



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

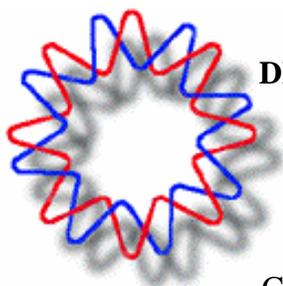
**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO  
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA  
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA CELULAR Y BIOCATÁLISIS**

**Incorporación de modificaciones  
genéticas a una cepa de *Escherichia coli*  
para modular la expresión de genes que  
permitan acumular shikimato**

**TESIS**  
PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
**MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA  
**L.C. JOSÉ ALBERTO RODRÍGUEZ RUIZ**

**DIRECTOR DE TESIS: DR. FRANCISCO GONZALO BOLÍVAR ZAPATA**





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# AGRADECIMIENTOS

A mis padres, por todo su apoyo y cariño

Al Dr. Francisco Bolívar, por brindarme su confianza, soporte y guía

A la Dra. Noemí Flores, por el apoyo teórico y metodológico

Al Dr. José Luis Báez, por su ayuda en la planeación y ejecución del proyecto

Al Dr. Enrique Morett, por sus valiosos comentarios y crítica

A los Dres. Enrique Merino, Guadalupe Espín, Alicia González y Fernando Martínez, por aceptar formar parte del jurado evaluador de este trabajo

A Mercedes Enzaldo, por el auxilio técnico, y a Paul Gaytán, Eugenio López y Jorge Yáñez, por su colaboración como integrantes de la unidad de síntesis y secuenciación de DNA del IBt

# ÍNDICE

<b>1) Resumen.....</b>	<b>4</b>
<b>2) Introducción.....</b>	<b>5</b>
<b>3) Estrategias Generales.....</b>	<b>7</b>
<b>4) Objetivos.....</b>	<b>10</b>
<b>5) Resultados y Discusión.....</b>	<b>11</b>
<b>6) Conclusiones.....</b>	<b>24</b>
<b>7) Perspectivas.....</b>	<b>25</b>
<b>8) Materiales y Métodos.....</b>	<b>26</b>
<b>9) Referencias.....</b>	<b>28</b>

## RESUMEN

El shikimato (SHK) es un compuesto intermediario en la vía biosintética de aminoácidos aromáticos en plantas y bacterias, el cual es particularmente útil como material de partida para la síntesis química de oseltamivir fosfato (Tamiflu), que se ha utilizado como antiviral contra la influenza. Teniendo en cuenta que muchas de las estrategias de modificación genética que se han propuesto hasta la fecha imponen restricciones metabólicas severas para las cepas de producción, se planteó la creación de un nuevo sistema que permita una modulación transcripcional más eficiente de los genes involucrados en la biosíntesis de SHK, minimizando simultáneamente la carga metabólica. Utilizando un conjunto de datos transcripcionales existentes en nuestro laboratorio, se propuso que el aislamiento de promotores que pertenezcan a genes diferencialmente expresados (alto, medio y bajo nivel de expresión) y su posterior clonación para controlar a nuestros genes blanco, modularía su expresión en una manera más fina. Nuestros resultados muestran que pueden obtenerse patrones de expresión predecibles al clonar promotores utilizando esta metodología y fue posible determinar su correlación con las fases del crecimiento. También se generó una cepa truncada en la vía de biosíntesis justo después de la formación de SHK para favorecer su acumulación (PB12 *aroK aroL*). Además, se construyeron plásmidos que poseen cuatro genes clave para la acumulación de shikimato formando un operón artificial, en donde se clonaron por separado los tres promotores para activar la expresión génica de manera diferencial. Adicionalmente, los vectores utilizados permiten efectuar una integración cromosomal de los operones creados en cualquier cepa *lacZ*<sup>+</sup>. La comprobación de la efectividad de las construcciones efectuadas promete resultados interesantes en el rendimiento de SHK y nos permiten proponer futuras modificaciones a PB12 *aroK aroL* y a las condiciones de cultivo.

## SUMMARY

Shikimic acid is an intermediate compound in the aromatic amino acid biosynthetic pathway in plants and bacteria, which is particularly useful as a starting material for the chemical synthesis of oseltamivir phosphate (Tamiflu) for the treatment against influenza. Several genetic modification strategies have been reported to improve shikimate productivity and yield in *E. coli*. Unfortunately, it is known that some of these alterations also impose severe metabolic constraints, so we proposed the creation of a new system that allows an efficient transcriptional modulation of key shikimate biosynthetic genes, while minimizing the metabolic burden. Using a compilation of transcriptional data existing in our lab that was obtained by qPCR from strains grew in similar culture conditions, we speculated that the isolation of promoters belonging to genes differentially expressed (high, medium or low level of expression) and its subsequent cloning to control our target genes, could modulate their transcription in a smoother way. Our results show that desirable expression patterns can be obtained when cloning promoters selected by this approach. In addition, a stable mutant strain (PB12 *aroK aroL*) and three plasmids were constructed, the latter possessing four key genes for shikimate accumulation forming an operon, each one controlled by one of the previous promoters. These vectors also permit chromosomal integration of the created operons in any *lacZ*<sup>+</sup> strain. The integrity of the created vectors makes this a very promising strategy and the results encouraged us to propose further modifications.

## INTRODUCCIÓN

El ácido shikímico (SHK), al ser una molécula con un anillo de seis carbonos y tres centros quirales, es un compuesto comercialmente relevante por sus múltiples aplicaciones en la síntesis orgánica. Su utilidad se refleja principalmente en su uso para la síntesis de fenol, ácido p-hidroxibenzoico y como material de partida para la síntesis química del antiviral oseltamivir fosfato, registrado bajo el nombre Tamiflu, para el tratamiento y prevención de la influenza [1,2].

Ante la latente amenaza de una pandemia, y por la posible aparición de nuevas cepas del virus de la influenza, se ha reconocido la necesidad de aumentar las reservas mundiales de Tamiflu [3]. Sin embargo, uno de los factores limitantes de la producción a gran escala del fármaco, es que el aislamiento tradicional de SHK a partir de plantas del género *Illicium* resulta insuficiente para cubrir la demanda [2].

Como el shikimato es un metabolito intermediario en la vía de síntesis de aminoácidos aromáticos en plantas y microorganismos, se ha planteado que la síntesis microbiana de shikimato a gran escala, a partir de recursos renovables como glucosa, constituye una excelente alternativa para producir mayores cantidades a nivel general [2]. Las ventajas de la síntesis biocatalítica sobre el aislamiento tradicional han resultado tan evidentes que, desde hace casi 10 años, varios grupos han trabajado en la creación y caracterización de cepas bacterianas productoras de SHK y otros compuestos aromáticos [1,4,5].

Diversas estrategias se han llevado a cabo con el objetivo de mejorar los rendimientos y productividades en la biosíntesis de compuestos aromáticos en bacterias, pues son éstos los factores clave que inciden en la viabilidad de un bioproceso. En general, estos enfoques consisten en incrementar la disponibilidad de los precursores directos de los compuestos aromáticos, eritrosa 4-fosfato (E4P) y fosfoenolpiruvato (PEP), mediante la inactivación de enzimas que los consumen, o la sobreexpresión de enzimas que los producen [1,2,6]. Por ejemplo, se ha demostrado que la sobreexpresión de genes que codifican para las enzimas transcetolasa (Tkt) y transaldolasa (Tal), mejora significativamente el rendimiento de compuestos aromáticos en *Escherichia coli*, presumiblemente por el incremento en la disponibilidad de E4P [7,8].

Las estrategias genéticas que se han llevado a cabo para aumentar la disponibilidad de PEP incluyen la sobreexpresión de la enzima PEP sintasa (PpsA) [1,5,9], o la inactivación de enzimas que consumen PEP como: PEP carboxilasa (Ppc) [11], piruvato cinasas (PykF y PykA) [12] y el sistema fosfoenolpiruvato: carbohidrato fosfotransferasa (PTS) [6].

El primer paso enzimático comprometido en la vía biosintética de los compuestos aromáticos es catalizado por la enzima 3-desoxi-D-arabinoheptuloso 7-fosfato (DAHP) sintasa, la cual condensa los precursores E4P y PEP produciendo el primer intermediario de esta vía, DAHP [4]. La desregulación de esta enzima a nivel alostérico y transcripcional es invariablemente requerida para superar este paso limitante y redireccionar los flujos de carbono del metabolismo central hacia la vía de aminoácidos aromáticos [4,6].

Se han evaluado en trabajos anteriores, los efectos de varias aproximaciones para mejorar el rendimiento y productividad de shikimato, lográndose avances considerables [2,12,24]. Sin embargo, al comparar los rendimientos obtenidos hasta ahora con el rendimiento máximo teórico calculado, resulta evidente que hay mucho espacio para mejorar los procesos actuales [18].

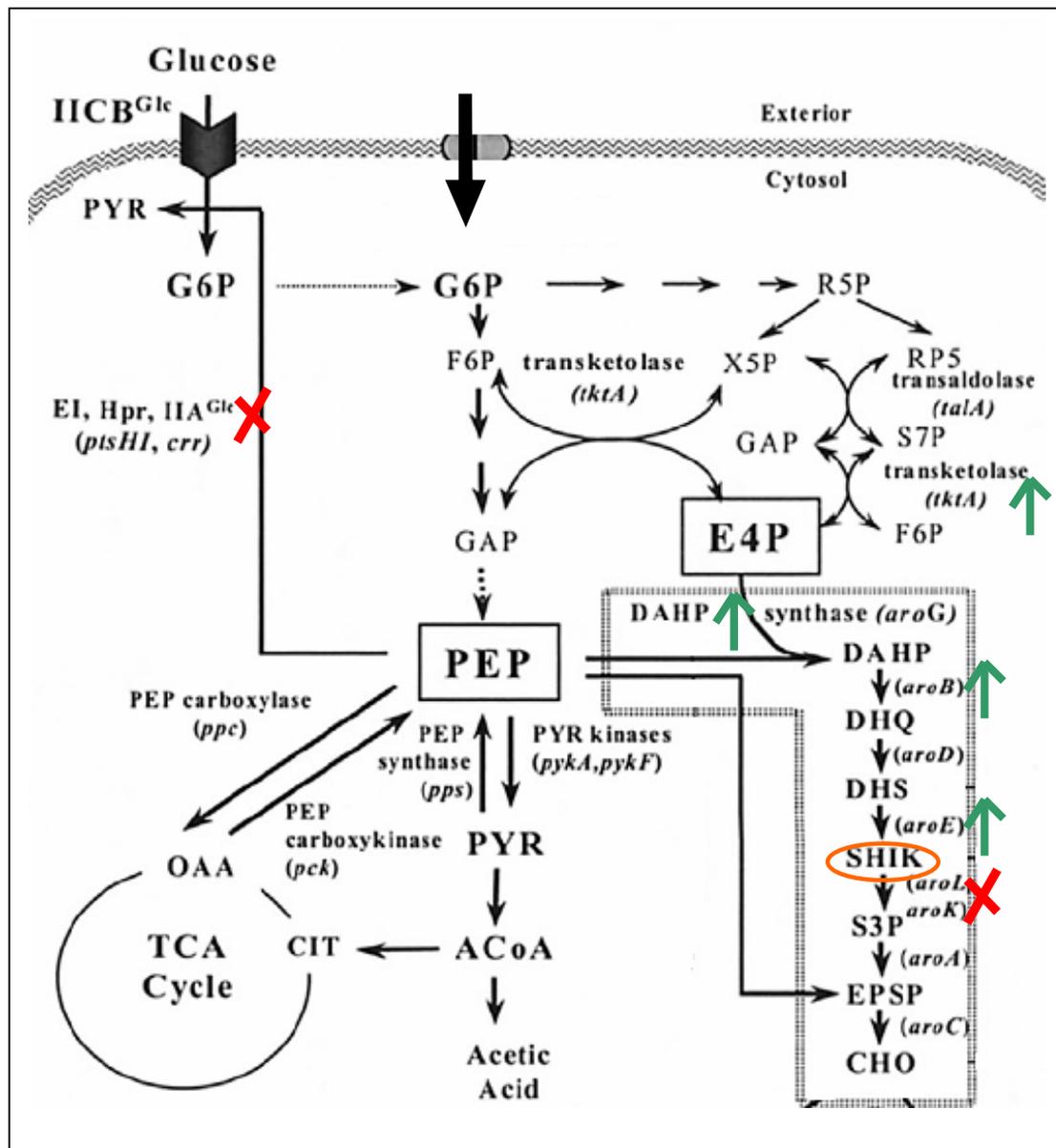


Figura 1. Esquema de las modificaciones genéticas que poseen las cepas utilizadas en este trabajo. Una cruz roja y una flecha verde simbolizan delección y sobreexpresión respectivamente, de los genes indicados. Más detalles en el texto.

Las modificaciones en la vía del shikimato (Fig. 1) comprenden generalmente la sobreexpresión de las enzimas shikimato deshidrogenasa y DHQ sintasa (codificadas por los genes *aroE* y *aroB*, respectivamente), así como el truncamiento de la vía justo después de la formación de shikimato mediante la delección de los genes codificantes para las isoenzimas shikimato cinasas (*aroK* y *aroL*) [1,2,18,24].

