



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis

Generación y caracterización de cepas de *Escherichia coli* modificadas en la capacidad del transporte de glucosa

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRÍA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

Laura Grecia Fuentes Ponce

TUTOR PRINCIPAL:

Dr. Guillermo Gosset Lagarda, Instituto de Biotecnología

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

Dr. O. Tonatiuh Ramírez, Instituto de Biotecnología

Dra. E. Guadalupe Espin, Instituto de Biotecnología

RESUMEN

En general, las bacterias utilizan glucosa como fuente principal de carbono y energía. En *E. coli*, la glucosa se transporta al citoplasma y se fosforila, por la proteína IIBC^{Glc} (codificada por el gen *ptsG*) del sistema de fosfotransferasa (PTS). Mutantes del tipo $\Delta ptsG$, son capaces de inducir transportadores alternativos a IIBC^{Glc}, los cuales, en su mayoría, no se han estudiado como transportadores de glucosa. Identificar proteínas con diferentes capacidades de transporte, permitirá generar mutantes con menores consumos específicos de glucosa (q_s) con respecto a la cepa silvestre. Se ha observado que la disminución de la q_s tiene un efecto positivo en la generación de compuestos heterólogos de interés industrial, y en la disminución de la formación de acetato, un subproducto no deseable en los procesos biotecnológicos. En este trabajo, se aborda el estudio de transportadores alternativos de glucosa y el efecto en la producción heteróloga de un plásmido de uso terapéutico, cuando se ha inactivado al gen *ptsG* y algunos otros genes relacionados con el transporte de glucosa. Se caracterizaron las dobles y triples inactivaciones de genes del PTS como *manX*, *malX*, *nagE*, *bglF* y *fruA* y, de genes no-PTS como *galP* y *mglABC*, mediante la determinación de la velocidad de crecimiento (μ), la q_s , la velocidad de producción de acetato (q_{ac}) y la producción de plásmido. A partir de los resultados en la cepa W3110 se encontró, que en la mutante $\Delta ptsG$ la proteína que tiene mayor impacto sobre el crecimiento es MalX, mientras que en la mutante $\Delta ptsG$, $\Delta manX$ las proteínas NagE y GalP son más importantes. La q_s a partir de la cual ya no se produjo acetato fue, 0.83 ± 0.07 g/g h. También se encontró que existen otra(s) proteínas no identificadas capaces de transportar glucosa además de GalP y MglABC en la mutante $\Delta ptsHIcrr$, $\Delta galP$, $\Delta mglABC$. Adicionalmente, se halló una correlación de tipo lineal entre la μ , la q_s y la q_{ac} de todas las mutantes generadas. Finalmente, se eligieron para la síntesis de un plásmido terapéutico (modelo de producción heteróloga), una serie de mutantes con diferentes q_s , de las cuales se obtuvo que la cepa $\Delta ptsG$, $\Delta manX$, $\Delta mglABC$ tuvo 3.5 veces más rendimiento de plásmido (2.56 ± 0.37 mg/g) respecto a la silvestre. La colección de mutantes generadas servirá como base para futuras modificaciones genéticas que mejoren la producción de plásmidos terapéuticos y/o productos heterólogos.

Índice

RESUMEN

Introducción.	1
Antecedentes.	3
1.1. La glucosa y <i>E. coli</i> en la industria.	3
1.1.1. Metabolismo de la glucosa.	4
1.2. El acetato, un problema en la producción biotecnológica.	6
1.3. Información general del PTS y de sus componentes.	11
1.3.1. Transporte de glucosa por el PTS.	15
1.4. Transportadores de glucosa alternativos a la proteína IIBC ^{Glc} en <i>E. coli</i>	17
1.5. Represión catabólica de carbono por los componentes del PTS.	19
1.6. Uso práctico de mutantes en el PTS.	22
1.7. Uso de plásmidos como modelo de producción.	23
1.7.1. El plásmido y la carga metabólica.	25
1.7.2. Replicación del plásmido.	26
1.7.3. Clasificación plasmídica.	27
1.7.4. Control de la replicación del plásmido de tipo pColE1.	29
1.7.5. Información sobre el plásmido pHN.	31
1.8. Estrategias empleadas para la producción de DNA plasmídico.	32
1.8.1. Efecto de la velocidad de crecimiento sobre la producción de DNA plasmídico.	35
Justificación.	37
Hipótesis.	37
Objetivo general.	38
Objetivos específicos.	38
Material y métodos.	39
2.1. Cepas bacterianas.	39
2.2. Plásmido pHN, modelo de vacuna de DNA.	41
2.3. Plásmidos empleados para la mutagénesis sitio dirigida en <i>E. coli</i>	43
2.4. Técnicas moleculares.	44

2.4.1. Extracción de DNA plasmídico por miniprep.	44
2.4.2. Purificación del producto de interés a pequeña escala.	45
2.4.3. Extracción de DNA cromosomal.	46
2.4.4. Transformación por electroporación.	47
2.4.5. Electroforesis de DNA en gel de agarosa.	48
2.4.6. Extracción de bandas de DNA en los geles de agarosa.	49
2.4.7. Transducción con el bacteriófago P1vir.	49
2.4.8. Comprobación de las inactivaciones.	51
2.4.9. Técnica de mutagénesis sitio dirigida.	53
2.4.10. Estrategia, para la eliminación del cassette de resistencia en las mutantes.	58
2.5. Sistemas de cultivo de <i>E. coli</i>	59
2.5.1. Medios de cultivo de uso general.	59
2.5.2. Medio de cultivo usado para la caracterización del crecimiento.	61
2.5.3. Medio de cultivo usado para la obtención del producto de interés.	62
2.5.4. Antibióticos.	63
2.5.5. Cultivos en matraz agitado.	64
2.6. Métodos analíticos para el seguimiento de los cultivos.	65
2.6.1. Determinación de la biomasa.	65
2.6.2. Cuantificación de la glucosa y el acetato por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	65
2.6.3. Cuantificación de DNA por nanodrop.	67
2.7. Cálculos cinéticos y estequiométricos.	67
2.7.1. Cálculo de los rendimientos.	68
2.7.2. Cálculo de las velocidades específicas de conversión.	68
2.7.3. Uso de ANOVA.	89
Resultados y discusión.	71
3.1. Estudio de la respuesta cinética y estequiométrica resultante de las inactivaciones en proteínas PTS en cepas de <i>E. coli</i> derivadas K-12.	71
3.1.1 Comparación de las velocidades de crecimiento en tres cepas de <i>E. coli</i> cuando se han inactivado los genes de transporte <i>ptsG</i> y <i>manX</i>	71

3.1.2. Comparación de los parámetros cinéticos y estequiométricos de tres cepas de <i>E. coli</i> cuando se han inactivado los genes <i>ptsG</i> y <i>manX</i>	75
3.1.3. Deleción de algunas proteínas pertenecientes a diferentes complejos del PTS en la cepa W3110, $\Delta ptsG$, $\Delta manX$	78
3.1.4. Deleción de componentes del PTS en la cepa W3110 $\Delta ptsG$	86
3.1.5. Efectos cinéticos y estequiométricos de las inactivaciones en proteínas de tipo ABC y simporte capaces de transportar glucosa en un fondo PTS ⁺	89
3.1.6. Efecto de la inactivación del gen <i>galP</i> y el operón <i>mgIABC</i> en un fondo PTS ⁻	92
3.1.7. Efectos macroscópicos de la inactivación de diferentes tipos de transporte en cepas de <i>E. coli</i> en medio mineral M9 con glucosa. . . .	94
3.2. Estudio de mutantes para la producción de una vacuna de interés industrial.	98
3.2.1. Cepas de interés para la producción del plásmido pHN.	98
Conclusiones.	110
Perspectivas.	113
Referencias.	116

Índice de tablas

Tabla 1.	Clasificación por familias de las proteínas transmembranales del PTS.	13
Tabla 2.	Material biológico.	39
Tabla 3.	Características relevantes del plásmido pHN.	42
Tabla 4.	Características de los plásmidos usados para la mutagénesis sitio dirigida.	43
Tabla 5.	Secuencias de los oligonucleótidos para la comprobación de las inserciones cromosomales.	52
Tabla 6.	Secuencias de los oligonucleótidos empleados para las inactivaciones cromosomales.	55
Tabla 7.	Secuencias de los oligonucleótidos para la comprobación de las inserciones cromosomales.	56
Tabla 8.	Medio LB.	59
Tabla 9.	Medio SOC.	60
Tabla 10.	Agar-MacConkey.	61
Tabla 11.	Medio mineral M9 10X.	61
Tabla 12.	Medio mineral PD 10X.	62
Tabla 13.	Elementos traza 250X.	63
Tabla 14.	Antibióticos empleados.	64
Tabla 15.	Parámetros cinéticos y estequiométricos de las mutantes $\Delta ptsG$ y $\Delta ptsG, \Delta manX$	76
Tabla 16.	Antecedentes sobre el posible transporte de glucosa por proteínas del PTS.	82
Tabla 17.	Parámetros cinéticos y estequiométricos de las mutantes en genes relacionados con el transporte de glucosa en la cepa W3110 $\Delta ptsG, \Delta manX$	85
Tabla 18.	Parámetros cinéticos y estequiométricos de las mutantes donde se inactivaron componentes del PTS en la mutante W3110 $\Delta ptsG$	88
Tabla 19.	Parámetros cinéticos y estequiométricos de las mutantes en los genes relacionados con el transporte de glucosa, dependientes de la	

	enzima glucocinasa.	90
Tabla 20.	Parámetros cinéticos y estequiométricos de las mutantes en genes que codifican para proteínas dependientes de la enzima glucocinasa..	93
Tabla 21.	Parámetros cinéticos y estequiométricos de las mutantes en medio mineral M9 sin plásmido.	99
Tabla 22.	Parámetros cinéticos y estequiométricos de cepas con mutaciones en genes relacionados al transporte de glucosa en medio mineral PD con glucosa.	107

Índice de figuras

Figura 1.	Metabolismo central de la glucosa en <i>E. coli</i>	5
Figura 2.	Representación de la acción desacoplante y la disipación de la fuerza protón-motriz en presencia de ácidos orgánicos de cadena corta, tal como el acetato.	7
Figura 3.	Transporte de glucosa por la proteína IIBC ^{Glc} (<i>ptsG</i>) del PTS.	14
Figura 4.	Proteínas transmembranales del PTS que han mostrado evidencia para el transporte de glucosa. <i>nagE</i> : N-acetil glucosamina, <i>bglF</i> : β-glucosidos, <i>manXYZ</i> : manosa, <i>malX</i> : maltosa, <i>fruAB</i> : fructosa.	16
Figura 5.	Representación del transporte de glucosa por sistemas alternos al PTS, en este caso específicos para el transporte de galactosa.	18
Figura 6.	Mecanismo de la represión catabólica de carbono en <i>E. coli</i>	20
Figura 7.	Mecanismo de regulación del inicio de la replicación del plásmido ColE1.	28
Figura 8.	Mapa simplificado del plásmido pHN.	44
Figura 9.	Esquema de la transducción general por el fago P1 _{vir}	49
Figura 10.	Dinámica de la comprobación de las inactivaciones cromosomales.	53
Figura 11.	Región amplificada por PCR para Datsenko.	56
Figura 12.	a) Curva estándar para la cuantificación de acetato, canal 210 b) Curva estándar para la cuantificación de glucosa, canal 410.	67
Figura 13.	Cálculo de los rendimientos.	68
Figura 14.	Comparación de las velocidades de crecimiento de las cepas; W3110, BW25113 y MG1655 cuando se ha inactivado el gen <i>ptsG</i> y los genes <i>ptsG</i> , <i>manX</i>	73
Figura 15.	Parámetros cinéticos y estequiométricos de las cepas y mutantes en MG1655, BW25113 y W3110.	77
Figura 16.	Relación existente entre la velocidad de crecimiento y el consumo de sustrato de las cepas evaluadas en los tres fondos genéticos BW25113, MG1655 y W3110.	78
Figura 17.	Velocidades de crecimiento de las mutantes relacionadas con el	

	transporte de glucosa.	80
Figura 18.	a) Comparación de la velocidad de crecimiento y b) Comparación de la velocidad específica de consumo de sustrato en el fondo W3110 $\Delta ptsG$, $\Delta manX$	85
Figura 19.	a) Comparación de la velocidad de crecimiento y b) Comparación de la velocidad específica de consumo de sustrato de diferentes mutantes en el fondo W3110 $\Delta ptsG$	88
Figura 20.	a) Efecto sobre el crecimiento de las inactivaciones en MglABC y GalP en un fondo PTS ⁺ (W3110 $\Delta ptsG$). b) Efecto sobre el crecimiento de las inactivaciones en MglABC y GalP en un fondo PTS ⁺ (W3110 $\Delta ptsG$, $\Delta manX$). c) Efecto sobre el crecimiento de las inactivaciones en MglABC y GalP en un fondo PTS ⁻ (W3110 $\Delta ptsHIcrr$).	91
Figura 21.	Velocidad de crecimiento de las mutantes en el fondo genético W3110 $\Delta ptsHIcrr$	93
Figura 22.	a) Relación entre la velocidad de crecimiento y la velocidad específica de consumo de glucosa. b) Relación entre el rendimiento y la velocidad específica de consumo de glucosa. c) Relación entre la velocidad de crecimiento y la velocidad específica de producción de acetato. d) Relación entre la velocidad específica de consumo de sustrato y la velocidad de producción de acetato.	95
Figura 23.	Transportadores de sustrato que mostraron contribución al consumo de glucosa en el fondo genético W3110.	97
Figura 24.	a) Grafica de comparación entre las velocidades específicas de consumo de glucosa con y sin la producción de plásmido b) Grafica de comparación entre las velocidades de crecimiento con y sin la producción de plásmido.	100
Figura 25.	Parámetros cinéticos y estequiométricos de las mutantes productoras del plásmido pHN.	104
Figura 26.	a) Grafica de comparación entre la velocidad de crecimiento y la velocidad específica de consumo de sustrato. b) Grafica de comparación entre la velocidad específica de consumo de sustrato y	

	el rendimiento de biomasa sobre sustrato.	105
Figura 27.	Relación entre la velocidad de crecimiento y el rendimiento de plásmido sobre biomasa.	105

Lista de abreviaturas

Abreviación	Significado
α -KG	α -cetoglutarato
AcK	acetato cinasa
Acs	citrato sintasa
Acetil-CoA	acetil coenzima A
ADP	adenosín difosfato
AMP	adenosín monofosfato
ANOVA	análisis de varianza
ATP	adenosín trifosfato
cAMP	adenosín monofosfato cíclico
CCR	represión catabólica de carbono
CIT	citrato
CRP	activador transcripcional involucrado en la represión catabólica
DNA	ácido desoxirribonucleico
E4P	eritrosa-4-fosfato
EI	enzima I
F6P	fructosa-6-fosfato
F1,6P	fructosa 1, 6-bifosfato
FUM	fumarato
G3P	gliceraldehido-3-fosfato
G6P	glucosa-6-fosfato
Glc	glucosa
Glk	glucocinasa
HN	hemaglutinina-neuraminidasa
HPr	proteína de histidina
K_M	constante de afinidad
Kpb	kilopares de bases
MAL	malato

NAD ⁺	nicotinamida adenín dinucleótido, en su forma oxidada
NADH	nicotinamida adenín dinucleótido en su forma reducida
NADPH	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en su forma reducida
nt	nucleótidos
OAA	oxalacetato
P	producto
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PEP	fosfoenolpiruvato
pHN	plásmido que lleva el gen de la hemaglutinina neuraminidasa
PIR	piruvato
PPP	vía de las pentosas fosfato
Pta	fosfato acetil transferasa
PTS	sistema de fosfotransferasa
PykA	piruvato cinasa A
q _{ac}	velocidad específica de producción de acetato
q _p	productividad específica
q _s	velocidad específica de consumo de glucosa
R5P	ribosa-5-fosfato
RNA	ácido ribonucleico
SUC	succinato
SUC-coA	succinil coenzima A
TCA	ciclo de los ácidos tricarboxílicos
V _{max}	velocidad máxima
X _{máx}	biomasa máxima
Y _{P/X}	rendimiento de plásmido sobre biomasa
Y _{P/S}	rendimiento de plásmido sobre sustrato
Y _{X/S}	rendimiento de biomasa sobre sustrato
μ	velocidad específica de crecimiento

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la dirección del Dr. Guillermo Gosset Lagarda.

Laura Grecia Fuentes Ponce fue financiada económicamente por CONACyT a través de su programa de becas de posgrado 2011-2012 Primer periodo.

A mis padres

*Elige un trabajo que te guste y
no tendrás que trabajar ni un
solo día de tu vida*

Confucio

Agradecimientos

Al Dr. Guillermo Gosset por su asesoría, paciencia y apoyo durante todo el desarrollo del proyecto.

Al Dr. Alvaro Lara de la UAM-Cuajimalpa por su apoyo incondicional.

A los miembros de mi Comité tutor, por sus aportaciones al proyecto y su tiempo.

- Dra. Guadalupe Espin
- Dr. Tonatiuh Ramírez

A los miembros del jurado por su tiempo, dedicación y sugerencias:

- Dr. Enrique Merino Pérez
- Dra. Clarita Olvera Carranza
- Dr. Miguel Ángel Cevallos Gaos
- Dra. Cinthia Ernestina Nuñez López
- Dr. Ricardo Oropeza Navarro

A los técnicos y académicos del Laboratorio, Q.I. Luz María Martínez, Mtra. Georgina Hernández-Chávez, Dra. Noemí flores, Mtro. Ramón de Anda y Dr. Adelfo Escalante por su asesoría técnica y logística.

A la Sra. Mercedes Enzaldo y a la Sra. Aurelia Gonzales por su apoyo técnico.

A todos los miembros del grupo Bolívar-Gosset-Martínez por sus observaciones constructivas durante el desarrollo del presente trabajo y además, porque algunos de ustedes, me transmitieron sus conocimientos y manías, en especial; Cesar Aguilar, Andrea Sabido, Sara Centeno, Karla Martínez, Adriana Garibay.

A algunos miembros del grupo del Dr. Tonatiuh, por su apoyo incondicional en los reactivos de Laboratorio y por su calidez de trato, Karim Jaem y Gheorghe Borja.

Con la mano en el corazón, me gustaría dirigir unas palabras a las personas que han marcado el rumbo de mi vida, o simplemente, las cuales me han acompañado en este camino. Mama, papa, ojala y esta tesis, muestre que su esfuerzo de cada día, desde que nací valió la pena, ojala y sepan que los llevo siempre y en cada momento de mi vida. Tienen que saber, que en los momentos más felices y más difíciles, siempre han estado presentes. Por tu frase célebre mama, brindo, "porque nadie te va a querer más que tu padre y tu madre". No tengo más que decir, solo espero, que algún día pueda recompensarlos por su apoyo. En este camino, aprovecho para agradecerle a la Sra. Aurelia Ocampo, porque cuando se entero de mi situación, no hizo más que llorar a mi lado y darme todo, cuanto pudo. Gracias Jorge Ríos por haberme dicho aquellas palabras del corazón que no olvidaré, me di cuenta, que aunque tú no tuvieras que dar, me darías lo más importante, me darías tu corazón. Gracias miembros del Topper, por hacerme reír y compartir momentos muy agradables, fiestas y festejos de los cuales fui participe, gracias por permitirme conocerlos, gracias a toda la generación enero 2011-2012, nuestra generación para mí, siempre será la mejor. Alterno a esto, compartí experiencias gratas con mis vecinos (Hansel, Cesar, Chock, Rodrigo), donde me vieron gritar, llorar y platicar cada fin de semana. Qué decir de ti, estimada Luz María, que conté con tu apoyo desde el primer momento. Siempre he sido como tu protegida, te agradezco, como les agradezco a todos los miembros del Laboratorio Bolívar-Gosset-Martínez por haber soportado a esta niña tan escandalosa y desesperante como la que soy. Gracias amiguito Miguel Atl, por soportarme. Porque aunque todo el tiempo te irrité, siempre estuviste con cara sonriente. Gracias Ramón y Georgina, por su apoyo en el material y en el asesoramiento técnico del equipo del laboratorio. Gracias Dr. Adelfo por siempre sonreírme, le agradezco porque siempre sentí que a su lado yo era importante. A usted, Dr. Alvaro, le agradezco por no solo ser mi asesor, si no mi amigo académico. Hannali, siempre tan sonriente que olvidaba que estabas triste y siempre me recuerdas, que una buena sonrisa hace la diferencia. Lindas hermanitas (Francia y Kenia), gracias por correrme de la casa, gracias a ello, llegue hasta Cuernavaca, porque ustedes siempre han sido parte de todo. Por otra parte, el buen protagonista hizo su acto al final del final de este final, mi querido Víctor Manuel que me permite a diario conocer que se puede hacer todo en la vida, pero especialmente porque a diario merregala una sonrisa, un baile y una palabra de aliento. Finalmente, quiero que sepan que si tan solo uno de ustedes (y los que no mencione) hubiera faltado en mi vida, yo no sería esta que sale con la frente en alto, yo no sería aquella persona que lucho cada día de su maestría por ser alguien digno del Instituto de Biotecnología, aunque, han de saber, que aquí, en este lugar, me di cuenta que si yo fuera quien evalúa el desempeño, pediría que Grecia Fuentes volviera a recorrer todo el camino y esta vez, que lo hiciera mejor. Puedo asegurar que es la cosa más difícil que hasta ahora he tenido que sobrevivir, la maestría en Ciencias de la UNAM. No tengo más que agradecer al Dr. Guillermo por aceptarme en su grupo de investigación, sin conocerme, acepto que trabajara en este proyecto, espero que después de esto, no tenga que hacer un proceso de selección riguroso. En conclusión, gracias a todos los presentes y los ausentes, por hacer de mi, una persona que no sabe rendirse.

Introducción

Una parte importante del éxito en la generación a gran escala de numerosos productos biotecnológicos, se basa en el conocimiento de las capacidades celulares y los procesos metabólicos que conlleven a un mayor nivel de producción.

Una de las capacidades de *E. coli*, es la adaptación a bajas concentraciones de glucosa. Fenómeno que ha resultado de interés en los procesos biotecnológicos, ya que mantener una baja concentración de glucosa en el medio de cultivo, disminuye la síntesis de acetato, un subproducto que afecta significativamente la obtención de compuestos heterólogos y el crecimiento celular. Este proceso, en donde se controla rigurosamente la cantidad de fuente de carbono en el medio de cultivo, es netamente ingenieril, sin embargo, se ha estudiado que mediante modificaciones genéticas en los genes relacionados con el transporte de sustrato, en *E. coli* se puede disminuir la velocidad de consumo de glucosa.

En *E. coli*, la glucosa se transporta al citoplasma y se fosforila, por la permeasa IIBC^{Glc} (codificada por el gen *ptsG*) del sistema de fosfotransferasa (PTS). Se ha reportado que cultivos de *E. coli* a bajas concentraciones de glucosa (<1 μM), son capaces de inducir transportadores alternativos del PTS (MalX, NagE, etc.) o del tipo no-PTS (GalP y MglABC) (Ferenci, 2001; Lemuth *et al.*, 2008). En particular, no se han estudiado a la mayoría de estas proteínas transmembranales como transportadoras de glucosa que sustituyan a IIBC^{Glc}, ni su efecto en la velocidad específica de consumo de glucosa (q_s), por lo que su estudio es importante. Hasta la fecha lo que se ha reportado, es que la proteína ManX (codificada por el operón *manXYZ*), transportadora de manosa del PTS, y la proteína GalP (no-PTS), transportadora de galactosa, se activan en mutantes $\Delta ptsG$ y además éstas poseen afinidad por la glucosa (Gosset, 2005; Steinsiek y Bettenbrock, 2012).

Existen publicaciones que indican, que la doble inactivación en *ptsG* y en *manX* mejora considerablemente el rendimiento en la producción de proteínas heterólogas y la reducción significativa en la síntesis de acetato (De Anda *et al.*, 2006; Bäcklund *et al.*, 2008; Bäcklund *et al.*, 2011). La disminución en la generación de acetato se puede explicar, porque al inactivar un gen que codifica para una proteína, capaz de transportar glucosa (*manX*) en una mutante $\Delta ptsG$, provoca una limitación en el flujo de entrada de glucosa y en consecuencia se ve reflejado en la disminución de q_s , reduciendo con esto, el sobre-flujo metabólico hacia acetyl-CoA, el precursor principal de acetato en condiciones de crecimiento exponencial.

También, desde un punto de vista ingenieril, se ha observado en diversos reportes, que la velocidad de crecimiento (μ) tiene un efecto sobre la producción de DNA plasmídico, una biomolécula que actualmente se está usando con fines terapéuticos (Kim y Ryu, 1991; Ryan y Parulekar, 1991). En este trabajo de tesis, se disminuyó la q_s y en consecuencia la μ , con el objetivo de ayudar a mejorar la síntesis de un producto heterólogo como lo es el DNA plasmídico. La disminución de q_s en las mutantes reducirá la producción de acetato y también se espera se aumente el rendimiento de plásmido. Al disminuir la q_s , la velocidad de las vías metabólicas del microorganismo disminuirá, mientras que la replicación del plásmido, se espera no se vea afectada, logrando con este efecto metabólico, un aumento en la cantidad de plásmido por célula (Prather *et al.*, 2003).

Antecedentes

1.1. La glucosa y *E. coli* en la industria

En la industria biotecnológica uno de los mayores costos de producción depende de la materia prima, por lo cual, los medios de cultivo suelen contener a la glucosa como fuente principal de carbono y de energía, ya que éste es un azúcar abundante y de bajo costo.

Los cultivos de alta densidad celular son la opción preferida en los bioprocesos industriales debido a sus altas productividades volumétricas, pues la concentración de biomasa se encuentra ligada, en la mayoría de los casos, a la concentración de producto formado. Con el uso de altas concentraciones de glucosa, se han reportado hasta 150 g/L de biomasa en peso seco (Pan *et al.*, 1987; Märkl *et al.*, 1993). Sin embargo, un problema que se ocasiona al trabajar con altas concentraciones de glucosa en medios minerales y en condiciones aerobias es que se genera una velocidad de crecimiento (μ) alta y con ello un sobre-flujo metabólico que no es deseable para los procesos de producción (Lara *et al.*, 2008).

La glucosa es la fuente de carbono y de energía preferido por *E. coli* (Muñoz-Elías y McKinney, 2006). La translocación de este azúcar a través de la membrana citoplasmática se puede llevar a cabo por una variedad de sistemas de transporte que dependen de las condiciones ambientales. En *E. coli*, el PTS es un sistema involucrado en el transporte y la fosforilación de varios carbohidratos (Postma *et al.*, 1993; Deutscher *et al.*, 2006). Además, los componentes de este sistema participan en funciones tan diversas como lo son el movimiento de las células hacia la fuente de carbono (quimiotaxis) y en la regulación de varios genes involucrados en el transporte de sustratos (Gabor *et al.*, 2011). Es importante recalcar que la bacteria anaerobia facultativa *E. coli* es uno de los hospederos más utilizados para la expresión de proteínas recombinantes y de metabolitos de interés industrial dado sus características genéticas y fisiológicas (Jana y Deb, 2005).

1.1.1. Metabolismo de la glucosa

Para que *E. coli* pueda metabolizar a la glucosa, ésta tiene que fosforilarse. La reacción de fosforilación puede llevarse a cabo por el PTS o por la glucocinasa (*Glk*). La glucosa-6-fosfato (G6P) se metaboliza a través de la glucólisis que es la ruta inicial catabólica de los azúcares para la generación de energía, tal como fosforilación de ADP a nivel de sustrato, o indirectamente en la producción de acetil-CoA (Figura 1). El intermediario acetil-CoA se dirige al ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) y posteriormente a la cadena respiratoria para la generación de ATP (Fraenkel, 1996; Emmerling *et al.*, 1999). Sin embargo, hay que mencionar que la glucólisis también desempeña un papel metabólico central en la generación de intermediarios metabólicos para otras rutas. La glucólisis está constituida por 10 pasos, que convierten a la glucosa en piruvato.

La última reacción de glucólisis en *E. coli*, puede ser catalizada por diferentes enzimas: la enzima EI del PTS, y las piruvato cinasas A y F (PykA/F) (Cunningham *et al.*, 2009). En el siguiente paso, el piruvato se convierte en acetil-CoA, luego éste se dirige principalmente a TCA, y finalmente a cadena respiratoria, aunque una parte de acetil-CoA también se puede dirigir a la síntesis de acetato, por las enzimas fosfato acetil transferasa (Pta) y acetato cinasa (AckA) (Figura 1).

La G6P también puede entrar a la vía de las pentosas fosfato (PPP), la cual es una ruta fundamentalmente anabólica más que catabólica, proporcionando NADPH para la biosíntesis reductora y ribosa-5-fosfato (R5P), para la biosíntesis de DNA, RNA y DNA plasmídico.

Por otra parte, el TCA es la ruta central de oxidación de los hidratos de carbono, los lípidos y las proteínas. Cada vuelta del TCA permite la entrada de dos carbonos en forma de grupo acetilo de la acetil-CoA y la pérdida de dos carbonos como CO₂. La acetil-CoA se condensa con el oxalacetato (OAA) para formar citrato (CIT). Después de una vuelta del ciclo, el OAA se regenera y con esto, se inicia nuevamente el proceso. Durante el ciclo se

generan transportadores electrónicos reducidos, fundamentalmente NADH, y su reoxidación en cadena respiratoria aporta la energía para la síntesis de ATP.

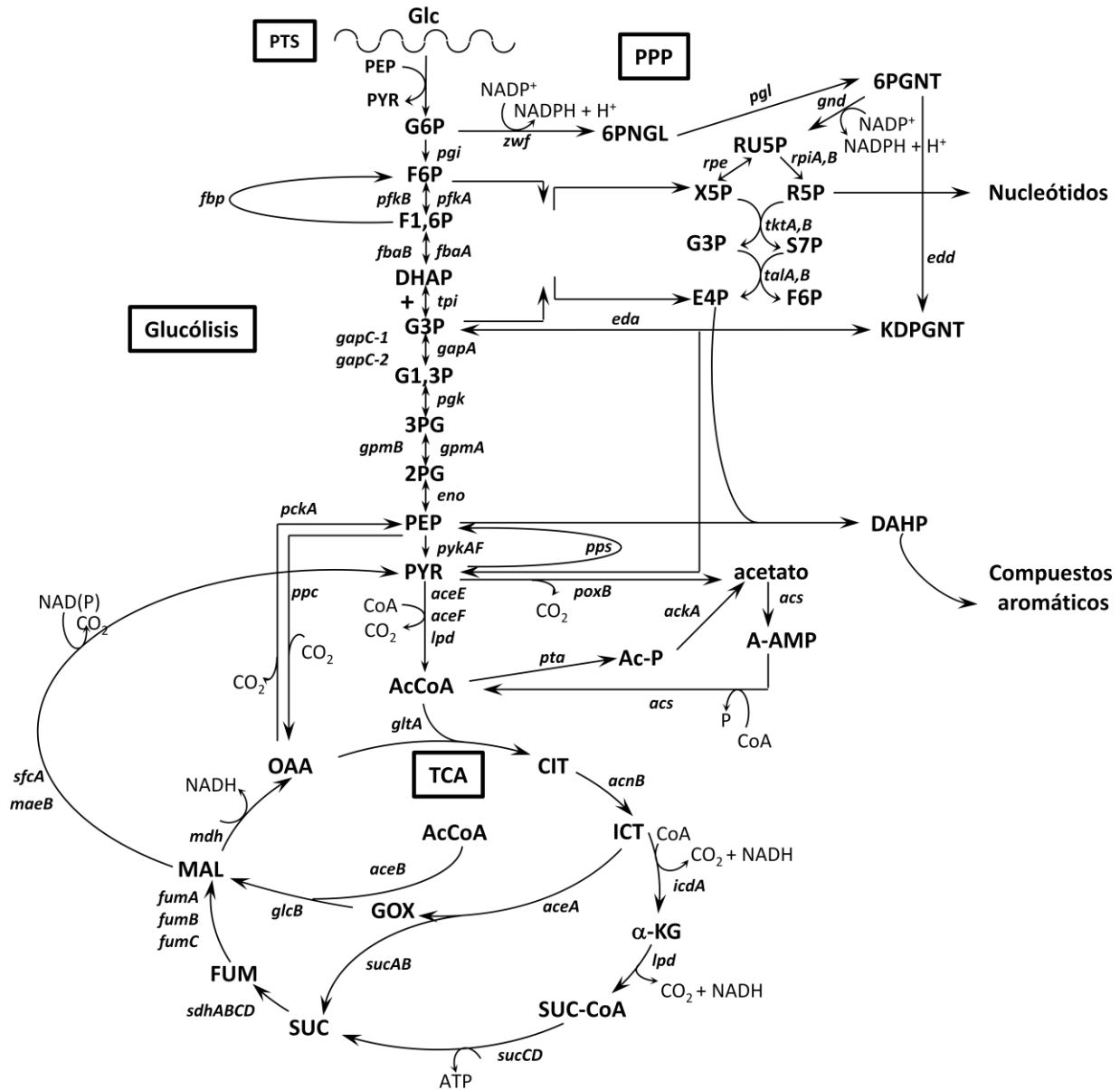


Figura 1. Metabolismo central de la glucosa en *E. coli*. Adaptación de Flores y colaboradores (2005).

1.2. El acetato, un problema en la producción biotecnológica

Se ha demostrado en múltiples trabajos que la velocidad de formación de acetato, un subproducto indeseable de fermentación aerobia, está relacionada directamente con la velocidad de crecimiento celular y por lo tanto, a la velocidad del flujo de consumo del sustrato (Eiteman y Altman, 2006).

En un cultivo de *E. coli*, cuando el sustrato es la glucosa, la velocidad de transporte hacia el citoplasma es alta, por lo que no todo el carbono se utiliza de manera óptima para la generación de biomasa, en vez de ello, se genera acetato. La sobre producción de acetato ocurre típicamente en cultivos lote a altas concentraciones de glucosa (Lara *et al.*, 2008). Se ha reportado que hasta el 30% del carbono se puede perder en la formación de acetato y su liberación no permite que todo el potencial energético y generador de biomasa de la glucosa se utilice, lo que resulta en un decremento del rendimiento, entre otros efectos negativos (Bäcklund *et al.*, 1996; Farmer y Liao, 1997; Picon *et al.*, 2005; Wolfe, 2005).

El acetato retarda el crecimiento e inhibe la producción de proteínas recombinantes aun en concentraciones tan bajas como 0.5 g/L (Luli y Strohl, 1990; Kleman y Strohl, 1994; Nakano *et al.*, 1997), esto se debe a que los ácidos de cadena corta reducen la velocidad de síntesis del RNA, del DNA, de las proteínas y de los lípidos. Desafortunadamente, en un cultivo de *E. coli* las altas concentraciones de acetato, ocasionan una reducción de productividad (Cherrington *et al.*, 1990; Jensen y Carlsen, 1990; Arnold *et al.*, 2001). Este ácido débil incluso afecta directamente la regulación de genes, particularmente los involucrados en la maquinaria de transcripción-traducción, así como, en la respuesta a estrés (Rosenthal *et al.*, 2008). Por lo tanto, el control de la producción de acetato en cultivos de *E. coli* es importante para lograr altas densidades celulares y buenos rendimientos de proteína recombinante (Boström *et al.*, 2005; Eiteman y Altman, 2006). En el caso particular de la cepa *E. coli* MG1655, se reportó que la q_s en la cual ya no se detecta acetato es 0.8 g/g h (Vemuri *et al.*, 2006).

Se ha propuesto que la formación de acetato por la vía Ack-Pta, es el resultado de un desbalance entre la glucólisis y el TCA, una condición en la que la entrada de carbono excede la velocidad de síntesis de acetyl-CoA, lo que trae como consecuencia, la generación de acetato que se excreta al medio de cultivo (Shiloach *et al.*, 1996; Van de Walle y Shiloach, 1998; Kirkpatrick *et al.*, 2001). Dicho de otra forma, el acetato se produce cuando la velocidad de consumo de sustrato, es mayor que la de su conversión en biomasa, ATP y CO₂ (Kleman y Strohl, 1994).

Debido a la naturaleza lipofílica del ácido acético que se excretó al medio de cultivo, éste puede cruzar la membrana celular y entonces retornar al citoplasma pues su carga es neutra (ácido acético), generando un gradiente de protones al interior de la célula. Debido a que el ácido acético tiene un pKa inferior al pH de la célula, éste se desprotona interfiriendo con el potencial de membrana para la producción de ATP, ver la Figura 2 (Luli y Strohl, 1990; Russell, 1992).

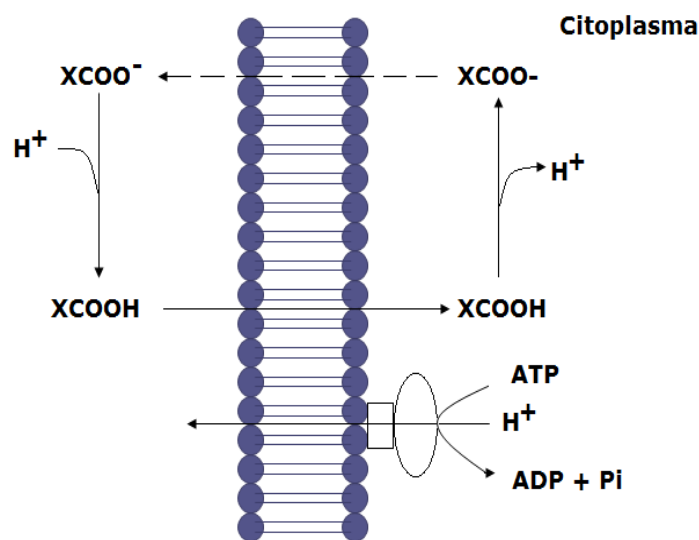


Figura 2. Representación de la acción desacoplante y la disipación de la fuerza protón-motriz de la membrana en presencia de ácidos orgánicos de cadena corta, tal como el acetato. Adaptación de Russell (1992).

Como se describió anteriormente, se ha asumido que el flujo de acetato ocurre porque hay un desequilibrio entre la capacidad de la glucólisis y el TCA, por lo que el carbono excedente de glucólisis se convierte en productos de fermentación tal como el acetato (Figura 1). (Majewski y Domach, 1990). Un estudio más reciente mostró, que en realidad un incremento en la proporción redox (reducción-oxidación) de las coenzimas NADH/H⁺ y NAD⁺ es la responsable de la formación de productos de fermentación (Vemuri *et al.*, 2006). Debido al cuello de botella en el consumo de oxígeno, la relación redox de NADH/H⁺ y NAD⁺ se incrementa dentro de la célula.

La coenzima NADH/H⁺ es un producto tanto de la glucólisis como del TCA. El NADH/H⁺ se oxida en la cadena respiratoria con el fin de proporcionar energía para la célula en forma de ATP. Además, esta molécula es un fuerte inhibidor de la enzima citrato sintasa (GltA) que cataliza la entrada del ácido acético activado con la coenzima A (coA) a el TCA. Así, cuando hay un aumento de la concentración de NADH/H⁺, entonces la actividad del TCA se reduce, a fin de evitar un aumento adicional de la relación redox. Esto también ocasiona un aumento de la concentración de piruvato y, finalmente, para favorecer una ruta metabólica que produzca menos NADH/H⁺, se conduce a la regeneración de NAD⁺ a través de la formación de productos como lactato y etanol o simplemente en la pérdida de carbono mediante la formación de acetato para reducir la formación de NADH/H⁺ (Eiteman *et al.*, 2006; Vemuri *et al.*, 2006; Caspi *et al.*, 2008).

De acuerdo con varios autores, la cantidad de acetato producida en un cultivo de *E. coli* puede variar principalmente por los siguientes aspectos (Kleman y Strohl, 1994; Shiloach *et al.*, 1996; Van de Walle y Shiloach, 1998; Akesson *et al.*, 2001):

- La cepa cultivada
- La composición del medio de cultivo y
- La cantidad de fuente de carbono presente

Luli y Strohl (1990) reportan diferencias importantes en la producción de acetato en ocho cepas distintas de *E. coli* cultivadas en matraz agitado en medio mineral con 5 g/L de glucosa suplementado con 5 g/L de extracto de levadura. Por ejemplo, la cepa HB101 produce 0.30 g/L de acetato al final de la fase exponencial, mientras que la cepa MC1060 genera 0.92 g/L. Por otra parte, una producción de acetato intermedia entre las dos cepas la tiene la W3110, al generar 0.50 g/L. Además de que la cantidad formada de acetato depende de la cepa, también se han encontrado modelos computacionales y experimentales en un medio mineral con glucosa, que muestran una relación directamente proporcional entre la q_s y la velocidad de formación de acetato. (Carlson y Srienc, 2004; Kayser *et al.*, 2005).

