



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“REVISIÓN DE LOS FACTORES SIGMA EN
ESCHERICHIA COLI, SU POTENCIAL COMO DIANAS
PARA EL MEJORAMIENTO DE CEPAS DE
PRODUCCIÓN DE PROTEÍNA RECOMBINANTE, Y
UNA PROPUESTA PARA SU EVALUACIÓN
EXPERIMENTAL”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
BIÓLOGO

P R E S E N T A :

DIEGO ALONSO ECHÁNOVE CUEVAS



Director de Tesis:
Ciudad de México

Dr. Guillermo Gosset Lagarda
2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo fue realizado con el apoyo del Programa UNAM-DGAPA-PAPIME PE200919, del donativo SEP-CONACYT A1-S-8646 y bajo la dirección del Dr. Guillermo Gosset Lagarda del Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Agradecimientos

Al Dr. Guillermo Gosset Lagarda, por su guía, apoyo y dirección de este proyecto, el cual fue posible gracias a su experiencia y gran disponibilidad mostrada, aun en el contexto de la pandemia y la distancia.

Al Dr. Alvaro R. Lara y el Dr. Adelfo Escalante por sus comentarios y retroalimentación que ayudaron a pulir y mejorar esta tesis en sus etapas iniciales.

A la Dra. América Castañeda y a Aminta Estrada por sus recomendaciones de herramientas de búsqueda y registro de fuentes bibliográficas.

A los programas e instituciones mencionadas por haber hecho posible la realización de este trabajo

Dedicatoria

A mis padres, Arturo y Edith, por brindarme el apoyo y las posibilidades de poder estudiar esta carrera a más de dos mil kilómetros de distancia de mi hogar. Por alentarme a buscar mis pasiones y a encontrar la forma en que yo quiero desarrollarme como persona. Por darme la ayuda, cariño y consuelo que he requerido a lo largo de mi vida, especialmente cuando más lo he necesitado.

A mis hermanos, Aaron y Pablo, por ser fuentes de comprensión, ánimo y alegría. Por sostenerme con una hermandad que crece año con año. Y por mostrarme, con sus palabras y sus acciones, ejemplos a seguir.

A mis amigas y amigos, por ser mi segunda familia y estar presentes en los momentos más duros, así como en los más felices, haciéndome sentir que pertenezco, tanto en la Ciudad como en la frontera.

Índice

1. Resumen	5
2. Introducción.....	7
2.1. Proteínas recombinantes	7
2.2. <i>E. coli</i> en la producción de proteína recombinante.....	8
2.3. Estrategias para optimizar la producción de proteína recombinante	9
2.4. Factores sigma	11
3. Justificación.....	13
4. Objetivos.....	13
4.1. Generales	13
4.2. Específicos	14
5. Materiales y Métodos.....	14
5.1. Revisión bibliográfica y análisis de información	14
5.2. Propuesta experimental	16
6. Resultados.....	17
6.1. Revisión bibliográfica y análisis de información	17
6.2. Propuesta experimental	37
7. Discusión	48
7.1. Potencial de los factores sigma como dianas para el mejoramiento de cepas de producción.....	48
7.2. Información que se obtendrá del protocolo experimental	50
7.3. Perspectivas y futuros experimentos.....	51
8. Conclusiones.....	52
9. Referencias	53
10. Anexos	66

1. Resumen

La producción de proteínas recombinantes (PR) es uno de los procesos biotecnológicos más importantes que existen en el mundo. La búsqueda de cepas con capacidad mejorada para la producción de PR ha permitido la disminución de costos y el aumento de productividad de diversos procesos de producción útiles para el humano y, por lo tanto, que ofrecen un beneficio a la sociedad. Para generar cepas de producción es, en la mayoría de los casos, necesario intervenir en la expresión de genes en específico lo cual puede resultar un proceso tardado si involucra diversos genes. Este proceso puede acelerarse gracias a las estrategias que modifican los factores de transcripción globales, que permite alterar la expresión de muchos genes modificando solo algunos reguladores. Sin embargo, en la bibliografía científica actual no existe una revisión que explore a profundidad el potencial de aplicar estas estrategias en factores globales de transcripción tales como los factores sigma de *Escherichia coli*. En el presente trabajo se elaboró una revisión bibliográfica de los fenotipos que surgen de la mutación, deleción o cambio en expresión de los factores sigma en *E. coli* y el potencial que representan para el mejoramiento de cepas para producción de proteína recombinante, junto con la propuesta para la evaluación experimental de este potencial.