Recientemente, nuestro grupo ha demostrado que la combinación de estrategias que combinan la inactivación del sistema PTS y la enzima PykF, en conjunto con la sobreexpresión de las enzimas Tkt, y DAHP sintasa resistente a inhibición por producto (*aroG<sup>br</sup>*) en cepas de *E. coli* (*aroE*), tienen un impacto positivo en el rendimiento del

intermediario aromático 3-deshidros hikimato (DHS) [16]. Los datos anteriores sugieren que la utilización de cepas que combinen algunas de las estrategias mencionadas, tanto para aumentar la disponibilidad intracelular de precursores ( $PTS^-$ ,  $tktA^+$ ,  $pykF^-$ ), como para la acumulación de shikimato ( $aroG^{br+}$ ,  $aroB^+$ ,  $aroE^+$ ,  $aroK^-$ ,  $aroL^-$ ) puede dar resultados satisfactorios.

Con el interés de crear una cepa que incremente la disponibilidad intracelular de PEP, nuestro grupo generó la cepa PB12, derivada de la silvestre JM101, a la que se le ha eliminado el operón que codifica para el sistema de fosfotransferasa ( $PTS^-$ ). Esta cepa ha sido evolucionada en quimiostato para recuperar el fenotipo de crecimiento rápido en glucosa ( $Glc^+$ ), y su caracterización revela numerosos cambios en el metabolismo [10]. Por ejemplo, se ha demostrado que PB12 puede redirigir el PEP no utilizado por PTS hacia la vía de aminoácidos aromáticos [4].

Por otro lado, es importante mencionar que en la mayoría de los trabajos reportados en esta área se han sobreexpresado genes clave usando promotores fuertes y plásmidos multicopia. En un trabajo reciente, se construyeron cepas sobreproductoras de SHK derivadas de PB12 utilizando esta estrategia [24]. Sin embargo, se ha señalado también que la expresión de genes en niveles transcripcionales altos no siempre es la estrategia más adecuada, pues puede causar problemas de sobrecarga metabólica y por lo tanto, disminución de la productividad del metabolito de interés [14]. Por lo tanto, es necesario el desarrollo y/o la selección de nuevos sistemas de expresión que permitan disminuir la dosis génica hasta el punto necesario, modulando eficientemente la expresión de genes clave con el objetivo de optimizar la producción [20]. Algunas aproximaciones a este problema han sido: el uso de promotores inducibles, variación de la dosis génica mediante el uso de plásmidos con diferente número de copias, empleo de promotores sintéticos obtenidos por mutagénesis para variar la fuerza del promotor, entre otros [14,15,20,21]. Sin embargo, se han identificado problemas con la aplicación de estas técnicas. Por ejemplo, se sabe que la inducción de promotores provoca heterogeneidad en los cultivos y disminución de la velocidad de crecimiento. Asimismo, incluso cuando las bibliotecas de promotores sintéticos han probado ser útiles para generar colecciones de fuerzas de expresión, los intervalos de fuerza obtenidos son relativamente pequeños [20,21].

Nuestro grupo ha realizado también diferentes estudios de análisis transcripcional en cepas de *E. coli* mediante el empleo de técnicas de qPCR [10,13]. A partir de estos trabajos, se ha obtenido una gran colección de datos de transcripción relativa de genes del metabolismo central. Con el objetivo de crear un nuevo sistema que permita modular eficientemente la transcripción, en el presente estudio se planteó la posibilidad de utilizar estos datos de forma novedosa para la selección de regiones reguladoras con diferentes fuerzas, de forma que controlen los niveles de expresión transcripcional de genes clave en la biosíntesis de shikimato. Lo anterior se llevó a cabo mediante el aislamiento de esas regiones, la clonación de los genes de interés bajo su control, y su introducción en la cepa PB12, la cual fue modificada para aumentar el rendimiento y productividad de shikimato bajo condiciones que permitan minimizar la carga metabólica, como se describe a continuación.

## **ESTRATEGIAS GENERALES**

A partir de los datos de transcripción de más de 150 genes de metabolismo central y otras vías obtenidos en trabajos anteriores [10,13], se realizó un ordenamiento que permitió la

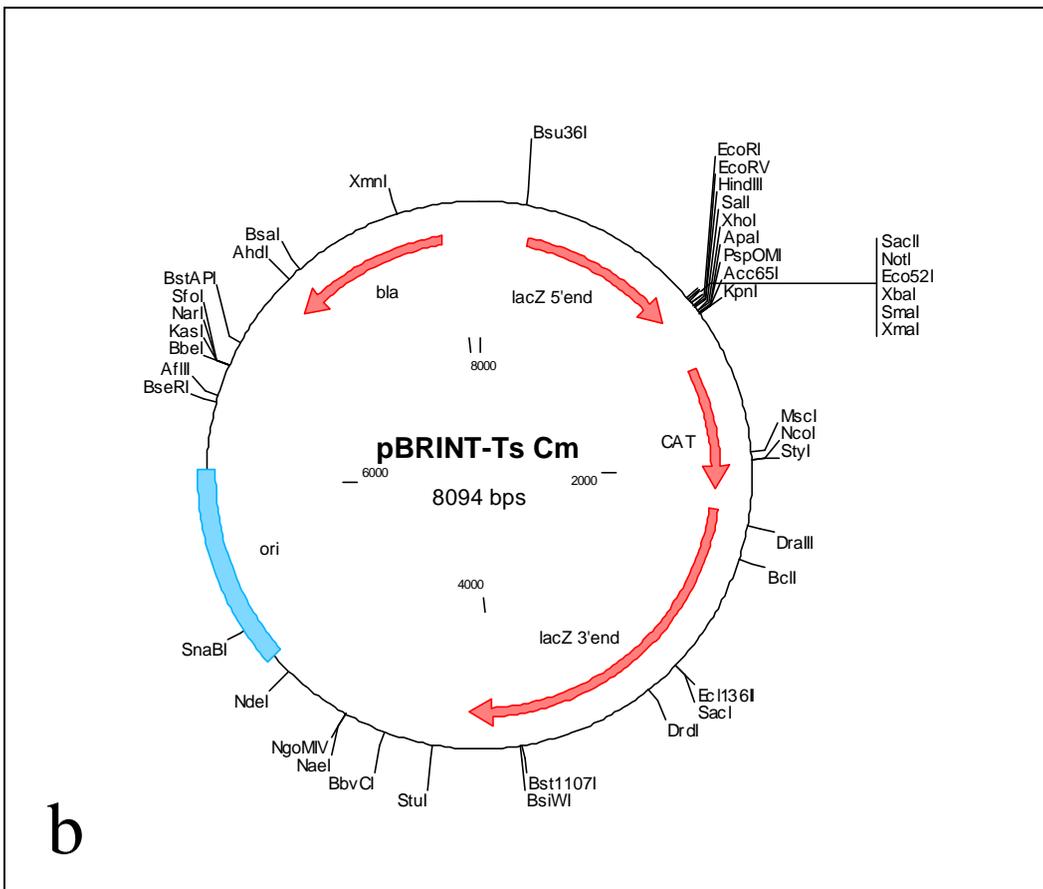
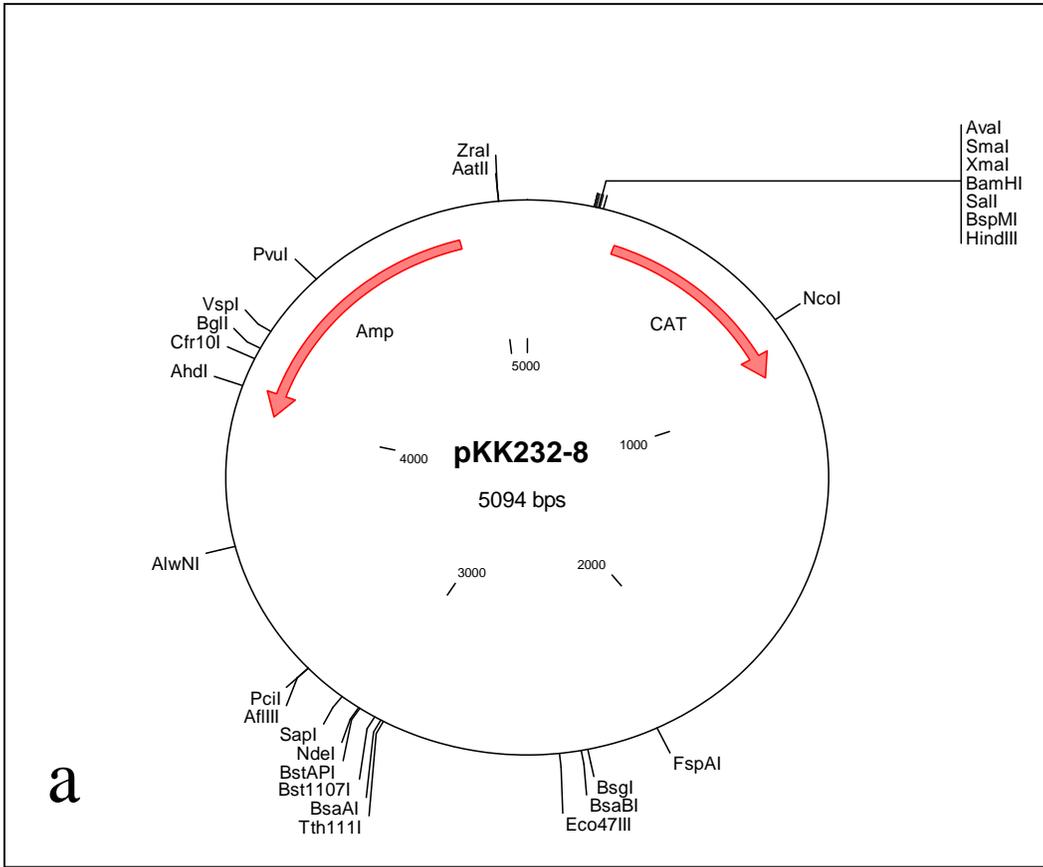


Figura 2. Plásmidos utilizados en este trabajo.

comparación de sus niveles de transcripción para clasificarlos de manera simplista en genes de alto, medio y bajo nivel de expresión. Con base en este ordenamiento, se seleccionaron posibles candidatos en cada uno de los tres niveles de expresión y se realizó una búsqueda bioinformática [19] de sus regiones reguladoras. Usando la mayor cantidad posible de información reportada, se eligieron los tres genes que tuvieron las regiones reguladoras más prometedoras para regular diferencialmente a cualquier secuencia codificante que se ponga bajo su control. El criterio básico de selección favoreció a aquellos genes que tienen promotores constitutivos, y que además presenten el mismo nivel de expresión en todas las cepas probadas en trabajos anteriores bajo las mismas condiciones de crecimiento [13].

Una vez seleccionados los genes de diferentes niveles transcripcionales, se aislaron por PCR las regiones reguladoras correspondientes. Se realizó un ensayo mediante la clonación de las regiones reguladoras en un plásmido que es utilizado para medir la fuerza de promotores, el pKK232-8 (Fig. 2a). Este vector tiene el gen que codifica para la enzima cloranfenicol acetiltransferasa (CAT) pero sin promotor [30], por lo que se insertaron de manera separada los 3 promotores escogidos y los plásmidos resultantes se utilizaron en un ensayo de fuerza de expresión.

Mediante la cuantificación de la actividad de CAT y su relación con la cantidad de proteína total presente en extractos celulares, se pueden inferir diferencias en la expresión del gen en cuestión [23]. La medición de la actividad específica se realizó en paralelo al registro de densidad celular con respecto al tiempo, con la finalidad de relacionar los datos con las fases del crecimiento y así identificar si la proporción en el cambio de la expresión para cada uno de los promotores es similar a la esperada.

Una vez comprobado que los promotores de los genes seleccionados aportan cambios graduales en la expresión, se emplearon estas regiones para modular la expresión de los genes requeridos para la biosíntesis de shikimato (*aroG<sup>fbr</sup>*, *tktA*, *aroE*, *aroB*).

Para disminuir la carga metabólica ocasionada por el uso de plásmidos multicopia, se clonaron las regiones reguladoras con los genes clave en un plásmido de inserción cromosomal, el pBRINT-Ts Cm (Fig. 2b). Este vector porta los 4 genes de interés clonados uno a uno en el sitio múltiple de clonación (MCS), generando así un operón sintético. Finalmente, se insertaron de forma independiente cada uno de los 3 promotores en la región que antecede al operón, con la finalidad de que una misma región controle a todos los genes de interés y que además las regiones codificantes quedaran lo más compactas posible dentro del vector. Así, se generaron 3 plásmidos con promotores distintos, precedidos de los 4 genes (cada uno con un sitio artificial de unión a ribosoma). Debido al diseño de oligonucleótidos con los que se amplificaron por PCR cada uno de los segmentos previos a la clonación, la construcción completa quedó además flanqueada por sitios de restricción únicos de modo que el fragmento entero (6kb) pueda ser movilizado para su uso en otras aplicaciones si fuera necesario. La región de inserción cromosomal en este plásmido está definida por 2 fragmentos del gen *lacZ*, que se insertan por recombinación homóloga junto con la región que está entre ellos. Uno de los 2 marcadores de selección de este vector cae en la región que se insertará en el cromosoma, y como posee un replicón sensible a la temperatura (el plásmido se pierde a temperaturas superiores a 37°C), es posible identificar cepas transformadas que han perdido el plásmido pero retienen el marcador de selección [17]. Éstas son buenas candidatas a haber integrado satisfactoriamente el fragmento al cromosoma. Este evento se llevará a cabo en una cepa mutante de *E. coli* con modificaciones genéticas (Fig. 1) que prometen aumentar el rendimiento de shikimato (PTS<sup>-</sup> *aroK aroL*).

