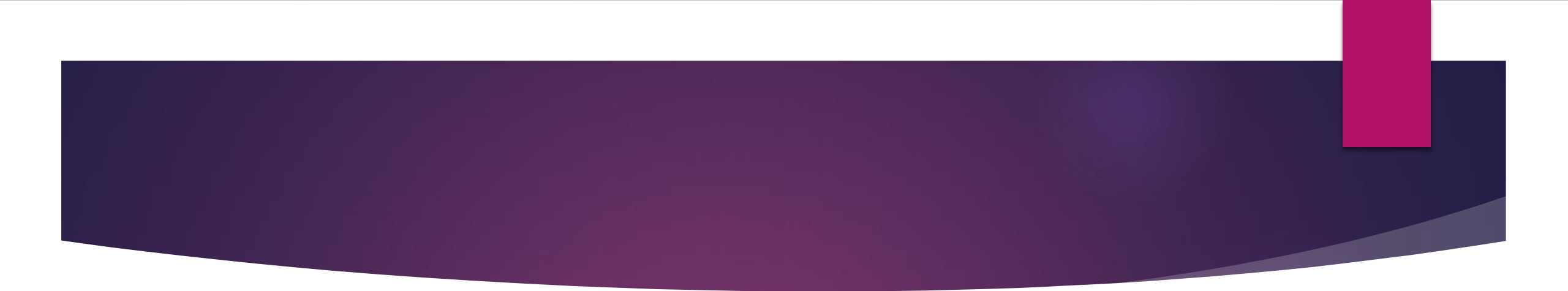


Dinámica de Producción del Sistema DE3 en Diferentes Chasis

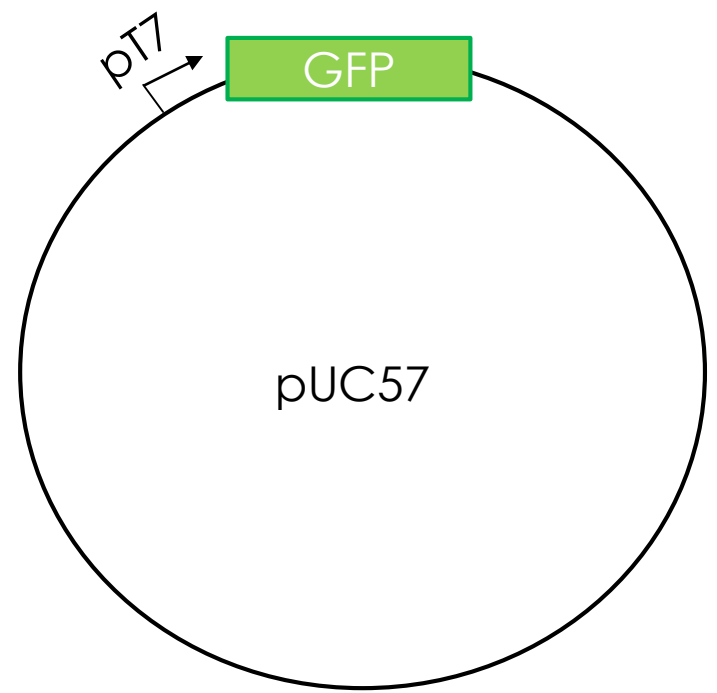
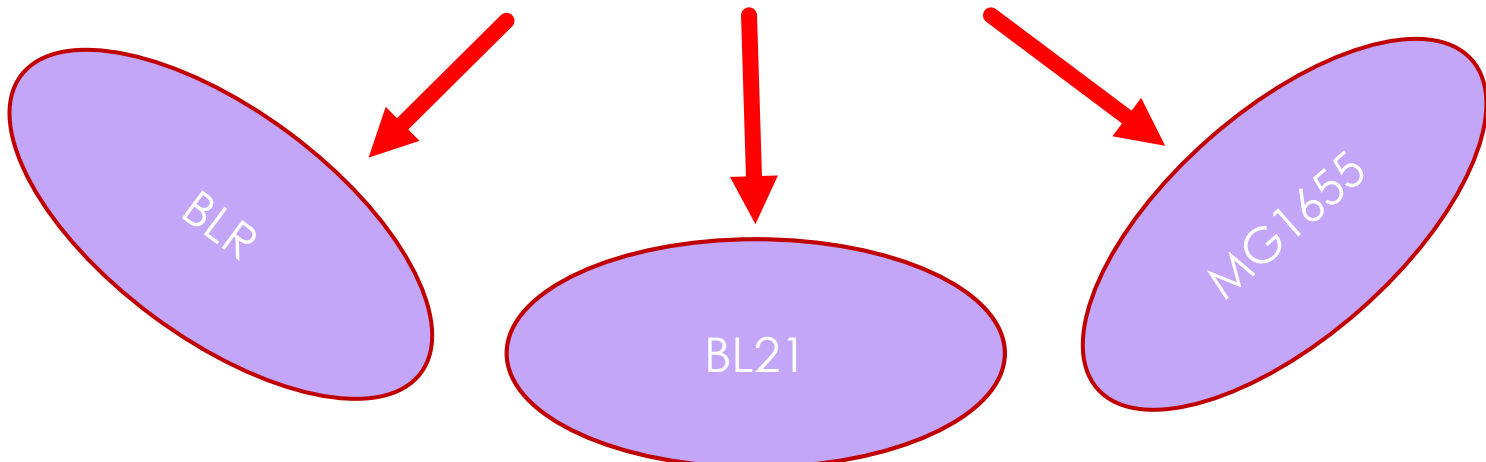
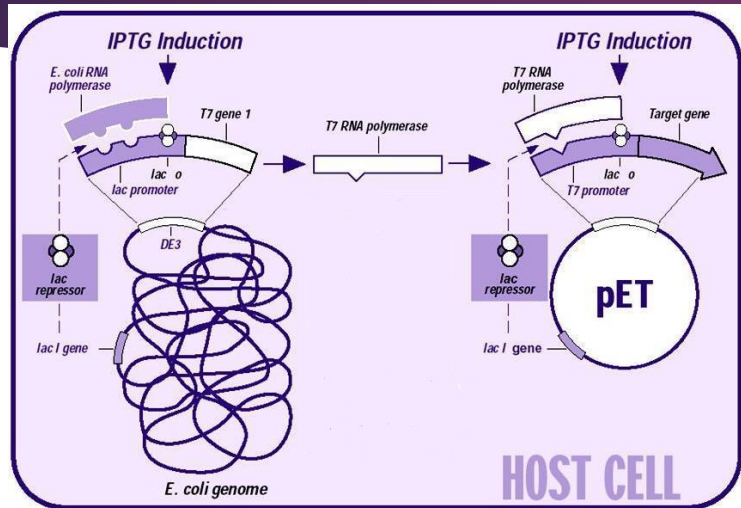
NICOLÁS ARIAS VACCARI

Proteínas recombinantes y carga metabólica

- ▶ La expresión de proteínas recombinantes implica introducir una ruta de consumo de recursos no regulada en un organismo.
- ▶ Se podría entender como un “sumidero” de recursos, no solo de nutrientes sino también de la maquinaria molecular de la célula (carga metabólica).
- ▶ Esta carga metabólica se espera tenga un impacto en la célula sobre todo en la tasa de crecimiento.

