

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO



ESCUELA SUPERIOR DE APAN

TESIS DE LICENCIATURA

Evaluación de TraR en el crecimiento y metabolismo en *Escherichia coli*

Para obtener el título de

Licenciada en Ingeniería en Biociencias

PRESENTA

Valeria Elena Bermeo Jaimes

Director de tesis

Dr. José Utrilla Carreri

Co-director de tesis

Dr. Martin Peralta Gil

Lugar donde se realizó la tesis

Este trabajo se realizó en el Programa de Biología Sintética del Centro de Ciencias Genómicas, bajo la dirección del Dr. José Utrilla Carreri y fue financiado por el proyecto DGAPA -PAPIIT-UNAM IN214923.



Valeria Elena Bermeo Jaimes P.D.L.I.B.C.
P R E S E N T E

Por este medio le comunico que, el jurado asignado a la pasante de la licenciatura en Ingeniería en Biociencias, **Valeria Elena Bermeo Jaimes (435592)**, a quien le presentó el trabajo para su titulación en la modalidad de tesis con el título "**Evaluación de TraR en el crecimiento y metabolismo en *Escherichia coli***", después de la revisión, ha autorizado la impresión.

A continuación, se presentan las firmas de conformidad de los miembros de este jurado:

PRESIDENTE: Dr. Martín Peralta Gil

SECRETARIO: Dr. José Ultrilla Carreri

PRIMER VOCAL: Dra. María Magdalena Armendáriz Ontiveros

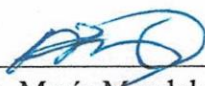
SEGUNDO VOCAL: Dr. Jaime Alioscha Cuervo Parra

TERCER VOCAL: Dra. Teresa Romero Cortes

SUPLENTE 1: Dr. Víctor Hugo Pérez España

SUPLENTE 2: Dra. Lis Tamayo Rivera

ATENTAMENTE
"Amor, Orden y Progreso"
Chimalpa, Apan, Hgo., México a 16 de junio de 2026.


Dra. María Magdalena Armendáriz Ontiveros
Coordinador de Ingeniería en Biociencias



Agradecimientos

Quiero agradecer profundamente al Dr. José Utrilla Carreri, quien dirigió este trabajo, por haberme brindado la oportunidad de realizar este proyecto y guiarme durante el proceso; sin su guía esto no hubiera sido posible. Gracias por haber sido un gran asesor y un jefe excepcional, cuya comprensión, calidad humana y constante apoyo hicieron de este camino una experiencia invaluable. Al M.C. Omar Alejandro Aguilar Vera y a la Dra. Gabriela Pérez-Segura, por el apoyo técnico y su valioso acompañamiento en el laboratorio. A la estudiante de doctorado Donaji Guadalupe Hernández Moreno por su paciencia para enseñarme a trabajar con HPLC y compartirme su experiencia. Asimismo, expreso mi gratitud por el financiamiento de la beca PAPIIT brindada por la UNAM, la cual hizo viable la realización de este proyecto.

También quiero agradecer al Dr. Martín Peralta Gil por ser un ejemplo a seguir desde que entré a la universidad, por su confianza, su motivación, por haber creído en mí e impulsarme a seguir mis sueños. Sus enseñanzas y todo el esfuerzo que realiza para dar lo mejor de sí como profesor me ha inspirado para seguir en el camino de la ciencia.

A mis mejores amigos, Karina Mendoza, Aaron Miranda y Mauricio Herrera, por jamás dejarme sola a pesar de los momentos tan difíciles que he atravesado el último año. Gracias por enseñarme el verdadero valor de la amistad y por todo su cariño; sin duda, me siento rodeada de mucho amor gracias a ustedes. En las buenas, en las malas y en las peores. De igual forma a mi amiga Citlali Campos, por acompañarme durante la universidad y brindarme su amistad.

Por último pero no menos importante, a mi mamá y a mi papá, por darme todas las herramientas para llegar hasta aquí. Gracias por ser mi sostén y mi motivación diaria; por ser grandes ejemplos de trabajo, dedicación y superación. Gracias por los valores que me han inculcado y por darme la mejor educación que pude haber tenido. En especial a mi madre por su gran crianza y todo su amor.

Resumen

En la optimización de bioprocesos, uno de los desafíos más significativos es el control del metabolismo bacteriano. Naturalmente, bacterias como *Escherichia coli* priorizan un crecimiento acelerado, destinando gran parte de su energía a la síntesis de ribosomas. Sin embargo, este crecimiento rápido suele conducir a la formación de subproductos como el acetato, lo que reduce la eficiencia en procesos biotecnológicos. En este contexto, esta tesis investiga la proteína TraR, una proteína pequeña de 73 aminoácidos capaz de simular la “respuesta estricta” bacteriana, un mecanismo de supervivencia que normalmente se activa ante la limitación de nutrientes y que reprograma las prioridades celulares.

El propósito central de este trabajo fue evaluar el uso de TraR como una posible herramienta de reprogramación celular en distintas condiciones nutricionales. Para ello, se indujo su expresión mediante IPTG y se analizó su impacto sobre el crecimiento y el metabolismo de *Escherichia coli*.

Los resultados demostraron que el efecto de la expresión de TraR depende de la concentración de IPTG y del momento de inducción. Una inducción desde el inicio del cultivo y a una concentración más alta redujo de manera más marcada el efecto sobre la velocidad máxima de crecimiento, mientras que una inducción en fase exponencial temprana y a menor concentración afectó principalmente la densidad óptica máxima alcanzada. Estos efectos se observaron tanto en medios ricos como en medios limitados en nutrientes.

El análisis metabólico mediante HPLC reveló una disminución en el consumo de glucosa y en la producción de acetato, así como la detección de succinato en los cultivos que expresaban TraR. Estos resultados sugieren que TraR no sólo influye en el crecimiento, sino que posee la cualidad de redirigir el flujo de carbono hacia otras rutas como el ciclo del

ácido tricarboxílico, aprovechando mejor la energía y los recursos de la célula.

Aunque los datos obtenidos evidencian un cambio metabólico claro, es necesario realizar experimentos para comprender los mecanismos moleculares exactos mediante los cuales TraR ejerce este efecto. No obstante, los resultados de este trabajo indican que TraR puede representar una herramienta útil en biología sintética y en la optimización de cepas bacterianas, especialmente en procesos donde se busca reducir la formación de subproductos y mejorar el aprovechamiento del sustrato para la producción de metabolitos de interés industrial.

Abstract

In bioprocess optimization, one of the most significant challenges is controlling bacterial metabolism. Naturally, bacteria such as *Escherichia coli* prioritize accelerated growth, allocating a large portion of their energy to ribosome synthesis. However, this rapid growth often leads to the formation of by-products like acetate, which reduces efficiency in biotechnological processes. In this context, this thesis investigates the TraR protein, a small 73-amino acid protein capable of mimicking the bacterial "stringent response"—a survival mechanism normally triggered by nutrient limitation that reprograms cellular priorities.

The central purpose of this work was to evaluate the use of TraR as a potential tool for cellular reprogramming under different nutritional conditions. To achieve this, its expression was induced using IPTG, and its impact on the growth and metabolism of *Escherichia coli* was analyzed.

The results demonstrated that the effect of TraR expression depends on both the IPTG concentration and the timing of induction. Induction from the beginning of the culture at a higher concentration led to a more pronounced reduction in the maximum growth rate, whereas induction during the early exponential phase at a lower concentration mainly affected the maximum optical density achieved. These effects were observed in both rich and nutrient-limited media.

Metabolic analysis via HPLC revealed a decrease in glucose consumption and acetate production, as well as the detection of succinate in cultures expressing TraR. These results suggest that TraR not only influences growth but also possesses the ability to redirect carbon flux toward alternative pathways, such as the tricarboxylic acid cycle, thereby optimizing the cell's energy and resources.

Although the obtained data demonstrate a clear metabolic shift, further experiments are required to understand the exact molecular mechanisms through which TraR exerts this effect. Nevertheless, the findings of this work indicate that TraR may represent a valuable tool in synthetic biology and bacterial strain

optimization, particularly in processes aimed at reducing by-product formation and improving substrate utilization for the production of metabolites of industrial interest.

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	11
1.1 Biología sintética	11
1.2 Chasis: <i>Escherichia coli</i>	12
1.3 Asignación de recursos celulares y división del proteoma	13
1.4 Síntesis de ribosomas en <i>E. coli</i>	15
1.4.1 Costo energético de los ribosomas y su importancia fisiológica	15
1.4.2 Organización de los operones ribosomales (<i>rrn</i>)	16
1.5 Regulación transcripcional: canal secundario de la ARN polimerasa	16
1.6 Respuesta estricta: alarmona ppGpp y DksA	18
1.7 TraR: una proteína reguladora en <i>E. coli</i>	19
2. ANTECEDENTES	20
3. JUSTIFICACIÓN	22
4. HIPÓTESIS	24
5.1 Objetivo general	24
5.2 Objetivos específicos	24
6. METODOLOGÍA	25
6.1 Plásmidos y cepas bacterianas	25
6.2 Preparación de células electrocompetentes	25
6.3 Transformación de cepas	26
6.4 Cinéticas de crecimiento	26
6.4.1 Medios de cultivo	26
6.4.2 Cinéticas en placa	26
6.4.3 Cinéticas en matraz	28
6.5 Análisis de HPLC	29
6.6 Análisis estadístico	30
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
7.1 Transformación de cepas y evidencia fenotípica inicial de <i>traR</i>	31
7.2 Caracterización cinética en microplaca revela una inhibición del crecimiento por TraR dependiente de la dosis del inductor y revela un mecanismo potencialmente independiente de ppGpp	32
7.2.1 Efecto de una inducción moderada	33

7.3 Efecto de la inducción temprana de <i>traR</i> sobre el crecimiento en matraz con M9 y glucosa	40
7.4 Cambios metabólicos asociados a la expresión de <i>traR</i>	43
7.4.1 Consumo de glucosa y producción de ácidos orgánicos determinados mediante HPLC en medio M9 con glucosa.....	43
7.4.2 Relación entre perfil metabólico y dinámica de crecimiento celular.....	45
7.4.3 Posibles implicaciones de la redistribución de recursos para la fisiología bacteriana y su aprovechamiento en biología sintética	46
8. CONCLUSIONES.....	48
9. PERSPECTIVAS.....	49
10. REFERENCIAS.....	50

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Biología sintética

La biología sintética es un campo emergente que busca aplicar principios de la ingeniería al diseño y construcción de sistemas biológicos. Este enfoque interdisciplinario combina conocimientos de biología molecular, bioquímica, ingeniería genética, informática y otras disciplinas para desarrollar organismos con funciones nuevas o mejoradas (Freemont, 2019). A diferencia de otras ramas de la biología, la biología sintética no se limita a estudiar organismos tal como existen en la naturaleza, sino que tiene como objetivo reprogramarlos de forma racional para que puedan realizar tareas específicas (Kitano et al., 2023).

Uno de los propósitos centrales de esta disciplina es modificar o ampliar el comportamiento de los organismos, ya sea para resolver problemas prácticos como la producción de compuestos químicos o medicamentos, o para ampliar los límites de lo que se puede construir con componentes biológicos (Andrianantoandro et al., 2006). Esto se logra mediante el uso de conceptos clave de la ingeniería que permiten diseñar partes biológicas funcionales de forma más sistemática, predecible y escalable (Garner, 2021; Kelwick et al., 2014).

Dentro del campo existen dos enfoques principales: el llamado “de arriba hacia abajo”, que consiste en modificar células vivas ya existentes utilizando herramientas de biología molecular e ingeniería genética; y el enfoque “de abajo hacia arriba”, que intenta construir células artificiales a partir de componentes no vivos (Elani, 2020). Ambos enfoques comparten un objetivo común que es diseñar sistemas biológicos controlables y programables, pero diferentes del punto en el que parten.

La riqueza y versatilidad de los sistemas biológicos hacen que sean herramientas ideales para enfrentar desafíos globales en áreas como la salud, la energía y el medio ambiente. Por ejemplo, a través de la ingeniería metabólica, es posible redirigir las rutas bioquímicas de una célula para producir compuestos de interés a partir de materias primas simples como la glucosa (Keasling, 2008). De hecho, la biología sintética ya ha demostrado su potencial en la modificación de microorganismos para la producción industrial de productos químicos (Freemont,

2019). Esto significa que, si conocemos cómo una célula regula sus genes, produce energía o responde al ambiente, podemos intervenir esos procesos para que cumpla nuevas tareas.

1.2 Chasis: *Escherichia coli*

En el contexto de la biología sintética, el término chasis se refiere a un organismo huésped que alberga componentes genéticos sintéticos y proporciona los recursos necesarios para su funcionamiento, tales como energía, maquinaria celular y condiciones adecuadas de expresión (Chi et al., 2019; Kelwick et al., 2014). Para que un sistema biológico artificial funcione correctamente, es esencial contar con un chasis que sea estable, bien caracterizado y capaz de crecer utilizando fuentes de carbono simples y económicas, especialmente cuando se busca la producción a escala de moléculas como compuestos químicos industriales (Keasling, 2008). Un buen chasis también debe resistir al estrés celular asociado a la producción de estas moléculas, además de permitir una manipulación genética eficiente y que sea reproducible en laboratorio.

Uno de los organismos modelo más utilizados como chasis es *Escherichia coli*, una bacteria que ha sido objeto de estudio en biología molecular durante más de 60 años. Gracias a su rápido crecimiento, facilidad de cultivo y manipulación genética, y a que puede vivir en condiciones controladas y económicas, *E. coli* se ha consolidado como el chasis de referencia para la biología sintética y la biotecnología (Garner, 2021; Katz et al., 2018). Su genoma ha sido completamente secuenciado y bien caracterizado, lo que permite una ingeniería de precisión a través de herramientas genéticas avanzadas. Además, cuenta con un amplio conjunto de recursos disponibles, como plásmidos, partes genéticas estándar, promotores, sitios de unión al ribosoma (RBS), terminadores y vectores de ADN, lo cual facilita enormemente el diseño y construcción de circuitos sintéticos (Adams, 2016).

Dentro de las muchas variantes de *E. coli*, una de las cepas más utilizadas en investigación actual es BW25113, derivada de la cepa K-12. Esta cepa fue desarrollada en el laboratorio de Barry L. Wanner utilizando el sistema de recombinación Red de fago lambda, lo que permitió interrumpir genes de forma más

precisa mediante productos de PCR de doble cadena (Datsenko & Wanner, 2000). A diferencia de otras cepas como MG1655 y W3110, BW25113 presenta delecciones intencionales en varios genes, como *araABD* (metabolismo de arabinosa), *rhaDAB* (metabolismo de ramnosa), *lacZYA* (metabolismo de lactosa), y *hsdRMS*, con el fin de simplificar el fondo genético y facilitar la inserción de ADN exógeno sin interferencias metabólicas o epigenéticas (Grenier et al., 2014). Su genoma, que cuenta con aproximadamente 4.63 millones de pares de bases, ha sido completamente secuenciado, y su estabilidad genética, junto con su facilidad para ser manipulada, la ha convertido en una herramienta altamente eficiente para aplicaciones en biotecnología, biología sintética e ingeniería metabólica (Baba et al., 2006).

1.3 Asignación de recursos celulares y división del proteoma

El funcionamiento de una célula está estrechamente influenciado por las condiciones del ambiente. En bacterias como *Escherichia coli*, la tasa de crecimiento puede cambiar considerablemente dependiendo del tipo y la cantidad de nutrientes disponibles. Estos cambios afectan no solo la velocidad de la división celular, sino también su composición macromolecular, tamaño y el número de componentes clave como ribosomas y ARN polimerasas (Klumpp et al., 2009; Klumpp & Hwa, 2014).