La concentración de glucosa en el medio de cultivo influye no solo en la formación de acetato sino también en su reutilización (Kleman y Strohl, 1994). Cuando la concentración de glucosa es baja en etapas avanzadas del cultivo, o cuando la glucosa se ha consumido completamente o casi, el acetato puede ser re-metabolizado (Kleman y Strohl, 1994).

Varias estrategias genéticas e ingenieriles se han aplicado para reducir la acumulación de acetato en *E. coli*. Algunas de las estrategias ingenieriles que se mencionan son las siguientes:

- I. *Disminución de la temperatura en el medio de cultivo, en un rango de 28 a 30°C.* Al bajar la temperatura, la μ disminuye, lo que se ha visto asociado a una menor velocidad de síntesis de acetato, sin embargo, este subproducto no se elimina por completo. Además, la disminución de la temperatura en un cultivo tiene efectos pleiotrópicos, ya que un gran número de mecanismos celulares y constantes de equilibrio se afectan por la temperatura. Cuando la temperatura decrece, se puede tener un impacto positivo o negativo en las reacciones encargadas de la producción de proteínas heterólogas (Jensen y Carlsen 1989; Lee, 1996).

- II. *Uso de cultivos lote alimentado para controlar la concentración de glucosa.* Con el empleo de cultivos lote alimentado se logra controlar la velocidad de consumo de glucosa, lo cual afecta directamente el flujo glucolítico, evitándose un sobre-flujo de acetil-CoA y la consecuente producción de acetato. Se ha observado, que la restricción en la alimentación de la fuente de carbono tiene un gran impacto positivo sobre la producción de proteína recombinante, por lo cual, el control en la velocidad de alimentación es una estrategia de gran interés (Paalme *et al.*, 1990; Gregory y Strohl, 1990; Korz *et al.*, 1995; Akesson *et al.*, 2001). Sin embargo, a pesar de su extendido uso, el modo lote alimentado presenta algunos inconvenientes como, un control riguroso del sistema de alimentación, una operación constante del cultivo, contaminación, entre otros.
- III. *Uso de fuentes de carbono alternativas a la glucosa.* La sustitución de la glucosa por otro sustrato como el glicerol, la manosa o la fructosa genera menor cantidad de acetato en un cultivo (Kleman y Strohl, 1994). Esta estrategia tiene como principal problema, que reduce inespecíficamente a la μ , y por lo tanto puede que se reduzca la productividad global del cultivo, aspecto que no es deseable ya que la productividad está relacionada directamente con el costo final de un proceso.

Entre las estrategias genéticas aplicadas destacan las siguientes:

- I. *Eliminación de las enzimas de la vía de síntesis del acetato.* La inactivación de la fosfato acetil transferasa y de la acetato cinasa. Esta modificación directa en el metabolismo tiene la desventaja de reducir la μ e incrementar la velocidad de formación de lactato, otro subproducto hetero-fermentativo de la bacteria *E. coli* (Yang *et al.*, 1999).
- II. *Incremento del flujo hacia las reacciones anapleróticas.* Por medio de la sobre expresión del gen de la fosfoenol piruvato carboxilasa (PpC) y la desregulación de la vía del glioxalato. Con el incremento de las reacciones anapleróticas se genera una mayor actividad del TCA y por lo tanto una mayor asimilación de acetil-CoA, el principal precursor de acetato. Sin embargo, esta estrategia genética solo disminuye la excreción de acetato hasta un máximo del 60% y además, dado que el fosfoenolpiruvato y el OAA son intermediarios claves entre el catabolismo y la

biosíntesis, la alteración del flujo puede afectar el rendimiento de biomasa y la formación de productos (Chao y Liao, 1993; Aristidou *et al.*, 1995).

III. *Reducción de la velocidad de consumo de glucosa.* Mediante la inactivación de proteínas específicas de transporte de sustrato se logra disminuir la q_s . Como ya se ha mencionado antes, la tasa de consumo de glucosa es un parámetro importante que influye en la reducción de acetato. La reducción de la q_s también influye en la productividad específica, en la tasa de solubilidad y en la velocidad de proteólisis de las proteínas (Picon y Postma, 2005; Bäcklund *et al.*, 2011). Ésta es una de las estrategias que ha tenido mayor impacto en la reducción de acetato, sin embargo, la mayoría de los trabajos enfocados en la disminución de acetato para mejorar la producción de proteínas heterólogas, solo han trabajado con pocas proteína del PTS capaces de transportar a la glucosa.

1.3. Información general del PTS y de sus componentes

Una característica propia de las bacterias Gram-negativas como *E. coli*, es la presencia de dos membranas concéntricas en torno al citoplasma, donde el espacio entre ellas, se llama periplasma (Figura 3). La membrana externa constituye la primera barrera a la entrada de carbohidratos. El paso al periplasma, se lleva a cabo por canales especializados de tipo proteico, llamados porinas, donde el motor del transporte, es un gradiente de concentraciones. Una vez que el sustrato se encuentra en la región periplasmática, éste se transloca al citoplasma y se fosforila como resultado de la actividad de un conjunto de proteínas del PTS, las generales y una proteína sustrato-específica. La fuerza impulsora tanto para cruzar la segunda barrera como para la fosforilación del sustrato, es la energía liberada de la hidrólisis del grupo fosfato de una molécula de fosfoenolpiruvato que proviene de la glucólisis (Postma *et al.*, 1993; Gosset, 2005).

El sistema de fosfotrasnferasa transporta y fosforila a la glucosa, además de otros azúcares específicos. Es importante mencionar que este sistema está ampliamente

distribuido en el dominio de las Bacterias pero ausente en el dominio Arquea y en el Eucarionte (Barabote y Saier, 2005).

El sistema PTS en *E. coli* consiste de dos tipos de componentes:

- Dos proteínas generales del PTS; la enzima I (EI) y la proteína de histidina (HPr), codificadas por los genes *ptsI* y *ptsH*. Estas proteínas participan en la fosforilación de todos los carbohidratos del tipo PTS.
- Complejos azúcar-específicos del PTS, también llamados enzimas II; *E. coli* cuenta con 21 complejos enzimáticos tipo II codificados ya sea en un gen o en un operón. Estas proteínas son las responsables de la translocación al citoplasma de los diferentes azúcares (Figura 4).

EI y HPr son proteínas citoplasmáticas solubles que participan de manera general en la fosforilación de los carbohidratos PTS (Tabla 1). Por otra parte, las EIIs son proteínas que pueden consistir de una proteína de unión a membrana, que se compone de tres dominios (A, B y C), o más de dos proteínas de las cuales al menos una está unida a la membrana (IIB, IIC o IID) y la otra se encuentra en forma soluble (IIA) (Postma *et al.*, 1993; Tchieu *et al.*, 2001).

En la actualidad, el modelo de mayor aceptación para el transporte y la fosforilación de azúcares PTS catalizada por las EIIs, consiste de los siguientes 3 pasos:

- 1) El sustrato periplasmático se une con alta afinidad a su proteína específica EII, si la EII no está en su forma fosforilada o si no está en complejo con su proteína IIA, el sustrato se transloca pausadamente por difusión facilitada (si este fenómeno llegara a ocurrir, la difusión facilitada ocurre vía un cambio conformacional en la proteína).

Tabla 1. Clasificación por familias de las proteínas transmembranales del PTS.
Adaptación de Postma y colaboradores (1993).

PTS/Nombre	Siglas	Algunos Sustratos	Genes involucrados	Dominio	No. de residuos
Familia de la glucosa					
Glucosa	Glc	Glc, Man,	<i>ptsG, crr</i>	IIBC, IIA	478, 169
Maltosa	Mal	Mal, Glc	<i>malX, crr</i>	IIBC, IIA	530, 169
N-acetil glucosamina	Nag	Nag, Stz,	<i>nagE</i>	IIABC	648
Trealosa	Tre	Tre	<i>treB, crr</i>	IIBC, IIA	485, 169
β-glucosidos	Bgl	Bgl, Glc	<i>bglF</i>	IIABC	625
Familia del manitol					
Manitol	Mtl	Mtl, Gut, Atl	<i>mtlA</i>	IIABC	637
Fructosa	Fru	Fru, Xtl, Glc, Sor, Man	<i>fruF(A)B</i>	FPr, IIBC	376, 563
Familia de la lactosa					
Celobiosa	Cel	Cel	<i>celABC</i>	IIB, IIC, IIA	106, 417, 116
Familia de la manosa					
Manosa	Man	Man, Nag, GlcN Fru, Glc, Tre	<i>manXYZ</i>	IIAB, IIC, IID	323, 266, 283
Clasificación desconocida					
Glucitol	Gut	Gut, Mtl, Atl	<i>gutAB</i>	II(BC), IIA	506, 123
Galactitol	Gat	Gat, Atl, Xtl	<i>gatABC</i>	IIA, IIB, IIC	150, 94, 427

Glc; glucosa, Man; manosa, Mal; maltosa, Nag; N-acetil glucosamina, Stz; streptozotocina, Tre; trealosa, Bgl; β-glucosidos, Mtl; manitol, Gut; glucitol, Atl; arabinitol, Fru; fructosa, Xtl; xilitol, Cel; celobiosa, GlcN; glucosamina, Gat; galactitol.

- 2) Alterno o seguido, ocurre la fosforilación del sitio IIB por la proteína IIA, lo que permite una translocación rápida del sustrato al citoplasma.
- 3) Cuando el sustrato se une al dominio IIB-P ocurre la fosforilación de éste, seguido de la disociación del carbohidrato fosforilado dentro del citoplasma (Postma *et al.*, 1996).

Las proteínas EIIs pueden agruparse en familias basadas en el análisis del alineamiento entre sus secuencias. Cuando los componentes particulares (proteínas transmembranales) del PTS presentan al menos un 25% de identidad entre los aminoácidos, entonces se agrupan en una familia. De acuerdo con esta clasificación existen 5 familias; la familia de la glucosa, la del manitol, la de la lactosa, la de la manosa y una sin clasificación (Tabla 1) (Lengeler *et al.*, 1990; Reizer *et al.*, 1991; Tchieu *et al.*, 2001).

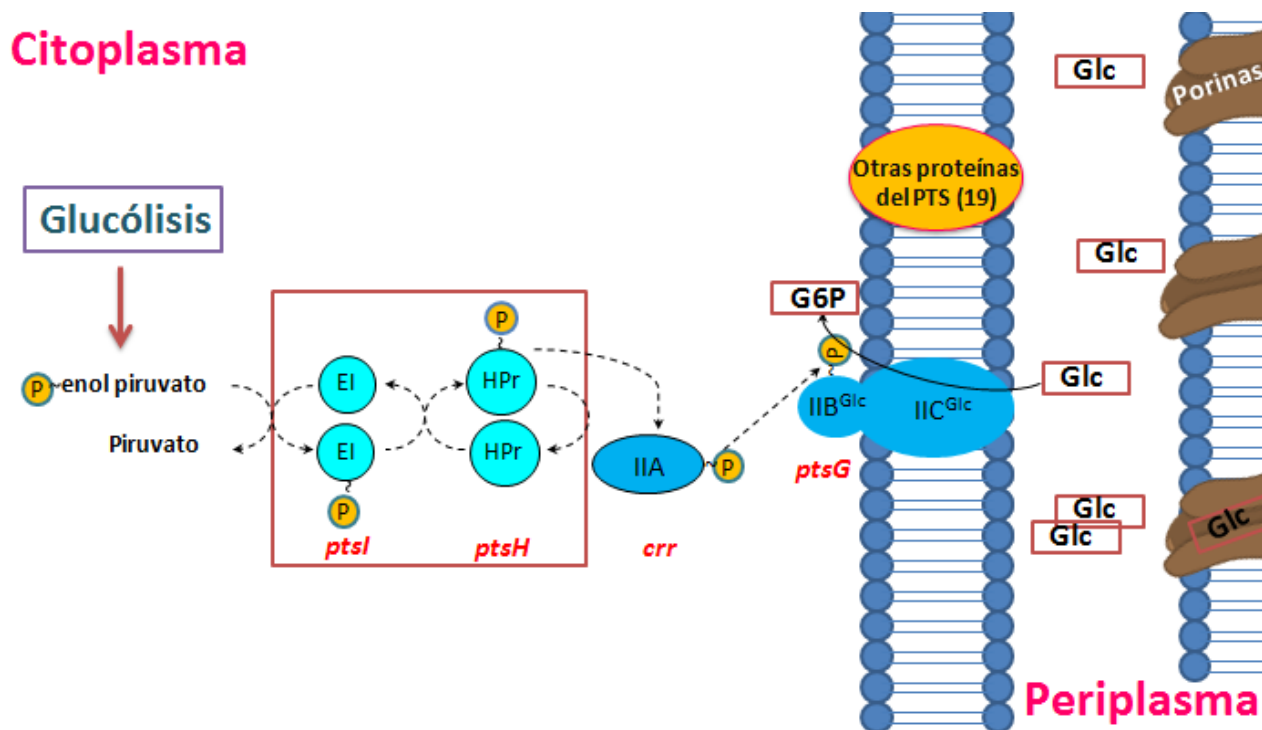


Figura 3. Transporte de glucosa por la proteína IIBC^{Glc} (ptsG) del PTS. Adaptación de Gosset (2005).

A continuación se enlistan algunas características relevantes de la familia de la glucosa.

Familia de la glucosa. Todos los miembros proteicos de esta familia, fosforilan a su sustrato en la posición C-6 (por ejemplo: glucosa, disacáridos de glucosa, amino azúcares) del anillo glucopiranosido. El dominio hidrofóbico IIC constituye el canal translocador. En esta familia, los dominios IIC y IIB están fusionados. En cambio los dominios IIA, pueden estar como proteínas libres o unidas al carboxilo terminal de los dominios IIB y IIC (Figura 4).

1.3.1. Transporte de glucosa por el PTS

El sistema de fosfotransferasa se ha estudiado ampliamente en *E. coli* y en algunas otras bacterias como *Salmonella typhimurium* y *Bacillus subtilis* (Postma *et al.*, 1993; Erni, 2002). En particular se ha estudiado extensamente a la proteína IIBC^{Glc} (PtsG) del PTS en *E. coli* (Plumbridge, 2000) ya que es la proteína principal encargada del transporte y fosforilación de la glucosa. La subunidad IIBC^{Glc} consiste de dos dominios (Figura 3), el dominio C (41.1 KDa) unido a membrana, el cual se encarga del reconocimiento del sustrato y del transporte, y el dominio B (9.6 KDa) en citoplasma, que fosforila a la glucosa. La proteína PtsG posee una alta afinidad por la glucosa (K_M 3-10 μ M) y una gran velocidad de transporte (V_{max} 126 μ mol/min g) (Gosset, 2005).

De una manera más detallada y específica, el modelo de translocación de la glucosa por el PTS se describe a continuación. El primer paso es, la auto-fosforilación de la cinasa general EI en la posición N-3 del residuo histidil 189 (His-189) a partir del grupo fosfato de la molécula de fosfoenolpiruvato, después, el grupo fosfato se transfiere a la proteína monomérica general HPr en la posición N-1 del residuo histidil 15 (His-15). Para continuar, el grupo fosfato se transfiere a la proteína soluble específica IIA^{Glc} en la posición N-3 del residuo histidil 90 (His-90), finalmente, se dona el grupo fosfato al dominio IIB de la proteína transmembranal IIBC^{Glc} en el residuo de cisteína 421 (Cys-421), para así poder donar el grupo fosfato a la glucosa que recién estará en contacto con el dominio IIC.

Cuando el dominio IIB está fosforilado y unido a IIC (componente integral de membrana del complejo EII), el complejo es activo. Algunos cambios conformacionales permiten la formación del sitio de unión a glucosa y del canal de translocación, de esta manera la proteína IIC reconoce a la glucosa y la transporta al citoplasma, mientras que la proteína IIB fosforila al carbohidrato recién internalizado (Figura 3) (Blattner *et al.*, 2011).

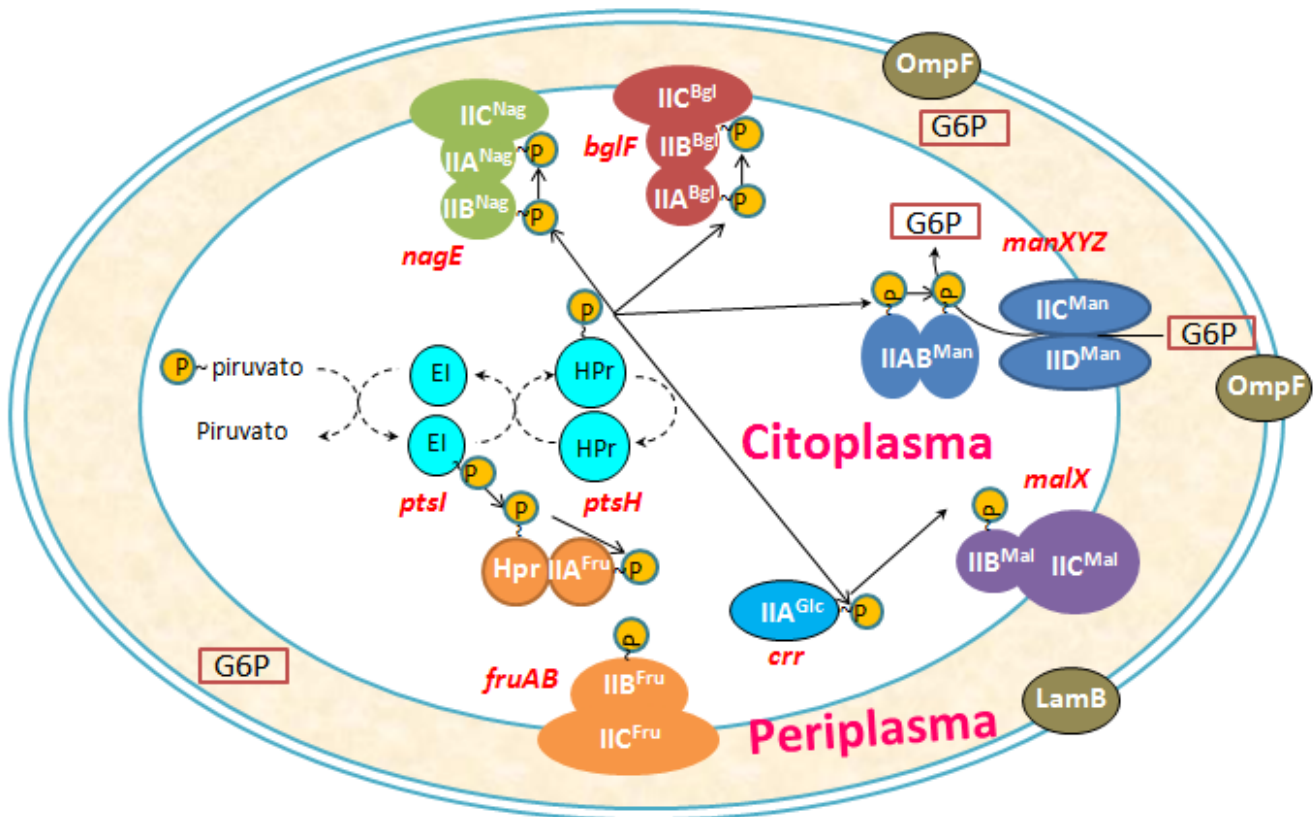


Figura 4. Proteínas transmembranales del PTS que han sido sugeridas tener una actividad de transporte de glucosa. NagE: N-acetil glucosamina, BglF: β -glucosidos, ManXYZ: manosa, MalX: maltosa, FruAB: fructosa.

La proteína IIBC^{Glc} también tiene efectos importantes en la regulación de la entrada de carbono, por lo que su inactivación provoca indirectamente la activación de otras proteínas que tienen afinidad por la glucosa (Figura 4) (Yao *et al.*, 2011).

Se tiene evidencia experimental desde la década de los 70's del siglo pasado, que el complejo proteico ManXYZ es capaz de transportar y de fosforilar a la glucosa (Curtis y Epstein, 1975). En un trabajo reciente por Picon y colaboradores (2005), donde se inactivó al gen *ptsG* en la cepa AF1000 (MC4100, *relA*⁺), observaron un decremento del 33% en la μ respecto a la cepa silvestre. Además, en éste mismo trabajo se realizó la doble inactivación (*ptsG*, *manX*) con el objetivo de disminuir aun más la velocidad de consumo del sustrato respecto a la mutante $\Delta ptsG$, logrando una μ de 0.13 h^{-1} . Bajo esta misma premisa Bäcklund y colaboradores en el 2008 y en el 2011 realizaron la doble inactivación en *ptsG* y en *manX*, obteniendo el mismo resultado respecto a la disminución en la μ y en la q_s , lo que sugiere entonces, que la proteína ManXYZ contribuye al consumo de glucosa en una mutante AF1000, $\Delta ptsG$.

Algunos otros reportes han sugerido que la proteína BglF (Bramley y Kornberg, 1987) y MalX (Reidl y Boos, 1991) también deberían tener cierta afinidad por la glucosa (Figura 4), dado que el porcentaje de identidad, entre las secuencias proteicas con respecto a la proteína PtsG es alto $\geq 40\%$ (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Ciertos estudios sugieren, que la naturaleza ha utilizado sitios comunes de unión y características mecánicas comunes para catalizar reacciones análogas con diferentes sustratos (O'Brien y Herschlag, 1999).

1.4. Transportadores de glucosa alternativos a la proteína IIBC^{Glc} en *E. coli*

La glucosa también puede ser transportada al citoplasma y fosforilada por las proteínas que están involucrados en la internalización de la galactosa. Se sabe que estos transportadores se inducen en las cepas de *E. coli* a concentraciones micro-molares de glucosa, pues cuando el estado energético de la célula baja drásticamente, se genera galactosa como un inductor intracelular (Death y Ferenci, 1994). Estos transportadores a diferencia de las proteínas del PTS, solo internalizan a la glucosa, mientras que una cinasa (codificada por el gen *glk*) fosforila a la glucosa consumiendo una molécula de ATP.

Se ha demostrado, que bajo condiciones de crecimiento donde la concentración de glucosa es inferior a $1 \mu\text{M}$ ($1.8 \times 10^{-4} \text{ g/L}$), el gen *galP* que codifica para la proteína transmembranal GalP (Figura 5) se induce (Ferenci, 2001). GalP, al ser un transportador de tipo simporte, por cada molécula de glucosa que internaliza, también introduce un protón (H^+) al interior de la célula.

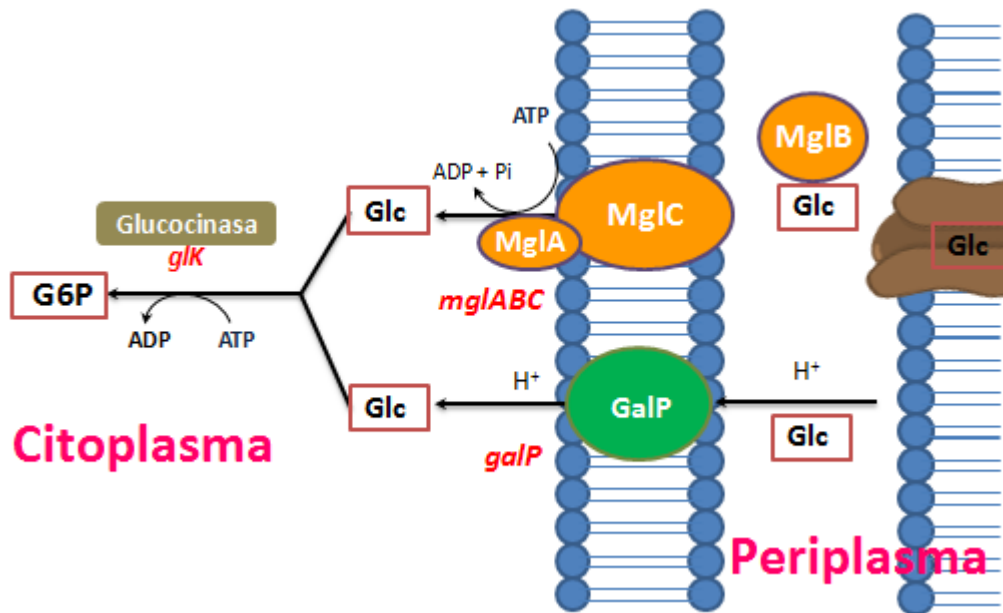


Figura 5. Representación del transporte de glucosa por sistemas alternos al PTS, en este caso específicos para el transporte de galactosa. Adaptación de Gosset (2005).

Los genes del operón *mglABC* codifican para una proteína dependiente de ATP, un componente periplásmico de unión y una proteína transmembranal (Figura 5), respectivamente. Estas proteínas forman el sistema MglABC, el cual transporta glucosa con alta afinidad (Death y Ferenci, 1994). Este sistema se induce cuando la concentración de glucosa está en el rango de $0.3 - 1.8 \mu\text{M}$.

Si se comparan las tres maneras en que *E. coli* puede transportar glucosa al interior de la célula, se concluye que el PTS (Figura 3) es el más eficiente, ya que consume un mol de

fosfoenolpiruvato por cada mol de glucosa que internaliza y fosforila. El equivalente energético de un mol de fosfoenolpiruvato es un mol de ATP. La alta afinidad del sistema Mgl-glucosinasa es el más costoso energéticamente, ya que consume dos moles de ATP por cada mol de glucosa que se internaliza y fosforila. Por último, GalP transporta y fosforila la glucosa a expensas de un mol de H⁺ y un mol de ATP.

1.5. Represión catabólica de carbono por los componentes del PTS

La presencia de una fuente de carbono principal como la glucosa previene la expresión, y a menudo también la actividad de los sistemas catabólicos que son capaces de usar un sustrato diferente (en el caso de *E. coli*, un sustrato diferente a la glucosa). Esta regulación, puede lograrse mediante varios mecanismos, incluyendo la activación de la transcripción, la represión y el control de la traducción por proteínas de unión a RNA (Brückner y Titgemeyer, 2002). Se puede definir la represión catabólica de carbono ("CCR" por sus siglas en inglés *catabolic carbon represion*) como un fenómeno regulatorio global de genes para el uso de fuentes alternas a la fuente principal de carbono (Gabor *et al.*, 2011).

En *E. coli* la CCR es uno de los sistemas de control génico más importantes, ya que regula del 5 al 10% de todos los genes de su genoma. Las proteínas que son capaces de usar una fuente de carbono secundaria, no se expresan cuando hay disponibilidad de glucosa (Figura 6) (Blattner *et al.*, 1997; Brückner y Titgemeyer, 2002).

Los principales actores en la vía global de CCR son (Figura 6):

- El activador transcripcional CRP, también llamado, proteína catabólica activadora de gen (CAP).
- La señal metabólica AMP cíclico (cAMP), sintetizada por la adenilato ciclasa.
- El componente EIIA^{Glc} del PTS (Görke y Stülke, 2008).

La regulación de CCR se lleva a cabo principalmente por la modulación del estado de fosforilación de la proteína $EIIA^{Glc}$. En presencia de glucosa u otros sustratos PTS, el fosfato de $EIIA^{Glc}$ -P se transfiere hacia los azúcares PTS recién internalizados. De esta manera, cuando la proporción entre el fosfoenolpiruvato y el piruvato es alta, $EIIA^{Glc}$ se encuentra predominantemente en su forma fosforilada ($EIIA^{Glc}$ -P). En contraste, si hay altas cantidades de piruvato y bajas cantidades de fosfoenolpiruvato, entonces $EIIA^{Glc}$ se encuentra predominantemente en su forma desfosforilada ($EIIA^{Glc}$) (Figura 6).

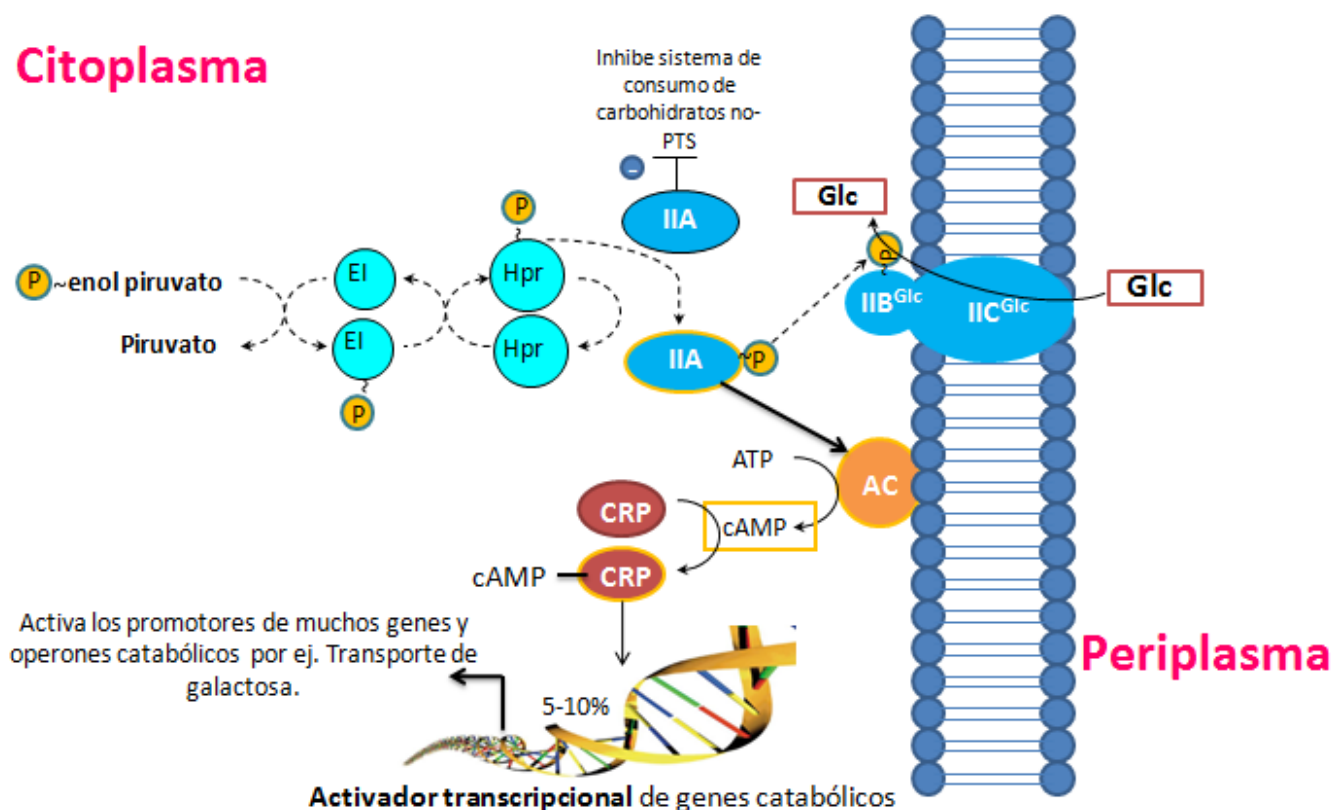


Figura 6. Mecanismo de la represión catabólica de carbono en *E. coli*. Adaptación de Görke y Stülke (2008).

Cuando *E. coli* se encuentra en un medio con una fuente de carbono que se metaboliza eficientemente como la glucosa, la señal principal de la CCR es la proteína $EIIA^{Glc}$ en su forma desfosforilada. Es decir, $EIIA^{Glc}$ inhibe los sistemas de consumo de carbohidratos

no-PTS, al unirse, por ejemplo, a los promotores que codifican para proteínas asociadas al transporte de galactosa e influyendo de manera negativa en su activación.

Por otra parte, la forma fosforilada de EIIA^{Glc}-P permite la desactivación de la CCR, ya que EIIA^{Glc}-P activa a la adenilato ciclasa y por lo tanto se puede formar el complejo cAMP-CRP, el cual interactúa con los sitios de unión de algunos promotores débiles que codifican para el transporte de sustratos como la maltosa, los β -glucosidos, la galactosa, entre otros para permitir su transcripción eficiente (Figura 4 y 5) (Bettenbrock *et al.*, 2006; Bettenbrock *et al.*, 2007). Este fenómeno regulatorio puede ocurrir por la baja concentración de glucosa (por debajo de 1 μ M) o por la ausencia de glucosa en el medio.

Es necesario mencionar, que la región sobre el DNA en donde se une el complejo cAMP-CRP posee diferente afinidad dependiendo del gen u del operón (Fic *et al.*, 2008). En el caso de algunos genes, no solo es una región específica a la que se debe unir el complejo para permitir la transcripción, si no son varios sitios de unión a cAMP-CRP (<http://ecocyc.org/>). Por lo tanto, la activación de los genes va a depender de la concentración del complejo que exista en la célula. Interesantemente, el complejo cAMP-CRP no solo regula genes que codifican a proteínas relacionadas con la CCR, si no también RNAs pequeños regulatorios no codificantes, tales como Spot42 y CyaR (Görke y Stülke, 2008). Ésta podría ser una explicación de cómo el complejo cAMP-CRP tiene efectos indirectos sobre la expresión de genes.

Dado todo lo anterior, es evidente que el PTS tiene efectos tanto directos como indirectos sobre la regulación de genes. Al inactivar genes que codifican para las proteínas generales del PTS, se pueden tener efectos pleiotrópicos en la capacidad de *E. coli* para crecer sobre la glucosa y otros azúcares que utilicen al PTS. Por otra parte, inactivaciones en los componentes del PTS, también podrían provocar algunos otros efectos metabólicos que son de interés industrial para la producción de algún compuesto heterólogo, como es el caso de las proteínas recombinantes (Gosset, 2005; Bäcklund *et al.*, 2011).

1.6. Uso práctico de mutantes en el PTS

En el artículo De Anda y colaboradores (2006) se trabajó con la cepa W3110 a la cual se le inactivaron los genes que codifican para las proteínas generales del PTS. En esta cepa además, se sobre-expresó al gen que codifica para la proteína transmembranal GalP con el fin de lograr un consumo de glucosa y una velocidad de crecimiento mayor (VH32). La mutante que resultó, se cultivó en un fermentador lote para producir a la proteína verde fluorescente (pV21). Con los experimentos se logró conocer algunos datos importantes:

1. El cultivo en lote de la cepa W3110-pV21 (silvestre) alcanzó una concentración máxima de acetato de 2.83 g/L, mientras que la producción de acetato en la mutante VH32-pV21 (fenotipo PTS⁻ GalP⁺) fue de 0.39 g/L.
2. La q_s de la cepa mutante fue 42% menor con respecto a la cepa W3110-pV21.
3. La productividad de la proteína verde fluorescente mejoró en un 239%.
4. El rendimiento de la proteína sobre el sustrato aumentó 3.4 veces.

Por otra parte, el Dr. Larsson trabajó con unas cepas que tienen inactivaciones en genes que codifican para proteínas transmembranales del PTS (Picon *et al.*, 2005), lo que resultó en una reducción de la q_s y de la μ , respecto a la silvestre. Dos cepas se generaron, una deficiente del gen *ptsG*, y otra cepa carente de los genes *ptsG* y *manX*. La idea fue un menor consumo de glucosa. Los resultados de las μ fueron 0.38 y 0.13 h⁻¹ para la mutante $\Delta ptsG$ y la mutante $\Delta ptsG, \Delta ManX$, respectivamente. Comparadas con la cepa silvestre AF1000, ésta tuvo un crecimiento de 0.78 h⁻¹ (Bäcklund *et al.*, 2007). Esta cepa y sus mutantes mostraron las siguientes características:

1. El cultivo lote de la cepa AF1000 mostró al final del cultivo una concentración de acetato de 1 g/L mientras que la doble mutante disminuyó la producción en 10 veces (0.1 g/L).
2. La concentración de la proteína recombinante aumentó en un 50% (β -galactosidasa).

3. La masa celular aumentó en ambas mutantes respecto a la cepa silvestre.

Con estos experimentos se observó que el efecto provocado por disminuir la q_s , fue la reducción en la μ y en la formación de acetato, lo que resultó en un mayor rendimiento de la proteína heteróloga. Por otra parte, la síntesis de plásmido terapéutico (modelo de producto heterólogo) en bacterias, también ha mostrado verse afectado por la modificación en la velocidad de crecimiento del hospedero. El DNA plasmídico es otro producto recombinante que se comienza a obtener en *E. coli* por diferentes laboratorios, dado que se tienen grandes expectativas respecto a su uso en un futuro no muy lejano (Lara y Ramírez, 2012).

1.7. Uso de plásmidos como modelo de producción

Los plásmidos se utilizan de manera habitual en los laboratorios de biología molecular desde que se descubrió que pueden ser una buena herramienta de manipulación, transferencia y modificación de la información genética. Uno de los trabajos más importantes, que fue posiblemente el parte-aguas para el diseño de diferentes plásmidos, fue la construcción del plásmido pBR322 por el Dr. Francisco Bolívar (Zapata *et al.*, 1977).

En la actualidad, el uso de plásmidos se ha extendido y mas allá de ser una herramienta de biología molecular, se han convertido en vectores terapéuticos. Una de las aplicaciones se basa en el hecho de que, los plásmidos que codifican para una proteína viral (promotor que permite la expresión en mamíferos) pueden desencadenar una respuesta inmune y/o celular, sin tener efectos secundarios como las vacunas tradicionales. Por esta razón los plásmidos de este tipo, han cobrado gran importancia y han resultado ser prometedores como vectores en terapia génica y vacunación basada en DNA plasmídico. Los plásmidos generados para este fin, están contruidos específicamente para codificar una proteína de interés, y se administran posteriormente *in vivo* transfectando a células de mamífero (Gurunathan *et al.*, 2000).

En comparación con las vacunas convencionales, las vacunas de DNA plasmídico presentan mayores ventajas. Las más importantes son, que no son infecciosas; dado que el vector únicamente expresa la región del virus o bacteria que se sabe tiene capacidad antigénica, éstas poseen una alta estabilidad tanto genética como ambiental, es posible tener múltiples antígenos en la misma vacuna y especialmente, estas podría llegar a ser de bajo costo y de fácil producción, características que se buscan en la actualidad (Carnes y Williams, 2007; Han *et al.*, 2009; Lara y Ramírez, 2012).

Existen en el mercado algunas vacunas de tipo veterinario a base de DNA plasmídico. En este momento, ya se han reportado más de 100 ensayos clínicos de vacunas de DNA (<http://www.who.int/topics/es/>), lo que sugiere que el desarrollo de esta tecnología va en aumento y seguramente la demanda en el futuro será grande. Para tales aplicaciones, las dosis empleadas deben de ser del orden de miligramos, lo que implica un reto para la producción de plásmidos (Robinson, 1999; Smith, 2000; Ulmer *et al.*, 2006).

Los plásmidos con fines terapéuticos están diseñados para expresar en el hospedero el gen de interés, lo que da como resultado, una producción *in situ* del antígeno (para vacunas) o de una proteína terapéutica (para aplicaciones en terapia génica). El DNA plasmídico usado para estos fines debe contener elementos para su replicación y su selección en hospederos bacterianos y también, todos los elementos que se requieran para la expresión del antígeno en las células eucariontes (Webster y Robinson, 1997; Gurunathan *et al.*, 2000).

Los elementos mínimos requeridos para este tipo de plásmidos terapéuticos son:

- Origen de replicación bacteriana
- Gen de selección bacteriana
- Promotor eucarionte
- Terminador de la transcripción eucarionte
- Gen o genes que codifiquen para una proteína antigénica

1.7.1. El plásmido y la carga metabólica

Las células que llevan un plásmido requieren de energía y de precursores adicionales para el mantenimiento, replicación y en algunos casos, la expresión del gen de interés (Roskov *et al.*, 2004; Ow *et al.*, 2006). Esta demanda se conoce como carga metabólica. Un plásmido representa un problema energético para el metabolismo de la bacteria cuando la función es independiente al microorganismo, esto es, cuando el plásmido no representa ningún beneficio para la bacteria. Tal es el caso de los plásmidos recombinantes, los cuales se introducen en un microorganismo para la obtención de una proteína recombinante o para la producción de únicamente el DNA plasmídico.

Para un hospedero bacteriano, un plásmido representa una carga metabólica que conduce a la reducción en la capacidad de crecimiento y de la viabilidad celular. Esto se puede traducir en la pérdida del plásmido y por lo tanto en la reducción de productividad (Kumar *et al.*, 1991). Por esta razón, se necesita de una presión de selección para que las bacterias que pierden el plásmido, no sean capaces de crecer más rápidamente que las que aun lo poseen, y de esta manera, no se desplace el cultivo hacia las bacterias que no portan al plásmido o no puedan sintetizar el producto de interés.

