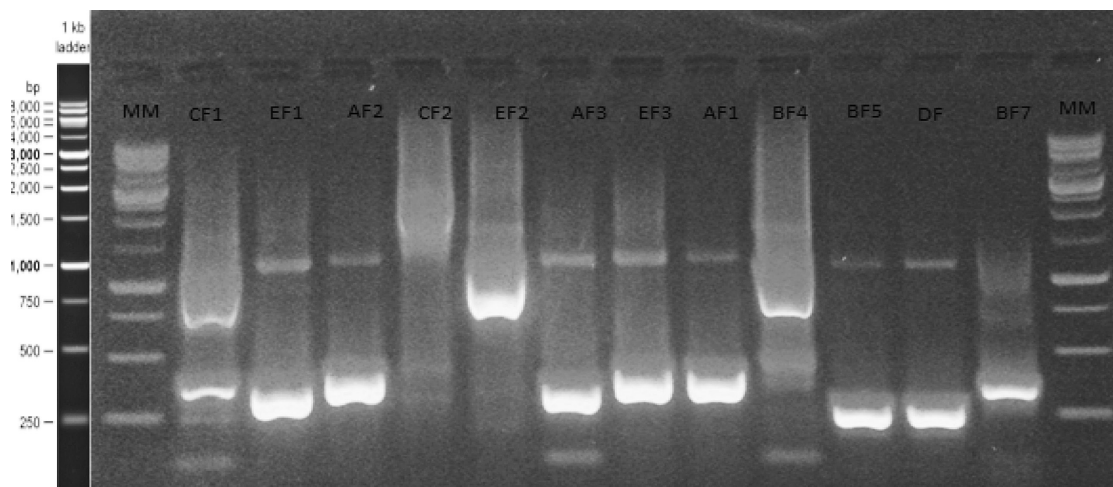


Figura 3. PCR de genes completos utilizando los imprimadores V2F y VR

Medición de la expresión de los genes mediante PCR Tiempo Real para la verificación de los componentes de la ruta metabólica del mevalonato.

Se realizó un análisis de la expresión de genes mediante el estudio del ARN, como una forma alternativa de verificar que la bacteria es potencialmente capaz de producir farneseno con la maquinaria sintética que se le insertó.

Para esto en el cuadro 5 se muestran los imprimadores utilizados para la reacción de PCR tiempo real.

La figura 4 muestra el electroferograma observado en la reacción de RT-PCR (sonda SYBR-Green) para la expresión de los 8 genes contemplados en la ruta modificada del mevalonato que conduce a la expresión del farneseno.

Cuadro 5. Imprimadores específicos para la amplificación de genes componentes de la ruta biosintética del Mevalonato (MVA) por la técnica de RT-PCR

Gen	Imprimador	Tm
Erg10 (F1)	AAGGTGCTGAAGGAAAAGAA	52 °C
	CCGAGTTGATGTCTTCGAT	52 °C
HMG-CoA (F2)	ATCAAGGAACCTGGACATCAC	52 °C
	AAGTTCTTCTTCAGGTGGG	52 °C
HMG1 (F3)	TGAACCTGAACTCAACTCG	52 °C
	GTCTTCTTGCAGGATGTACT	52 °C
ERG12 (F4)	CAACAACGAACTGTACGAAC	52 °C
	CAGGTTCTTGATCAGTTCCA	52 °C

Continúa

ERG8 (F5)	AAGAAGACTGGAACATCACC	52 °C
	GAGTCGTACCAGTTCTTCAC	52 °C
MVD1 (F6)	CCATCGTGGAAAAGGACTT	52 °C
	GGTGTCGTTTCATGTAGAAGA	52 °C
IDI (F7)	AGATCAAGCTGATGAACGAA	52 °C
	TGAAGATGAACACCGAGAAG	52 °C
Erg20 (F8)	GGAAGAAGAAGCTGAAGCACT	52 °C
	TTTTCTTCTTCGATTCGCG	51 °C