La integración cromosomal de los genes seleccionados bajo cada una de las tres regiones reguladoras, permitirá encontrar a la cepa más prometedora para producción (mediante la cuantificación de shikimato y otros intermediarios de la vía) con la ventaja de que ésta no requerirá del uso antibióticos para el mantenimiento de plásmidos.

## **OBJETIVO GENERAL**

Modificar genéticamente una cepa evolucionada de *Escherichia coli* para favorecer la acumulación de shikimato, mediante la presencia de vectores de clonación que permitan modular la expresión de 4 genes clave en la biosíntesis de este metabolito, utilizando diferentes regiones reguladoras y minimizando la carga metabólica mediante su integración cromosomal.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

1.- Realizar un análisis preliminar de datos obtenidos en estudios previos para ordenar y clasificar los diferentes niveles de transcripción en altos, medios y bajos. Seleccionar genes con niveles de expresión alto, medio y bajo, que posean promotores que sean buenos candidatos para modular la expresión de manera predecible.

2.- Amplificar los 4 genes clave y las regiones reguladoras (400pb aprox.) de los genes anteriores por PCR, diseñando oligonucleótidos específicos para insertar sitios de restricción en los productos que faciliten la clonación. De igual manera, los oligos deben diseñarse para introducir sitios de unión al ribosoma con secuencia consenso y espaciamiento preciso, y servir también para introducir sitios de restricción en los extremos del operón construido.

3.- Realizar un ensayo de fuerza de los promotores elegidos mediante su ligación de manera independiente al plásmido pKK232-8 y cuantificar la actividad específica de la enzima CAT para cada una de las construcciones. Evaluar las diferencias en la expresión génica asociada a la fuerza del promotor en cada fase del crecimiento y correlacionarlas con las fuerzas esperadas.

4.- A partir de la cepa PB12 (PTS<sup>-</sup>Glc<sup>+</sup>), generar su derivada *aroK aroL*<sup>-</sup> mediante una modificación al protocolo para interrupción de genes en el cromosoma utilizando fragmentos de PCR [25], y posteriormente transducir una de las mutaciones utilizando el fago P1 [28].

5.- Amplificar, digerir, purificar y ligar secuencialmente los 4 genes en el MCS del plásmido pBRINT-Ts Cm, en el siguiente orden: *aroB* en sitio *SmaI*, *tktA* en sitio *EcoRV*, *aroG* en sitio *XhoI*, y *aroE* en sitio *Apal* (escogido así para facilitar la clonación en base a las propiedades de cada sitio de restricción y para hacerlos sitios únicos). Digerir, purificar y ligar el vector resultante con cada uno de los 3 promotores en el sitio *XbaI* (19pb río arriba de *aroB*), generando 3 plásmidos distintos de alto, medio y bajo nivel de transcripción. Transformar a la cepa PB12 *aroK aroL*<sup>-</sup>, con los 3 plásmidos creados y verificar que presente el fenotipo adecuado para que se pueda dar el evento de integración al cromosoma.

6.- Secuenciar los operones completos para verificar integridad de secuencia y efectuar ensayos simples de funcionalidad de proteínas, complementando la auxotrofia en medio mínimo de cepas mutantes en genes de la vía de aromáticos con los plásmidos generados.

## HIPÓTESIS

Será posible seleccionar regiones reguladoras con diferentes niveles de expresión que modulen eficientemente la transcripción de los genes biosintéticos de interés. El análisis de esta modulación utilizando los vectores generados, en combinación con la minimización de la carga metabólica y el uso de cepas mutantes modificadas para acumular shikimate, permitirán evaluar qué características aumentan el rendimiento y la productividad de este metabolito.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.- Ordenamiento de los datos de transcripción relativa obtenidos por qPCR en estudios anteriores para inferir la fuerza de la expresión génica.

El qPCR en tiempo real es una técnica poderosa para cuantificar indirectamente mRNA que ha sido convertido a cDNA. Algunas ventajas de este procedimiento sobre otros métodos para medir RNA incluyen su alta sensibilidad, precisión y amplio rango dinámico, lo que permite comparar RNAs (o cDNAs) que difieren ampliamente en su abundancia. En este ensayo, cada reacción está caracterizada por el ciclo de PCR en el cual la fluorescencia (directamente relacionada con la cantidad de moléculas presentes) rebasa una línea umbral. Este valor se llama  $C_T$  y disminuye conforme aumenta la cantidad inicial de moléculas objetivo para esa reacción, pues son necesarios menos ciclos de amplificación para alcanzar el umbral [26].

Para que los  $C_T$  sean comparables en dos reacciones independientes, es necesario cotejar su valor con el de un gen control (que se expresa siempre en la misma cantidad) y así excluir alteraciones en el resultado producidas por efectos de la experimentación. De esta manera se obtiene para cada reacción el  $\Delta CT$  ( $\Delta CT = C_{T\text{OBJETIVO}} - C_{T\text{CONTROL}}$ ), que permite entonces obtener la diferencia en el número de ciclos para dos genes, y por ende, la diferencia en abundancia. Si el  $\Delta CT$  para un gen es negativo, implica que éste se expresa más fuertemente que el gen control (que por definición tendría un  $\Delta CT = 0$ ). Evidentemente, si el  $\Delta CT$  es positivo, el gen en cuestión presentaría menor expresión que el control.

Utilizando los valores de  $\Delta CT$  de más de 150 genes en la cepa JM101 y sus derivadas PTS<sup>-</sup> (PB12 y PB13) crecidas en medio mínimo con 10g/L de glucosa y 5g/L de extracto de levadura en condiciones ya reportadas [13], se efectuó un ordenamiento creciente en la fuerza de expresión. Se encontró que hay un intervalo de 30 unidades en los valores de  $\Delta CT$  (van desde 13 hasta -17) mostrando una amplia gama de fuerzas de expresión (Fig. 3). Con base en este ordenamiento, se seleccionaron 3 genes con distintos niveles de expresión para aislar sus regiones promotoras: *tpiA*, **expresión fuerte** ( $\Delta CT \approx -10$ ), *pfkB*, **expresión media** ( $\Delta CT \approx 2$ ) y *pheP*, **expresión baja** ( $\Delta CT \approx 9$ ).

El criterio de selección consistió en evitar aquellos genes que tuvieran reguladores transcripcionales conocidos y buscar que el nivel de expresión fuera igual tanto en la cepa PB12, que será la cepa base de este trabajo, como en la cepa silvestre JM101.

Con estas aproximaciones se busca minimizar la probabilidad de cambios en la fuerza de expresión cuando se modifiquen ligeramente, tanto la cepa, como las condiciones de

cultivo. Para llevar a cabo lo anterior, se efectuaron búsquedas en sitios que proveen bases de datos de secuencia y de redes de regulación transcripcional [19,22]. La secuencia completa del genoma reportada en estas bases de datos para la cepa MG1655 se utilizó también en el diseño de primers.

2.- *Diseño de oligonucleótidos para la amplificación de las regiones reguladoras de los 3 genes elegidos, así como de 4 genes de la vía del shikimato.*

Se diseñaron oligonucleótidos con una longitud promedio de 40pb para amplificar por PCR los genes: *aroG<sup>tblr</sup>*, *tktA*, *aroB* y *aroE*, así como los tres promotores de los genes *pfkB*, *pheP* y *tpiA*, de manera que se crearan sitios de restricción en los extremos de los productos amplificados (Tabla 2).

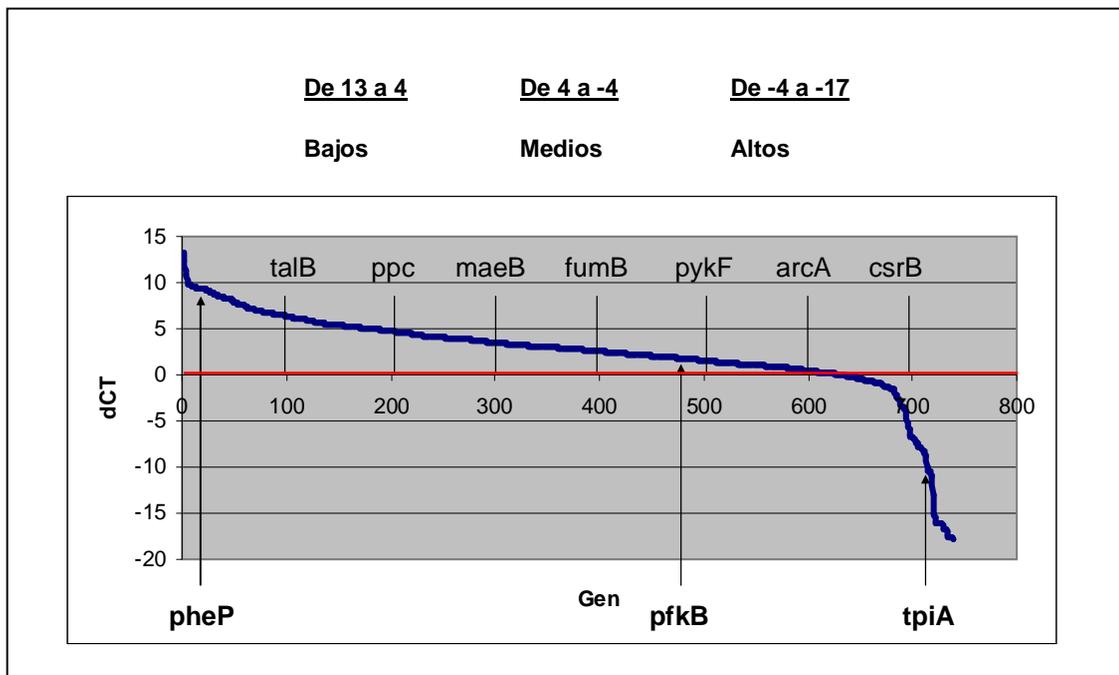


Figura 3. Ordenamiento decreciente y clasificación de la fuerza de expresión de más de 150 genes en la cepa JM101 y sus derivadas PTS. Si bien un valor de CT cercano a cero implica un nivel de expresión muy parecido al del gen control *ihfB*, éste no representa el punto medio de la gráfica.

Además, cada oligonucleótido se diseñó de tal manera que al amplificar esas regiones se crearan sitios Shine-Dalgarno con secuencia consenso (AGGAGG), y un espaciado de 8pb al sitio de inicio de la traducción. Esto con la finalidad de que las secuencias codificantes de mRNA se unan al ribosoma lo más eficientemente posible y favorecer así su traducción. De esta manera se creó un operón sintético de 4 genes por clonación secuencial, donde a cada gen se le adicionó una secuencia Shine-Dalgarno consenso y la distancia intergénica nunca fue mayor a 40bp (entre el codón de término de un gen y el de inicio del

siguiente). Posteriormente, se clonaron de manera independiente los tres promotores a 21bp río arriba del primer gen para generar 3 plásmidos distintos.

Cabe mencionar que el operón generado quedó flanqueado por dos sitios *NotI* en caso de que fuera requerido movilizarlo a otro vector. Los promotores insertados también se encuentran clonados entre dos sitios de corte de *XbaI*, que al ser sitios únicos en todo el vector, permiten que los promotores puedan ser fácilmente removidos o intercambiados por otros.

Cepa	Características	Referencia
JM101	F <sup>-</sup> traD36 proA <sup>+</sup> proB <sup>+</sup> lacI <sup>q</sup> lacZΔM15/supE thi Δ(lac-proAB)	Bolívar et al. (1977)
PB12	JM101, Δ( <i>ptsH, ptsI, crr</i> )::kan, Glc <sup>+</sup>	Flores et al. (1996)
PB12 <i>aroK aroL</i> <sup>-</sup>	PB12, Δ <i>aroL ΔaroK</i> ; Km <sup>R</sup> , Cm <sup>S</sup> , Ap <sup>S</sup>	Este trabajo
TOP10	F <sup>-</sup> <i>mcrA</i> Δ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL endA1 nupG</i>	Invitrogen
Plásmido	Características	Referencia
pJLBaroG <sup>ibr</sup> <i>tktA</i>	Derivado de pJLBaroG <sup>ibr</sup> con el gen <i>tktA</i> clonado con su promotor nativo	[27]
pTrc <i>aroB-aroE</i>	pTrc99A que posee los genes <i>aroB</i> y <i>aroE</i> clonados bajo el promotor Trc	N/D
pKK232-8	Contiene el gen de resistencia a cloranfenicol sin promotor	[30]
pBRINT-Ts Cm	Permite integración cromosomal en cualquier cepa <i>lacZ</i> <sup>+</sup>	[17]
pBRINT <i>TpiA</i>	pBRINT-Ts Cm con el operon clonado bajo el control del promotor de <i>tpiA</i>	Este trabajo
pBRINT <i>PfkB</i>	pBRINT-Ts Cm con el operon clonado bajo el control del promotor de <i>pfkB</i>	Este trabajo
pBRINT <i>PheP</i>	pBRINT-Ts Cm con el operon clonado bajo el control del promotor de <i>pheP</i>	Este trabajo

Tabla 1. Cepas y plásmidos utilizados en este estudio.

### 3.- Amplificación de las regiones a clonar mediante PCR.

Tras algunos experimentos iniciales, se determinó que las restricciones que inevitablemente se presentaron en el diseño de oligonucleótidos dificultaron la amplificación de todos los genes a partir de DNA cromosomal. Por ello, se utilizaron plásmidos como templado para la amplificación, de modo que la reducción en el tamaño del DNA templado aminorara el efecto de la unión débil de los primers y se lograra una mejor amplificación. En efecto, después de ajustar las condiciones para cada par de oligonucleótidos de manera especial, se logró la amplificación de todos los genes utilizando como DNA templado a plásmidos existentes en nuestro laboratorio. Por otro lado, para la amplificación de las tres regiones promotoras, se utilizó como templado al DNA cromosomal de la cepa silvestre JM101 (Tabla 1).