El uso de un antibiótico como presión de selección en medios de cultivo de *E. coli* para la producción de plásmidos terapéuticos es muy común. Lo que se espera, es que todas las células lleven el plásmido de interés. Aquellas células que lo han perdido, deberían morir, pues no serán capaces de producir a la enzima involucrada con la resistencia al antibiótico.

La síntesis de una enzima, capaz de degradar a un antibiótico del medio de cultivo, es una causa importante de la carga metabólica en una bacteria portadora de un plásmido recombinante. La construcción de la mayoría de los plásmidos está diseñada para una síntesis constitutiva del antibiótico. En el caso específico de la síntesis de β -lactamasa, la

concentración de la enzima está en relación al número de copias del plásmido, es así, que entre mayor sea el número de copias del plásmido, habrá más síntesis de la enzima y con ello una mayor carga metabólica (Bentley *et al.*, 1990; Roskov *et al.*, 2004).

Debido a lo anterior, se han explorado alternativas al uso de antibióticos como presión de selección. Los esfuerzos van dirigidos hacia la inactivación de genes esenciales del metabolismo de la bacteria, como es el caso del gen esencial *glyA*, que codifica para una enzima involucrada en la biosíntesis de glicina. En este caso, el sistema consiste de la inactivación del gen *glyA* en el hospedero, posterior a esto, se transforma con un plásmido que contiene el gen de interés y el gen que codifica de forma constitutiva para el gen esencial, con ello la bacteria es capaz de crecer únicamente cuando porta el plásmido recombinante (Vidal *et al.*, 2008). De esta manera el plásmido terapéutico en vez de representar una carga metabólica, se convierte en un elemento importante para el crecimiento bacteriano.

También se han diseñado estrategias en las cuales no es necesario modificar al huésped. Tal es el caso de los sistemas de sobre-expresión/represión. En el sistema desarrollado por Goh y Good (2008), se transforma a la bacteria con un plásmido que sobre-expresa al gen *fabI* que cataliza un paso esencial en la biosíntesis de ácidos grasos, mientras que, un inhibidor de la expresión del gen (*fabI*), se administra como sustrato (triclosan). Por lo tanto, las células que no llevan al plásmido no son capaces de expresar a este gen esencial lo suficiente, mientras que la sobre-expresión del gen dada por el vector, se reduce a una escala normal en presencia del inhibidor.

1.7.2. Replicación del plásmido

Una característica que define a los plásmidos es que controlan su replicación de forma autónoma. Su capacidad de autoreplicación y de mantenimiento dentro de la bacteria hospedera se debe a la existencia de ciertos elementos genéticos, los cuales se agrupan

en una unidad genética llamada replicón básico (Couturier *et al.*, 1998). Existen tres mecanismos básicos de replicación de plásmidos circulares: el de tipo theta, el de desplazamiento de la cadena y el de círculo rodante. Los mecanismos de regulación de la replicación de plásmidos difieren de los del cromosoma bacteriano (Bouet *et al.*, 2007).

El replicón básico comprende una región de entre 2 a 3 kb, que contiene;

- Los genes que controlan el inicio de la replicación (*cop* e *inc* entre otros).
- Los genes que codifican las moléculas involucradas en el inicio de la replicación (*rep*).
- Secuencias específicas de unión tanto de las moléculas iniciadoras de la replicación (*oriV*) como de sitios que colaboran en el control de la replicación.

1.7.3. Clasificación plasmídica

Los plásmidos son elementos genéticos extracromosómicos que pueden constituir una carga metabólica extra para la bacteria. Para impedir su eliminación, los plásmidos han desarrollado un complejo sistema de control en el número de copias y en el mantenimiento del plásmido dentro de la célula (Couturier *et al.*, 1988).

Estos sistemas son capaces de controlar y de responder ante las fluctuaciones que pueden producir tanto un aumento desmesurado en su número de copias, como una disminución, lo cual podría conducir a la pérdida del plásmido. Los sistemas involucrados en el control de la replicación y de la segregación, son los responsables del fenómeno de incompatibilidad plasmídica. Se considera como plásmidos incompatibles a aquellos que no pueden mantenerse de forma estable en la misma línea celular, en ausencia de un marcador de selección (Novick *et al.*, 1976).

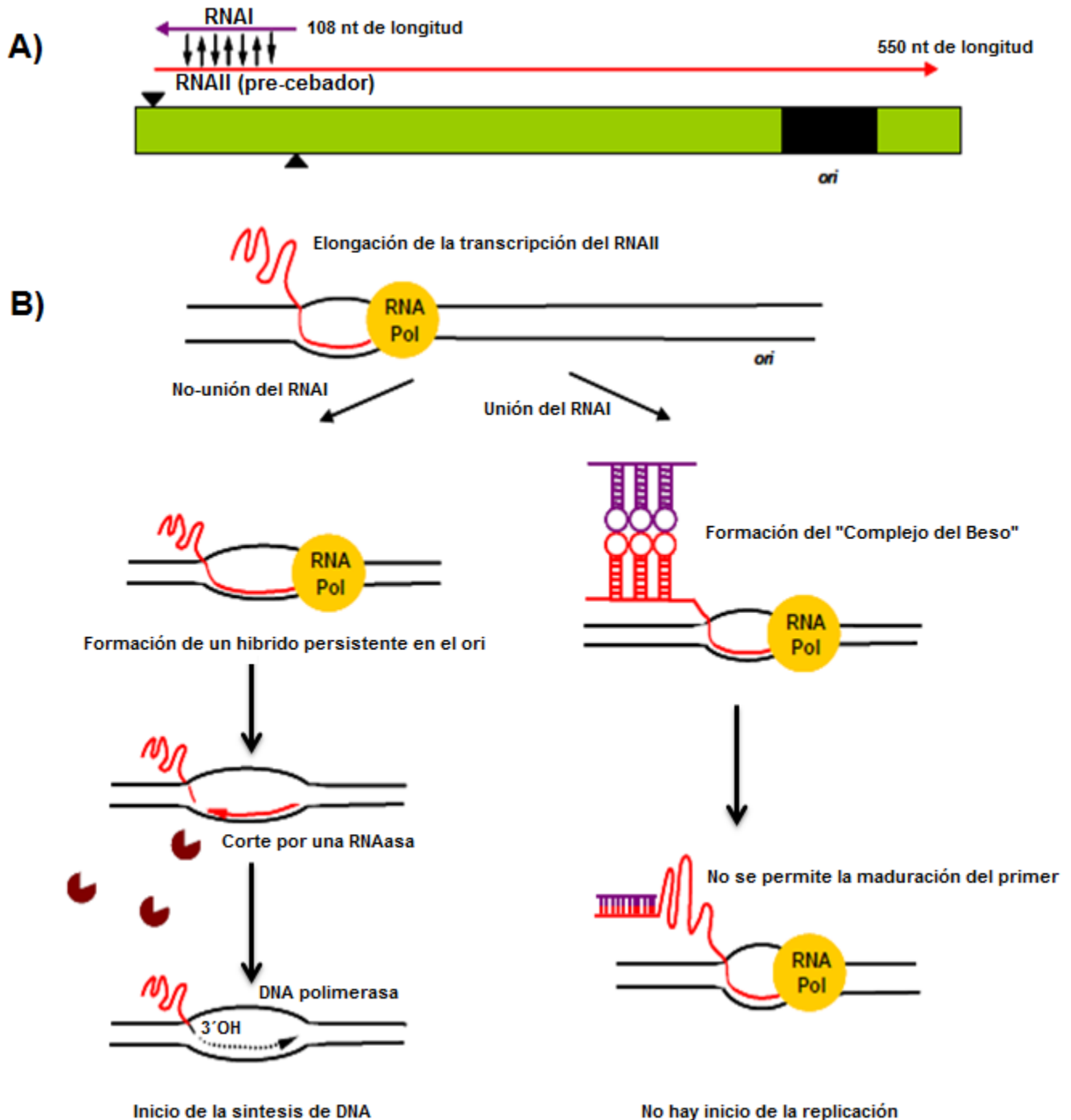


Figura 7. Mecanismo de regulación del inicio de la replicación del plásmido ColE1. A) Representación de la zona de replicación del plásmido. Se muestra el sentido de la síntesis del RNAI y del RNAII. **B)** Mecanismo de inhibición de la formación del cebador por la estructura del "complejo del beso" (derecho). La replicación del DNA se inicia al cortar el RNAPre-cebador para generar un extremo 3'OH y poder iniciar la replicación (izquierda). Adaptación de Brantl (2004).

Se distinguen los siguientes mecanismos de control:

- I. Control de la replicación plasmídica por un RNA antisentido
- II. Control de la replicación plasmídica por proteínas y secuencias repetidas

Es relevante mencionar que la mayoría de los plásmidos usados para fines terapéuticos se derivan del tipo ColE1, dado el alto número de copias por célula que se asocian a su origen de replicación. Este plásmido se replica mediante el mecanismo theta y el control de su replicación está dado por un RNA antisentido.

1.7.4. Control de la replicación del plásmido de tipo pColE1

Los RNA antisentido son pequeñas moléculas de 35 a 150 nucleótidos (nt), cuya estructura forma de una a cuatro estructuras tallo-asa (*stem-loops*). Su actuación es tanto en *cis* como en *trans*, según sea la localización de su secuencia complementaria, denominada RNA con sentido, la cual generalmente codifica alguna de las proteínas esenciales para la replicación plasmídica. Los RNA antisentido regulan también el mantenimiento del plásmido y su conjugación (Wagner *et al.*, 2002).

Los RNA antisentido regulan negativamente la replicación plasmídica, se sintetizan constitutivamente y son metabólicamente inestables, de tal forma que cualquier cambio en el número de plásmidos afecta a la concentración de estos reguladores negativos. La variación en el número de copias del plásmido se traduce en una alteración de la frecuencia de la replicación. Así, un aumento del número de copias hace que se incremente proporcionalmente la concentración de RNA antisentido con lo cual se inhibe la replicación. Por el contrario, la disminución del número de copias supone una disminución de la concentración de RNA antisentido, facilitándose así el inicio de la replicación (Brantl, 2004). Cabe destacar que en algunos casos, la regulación por el RNA antisentido va acompañada de proteínas reguladoras que funcionan como represores transcripcionales o proteínas de unión al RNA (Summers, 1996).

El plásmido ColE1 es un ejemplo típico de plásmidos de alto número de copias de *E. coli* que no requieren de una proteína para el inicio de la replicación. El único componente plasmídico esencial para la replicación es un cebador de RNA, denominado RNAII de 550 nt, el cual funciona como iniciador de la replicación, y además es la diana del control del número de copias. Este RNAII se asocia al DNA en la región del origen de replicación en donde la enzima RNAsa H del hospedero (Figura 7), produce un cebador maduro que genera un extremo 3'OH en donde la DNA polimerasa I comienza la síntesis de la cadena principal mediante la conexión de nucleótidos complementarios con una tasa de polimerización de aproximadamente 60 nucleótidos por segundo a 37°C (Summers, 1996).

Un RNA antisentido, denominado RNAI, es quien controla los niveles de replicación. Este RNAI se transcribe constitutivamente a partir de la hebra complementaria en la región del cebador de RNA. Este RNAI, forma una estructura secundaria de tres tallos-asa y una cola desestructurada. La unión del RNAI con el RNAII bloquea el apareamiento correcto del RNA, que funciona como cebador, con el DNA. De esta forma se impide la maduración del RNA para ser funcional como un cebador.

Una parte adicional del sistema de control de la replicación del RNA es una proteína (antiguo nombre: Represor del primer: Rop) moduladora (Rom), codificada por un gen que se encuentra corriente abajo del origen de replicación y que modula la unión entre el RNAI y el RNAII. La proteína Rom favorece la unión entre el RNAI y el RNAII. El RNAI es inestable y tiene una vida media de $t_{1/2} = 2$ min. Debido a su corta vida media, la concentración de RNAI es un buen indicador del número de plásmido en la célula.

El modelo descrito anteriormente sobre el control de la replicación, es específico para plásmidos de tipo pColE1. Este tipo de plásmidos se utiliza de manera frecuente para la producción de DNA terapéutico ya que es un vector que alcanza un alto número de copias por célula. Como modelo de producción heteróloga se eligió al DNA plasmídico

denominado pHN, este plásmido es uno de tipo ColE1. A continuación se detallan aspectos particulares de la molécula de DNA terapéutica.

1.7.5. Información sobre el plásmido pHN

El plásmido pcDNA3.1(+) de *Invitrogen* fue la base para la generación del plásmido pHN (6.1 kpb). Éste último plásmido se diseñó como una vacuna potencial contra las paperas (Herrera *et al.*, 2007).

En el sitio múltiple de clonación del plásmido pcDNA3.1(+), se insertó el gen de la hemaglutinina-neuraminidasa del virus de las paperas. El gen quedó bajo el control del promotor de citomegalovirus humano (CMV) y por lo tanto se espera que cause una respuesta inmune cuando se expresa en células humanas. La expresión de este gen no ocurre en las células bacterianas lo que evita una carga metabólica adicional para las células portadoras del plásmido (Anderson *et al.*, 1989).

El plásmido pHN es un plásmido de tipo ColE1 con un origen de replicación pUC, originalmente derivado del origen de replicación pMB1, sin embargo ColE1 tiene una mutación puntual inmediatamente antes de la secuencia del RNAI. Esta mutación es una inversión de guanina a adenina (G -> A) (Lin-Chao *et al.*, 1992) que aumenta el número de copias del plásmido cuando se incrementa la temperatura del cultivo. En esta temperatura, esta mutación, causa que el RNAII no se pliegue bien, de modo que el RNAI no puede unirse correctamente, y consecuentemente no se controla eficazmente la replicación del plásmido. Sin embargo, este efecto puede suprimirse mediante la reducción de la temperatura del cultivo a 30°C. Por el contrario, un aumento de la temperatura de 42 a 45°C (en ausencia de la proteína Rom) conduce a un aumento en el número de copias del plásmido (de 400 a 500 copias por célula) (Wong *et al.*, 1982; Miki *et al.*, 1987; Lin-Chao *et al.*, 1992; Lahijani *et al.*, 1996).

Además, el plásmido pHN no sintetiza el RNA modulador (Rom), cuya transcripción daría lugar a un frenado de la replicación del plásmido. Con la inactivación de este gen, el número de copias es de alrededor de 400 (Miki *et al.*, 1987). Como comparación, el plásmido pBR322 sin esta mutación puntual y sin la inactivación de la proteína Rom, genera de 20 a 50 copias por célula (Cesareni *et al.*, 1982, Lahijani *et al.*, 1996).

1.8. Estrategias empleadas para la producción de DNA plasmídico

En la actualidad, se ha dedicado un gran esfuerzo a la búsqueda de estrategias para mejorar la producción de DNA plasmídico. Principalmente, se han evaluado las estrategias de fermentación, incluyendo el medio de cultivo, el modo de alimentación y el comportamiento en cultivos de alta densidad celular (Parather *et al.*, 2003; O'Mahoney *et al.*, 2007). Además, se ha estudiado el impacto de diferentes cepas de *E. coli* en cultivos lote y lote alimentado, la combinación plásmido-cepa y cepas modificadas en las vías metabólicas que afectan directamente el rendimiento y también la estabilidad del plásmido, entre algunas otras (Listner *et al.*, 2006; Lara *et al.*, 2008; Phue *et al.*, 2008; Williams *et al.*, 2009). Sin embargo, no se cuenta con evidencias que nos permitan elegir a la mejor cepa productora de DNA plasmídico ni al mejor bioproceso.

Los datos experimentales sugieren que la productividad, la tasa de crecimiento, los rendimientos y la formación de subproductos dependen en gran medida de la combinación de la cepa, el plásmido y las características del proceso. Aunque también es cierto que falta información fisiológica de las condiciones de producción, como flujos metabólicos y expresión genética, que nos permitan condensar mejor la información para poder aplicarla a un proceso de producción (O'Kennedy *et al.*, 2003; Yau *et al.*, 2008; Singer *et al.*, 2009). Esto representa un problema, pues no se consigue hablar del efecto de una variable, si no de la combinación de varias. De este modo, no se puede pensar que de manera general, la producción de plásmido será buena en una cepa que antes ya demostró altos rendimientos de DNA plasmídico.

La selección de las cepas bacterianas para la producción de plásmidos terapéuticos se ha basado en la evidencia experimental, por lo que estas cepas se han seleccionado por sus buenas productividades. Sin embargo, evidencias recientes muestran que estas cepas pueden no ser la mejor opción para la producción comercial de DNA plasmídico.

Por ejemplo, las cepas utilizadas actualmente para la producción de plásmido tienden a ser inestables, es decir tienen una tasa de mutación relativamente elevada que conduce a cambios en el DNA cromosomal. Se ha demostrado que la cepa de *E. coli* DH10B tiene una tasa mayor de mutaciones (13.5 veces) en comparación con la cepa MG1655, esto se atribuye principalmente a una mayor tasa de transposición de secuencias de inserción (Bower y Prather, 2009). Esto significa que la cepa en cuestión, quizás no responderá de la misma manera después de muchas duplicaciones, y que las condiciones de cultivo establecidas, ya no serán las más óptimas para la manufactura de la cepa mutante. Esto podría generar variaciones indeseadas en la producción, provocando incluso, pérdidas monetarias.

Por otra parte, la cepa DH5 α es ampliamente utilizada en estudios de producción heteróloga. Actualmente es la cepa más productiva en cultivos a pequeña escala (Yau *et al.*, 2008; Singer *et al.*, 2009). Sin embargo, la falta de información detallada sobre la fisiología de esta cepa que está altamente modificada en su genoma, es desfavorable para un modelado preciso y un desarrollo de ingeniería genética. Por ejemplo, se había dicho que el gen *deoR* que codifica para un represor transcripcional, involucrado en la expresión negativa de genes relacionados al transporte y catabolismo de nucleótidos estaba inactivo, no obstante, recientemente se ha demostrado, que este gen está activo en la DH5 α (Xia *et al.*, 2011). Además de este inconveniente, la cepa muestra elevado sobreflujo metabólico (producción de acetato), lo que representa una seria desventaja para la producción en altas densidades celulares.

Altos rendimientos de DNA plasmídico se atribuyen principalmente a la inactivación del gen *recA*. Se considera que este gen influyen en la estabilidad del DNA plasmídico porque reduce la degradación de éste. El gen *recA* se expresa constitutivamente. RecA es una proteína reguladora que induce una respuesta global al daño del DNA que se produce cuando los daños acumulados son tantos que impiden el avance de la maquinaria de replicación (respuesta SOS). Algunos autores han mostraron que en comparación con la cepa silvestre, la inactivación de este gen conduce a una μ mayor y a un rendimiento de DNA del más del doble (Bell 2005; Yau *et al.*, 2008; Keseler *et al.*, 2009; Singer *et al.*, 2009). Sin embargo, hay autores que no han observado un efecto benéfico, ya que por ejemplo Capaldo y colaboradores (1974) encontraron aproximadamente el 10% de células sin material genético en cada división celular.

Singer y colaboradores (2009) compararon la producción de plásmido utilizando como fuente de carbono a la glucosa y al glicerol en un cultivo de *E. coli* DH1. En este estudio se mostró que el glicerol como fuente de carbono aumenta significativamente el rendimiento de plásmido (61%), sin embargo, se observa una disminución en la μ de 0.90 a 0.61 h⁻¹. El problema es que no se sabe si realmente fue por el cambio de la fuente de carbono, o si fue porque se disminuyó el crecimiento a raíz de que el glicerol no es la fuente de carbono preferida por *E. coli*.

La influencia de la μ en la formación de DNA plasmídico se ha estudiado activamente. El entendimiento del efecto de la velocidad específica de crecimiento sobre el rendimiento de plásmido es de particular importancia para el diseño de estrategias de cultivo. En general, bajas velocidades de crecimiento conllevan a una mayor síntesis de plásmido. A continuación se detalla más sobre este tema, ya que es un antecedente directo del presente trabajo de tesis.

1.8.1. Efecto de la velocidad de crecimiento sobre la producción de DNA plasmídico

La influencia de la μ sobre la formación de plásmido ha cobrado gran importancia, ya que este parámetro ha resultado tener un efecto, por lo que se ha convertido en una de las estrategias utilizadas para aumentar la cantidad de DNA plasmídico. Hasta la fecha, lo que se sabe, es que la μ reportada en la cual el rendimiento de plásmido es "máximo" no es la misma. A continuación se muestran trabajos al respecto.

Tipo de correlación obtenida al evaluar la velocidad de consumo de glucosa

- **Positiva.** En la cepa HB101 en un cultivo en quimiostato y medio complejo (LB), se mostró un aumento de 2 a 3 veces en el número de copias del plásmido al aumentar la velocidad de crecimiento de $\mu=0$ a 1 h^{-1} (Reinikainen y Virkajarvi 1989). El aumento adicional de la tasa de dilución, redujo drásticamente el número de copias. La tasa de dilución crítica fue 1.4 h^{-1} cuando las células contenían el plásmido pBR322 (4.4 kpb). Sin embargo, este fenómeno es cuestionable ya que se ha reportado que la concentración del plásmido es dependiente de la situación nutrimental (Zabriskie y Arcuri 1986) y en este trabajo, el sustrato limitante se desconoce, por lo que podría haber tenido una influencia importante a bajas tasas de dilución.
- **Negativa.** En la cepa RR1 se probó la producción del plásmido pBR329 en tres medios de cultivo distintos (M9, M9+fuentes ricas de nitrógeno [*Casamino Acids*] y LB) observando un efecto en la velocidad específica de crecimiento dependiente del medio de cultivo. En este trabajo, se encontró una correlación negativa entre la velocidad de crecimiento y la producción, independiente del medio de cultivo. La baja velocidad de crecimiento ($0.2-0.4 \text{ h}^{-1}$) dada por el medio M9 favoreció la producción del plásmido, mientras que el medio LB ($0.9-1.2 \text{ h}^{-1}$) afectó negativamente la producción (Bentley *et al.*, 1990).

En la cepa JM103 se probó la producción del plásmido pUC8 en medio mínimo en un cultivo continuo, mostrando igual que en caso anterior, que el decremento en el crecimiento es directamente proporcional a el incremento en la producción del

plásmido, encontrando el mayor número de copias de plásmido por célula a una μ de 0.23 h^{-1} , aumentando 19 veces la producción de plásmido respecto a una velocidad de crecimiento de 0.4 h^{-1} (Ryan y Parulekar, 1991).

En la cepa M72 se probó la producción del plásmido pPLc-RP en medio complejo (LB) en un cultivo continuo, en donde la mayor producción de plásmido se dio a una baja velocidad de crecimiento (0.64 h^{-1}) mientras que la menor producción fue a una μ de 0.9 h^{-1} , aunque en este caso, la cantidad de DNA solo aumento en un 15% (Kim y Ryu, 1991).

En general, la correlación negativa se atribuye a la estabilidad adquirida por el plásmido, así como, a la replicación privilegiada sobre otras vías metabólicas de la célula a bajas velocidades de crecimiento, lo que conduce a una considerable acumulación de plásmido ya que su replicación continúa a la misma velocidad, independiente de la división celular (Prather *et al.*, 2003). Hay que hacer notar que todas las cepas y plásmidos en estos trabajos son totalmente distintos y sin embargo el efecto fue el mismo para todas.

- **Ninguna con un óptimo.** En un cultivo continuo donde se trabajaron diferentes tasas de dilución (de 0.23 a 0.64 h^{-1}) en medio M9 + *Casamino Acids*, se reportó que la cepa HB101 de *E. coli*, con el plásmido pDM246 (alto número de copias) mostro el mayor número de copias por célula a una tasa de crecimiento de 0.34 h^{-1} . La misma cepa pero con un plásmido distinto (RSF1050) mostró un incremento de tres veces en el número de copias de DNA plasmídico por célula cuando la velocidad de crecimiento fue de 0.35 h^{-1} (Seo y bailey 1985; Seo y Bailey 1986).
- **Ninguna.** En el trabajo de Yau y colaboradores (2008) se reporto que la modificación de la velocidad específica de crecimiento no tiene efecto sobre el rendimiento del plásmido, sin embargo, son muy pocos los trabajos que no han encontrado ninguna relación entre la velocidad de crecimiento y la producción de plásmido.

De acuerdo con estos antecedentes, la μ con la cual se consigue el mejor rendimiento de plásmido, deberá ser determinada para cada vacuna a base de DNA. Aunque en general, la mayoría de los trabajos que se han reportado muestran que entre más baja sea la μ de la cepa, mejor es el rendimiento de plásmido.

Justificación

Existen reportes de cepas mutantes en los genes *ptsG* y *manX* del PTS en donde se observó una disminución de la q_s . Esta reducción, ocasionó un decremento de hasta 10 veces en la producción de acetato respecto a la cepa silvestre, en consecuencia, se obtuvo un aumento en la generación de la proteína recombinante y de la biomasa celular. Sin embargo, estos estudios no han explorado todo el rango de posibles valores para la q_s que pueden derivarse de la alteración de otros componentes del PTS como MalX, NagE, BglF, FruA y de otros sistemas de transporte no dependientes del enlace fosfato del fosfoenolpiruvato. Por lo cual, proponemos generar un conjunto de mutantes con inactivaciones en los distintos transportadores para la glucosa que nos permitan explorar un amplio rango de la q_s para *E. coli*. Este estudio aportará valiosa información sobre los efectos de cada transportador en la velocidad de transporte de glucosa. Además, este conocimiento, podrá ser utilizado para el diseño de cepas productoras de plásmidos terapéuticos u otros productos de interés industrial, como pueden ser las proteínas recombinantes.

Hipótesis

La inactivación progresiva de los genes relacionados con el transporte de glucosa en *E. coli* permitirá generar cepas mutantes con diferentes velocidades específicas de consumo de glucosa y su posterior uso para mejorar la producción de compuestos heterólogos.

Objetivo general

Generar una colección de cepas mutantes de *E. coli* donde se hayan eliminado progresivamente algunos genes que están involucrados en el transporte de glucosa para disminuir, la velocidad específica de consumo de sustrato y evaluar la producción de acetato, de biomasa celular y de un plásmido terapéutico, llamado pHN.

Objetivos particulares

- Caracterizar cinética y estequiometricamente el crecimiento de cepas de *E. coli* y de sus mutantes en los genes *ptsG* y *manX*.
- Identificar, mediante la evaluación del crecimiento de mutantes que carecen de los genes *ptsG* y *manX*, si existen otros transportadores del PTS que apoyen al consumo de glucosa en *E. coli*.
- Establecer el nivel de contribución al consumo de glucosa de las proteínas MglABC y GalP en mutantes PTS⁺ y PTS⁻.
- Determinar si existen otros transportadores de glucosa no-PTS en la mutante $\Delta ptsHIcrr$, $\Delta galP$, $\Delta mglABC$.
- Evaluar la capacidad de producción del plásmido pHN en mutantes que abarquen un amplio rango de velocidades específicas de consumo de glucosa.

Material y métodos

2.1. Cepas bacterias

Las cepas de la colección de Keio empleadas y las mutantes de *E. coli* generadas en este trabajo, se enlistan en la Tabla 2.

Tabla 2. Material biológico.

Cepa	Genotipo	Fuente	Método de construcción
W3110	<i>F</i> λ^- <i>rph-1</i> <i>IN(rrnD-rrnE)1</i>	CGSC # 4474	
MG1655	<i>F</i> λ^- <i>rph-1</i> <i>ilvG</i> <i>rfb-50</i>	CGSC # 6300	
BW25113	<i>F</i> λ^- Δ <i>araBAD</i> _{AH33} Δ <i>lacZ</i> _{WJ16} <i>rrnB</i> _{T14} Δ <i>rhaBAD</i> _{LD78} <i>hsdR514</i> <i>rph</i> ⁻¹ <i>lacI</i> ^q	CGSC # 6159	
JM101	<i>F'</i> <i>traD36</i> <i>proA</i> ⁺ <i>proB</i> ⁺ <i>lacI</i> ^q <i>lacZ</i> Δ <i>M15/supE</i> <i>thi</i> Δ (<i>lac-proAB</i>)	Stratagene	
JW1087-2	BW25113 Δ <i>ptsG763::kan</i>	CGSC # 9031	Datsenko
JW1806-1	BW25113 Δ <i>manX741::kan</i>	CGSC # 9511	Datsenko
JW1613-1	BW25113 Δ <i>malX769::kan</i>	CGSC # 9374	Datsenko
JW3700-1	BW25113 Δ <i>bgf753::kan</i>	CGSC # 10704	Datsenko
JW0665-1	BW25113 Δ <i>nagE728::kan</i>	CGSC # 8756	Datsenko
JW2910-1	BW25113 Δ <i>galP789::kan</i>	CGSC # 10251	Datsenko
JW2154-1	BW25113 Δ <i>fruA723::kan</i>	CGSC # 9747	Datsenko
WG	W3110 Δ <i>ptsG::Km</i>	Este trabajo	Transducción
WM	W3110 Δ <i>manX::Km</i>	Este trabajo	Transducción
WK	W3110 Δ <i>glk::Km</i>	Este trabajo	Transducción
WE	W3110 Δ <i>nagE::Km</i>	Este trabajo	Transducción

WP	W3110 $\Delta galP::Km$	Este trabajo	Transducción
WGE	W3110 $\Delta ptsG, \Delta nagE::Km$	Este trabajo	Transducción
WGF	W3110 $\Delta ptsG, \Delta fruA::Km$	Este trabajo	Transducción
WGX	W3110 $\Delta ptsG, \Delta malX::Km$	Este trabajo	Transducción
WGB	W3110 $\Delta ptsG, \Delta bgIF::Km$	Este trabajo	Transducción
WGP	W3110 $\Delta ptsG, \Delta galP::Km$	Este trabajo	Transducción
WGAB	W3110 $\Delta ptsG, \Delta mglABC::Cm$	Este trabajo	Datsenko
WGM	W3110 $\Delta ptsG, \Delta manX::Km$	Este trabajo	Transducción
WGMX	W3110 $\Delta ptsG, \Delta manX, \Delta malX::Km$	Este trabajo	Transducción
WGMF	W3110 $\Delta ptsG, \Delta manX, \Delta fruA::Km$	Este trabajo	Transducción
WGMB	W3110 $\Delta ptsG, \Delta manX, \Delta bgIF::Km$	Este trabajo	Transducción
WGME	W3110 $\Delta ptsG, \Delta manX, \Delta nagE::Km$	Este trabajo	Transducción
WGMK	W3110 $\Delta ptsG, \Delta manX, \Delta glK::Km$	Este trabajo	Transducción
WGMP	W3110 $\Delta ptsG, \Delta manX, \Delta galP::Km$	Este trabajo	Transducción
WMAB	W3110 $\Delta ptsG, \Delta manX, \Delta mglABC::Cm$	Este trabajo	Datsenko
WHI	W3110 $\Delta ptsHIcrr::Cm$	Este trabajo	Datsenko
WHIP	W3110 $\Delta ptsHIcrr::Cm, \Delta galP::Km$	Este trabajo	Transducción
WHIAB	W3110 $\Delta ptsHIcrr, \Delta mglABC::Cm$	Este trabajo	Datsenko
WHIPAB	W3110 $\Delta ptsHIcrr, \Delta galP, \Delta mglABC::Cm$	Este trabajo	Datsenko
WHIK	W3110 $\Delta ptsHIcrr::Cm, \Delta glK::Km$	Este trabajo	Transducción
MG	MG1655 $\Delta ptsG::Km$	Este trabajo	Transducción
MM	MG1655 $\Delta manX::Km$	Este trabajo	Transducción
MGM	MG1655 $\Delta ptsG, \Delta manX::Km$	Este trabajo	Transducción
MGX	MG1655 $\Delta ptsG, \Delta malX::Km$	Este trabajo	Transducción
MGA	MG1655 $\Delta ptsG, \Delta fruA::Km$	Este trabajo	Transducción
MGB	MG1655 $\Delta ptsG, \Delta bgIF::Km$	Este trabajo	Transducción

Cepa	Genotipo	Fuente	Método de construcción
MHI	MG1655 $\Delta ptsHIcrr::Cm$	Este trabajo	Datsenko
BG	BW25113 $\Delta ptsG::Km$	Este trabajo	Transducción
BGM	BW25113 $\Delta ptsG, \Delta manX::Km$	Este trabajo	Transducción
JG	JM101 $\Delta ptsG::Km$	Este trabajo	Transducción
JGM	JM101 $\Delta ptsG, \Delta manX::Km$	Este trabajo	Transducción

2.2. Plásmido pHN, modelo de vacuna de DNA

Como modelo para la generación de un producto de interés comercial (modelo de vacuna de DNA), en este trabajo se empleó al plásmido pcDNA HN176-MuV, denominado en la tesis como pHN (Figura 8). Éste es un derivado del plásmido "pcDNA3.1" de *Invitrogen* (Catalogo No. V790-20).

Al plásmido pcDNA3.1, se le clonó un gen que codifica para un antígeno que genera respuesta inmune contra la parotiditis (hemaglutinina neuraminidasa HN-). El plásmido pHN lo donó amablemente la Dra. Blanca Barrón de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional (Herrera *et al.*, 2010), a través del Dr. Alvaro Lara de la Universidad Autónoma Metropolitana-Cuajimalpa.

En la Tabla 3, se enumeran los elementos característicos del plásmido pHN tanto para su expresión en mamíferos como para su replicación en bacterias.

Tabla 3. Características relevantes del plásmido pHN.

Abreviatura	Características	Ventaja
P_{CMV}	Promotor de citomegalovirus (CMV) basado en la secuencia del CMV humano	Permite un eficiente y alto nivel de expresión del gen heterólogo bajo el control en células de mamíferos (Boshart <i>et al.</i> , 1985; Nelson <i>et al.</i> , 1987).
Gen HN	Gen de la hemaglutinina-neuraminidasa	Gen viral para aplicaciones como vacuna, que genera respuesta inmune contra las paperas (Herrera <i>et al.</i> , 2007).
BGH pA	Sitio de múltiple clonación	Permite la inserción del gen y facilita la clonación.
	Hormona bovina de crecimiento (BGH). Señal de poliadenilación	Eficiente terminación de la transcripción y poliadenilación del RNAm.
ori f1	Promotor T7	Permite la transcripción in vitro en la orientación y sentido de la secuencia.
	Origen f1	Permite rescate de DNA de cadena sencilla.
ori SV40	Promotor temprano y origen de virus de simio	Permite un eficiente y alto nivel de expresión del gen de resistencia a neomicina y la replicación episomal en células que expresan el gran antígeno T de SV40; para su uso en células de mamífero.
Neomycin	Gen de resistencia a neomicina	Selección de transfectantes estables en células de mamíferos (Southern y Berg, 1982).
SV40 pA	Señal temprana de poliadenilación de virus de simio	Eficiente terminador de la transcripción y poliadenilación del RNAm; uso en células de mamífero.
pUC ori	Origen de replicación en bacterias	Permite la replicación en <i>E. coli</i> .
Ampicilin	Gen de resistencia a ampicilina	Este gen, codifica para la enzima β -lactamasa la cual rompe el anillo betalactámico de la ampicilina, desactivando las propiedades antimicrobianas; selección en cepas bacterianas.

2.3. Plásmidos empleados para la mutagénesis sitio dirigida en *E. coli*

En la Tabla 4 se describen brevemente las características de los plásmidos empleados en este trabajo (para mayor referencia consultar Datsenko y Wanner, 2000).

Tabla 4. Características de los plásmidos usados para la mutagénesis sitio dirigida.

Nombre	Uso	Características
pKD46	Este plásmido sirve para promover la recombinación de la secuencia que se desea intercambiar por el gen blanco, ya que contiene tres genes: γ , β y <i>exo</i> . <i>Exo</i> es una exonucleasa que degrada el DNA lineal en dirección 5' - 3' lo cual genera extremos de DNA 3' y de esta manera son reconocidos inmediatamente por <i>Beta</i> , que protege al DNA de la degradación de nucleasas, sin embargo la actividad de <i>Exo</i> y <i>Beta</i> no podrían llevarse a cabo sin la función de <i>Gamma</i> , la cual inhibe la exonucleasa <i>V</i> del complejo de recombinación <i>RecBCD</i> del hospedero.	<ul style="list-style-type: none"> • Plásmido de bajo número de copias. • Posee un replicón sensible a temperatura (permite su posterior cura a 42 °C). • Este plásmido tiene clonado el sistema <i>Red</i> de fago λ bajo el control de un promotor inducible por arabinosa (P_{araB}), los genes representantes son el Gen γ, Gen β y Gen <i>exo</i>.
pKD3	Plásmido molde, utilizado para generar por PCR el fragmento H1-P1-Cloranfenicol-P2-H2 (los extremos P1, P2 son secuencias complementarias al plásmido pKD3 y las secuencias H1, H2 son complementarias al gen), lo cual resulta en un fragmento lineal que sirve para la recombinación con el gen blanco.	Posee un gen de resistencia a cloranfenicol flanqueado por sitios <i>FRT</i> (<i>FLP</i> "recognition target"), los cuales serán reconocidos por la <i>FLP</i> recombinasa para la posterior escisión del cromosoma bacteriano (figura 8).
pCP20	La expresión del plásmido permite escindir el gen de resistencia en el cromosoma bacteriano, por la acción de la enzima <i>FLP</i> , dejando una pequeña secuencia y sin efectos polares de los genes rio abajo.	Plásmido resistente a ampicilina y cloranfenicol. Este plásmido posee un replicón sensible a temperatura y un gen que codifica la enzima <i>FLP</i> recombinasa bajo un promotor inducible por temperatura.

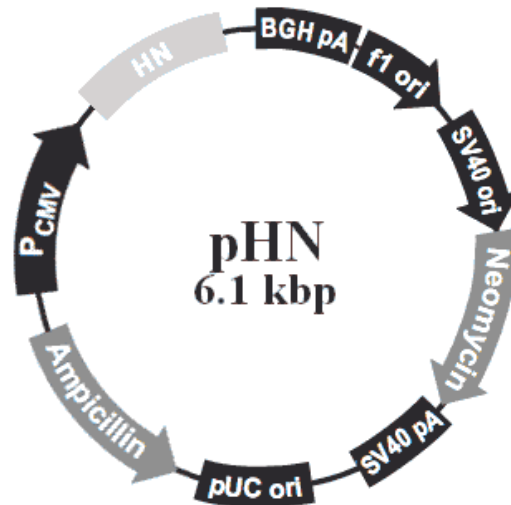


Figura 8. Mapa simplificado del plásmido pHN.

2.4. Técnicas moleculares

2.4.1. Extracción de DNA plasmídico por miniprep

La extracción de DNA plasmídico en la mayoría de los casos se realizó por miniprep casera (casos en los que no se requería una cuantificación exacta del producto), es así, que todas las soluciones utilizadas se prepararon en el Laboratorio Bolívar-Gosset. Esta técnica se fundamenta en la lisis alcalina de las células bacterianas, seguido de la re-naturalización selectiva del DNA plasmídico. Este fenómeno ocurre gracias a las diferencias topológicas entre el DNA plasmídico (molécula pequeña super-enrollada) y el DNA cromosomal (mas grande y menos enrollada). El procedimiento, aunque conlleva varios pasos consta de tres etapas.

a) Lisis alcalina de las bacterias

Antes de iniciar la lisis alcalina se agrega RNAasa en una solución tamponada, la cual sirve para degradar el RNA que pudiera ser un contaminante del DNA plasmídico. Las bacterias se lisan bajo condiciones alcalinas con una solución que posee SDS (dodecil sulfato de sodio) y NaOH (hidróxido de sodio). El SDS solubiliza a los fosfolípidos y a los

componentes proteicos de la membrana celular, lo que conduce a la lisis y a la liberación de los componentes celulares, mientras que las condiciones alcalinas dadas por el NaOH desnaturalizan al cromosoma y a los plásmidos, así como a las proteínas intracelulares.

b) Renaturalización selectiva por acetato de sodio anhidro

La renaturalización selectiva por el acetato de sodio, es realmente el paso clave en la extracción del DNA plasmídico. El pH bajo de la solución de acetato de sodio (pH 4.8) neutraliza al NaOH y cuando el pH vuelve a cerca de la neutralidad, entonces se renaturalizan las macromoléculas. Sin embargo, las proteínas y moléculas grandes de DNA no renaturalizan correctamente ya que se forman entre sí, inespecíficamente enlaces hidrofóbicos, iónicos y de hidrógeno, pues la conformación correcta de la molécula no se mantuvo durante la desnaturalización. Las moléculas de DNA plasmídico, no obstante, en realidad nunca estuvieron del todo desnaturalizadas, ya que son pequeñas moléculas circulares superenrolladas. A pesar de que los puentes de hidrógeno se rompieron por el pH alto, estos se pueden formar correctamente cuando se baja el pH. Las grandes moléculas de DNA (DNA cromosómico) y proteínas, precipitan, porque se unen entre sí en un agregado grande, no obstante, los plásmidos no precipitan porque renaturalizan correctamente y no forman parte de las moléculas grandes de múltiples agregados en forma de sal. De esta manera, el DNA plasmídico permanece en la solución.

c) Recuperación del sobrenadante

El DNA plasmídico está contenido en el sobrenadante, por lo que éste se recupera y posteriormente, se precipita con isopropanol. La pastilla que se obtiene se lava con etanol y en seguida se resuspende en una solución tampón baja en sales.