Para la revisión bibliográfica se utilizó la herramienta de Scopus realizando búsquedas individuales para cada uno de los 7 factores sigma. Cada búsqueda contenía como mínimo las variantes del nombre de *E. coli*, el factor sigma, el tipo de modificación al factor (deleción, sobreexpresión, mutación) y, opcionalmente, el fenotipo que se busca (resistencia a estrés, producción de metabolito). Todos estos elementos eran unidos a través de un operador booleano AND (Y). En el caso de la propuesta metodológica, se optó por plantear una evaluación del crecimiento y producción de GFP en cepas con deleción en los factores sigma no esenciales.

Los resultados de la búsqueda bibliográfica arrojaron 3902 documentos los cuales fueron filtrados a través de seleccionar factores sigma, modificaciones y fenotipos específicos. A través de la información recabada se pudo observar que RpoD, RpoN y RpoS tienen un alto potencial de ser modificados para generar fenotipos útiles, RpoE y RpoH podrían ser dianas interesantes (si se evitan los efectos deletéreos de su mutación)

debido a su relación con las temperaturas de crecimiento y el correcto plegamiento de proteínas, y FliA y Fecl mostraron un potencial menor a el resto de los factores sigma. La propuesta metodológica permitirá evaluar y comparar los efectos de la delección de *rpoN*, *rpoS*, *fliA*, *fecl* y *rpoH* en el crecimiento, resistencia a distintos tipos de estrés y producción de GFP recombinante. Así mismo, podrá servir para corroborar aseveraciones encontradas en la búsqueda bibliográfica. La utilización de la información analizada junto con herramientas de control metabólico, biología sintética y de ingeniería genética, podrían brindarnos la capacidad de entender e influenciar de nuevas formas el complejo espacio metabólico, su relación con el transcriptoma y la producción de proteínas recombinantes tanto en *E. coli* como en otras bacterias.

2. Introducción

La aplicación de ciencia y tecnología tiene un enorme impacto en la sociedad ya que permite satisfacer necesidades básicas y aumentar la calidad de vida de las personas (Rull, 2014). Un ejemplo de un avance científico-tecnológico en el área biológica que ha tenido un impacto pocas veces igualado es el desarrollo de la ingeniería genética y las tecnologías de ADN recombinante (rADN), pues ha jugado un papel inmenso en la mejora de la salud humana, revolucionado el desarrollo científico de muchas áreas biológicas y generado gran cantidad de cambios en las industrias biomédicas y biotecnológicas (Khan et al., 2016). Una importante aplicación de las tecnologías de rADN es la producción de proteína recombinante.

2.1. Proteínas recombinantes

La producción de proteína recombinante (PR) consiste en la expresión de proteínas a partir de fragmentos de rADN (es decir, moléculas de ADN que han sido generadas artificialmente a través de la combinación de 2 o más moléculas de origen distinto) en un organismo hospedero, para la posterior purificación y utilización de la proteína (Langlais & Korn, 2006; Palomares et al., 2004; Schumann & Ferreira, 2004; Structural Genomics Consortium et al., 2008; Griffiths et al., 2000). La producción de PR es una tecnología ampliamente practicada para el desarrollo de ciencia biológica y biomédica, así como en la industria química, biotecnológica y farmacéutica. Las aplicaciones de las PR son tan diversas como las proteínas mismas; pueden ser utilizadas para la producción de vacunas, como parte de estudios bioquímicos, en la producción de fármacos u otros metabolitos útiles, en la realización de pruebas diagnósticas, como componentes de insecticidas y procesos de biorremediación, entre muchas otras (Palomares et al., 2004; Schumann & Ferreira, 2004; Structural Genomics Consortium et al., 2008). Para ilustrar y ejemplificar esta importancia se puede observar en la **Figura 1** el valor del mercado global en proteínas recombinantes y sus proyecciones de crecimiento para 2026.

Figura 1. Valor estimado y proyectado del mercado de proteínas recombinantes a nivel global.
Oportunidades atractivas en el mercado de proteínas recombinantes



Infografía tomada de *MarketsandMarkets Research Private Ltd.* En su reporte del mercado de proteínas recombinantes publicado en febrero de 2021. [Traducción libre]

El uso de las PR ha implicado una mejora sustancial comparado a los métodos anteriores de obtención de proteína purificada, ya que el bajo rendimiento de éstos se requería la obtención de grandes volúmenes de biomasa para la extracción y purificación de una pequeña cantidad de las proteínas de interés. Gracias al desarrollo del rADN y sus aplicaciones, es posible alcanzar grandes rendimientos y, como consecuencia, necesitando sustancialmente menos biomasa. Además, las PR son producidas manejando organismos bien estudiados en condiciones controladas, lo que facilita la homogeneidad de los compuestos producidos y la optimización de los procesos (Rosano y Ceccarelli, 2014a). De todos los hospederos usados a través de la historia para la producción de PR, el más estudiado y frecuentemente seleccionado es la bacteria *Escherichia coli* (Rosano & Ceccarelli, 2014b)