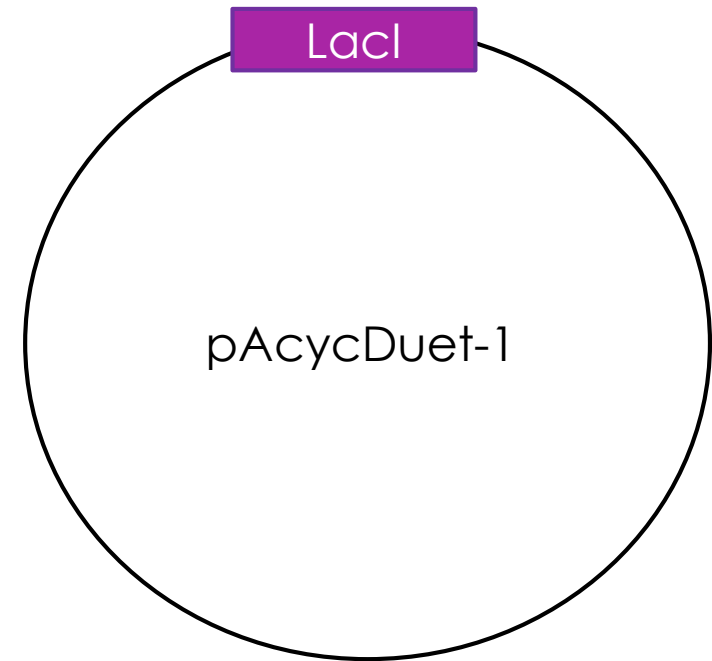
- 
- ▶ Conocer que tan propenso es un organismo a sufrir por la carga metabólica que implica la expresión de proteínas recombinantes ayuda a **seleccionar el chasis para un sistema de producción**
 - ▶ Comprender la dinámica de producción y su impacto en el organismo productor permite evaluar ciertos aspectos del chasis que no son del todo conveniente y **mejorar su rendimiento haciendo modificaciones selectivas.**

Evaluación de sistema DE3 en E. coli

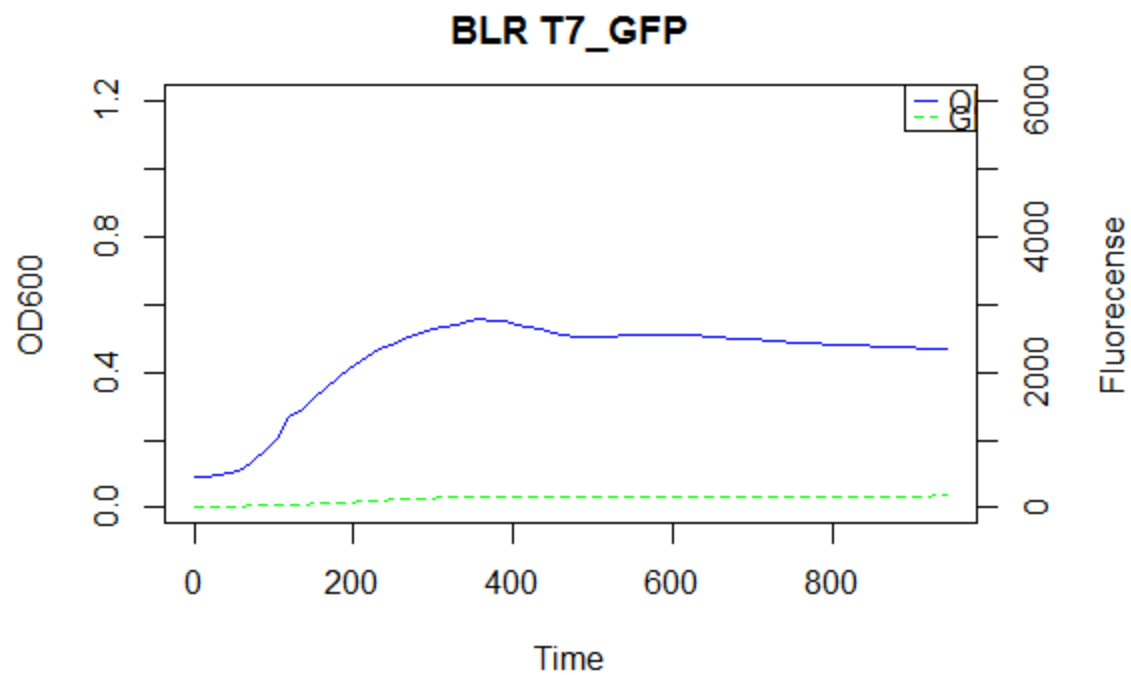


LacI

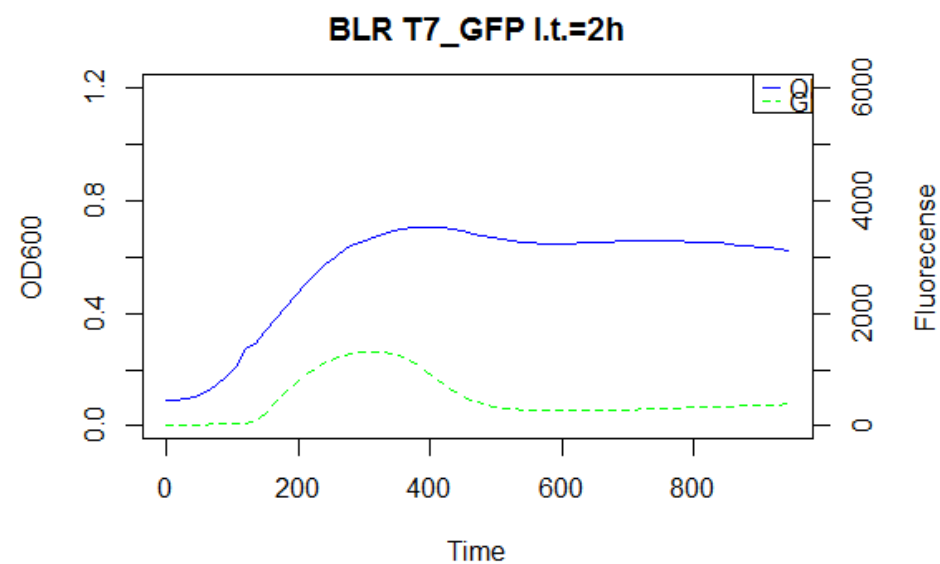
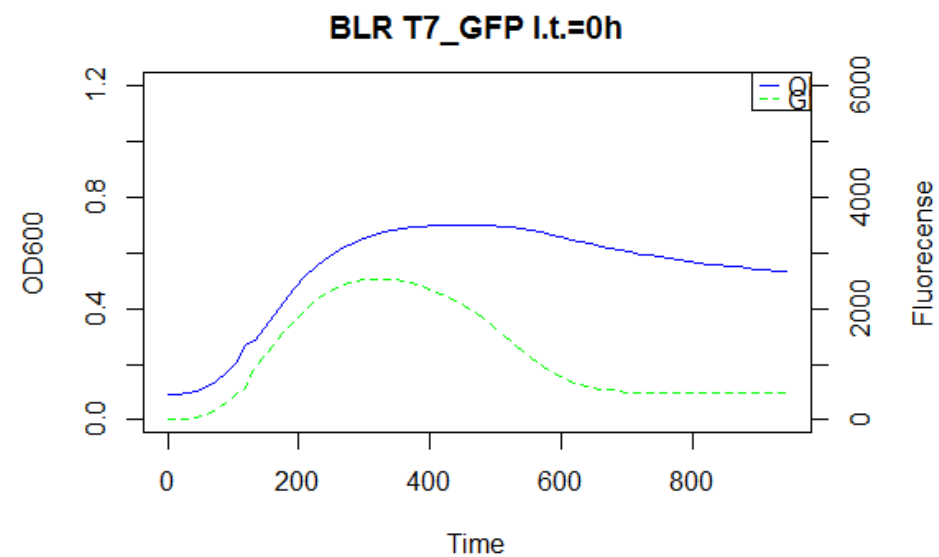
- ▶ Para evaluar el impacto que podría tener la sobreproducción de LacI en la bacteria se introdujo un control con pAcyc