2.4.2. Purificación del producto de interés a pequeña escala

Para la purificación del plásmido pHN (modelo de vacuna de DNA) se empleó el kit comercial QIAquick de QIAGEN dado que presenta ciertas ventajas respecto a la

extracción por lisis alcalina (miniprep casera). En este caso, la principal característica por la cual se utilizó el kit, es por la pureza deseada del DNA plasmídico, lo que vuelve más confiables a los datos obtenidos de la cuantificación. El kit de purificación para plásmidos de QIAGEN se basa en la selectividad de una resina patentada, permitiendo la purificación del plásmido súper-enrollado, en forma ultra-pura, con altos rendimientos.

El protocolo de purificación de plásmidos de QIAGEN se basa en una modificación del protocolo de lisis alcalina, seguido por la unión del DNA plasmídico a la resina de intercambio iónico de QIAGEN en condiciones apropiadas de bajo contenido en sales y bajo pH. El RNA, las proteínas y las impurezas de bajo peso molecular se eliminan por medio de un lavado de sales. El DNA plasmídico se eluye en un buffer de alto contenido en sales y después se concentra y se desala mediante precipitación con isopropanol. Cada resina está diseñada para funcionar por gravedad, lo que reduce el tiempo de purificación.

2.4.3. Extracción de DNA cromosomal

La extracción del DNA cromosomal se realizó por simple ebullición. Esta técnica se fundamenta en la característica fisiológica de las bacterias Gram-negativas, las cuales poseen membranas celulares de fácil acceso para el rescate del material genético. En este caso, con una simple ebullición del paquete celular en agua, de 10 a 15 min es suficiente para liberar al cromosoma bacteriano (molécula de alto peso molecular).

Ya que las bacterias no suelen contener sustancias inhibitorias, este material no pasó por un proceso de purificación, únicamente se centrifugó después de la ebullición y el sobrenadante se recuperó en 200 μ L de agua MiliQ. En este caso, el uso del DNA cromosomal, fue para realizar la confirmación de las inactivaciones correspondientes por lo que no era necesario un proceso de lavado.

Un paso de purificación asegura la eliminación de posibles inhibidores en la reacción de PCR (reacción en cadena de la polimerasa), en este caso, cuando la reacción de PCR no dio positiva, lo que se hizo, fue diluir el material genético hasta concentraciones de 1:20 y de esta manera la PCR fue exitosa, dado que se diluyeron 20 veces los posibles contaminantes.

2.4.4. Transformación por electroporación

La electroporación es un método de transformación bacteriana que consiste en la administración de pulsos rápidos de una corriente eléctrica de gran voltaje (2500 Volts) a fin de producir poros transitorios en la membrana de la bacteria y volverla permeable al ingreso de DNA recombinante.

En todos los casos, en los cuales que se transformó con un plásmido de interés (pKD46, pCP20, pHN) o DNA lineal (producto de PCR), se utilizó electroporación, ya que en ninguno de los casos se obtuvieron resultados favorables con el método químico, que es a base de CaCl_2 , el cual es conocido, como de baja eficiencia. Para la transformación por electroporación se uso el *electroporator 2510* de la marca *ependorf*.

Previo a la transformación, es necesario dar de 3 a 5 lavados con "agua MiliQ" fría, a la pastilla de células, esto, con el fin de quitar algún excedente de sales que pudieran interferir con la electroporación, dando como resultado células inviables. Todos los cultivos electroporados fueron frescos, es decir, los lavados se realizaron al momento de electroporar.

En el caso exclusivo para la técnica de Datsenko, las cepas transformadas previamente con el plásmido pKD46 se incubaron en medio SOB y L-arabinosa (1 mM) a 30°C hasta una $\text{D.O}_{600\text{nm}}$ entre 0.6-1.0 ya que, este plásmido se induce por arabinosa.

La electroporación en todos los casos, se realizó empleando de 10-50 ng de DNA total y 100 μ L de la cepa a transformar. Las condiciones de operación fueron:

V (modo)=2500

C (capacitancia)=25 μ F

R (Resistencia)=200 Ω

t (duración del pulso)=5ms

Tiempo de carga = <8 seg

Temperatura 4°C

A las células electroporadas se les añadió 1 mL de medio SOC con glucosa, inmediatamente se incubaron de 3-5 h a una temperatura dependiente del material plasmídico, ya que en el caso de los plásmidos pKD46 y pCP20 se incubaba a 30°C, dado que los orígenes de replicación son termosensibles, y en el caso del plásmido pHN se hizo a 37°C en agitación constante a 300rpm. Finalmente se toman de 50-200 μ L del cultivo y se plaquean con el antibiótico respectivo a cada plásmido y a cada mutante.

2.4.5. Electroforesis de DNA en gel de agarosa

La electroforesis en gel de agarosa se basa, en la carga neta del DNA (carga negativa, dada por el fosfato unido al esqueleto de azúcar) como en el tamaño del fragmento (un tamaño particular para cada región de DNA amplificado). El concentrado de DNA cargado en el gel, se somete a un campo eléctrico, lo cual permite la migración de DNA hacia el ánodo. Dado que el gel es un polímero de agarosa con un tamaño de poro específico la velocidad de migración es inversamente proporcional a su tamaño. Así, mientras más pequeña es una molécula de DNA más fácilmente migrará a través del gel, por lo cual es posible identificar el tamaño del producto en comparación a un marcador de peso molecular conocido (1 kb).

La técnica de separación de moléculas o de fragmentos, por electroforesis en geles de agarosa, permite no solo identificar fragmentos de DNA, sino, obtenerlos del gel de agarosa para posteriores operaciones. En este caso particular, se hizo uso de un polvo de agarosa de bajo punto de fusión para la extracción del material genético.

2.4.6. Extracción de bandas de DNA en los geles de agarosa

Para recuperar fragmentos de DNA separados electroforéticamente, se empleó el kit comercial *High Pure PCR Product Purification* de Roche. Esta técnica posé cuatro etapas, las cuales incluyen.

- Solubilización en una solución tampón, del gel de agarosa que contiene el fragmento de DNA de interés.
- Filtración y eliminación de contaminantes de alto peso molecular. En esta etapa, el DNA se absorbe a la membrana de sílica en presencia de alta concentración de sales, mientras que el resto de los contaminantes pasan a través de la columna.
- Lavado de la columna para la eliminación eficiente de impurezas tales como: sales, nucleótidos sin incorporar, agarosa, bromuro de etidio, detergentes (DMSO).
- Elución del DNA con una solución Tampón Tris-HCl 10 mM a pH 8.5

2.4.7. Transducción con el bacteriófago P1vir

La transducción es el método de recombinación genética por el cual se introduce DNA exógeno en una célula por medio de un vector viral. Esta técnica, parte de la idea de contar previamente con una cepa que tenga la mutación deseada y de este modo pasarla a otra cepa mediante el fago P1 vir.

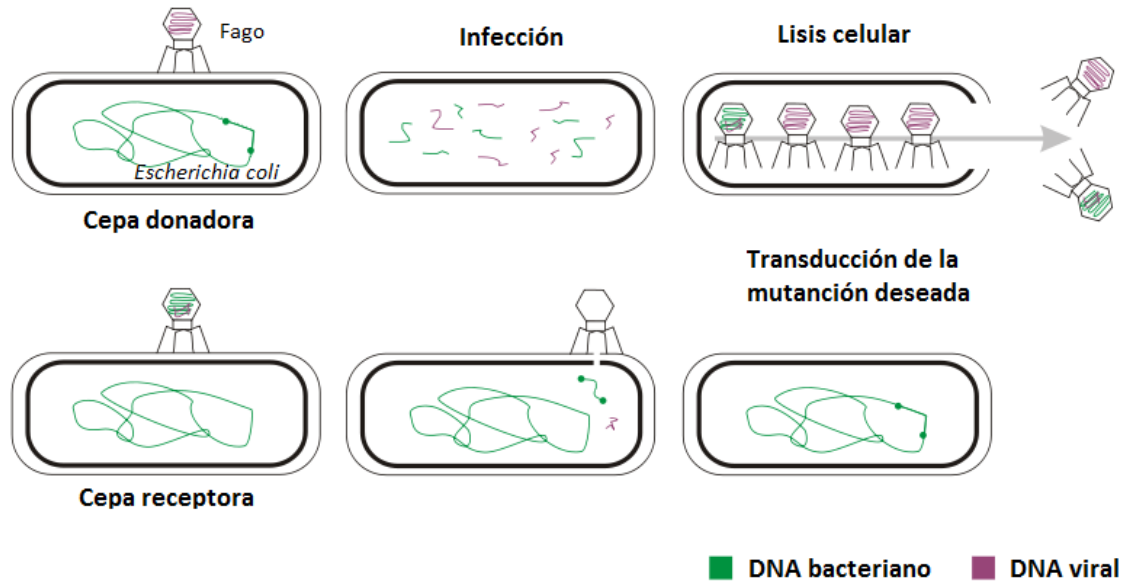


Figura 9. Esquema de la transducción general por el fago P1vir.

El bacteriófago P1 *HT int4* (Schmiege, 1972) se utilizó en este trabajo para introducir mutaciones en las cepas por recombinación homóloga. Este fago P1 presenta dos mutaciones *HT* e *int*, que le confiere respectivamente una elevada frecuencia de transducción, y una deficiencia en la integración del DNA del bacteriófago en el cromosoma de la cepa receptora, evitando así la lisogenia. El bacteriófago P1, se utilizó en este trabajo para la construcción de cepas con mutaciones en los siguientes genes; *ptsG* (glucosa), *manX* (manosa), *malX* (maltosa), *fruA* (fructosa), *bglF* (β -glucosidos), *nagE* (N-acetil-glucosamina), *galP* (galactosa), *mgIA* (galactosa). La técnica que se utilizó en este trabajo, es una modificación de la propuesta por Miller JH. en 1992. El fundamento se muestra en la figura 9.

La técnica se puede dividir en dos etapas. Previo a la transducción, se debe contar tanto con un lisado de fagos P1-, como de una cepa donadora (en nuestro caso, todas las cepas de *E. coli* donadoras fueron del banco de Keio, consultar la página de internet: <http://cgsc.biology.yale.edu/KeioList.php> o la Tabla 1) y una cepa receptora de la inactivación (cepa a la que se le introducirá la mutación).

1. **Obtención de lisado viral.** El fago P1- con ayuda de CaCl_2 (para la adsorción de fago), infecta a la cepa donadora (se llama así, porque en vez de contener el gen correspondiente al *locus*, se encuentra un *cassette* de resistencia, flanqueado por regiones homologas al gen nativo), quedando después de la infección, una cepa que contiene tanto fragmentos de DNA viral como fragmentos de DNA bacteriano. Posterior a esto, se empaqueta el material genético dentro de la cápside del virus y entonces, se degrada a la membrana de la célula, obteniendo un lisado que entre otros fragmentos, contiene el fragmento deseado (solo unos pocos fagos pueden transferir la resistencia).
2. **Transducción del gen de resistencia al gen blanco.** Una vez que se obtiene el lisado, se transduce a la cepa receptora, resultando en una recombinación homologa ya que los extremos del gen donado son homólogos con el gen que se desea inactivar. Posteriormente, se seleccionan las colonias de interés por el marcador de resistencia, que en todos los casos fue kanamicina.

En el presente trabajo se realizaron triples mutantes, muchas de ellas hechas por transducción generalizada, por lo que antes de hacer la siguiente eliminación del gen X, fue necesario eliminar el *cassette* de resistencia a Kanamicina, ya que todas las cepas donadoras se seleccionaron con kanamicina. Dicha metodología se describe más adelante.

2.4.8. Comprobación de las inactivaciones

En la Tabla 5 se enlistan los oligonucleótidos (oligos) empleados para la comprobación de las mutantes obtenidas por transducción, recordando que cada vez que se corroboró la correcta inactivación de una cepa, se comprobó al mismo tiempo que siguieran teniendo las deleciones anteriores. Para esto, se verificó que el tamaño del producto fuera el correspondiente a cada gen que se inactivó. Además, se diseñaron oligos (csgC Fwd – ymdA Rev) que permiten diferenciar a las cepas MG1655 de la W3110, ya que el producto de la W3110 es mayor (1858 pb), pues esta cepa tiene un elemento de inserción que la MG1655 no posee. En el Figura 10 se muestra el uso de los oligonucleótidos o primers.

Tabla 5. Secuencias de los oligonucleótidos para la comprobación de las inserciones cromosomales.

Gen	Nombre	Secuencia 5' -3'	Tamaño	No. de registro²/año
<i>ptsG</i>	ptsGF	CGC AGG TAA CCA CCG ATA AC	20	5349/2011
<i>ptsG</i>	ptsGR	GCA ACG CGC TAT ATT GCA GA	20	5350/2011
<i>manX</i>	manXF	ATC TGG CAC GTT GAC GTG TT	20	5351/2011
<i>manX</i>	manXR	TTG CCG TTA TCA GCA GCC TT	20	5352/2011
<i>malX</i>	malXF	AGC CAT GCA GAT GAC CTA CT	20	7149/2011
<i>malX</i>	malXR	AAC GGT CAG CGA CAT AAT CC	20	7150/2011
<i>fruA</i>	fruAF	CAC ATG CGC TAC GTG AAC AA	20	7151/2011
<i>fruA</i>	fruAR	CAT AGC ACG TCC TCT GGT AA	20	7152/2011
<i>bglF</i>	bglFF	GGA TTG TTA CCG CAC TAA GC	20	1414/2012
<i>bglF</i>	bglFR	AGG CAC CTT CCA CCT GAT TG	20	7148/2011
<i>nagE</i>	nagEF	CGT TGG CGG ATT AGG CAT CT	20	1343/2012
<i>nagE</i>	nagER	TGT TGG ATG CGA CGC TCA AG	20	1344/2012
<i>glk</i>	glk2F	CCG CCA GCA AGA CCG AGA AT	20	2039/2012
<i>glk</i>	glk2R	TCT ACC GCC GCT TCT TCC AG	20	2040/2012
<i>galP</i>	galPF	CGA TGC TGC CGG TCT GAA GT	20	5353/2011
<i>galP</i>	galPR	GTG TTG CGA CGC ACG GAT TG	20	5354/2011
<i>csgC</i>	csgCFwd	ACA ACG CGA CCG CTC ATC AG	20	1118/2011
<i>ymdA</i>	ymdARev	CGT CAC ATG CCG GTT CCA CA	20	1119/2011
<i>Km</i>	K1 ¹	CAG TCA TAG CCG AAT AGC CT	20	5759/2009
<i>Km</i>	K2 ¹	CGG TGC CCT GAA TGA ACT GC	20	5760/2009
<i>Cm</i>	C1 ³	TTA TAC GCA AGG CGA CAA GG	20	5761/2009
<i>Cm</i>	C2 ³	GAT CTT CCG TCA CAG GTA GG	20	5762/2009

1. K1 y K2 son oligonucleótidos internos del cassette de kanamicina descritos por Datsenko.

2. <http://www.ibt.unam.mx/sintesis/busquedas.html>, en esta página de internet se describe cada oligonucleótido.

3. C1 y C2 son oligonucleótidos internos del cassette de cloranfenicol descritos por Datsenko.

El diseño de los primers se realizó con el programa *Clone Manager Profesional Suite* versión 6 y se aceptaron solo aquellos oligos cuya T_m , según la fórmula termodinámica, estuviera en el rango de 50 a 70 °C y que además, no formaran estructuras secundarias con T_m superior a 37°C.

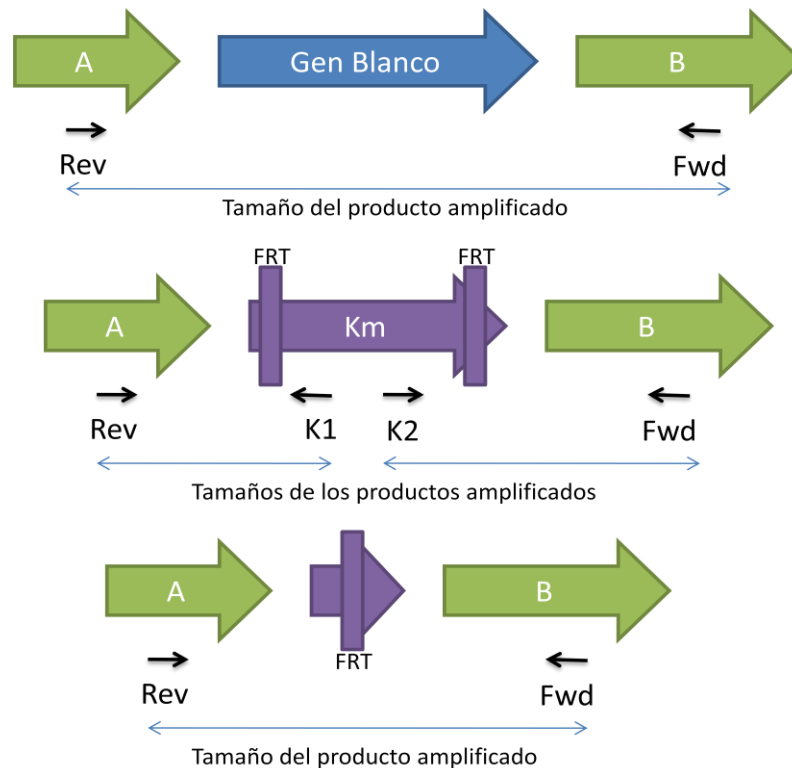


Figura 10. Dinámica de la comprobación de las inactivaciones cromosomales.

2.4.9. Técnica de mutagénesis sitio dirigida

Inactivación de genes cromosomales por productos de PCR

Con la metodología descrita por Datsenko y Wanner (2000) es posible reemplazar una secuencia cromosómica específica, por un gen de resistencia a antibiótico generado por PCR. Para esta técnica, se utilizan oligos con extensiones homólogas correspondientes al gen a inactivar. Estas extensiones, permiten la recombinación del producto de PCR mediante la recombinasa Red del fago λ en las regiones que flanquean al gen. Después de

la selección de las mutantes, la resistencia al antibiótico se puede eliminar utilizando un plásmido auxiliar que expresa la recombinasa FLP, actuando sobre las secuencias directas repetidas FRTs adyacentes al gen de resistencia.

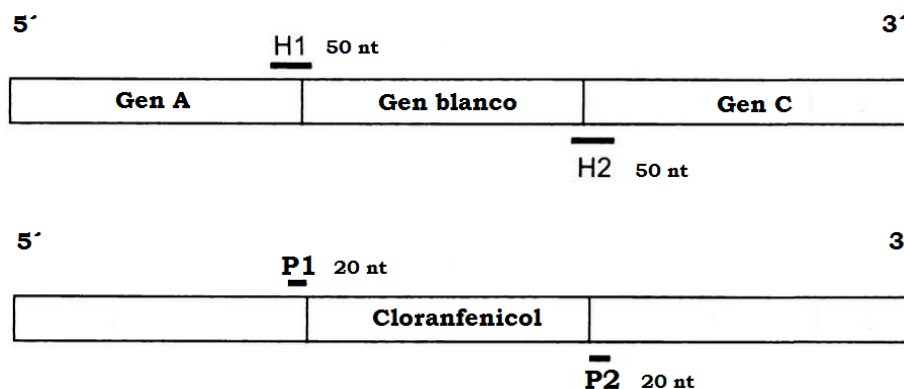
Esta metodología se puede dividir en seis secciones:

1. Diseño de oligonucleótidos

- a)** Se diseñaron oligonucleótidos específicos (denominados en los esquemas como H1-P1 y H2-P2) para la eliminación del gen deseado que incluyeron (Tabla 6):

En la secuencia 5' un fragmento homólogo al gen que se deseó eliminar (el fragmento homólogo tiene que ser adyacente a la secuencia de interés (H1 y H2) (50 nt)).

En el fragmento 3' una secuencia homóloga (20 nt) que ancló al vector pKD3 (Cm^R) para poder amplificar el gene de resistencia deseado (P1 y P2) y los sitios de reconocimiento FLP.



- b)** Diseño de oligonucleótidos específicos que flanquearon al gen de interés para comprobar la correcta inactivación (Tabla 7). La consideración adicional que se tomo, fue procurar que el tamaño del producto en un caso (cepa parental) y en el otro (cepa mutante) fuera distintos.

El diseño de H1 y H2 se realizó a partir de la misma premisa que lo hicieron los investigadores de la Universidad de Keio. A continuación se ejemplifica para el gen *ptsH*. Donde las regiones sombreadas en amarillo representan a cada uno de los oligos H. Como se puede inferir en la secuencia, con los oligos diseñados, al inactivar el gen *ptsH* sobre el DNA cromosomal de la bacteria, queda una región de 24 nt, que inicia con ATG y termina con TAA.

5' —————> 3'

CTAGACTTTA GTTCCACAAC ACTAAACCTA TAAGTTGGGG AAATACAatg TTCCAGCAAG
 AAGTTACCAT TACCGCTCCG AACGGTCTGC ACACCCGCC TGCTGCCAG TTTGTAAAAG
 AAGCTAAGGG CTTCACTTCT GAAATTACTG TGACTIONCAA CGGCAAAAGC GCCAGCGCGA
 AAAGCCTGTT TAAACTGCAG ACTCTGGGCC TGACTIONAAG TACCGTTGTG ACTATCTCCG
 CAGAAGGCGA AGACGAGCAG AAAGCGGTTG AACATCTGGT TAAACTGATG GCGGAACTCG
 AGtaaTTTCC CGGGTTCTTT TAAAAATCAG TCAC

Tabla 6. Secuencias de los oligonucleótidos empleados para las inactivaciones cromosomales.

Operón	Nombre	Secuencia 5'-3'	Tamaño	No. de registro ¹
<i>ptsHIcrr</i>	PTSF	CTA GAC TTT AGT TCC ACA ACA CTA AAC CTA TAA GTT GGG GAA ATA CAA TGG TGT AGG CTG GAG CTG CTT C	70	264/2012
<i>ptsHIcrr</i>	PTSR	ATG GGC GCC ATT TTT CAC TGC GGC AAG AAT TAC TTC TTG ATG CGG ATA ACA TGG GAA TTA GCC ATG GTC C	70	265/2012
<i>mgIABC</i>	mgIABCDtF	AGC ATT TAT CTC AAG CAC TAC CCT GCA TAA GAA AAA CCG GAG ATA CCA TGG TGT AGG CTG GAG CTG CTT C	70	3015/2012
<i>mgIABC</i>	mgIABCDtR	TTT ATG ACC GAA TGC GGA CCA CAT TCA CAT CAT TTC TTA CGC GCG TAT TTA TGG GAA TTA GCC ATG GTC C	70	3016/2012

1. <http://www.ibt.unam.mx/sintesis/busquedas.html>, en esta página de internet se describe cada oligonucleótido.

Las propiedades termodinámicas de los oligonucleótidos diseñados se calcularon con *Clone Manager Profesional Suite* versión 6. A los extremo 3' de los oligonucleótidos H1 y H2 se les añadieron las secuencias correspondientes a P1 (GTGTAGGCTGGAGCTGCTTC) y a P2 (CATATGAATATCCTCCTTAG) las cuales hibridan con el plásmido pKD3 (Cm).

Tabla 7. Secuencias de los oligonucleótidos para la comprobación de las inserciones cromosomales.

Operón	Nombre	Secuencia 5' -3'	Tamaño	No. de registro ¹
<i>ptsHIcrr</i>	cysK1	CGA TGT GGC GGT AAC AAT CT	20	1321/2011
<i>ptsHIcrr</i>	pdxK1	CCG CTT CAT AGC AGG TAT GT	20	1323/2011
<i>mgIABC</i>	mgIABF	GCT TCG GCG TTC AGT AAC AC	20	3017/2012
<i>mgIABC</i>	mgIABR	TAT GAC CGA ATG CGG ACC AC	20	3018/2012

1. <http://www.ibt.unam.mx/sintesis/busquedas.html>, en esta página de internet se describe cada oligonucleótido.

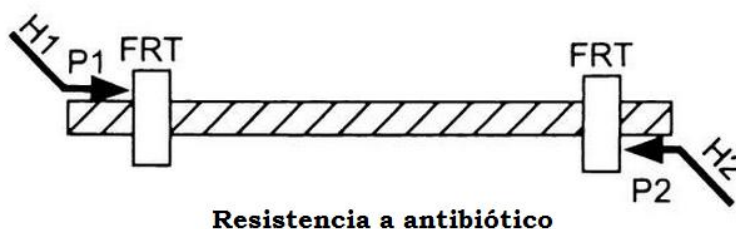


Figura 11. Región amplificada por PCR para Datsenko.

2. Productos de PCR

a) Amplificación por PCR de fragmentos lineales

Con los oligos diseñados anteriormente, se amplificaron productos lineales, utilizando como templado al plásmido pKD3 (Recordar que los oligos diseñados tienen 20 pb

homólogas a pKD3). Esto, con el objetivo de amplificar el cassette de resistencia, que deberá estar flaqueado por regiones homólogas al gen que se desea recombinar (H1 y H2) ver Figura 11.

b) Purificación de los fragmentos lineales amplificados por PCR

Una vez obtenidos los productos de PCR:

- Juntar los productos
- Digerir con la enzima de restricción *Dpn I* (esta enzima reconoce sólo sitios metilados de tal forma que cortará el plásmido que se uso como templado y no los productos de PCR, a la par se puede utilizar cualquier otra enzima que corte el plásmido pero no la región que se utilizará para inactivar).
- Enseguida de la digestión, correr un gel preparativo (con agarosa de bajo punto de fusión) y cortar la banda correspondiente; limpiar por kit para purificar banda del gel (metodología descrita anteriormente), eluir al final con H₂O caliente.
- Concentrar con vacío el producto de PCR purificado a una concentración final de 100 ng/μL
- Correr nuevamente un gel para verificar el producto purificado.

3. Transformación de la cepa de interés con el plásmido pKD46

Transformar a la cepa en donde se desea introducir la delección con el plásmido *Red Helper* pKD46 mediante electroporación (descrita anteriormente). Tener cuidado pues el plásmido es termosensible, manejar a 30°C; esta cepa transformada con pKD46 puede hacerse previamente y conservarse a -70°C.

4. Células electrocompetentes para la transformación de la cepa blanco

En este paso, la cepa blanco transformada con el plásmido pKD46 se vuelve a transformar pero ahora con el fragmento lineal (estrategia descrita anteriormente).

5. Eliminación del plásmido termosensible

Si las candidatas son positivas (crecimiento en Cm), tomar una asada de los gliceroles e inocular en LB sin antibiótico a 42°C, 300 rpm durante 16-20 horas.

6. Comprobación

Verificar la resistencia final de la mutante tomando una asada en el siguiente orden: en cajas de LB Cb¹⁰⁰ (NO deben crecer porque perdieron el pKD46), LB + antibiótico que se utilizó para inactivar (SÍ deben crecer), y LB sin antibiótico (SÍ deben crecer).

2.4.10. Estrategia, para la eliminación del cassette de resistencia las en mutantes

Es posible eliminar el cassette de resistencia de las mutantes siempre y cuando se haya empleado la técnica descrita por Datsenko o alguna modificación de ésta, pues las inactivaciones obtenidas poseen regiones FRT (Figura 11), las cuales son reconocidas por la recombinasa FLP. Esto hace posible que un marcador de selección pueda volver a ser usado, como es el caso del presente trabajo, donde se utilizó por lo general el cassette de kanamicina. Para lograr esto, se transformó con el plásmido pCP20 que codifica para la recombinasa FLP. Las células transformadas se sembraron en medio solido con Ampicilina a 30°C, y se incubaron durante 16 horas.

Las transformantes obtenidas se sembraron en medio solido no selectivo a 42°C para favorecer la pérdida del plásmido. Para finalizar, se comprobó por PCR la pérdida de la

resistencia con los oligonucleótidos específicos de cada inactivación, que en este caso flanquearon el *locus* del gen.

2.5. Sistemas de cultivo de *E. coli*

2.5.1. Medios de cultivo de uso general

Se utilizaron varios medios de cultivo durante la caracterización y construcción de las mutantes. En las siguientes tablas se menciona su composición.

LB (Sambrook *et al.*, 1989). Clásico, medio de cultivo líquido que se utilizó de forma rutinaria tanto para el crecimiento de las mutantes que serían almacenadas a -70°C (glicerol), como para los inóculos que fueron utilizados como pre-inóculos (Tabla 8).

Tabla 8. Medio LB.

Componente	g/L
Triptona	10
Extracto de levadura	5
NaCl	10

LB agar. Medio de cultivo utilizado para el crecimiento bacteriano en medio sólido. La composición de este medio, es la misma que la usada para la realización del medio LB, con la diferencia, que el medio LB agar, se suplementa con 15 g/L de agar para bacteriología.

LB agar blando. Medio empleado para la obtención y titulación de lisados fágicos. La composición es la misma que la del medio LB, pero éste es suplementado de 6-8 g/L de agar para bacteriología.

SOC (Hanahan *et al.*, 1991). Medio utilizado para la recuperación de células después de la electroporación (Tabla 9).

Agar-MacConkey. Medio selectivo y diferencial para la familia de las Enterobacteriaceae. Este medio se usó para caracterizar el consumo de glucosa de manera cualitativa de las mutantes generadas. (Tabla 10). En este medio de cultivo, las peptonas aportan los nutrientes necesarios para el desarrollo bacteriano, la glucosa es el carbohidrato fermentable, y la mezcla de sales biliares y el cristal violeta son los agentes selectivos que inhiben el desarrollo de gran parte de la flora Gram positiva. Por fermentación de la glucosa, disminuye el pH alrededor de la colonia. Esto produce un viraje del color del indicador de pH (rojo neutro), la absorción en las colonias, y la precipitación de las sales biliares. Los microorganismos no fermentadores de glucosa producen colonias incoloras o lo que es lo mismo, no consumen glucosa.

Tabla 9. Medio SOC.

Componente	g/L
Peptona tríptica de caseína	20
Extracto de levadura	5
NaCl	0.58
KCl	0.19
MgCl ₂	2.03
MgSO ₄	2.46
Glucosa	3.6

Tabla 10. Agar-MacConkey.

Componente	g/L
Peptona	20
Glucosa	10
Sales biliares	2.5
NaCl	5
Rojo neutro	0.05
Cristal violeta	0.001
Agar	15

2.5.2. Medio de cultivo usado para la caracterización del crecimiento

La cantidad y composición del medio de cultivo empleado para la caracterización de todas las cepas generadas se describe en la Tabla 11. Se uso el mismo medio de cultivo para los inóculos y para las cinéticas de crecimiento.

Tabla 11. Medio mineral M9 10X.

Componente	g/L
Na_2HPO_4	6
KH_2PO_4	3
NaCl	0.5
$(\text{NH}_4)\text{Cl}$	1
Tiamina-HCl	0.001
Kanamicina	0.03
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5
CaCl_2	0.01

En la preparación del medio de cultivo M9, primero se disolvieron las cantidades requeridas de sales tales como: Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 , $(\text{NH}_4)\text{Cl}$ y NaCl en un volumen adecuado de agua destilada. Se ajustó el pH a 7.2 con NaOH 10 M y posteriormente la solución se esterilizó en una autoclave por 20 min a 121 °C y 15 psi. Por separado, se prepararon soluciones stock de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1 M), y de CaCl_2 (1 M) las cuales se esterilizaron en las mismas condiciones que la sales. También, se prepararon soluciones stock de tiamina (30 $\mu\text{g/ml}$) y ampicilina (30 $\mu\text{g/ml}$), pero éstas se esterilizaron por filtración. En segundo lugar, se agregaron estos componentes ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, CaCl_2 y antibiótico) al medio mineral estéril, en las cantidades descritas. Finalmente, la concentración de glucosa puesta a la solución resultante, fue de 2.5 g/L proveniente de una solución stock de 200 g/L, anteriormente esterilizada.

2.5.3. Medio de cultivo para la obtención del producto de interés

La composición del medio de cultivo empleado para el cultivo de las cepas que se eligieron para producir el plásmido pHN se describe en la Tabla 12.

Tabla 12. Medio mineral PD 10X.

Componente	g/L
K_2HPO_4	17
KH_2PO_4	5.3
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2.5
$(\text{NH}_4)\text{Cl}$	1.0
Acido cítrico (citrato de sodio)	1.0
Tiamina-HCl	0.01
Ampicilina	0.1
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.0
Solución de elementos traza	4 mL/L (250X)

Para los inóculos y la cinética, el medio consistió de la misma composición y cantidad de nutrientes, con una concentración de glucosa de 2.5 g/L proveniente de una solución stock de 200 g/L, previamente esterilizada. Para la preparación del medio se disolvieron las cantidades requeridas de sales tales como: K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , $(NH_4)_2SO_4$, $(NH_4)Cl$ y citrato de sodio en un volumen adecuado de agua destilada. Además se ajustó el pH a 7.2 con NaOH 10 M, la solución se esterilizó en una autoclave por 20 min a 121 °C y 15 psi.

Por separado, se prepararon y se esterilizaron soluciones stock de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (1M), glucosa (200 g/L) y elementos traza (250X) (descrita en la Tabla 13) a 121°C y 15 psi por 20 min. De igual modo se prepararon soluciones stock de tiamina (30 µg/ml) y ampicilina (µg/ml) pero estas se esterilizaron por filtración.

Tabla 13. Elementos traza 250X.

Componente	g/L
Na EDTA	7.05
$CoCl_2 \cdot 7 H_2O$	1.25
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	7.5
$CuCl_2 \cdot 2 H_2O$	0.75
H_3BO_3	1.5
$NaMoO_4 \cdot 2H_2O$	1.05
$Zn (CH_3COO) 2 H_2O$	16.9
Citrato férrico	50.4

2.5.4. Antibióticos

Los diferentes medios de cultivo se suplementaron siempre con antibiótico correspondiente a cada mutante. Estos antibióticos se añadieron al medio estéril a partir de una solución concentrada conservada a -20°C. Todas las soluciones de antibiótico se esterilizaron por filtración, en una membrana de tamaño de poro de 0.22 µm marca

MILLEX[®] GV. En la Tabla 14 se muestran las concentraciones finales a los que fueron utilizados los antibióticos.

Tabla 14. Antibióticos empleados.

Antibiótico	Concentración en el medio (µg/ml)
Ampicilina (Amp)	100
Carbenicilina (Cb)	100
Cloranfenicol (Cm)	30
Kanamicina (Km)	30

Ampicilina (sal sódica): se preparó una solución concentrada a 100 mg/mL en agua bidestilada.

Carbenicilina: se preparó una solución concentrada a 100 mg/mL en agua bidestilada.

Cloranfenicol: Se preparó una solución concentrada de 30 mg/ml en etanol absoluto.

Kanamicina (Sulfato ácido): Se preparó una solución concentrada de 30 mg/ml en agua destilada.

2.5.5. Cultivos en matraz agitado

Los estudios de crecimiento de las cepas enlistadas en la Tabla 4 se realizaron por triplicado en matraces Erlenmeyer bafleados con capacidad de 250 mL, con un volumen de operación de 50 mL de medio de cultivo mínimo (M9 o PD), con 2.5 g/L de glucosa a 37°C y 300 rpm. Todos los cultivos se crecieron en la incubadora "New Brunswick Scientific classic series C24KC Refrigerated Incubator Shaker Edison NJ, USA". En condiciones de esterilidad, los medios minerales (M9 y PD) se inocularon con una cantidad de biomasa tal que la absorbancia inicial (600nm) del cultivo fuera de 0.10 ± 0.01 . Para la inoculación del matraz, se partió de un cultivo semilla crecido bajo las condiciones

mencionadas anteriormente y tomado siempre en fase exponencial. Cada cultivo semilla fue crecido por un tiempo dependiente de cada cepa, procurando que el cultivo semilla siempre llegara al final de la fase exponencial, en este caso la $D.O_{600}$ oscilaba entre 2.25 y 2.75 (nota: se procuraba tomar en este intervalo ya que si se tomaba a una D.O de 1 o arriba de 3 el cultivo sufría de fase lag o simplemente se retrasaba su crecimiento). El cultivo semilla provino de un cultivo (pre-inoculo) crecido en LB *overnight*.

2.6. Métodos analíticos para el seguimiento de los cultivos

2.6.1. Determinación de la biomasa

Medición de la absorbancia del cultivo

La concentración de biomasa se determinó en base a la densidad óptica medida a una longitud de onda de 600nm (Luz Visible) en un espectrofotómetro de la marca Beckman DU-70. Para esto, se extrajeron muestras del cultivo y se mezclaron en cantidades adecuadas con agua destilada para diluir a la concentración necesaria, esto es, entre 0.1 y 0.5 D.O (diluciones de 1:1 y 1:8 se tuvieron que realizar).

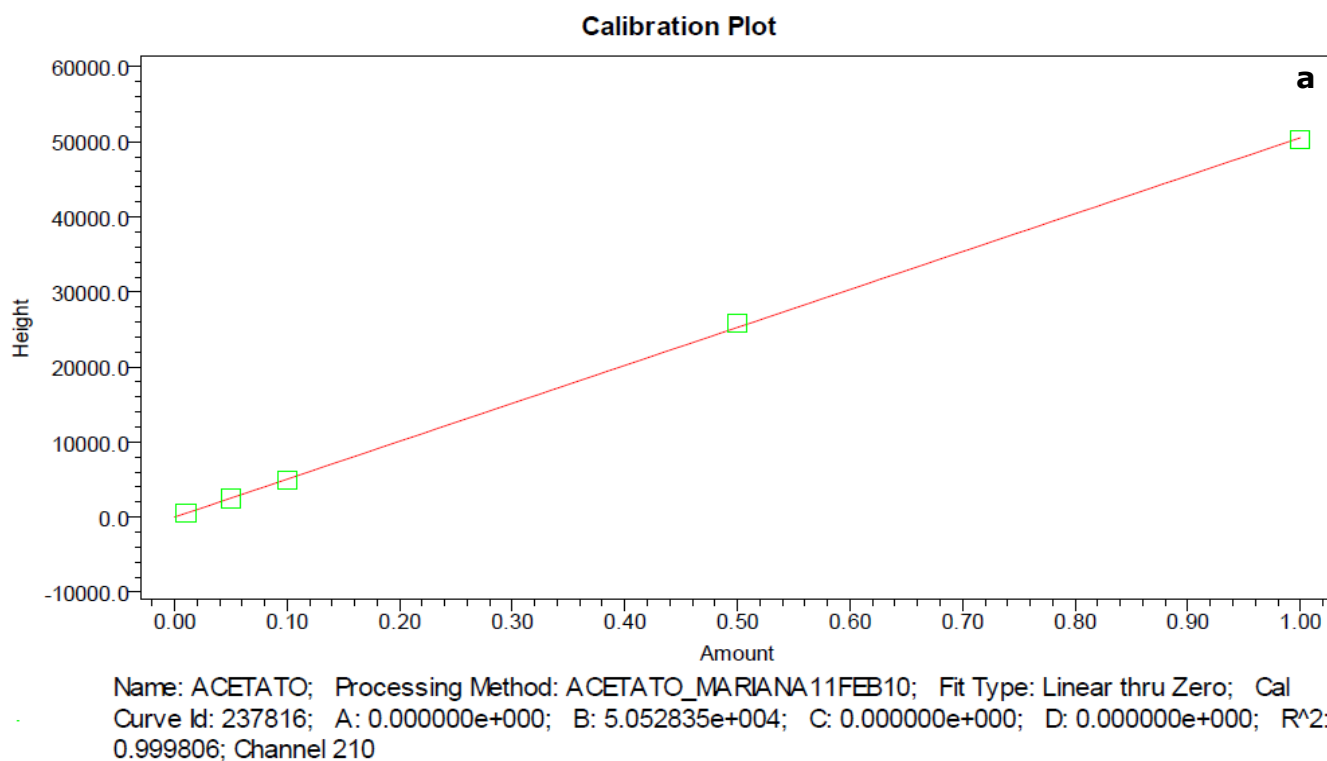
Dado que son cultivos de baja densidad celular, cuantificar la biomasa se vuelve inespecífico por la baja cantidad de biomasa obtenida y el error se hace más grande entre menor sea la cantidad analizada, por lo que, para obtener la cantidad de biomasa en cada punto de la cinética se utilizó una relación de, $1 \text{ D.O} = 0.37 \text{ g/L}$.