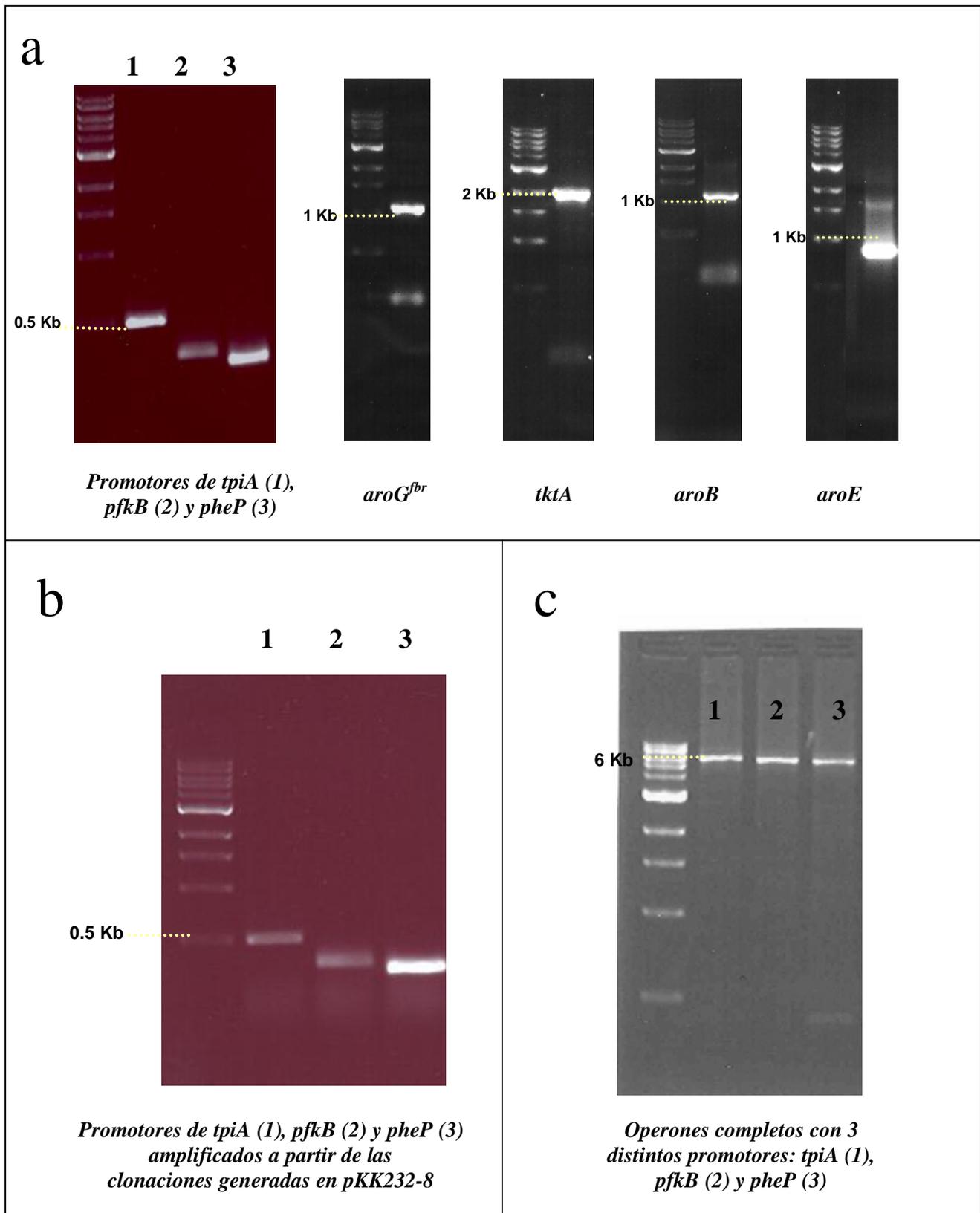


Figura 4. Productos de PCR. La longitud de los productos obtenidos es: **a)** *tpiA* 494pb, *pfkB* 333pb, *pheP* 321pb, *aroG<sup>fbr</sup>* 1091pb, *tktA* 2040pb, *aroB* 1087pb, *aroE* 902pb; **b)** *tpiA* 494pb, *pfkB* 333pb, *pheP* 321pb; **c)** *tpiA<sup>full</sup>* 5588pb, *pfkB<sup>full</sup>* 5426pb, *pheP<sup>full</sup>* 5392pb.

Como se detalla en Materiales y métodos se decidió utilizar a la DNA polimerasa *Pfu*, que tiene una tasa baja de cambios nucleotídicos incorporados durante el proceso de amplificación, para minimizar la probabilidad de mutaciones en las regiones clonadas. También con esta finalidad, el número de ciclos de amplificación, la concentración de  $MgSO_4$  y el tiempo de exposición a la luz UV de geles preparativos se mantuvieron en niveles bajos.

Los 7 productos de PCR se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa (Fig. 4a), se purificaron cortando la banda en un gel preparativo con agarosa de bajo punto de fusión, y extrayendo el DNA usando un kit de recuperación de productos de PCR.

#### 4.- Ligación de los 3 promotores al plásmido reportero pKK232-8.

Con la finalidad de comprobar si las regiones reguladoras aisladas con los primers diseñados podían efectivamente promover la transcripción, se consideró pertinente efectuar un ensayo con un plásmido que contenga un gen reportero. De esta manera podría verificarse su efectividad, y en su defecto, cambiar de promotor antes de continuar con la clonación en los plásmidos finales.

El sistema de gen reportero seleccionado para este estudio fue el plásmido pKK232-8, que tiene un gen que confiere resistencia a cloranfenicol (*cat*) sin promotor [30] y que ha probado ser útil para medir la actividad de promotores. Este vector tiene codones de paro para los tres marcos de lectura localizados entre el MCS y el codón de inicio del gen *cat*, lo que impide que el ribosoma pueda traducirlo como consecuencia de otros sitios de unión. Además, el gen está flanqueado por terminadores de la transcripción. De esta manera se garantiza que el gen pueda ser expresado, al menos en principio, únicamente cuando es activado a partir de un promotor funcional clonado en el MCS (Fig. 2a).

Se realizó la purificación del plásmido pKK232-8 a partir de la cepa DH5- $\alpha$ . Una vez resuspendido en agua, se digirió con la enzima *SmaI* y después se visualizó en gel de agarosa para verificar su presencia (por tamaño) e integridad. Tanto el plásmido digerido como los 3 promotores fueron purificados, ligados en el sitio *SmaI* y los 3 productos sirvieron para transformar células electrocompetentes TOP10, las cuales fueron plateadas en cajas con cloranfenicol para forzar la selección de modo que solo los promotores integrados en la dirección correcta expresen la enzima CAT. Se incluyeron controles de transformación (células solas, vector digerido, vector digerido y ligado, y fragmento solo) los cuales mostraron resultados adecuados.

Se analizaron varias colonias transformadas con los productos de ligación de los 3 promotores y se analizaron por restricción y visualización en gel de agarosa (Fig. 4b), así como por secuenciación.

Con base en estos resultados, se seleccionó una colonia con el inserto en la orientación correcta para cada promotor y los plásmidos resultantes se utilizaron para transformar a la cepa PB12 $aroK$  $aroL$  y realizar el ensayo de actividad específica.

#### 5.- Construcción de la cepa PB12 $aroK$ - $aroL$ .

Para generar la mutante  $aroK$ - $aroL$ - a partir de la cepa PB12, se utilizó el protocolo reportado por Datsenko y Wanner para la interrupción de genes en el cromosoma utilizando productos de PCR [25].

En primer lugar se amplificó el gen *cat* utilizando como templado al plásmido pKD3 y oligonucleótidos especiales (llamados  $aroKcat$  y  $aroLcat$ ) para crear regiones de homología de 40bp a los genes *aroK* y *aroL* en los extremos del producto (Tabla 2).

Oligonucleótido	Secuencia (5' → 3')
<i>aroB5'</i>	CATACTGAGTTCGTAGGAGGGTCGCGTTATGGAGAGGATTG
<i>aroB3'</i>	CCTCCTGACGCTGACTTGACTTACGCTGATTGACAATCGG
<i>aroG5'</i>	GCGCGCGTCGACAGGAGGGAACAGACATGAATTATC
<i>aroG3'</i>	GGTACGGTCGACTTACCCGCGACGCGCTTTTA
<i>tktA5'</i>	GCTACGATCTAGCTAGGAGGGAGTCAAAATGTCCTCACG
<i>tktA3'</i>	CCTCCTACGAACTCAGTATGTTACAGCAGTTCTTTTGCTT
<i>aroE5'</i>	GCGTCGAGGGCCCAGGAGGCAGATAATGGAAACCTATGCTGTTTTTG
<i>aroE3'</i>	ATCTAGCGGGCCCTACTGATTCACGCGGACAATTCCTCCT
<i>tpiA5'</i>	GCGCCTAGTCTAGAAAGCCAATCTCACTCGTGCT
<i>tpiA3'</i>	GACGCAGCTCTAGAGCTTTAATTCTCCACGCTTA
<i>pfkB5'</i>	GCGCCTAGTCTAGAGCCAACATAACGATGGCAGG
<i>pfkB3'</i>	GGCCTAGTTCTAGACATTTCTCCTATAGGCTGA
<i>pheP5'</i>	GCTACTAGTCTAGAGCGATGACGGTGGCGGTGAT
<i>pheP3'</i>	GGCCTAGTTCTAGAGCCTTTCCCCTGTGTGTCTT
<i>aroKcat5'</i>	AATAGTCTTAGTAGTACCGAAAAAATGGCAGAGAAACGCAATATCTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG
<i>aroKcat3'</i>	AGACGAGTGTATATAAAGCCAGAATTAGTTGCTTTCCAGCATGTGATGGGAATTAGCCATGGTCC
<i>aroLcat5'</i>	GCGACCTATTGGGGAAAACCCACGATGACACAACCTCTTTTTCTGTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
<i>aroLcat3'</i>	ACGTAAAGTATAGGCGCTCGAAAATCAACAATTGATCGTCTGTGCATGGGAATTAGCCATGGTCC
+500 <i>aroL3'</i>	TTACCGGGCAAGTGTGAAGC
-500 <i>aroL5'</i>	TTGTCCGGCAGTGTGAAGCG
+500 <i>aroK3'</i>	GGGATGGTTGACCGCAGTTT
-500 <i>aroK5'</i>	CATTCCTGGTTCGGGCAAT

Tabla 2. Secuencias de los oligonucleótidos utilizados. Los sitios de restricción introducidos se muestran subrayados y los sitios Shine-Dalgarno consenso se muestran en cursiva.

Posteriormente, se transformó a la cepa PB12 portadora del plásmido termosensible que posee la recombinasa Red (pKD46) con el producto de PCR de *aroL* y se siguió el protocolo de recombinación homóloga, como se detalla en Materiales y métodos. Después, se seleccionaron transformantes por resistencia a cloranfenicol ( $Cm^R$ ) y sensibilidad a ampicilina ( $Ap^S$ ), que han perdido el plásmido pero lograron integrar el fragmento al cromosoma. El 100% de colonias analizadas presentaron la disrupción cromosomal (PB12 *aroL::cat*), la cual se comprobó por PCR utilizando oligonucleótidos que aparean 500 pares de bases hacia arriba y hacia abajo de estos genes. Estos 2 pares de oligos se llaman +500*aroL3'*, -500*aroL5'*, +500*aroK3'* y -500*aroK5'* (Tabla 2, Fig. 5b y Fig. 6a). Se repitió el protocolo anterior transformando ahora el producto de PCR de *aroK* en PB12/pKD46 para generar la cepa PB12 *aroK::cat*, la cual también se comprobó por PCR usando los primers correspondientes (Tabla 2, Fig. 5b y Fig. 6a).

Posteriormente, se escindió el casete de resistencia a cloranfenicol de una de las cepas generadas (PB12 *aroL::cat*) utilizando el plásmido termosensible auxiliar pCP20, y se generó la cepa PB12 *aroL-* ( $Cm^S$ ,  $Ap^S$ ). Simultáneamente, se infectó a la cepa PB12 *aroK::cat* con fago P1vir para transducir la mutación a la cepa receptora PB12 *aroL-* (Fig. 5a). La transducción se seleccionó por resistencia a cloranfenicol y por PCR (Fig. 6a). Tras escindir nuevamente el gen de resistencia a cloranfenicol, se verificó que el fenotipo ( $Km^R$ ,  $Cm^S$ ,  $Ap^S$ ) y genotipo (*aroK-aroL-*) de la cepa creada fueran los esperados, creciendo a la cepa en medio LB líquido con los respectivos antibióticos (Fig. 6c), por auxotrofia en medio mínimo y por PCR (Fig. 6b).

