



ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS

INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

TRABAJO DE TITULACIÓN, PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

TEMA:

**PRODUCCIÓN RECOMBINANTE DE LA PROTEÍNA DE FUSIÓN CBD-
BMP2 EN *Escherichia coli* Y SU ACOPLAMIENTO A CELULOSA
BACTERIANA PARA LA OBTENCIÓN DE UN BIOMATERIAL
FUNCIONAL.**

AUTOR: MOSQUERA YUQUI, BYRON FRANCISCO

DIRECTOR: PhD: FLORES FLOR, FRANCISCO JAVIER

SANGOLQUÍ

2019

CERTIFICACIÓN



ii

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, **“Producción recombinante de la proteína de fusión CBD-BMP2 en *Escherichia coli* y su acoplamiento a celulosa bacteriana para la obtención de un biomaterial funcional”** fue realizado por el señor **Mosquera Yuqui, Byron Francisco** el mismo que ha sido revisado en su totalidad, analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 14 de junio de 2019.



Francisco Javier Flores Flor, PhD.

C.C: 1713443479

AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

iii

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD

Yo, **Mosquera Yuqui, Byron Francisco**, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **Producción recombinante de la proteína de fusión CBD-BMP2 en *Escherichia coli* y su acoplamiento a celulosa bacteriana para la obtención de un biomaterial funcional** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Consecuentemente el contenido de la investigación mencionada es veraz.

Sangolquí, 14 de junio de 2019.

Byron Francisco Mosquera Yuqui

C.C: 1722304480

AUTORIZACIÓN



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

iv

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORIZACIÓN

Yo, **Mosquera Yuqui, Byron Francisco**, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación **Producción recombinante de la proteína de fusión CBD-BMP2 en *Escherichia coli* y su acoplamiento a celulosa bacteriana para la obtención de un biomaterial funcional** en el Repositorio Institucional cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 14 de junio de 2019.

Byron Francisco Mosquera Yuqui

C.C: 1722304480

DEDICATORIA

Este trabajo es uno de los frutos derivados de todas las lecciones y valores inculcados día a día por mis padres, los cuales han forjado en mí fortaleza mental y espiritual, así que va dedicado principalmente a ellos.

A mi hermana, por su dedicación académica y con quien he podido compartir algunos consejos de la vida universitaria que actualmente está cursando.

A mi abuelita Esperanza, porque siempre se ha preocupado por el bienestar de cada miembro de la familia, presta a preparar y brindarnos alimentos.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por su bondad brindada demostrada con cada integrante de mi familia en términos de trabajo, salud y armonía.

A la Universidad de las Fuerzas Armadas, por el desarrollo profesional, por los recursos brindados para llevar a cabo esta investigación y por gratos reconocimientos al mérito académico.

A Francisco Javier Flores Flor, quien a más de ser el tutor del presente trabajo de investigación y contribuir económicamente para su desarrollo, ha demostrado ser un inmejorable amigo, siempre brindado grandes consejos, opiniones, desarrollar y oportunidades de superación académica y personal.

A Alma Koch, quien fue la primera persona en darme la confianza y abrirme las puertas de su laboratorio para sacar adelante ideas y experimentos; siempre estaré muy agradecido por eso.

A Printeria, de la Universitat Politècnica de València, el grupo ganador del Giant Jamboree 2018, por el suministro de enzimas y cepas bacterianas a pesar de un océano y selva amazónica de distancia.

A la Doctora Marbel Torres por ser una gran persona dentro y fuera de las aulas, logrando de una u otra forma solventar inquietudes académicas, así como el uso de equipos y reactivos.

A Linda Guamán, de la Universidad Tecnológica Equinoccial, y Carlos Barba por permitir y brindarme sus opiniones de los ensayos de fluorescencia.

A Stephanie Espín por su colaboración y criterio en el experimento de electroforesis SDS-PAGE.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CERTIFICACIÓN.....	ii
AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD	iii
AUTORIZACIÓN.....	iv
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTOS	vi
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	viii
ÍNDICE DE TABLAS.....	xi
ÍNDICE DE FIGURAS	xii
RESUMEN.....	xvi
ABSTRACT	xvii
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	1
1.1 Formulación del problema	1
1.2 Justificación.....	2
1.3 Objetivos	5
1.3.1 Objetivo General.....	5
1.3.2 Objetivos Específicos	5
1.4 Hipótesis	5
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO	6
2.1 Ingeniería Genética.....	6
2.1.1 Fundamentos	6
2.1.2 Proteínas de fusión	8
2.1.2.1 Proteínas de fusión fluorescentes	10
2.1.2.2 Proteínas de fusión terapéuticas	11
2.1.2.3 Ensamblaje de fusión	13
2.1.3 Sistema de expresión inducible por IPTG	14
2.2 Dominios de unión a celulosa	16
2.2.1 Fundamentos	16

2.2.2	CBDcipA	17
2.3	Proteínas morfogénicas óseas.....	18
2.3.1	Fundamentos	18
2.3.2	BMP2.....	19
2.4	Biomateriales	21
2.4.1	Fundamentos	21
2.4.2	Celulosa	22
CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS		24
3.1	Preparación de células competentes.....	24
3.2	Domesticación de biobricks	24
3.2.1	Síntesis química de los oligonucleótidos.....	24
3.2.2	Adaptación de los extremos N-terminal y C-terminal	25
3.3	Ensamblaje de fusión	27
3.3.1	Digestión	27
3.3.2	Ligación.....	27
3.4	Transformación de <i>Escherichia coli</i>	29
3.5	Selección de los transformantes.....	29
3.6	Modelo matemático de la expresión de las proteínas recombinantes.....	30
3.6.1	Internalización del inductor IPTG en <i>Escherichia coli</i>	30
3.6.2	Producción inducida por IPTG de las proteínas de fusión	32
3.6.3	Estabilidad de los nodos	33
3.7	Determinación de la concentración saturante de IPTG y cuantificación de proteína recombinante.....	34
3.8	Expresión de las proteínas recombinantes	36
3.9	Obtención de celulosa bacteriana	37
3.10	Caracterización de la fuerza de enlace de la proteína recombinante a la celulosa bacteriana	38
CAPÍTULO IV: RESULTADOS		40
4.1	Ensamblaje de fusión	40
4.2	Modelo matemático de la expresión de las proteínas recombinantes.....	41

- 4.2.1 Internalización del inductor IPTG en *Escherichia coli*41
- 4.2.2 Expresión de las especies moleculares.....43
- 4.2.3 Estabilidad de los nodos44
- 4.3 Determinación de la concentración saturante de IPTG y cuantificación de proteína recombinante.....45
- 4.4 Expresión de las proteínas recombinantes48
- 4.5 Obtención de celulosa bacteriana49
- 4.6 Caracterización de la fuerza de enlace de la proteína recombinante a celulosa bacteriana49
- CAPÍTULO V: DISCUSIÓN**..... 51
- CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES**..... 55
- CAPÍTULO VII: RECOMENDACIONES**..... 57
- REFERENCIAS**..... 58

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 <i>Proteínas o péptidos ampliamente usados para purificar proteínas de interés ..</i>	9
Tabla 2 <i>Ajuste de reacción para la polimerasa Q5.....</i>	26
Tabla 3 <i>Condiciones de PCR para los gBlocks A, B, y C.....</i>	26
Tabla 4 <i>Composición de los Mix A, B y C utilizados para digerir los productos de PCR purificados A, B, y C.</i>	27
Tabla 5 <i>Composición del Mix de Ligación.....</i>	28
Tabla 6 <i>Ajuste de la PCR de colonia para selección de transformantes.....</i>	30
Tabla 7 <i>Condiciones de la PCR de colonia para selección de transformantes</i>	30
Tabla 8 <i>Parámetros experimentales para medir la OD600 e intensidad de fluorescencia.</i>	35

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Hitos en el desarrollo de la Ingeniería Genética en el desarrollo de productos recombinantes para uso humano 8
- Figura 2.** (A) Estructura y dimensiones de la proteína verde fluorescente (GFP) de *Aequorea victoria*. (B) Estructura bidimensional del comóforo p-hidroxibencilidenimidazolinona de la GFP 11
- Figura 3.** Estructura y funcionamiento del operon lac de *Escherichia coli*. La transcripción del operon lac se activa por unión de moléculas de lactosa y sus análogos sintéticos IPTG y TMG a la proteína de expresión constitutiva lacI 15
- Figura 4.** Estructura típica de celulasas altamente eficientes, consistiendo de un dominio de anclaje a sustrato y un dominio catalítico, separados por un péptido espaciador 17
- Figura 5.** Representación esquemática del dominio de unión a celulosa (CBD) de la proteína de andamiaje cipA de los celulosomas de *Clostridium thermocellum* 18
- Figura 6.** Representación esquemática de la proteína ósea morfogénica humana 2 (BMP2) 20
- Figura 7.** Estructura de los plásmidos (A) psb1A3-CBDcipA-BMP2 y (B) psb1A3-CBDcipA-sfGFP 28
- Figura 8.** Esquema del experimento para determinar la concentración saturante de IPTG y cuantificar la expresión de la proteína de fusión CBDcipA-sfGFP. Seis niveles de IPTG entre 0 uM y 100 uM con cinco repeticiones fueron ensayados 35

Figura 9. Preparación de celulosa bacteriana.....	37
Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa (1% m/V) de los productos de PCR de colonia de bacterias conteniendo el casete de expresión para CBDcipA-BMP2 (Carril 2 y 3) y CBDcipA-sfGFP (Carril 4).....	40
Figura 11. Cultivos puros de <i>E. coli</i> BL21(DE3) codificando las proteínas (A) CBDcipA-BMP2 y (B) CBDcipA-sfGFP	41
Figura 12. Balance de tasas de avance y retroceso de la difusión de IPTG a través de la membrana de <i>E. coli</i> . El punto de intersección corresponde al estado estacionario	42
Figura 13. Simulación de la expresión de las proteínas (A) CBDcipA-BMP2 y (B) CBDcipA-sfGFP bajo distintas concentraciones de IPTG	44
Figura 14. Cinética de la expresión de la proteína CBDcipA-sfGFP inducida con seis niveles de IPTG y medida en unidades arbitrarias	46
Figura 15. Concentraciones máximas de proteína CBDcipA-sfGFP inducida por los seis niveles de IPTG. **= $p < 0.01$, ***= $p < 0.001$, ns=no significativamente diferente de IPTG 0 μ M	47
Figura 16. Expresión de las proteínas recombinantes en fracciones solubles (FS) e insolubles (FI). CBDcipA-sfGFP en FS (Carriles 1 y 8) y FI (Carriles 4 y 5). CBDcipA-BMP2 en FI (Carriles 2 y 3) y FS (Carriles 6 y 7).....	48
Figura 17. (A) Membranas de celulosa bacteriana cultivadas por 2 semanas y (B) tratadas con solución alcalina.....	49

Figura 18. Caracterización de la fuerza de enlace de las proteínas CBDcipA-sfGFP y GFPwt con celulosa bacteriana **(A)** prelavado, al extraer la solución proteínica incubada toda la noche y **(B)** postlavado, tras lavar 3 veces con SFB las membranas de celulosa acoplada con las proteínas 50

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo A. gBlock A EN FORMATO BIOBRICK CONTENIENDO EL PROMOTOR INDUCIBLE PLAC, CBDcipA CON ESPACIADOR ENDÓGENO	65
Anexo B. gBlock B EN FORMATO BIOBRICK CONTENIENDO EL ORF DE LA PROTEÍNA BMP2	66
Anexo C. gBlock B EN FORMATO BIOBRICK CONTENIENDO EL ORF DE LA PROTEÍNA sfGFP	67

RESUMEN

A pesar de las propiedades intrínsecas de regeneración de tejido y función del hueso humano, existen desafíos clínicos principalmente relacionados a la edad que precisan de terapia costosa y de largo plazo. Novedosos tratamientos basados en biomateriales han sido ampliamente estudiados porque su uso favorece la adhesión, proliferación y diferenciación de células en osteoblastos. El objetivo de este trabajo fue producir de manera recombinante una proteína de fusión entre el dominio de unión a celulosa de la proteína de andamiaje cipA (CBDcipA) y la proteína morfogénica ósea humana 2 (BMP2) en *Escherichia coli*, modelando matemáticamente su expresión. La adherencia de la proteína quimera a celulosa bacteriana (BC) fue una característica del dominio CBDcipA, ubicado en el extremo N-terminal, dejando libre en el extremo C-terminal a la proteína BMP2. Para estimar la cinética de producción de la quimera, se fusionó a CBDcipA con la proteína verde fluorescente “superfolder” (sfGFP). El modelo matemático determinístico utilizando ecuaciones diferenciales ordinarias de primer grado permitió predecir el rango de concentraciones de IPTG saturante de la expresión de las proteínas CBDcipA-BMP2 y CBDcipA-sfGFP, y sus concentraciones. Las cinéticas experimentales de expresión de la proteína CBDcipA-sfGFP fueron concordantes con las cinéticas predichas por el modelo matemático hasta 0.1 uM ya que concentraciones de inductor mayores o iguales a 20 uM redujeron significativamente la máxima concentración de proteína al ser tóxicas para las células. Los lavados de la proteína CBDcipA-sfGFP acoplada a membranas de BC evidenciaron que el dominio CBDcipA confirió fuerza de enlace a las proteínas quimeras.

PALABRAS CLAVE:

- **BIOMATERIALES**
- **PROTEÍNAS DE FUSIÓN**
- **CELULOSA BACTERIANA**

ABSTRACT

Despite the intrinsic capabilities of human bone to restore tissue and function, there are clinical challenges mainly age-related where expensive and long-term therapy is needed. Innovative treatments based on biomaterials have been widely studied because its use allows the adhesion, proliferation, and differentiation of cells into osteoblasts. The aim of this work was the recombinant production of a fusion protein between the cellulose binding domain of the scaffolding protein CipA (CBDcipA) and the bone morphogenetic protein 2 (BMP2) in *Escherichia coli*, modeling mathematically its expression. The adherence of the chimeric protein to bacterial cellulose (BC) was a property of the CipA domain, located in the N-terminus region, letting the BMP2 free in the C-terminus region. In order to estimate the kinetics of the chimeric protein, the CBDcipA domain was fused to the superfolder green fluorescent protein (sfGFP). The deterministic mathematical modeling using first-order ordinary differential equations allows to predict the range of saturating IPTG concentrations of the CBDcipA-BMP2 and CBDcipA-sfGFP, as well as their concentrations. The experimental kinetics of the CBDcipA-sfGFP protein expression were in accordance with the kinetics predicted by the mathematic model until 0.1 uM because inducer concentrations equal or greater than 20 uM significantly reduced the highest protein concentration as a result of its toxicity. The washes of the CBDcipA-sfGFP protein coupled to BC membranes showed the CBDcipA domain confers binding strength to the chimeric proteins.

KEYWORDS:

- **BIOMATERIALS**
- **FUSION PROTEINS**
- **BACTERIAL CELLULOSE**

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

1.1 Formulación del problema

Como curación de hueso se define al proceso fisiológico mediante el cual su ruptura es reparada de forma natural o inducida. Considerado como un fenómeno complejo y delicado es altamente influenciado por la vascularidad local (Keramaris, Calori, Nikolaou , Schemits, & Giannoudis, 2008).

Patologías como la osteoporosis, enfermedad relacionada a la edad y altamente frecuente, hacen que el riesgo de fractura ósea incremente. Se estima que actualmente más de 200 millones de personas sufren de osteoporosis con una relación mujer:hombre de 3.5:1 debido a que las mujeres pierden una mayor cantidad de masa ósea (Sözen, Özişik, & Başaran, 2016).

Una tasa de curación de hueso ralentizada por la edad del individuo hace que el panorama se vuelva más complicado. Ante tal situación, numerosas investigaciones basadas en el uso de proteínas morfogénicas óseas (BMPs) han sido desarrolladas para promover la curación de hueso. Sin embargo, la completa recuperación del paciente todavía constituye un desafío clínico en ciertas afecciones como la pseudoartrosis, osteitis y osteomielitis cuyas consecuencias pueden derivar en la sustitución completa de estructuras óseas por prótesis.

1.2 Justificación

Un hueso roto representa una complicación a cualquier edad para cualquier persona pero para aquellas de edad avanzada puede ser mortal. Las estadísticas muestran que una de cada tres personas sobre los 50 años muere como consecuencia de complicaciones derivadas de alguna fractura ósea (Sequin, 2018). Las fracturas de cadera son el tipo de fractura con mayor mortalidad, su incidencia bordea 1.7 millones y para 2050 se estima que el número de fracturas en Sudamérica, Norteamérica, Europa y Asia será de 655, 763, 725 y 3252 millones, respectivamente (Cooper, Campion, & Melton, 1992). Desde el punto de vista económico, el costo promedio que representa curar una fractura de cadera en Estados Unidos es de \$80 000 (Sequin, 2018). Lograr disminuir los tiempos de recuperación después de una fractura tiene especial interés dentro del ámbito de los deportes profesionales donde los tiempos de para representan significativas pérdidas económicas. En otra perspectiva, existen patologías como la pseudoartrosis, osteitis y osteomielitis que entorpecen la curación ósea a cualquier edad.

Uno de los paradigmas de la ingeniería de tejidos es usar los biomateriales para evitar los trasplantes de órganos. Un análisis de datos recolectados por “Newsletter Transplant” en el año 2015, sobre 112 países, indica que existe un aumento constante de trasplantes en el mundo. En los últimos 5 años el número total de trasplantes registrados se han incrementado en un 15%; sin embargo, pese a este aumento, tanto la Organización Mundial de la Salud (OMS) como la Organización Nacional de Trasplantes (ONT) estiman que estas cifras representan solamente el 10% de la necesidad mundial. Este procedimiento presenta un problema de gran importancia: la compatibilidad entre el

donante y el receptor. Con el avance de la tecnología enfocado a la medicina regenerativa y el desarrollo de la ingeniería de tejidos, se ha logrado obtener biomateriales que permiten tanto el restablecimiento estructural como la regeneración funcional de tejidos para evitar reemplazar órganos. Por tanto, la ingeniería de tejidos juega un papel central al imitar la porosidad, tamaño de poro e interconectividad de los tejidos para proporcionar un ambiente adecuado para adhesión, proliferación, diferenciación celular y sobretodo, mimetizar la función de los tejidos humanos nativos (Picheth et al., 2014).

Una limitante de la medicina regenerativa es la escasez de materiales biocompatibles funcionalizables, por lo que funcionalizar e investigar biomateriales es esencial para el desarrollo de la biomedicina. Una de las estrategias empleadas es la producción de biomateriales por medio de tecnología recombinante, con la cual se generan diversas proteínas fibrilares de la matriz extracelular como el colágeno, queratina, elastina y fibrina (Paredes-Puerto, Camacho-Villegas, Vallejo-Cardona, & Esquivel-Solís, 2017).

Un material muy prometedor de la medicina regenerativa es la celulosa bacteriana (BC), que ha sido utilizada como material de vendaje para heridas crónicas y quemaduras gracias a su alto grado de porosidad. Sin embargo, al ser un material inerte resulta difícil hacerla funcional para aplicaciones más complejas. Afortunadamente, los dominios de unión a celulosa (CBDs) han emergido como complementos para potenciar el uso de la BC porque permiten anclar proteínas bioactivas (Picheth et al., 2014).

Cuantiosas cifras han sido destinadas a la investigación y desarrollo de productos destinados a regenerar hueso. Por ejemplo, Novosteo Inc. recibió \$1.7 millones para poner en marcha la fase I y II de su proyecto que mediante el uso de una solución inyectable busca acelerar la curación de huesos rotos mejorando la calidad de vida de personas que han sufrido este tipo de complicaciones (Sequin, 2018).

El presente trabajo de investigación fue enfocado en el uso de celulosa bacteriana como un sistema de andamiaje para el despliegue localizado de la proteína de fusión CBDcipA-BMP2 para la obtención de un biomaterial funcional.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General

Producir la proteína de fusión CBD-BMP2 en *Escherichia coli* y acoplarla a celulosa bacteriana para la obtención de un biomaterial funcional.

