

Alternativas de biología sintética para el control de rutas metabólicas

Pavel Zach[†], Alejandro Vignoni[‡], Daniel Georgiev[†], Jesús Picó[‡]

[†]CECYL Lab, Department of Cybernetics, Faculty of Applied Sciences, University of West Bohemia in Pilsen
Univerzitni 8, Pilsen 306 14, Czech Republic. Email: pzach@students.zcu.cz, georgiev@kky.zcu.cz

[‡]Institut d'Automàtica i Informàtica Industrial, Universitat Politècnica de València,
Camino de Vera s/n, 46022 Valencia, España. Email:{alvig2, jpico}@upv.es

Resumen

Este trabajo intenta hacer hincapié en las alternativas que presenta la biología sintética y en como se pueden incluir en rutas metabólicas para mejorar la producción de metabolitos. Primero se presenta un análisis de una ruta metabólica interesante como la de la biosíntesis del triptófano. Luego hace un análisis de los procesos de regulación y introduce las posibles alternativas que aparecen con la biología sintética para reemplazar o mejorar la regulación y en definitiva la producción de metabolito en la industria biotecnológica. Finalmente se analizan las posibles implementaciones sintéticas para regular rutas metabólicas

Palabras clave: biología sintética, biotecnología, regulación de rutas metabólicas.

1. Introducción

La utilización de microorganismos para la producción de compuestos y metabolitos valiosos se convirtió en realidad después de la invención de diferentes técnicas para la síntesis de ADN y la transfección de ADN en células vivas. Estos métodos, tales como la digestión de restricción para cortar el ADN en lugares específicos, de ligadura de DNA para la unión de diferentes fragmentos de ADN, y la transfección de células para la introducción de un nuevo ADN en las células han permitido la ingeniería genética para convertirse en realidad.

En 1977, Genentech, Inc., informó de la producción de la primera proteína humana producida en bacterias, usando un gen recombinante sintético por primera vez. Sólo un año más tarde, en 1978, la misma compañía anunció una exitosa producción de insulina humana en una bacteria *Escherichia coli* [1]. En el tratamiento de la diabetes, esta insulina sintética sustituye la insulina animal, que era más difícil de obtener, por lo tanto más costosa y que estaba causando reacciones no deseadas en algunos pacientes. En este momento clave ha comenzado una nueva era de la biotecnología.

Mientras que la ingeniería metabólica añadió un enfoque sistemático, la biología sintética introduce otro nivel a la ingeniería de los circuitos genéticos

y las vías metabólicas. Su objetivo es aplicar los principios de ingeniería, tales como la normalización, la modularidad y la reutilización de todas las piezas utilizadas, en última instancia, la creación de bibliotecas de piezas normalizadas bien caracterizados implicados en la regulación de la expresión génica.

Su atención se centra en la creación de circuitos genéticos o rutas metabólicas *de novo*, la exploración de nuevas opciones y nuevos diseños que no se pueden encontrar en la naturaleza. Esto significa una amplia necesidad de modelado computacional, acompañado por la comprensión de todos los procesos biológicos implicados y la capacidad de sintetizar nuevas partes de ADN a un precio razonable.

Tras más de 40 años de uso de métodos de ingeniería genética y metabólica en el desarrollo de productos comerciales, la biología sintética ha comenzado a extenderse en aplicaciones comerciales. Una de las primeras empresas industriales, que utilizan métodos de biología sintética en su producción, es la compañía de ciencias de la vida y los materiales DSM. Esta compañía utiliza biología sintética en la optimización de su proceso de síntesis y producción de antibióticos como la cefalexina [6]. Aunque el número de empresas de biotecnología que han utilizado técnicas de biología sintética para acelerar y mejorar su investigación es cada vez mayor, el máximo potencial todavía no se ha dado alcanzado.

El trabajo se organiza de la siguiente manera: primero se presenta un análisis de una ruta metabólica interesante como la de la biosíntesis del triptófano en la Sección 2. Luego en la Sección 3 se hace un análisis de los procesos de regulación y a medida que van apareciendo se introducen las posibles alternativas que aparecen con la biología sintética para reemplazar o mejorar la regulación y en definitiva la producción de metabolito en la industria biotecnológica. En la Sección 4 se presenta al control en traducción como alternativa a la regulación de la transcripción y su utilidad para controlar rutas metabólicas. Finalmente se muestra un posible implementación, se revisa lo explicado y se proponen los trabajos futuros.