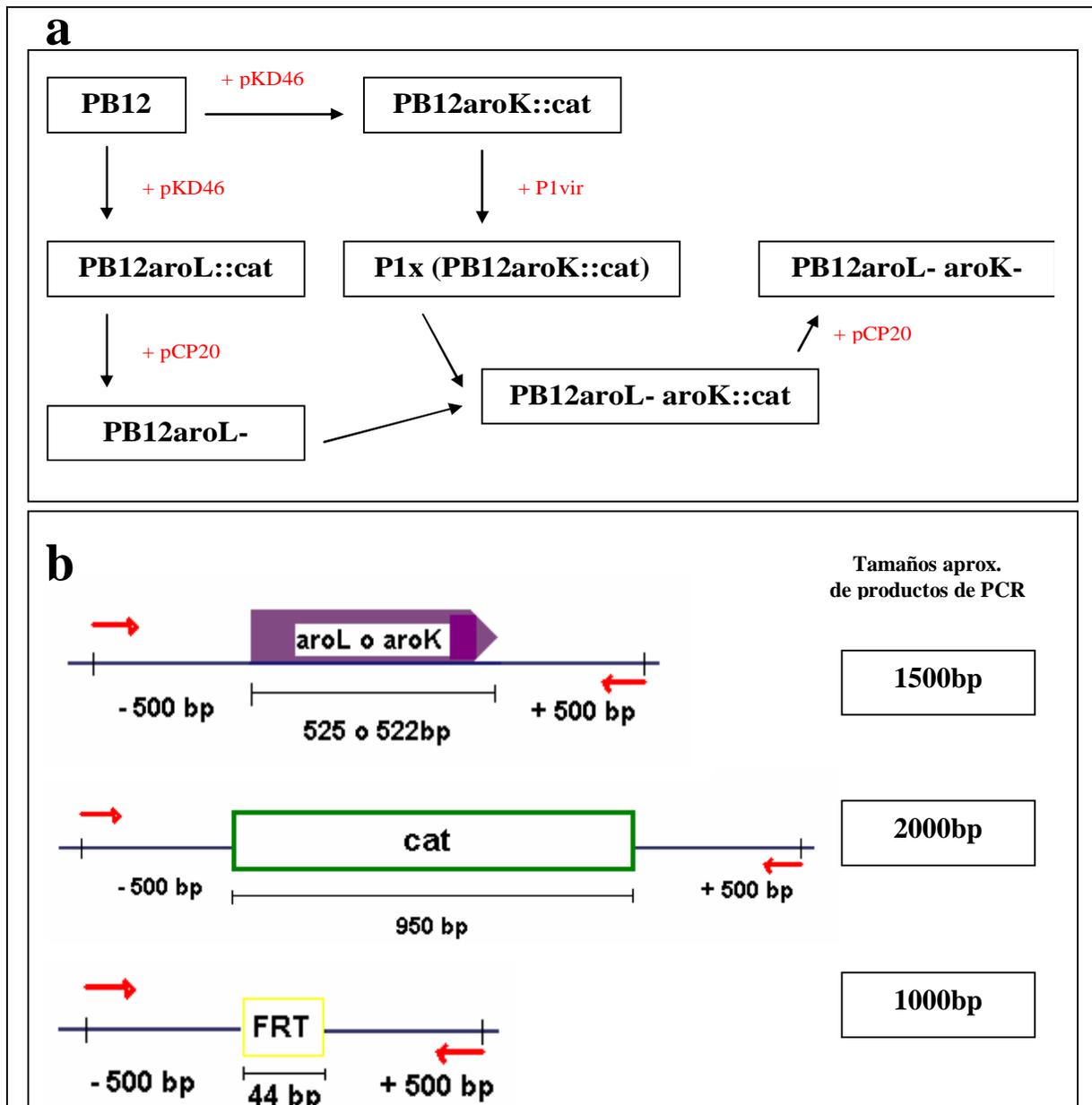


Figura 5. a) Diagrama de los pasos empleados en la construcción de la cepa PB12 *aroK-aroL*, b) Esquema de los tamaños esperados de productos de PCR utilizando primers que aparecen en +500 y -500bp de los genes *aroK* y *aroL*, antes y después de la inserción del gen *cat*.

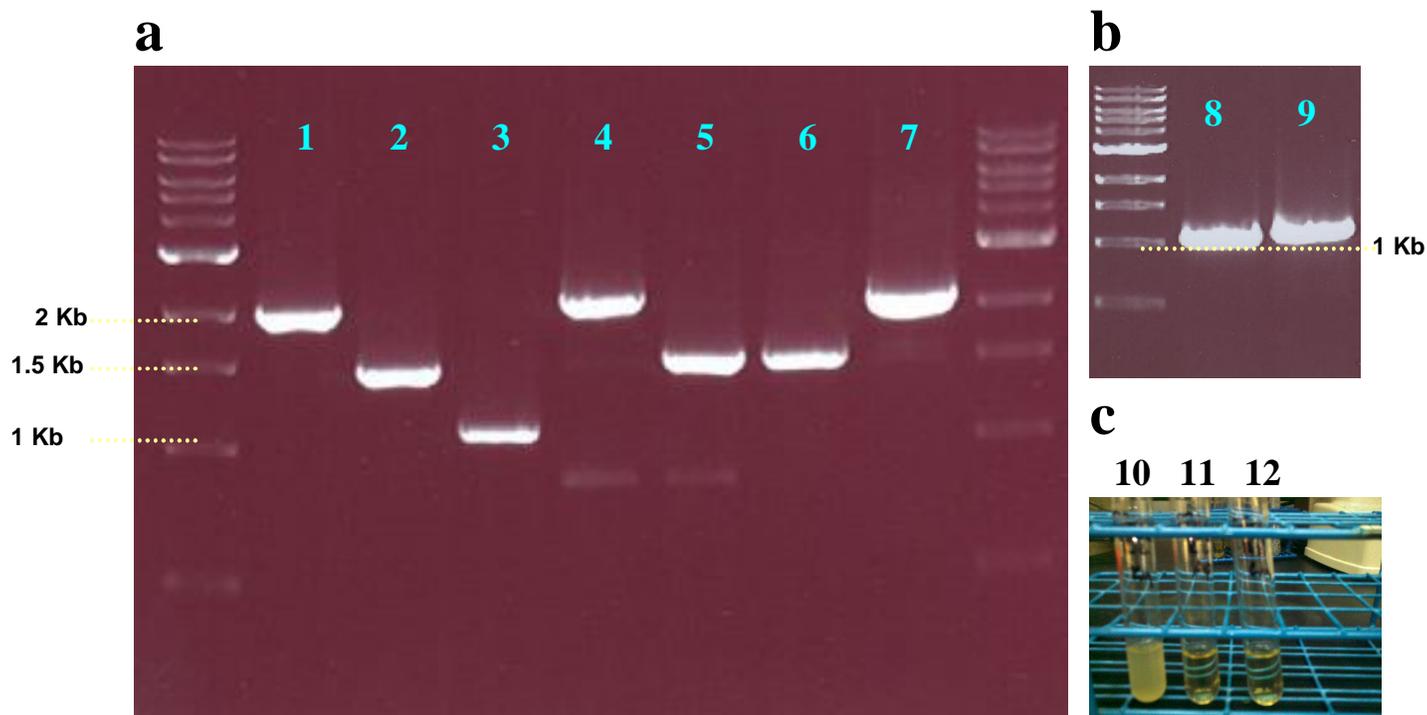


Figura 6. **a), b)**: Productos de PCR obtenidos durante la comprobación de las disrupciones cromosomales utilizando los oligonucleótidos  $\pm 500$  *aroK* y  $\pm 500$  *aroL*. **1)** PB12 *aroL::cat* con oligos *aroL*, **2)** PB12 con oligos *aroL*, **3)** PB12 *aroL-* (sin casete) con oligos *aroL*, **4)** PB12 *aroK::cat* con oligos *aroK*, **5)** PB12 con oligos *aroK*, **6)** PB12 *aroL-* (sin casete) con oligos *aroK*, **7)** PB12 *aroL-aroK::cat* con oligos *aroK*, **8)** PB12 *aroL-aroK-* con oligos *aroL*, **9)** PB12 *aroL-aroK-* con oligos *aroK*.  
**c)**: Comprobación del fenotipo  $Km^R$ ,  $Cm^S$ ,  $Ap^S$  de la cepa PB12 *aroL-aroK-* en medio LB líquido, **10)** 3 ml de LB + 2  $\mu$ l de  $Km30mg/ml$ , **11)** 3 ml de LB + 2  $\mu$ l de  $Ap100mg/ml$ , **12)** 3 ml de LB + 2  $\mu$ l de  $Cm30mg/ml$ .

#### 6.- Ensayo de actividad específica de la enzima CAT.

A partir de un cultivo de toda la noche, se inocularon matraces con cada una de las 3 cepas transformadas. Tomando muestras en puntos definidos de la cinética de crecimiento, las células se procesaron y la concentración de proteína en los extractos celulares fue determinada utilizando un kit. Posteriormente se llevó a cabo el ensayo enzimático (desaparición de acetil-CoA en presencia de cloranfenicol y medición espectrofotométrica del sustrato DNTB-CoA) y se interpolaron los resultados en una gráfica de referencia. Así, se obtuvo la cantidad de enzima por cada miligramo de proteína total en un determinado tiempo, lo cual en este caso está directamente relacionado con la fuerza de activación de la transcripción.

Este ensayo mostró que los promotores amplificados y clonados son funcionales (Fig. 7). La sensibilidad del sistema fue probada al hacer el mismo ensayo para promotores clonados en la orientación inversa, en cuyo caso se observó una actividad específica muy baja (no se muestra). Además, se puede observar que en efecto hay una expresión diferencial generada por los tres promotores (TpiA expresándose más y PheP expresándose menos), aunque dependiente de la fase de crecimiento. Es importante resaltar también que el tipo de plásmido no afectó la velocidad de crecimiento de la cepa, y que la mayor diferencia en expresión se obtuvo alrededor de la hora 6 post-inoculación, que corresponde a una  $DO_{600}$  de 1.2, es decir en fase exponencial.

Estos resultados presentan un panorama alentador para utilizar a estos promotores como moduladores de la expresión de los genes de interés, pues se demostró que las regiones clonadas pueden activar la transcripción con diferentes fuerzas relativas. Sin embargo, es pertinente discutir algunos puntos que llaman la atención y que podrían provocar que nuestro sistema presente un desempeño diferente al esperado. Primero, cabe mencionar que a pesar de que los promotores muestran la tendencia esperada, la diferencia en las fuerzas de expresión obtenida no es tan grande como se desea. Lo anterior puede deberse a varios

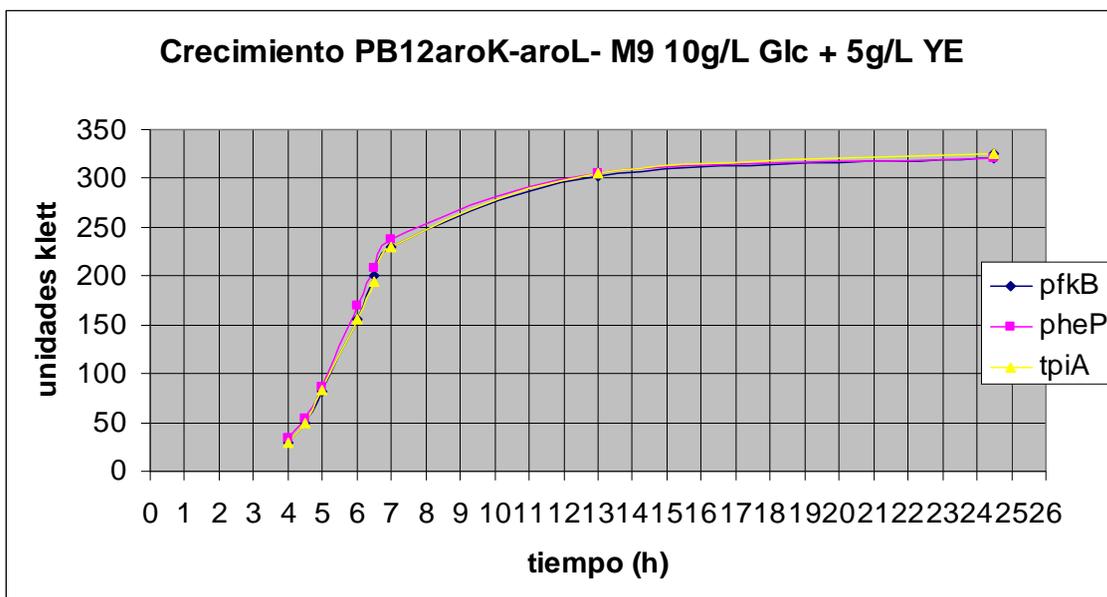
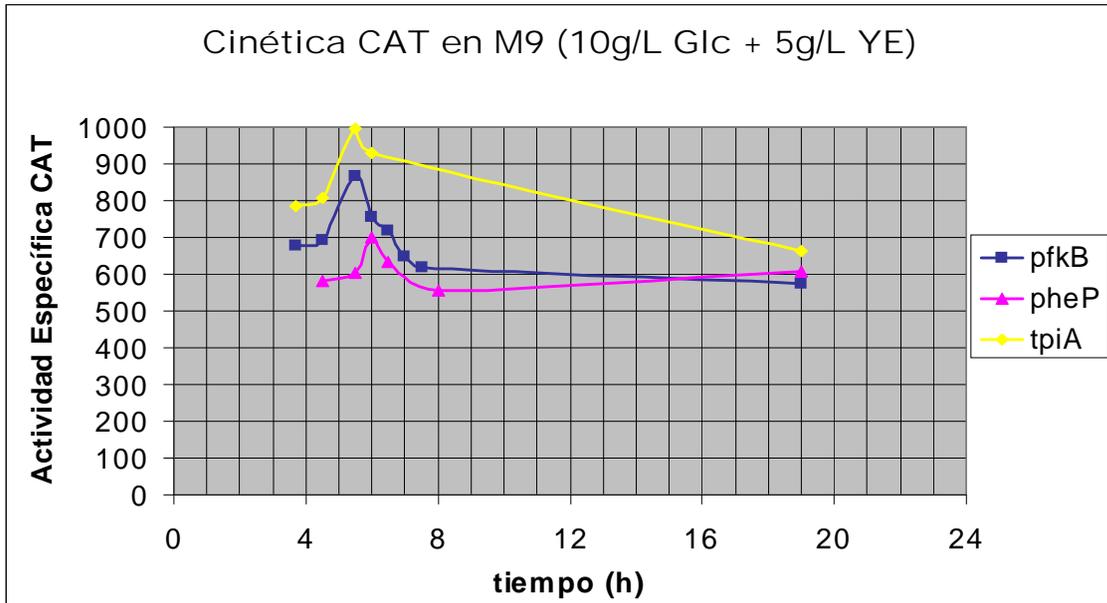