Resultados

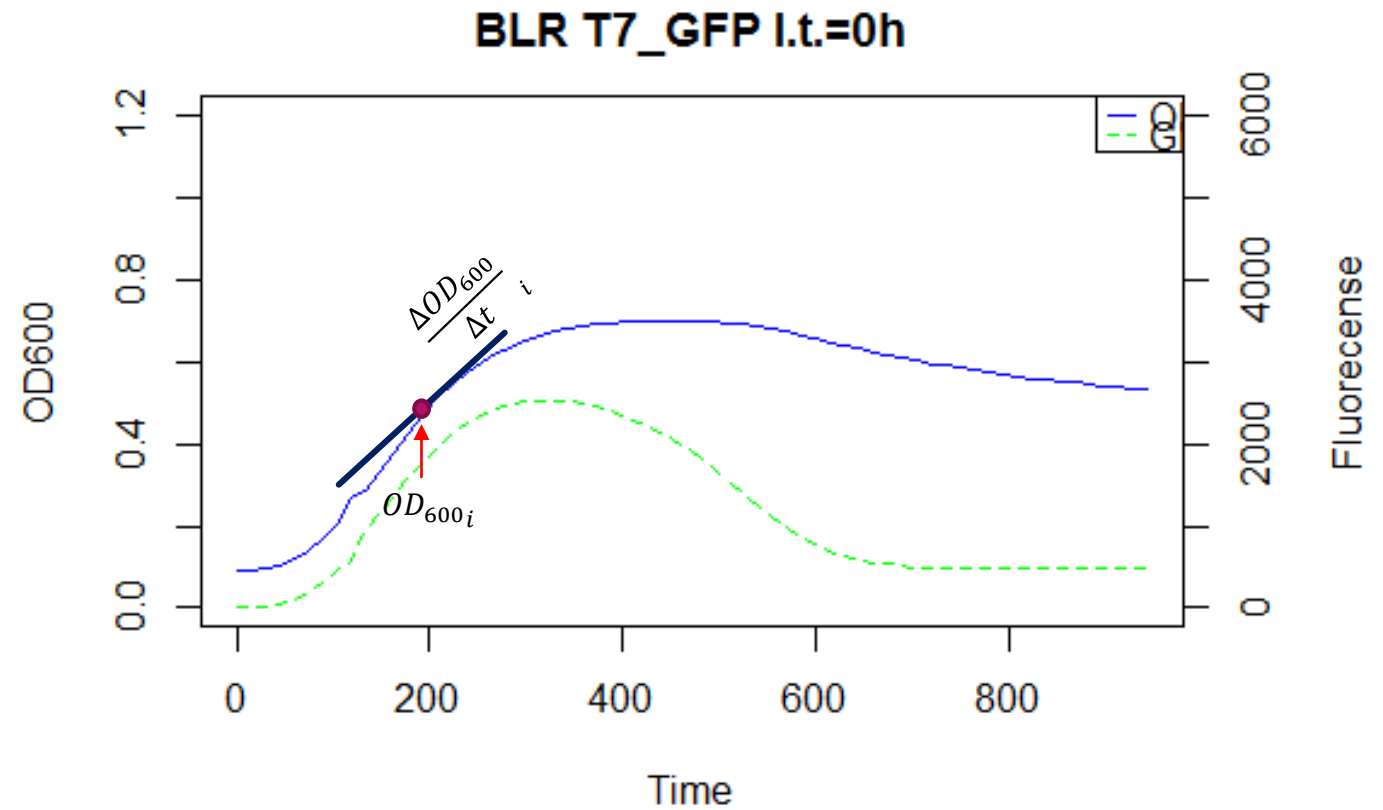


— OD600
- - Fluorescencia



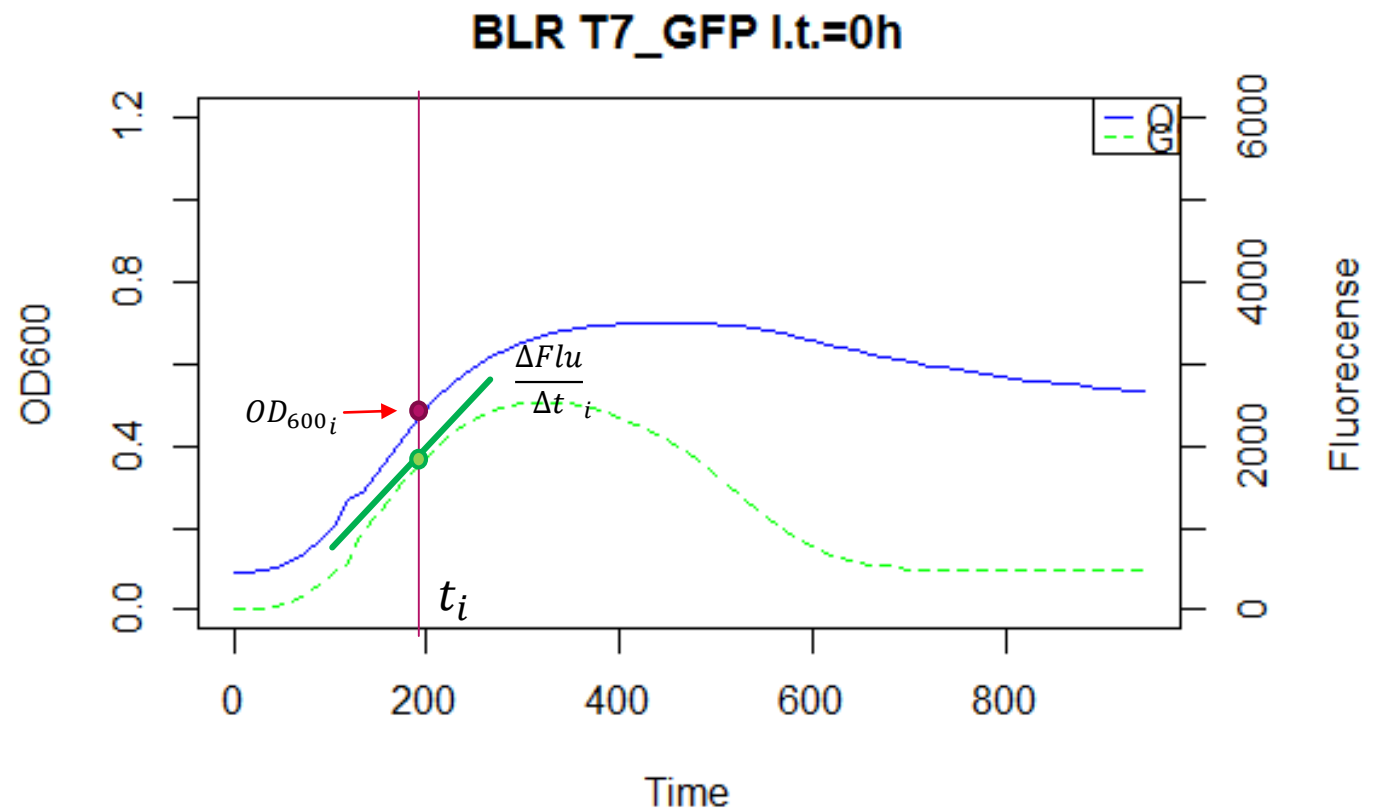
Tasa de crecimiento

$$\frac{\Delta OD_{600}}{\Delta t}_i = \mu_i \cdot OD_{600i} \rightarrow \mu_i = \frac{1}{OD_{600i}} \cdot \frac{\Delta OD_{600}}{\Delta t}_i$$