2.2. *E. coli* en la producción de proteína recombinante

E. coli es una bacteria Gram-negativa perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*. Es el microorganismo que más ha sido investigado, el modelo experimental procarionta más popular y el “caballo de batalla” para la producción de PR (Cronan, 2014; Kneifel & Forsythe, 2017). Las ventajas que ofrece *E. coli* como productora de PR son variadas, entre ellas se puede resaltar su rápido crecimiento (con

un tiempo de duplicación en condiciones óptimas de 20 minutos), la facilidad de lograr cultivos de alta densidad, su bajo costo de cultivo y el amplio conocimiento tanto de su fisiología y de las técnicas efectivas para su modificación genética (Rosano & Ceccarelli, 2014a). Aunque es cierto que *E. coli* es muy útil para la producción de PR, como cualquier modelo tiene sus limitantes y desventajas.

Entre las desventajas de *E. coli* como un hospedero para la producción de PR encontramos que es difícil utilizarla para producir proteínas no solubles, tiene una preferencia de codones distinta a otros organismos, puede formar cuerpos de inclusión y no tiene la maquinaria celular necesaria para realizar modificaciones postraduccionales complejas como es el caso de muchos eucariontes (Duzenli & Okay, 2020; El-Baky & Redwan, 2015). Además de las limitantes intrínsecas de cada modelo, existen muchos otros factores propios de la técnica que se deben considerar cuando se busca producir PR. Afortunadamente, se han desarrollado variadas estrategias para solucionar los problemas y limitantes que pueden surgir, optimizando la producción de la proteína de interés (Duzenli & Okay, 2020; Gopal & Kumar, 2013).

2.3. Estrategias para optimizar la producción de proteína recombinante

Para poder optimizar la producción de PR es necesario conocer los factores que afectan el proceso. Entre estos factores encontramos las características del organismo hospedero en cuanto a su maquinaria de síntesis de proteínas y uso preferencial de codones; los elementos genéticos como promotores, terminadores y el vector de expresión; el medio de crecimiento y condiciones de cultivo del organismo hospedero incluyendo temperatura, fuentes de nutrientes y tipo de cultivo; la compatibilidad entre la proteína de interés y la célula hospedera (como es el caso de proteínas que podrían ser tóxicas para un hospedero); y los mecanismos de purificación (Duzenli y Okay, 2020; Gopal y Kumar, 2013). Debido a esto pueden surgir diversos problemas como la pérdida de la expresión de la proteína, errores en el procesamiento postraduccional, transporte y localización no deseada de la proteína y crecimiento inhibido en la célula huésped, entre otras (Gopal & Kumar, 2013; Li & Rinas, 2020; Palomares et al., 2004; Structural Genomics Consortium et al., 2008).

Para solucionar estos problemas existen diversas estrategias como lo son utilizar sistemas inducibles, manipulando las condiciones del cultivo, fusionar proteínas para mejorar su solubilidad realizando coexpresión de otras proteínas, cambiar el vector de expresión, modificar el promotor o utilizando un sistema de doble promotor, optimizar o armonizar el uso de codones, realizar una optimización metabólica, eliminar cuellos de botella traduccionales, aumentar la disponibilidad de energía, mejorar la regeneración de cofactores y muchas otras (Duzenli & Okay, 2020; Gopal & Kumar, 2013; Mahalik et al., 2014; Palomares et al., 2004; Structural Genomics Consortium et al., 2008). Muchas, aunque no todas, de las estrategias disponibles para optimizar la producción de proteína recombinante requieren de la modificación, introducción o inactivación de genes específicos cuyos productos tienen un efecto directo o indirecto en el crecimiento del organismo, la síntesis de la proteína, su estabilidad o la facilidad con que pueda ser purificada. Utilizar este acercamiento para optimizar la producción de proteína puede ser muy útil, pero tiene la gran limitante de que las modificaciones normalmente se tienen que realizar de forma individual y secuencial, por lo que se vuelve un proceso muy tardado, aunque con las nuevas tecnologías de edición de genoma como CRISPR-CAS, el panorama está cambiando (Alper & Stephanopoulos, 2007; Mahalik et al., 2014). Por lo tanto, una metodología que permita realizar modificaciones en la expresión de múltiples genes de forma simultánea tiene el potencial de optimizar eficientemente, y en poco tiempo, el fenotipo de las cepas en cuestión. Esto se puede lograr a través de la modificación de los factores de transcripción globales, es decir, factores de transcripción que controlan la expresión de una parte significativa del genoma conformando sus regulones (Alper y Stephanopoulos, 2007).