Figura 7. Arriba: Ensayo cinético de la cepa PB12 *aroK aroL* transformada con cada uno de los plásmidos reporteros para correlacionar las distintas fuerzas de los promotores a lo largo del tiempo. Abajo: Cinética de crecimiento de las células sometidas al ensayo de CAT.

factores: 1) la cepa en la cual se realizaron los experimentos de RT-PCR fue PB12, y aunque se espera que su patrón de expresión no cambie significativamente en comparación a PB12 *aroK aroL*, esta última ha sufrido varias manipulaciones genéticas, por lo que no debemos excluir esa posibilidad. De hecho, al efectuar otros experimentos utilizando células TOP10 en lugar de PB12 *aroK aroL*, encontramos que los patrones de actividad específica cambian drásticamente, aún cuando se utilicen los mismos plásmidos (datos no mostrados); 2) los datos de expresión génica con los que se efectuó el ordenamiento de fuerzas de expresión fueron obtenidos con células cultivadas en fermentadores de 1L con condiciones controladas. Sin embargo, para el ensayo de CAT utilizamos matraces con volúmenes de 25mL de cultivo y controlando únicamente la temperatura y la agitación por lo que podemos esperar que las células se comporten de una manera ligeramente diferente. Otra circunstancia que podría tener un efecto negativo en nuestro sistema de expresión es que, al parecer, la fuerza de expresión tiende a ser la misma entre los tres promotores conforme pasa el tiempo. Lo anterior hace surgir la pregunta de si estos promotores van a activar la transcripción eficientemente durante la fase estacionaria, pues debemos tener en cuenta que los datos de referencia fueron obtenidos en fase exponencial.

Ciertamente, con la información obtenida no es posible garantizar el comportamiento de los promotores en una fermentación de producción, en la cual las células permanecen en fase estacionaria por mucho tiempo. No obstante, el hecho de que los promotores sólo fomenten una transcripción diferencial durante las primeras 20 horas de cultivo no necesariamente impone una restricción a nuestro sistema. Se ha reportado que la producción de shikimato empieza en fase exponencial tardía [24] y nuestros resultados muestran que en este punto existe una diferencia en la fuerza de expresión para los tres promotores, la cual se mantiene por algunas horas más. De hecho, la cantidad de enzima generada por cada uno de los genes durante las primeras horas puede ser más que suficiente para que en la vía no se encuentre algún paso limitante, de modo que no se comprometa demasiada energía celular para estos fines en etapas tardías. Esto aumentaría el rendimiento de shikimato a partir de glucosa.

De esta manera, podemos concluir de manera preliminar que los resultados obtenidos aquí dan luz verde para que el proyecto siga su curso. Es importante recordar que la intención de efectuar este ensayo fue determinar de manera simplista si las regiones amplificadas podían funcionar como promotores, y si era posible notar alguna diferencia en la expresión aún a pocas horas post-inoculación, mas no cuantificarla. Se intentó así, emular únicamente el medio de cultivo y la cepa transformada, sin ser demasiado estrictos en las condiciones de fermentación o cuantificar los niveles de transcrito por qPCR. Medir estas diferencias de manera más fina sería costoso y consumiría mucho tiempo. Además, es evidente que una vez que los promotores estén clonados a los genes clave, su efectividad será determinada al cuantificar la producción de shikimato en condiciones óptimas y controladas, siendo esto el verdadero juez de la eficiencia del sistema.

#### *7.- Clonación secuencial de los genes de interés en el plásmido pBRINT-Ts Cm.*

Como se comentó en las estrategias generales, se utilizará al plásmido pBRINT-Ts Cm (Fig. 2b) como base para clonar en él a los 4 genes de interés. Este plásmido ofrece la posibilidad de realizar una inserción cromosomal por recombinación homóloga en el gen *lacZ* de cualquier fragmento introducido en el MCS. La familia de vectores pBRINT-Ts tienen un origen de replicación derivado de pSC101, lo cual se manifiesta con la presencia de replicón sensible a la temperatura (el plásmido se pierde a temperaturas mayores a 37°C). Este vector posee un doble sistema de selección de recombinantes: por un lado

permite la selección de colonias resistentes a cloranfenicol y sensibles a ampicilina, y adicionalmente, permite el rastreo de integrantes por coloración blanca en cajas de X-Gal con IPTG [17]. Además del trabajo hecho por los autores originales, este plásmido fue utilizado con éxito por otro grupo para expresar genes que codifican para enzimas de la vía de biosíntesis de L-treonina, logrando títulos altos y buenos rendimientos [29]. Lo anterior refuerza nuestra propuesta de que el utilizar al pBRINT-Ts para disminuir la carga metabólica es una estrategia promisoriosa.

El plásmido pBRINT-Ts Cm fue replicado, extraído y purificado para ser usado como punto de partida para la clonación secuencial de los 4 genes y 3 promotores previamente amplificados por PCR. Como se comentó anteriormente, se ligaron los genes: *aroB* en el sitio *SmaI*, *tktA* en el sitio *EcoRV*, *aroG* en el sitio *XhoI*, *aroE* en el sitio *ApaI* y los 3 promotores en el sitio *XbaI*. El orden de introducción de los genes fue seleccionado pensando en mantener los sitios del MCS como sitios únicos, y que ninguna de las regiones de corte de enzimas de restricción apareciera en alguna región ya clonada. Además, se intentó hacer buen uso del MCS utilizando un solo sitio de corte para cada gen, de modo que no se perdieran otros sitios de restricción y, si se requiere, poder hacer uso de ellos en un futuro.

Por la naturaleza de la estrategia de clonación, ninguna ligación presentó orientación específica, y es por ello que ha sido necesario comprobar la orientación del fragmento ligado en todos los casos. Así, cada una de las clonaciones fue verificada por PCR, perfiles de restricción y secuenciación.

Es importante mencionar que al utilizar esta secuencia de clonación, el operón completo sin promotor quedó flanqueado por dos sitios *NcoI*, de modo que podrá ser fácilmente transferido a otro vector en caso de ser necesario. Los promotores introducidos también están delimitados por dos sitios *XbaI* únicos en el plásmido (los mismos con los que se ligaron), de tal manera que el promotor puede ser escindido del vector y convenientemente reemplazado por otro, en caso de que se así se deseara.

Finalmente, se generaron los 3 plásmidos que contienen los operones completos bajo el control de cada uno de los promotores de alto, medio y bajo nivel de transcripción, llamados **pBRINT<sub>tpiA</sub>**, **pBRINT<sub>pfkB</sub>** y **pBRINT<sub>pheP</sub>**, respectivamente (Fig. 8).

Se efectuaron 3 reacciones de PCR empleando los primers externos y los plásmidos finales como templado para amplificar el operón completo con cada uno de los promotores. Los productos de PCR fueron del tamaño esperado, lo que comprueba la presencia de todos los genes y su región regulatoria correspondiente (Fig. 4c). Además, se verificó que los operones completos tuvieran la secuencia correcta, como se detalla a continuación.

#### 8.- Verificación de integridad de secuencia del operón generado.

Los plásmidos obtenidos se secuenciaron utilizando oligonucleótidos que aparearan cada 500bp aproximadamente a lo largo del operón creado y de esta manera garantizar que las regiones codificantes tuvieran una secuencia correcta. En efecto, el resultado de la secuenciación y su posterior alineamiento, mostró que no hay diferencias con la secuencia esperada (generada *in silico*) para los genes *tktA*, *aroG<sup>br</sup>* y *aroB*.

El gen *aroE* presentó dos cambios nucleotídicos en su secuencia codificante (sustituciones), pero afortunadamente ninguna altera el marco de lectura ni hay cambios de aminoácidos. La primera alteración ocurrió en la posición 96 de su secuencia codificante. Hay un cambio de A→C en el DNA (o T→C en el mRNA), el cual cae en la tercera posición del codón

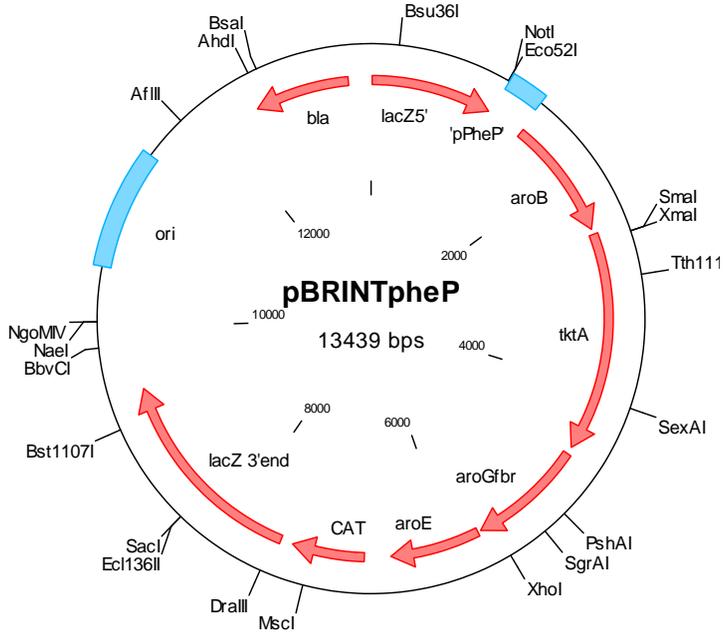
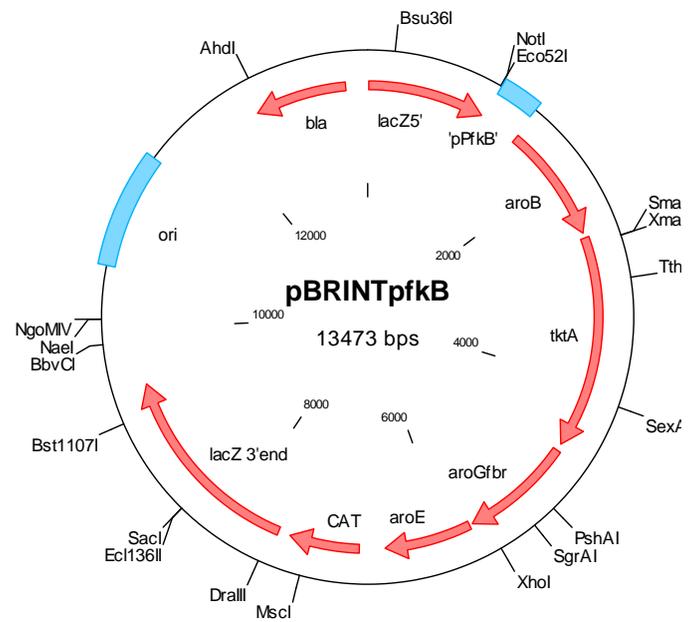
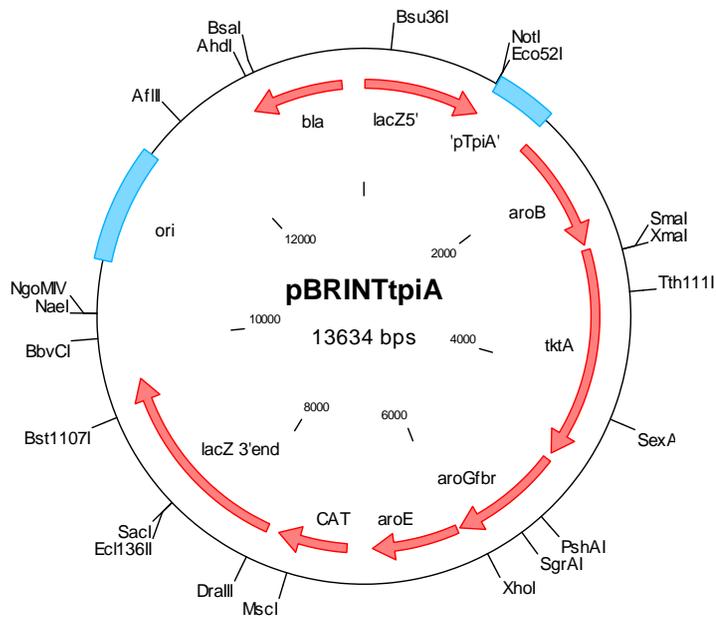


Figura 8. Plásmidos generados en este trabajo.

correspondiente (AAT→AAC), por lo que éste sigue codificando para una asparagina (aunque el nuevo codón tiene una frecuencia de uso 30% menor que el anterior). El segundo cambio de secuencia ocurrió en la posición 823. La sustitución es G→T en el DNA (G→A en el mRNA), el cual también cae en la tercera posición de su codón (TTG→TTA), aunque afortunadamente sigue codificando para una leucina (sin cambio en frecuencia de uso de codones). La secuenciación de todo el operón se realizó dos veces con los mismos resultados.