1.3.2 Objetivos Específicos

- Clonar la proteína de fusión CBD-BMP2 en *Escherichia coli*.
- Construir un modelo matemático de la expresión de la proteína de fusión CBD-BMP2 inducida por IPTG.
- Cuantificar la expresión de la proteína de fusión CBD-BMP2 inducida por IPTG.
- Caracterizar la fuerza de enlace del CBDcipA a celulosa bacteriana seca.

1.4 Hipótesis

Existe una concentración saturante de IPTG que induce el máximo nivel de expresión de la proteína de fusión CBD-BMP2 que a su vez puede ser acoplada en matrices de celulosa bacteriana.

CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

2.1 Ingeniería Genética

Esta sección inicia con los fundamentos de ingeniería genética desde una perspectiva histórica con los hitos que marcaron su desarrollo y despliegue de productos en el mercado. Las secciones siguientes hacen especial énfasis en los antecedentes y aplicaciones de las proteínas de fusión fluorescentes y terapéuticas; así como en el ensamblaje de fusión que facilita la construcción de este tipo de proteínas. Finalmente, se describe el funcionamiento del sistema inducible por IPTG que ha sido ampliamente utilizado en Ingeniería Genética para la expresión de proteínas de interés.

2.1.1 Fundamentos

La ingeniería genética consiste en la manipulación de dos o más secuencias de ADN de diferentes especies biológicas con función específica para la producción *in vitro* de moléculas quiméricas de ADN que luego son insertadas en un organismo hospedero procarionta o eucariota en un ambiente controlado (Rosenberg, 2017; Van Pham, 2018). Utiliza un conjunto de estrategias y métodos de varias ramas de la ciencia, especialmente biología molecular y bioinformática, impulsando el desarrollo de la biotecnología moderna.

Este tipo de tecnología era una utopía hasta mediados del siglo XX ya que algunas proteínas utilizadas como drogas para el tratamiento de ciertas enfermedades eran extraídas naturalmente procesando a larga escala plasma humano (Cohn, Oncley, Strong, Hughes, & Armstrong, 1944). Por ejemplo, la albúmina (mayor componente del

suero humano) ha sido usada para el tratamiento de quemaduras, shocks o traumas. Además, ciertas inmunoglobulinas como la gamma han sido utilizadas para el tratamiento de enfermedades como la epilepsia infantil intratable, enfermedades autoinmunes, alergias atópicas, entre otras (Pahwa, 1988).

Sin embargo, factores como la contaminación de muestras por virus (VIH, hepatitis) y la posibilidad de incrementar la tasa de producción promovieron el paso hacia la ingeniería genética usando tecnología recombinante. En 1982 la Agencia de Administración de Alimentos y Drogas (FDA, por sus siglas en inglés) aprobó la comercialización de la insulina humana recombinante bajo el nombre de Humulina®, siendo la primera proteína terapéutica para uso humano (Schmidt, 2013). Desde aquel tiempo, numerosas proteínas de interés farmacéutico como el factor VIII contra la hemofilia, hormona de crecimiento humano, hormona folículo estimulante, entre otras han sido producidas de manera recombinante. Habiendo dominado esta tecnología, los científicos decidieron generar anticuerpos y proteínas terapéuticas con funciones únicas que no podían ser encontradas en la naturaleza. De esta manera surgieron las proteínas de fusión de interés biomédico cuya producción inició en 1986 y su investigación y desarrollo continúan de manera acelerada. Actualmente más de 130 proteínas de fusión han sido aprobadas por la FDA y más de 170 son usadas en el mundo (Van Pham, 2018). Los hitos marcados en Ingeniería Genética son recopilados en la Figura 1.

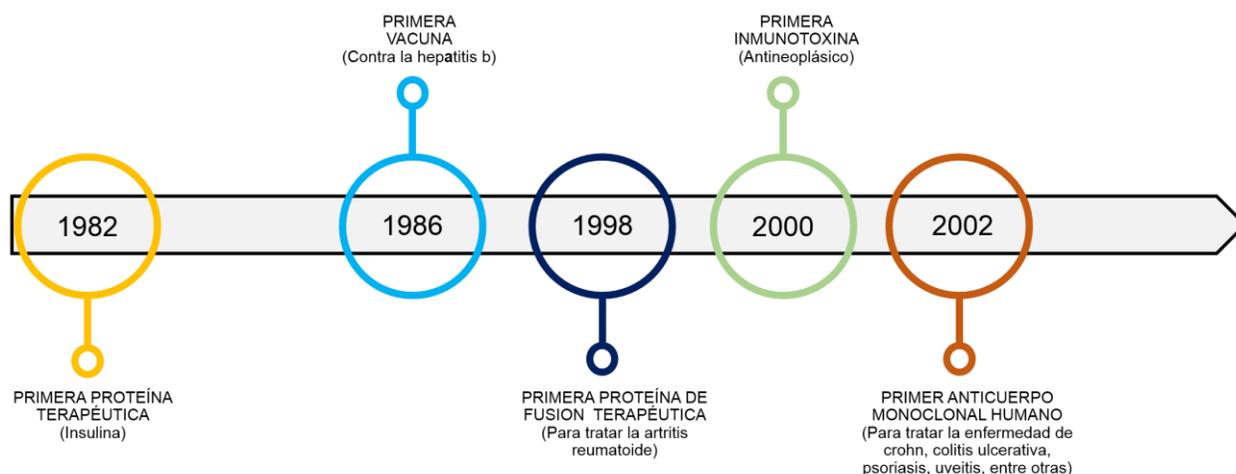


Figura 1. Hitos en el desarrollo de la Ingeniería Genética en el desarrollo de productos recombinantes para uso humano

Fuente: (Mosquera, 2019)

2.1.2 Proteínas de fusión

Las proteínas de fusión son proteínas multifuncionales transcritas y traducidas a partir de un marco abierto de lectura (ORF, por sus siglas en inglés) donde dos o más ORFs o segmentos de ORFs han sido unidos con el objetivo de incrementar la bioactividad o generar nuevas combinaciones bifuncionales con aplicación biotecnológica y farmacéutica (Kai, Chengcheng, Byung-Gee, & Dong-Yup, 2015).

Históricamente, las primeras proteínas de fusión fueron creadas en *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae* uniendo proteínas de interés al gen de la β -galactosidasa para cuantificar niveles de expresión y purificar proteínas de interés, reteniendo la actividad de los dos o más dominios constituyentes (Casadaban, Chou, & Cohen, 1980; Casadaban, Martinez-Arias, Shapira, & Chou, 1983; Myers, Tzagoloff, Kinney, & Lusty, 1986; Weinstock et al., 1983) o al gen de la proteína de unión a maltosa (Maina et al., 1988; Rose, Casadaban, & Botstein, 1981).

Las proteínas de fusión han sido ampliamente usadas para la purificación de proteínas de interés, así como reporteros del nivel de expresión génica y como etiquetas para rastrear el movimiento y localización de proteínas en cultivo celular, de tejidos y modelos animales (Riggs, 2001). Diversos dominios proteínicos han sido usados para la purificación de ciertas proteínas mediante cromatografía de afinidad (Tabla 1). Entre otras aplicaciones, la β -galactosidasa, luciferasa y proteínas fluorescentes (GFP, RFP, entre otras) han sido usadas como dominios reporteros.

Tabla 1

Proteínas o péptidos ampliamente usados para purificar proteínas de interés

Proteínas/péptidos	Longitud (aa)	Referencias
Dominio de unión a albúmina	137	(Nilvebrant & Hober, 2013)
Dominio de unión a celulosa	27-189	(Sugimoto, Igarashi, & Samejima, 2012)
Dominio de unión a quitina	51	(Mitchell & Lorsch, 2015)
Estreptavidina	159	(Arribillaga et al., 2013; Fogen, Wu, Ng, & Wong, 2015; C. X. Xu, Hu, Li, & Gao, 2009)
Glutación-S-transferasa	211	(Castelli, Petris, & Carroll, 1995; Einarson, Pugacheva, & Orlinick, 2007)
Proteína de unión a calmodulina	26	(Klein, 2003)
Péptido de unión a estreptavidina	38	(Fogen et al., 2015; Keefe, Wilson, Seelig, & Szostak, 2001)
Proteína A de Staphylococcus	280	(Shpigel et al., 2000; Ståhl & Nygren, 1997)
Proteína G de Staphylococcus	280	(Ståhl & Nygren, 1997)
Polihistidina	2-10	(Bornhorst & Falke, 2000)
Proteína de unión a maltosa	396	(Lebendiker & Danieli, 2011)
Sistema S-tag	15	(Raines, McCormick, Van Oosbree, & Mierendorf, 2000)
Tioredoxina	109	(McCoy & La Ville, 2001)
TrpE	25-336	(Hoey, 2001)
Ubiquitina	76	(Baker, Smith, Marano, McKee, & Board, 1994)

Fuente: (Mosquera, 2019)

Los sustratos de la β -galactosidasa son variados y altamente comerciales, la luciferasa requiere de luciferina y otros compuestos (ATP, O_2 y Mg^{2+}), las proteínas fluorescentes no precisan el uso de un sustrato ya que son excitadas a una cierta longitud de onda (Shaner, Steinbach, & Tsien, 2005). Mientras que las reacciones químicas catalizadas por la β -galactosidasa generan un cierto color o luz, aquellas catalizadas por la luciferasa o proteínas fluorescentes producen luz que puede ser cuantificada usando un luminómetro o fluorómetro, respectivamente (Riggs, 2001).

2.1.2.1 Proteínas de fusión fluorescentes

Las proteínas fluorescentes constituyen un grupo de proteínas estructuralmente homólogas con una propiedad ínfima para formar un cromóforo de longitud de onda visible a partir de residuos aminoacídicos (Campbell, 2008).

La primera y más ampliamente estudiada proteína fluorescente fue aislada de la medusa *Aequorea victoria* en 1962 durante una investigación centrada en otra proteína bioluminiscente (aequorina) capaz de emitir luz azul en presencia de calcio (Shimomura, Johnson, & Saiga, 1962). En 1971, Morin & Hastings la nombraron como proteína fluorescente verde (GFP, por sus siglas en inglés) (Fig. 1A). El cromóforo de longitud de onda visible de la GFP (p-hidroxibencilidenimidazolinona) se forma por los residuos aminoacídicos 65-67 (Ser-Tyr-Gly) (Cody, Prasher, Westler, Prendergast, & Ward, 1993) (Fig. 1B). En los últimos 15 años se ha utilizado una variante superfolder de la GFP (sfGFP) ya que se pliega bien incluso cuando se fusiona con polipéptidos mal plegados y cuya cinética de maduración es más rápida que la GFP (Pédelacq, Cabantous, Tran, Terwilliger, & Waldo, 2005).

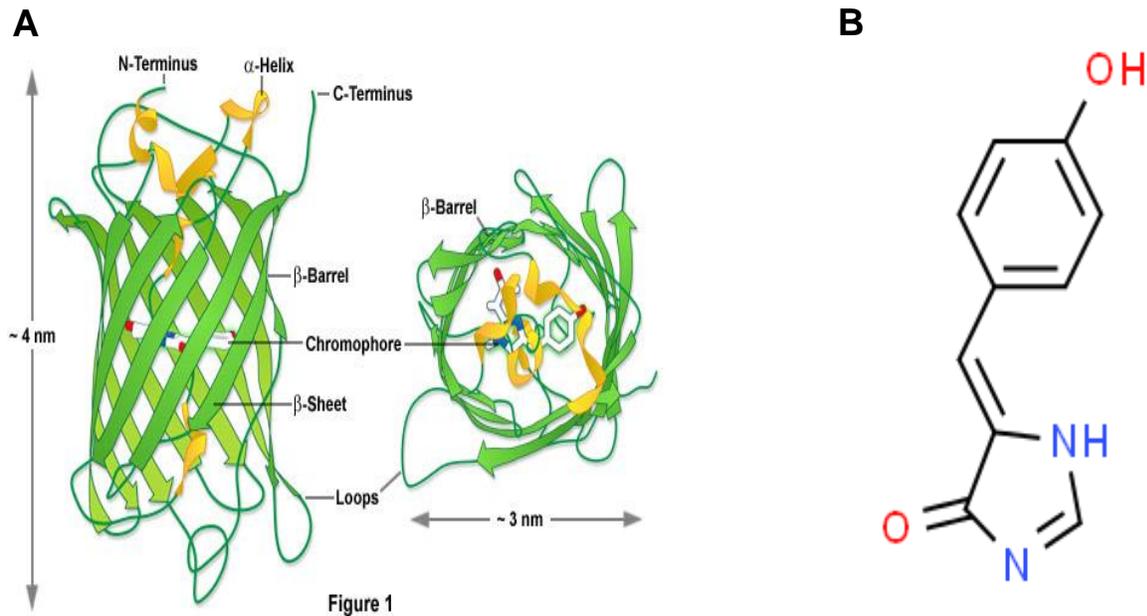


Figura 2. (A) Estructura y dimensiones de la proteína verde fluorescente (GFP) de *Aequorea victoria*. (B) Estructura bidimensional del comóforo p-hidroxibencilidenimidazolinona de la GFP

Fuente: (Zeiss, Day, & Davidson, 2019)

Dos son las principales aplicaciones que los científicos han dado a las proteínas de fluorescencia: (1) como marcadores moleculares acoplándolas a proteínas que interese rastrear su localización dentro y fuera de células procariontas, eucariotas y tejidos vegetales y animales y (2) para monitorear y optimizar la producción recombinante de proteínas dependiendo de casetes de expresión y cepas bacterianas (Su, 2005; Zou, 2014).

2.1.2.2 Proteínas de fusión terapéuticas

Por más de 30 años las proteínas de fusión han sido usadas en la industria farmacéutica (Strohl, 2015) donde su diseño *de novo* busca ya sea superar inconvenientes inherentes de uno o más de sus dominios: (1) corto tiempo de vida media

por nivel de filtración renal, (2) efectos secundarios potencialmente adversos o variar el mecanismo de acción o rutas de administración. Sin embargo, dentro de los retos implicados se encuentran potenciales respuestas inmunitarias debido a la formación de epítopes en la unión de los dominios proteínicos, incluso si ambos son de origen humano (Berger, Lowe, & Tesar, 2015).

Las proteínas quimeras creadas para aumentar el tiempo de vida media se obtienen: (1) vía conjugación química con un polímero tipo PEG para aumentar el radio hidrodinámico o (2) por unión del dominio de interés a una proteína asociada ya sea de manera covalente o no covalente obtenida vía recombinante donde los dominios no se separan mientras se realiza la función terapéutica. Las principales proteínas asociadas que se han utilizado en el área terapéutica son: el fragmento Fc de la inmunoglobulina IgG, albúmina y transferrina (Pechtner, Karanikas, García-Pérez, & Glaesner, 2017)

La primera proteína de fusión aprobada para uso terapéutico fue etanercept, compuesta por el receptor p75 del factor de necrosis tumoral (TNF) fusionado al dominio Fc de la inmunoglobulina humana IgG1. Su mecanismo de acción es atrapar la citocina proinflamatoria TNF que juega un rol transcendental en la patogénesis de la artritis reumatoide (Weinblatt et al., 1999). Actualmente, las proteínas de fusión generadas artificialmente con mayor ventas en el mercado son etanercept (Enbrel®), romiplostim (Nplate®), dulaglutida (TrulicityTM®), aflibercept (Eylea®) para el tratamiento de la artritis reumatoide, idiopática, diabetes mellitus y afecciones graves de ojo, respectivamente.

Un segundo enfoque para reducir la filtración renal involucra una administración lenta, constante y prolongada *in situ* de la proteína de interés usando sistemas poliméricos o lipídicos simples o en combinación (Pechtner et al., 2017).

2.1.2.3 Ensamblaje de fusión

El objetivo subyacente de la biología sintética es hacer de la ingeniería de sistemas biológicos un proceso sencillo y controlable (Shetty, Endy, & Knight, 2008). Un proceso de este tipo involucra la disponibilidad de piezas funcionales (de ADN) que puedan ser acopladas en un sistema biológico tal como los componentes electrónicos lo hacen dentro de un circuito eléctrico. Con este objetivo, las piezas biológicas funcionales son flanqueadas con sitios de reconocimiento de enzimas de restricción (prefijo y sufijo), y toman el nombre de *Biobricks*.

El ensamblaje de fusión es una variante del ensamblaje 3A (Shetty, Lizarazo, Rettberg, & Knight, 2011), diseñados para unir dos o más biobricks y obtener un nuevo biobrick lineal o dentro de un plásmido.

En el ensamblaje de fusión dos *Biobricks* se fusionan dentro de un vector de clonación plasmídico. El *Biobrick* ubicado en el extremo N-terminal se conoce como parte A y el *Biobrick* C-terminal es la parte B. Cuando la parte A y B provienen de plásmidos, es necesario que el gen de resistencia a antibiótico sea diferente al del plásmido de construcción donde el producto será insertado. Las partes A, B y plásmido de construcción son digeridos con EcoRI/AgeI, NgoMIV/PstI y EcoRI /PstI, respectivamente. Los extremos cohesivos formados por la digestión con AgeI y NgoMIV generan extremos cohesivos complementarios que en su ligación producen una cicatriz (SCAR) de dos

pequeños aminoácidos (Treonina y Glicina) no cargados y que son frecuentemente encontrados de manera natural en péptidos espaciadores de origen natural y sintético (Grünberg, Arndt, & Müller, 2009). La ligación al plásmido se produce vía EcoRI en 5' y PstI en 3'.

Los productos de ligación son entonces transfectados a células competentes y cultivadas en el medio de cultivo con el antibiótico para el cual el plásmido de construcción tiene el gen de resistencia y lograr una selección positiva de los ensamblajes correctos.

2.1.3 Sistema de expresión inducible por IPTG

El operon *lac* u operon lactosa de *E. coli* es un casete de expresión de 3 genes estructurales *lacZ*, *lacY* y *lacA* que codifican para las proteínas implicadas en el metabolismo de la lactosa: β -galactosidasa (corta la lactosa en glucosa y galactosa), lactosa permeasa (facilita el paso de lactosa a través de la bicapa lipídica) y lactosa transacetilasa (cuya función *in vivo* no es clara e *in vitro* es capaz de transferir grupos acetil de la acetil-coenzima A al grupo hidroxil C6 del tiogalactosido), respectivamente (Parker, 2001; Zander, Samaga, Straube, & Bettenbrock, 2017).

Cuando *E. coli* se desarrolla en medios de cultivo cuya fuente de carbono son diferentes a lactosa la producción de los genes antes mencionados es bastante baja. En contraste, cuando la bacteria crece en un medio conteniendo glucosa y lactosa se produce el fenómeno *diauxie* donde se generan dos fases de crecimiento bastante apreciables y son consecuencia de la exclusiva utilización de glucosa en la fase inicial de crecimiento, y luego, tras el agotamiento de glucosa, se utiliza lactosa en la segunda fase

de desarrollo y donde la expresión de los genes del operon lac es máxima (Loomis & Magasanik, 1966).

Otro componente del operon lac y que se encuentra aguas arriba de los ORFs de los genes estructurales es el promotor inducible plac que permite o no la expresión de dichos genes según la concentración de la proteína represora lacI que es producida naturalmente por *E. coli* y a menudo traducida por un casete dentro del plásmido insertado. Esta represión de la transcripción se da mediante la unión de la proteína lacI a los sitios de represión lacO. Cuando los análogos sintéticos IPTG y TMG son añadidos al medio, ingresan a las células por difusión pasiva y se unen a la proteína lacI provocándole un cambio conformacional que altera su afinidad por los sitios lacO. Las proteínas lacI unidas a los sitios lacO se separan y aquellas en el medio no pueden unirse; consecuentemente la transcripción se libera (Marbach & Bettenbrock, 2012) (Figura 3).