La expresión génica está fuertemente acoplada al estado fisiológico de la célula, especialmente a la tasa de crecimiento. Por ejemplo, durante el crecimiento rápido, la célula necesita más ribosomas para sostener una alta tasa de producción de proteínas. Sin embargo, como la síntesis de proteínas es el proceso más costoso energéticamente durante la proliferación celular (Li et al., 2014), la célula se ve forzada a distribuir sus recursos de forma óptima para no comprometer su viabilidad (Scott et al., 2010).

Se ha propuesto una división del proteoma, es decir, el conjunto de todas las proteínas presentes en la célula en un momento dado (Aslam et al., 2017), en distintas fracciones según su función. Esta división contempla tres partes principales. La primera es una fracción fija que permanece constante

independientemente de la tasa de crecimiento, y que incluye proteínas esenciales para su mantenimiento (Scott et al., 2014; Scott & Hwa, 2011). La segunda es la fracción ribosómica, que está formada por los ribosomas y otras proteínas necesarias para la producción de nuevas proteínas, la cual suele aumentar cuando la célula crece rápidamente (Molenaar et al., 2009; Scott et al., 2010). La tercera es la fracción metabólica, que contiene proteínas como enzimas, transportadores y otras proteínas que ayudan a captar y procesar nutrientes, las cuales también son ajustadas según las necesidades de crecimiento (Scott et al., 2014).

Durante el crecimiento rápido, la fracción ribosómica del proteoma aumenta casi proporcionalmente con la tasa de crecimiento (Molenaar et al., 2009), pero esto ocurre a expensas de reducir la fracción metabólica (Klumpp & Hwa, 2014). Es decir, la célula hace un intercambio donde prioriza la producción de ribosomas para mantener su capacidad de síntesis, pero sacrifica la expresión de otras proteínas no esenciales bajo esas condiciones.

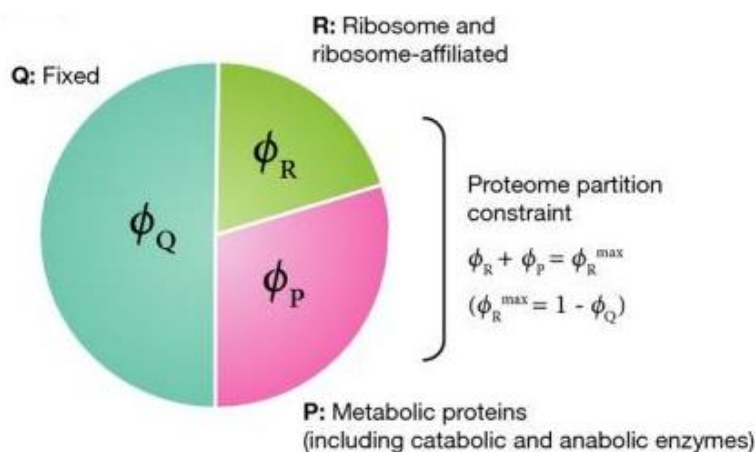


Figura 1. Diagrama de la partición mínima del proteoma. La fracción Q es independiente a la tasa de crecimiento, la fracción R contiene proteínas relacionadas al ribosoma y la fracción P incluye proteínas metabólicas (Scott et al., 2014).

Este modelo de división del proteoma ayuda a explicar cómo la célula adapta su fisiología para maximizar su eficiencia y crecimiento. Además, es fundamental para entender el comportamiento de los mecanismos que regulan la expresión de los genes en distintos contextos fisiológicos, que estos no funcionan de forma aislada,

sino dentro de un sistema que ajusta constantemente cómo distribuye sus recursos limitados (Li et al., 2014).

1.4 Síntesis de ribosomas en *E. coli*

Los ribosomas son estructuras celulares fundamentales compuestas por ARN y proteínas, cuya función principal es traducir la información contenida en el ARN mensajero (ARNm) en proteínas (Kaczanowska & Rydén-Aulin, 2007). Su formación es un proceso altamente coordinado que incluye la transcripción y maduración de los ARN ribosómicos (ARNr), la síntesis de las proteínas ribosómicas y su posterior ensamblaje (Bachmann, 1990; Bremer & Dennis, 2008). La cantidad y actividad de los ribosomas están estrechamente reguladas y ajustadas a las condiciones ambientales y al estado fisiológico del microorganismo, lo cual es indispensable para mantener el equilibrio celular y evitar un gasto excesivo de energía (Paul et al., 2025).

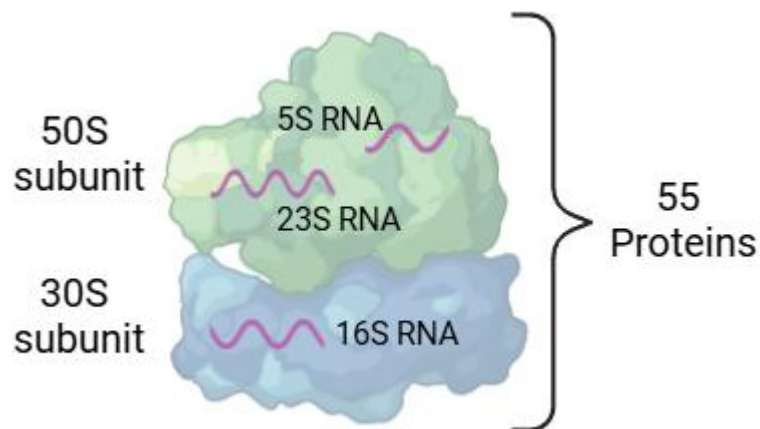


Figura 2. Estructura del ribosoma procariota (adaptado de Steitz, 2008). Está formado por dos subunidades: la pequeña, de 30S, que contiene el ARN ribosómico 16S y 21 proteínas, y la grande, de 50S, que incluye los ARN ribosómicos 23S y 5S junto con 34 proteínas ribosómicas.

1.4.1 Costo energético de los ribosomas y su importancia fisiológica

La producción de ribosomas representa uno de los procesos más demandantes en términos energéticos. Se estima que alrededor del 85% del ARN total corresponde a ARNr y que, en condiciones de crecimiento rápido, hasta el 80% del ATP de la célula es destinado a la síntesis de proteínas ribosómicas y ARNr (Choi et al., 2022; Scott et al., 2010). Este alto costo refleja la relevancia fisiológica

de estas estructuras: la cantidad de ribosomas disponibles determina directamente la tasa de síntesis de proteínas y, en consecuencia, el crecimiento bacteriano (Bremer & Dennis, 2008).

La célula ajusta la producción de ribosomas en función de la disponibilidad de nutrientes. En condiciones favorables, se incrementa la síntesis ribosomal para sostener una alta tasa de crecimiento y producción de proteínas, mientras que en condiciones limitantes, se reduce su producción con el fin de evitar un gasto innecesario de recursos (Paul, Ross, et al., 2004). Este balance se regula principalmente a nivel transcripcional y traduccional, mediante la acción de la ARN polimerasa, factores sigma, proteínas reguladoras y pequeños ARN que modulan la expresión génica (Kaczanowska & Rydén-Aulin, 2007).

1.4.2 Organización de los operones ribosomales (*rrn*)

En *Escherichia coli* se han identificado siete operones ribosomales (*rrnA*, *rrnB*, *rrnC*, *rrnD*, *rrnE*, *rrnG* y *rrnH*), los cuales codifican los ARNr 16S, 23S y 5S, además de genes de ARN de transferencia (ARNt) insertados en las regiones espaciadoras o posteriores al ARN 5S. Un ejemplo particular es el operón *rrnD*, que contiene dos copias del gen 5S separadas por un gen ARNt (Condon et al., 1995). La transcripción de estos operones depende de dos promotores, *P1* y *P2*: el primero es altamente activo durante el crecimiento exponencial, mientras que el segundo asegura un nivel basal de expresión en condiciones de menor actividad metabólica (Paul, Ross, et al., 2004). Gracias a esta organización y al control ejercido por ambos promotores, la célula mantiene la producción de ribosomas ajustada a su estado fisiológico y a la disponibilidad de nutrientes.

1.5 Regulación transcripcional: canal secundario de la ARN polimerasa

La transcripción es el paso inicial y más regulado de la expresión génica en bacterias, ya que determina cuándo y en qué medida un gen va a ser expresado (Zenkin & Yuzenkova, 2015). Este proceso depende de la ARN polimerasa (RNAP), una enzima central que no solo sintetiza ARN a partir de ADN, sino que también integra múltiples señales regulatorias que permiten a la célula responder de manera eficiente a cambios ambientales (Browning & Busby, 2016; Esyunina et al., 2016).

La actividad de RNAP puede ser modulada por secuencias específicas de ADN, factores proteicos y moléculas pequeñas que actúan sobre distintas regiones de la enzima (Feklistov, 2013; Kormanec, 2022). De esta manera, la regulación transcripcional asegura que la síntesis de ARN se ajuste a las condiciones del entorno, favoreciendo la adaptación y la supervivencia celular.

Un punto clave dentro de RNAP es el canal secundario, un túnel estrecho que conecta la superficie de la enzima con su centro catalítico. Este canal constituye un sitio regulador estratégico, ya que permite el acceso directo de proteínas que pueden modificar las propiedades catalíticas de la polimerasa e influir en distintas etapas de la transcripción (Nickels & Hochschild, 2004; Zenkin & Yuzenkova, 2015). Entre estas proteínas se encuentran los factores de canal secundario (SCF), un grupo de pequeñas proteínas con una organización estructural conservada que incluye un dominio globular y un dominio en hélice enrollada. Este último se inserta en el canal para modular la actividad de RNAP y ajustar de manera precisa la síntesis de ARN (Stumper et al., 2019; Zenkin & Yuzenkova, 2015).

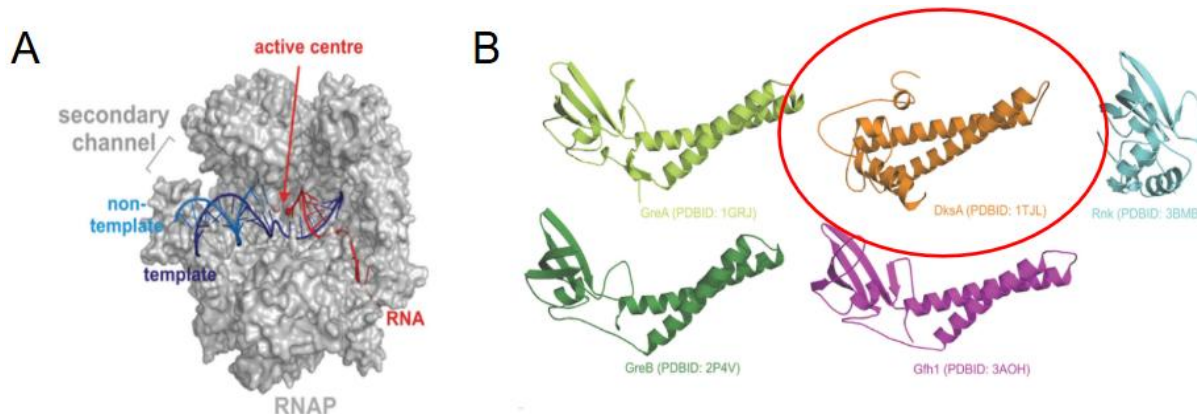


Figura 3. A) Estructura del complejo de elongación de la transcripción. B) Factores de unión al canal secundario de la ARN polimerasa bacterianos (Zenkin & Yuzenkova, 2015).

En *E. coli* se han identificado cinco factores de canal secundario (SCF): GreA, GreB, DksA, Gfh1 y Rnk (Zenkin & Yuzenkova, 2015). Aunque todos tienen una estructura similar, cada uno cumple un papel distinto en la regulación de la transcripción. GreA y GreB ayudan a RNAP a superar pausas cuando se detiene o retrocede durante la síntesis de ARN, DksA trabaja junto con la molécula señal ppGpp para ajustar la expresión de genes en condiciones de escasez de nutrientes,

mientras que TraR y Rnk funcionan como moduladores adicionales que influyen en la actividad de la enzima (Esyunina et al., 2016; Trautinger et al., 2005). De esta forma, el canal secundario actúa como un “centro de control” de la transcripción.

1.6 Respuesta estricta: alarmona ppGpp y DksA

La respuesta estricta es un mecanismo global de regulación que permite a *Escherichia coli* adaptarse rápidamente a condiciones de estrés nutricional. Este proceso depende de las denominadas alarmonas, ppGpp y pppGpp (conocidas en conjunto como (p)ppGpp), que fueron descritas por primera vez en bacterias durante la inanición de aminoácidos (Barker et al., 2001; Cashel & Gallant, 1969) y que se reconocen hoy como reguladores centrales del metabolismo. Estas moléculas actúan directamente sobre la ARN polimerasa, modificando su actividad para reprogramar la expresión génica y priorizar la supervivencia sobre el crecimiento celular (Artsimovitch et al., 2004; Potrykus et al., 2011; Zuo et al., 2013).

La síntesis de estas moléculas es mediada principalmente por dos enzimas homólogas que son RelA y SpoT. RelA se activa cuando hay escasez de aminoácidos: un ARNt sin carga entra en el sitio A del ribosoma, lo que bloquea temporalmente la síntesis proteica y desencadena la producción de ppGpp y pppGpp a partir de GDP/GTP Y ATP. Por su parte SpoT detecta limitaciones en la síntesis de ácidos grasos, hierro o carbono mediante la interacción con la proteína transportadora de acilos (ACP), regulando su actividad sintética e hidrolítica según la disponibilidad de estos nutrientes (Potrykus & Cashel, 2008; Wu & Xie, 2009).

Una vez acumulado en la célula, el (p)ppGpp altera de manera profunda la transcripción bacteriana. Se ha demostrado que inhibe la síntesis de ARN estable, como ARNr y ARNt, lo cual reduce la producción de ribosomas y ralentiza el crecimiento (Barker et al., 2001; Durfee et al., 2007; Ross et al., 2013). Al mismo tiempo, activa la expresión de genes asociados a la biosíntesis de aminoácidos, al transporte de nutrientes y a la respuesta al estrés, asegurando que los recursos disponibles se utilicen de manera más eficiente (Artsimovitch et al., 2004).

En este contexto, la proteína DksA desempeña un papel clave al potenciar los efectos de (p)ppGpp sobre la RNAP. DksA, formada por 151 aminoácidos, se une

al canal secundario de la enzima y, junto con la alarmona, modula de manera eficiente su actividad (Molodtsov et al., 2018; Paul, Barker, et al., 2004; Ross et al., 2013). La presencia de DksA permite la formación del “sitio 2” de unión de ppGpp en la polimerasa, lo que refuerza el acoplamiento entre ambos factores y asegura una regulación precisa de la transcripción (Molodtsov et al., 2018; Ross et al., 2016).

1.7 TraR: una proteína reguladora en *E. coli*

El gen *traR* se localiza en la región terminal del operón *tra* de los plásmidos conjugativos, como el plásmido F de *Escherichia coli*, considerado un modelo ampliamente estudiado en la transferencia horizontal de genes (Frost et al., 1994). Aunque su función no está completamente caracterizada, su alta conservación en plásmidos de la familia F indica que otorga una ventaja adaptativa a la bacteria, particularmente en etapas asociadas con la conjugación (Blankschien et al., 2009).