2.6.2. Cuantificación de la glucosa y el acetato por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Para determinar la concentración del acetato y de la glucosa extracelular, se tomaron muestras de 1 mL en tubos *ependorf* de los cultivos y después se centrifugaron por 5 min a 13 000 rpm. El sobrenadante se filtró por membranas Millipore Millex-HN de Nylon con tamaño de poro de $0.45 \mu\text{m}$. La cuantificación se realizó en un equipo de HPLC

equipado con detectores de índice de refracción (IR) y de fotoarreglo de diodos (UV), utilizando una columna de Aminex HPX 87H (Biorad). Como fase móvil, se utilizó una solución de H_2SO_4 5 mM a un flujo de 0.5 mL/min y a una temperatura de 50°C.

Se construyeron dos curvas estándar, una para el acetato y otra para la glucosa. Se utilizaron 5 concentraciones para la formación de estas rectas. En el caso de la curva de acetato la máxima concentración fue de 1 g/L y la mínima de 0.05 g/L, por otra parte, la máxima concentración de glucosa que se manejo fue de 3 g/L y la mínima de 0.01 g/L. Los datos se ajustaron a una recta que se hizo pasar por cero con un valor de $r^2 = 0.99$ (Figura 12). La cuantificación de los estándares sirvió para calcular las concentraciones de acetato y de glucosa de cada muestra. Las curvas estándar se muestran en la siguiente Figura (a y b).



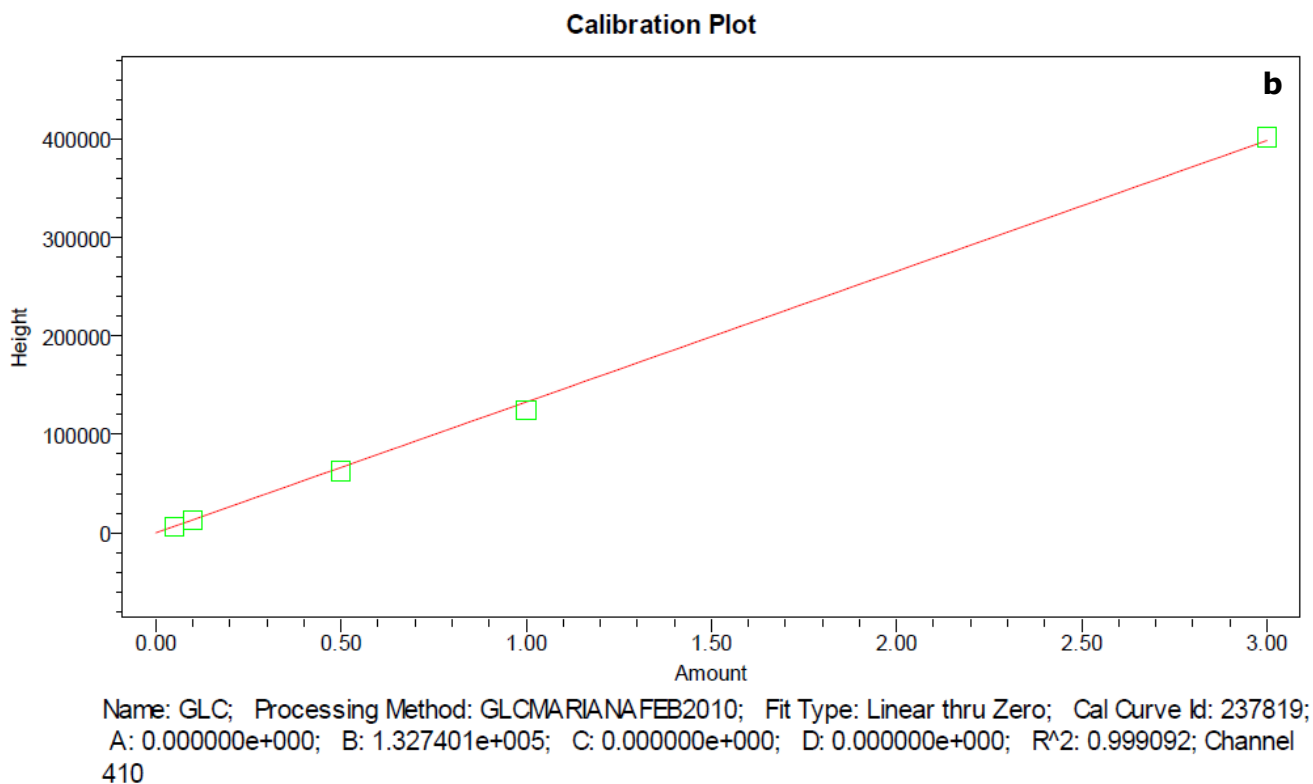


Figura 12. a) Curva estándar para la cuantificación de acetato, canal 210 b) Curva estándar para la cuantificación de glucosa, canal 410.

2.6.3. Cuantificación de DNA por nanodrop

Para la cuantificación del DNA tanto lineal como circular (pHN), se utilizó un espectrofotómetro con capacidad micro, el Nanodrop 2000c de Thermo SCIENTIFIC a una longitud de onda de 260nm.

2.7. Cálculos cinéticos y estequiométricos

Una vez que se ha realizado un experimento, es necesario determinar parámetros que nos indiquen la magnitud del cambio obtenido entre las mutantes y el control, por ello se determinaron los cálculos de la misma forma para cada mutante.

Los parámetros evaluados fueron: la velocidad específica de crecimiento (μ); el rendimiento biomasa/sustrato ($Y_{x/s}$), el rendimiento producto/biomasa ($Y_{p/x}$), la velocidad específica de consumo de sustrato (q_s), la velocidad específica de producción de acetato (q_{ac}), el producto al final del cultivo ($P_{m\acute{a}x}$) así como la productividad específica (q_p), los cuales se determinaron durante la fase de crecimiento exponencial. Las expresiones matemáticas que se emplearon para calcular estos parámetros se detallan a continuación.

2.7.1. Cálculo de los rendimientos

Los rendimientos $Y_{x/s}$, $Y_{p/s}$ y $Y_{p/x}$ durante la fase de crecimiento exponencial fueron calculados mediante la determinación de la pendiente en la grafica S (sustrato) contra X (biomasa), S contra P (producto) o X contra P, de manera correspondiente, como se muestra en la Figura 13.

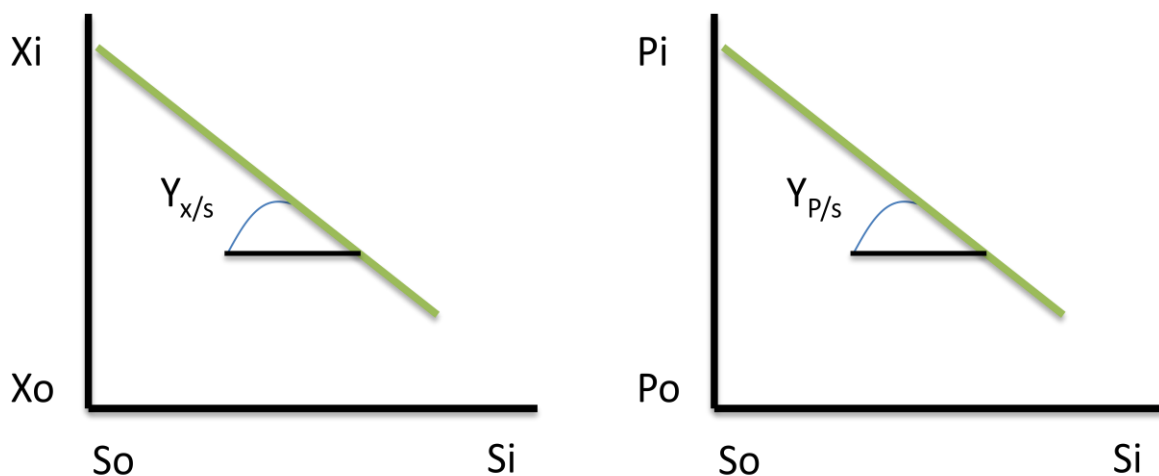


Figura 13. Cálculo de rendimientos.

2.7.2. Cálculo de las velocidades específicas de conversión

La velocidad específica de crecimiento se obtuvo durante la fase exponencial de crecimiento, mediante el cálculo por regresión lineal ($\ln x = \mu t + \ln X_0$), esto es, graficando

el logaritmo natural de la concentración de biomasa contra el tiempo. Donde la pendiente representa la velocidad de crecimiento. El método de mínimos cuadrados obtenidos en todas la cinéticas mostró correlaciones mayores o iguales a 0.97.

Las velocidades específicas de consumo de sustrato, producción de acetato y productividad específica se calcularon con las siguientes ecuaciones:

$$q_s = Y_{x/s} \cdot \mu$$

$$q_{ac} = Y_{x/ac} \cdot \mu$$

$$q_p = Y_{p/x} \cdot \mu$$

2.7.3. Uso de ANOVA

El análisis de ANOVA (análisis de varianza), se basa en el planteamiento de dos hipótesis, la hipótesis nula (H_0) y la hipótesis alternativa (H_a), que en nuestro caso fueron las siguientes:

H_0 : $\mu_1 = \mu_2$; No hay diferencia entre los promedios de las velocidades de crecimiento

H_a : $\mu_1 \neq \mu_2$

Es así, que mediante este análisis, se pudo determinar, si la diferencia del parámetro evaluado que se obtuvo entre los dos experimentos, se debió a un cambio por el tratamiento, o si se debió a un error experimental o dato atípico, teniendo en cuenta que el nivel de significancia, α (el valor α nos muestra la probabilidad de haber obtenido realmente el resultado que hemos obtenido *si suponemos que la hipótesis nula es cierta*) tomado para este experimento, fue de 0.05.

Hay que saber, que el cambio siempre será significativo desde el punto de vista estadístico y el experto en la materia deberá determinar, si ese cambio realmente es significativo en su área de trabajo, pues una diferencia que es altamente significativa puede ser de ninguna significancia práctica. Con este tipo de planteamientos, podemos cometer el error de tipo I. Este error se comete cuando el investigador no acepta la hipótesis nula (H_0) siendo ésta verdadera en la población. Es equivalente a encontrar un resultado falso positivo.

Antes de realizar el análisis de varianza se comprobó el supuesto de normalidad de cada uno de los datos, que la desviación estándar de las poblaciones fueran iguales y además, se aseguró que las muestras fueran independientes.

Se usó esta herramienta estadística por cada dos bloques experimentales de tres muestras independientes cada uno; en este caso, el parámetro evaluado fueron las velocidades de crecimiento, donde se comparó, el control (antes de la mutación) y el experimental (después de la mutación).

El programa usado para calcular el ANOVA fue el paquete estadístico NCSS 2000.

Resultados y discusión

3.1. Estudio de la respuesta cinética y estequiométrica resultante de las inactivaciones en proteínas PTS en cepas de *E. coli* derivadas K-12

3.1.1 Comparación de las velocidades de crecimiento en tres cepas de *E. coli* cuando se han inactivado los genes de transporte *ptsG* y *manX*

Para caracterizar fenotípicamente a una bacteria, es necesario conocer las mutaciones que pudieran tener un efecto sobre la respuesta cinética y estequiométrica, aunque en ocasiones hacer una relación entre el genotipo y el fenotipo no es tan sencillo, o simplemente no es claro. Es común elegir para un proyecto de ciencia básica, a las cepas que están descritas genéticamente por completo y que se han mantenido en el laboratorio con un mínimo de manipulación genética. Es el caso de las cepas K-12, que solo se les ha curado al bacteriófago λ y al plásmido F por luz ultra violeta y anaranjado de acrilamida, respectivamente. Gracias a la secuenciación de la cepa MG1655, ahora se sabe que estos tratamientos resultaron en una mutación que corrió el marco de lectura al final del gen *rph*, causando la baja expresión del gen *pyrE* y en consecuencia una disminución en la síntesis de las pirimidinas. Además, la mutación en *ilvG* inactivó en todas las k-12 aisladas, una de las vías de síntesis de valina (Blattner *et al.*, 2011).

En este trabajo, se estudió el efecto que tiene la delección de los genes *ptsG* y *manX* sobre el consumo de glucosa en varias cepas derivadas K-12. En las cepas W3110, MG1655 y BW25113, se inactivó por remoción a los genes *ptsG* y *ptsG*, *manX*. Se caracterizó en la cepa parental y en las mutantes generadas, la cinética de crecimiento y la estequiometría del consumo de la glucosa y la producción de acetato y de biomasa celular. Los datos se presentan en la Tabla 15. Estos resultados se obtuvieron en medio mineral M9 con 2.5 g/L de glucosa como única fuente de carbono y energía. En la Figura 14, se puede observar el comportamiento cinético de cada mutante y de su cepa parental.

En las cepas BW25113 y MG1655, al eliminar el gen *ptsG*, la velocidad de crecimiento disminuye alrededor de un 71%. Por otra parte, al inactivar el gen *manX* (además del gen *ptsG*) en ambas cepas, se observó un aumento en la velocidad de crecimiento con respecto a la mutante sencilla, $\Delta ptsG$. El aumento en la μ de la mutante sencilla respecto a la doble en el fondo genético MG1655 fue de 35%, mientras que en el fondo BW25113, el aumento en la μ fue de un poco más que el triple.

Los resultados con las cepas BW25113 y MG1655 indican que la inactivación del gen *manX* en el fondo $\Delta ptsG$, beneficia al crecimiento. Este dato sugiere, que cuando el gen *manX* ya no está presente en la mutante $\Delta ptsG$, $\Delta manX$, entonces otros genes relacionados con el transporte de glucosa se activan, y lo hacen de tal manera que superaran el crecimiento de la mutante sencilla, $\Delta ptsG$. Para tratar de explicar este efecto en las cepas derivadas K-12, se necesita del apoyo de otro tipo de estudios, como transcriptómica, con el objetivo de poder saber cuánto y cuáles son los genes que se inducen en cada condición genética respecto a la cepa de referencia.

Por otra parte, la única cepa con las inactivaciones en *ptsG* y *ptsG*, *manX* que mostró un comportamiento similar a la cepa de referencia (AF1000) fue la cepa W3110 (Picon *et al.*, 2004; Bäcklund *et al.*, 2008), es decir, que al inactivar secuencialmente los genes relacionados al transporte de glucosa, fue disminuyendo la velocidad de crecimiento. En el caso de la cepa AF1000 (0.69 h^{-1}) se observó que cuando se inactiva al gen *ptsG*, la μ es de 0.46 h^{-1} mientras que la μ de la doble mutante fue de 0.13 h^{-1} . A diferencia de la cepa AF1000, en el fondo genético W3110, la velocidad de crecimiento de la doble mutante disminuyó en un 45% con respecto a la cepa silvestre.

Tomando en cuenta datos de la literatura, se esperaba que la tendencia en todas las mutantes fuera similar a la obtenida en el fondo genético W3110, es decir, que el inactivar los genes *ptsG* y *manX* en una cepa, condujera a una mayor disminución en la velocidad de crecimiento con respecto a la silvestre y a la mutante sencilla $\Delta ptsG$ (Picon *et al.*,

2004; Bäcklund *et al.*, 2007; Jantama, 2010; Ohta *et al.*, 2012). Se conoce que el complejo proteico del PTS, ManXYZ tiene afinidad por la glucosa ($K_M = 15 \mu\text{M}$), en el rango de la proteína PtsG ($K_M = 3-10 \mu\text{M}$). Además, el complejo ManXYZ tiene una alta velocidad de transporte de glucosa ($V_{\text{máx}} = 72 \mu\text{mol/min g}$), un poco más de la mitad de la velocidad de transporte que la proteína PtsG ($V_{\text{máx}} = 126 \mu\text{mol/min g}$), por lo que, el complejo ManXYZ pudiera ser un importante transportador de glucosa en ausencia de PtsG, y en consecuencia de su inactivación en una mutante $\Delta ptsG$, la μ debería verse afectada.

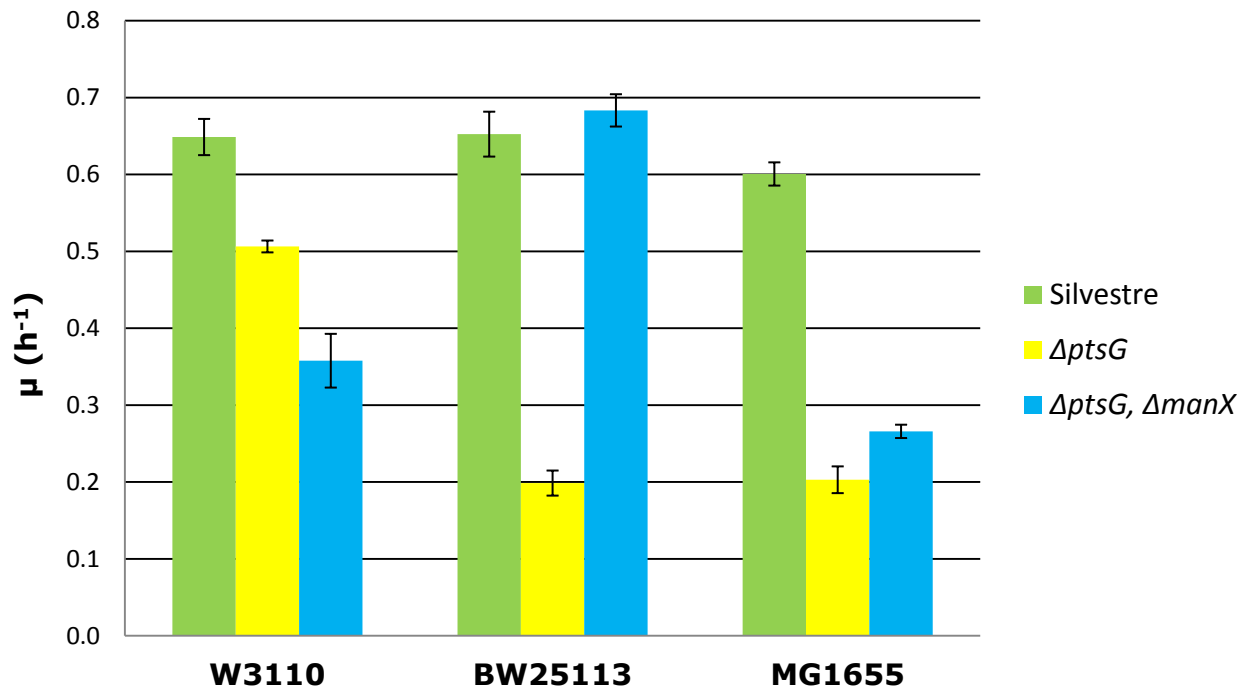


Figura 14. Comparación de las velocidades de crecimiento de las cepas; W3110, BW25113 y MG1655 cuando se ha inactivado el gen *ptsG* y los genes *ptsG*, *manX*.

La comparación de las velocidades de crecimiento de estas cepas, aborda una cuestión biológica fundamental: ¿Cuánta diversidad de respuesta puede haber a nivel de una especie, aún cuando las cepas se encuentran estrechamente relacionadas? como es el caso de W3110 y MG1655 (Vijayendran *et al.*, 2006).

De acuerdo con un análisis comparativo de los genomas completos de las cepas k-12 W3110 y MG1655 existen 8 diferencias significativas. Inserciones en cuatro genes de la cepa W3110, posiblemente afecten el metabolismo sobre el galactitol (*gatA*), el succinato (*dcuA* y *dcuC*), el uso del triptófano (*tnaB*) como fuente de carbono, y la biosíntesis de polisacáridos (*rscC*).

Un cambio de un solo aminoácido en la región de unión con el cAMP, el DNA o la RNA polimerasa del regulador Crp, pudiera explicar el efecto observado en la velocidad de crecimiento de la mutante $\Delta ptsG$, $\Delta manX$ en el fondo MG1655, ya que la expresión de genes asociados a Crp (genes de transporte de sustrato como *manX*, *galP*, *nagE* entre otros) pudiera ser diferente en una cepa y en otra. Sin embargo, la sustitución en Crp de lisina por treonina afecta a un residuo que no está involucrado en la unión con otras moléculas (Hayashi *et al.*, 2006; Vijayendran *et al.*, 2007). Cuando a las cepas se les somete a stress por la inactivación de genes asociados al transporte de glucosa (en nuestro caso, a la inactivación de *ptsG* y *manX*), la modificación de una sola base en Crp, podría ser la respuesta al distinto fenotipo observado.

Por otra parte, en la cepa W3110, el cambio de una base en el gen *rpoS* (factor σ) provocó la terminación temprana de su transcripción (mutación ambar). La transición de una base, ocasionó la disminución en la actividad del regulador maestro de la respuesta general a stress (factor de la RNA polimerasa).

El factor σ regula alrededor de 100 genes, de los cuales, muchos están involucrados con sistemas de transporte (transporte de tipo ABC), enzimas del metabolismo central (glucólisis y TCA), enzimas de la respiración aerobia y anaerobia y proteínas asociadas al transporte de electrones (Patten *et al.*, 2004). La mutación en el factor σ , lograría generar diferencias en los niveles de transcrito y en la cantidad de proteína sintetizada. Esto, puede alterar de alguna manera las redes regulatorias, la cantidad de los metabolitos

disponibles y las condiciones energéticas, dando como resultado una respuesta diferente entre las mutantes generadas, en este caso nos referimos a las cepas MG1655 y W3110.

3.1.2. Comparación de los parámetros cinéticos y estequiométricos de tres cepas de *E. coli* cuando se han inactivado los genes *ptsG* y *manX*

En la Tabla 15 se presentan los resultados de las cepas W3110, MG1655, BW25113 y de las mutantes en $\Delta ptsG$ y $\Delta ptsG, \Delta manX$. Se reporta la μ , la q_s , la velocidad de producción de acetato (q_{ac}) y el rendimiento de biomasa sobre sustrato ($Y_{x/s}$).

Hay varios aspectos importantes a resaltar de la respuesta a las inactivaciones en genes de transporte de sustrato en las cepas K-12 (Tabla 15). La μ disminuyó o aumentó conforme lo hizo la q_s de manera lineal. La q_{ac} fue mayor para la cepa parental MG1655 respecto a la cepa W3110 (aun cuando la q_s fue mayor en la cepa parental W3110). La cepa BW25113 mostró la mayor velocidad de producción de acetato, pero también fue la que tuvo mayor velocidad de consumo de sustrato. Y, el $Y_{x/s}$ para cada cepa y mutantes fue similar.

La cepa W3110 mostró un rendimiento de acetato sobre sustrato $Y_{ac/s} = 0.14 \text{ g}_{ac}/\text{g}_s$, la cepa MG1655 tuvo un $Y_{ac/s} = 0.20 \text{ g}_{ac}/\text{g}_s$, y la cepa BW25113 mostró un $Y_{ac/s} = 0.28 \text{ g}_{ac}/\text{g}_s$. Lo que nos indica, que la cepa W3110 produce la menor cantidad de acetato (0.14 g) a partir de un gramo de glucosa respecto a las otras dos cepas evaluadas. Por otra parte, si calculamos el rendimiento de acetato sobre biomasa ($Y_{ac/x}$) las relaciones cambian. La cepa W3110 mostró un $Y_{ac/x} 0.44 \text{ g}_{ac}/\text{g}_x$, la cepa MG1655 tuvo un $Y_{ac/x} 0.44 \text{ g}_{ac}/\text{g}_x$, y la cepa BW25113 mostró un $Y_{ac/x} 0.72 \text{ g}_{ac}/\text{g}_x$. Esto sugiere, que la cepa W3110 y la cepa MG1655 tienen un sobre-flujo metabólico similar, ya que 1 gramo de biomasa produce la misma cantidad de acetato. Por otro lado, este dato nos indica que la cepa BW25113 produce casi el doble de acetato con la misma cantidad de biomasa. Finalmente, con respecto al $Y_{x/s}$ se puede observar que prácticamente las tres cepas dirigen la misma cantidad de glucosa a biomasa durante todo el cultivo.

Del análisis anterior, podemos predecir que la q_s en la cual ya no se detectará acetato es similar en las cepas MG1655 y W3110, dado que observamos que el sobre-flujo metabólico es igual para estas cepas. Por otra parte, la q_s en la cual ya no se detectará acetato en el fondo BW25113, es más baja respecto a las otras dos cepas evaluadas.

Tabla 15. Parámetros cinéticos y estequiométricos de las mutantes $\Delta ptsG$ y $\Delta ptsG$, $\Delta manX$. Todos los parámetros fueron calculados durante la fase exponencial de crecimiento. Los símbolos \pm se refiere a la desviación estándar de los experimentos individuales por triplicado.

Cepa	Características	μ (h^{-1})	q_s (g/g h)	q_{ac} (g/g h)	$Y_{x/s}$
MG1655	λ -, <i>rph-1</i>	0.60 ± 0.02	1.37 ± 0.14	0.28 ± 0.02	0.44 ± 0.03
MG	MG1655 $\Delta ptsG::Km$	0.20 ± 0.02	0.49 ± 0.08	0.00 ± 0.00	0.43 ± 0.04
MGM	MG $\Delta manX::Km$	0.27 ± 0.01	0.67 ± 0.01	0.00 ± 0.00	0.40 ± 0.01
BW25113	F-, $\Delta(araD-araB)567$...	0.65 ± 0.03	1.74 ± 0.16	0.48 ± 0.03	0.38 ± 0.02
BG	BW25113 $\Delta ptsG::Km$	0.20 ± 0.02	0.60 ± 0.03	0.00 ± 0.00	0.33 ± 0.04
BGM	BG $\Delta manX::Km$	0.68 ± 0.02	1.78 ± 0.19	0.41 ± 0.05	0.35 ± 0.05
W3110	λ -, $IN(rrnD-rrnE)1$, <i>rph-1</i>	0.65 ± 0.02	1.62 ± 0.05	0.23 ± 0.02	0.40 ± 0.00
WG	W3110 $\Delta ptsG::Km$	0.51 ± 0.01	1.27 ± 0.15	0.08 ± 0.06	0.46 ± 0.13
WGM	WG $\Delta manX::Km$	0.36 ± 0.03	0.79 ± 0.06	0.00 ± 0.00	0.46 ± 0.06

En relación a la producción de biomasa, en la mayoría de las cepas y mutantes, no se observó cambio alguno (Figura 15), aun cuando se esperaba que el rendimiento de biomasa aumentara al eliminar la producción de acetato. Se ha reportado en múltiples trabajos que al disminuir la velocidad de consumo de sustrato el rendimiento de biomasa aumenta, sin embargo, bajo las condiciones de trabajo de este proyecto (2.5 g/L de glucosa como una fuente de carbono y energía) no observamos tal efecto (Luli y Strohl, 1990; Picon *et al.*, 2004; Backlund *et al.*, 2011). Esto se puede deber principalmente, a que la concentración de acetato (0.3 g/L para la W3110) producida por la bacteria en la cepa silvestre no es inhibitoria para el crecimiento, por lo que la tasa de generación de biomasa es constante para todas las cepas y mutantes. De estos resultados podemos

concluir que a bajas concentraciones de glucosa la poca producción de acetato no afecta la generación de la biomasa celular y que una baja concentración de acetato le permite a la bacteria asimilar la pérdida de carbono al final del cultivo.

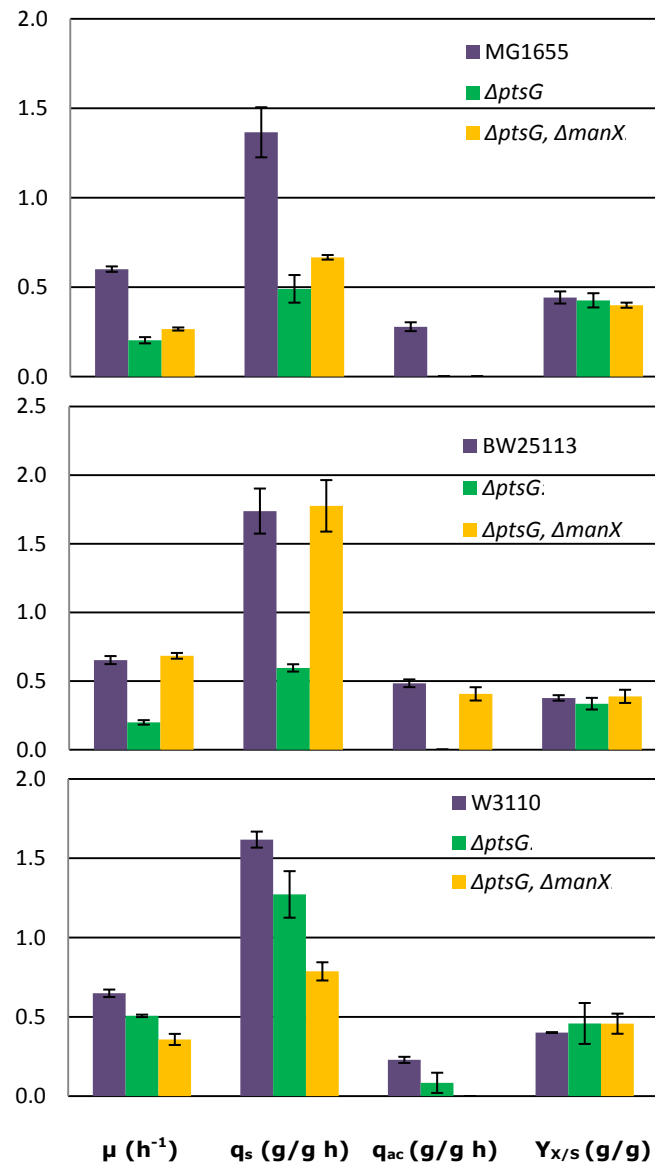


Figura 15. Parámetros cinéticos y estequiométricos de las cepas y mutantes en MG1655, BW25113 y W3110.

A pesar de que las velocidades de crecimiento, ante la misma delección fueron diferentes en cada cepa, se observó una relación lineal entre la velocidad de crecimiento y la velocidad específica de consumo de glucosa con alta correlación ($r^2 = 0.97$) (Figura 16). La relación que se encontró fue $q_s = 2.5\mu$. Esta correlación muestra que aun cuando la inactivación de *ptsG* y *manX* fue diferente para las tres cepas, la μ siguió dependiente de la velocidad de consumo de sustrato; por lo que la doble mutante BW25113, $\Delta ptsG$, $\Delta manX$ presenta un crecimiento igual al de la silvestre, a costa de un consumo de glucosa similar.

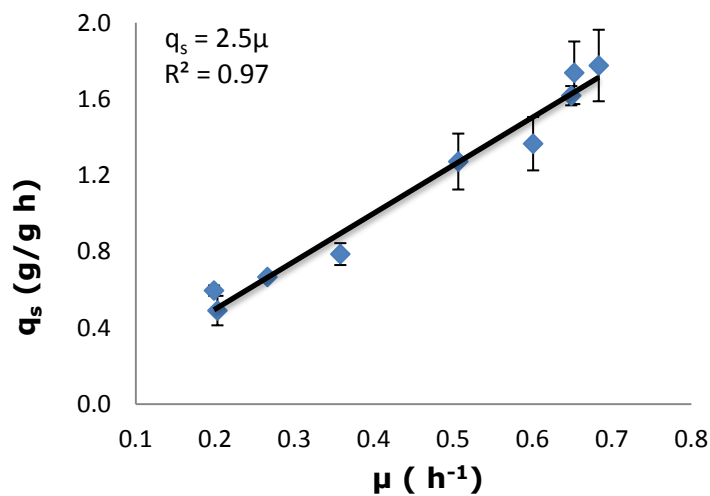


Figura 16. Relación existente entre la velocidad de crecimiento y el consumo de sustrato de las cepas evaluadas en los tres fondos genéticos BW25112, MG1655 y W3110.

Después del análisis en las tres cepas k-12, se decidió seguir estudiando a la cepa W3110 por varias razones sencillas. Una, porque su comportamiento cinético después de la doble inactivación se puede explicar y es similar a la cepa de referencia, también, porque es la cepa que produce menor cantidad de acetato respecto a las otras dos cepas evaluadas y finalmente, porque es una cepa ampliamente estudiada en nuestro Laboratorio.

3.1.3. Delección de algunas proteínas pertenecientes a diferentes complejos del PTS en la cepa W3110, $\Delta ptsG$, $\Delta manX$

Para determinar si otras proteínas del PTS son capaces de transportar glucosa en la mutante W3110, $\Delta ptsG$, $\Delta manX$ se construyeron y caracterizaron tres mutantes

($\Delta ptsHIcrr$, $\Delta ptsG$, $\Delta manX$, Δglk y $\Delta ptsHIcrr$, Δglk), la comparación de sus velocidades de crecimiento se muestra en la Figura 17.

Se realizaron dos planteamientos dependientes uno del otro:

1. Si la mutante $\Delta ptsG$, $\Delta manX$, Δglk crece a una $\mu > 0$, entonces existe(n) otras proteínas del PTS además de *ptsG* y *manX* que son capaces de transportar a la glucosa. Al inactivar a la glucocinasa (*glk*) se pierde la capacidad de fosforilar a la glucosa que se internalizó por algunas proteínas no dependiente del PTS. Por lo que el consumo y la fosforilación de la glucosa en la mutante $\Delta ptsG$, $\Delta manX$, Δglk sería dependiente de las proteínas del PTS. Este planteamiento, es únicamente válido cuando se hace el supuesto de que no existe la inducción de alguna cinasa afín por la glucosa que pueda fosforilar a este sustrato transportado por las proteínas de tipo no-PTS.
2. Por otro lado, si la μ en la mutante $\Delta ptsG$, $\Delta manX > \Delta ptsHIcrr$, entonces la diferencia en la μ podría deberse a la contribución de proteína(s) del PTS y posiblemente de proteínas no-PTS. Esto es, porque cuando se inactiva al operón completo (*ptsHIcrr*) ninguna proteína del PTS puede ser funcional debido a que el grupo fosfato no puede ser transportado del fosfoenolpiruvato a las enzimas EI y HPr, por consiguiente a ninguna proteína del PTS. Por ello la contribución a la entrada de carbono en la mutante $\Delta ptsHIcrr$ sería únicamente de las proteínas no-PTS. En cambio, en la condición genética $\Delta ptsG$, $\Delta manX$, Δglk , son funcionales 18 complejos del PTS, por lo que es probable que alguno de ellos sea activo cuando únicamente se inactiva a *ptsG* y *manX*.

Después de comparar la velocidad de crecimiento de las mutantes, podemos dar respuesta a los planteamientos enunciados (Figura 17). 1) La mutante $\Delta ptsG$, $\Delta manX$, Δglk mostró una μ de 0.41 h^{-1} , lo que nos indica, que hay uno o varios complejos del PTS que pueden ser capaces de internalizar y fosforilar a la glucosa. 2) la velocidad de crecimiento de la mutante $\Delta ptsG$, $\Delta manX$ fue ligeramente mayor a la de la mutante

$\Delta ptsHIcrr$ por lo que esto nos sugiere, que existe una pequeña contribución de transporte de glucosa de otro u otros complejos del PTS en la mutante $\Delta ptsG, \Delta manX$.

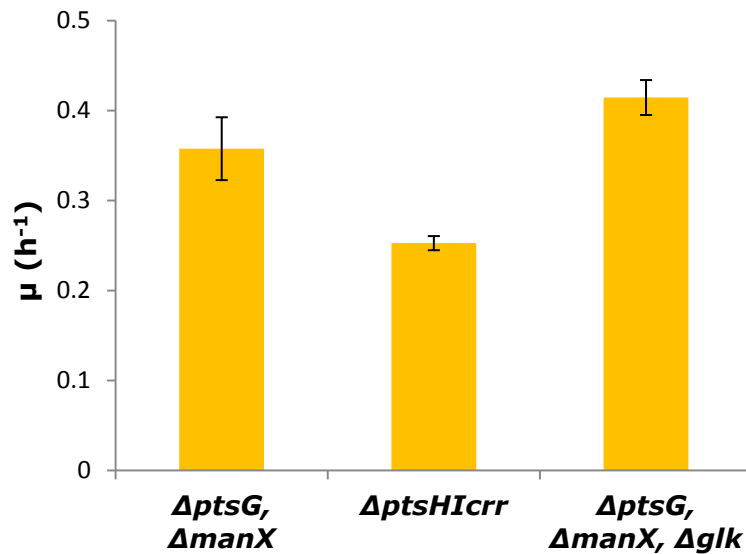


Figura 17. Velocidades de crecimiento de las mutantes relacionadas con el transporte de glucosa.

Con respecto a la velocidad de crecimiento de la mutante $\Delta ptsG, \Delta manX, \Delta glk$, ésta creció más de lo esperado. Idealmente, la inactivación en *glk* debió haber disminuido la velocidad de crecimiento respecto a la mutante $\Delta ptsG, \Delta manX$. La razón es que en la triple mutante, además de que se han inactivado a los principales componente del PTS con mayor afinidad por la glucosa, se inactivó a la proteína encargada de la fosforilación de la glucosa que es internalizada por proteínas no-PTS. La explicación que encontramos para el crecimiento anormal de esta mutante, es la posible sobre expresión de proteínas del PTS que son capaces en conjunto de translocar a la glucosa a una mayor velocidad de transporte que ManX y además, cabe la posibilidad de que se halla activado alguna cinasa de baja afinidad por la glucosa y esto ayude a un crecimiento mayor (Arora y Pedersen, 2005).

Los datos anteriores sugieren la posibilidad de que algunos complejos del PTS están contribuyendo al consumo de glucosa en la mutante $\Delta ptsG, \Delta manX$. En este caso, se

realizó la inactivación independiente de cuatro genes que codifican para proteínas (MalX, BglF, FruA y NagE) del PTS en la doble mutante. En la Tabla 16 se enlista brevemente el por qué se eligieron a estas proteínas de los 18 complejos proteicos restantes del PTS.

El análisis inicial se enfocó en las proteínas transmembranales que pertenecen a la familia de la glucosa (maltosa, MalX; N-acetil-glucosamina, NagE; trealosa, TreB y β -glucosidos, BglF) pues de acuerdo con la clasificación descrita en la Tabla 1 (Reiner, 1977; Saier *et al.*, 1988; Lengeler *et al.*, 1990; Buhr *et al.*, 1992; Saier y Reizer, 1992) estos complejos proteicos tienen entre sí, alta identidad en su secuencia de aminoácidos con respecto al componente IIBC^{Glc}. Sin embargo, esto no garantiza que los componentes transmembranales tengan afinidad por la glucosa para su transporte al citoplasma y su fosforilación.

En segundo lugar, se hizo una búsqueda extensiva en bases de datos tales como: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>, <http://scholar.google.es/> y <http://ecocyc.org/>, donde se encontraron tres trabajos distintos enfocados a los genes *bglF*, *nagE* y *malX* respectivamente, que dan indicios de la capacidad de transporte de glucosa. Sin embargo, en ninguno de estos reportes, se realizaron experimentos cinéticos que mostraran, cual es la importancia de estos transportadores en el consumo de glucosa en mutantes carentes únicamente de la proteína principal IIBC^{Glc} del PTS. En el reporte de Reidl y Boos (1991) muestran la importancia de MalX en mutantes carentes del gen *ptsG* y *manX* en ausencia de su represor MalI. Por otra parte, un trabajo reciente (Raberg *et al.*, 2012) con una bacteria Gram-negativa llamada *Ralstonia eutropha* G⁺¹ mostró que la proteína NagE tiene la capacidad de transportar glucosa en medio sólido y líquido, sin embargo, aun se desconoce cuáles son los dominios que interactúan con la glucosa y permiten la entrada de este sustrato al citoplasma.