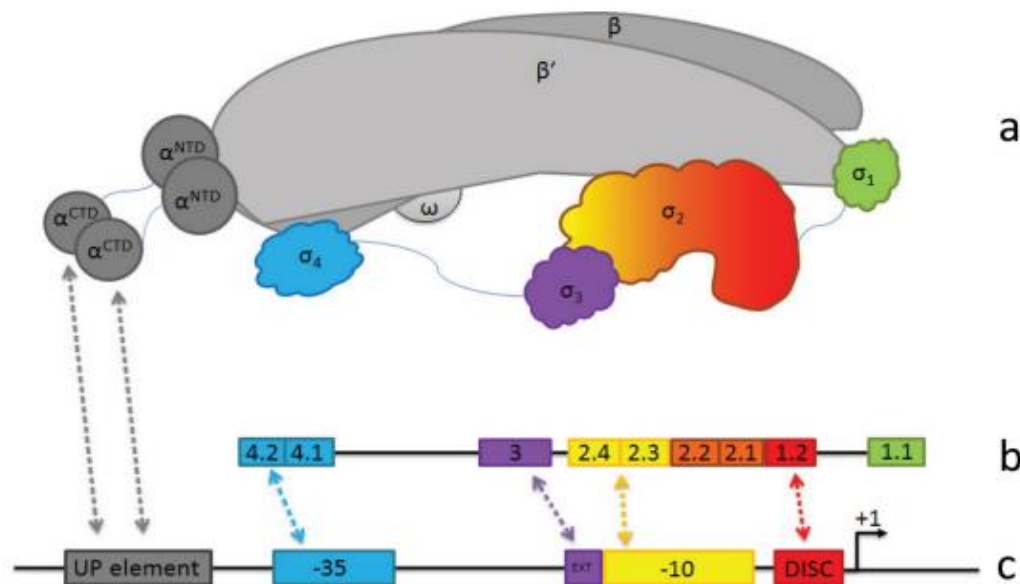
Las técnicas de modificación de factores de transcripción globales buscan generar fenotipos complejos alterando la transcripción a nivel genómico. Es decir, se aprovecha la maquinaria intrínseca de las células para controlar un gran número de genes al mismo tiempo o en respuesta a un mismo estímulo (los factores globales de transcripción) y los modifica para permitir grandes cambios en la transcripción con la mínima inversión de tiempo. Esto puede implicar diversas modificaciones como mutaciones puntuales, deleciones completas o métodos más complejos que involucren una serie de procesos de selección como lo es la ingeniería de maquinaria global de transcripción, o gTME por

sus siglas en inglés (Alper y Stephanopoulos, 2007). Estas modificaciones en los factores de transcripción se pueden realizar de diversas formas y pueden tener efectos distintos en las cepas, como aumentar la resistencia a ciertos compuestos o mejorar la eficiencia de producción de algún producto celular (Zhang et al., 2015; Gao et al., 2018; Ke et al., 2020). La aplicación de esta estrategia en *E. coli* considera a factores globales de transcripción como los factores sigma.

2.4. Factores sigma

Los factores sigma son subunidades dissociables de la ARN polimerasa (ARNP) en bacterias. Esta subunidad multidominio permite reconocer los promotores en el ADN y que se dé la unión de alta afinidad entre la holoenzima ARNP y el sitio específico del ADN. Así mismo juega un papel esencial en la iniciación de la transcripción (Helmann, 2005; Paget, 2015). Un diagrama general de la estructura de los factores sigma se muestra en la **figura 2**.

Figura 2. Subunidades de la holoenzima de ARN polimerasa



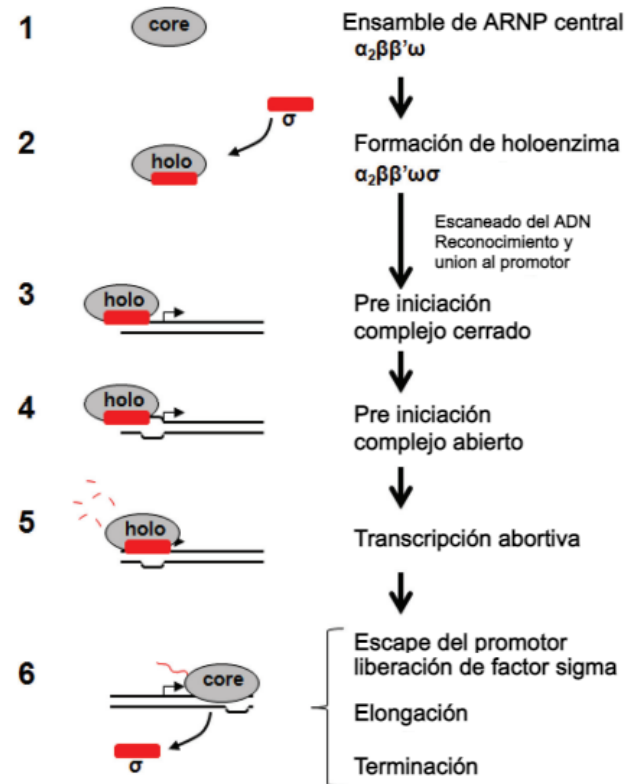
La figura 2 es una representación esquemática de la holoenzima ARN polimerasa bacteriana, la estructura del factor sigma y una estructura de un promotor. (a) Arquitectura de subunidades de la holoenzima (las subunidades del complejo central o *core* se muestran en diferentes tonos de gris); el factor sigma se representa como 4 dominios estructurales resaltados con colores representando su interacción con los elementos del (c) promotor con sus elementos clave (DISC, secuencia del discriminador UP, río arriba. Ilustración tomada de Davis, M. C., Kesthely, C. A., Franklin, E. A., y MacLellan, S. R. (2017). The essential activities of the bacterial sigma factor. *Canadian Journal of Microbiology*, 63(2), 89–99. [Traducción libre]