A nivel estructural, TraR es una proteína de 73 aminoácidos que comparte similitud con DksA, sobre todo en su región C-terminal. En esta zona se encuentran cisteínas que forman un motivo tipo “dedo de zinc”, conservado en varias proteínas reguladoras de la RNAP (Doran et al., 1994; Perederina et al., 2004). Aunque TraR es más corto que DksA, se ha propuesto que esta similitud le permite interactuar con la maquinaria transcripcional de la bacteria (Blankschien et al., 2009).

Funcionalmente, TraR participa en la adaptación de *E. coli* al estrés durante la conjugación al unirse al canal secundario de la RNAP y modular directamente su actividad transcripcional (Blankschien et al., 2009). Durante la formación de los pili F, se acumulan muchas proteínas en el periplasma, generando estrés para la célula. TraR activa genes dependientes del factor sigma σ^E , lo que aumenta la producción de chaperonas y proteasas. Estas proteínas ayudan a que las proteínas se plieguen correctamente, protegen a la célula de daños por estrés como calor o etanol y permiten que la transferencia del plásmido se realice con éxito. Así, TraR actúa como un regulador que conecta la conjugación con la respuesta al estrés, asegurando la supervivencia de la bacteria (Grace et al., 2015).

2. ANTECEDENTES

Diversos trabajos han demostrado experimentalmente que TraR puede sustituir funcionalmente a DksA en *E. coli*. Blankschien et al. (2009) demostraron que la sobreexpresión de *traR* en cepas de *E. coli* con delección de *dksA* podía restaurar la regulación de ciertos promotores, incluyendo los de ARNr, lo que evidenció su capacidad para sustituir parcialmente la función de DksA. Este hallazgo posicionó a TraR como un modulador global de la transcripción independiente de (p)ppGpp. En la misma línea, estudios posteriores con variantes DksA de actividad incrementada (Super DksAs) mostraron que pequeñas modificaciones en la interacción con la ARN polimerasa amplifican el control sobre promotores regulados por esta proteína (Blankschien, Lee, et al., 2009).

El papel de la redistribución de recursos se exploró también desde una perspectiva de evolución adaptativa. Utrilla et al. (2016) describieron cómo mutaciones puntuales pleiotrópicas en genes reguladores reprogramaban globalmente el metabolismo bacteriano, reduciendo la síntesis de ribosomas y favoreciendo rutas biosintéticas. Por su parte, Hidalgo et al. (2022) confirmaron que cambios regulatorios en la asignación de ribosomas reconfiguran el proteoma de crecimiento, lo cual genera un balance entre tasa de crecimiento y capacidad de adaptación. Estos resultados apoyan la idea de que factores como TraR, que reprimen la síntesis de ARNr, puede tener un impacto profundo en la fisiología celular al alterar el uso de los recursos.

De forma particularmente relevante, Gopalkrishnan et al., (2017) demostraron que TraR puede reprimir promotores de ARNr y activar rutas anabólicas de manera más efectiva que DksA en presencia de ppGpp. Estos experimentos mostraron que TraR no requiere de ppGpp para ejercer su función reguladora, lo que lo convierte en un factor aún más potente para reprogramar la transcripción. Posteriormente, Chen et al. (2019) confirmaron este efecto a nivel estructural, mostrando que TraR actúa mediante un mecanismo alostérico que modifica la conformación de la RNAP. Más recientemente, Gopalkrishnan et al.

(2022) ampliaron este panorama al identificar homólogos de TraR en otros sistemas bacterianos y fágicos, como Orf73 del fago λ , capaces de reprogramar directamente la transcripción del hospedero.

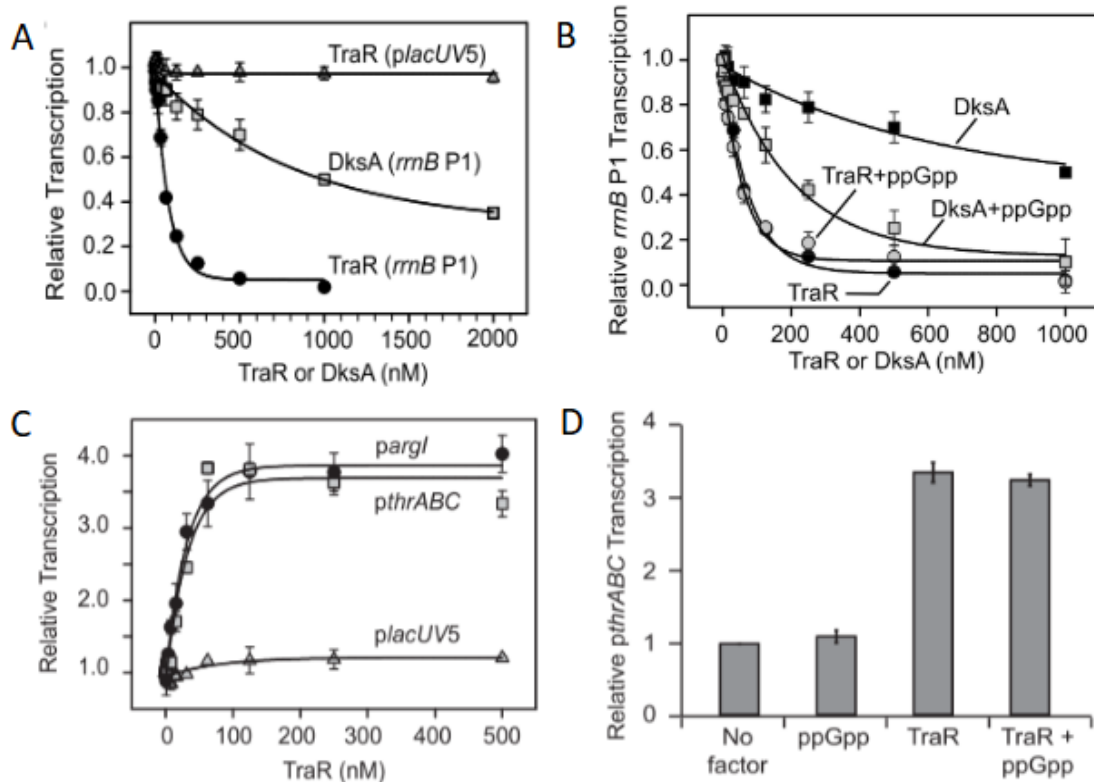


Figura 4. A) Curvas de transcripción relativa del promotor *rrnB P1* en presencia de diferentes concentraciones de TraR o DksA, mostrando que TraR reprime de manera más eficiente la transcripción de dicho promotor en comparación con DksA. B) Comparación de la actividad transcripcional de *rrnB P1* con DksA solo, DksA + ppGpp, TraR solo y TraR + ppGpp, evidenciando que TraR actúa de mejor manera sin necesidad de ppGpp y puede superar la represión inducida por DksA + ppGpp. C) Activación de promotores de biosíntesis de aminoácidos por TraR. D) Transcripción relativa de *pthrABC* en presencia de TraR, ppGpp y TraR+ppGpp, mostrando que TraR activa significativamente la transcripción independiente de ppGpp (Gopalkrishnan et al., 2017).

También dentro de la biotecnología bacteriana se han explorado distintas estrategias para modular el crecimiento con fines productivos. Entre ellas destacan la manipulación de factores globales de transcripción, que permiten reprogramar de

manera amplia la asignación de recursos celulares hacia rutas de interés (Zhou et al., 2024).

En conjunto, estos antecedentes muestran que la expresión de *traR* reprime la síntesis de ARNr y redistribuye recursos hacia rutas biosintéticas, promoviendo una fisiología bacteriana menos enfocada en el crecimiento rápido y más en la adaptación metabólica. Sin embargo, la mayoría de los estudios se han enfocado en la regulación transcripcional o en mutantes de laboratorio, mientras que falta caracterizar de manera sistemática el efecto fisiológico al inducir *traR* en *E. coli*, particularmente en términos de velocidad de crecimiento, densidad celular y perfil metabólico. Precisamente este es el enfoque de la presente investigación.

3.JUSTIFICACIÓN

A pesar de los avances en la caracterización estructural y regulatoria de TraR en *Escherichia coli*, todavía se desconoce cómo su expresión inducida impacta directamente la fisiología celular. Hasta el momento, la mayoría de los estudios se han enfocado en describir sus mecanismos de interacción con la ARN polimerasa y su capacidad de modular la transcripción (Chen et al., 2019; Gopalkrishnan et al., 2017), pero no se ha evaluado de manera sistemática cómo esta regulación se traduce en cambios medibles en el crecimiento, la biomasa o el metabolismo.

Este vacío resulta especialmente relevante porque la redistribución de recursos celulares, en particular la que afecta la síntesis ribosomal, se ha identificado como un factor clave en la capacidad de las bacterias para equilibrar la proliferación y la adaptación metabólica (Hidalgo et al., 2022; Utrilla et al., 2016). Comprender si TraR puede redirigir estos recursos hacia rutas biosintéticas sin depender de las señales clásicas como (p)ppGpp, no solo permitirá profundizar en su papel como modulador global, sino que también abrirá oportunidades en biología sintética. En este campo, la posibilidad de ralentizar selectivamente el crecimiento para liberar capacidad biosintética resulta estratégica para optimizar la producción de metabolitos de interés industrial, como aminoácidos, ácidos orgánicos o precursores de fármacos.

Por estas razones, la presente investigación busca llenar dicho vacío al evaluar de manera sistemática cómo la inducción de *traR* afecta el crecimiento y el metabolismo de *E. coli* en diferentes condiciones de cultivo. Al integrar análisis de cinética de crecimiento con perfiles metabólicos obtenidos por HPLC, este trabajo no solo aportará información sobre el impacto fisiológico de TraR, sino que también contribuirá a sentar bases para su aplicación como herramienta regulatoria en el diseño de bacterias optimizadas para la producción biotecnológica. De esta manera, los resultados esperados profundizarán en el conocimiento de la biología de la regulación transcripcional en bacterias y ampliarán las herramientas disponibles en biología sintética para el rediseño de microorganismos productores.

4.HIPÓTESIS

La expresión inducida de *traR* en *Escherichia coli* reducirá la velocidad de crecimiento, el consumo de glucosa y el metabolismo de sobreflujo de manera concentración dependiente.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general.

Evaluar el efecto de la expresión inducida de la proteína TraR en *Escherichia coli* sobre la velocidad de crecimiento celular, la densidad óptica y el perfil metabólico, bajo diferentes condiciones de cultivo y parámetros de inducción, con el fin de caracterizar su impacto fisiológico y su posible aplicación en el control del crecimiento bacteriano.

5.2 Objetivos específicos.

1. Determinar el efecto de la expresión de *traR* en *E. coli* sobre el crecimiento celular en distintos medios de cultivo.
2. Comparar la cinética de crecimiento en microplacas y matraces, bajo diferentes condiciones de inducción de *traR* (concentración y tiempo).
3. Analizar el consumo de glucosa y la producción de ácidos orgánicos mediante HPLC para asociar cambios metabólicos con la expresión de *traR*.

6. METODOLOGÍA

6.1 Plásmidos y cepas bacterianas

Se trabajó con dos versiones del plásmido pAJM.336, ambos con resistencia a kanamicina. El primero contiene el gen *traR*, el cual codifica para el regulador transcripcional TraR y cuya expresión es inducible mediante IPTG. El segundo corresponde a la versión vacía del mismo plásmido, utilizada como control negativo. Ambos plásmidos fueron previamente contruidos y extraídos a partir de cepas de *Escherichia coli* disponibles en el laboratorio, utilizando el kit de purificación de plásmidos de Jena Bioscience. Cabe mencionar que durante el desarrollo de este trabajo no se realizaron modificaciones en los plásmidos. Las transformaciones se llevaron a cabo en la cepa *E. coli* BW25113.

6.2 Preparación de células electrocompetentes

Una alícuota de *E. coli* BW25113 crio-preservada en glicerol al 20 % fue descongelada y sembrada en medio sólido LB. Tras incubación a 37 °C durante 16 horas, se seleccionaron colonias individuales para inocular 4 mL de medio YENB en tubos cónicos de 15 mL, incubando a 37 °C y 250 rpm durante toda la noche.

Del cultivo nocturno se midió la densidad óptica a 600 nm (DO_{600}), y se inoculó el volumen necesario para obtener una DO_{600} inicial de 0.05 en 50 mL de medio YENB en un matraz Erlenmeyer de 500 mL. El cultivo se incubó a 37 °C con agitación a 250 rpm hasta alcanzar una DO_{600} entre 0.5 y 0.9. Se detuvo el crecimiento colocando los matraces en hielo durante 10 minutos.

El cultivo se dividió en tubos cónicos de 50 mL (25 mL/tubo) y se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos a 15 °C. El sobrenadante fue descartado, y las células se lavaron dos veces con 5 mL de glicerol al 10 % estéril, evitando el uso de vortex. En cada lavado, se repitió la centrifugación en las mismas condiciones. Las células se resuspendieron en 0.25 mL de glicerol al 10 %, se alicuotaron en volúmenes de 50 μ L y se congelaron en nitrógeno líquido. Las alícuotas se almacenaron a –80 °C hasta su uso.

6.3 Transformación de cepas

Se descongelaron dos alícuotas de células electrocompetentes en hielo durante 10 minutos. Se añadieron 3 μ L de ADN plasmídico (pAJM.336 con *traR* o pAJM.336 vacío) a 50 μ L de células, mezclando suavemente por pipeteo. Las mezclas se mantuvieron en hielo durante 30 minutos y luego se transfirió cada una a una cubeta de electroporación. Se aplicó un pulso eléctrico de 1800 V usando un Eppendorf Eporator. De inmediato, se añadieron 1 mL de medio SOC, incubando a 37 °C durante 1 hora con agitación a 250 rpm para permitir la recuperación celular.

Posteriormente, se sembraron 100 μ L de cada cultivo en placas con medio LB suplementado con kanamicina (50 μ g/mL). Las células se distribuyeron con perlas de vidrio estériles. Las placas se incubaron boca abajo a 37 °C durante 16 horas. Se seleccionaron las colonias transformadas, las cuales se recuperaron para la preparación de alícuotas en glicerol y posterior criopreservación a -20 °C.

6.4 Cinéticas de crecimiento

6.4.1 Medios de cultivo

Los medios de cultivo evaluados fueron: medio mínimo M9 suplementado con glucosa al 0.4%, medio mínimo M9 con glucosa al 0.4% y casaminoácidos al 0.02%, y medio LB.

El medio mínimo M9 se preparó con la siguiente composición: 33.7 mM Na_2HPO_4 , 22.0 mM KH_2PO_4 , 8.55 mM NaCl, 9.35 mM NH_4Cl , 1 mM MgSO_4 y 0.3 mM CaCl_2 , y se suplementó con una solución de elementos traza que contenía 13.4 μ M EDTA, 3.1 μ M FeCl_3 , 0.62 μ M ZnCl_2 , 76 nM CuCl_2 , 42 nM CoCl_2 , 162 nM H_3BO_3 y 8.1 nM MnCl_2 (J.T. Baker).

6.4.2 Cinéticas en placa

Se trabajó con tres variantes de la cepa *Escherichia coli* BW25113: cepa silvestre (wild type), cepa transformada con el plásmido pAJM.336 vacío, y cepa transformada con el plásmido pAJM.336 que contiene el gen *traR*. Además, se incluyó una cuarta condición experimental, en la que la cepa portadora del plásmido

con *traR* fue inducida con alguna concentración de IPTG según el experimento para evaluar los efectos de su sobreexpresión.