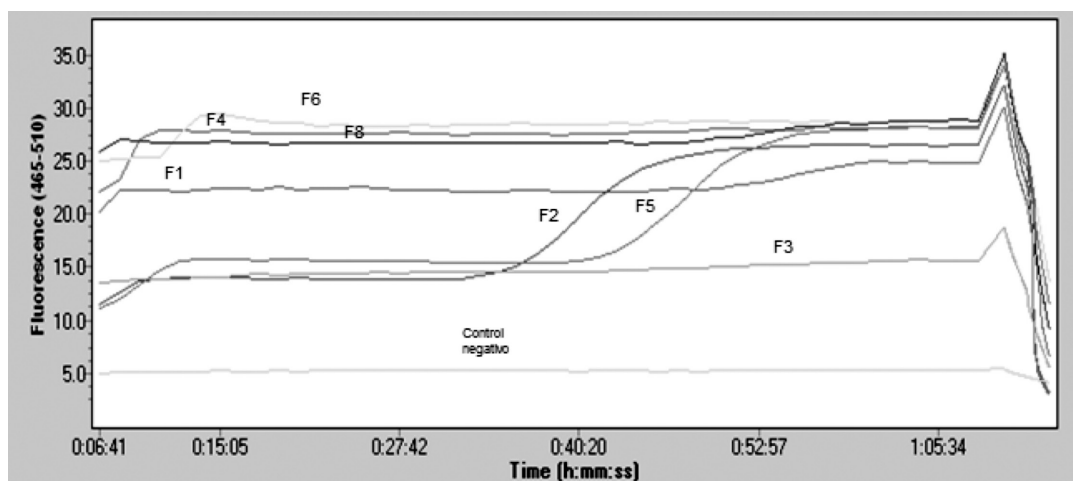


Figura 4. Expresión de genes componentes de ruta biosintética del mevalonato medida en un cultivo bacteriano de *E. coli* modificada con los 8 genes para producir Farneseno.

Discusión

Diseño y síntesis de genes y ensamblaje en bloques.

La ruta metabólica diseñada y generada de manera sintética empieza con el gen ERG10 el cual traduce la enzima acetoacetyl-CoA sintetasa que tiene una actividad enzimática de ligasa. Esta enzima se encarga de la conversión de cuerpos cetónicos en acetoacetyl-CoA el cual se requiere para la síntesis de colesterol. Posteriormente se diseñó el gen ERG13 que genera la enzima hidroximetilglutaril-CoA sintasa (HMG-CoA sintasa). Esta enzima cataliza la reacción en la que el acetyl-CoA se condensa con el acetoacetyl-CoA para formar 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA). Seguidamente se diseñó y sintetizó el gen HMG1 que produce la enzima HMG-CoA reductasa. Esta enzima es dependiente de NADH/NADPH que controla la velocidad de la vía del mevalonato. Dentro de la ruta del mevalonato existe la subruta: biosíntesis del isopentil difosfato. Esta ruta está formada por los genes ERG12, ERG8 y MVD1. El gen ERG12 expresa la enzima mevalonato quinasa la cual contribuye a la regulación en las rutas metabólicas de isoprenoides y esteroides. La mevalonato quinasa cataliza la conversión del intermediario mevalonato en (R)-5-fosfomevalonato. El gen ERG8 produce la enzima fosfomevalonato quinasa la cual es una enzima esencial del citosol celular. Esta enzima cataliza la conversión del (R)-5-fosfomevalonato (producto del gen ERG12) en (R)-5-difosfomevalonato. En ambas reacciones ejecutadas por los genes ERG12 y ERG8 media ATP, el cual cede un grupo fosfato en ambos productos. El gen MVD1 traduce para la enzima mevalonato pirofosfato decarboxilasa la actual