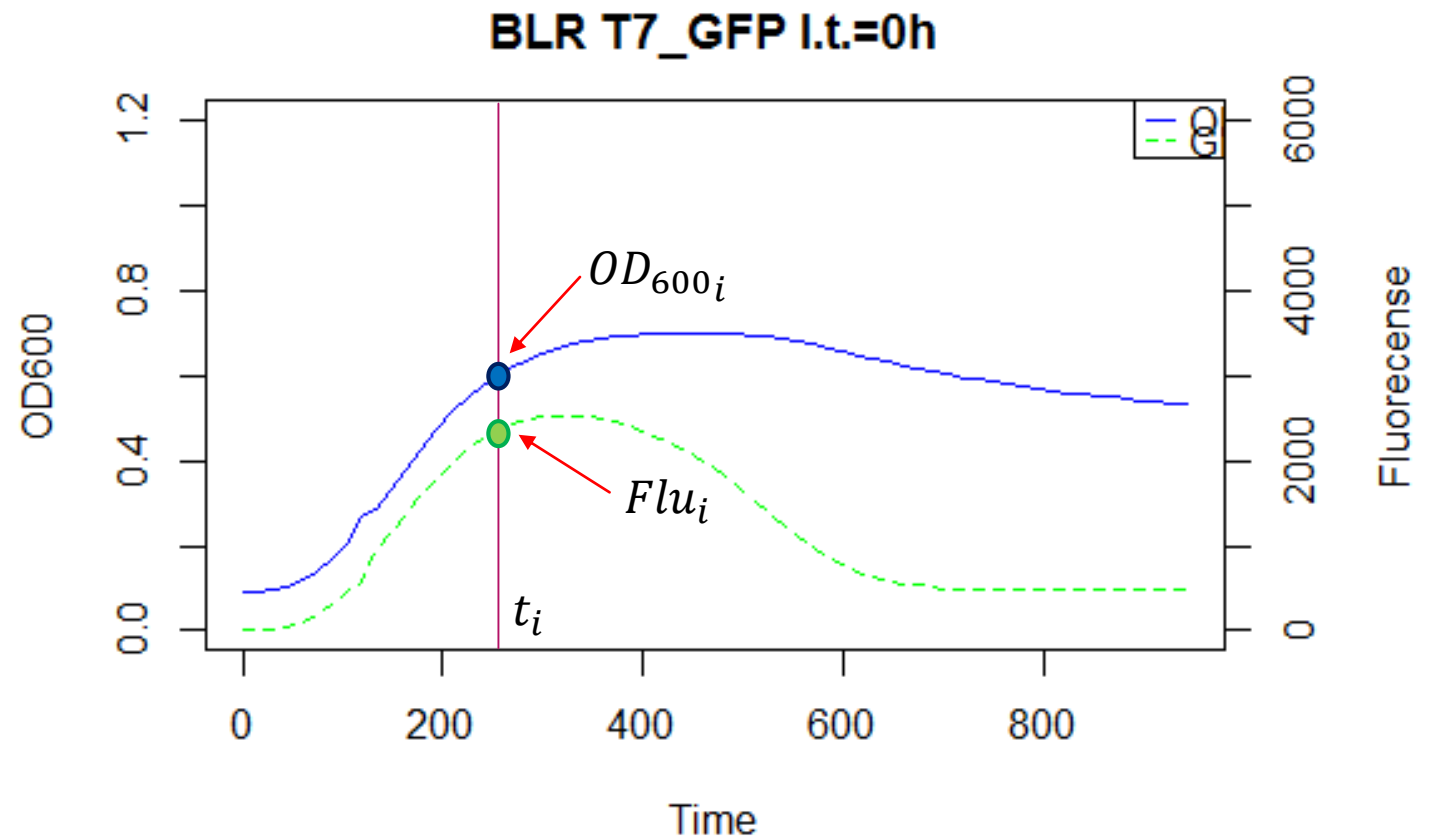
Tasa de producción

$$\frac{\Delta Flu}{\Delta t_i} = \rho_i \cdot OD_{600i} \rightarrow \rho_i = \frac{1}{OD_{600i}} \cdot \frac{\Delta Flu}{\Delta t_i}$$



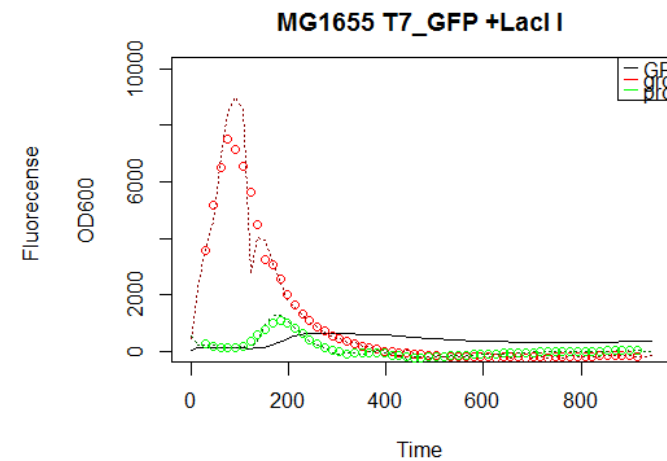
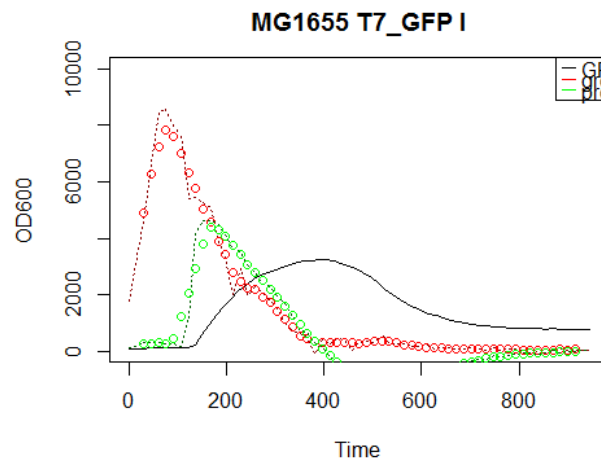
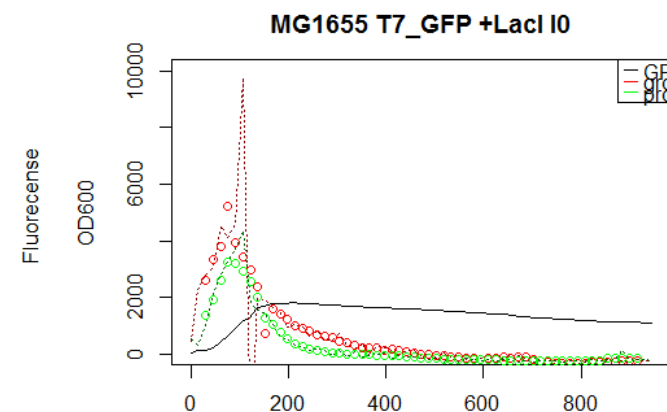
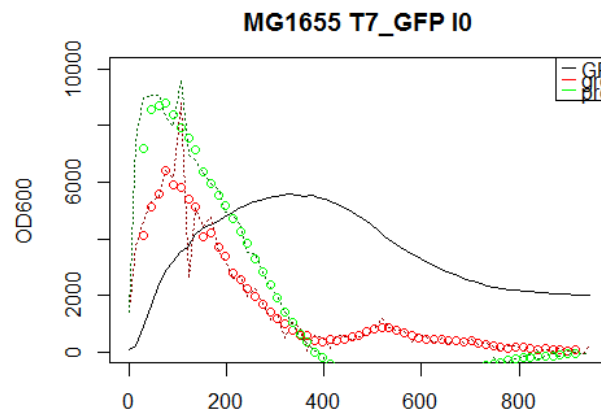
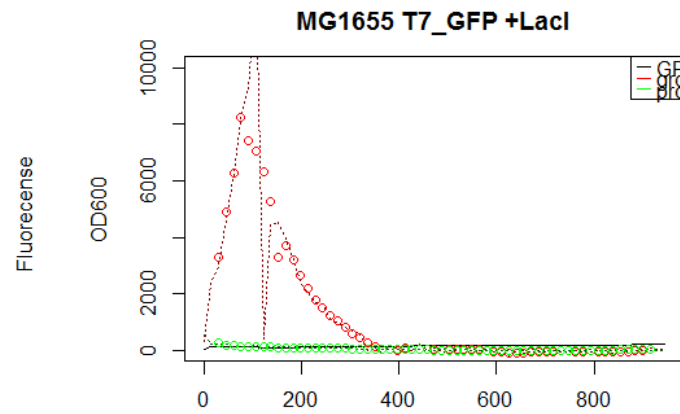
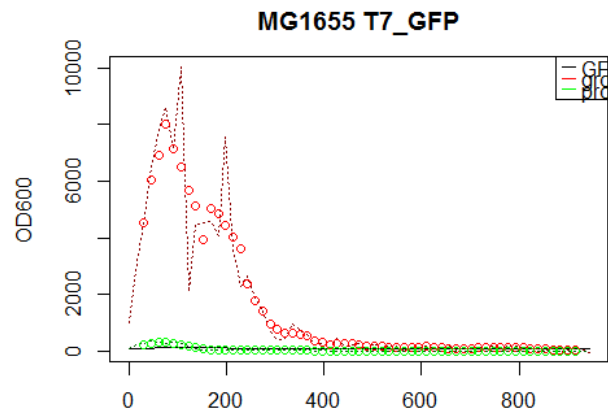
Fluorescencia especifica