Para su recuperación, se utilizaron alícuotas previamente conservadas a -20°C en glicerol. A partir de estas, se tomó una pequeña cantidad con un asa estéril y se sembró en cajas Petri con medio LB sólido. En el caso de las cepas transformadas, el medio fue suplementado con kanamicina ($50\text{ }\mu\text{g/mL}$), correspondiente al marcador de resistencia presente en el plásmido. Las cajas se incubaron a 37°C durante aproximadamente 16 horas, hasta observar el crecimiento de colonias aisladas.

Una vez recuperadas las cepas, se seleccionó una colonia individual de cada una para preparar el preinóculo. Cada colonia se inoculó en 2 mL del medio a evaluar: medio mínimo M9 suplementado con glucosa al 0.4 %, medio M9 con glucosa al 0.4 % y casaminoácidos al 0.02 %, o bien, medio LB. Los cultivos fueron suplementados con kanamicina ($50\text{ }\mu\text{g/mL}$) cuando fue necesario. La incubación se realizó a 37°C con agitación a 250 rpm durante 12 a 16 horas.

Al día siguiente, se midió la densidad óptica (DO_{600}) de cada preinóculo utilizando un espectrofotómetro (BioSpectrometer, Eppendorf). Las muestras fueron diluidas 1:10 para evitar saturación. Se utilizó como blanco el mismo medio de cultivo de la muestra a medir. El valor real de DO se obtuvo multiplicando la lectura por el factor de dilución.

Cada cultivo se preparó en un volumen final de 500 μL de medio fresco. Para la condición inducida, se añadió IPTG a una concentración final de 0.1 mM o 1 mM, dependiendo del experimento. La inducción se realizó ya sea al inicio de la cinética o una vez alcanzada una densidad óptica (DO_{600}) entre 0.15 y 0.2, según el diseño experimental.

Los 500 μL de cultivo permitieron llenar tres pozos de una placa de 96 pozos, distribuyendo 150 μL por pozo, y asegurando así el análisis por triplicado de cada condición experimental. La transferencia del cultivo a la placa se llevó a cabo dentro

de una campana de extracción, con el fin de mantener condiciones estériles. Una vez cargada, la placa se cubrió con un film estéril y se colocó en el lector de microplacas BioTek ELx808, operado mediante el software Gen5 versión 3.05.

El experimento fue programado para monitorear el crecimiento bacteriano a 37 °C, con agitación orbital constante y lecturas de densidad óptica (DO_{600}) cada 20 minutos, durante un periodo total de 24 horas. Finalizada la lectura, los datos fueron exportados en formato de texto (.txt) para su posterior análisis.

6.4.3 Cinéticas en matraz

Se realizaron experimentos de cinética en matraz con las siguientes variantes de la cepa *Escherichia coli* BW25113: cepa silvestre (wild type), cepa transformada con el plásmido pAJM.336 vacío, cepa transformada con el plásmido pAJM.336 que contiene el gen *traR*, bajo condición de inducción con IPTG.

Las cepas fueron recuperadas a partir de alícuotas previamente conservadas a -20 °C en glicerol. Para ello, se tomó una pequeña cantidad de cada cepa con un asa estéril y se sembró en medio LB sólido, suplementado con kanamicina (50 µg/mL) en el caso de las cepas transformadas. Las placas se incubaron a 37 °C durante aproximadamente 16 horas hasta obtener colonias aisladas. A partir de estas, se seleccionó una colonia individual por cepa y se inoculó en 5 mL de medio de cultivo M9 suplementado con glucosa al 0.4%. La incubación se llevó a cabo a 37 °C con agitación constante a 250 rpm durante 12 a 16 horas.

Posteriormente, se determinó la densidad óptica (DO_{600}) de cada preinóculo mediante espectrofotometría (BioSpectrometer Eppendorf), utilizando diluciones 1:10 para evitar lecturas saturadas. Se empleó como blanco el mismo medio en el que crecieron las células. El valor real de DO se obtuvo multiplicando la lectura por el factor de dilución.

Con base en los valores de DO medidos, se calcularon los volúmenes de preinóculo necesarios para ajustar una DO_{600} inicial de 0.05 en 50 mL de medio M9 enriquecido con glucosa al 0.4%, contenido en matraces Erlenmeyer de 250 mL

previamente identificados. En los casos correspondientes, se suplementó el medio con kanamicina (50 µg/mL). Para la condición inducida, se añadió IPTG a una concentración final de 1 mM desde el inicio de la cinética. Todos los cultivos se realizaron por triplicado.

Una vez inoculados, los matraces se incubaron en un baño de agua a 37 °C con agitación constante durante 24 horas. El seguimiento del crecimiento celular se realizó mediante muestreos durante las primeras 10 horas, y un último muestreo al cabo de 24 horas. Las muestras fueron analizadas por espectrofotometría, realizando las diluciones adecuadas según la densidad celular. Todos los valores de densidad óptica (DO₆₀₀) obtenidos fueron registrados en tablas para su análisis posterior.

Además, se recolectaron muestras para análisis de metabolitos mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Para ello, se tomaron 1 mL de todos los cultivos de cada condición experimental en los puntos de tiempo antes mencionados. Las muestras se centrifugaron a 13,000 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante fue transferido cuidadosamente a tubos Eppendorf estériles previamente rotulados con el nombre de la cepa, la hora de muestreo y la fecha, y almacenado a -20 °C hasta su procesamiento.

6.5 Análisis de HPLC

Los análisis se realizaron en un sistema de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), equipado con detectores de índice de refracción (RID) y de arreglo de diodos (DAD). La cuantificación de metabolitos, incluyendo glucosa y ácidos orgánicos, se llevó a cabo utilizando una columna Aminex® HPX-87H (300 mm × 7.8 mm, Bio-Rad) diseñada específicamente para la separación de ácidos orgánicos. La fase móvil consistió en ácido sulfúrico 5 mM, con un flujo de 0.5 mL/min a 50°C. Las muestras fueron filtradas previamente mediante filtros de 0.22 µm antes de la inyección para evitar la presencia de partículas que pudieran afectar la columna.

El procedimiento se realizó únicamente en el medio M9 con glucosa al 0.4%, seleccionado por su composición conocida, bajo una única condición de inducción

de *traR*: 1 mM de IPTG desde el inicio del cultivo, ya que los experimentos preliminares en microplaca indicaron que esta condición producía el mayor efecto sobre el crecimiento, lo que permitió una interpretación precisa de los perfiles metabólicos. Para cada metabolito a analizar, se prepararon curvas patrón con concentraciones conocidas, las cuales sirvieron para establecer la relación entre la señal del detector y la concentración del compuesto, permitiendo una cuantificación precisa de los metabolitos presentes en las muestras.

Los datos obtenidos fueron procesados mediante la integración de los picos correspondientes a cada metabolito, determinando los perfiles de consumo de glucosa y producción de ácidos orgánicos bajo la condición seleccionada. Posteriormente, estos resultados se correlacionaron con la cinética de crecimiento de *Escherichia coli* para evaluar el impacto fisiológico de la expresión del regulador transcripcional.

6.6 Análisis estadístico

Los resultados se analizaron en Python version 3.10. Se realizó una prueba T Student para cada uno de los experimentos. Valores “p”: $p < 0.001$ (***), $p < 0.01$ (**), $p < 0.05$ (*) y $p > 0.05$ (ns).

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La proteína TraR ha sido descrita como un modulador de la transcripción que interactúa con la RNAP y altera la expresión de genes asociados a la síntesis ribosomal y a la biosíntesis de aminoácidos. Con base en este conocimiento, se presenta un mecanismo de acción propuesto para TraR, el cual sirvió como marco conceptual para el diseño de los experimentos realizados en este trabajo (figura 6).

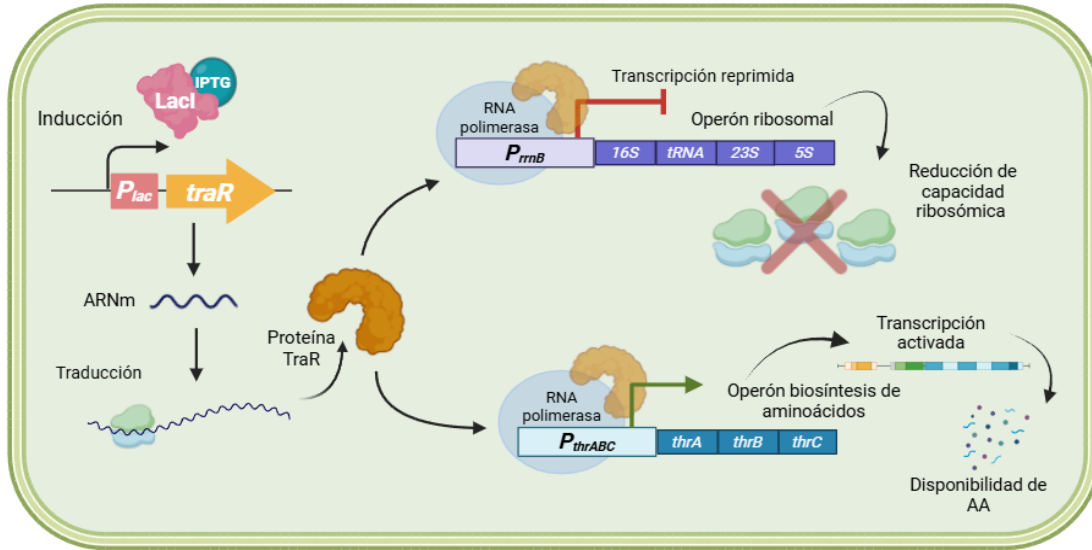


Figura 5. Esquema del mecanismo de acción descrito para la proteína TraR en *Escherichia coli*.

7.1 Transformación de cepas y evidencia fenotípica inicial de *traR*

Como parte de la caracterización inicial, se evaluó el efecto de la expresión de *traR* directamente en el fenotipo de crecimiento en placas de Petri. Para ello, se sembraron en paralelo la cepa control (BW25113 con plásmido vacío) y la cepa portadora de *traR* en medio LB con kanamicina, tanto en ausencia como en presencia de IPTG (0.1 mM). En el medio sin inductor, ambas cepas mostraron un fenotipo comparable, lo que indica que la sola presencia del plásmido no altera de manera detectable el crecimiento. En contraste, al añadir IPTG se observó una marcada reducción en el tamaño de las colonias de la cepa con *traR* respecto al control (figura 6).

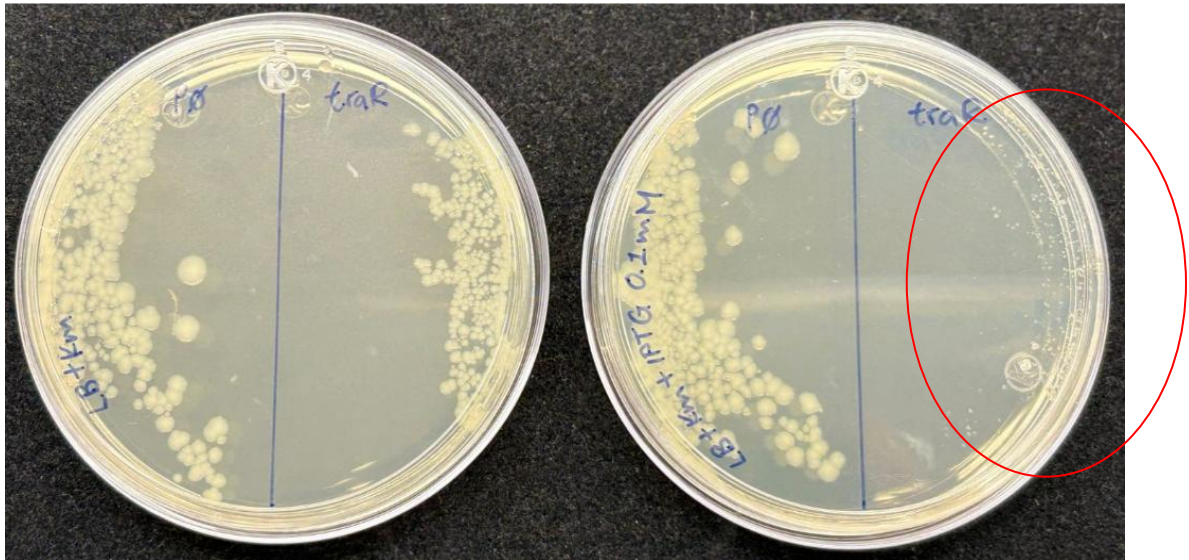


Figura 6. Efecto fenotípico de la inducción de *traR* en placas Petri.

Este resultado confirma que las transformaciones fueron exitosas, ya que la cepa portadora de *traR* respondió de manera diferencial al inductor, y además constituye una primera evidencia fenotípica de que la inducción de este regulador transcripcional impone una carga notable sobre la fisiología celular. Dicho hallazgo sirvió como punto de partida para analizar de forma más detallada su efecto en condiciones controladas de cultivo en medio líquido.

7.2 Caracterización cinética en microplaca revela una inhibición del crecimiento por TraR dependiente de la dosis del inductor y revela un mecanismo potencialmente independiente de ppGpp

La evaluación de las cinéticas de crecimiento en microplaca mostró que la expresión de *traR* produce un efecto inhibitorio sobre la velocidad de crecimiento (V_{max}) y sobre la densidad óptica máxima (OD_{max}), con una dependencia clara de la dosis de IPTG y del tipo de medio nutritivo. Estos hallazgos confirman la hipótesis de que *traR* reduce la proliferación celular y sugieren que su acción no se restringe a condiciones de limitación nutricional, sino que puede representar un mecanismo de control transcripcional de mayor alcance.

7.2.1 Efecto de una inducción moderada

Con una inducción moderada (0.1 mM IPTG) aplicada durante la fase exponencial temprana ($OD \approx 0.15\text{--}0.2$), la cepa que expresa *traR* mostró reducciones consistentes en V_{max} y OD_{max} en todos los medios comparados con la cepa control. En M9 con glucosa, la velocidad máxima de crecimiento (V_{max}) de la cepa TraR con IPTG no disminuyó significativamente en comparación con la cepa control WT, mientras que la densidad óptica máxima (OD_{max}) mostró una reducción significativa marcada del 49% (de 0.7 a 0.36) (ver figura 7). Este efecto pronunciado en este medio de cultivo limitante puede deberse a que TraR no solo inhibe la transcripción de ARN ribosomal, sino que también afecta a la expresión de un amplio conjunto de genes esenciales para la adaptación y supervivencia en condiciones de estrés, desviando la RNAP hacia rutas de respuesta al estrés a costa del crecimiento (Blankschien et al., 2009; Gopalkrishnan et al., 2017). Y, aunque TraR puede activar genes de biosíntesis de aminoácidos, su impacto dominante es la represión de ARN ribosomal, lo que explica la disminución observada en velocidad de crecimiento y biomasa.