actúa como un heterodímero y cataliza la conversión de (R)-5-difosfomevalonato en isopentenil difosfato. *E. coli* tiene una copia de IDI, el cual genera la enzima isopentenil difosfato isomerasa, sin embargo, se inserta como parte de esta ruta sintética debido a que la sobreexpresión de este gen conlleva a una estrecha relación entre el consumo y la producción de IPP y DMAPP lo cual contribuye significativamente al aumento en la producción de α -Farneseno además de aliviar la inhibición en el crecimiento de *E. coli*. Esta enzima cataliza el arreglo 1,3 alílico del sustrato (isopentenil pirofosfato) en DMAPP que es su isómero más alílico. Como último gen se diseñó una fusión de dos genes: ERG20 y α FS, ya que la fusión de ambas proteínas ayuda a incrementar la concentración farnesil pirofosfato disponible de forma inmediata a α -farnesil sintasa y esta unión previene la difusión del farnesil pirofosfato en el citoplasma celular. El gen ERG20 traduce la enzima farnesil pirofosfato sintasa la cual cataliza la condensación secuencial de isopentenil pirofosfato con pirofosfato alílico, dimetilalil pirofosfato y luego con geranilpirofosfato hasta producir farnesil pirofosfato. Este último subproducto es posteriormente transformado por la proteína α farnesil sintasa en (E,E)- α farneseno. Una sobreexpresión de esta fusión de proteínas lleva al aumento de α -farneseno, sin embargo, lleva a la reducción de la biomasa. Este efecto no se da por una sobreexpresión de estas últimas proteínas o la mutación generada sino al desgaste de compuestos esenciales como DMAPP, Isopentenil pirofosfato y farnesil pirofosfato. Cabe señalar, como se hizo previamente, la necesidad de sobreexpresar el gen IDI para aumentar la concentración de los compuestos esenciales ya mencionados y que haya suficientes precursores para generar α -farneseno sin comprometer el crecimiento bacteriano [9].

Como producto adicional se obtuvieron diferentes versiones de expresión de los genes ya que en lugar de un único promotor se utilizó el promotor *ompR* de regulación genética positiva. Este promotor se toma de la región corriente arriba de *ompC*. El *OmpR* fosforilado se une a los tres sitios del operador y activa la transcripción.

Transformación bacteriana con los bio-bloques obtenidos en un solo constructo.

Como se puede observar en la figura 1, hay colonias rojas y colonias blancas. Las colonias rojas corresponden a bacterias que fueron transformadas con plásmidos re-circularizados y de ahí su coloración por lo que estas colonias se descartan. Las colonias de color blanco corresponden a las bacterias que fueron transformadas con el plásmido que contiene el inserto deseado. El constructo desplazó al gen fluorescente y de ahí que este perdiera su coloración. De esta forma las colonias blancas son pasadas a nuevas placas y las colonias rojas son desechadas ya que esta coloración indica que no fueron transformadas.

En las figuras 3 y 4 se podrá corroborar que los genes CF1, AF2, CF2, EF2, BF4, BF5, DF5 y BF7 poseen los tamaños esperados para ambos juegos de imprimadores. Contrario a esto los genes AF1, EF1 y BF7 presentan un tamaño correspondiente para los imprimadores HpR pero en el caso de los imprimadores V2F y VR no se obtuvieron amplificaciones. El gen AF3 presenta amplificación positiva para los marcadores V2F/VR.

En el caso de los genes que lograron amplificar por PCR con ambos imprimadores presentan una alta probabilidad de que correspondan a los genes deseados. En el caso de los genes que amplificaron con un solo juego de imprimadores, se puede tener una alta certeza de que estos genes corresponden a los buscados. Cabe resaltar que los imprimadores HPR están basados en los prefijos y sufijos de los genes mientras que los V2F/VR están basados en la secuencia del plásmido por lo que estos últimos pudieron sufrir alguna mutación en el proceso de digestión que afecte la amplificación por PCR.