Por último, nos basamos en el artículo de Lemuth y colaboradores (2008), donde se realizó un cultivo en quimiostato con la cepa W3110 variando la tasa de dilución de 0.37 a

0.08 h⁻¹, en el cual se analizaron los transcritos de la mayoría de genes catabólicos en 8 puntos del intervalo mencionado. Estos autores reportan el nivel de sobre-expresión de genes asociados al transporte de sustrato respecto a un punto de saturación máxima de glucosa en el medio de cultivo, es decir respecto a la velocidad de crecimiento máxima para la cepa W3110. De ese trabajo se pudo extraer evidencia del posible transporte de glucosa por proteínas del PTS y no-PTS dada la expresión diferencial respecto a la condición de referencia. Los genes destacados fueron los siguientes: *fruA*, *manXYZ*, *treB*, *malX*, *nagE*, *mglABC*, *galP* y *lamB*.

Tabla 16. Antecedentes sobre el posible transporte de glucosa por proteínas del PTS.

Característica	FruA	BglF	MalX	NagE
Sustrato principal	Fructosa	β-glucosido	Maltosa	N-acetil glucosamina
Relación con la glucosa	Misma fórmula molecular que la glucosa	Glucosa-sustituída	Disacárido de la glucosa	Glucosa-sustituída
Miembro de la familia de: (Postma <i>et al.</i>, 1993)	Manitol	Glucosa	Glucosa	Glucosa
% de alineamiento dado por Blast con respecto a PtsG	E value: 1e-04 Max ident: 47%	E value: 1e-08 Max ident: 67%	E value: 6e-87 Max ident: 37%	E value: 6e-111 Max ident: 40%
Presencia del transcrito a bajas concentraciones de glucosa en el análisis de transcriptoma de la W3110 (Lemuth <i>et al.</i>, 2008)	✓	×	✓	✓
Antecedentes bibliográficos del transporte de glucosa	NR	(Bramley y Kornberg, 1987)	(Reidl y Boos, 1991)	(Raberg <i>et al.</i> , 2012)

NR= No reportado

Con base a la información obtenida, se decidió seleccionar a los genes *malX*, *nagE*, *bglF* y *fruA* para su inactivación en la cepa W3110 $\Delta ptsG$, $\Delta manX$. Con la inactivación de cada uno de estos genes que codifican para proteínas del PTS, pudimos determinar si existen más complejos además de ManXYZ capaces de transportar a la glucosa. Aunque es cierto

que el gen *treB* pudo ser un buen candidato para inactivar (no se encontró nada en la base de datos sobre posible transporte de glucosa por la proteína TreB) y que el gen *fruA* quizás habría sido el menos indicado, se optó por incluir en el análisis de las inactivaciones, al gen de otra familia distinta al de la glucosa.

La respuesta cinética y estequiométrica de la cepa mutante $\Delta ptsG$, $\Delta manX$ con las deleciones individuales en los genes *fruA*, *bglF*, *malX* y *nagE* se presenta en la Tabla 17. Respecto al $Y_{X/S}$, no hubo ninguna diferencia para las cuatro cepas. Por otra parte, no se detectó por cromatografía de líquidos la producción de acetato.

Uno de los objetivos era encontrar mediante la caracterización de las inactivaciones individuales (*FruA*, *BglF*, *MalX* y *NagE*) en la cepa $\Delta ptsG$, $\Delta manX$, si existía la capacidad de transportar a la glucosa en cada una de las cuatro proteínas evaluadas. Esto significó, que si una inactivación provoca la disminución en la μ y en la q_s , entonces, la proteína codificada por ese gen, tiene la capacidad de transportar a la glucosa, mientras que si no se observa algún efecto en los parámetros, es porque, el gen no está relacionado con el transporte de glucosa en ese fondo genético.

El análisis de ANOVA nos permitió discernir cuales fueron los genes cuya inactivación tienen un efecto estadísticamente significativo en la velocidad de crecimiento en la cepa W3110 $\Delta ptsG$, $\Delta manX$. Este análisis se hizo comparando la cepa de referencia $\Delta ptsG$, $\Delta manX$ contra cada una de las mutantes generadas.

Para el caso de la cepa $\Delta ptsG$, $\Delta manX$ con la inactivación de los genes *fruA* y *malX*, estas mutantes no mostraron algún efecto en los parámetros evaluados. Por otra parte, la inactivación del gen *nagE* en la cepa $\Delta ptsG$, $\Delta manX$ mostró una velocidad de crecimiento ($p=0.02$) y un consumo de glucosa similar al de la mutante $\Delta ptsHIcrrr$, lo que sugiere que en esa condición genética ($\Delta ptsG$, $\Delta manX$) la proteína más importante para el transporte

de glucosa es NagE. Finalmente, para el caso de la mutante $\Delta ptsG$, $\Delta manX$, $\Delta bglF$ la velocidad de crecimiento disminuyó ($p=0.02$) respecto a la mutante doble, sin embargo, el efecto en la q_s no fue significativo como en el caso de la inactivación del gen *nagE*.

Respecto a la q_s , no se observó un cambio significativo entre la mutante $\Delta ptsG$, $\Delta manX$ y la mutante $\Delta ptsG$, $\Delta manX$, $\Delta bglF$. Esto sugiere que el gen *bglF* en la mutante doble no está relacionado con el transporte de glucosa. Por otra parte, si su transcripción se llevara a cabo, entonces podría estar afectando el crecimiento de la bacteria directa o indirectamente, aunque no su consumo de glucosa, tal como se observó en la triple mutante (Tabla 17).

Las bases de datos (<http://ecocyc.org/>) y algunos autores describen al operón *bgl* en cepas K-12 como críptico (pueden ser expresados después de alguna mutación), es decir, como un operón silencioso, donde su transcripción es tan controlada, que no permite ni siquiera la transcripción necesaria del RNAm que traduzca suficiente proteína que pueda internalizar a los β -glucósidos (Postma *et al.*, 1993; Schnetz, 1995). Estos datos podrían apoyar las conclusiones del trabajo, respecto a que, *bglF* no transporta glucosa en la mutante $\Delta ptsG$, $\Delta manX$.

Por otra parte, se ha abordado el tema de los genes crípticos de un modo distinto, proponiendo que no se ha observado la activación de dichos genes porque bajo las circunstancias evaluadas no se permite su transcripción, pero bajo otras muy distintas, podrían activarse y tener efectos no anticipados (se propone como una forma de regulación de la expresión genética). En este caso, es seguro que la doble mutante tenga efectos importantes en la regulación metabólica (muy distintos a una cepa silvestre), lo que podría entonces activar al operón *bgl* y entonces tener una función no prevista en la doble mutante. De esta manera, podría explicarse el cambio en la μ y no en la q_s , al inactivarse un gen que pudiera tener un papel importante, no anticipado en la mutante $\Delta ptsG$, $\Delta manX$ (Tamburini y Mastromei, 2000).

La Figura 18 muestra el consumo específico de la glucosa y la velocidad de crecimiento de las dos cepas de referencia ($\Delta ptsG$, $\Delta manX$ y $\Delta ptsHIcrr$) y de las dos mutantes que mostraron un cambio significativo en la velocidad de crecimiento al inactivar una proteína de transporte.

Tabla 17. Parámetros cinéticos y estequiométricos de las mutantes en genes relacionados con el transporte de glucosa en la cepa W3110 $\Delta ptsG$, $\Delta manX$. Todos los parámetros fueron calculados durante la fase exponencial de crecimiento. Los símbolos \pm se refiere a la desviación estándar de los experimentos individuales por triplicado.

Cepa	Características relevantes	μ (h^{-1})	q_s (g/g h)	q_{ac} (g/g h)	$Y_{x/s}$	p (<0.05)
WGM	$\Delta ptsG$, $\Delta manX::Km$	0.36 ± 0.03	0.79 ± 0.06	N.D.	0.46 ± 0.06	0.00
WGMF	WGM, $\Delta fruA::Km$	0.37 ± 0.03	0.86 ± 0.11	N.D.	0.43 ± 0.06	0.66
WGMX	WGM, $\Delta malX::Km$	0.32 ± 0.01	0.70 ± 0.07	N.D.	0.45 ± 0.05	0.13
WGMB	WGM, $\Delta bgIF::Km$	0.29 ± 0.00	0.81 ± 0.09	N.D.	0.33 ± 0.01	0.02
WGME	WGM, $\Delta nagE::Km$	0.28 ± 0.02	0.68 ± 0.00	N.D.	0.39 ± 0.03	0.02
WHI	$\Delta ptsHIcrr::Cm$	0.25 ± 0.01	0.60 ± 0.04	N.D.	0.42 ± 0.02	0.01

N.D.=No detectado

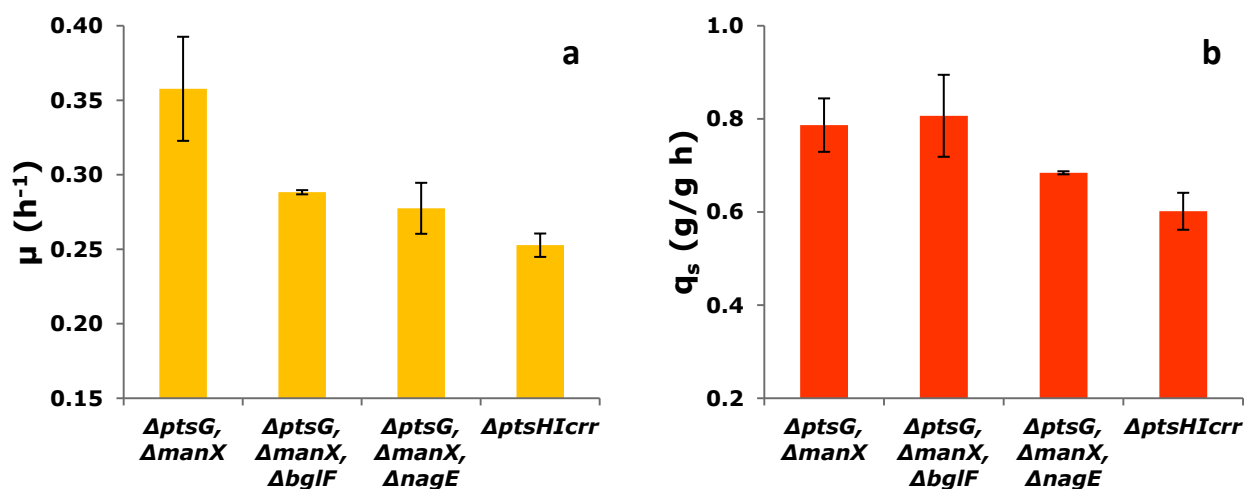


Figura 18. a) Comparación de la velocidad de crecimiento y b) Comparación de la velocidad específica de consumo de sustrato en el fondo W3310 $\Delta ptsG$, $\Delta manX$.

Finalmente, una manera que utilizamos para comprobar que el gen *nagE* está relacionado al transporte de glucosa en la cepa $\Delta ptsG$, $\Delta manX$ y que, solo se asocia al consumo de glucosa y no a otro efecto que pudiera provocar una disminución en el crecimiento y en la velocidad de consumo de glucosa, se inactivó a este gen (*nagE*) en la cepa silvestre (W3110 $\Delta nagE$). El resultado que se obtuvo fue, la misma μ y q_s entre la silvestre y la mutante W3110 $\Delta nagE$. Esto indica, que el efecto cinético y estequiométrico de la inactivación del gen relacionado con la proteína NagE en la mutante doble, es debido al transporte de glucosa y no a otro efecto ocasionado en el metabolismo de la bacteria.

Otra forma que tenemos de comprobar que el transportador NagE tiene la capacidad de transportar a la glucosa, es la clonación de este gen en un vector de expresión y la complementación en la mutante $\Delta ptsG$, $\Delta manX$, $\Delta nagE$, con el objetivo de que supere el crecimiento de la mutante doble o al menos recupere el crecimiento. En nuestro caso, ésta posible clonación es una perspectiva.

3.1.4. Delección de componentes del PTS en la cepa W3110 $\Delta ptsG$

Una vez que se encontró, que existen otros componentes del PTS capaces de transportar a la glucosa en la mutante $\Delta ptsG$, $\Delta manX$, se inactivaron los mismos cuatro genes del PTS (*fruA*, *bglF*, *malX* y *nagE*) antes seleccionados, en la mutante W3110 $\Delta ptsG$. La pregunta en este caso fue, ¿existirán algunos componentes del PTS además de la proteína ManX, que participan en el transporte de glucosa en una mutante que tiene una velocidad de crecimiento alta ($0.51 \pm 0.01 \text{ h}^{-1}$)? La Tabla 18 muestra los parámetros cinéticos y estequiométricos de estas mutantes derivadas de la cepa W3110 $\Delta ptsG$.

Como se puede observar en la Figura 19a, el gen relacionado con el transporte de glucosa cuya inactivación provocó una mayor disminución en la velocidad de crecimiento y en el consumo de glucosa de la cepa $\Delta ptsG$ fue el gen *malX* (gen relacionado al transporte preferencial por la maltosa). A partir de este resultado podemos sugerir que en la cepa

W3110, después del gen *ptsG*, el gen que tiene mayor impacto sobre el consumo de glucosa y la velocidad de crecimiento es el gen *malX*.

La razón por la cual la μ y la q_s son menores en la mutante $\Delta ptsG$, $\Delta malX$ con respecto a la mutante $\Delta ptsG$, $\Delta manX$ se puede deber a que la proteína MalX es la proteína principal encargada del transporte de glucosa en $\Delta ptsG$. Por una parte, podría ser que exista una mayor sobre-expresión del gen *malX* (reduciendo al máximo la expresión de su represor MalI controlado por sí mismo y por la cantidad de CRP-cAMP) con respecto a *manX* y esto provocara finalmente una cantidad de proteína que superara en gran cantidad a la proteína ManX o por otra parte, que la afinidad y/o velocidad de transporte de la glucosa en la proteína MalX sea mayor que en ManX. Incluso ambos sucesos podrían estar ocurriendo a la vez, y en conclusión, esto estaría ocasionando que MalX fuera tan significativa en la mutante $\Delta ptsG$ que por lo tanto, su inactivación tuviera un efecto importante en la μ y en la q_s como lo observamos en la mutante $\Delta ptsG$, $\Delta malX$.

Otra cosa interesante que notamos, es que si las dos proteínas ManX y MalX son importantes para el crecimiento de la mutante $\Delta ptsG$ (una más que la otra), entonces las contribuciones al consumo de glucosa no son aditivas, dado que únicamente con la inactivación del gen *malX* se logra disminuir el consumo de glucosa hasta el obtenido con la mutante $\Delta ptsHIcrr$. Esto sugiere además, que la inactivación de *manX* es sustituido por la actividad de la proteína MalX a un nivel que casi alcanza la velocidad de crecimiento de la cepa silvestre ($0.51 \pm 0.01 \text{ h}^{-1}$), sin embargo la inactivación de *malX* no logra recuperar el crecimiento, lo que convierte insuficiente la actividad de ManX.

Desde otro punto de vista, los transportadores de maltosa y manosa parecen tener ciertas características en común respecto al sustrato principal que transportan. La proteína de maltosa transloca al disacárido de la glucosa (enlace o-glucosídico). La glucosa y la manosa son aldosas de 6 carbono, que forman una estructura piranosa en donde lo único que las diferencia es la configuración de uno de sus carbonos quirales (epímeros).

Finalmente, otro aspecto también importante, son las interacciones específicas que se forman entre la proteína y el sustrato. Por lo que, la estructura del sustrato no es el único factor que define la afinidad por la proteína.

Tabla 18. Parámetros cinéticos y estequiométricos de las mutantes donde se inactivaron componentes del PTS en la mutante W3110 $\Delta ptsG$. Todos los parámetros fueron calculados durante la fase exponencial de crecimiento. Los símbolos \pm se refiere a la desviación estándar de los experimentos individuales por triplicado.

Cepa	Características relevantes	μ (h^{-1})	q_s (g/g h)	q_{ac} (g/g h)	$Y_{x/s}$	p (<0.05)
WG	$\Delta ptsG::Km$	0.51 ± 0.01	1.27 ± 0.15	0.08 ± 0.06	0.46 ± 0.13	0.00
WGM	WG, $\Delta manX::Km$	0.36 ± 0.03	0.79 ± 0.06	N.D.	0.46 ± 0.06	0.00
WGX	WG, $\Delta malX::Km$	0.23 ± 0.03	0.61 ± 0.00	N.D.	0.33 ± 0.00	0.00
WGB	WG, $\Delta bgfF::Km$	0.43 ± 0.04	1.29 ± 0.03	0.08 ± 0.02	0.35 ± 0.03	0.04
WGE	WG, $\Delta nagE::Km$	0.41 ± 0.02	0.83 ± 0.07	N.D.	0.50 ± 0.06	0.00
WGA	WG, $\Delta fruA::Km$	0.53 ± 0.02	1.40 ± 0.43	0.11 ± 0.01	0.39 ± 0.10	0.16

N.D.=No detectado

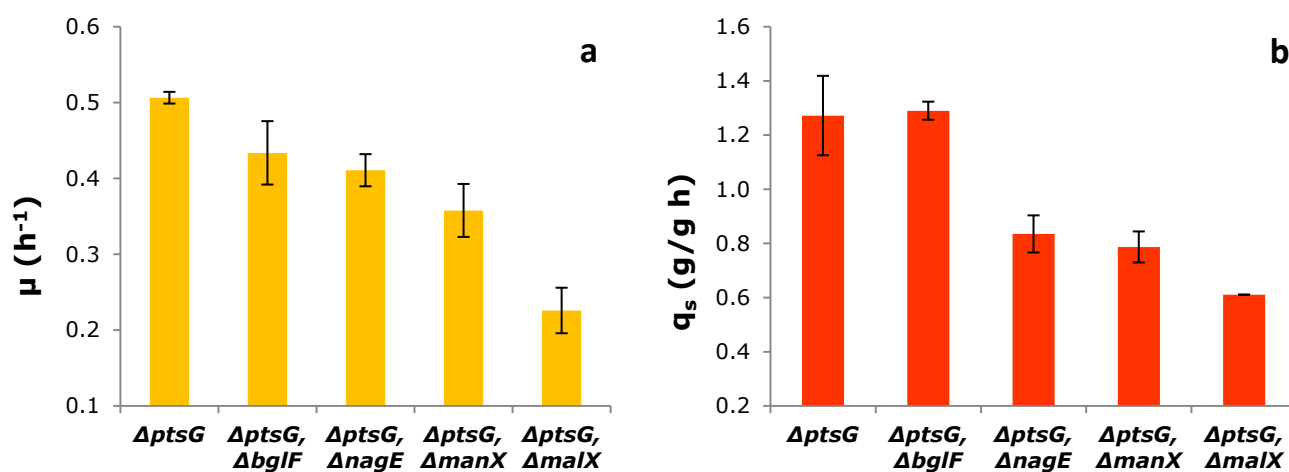


Figura 19. a) Comparación de la velocidad de crecimiento y b) Comparación de la velocidad específica de consumo de sustrato de diferentes mutantes en el fondo W3110 $\Delta ptsG$.

En esta condición fisiológica/genética, donde la limitación de carbono no es drástica ($\Delta ptsG$), NagE tiene poca importancia en el transporte de glucosa, contrario a lo observado en la mutante $\Delta ptsG$, $\Delta manX$ (Figura 18). Estos datos sugieren, que en este caso, la velocidad de crecimiento y el consumo de glucosa de cada una de estas mutantes es dependiente de la condición genética, pero a su vez, puede estar influenciado por el estado energético de la célula, ya que lo que rige a la célula es la disponibilidad de carbono (Jensen y Michelsen, 1992; Hofmeyr, 1997; Koebmann *et al.*, 2002). La q_s disminuyó conforme lo hizo la μ en estas mutantes (Figura 19). Sin embargo, la inactivación en el gen *bglF* volvió a provocar una disminución en la μ , pero no en la q_s , la cual se mantuvo similar a la de la cepa parental ($\Delta ptsG$). Estos datos podrían apoyar aun más, nuestra hipótesis antes mencionada acerca del operón *bgl*.

Respecto al gen *fruA*, se puede decir que bajo las condiciones evaluadas, la inactivación no tuvo algún efecto negativo en el consumo de glucosa, ni en la velocidad de crecimiento, el pequeño aumento observado en estos parámetros se considera dentro del error experimental (Figura 19).

En la Tabla 18 se puede observar como las únicas mutantes que produjeron acetato fueron aquellas donde la inactivación del componente PTS no tuvo efecto (*bglF* y *fruA*) sobre el crecimiento y/o sobre el consumo de glucosa, es decir, en las cepas que mantuvieron su q_s similar a la mutante de la que derivaron ($\Delta ptsG$). En promedio, estas mutantes produjeron 0.08 g/g h de acetato.

3.1.5. Efectos cinéticos y estequiométricos de las inactivaciones en proteínas de tipo ABC y simporte capaces de transportar glucosa en un fondo PTS⁺

Para determinar la importancia en el transporte de glucosa de las proteínas GalP y MglABC dependientes de la glucoquinasa, se evaluó la inactivación de los genes que codifican para estas proteínas en las mutantes, $\Delta ptsG$, $\Delta ptsG$, $\Delta manX$ y $\Delta ptsHIcrr$ (Tabla 19). Es decir, en dos fondos genéticos distintos, en uno que nosotros llamamos PTS⁺ y en otro PTS⁻. En

el PTS⁺, solo se han inactivado uno o unos de los complejos transmembranales del sistema de fosfotransferasa ($\Delta ptsG$ y $\Delta ptsG, \Delta manX$) y PTS⁻, cuando se han inactivado los componentes generales del sistema de fosfotransferasa, con lo cual, ninguna proteína sustrato-específica del PTS es capaz de transportar y activar a la glucosa, pues no es posible la fosforilación de los componentes IIBC, porque las proteína generales (EI y HPr) que translocan el grupo fosfato del fosfoenolpiruvato han sido inactivadas ($\Delta ptsHIcrr$) (Figura 3).

Tabla 19. Parámetros cinéticos y estequiométricos de las mutantes en los genes relacionados con el transporte de glucosa, dependientes de la enzima glucocinasa. Todos los parámetros fueron calculados durante la fase exponencial de crecimiento. Los símbolos \pm se refiere a la desviación de los experimentos individuales por triplicado.

Cepa	Características relevantes	μ (h ⁻¹)	q_s (g/g h)	q_{ac} (g/g h)	$Y_{x/s}$	p (<0.05)
WGP	$\Delta ptsG, galP::Km$	0.49 \pm 0.08	1.45 \pm 0.00	0.07 \pm 0.00	0.36 \pm 0.01	0.06
WGAB	$\Delta ptsG, mglABC::Km$	0.48 \pm 0.01	1.24 \pm 0.00	0.10 \pm 0.00	0.39 \pm 0.05	0.08
WGMP	$\Delta ptsG, manX, galP::Km$	0.29 \pm 0.01	0.68 \pm 0.01	N.D.	0.43 \pm 0.01	0.04
WGMAB	$\Delta ptsG, manX, mglABC::Cm$	0.31 \pm 0.01	0.82 \pm 0.00	N.D.	0.38 \pm 0.00	0.09
WHIP	$\Delta ptsHIcrr::Cm, galP::Km$	0.18 \pm 0.02	0.39 \pm 0.02	N.D.	0.42 \pm 0.04	0.00
WHIAB	$\Delta ptsHIcrr, mglABC::Cm$	0.20 \pm 0.01	0.39 \pm 0.02	N.D.	0.32 \pm 0.05	0.00

N.D.=No detectado

En el fondo genético $\Delta ptsG$ (PTS⁺) donde la velocidad de crecimiento aun es alta ($\mu = 0.5$ h⁻¹) y donde se puede decir que hay suficiente carbono y energía, se observó que la inactivación del gen *galP* (p=0.06) y el operón *mglABC* (p=0.08) no tienen algún efecto negativo en la q_s ni en la μ (Figura 20a). Por otra parte, en la mutante $\Delta ptsG, \Delta manX$ (PTS⁺) se observó que el gen *galP* es importante para el metabolismo dado que su inactivación disminuyó la μ (p=0.04) y la q_s . En cambio, la inactivación del operón *mglABC* en la doble mutante no tiene efecto (p=0.09) sobre los parámetros de interés (Figura 20b).

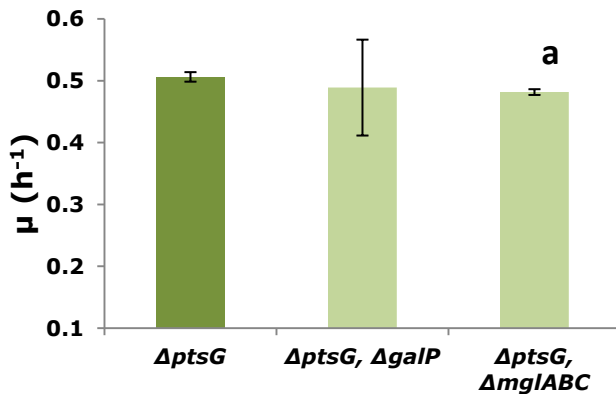
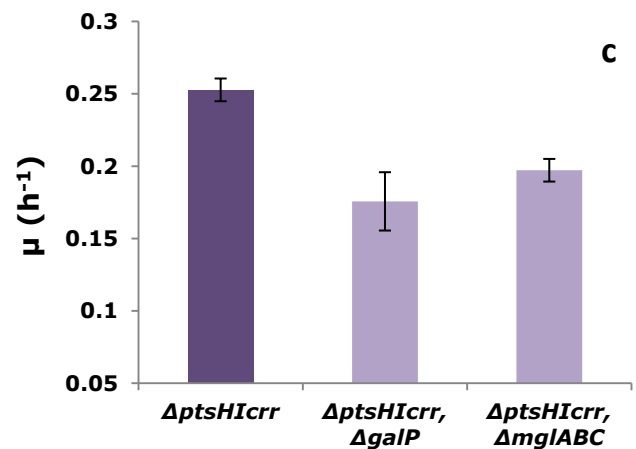
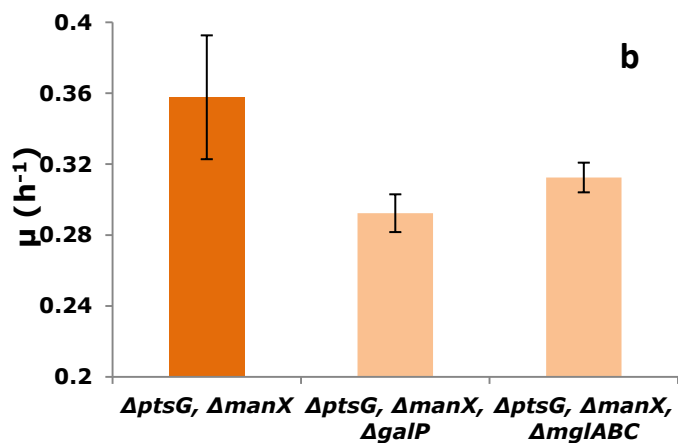


Figura 20. a) Efecto sobre el crecimiento de las inactivaciones en MglABC y GalP en un fondo PTS⁺ (W3110, $\Delta ptsG$). b) Efecto sobre el crecimiento de las inactivaciones en MglABC y GalP en un fondo PTS⁺ (W3110, $\Delta ptsG, \Delta manX$). c) Efecto sobre el crecimiento de las inactivaciones en MglABC y GalP en un fondo PTS⁻ (W3110, $\Delta ptsHIcrr$).



Como último dato de esta sección, se comenta que al inicio del proyecto se había planteado la inactivación de un solo gen del operón *mglABC* para observar su efecto en el transporte de glucosa. De acuerdo con la conclusión de una de las referencias (Haramaya *et al.*, 1983), se deduce que, para que el sistema ABC de transporte alternativo de glucosa (suponiendo que *mglABC* transporte glucosa en la cepa W3110) sea funcional se requieren de las tres subunidades. Este dato, nos llevó al planteamiento de inactivar únicamente el gen *mglA* (gen que codifica para la proteína transmembranal de unión a ATP) en los tres fondos genéticos distintos. Sin embargo, no se observó algún cambio en la μ o en la q_s respecto a las cepas parentales (datos no mostrados).

Para corroborar el papel del operón *mglABC* en el transporte de glucosa, se realizó la inactivación del operón completo. De acuerdo con los resultados mostrados más arriba (Figura 20c), se concluye que el complejo proteico MglABC tiene un importante efecto negativo sobre la μ y la q_s en la mutante $\Delta ptsHIcrr$ y que, este sistema puede ser funcional aun cuando se haya inactivado al componente *mglA*.

3.1.6. Efecto de la inactivación del gen *galP* y el operón *mglABC* en un fondo PTS^-

Uno de los objetivos de este trabajo fue determinar mediante la generación de mutantes, la posible participación de otras proteínas de tipo no-PTS diferentes a GalP y MglABC que fueran capaces de transportar a la glucosa. Esto se logró mediante la generación de la mutante $\Delta ptsHIcrr$, $\Delta galP$, $\Delta mglABC$ y la complementación de la mutante $\Delta ptsHIcrr$, Δglk (Tabla 20).

La velocidad de crecimiento de la cepa $\Delta ptsHIcrr$, $\Delta galP$, $\Delta mglABC$ fue de $0.20 \pm 0.01 \text{ h}^{-1}$ lo que indica que, aun cuando se ha perdido a los dos componentes identificados como transportadores principales de glucosa en cepas PTS^- , esta cepa es capaz de consumir a la glucosa a una velocidad específica de $0.40 \pm 0.04 \text{ g/g h}$. A partir de este resultado, se sugiere la existencia de otras proteínas no-PTS capaces de transportar a la glucosa además de MglABC y GalP.

La velocidad de crecimiento de la triple mutante disminuyó en un 20% respecto a la cepa $\Delta ptsHIcrr$, lo que indica que esta o estas proteínas que toman el papel de MglABC y galP no son igual de eficientes. Aunque la pregunta que surge es, ¿por qué en la mutante sencilla ($\Delta ptsHIcrr$) esta o estas proteínas no se activan? o al menos eso podemos interpretar con los resultados. La respuesta podría ser, porque solamente se inducen bajo condiciones extremas de stress. Un complejo que posiblemente pudiera activarse, es el sistema ABC de transporte de maltosa (operón *malEFG*), donde datos recientes, muestran la posible actividad de transporte de la glucosa (Steinsiek y Bettenbrock, 2012). La conclusión de acuerdo con la literatura es que el transporte de glucosa al citoplasma de la

mutante $\Delta ptsHIcrr$, $\Delta galP$, $\Delta mglABC$ está sustentado por proteínas de tipo no-PTS y éstas pueden depender de la glucocinasa (Glk) para la fosforilación de la glucosa.

Tabla 20. Parámetros cinéticos y estequiométricos de las mutantes en genes que codifican para proteínas dependientes de la enzima glucocinasa. Todos los parámetros fueron calculados durante la fase exponencial de crecimiento. Los símbolos \pm se refiere a la desviación estándar de los experimentos individuales por triplicado.

Cepa	Características relevantes	μ (h^{-1})	q_s (g/g h)	q_{ac} (g/g h)	$Y_{x/s}$
WHI	$\Delta ptsHIcrr::Cm$	0.25 ± 0.01	0.60 ± 0.04	N.D.	0.42 ± 0.02
WHIPAB	WHI, $\Delta galP$, $\Delta mglABC::Cm$	0.20 ± 0.01	0.40 ± 0.04	N.D.	0.41 ± 0.01
WHIK	WHI, $\Delta glk::Km$	0.17 ± 0.00	0.48 ± 0.01	N.D.	0.35 ± 0.01

N.D.=No detectado

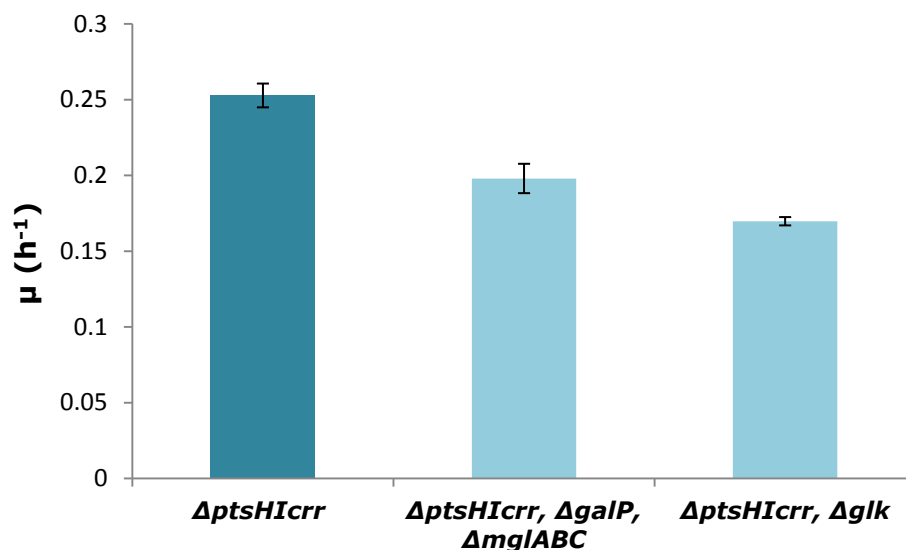


Figura 21. Velocidad de crecimiento de las mutantes en el fondo genético W3110, $\Delta ptsHIcrr$.

Por otra parte, no se puede descartar la posibilidad de que GalP y MglABC contribuyan al transporte de la glucosa en la mutante $\Delta ptsHIcrr, \Delta glk$ ($0.17 \pm 0.00 h^{-1}$). En esta mutante, la fosforilación de la glucosa internalizada por proteínas no-PTS pudiera

dependen de una cinasa diferente a la glucocinasa (Glk) que pudiera tener alguna afinidad por la glucosa y de esta manera activar al sustrato para la glucólisis.

Además de los fenómenos descritos anteriormente, podemos observar que en la mutante $\Delta ptsHIcrr, \Delta glk$ (WHIK) el $Y_{X/S}$ disminuyó respecto a la mutante $\Delta ptsHIcrr \Delta galP, \Delta mglABC$ (WHIPAB) y que la q_s de WHIK es ligeramente mayor, aun cuando la μ fue menor en la mutante WHIPAB. El fenómeno se puede explicar de una manera sencilla, primero, la μ disminuyó porque la sustitución de Glk por otra cinasa, no tiene la misma velocidad de conversión ni la misma afinidad y por lo tanto ocasiona una disminución en el crecimiento. Dado su poca afinidad y su velocidad de conversión, se requiere de proteína en exceso para suplir la función, por lo que se puede observar un aumento en el consumo de glucosa pero no ser reflejo del crecimiento. En cuanto al rendimiento de biomasa ésta tuvo efectos negativos posiblemente porque la distribución de carbono se vio afectada por la condición genética. Encontrar las verdaderas razones de por qué se obtuvieron estos resultados, requiere de un análisis más profundo y detallado.

3.1.7. Efectos macroscópicos de la inactivación de diferentes tipos de transporte en cepas de *E. coli* en medio mineral M9 con glucosa

En esta parte, se muestra el análisis de los datos cinéticos y estequiométricos obtenidos de las mutantes generadas en el fondo genético W3110 y de las cuales se discutió más arriba. La Figura 22a muestra la correlación de tipo lineal que existe entre la μ y la q_s de manera general para todas las mutantes. Se puede observar que independientemente de la mutación *per se* el efecto provocado en la velocidad de crecimiento estuvo relacionado de manera positiva con la velocidad de consumo de sustrato. Se obtuvo la siguiente correlación general, $q_s = 2.74\mu$, de donde se extrae, que para producir un gramo de biomasa en la cepa W3110 en un rango de q_s que va de 1.62 a 0.39 g/g h es necesario el consumo de 2.74 g de glucosa.

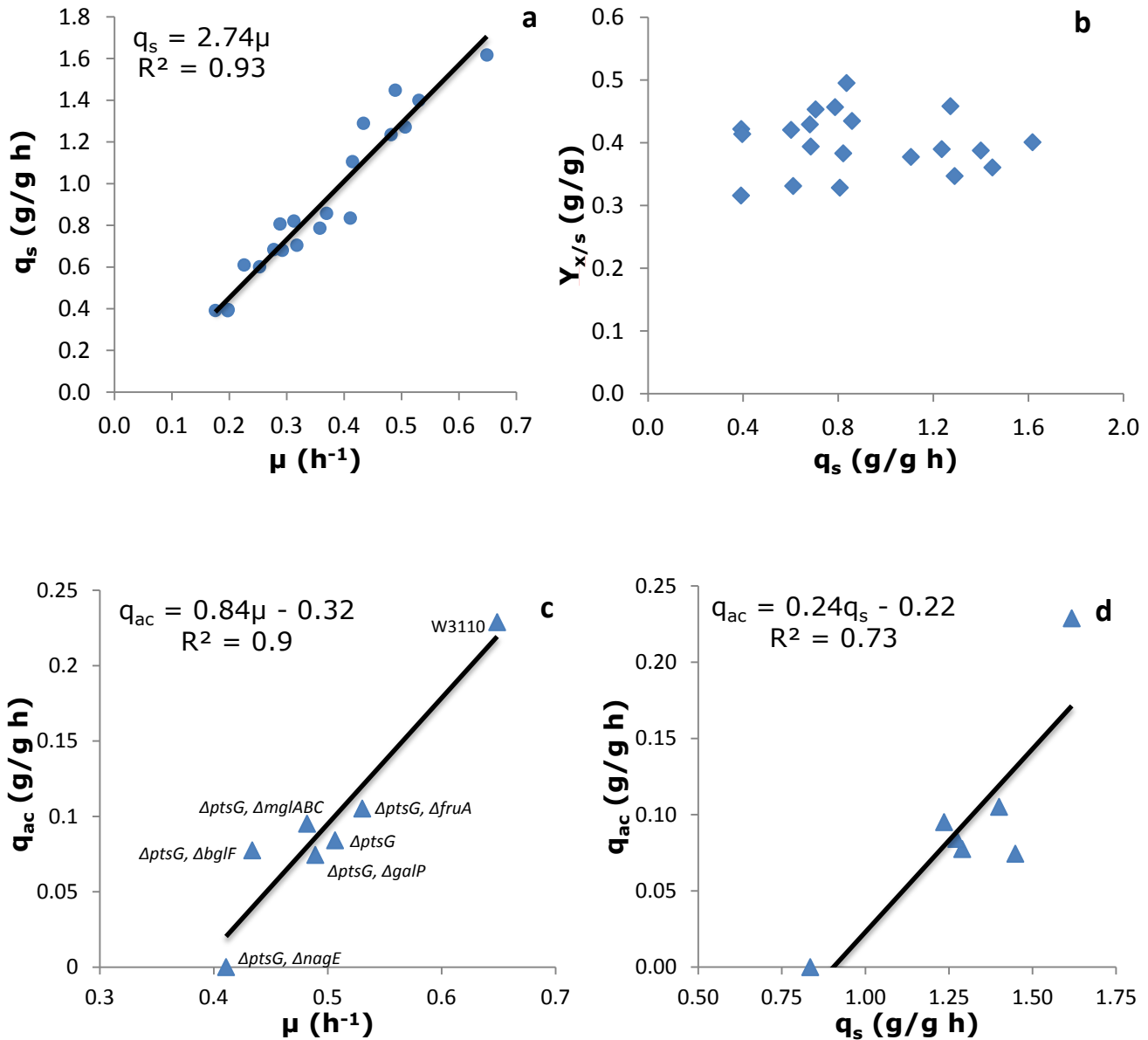


Figura 22. a) Relación entre la velocidad de crecimiento y la velocidad específica de consumo de glucosa. b) Relación entre el rendimiento y la velocidad específica de consumo de glucosa. c) Relación entre la velocidad de crecimiento y la velocidad específica de producción de acetato. d) Relación entre la velocidad específica de consumo de sustrato y la velocidad de producción de acetato.

Por otra parte, la Figura 22b muestra que la velocidad de consumo de sustrato de las diferentes mutantes generadas no tiene ningún efecto sobre el $Y_{x/s}$. Esto significa que en un rango de $\mu = 0.65$ a 0.18 h^{-1} ($q_s = 1.62$ a 0.39 g/g h , respectivamente), el efecto que

podiera provocar la q_s en la redistribución de carbono de las vías metabólicas principales como, glucólisis, TCA o PPP no modifica el $Y_{X/S}$. Esto puede interpretarse de la siguiente manera, aun cuando la célula solo puede transportar un menor porcentaje de carbono respecto al que transporta la cepa silvestre, estas mutantes distribuyen la glucosa de tal manera que se sigue dirigiendo la misma cantidad a la formación de biomasa independiente de la síntesis de acetato. También llama la atención, que el $Y_{X/S}$ muestra un rango tan amplio (0.3 a 0.5 g/g) en todas las q_s estudiadas. Esto hace suponer que además de la q_s existe(n) otras variables que tienen efecto sobre el $Y_{X/S}$.