Por lo anterior, podemos concluir que las secuencias clonadas no deberían presentar impedimento para su traducción como proteínas funcionales, al no haber cambios de aminoácidos o modificaciones considerables en la frecuencia de uso de codones. No obstante, se decidió comprobar la funcionalidad de las proteínas mediante un ensayo simple de complementación de auxotrofia en medio mínimo de mutantes sencillas, al menos para el caso de *aroB* y *aroE*, utilizando cepas existentes en nuestro laboratorio. De esta manera, se crecieron en cajas de LB las cepas PB103 *aroB*- y JM101 *aroE*- (generadas en nuestro laboratorio), y paralelamente se transformaron ambas cepas con uno de los plásmidos que tiene el operón completo, y las células fueron recuperadas en cajas de LB. Posteriormente, se picaron 2 colonias al azar de cada una de las 4 combinaciones de cajas en nuevas cajas de medio mínimo M9 con glucosa (Fig. 9c). Como puede verse, el plásmido con los genes clonados *aroB* y *aroE* complementó la auxotrofia en ambas cepas, lo que demuestra que codifican para proteínas funcionales (Fig. 9c, colonias 5-8). Tal como era de esperarse, ninguna de las dos cepas no transformadas creció en M9 con glucosa como única fuente de carbono (Fig. 9a y 9b).

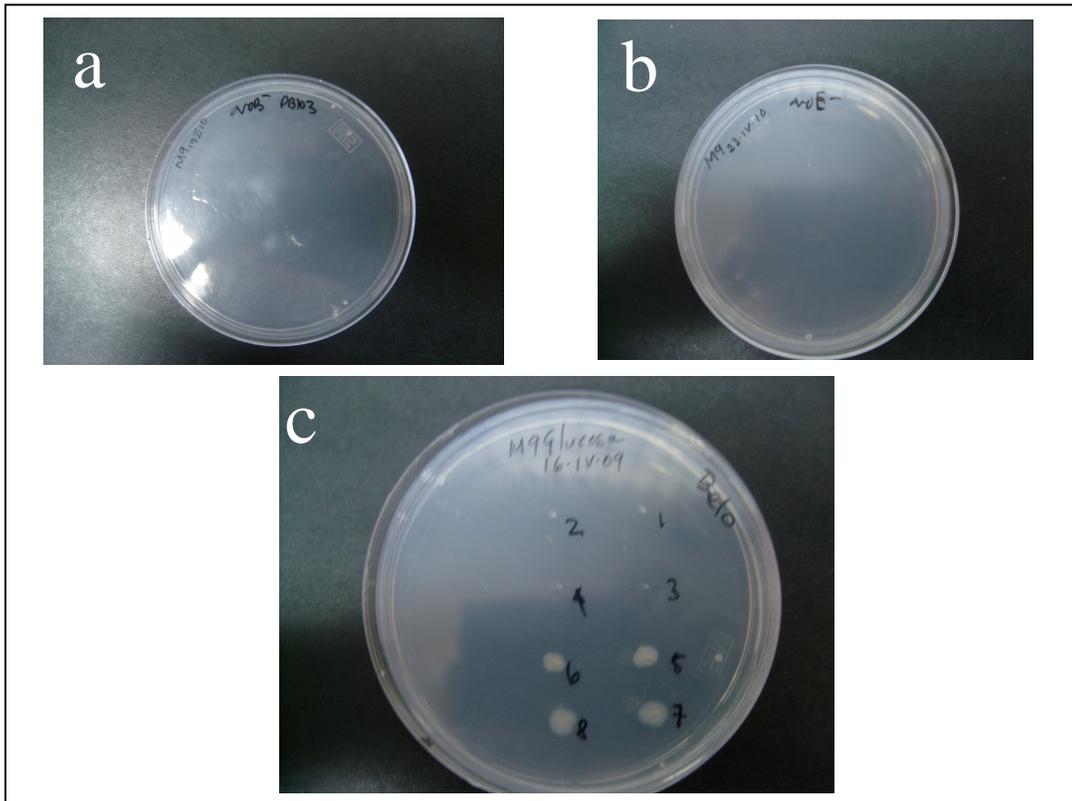


Figura 9. Ensayos de complementación de auxotrofia en cajas de medio mínimo M9 con 2g/L de glucosa. **a)** Cepa PB103 *aroB*-; **b)** Cepa JM101 *aroE*-; **c)** 1 y 2: Colonias tomadas de la cepa PB103 *aroB*- crecida en LB, 3 y 4: Colonias tomadas de la cepa JM101 *aroE*- crecida en LB, 5 y 6: Colonias tomadas de la cepa PB103 *aroB*- transformada con plásmido crecida en LB, 7 y 8: Colonias tomadas de la cepa JM101 *aroE* transformada con plásmido crecida en LB.

## CONCLUSIONES

Durante más de 10 años, han existido numerosos esfuerzos por muchos grupos de trabajo en el mundo para la obtención de cepas de *Escherichia coli* sobreproductoras de shikimato, y en algunos casos, las cepas reportadas presentan muy buenas capacidades de producción [1, 18, 24]. No obstante, tras analizar el rendimiento máximo teórico de conversión de glucosa a shikimato y las productividades que se reportan para algunas cepas, queda claro que queda todavía mucho por hacer para mejorar tanto a las cepas como a los procesos.

Tomando lo anterior en consideración, este trabajo surgió con la intención de generar un nuevo sistema de expresión que permita modular la transcripción de una manera novedosa, la cual plantea utilizar una combinación de factores para obtener una mejor cepa de producción que las ya reportadas, entre ellos: 1) uso de una cepa PTS<sup>-</sup> evolucionada, obtenida en nuestro laboratorio, que ha demostrado tener potencial para producir compuestos aromáticos; 2) uso de promotores naturales de *E. coli* que confieran fuerzas de expresión predecibles y graduales; 3) creación de un operón sintético bajo el control de los promotores anteriores y su inserción en el cromosoma para minimizar la carga metabólica y eliminar los problemas asociados con el mantenimiento de plásmidos, y 4) generación de la cepa doble mutante truncada en la vía de compuestos aromáticos justo después de la formación de shikimato, para favorecer su acumulación.

Por la naturaleza de la aproximación planteada en esta tesis, y siendo ésta una estrategia que involucra la creación *de novo* del sistema de producción, es necesario considerar que los resultados obtenidos aquí representan apenas la primera parte del proceso. No obstante, las conclusiones que podemos obtener de los experimentos involucrados en llevar a cabo los 4 puntos anteriores, fueron los esperados y dan luz verde para continuar con la caracterización de la cepa generada, pues podemos estar seguros que las construcciones se efectuaron de una manera satisfactoria.

Con base a lo anterior, se puede concluir que:

1. Los promotores amplificados y clonados **son funcionales y presentan control transcripcional diferencial** con una tendencia similar a la esperada, aunque no en la magnitud esperada.
2. Se crearon **tres plásmidos distintos** con los 4 genes de interés clonados en forma de operón, controlados por cada uno de los 3 promotores seleccionados. Los plásmidos generados permiten el intercambio de los promotores existentes por otros y la posibilidad de efectuar una integración cromosomal de los operones.
3. El operón completo **tiene una secuencia codificante correcta**, incluyendo los sitios de unión ribosomal artificiales y los sitios de restricción introducidos. Al menos dos de los genes clonados codifican para proteínas funcionales, demostrado en ensayos de complementación de auxotrofia en medio mínimo. Con base en la integridad de secuencia es de esperarse que los otros dos genes también codifiquen para proteínas funcionales.
4. La cepa PB12 *aroK<sup>-</sup>aroL<sup>-</sup>*, creada por recombinación homóloga de fragmentos de PCR, **fue estable** y está libre de casetes de resistencia a ampicilina y cloranfenicol, por lo que no hay impedimentos para la integración cromosomal.

5. Las modificaciones logradas son un paso adelante en la creación de una cepa estable productora de shikimato, apta para procesos de producción.

## PERSPECTIVAS

Como ya se mencionó, la creación de la cepa mutante y de los vectores de clonación presentados aquí representan apenas un primer paso en la consolidación de un proceso de sobreproducción de SHK. Es indiscutible que el siguiente punto del mismo, consistirá en la evaluación del impacto que tienen estos factores en la biosíntesis de SHK y otros metabolitos e intermediarios de la vía. Sin embargo, se presentan otras opciones que resultan atractivas para aumentar la producción y muchas de ellas son factibles a corto plazo por la facilidad con la que se pueden modificar las construcciones generadas en este trabajo. Algunos de los experimentos subsecuentes podrían involucrar:

1. Determinación de parámetros cinéticos y capacidades de producción (título, rendimiento, etc.) de la cepa generada transformada con los plásmidos creados, cuantificando los intermediarios de la vía de aromáticos y otros ácidos orgánicos por HPLC, antes y después de integrar al cromosoma los operones construidos.
2. Evaluación de otros medios y condiciones de cultivo que ya se han reportado que aumentan la producción de compuestos aromáticos (por ejemplo el aumento de la cantidad de sustrato inicial, el escalamiento a fermentadores de 1L y la coutilización de fuentes de carbono).
3. Intercambiar uno de los promotores clonados por un promotor sintético fuerte y evaluar el efecto que esto tiene sobre las capacidades de producción, una vez que sea insertado junto con el operón en el cromosoma.
4. Generar las cepas PB12 *aroK<sup>-</sup>aroL<sup>-</sup>pykF<sup>-</sup>* y PB12 *aroK<sup>-</sup>aroL<sup>-</sup>pykA<sup>-</sup>* (carentes de alguna de las isoenzimas piruvato cinasas) para aumentar aún más la disponibilidad intracelular de PEP y el flujo hacia la vía de aromáticos e integrarles en el cromosoma los operones creados.
5. Puesto que se ha reportado que la mutante cuádruple *aroK<sup>-</sup>aroL<sup>-</sup>pykF<sup>-</sup>pykA<sup>-</sup>* crece muy lentamente [24], resulta interesante utilizar las construcciones generadas en este trabajo en cepas *PTS<sup>-</sup>aroK<sup>-</sup>aroL<sup>-</sup>pykF<sup>-</sup>* en las cuales se haya eliminado uno de los dos promotores del gen *pykA* e insertado alguno de los promotores endógenos anteriores. Esto con el objetivo de disminuir la cantidad de transcrito del gen *pykA* de manera sutil y aumentar así el flujo de carbono hacia la vía de shikimato sin que tenga un efecto tan drástico en el crecimiento, como en la cepa *pykF<sup>-</sup>pykA<sup>-</sup>*.
6. Tomando en cuenta que se ha determinado que el paso limitante de la vía se da de manera natural por la enzima DHQ sintasa codificada por el gen *aroB* [31], puede evaluarse el efecto que tiene sobre las capacidades de producción el clonar una copia extra del gen *aroB* en un plásmido con un promotor inducible. Esto garantizaría una expresión óptima de la proteína en la fase de producción sin afectar tan severamente la fase de crecimiento exponencial.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Condiciones de cultivo.*

Las células fueron crecidas en medio Luria-Bertani (LB) y se utilizaron antibióticos a las siguientes concentraciones (por ml): carbenicilina (Cb) 50µg, cloranfenicol (Cm) 30µg, kanamicina (Km) 30µg, para seleccionar genes de resistencia presentes en plásmidos; y ampicilina (Cb) 100µg, cloranfenicol (Cm) 15µg, kanamicina (Km) 15µg, para genes integrados al cromosoma.

Los plásmidos fueron introducidos por electroporación y las colonias transformantes se seleccionaron después de 24h a 37°C en el caso de pKK232-8 y después de 60h a 30°C en el caso de pBRINT-Ts, recuperadas en medio SOB.

El medio mínimo M9 utilizado en las cajas de los ensayos de auxotrofia se preparó utilizando las siguientes cantidades, en 900ml de agua: 100ml de sales M9 (64g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 15g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5.0g NH<sub>4</sub>Cl, 2.5g NaCl y aforar a 1L con agua), 7.5g de agar, 2ml de MgSO<sub>4</sub> 1M, 0.2 ml de CaCl<sub>2</sub> 1M, 8 ml 50% Glucosa (2g/L) y 0.5 ml de tiamina 1%.

### *Diseño de oligonucleótidos, construcción de vectores y análisis de secuencias de DNA.*

Para el diseño *in silico* de todas las moléculas de DNA utilizadas (oligonucleótidos, vectores, fragmentos a clonar, regiones cromosomales, mapas de restricción, resultado de ligaciones, etc.) se empleó el conjunto de programas pertenecientes a la familia de software Sci Ed Central: Clone Manager Professional Suite 6, Align Plus 4 y Primer Designer 4. Para los alineamientos de secuencias y manipulación de fragmentos de DNA empleados en el diseño de oligonucleótidos se emplearon los programas de la familia DNASTar: EditSeq y PrimerSelect.

### *Reacciones de PCR.*

Las reacciones de PCR iniciales se llevaron a cabo en tubos de pared delgada en 50µl de volumen final utilizando: 1µl DNA templado, 5µl buffer Pfu 10x con MgSO<sub>4</sub>, 4µl de cada primer diluido a 5pmoles/µl, 1.25µl de dNTPs 10mM, 0.5µl de polimerasa Pfu a una concentración de 2.5u y el resto de agua.