Medición de la expresión de los genes de la ruta del farneseno mediante PCR Tiempo Real

El adecuado crecimiento de cepas de *E. coli* transformadas demostró que la maquinaria sintética insertada no afecta el correcto funcionamiento de la bacteria. Por otro lado, su posterior análisis mediante PCR Tiempo Real (Fig. 5) permitió demostrar el correcto ensamblaje de los genes en la bacteria y su adecuada expresión. El estudio comparativo de la expresión de los genes de la ruta biosintética del mevalonato mostró un incremento en los niveles de ARNm en todos los genes recombinantes insertados en *E. Coli*, sin embargo, el nivel de expresión varía entre los genes. Esto puede deberse a la complejidad de varios genes, sobre todo de ERG20 y α FS debido a la fusión entre ambos genes [13].

Conclusiones

- Se logró ensamblar la ruta metabólica que incluya todos los genes modulados por diferentes promotores.
- El sistema de rfc10 permite el ensamblaje de piezas de una forma eficiente, logrando tener genes completos que posteriormente pueden ensamblarse entre sí para generar rutas metabólicas completas.
- Se obtuvieron las secuencias de las enzimas que reportaban mejores rendimientos y se optimizaron para poder ensamblarlas a manera de bloques. para ser expresadas en *E. coli*.
- Los genes sintéticos completos ensamblados con un doble terminador, un RBS y un promotor se expresaron correctamente en las bacterias transformadas.

Agradecimientos

Este proyecto fue financiado por la Vicerrectoría de Investigación y extensión (VIE) del INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA.

Referencias

- [1] Moore, B. D., Andrew, R. L., Külheim, C., & Foley, W. J. (2014). Explaining intraspecific diversity in plant secondary metabolites in an ecological context. *New Phytologist*, 201(3), 733-750.
- [2] Arendt, P., Pollier, J., Callewaert, N., & Goossens, A. (2016). Synthetic biology for production of natural and new-to-nature terpenoids in photosynthetic organisms. *The Plant Journal*, 87(1), 16-37.
- [3] Paddon, C. & Keasling, J.D. (2014). Semisynthetic artemisinin: a model for the use of synthetic biology in pharmaceutical development. *Nature* vol 12.
- [4] Arendt, P. Polier, J. Calleart, N. & Goossens, A. (2016). Synthetic biology for production of natural and new-to-nature terpenoids in photosynthetic organisms. *The Plant Journal*, 87: 16-37.
- [5] Zhu, F. Zhong, X. Hu, M. Lu, L. Deng, Z. & Liu, T. (2014). In Vitro Reconstitution of Mevalonate Pathway and Targeted Engineering of Farnesene Overproduction in *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 111 (7) 1396-1405
- [6] Agapakis, C.M. (2013). Designing Synthetic Biology. *ACS Synthetic Biology*.
- [7] Cheng, A. & Lu, T.K. (2012). Synthetic Biology: An Emerging Engineering Discipline. *Ann. Rev. Biomed. Eng.* 14: 155-178.
- [8] Chandran, S.S. Kealey, J.T. & Reeves, C. (2011). Microbial production of isoprenoids. *Process Biochemistry* (46) pp.1703-1710
- [9] Wang, C. Yoon, S. Jang, H. Chung, Y. Kim, J. Choi, E. & Kim, S. (2011). Metabolic engineering of *Escherichia coli* for α -Farnesene production. *Metabolic Engineering* 13:648-655.

- [10] Caspi R, Altman T, Dale JM, Dreher K, Fulcher CA, Gilham F, Kaipa P, Karthikeyan AS, Kothari A, Krummenacker M *et al.*: The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of pathway/genome databases. *Nucleic Acids Res* 2010, 38:D473-D479.
- [11] Puigbo P, Guzman E, Romeu A, Garcia-Vallve S: OPTIMIZER: a web server for optimizing the codon usage of DNA sequences. *Nucleic Acids Res* 2007, 35:126–131.
- [12] Elowitz, M. & Stanislas, L. (2000). A synthetic oscillatory network of transcriptional regulators. *Nature* vol 403.
- [13] Maciejak, A. Leszczynska, A. Warchol, I. Gora, M. Kaminska, J. Plochocka, D. & Burzynska, B. (2013) The effects of statins on the mevalonic acid pathway in recombinant yeast strains expressing human HMG-CoA reductase. *BMC Biotechnology*, 13:68