$$Flu_{esp} = \frac{Flu_i}{OD_{600i}}$$



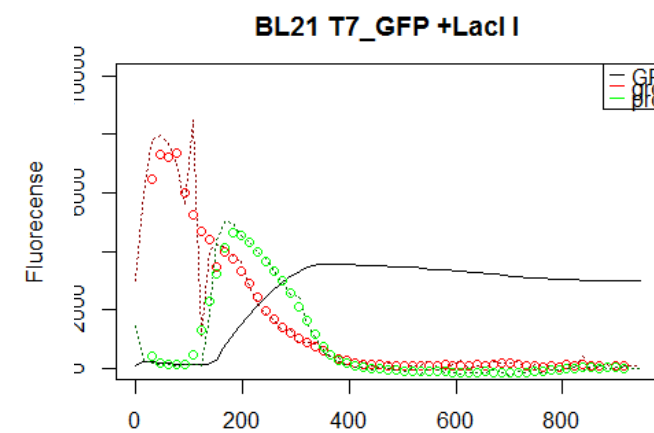
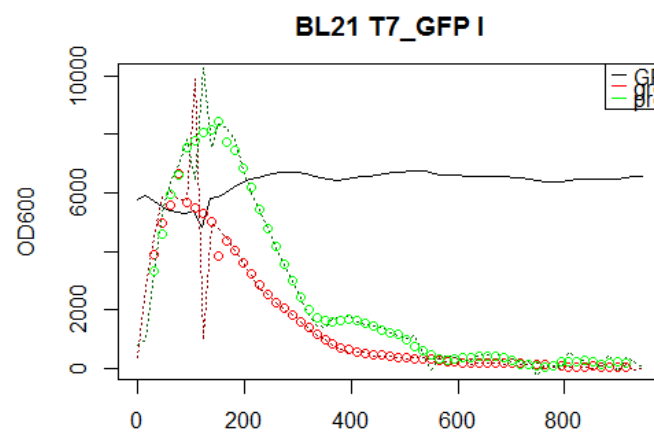
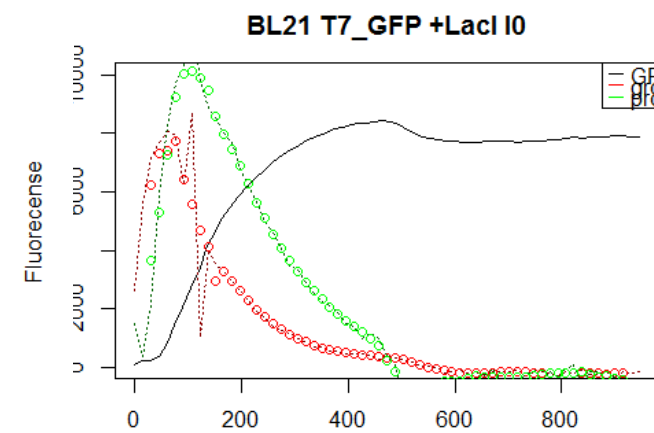
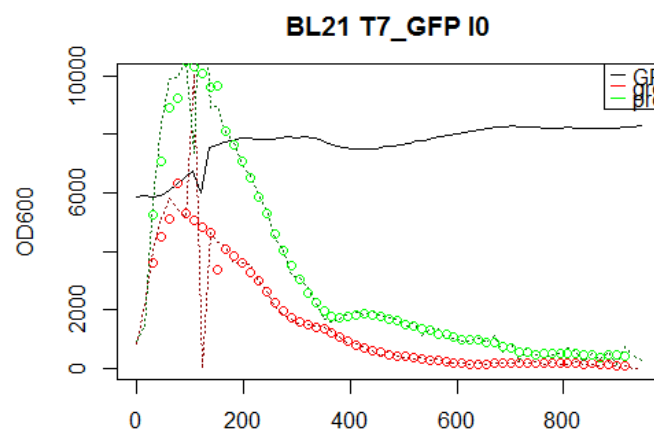
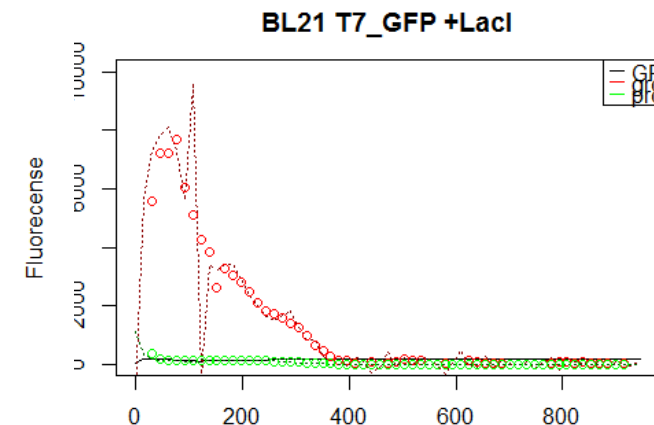
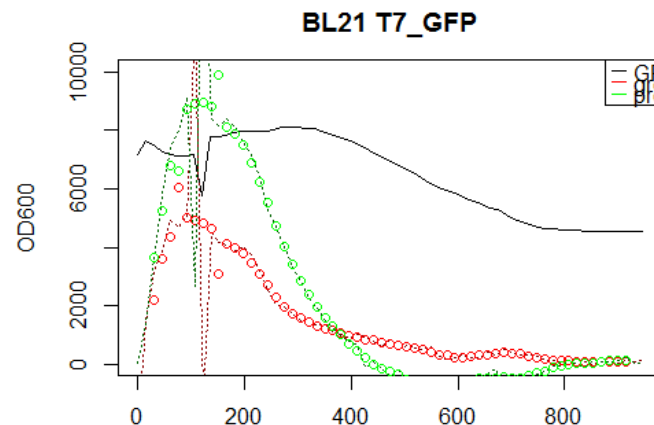
MG1655