La Figura 22c muestra la relación de tipo lineal ($q_{ac} = 0.84\mu - 0.32$) que existe entre la μ y la q_{ac} . Con esta relación, podemos encontrar de manera empírica, la μ a la cual ya no hay producción de acetato, la cual es 0.38 h^{-1} . Este valor es cercano al que encontramos experimentalmente el cual es de $0.41 \pm 0.02 \text{ h}^{-1}$. Por otra parte, la Figura 22d muestra la relación que existe entre la q_s y la q_{ac} . Con esta relación, podemos localizar de manera empírica, la q_s a la cual ya no hay producción de acetato, la cual es 0.92 g/g h , este valor es cercano al que encontramos experimentalmente, el cual es de $0.83 \pm 0.07 \text{ g/g h}$.

Aunque es cierto que cada una de las inactivaciones provoco un cambio inespecífico en las mutantes, los parámetros estequiométricos parecieron conservarse. Como referencia tenemos que el cultivo de la cepa MG1655 en quimiostato y medio mineral (Vermuri, 2006), dejó de producir acetato a una $q_s = 0.81 \text{ g/g h}$. Este dato coincide con el encontrado en este trabajo en la cepa W3110 $\Delta ptsG$, $\Delta nagE$ (0.83 g/g h). En otro trabajo realizado en quimiostato con una cepa también K-12 (TG1) se observa un efecto similar respecto a la producción de acetato; a una tasa de dilución de 0.37 h^{-1} se observa que el acetato comienza a producirse, sin embargo, la μ a la cual ya no se produce acetato en la cepa W3110 es ligeramente mayor ($0.41 \pm 0.02 \text{ h}^{-1}$) (Kayser *et al.*, 2005).

La ligera variación entre los datos obtenidos y reportados, se puede deber simplemente a que se trata de cepas diferentes, y no necesariamente, a que en nuestro trabajo se

lograron diferentes q_s con la inactivación de genes asociados al transporte de glucosa y no con la variación de la tasa de dilución del cultivo, como es el caso de los trabajos reportados.

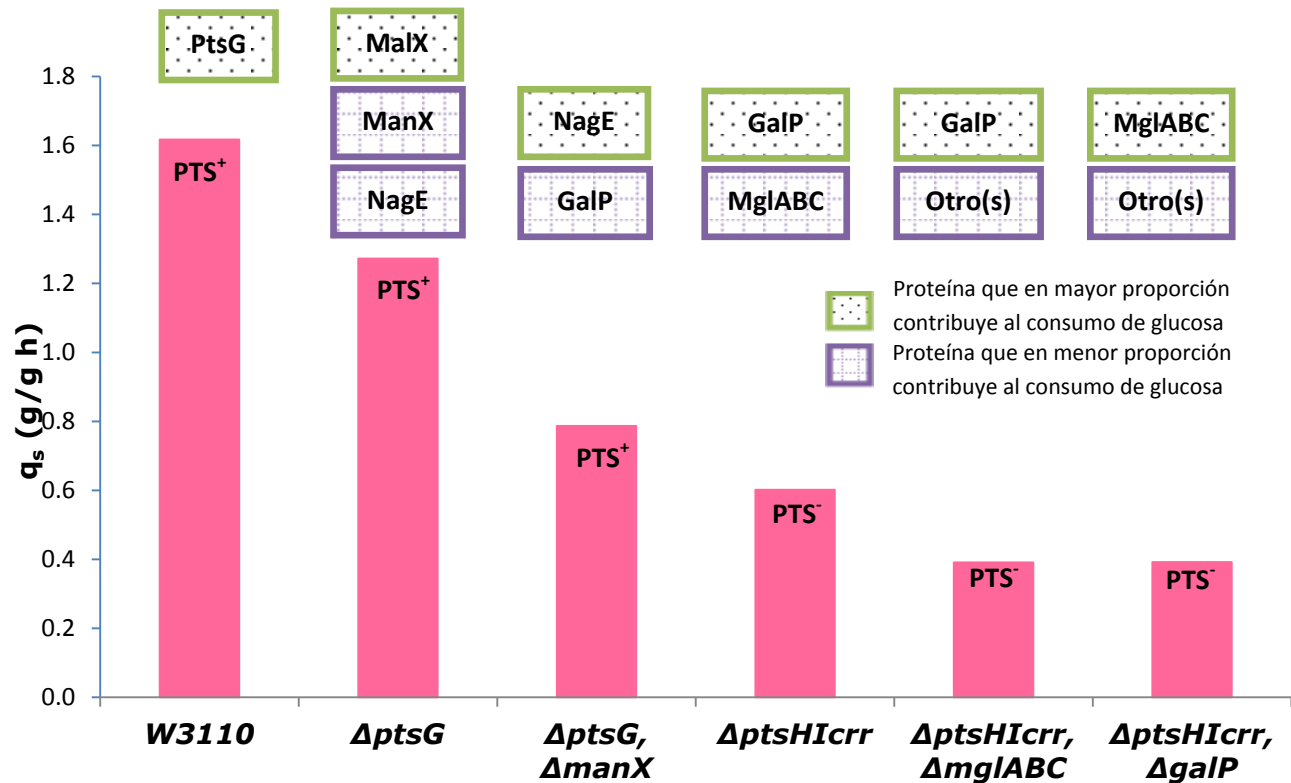


Figura 23. Transportadores de sustrato que mostraron contribución al consumo de glucosa en el fondo genético W3110.

En la figura 23 se indican las proteínas transportadoras de glucosa en el fondo genético W3110 que mostraron tener un efecto importante en la μ y en la q_s . En esta gráfica, también se puede observar, como se logró obtener una gama de q_s como era uno de los objetivos, el cual va de 1.6 a 0.4 g/g h. Se observa también, que en cada uno de los fondos genéticos ($\Delta ptsG$, $\Delta ptsG \Delta manX$, $\Delta ptsHIcrr$, $\Delta ptsHIcrr \Delta galP$, $\Delta ptsHIcrr \Delta mglABC$) la proteína más importante para el consumo de glucosa es diferente. Esto se puede deber a la condición genética y al estado energético en la que se encuentran las mutantes. Se

sabe que la inducción de la mayoría de estos genes, depende del complejo (cAMP-CRP), cuya cantidad depende del estado energético de la célula (Bettenbrock, *et al.*, 2006).

Dado que se inactivaron en cada cepa, proteínas distintas, lo anterior indica, que en cada uno de los fondos genéticos estudiados la combinación de transportadores es diferente y por lo tanto esto, podría tener repercusiones en el metabolismo general de la bacteria, pues el gasto energético para el transporte y la fosforilación de la glucosa es diferente, dependiendo del tipo de transporte (1 fosfoenolpiruvato para el PTS, 2 ATPs para sistemas ABC y 1 ATP y un H⁺ para proteínas de tipo simporte) (Gosset, 2005).

Una vez que se caracterizaron a las mutantes en medio mineral con glucosa como única fuente de carbono y se respondieron las preguntas hechas al inicio del proyecto, se eligieron a un conjunto de ellas con diferentes velocidades específicas de consumo de sustrato. Las mutantes seleccionadas (Tabla 21) se usaron con el objetivo de probar sus capacidades para la generación de un compuesto heterólogo en comparación a la cepa silvestre. En este caso particular, como modelo de producto, se sintetizó en el interior citoplasmático de la bacteria, a un plásmido con intereses terapéuticos (pHN).

3.2. Estudio de mutantes para la producción de una vacuna de interés industrial

3.2.1. Cepas de interés para la producción del plásmido pHN

En la Tabla 21 se enlistan los parámetros cinéticos y estequiométricos de las mutantes que se eligieron para la producción del plásmido pHN. Para caracterizar la producción del plásmido en las mutantes seleccionadas, se realizaron los cultivos en matraz agitado, con 2.5 g/L de glucosa en medio mineral PD y elementos traza. Este medio de cultivo, se eligió porque está formulado para la producción de compuestos heterólogos en altas densidades celulares. En futuros experimentos, se espera producir al plásmido pHN en un medio mineral con mayor cantidad de glucosa, en donde se obtenga una mayor densidad

celular con respecto a la obtenida en este trabajo de tesis, por lo que ésta fue la razón principal de su uso.

Con el fin de establecer, si el medio de cultivo PD estaba modificando de alguna manera los parámetros cinéticos y estequiométricos en las mutantes, independientemente de la modificación dada por la presencia del plásmido, se realizó la cinética de crecimiento con la cepa silvestre W3110 y con la mutante $\Delta ptsG$, $\Delta manX$ en medio mineral PD. De acuerdo con los resultados, el medio PD no tuvo un efecto adicional. Los valores encontrados en las cepas sin transformar con pHN, se encuentran dentro de la desviación estándar de los encontrados en medio mineral M9 (Datos no mostrados).

Tabla 21. Parámetros cinéticos y estequiométricos de las mutantes en medio mineral M9 sin plásmido. Todos los parámetros fueron calculados durante la fase exponencial de crecimiento. Los símbolos \pm se refiere a la desviación estándar de los experimentos individuales por triplicado.

Cepa	Características relevantes	μ (h^{-1})	q_s (g/g h)	q_{ac} (g/g h)	$Y_{x/s}$
W3110	<i>IN(rrnD-rrnE)1, rph-1</i>	0.65 ± 0.02	1.62 ± 0.05	0.23 ± 0.02	0.40 ± 0.00
WG	W3110, $\Delta ptsG::Km$	0.51 ± 0.01	1.27 ± 0.15	0.08 ± 0.06	0.46 ± 0.13
WGE	WG, $\Delta nagE::Km$	0.41 ± 0.02	0.83 ± 0.07	N.D.	0.50 ± 0.06
WGM	WG, $\Delta manX::Km$	0.36 ± 0.03	0.79 ± 0.06	N.D.	0.46 ± 0.06
WGMAB	WGM, $\Delta mglAB::Cm$	0.31 ± 0.01	0.82 ± 0.00	N.D.	0.38 ± 0.00
WGMP**	WGM, $\Delta galP::Km$	0.29 ± 0.01	0.68 ± 0.01	N.D.	0.43 ± 0.01
WGME	WGM, $\Delta nagE::Km$	0.28 ± 0.02	0.68 ± 0.00	N.D.	0.39 ± 0.03
WHI*	$\Delta ptsHIcrr::Cm$	0.25 ± 0.01	0.60 ± 0.04	N.D.	0.42 ± 0.01
WHIAB	WHI, $mglABC::Cm$	0.20 ± 0.01	0.39 ± 0.02	N.D.	0.32 ± 0.05
WHIP*	WHI, $galP::Km$	0.18 ± 0.02	0.39 ± 0.02	N.D.	0.42 ± 0.04

N.D.=No detectado

* Mutantes que no crecieron con plásmido

** Cinética de crecimiento no reproducible de mutantes con plásmido

Las mutantes seleccionadas para producir el plásmido pHN abarcan un rango de $\mu = 0.65$ a 0.18 h^{-1} y una $q_s = 1.62$ a 0.39 g/g h .

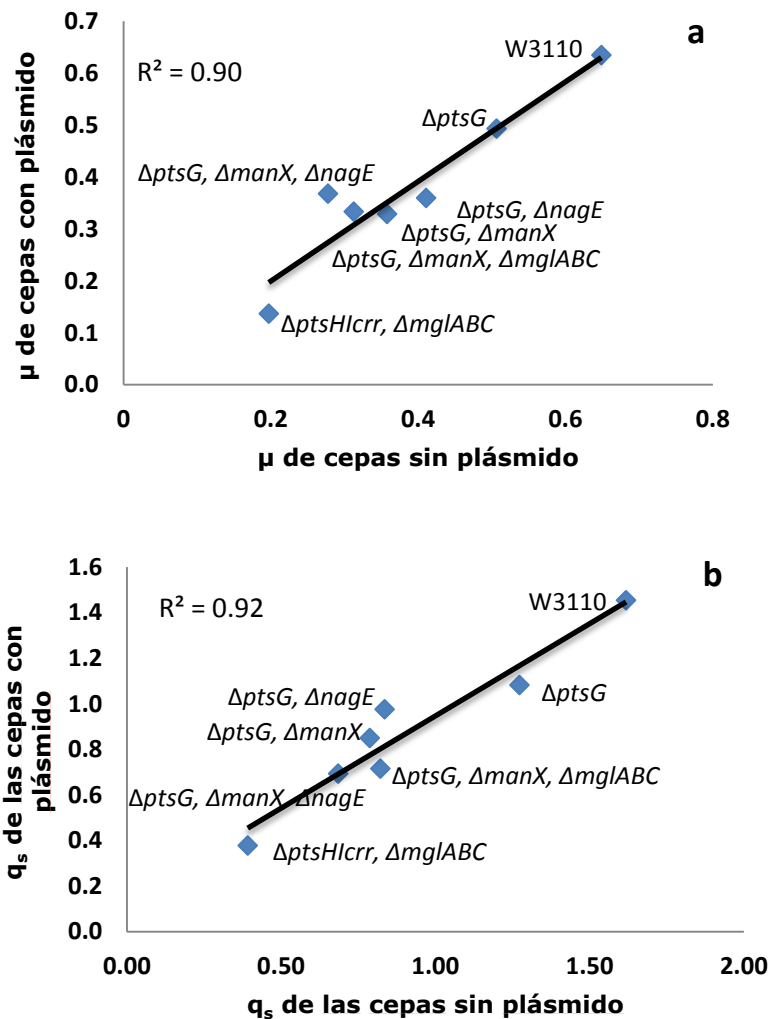


Figura 24. a) Grafica de comparación entre las velocidades específicas de consumo de glucosa con y sin la producción de plásmido b) Grafica de comparación entre las velocidades de crecimiento con y sin la producción de plásmido.

En la Figura 24 a y b se muestran las relaciones de las q_s y las μ de cepas con y sin plásmido, respectivamente. Las mutantes $\Delta ptsHIcrr$ y $\Delta ptsHIcrr, \Delta galP$ no crecieron bajo las condiciones evaluadas. Por otra parte, la mutante $\Delta ptsG, \Delta manX, \Delta galP$ tuvo un

comportamiento cinético no reproducible. Finalmente, el estudio se continuó con las siete cepas restantes.

En el caso de la cepa mutante $\Delta ptsHIcrr$, el transporte es dependiente de la expresión de proteínas del tipo ABC como MglABC, por lo cual, el sistema de transporte de glucosa para la célula se convierte en uno muy costoso (consumo de 2 ATPs por cada glucosa que es internalizada y fosforilada). Para esta mutante, es probable, que la replicación y la transcripción (resistencia al antibiótico) del plásmido se encuentre limitada energéticamente, además del propio metabolismo de la bacteria. Esto no ocurre con la mutante sin el plásmido, ya que en este caso, la poca energía que logra obtener de la glucosa metabolizada, se dirige principalmente a la formación de biomasa y al mantenimiento celular. En el caso de la mutante $\Delta ptsHIcrr$, $\Delta galP$ puede suponerse lo mismo. Lo único que podemos observar en ambas mutantes, es que, en presencia del complejo MglABC éstas no muestran un crecimiento.

En la Figura 24a, se muestra que de manera general la μ se mantuvo cuando las mutantes sintetizaron al plásmido pHN que cuando no lo produjeron, a excepción de la mutante $\Delta ptsG$, $\Delta manX$, $nagE$ y la mutante $\Delta ptsHIcrr$, $\Delta mglABC$, en donde se observa que una cepa aumentó y la otra disminuyó ligeramente en la μ , respectivamente. La respuesta que se esperaba en todas las mutantes, era que la μ disminuyera ligeramente, dado que una pequeña parte del carbono y energía se desvía a la síntesis del plásmido y esto, podría de alguna manera, retrasar la velocidad de crecimiento. Sin embargo, hay varios reportes que indican que la verdadera carga metabólica que pudiera retrasar el crecimiento celular, no es la cantidad de plásmido (la maquinaria del hospedero es la misma utilizada para la replicación del plásmido) sintetizado por la bacteria, si no, la síntesis de una proteína heteróloga, que en nuestro caso, no se produce en el hospedero bacteriano sino en el mamífero (Ricci y Hernández, 2000; DaSilva y Bailey, 1986).

La Figura 24b, muestra la relación que existe entre la q_s con y sin plásmido. Se observa que las cepas evaluadas tienen una q_s similar a la de las cepas sin producción de DNA plasmídico. La mutante que mostró un ligero aumento en la q_s fue la $\Delta ptsG$, $\Delta nagE$. En este caso, parece que la producción del plásmido y de la proteína que genera la resistencia contra la ampicilina, no provocaron un aumento en el consumo de glucosa, que se explicaría por una mayor expresión de componentes relacionados a los sistemas de transporte de glucosa, como podrían llegar a ser los componentes del PTS (Postma *et al.*, 1996).

Con estos datos, se encontró una relación lineal entre la q_s y la μ de las cepas productoras de pHN (Figura 26a), la cual fue, $q_s = 2.12\mu + 0.08$ ($y = mx + b$), diferente a la encontrada con las mismas cepas ($q_s = 2.6\mu$), pero sin producción de plásmido. En este caso, podemos interpretar al coeficiente b , como la energía de mantenimiento de las mutantes, según la ecuación lineal de Herbert-Pirt (Pirt, 1982) y a $1/m$ como el $Y_{x/s}$, el cual es de $0.47 \text{ g}_x/\text{g}_s$. La energía de mantenimiento, aumentó de cercano a 0.00 para cepas no productoras a $0.08 \text{ g}_s/\text{g}_x \text{ h}$ para mutantes que producen pHN, lo que podría interpretarse, como la velocidad de consumo de glucosa en W3110 necesaria para mantener al plásmido pHN. El valor del coeficiente b (energía de mantenimiento) es alto con respecto a otros encontrados cuando las cepas son W3110 y también producen pHN, por ejemplo en la cepa silvestre W3110, b es de $0.032 \text{ g}_s/\text{g}_x \text{ h}$ en modo quimiostato (datos no publicados), mientras que en la mutante VH33 (W3110, $\Delta ptsHIcr$, $galP^+$) b es de $0.054 \text{ g}_s/\text{g}_x \text{ h}$ (Datos no publicados).

La cepa silvestre produjo $0.25 \pm 0.02 \text{ g/L}$ de acetato, en tanto que este ácido no se detectó en ninguna otra mutante de las siete evaluadas. Por esta razón, no podemos atribuir por completo una mayor formación del plásmido pHN en la cepa $\Delta ptsG$, $\Delta manX$, $\Delta mglABC$ a un efecto por no generar acetato, pues cepas que tampoco lo produjeron alcanzaron un menor rendimiento de plásmido respecto a la cepa de mayor producción de pHN por gramo de bacterias. Por otra parte, comparar a la cepa silvestre contra la mutante sencilla ($\Delta ptsG$) podría dar un indicio de la cantidad de plásmido que se genera

con el acetato excretado, aunque este efecto también podría deberse únicamente a la disminución de la q_s .

Se sabe que la formación de acetato provoca una desviación de carbono y un efecto negativo en las células (en nuestro trabajo no se observa un efecto negativo en la generación de biomasa dado que la concentración no es inhibitoria), en este caso, podemos observar en la Figura 25, que la diferencia entre el rendimiento de plásmido sobre biomasa ($Y_{P/X}$) en la cepa $\Delta ptsG/pHN$ es 40% mayor con respecto a la cepa silvestre (W3110/pHN), mientras que la producción de acetato en la cepa silvestre es cerca del 10% de la entrada de glucosa. Este carbono, en conjunto con la disminución en la q_s mejora el rendimiento de la mutante $\Delta ptsG/pHN$.

A partir de la mutante $\Delta ptsG$, $\Delta nagE$ ($q_s=0.98 \pm 0.05$ g/g h) y de las mutantes subsecuentes, el aumento en el $Y_{P/X}$ no se puede deber a la no producción de acetato, ya que, ninguna mutante lo produce (Figura 25). El fenómeno más bien se debe a un efecto directo de la baja velocidad de consumo de glucosa, en donde, se ve afectada la velocidad de crecimiento. Es necesario remarcar, que en esta colección de mutantes, también está influyendo el tipo de transportadores de glucosa con requerimientos específicos de energía, que en combinación logran una q_s determinada.

El rendimiento de biomasa sobre sustrato ($Y_{X/S}$) indica la cantidad de biomasa que se produce por unidad de sustrato consumido (usualmente la fuente de carbono y energía) y varía en función de las condiciones del cultivo, de la fisiología de la célula y de su metabolismo. Para las mutantes de esta sección, no se encontró una dependencia del $Y_{X/S}$ con respecto al cambio en la q_s o en el $Y_{P/X}$. Lo que podemos observar únicamente, es que dos mutantes con diferentes q_s disminuyeron su $Y_{X/S}$ respecto a la cepa silvestre, máximo hasta un 20% (Figura 26b).

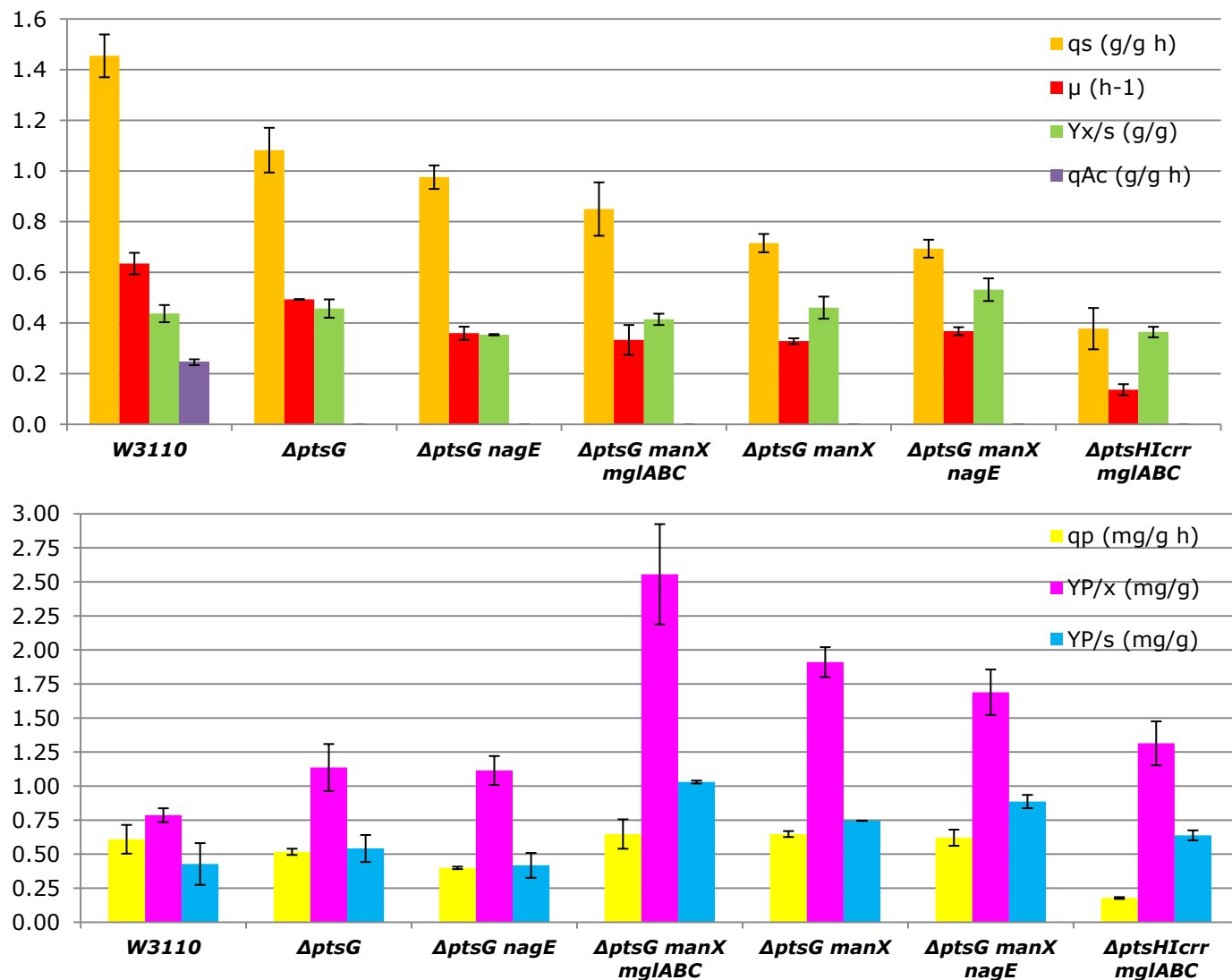


Figura 25. Parámetros cinéticos y estequiométricos de las mutantes productoras del plásmido pHN.

El $Y_{P/X}$ es uno de los parámetros más importantes que se consideran para evaluar a una cepa productora. En la Figura 27 se muestra la relación que existe entre el $Y_{P/X}$ y la μ en las mutantes evaluadas. Se puede observar que solo existe un punto máximo en el valor de $Y_{P/X}$ ($\Delta ptsG$, $\Delta manX$, $\Delta mglABC$), que corresponde a una $q_s = 0.65 \pm 0.11$ g/g h y a una $\mu = 0.33 \pm 0.06$ h⁻¹, a partir de la cual, el rendimiento de plásmido comenzó a decrecer drásticamente.

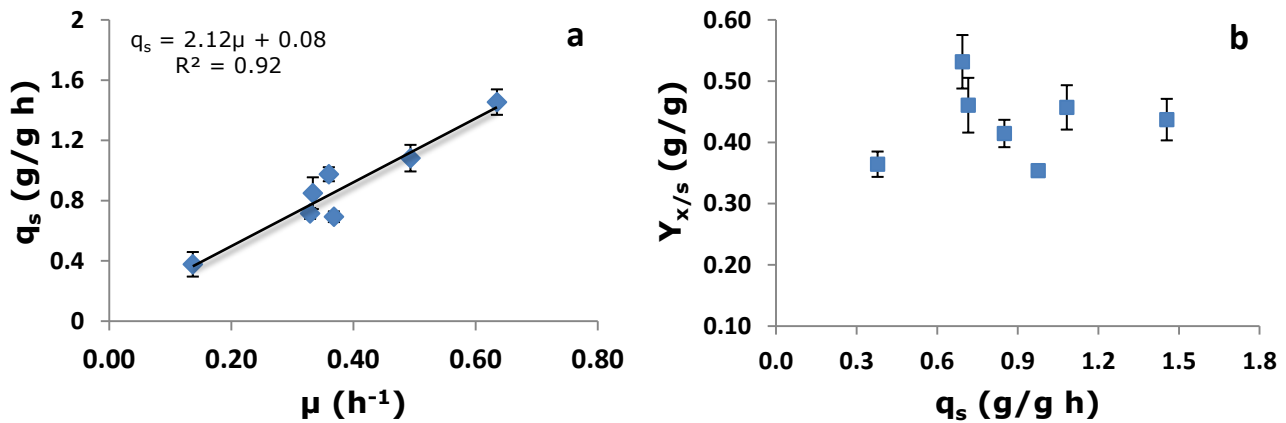


Figura 26. a) Grafica de comparación entre la velocidad de crecimiento y la velocidad específica de consumo de sustrato. b) Grafica de comparación entre la velocidad específica de consumo de sustrato y el rendimiento de biomasa sobre sustrato.

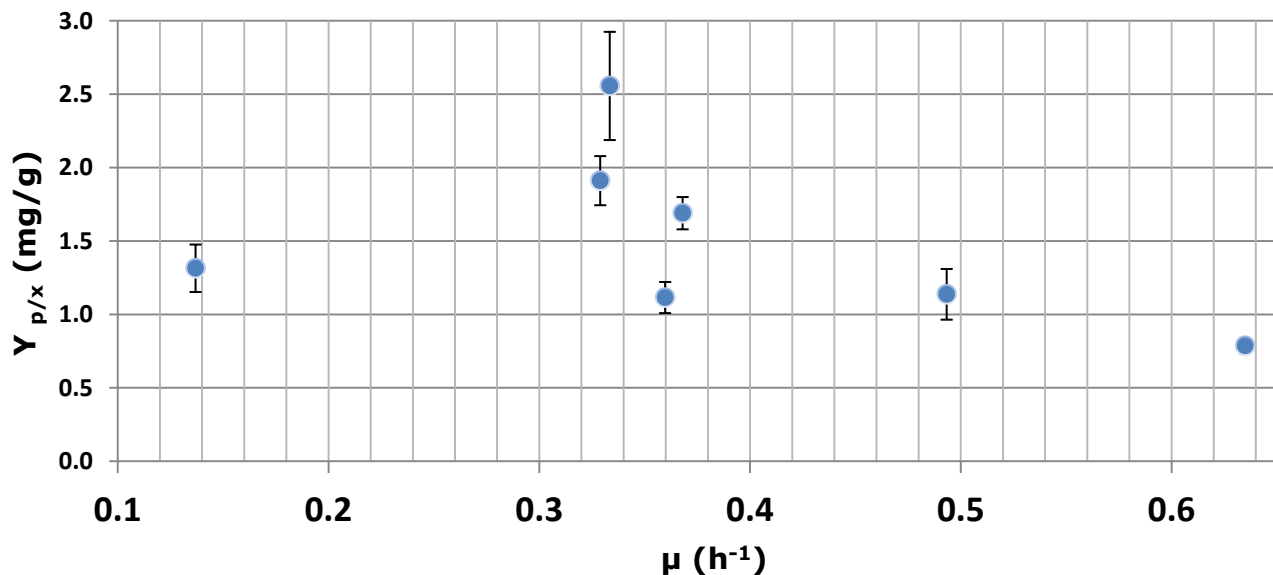


Figura 27. Relación entre la velocidad de crecimiento y el rendimiento de plásmido sobre biomasa.

La ventaja de producir al plásmido pHN en la cepa hospedera W3110 $\Delta ptsG$, $\Delta manX$, $\Delta mglABC$ de *E. coli*, radica en que, es la mutante con el máximo en el $Y_{p/x}$ respecto a

todas las cepas evaluadas, tiene una velocidad de crecimiento alta (0.33 h^{-1}), es la cepa con la más alta productividad y además es la cepa que mejores resultados tuvo en la producción de plásmido con la misma cantidad de carbono respecto a las otras.

Un poco más de información sobre la mutante con el rendimiento más alto de plásmido se describe a continuación. La tercera inactivación de la mutante $\Delta ptsG, \Delta manX, \Delta mglABC$, representó una ventaja para la producción de plásmido. Este resultado fue inesperado, dado que en condiciones sin producción de plásmido, los parámetros cinéticos y estequiométricos de la mutante $\Delta ptsG, \Delta manX, \Delta mglABC$ no mostraron ninguna diferencia con respecto a su cepa parental $\Delta ptsG, \Delta manX$ (Figura 20b). De alguna manera esto, para nosotros indicó que el operón *mglABC* no tendría ningún efecto en la doble mutante que produce plásmido, sin embargo, no fue así (Figura 25), por el contrario, su inactivación provocó un beneficio para la producción de plásmido.

Después de revisar la literatura, y entender que la producción de DNA plasmídico produce en la célula una variación de las concentraciones intracelulares de moléculas clave en el metabolismo, tales como el complejo cAMP-CRP (relacionado con el estado energético de la célula), el cual regula finalmente la activación de genes relacionados con el transporte de glucosa, entendimos porque aparentemente, el operón *mglABC* si tiene un efecto en la doble mutante ($\Delta ptsG, \Delta manX$) cuando se está produciendo al plásmido y como, con su inactivación ($\Delta ptsG, \Delta manX, \Delta mglABC$) produce una mejora en el rendimiento, dado que se inactiva a un gen, que está consumiendo en la mutante $\Delta ptsG, \Delta manX$, 2 ATPs por cada molécula de glucosa que se internaliza (Ricci, 1995).

Por otra parte, el caso contrario a la mejor mutante que encontramos en nuestro trabajo, para la producción de plásmido, se encuentra la mutante $\Delta ptsHIcrr, \Delta mglABC$, la cual se vio afectada en todos los parámetros evaluados, esto parece lógico ya que la cantidad de energía que se internalizó no era suficiente para mantener los procesos celulares y la producción de plásmido.

Tabla 22. Parámetros cinéticos y estequiométricos de cepas con mutaciones en genes relacionados al transporte de glucosa en medio mineral PD con glucosa. Todos los parámetros fueron calculados durante la fase exponencial de crecimiento. Los símbolos \pm se refiere a la desviación estándar de los experimentos individuales por triplicado.

Cepa	μ (h^{-1})	q_s (g/g h)	q_p (mg/g h)	$Y_{x/s}$ (g/g)	$Y_{p/x}$ (mg/g)
W3110	0.63 ± 0.04	1.45 ± 0.08	0.61 ± 0.11	0.44 ± 0.03	0.79 ± 0.05
WG	0.49 ± 0.00	1.08 ± 0.09	0.52 ± 0.02	0.46 ± 0.04	1.14 ± 0.17
WGE	0.36 ± 0.03	0.98 ± 0.05	0.40 ± 0.01	0.35 ± 0.00	1.11 ± 0.11
WGMAB	0.33 ± 0.06	0.85 ± 0.11	0.65 ± 0.11	0.41 ± 0.02	2.56 ± 0.37
WGM	0.33 ± 0.02	0.72 ± 0.04	0.65 ± 0.06	0.46 ± 0.04	1.91 ± 0.17
WGME	0.37 ± 0.01	0.69 ± 0.04	0.62 ± 0.02	0.53 ± 0.04	1.69 ± 0.11
WHIAB	0.14 ± 0.02	0.38 ± 0.08	0.18 ± 0.01	0.36 ± 0.02	1.31 ± 0.16

Cepa	Características relevantes	$X_{m\acute{a}x}$ (g/L)	q_{ac} (g/g h)	Conc. de H_{ac} (g/L)	P (mg/L)
W3110	<i>IN(rrnD-rrnE)1, rph-1</i>	0.94 ± 0.13	0.25 ± 0.02	0.40 ± 0.01	0.83 ± 0.18
WG	<i>W3110, $\Delta ptsG::Km$</i>	1.17 ± 0.02	0.00 ± 0.00	N.D.	1.06 ± 0.19
WGE	<i>$\Delta ptsG, \Delta nagE::Km$</i>	0.77 ± 0.04	0.00 ± 0.00	N.D.	0.64 ± 0.13
WGMAB	<i>$\Delta ptsG \Delta manX, \Delta mglABC::Cm$</i>	0.68 ± 0.25	0.00 ± 0.00	N.D.	1.63 ± 0.45
WGM	<i>$\Delta ptsG, \Delta manX::Km$</i>	0.89 ± 0.04	0.00 ± 0.00	N.D.	1.09 ± 0.34
WGME	<i>$\Delta ptsG, \Delta manX, \Delta nagE::Km$</i>	0.92 ± 0.05	0.00 ± 0.00	N.D.	1.19 ± 0.41
WHIAB	<i>$\Delta ptsHIcrr, \Delta mglABC::Cm$</i>	0.93 ± 0.13	0.00 ± 0.00	N.D.	1.47 ± 0.30

N.D.=No detectado

El que no se haya obtenido una relación de tipo lineal entre el $Y_{p/s}$ y la μ , se puede deber a que a una cierta velocidad de consumo de glucosa, se optimizan todos los requerimientos celulares, sin embargo, cuando se baja aun más la q_s , el flujo de entrada de glucosa ya no

es suficiente para mantener al plásmido y a la célula, de esta manera disminuye la producción de pHN y conforme baja aun más la q_s , se ve afectado más y más el $Y_{P/S}$ y $Y_{P/X}$. Este resultado no contradice la idea de que a una menor q_s se adquiere estabilidad por el plásmido, así como, una replicación privilegiada sobre otras vías metabólicas de la célula, lo que conduce a una considerable acumulación de plásmido ya que su replicación continúa a la misma velocidad, independiente de la división celular (Prather *et al.*, 2003).

Un parámetro importante en los procesos biotecnológicos es la productividad específica (q_p), debido a que representa la velocidad de producción. Recordemos que el factor tiempo, tiene un papel importante en los procesos biotecnológicos, pues entre más tiempo se tarde un cultivo produciendo, su costo de mantenimiento aumenta y por ende el valor del producto de interés. En general, la q_p fue similar en todas las cepas (0.60 mg/g h) a excepción de la mutante con la menor velocidad de crecimiento ($\Delta ptsHIcrr$, $\Delta mglABC$). Esto se debe posiblemente, a que el flujo de entrada de glucosa ($q_s = 0.38 \pm 0.08$ g/g h) es bajo, éste puede no ser suficiente para mantener al plásmido y a las reacciones metabólicas propias de la célula, por lo que la síntesis del plásmido se ve disminuida considerablemente.

En la colección de mutantes, seguramente la energía y precursores generados con la lisis de la glucosa entrante, está jugando un papel importante, lo cual se demuestra al verse disminuido el $Y_{P/S}$ y el $Y_{P/X}$ cuando la q_s es menor a 0.85 g/g h. Aunque ya se explico que la disminución de la q_s en una mutante beneficia la producción de plásmido, en este caso, la energía generada con la poca glucosa entrante <0.85 g/g h, limita la producción. Observamos un decremento en los rendimientos de plásmido de las cepas $\Delta ptsG$, $\Delta manX$ ($q_s = 0.72 \pm 0.04$ g/g h), $\Delta ptsG$, $\Delta manX$, $\Delta nagE$ ($q_s = 0.69 \pm 0.04$ g/g h) y $\Delta ptsHIcrr$, $\Delta mglABC$ ($q_s = 0.38 \pm 0.08$ g/g h), respecto a la mutante $\Delta ptsG \Delta manX$, $\Delta mglABC$, aunque hay que hacer notar, que el rendimiento del plásmido de las tres cepas (WGM, WGME y WHIAB) fue mayor con respecto a las mutantes cuya q_s fue >0.85 g/g h (Tabla 22).

Además, como ya se explicó, es posible que haya un cambio en el metabolismo de la célula al estar produciéndose el plásmido pHN con origen pUC (Wang *et al.*, 2006) ya que se ha demostrado que este plásmido tiene un efecto sobre las vías principales como glucólisis, PPP y TCA.

Se triplico el $Y_{P/X}$ en la cepa $\Delta ptsG$, $manX$, $\Delta mglABC$. Este resultado, es un buen comienzo para la producción de pHN, sin embargo, no es suficiente para producirlo a gran escala, por lo que es necesario seguir modificando genéticamente a la mutante $\Delta ptsG$, $\Delta manX$, $\Delta mglABC$ antes de llevarla a un cultivos de mayor escala. Un segundo enfoque molecular que podría aplicarse a esta mutante es la inactivación del gen *recA* (Se considera que este gen influyen en la estabilidad del DNA plasmídico porque reduce la degradación de éste), inactivación que ha mostrado tener buenos resultados en el $Y_{P/X}$, ya que induce incrementos hasta 3 o 4 veces más que con respecto a la cepa silvestre (Bell 2005; Keseler *et al.*, 2009; Yau *et al.*, 2008; Singer *et al.*, 2009).

Los resultados obtenidos con las mutantes seleccionadas permitieron relacionar el efecto de diferentes q_s sobre la q_p y el $Y_{P/X}$. Al mismo tiempo, el estudio permitió evaluar diferentes mecanismos de transporte de glucosa. Es necesario considerar, que la mejor cepa de producción de plásmido encontrada en este trabajo, no necesariamente se relacionara a la mejor cepa para producir por ejemplo, proteína recombinante.

4. Conclusiones

El efecto de la inactivación de *ptsG* y *ptsG, manX* disminuye la q_s en la cepa W3110, mientras que en las cepas MG1655 y BW25113 la q_s aumenta con la doble inactivación. Este resultado indica, que el efecto de la inactivación de genes asociados al transporte de glucosa tiene efectos marcadamente diferentes en las cepas K-12.

De las tres cepas silvestres evaluadas, la cepa que dirige menor cantidad de glucosa a la formación de acetato es la W3110.

Los transportadores del PTS estudiados en las mutantes $\Delta ptsG$ y $\Delta ptsG, \Delta manX$ que mostraron una contribución significativa al consumo de glucosa fueron MalX y NagE, los cuales en condiciones silvestres transportan preferentemente maltosa y N-acetilglucosamina, respectivamente.

La única proteína del PTS que tiene importancia para el transporte de glucosa en la mutante $\Delta ptsG, \Delta manX$ es NagE.

Se demostró, que en la cepa PTS⁺ ($\Delta ptsG, \Delta manX$), la proteína simporte GalP contribuye al consumo de glucosa.

Se demostró que existe la posible actividad de una glucocinasa adicional a *glkA*.