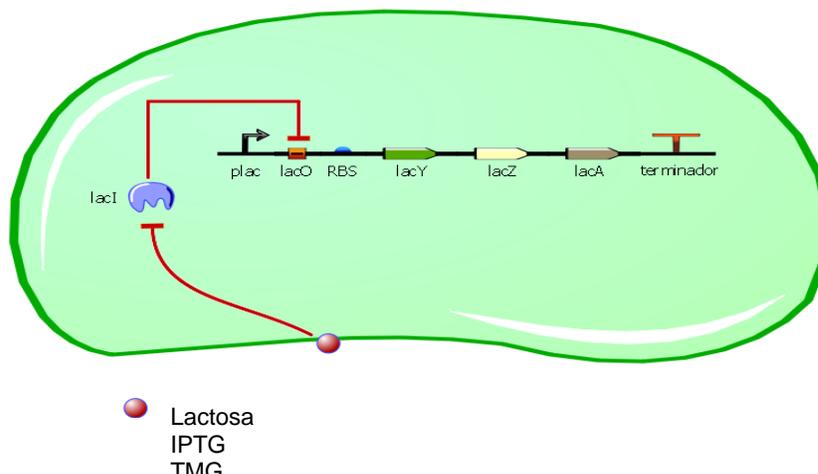


Figura 3. Estructura y funcionamiento del operon lac de *Escherichia coli*. La transcripción del operon lac se activa por unión de moléculas de lactosa y sus análogos sintéticos IPTG y TMG a la proteína de expresión constitutiva lacI

Fuente: (Mosquera, 2019)

2.2 Dominios de unión a celulosa

En esta sección se mencionan las generalidades de los CBDs, así como un énfasis en el CBD de la proteína de andamiaje cipA de *Clostridium thermocellum*, el organismo celulolítico individual más eficiente.

2.2.1 Fundamentos

Los organismos celulolíticos son definidos como aquellos organismos capaces de degradar celulosa para utilizarla como fuente de carbono. El mecanismo de acción involucra sistemas enzimáticos que actúan en diferentes lugares del sustrato celulósico y bajo este criterio los organismos productores pueden ser ubicados en dos grupos (Hirano et al., 2016). Dentro del primer grupo se encuentran algunos hongos filamentosos y bacterias aerobias secretadoras de enzimas celulasas libres que actúan sinérgicamente mientras en el segundo grupo están algunos hongos y organismos anaerobios que producen complejos multienzimáticos (celulosomas) que actúan sobre la superficie celulósica y que pueden ser desplegados en la superficie celular o secretados fuera de ella (Linder & Teeri 1997; Paye et al., 2016).

La mayoría, sino todas las celulasas que degradan efectivamente celulosa cristalina están compuestas por un dominio catalítico y un CBD. Los CBDs son estructuras que mejoran el acoplamiento celulasas-celulosa, aumentando la actividad enzimática (Kruus, Lua, Demain, & Wu, 1995).

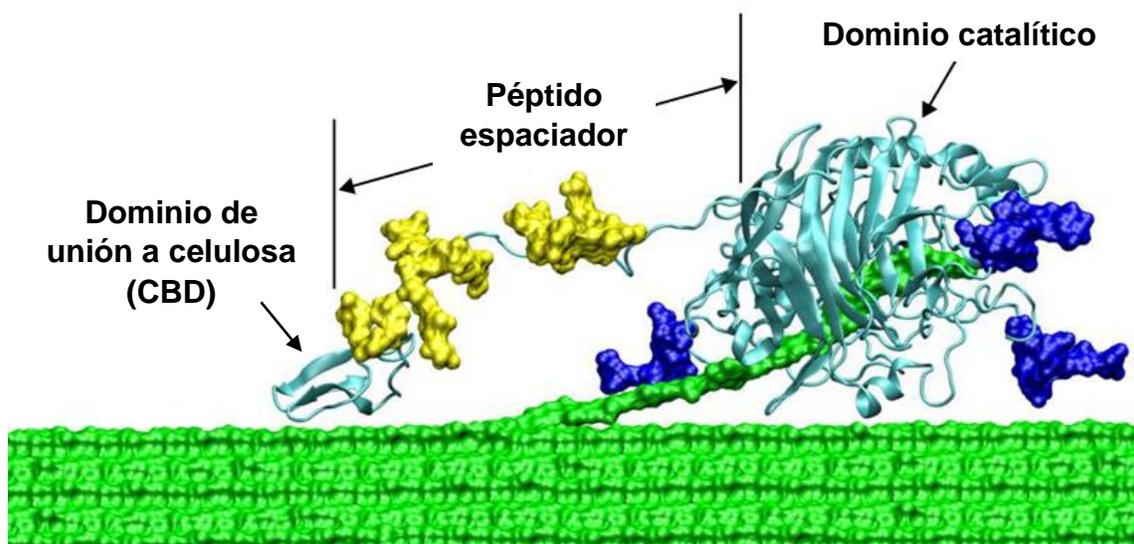


Figura 4. Estructura típica de celulasas altamente eficientes, consistiendo de un dominio de anclaje a sustrato y un dominio catalítico, separados por un péptido espaciador

Fuente: (Burgess-Clifford, 2018)

2.2.2 CBDcipA

Clostridium thermocellum es una bacteria anaerobia que produce ambos tipos de sistemas celulósicos con 25 enzimas libres y 72 proteínas en sus celulosomas que han sido ampliamente estudiados ya que es el organismo celulolítico individual más eficiente (Paye et al., 2016; Q. Xu et al., 2016). El principal componente estructural de los celulosomas de *C. thermocellum* es la proteína de andamiaje cipA que está formada por nueve módulos de cohesina tipo I, un módulo de dockerina tipo II y un CBD conocido por su fuerte unión a celulosa (CBDcipA). A diferencia de la proteína de andamiaje cipA, la ausencia de las proteínas de andamiaje secundarias ha demostrado no repercutir en la degradación eficiente de celulosa (Hirano et al., 2016; Paye et al., 2016).

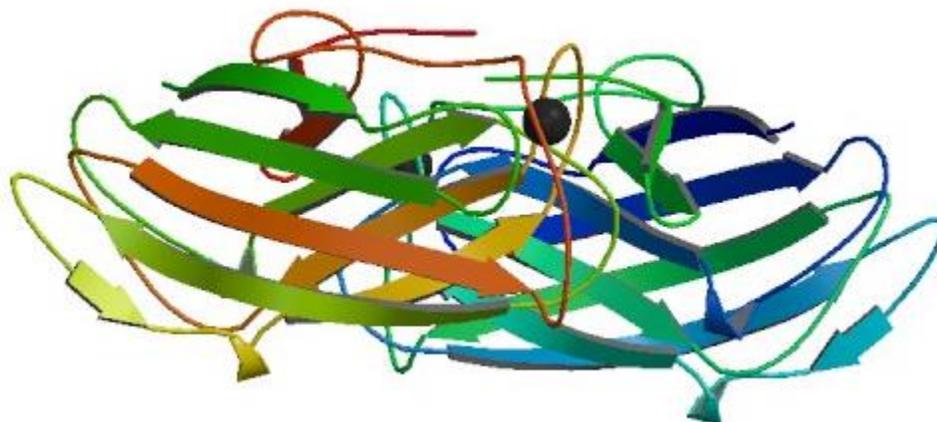


Figura 5. Representación esquemática del dominio de unión a celulosa (CBD) de la proteína de andamiaje cipA de los celulosomas de *Clostridium thermocellum*
Fuente: (Tormo et al., 1996)

2.3 Proteínas morfogénicas óseas

Esta sección aborda las generalidades de las BMPs que constituyen un grupo de citocinas que actúan como factores de crecimiento de hueso, cartílago y tejido conjuntivo. Además, se destaca la BMP2, desde sus antecedentes hasta sus aplicaciones preclínicas y clínicas.

2.3.1 Fundamentos

En 1965, el Dr. Marshall Urist introdujo el término *principio inductivo de hueso* para referirse a una sustancia natural del hueso capaz que inducir la generación del mismo. Sus experimentos demostraron que matrices óseas desmineralizadas implantadas ectópicamente en tejido muscular o debajo de la piel eran capaces de formar hueso en forma autoinductiva donde tanto células inductivas como inducidas eran propias del modelo de estudio (Urist, 1965). El Dr. Urist pasó las siguientes tres décadas aislando y purificando los mencionados principios que hoy en día se conocen como proteínas

morfogénicas óseas (Pecina, Grgurevic, & Vuki, 2017). Se ha descrito que el ser humano produce 20 BMPs agrupadas en tres clases según la homología de sus secuencias aminoacídicas.

Las BMPs son factores de crecimiento clasificados dentro de la súperfamilia de factores de crecimiento transformante β . Su modo de acción es autócrino y parácrino mediante la unión a receptores kinasa serina/treonina tipo I y II de la superficie celular. De esta manera se genera una cascada de señales mediada por las proteínas intermediarias citoplasmáticas Smad 1, 5 y 8 presentes en varios tipos celulares (Chen, Zhao, & Mundy, 2004). Su actividad es influenciada por factores intrínsecos y ambientales. Factores del medio, dosis, matrices de soporte y posición espacial influyen positiva o negativamente de forma directa en la farmacocinética y farmacodinámica repercutiendo en la curación de hueso y cartílago (Sykaras & Opperman, 2003).

2.3.2 BMP2

BMP2 es el factor de crecimiento más importante empleado en el tratamiento clínico de defectos óseos. Es una proteína naturalmente glicosilada; sin embargo, la falta de glicosilación no repercute en su actividad. Su precursor (396 a.a) consiste en una secuencia señal N-terminal (23 a.a.), propéptido (259a.a.) y proteína madura (114 a.a.). Esta forma madura es monomérica y contiene siete residuos de cisteína, seis de los cuales intervienen en el plegamiento, formando las siete cisteínas un puente disulfuro que une dos monómeros que generan el dímero BMP2 biológicamente activo (Karyagina et al., 2017; Pramesti, Suciati, Indrayati, Asjarie, & Retnoningrum, 2012).

Las evaluaciones preclínicas y clínicas han demostrado el potencial osteoinductivo de la BMP2. Utilizando ratas, perros, conejos, ovejas y primates no humanos como modelos animales se demostró la curación de defectos óseos de tamaño crítico en los que era necesaria la intervención médica para su reparación (Murakami, Watabe, Takaoka, & Miyazono, 2003). Considerando la actividad mesenquimal incrementada tras la administración sistémica de BMP2 y su acción sobre defectos óseos relacionados a la edad, se ha determinado que la BMP2 puede ser utilizada para tratar la osteoporosis (Chen et al., 2004). Además, se ha demostrado su utilidad para reconstrucción periodontal en la formación de hueso alrededor de implantes dentales (Cochran & Wozney, 1999).

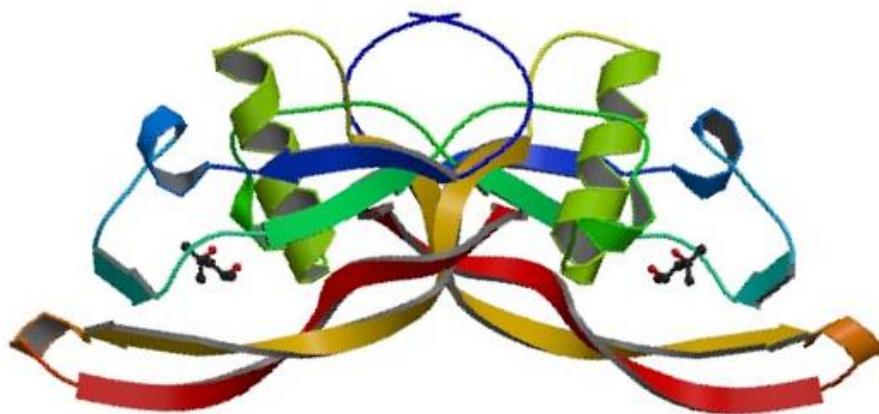


Figura 6. Representación esquemática de la proteína ósea morfogénica humana 2 (BMP2)

Fuente: (Scheufler, Sebalda, & Hülsmeier, 1999)

2.4 Biomateriales

En esta sección se encuentra una revisión de las generalidades de los biomateriales desde una perspectiva histórica hasta los esfuerzos dirigidos a la regeneración de hueso. Luego, se describe a la celulosa desde su aislamiento a partir de materia vegetal como también las características e importancia de la celulosa bacteriana.

2.4.1 Fundamentos

El uso biológico que el ser humano le ha dado a los biomateriales data de tiempos ancestrales. Fueron muy utilizados como implantes dentales, en 600 DC, los mayas aprovecharon los recursos marítimos para formarlos a partir de conchas de nácar ("Boom time for biomaterials," 2009). Por su parte, en China y Egipto los implantes fueron elaborados con marfil (Misch, 1999). En la actualidad, la investigación con biomateriales gira alrededor de infecciones microbianas, higiene, purificación de agua, cuidado de la salud y entrega localizada de medicamentos (Gangadoo & Chapman, 2014).

Como medicina preventiva el cuidado de la salud ha recibido una creciente atención por parte de la sociedad moderna. El rápido avance científico y tecnológico ha permitido pasar del uso empírico de biomateriales como simples estructuras íntegras hacia sistemas complejos funcionales capaces de controlar interacciones biológicas en modelos *in vivo* ("Boom time for biomaterials," 2009; Gangadoo & Chapman, 2014).

A pesar de innovadores enfoques dirigidos a la regeneración de hueso, la completa recuperación del paciente es todavía un desafío clínico en ciertas afecciones como la pseudoartrosis, osteitis y osteomielitis cuyas consecuencias pueden derivar en

la sustitución completa de estructuras óseas por prótesis. Los estándares clínicos actuales para solventar la regeneración de hueso incluyen el trasplante de hueso, espaciadores de cemento cargados con antibiótico, fijación externa e interna y terapia local con BMPs (Winkler, Sass, Duda, & Schmidt-Bleek, 2018).

En condiciones comparables, la administración de proteínas solas ha revelado una menor tasa de retención y curación en relación a su administración utilizando biomateriales. Estos biomateriales pueden ser utilizados en forma de membranas, hidrogeles, tubos capilares, péptidos, entre otros (Schmoekel et al., 2005). Allí la importancia de usar biomateriales como medio de soporte para el despliegue localizado de medicamentos.

2.4.2 Celulosa

El término celulosa (monómero con residuos de glucosa) fue acuñado por primera vez en 1839 por Anselme Payen luego de sus trabajos científicos publicados en 1838 con los cuales logró aislarla. La describió como un material sólido, fibroso remanente del tratamiento de plantas y maderas con ácido nítrico, amoníaco y subsecuentes lavados con agua, alcohol, y éter (Payen & Hebd, 1838).

La biocompatibilidad de celulosa proveniente de plantas ha sido evaluada en modelos *in vivo*. En 1999, Martson y colaboradores llevando a cabo un estudio con una esponja celulósica compuesta por fibras de algodón recubiertas por una matriz porosa obtenida de una solución viscosa, concluyeron que este tipo de celulosa es un material de lenta degradación que comenzó en la semana 16 y no concluyó hasta la semana 60. Sin embargo (Miyamoto, Takahashi, Ito, Inagaki, & Noishiki 1989), utilizando un modelo

canino, concluyeron que la degradación de la celulosa depende significativamente de su forma cristalina y su derivación química.

A pesar de que la celulosa bacteriana (BC) fue descrita por primera vez en 1866 (Brown, 1886), fue en la mitad del siglo XX cuando recibió especial atención con el trabajo de Hestrin & Schramm (1954) dirigido a una síntesis óptima separándola de células productoras de la especie *Acetobacter xylinum*. Debido a su alta pureza, grado de polimerización, resistencia a la tracción y biocompatibilidad, la BC ha sido un material ampliamente estudiado y aplicado en ingeniería de tejidos. Además, ha servido como andamio para la entrega dirigida de drogas y como apósito tópico gracias a sus propiedades de hidrogel para prevenir la deshidratación de las heridas y acelerar la cicatrización (Dougan, Gough, & Eichhorn, 2013).

CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Preparación de células competentes

Células competentes *E. coli* BL21(DE3) fueron preparadas mediante un proceso ligeramente modificado al propuesto por la Organización IGEM. Un mL de células *E. coli* BL21(DE3) criopreservadas fue inoculado en 125 mL de medio SOB (5 g/L de extracto de levadura, 20 g/L de triptona, 0.584 g/L de NaCl, 0.186 g/L de KCl, 2.4 g/L de MgSO₄) y se incubó a temperatura ambiente hasta una absorbancia medida a 600 nm (OD₆₀₀) de aproximadamente 0.3. Luego de transferir el cultivo a tubos plásticos estériles de 50 mL previamente enfriados siguió una centrifugación a 3000 g durante 10 min a 4°C. El sobrenadante fue descartado y el pellet fue resuspendido en 40 mL de buffer CCMB80 (10 mL de una solución 1M de acetato de potasio a pH 7.0, 11.8 g/L de CaCl₂·2H₂O, 4.0 g/L de MnCl₂·4H₂O, 2.0 g/L de MgCl₂·6H₂O y 100mL/L de glicerol; pH final 6.4, esterilizado por filtración) frío y se incubó en hielo por 20 min. Tras centrifugar a 3000 g por 10 min a 4°C se descartó el sobrenadante y el pellet fue resuspendido en 10 mL de buffer CCMB80 frío. Se incubó en hielo por 20 min y se alicuotó en tubos de PCR para luego almacenarlos indefinidamente a -80°C.

3.2 Domesticación de biobricks

3.2.1 Síntesis química de los oligonucleótidos

Los gBlocks necesarios para la formación *in vitro* de las proteínas quimera CBDcipA-BMP2 y CBDcipA-sfGFP (utilizada para evaluar la concentración saturante de IPTG sobre el casete de expresión, así como la fuerza de enlace del CBDcipA con la celulosa bacteriana) fueron codon optimizados para *E. coli*, diseñados para contener un

prefijo y sufijo, y luego sintetizados químicamente (Integrated DNA Technologies, Coralville, USA).

El gBlock A estuvo constituido por un prefijo RFC10 (5'-GAATTCGCGGCCGCTTCTAGAC-3') en extremo N-terminal, seguido de la secuencia del promotor plac con el operador lacO que lo hace inducible por IPTG, la secuencia codificante del CBDcipA con un espaciador endógeno y un sufijo RFC25 (5'-ACCGGTTAATACTAGTAGCGGCCGCTGCAG-3') (Anexo I). El gBlock B estuvo formado por un prefijo RFC25 (5'-GAATTCGCGGCCGCTTCTAGATGGCCGGC-3') en extremo N-terminal, seguido de la secuencia nucleotídica de la BMP2, un doble terminador de la transcripción y un sufijo RFC10 (5'-TACTAGTAGCGGCCGCTGCAG-3') (Anexo II). El gBlock C contuvo el prefijo RFC25 (5'-GAATTCGCGGCCGCTTCTAGATGGCCGGC-3') en extremo N-terminal, la secuencia codificante de la sfGFP, una cola de 6 residuos de histidina, un doble terminador de la transcripción y un sufijo RFC10 (5'-TACTAGTAGCGGCCGCTGCAG-3') (Anexo III).

3.2.2 Adaptación de los extremos N-terminal y C-terminal

Dado que la actividad nucleasa de las enzimas de restricción precisa de bases extra a los lados del sitio de corte, se llevó a cabo una PCR utilizando la polimerasa de alta fidelidad Q5 (New England Biolabs, USA) y los primers Eco-Fu (5'-CCGGAATTCGCGGCCGCTTCTAG-3') y Pst-Fu (5'-AAACTGCAGCGGCCGCTACTAG-3') para añadir dichas bases.

El ajuste de reacción para la polimerasa Q5 y las condiciones de PCR de los gBlocks A, B y C aparecen descritas en la Tabla 2 y Tabla 3, respectivamente.