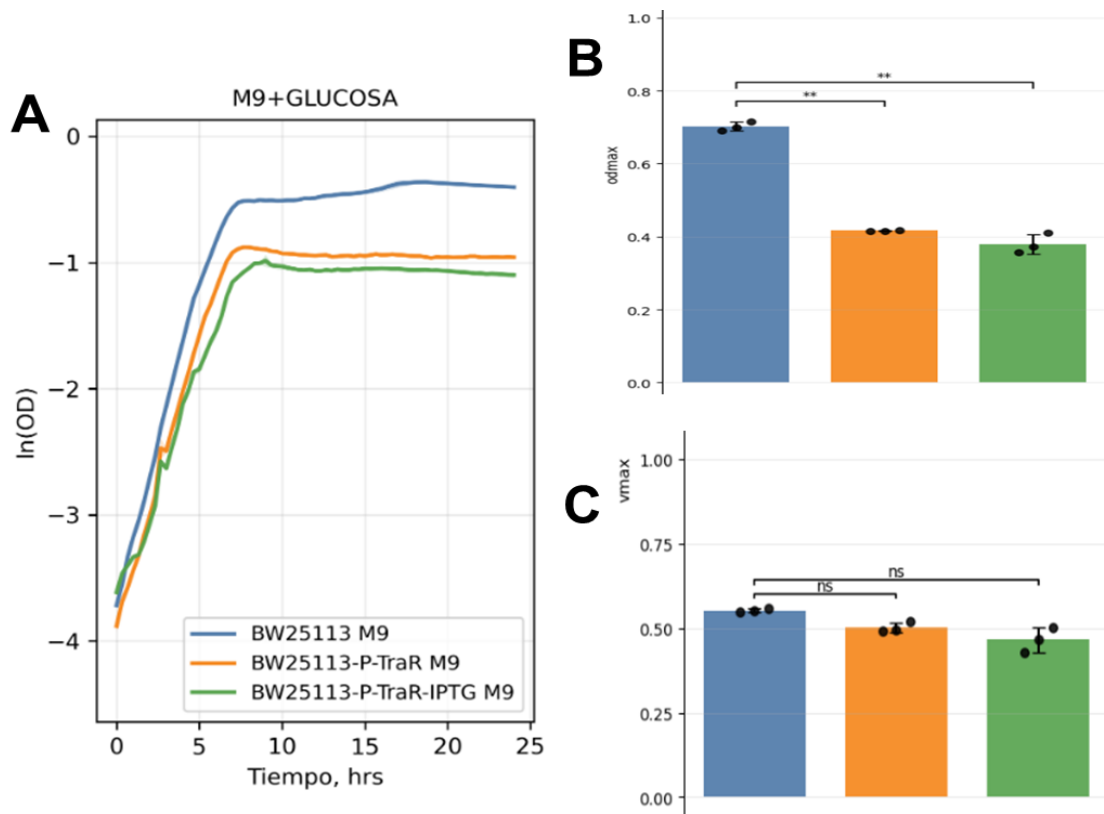


Figura 7. Crecimiento de cepas BW25113 en medio M9+GLUCOSA 0.4% en placa (0.1 mM IPTG). A) Curva de crecimiento. B) Densidad óptica máxima. C) Velocidad máxima de crecimiento. La desviación estándar se muestra con sombras y barras de error. Los niveles de significancia estadística se indican como ns: no significativo, $p \geq 0.05$; *: $0.01 \leq p < 0.05$; **: $0.001 \leq p < 0.01$; ***: $p < 0.001$).

La suplementación con casaminoácidos atenuó parcialmente este efecto sobre la ODmax, donde la cepa TraR con IPTG alcanzó 0.69 (solo 12% menor que el control WT de 0.78) y la Vmax se redujo significativamente en un 36% (de 0.75 h^{-1} a 0.48 h^{-1}) respecto al control en el mismo medio (ver figura 8). Esto indica que, si bien TraR continúa inhibiendo procesos fundamentales como la transcripción de ARN ribosomal y la formación de ribosomas, la disponibilidad de aminoácidos exógenos permite a las células compensar parcialmente la limitación biosintética, mantener la síntesis proteica y acumular biomasa de manera más eficiente. En medios mínimos sin suplemento, la dependencia de rutas metabólicas endógenas

costosas acentúa el efecto de TraR, reduciendo tanto la velocidad de división como la densidad final alcanzada.

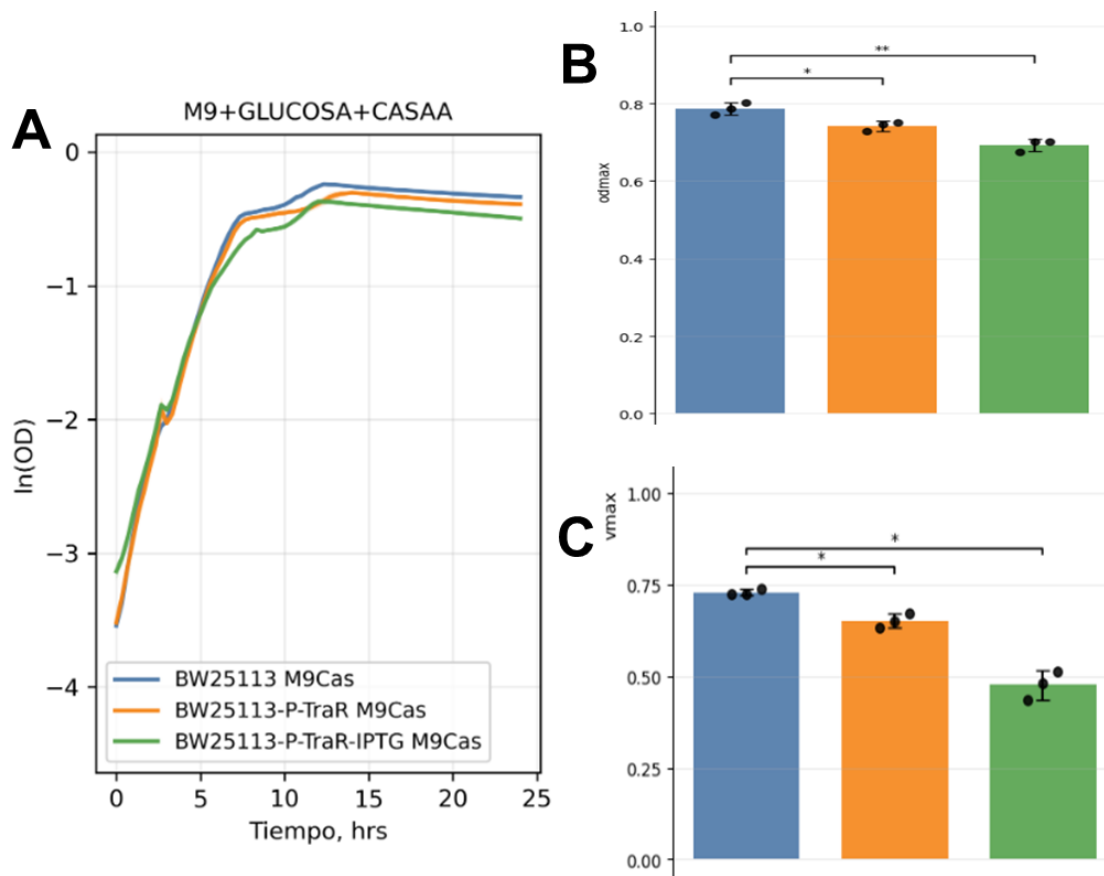


Figura 8. Crecimiento de cepas BW25113 en medio M9+GLUCOSA 0.4% + CASAA 0.02% en placa (0.1 mM IPTG). A) Curva de crecimiento. B) Densidad óptica máxima. C) Velocidad máxima de crecimiento. La desviación estándar se muestra con sombras y barras de error. Los niveles de significancia estadística se indican como ns: no significativo, $p \geq 0.05$; *: $0.01 \leq p < 0.05$; **: $0.001 \leq p < 0.01$; ***: $p < 0.001$).

En contraste, en medio LB rico, la expresión de *traR* también ejerció un efecto negativo sobre el crecimiento, aunque menos marcado que en medios limitantes. La Vmax disminuyó un 9.4% (de 1.38 h^{-1} a 1.25 h^{-1}) y la ODmax un 8% (de 0.88 a 0.81) respecto al control WT (ver figura), indicando que el impacto de TraR se mantiene incluso bajo condiciones de abundancia nutricional. Dado que TraR actúa independientemente de ppGpp, alarmona cuya producción se favorece en

condiciones de estrés nutricional (Engelhardt et al., 2025), se esperaría un impacto más pronunciado en medios nutritivos. Estos resultados plantean la interrogante de cómo una inducción más intensa de *traR* podría modificar el crecimiento en medios ricos, cuestión que se abordará en el siguiente apartado.

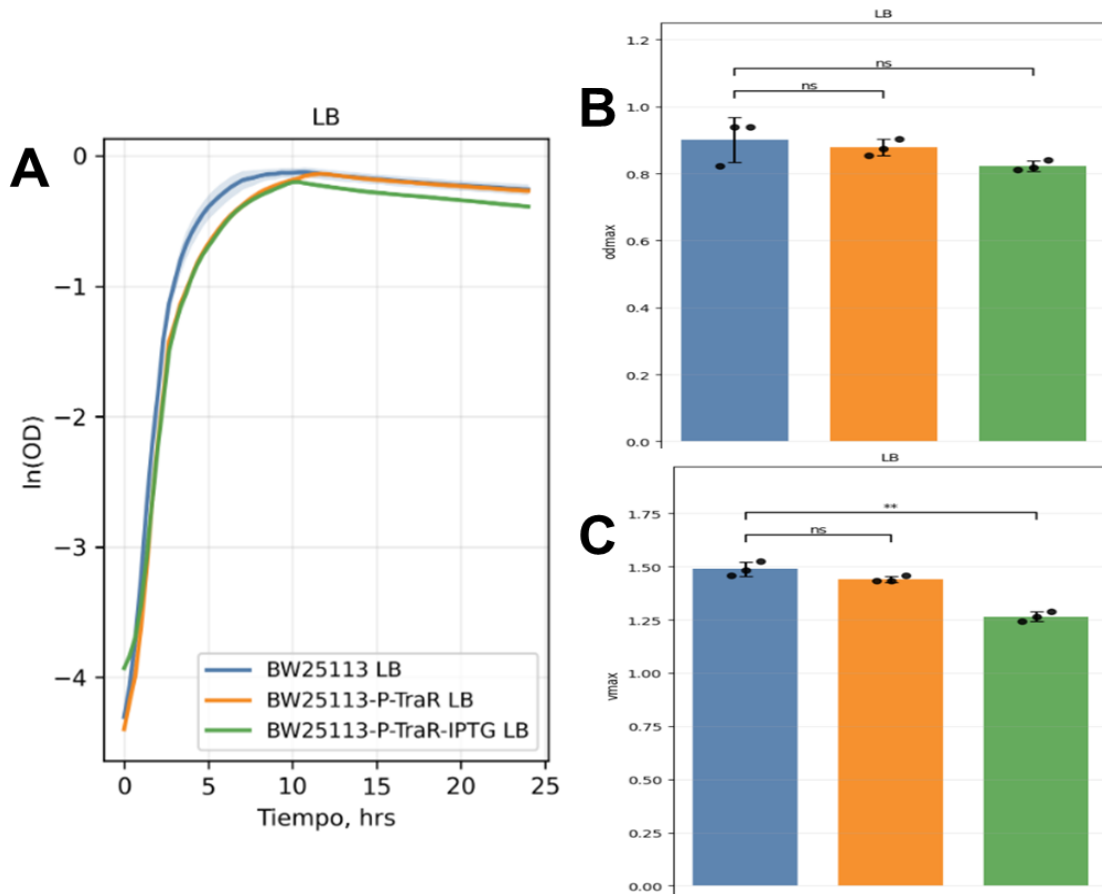


Figura 9. Crecimiento de cepas BW25113 en medio LB en placa (0.1 mM IPTG). A) Curva de crecimiento. B) Densidad óptica máxima. C) Velocidad máxima de crecimiento. La desviación estándar se muestra con sombras y barras de error. Los niveles de significancia estadística se indican como ns: no significativo, $p \geq 0.05$; *: $0.01 \leq p < 0.05$; **: $0.001 \leq p < 0.01$; ***: $p < 0.001$.

7.2.2 La inducción fuerte intensifica la inhibición y revela un impacto prioritario sobre la tasa de crecimiento

El incremento a 1 mM de IPTG desde el inicio del cultivo intensificó la inhibición, confirmando que el efecto de *traR* es dependiente de la dosis y el

momento de inducción. En M9 con glucosa, la V_{max} cayó 50 % respecto al control (0.62 a 0.31 h^{-1}), un valor aún menor que el observado con la inducción moderada (0.43 h^{-1}). La OD_{max} (0.79) fue un 19 % menor que la del control (0.98) (figura). Este contraste revela que la inducción fuerte de *traR* afecta principalmente la velocidad de división celular, pero que las células logran adaptarse para alcanzar una biomasa relativamente elevada tras un periodo de crecimiento prolongado, probablemente mediante ajustes fisiológicos en la economía de recursos.

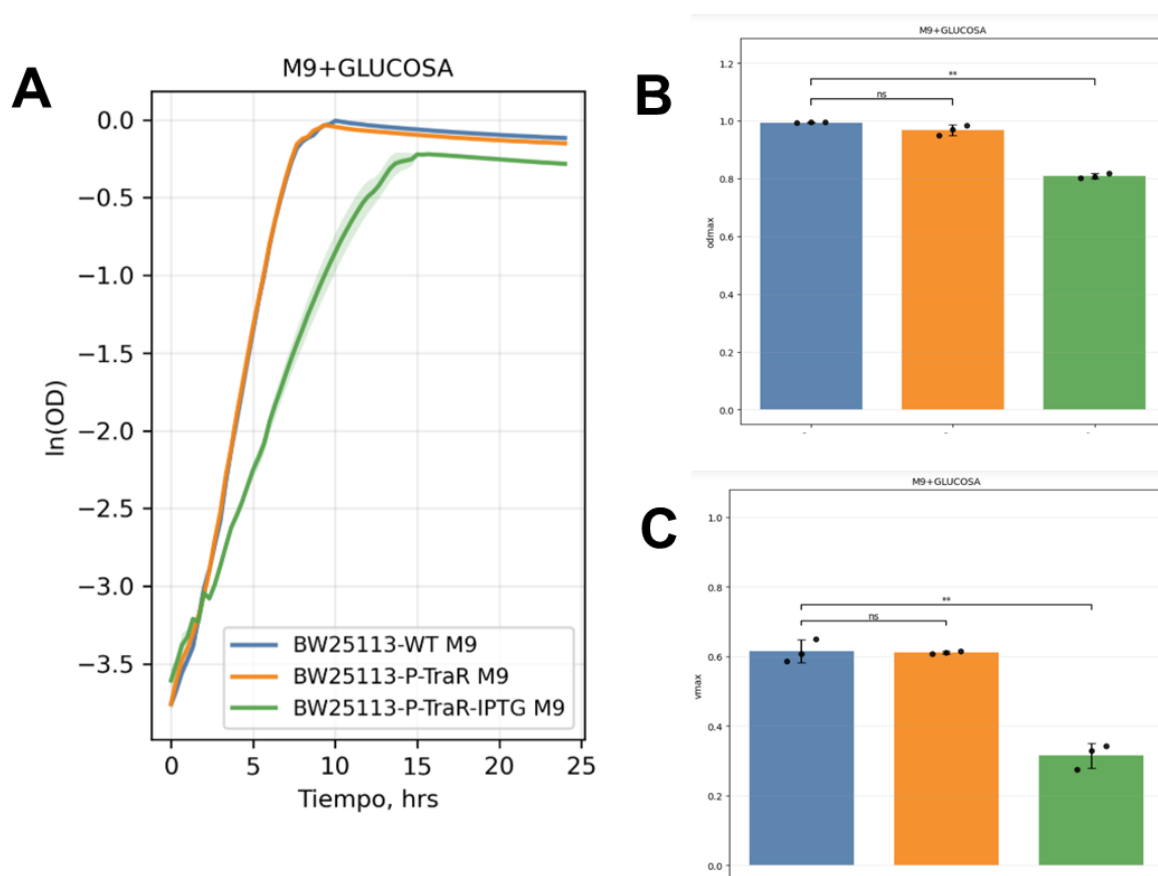


Figura 10. Crecimiento de cepas BW25113 en medio M9+GLUCOSA 0.4% en placa (1mM IPTG).