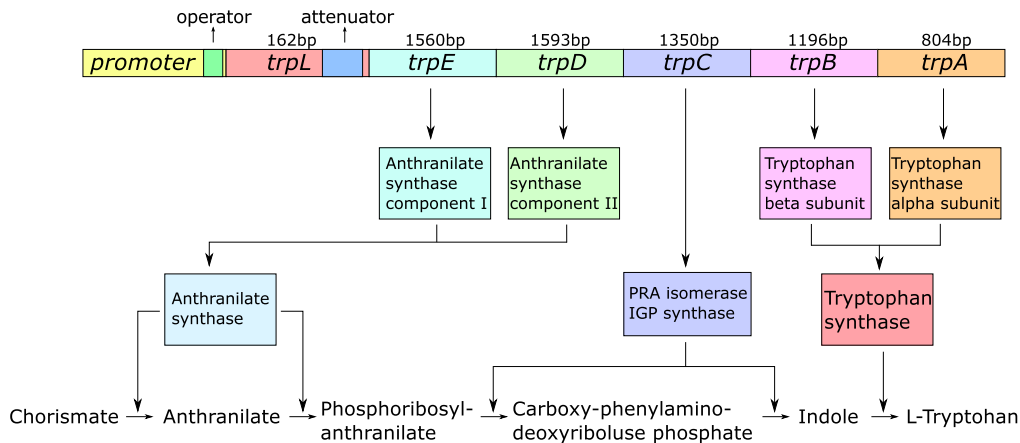


Figura 1: Esquema del operón *trp* y de la ruta de biosíntesis del triptófano.

2. Ruta metabólica para la biosíntesis del L-Triptófano

Las bacterias utilizan operones, conjuntos de genes regulados por el mismo promotor, para expresar conjuntamente las enzimas requeridas para la producción de metabolitos. Una de las rutas metabólicas más estudiadas es la de la biosíntesis del aminoácido L-triptófano en la bacteria *E. coli*. A continuación se describen varios motivos que condujeron a su selección para nuestro estudio:

1. Es una de las rutas más estudiadas, tanto experimentalmente [21] como matemáticamente [3].
2. Incluye 3 bucles con realimentación negativa (ver Sección 3). Esto sugiere que la regulación es un elemento importante en los operones.

3. Biología y regulación

El operón *trp* codifica las enzimas necesarias para catalizar las etapas que conforman la la ruta metabólica de la biosíntesis del triptófano (Fig. 1).

El operón *Trp* incluye cinco genes (*trpE*, *trpD*, *trpC*, *trpB* y *trpA*), que son transcritos en conjunto de izquierda (*trpE*) a derecha (*trpA*). Esta organización asegura que las enzimas que son necesarias al principio de la ruta se expresan primero. La transcripción del operón está controlada por dos bucles de realimentación negativa: represión y atenuación. Además, un tercer bucle regula en forma de inhibición alostérica de la enzima. Estos tres bucles se observan en la Fig. 2.

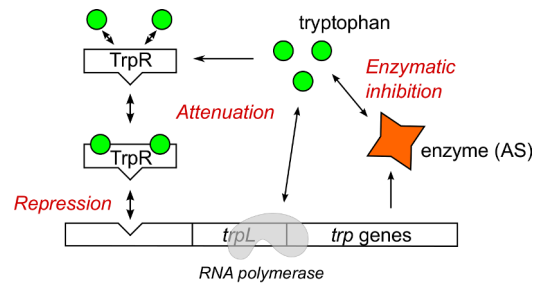


Figura 2: Mecanismos de control en el operón *trp*.

3.1. Represión de la transcripción

La represión a nivel de transcripción, se produce en el caso del operón *Trp* a través de la proteína *TrpR*, que funciona como factor de transcripción cuando se dimeriza. La proteína *TrpP* es codificada por el gen *trpR*, que no se encuentra adyacente al operón, sino en otro lado y controlado por un promotor moderado, pero autorregulado por la proteína *TrpR* [8]. Cuando en la célula hay

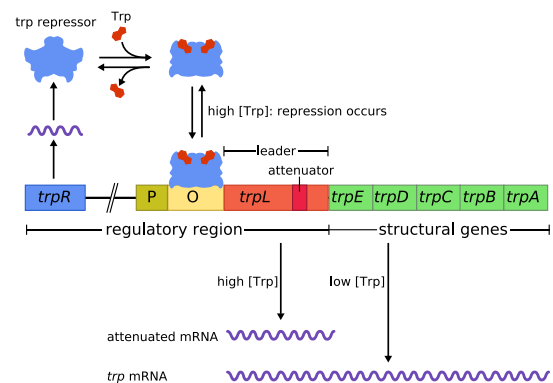


Figura 3: Mecanismo de represión en el operón *trp*.

triptófano en concentraciones bajas, la proteína TrpR se encuentra en su forma inactiva y no se puede unir al sitio operador del promotor del operón *trp* (ver Fig. 3). Así, se permite a la RNA polimerasa iniciar la transcripción de los genes del operón, incrementando el nivel de concentración de las enzimas que participan en la ruta metabólica de síntesis del triptófano, elevando a su vez, el nivel de triptófano en la célula. Cuando el nivel de triptófano es suficiente, el exceso de triptófano se une cooperativamente al represor TrpR (necesitándose 2 moléculas de triptófano por represor) permitiendo que el represor activado se una de forma no-cooperativa al operador y así inhibiendo la transcripción de los genes, lo que a su vez contribuye a disminuir el nivel de producción de triptófano [13].