Tabla 2

Ajuste de reacción para la polimerasa Q5

Componente	Reacción 50 uL	Concentración Final
5X Q5 Reaction Buffer	10 uL	1X
10 mM dNTPs	1 uL	200 uM
10 uM Forward Primer	2.5 uL	0.5 uM
10 uM Reverse Primer	2.5 uL	0.5 uM
Polimerasa Q5	0.5 uL	0.02 U/uL
ADN template	2 uL	100 ng
Agua de PCR	31.5 uL	

Fuente: (Mosquera, 2019)

Tabla 3

Condiciones de PCR para los gBlocks A, B, y C

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo (s)
Desnaturalización inicial	98	30
30 ciclos	98	10
	72	25
	72	25
Extensión final	72	120
Almacenamiento	10	∞

Fuente: (Mosquera, 2019)

Los productos de PCR fueron purificados usando el PCR Purification Combo Kit, siguiendo las instrucciones del fabricante (Invitrogen, USA).

3.3 Ensamblaje de fusión

3.3.1 Digestión

Cuarenta nanogramos del plásmido psb1A3 fueron digeridos con 0.4 uL del Mix C (Tabla 4). De manera similar, 4 uL del purificado A fueron digeridos con 1uL del Mix A (Tabla 4), 4 uL del purificado B tratados con 1 uL del Mix B (Tabla 4) y 4 uL del purificado C con 1uL del Mix B. Las digestiones fueron a 37°C por 2h, seguidas de una inactivación a 85°C por 20 min.

Tabla 4

Composición de los Mix A, B y C utilizados para digerir los productos de PCR purificados A, B, y C.

Componente	Mix A (3X)	Mix B (3X)	Mix C (3X)
Agua libre de nucleasas	0.69 uL	-	-
NEBuffer 1.1 10X	1.50 uL	-	-
EcoRI (15 U/uL)	0.20 uL	-	-
Agel (5U/uL)	0.60 uL	-	-
NEBuffer 4 10X	-	1.50 uL	-
PstI (10 U/uL)	-	0.51 uL	-
NgoMIV (10 U/uL)	-	0.51 uL	-
BSA 0.1%	-	0.48 uL	-
Buffer O 10X	-	-	1.74uL
EcoRI (15 U/uL)	-	-	0.51 uL
PstI (10 U/uL)	-	-	0.75 uL

Fuente: (Mosquera, 2019)

3.3.2 Ligación

Para ensamblar la proteína de fusión CBDcipA-BMP2 se mezclaron 2uL del digerido A, 2 uL del digerido B y 1 uL del plásmido digerido psb1A3 con 5 uL del Mix de Ligación (Tabla 5). De manera similar, para ensamblar la proteína CBDcipA-sfGFP se mezclaron 2 uL del digerido A, 2 uL del digerido C y 1 uL del plásmido digerido psb1A3 con 5 uL del Mix de Ligación. Ambas reacciones consistieron de una etapa de ligación a

16°C toda la noche, seguida de una inactivación a 70°C por 30 min. A estos vectores ensamblados de manera in vitro se los denominó psb1-CBDcipA-BMP2 y psb1A3-CBDcipA-sfGFP.

Tabla 5
Composición del Mix de Ligación.

Componente	Volumen (uL)
Agua libre de nucleasas	7.0
10x T4 DNA Ligase buffer	2.0
T4 DNA Ligase (1U/uL)	1.0
Volumen total	20

Fuente: (Mosquera, 2019)

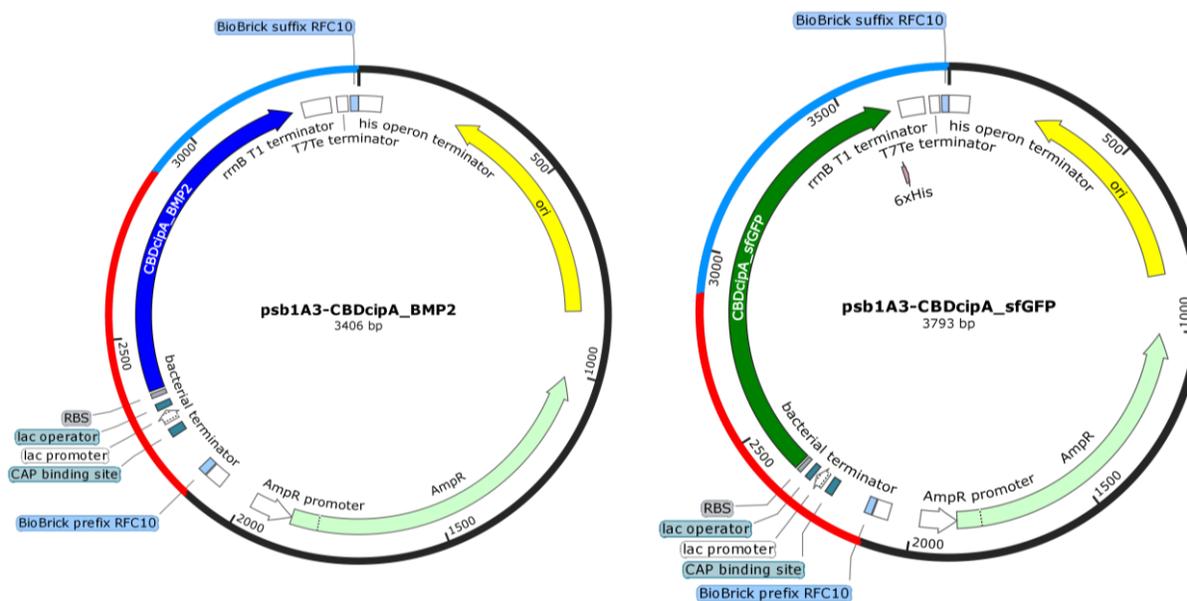


Figura 7. Estructura de los plásmidos (A) psb1A3-CBDcipA-BMP2 y (B) psb1A3-CBDcipA-sfGFP.

Fuente: (Mosquera, 2019)

3.4 Transformación de *Escherichia coli*

Los vectores psb1-CBDcipA-BMP2 y psb1A3-CBDcipA-sfGFP fueron transformados por separado en *E. coli* BL21(DE3). Para cada transformación, en un tubo de 1.5 mL o 2.0 mL se mezclaron 70 uL de células competentes *E. coli* BL21(DE3) con 6 uL del vector ensamblado homogenizando por pipeteo y se incubó en hielo por 20 min. Luego de provocar un shock térmico a 42°C por 45 s e incubar en hielo por 4 min, se añadieron 800 uL de medio SOC (5 g/L de extracto de levadura, 20 g/L de triptona, 0.584 g/L de NaCl, 0.186 g/L de KCl, 2.4 g/L de MgSO₄, 3.6 g/L de glucosa) para promover su crecimiento cultivándolas a 37°C por 1.5 h a 300 rpm. A continuación, el cultivo fue centrifugado a 700g por 4 min, se descartó 600 uL del sobrenadante y en el volumen restante se resuspendió el pellet por homogenización de donde 100 uL fueron tomados para sembrar en medio ágar LB con ampicilina (0.1 mg/mL) como marcador de selección.

3.5 Selección de los transformantes

La selección de las *E. coli* BL21(DE3) conteniendo el plásmido psb1A3-CBDcipA-BMP2 y psb1A3-CBDcipA-sfGFP se llevó a cabo mediante la técnica PCR de colonia a partir de un cultivo incubado a 37°C por 18 h. Una punta de micropipeta de 0.2-10 uL estéril fue utilizada para topar suave y superficialmente las colonias bacterianas, sumergirla en tubos de PCR conteniendo 20 uL de agua estéril y homogenizar por pipeteo de donde se tomó 1 uL como ADN template en la reacción de PCR (Tabla 6) cuyas condiciones son descritas en la Tabla 7. Los células transformadas conteniendo el constructo deseado fueron sembrados en ágar LB con ampicilina (0.1 mg/mL) y posteriormente criopreservadas.

Tabla 6*Ajuste de la PCR de colonia para selección de transformantes.*

Componente	Reacción 20 uL	Concentración Final
DreamTaq PCR Master Mix (2X)	10 uL	1X
10 uM Forward Primer	1.0 uL	0.5 uM
10 uM Reverse Primer	1.0 uL	0.5 uM
ADN template	1.0 uL	10 pg – 1 ug
Agua de PCR	7.0 uL	

Fuente: (Mosquera, 2019)

Tabla 7*Condiciones de la PCR de colonia para selección de transformantes*

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (s)
Desnaturalización inicial	98	150
30 ciclos	98	10
	72	25
	72	25
	72	25
Extensión final	72	120
Almacenamiento	10	∞

Fuente: (Mosquera, 2019)

3.6 Modelo matemático de la expresión de las proteínas recombinantes

3.6.1 Internalización del inductor IPTG en *Escherichia coli*

El IPTG ingresa a las células de *E. coli* de manera dependiente de su concentración. Su internalización es mediada por la lactosa permeasa y difusión pasiva a bajas y altas concentraciones, respectivamente (Ukkonen & Vasala, 2015). La internalización por difusión pasiva puede ser descrita con una ecuación diferencial ordinaria (EDO) (Ecuación 1) derivada de la ley de acción de masas.



$$\frac{d\text{IPTG}_{\text{int}}}{dt} = k_{\text{IPTGupt}}[\text{IPTG}]_{\text{ext}} - k_{\text{IPTGout}}[\text{IPTG}]_{\text{int}}$$

Ecuación 1

donde $[\text{IPTG}]_{\text{ext}}$ e $[\text{IPTG}]_{\text{int}}$ son las concentraciones de IPTG fuera y dentro de la célula, respectivamente; k_{IPTGupt} es la tasa de internalización de IPTG (0.92 min^{-1}) y k_{IPTGout} es su tasa de salida (0.05 min^{-1}) (TUDelft, 2009).

La interacción entre IPTG y LacI es considerada rápida cuando la concentración de IPTG excede largamente la concentración de LacI. La concentración del LacI que activamente reprime la expresión de la proteína de interés ($[\text{LacI}]_{\text{act}}$) puede ser descrita con la ecuación de Hill (Ecuación 2) (Semsey et al., 2014; Ukkonen & Vasala, 2015).

$$[\text{LacI}]_{\text{act}} = \frac{[\text{LacI}]_{\text{TOTAL}}}{1 + \left(\frac{[\text{IPTG}]_{\text{int}}}{K_{\text{IPTG}}}\right)^{h_{\text{IPTG}}}}$$

Ecuación 2

donde K_{IPTG} es la constante de Michaelis-Menten del enlace IPTG-LacI, h_{IPTG} es el coeficiente de Hill asociado (2) (Ozbudak, Thattai, Lim, Shraiman, & Van Oudenaarden, 2004; TUDelft, 2009) y $[\text{LacI}]_{\text{TOTAL}}$ es la concentración del represor LacI en *E. coli*. Dado que los plásmidos del presente estudio carecen de un casete de expresión constitutiva de LacI, se trabajó únicamente con la concentración producida naturalmente en *E. coli* (10nM) (Kalisky, Dekel, & Alon, 2007).

3.6.2 Producción inducida por IPTG de las proteínas de fusión

La concentración de los ARNm CBDcipA-BMP2 ($[\text{CBD} - \text{BMP2}]_{\text{ARNm}}$) y CBDcipA-sfGFP ($[\text{CBD} - \text{sfGFP}]_{\text{ARNm}}$) a un tiempo t puede ser descrita matemáticamente por la Ecuación 3 y Ecuación 4, respectivamente.

$$\frac{d[\text{CBDcipA} - \text{BMP2}]_{\text{ARNm}}}{dt} = k_{\text{Plac}} \left(\alpha + (1 - \alpha) \frac{1}{1 + \left(\frac{[\text{LacI}]_{\text{act}}}{K_{\text{LacI}}} \right)^{h_{\text{LacI}}}} \right) - \delta [\text{CBDcipA} - \text{BMP2}]_{\text{ARNm}}$$

Ecuación 3

$$\frac{d[\text{CBDcipA} - \text{sfGFP}]_{\text{ARNm}}}{dt} = k_{\text{Plac}} \left(\alpha + (1 - \alpha) \frac{1}{1 + \left(\frac{[\text{LacI}]_{\text{act}}}{K_{\text{LacI}}} \right)^{h_{\text{LacI}}}} \right) - \delta [\text{CBDcipA} - \text{sfGFP}]_{\text{ARNm}}$$

Ecuación 4

donde k_{Plac} es la tasa de transcripción máxima del promotor Plac (0.5 nM min^{-1}); α es el factor de fugacidad del casete, $\left(\frac{[\text{LacI}]_{\text{act}}}{K_{\text{LacI}}} \right)^{h_{\text{LacI}}}$ es la función represora de Hill donde K_{LacI} es la constante de Michaelis de la unión de la proteína LacI con el promotor Plac (1 nM), h_{LacI} es el coeficiente de Hill asociado (2) y δ es la tasa de degradación de los ARNms (Ozdubak, Thattai, Lim, Shraiman, & Van Oudenaarden, 2004; TUDelft, 2009). La concentración de las proteínas CBDcipA-BMP2 ($[\text{CBDcipA} - \text{BMP2}]$) y CBDcipA-sfGFP ($[\text{CBDcipA} - \text{sfGFP}]$) pueden ser descritas con la Ecuación 5 y Ecuación 6, respectivamente.

$$\frac{d[\text{CBD} - \text{BMP2}]}{dt} = \beta_{\text{CB}} [\text{CBD} - \text{BMP2}]_{\text{ARNm}} - \sigma [\text{CBD} - \text{BMP2}]$$

Ecuación 5

$$\frac{d[\text{CBD} - \text{sfGFP}]}{dt} = \beta_{\text{CG}}[\text{CBD} - \text{sfGFP}]_{\text{ARNm}} - \sigma[\text{CBD} - \text{sfGFP}]$$

Ecuación 6

donde β_{CB} y β_{CG} son las tasas de traducción de [CBDcipA – BMP2] y de [CBDcipA – sfGFP], respectivamente; y σ es la tasa de degradación de [CBDcipA – BMP2] y [CBDcipA – sfGFP]. Las EDOs fueron resueltas con el método de Euler usando el lenguaje Python en Spyder 3.6 (Anaconda).

3.6.3 Estabilidad de los nodos

La estabilidad en los puntos de equilibrio fue determinada según los eigenvalues de las matrices jacobianas derivadas de la linealización de las EDOs de los Sistemas de EDOs 1 y 2. Cada Sistema se compone de 2 EDOs (f_1 y f_2) que originan una matriz jacobiana 2x2 (Matriz 1).

$$\frac{d[\text{CBDcipA} - \text{BMP2}]_{\text{ARNm}}}{dt} = k_{\text{Plac}} \left(\alpha + (1 - \alpha) \frac{1}{1 + \left(\frac{[\text{LacI}]_{\text{act}}}{K_{\text{lacI}}} \right)^{h_{\text{lacI}}}} \right) - \delta[\text{CBDcipA} - \text{BMP2}]_{\text{ARNm}}$$

$$\frac{d[\text{CBD} - \text{BMP2}]}{dt} = \beta_{\text{CB}}[\text{CBD} - \text{BMP2}]_{\text{ARNm}} - \sigma[\text{CBD} - \text{BMP2}]$$

Sistema de EDOs 1

$$\frac{d[\text{CBDcipA} - \text{sfGFP}]_{\text{ARNm}}}{dt} = k_{\text{Plac}} \left(\alpha + (1 - \alpha) \frac{1}{1 + \left(\frac{[\text{LacI}]_{\text{act}}}{K_{\text{lacI}}} \right)^{h_{\text{lacI}}}} \right) - \delta[\text{CBDcipA} - \text{sfGFP}]_{\text{ARNm}}$$

$$\frac{d[\text{CBD} - \text{sfGFP}]}{dt} = \beta_{\text{CG}}[\text{CBD} - \text{sfGFP}]_{\text{ARNm}} - \sigma[\text{CBD} - \text{sfGFP}]$$

Sistema de EDOs 2

$$J_{\text{F}}(r, \theta) = \begin{bmatrix} \frac{\partial f_1}{\partial r} & \frac{\partial f_1}{\partial \theta} \\ \frac{\partial f_2}{\partial r} & \frac{\partial f_2}{\partial \theta} \end{bmatrix}$$

Matriz 1

donde r, θ representan las especies moleculares ARNm y proteína que son variables en los Sistemas 1 y 2.

3.7 Determinación de la concentración saturante de IPTG y cuantificación de proteína recombinante

Utilizando una microplaca de 96 pocillos se hizo una dilución 1:10 de un cultivo de 16 h de *E. coli* BL21(DE3) conteniendo el plásmido psb1A3-CBDcipA-sfGFP en caldo LB con ampicilina (0.1 mg/mL) y seis niveles de IPTG (0 uM, 0.01 uM, 0.1 uM, 2 uM, 20 uM y 100 uM) como variable independiente del ensayo. Se realizaron 5 repeticiones por cada nivel (Figura 8). La OD600 e intensidad de fluorescencia normalizada (IFN, Ecuación 6) fueron medidas con un intervalo de 5 min por 24 h utilizando el sistema Cytation 5 (BioTek, USA) bajo las condiciones experimentales de cultivo anotadas en la Tabla 8.

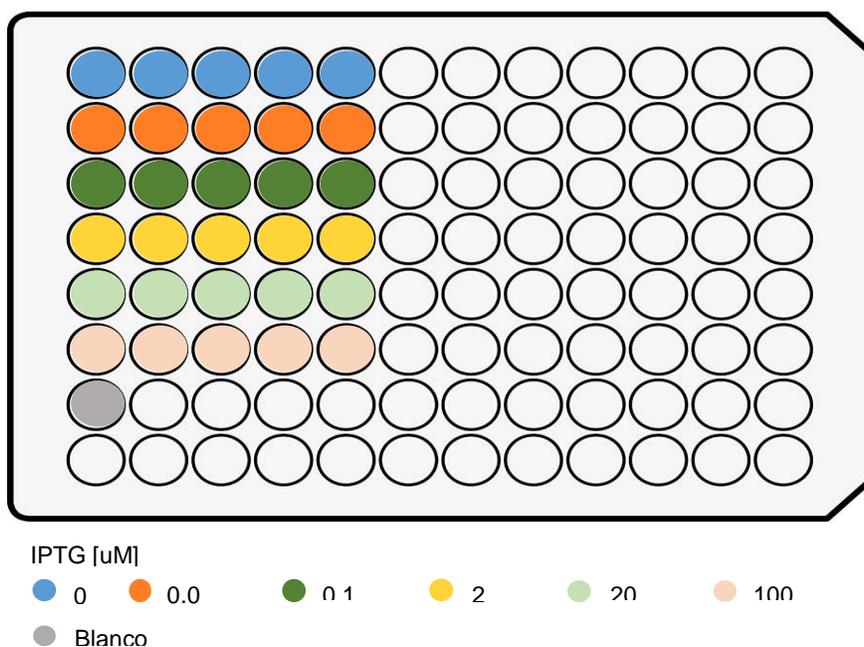


Figura 8. Esquema del experimento para determinar la concentración saturante de IPTG y cuantificar la expresión de la proteína de fusión CBDcipA-sfGFP. Seis niveles de IPTG entre 0 μM y 100 μM con cinco repeticiones fueron ensayados

Fuente: (Mosquera, 2019)

Tabla 8

Parámetros experimentales para medir la OD600 e intensidad de fluorescencia.

Parámetro	Descripción
Número de réplicas	5
Temperatura	37°C
Agitación	Doble orbital: continuo
	Frecuencia: 425 cpm (3 mm)
Absorbancia-OD	600 nm
Excitación, Emisión	485/20, 528/20
Óptica	Fondo
Ganancia	Extendida

Fuente: (Mosquera, 2019)

$$\text{IFN} = \frac{\text{IF}_{\text{muestra}} - \text{IF}_{\text{blanco}}}{\text{OD600}}$$

Ecuación 6

3.8 Expresión de las proteínas recombinantes

Para evaluar las fracciones solubles e insolubles de las proteínas recombinantes las cepas de *E. coli* BL21(DE3) portadoras del plásmido psb1A3-CBDcipA-BMP2 y psb1A3-CBDcipA-sfGFP fueron cultivadas por 16 h a 37°C y 150 rpm en caldo LB conteniendo ampicilina (0.1 mg/mL). Luego se añadió IPTG a una concentración final 1mM para saturar la expresión y se incubó por 6 h a 37°C y 150 rpm. El pellet bacteriano fue recolectado por centrifugación a 9000 g por 3 min y luego resuspendido en 350 uL de buffer STET (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.1 M NaCl, 1 mM EDTA, y 5% [m/V] TRITON® X-100). Después de añadir 25 uL de una solución fresca de lisozima (10 mg/mL en 10 mM Tris-HCl, pH 8.0) se agitó en vórtex por 12 s y se incubó la mezcla por 30 min a 37°C. Luego los tubos fueron colocados en agua a 92°C por 40 s y se centrifugaron a 14 000 g. El sobrenadante y el pellet fueron separados para analizar la fracción soluble e insoluble de proteína recombinante vía electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Los ensayos fueron realizados por duplicado para cada proteína.