A) Curva de crecimiento. B) Densidad óptica máxima. C) Velocidad máxima de crecimiento. La desviación estándar se muestra con sombras y barras de error. Los niveles de significancia estadística se indican como ns: no significativo, $p \geq 0.05$; *: $0.01 \leq p < 0.05$; **: $0.001 \leq p < 0.01$; ***: $p < 0.001$).

En M9 con glucosa y casaminoácidos, se observó un patrón similar: la V_{max} de TraR con IPTG fue de 0.51 h^{-1} (39% menor que el control de 0.84 h^{-1}), mientras que la OD_{max} se redujo solo un 21% (0.76 frente a 0.96 del control) (ver figura). Estos resultados sugieren que, aunque TraR limita severamente la velocidad de división celular, la suplementación con casaminoácidos permite a las células sostener la producción de proteínas esenciales y mantener la viabilidad poblacional. De este modo, la población no alcanza la rapidez de crecimiento del control, pero logra estabilizarse en un nivel de biomasa considerable.

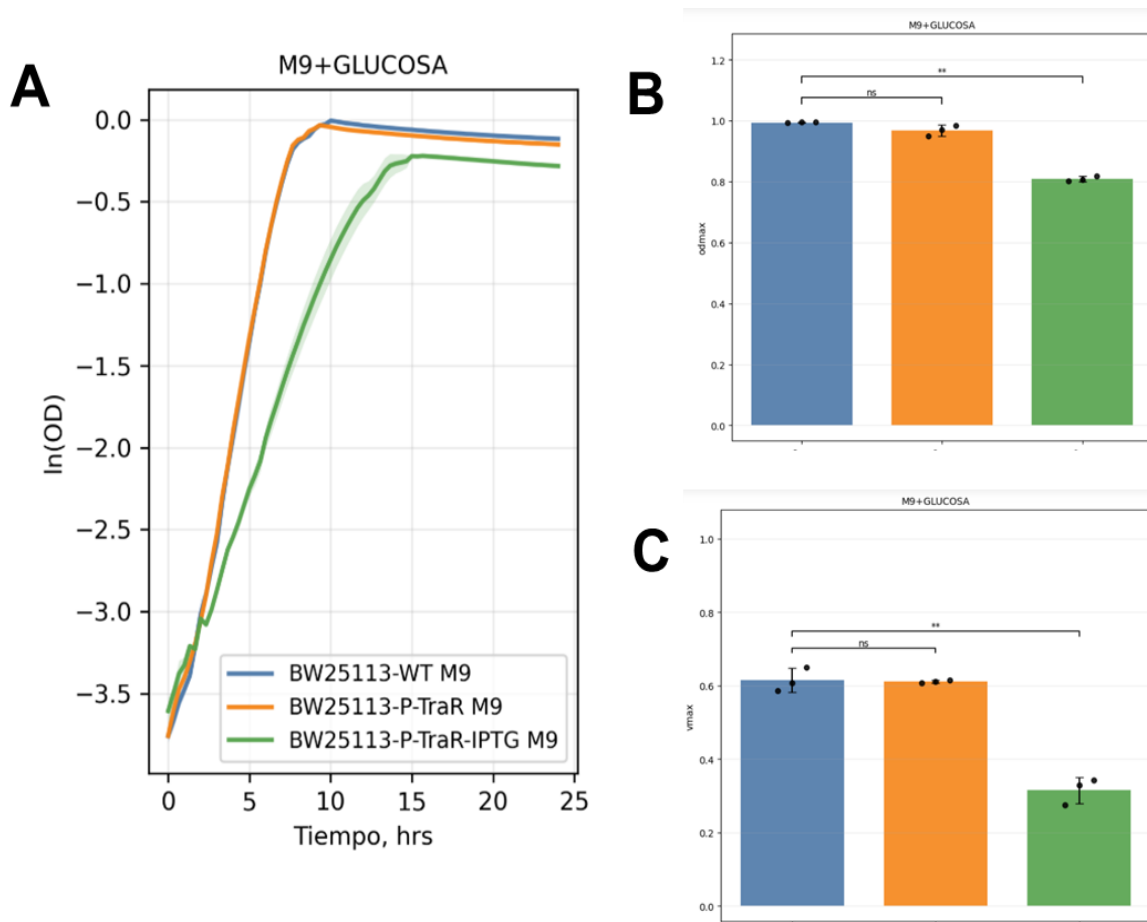


Figura 11. Crecimiento de cepas BW25113 en medio M9+GLUCOSA 0.4% + CASAA 0.02% en placa (1 mM IPTG). A) Curva de crecimiento. B) Densidad óptica máxima. C) Velocidad máxima de crecimiento. La desviación estándar se muestra con sombras y barras de error. Los niveles de significancia estadística se indican como ns: no significativo, $p \geq 0.05$; *: $0.01 \leq p < 0.05$; **: $0.001 \leq p < 0.01$; ***: $p < 0.001$).

En medio LB, la inducción fuerte tuvo un impacto especialmente marcado. La V_{max} disminuyó a 0.49 h^{-1} , una reducción del 64% respecto al control (1.36 h^{-1}), mientras que la OD_{max} cayó un 26% (de 1.035 a 0.77) (ver figura). Este resultado es notable, ya que LB suele favorecer una rápida proliferación celular por su abundancia en nutrientes. Sin embargo, la acción de TraR interfiere directamente con la maquinaria transcripcional al bloquear la actividad del promotor *rnnB P1*, reduciendo la producción de ARNr y, por ende, de ribosomas (Blankschien et al., 2009). Al limitar la biogénesis ribosomal en un medio donde la célula suele invertir intensivamente en este proceso, TraR introduce un cuello de botella que explica la drástica caída en la tasa de crecimiento.

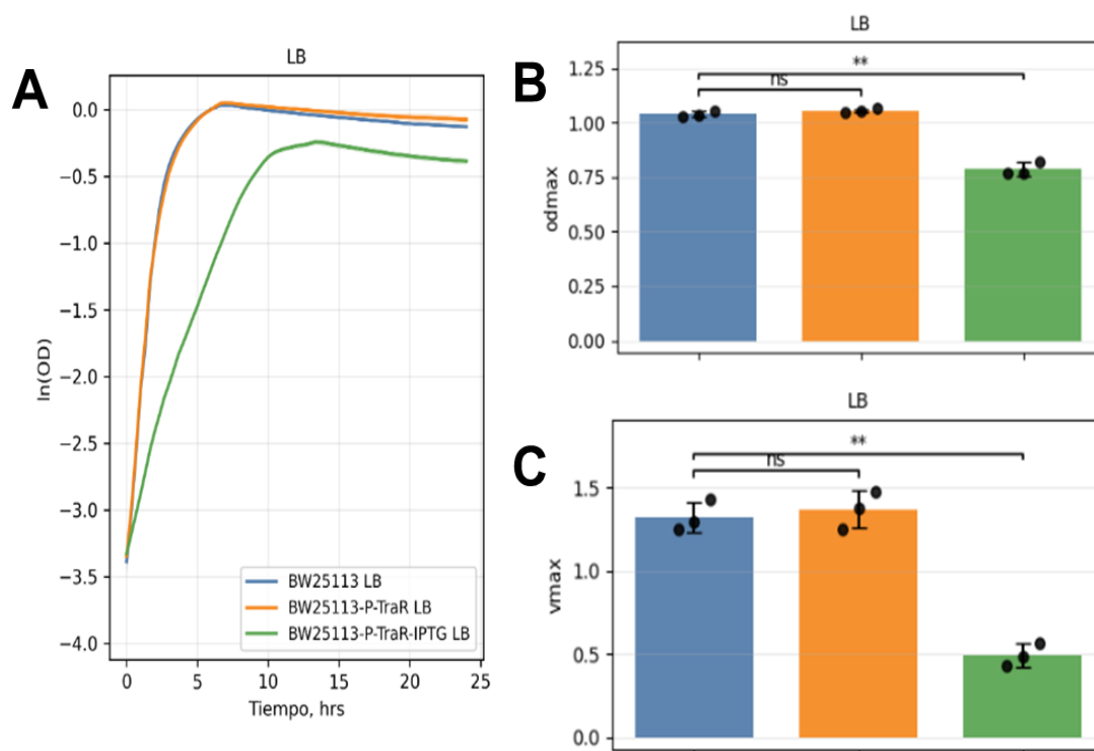


Figura 12. Crecimiento de cepas BW25113 en medio LB en placa (1 mM IPTG). A) Curva de crecimiento. B) Densidad óptica máxima. C) Velocidad máxima de crecimiento. La desviación estándar se muestra con sombras y barras de error. Los niveles de significancia estadística se indican como ns: no significativo, $p \geq 0.05$; *, $0.01 \leq p < 0.05$; **, $0.001 \leq p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

La reducción en la síntesis de ribosomas repercute en la eficiencia traduccional. Con menos ribosomas disponibles, la célula enfrenta dificultades para sostener una traducción equilibrada y recurre a mecanismos alternativos como la traducción de ARNm sin líder, es decir, mensajes que no tienen la región reguladora usual al inicio (Leiva Araya, 2020). Aunque este modo de traducción asegura cierta producción proteica bajo estrés, es menos eficiente y contribuye a la acumulación más lenta de biomasa. De esta forma, la disminución tanto en V_{max} como en OD_{max} refleja la suma de una biogénesis ribosomal restringida y una traducción subóptima en todos los medios evaluados.

En conjunto, los resultados demuestran que, aunque los medios ricos como LB promueven un crecimiento acelerado en condiciones normales, la fuerte inducción de *traR* anula estas ventajas e impone una carga regulatoria que desplaza el equilibrio hacia un estado de crecimiento más lento y limitado en biomasa (Navarro García, 2010; Ortiz Maldonado, 2017). La acción de TraR ilustra cómo un regulador transcripcional puede sobreponerse incluso a la abundancia de nutrientes, reconfigurando la fisiología celular hacia un perfil dominado por la restricción ribosomal y la ralentización global del crecimiento. Este fenómeno no solo aporta información valiosa para comprender la fisiología bacteriana fundamental, sino que también abre perspectivas para el diseño de sistemas biotecnológicos que requieran una regulación estricta de la expresión génica. Finalmente, la caracterización cinética en microplaca plantea interrogantes sobre cómo la inducción temprana de *traR* podría afectar el crecimiento en condiciones más cercanas a la fisiología natural.

7.3 Efecto de la inducción temprana de *traR* sobre el crecimiento en matraz con M9 y glucosa

Debido a que los ensayos en microplaca limitan el número de generaciones bacterianas por el bajo volumen de cultivo, se decidió trasladar el sistema experimental a cultivos en matraz con agitación. Este tipo de cultivo permite una mejor aireación y mezcla uniforme del medio, así como un crecimiento más prolongado, lo que se traduce en un mayor número de divisiones celulares antes de

alcanzar la fase estacionaria. Estas condiciones son relevantes para evaluar con mayor claridad el efecto de la expresión de *traR* sobre el crecimiento, especialmente cuando los efectos inhibitorios pueden amplificarse a lo largo de varias generaciones. En función de los resultados obtenidos en los ensayos en microplaca, se utilizó una inducción fuerte de IPTG (1 mM) desde el inicio del cultivo.

La cepa control WT alcanzó una V_{max} de 0.68 h^{-1} , mientras que la cepa que expresa *traR* presentó una V_{max} reducida de 0.45 h^{-1} , lo que representa una disminución aproximada del 34%. Este resultado confirma que el efecto inhibitorio de TraR sobre la velocidad de crecimiento se mantiene cuando las células experimentan múltiples ciclos de división y refuerza la idea de que la expresión temprana de este regulador impone una restricción persistente sobre la capacidad de proliferación celular.

En contraste con la marcada reducción en la V_{max} , la densidad óptica máxima alcanzada por la cepa TraR (2.52) fue solo ligeramente inferior a la observada en la cepa control (2.87) (ver figura). Esta diferencia relativamente moderada sugiere que, aunque TraR limita de manera significativa la tasa de división, las células son capaces de adaptarse a lo largo del tiempo y acumular biomasa tras un crecimiento más prolongado. Este comportamiento es consistente con un modelo en el que TraR desacopla parcialmente la velocidad de crecimiento de la biomasa final, probablemente mediante una redistribución de recursos celulares que prioriza la eficiencia metabólica sobre el crecimiento rápido.

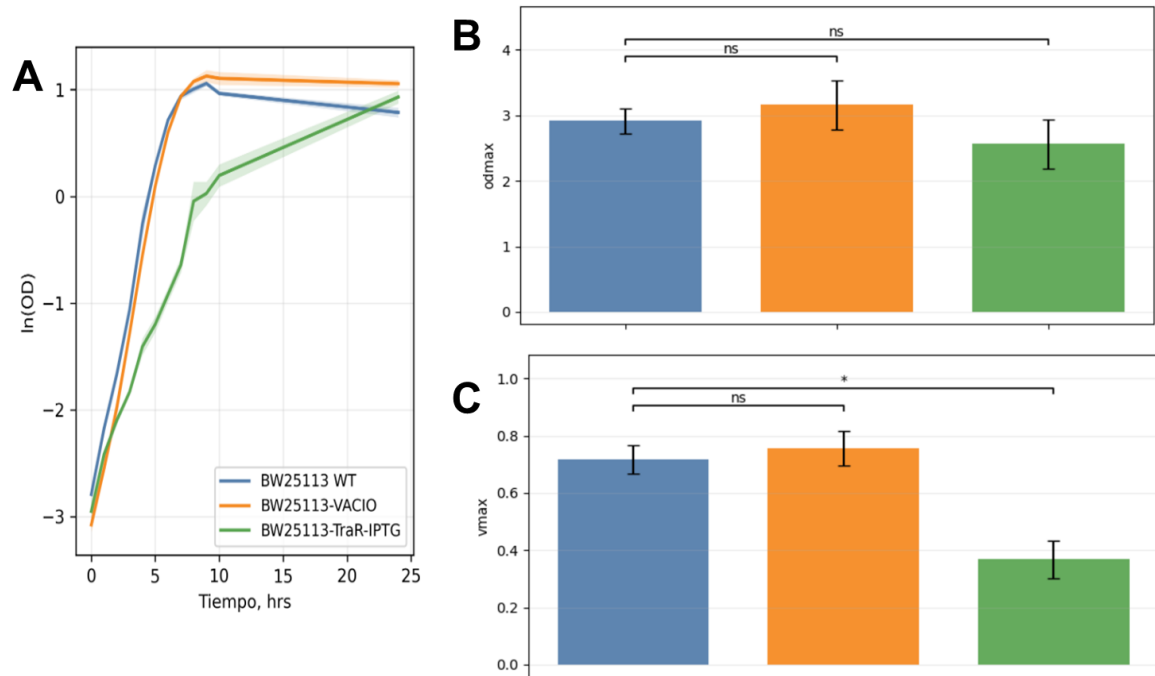


Figura 13. Crecimiento de cepas BW25113 en medio M9+GLUCOSA 0.4% en matraz (1mM IPTG).