Este mecanismo regula el operón *trp* permitiendo un cambio del orden de 100 veces en su nivel de expresión [22] y depende de la concentración intracelular del triptófano [15].

Alternativas de la Biología Sintética Para regular la expresión del operón utilizado un bucle con realimentación negativa, se puede incorporar una proteína represora que sea expresada por alguno de los genes del operón. La proteína en cuestión debe reconocer una secuencia en el promotor del operón (llamada región del operador) determinando la especificidad de la represión. Esto es, para generar una realimentación negativa, se debe elegir un tandem específico promotor - gen. Si bien en la naturaleza existen varios represores bien caracterizados (como por ejemplo el represor LacI y el correspondiente promotor pLac [2]), no son demasiados. Esta limitación puede resolverse con el uso de los efectores *Transcriptional Activator Like* (Efectores TAL o TALE).

Los Efectores TAL fueron descubiertos en 2009 en las bacterias *Xanthomonas* que los utilizan cuando infectan ciertas especies de plantas [11]. El propósito de estas proteínas es modular la transcripción en las plantas huéspedes para promover la infección bacteriana, siendo su principal característica el dominio central donde se repiten 34 aminoácidos iguales.

Este dominio central es capaz de reconocer y unirse a una secuencia específica de ADN, basándose en la identidad crítica de dos aminoácidos en cada una de las repeticiones. Como existe una relación conocida entre estos aminoácidos y las secuencias de nucleótidos que reconocen (ver Fig. 4), estas proteínas se pueden utilizar fácilmente para diseñar unirse a regiones deseadas del DNA y así convertirse en efectores TAL. Asimismo estas proteínas pueden diseñarse para funcionar como represores y dar lugar a un bucle de reali-

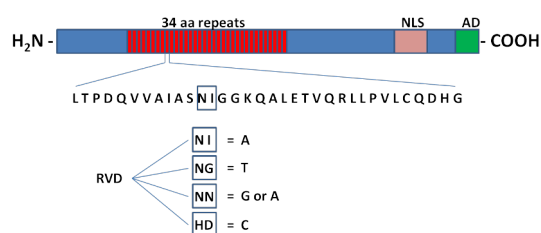


Figura 4: Esquema de un efector TAL. Los aminoácidos NI repetidos en el dominio central reconocen al nucleótido Adenina.

mentación negativa. Sin embargo, el uso general de factores de transcripción (ya sean naturales o diseñados sintéticamente como los TALEs) tienen una desventaja con respecto al control presente en el operón *trp*: La realimentación se produce desde la enzima y no del metabolito en cuestión.

3.1.1. Atenuación

La atenuación transcripcional por otro lado, es un mecanismo para la terminación prematura de la transcripción, basada en el acoplamiento entre transcripción y traducción en procariotas. Este proceso fue descubierto en operones similares de *E. coli* y otros procariotas [13] y consiste en una secuencia corta, ubicada entre el promotor y los genes estructurales del promotor (en la UTR 5').

En el operón *trp*, esta secuencia es de 162bp de largo y es una región que se encuentra liderando a los genes del operón *trpL* (ver Fig. 1) [21]. Esta región contiene cuatro secuencias numeradas del 1 al 4 de izquierda a derecha. Cada una de estas secuencias es parcialmente complementaria a la siguiente, con lo cual una vez transcritas, el ARN se pueden plegar en tres diferentes estructuras secundarias (horquillas) 1-2, 2-3, y 3-4. Sin embargo, el ARN transcripto solamente puede adoptar dos conformaciones: la conformación terminador y la anti-terminador:

- **Terminador** - este caso sucede cuando se forma la estructura 3-4 y solo puede suceder cuando la secuencia 3 no está apareada con la 2, es decir, la secuencia dos debe estar apareada con la 1, o bien secuestrada por un ribosoma.
- **Anti-terminador** - este caso sucede cuando la estructura 3-4 no se forma, formándose así el complejo 2-3. A su vez esto solo puede suceder cuando la secuencia 2 se encuentra disponible por no formar parte del complejo 1-2.

La conformación final depende de la concentración intracelular de triptófano. El mecanismo por el

cual la atenuación regula la transcripción se muestra en la figura 5. En primer lugar, RNAP comienza con la transcripción de la región líder con las secuencias 1 y 2. Casi inmediatamente después de que se transcribe esta secuencia, los ribosomas se unen al ARN y comienza con la traducción. Si la concentración de triptófano es baja, el ribosoma se para en la secuencia 1 que tiene dos codones consecutivos de Trp. Este bloqueo de la formación de complejo de 1-2 permite la formación de la conformación anti-terminación (Fig. 5b).