En ausencia de GalP y MglABC existen una o más proteínas no-PTS que son capaces de transportar glucosa al interior de *E. coli*, las cuales le permiten crecer a la cepa $\Delta ptsHIcrr$, $\Delta galP$, $\Delta mglABC$ a una μ de $0.20 \pm 0.01 \text{ h}^{-1}$.

Se encontró una relación lineal entre la μ y la q_s de todas las cepas derivadas de W3110 la cual fue de $q_s = 2.74\mu$.

Se encontró que, conforme aumenta la q_s , aumenta la q_{ac} de manera lineal en la cepa W3110. A una q_s igual o menor a 0.83 g/g h ya no hay producción de acetato, esto corresponde a una velocidad de crecimiento de $0.41 \pm 0.02 \text{ h}^{-1}$.

Dado que no hay un cambio significativo en el $Y_{X/S}$ conforme cambia la q_s , entonces, se deduce que aun cuando el flujo de carbono es tan bajo como 0.4 g/g h , la redistribución de carbono favorece principalmente la formación de biomasa.

La inactivación del operón *mglABC* causa un aumento en el $Y_{P/X}$ del 34% respecto a la cepa parental ($\Delta ptsG$, $\Delta manX$). Posiblemente por la reducción del gasto energético de transportar y fosforilar a la glucosa.

Aun cuando las células se someten a una carga metabólica extra, como lo es la producción de un plásmido de alto número de copias, la μ sigue dependiente de la q_s de manera lineal.

De manera general, la disminución en la velocidad de crecimiento ayudo a mejorar el rendimiento de plásmido sobre biomasa respecto a la cepa silvestre.

El punto óptimo del $Y_{P/X}$ y $Y_{P/S}$ de pHN corresponde a una q_s de 0.85 ± 0.11 g/g h, y a una μ de 0.33 ± 0.06 h⁻¹. De acuerdo con estos resultados, una q_s menor (0.85 g/g h), no es suficiente para mantener la producción del plásmido ya que se observa disminución en el $Y_{P/X}$, el cual indica que la cantidad de pHN obtenido disminuyó por gramo de biomasa.

Perspectivas

Con base a los resultados obtenidos, surgen varias perspectivas que pudieran conducir a entender mejor cual es el grado de expresión de los genes de transporte bajo las condiciones genéticas evaluadas y si el estado energético de la célula determina la expresión de estos genes. Tratar de identificar si la q_s obtenida en la mutante $\Delta ptsG$, $\Delta manX$, $\Delta mglABC$ cambió los flujos de carbono en el metabolismo central respecto a la cepa silvestre y si esto, pudiera haber favorecido la producción de mayor cantidad de plásmido pHN.

Analizar los transcritos para las cepas $\Delta ptsG$, $\Delta ptsG \Delta manX$, $\Delta ptsHIcrr$ y $\Delta ptsHIcrr \Delta galP$, con el fin de identificar cuáles genes de transporte se expresan y a qué nivel, con respecto a la cepa silvestre W3110.

Medir el metabolito intracelular cAMP en las mutantes $\Delta ptsG$, $\Delta ptsG \Delta manX$, $\Delta ptsHIcrr$ y $\Delta ptsHIcrr \Delta galP$ y relacionarlo con la expresión de los genes que se estudiaron en este trabajo.

Realizar análisis de transcriptómica y de proteómica de la cepa $\Delta ptsHIcrr$, $\Delta galP$, $\Delta mglABC$ con el fin de identificar a la otra o otras proteínas que están internalizando a la glucosa en este fondo genético y medir también la expresión de *glk*.

Análisis del flujo de las cepas W3110 y $\Delta ptsG$, $\Delta manX$, $\Delta mglABC$ para identificar cuáles fueron los cambios importantes en el flujo de carbono de las mutantes, y con este resultado tratar de predecir cómo benefició a la producción de plásmido.

Balance energético de cepas con q_s similar pero diferente rendimiento de plásmido, es el caso de las cepas $\Delta ptsG$, $\Delta nagE$ y $\Delta ptsG$, $\Delta manX$, $\Delta mglABC$ para identificar si el estado energético de la célula está siendo limitante para la producción de plásmido.

Comparar a la mutante $\Delta ptsG$, $\Delta manX$, $\Delta mglABC$ que mostró el mejor $Y_{P/S}$, con respecto a la cepa silvestre W3110 en quimiostato manteniendo la misma μ que la mutante (0.33 ± 0.06).

Producción de proteínas recombinantes o compuestos aromáticos, como modelos de producción en la colección de mutantes generadas que abarquen un amplio rango de q_s .

Producción Científica

- Impartición de clase "Transportadores de glucosa en bacterias", Universidad Politécnica del Estado de Morelos. Enero 2013.
- Presentación Oral en el Congreso Nacional de Bioquímica. Realizado en Oaxaca, Oax, del 11 al 17 de Noviembre del 2012.
- Manuscrito en preparación para ser sometido a Microbial Cell Factories, titulado: "Modification of glucose import capacity in *Escherichia coli*: physiologic consequences and application to improve DNA vaccine production".

Referencias bibliográficas

- Abdel-Hamid, A., Attwood, M., Guest, R.** 2001. Pyruvate oxidase contributes to the aerobic growth efficiency of *Escherichia coli*. *Microbiology* 147(6):1483–1498.
- Åkesson, M., Hagander, P., Axelsson, JP.** 2001. Avoiding acetate accumulation in *Escherichia coli* cultures using feedback control of glucose feeding. *Biotechnology and Bioengineering* 73(3):223–230.
- Aristidou, AA, San, K-Y., Bennett, GN.** 1995. Metabolic engineering of *Escherichia coli* to enhance recombinant protein production through acetate reduction. *Biotechnology Progress* 11(4):475–478.
- Arnold, CN., McElhanon, J., Lee, A., Leonhart, R., Siegele, DA.** 2001. Global analysis of *Escherichia coli* gene expression during the acetate-induced acid tolerance response. *Journal of Bacteriology* 183(7):2178–2186.
- Arora, KK., Pedersen, PL.** 1995. Glucokinase of *Escherichia-coli*: Induction in response to the stress of overexpressing foreign proteins. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 319(2):574-578.
- Baba, T., Takeshi, A., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K., Tomita, M., Wanner, B., Mori, H.** 2006. Construction of *Escherichia coli* k-12 inframe, single-gene knockout mutants: the keio collection. *Molecular Systems Biology* doi: 10.1038/msb4100050.
- Bäcklund, E., Ignatushchenko, M., Larsson, G.** 2011. Suppressing glucose uptake and acetic acid production increases membrane protein overexpression in *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories* 10:35.
- Bäcklund, E., Markland, K., Larsson, G.** 2008. Cell engineering of *Escherichia coli* allows high cell density accumulation without fed-batch process control. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 31(1):11-20.
- Bäcklund, E., Reeks, D., Markland, K., Weir, N., Bowering, L., Larsson, G.** 2008. Fedbatch design for periplasmic product retention in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology* 135(4):358-365.
- Barabote, RD., Saier, MJr.,** 2005. Comparative genomic analysis of the bacterial phosphotransferase system. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 69(4):608-634.
- Bell, CE.** 2005. Structure and mechanism of *Escherichia coli* RecA ATPase. *Molecular Microbiology* 58(2):358–366.

- Bentley, WE., Mirjalili, N., Andersen, DC., Davis, RH., Kompala, DS.** 1990. Plasmid-encoded protein: The principal factor in the "metabolic burden" associated with recombinant bacteria. *Biotechnology and Bioengineering* 35(7):668-681.
- Bettenbrock, K., Fischer, S., Kremling, A., Jahreis, K., Sauter, T., Guiller, E-D.** 2006. A quantitative approach to catabolite repression in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* 281(5):2578-2584.
- Bettenbrock, K., Sauter, T., Jahreis, K., Kremling, A., Lengeler, J., Gilles, E-D.** 2007. Correlation between growth rates, EIIC^{Cr} phosphorylation, and intracellular cyclic AMP levels in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology* 189(19):6891-6900.
- Blattner, FR., Plunkett, G., Bloch, CA., Perna, NT., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, JD., Rode, CK., Mayhew, GF., Gregor, J., Davis, NW., Kirkpatrick, HA., Goeden, MA., Rose, DJ., Mau, B., Shao, Y.** 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277(5331):1453-1462.
- Bolivar, F., Rodriguez, RL., Betlach, MC. Boyer, HW.** 1977. Construction and characterization of new cloning vehicles. I. Ampicillin-resistant derivatives of the plasmid pMB9. *Gene* 2(2):75-93.
- Boshart, M., Weber, F., Jahn, G., Dorsch-Häsler, K., Fleckenstein, B., Schaffner, W.** 1985. A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus. *Cell* 41(2):521-530.
- Boström, M., Markland, K., Sandén, A., Hedhammar, M., Hober, S., Larsson, G.** 2005. Effect of substrate feed rate on recombinant protein secretion, degradation and inclusion body formation in *Escherichia coli*. *Applied Genetics and Molecular Biotechnology* 68(1):82-90.
- Bouet, J., Nordstrom, K., Lane D.** 2007. Plasmid partition and incompatibility - the focus shifts. *Molecular Microbiology* 65(6):1405-1414.
- Bower, DM., Prather, KL.** 2009. Engineering of bacterial strains and vectors for the production of plasmid DNA. *Applied Microbiology and Biotechnology* 82(5):805-813.
- Bramley, H., Kornberg, H.** 1987. Sequence homologies between proteins of bacterial phosphoenolpyruvate-dependent sugar phosphotransferase system: identification of possible phosphate carrying histidine residues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84(14):4777-4780.
- Brantl, S.** 1994. The copR gene product of plasmid pIP501 acts as a transcriptional repressor at the essential *repR* promoter. *Molecular Microbiology* 14(3):473-483.
- Brückner, R., Titgemeyer, F.** 2002. Carbon catabolite repression in bacteria: choice of the carbon source and autoregulatory limitation of sugar utilization. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters* 209(2):141-148.

- Buhr, A., Daniels, GA., Bernhard, E.** 1992. The glucose transporter of *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry* 267(6):3847-3851.
- Capaldo, FN., Ramsey, G., Barbour, SD.** 1974. Analysis of the growth of recombination-deficient strains of *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology* 118(1):242-249.
- Carlson, R., Srienc, F.** 2004. Fundamental *Escherichia coli* biochemical pathways for biomass and energy production: Identification of reactions. *Biotechnology Bioengineering* 85(1):1-19.
- Carnes, AE., Williams, JA.** 2007. Plasmid DNA manufacturing technology. *Recent Patents on Biotechnology* 1(2):151-166.
- Casali, N.** 2003. *Escherichia coli* Host strains. In Lorence, A. (ed.), *Methods in Molecular Biology: E. coli plasmid vectors*, 3rd ed. Humana Press.
- Caspi, R., Foerster, H., Fulcher, CA., Kaipa, P., Krummenacker, M., Latendresse, M., Paley, S., Rhee, SY., Shearer, AG., Tissier, C., Walk, TC., Zhang, P., Karp, PD.** 2008. The MetaCyc Database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of pathway/genome databases. *Nucleic Acids Research* 36:623-631.
- Cesareni, G., Muesing, MA., Polisky, B.** 1982. Control of ColE1 DNA replication: the *rop* gene product negatively affects transcription from the replication primer promoter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 79(20):6313-6317.
- Chao, YP., Liao JC.** 1993. Alteration of growth yield by overexpression of phosphoenolpyruvate carboxylase and phosphoenolpyruvate carboxykinase in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* 59(12):4261-4265.
- Chen, W., Graham, C., Ciccarelli, RB.** 1997. Automated fed-batch fermentation with feed-back controls based on dissolved oxygen (DO) and pH for production of DNA vaccines. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 18(1):43-48.
- Cherrington, CA., Hinton, M., Chopra, I.** 1990. Effect of short-chain organic acids on macromolecular synthesis in *Escherichia coli*. *Journal of Applied Bacteriology* 68(1):69-74.
- Couturier, M., Bex, F., Bergquist, PL., Maas, WK.** 1988. Identification and classification of bacterial plasmid. *Microbiological Reviews* 52(3):375-395.
- Cranenburgh, RM., Hanak, AJ., Williams, SG., Sherratt, DJ.** 2001. *Escherichia coli* strains that allow antibiotic-free plasmid selection and maintenance by repressor titration. *Nucleic Acids Research* 29(5):1-6.
- Cubas, R., Zhang, S., Li, M., Chen, C., Yao, Q.** 2011. Chimeric Trop2 virus-like particles: a potential immunotherapeutic approach against pancreatic cancer. *Journal Immunotherapy* 34(3):251-263.

- Cunningham, DS., Liu, Z., Domagalski, N., Koepsel, RR., Ataii, MM., Domach, MM.** 2009. Pyruvate kinase-deficient *Escherichia coli* exhibits increased plasmid copy number and cyclic AMP levels. *Journal of Bacteriology* 191(9):3041–3049.
- Curtis, S., Epstein, W.** 1975. Phosphorylation of D-Glucose in *Escherichia coli* mutants defective in glucosephosphotransferase, mannosephosphotransferase, and glucokinase. *Journal of Bacteriology* 122(3):1189-1199.
- DaSilva, NA., Bailey, JE.** 1986. Theoretical growth yield estimates for recombinant cells. *Biotechnology and Bioengineering* 28(5):741–746.
- Datsenko, K., Wanner, B.** 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):6640-6645.
- Datta, N., Hedges, R.** 1972. Host Ranges of R Factors. *Journal of General Microbiology* 70:453-460.
- De Anda, R., Lara, AR., Hernández, V., Hernández-Montalvo, V., Gosset, G., Bolívar, F., Ramírez, OT.** 2006. Replacement of the glucose phosphotransferase transport system by galactose permease reduces acetate accumulation and improves process performance of *Escherichia coli* for recombinant protein production without impairment of growth rate. *Metabolic Engineering* 8(3):281–290.
- Death, A., Ferenci, T.** 1994. Between feast and famine: Endogenous inducer synthesis in the adaptation of *Escherichia coli* to growth with limiting carbohydrates. *Journal of Bacteriology* 176(16):5101-5107.
- Deutscher, J., Francke, C., Postma, W.** 2006. How phosphotransferase system-related protein phosphorylation regulates carbohydrate metabolism in bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 70(4):939-1031.
- Diaz-Ricci, JC., Regan, L., Bailey, JE.** 1991. Effect of alteration of the acetic acid synthesis pathway on the fermentation pattern of *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering* 38(11):1318–1324.
- Dong, WR., Xiang, LX., Shao, JZ.** 2010. Novel antibiotic-free plasmid selection system based on complementation of host auxotrophy in the NAD *de novo* synthesis pathway. *Applied Environmental Microbiology* 76(7):2295–2303.
- Eiteman, MA., Altman, E.** 2006. Overcoming acetate in *Escherichia coli* recombinant protein fermentations. *Trends in Biotechnology* 24(11):530–536.
- Emmerling, M., Bailey, JE., Sauer, U.** 1999. Glucose catabolism of *Escherichia coli* strains with increased activity and altered regulation of key glycolytic enzymes. *Metabolic Engineering* 1(2):117-127.

- Engberg, B., Nordström, K.** 1975. Replication of R-factor R1 in *Escherichia coli* K-12 at different growth rates. *Journal of Bacteriology* 123(1):179–186.
- Enri, B.** 2002. Glucose transport by the bacterial phosphotransferase system (PTS): An interface between Energy- and signal transduction. *Microbial Transport Systems* Winkelmann 115-137.
- Erbs, P., Findeli, A., Kintz, J., Cordier, P., Hoffmann, C., Geist, M., Balloul, JM.** 2008. Modified vaccinia virus Ankara as a vector for suicide gene therapy. *Cancer Gene Therapy* 15(1):18-28.
- Farmer, WR., Liao, JC.** 1997. Reduction of aerobic acetate production by *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* 63(8):3205-3210.
- Ferenci, T.** 2001. Hungry bacteria –definition and properties of a nutritional state. *Environmental Microbiology* 3(10):605–611.
- Fic, E., Bonarek, P., Gorecki, A., Krok-Kedracka, S., Mikolajczak, J., Polit, A., Tworzydło, M., Wasylewska-Dziedzicka, M., Wasylewski, Z.** 2008. cAMP receptor protein from *Escherichia coli* as a model of signal transduction in proteins. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 17(1):1-11.
- 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(2):70–87.
- Flores, N., Xiao, J., Berry, A., Bolívar, F., Valle, F.** 1996. Pathway engineering for the production of aromatic compounds in *Escherichia coli*. *Nature Biotechnology* 14(5):620-623.
- Flores, S., de Anda-Herrera, R., Gosset, G., Bolívar, F. G.** 2004. Growth-rate recovery of *Escherichia coli* cultures carrying a multicopy plasmid, by engineering of the pentose-phosphate pathway. *Biotechnology and Bioengineering* 87(4):485–494.
- Flores, S., Gosset, G., Flores, N., De Graff, AA., Bolívar, F.** 2002. Analysis of carbon metabolism in *Escherichia coli* strains with an inactive phosphotransferase system by ¹³C labeling and NMR spectroscopy. *Metabolic Engineering* 4(2):124–137.
- Fraenkel, DG.** Glycolysis. 1996. *Escherichia coli* and *Salmonella*, Cellular and Molecular Biology, 2nd edition, Vol I, 189-198.
- Gabor, E., Göhler, AK., Kosfeld, A., Staab, A., Kremling, A., Jahreis, K.** 2011. The phosphoenolpyruvate-dependent glucose-phosphotransferase system from *Escherichia coli* K-12 as the center of a network regulating carbohydrate flux in the cell. *European Journal of Cell Biology* 90(9):711-720.

- Goh, S., Good, L.** 2008. Plasmid selection in *Escherichia coli* using an endogenous essential gene marker. *BioMed Central Biotechnology* 8:61.
- Görke, B., Stülke, J.** 2008. Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients. *Nature Reviews Microbiology* 6(8):613-624.
- Gosset, G.** 2005. Improvement of *Escherichia coli* production strains by modification of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system. *Microbial Cell Factories* 4(1):14.
- Gosset, G., Yong-Xiao, J., Berry, A.** 1996. A direct comparison of approaches for increasing carbon flow to aromatic biosynthesis in *Escherichia coli*. *Journal of Industrial Microbiology* 17(1):47-52.
- Gurunathan, S., Klinman, DM., Seder, RA.** 2000. DNA vaccines: immunology, application, and optimization. *Annual Review of Immunology* 18:927-974.
- Han, Y., Liu, S., Ho, J., Danquah, M., Forde, GM.** 2009. Using DNA as a drug—Bioprocessing and delivery strategies. *Chemical Engineering Research and Design* 87(3):343-348.
- Harayama, S., Bollinger, J., Lino, T., Hazelbauer, GL.** 1983. Characterization of the *mgl* operon of *Escherichia coli* by transposon mutagenesis and molecular cloning. *Journal of Bacteriology* 153(1):408-415.
- Hayashi, K., Morooka, N., Yamamoto, Y., Fujita, K., Isono, K., Choi, S., Ohtsubo, E., Baba, T., Wanner, BL., Mori, H., Horiuchi, T.** 2006. Highly accurate genome sequences of *Escherichia coli* K-12 strains MG1655 and W3110. *Molecular Systems Biology* 2:1-5.
- Hecker, M., Schroeter, A., Mach, F.** 1985. *Escherichia coli relA* strains as hosts for amplification of pBR322 plasmid DNA. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters* 29(3):331-334.
- Hernández-Montalvo, V., Martínez, A., Hernández-Chavez, G., Bolívar, F., Valle, F., Gosset, G.** 2003. Expression of *galP* and *glk* in a *Escherichia coli* PTS mutant restores glucose transport and increases glycolytic flux to fermentation products. *Biotechnology and Bioengineering* 83(6):687-694.
- Herrera, ME., Barcenas, P., Hernández, R., Méndez, A., Pérez-Ishiwara, G., Barrón, B.** 2010. A 176 amino acid polypeptide derived from the mumps virus HN ectodomain shows immunological and biological properties similar to the HN protein. *Virology Journal* 7:1-11.
- Herrera ME., Barrón, LB.** 2007. Evaluación de una Vacuna de DNA contra la Infección del Virus de la Parotiditis Humana (MuV). *BioTecnología* 10(1):28-33.

Hofmann, KH., Neubauer, P., Reithdorf, S., Hecker, M. 1990. Amplification of pBR322 plasmid DNA in *Escherichia coli relA* strains during batch and fed-batch fermentation. *Journal of Basic Microbiology* 30(1):37–41.

Invitrogen 2001. Manual of pcDNA3.1 tools. www.invitrogen.com/content/sfs/manuals/pcdna3.1_man.pdf (18/05/2010).

Jana S. y Deb J. 2005. Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology Biotechnology*. 67(3):289–298.

Jensen, E., Carlsen, S. 1990. Production of recombinant human growth hormone in *Escherichia coli*: Expression of different precursors and physiological effects of glucose, acetate, and salts. *Biotechnology and Bioengineering* 36(1):1–11.

Jones-Prather, KL., Sager, KS., Murphy, J., Chartrain, M. 2003. Industrial scale production of plasmid DNA for vaccine and gene therapy: plasmid design, production, and purification. *Enzyme and Microbial Technology* 33(7):865–883.

Kayser, A., Weber, J., Hecht, V., Rinas, U. 2005. Metabolic flux analysis of *Escherichia coli* in glucose-limited continuous culture. I. Growth-rate-dependent metabolic efficiency at steady state. *Microbiology* 151(3):693–706.

Keseler, IM., Bonavides-Martínez, C., Collado-Vides, J., Gama-Castro, S., Gunsalus, RP., Johnson, DA., Krummenacker, M., Nolan, LM., Paley, S., Paulsen, IT., Peralta-Gil, M., Santos-Zavaleta, A., Shearer, AG., Karp, PD. 2009. EcoCyc: A comprehensive view of *Escherichia coli* biology. *Nucleic Acids Research* 37:464–470.

Kim, JY., Ryu, DY. 1991. The effects of plasmid content, transcription efficiency, and translation efficiency on the productivity of a cloned gene protein in *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering* 38(11):1271–1279

Kirkpatrick C., Maurer LM., Oyelakin NE., Yoncheva YN., Maurer R., Slonczewski JL. 2001. Acetate and formate stress: opposite responses in the proteome of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 183(21):6466–6477.

Kleman, G., Strohl, WR. 1994. Acetate metabolism by *Escherichia coli* in high-cell density fermentation. *Applied Environmental Microbiology* 60(11):3952–3958.

Korz, DJ., Rinas, U., Hellmuth, K., Sanders, EA., Deckwer, WD. 1995. Simple fedbatch technique for high cell density cultivation of *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology* 39(1):59–65.

Kumar, PKR., Maschke, HE., Friehs, K., Schügerl, K. 1991. Strategies for improving plasmid stability in genetically modified bacteria in bioreactors. *Trends in Biotechnology* 9(1):279–284.

Kyslik, P., Dobisova, M., Maresova, H., Sobotkova, L. 1992. Plasmid burden in chemostat culture of *Escherichia coli*: Its effect on the selection for overproducers of host enzymes. *Biotechnology and Bioengineering* 41(3):325–329.

Lahijani, R., Hulley, G., Soriano, G., Horn, NA., Marquet, M. 1996. High-yield production of pBR322-derived plasmids intended for human gene therapy by employing a temperature-controllable point mutation. *Human Gene Therapy* 7(16):1971–1980.

Lara, AR. 2011. Producción de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 10(2):209-223.

Lara, AR., Caspeta, L., Gosset, G., Bolívar, F., Ramírez, OT. 2007. Utility of an *Escherichia coli* strain engineered in the substrate uptake system for improved culture performance at high glucose and cell concentrations: An alternative to fed-batch cultures. *Biotechnology and Bioengineering* 99(4):893–901.

Lara, AR., Ramírez, OT., 2012. Plasmid DNA production for therapeutic applications. In Lorence, A. (ed.), *Methods in Molecular Biology: Recombinant Gene Expression*, 3rd ed. Humana Press.

Lee, SY. 1996. High cell density culture of *Escherichia coli*. *Trends Biotechnology* 14(3):98-105.

Lemuth, K., Hardiman, T., Winter, S., Pfeiffer, D., Keller, M., Lange, S., Reuss, M., Schmid, R., Siemann-Herzberg M. 2008. Global transcription and metabolic flux analysis of *Escherichia coli* in glucose-limited fed-batch cultivations. *Applied and Environmental Microbiology*. 74(22):7002-7015.

Lengeler, JW., Titgemeyer F., Vogler AP., Wohrl BM., 1990. Structures and homologies of carbohydrate: phosphotransferase system (PTS) proteins. *Biological Sciences* 326(1236):489-504.

Lin-Chao, S., Bremer, H. 1986. Effect of the bacterial growth rate on replication control of plasmid pBR322 in *Escherichia coli*. *Molecular and General Genetics* 203(1):143–149.

Lin-Chao, S., Chen, W., and Wong, T. 1992. High copy number of the pUC plasmid results from a Rom/Rop-suppressible point mutation in RNAII. *Molecular Microbiology* 6(22):3385–3393.

Listner, K., Bentley, L., Okonkowski, J., Kistler, C., Wnek, R., Caparoni, A., Junker, B., Robinson, D., Salmon, P., Chartrain, M. 2006. Development of a highly productive and scalable plasmid DNA production platform. *Biotechnology Progress* 22(5):1335–1345.

Löser, Ch., Ray, P. 1996. Stability of the pBR322 plasmid derivative pBB210 in *Escherichia coli* TG1 under non-selective and selective conditions. *Acta Biotechnologica* 15(4):375–380.

- Luli, GW., Strohl, WR.** 1990. Comparison of growth, acetate production, and acetate inhibition of *Escherichia coli* strains in *batch* and *fed-batch* fermentations. *Applied and Environmental Microbiology* 56(4):1004–1011.
- Majewski, RA., Domach, MM.** 1990. Simple constrained-optimization view of acetate overflow in *E. coli*. *Biotechnology and Bioengineering* 35(7):732–738.
- Märkl H., Zenneck C., Dubach A., Ogonna J.** 1993. Cultivation of *Escherichia coli* to high cell densities in a dialysis reactor. *Applied Microbiology Biotechnology* 39(1):48–52.
- Miki, T., Yasukochi, T., Nagatani, H., Furuno, M., Orita, T., Yamada, H., Imoto, T., Horiuchi, T.** 1987. Construction of a plasmid vector for the regulatable high level expression of eukaryotic genes in *Escherichia coli*: an application to overproduction of chicken lysozyme. *Protein Engineering* 1(4):327–332.
- Muñoz-Elias, EJ., McKinney, JD.** 2006. Microreview. Carbon metabolism of intracellular bacteria. *Cellular Microbiology* 8(1):10–22.
- Nahku, R., Valgepea, K., Lahtvee, PJ., Erm, S., Abner, K., Adamberg, K., Vilu, R.** 2010. Specific growth rate dependent transcriptome profiling of *Escherichia coli* K-12 MG1655 in accelerostat cultures. *Journal of Biotechnology* 145(1):60–65.
- Nakano, K., Rischke, M., Sato, S., Märkl, H.** 1997. Influence of acetic acid on the growth of *Escherichia coli* K12 during high-cell-density cultivation in a dialysis reactor. *Applied Microbiological Biotechnology* 48(5):597–601.
- Nelson, J. A., Reynolds-Kohler, C., Smith, B. A.** 1987. Negative and positive regulation by a short segment in the 5'-flanking region of the human cytomegalovirus major immediate-early gene. *Molecular and Cellular Biology* 7(11):4125–4129.
- Nichols, WW., Ledwith, BJ., Manam, SV., Troilo, PJ.** 1995. Potential DNA vaccine integration into host cell genome. *Annals of the New York Academy of Sciences* 772:30–39.
- Notley-McRobb, L., Death, A., Ferenci T.** 1997. The relationship between external glucose concentration and cAMP levels inside *Escherichia coli*: implications for models of phosphotransferase-mediated regulation of adenylate cyclase. *Microbiology* 143(6):1909–1918.
- Novick, RP.** 1987. Plasmid Incompatibility. *Microbiological Reviews* 51(4):381–395.
- O'Brien, PJ., Herschlag, D.** 1999. Catalytic promiscuity and the evolution of new enzymatic activities. *Chemistry and Biology* 6(4):91–105.
- O'Kennedy, RD., Baldwin, C., Keshavarz-Moore, E.** 2000. Effects of growth medium selection on plasmid DNA production and initial processing steps. *Journal of Biotechnology* 76(2–3):175–183.

- O’Kennedy, RD., Ward, JM., Keshavarz-Moore, E.** 2003. Effects of fermentation strategy on the characteristics of plasmid DNA production. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 37(1):83–90.
- O’Mahony, K., Freitag, R., Hilbrig, F., Müller, M., Schumacher, I.** 2007. Strategies for high titre plasmid DNA production in *Escherichia coli* DH5 α . *Process Biochemistry* 42(7):1039–1049.
- Ow, W., Nissom, PM., Philp, R., Oh, KW., Yap, GS.** 2006. Global transcriptional analysis of metabolic burden due to plasmid maintenance in *Escherichia coli* DH5 α during batch fermentation. *Enzyme and Microbial Technology* 39(3):391–398.
- Paalme, T., Elken, R., Kahru, A., Vanatalu, K., Vilu, R.** 1997. The growth rate control in *Escherichia coli* at near to maximum growth rates: the A-stat approach. *Antonie Van Leeuwenhoek* 71(3):217–230.
- Paalme, T., Tijtsma, K., Kahru, A., Vanatalu, K., Vilu, R.** 1990. Glucose-limited fed-batch cultivation of *Escherichia coli* with computer-controlled fixed growth rate. *Biotechnology and Bioengineering* 35(3):312–319.
- Pan, JG., Rhee, JS., Lebeault, JM.** 1987. Physiological constraints in increasing biomass concentration of *Escherichia coli* B in fed-batch culture. *Biotechnology Letters* 9(2):89–94.
- Patten, CL., Kirchhof, MG., Schertzberg, MR., Morton, RA., Schellhorn, HE.** 2004. Microarray analysis of RpoS-mediated gene expression in *Escherichia coli* K-12. *Molecular Genetics Genomics* 272(5):580–591.
- Phue, JN., Lee, SJ., Trinh, L., Shiloach, J.** 2008. Modified *Escherichia coli* B (BL21), a superior producer of plasmid DNA compared with *Escherichia coli* K (DH5 α). *Biotechnology and Bioengineering* 101(4):831–836.
- Phue, JN., Shiloach, J.** 2004. Transcription levels of key metabolic genes are the cause for different glucose utilization pathways in *E. coli* B (BL21) and *E. coli* K (JM109). *Journal of Biotechnology* 109(1–2):21–30.
- Picon, A., Teixeira de Mattos, MJ., Postma, PW.** 2005. Reducing the glucose uptake rate in *Escherichia coli* affects growth rate but not protein production. *Biotechnology and Bioengineering* 90(2):191–200.
- Pirt, SJ.** 1982. Maintenance energy: a general model for energy-limited and energy-sufficient growth. *Archives of Microbiology* 133(4):300–302.
- Plumbridge, J.** 2000. A mutation which affects both the specificity of PtsG sugar transport and the regulation of *ptsG* expression by Mlc in *Escherichia coli*. *Microbiology* 146:2655–2663.

- Postma, PW., Lengeler, JW., Jacobson, R.** 1993. Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiology and Biology Reviews* 57(3):543-594.
- Postma, PW., Lengeler, JW., Jacobson, R.** 1996. Phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase systems. In: Neidhardt, F.C. (Ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology, 2nd ed. ASM Press, USA. 1149-1174.
- Prazeres, DM., Ferreira, GN., Monteiro, GA., Cooney, CL., Cabral, JM.** 1999. Large-scale production of pharmaceutical-grade plasmid DNA for gene therapy: problems and bottlenecks. *Trends in Biotechnology* 17(4):169-174.
- Raberg, M., Peplinski, K., Heiss, S., Ehrenreich, A., Voigt, B., Döring, C., Bömeke, M., Hecker, M., Steinbüchel A.** 2011. Proteomic and transcriptomic elucidation of the mutant *Ralstonia eutropha* G⁺1 with regard to glucose utilization. *Applied and Environmental Microbiology* 77(6):2058-2070.
- Reidl, J., Boos, W.** 1991. The malX malY operon of *Escherichia coli* encodes a novel enzyme II of the phosphotransferase system recognizing glucose and maltose and an enzyme abolishing the endogenous induction of the maltose system. *Journal of Bacteriology* 173(15):4862-4876.
- Rein, DT., Breidenbach, M., Curiel, DT.** 2006. Current developments in adenovirus based cancer gene therapy. *Future Oncology* 2(1):137-143.
- Reinikainen, P., Virkajärvi, I.** 1989. *Escherichia coli* growth and plasmid copy number in continuous cultivations. *Biotechnology Letters* 11(4):225-230.
- Reizer, A., Pao, GM., Saier MH.** 1991. Evolutionary relationships among the permease proteins of the bacterial phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system. Construction of phylogenetic trees and possible relatedness to proteins of eukaryotic mitochondria. *Journal of Molecular Evolution* 33(2):179-193.
- Ricci, CD., Hernández, ME.** Plasmid effects on *Escherichia coli* metabolism. 2000. *Critical Reviews in Biotechnology* 20(2):79-108.
- Robinson, HL.** DNA vaccines: basic mechanism and immune responses. *International Journal of Molecular Medicine* 5(5):549-555.
- Rosenthal, A., Youngbae, K., Gralla, J.** 2008. Regulation of transcription by acetate in *Escherichia coli*: in vivo and vitro comparisons. *Molecular Microbiology* 68(4):907-917.
- Rozkov, A., Avignone-Rossa, CA., Ertl, PF., Jones, P., O'Kennedy, RD., Smith, JJ., Dale, JW., Bushell, ME.** 2004. Characterization of the metabolic burden on *Escherichia coli* DH1 cells imposed by the presence of a plasmid containing a gene therapy sequence. *Biotechnology and Bioengineering* 88(7):909-915.

- Russell, J.** 1992. Another explanation for the toxicity of fermentation acids at low pH: anion accumulation versus uncoupling. *Journal of Applied Microbiology* 73(5):363-370.
- Ryan, W., Parulekar, S.J.** 1991. Recombinant protein synthesis and plasmid instability in continuous cultures of *Escherichia coli* JM103 harbouring a high copy number plasmid. *Biotechnology and Bioengineering* 37(5):415-429.
- Schmieger, H.** 1972. Phage P22-Mutants with increased or decreased transduction abilities. *Molecular and General Genetics* 119(1):75-88.
- Seo, J., Bailey, J.E.** 1985. Effects of recombinant plasmid content on growth properties and cloned gene product formation in *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering* 27(12):1668-1674.
- Seo, J., Bailey, J.E.** 1986. Continuous cultivation of recombinant *Escherichia coli*: existence of an optimum dilution rate for maximum plasmid and gene product concentration. *Biotechnology and Bioengineering* 28(10):1590-1594.
- Shiloach, J., Kaufman, J., Guillard, A., Fass, R.** 1996. Effect of glucose supply strategy on acetate accumulation, growth, and recombinant protein production by *Escherichia coli* BL21 (λ DE3) and *Escherichia coli* JM109. *Biotechnology and Bioengineering* 49(4):421-428.
- Singer, A., Eiteman, M.A., Altman E.** 2009. DNA plasmid production in different host strains of *Escherichia coli*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 36(4):521-530.
- Smith, H.A.** Regulation and review of DNA vaccine products. *Developments in Biologicals* 104:57-62.
- Snyder, L., Champness, W.** 2007. Molecular genetics of bacteria. American Society for Microbiology. Press: 1^a ed. 1997; 3^a ed.
- Steinsiek, S., Bettenbrock, K.** 2012. Glucose transport in *Escherichia coli* mutant strains with defects in sugar transport systems. *Journal of Bacteriology* 194(21):5897-5908.
- Summers, D.K.** 1991. The kinetics of plasmid loss. *Trends in Biotechnology* 9(1):273-278.
- Summers, D.K.** 1996. *The Biology of Plasmids*. Oxford: Blackwell Science Ltd.
- Szipirer, C.Y., Milinkovitch, M.C.** 2005. Separate-component-stabilization system for protein and DNA production without the use of antibiotics. *Biotechniques* 38(5):775-781.
- Tchieu, J.H., Norris, V., Edwards, J.S., Saier, J.R.** 2001. The complete phosphotransferase system in *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 3(3):329-346.

Ulmer, JB., Wahren, B., Liu, MA. 2006. Gene-based vaccines: recent technical and clinical advances. *Trends in Molecular Medicine* 12(5):216-222.

Valle, F., Muñoz, E., Ponce, E., Flores, N., Bolivar, F. 1996. Basic and applied aspects of metabolic diversity: The phosphoenolpyruvate node. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 17(5-6):458-462.

Van de Walle, M., Shiloach, J. 1998. Proposed mechanism of acetate accumulation in two recombinant *Escherichia coli* strains during high density fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*. 57(1)71-78.

Varma, A., Palsson, BO. 1994. Stoichiometric flux balance models quantitatively predict growth and metabolic by-product secretion in wild-type *Escherichia coli* W3110. *Applied Environmental Microbiology* 60(10):3724-3731.

Vemuri, GN., Altman, E., Sangurdekar, DP., Khodursky, AB., Eiteman, MA. 2006. Overflow Metabolism in *Escherichia coli* during Steady-State Growth: Transcriptional Regulation and Effect of the Redox Ratio. *Applied and Environmental Microbiology* 72(5):3653-3661.

Vidal, L., Pinsach, J., Striedner, G., Caminal, G., Ferrer, P. 2008. Development of an antibiotic-free plasmid selection system based on glycine auxotrophy for recombinant protein overproduction in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology* 134(1-2):127-136.

Vijayendran, C., Polen, T., Wendisch, V., Friehs, K., Niehaus, K., Flaschel, E. 2007. The plasticity of global proteome and genome expression analyzed in closely related W3110 and MG1655 strains of a well-studied model organism, *Escherichia coli*-K12. *Journal of Biotechnology* 128(4):747-761.

Von Stockar, U., Auberson, LC. 1992. Chemostat cultures of yeasts, continuous culture fundamentals and simple unstructured mathematical models. *Journal of Biotechnology* 22(1-2): 69-87.

Wagner, GH., Altuvia, S., Romby, P. 2002. Antisense RNAs in bacteria and their genetic elements. *Advances in Genetics*. 46:361-398.

Wang, Z., Xiang, L., Shao, J., Wegrzyn, A., Wegrzyn, G. 2006. Effects of the presence of ColEI plasmid DNA in *Escherichia coli* on the host cell metabolism. *Microbial Cell Factories* 5:34.

Webster, RG., Robinson, HL. DNA vaccines: a review of developments. *Clinical Immunotherapeutics Biopharmaceuticals and Gene* 8(4):273-292.

Williams, JA., Carnes, AE., Hodgson, CP. 2009. Plasmid DNA vaccine vector design: Impact on efficacy, safety and upstream production. *Biotechnology Advances* 27(4):353-370.

Wolfe, AJ. 2005. The Acetate Switch. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 69(1):12–50.

Wong, EM., Muesing, MA., Polisky, B. 1982. Temperature-sensitive copy number mutants of ColE1 are located in an untranslated region of the plasmid genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 79(11):3570–3574.

Yang, YT., Aristidou, AA., San, K-Y., Bennett, GN. 1999. Metabolic flux analysis of *Escherichia coli* deficient in the acetate production pathway and expressing the *Bacillus subtilis* acetolactate synthase. *Metabolic Engineering* 1(1):26–34.

Yao, R., Hirose, Y., Sarkar, D., Nakahigashi, K., Ye, Q., Shimizu, K. 2011. Catabolic regulation analysis of *Escherichia coli* and its *crp*, *mlc*, *mgsA*, *pgi* and *ptsG* mutants. *Microbial Cell Factories* 10:67.

Yau, SY., Keshavarz-Moore, E., Ward, J. 2008. Host Strain Influences on Supercoiled Plasmid DNA Production in *Escherichia coli*: Implications for Efficient Design of Large-Scale Processes. *Biotechnology and Bioengineering* 101(3):529–544.

Xia, XX., Qian, ZG., and Lee, SY. 2011. Comparative proteomic and genetic analyses reveal unidentified mutations in *Escherichia coli* XL1-Blue and DH5 alpha. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters* 314(2):119-124.

Zabriskie, DW., Arcuri, EJ. 1986. Factors influencing productivity of fermentations employing recombinant microorganisms. *Enzyme and Microbial Technology* 8(12):706–717.