Las subunidades sigma son factores de transcripción generales que establecen uno de los primeros niveles de regulación global de la transcripción en bacterias, teniendo en conjunto miles de regiones de unión en el ADN (Cho et al., 2014; Tripathi et al., 2014; Davis et al., 2017). Estructuralmente las subunidades sigma se pueden clasificar en dos familias, la familia σ^{70} y la familia σ^{54} , basándose en la homología que pueden tener con las correspondientes subunidades sigma de *E. coli*, las cuales son estructuralmente distintas entre ellas, pero su funcionamiento es esencialmente el mismo (Helmann, 2005; Paget, 2015).

La función de los factores sigma se pueden definir en 4 procesos: El reconocimiento e interacción con los promotores a través de los elementos -10 y -35 (para miembros de la familia σ^{70}) y los elementos -12 y -24 (para miembros de la familia σ^{54}); la unión con la ARNP para la formación de la holoenzima; la formación de la burbuja de transcripción y permitir la asociación de la ARNP con el ADN de cadena sencilla; y la interacción con

proteínas activadoras (Paget, 2015). Una secuencia simplificada de como ejecuta sus funciones se encuentra ilustrada en la **figura 3**. En *E. coli* se han descrito 7 factores sigma: σ^{70} (*rpoD*), σ^{54} (*rpoN*), σ^{38} (*rpoS*), σ^{32} (*rpoH*), σ^{28} (*fliA*), σ^{24} (*rpoE*), y σ^{19} (*fecI*), siendo *rpoD* el factor sigma principal o de “housekeeping” y el resto factores sigma alternativos (Cho et al., 2014; Treviño-Quintanilla et al., 2013).

Figura 3. Diagrama simplificado del proceso de transcripción



Esta figura muestra paso a paso el proceso de transcripción incluyendo la unión del factor sigma al complejo central (*core*) de la ARP. Ilustración tomada de Davis, M. C., Kesthely, C. A., Franklin, E. A., y MacLellan, S. R. (2017). The essential activities of the bacterial sigma factor. Canadian Journal of Microbiology, 63(2), 89–99. [Traducción libre]

Debido a la importancia de cada factor sigma en la regulación de distintos genes enfocados a una variedad de procesos celulares, éstos han sido estudiados de diversas formas para entender su función celular, las interacciones entre los factores sigma y los cambios fenotípicos que pueden ocurrir cuando se realizan modificaciones en dichos factores. Sin embargo, la gran cantidad de estudios dificulta entender las implicaciones de modificar cada factor de transcripción, por lo que una revisión concisa de esta información sería útil si se planea utilizar estrategias que modifiquen dichos genes con el objetivo de generar cepas de producción. En este trabajo, se busca explorar bibliográficamente las alteraciones fenotípicas que surgen al modificar la secuencia, los niveles de expresión o eliminar los factores sigma de *E. coli*, así como su utilidad para la producción de proteína recombinante.

3. Justificación

La búsqueda de cepas con capacidad mejorada para la producción de proteínas recombinantes ha sido una labor realizada en el campo de la biotecnología durante décadas. Éstas han permitido la disminución de costos y el aumento de eficiencia de diversos productos útiles para el humano y, por lo tanto, ofrecen un beneficio a la sociedad. Dentro de las estrategias para generar estas cepas de producción es muy común utilizar la modificación genética sobre los organismos alterando la expresión de ciertos genes, lo cual puede ser realizado en corto tiempo con estrategias que modifiquen los factores de transcripción globales. Sin embargo, en la bibliografía científica actual no existe una revisión que explore a profundidad el potencial de aplicar estas estrategias en los factores globales de transcripción en *E. coli*: los factores sigma. En el presente trabajo se elaboró una revisión bibliográfica de los fenotipos que surgen de la modificación o delección de los factores sigma en *E. coli* y el potencial que representan para el mejoramiento de cepas para producción de proteína recombinante, junto con la propuesta para la evaluación experimental de este potencial.