De lo contrario, si la concentración de triptófano es alta, la secuencia 2 es secuestrada en lugar de la secuencia de 1, por lo que la conformación terminador se puede formar (Fig. 5a), lo que no permite la transcripción de los genes restantes del operón. Este mecanismo regula la expresión del operón *trp* en un intervalo de 6 a 8 veces [22].

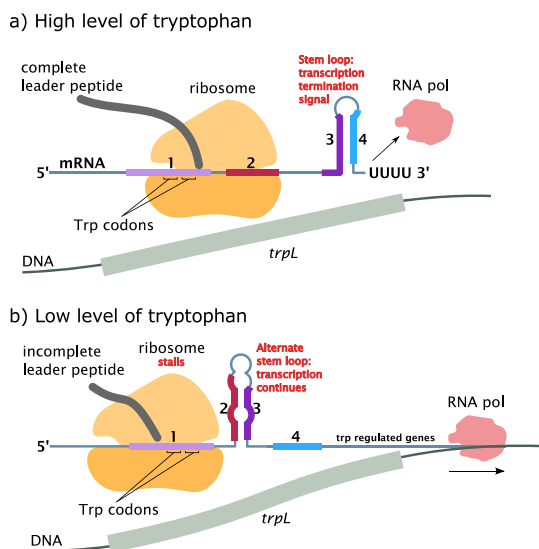


Figura 5: Mecanismo de atenuación presente en el operón *trp*.

Alternativas de la Biología Sintética La alternativa de la biología sintética para los atenuadores son los *riboswitches* transcripcionales. Según [12], los *riboswitches* transcripcionales pueden ser considerados como una clase especial de atenuadores, aunque algunos autores consideran a los *riboswitches* como un grupo separado. La principal diferencia entre atenuadores y *riboswitches* es en el elemento de detección de ARN. En los atenuadores, esta parte es un elemento general de la detección de una variedad de entradas (por ejemplo, proteínas, temperatura), mientras que en *riboswitches*, esta parte se llama *aptámero* y es a la que se unen diferentes moléculas pequeñas (llamadas *ligandos*). Después

de la parte del *aptámero*, el *riboswitch* consiste en una plataforma de expresión que realiza una acción específica cuando se le une un *ligando* (Ver Fig. 6). Esta acción puede ser la formación de un *terminador* o la formación de un *anti-terminador* que permite la transcripción de los genes aguas abajo.

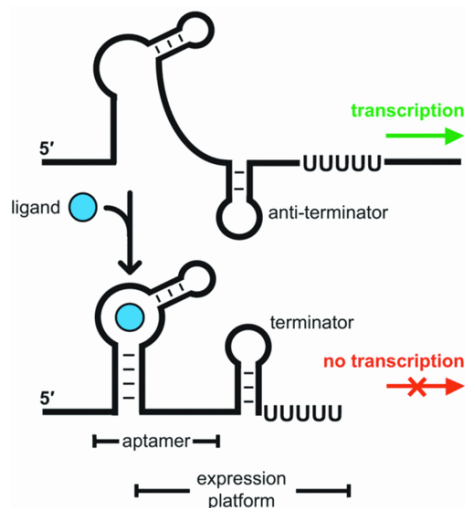


Figura 6: Mecanismo de los *riboswitches* transcripcionales. En este caso, un *ligando* se une al *aptámero* y se forma *terminador*, por lo tanto la transcripción se detiene [9].

El descubrimiento y caracterización de estos elementos reguladores basados en ARN se produjo en 2002, cuando se publicó el primer estudio exhaustivo [19]. Desde entonces, muchos *riboswitches* naturales fueron descubiertos y una gran cantidad de trabajo se ha hecho en el estudio de su mecanismo.

El problema de ingeniería *riboswitches* sintéticos puede ser generalmente dividido en dos partes separadas:

1. **Diseño del Aptámero** prácticamente todos los métodos para la obtención de un nuevo *aptámero* se basan en un método llamado SELEX (evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial). Este método consiste en la generación de un gran número de secuencias de ARN aleatorias (hasta 10^{14}), y su mezcla con *ligandos* diana inmovilizados. Después del lavado, las secuencias unidas se eluyen, son amplificadas por PCR¹ Y se someten a más rondas de este proceso de selección. Después de cada iteración se encuentran

¹reacción de polimerasa en cadena.

aptámeros con mayor afinidad (capacidad de enlazado con el ligando) [20].

2. Diseño de la plataforma de expresión - implica el diseño de una secuencia de ARN, que altere su estructura secundaria cuando un ligando se une al aptámero. Por lo tanto esta secuencia se puede dividir en dos partes - módulo que realiza el cambio deseado en su estructura secundaria, y del módulo de comunicación, que sirve como una interconexión entre un aptámero y este módulo[16].