La SDS-PAGE se llevó a cabo usando el sistema Mini-PROTEAN Tetra Cell (BioRad, USA) con geles de poliacrilamida de separación al 8% (5.4 mL de agua destilada, 2 mL de acrilamida/bisacrilamida líquida al 40%, 2.5 mL Tris-HCl 1.5 M, 0.4% de SDS, pH 8.8 (Buffer Lower), 50 µL de APS 10% y 10 µL de TEMED) y de concentración al 4% (3.2 mL de agua destilada, 0.5 mL de acrilamida/bisacrilamida líquida al 40%, 1.25 mL de buffer Tris-HCl 0.5 M, 0.4% de SDS, pH 6.8 (Buffer Upper), 25 µL de APS 10%, 5 µL de TEMED).

Luego de la corrida electroforética por 2 h a 120 V, el gel fue sumergido en la solución de tinción (azul de Coomassie R-250 0.5%, metanol 25% y ácido acético glacial 50%) por 48 h a temperatura ambiente. El exceso de colorante fue tratado con solución de lavado (metanol 10% y ácido acético glacial 10%) por 6 h a temperatura ambiente.

3.9 Obtención de celulosa bacteriana

La obtención de BC se llevó a cabo con ligeras modificaciones a la metodología Goh y colaboradores (2012). En un frasco de vidrio se agregó 1 L de agua hervida, tres bolsas (aproximadamente 6.0 g) de té negro y 100 g de azúcar comercial. Las bolsas de té fueron agitadas por 5 min. Cuando la temperatura descendió a 30°C se agregaron 10 mL de ácido acético al 50% (V/V) para acidificar el medio y evitar el crecimiento de organismos no deseados. Luego se removieron las bolsas de té y se agregaron pequeñas piezas de un cultivo simbiótico de hongos y bacterias “*Scooby*”, preliminarmente obtenidas en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE. El frasco se tapó y se permitió la fermentación por 14 días (Figura 9) donde cada 2 se destapó por 2 minutos en condiciones estériles para favorecer el intercambio gaseoso.



Figura 9. Preparación de celulosa bacteriana

Fuente: (Mosquera, 2019)

Transcurrido el tiempo de fermentación se procedió a limpiar las películas de celulosa húmedas tratándolas por 2 h a 90°C y hervidas por 20 min en una solución 0.5 M de NaOH, lavadas varias veces con agua desionizada, remojadas por 2 días en solución 1% de NaOH y finalmente lavadas 4 veces con agua desionizada.

3.10 Caracterización de la fuerza de enlace de la proteína recombinante a la celulosa bacteriana

La fuerza de enlace de las proteínas recombinantes CBDcipA-BMP2 y CBDcipA-sfGFP es una propiedad del dominio N-terminal CBDcipA que interactúa con la BC y permite la unión de la proteína quimera cuya fuerza fue caracterizada por lavados utilizando la proteína CBDcipA-sfGFP ya que la fluorescencia puede ser cuantificada.

El primer paso de este ensayo consistió en la preparación de finas membranas homogéneas de BC acopladas dentro de los pocillos de una microplaca. Treinta gramos de celulosa bacteriana tratada alcalinamente fueron licuados por 12 min con 150 mL de agua desionizada. De la pasta homogénea obtenida 120 uL fueron agregados en los pocillos de la microplaca y se secó a 37°C por 22.5 h. Dentro de cada pocillo se colocaron 100 uL de la fracción soluble de la proteína CBDcipA-sfGFP y se dejó incubó por 18 h a 4°C para favorecer la interacción de la proteína con la BC. De manera similar se usó un extracto de GFP wild type (GFPwt) como control negativo. El siguiente paso fue evaluar la fluorescencia remanente luego de lavar 3 veces los pocillos conteniendo BC y la proteína CBDcipA-sfGFP o GFP con una solución 1X de fluido corporal simulado (SFB,

por sus siglas en inglés) (140 mM NaCl, 4.23 mM NaHCO₃, 3.02 mM KCl, 1.01 mM K₂HPO₄, 1.53 mM MgCl₂·6H₂O, 2.63 mM CaCl₂·2H₂O, 0.51 mM Na₂SO₄, 50.5 mM Tris-Base, pH 7.4) (Srinivasan & Rajendran, 2015). Cada tratamiento fue realizado con 8 repeticiones.

CAPÍTULO IV: RESULTADOS

4.1 Ensamblaje de fusión

Los productos de PCR correspondientes a los biobricks A, B y C obtenidos con los primers Eco-Fu y Pst-Fu para añadir bases extras a los extremos N-terminal y C-terminal para permitir la acción de las enzimas EcoRI y PstI y que fueron luego purificados se utilizaron para ensamblar *in vitro* el casete de expresión de cada una de las dos proteínas de fusión dentro del plásmido psb1A3 cuya prueba de concepto fue evidenciada realizando una PCR de colonia verificando que la longitud del producto fue la esperada por la unión del gBlock A con gBlock B (CBDcipA-BMP2: 1301 bp) y gBlock A con gBlock C (CBDcipA-sfGFP: 1688 bp) (Figura 10).

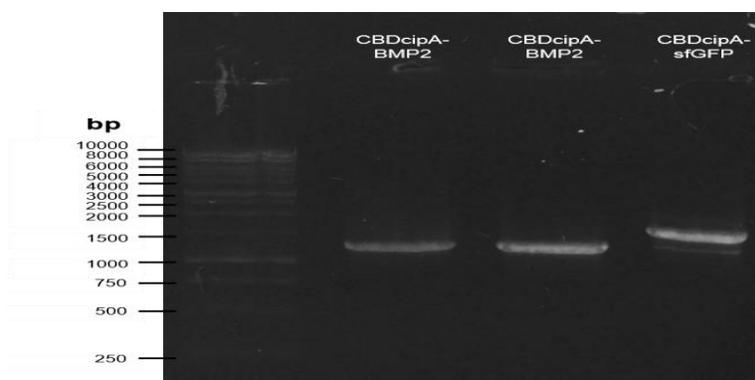


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa (1% m/V) de los productos de PCR de colonia de bacterias conteniendo el casete de expresión para CBDcipA-BMP2 (Carril 2 y 3) y CBDcipA-sfGFP (Carril 4)

Fuente: (Mosquera, 2019)

Luego se procedió a sembrar en medio ágar LB con ampicilina (0.1 mg/mL) las colonias transformadas con el plásmido psb1A3-CBDcipA-BMP2 (Figura 11A) y psb1A3-CBDcipA-sfGFP (Figura 11B).

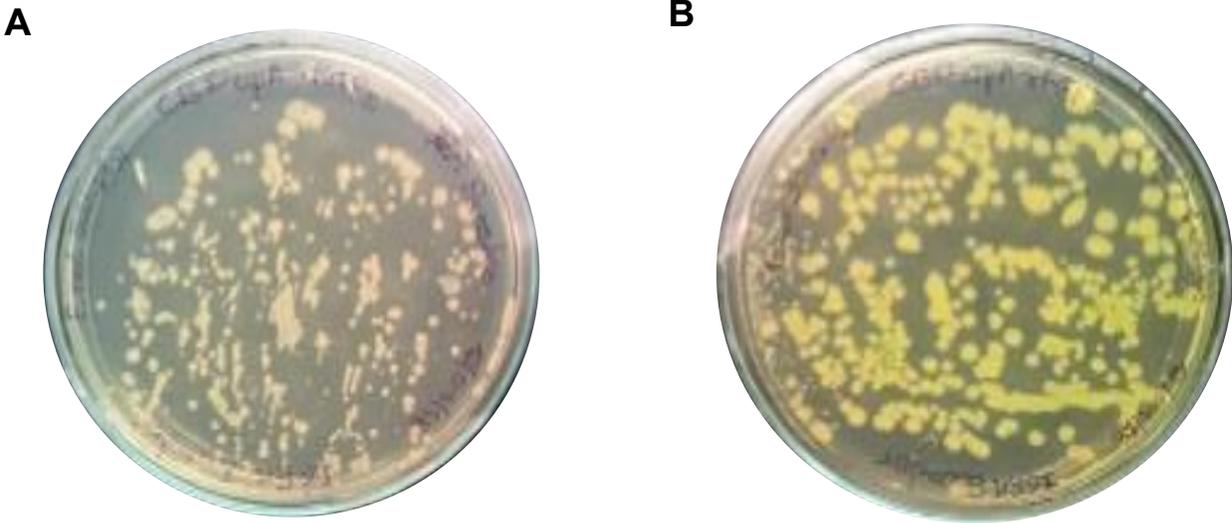


Figura 11. Cultivos puros de *E. coli* BL21(DE3) codificando las proteínas (A) CBDcipA-BMP2 y (B) CBDcipA-sfGFP

Fuente: (Mosquera, 2019)

4.2 Modelo matemático de la expresión de las proteínas recombinantes

4.2.1 Internalización del inductor IPTG en *Escherichia coli*

La Ecuación 7 es una EDO que describe $[IPTG]_{int}$ con respecto al tiempo, la variable $[IPTG]_{ext}$ es igual a la concentración de IPTG total ($[IPTG]_{TOTAL}$) añadida en el medio de cultivo menos $[IPTG]_{int}$,

$$\frac{dIPTG_{int}}{dt} = k_{IPTGupt}([IPTG]_{TOTAL} - [IPTG]_{int}) - k_{IPTGout}[IPTG]_{int}$$

Ecuación 7

En la Ecuación 7 se distinguen dos términos, $k_{IPTGupt}([IPTG]_{TOTAL} - [IPTG]_{int})$ es la tasa de avance del ingreso de IPTG (Forward Rate) y $k_{IPTGout}[IPTG]_{int}$ es la tasa de retroceso (Backward rate),

$$\frac{d\text{IPTG}_{\text{int}}}{dt} = \underbrace{k_{\text{IPTG}_{\text{Gupt}}}([\text{IPTG}]_{\text{TOTAL}} - [\text{IPTG}]_{\text{int}})}_{\text{Forward rate}} - \underbrace{k_{\text{IPTG}_{\text{Gout}}}[\text{IPTG}]_{\text{int}}}_{\text{Backward rate}}$$

En el estado estacionario, la solución puede determinarse graficando las Ecuaciones 8 y 9, normalizando la $[\text{IPTG}]_{\text{int}}$ (Figura 12).

$$\text{Forward rate} = k_{\text{IPTG}_{\text{Gupt}}}([\text{IPTG}]_{\text{TOTAL}} - [\text{IPTG}]_{\text{int}})$$

Ecuación 8

$$\text{Backward rate} = k_{\text{IPTG}_{\text{Gout}}}[\text{IPTG}]_{\text{int}}$$

Ecuación 9

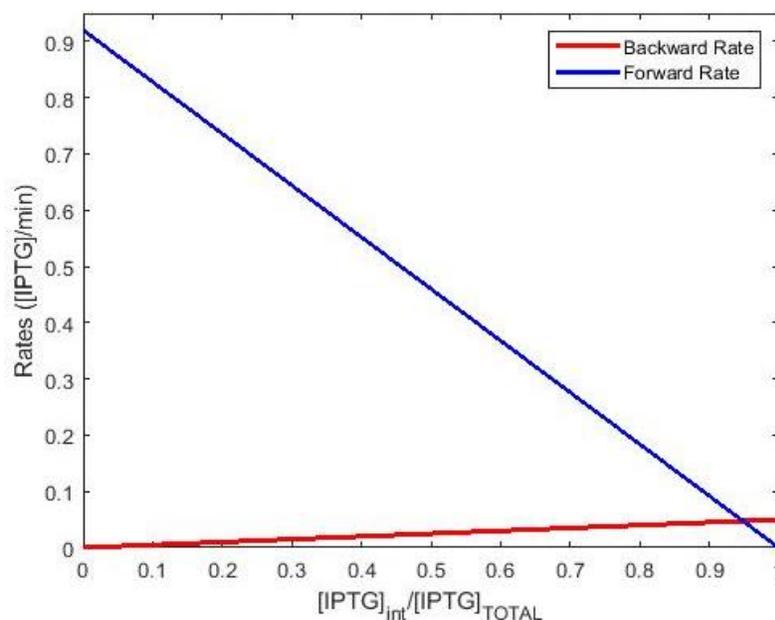


Figura 12. Balance de tasas de avance y retroceso de la difusión de IPTG a través de la membrana de *E. coli*.

El punto de intersección corresponde al estado estacionario

Fuente: (Mosquera, 2019)

El punto de intersección de las rectas (Figura 12) corresponde al estado estacionario cuando la $[IPTG]_{int}$ se mantiene constante en el tiempo y cuyo valor estimado por el modelo matemático es 94.845% de la $[IPTG]_{TOTAL}$ añadida al sistema.

La Ecuación 2, útil para conocer la $[LacI]_{act}$ que influye en la expresión de las especies moleculares queda entonces definida en términos de constantes y de la $[IPTG]_{TOTAL}$ añadida por el sujeto,

$$[LacI]_{act} = \frac{[LacI]_{TOTAL}}{1 + \left(\frac{0.94845[IPTG]_{TOTAL}}{K_{IPTG}} \right)^{h_{IPTG}}}$$

Ecuación 10

4.2.2 Expresión de las especies moleculares

De acuerdo a los resultados derivados del sistema de EDOs 1 y 2, la concentración máxima de las proteínas CBDcipA-BMP2 y CBDcipA-sfGFP sin inductor IPTG fue de 542.85 uM y 376.20 uM respectivamente. Con 0.01 uM de IPTG la concentración fue aproximadamente la misma con 543.57 uM de CBDcipA-BMP2 y 376.70 uM de CBDcipA-sfGFP. En contraste, a concentraciones de IPTG igual o mayores a 0.1 uM el sistema se satura y la expresión se libera a su máximo nivel con valores de 570.79 uM y 395.56 uM de CBDcipA-BMP2 (Figura 13A) y CBDcipA-sfGFP (Figura 13B), respectivamente. Dichos valores constituyen puntos de equilibrio en estos sistemas de expresión. Estos datos sirvieron para predecir que la concentración saturante de IPTG estaría entre 0.010 uM y 10 uM.

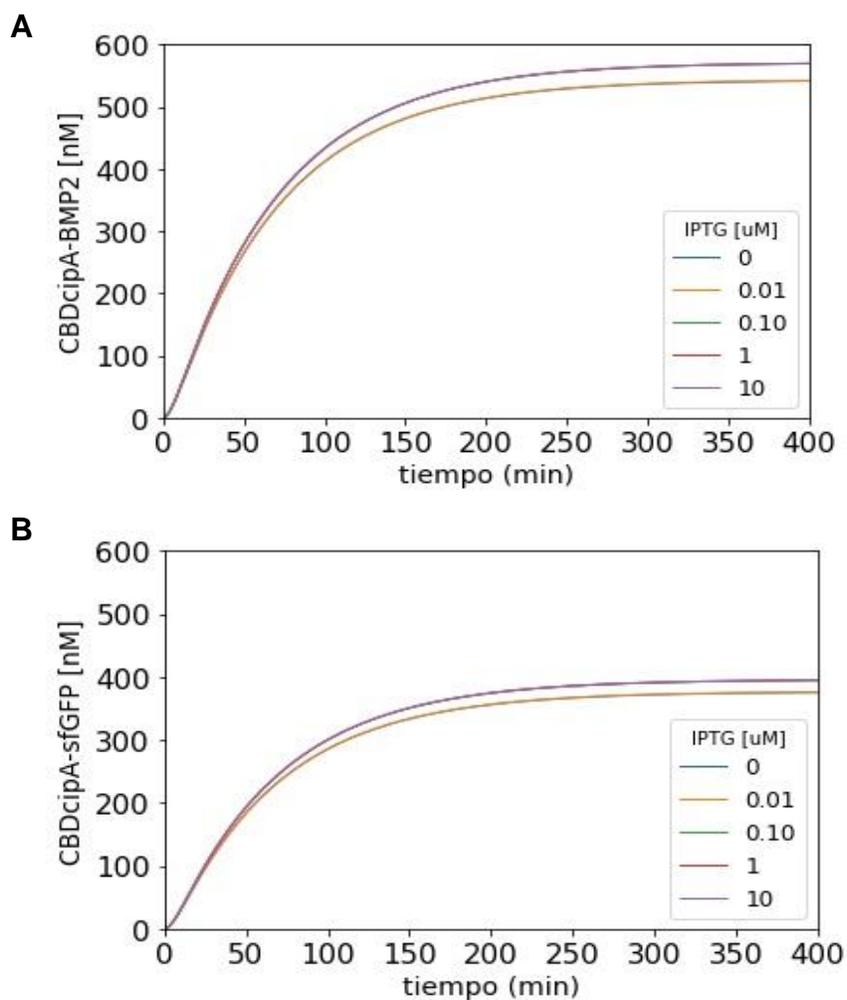


Figura 13. Simulación de la expresión de las proteínas **(A)** CBDcipA-BMP2 y **(B)** CBDcipA-sfGFP bajo distintas concentraciones de IPTG

Fuente: (Mosquera, 2019)

4.2.3 Estabilidad de los nodos

Para determinar si los puntos de equilibrio son estables o inestables se realizaron linealizaciones Jacobianas al Sistema de EDOs 1 y 2 resumidas en una matriz para CBDcipA-BMP2 (Matriz 2) y otra para CBDcipA-sfGFP (Matriz 3). Los eigenvalues en

ambas matrices tienen valores negativos lo que define a los puntos de equilibrio de los dos sistemas de expresión como nodos estables.

$$J_F(\overrightarrow{\text{CBDcipA} - \text{BMP2}}) = \begin{bmatrix} -0.192 & 0 \\ 3.290 & -0.015 \end{bmatrix}$$

Matriz 2

$$J_F(\overrightarrow{\text{CBDcipA} - \text{sfGFP}}) = \begin{bmatrix} -0.192 & 0 \\ 2.280 & -0.015 \end{bmatrix}$$

Matriz 3

4.3 Determinación de la concentración saturante de IPTG y cuantificación de proteína recombinante

La Figura 14 corresponde a la cinética de expresión de la proteína CBDcipA-sfGFP inducida con seis niveles de IPTG que actúan sobre las regiones reguladoras, ubicadas aguas arriba de los ORFs de las proteínas CBDcipA-BMP2 y CBDcipA-sfGFP. Comparando con las demás concentraciones de IPTG, la inducción con 100 μM incrementó la expresión proteínica, medida en unidades arbitrarias, hasta las 10.24 h del cultivo transformado de *E. coli* BL21(DE3), tiempo luego del cual se produjo un efecto contrario reduciendo progresivamente la expresión proteínica (Figura 14).