- Fluorescencia especifica
- Tasa de crecimiento
- Tasa de producción



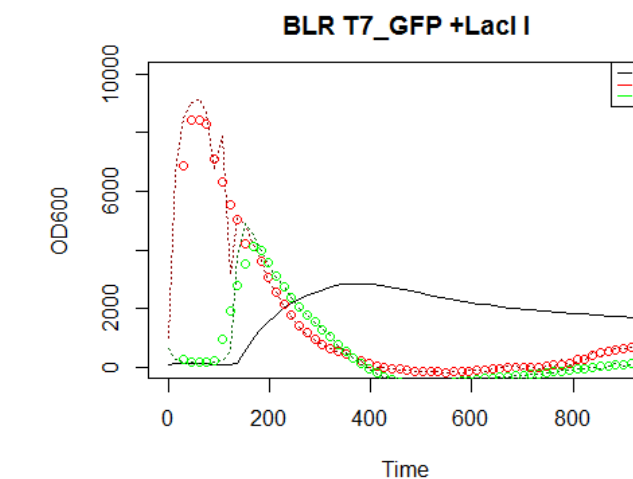
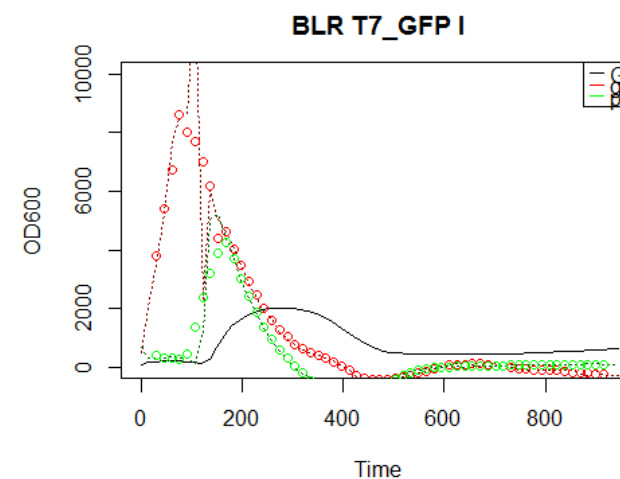
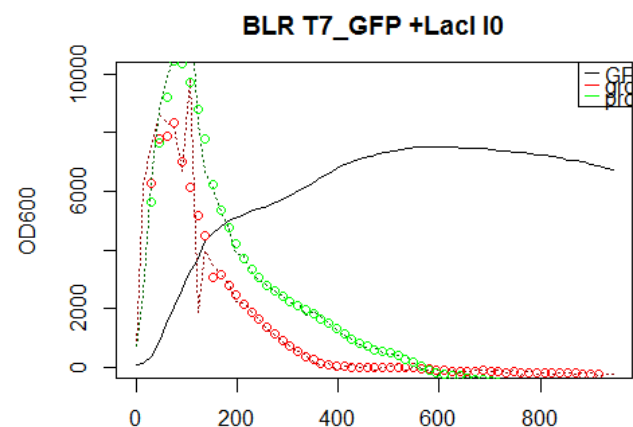
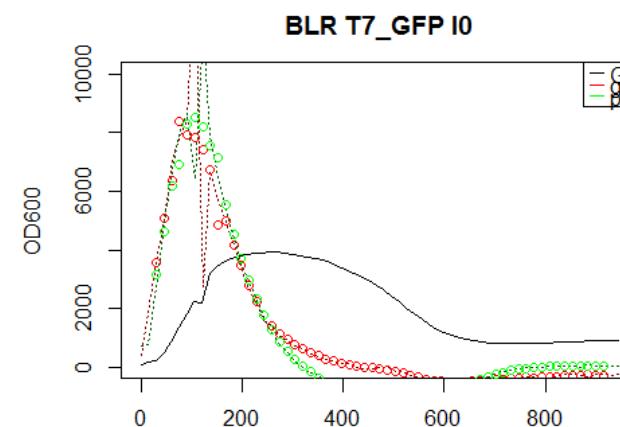
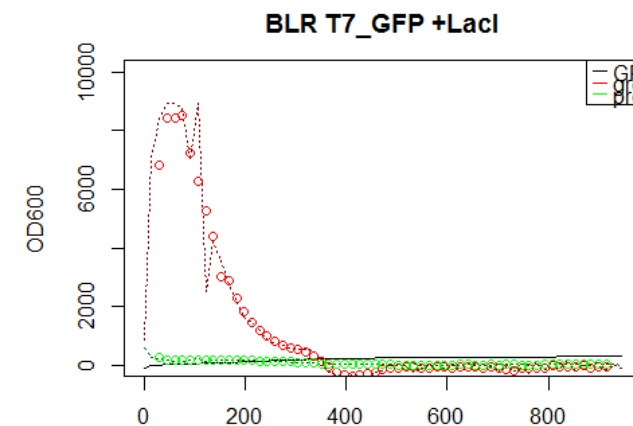
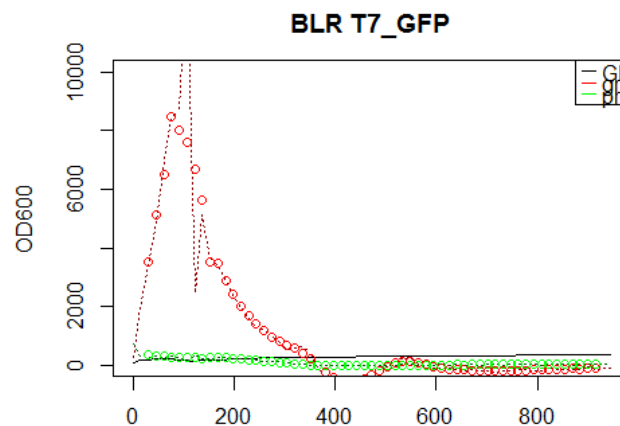
BL21

- Fluorescencia especifica
- Tasa de crecimiento
- Tasa de producción



BLR

- Fluorescencia especifica
- Tasa de crecimiento
- Tasa de producción



Fluorecence

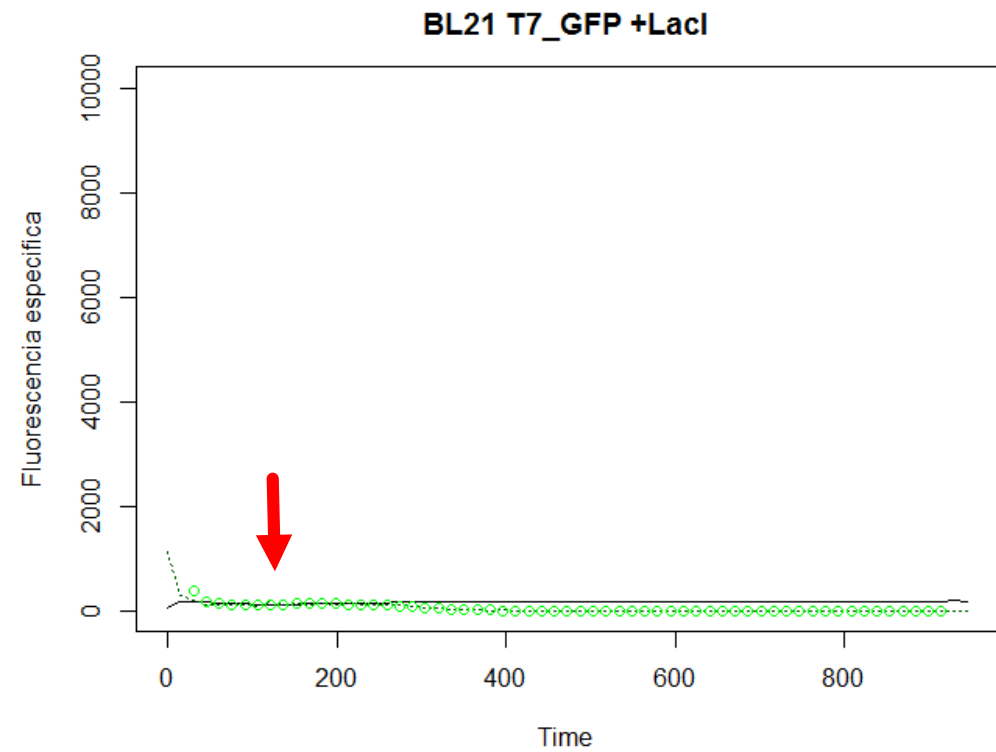
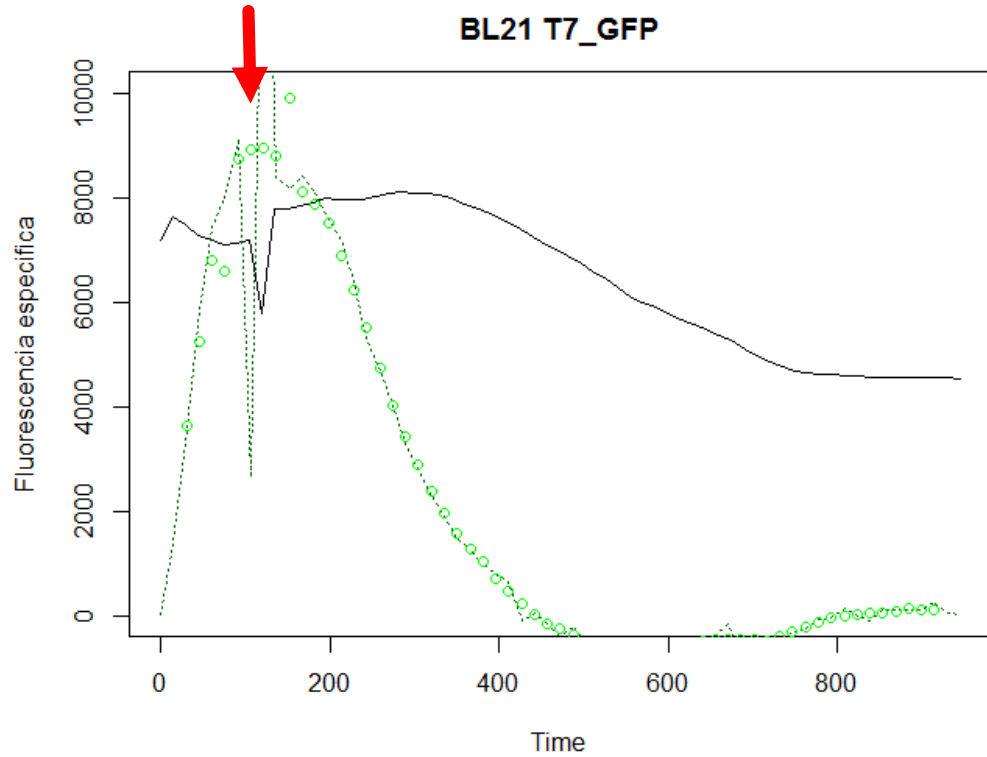
Fluorecence