Por desgracia, hay algunas limitaciones en el diseño de nuevos riboswitches. En primer lugar, los aptámeros obtenidos por el procedimiento SELEX son aptámeros que funcionan *in vitro*. Sin embargo, a menudo presentan una reducida funcionalidad *in vivo*, debido principalmente a una concentración diferente de iones *Mg*. Además, se ha conseguido poco éxito en el diseño de plataformas de expresión para riboswitches transcripcionales, debido a interacciones más complicadas entre la molécula de ARN producido. Sin embargo, esta situación ha comenzado a cambiar, ya que en 2013 algunos autores reportaron diseño *de novo* de riboswitches sintéticos que regula la terminación de la transcripción [17],[5].

3.1.2. Inhibición enzimática

El tercer mecanismo de regulación en la biosíntesis de triptófano no influye en el proceso de la transcripción de las enzimas implicadas, sino que se dirige a su actividad, específicamente la actividad de la sintetasa de antranilato (AS), un heterotetrámero formado por dos TrpE y dos polipéptidos TrpD [15]. Esta enzima cataliza la primera etapa de la vía que conduce a la producción de triptófano. Si la concentración de triptófano es alta, se une a la AS, causando la inhibición alostérica de su actividad y por lo tanto disminuyendo su producción.

Alternativas de la Biología Sintética
Aunque se están realizando avances significativos en el campo de la ingeniería de proteínas todos los años, en el conocimiento del autor, no existen métodos que permitan el diseño de nuevas enzimas, o rediseño racional de las enzimas existentes (con el fin de introducir este tipo de inhibición). El estado actual de la ingeniería de proteínas en la biología sintética implica incremento de la actividad, la alteración de la especificidad de proteínas y la modificación de los elementos reguladores de proteínas (principalmente eliminación de la inhibición alostérica destruyendo el sitio específico mediante mutagénesis dirigida [4] o por evolución dirigida) [7].

4. Control en traducción como alternativa a la regulación de la transcripción

Uno de los mecanismos de regulación utilizado en la biología sintética que no está implicado en la regulación de operón *trp* son los riboswitches. Este mecanismo funciona en un nivel de traducción.

Los riboswitches de traducción se basan en el mismo principio que los riboswitches para control de la transcripción. También tienen un aptámero y una plataforma de expresión (véase la Sección 3.1.1), que cambia su conformación con la unión del ligando. La diferencia es que riboswitches de traslación sólo secuestran o liberan al sitio RBS en el ARNm, utilizando generalmente emparejamiento simple (ver Fig. 7).

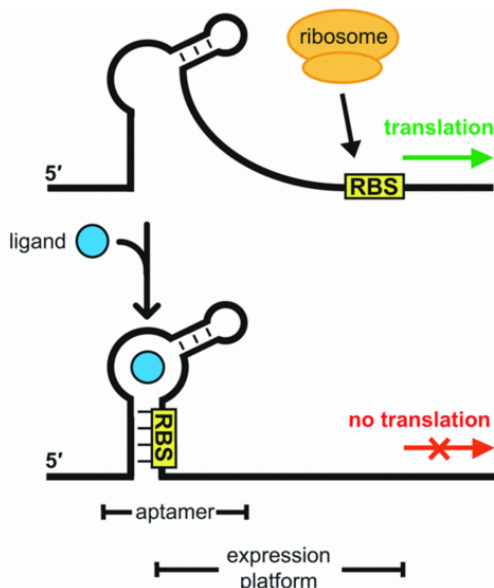


Figura 7: Mecanismo de los riboswitches traducionales. En este caso, luego de la unión del ligando al aptamero, el sitio del RBS es secuestrado, por tanto, el ribosoma no puede unirse y empezar la traducción. Imagen original tomada de [9].

Dado que no se forman estructuras secundarias complejas, el diseño de estos elementos es más simple que el de los riboswitches transcripcionales [17], [10], y muchos riboswitches artificiales han sido diseñados [16]. Desventaja de su uso en el control de la expresión de genes en operones es que una molécula de ARNm completo se produce siempre. Esta producción genera una carga innecesaria para la célula.

Una desventaja es que un riboswitch de traducción sólo puede regular la traducción de los

genes a continuación de un solo RBS (véase la fig. 8). Esta regulación es plausible para operones como el operón *trp*, donde un solo RBS controla todos los genes mediante la superposición de codones (último nucleótido del codón de parada es también el primer nucleótido del codón de inicio (ver fig. 8) y [14]). La mayoría de los operones existentes, sin embargo, son controlados por múltiples RBS, uno para cada gen [18].