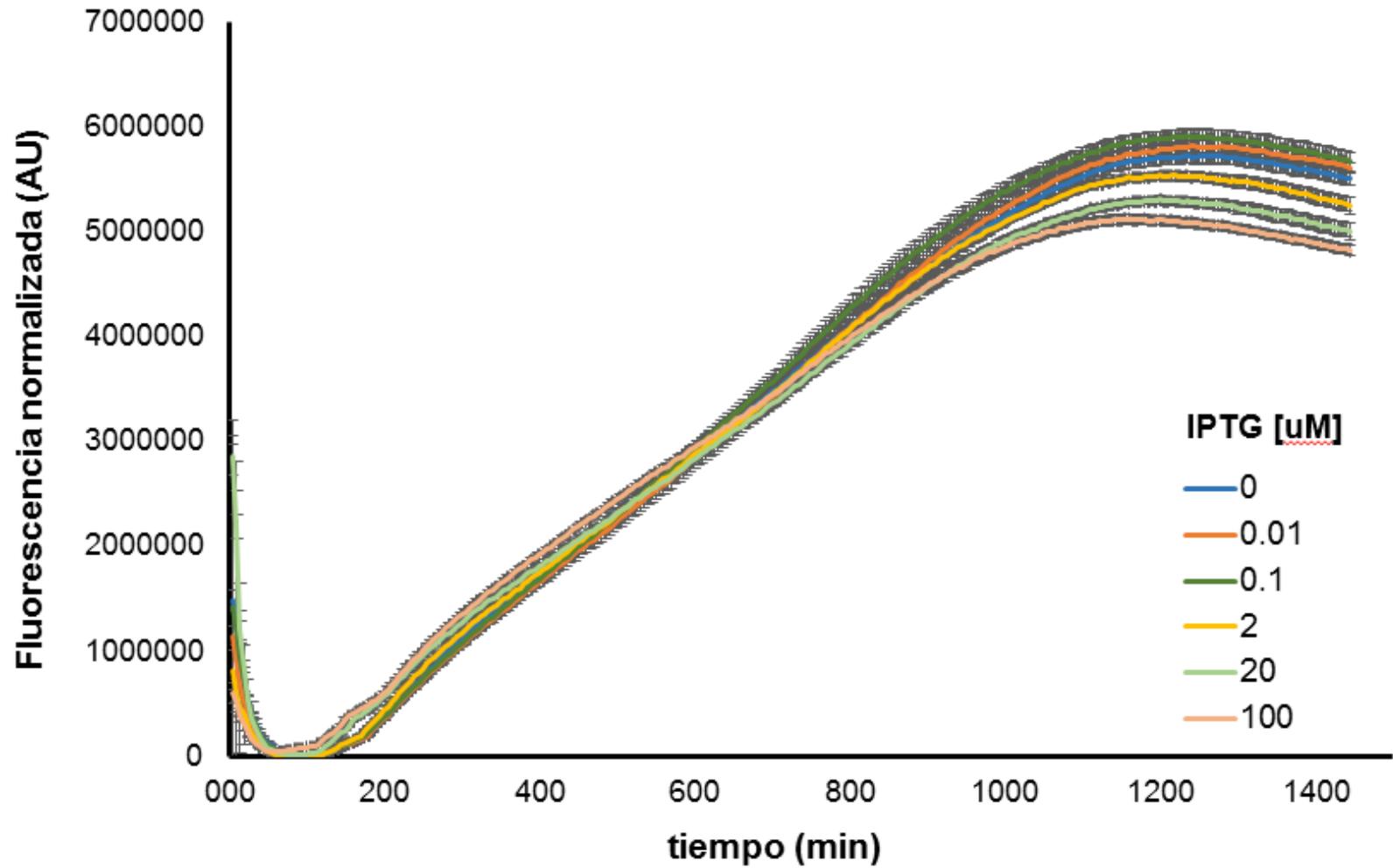


Figura 14. Cinética de la expresión de la proteína CBDcipA-sfGFP inducida con seis niveles de IPTG y medida en unidades arbitrarias
Fuente: (Mosquera, 2019)

La expresión de la proteína CBDcipA-sfGFP alcanzó la saturación en una manera dependiente de la concentración de IPTG. El tiempo de saturación para la inducción con 0 uM, 0.01 uM, 0.1 uM, 2 uM, 20 uM y 100 uM fue 20.91 h, 20.66 h, 20.57 h, 20.32 h, 19.99 h y 19.65 h, respectivamente (Figura 14). Consecuentemente se analizaron las concentraciones de proteínas inducidas por los seis niveles de IPTG en los respectivos tiempos de saturación, con una significancia de 0.05. A pesar de que los datos se ajustaron a una distribución normal según la prueba de Shapiro-Wilk (valor- $p=0.76$), no se cumplió la homocedasticidad según la prueba de Levene (valor- $p=0.016$), por lo cual se aplicó una prueba de Welch acompañada de un test post hoc de Games–Howell. Comparando con el control, mientras las expresiones conseguidas con 0.01 y 0.1 uM de IPTG no fueron significativamente mayores, se registraron reducciones significativas con 20 uM (valor- $p=0.005$) y 100 uM de IPTG (valor- $p<0.001$) (Figura 15).

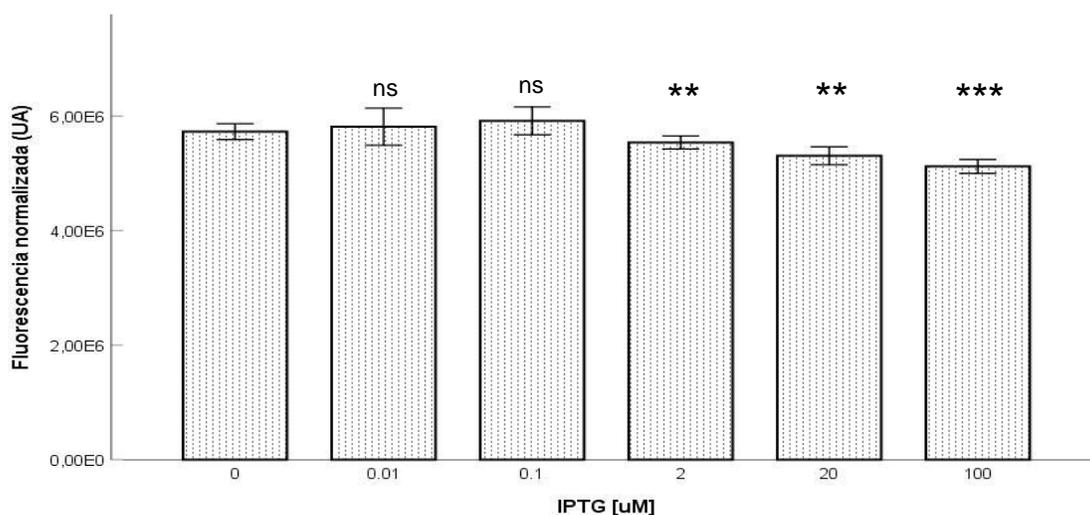


Figura 15. Concentraciones máximas de proteína CBDcipA-sfGFP inducida por los seis niveles de IPTG. **= $p<0.01$, ***= $p<0.001$, ns=no significativamente diferente de IPTG 0 uM
Fuente: (Mosquera, 2019)

4.4 Expresión de las proteínas recombinantes

Para estimar la fracción soluble e insoluble en que las proteínas recombinantes se expresan en las cepas transformadas de *E. coli* BL21(DE3) se realizó una lisis química a un cultivo de 16 h inducido su máxima expresión por 6 h añadiendo IPTG 1mM concentración final. A diferencia de las fracciones solubles e insolubles de la proteína CBDcipA-sfGFP (≈ 64 kDa, Figura 16) que aparecen semejantes, la proteína CBDcipA-BMP2 (≈ 35 kDa, Figura 14) aparece concentrada en su fracción insoluble y no detectable en la soluble (Figura 14).

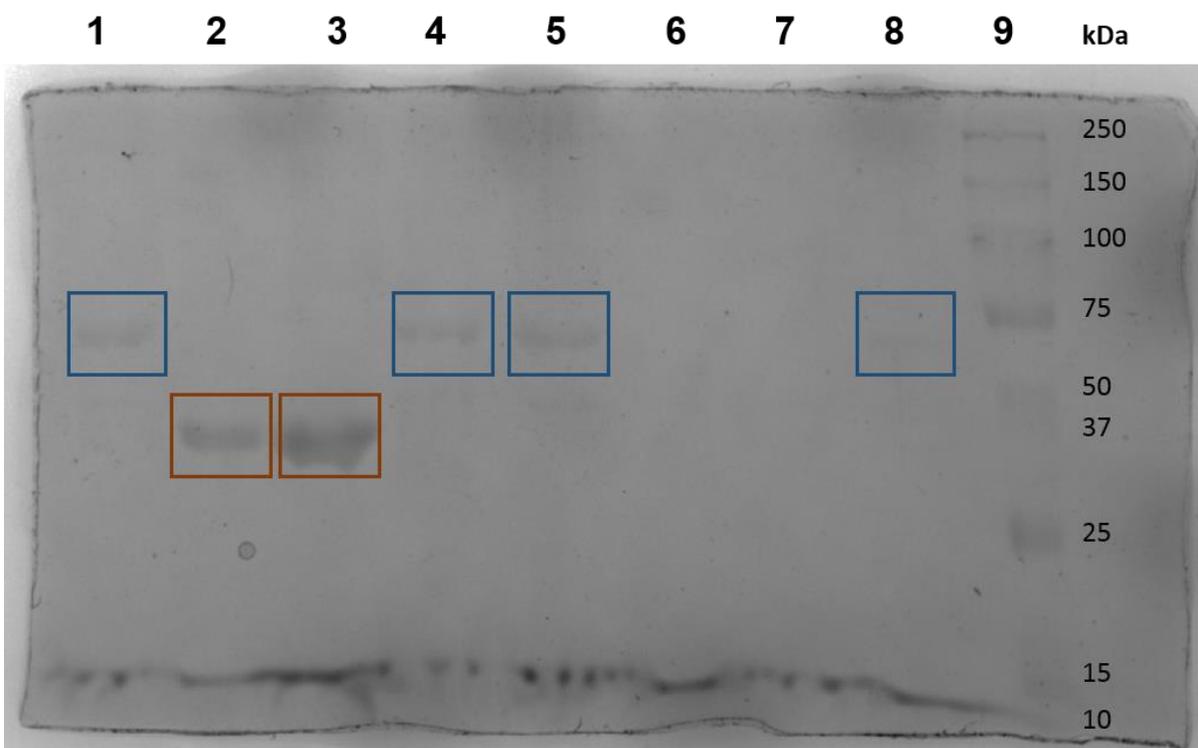


Figura 16. Expresión de las proteínas recombinantes en fracciones solubles (FS) e insolubles (FI). CBDcipA-sfGFP en FS (Carriles 1 y 8) y FI (Carriles 4 y 5). CBDcipA-BMP2 en FI (Carriles 2 y 3) y FS (Carriles 6 y 7)

Fuente: (Mosquera, 2019)

4.5 Obtención de celulosa bacteriana

La primera membrana íntegra se formó al cabo de 9 días. Un tiempo de cultivo prolongado permitió su apilamiento (Figura 17A) en la forma del área del recipiente. Luego de lavadas en solución alcalina tomaron un color blanquecino mientras estuvo hidratada (Figura 17B).

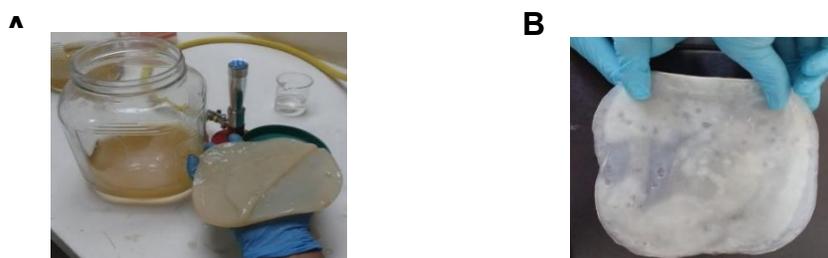


Figura 17. (A) Membranas de celulosa bacteriana cultivadas por 2 semanas y (B) tratadas con solución alcalina
Fuente: (Mosquera, 2019)

4.6 Caracterización de la fuerza de enlace de la proteína recombinante a celulosa bacteriana

La fluorescencia remanente luego de extraer la solución incubada por 18 h con finas membranas de BC (fluorescencia prelavado) fue del 91.11 ± 4.19 y 2.57 ± 0.65 para CBDcipA-sfGFP y GFPwt, respectivamente (Figura 18A), lo que da cuenta de que la concentración de proteína CBDcipA-sfGFP acoplada a las membranas de BC fue significativamente mayor que la GFPwt (valor- $p < 0.0001$). Esta fluorescencia remanente fue lavada 3 veces con SFB y entonces se midió la fluorescencia restante (fluorescencia postlavado) cuyos valores fue 98.17 ± 0.42 para CBDcipA-sfGFP, significativamente mayor que 64.83 ± 2.64 de GFPwt (valor- $p < 0.0001$) (Figura 18B).

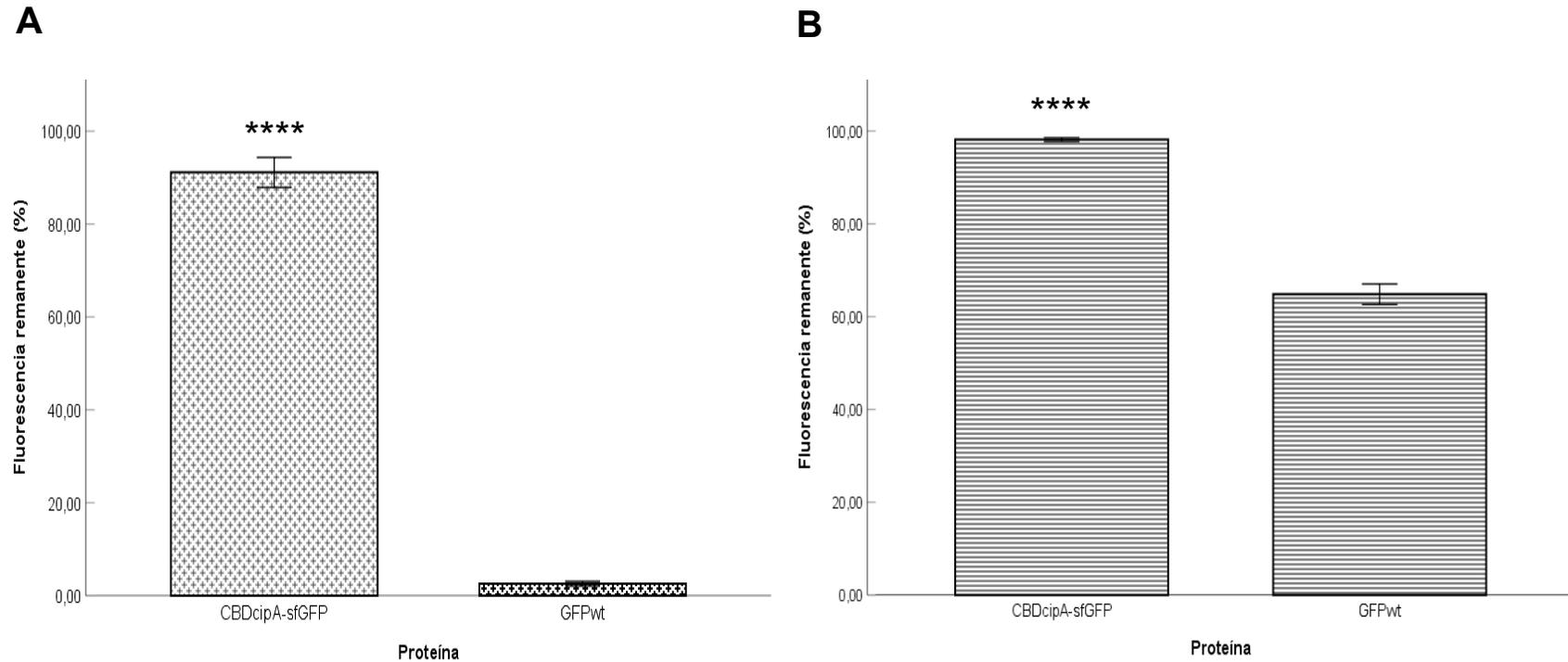


Figura 18. Caracterización de la fuerza de enlace de las proteínas CBDcipA-sfGFP y GFPwt con celulosa bacteriana (**A**) prelavado, al extraer la solución proteínica incubada toda la noche y (**B**) postlavado, tras lavar 3 veces con SFB las membranas de celulosa acoplada con las proteínas

Fuente: (Mosquera, 2019)

CAPÍTULO V: DISCUSIÓN

La funcionalidad de los dominios de la proteína CBDcipA-sfGFP generada por el ensamblaje de fusión fue demostrada por los experimentos llevados a cabo. El dominio CBDcipA, localizado en el extremo N-terminal, confirió a la proteína quimera la propiedad de adherencia a celulosa bacteriana (Figura 18A) que fue progresivamente liberada por lavados con SFB (Figura 18B). La solución SFB ha sido ampliamente utilizada para evaluar la bioactividad de materiales *in vitro* y aproximar su funcionalidad *in vivo* porque su concentración iónica similar a la del plasma humano (Bhatt & Anbarasu, 2019; Clèries, Fernández-Pradas, & Morenza, 2000; Kokubo & Takadama, 2006; Li, Gao, & Wang, 2004; Magallanes-Perdomo et al., 2011). Por otra parte, la funcionalidad del dominio sfGFP en extremo C-terminal fue evidenciada visualmente por la fluorescencia de las colonias bacterianas conteniendo el plásmido psb1A3-CBDcipA-sfGFP (Figura 11B) así como por la lectura de la fluorescencia durante la cinética de crecimiento (Figura 14).

La proteína BMP2 fue ensamblada como extremo C-terminal en base a estudios previos donde se demostró su actividad osteogénica *in vivo* en un modelo animal murino utilizando la proteína recombinante TG-pi-BMP2 acoplada a fibrina (Schmoekel et al., 2005). De manera similar, se escogió CBDcipA en extremo N-terminal por su mayor fuerza de enlace a celulosa bacteriana comparado con otros CBDs (Florea et al., 2016). Tomado en conjunto, debido a que el ensamblaje de la proteína CBDcipA-BMP2 fue semejante a la proteína CBDcipA-sfGFP se espera la actividad de ambos dominios que acoplada se obtiene el biomaterial funcional.

La ley de acción de masas es una herramienta útil para crear modelos no lineales, variables en el tiempo y que ha sido tradicionalmente utilizada para describir reacciones bioquímicas de unión ligando-receptor o procesos citosólicos tipo fosforilación de especies moleculares (Enderle, 2012; Kenakin, 2019). En este estudio dicha ley fue aplicada para describir matemáticamente las concentraciones de IPTG dentro y fuera de la célula que en el estado estacionario, cuando la tasa de entrada es igual a la de salida, el $[IPTG]_{int}$ fue del 94.845% de la $[IPTG]_{TOTAL}$ (Figura 12).

Para describir la transcripción del ARNm y traducción de las proteínas de fusión, se utilizaron EDOs de primer grado (Ecuación 3, 4, 5 y 6) que se basan en la producción y degradación de las especies moleculares (Fernandez-Lopez, del Campo, Revilla, Cuevas, & de la Cruz, 2014; M. A. Gibson & Mjolsness, 2001). El valor de fugacidad de transcripción (α) de las proteínas CBDcipA-BMP2 y CBDcipA-sfGFP fue tomado como 0.95 porque los plásmidos no tienen el casete de expresión constitutiva de la proteína represora LacI y la concentración naturalmente presente en *E. coli* (10 nM) era muy baja para provocar una represión efectiva. Este detalle del modelo matemático concuerda con la fase experimental donde la expresión inducida por IPTG hasta 0.01 μ M de la proteína CBDcipA-sfGFP no fue significativamente mayor que el tratamiento control. En contraste, una relación inversa entre producción proteínica y concentraciones de IPTG fue encontrada para valores de inductor igual o mayor a 20 μ M ya que producen una reducción significativa en la concentración de CBDcipA-sfGFP (Figura 15); este fenómeno puede explicarse porque el IPTG es un compuesto no metabolizable y que en altas concentraciones se vuelve tóxico para la célula bacteriana (Kopp et al., 2018; Rizkia

et al., 2015). Además, a mayores concentraciones de IPTG el sistema de expresión se satura más rápido debido a la interacción inductor-proteína represora (Figura 14).