Fluorecence



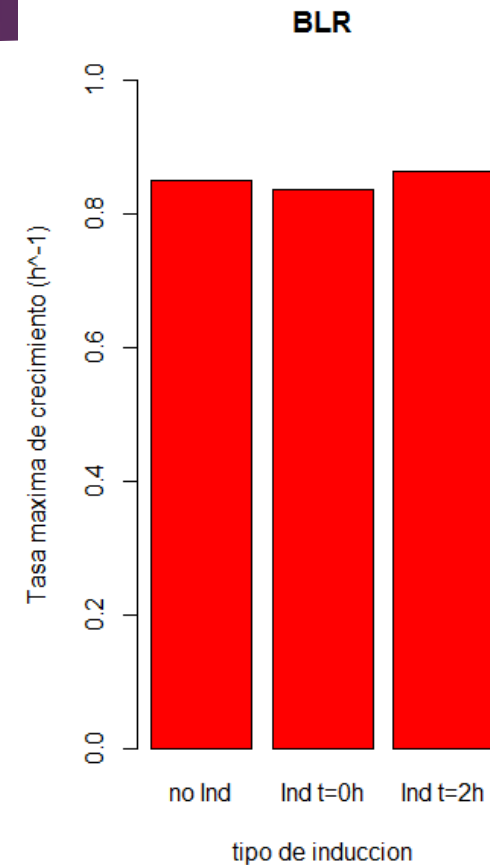
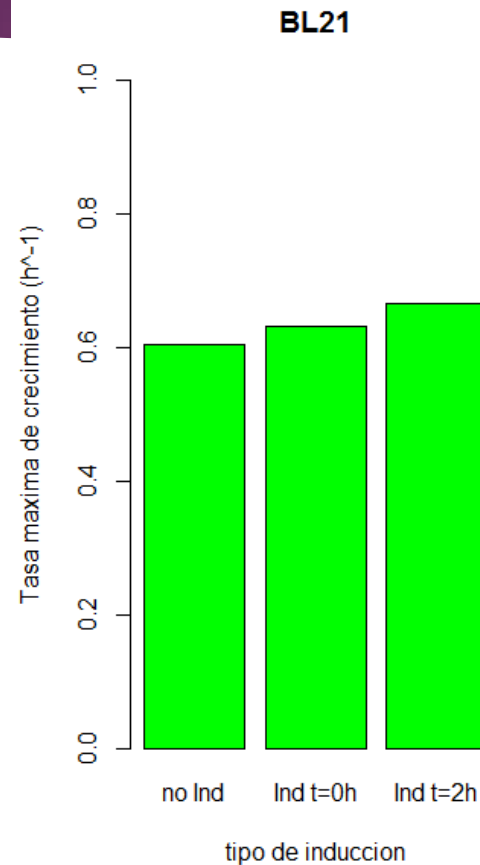
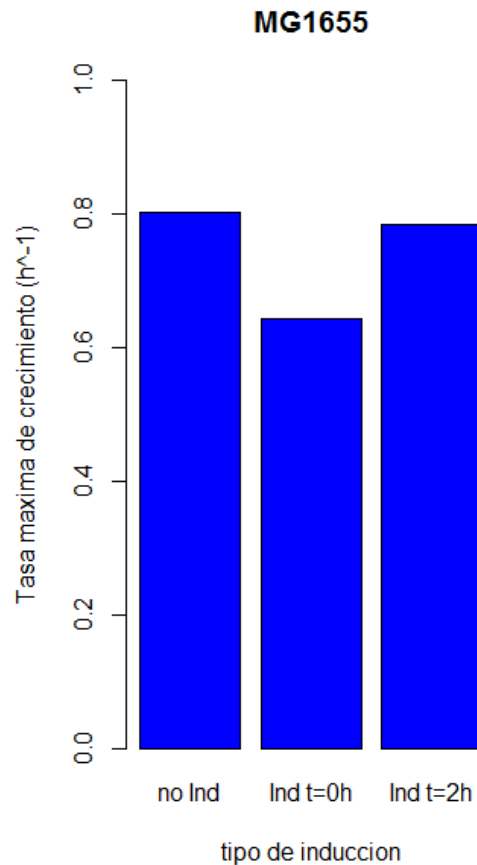
Observaciones

En BL21 la represión del sistema DE3 no es buena, esto se arregla al introducir el plásmido con LacI.



— Fluorescencia específica
— Tasa de producción

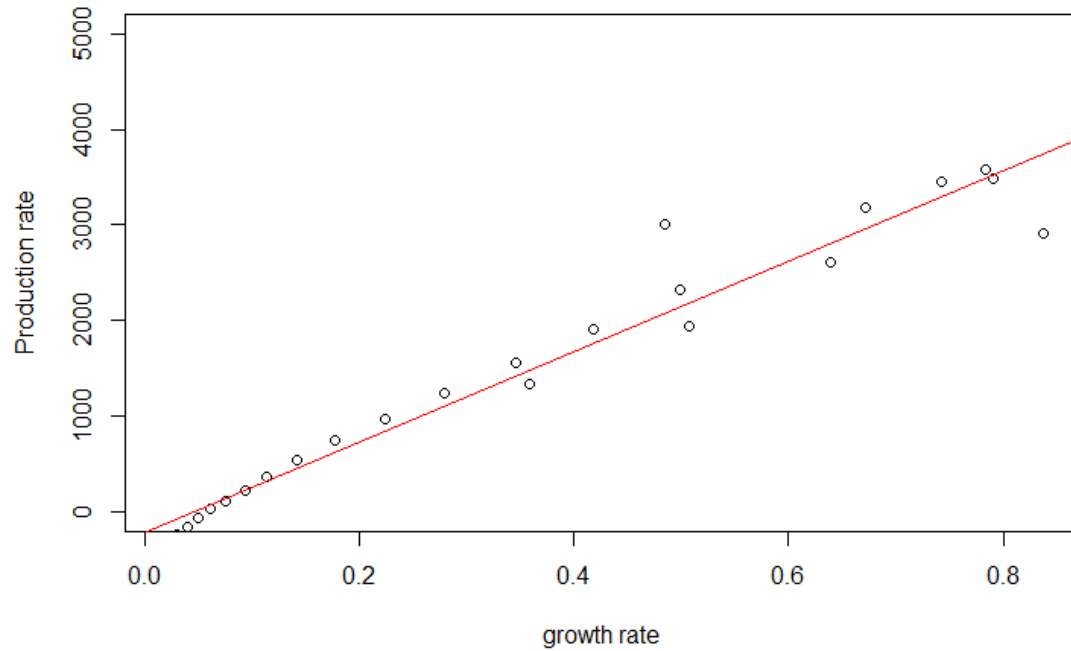
La cepa MG1655 reduce su tasa de crecimiento máxima cuando produce GFP (i.t.=0), cosa que no ocurre si se induce la expresión más tarde (i.t.=2h) o en las cepas tipo B (BL21 y BLR).



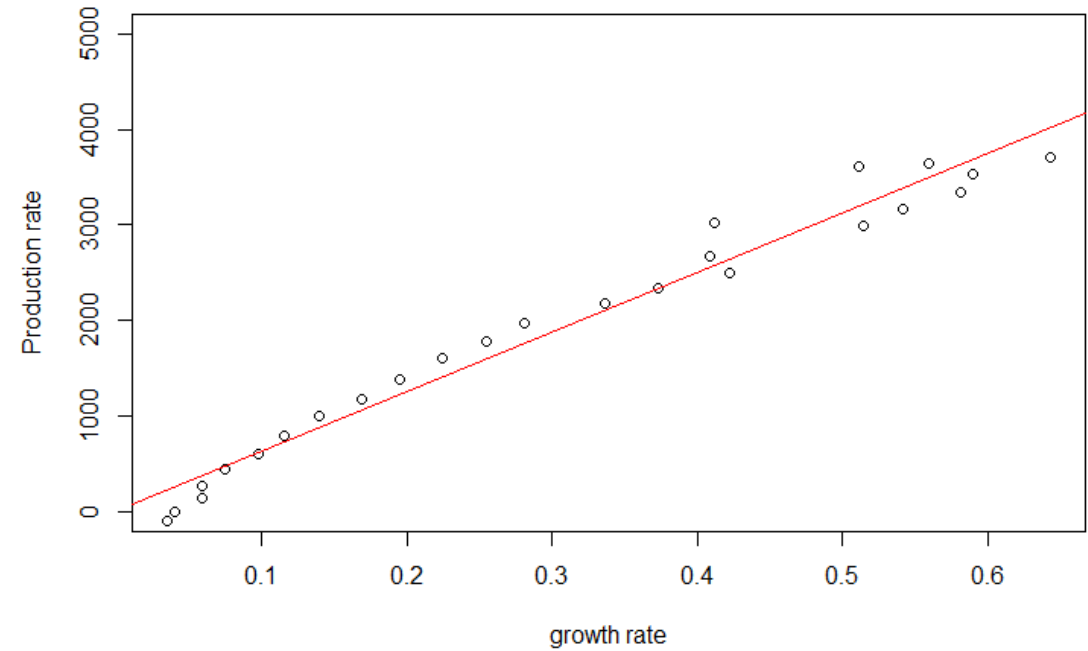
Tasa de producción parece tener una dependencia lineal con la tasa de crecimiento al menos durante las primeras 6 horas:

$$\rho_i \propto \mu_i$$

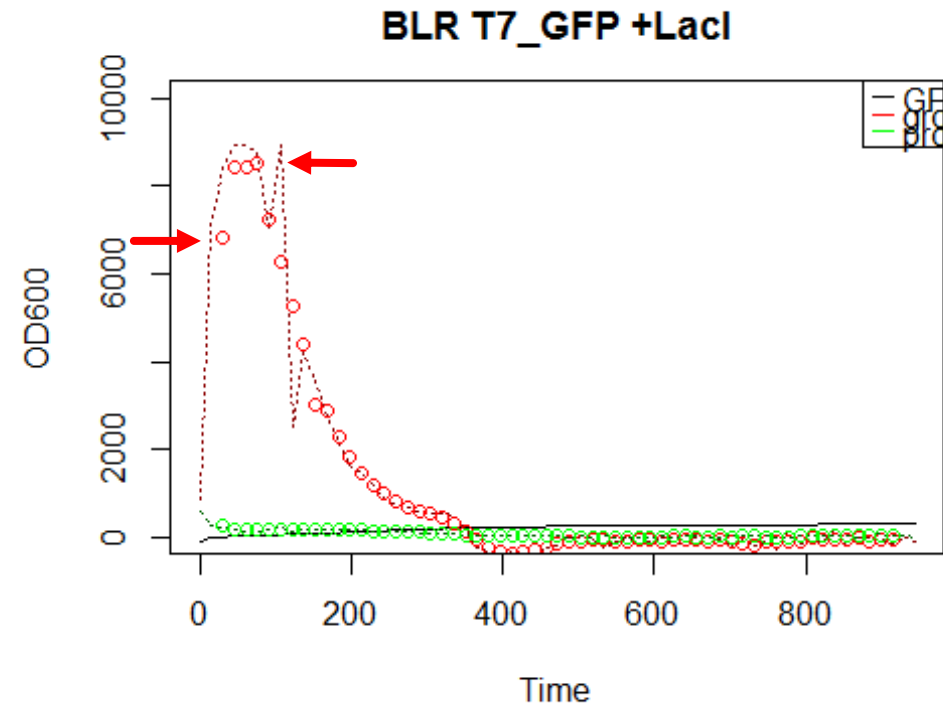
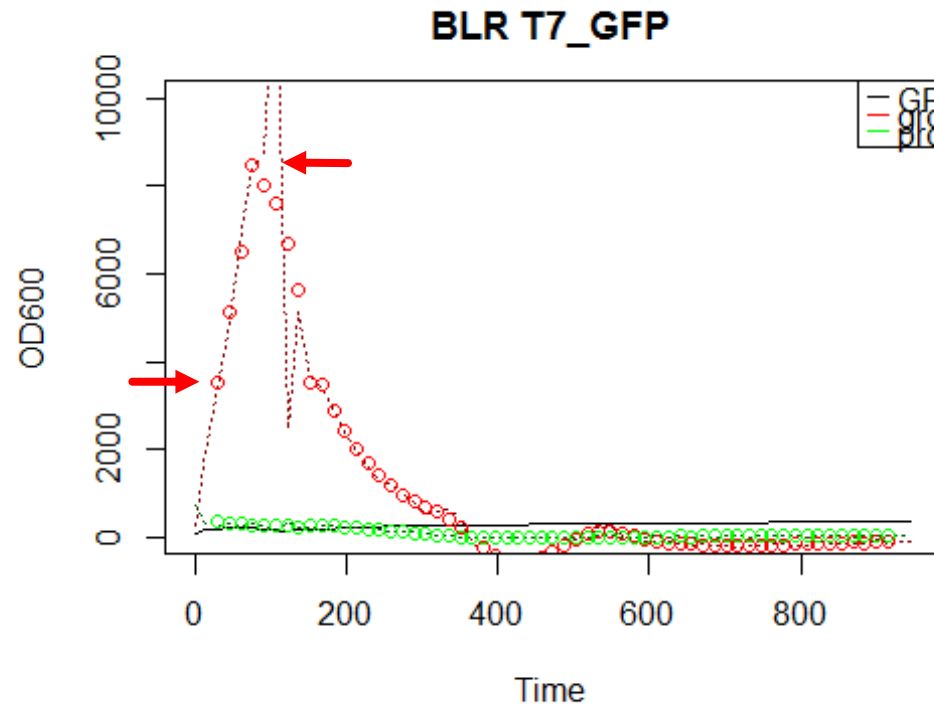
BLR induciendo desde el inicio (6h)



MG1655 induciendo desde el inicio (6h)



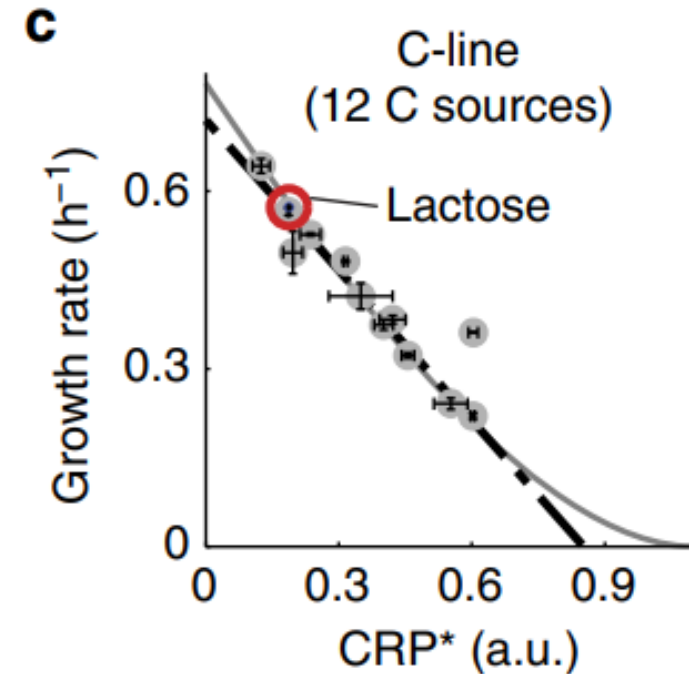
LacI parece alterar la forma de la curva de las tasas de crecimiento, haciendo que esta incremente con mayor rapidez y que se mantenga en un maximo por mayor tiempo.



Fluorecence

?Por que LacI tendría ese efecto?

- ▶ Ley de crecimiento: Tasa de crecimiento disminuye de forma lineal con la expresión, en equilibrio, de genes para el catabolismo de carbono.
- ▶ LacI intervendría en la regulación del metabolismo de carbono del chasis alterando la tasa de crecimiento de la bacteria, razón por la cual esta curva variaría.



Optimality and sub-optimality in a bacteria growth law, B. Towbin et. al (2016)

conclusiones

- ▶ En la cepa BL21 el sistema DE3 no parece tener un control muy estricto, se puede resolver el problema introduciendo LacI.
- ▶ Estos ensayos sugieren que las cepas tipo B, como podría esperarse, tendrían una mayor resistencia al expresar proteínas recombinantes.
- ▶ Es conveniente mantener tasas de crecimiento altas en la bacteria al momento de producir proteínas, una alta tasa de crecimiento parece implicar tasas de producción mayores.
- ▶ La sobreexpresión de LacI no es inocua, afecta el crecimiento de la bacteria