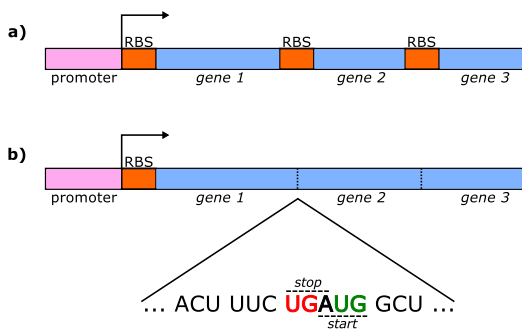


Figura 8: a) Estructura común del operón - cada gen tiene su propio RBS. b) operón con una sola RBS para todos los genes (ejemplo de ello es el operón *trp*). En este caso, un ribosoma puede traducir todos los genes a la vez sin salir del ARNm. Cuando el ribosoma encuentra el codón de parada, también detecta codón de inicio del próximo gen.

5. Discusión: Posible implementación de un control sintético de ruta metabólica

Utilizando la alternativas propuesta en la sección anterior, se analizan las diferencias entre las diferentes entradas del controlador, es decir si se realimenta información de las enzimas, de los metabolitos o de ambos. A continuación se propone un modelo simple:

$$\frac{dM}{dt} = k_1 C_1(E) - (k_{d2} + \mu)M, \quad (1)$$

$$\frac{dE}{dt} = k_3 C_2(P)M - \mu E, \quad (2)$$

$$\frac{dP}{dt} = k_4 E - \mu P. \quad (3)$$

Estas ecuaciones se refieren a la transcripción de ARNm (M) a partir del operón (1) y la producción de una enzima (E) (2) que cataliza la formación de

un producto/metabolito (P) (3). Los valores por defecto para todos los parámetros se tomaron del modelo del operón *trp* y se pueden encontrar en el Tabla 1. Funciones $C_1(E)$ y $C_2(P)$ se define como

$$C_1(E) = \frac{K_1^{n_1}}{K_1^{n_1} + E^{n_1}}, \quad (4)$$

$$C_2(P) = \frac{K_p}{K_p + P}. \quad (5)$$

La función C_1 incorpora el efecto de la represión genética de la enzima producida, la función C_2 incorpora el efecto de la represión de traducción desde un riboswitch (por lo tanto la entrada del controlador C_2 es la concentración de metabolitos, mientras que la entrada del regulador a C_1 es la concentración de la enzima). Los parámetros k_1 y n_1 fueron nuevamente tomados de la Tabla 1, mientras que el parámetro K_p se fijó a $10\mu\text{M}$. Tres diseños diferentes se compararon utilizando los controladores individuales C_1 , C_2 , y su combinación.

En esta comparación (Fig. 9), el parámetro k_1 en el modelo con el controlador C_1 se redujo a $k_1 = 3 \text{ min}^{-1}$. Para otros dos modelos, parámetros k_1 y k_3 estaban sintonizados con el fin de obtener el mismo nivel de estado estable del metabolito. Estos parámetros fueron escogidos porque son sintonizables fácilmente en sistemas reales (promotor y RBS fuerza). EL tiempo de simulación fue de 3 horas. En el momento $t = 70\text{min}$, después de todos los modelos llegan a su estado de equilibrio, el parámetro k_4 fue perturbado, incrementándolo dos veces, con una duración de una hora. Esta perturbación puede ser causada en sistemas reales por un aumento repentino de una concentración de sustrato, una adición de un metabolito al medio o por un cambio en la actividad enzimática.

Los tres diseños muestran sobre-pico en el transitorio de los niveles de enzima. Ante la perturbación en el parámetro k_4 , podemos observar que los niveles de la enzima del diseño con riboswitch no han cambiado. Esto es predicho por el modelo, ya que la realimentación rechaza cambios en la concentración de metabolito. El nivel de metabolito para este diseño está en concordancia con este comportamiento: el nuevo estado de equilibrio es tres veces mayor.

Los otros dos diseños tienen una retroalimentación derivada directamente de los niveles de metabolitos. Como puede verse, el diseño único riboswitch supera a la combinada en términos de sensibilidad a la perturbación introducida - Diseño riboswitch muestra el cambio de 1,7 veces en su estado de equilibrio metabolito, el diseño por su parte combinada muestra el cambio de 2,3 veces. Esto se