Las condiciones de amplificación para el gen *aroG<sup>fb</sup>* fueron: 2min a 95°C, 30 ciclos (1min a 95°C, 1min a 58°C, 1min a 72°C) y 10min a 72°C.

Las condiciones de amplificación para el gen *tktA* fueron: 2min a 95°C, 30 ciclos (1min a 95°C, 1min a 68°C, 2min a 72°C) y 10min a 72°C.

Las condiciones de amplificación para los genes *aroB* y *aroE* fueron: 2min a 95°C, 30 ciclos (1min a 95°C, 1min a 70°C, 1min a 72°C) y 10min a 72°C.

Las condiciones de amplificación para los promotores fueron: 2min a 95°C, 30 ciclos (1min a 95°C, 1min a 65°C, 30s a 72°C) y 10min a 72°C.

Durante la verificación de inserciones y deleciones cromosomales se utilizaron las siguientes condiciones de reacción para 50 µl: 1µl DNA cromosomal templado, 5µl buffer Taq (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10x, 4µl de MgCl<sub>2</sub> 25mM, 4µl de cada primer diluido a 5pmoles/µl, 1.25µl de dNTPs 10mM, 0.5µl de polimerasa Taq a una concentración de 5u y el resto de agua.

Las condiciones de amplificación para los genes *aroK* y *aroL* fueron: 10min a 95°C, 30 ciclos (30s a 95°C, 1min a 55°C, 2min a 72°C) y 10min a 72°C.

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en los aparatos Perkin-Elmer GenAmp 7000 y Stratagene RoboCycler Gradient, de manera indistinta, y los productos fueron purificados y concentrados utilizando el kit High Pure PCR Product Purification Kit (Roche).

*Aislamiento, modificación y análisis de DNA.*

El DNA cromosomal se extrajo por lisis bacteriana utilizando SDS 10% y proteinasa K, y las macromoléculas fueron precipitadas por CTAB/NaCl. El DNA de alto peso molecular se recuperó del sobrenadante por precipitación con isopropanol y se resuspendió en buffer TE. La extracción de los plásmidos, tanto para monitorear transformantes como para la purificación y concentración de los mismos, se efectuó creciendo a la cepa portadora en medio LB con el antibiótico apropiado, y se extrajo mediante minipreps. Centrifugando los tubos de cultivo se obtuvo una pastilla bacteriana que fue degradada utilizando el método tradicional de lisis alcalina (solución NaOH 0.4N/SDS 2%), seguido de precipitación de macromoléculas por acetato de sodio y purificación de plásmido por isopropanol.

El paso extra de purificación de plásmidos para uso en clonaciones, se llevó a cabo con fenol/cloroformo: 1v/1v y la precipitación con acetato de amonio 5M y EtOH 95%.

Las ligaciones se llevaron a cabo utilizando el kit Rapid DNA Ligation Kit (Fermentas), que contiene un buffer con DMSO y una ligasa T4 concentrada. Las enzimas de restricción utilizadas, así como sus respectivos buffers son de Fermentas y de New England Biolabs. Los geles de agarosa analíticos se prepararon al 1% y los preparativos al 0.8%. Cuando la finalidad fue verificar integridad del producto se utilizó agarosa de Sigma, mientras que para los geles preparativos se usó agarosa de Bio-Rad de bajo punto de fusión.

*Ensayo de actividad específica de la enzima CAT.*

Para preparar los extractos celulares, las muestras se centrifugaron a 12,000g y se lavaron con buffer TDTT (50mM Tris-HCl, pH 7.8, y 30μM de L-ditiotreitol. Después de la segunda centrifugación se resuspendió la pastilla bacteriana en 500μl de buffer TDTT. Usando un sonicador al nivel máximo, las muestras fueron sonicadas en hielo y centrifugadas por 15min para eliminar detritos celulares y el sobrenadante se transfirió a otro tubo. Posteriormente, 10μl de cada extracto fueron añadidos por duplicado a una placa de ELISA de 96 pozos, precedido de 200μl de la mezcla de reacción conteniendo: 1mM DTNB (ácido ditiobis-nitrobenzoico), 0.1M Tris-HCl/acetil-CoA y 0.1M de cloranfenicol. La velocidad de cada reacción fue obtenida monitoreando el cambio de absorbencia a 405nm cada 5s durante una reacción de 5min con un lector de microplacas MAXline. La concentración de proteína de los extractos celulares fue obtenida usando un kit de ensayo de proteínas (Pierce). Estos valores fueron usados para calcular la actividad específica de CAT por medio de la relación existente entre la velocidad de reacción para cada punto entre la concentración total de proteína en la muestra empleada, y el resultado fue expresado en mg/μl.

*Deleciones en el cromosoma de la cepa PB12.*

La disrupción génica de *aroK* y *aroL* fue llevada a cabo empleando el método reportado por Datsenko y Wanner que hace uso de la recombinación homóloga de fragmentos de PCR [25]. La cepa PB12 se transformó con los plásmidos termosensibles pKD46 y pCP20 y se seleccionaron transformantes a 30°C. La recombinasa Red fue expresada a 30°C por 3 horas induciendo el promotor que controla su gen con arabinosa 1M en cepas a las que se les transformaron los productos de PCR obtenidos usando como templado al plásmido

pKD3. Se seleccionaron transformantes que han integrado el casete de resistencia a cloranfenicol a 44°C y se observó pérdida del plásmido. El plásmido pCP20 contiene el gen que codifica para la recombinasa FLP, el cual escinde el gen *cat* flanqueado por sus sitios de reconocimiento (FRT) y nuevamente se efectuó el protocolo de pérdida del plásmido a 44°C.

Una de las mutaciones, *aroK::cat*, fue transducida utilizando el fago P1. El primer paso fue infectar a la cepa donadora utilizando un fago P1vir. 1.5ml de cultivo celular fue centrifugado y resuspendido en 0.75ml de una solución MgSO<sub>4</sub> 10mM + CaCl<sub>2</sub> 5mM e infectado con 100µl de fago por 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se platearon en cajas de LB sin antibiótico a las que se les adicionaron 4ml de agar suave, 40µl de MgSO<sub>4</sub> y 20 µl de CaCl<sub>2</sub>, y se dejaron crecer a 37°C por 24h. Posteriormente se extrajo fago raspando el agar suave y se rompieron las células con unas gotas de cloroformo. Después de agitar fuertemente el medio, se centrifugó la solución a 3000rpm por 15min y se filtró (con filtros de 0.45µm) para obtener fago puro. Utilizando 100µl de fago estéril se infectó a 1.5ml de cultivo de la cepa receptora (PB12 *aroL*) preparada como se detalló para la receptora y se dejó reposar 30min a temperatura ambiente. Después se agregaron 100µl de citrato de sodio para detener el ciclo lítico y se plateó el contenido de los tubos en cajas con cloranfenicol a 15µg por mililitro. Se obtuvieron colonias después de incubar las cajas a 37°C por 24h y se verificaron por la presencia de la disrupción cromosomal (y la presencia del casete de resistencia) por PCR.

#### *Secuenciaciones de DNA.*

Las secuenciaciones automatizadas de DNA se llevaron a cabo en la unidad de síntesis y secuenciación del propio Instituto de Biotecnología utilizando un equipo Perkin Elmer/Applied Biosystems Modelo 3730 con capacidad para procesar 96 muestras en 4hrs, utilizando el método Taq FS Dye Terminator Cycle Sequencing Fluorescence-Based Sequencing.

## REFERENCIAS

- 1.- Chandran S, Yi J, Draths K. M., Daeniken R, Weber W, Frost J. 2003. *Phosphoenolpyruvate availability and the biosynthesis of shikimic acid*. Biotechnol Prog 19, 808-814.
- 2.- Kramer M, Bongaerts J, Bovenberg R, Kremer S, Muller U, Orf S, Wubbolts M, Raeven L. 2003. *Metabolic engineering for microbial production of shikimic acid*. Metabolic Engineering 5, 277-283.
- 3.- Farina V, Brown J. 2006. *Tamiflu: The supply problem*. Angew Chem Int 45, 7330-7334.
- 4.- Baez J, Bolivar F, Gosset G. 2001. *Determination of 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate productivity and yield from glucose in Escherichia coli devoid of the glucose phosphotransferase transport system*. Biotechnol Bioeng 73, 530-535.
- 5.- Yi J, Li K, Draths K, Frost J. 2002. *Modulation of phosphoenolpyruvate synthase expression increases shikimate pathway product yields in E. Coli*. Biotechnol Prog 18, 1141-1148.
- 6.- Flores N, Xiao J, Berry A, Bolivar F, Valle F. 1996. *Pathway engineering for the production of aromatic compounds in Escherichia coli*. Nature Biotechnol 14, 620-623.

- 7.- Draths K, Pompliano D, Conley D, Frost J, Berry A, Disbrow G, Staversky R, Lievens J. 1992. *Biocatalytic synthesis of aromatic from D-glucose: the role of transketolase*. J Am Chem Soc 114, 3956-3962.
- 8.- Lu J, Liao J. 1997. *Metabolic engineering and control analysis for production of aromatics: role of transaldolase*. Biotechnol Bioeng 53, 132-138.
- 9.- Patnaik R, Liao J. 1994. *Engineering of Escherichia coli central metabolism for aromatic production with near theoretical yield*. Appl Environ Microbiol 60, 3903-3908.
- 10.- Flores N, Flores S, Escalante A, de Anda R, Leal L, Malpica R, Georgellis D, Gosset G, Bolívar F. 2005. *Adaptation for fast growth on glucose by differential expression of central carbon metabolism and gal regulon genes in an Escherichia coli strain lacking the phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system*. Metabolic engineering 7, 70-87.
- 11.- Miller J, Backman K, O'Connor M, Hatch R. 1987. *Production of phenylalanine and organic acids by phosphoenolpyruvate carboxylase-deficient mutants of Escherichia coli*. JIMB 2, 143-149.
- 12.- Gosset G, Xiao J, Berry A. 1996. *A direct comparison of approaches for increasing carbon flow to aromatic biosynthesis in Escherichia coli*. JIMB 17, 47-52.
- 13.- Baez J, Flores N, Juarez K, Castillo-España P, Bolivar F, Gosset G. 2007. *Metabolic transcription analysis of engineered Escherichia coli strains that overproduce L-phenylalanine*. Microbial Cell Factories 6:30.
- 14.- Jones K, Kim S, Keasling J. 2000. *Low-copy plasmids can perform as well as or better than high-copy plasmids for metabolic engineering of bacteria*. Metabolic Engineering 2, 328-338.
- 15.- Alper H, Stephanopoulos G. 2005. *Tuning genetic control through promoter engineering*. PNAS 102, 12678-12683.
- 16.- Baez J et al. Publicación en proceso.
- 17.- Le Borgne, S. 1998. *pBRINT-Ts, a family with a temperature sensitive replicon, designed for chromosomal integration into the lacZ gene of Escherichia coli*. Gene 223, 213-219.
- 18.- Frost J, Frost K, Knop D. 2003. *Biocatalytic synthesis of shikimic acid*. US Patent 6,613,552.
- 19.- <http://www.ecocyc.org> Encyclopedia of Escherichia coli K-12 Genes and Metabolism.
- 20.- Mijakovic I, Jensen P. 2005. *Tunable promoters in systems biology*. Curr Op Biotechnol 16, 329-335.
- 21.- Jensen P, Hammer K. 1998. *The sequence of spacers between the consensus sequences modulates the strength of prokaryotic promoters*. App Environ Microbiol 64, 82-87.
- 22.- <http://regulondb.ccg.unam.mx> Escherichia coli K-12 transcriptional network.
- 23.- Puente JL et al. 1996. *The bundle-forming pili of enteropathogenic Escherichia coli: transcriptional regulation by environmental signals*. Mol Microbiol 20, 87-100.
- 24.- Escalante A, Calderon R, Valdivia A, De Anda R, Hernandez G, Ramirez O, Gosset G, Bolivar F. 2010. *Metabolic engineering for the production of shikimic acid in an evolved Escherichia coli strain lacking the phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system*. Microbial Cell Factories 9:21.

- 25.- Datsenko K, Wanner B. 2000. *One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products*. PNAS 97, 6640-6645.
- 26.- Nolan T, Hands R, Bustin S. 2006. *Quantification of mRNA using real-time RT-PCR*. Nature protocols 1, 1559-1582.
- 27.- Balderas VE, Sabido-Ramos A, Silva P, Cabrera-Valladares N, Hernandez-Chavez G, Baez-Viveros JL, Martinez A, Bolivar F, Gosset G. 2009. *Metabolic engineering for improving anthranilate synthesis from glucose in Escherichia coli*. Microbial Cell Factories 8:19.
- 28.- Lennox E.S. 1955. *Transduction of linked genetic characters of the host by bacteriophage P1*. Virology 1, 190-206.
- 29.- Noh K, Kim Y, Park J, Kim D, Lee J, Ok S. 2008. *Method for L-threonine production*. United States Patent No. 7,368,266.
- 30.- Brosius J. 1984. *Plasmid vectors for the selection of promoters*. Gene 27, 151-160.
- 31.- Dell K.A., Frost J.W. 1993. *Identification and Removal of Impediments to Biocatalytic Synthesis of Aromatics from D-Glucose: Rate Limiting Enzymes in the Common Pathway of Aromatic Amino Acid Biosynthesis*. J. Am. Chem. Soc. 115, 11581-11589.