4. Objetivos

4.1. Generales

- Recabar, analizar y sintetizar la información disponible sobre los factores sigma de *E. coli* en lo concerniente a su función y al potencial que tienen modificaciones

en su estructura o expresión para generar fenotipos útiles para la producción de PR.

- Proponer un método experimental para evaluar la producción de PR en cepas carentes de los diferentes factores sigma.

4.2. Específicos

- Recabar la literatura científica disponible sobre la función de los factores sigma de *E. coli* así como los efectos fenotípicos de su modificación, delección o cambios en expresión.
- Analizar la información obtenida de la literatura en su relevancia para ser diana de modificaciones para generar cepas de producción de proteína.
- Sintetizar la información seleccionada para cada factor sigma presentándola de forma detallada e individual.
- Proponer un método experimental para evaluar la producción de PR en cepas de *E. coli* con delección en los factores sigma no esenciales.

5. Materiales y Métodos

5.1. Revisión bibliográfica y análisis de información

Para la búsqueda de fuentes bibliográfica se utilizó Scopus en idioma inglés. Scopus es una base de datos bibliográfica de resúmenes y citas de artículos de revistas científicas, la cual tiene una herramienta para la navegación de dicha base datos en su página web. Las búsquedas de información se realizaron para cada factor sigma de forma independiente y se aplicaron a través de la aparición de ciertas palabras en el título, resumen o palabras clave de los documentos en la base de datos (que se representa por TITLE-ABS-KEY en Scopus) sin limitaciones de año de publicación. En cada caso, se aplicó un filtro en la búsqueda inicial para cada factor sigma (filtro troncal) y esta se dividió en tres ramas a través de filtros anidados en el troncal (ramas A, B, y C). De obtener demasiados resultados en las búsquedas rama (más de 100), se utilizaron individualmente una serie de filtros de temas específicos llamados filtros terminales. En los casos que las búsquedas rama aun arrojaran más de 100 resultados, estas eran limitadas a solamente los 100 documentos de fecha de publicación más reciente. A continuación, se describe a detalle los parámetros para cada búsqueda.

- **Filtro troncal:** Las búsquedas troncales consistían en 2 variables el nombre del factor sigma y el nombre de la bacteria de interés: *E. coli*. Se aislaron los documentos que contuvieran cualquier variación del nombre del factor sigma unidas con el operador “OR” y que además (operador “AND”) contuvieran el nombre científico abreviado o completo de *Escherichia coli* ("E. coli" OR "Escherichia coli"). Las búsquedas con las variaciones específicas para factor sigma son:
 - RpoD: (TITLE-ABS-KEY ("rpoD" OR " σ 70" OR "sigma 70" OR " σ D")
 - RpoN: (TITLE-ABS-KEY ("rpoN" OR " σ 54" OR "sigma 54" OR " σ N")
 - RpoS: (TITLE-ABS-KEY ("rpoS" OR " σ 38" OR "sigma 38" OR " σ S")
 - RpoH: (TITLE-ABS-KEY ("rpoH" OR " σ 32" OR "sigma 32" OR " σ H")
 - FliA: (TITLE-ABS-KEY ("fliA" OR " σ 28" OR "sigma 28" OR " σ F")
 - RpoE: (TITLE-ABS-KEY ("rpoE" OR " σ 24" OR "sigma 24" OR " σ E")
 - Fecl: (TITLE-ABS-KEY ("fecl" OR " σ 19" OR "sigma 19" OR " σ fecl" OR " σ 18" OR "sigma 18")

- **Filtro rama:** De forma separada, cada rama refinó la búsqueda uniéndose al filtro troncal con el operador “AND” seguido de las variaciones del nombre de 3 tipos de modificaciones a los genes: deleciones (Rama A), mutaciones o cambios en expresión (Rama B) y utilización de gTME (Rama C). Las búsquedas y sus operadores son:
 - Rama A: TITLE-ABS-KEY ("deletion" OR "deficient" OR "absent" OR "defective")
 - Rama B: TITLE-ABS-KEY ("mutant" OR "mutation" OR "overexpression" OR "underexpression")
 - Rama C: TITLE-ABS-KEY ("gTME" OR "Global transcription machinery engineering")

- **Filtros terminales:** En caso de que la rama presentara más de 100 resultados, se agregaba de forma separada 6 grupos de palabras de los temas de mayor interés: Resistencia a estrés, cambios en crecimiento, utilización de fuentes de carbono o nitrógeno, estrés osmótico y producción de metabolitos o de proteínas. Aquí se muestran los operadores utilizados en Scopus:

- T1: AND TITLE-ABS-KEY ("Resistance" OR " Tolerance " OR "Resistant" OR " Tolerant")
- T2: AND TITLE-ABS-KEY ("growth" OR "growth rate")
- T3: AND TITLE-ABS-KEY ("nitrogen source" OR "n source" OR "Nitrogen")
- T4: AND TITLE-ABS-KEY ("Carbon source" OR "C source " OR "acetate" OR "Carbon")
- T5: AND TITLE-ABS-KEY ("high concentration" OR "osmotic pressure" OR " high osmolarity " OR " high NaCl " OR "high glucose")
- T6: AND TITLE-ABS-KEY ("Protein production" OR "metabolite production" OR "polymer production" OR "antibody production")

Por lo tanto, un ejemplo de una búsqueda con filtro terminal 2 de la rama A del factor sigma RpoD sería:

(TITLE-ABS-KEY ("rpoD" OR " σ 70" OR "sigma 70" OR " σ D") AND TITLE-ABS-KEY ("E. coli" OR "Escherichia coli") AND TITLE-ABS-KEY ("deletion" OR "deficient" OR "absent" OR "defective") AND TITLE-ABS-KEY (" growth " OR " growth rate ")).

A partir de los documentos resultantes de búsquedas rama que no excedieran los 100 documentos, o en su defecto las búsquedas terminales, se realizó una lectura rápida del resumen para eliminar cualquier documento que no fuera pertinente al tema. Estos documentos no pertinentes surgen a raíz del uso de operadores OR en las búsquedas. Esto permite dar una cierta laxitud al algoritmo que evita que no se consideren artículos por no seguir estrictamente todos los parámetros, pero a su vez provoca que artículos que mencionan alguna de las palabras seleccionadas para dirigir la búsqueda pero no se adentran al tema que concierne a este trabajo Finalmente, en caso de que surgieran dudas específicas a las funciones asociadas a cada factor sigma o cuestiones sobre la esencialidad de los genes, se realizaron búsquedas forma directa al tema utilizando las herramientas de biblioteca digital UNAM (bidiunam), Google Scholar o Scopus.

5.2. Propuesta experimental

Esta propuesta consiste en evaluar la producción de proteína recombinante en cepas con delección en el factor sigma. Esto se planteó debido a que la delección de los genes

es un proceso mucho más rápido que generar mutaciones puntuales por métodos azarosos, lo cual permitiría evaluar a más de un factor sigma a la vez. Además de esto, entender el efecto de la delección en la producción de PR es un buen primer paso hacia entender el alcance del impacto que puede tener las modificaciones de dicho factor sigma, así como puede brindar información útil en temas de investigación como célula mínima y el entendimiento de las redes transcripcionales de *E. coli*. A partir de este planteamiento, se estableció un método dividido en 3 partes: La obtención, verificación y caracterización general de las cepas mutantes; la caracterización del crecimiento de las cepas en diversas condiciones de cultivo; y la evaluación de un sistema plasmídico para producción de PR y subsecuente evaluación de dicha producción en las cepas mutantes.

Cada sección del experimento fue respaldada con fuentes que avalen o justifiquen la selección de las cepas y protocolos a realizar. Para la primera sección esto consistió en respaldar bibliográficamente las cepas seleccionadas, los métodos para obtenerlas, los protocolos de verificación y caracterización general de crecimiento. En la segunda sección se establecieron las condiciones de cultivo que son importantes de evaluar en cepas de producción de PR, así como los rangos utilizados en el experimento. Finalmente, en la última sección, se propusieron los plásmidos a utilizar para evaluar la producción de proteína recombinante, así como los protocolos de transformación y el método para cuantificar esta producción en las diferentes cepas.

6. Resultados

Los resultados se dividen en dos grandes rubros: la revisión bibliográfica del tema y la propuesta experimental.

6.1. Revisión bibliográfica y análisis de información

Al realizar una búsqueda general que incluye todas las búsquedas troncales de cada factor sigma en *E. coli* unidas con el operador OR, se encuentran 3,902 documentos. Esto representa el acervo completo de donde se obtendrá la bibliografía para este trabajo. En la **Tabla 1** se muestran el número de documentos para cada búsqueda troncal y rama. A continuación, se detallará la información más importante obtenida de cada factor sigma.

Tabla 1: Documentos encontrados en las búsquedas iniciales para cada factor sigma de *E. coli*.