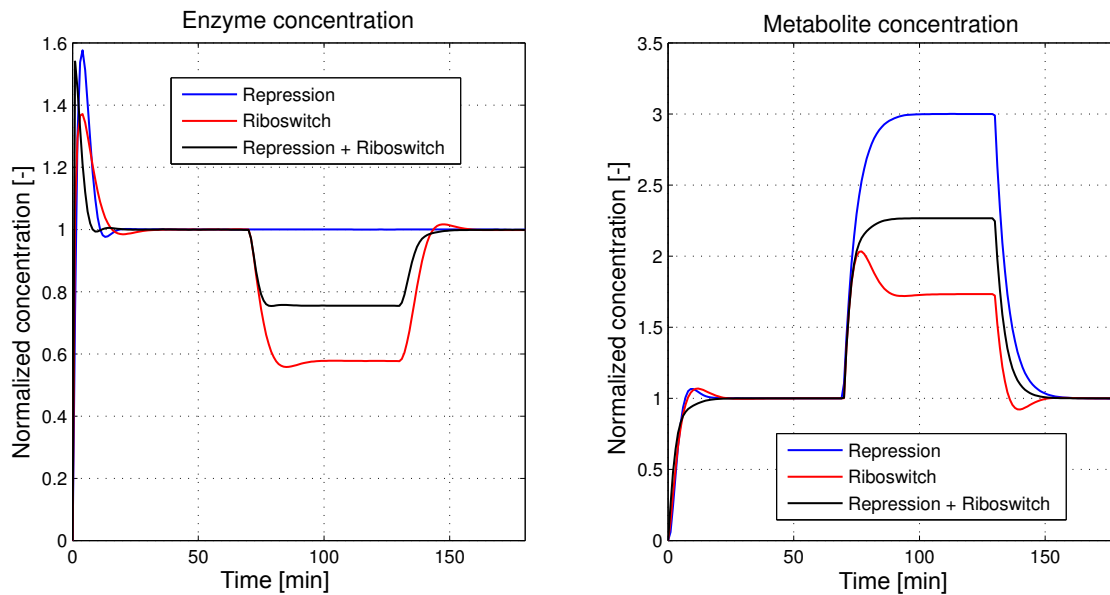


Figura 9: Comparativa de tres diseños sintéticos diferentes para el control de operones. *Represión* es un diseño que utiliza solo el controlador C_1 , el diseño *riboswitch* incluye solo el controlador C_2 y finalmente el diseño *represión + riboswitch* combina ambos controladores.

puede explicar por los respectivos niveles de la enzima - aunque estos niveles se redujeron a la inducción, el diseño combinado a mantener los niveles más altos. Esto es debido al hecho de que en este diseño, cuando se introduce la perturbación, el controlador C_2 actúa para reducir el nivel de los enzimas. Este cambio en la concentración enzimática es observado por el controlador C_1 , que trata de compensar esta pérdida.

Tabla 1: Tendencia de los parámetros optimizados para el circuito sintético de 3 nodos. Los parámetros k_d y d_{Ie} fueron fijados de acuerdo a la naturaleza del modelo.

Parameter	Description	Value
k_1	Free operator synthesis rate	50 min^{-1}
k_2	Transcription rate	5.1 min^{-1}
k_3	Translation rate	20 min^{-1}
k_4	Tryptophan synthesis rate	59 min^{-1}
k_{d1}	Free operator degradation rate	0.5 min^{-1}
k_{d2}	mRNA degradation rate	0.96 min^{-1}
k_{d3}	Enzyme degradation rate	0 min^{-1}
K_1	Repression's dissociation constant	$3.53 \mu\text{M}$
K_2	Attenuation's dissociation constant	$0.04 \mu\text{M}$
K_3	Enzyme inhibition's dissociation constant	$4.1 \mu\text{M}$
n_1	Repression's Hill coefficient	1.92
n_2	Attenuation's Hill coefficient	1.72
n_3	Enzyme inhibition's Hill coefficient	1.2
g	Tryptophan uptake kinetic rate	$25 \mu\text{Mmin}^{-1}$
K_g	Tryptophan uptake's dissociation constant	$0.2 \mu\text{M}$
O_t	Total operator concentration	$0.00332 \mu\text{M}$
μ	Cell growth rate	0.01 min^{-1}
d	Tryptophan adsorption constant	$23.5 \mu\text{Mmin}^{-1}$
e	Parameter in the Trp intake expression	$0.9 \mu\text{M}$
f	Parameter in the Trp intake expression	$380 \mu\text{M}$

6. Conclusión

Para controlar rutas metabólicas se pueden hay distintas opciones, y como se ha visto la biología sintética ofrece varias alternativas a las imple-

mentaciones originales. Algunas de estas alternativas, como el control en traducción como alternativa a la regulación de la transcripción, presentan características interesantes, que pueden ser rescatadas a la hora de buscar una solución de biología sintética a problemas de biotecnología. De este modo la biotecnología a ido avanzando a partir de los nuevas tecnologías que han ido apareciendo, siendo la aplicación de alternativas de biología sintética la ma llamativa, ya que propone un control al nivel genético y molecular de un problema macroscópico como puede ser la optimización de un bioproceso de producción.

En este trabajo se han revisado estas alternativas a partir del análisis de una ruta metabólica modelo como lo es la de biosíntesis del L-triptófano. En la actualidad, en el grupo de colaboración, se esta trabajando en la implementación en circuitos biológicos in vivo de las técnicas presentadas, con vistas de mejorar procesos biotecnológicos y optimizar rutas metabólicas.