Es importante notar que la cinética de producción de la proteína CBDcipA-sfGFP modeladas matemáticamente (Figura 13) es semejante a la cinética obtenida experimentalmente (Figura 14) hasta el punto de saturación. A partir de este punto, mientras que experimentalmente la concentración proteínica decae progresivamente, según el modelo la concentración proteínica se mantiene constante. Este fenómeno se debe a que el modelo matemático no toma en cuenta la muerte celular provocada por el agotamiento de nutrientes y concentraciones altas de IPTG.

El tiempo de vida media de los ARNms en *E. coli* fue bien estudiada por Bernstein, Khodursky, Lin, Lin-Chao, & Cohen (2002), concluyendo que depende del medio y temperatura de cultivo; en medio LB, el 99% de los ARNms tuvo una vida media entre 1-15 min con un promedio de 5.2 min. Por tanto, la tasa de degradación de los ARNms CBDcipA-BMP2 y CBDcipA-sfGP fue asumida como 0.192 min^{-1} . Tomando en cuenta que la tasa de traducción en *E. coli* tiene una media de 16 aa s^{-1} (Nieß, Siemann-Herzberg, & Takors), las tasas de traducción asumidas para las proteínas CBDcipA-BMP2 (β_{CB}) y CBDcipA-sfGFP (β_{CG}) fueron 3.29 min^{-1} y 2.28 min^{-1} , respectivamente. Por otra parte, la tasa de degradación proteínica (σ) es mayor o igual que el ciclo celular de los organismos (Maurizi, 1992) que en *E. coli* es de 20 min bajo condiciones óptimas de cultivo (medio rico en nutrientes y 37°C) (B. Gibson, Wilson, Feil, & Eyre-Walker, 2018). Considerando que la cepa hospedera *E. coli* BL21(DE3) es deficiente en los genes codificantes de las proteasas OmpT y Lon (Ratelade et al., 2009),

la tasa de degradación fue asumida como 0.015 min^{-1} . Dadas las condiciones $\beta_{CB} > \beta_{CG}$ y una sola σ , el modelo matemático predijo concentraciones mayores de CBDcipA-BMP2 que de CBDcipA-sfGFP (Figura 13) porque la CBDcipA-BMP2 se traduce más rápido.

La insolubilidad y formación de cuerpos de inclusión ha sido reportada como característica de la BMP2 (Nasrabadi, Rezaeiani, Sayadmanesh, Baghaban-Eslaminejad, & Shabani, 2018) y de proteínas quimeras con un dominio BMP2 (Pramesti et al., 2012; Schmoekel et al., 2005). Esto concuerda con la insolubilidad de la proteína CBDcipA-BMP2 reportada en el presente trabajo de investigación, evidenciada por la SDS-PAGE (Figura 16, Carriles 2 y 3).

La fuerza de enlace entre las proteínas recombinantes y celulosa bacteriana dada por la funcionalidad del dominio CBDcipA y caracterizada por lavados con SFB fue mayor que la fuerza de enlace de GFPwt utilizada como control, lo que es acorde con estudios previos donde utilizaron como solventes de lavado 70% EtOH, 5% BSA, PBS y H₂O (Florencia et al., 2016).

CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES

La proteína de fusión CBDcipA-BMP2 expresada en *Escherichia coli* BL21(DE3) fue detectable en fase insoluble revelando una alta tasa de formación de cuerpos de inclusión, característica de la BMP2 y algunas de sus quimeras. Por otra parte, la proteína de fusión CBDcipA-sfGFP fue detectada tanto en fase soluble como insoluble.

El modelo matemático de la expresión de las proteínas recombinantes inducidas por IPTG contempló dos fases. La primera referida a la internalización de IPTG en *E. coli* a través de su membrana y cuyo análisis a partir de la ley de acción de masas reveló que en el estado estacionario la concentración de IPTG dentro de la célula es el 94.845% del IPTG añadido al medio. La segunda fase, centrada en la producción de las especies moleculares ARNm y proteína, predijo que la concentración saturante de IPTG estaría entre 0.01 μ M y 1 μ M lo que fue útil en la etapa experimental para definir los niveles de IPTG inductores de la expresión.

Dentro del modelo matemático, una de las limitaciones fue la omisión de la muerte celular que a diferencia de las cinéticas obtenidas por el modelo, fue evidente en la cinética experimental entre las 19.65 h y 20.91 h dependiendo de la concentración de IPTG añadida al medio de cultivo. Además, el modelo omite que altas concentraciones de IPTG, al ser un compuesto no metabolizable, se vuelven tóxicas para las células y consecuentemente disminuye la máxima concentración de proteína obtenida, también evidenciado en la cinética experimental.

Analizando los valores de intensidad de fluorescencia en los puntos de saturación, correspondientes a la máxima concentración de proteína demostraron un incremento no significativo con la inducción de hasta 0.1 uM de IPTG. Valores sobre 20 uM demostraron ser tóxicos para las células y redujeron significativamente la máxima concentración de proteína.

La fuerza de enlace de la proteína CBDcipA-sfGFP a celulosa bacteriana significativamente mayor que el control GFPwt demostró la funcionalidad del dominio CBDcipA al ser lavado progresivamente con SFB. Es decir, en una terapia de inducción de hueso dirigida con membranas de celulosa bacteriana, el dominio CBDcipA otorgaría una acción progresiva de la proteína morfogénica ósea BMP2.

CAPÍTULO VII: RECOMENDACIONES

Con la ayuda de un espectrofotómetro, cuantificar el ADN para realizar los ensayos de ensamblaje y ligación ya que influye para determinar la concentración necesaria de las enzimas nucleasas y ligasa.

Probar otros tipos de modelos matemáticos de la expresión de genes como modelos estocásticos que incluyan aspectos como el ciclo celular.

Variar las formas de cultivo de las cepas recombinantes ya que factores como la agitación en matraces con deflectores puede aumentar la solubilidad de las proteínas

Bajo las condiciones de laboratorio y equipos donde se realicen los ensayos, establecer un factor de conversión de intensidad de fluorescencia medida en unidades arbitrarias a concentración de proteína.

En caso que se busque una sola intervención quirúrgica, experimentar con celulosa bacteriana tratada con irradiación ya que aumenta su reabsorción por el cuerpo humano y animal.

REFERENCIAS

- Arribillaga, L., Durantez, M., Lozano, T., Rudilla, F., Rehberger, F., Casares, N., . . . Lasarte, J. J. (2013). A Fusion Protein between Streptavidin and the Endogenous TLR4 Ligand EDA Targets Biotinylated Antigens to Dendritic Cells and Induces T Cell Responses *In Vivo*. *BioMed Research International*, 2013, 864720. doi:10.1155/2013/864720
- Baker, R. T., Smith, S. A., Marano, R., McKee, J., & Board, P. G. (1994). Protein Expression Using Cotranslational Fusion and Cleavage of Ubiquitin *The Journal of Biological Chemistry*, 269(41), 25381-25386. Retrieved from <http://www.jbc.org/content/269/41/25381.long>.
- Berger, S., Lowe, P., & Tesar, M. (2015). Fusion protein technologies for biopharmaceuticals: Applications and challenges. *mAbs*, 7(3), 456-460. doi:10.1080/19420862.2015.1019788
- Bernstein, J. A., Khodursky, A. B., Lin, P. H., Lin-Chao, S., & Cohen, S. N. (2002). Global analysis of mRNA decay and abundance in *Escherichia coli* at single-gene resolution using two-color fluorescent DNA microarrays. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(15), 9697–9702. doi:10.1073/pnas.112318199
- Bhatt, A., & Anbarasu, A. (2019). Rapid and economic synthesis of bone like apatite using simulated body fluid (SBF). *Materials Research Innovations*, 23(3), 149-154. doi:10.1080/14328917.2017.1404203
- Boom time for biomaterials. (2009). *Nature Materials*, 8, 439. Retrieved from <https://doi.org/10.1038/nmat2451>. doi:10.1038/nmat2451
- Bornhorst, J. A., & Falke, J. J. (2000). Purification of proteins using polyhistidine affinity tags. *Methods in Enzymology*, 326, 245–254. doi:10.1016/S0076-6879(00)26058-8
- Brown, A. J. (1886). The chemical action of pure cultivations of bacterium aceti. *Journal of Chemical Society*, 49, 172-187.
- Burgess-Clifford, C. (2018). Composition of Enzymes.
- Campbell, R. (2008). Fluorescent proteins. In *Scholarpedia* (Vol. 3, pp. 5410).
- Casadaban, M. J., Chou, J., & Cohen, S. N. (1980). In vitro gene fusions that join an enzymatically active β -galactosidase segment to amino-terminal fragments of exogenous proteins: *Escherichia coli* plasmid vectors for the detection and cloning of translational initiation signals. *Journal of bacteriology*, 143(2), 971-980. Retrieved from <https://j.b.asm.org/content/143/2/971.long>.
- Casadaban, M. J., Martinez-Arias, A., Shapira, S. K., & Chou, J. (1983). B-Galactosidase gene fusions for analyzing gene expression in *Escherichia coli* and yeast. *Methods in Enzymology*, 100, 293-308. doi:10.1016/0076-6879(83)00063-4
- Castelli, L. A., Petris, A. J., & Carroll, S. M. (1995). Secretion and affinity purification of glutathione S-transferase fusion proteins from yeast. *Biotechnology Techniques*, 9(11), 821-826. doi:10.1007/BF00159408
- Chen, D., Zhao, M., & Mundy, G. R. (2004). Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors*, 22(4), 233-241. doi:10.1080/08977190412331279890
- Clèries, L., Fernández-Pradas, J. M., & Morenza, J. L. (2000). Behavior in simulated body fluid of calcium phosphate coatings obtained by laser ablation. *Biomaterials*, 21(18), 1861-1865. doi:10.1016/S0142-9612(00)00060-0
- Cochran, D., & Wozney, J. M. (1999). Biological mediators for periodontal regeneration. *Periodontology*, 19, 40-58. doi:10.1111/j.1600-0757.1999.tb00146.x
- Cody, C. W., Prasher, D. C., Westler, W. M., Prendergast, F. G., & Ward, W. G. (1993). Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the *Aequorea* green-fluorescent protein. *Biochemistry*, 32(5), 1212-1218. doi:10.1021/bi00056a003

- Cohn, E. J., Oncley, J. L., Strong, L. E., Hughes, W. L., & Armstrong, S. H. (1944). Chemical, clinical, and immunological studies on the products of human plasma fractionation. I. The characterization of the protein fractions of human plasma. *Journal of Clinical Investigation*, 23, 417-423. doi:10.1172/JCI101508
- Cooper, C., Campion, G., & Melton, L. (1992). Hip fractures in the elderly: a world-wide projection. *Osteoporos*, 2(6), 285-289. doi:10.1007/BF01623184
- Dougan, M., Gough, J., & Eichhorn, S. (2013). Bacterial cellulose scaffolds and cellulose. *Nanomedicine*, 8(2), 287-298. doi:10.2217/nnm.12.211
- Einarson, M. B., Pugacheva, E. N., & Orlinick, J. R. (2007). Preparation of GST Fusion Proteins. *Cold Spring Harbor Protocols* pdb prot4738. doi:10.1101/pdb.prot4738
- Enderle, J. D. (2012). Biochemical Reactions and Enzyme Kinetics. In J. D. Enderle & B. J (Eds.), *Introduction to Biomedical Engineering* (3rd ed., pp. 447-508): Biomedical Engineering.
- Fernandez-Lopez, R., del Campo, I., Revilla, C., Cuevas, A., & de la Cruz, F. (2014). Negative Feedback and Transcriptional Overshooting in a Regulatory Network for Horizontal Gene Transfer. *PLoS Genetics*, 10(2), e1004171. doi:10.1371/journal.pgen.1004171
- Florea, M., Hagemann, H., Santosa, G., Abbott, J., Micklem, C. N., Spencer-Milnes, X., . . . Ellis, T. (2016). Engineering control of bacterial cellulose production using a genetic toolkit and a new cellulose-producing strain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(24), E3431-E3440. doi:10.1073/pnas.1522985113
- Fogen, D., Wu, S.-C., Ng, K.-S., & Wong, S.-L. (2015). Engineering Streptavidin and a Streptavidin-Binding Peptide with Infinite Binding Affinity and Reversible Binding Capability: Purification of a Tagged Recombinant Protein to High Purity via Affinity-Driven Thiol Coupling. *PLoS ONE*, 10(9), e0139137. doi:10.1371/journal.pone.0139137
- Gangadoo, S., & Chapman, J. (2014). Emerging biomaterials and strategies for medical applications: a review. *Materials Technology*, 30(B1), B3–B7. doi:10.1179/1753555714Y.0000000206
- Gibson, B., Wilson, D. J., Feil, E., & Eyre-Walker, A. (2018). The distribution of bacterial doubling times in the wild. *Proceedings: Biological Sciences*, 285(1880), 20180789. doi:10.1098/rspb.2018.0789
- Gibson, M. A., & Mjolsness, E. (2001). Modeling the activity of single genes. In J. M. Bower & B. H (Eds.), *Computational Modeling of Genetic and Biochemical Network* (pp. 1-48). Cambridge, MA: MIT Press.
- Goh, W. N., Rosma, A., Kaur, B., Fazilah, A., Karim, A. A., & Rajeev, B. (2012). Fermentation of black tea broth (Kombucha): I. Effects of sucrose concentration and fermentation time on the yield of microbial cellulose. *International Food Research Journal*, 19(1), 109-117. Retrieved from [http://www.ifrj.upm.edu.my/19%20\(01\)%202011/\(15\)IFRJ-2011-105%20Rajeev.pdf](http://www.ifrj.upm.edu.my/19%20(01)%202011/(15)IFRJ-2011-105%20Rajeev.pdf).
- Grünberg, R., Arndt, K., & Müller, K. (2009). Fusion Protein (Freiburg) Biobrick assembly standard. Retrieved from <https://dspace.mit.edu/handle/1721.1/45140>
- Hestrin, S., & Schramm, M. (1954). Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. II. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose. *Biochemistry Journal*, 58, 345-352. doi:10.1042/bj0580345
- Hirano, K., Kurosaki, M., Nihei, S., Hasegawa, H., Shinoda, S., & Haruki, M. (2016). Enzymatic diversity of the *Clostridium thermocellum* cellulosome is crucial for the degradation of crystalline cellulose and plant biomass. *Scientific reports*, 6(1), 35709. doi:10.1038/srep35709
- Hoey, T. (2001). Expression and purification of lacZ and trpE fusion proteins. *Current Protocols in Protein Sciences*, Chapter 16:Unit16.15. doi:10.1002/0471142727.mb1605s28

- Kai, Y., Chengcheng, L., Byung-Gee, K., & Dong-Yup, L. (2015). Synthetic fusion protein design and applications. *Biotechnology Advances*, 33(1), 155-164. doi:10.1016/j.biotechadv.2014.11.005
- Kalisky, T., Dekel, E., & Alon, U. (2007). Cost-benefit theory and optimal design of gene regulation functions. *Physical Biology*, 4(4), 229-245. doi:10.1088/1478-3975/4/4/001
- Karyagina, A. S., Boksha, I. S., Grunina, T. M., Demidenko, A. V., Poponova, M. S., Sergienko, O. V., & Lunin, V. G. (2017). Two Variants of Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 (rhBMP-2) with Additional Protein Domains: Synthesis in an *Escherichia coli* Heterologous Expression System. *Biochemistry*, 82(5), 613-624. doi:10.1134/S0006297917050091
- Keefe, A. D., Wilson, D. S., Seelig, B., & Szostak, J. W. (2001). One-step purification of recombinant proteins using a nanomolar-affinity streptavidin-binding peptide, the SBP-Tag. *Protein Expression and Purification*, 23(3), 440-446. doi:10.1006/prep.2001.1515
- Kenakin, T. P. (2019). How Different Tissues Process Drug Response. In T. P. Kenakin (Ed.), *A Pharmacology Primer: Techniques for More Effective and Strategic Drug Discovery* (5th ed., pp. 23-46): Academic Press.
- Keramaris, N., Calori, G., Nikolaou, V., Schemits, E., & Giannoudis, P. (2008). Fracture vascularity and bone healing: A systematic review of the role of VEGF. *Injury*, 39(Suppl 2), S45-S57. doi:10.1016/S0020-1383(08)70015-9
- Klein, W. (2003). Calmodulin-Binding Peptide as a Removable Affinity Tag for Protein Purification. In P. E. Vaillancourt (Ed.), *E. coli Gene Expression Protocols. Methods in Molecular Biology™* (Vol. 205): Humana Press.
- Kokubo, T., & Takadama, H. (2006). How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? *Biomaterials*, 27(15), 2907-2915. doi:10.1016/j.biomaterials.2006.01.017
- Kopp, J., Slouka, C., Ulonska, S., Kager, J., Fricke, J., Spadiut, O., & C, H. (2018). Impact of glycerol as carbon source onto specific sugar and inducer uptake rates and inclusion body productivity in *E. coli* BL21(DE3). *Bioengineering*, 5(1), 1. doi:10.3390/bioengineering5010001
- Kruus, K., Lua, A., Demain, A., & Wu, J. H. (1995). The anchorage function of CipA (Cell), a scaffolding protein of the *Clostridium thermocellum* cellulosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(20), 9254-9258. doi:10.1073/pnas.92.20.9254
- Lebendiker, M., & Danieli, T. (2011). Purification of proteins fused to maltose-binding protein. *Methods in molecular biology*, 1485, 257-273. doi:10.1007/978-1-4939-6412-3_13
- Li, L., Gao, J., & Wang, Y. (2004). Evaluation of cyto-toxicity and corrosion behavior of alkali-heat-treated magnesium in simulated body fluid. *Surface and Coatings Technology*, 185(1), 92-98. doi:10.1016/j.surfcoat.2004.01.004
- Linder, M., & Teeri, T. (1997). The roles and function of cellulose-binding domains. *Journal of Biotechnology*, 57(1-3), 15-28. doi:10.1016/S0168-1656(97)00087-4
- Loomis, W. F., & Magasanik, B. (1966). Glucose-Lactose Diauxie in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 93(4), 1397-1401.
- Magallanes-Perdomo, M., Luklinska, Z. B., De Aza, A. H., Carrodegua, R. G., De Aza, S., & Pena, P. (2011). Bone-like forming ability of apatite-wollastonite glass ceramic. *Journal of the European Ceramic Society*, 31(9), 1549-1561. doi:10.1016/j.jeurceramsoc.2011.03.007
- Maina, C. V., Riggs, P. D., Grandea, A. G., Slatko, B. E., Moran, L. S., Tagliamonte, J. A., . . . Guan, C. D. (1988). An *Escherichia coli* vector to express and purify foreign proteins by fusion to and separation from maltose-binding protein. *Gene*, 74(2), 365-373. doi:10.1016/0378-1119(88)90170-9