A) Curva de crecimiento. B) Densidad óptica máxima. C) Velocidad máxima de crecimiento. La desviación estándar se muestra con sombras y barras de error. Los niveles de significancia estadística se indican como ns: no significativo, $p \geq 0.05$; *: $0.01 \leq p < 0.05$; **: $0.001 \leq p < 0.01$; ***: $p < 0.001$).

A diferencia de los ensayos en microplaca, el cultivo en matraz permite evidenciar que el efecto de TraR no conduce a un colapso del crecimiento, sino a la instauración de un régimen fisiológico caracterizado por una menor velocidad de división, pero una viabilidad sostenida de la población. Este patrón concuerda con el papel de TraR como modulador global de la transcripción, capaz de restringir la biogénesis ribosomal sin impedir completamente la acumulación de biomasa cuando el cultivo se prolonga en el tiempo. Este escenario proporciona un marco adecuado para analizar cómo esta reprogramación fisiológica inducida por TraR se refleja en cambios en el consumo de glucosa y en la producción de metabolitos.

7.4 Cambios metabólicos asociados a la expresión de *traR*

Para evaluar si la expresión de *traR* se asocia con una reprogramación metabólica, se analizó el consumo de glucosa y la producción de ácidos orgánicos mediante HPLC en cultivos en matraz con medio M9 suplementado con glucosa. Estos análisis permitieron relacionar directamente la dinámica metabólica con los efectos observados previamente en el crecimiento celular, particularmente con la reducción en la velocidad de crecimiento inducida por la expresión temprana de *traR*.

El análisis conjunto de los perfiles de consumo de sustrato y producción de metabolitos permite explorar si la reducción en la tasa de crecimiento está acompañada de cambios en la forma en que la célula utiliza el carbono disponible. En este contexto, la evaluación de parámetros como el consumo de glucosa y la acumulación de ácidos orgánicos resulta clave para identificar posibles ajustes en los flujos metabólicos centrales asociados a la expresión de *traR*. De esta manera, los resultados metabólicos obtenidos complementan la información de crecimiento y aportan evidencia adicional sobre el impacto fisiológico de esta proteína en *E. coli*.

7.4.1 Consumo de glucosa y producción de ácidos orgánicos determinados mediante HPLC en medio M9 con glucosa

El análisis por HPLC evidenció diferencias claras en el comportamiento metabólico entre la cepa control y la cepa que expresa *traR*. En la cepa control, la glucosa fue consumida rápidamente durante las primeras horas de cultivo, lo que coincide con su mayor velocidad de crecimiento. Este consumo se acompañó de una acumulación progresiva de acetato, un fenómeno común en *E. coli* cuando crece a tasas elevadas y carbono se desvía hacia metabolismo de sobreflujo.

En contraste, la cepa que expresa *traR* mostró un consumo de glucosa más lento y sostenido a lo largo del cultivo. De manera consistente, la producción de acetato fue considerablemente menor en comparación con la cepa control, lo que sugiere una disminución del metabolismo de sobreflujo y un uso más controlado del carbono disponible. Este patrón concuerda tanto con la menor velocidad de crecimiento observada previamente como con lo reportado en otros estudios, donde

la reducción en la tasa de consumo de glucosa se asocia con una menor acumulación de acetil-CoA y, por ende, con una disminución en la producción de acetato (Fuentes et al., 2013).

Adicionalmente, en el perfil metabólico de la cepa *traR* se detectó succinato desde la primera muestra analizada. Es importante señalar que esta señal inicial probablemente se debe a la presencia de succinato proveniente del preinóculo utilizado para iniciar el cultivo en matraz, más que a una producción temprana durante el crecimiento. No obstante, conforme avanzó el tiempo de cultivo, la concentración de succinato mostró un ligero incremento, lo que sugiere que la cepa podría producirlo durante etapas tardías del crecimiento, como la fase estacionaria (Figura).

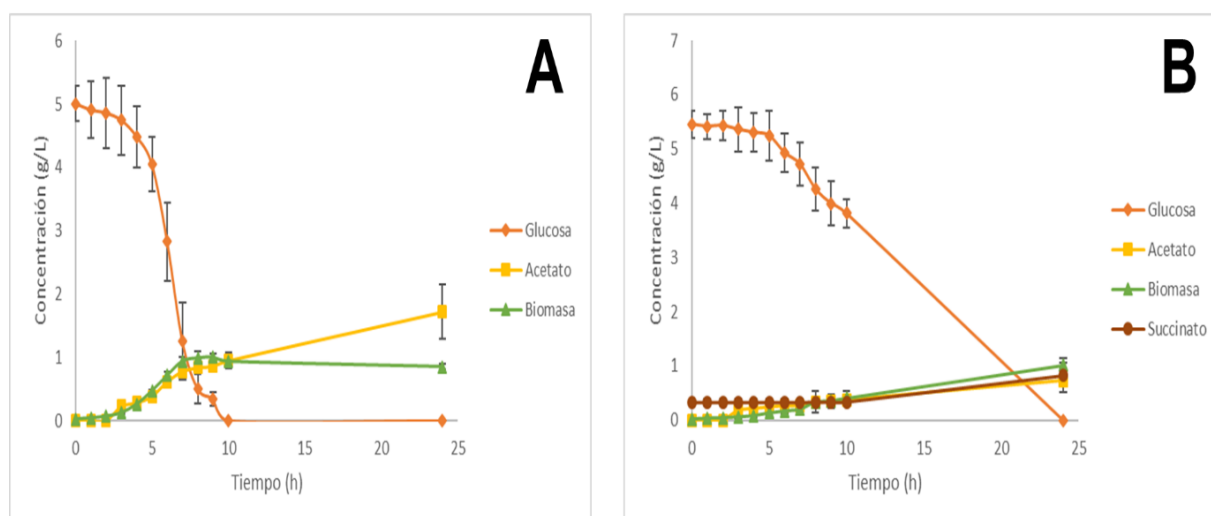


Figura 14. A) Consumo de glucosa y producción de acetato en cepa BW25113 wt. B) Consumo de glucosa y producción de acetato y succinato en cepa BW25113 *traR*. La desviación estándar se muestra con barras de error.

Este comportamiento es consistente con reportes previos que indican que una reducción en la velocidad del metabolismo central puede favorecer la acumulación de intermediarios del ciclo de Krebs, como el succinato, particularmente cuando se activan vías metabólicas alternativas que permiten reponer o desviar intermediarios del ciclo (Godoy, 2014).

7.4.2 Relación entre perfil metabólico y dinámica de crecimiento celular

Los parámetros cinéticos obtenidos permiten profundizar en la relación entre la dinámica de crecimiento y la redistribución del flujo metabólico inducida por la expresión de *traR*. La disminución paralela de velocidad específica de crecimiento (μ) y la tasa específica de consumo de glucosa ($q_s \approx -36\%$) es consistente con la función conocida de TraR como regulador transcripcional que inhibe la expresión de operones ribosomales y activa genes asociados a la biosíntesis de aminoácidos. Esta reprogramación reduce la demanda celular de recursos destinados al crecimiento rápido, lo que se traduce en una menor presión por consumir glucosa a altas tasas. En este contexto, la reducción de q_s puede interpretarse como un ajuste fisiológico coherente con una menor presión biosintética, más que como una limitación directa en la disponibilidad de sustrato (Tabla 1).

Un aspecto particularmente relevante es la marcada disminución en q_{ac} , lo cual indica que, por cada unidad de biomasa formada, la cepa *traR* produce considerablemente menos acetato que la cepa control. Este resultado apunta a una reducción del metabolismo de sobreflujo a nivel cinético y respalda la idea de que la menor entrada de carbono al metabolismo central limita la acumulación de acetyl-CoA y, por ende, la activación de vías de excreción de carbono como la ruta Pta-AckA (Schütze et al., 2020).

Tabla 1. Los valores representan la media $\pm$ la desviación estándar de las réplicas. μ : velocidad específica de crecimiento (h^{-1}); q_s : tasa específica de consumo de glucosa ($g/g \cdot h$); q_{ac} : tasa específica de producción de acetato ($g/g \cdot h$). La significancia estadística se determinó mediante una prueba t de Student comparando la cepa modificada (BW25113 *traR*) frente al control silvestre (BW25113 WT). Los niveles de significancia se indican como: *: estadísticamente significativo ($p < 0.05$); **: muy significativo ($p < 0.01$); ***: altamente significativo ($p < 0.001$).

Cepas	μ (h^{-1})	q_s ($g/g \cdot h$)	q_{ac} ($g/g \cdot h$)
BW25113 WT	0.53 ± 0.002	-2.14 ± 0.14	0.45 ± 0.01
BW25113 <i>traR</i>	0.31 ± 0.05	-1.37 ± 0.25	0.16 ± 0.02

Significancia	**	*	***
----------------------	-----------	----------	------------

Este perfil cinético es coherente con observaciones previas en las que una disminución controlada de q_s se asocia con reducciones en μ y q_{ac} , reflejando un metabolismo menos fermentativo y más eficiente en el uso de carbono (Fuentes et al., 2013). En el presente trabajo, la expresión de *traR* parece inducir un estado fisiológico comparable, aunque con un mecanismo regulatorio distinto, basado en la modulación de la expresión génica global más que en las alteraciones directas de los sistemas de transporte. Esta combinación sugiere una reorganización del metabolismo central hacia un estado más equilibrado, en el que la utilización del carbono está mejor acoplada a las necesidades celulares, lo que resulta en un perfil metabólico más eficiente y menos propenso a la acumulación de subproductos indeseables.

7.4.3 Posibles implicaciones de la redistribución de recursos para la fisiología bacteriana y su aprovechamiento en biología sintética

Los resultados de este trabajo muestran que la expresión de *traR* permite modular la velocidad de crecimiento bacteriano y, con ello, el estado fisiológico general de la célula. Este efecto sugiere que *traR* puede emplearse como una herramienta para controlar el crecimiento de *E. coli* de manera intencional, en lugar de considerarlo únicamente como un regulador con impacto indirecto sobre el metabolismo.

Desde un punto de vista aplicado, el control del crecimiento resulta especialmente relevante para la producción de metabolitos de interés, ya que el crecimiento acelerado suele estar asociado con la formación de subproductos no deseados que afectan la eficiencia del proceso. En este contexto, la expresión de *traR* podría contribuir a establecer condiciones fisiológicas en las que el metabolismo celular se encuentre mejor balanceado, favoreciendo la canalización de recursos hacia la síntesis del producto deseado y reduciendo la generación de compuestos secundarios.

En este sentido, *traR* puede considerarse un elemento que permite modular el crecimiento bacteriano, ya que su nivel o momento de expresión podría ajustarse de acuerdo a los requerimientos del sistema en el que se vaya a utilizar. Esta posibilidad ofrecería cierta flexibilidad para influir en la distribución de los recursos celulares, ya sea para mantener el crecimiento o para favorecer condiciones metabólicas más adecuadas para la producción, sin necesidad de aplicar estrategias de control estricto.

La utilización de esta proteína como regulador del crecimiento también podría complementarse con otras estrategias de control, como la modulación de la captación de glucosa, permitiendo un ajuste más preciso entre la disponibilidad de sustrato y la demanda metabólica celular. En conjunto, estos resultados sugieren procesos de producción, aportando una alternativa regulatoria para mejorar la eficiencia metabólica y reducir la formación de subproductos no deseados en sistemas de biología sintética.

8. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos a lo largo de este trabajo evidencian que TraR en *Escherichia coli* conduce a una reorganización profunda de la fisiología celular, observable de manera coherente tanto en la dinámica de crecimiento como en el perfil metabólico. La combinación de experimentos en microplaca y matraz permitió mostrar que TraR reduce la velocidad de crecimiento, sin provocar una pérdida drástica de viabilidad ni impedir la acumulación de biomasa cuando el cultivo se prolonga en el tiempo.

La reducción consistente de la velocidad de crecimiento bajo distintas condiciones nutricionales y parámetros de inducción sugiere que TraR actúa como un regulador de alcance amplio, capaz de imponerse incluso en medios ricos, en concordancia con la naturaleza regulatoria en la RNAP. La dependencia del efecto con la dosis y el momento de inducción pone de manifiesto que la acción de TraR es modulable, lo que refuerza la idea de que esta proteína no solo restringe la biosíntesis ribosomal, sino que redefine el equilibrio entre proliferación, capacidad transcripcional y demanda metabólica. De esta forma, la desaceleración del crecimiento no implica un colapso fisiológico, sino la instauración de un estado celular alternativo, caracterizado por una menor presión biosintética y una adaptación progresiva. Su expresión ajustable representa una alternativa regulatoria con potencial aplicación en sistemas productivos donde se requiera limitar el crecimiento celular para favorecer una utilización más eficiente del sustrato y la producción de metabolitos de interés.

Un hallazgo también muy relevante de este trabajo fue la detección de succinato en los cultivos que expresan *traR*, un resultado que no se esperaba y que adquiere especial importancia debido a que previamente no se había caracterizado el perfil metabólico asociado a la expresión de esta proteína. Esto aporta nueva evidencia sobre su impacto fisiológico más allá del control del crecimiento.

9. PERSPECTIVAS

Sin embargo, a nivel molecular, los resultados plantean la necesidad de profundizar en el mecanismo regulatorio de TraR, particularmente mediante la identificación de sus blancos directos en el genoma de *E. coli*. El uso de técnicas como RNA-seq permitiría mapear de manera sistemática los promotores regulados por TraR y distinguir entre efectos directos e indirectos, aportando una visión más completa de cómo esta proteína reconfigura la red transcripcional y, en consecuencia, la fisiología celular. A su vez, la integración de *traR* en estrategias de optimización de cepas productoras podría contribuir al desarrollo de procesos biotecnológicos más eficientes, en los que el control del crecimiento y el metabolismo pueda ajustarse de forma fina a las necesidades del proceso.