Agradecimientos

Agradecemos al Ministerio de Ciencia e Innovación, Gobierno de España (FEDER-CICYT DPI2011-28112-C04-01), el apoyo de la University of West Bohemia en Pilsen y del Dr. Guillermo Rodríguez del CSIC.

Referencias

- [1] First successful laboratory production of human insulin announced. in: *Genentech: Press Releases* [online]. 1978. <http://web.archive.org/web/20080207010024/http://www.808multimedia.com/winnt/kernel.htm>. Accessed: 2014-04-16.
- [2] Laci regulated promoter. in: Registry of standard biological parts [online]. 2003.
- [3] Sharad Bhartiya, Nikhil Chaudhary, KV Venkatesh, and Francis J Doyle. Multiple feedback loop design in the tryptophan regulatory network of escherichia coli suggests a paradigm for robust regulation of processes in series. *Journal of the Royal Society Interface*, 3(8):383–391, 2006.
- [4] Paul Carter. Site-directed mutagenesis. *Biochemical Journal*, 237(1):1, 1986.
- [5] Pablo Ceres, Jeremiah J Trausch, and Robert T Batey. Engineering modular on rna switches using biological components. *Nucleic acids research*, page gkt787, 2013.
- [6] Brent Erickson, Rina Singh, and Paul Winters. Synthetic biology: regulating industry uses of new biotechnologies. *Science*, 333(6047):1254–1256, 2011.
- [7] Jee Loon Foo, Chi Bun Ching, Matthew Wook Chang, and Susanna Su Jan Leong. The imminent role of protein engineering in synthetic biology. *Biotechnology advances*, 30(3):541–549, 2012.
- [8] Richard L Kelley and Charles Yanofsky. Trp aporepressor production is controlled by autogenous regulation and inefficient translation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 79(10):3120–3124, 1982.
- [9] Jane N Kim and Ronald R Breaker. Purine sensing by riboswitches. *Biology of the Cell*, 100(1):1–11, 2008.
- [10] Chang C Liu, Lei Qi, Julius B Lucks, Thomas H Segall-Shapiro, Denise Wang, Vivek K Mutalik, and Adam P Arkin. An adaptor from translational to transcriptional control enables predictable assembly of complex regulation. *Nature methods*, 9(11):1088–1094, 2012.
- [11] Matthew J Moscou and Adam J Bogdanove. A simple cipher governs dna recognition by tal effectors. *Science*, 326(5959):1501–1501, 2009.
- [12] Magali Naville and Daniel Gautheret. Transcription attenuation in bacteria: theme and variations. *Briefings in functional genomics & proteomics*, 8(6):482–492, 2009.
- [13] Lan K Nguyen and Don Kulasiri. On multiple regulatory mechanisms in the tryptophan operon system in escherichia coli: in silico study of perturbation dynamics. *In silico biology*, 8(5):485–510, 2008.
- [14] Daniel S Oppenheim and Charles Yanofsky. Translational coupling during expression of the tryptophan operon of escherichia coli. *Genetics*, 95(4):785–795, 1980.
- [15] Moisés Santillán and Eduardo S Zeron. Dynamic influence of feedback enzyme inhibition and transcription attenuation on the tryptophan operon response to nutritional shifts. *Journal of theoretical biology*, 231(2):287–298, 2004.
- [16] Beatrix Suess, Barbara Fink, Christian Berens, Régis Stentz, and Wolfgang Hillen. A theophylline responsive riboswitch based on helix slipping controls gene expression in vivo. *Nucleic acids research*, 32(4):1610–1614, 2004.
- [17] Manja Wachsmuth, Sven Findeiß, Nadine Weissheimer, Peter F Stadler, and Mario Mörl. De novo design of a synthetic riboswitch that regulates transcription termination. *Nucleic acids research*, 41(4):2541–2551, 2013.
- [18] James D Watson et al. *Molecular biology of the gene*. Benjamin Cummings, San Francisco, 5th edition, 2004.
- [19] Wade C Winkler and Ronald R Breaker. Genetic control by metabolite-binding riboswitches. *ChemBiochem*, 4(10):1024–1032, 2003.
- [20] Alexander Wittmann and Beatrix Suess. Engineered riboswitches: expanding researchers toolbox with synthetic rna regulators. *FEBS letters*, 586(15):2076–2083, 2012.
- [21] Ch Yanofsky, T Platt, IP Crawford, BP Nichols, GE Christie, H Horowitz, M VanCleemput, and AM Wu. The complete nucleotide sequence of the tryptophan operon of escherichia coli. *Nucleic acids research*, 9(24):6647–6668, 1981.
- [22] Charles Yanofsky and Virginia Horn. Role of regulatory features of the trp operon of escherichia coli in mediating a response to a nutritional shift. *Journal of bacteriology*, 156(20):6245–6254, 1994.