- Marbach, A., & Bettenbrock, K. (2012). lac operon induction in *Escherichia coli*: Systematic comparison of IPTG and TMG induction and influence of the transacetylase LacA. *Journal of Biotechnology*, 157(1), 82-88. doi:10.1016/j.jbiotec.2011.10.009
- Märtson, M., Viljanto, J., Hurme, T., Laippala, P., & Saukko, P. (1999). Is cellulose sponge degradable or stable as implantation material? An in vivo subcutaneous study in the rat. *Biomaterials*, 20(21), 1989-1995. doi:10.1016/S0142-9612(99)00094-0
- Maurizi, M. R. (1992). Proteases and protein degradation in *Escherichia coli*. *Experientia*, 48(2), 178-201. doi:10.1007/BF01923511
- McCoy, J., & La Ville, E. (2001). Expression and purification of thioredoxin fusion proteins. *Current Protocols in Protein Sciences*, Chapter 6:Unit 6.7. doi:10.1002/0471140864.ps0607s10
- Misch, C. E. (1999). Treatment options for a congenitally missing lateral incisor: a case report. *Dentistry Today*, 8, 90.
- Mitchell, S. F., & Lorsch, J. R. (2015). Protein Affinity Purification using Intein/Chitin Binding Protein Tags. *Methods in Enzymology*, 559, 111-125. doi:10.1016/bs.mie.2014.11.002
- Miyamoto, T., Takahashi, S., Ito, H., Inagaki, H., & Noishiki, Y. (1989). Tissue biocompatibility of cellulose and its derivatives. *Journal of Biomedical Materials Research*, 23(1), 125-133. doi:10.1002/jbm.820230110
- Morin, J. G., & Hastings, J. W. (1971). Energy transfer in a bioluminescent system. *Journal of Cell Physiology*, 77(3), 313. doi:10.1002/jcp.1040770305
- Murakami, G., Watabe, T., Takaoka, K., & Miyazono, K. (2003). Cooperative inhibition of bone morphogenetic protein signaling by Smurf1 and inhibitory Smads. *Molecular Biology of the Cell*, 14, 2809–2817. doi:10.1091/mbc.e02-07-0441
- Myers, A. M., Tzagoloff, A., Kinney, D. M., & Lusty, C. J. (1986). Yeast shuttle and integrative vectors with multiple cloning sites suitable for construction of lacZ fusions. *Gene*, 45(3), 299-310. doi:10.1016/0378-1119(86)90028-4
- Nasrabadi, D., Rezaeiani, S., Sayadmanesh, A., Baghaban-Eslaminejad, M., & Shabani, A. (2018). Inclusion Body Expression and Refolding of Recombinant Bone Morphogenetic Protein-2. *Avicenna journal of medical biotechnology*, 10(4), 202-207.
- Nieß, A., Siemann-Herzberg, M., & Takors, R. Protein production in *Escherichia coli* is guided by the trade-off between intracellular substrate availability and energy cost. *Microbial Cell Factories*, 18(1), 8. doi:10.1186/s12934-019-1057-5
- Nilvebrant, J., & Hober, S. (2013). The albumin-binding domain as a scaffold for protein engineering. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 6, e201303009. doi:10.5936/csbj.201303009
- Ozdubak, E. M., Thattai, M., Lim, H. N., Shraiman, B. I., & Van Oudenaarden, A. (2004). Multistability in the lactose utilization network of *Escherichia coli*. *Nature*, 427(6976), 737-740. doi:10.1038/nature02298
- Pahwa, R. N. (1988). New and controversial uses of intravenous gamma-globulin. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 7(5 Suppl), S34-36.
- Paredes-Puerto, A., Camacho-Villegas, T., Vallejo-Cardona, A., & Esquivel-Solís, H. (2017). Colágenas Recombinantes para Andamios de Ingeniería de Tejidos. *Revista Mexicana de Ingeniería Biomédica*, 38(1), 103-114. doi:10.17488/RMIB.38.1.7
- Parker, J. (2001). lac Operon. In S. Brenner & J. H. Miller (Eds.), *Encyclopedia of Genetics* (pp. 1070): Academic Press.
- Paye, J., Guseva, A., Hammer, S., Balch, M., Davis, M., Davison, B. H., . . . Lynd, L. (2016). Biological lignocellulose solubilization: comparative evaluation of biocatalysts and enhancement via cotreatment. *Biotechnology Biofuels*, 9, 8. doi:10.1186/s13068-015-0412-y

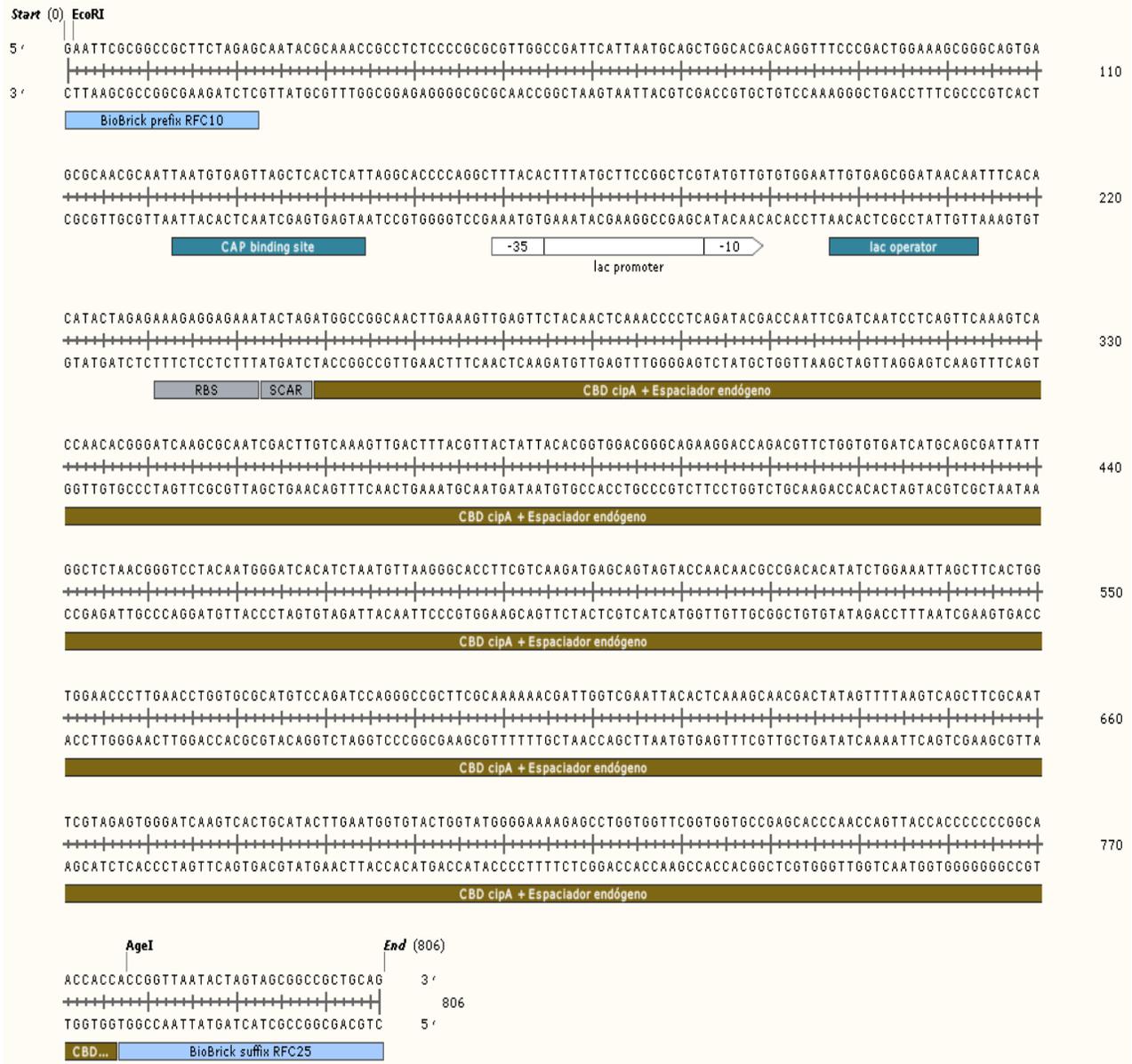
- Payen, A., & Hebd, C. R. (1838). Sur un Moyen d'isoler le Tissu élémentaire des Bois. *Seances de l'Academie des Sciences*, 7, 1125.
- Pechtner, V., Karanikas, C., García-Pérez, L. E., & Glaesner, W. (2017). A New Approach to Drug Therapy: Fc-Fusion Technology. *Primary Health Care*, 7, 255. doi:10.4172/2167-1079.1000255
- Pecina, M., Grgurevic, L., & Vuki, S. (2017). Marshall R. Urist and the discovery of bone. *International Orthopaedics*, 41(5), 1065-1069. doi:10.1007/s00264-017-3402-9
- Pédelacq, J. D., Cabantous, S., Tran, T., Terwilliger, T. C., & Waldo, G. S. (2005). Engineering and characterization of a superfolder green fluorescent protein. *Nature Biotechnology*, 24, 79-88. doi:10.1038/nbt1172
- Picheth, G. F., Sierakowski, M. R., Woehl, M. A., Ono, L., Cofré, A. R., Vanin, L. P., . . . De Freitas, R. A. (2014). Lysozyme-triggered epidermal growth factor release from bacterial cellulose membranes controlled by smart nanostructured films. *Journal of pharmaceutical sciences*, 103(12), 3958-3965. doi:10.1002/jps.24205
- Prameshti, H. T., Suciati, T., Indrayati, A., Asjarie, S., & Retnoningrum, D. S. (2012). Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2: Optimization of Overproduction, Solubilization, Renaturation and Its Characterization. *Biotechnology*, 11(3), 133. doi:10.3923/biotech.2012.133.143
- Raines, R. T., McCormick, M., Van Oosbree, T. R., & Mierendorf, R. C. (2000). The S-tag fusion system for protein purification. *Methods in Enzymology*, 326, 362-376. doi:10.1016/S0076-6879(00)26065-5
- Ratelade, J., Miot, M. C., Johnson, E., Betton, J. M., Mazodier, P., & Benaroudj, N. (2009). Production of recombinant proteins in the lon-deficient BL21(DE3) strain of *Escherichia coli* in the absence of the DnaK chaperone. *Applied and environmental microbiology*, 75(11), 3803-3807. doi:10.1128/AEM.00255-09
- Riggs, P. (2001). Fusion Gene. In *Encyclopedia of Genetics* (pp. 738-739): Academic Press.
- Rizkia, P. R., Silaban, S., Hasan, K., Kamara, D. S., Subroto, T., Soemitro, S., & Maksum, I. P. (2015). Effect of isopropyl-B-D-thiogalactopyranoside concentration on prethrombin-2 recombinant gene expression in *Escherichia Coli* ER2566. *Procedia Chemistry*, 17, 118-124. doi:10.1016/j.proche.2015.12.121
- Rose, M., Casadaban, M. J., & Botstein, D. (1981). Yeast genes fused to beta-galactosidase in *Escherichia coli* can be expressed normally in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78(4), 2460-2464. doi:10.1073/pnas.78.4.2460
- Rosenberg, E. (2017). *It's in Your DNA: From Discovery to Structure, Function and Role in Evolution, Cancer and Aging*: Academic Press.
- Scheufler, C., Sebalda, W., & Hülsmeier, M. (1999). Crystal structure of human bone morphogenetic protein-2 at 2.7 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, 287(1), 103-115. doi:10.1006/jmbi.1999.2590
- Schmidt, S. (2013). Introduction. In S. Schmidt (Ed.), *Fusion Protein Technologies for Biopharmaceuticals: Applications and Challenges* (pp. 1-24): John Wiley & Sons.
- Schmoekel, H. G., Weber, F. E., Schense, J. C., Grätz, K. W., Schawaldner, P., & Hubbell, J. A. (2005). Bone Repair With a Form of BMP-2 Engineered for Incorporation Into Fibrin Cell Ingrowth Matrices. *Biotechnology and Bioengineering*, 89(3), 253-262. doi:10.1002/bit.20168
- Semsey, S., Jauffred, L., Csiszovszki, Z., Erdssy, J., Stger, V., Hansen, A., & Krishna, S. (2014). The effect of LacI autoregulation on the performance of the lactose utilization system in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research*, 41(13), 6381-6390. doi:10.1093/nar/gkt351

- Sequin, C. (2018, Septiembre 18). PURDUE University: Research Foundation News. Retrieved from <https://www.purdue.edu/newsroom/releases/2018/Q3/1.7-million-sbir-grant-fast-tracks-faster-bone-fracture-healing-...-aims-to-reduce-mortality-and-improve-quality-of-life-for-aging-population.html>
- Shaner, N. C., Steinbach, P. A., & Tsien, R. Y. (2005). A guide to choosing fluorescent proteins. *Nature Methods*, 2(12), 905-909. doi:10.1038/nmeth819
- Shetty, R. P., Endy, D., & Knight, T. F. (2008). Engineering BioBrick vectors from BioBrick parts. *Journal of Biological Engineering*, 2, 5. doi:10.1186/1754-1611-2-5
- Shetty, R. P., Lizarazo, M., Rettberg, R., & Knight, T. F. (2011). Assembly of BioBrick standard biological parts using three antibiotic assembly. *Methods in Enzymology*, 498, 311-326. doi:10.1016/B978-0-12-385120-8.00013-9
- Shimomura, O., Johnson, F. H., & Saiga, Y. (1962). Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *Journal of Cellular and Comparative Physiology*, 59, 223-239. doi:10.1002/jcp.1030590302
- Shpigel, E., Goldlust, A., Eshel, A., Ber, I. K., Efroni, G., Singer, Y., . . . Shoseyov, O. (2000). Expression, purification and applications of staphylococcal protein A fused to cellulose-binding domain. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 31(Pt 3), 197-203.
- Sözen, T., Özişik, L., & Başaran, N. (2016). Engineering BioBrick vectors from BioBrick parts. *European journal of rheumatology*, 4(1), 46-56. doi:10.1186/1754-1611-2-5
- Srinivasan, A., & Rajendran, N. (2015). Surface characteristics, corrosion resistance and MG63 osteoblast-like cells attachment behaviour of nano SiO₂-ZrO₂ coated 316L stainless steel. *RSC Advances*, 5(33), 26007 – 26016. doi:10.1039/C5RA01881A
- Ståhl, S., & Nygren, P. (1997). The use of gene fusions to protein A and protein G in immunology and biotechnology. *Pathologie-biologie*, 45(1), 66-76.
- Strohl, W. R. (2015). Fusion Proteins for Half-Life Extension of Biologics as a Strategy to Make Biobetters. *BioDrugs*, 29, 215–239. doi:10.1007/s40259-015-0133-6
- Su, W. W. (2005). Fluorescent proteins as tools to aid protein production. *Microbial Cell Factories*, 4(1), 12. doi:10.1186/1475-2859-4-12
- Sugimoto, N., Igarashi, K., & Samejima, M. (2012). Cellulose affinity purification of fusion proteins tagged with fungal family 1 cellulose-binding domain. *Protein Expression and Purification*, 82(2), 290-296. doi:10.1016/j.pep.2012.01.007
- Sykaras, N., & Opperman, L. A. (2003). Bone morphogenetic proteins (BMPs): how do they function and what can they offer the clinician? *Journal of Oral Science*, 45(2), 57-73.
- Tormo, J., Lamed, R., Chirino, A. J., Morag, E., Bayer, E. A., Shoham, Y., & Steitz, T. A. (1996). Crystal structure of a bacterial family-III cellulose-binding domain: a general mechanism for attachment to cellulose. *The EMBO journal*, 15(21), 5739–5751.
- TUDeft. (2009). TUDeft iGEM 2009. Retrieved from <http://2009.igem.org/Team:TUDeft>
- Ukkonen, K., & Vasala, A. (2015). *Protein expression by IPTG autoinduction in EnPresso B: Protocol with minimal manual work and superior yields compared to other media*. Poster session presented at BioSilta. Retrieved from <https://bioscience.co.uk/userfiles/pdf/Application%20Note%20-%20Protein%20expression%20by%20IPTG%20autoinduction%20in%20EnPresso%20B.pdf>.
- Urist, M. R. (1965). Bone: formation by autoinduction. *Science*, 150(3698), 893-899. doi:10.1126/science.150.3698.893
- Van Pham, P. (2018). Medical Biotechnology. In D. Barh & V. Azevedo (Eds.), *Omics Technologies and Bio-engineering*: Academic Press.
- Weinblatt, M. E., Kremer, J. M., Bankhurst, A. D., Bulpitt, K. J., Fleischmann, R. M., Fox, R. I., . . . Burge, D. J. (1999). A Trial of Etanercept, a Recombinant Tumor Necrosis Factor

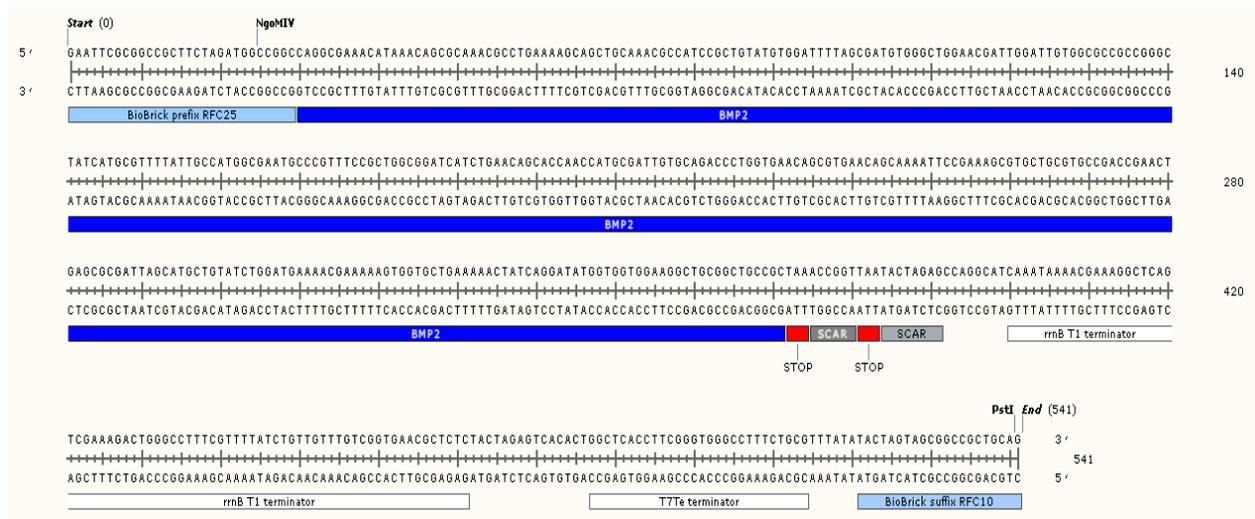
- Receptor:Fc Fusion Protein, in Patients with Rheumatoid Arthritis Receiving Methotrexate. *The New England Journal of Medicine*, 340, 253-259. doi:10.1056/NEJM199901283400401
- Weinstock, G. M., ap Rhys, C., Berman, M. L., Hampar, B., Jackson, D., Silhavy, T. J., . . . Zweig, M. (1983). Open reading frame expression vectors: a general method for antigen production in *Escherichia coli* using protein fusions to beta-galactosidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 80(14), 4432-4436. doi:10.1073/pnas.80.14.4432
- Winkler, T., Sass, F. A., Duda, G. N., & Schmidt-Bleek, K. (2018). A review of biomaterials in bone defect healing, remaining shortcomings and future opportunities for bone tissue engineering. *Bone & Joint Research*, 7(3), 232-243.
- Xu, C. X., Hu, Z. M., Li, J. L., & Gao, J. M. (2009). Expression, purification and refolding of streptavidin-tagged human tumor necrosis factor-alpha fusion protein. *Journal of Southern Medical University*, 29(3), 412-415.
- Xu, Q., Resch, M. G., Podkaminer, K., Yang, S., Baker, J. O., Donohoe, B. S., . . . Bomble, Y. J. (2016). Dramatic performance of *Clostridium thermocellum* explained by its wide range of cellulase modalities. *Sciences Advances*, 2(2), e1501254. doi:10.1126/sciadv.1501254
- Zander, D., Samaga, D., Straube, R., & Bettenbrock, K. (2017). Bistability and Nonmonotonic Induction of the lac Operon in the Natural Lactose Uptake System. *Biophysical journal*, 112(9), 1984-1996. doi:10.1016/j.bpj.2017.03.038
- Zeiss, C., Day, R. N., & Davidson, M. W. (2019). *Aequorea victoria* Fluorescent Proteins. Retrieved from <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/probes/jellyfishfps.html>
- Zou, Y. (2014, November 6th, 2014). Green Fluorescent Protein. *Embryo Project Encyclopedia*. Retrieved from <https://embryo.asu.edu/pages/green-fluorescent-protein>

ANEXOS

Anexo A. gBlock A EN FORMATO BIOBRICK CONTENIENDO EL PROMOTOR INDUCIBLE plac y CBDcipA CON ESPACIADOR ENDÓGENO



Anexo B. gBlock B EN FORMATO BIOBRICK CONTENIENDO EL ORF DE LA PROTEÍNA BMP2



Anexo C. gBlock B EN FORMATO BIOBRICK CONTENIENDO EL ORF DE LA PROTEÍNA sfGFP