10. REFERENCIAS

- Adams, B. L. (2016). The Next Generation of Synthetic Biology Chassis: Moving Synthetic Biology from the Laboratory to the Field. *ACS Synthetic Biology*, 5(12), 1328–1330.
https://doi.org/10.1021/ACSSYNBIO.6B00256/ASSET/IMAGES/LARGE/SB-2016-002563_0001.JPEG
- Andrianantoandro, E., Basu, S., Karig, D. K., & Weiss, R. (2006). Synthetic biology: new engineering rules for an emerging discipline. *Molecular Systems Biology*, 2, 2006.0028. <https://doi.org/10.1038/MSB4100073>
- Artsimovitch, I., Patlan, V., Sekine, S. I., Vassilyeva, M. N., Hosaka, T., Ochi, K., Yokoyama, S., & Vassilyev, D. G. (2004). Structural Basis for Transcription Regulation by Alarmones ppGpp. *Cell*, 117(3), 299–310.
[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00401-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00401-5)
- Aslam, B., Basit, M., Nisar, M. A., Khurshid, M., & Rasool, M. H. (2017). Proteomics: Technologies and their applications. *Journal of Chromatographic Science*, 55(2), 182–196. <https://doi.org/10.1093/CHROMSCI/BMW167>
- Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K. A., Tomita, M., Wanner, B. L., & Mori, H. (2006). Construction of Escherichia coli K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Molecular Systems Biology*, 2, 2006.0008. <https://doi.org/10.1038/MSB4100050>
- Bachmann, B. J. (1990). Linkage map of Escherichia coli K-12, edition 8. *Microbiological Reviews*, 54(2), 130–197. <https://doi.org/10.1128/MR.54.2.130-197.1990>,
- Barker, M. M., Gaal, T., Josaitis, C. A., & Gourse, R. L. (2001). Mechanism of regulation of transcription initiation by ppGpp. I. Effects of ppGpp on transcription initiation in vivo and in vitro. *Journal of Molecular Biology*, 305(4), 673–688.
<https://doi.org/10.1006/JMBI.2000.4327>

- Blankschien, M. D., Lee, J. H., Grace, E. D., Lennon, C. W., Halliday, J. A., Ross, W., Gourse, R. L., & Herman, C. (2009). Super DksAs: substitutions in DksA enhancing its effects on transcription initiation. *The EMBO Journal*, 28(12), 1720–1731. <https://doi.org/10.1038/EMBOJ.2009.126>
- Blankschien, M. D., Potrykus, K., Grace, E., Choudhary, A., Vinella, D., Cashel, M., & Herman, C. (2009). TraR, a homolog of a RNAP secondary channel interactor, modulates transcription. *PLoS Genetics*, 5(1). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.1000345>
- Bremer, H., & Dennis, P. P. (2008). Modulation of Chemical Composition and Other Parameters of the Cell at Different Exponential Growth Rates. *EcoSal Plus*, 3(1). <https://doi.org/10.1128/ECOSAL.5.2.3/ASSET/EC65E8C7-8572-4870-BAE2-75BD45F44790/ASSETS/GRAPHIC/FIG3.GIF>
- Browning, D. F., & Busby, S. J. W. (2016). Local and global regulation of transcription initiation in bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 14(10), 638–650. <https://doi.org/10.1038/NRMICRO.2016.103>,
- Cashel, M., & Gallant, J. (1969). Two compounds implicated in the function of the RC gene of escherichia coli. *Nature*, 221(5183), 838–841. <https://doi.org/10.1038/221838A0;KWRD>
- Chen, J., Gopalkrishnan, S., Chiu, C., Chen, A. Y., Campbell, E. A., Gourse, R. L., Ross, W., & Darst, S. A. (2019). E. coli TraR allosterically regulates transcription initiation by altering RNA polymerase conformation. *ELife*, 8. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.49375>
- Chi, H., Wang, X., Shao, Y., Qin, Y., Deng, Z., Wang, L., & Chen, S. (2019). Engineering and modification of microbial chassis for systems and synthetic biology. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 4(1), 25–33. <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2018.12.001>
- Choi, Y. K., Han, S. M., Lee, S. M., Soh, J. O., Lee, S. K., & Lee, J. H. (2022). Investigation of the Relation between Temperature and M13 Phage Production via ATP Expenditure. *Processes*, 10(5), 962. <https://doi.org/10.3390/PR10050962/S1>

- Condon, C., Liveris, D., Squires, C., Schwartz, I., & Squires, C. L. (1995). rRNA operon multiplicity in *Escherichia coli* and the physiological implications of *rrn* inactivation. *Journal of Bacteriology*, 177(14), 4152–4156. <https://doi.org/10.1128/JB.177.14.4152-4156.1995>,
- Datsenko, K. A., & Wanner, B. L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(12), 6640. <https://doi.org/10.1073/PNAS.120163297>
- Doran, T. J., Loh, S. M., Firth, N., & Skurray, R. A. (1994). Molecular analysis of the F plasmid *traVR* region: *traV* encodes a lipoprotein. *Journal of Bacteriology*, 176(13), 4182–4186. <https://doi.org/10.1128/JB.176.13.4182-4186.1994>
- Durfee, T., Hansen, A. M., Zhi, H., Blattner, F. R., & Ding, J. J. (2007). Transcription Profiling of the Stringent Response in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 190(3), 1084. <https://doi.org/10.1128/JB.01092-07>
- Elani, Y. (2020). Interfacing Living and Synthetic Cells as an Emerging Frontier in Synthetic Biology. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, 60(11), 5602. <https://doi.org/10.1002/ANIE.202006941>
- Engelhardt, F., Turnbull, K., Gür, M., Müsken, M., Preusse, M., Häussler, S., & Roghanian, M. (2025). (p)ppGpp imposes graded transcriptional changes to impair motility and promote antibiotic tolerance in biofilms. *Npj Biofilms and Microbiomes*, 11(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/S41522-025-00795-7>;SUBJMETA
- Esyunina, D., Agapov, A., & Kulbachinskiy, A. (2016). Regulation of transcriptional pausing through the secondary channel of RNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(31), 8699–8704. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1603531113>,
- Feklistov, A. (2013). RNA polymerase: In search of promoters. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1293(1), 25–32. <https://doi.org/10.1111/NYAS.12197>,

- Freemont, P. S. (2019). Synthetic biology industry: data-driven design is creating new opportunities in biotechnology. *Emerging Topics in Life Sciences*, 3(5), 651. <https://doi.org/10.1042/ETLS20190040>
- Frost, L. S., Ippen-Ihler, K., & Skurray, R. A. (1994). Analysis of the sequence and gene products of the transfer region of the F sex factor. *Microbiological Reviews*, 58(2), 162–210. <https://doi.org/10.1128/MR.58.2.162-210.1994>
- Fuentes, L. G., Lara, A. R., Martínez, L. M., Ramírez, O. T., Martínez, A., Bolívar, F., & Gosset, G. (2013). Modification of glucose import capacity in *Escherichia coli*: physiologic consequences and utility for improving DNA vaccine production. *Microbial Cell Factories* 2013 12:1, 12(1), 42-. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-12-42>
- Garner, K. L. (2021). Principles of synthetic biology. *Essays in Biochemistry*, 65(5), 791–811. <https://doi.org/10.1042/EBC20200059>,
- Gopalkrishnan, S., Ross, W., Akbari, M. S., Li, X., Haycocks, J. R. J., Grainger, D. C., Court, D. L., & Gourse, R. L. (2022). Homologs of the *Escherichia coli* F Element Protein TraR, Including Phage Lambda Orf73, Directly Reprogram Host Transcription. *MBio*, 13(3). <https://doi.org/10.1128/MBIO.00952-22>
- Gopalkrishnan, S., Ross, W., Chen, A. Y., Gourse, R. L., & Roberts, J. W. (2017). TraR directly regulates transcription initiation by mimicking the combined effects of the global regulators DksA and ppGpp. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(28), E5539–E5548. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1704105114>
- Grace, E. D., Gopalkrishnan, S., Girard, M. E., Blankschien, M. D., Ross, W., Gourse, R. L., & Herman, C. (2015). Activation of the σ E-Dependent Stress Pathway by Conjugative TraR May Anticipate Conjugational Stress. *Journal of Bacteriology*, 197(5), 924. <https://doi.org/10.1128/JB.02279-14>
- Grenier, F., Matteau, D., Baby, V., & Rodrigue, S. (2014). Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* BW25113. *Genome Announcements*, 2(5), e01038-14. <https://doi.org/10.1128/GENOMEA.01038-14>

- Hidalgo, D., Martínez-Ortiz, C. A., Palsson, B. O., Jiménez, J. I., & Utrilla, J. (2022). Regulatory perturbations of ribosome allocation in bacteria reshape the growth proteome with a trade-off in adaptation capacity. *IScience*, 25(3). <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.103879>
- Kaczanowska, M., & Rydén-Aulin, M. (2007). Ribosome Biogenesis and the Translation Process in *Escherichia coli*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71(3), 477–494. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00013-07>,
- Katz, L., Chen, Y. Y., Gonzalez, R., Peterson, T. C., Zhao, H., & Baltz, R. H. (2018). Synthetic biology advances and applications in the biotechnology industry: a perspective. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 45(7), 449–461. <https://doi.org/10.1007/S10295-018-2056-Y>,
- Keasling, J. D. (2008). Synthetic biology for synthetic chemistry. *ACS Chemical Biology*, 3(1), 64–76. <https://doi.org/10.1021/CB7002434>,
- Kelwick, R., MacDonald, J. T., Webb, A. J., & Freemont, P. (2014). Developments in the Tools and Methodologies of Synthetic Biology. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2(NOV), 60. <https://doi.org/10.3389/FBIOE.2014.00060>
- Kitano, S., Lin, C., Foo, J. L., & Chang, M. W. (2023). Synthetic biology: Learning the way toward high-precision biological design. *PLOS Biology*, 21(4), e3002116. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PBIO.3002116>
- Klumpp, S., & Hwa, T. (2014). Bacterial growth: Global effects on gene expression, growth feedback and proteome partition. *Current Opinion in Biotechnology*, 28, 96–102. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.01.001>
- Klumpp, S., Zhang, Z., & Hwa, T. (2009). Growth Rate-Dependent Global Effects on Gene Expression in Bacteria. *Cell*, 139(7), 1366–1375. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.12.001>
- Kormanec, J. (2022). Bacterial Regulatory Proteins. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(12). <https://doi.org/10.3390/IJMS23126854>,

- Leiva Araya, L. E. (2020). *Caracterización de alteraciones de RNA en escherichia coli bajo estrés oxidativo y de su efecto sobre la traducción del mensaje genético*. <https://repositorio.uchile.cl/handle/2250/176849>
- Li, G. W., Burkhardt, D., Gross, C., & Weissman, J. S. (2014). Quantifying absolute protein synthesis rates reveals principles underlying allocation of cellular resources. *Cell*, 157(3), 624. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2014.02.033>
- Molenaar, D., Van Berlo, R., De Ridder, D., & Teusink, B. (2009). Shifts in growth strategies reflect tradeoffs in cellular economics. *Molecular Systems Biology*, 5, 323. <https://doi.org/10.1038/MSB.2009.82>
- Molodtsov, V., Sineva, E., Zhang, L., Huang, X., Cashel, M., Ades, S. E., & Murakami, K. S. (2018). Allosteric Effector ppGpp Potentiates the Inhibition of Transcript Initiation by DksA. *Molecular Cell*, 69(5). <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.01.035>
- Navarro García, P. E. (2010). *Efecto de condiciones ambientales en la biosíntesis de la proteína recombinante PE_PGRS26 de Mycobacterium tuberculosis en cultivos sumergidos de Escherichia coli*. <https://hdl.handle.net/20.500.14330/TES01000660588>
- Nickels, B. E., & Hochschild, A. (2004). Regulation of RNA polymerase through the secondary channel. *Cell*, 118(3), 281–284. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.07.021>
- Ortiz Maldonado, H. A. (2017). *Diseño y desarrollo de un nuevo sistema de termo inducción en Escherichia coli para la producción de proteínas recombinantes*. <https://hdl.handle.net/20.500.14330/TES01000768989>
- Paul, B. J., Barker, M. M., Ross, W., Schneider, D. A., Webb, C., Foster, J. W., & Gourse, R. L. (2004). DksA: A critical component of the transcription initiation machinery that potentiates the regulation of rRNA promoters by ppGpp and the initiating NTP. *Cell*, 118(3), 311–322. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.07.009>

- Paul, B. J., Ross, W., Gaal, T., & Gourse, R. L. (2004). rRNA transcription in *Escherichia coli*. *Annual Review of Genetics*, 38, 749–770. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.GENET.38.072902.091347>,
- Paul, B. J., Ross, W., Gaal, T., & Gourse, R. L. (2025). RRNA TRANSCRIPTION IN *ESCHERICHIA COLI*. *Annu. Rev. Genet*, 38, 749–770. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.38.072902.091347>
- Perederina, A., Svetlov, V., Vassilyeva, M. N., Tahirov, T. H., Yokoyama, S., Artsimovitch, I., & Vassilyev, D. G. (2004). Regulation through the Secondary Channel—Structural Framework for ppGpp-DksA Synergism during Transcription. *Cell*, 118(3), 297–309. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2004.06.030>
- Potrykus, K., & Cashel, M. (2008). (p)ppGpp: still magical? *Annual Review of Microbiology*, 62, 35–51. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.MICRO.62.081307.162903>
- Potrykus, K., Murphy, H., Philippe, N., & Cashel, M. (2011). ppGpp is the major source of growth rate control in *E. coli*. *Environmental Microbiology*, 13(3), 563–575. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02357.x>
- Ross, W., Sanchez-Vazquez, P., Chen, A. Y., Lee, J. H., Burgos, H. L., & Gourse, R. L. (2016). ppGpp binding to a site at the RNAP-DksA interface accounts for its dramatic effects on transcription initiation during the stringent response. *Molecular Cell*, 62(6), 811. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2016.04.029>
- Ross, W., Vrentas, C. E., Sanchez-Vazquez, P., Gaal, T., & Gourse, R. L. (2013). The magic spot: A ppGpp binding site on *E. coli* RNA polymerase responsible for regulation of transcription initiation. *Molecular Cell*, 50(3), 420–429. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.03.021>
- Scott, M., Gunderson, C. W., Mateescu, E. M., Zhang, Z., & Hwa, T. (2010). Interdependence of cell growth and gene expression: Origins and consequences. *Science*, 330(6007), 1099–1102. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1192588>,

- Scott, M., & Hwa, T. (2011). Bacterial growth laws and their applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 22(4), 559–565. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.04.014>
- Scott, M., Klumpp, S., Mateescu, E. M., & Hwa, T. (2014). Emergence of robust growth laws from optimal regulation of ribosome synthesis. *Molecular Systems Biology*, 10(8), 747. <https://doi.org/10.15252/MSB.20145379>
- Steitz, T. A. (2008). A structural understanding of the dynamic ribosome machine. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(3), 242–253. <https://doi.org/10.1038/NRM2352;KWRD=LIFE+SCIENCES>
- Stumper, S. K., Ravi, H., Friedman, L. J., Mooney, R. A., Corrêa, I. R., Gershenson, A., Landick, R., & Gelles, J. (2019). Delayed inhibition mechanism for secondary channel factor regulation of ribosomal rna transcription. *ELife*, 8. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.40576>,
- Trautinger, B. W., Jaktaji, R. P., Rusakova, E., & Lloyd, R. G. (2005). RNA polymerase modulators and DNA repair activities resolve conflicts between DNA replication and transcription. *Molecular Cell*, 19(2), 247–258. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.06.004>
- Utrilla, J., O'Brien, E. J., Chen, K., McCloskey, D., Cheung, J., Wang, H., Armenta-Medina, D., Feist, A. M., & Palsson, B. O. (2016). Global Rebalancing of Cellular Resources by Pleiotropic Point Mutations Illustrates a Multi-scale Mechanism of Adaptive Evolution. *Cell Systems*, 2(4), 260–271. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2016.04.003>
- Wu, J., & Xie, J. (2009). Magic spot: (p) ppGpp. *Journal of Cellular Physiology*, 220(2), 297–302. <https://doi.org/10.1002/JCP.21797>
- Zenkin, N., & Yuzenkova, Y. (2015). New insights into the functions of transcription factors that bind the rna polymerase secondary channel. *Biomolecules*, 5(3), 1195–1209. <https://doi.org/10.3390/BIOM5031195>,
- Zhou, X.-L., Zhang, M.-S., Zheng, X.-R., Zhang, Z.-Q., & Liu, J.-Z. (2024). Increasing the robustness of Escherichia coli for aromatic chemicals production through

transcription factor engineering. *Advanced Biotechnology*, 2(2), 15.
<https://doi.org/10.1007/S44307-024-00023-X>

Zuo, Y., Wang, Y., & Steitz, T. A. (2013). The Mechanism of E. coli RNA Polymerase Regulation by ppGpp is suggested by the structure of their complex. *Molecular Cell*, 50(3), 430–436. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.03.020>