Factor sigma	Búsqueda troncal	Rama A	Rama B	Rama C
Fecl	58	10	28	0
RpoE	337	77	169	0
FliA	227	29	113	0
RpoH	585	125	308	0
RpoS	1,462	382	816	0
RpoN	534	108	222	0
RpoD	1,393	233	516	5

6.1.1. Factor σ^{70} (*rpoD*)

La proteína σ^{70} o RpoD es el principal factor sigma de *E. coli* y es responsable de la transcripción de la mayoría de los genes que son expresados cuando esta bacteria crece en fase exponencial (Shimada et al., 2014). En un estudio realizado por Cho *et al.* en 2014 se identificaron experimentalmente 1,643 sitios de unión por parte de RpoD en el ADN y se tiene registrado 1130 unidades de transcripción dentro de su regulón en *E. coli* convirtiéndolo en el factor sigma que controla la expresión del mayor número de genes en dicha bacteria (Keseler et al., 2021). Este factor sigma regula su propia expresión junto con la de los factores *rpoE*, *fecl*, *rpoH*, *rpoS*, *rpoN*. Además, todos los factores sigma regulan la expresión de *rpoD* a excepción de Fecl. El gen que codifica a este este factor de transcripción ha sido identificado como esencial en diversas ocasiones tanto en medio complejo (LB) y medio mínimo, probablemente debido a que regula genes esenciales, por lo cual resulta imposible generar una cepa con una delección total del gen (Cho et al., 2014; Goodall et al., 2018).

Aun siendo esencial, se han podido estudiar las características de cepas con diversos tipos de mutaciones (sin contar inactivaciones totales) en el gen *rpoD*, como es el caso de fenotipos de resistencia a diferentes tipos de estrés. En la literatura consultada, se encontraron reportes de cepas con cambios en la secuencia o expresión de *rpoD* que son resistentes a pH bajo, a antibióticos, a presiones hidrostáticas altas y a

algunos solventes orgánicos. Los fenotipos resistentes a pH ácido se encontraron en las cepas K-12 W3110 por evolución experimental en medio ácido (pH=4.6) y DH5 α por un método de mutación azarosa llamado RAISE (Mutagénesis azarosa por intercambio de inserción o deleción de hebra). La mejor mutante obtenida por RAISE (con 10 sustituciones de aminoácido y 2 regiones de 4 aminoácidos delatadas) mostró una tasa de crecimiento mayor que la del control en pH =3.17. Este fenotipo se cree que surgió debido al aumento de expresión de genes estructurales y regulatorios (Gao et al., 2016; Harden et al., 2015). La resistencia a antibióticos se exploró en dos trabajos donde se seleccionó a cepas de *E. coli* K12 MG1655 y ATCC 25922 para fenotipos resistentes a kanamicina e imipenem, respectivamente. En ambos casos se encontraron cambios en la secuencia de *rpoD* y en la cepa ATCC25922 se observó una sustitución aminoacídica de A444V en una región de reconocimiento a promotor -10, dicha cepa tenía una resistencia de hasta 4 veces la concentración máxima para crecimiento del control (El Khoury et al., 2019; Mogre et al., 2017). En MG1655, una cepa resistente a presiones hidrostáticas altas (de 500 a 800 MPa), se encontró una mutación por sustitución de aminoácido (G->A) en la región UTR 5' de *rpoD* asociada a este fenotipo (Gayán et al., 2020). Finalmente, a través de la aplicación de gTME se han obtenido cepas de *E. coli* resistentes a etanol, butanol, SDS y ciclohexano, entre otros solventes orgánicos. En la mayoría de los casos se ha logrado que cepas mutantes obtenidas por mutagénesis azarosa mediada por PCR propensa al error sobreviva y crezca a concentraciones más del doble que la silvestre: etanol de 20 g/L a 70 g/L, butanol de 1% a 2%, hasta 69% ciclohexano. Estas mutantes en muchos casos son por sustitución de aminoácidos, aunque interesantemente, se han encontrado también casos de RpoD truncado dejando únicamente la región 4 y fragmentos de la región 3. Estas regiones están asociadas a la unión con la región promotora y a factores reguladores como los factores antisigma, sin embargo aún no se encuentra una explicación mecánica de los cambios fenotípicos que generan estos factores truncanos (Alper & Stephanopoulos, 2007; Si et al., 2016; Zhang et al., 2015).

Haciendo a un lado las posibles resistencias que se pueden obtener a través de los distintos tipos de modificaciones a *rpoD*, es claro existen ciertas alteraciones en la expresión o secuencia de este factor que pueden conllevar consecuencias negativas

para el crecimiento. Esto se observó en dos estudios donde mutaciones de sustitución de un solo aminoácido en la región 1.1 de RpoD (una región asociada a funciones de ensamble de holoenzima, formación del complejo con el promotor e interacción con proteínas regulatorias) lograba reprimir genes asociados a la biosíntesis de nucleótidos y trehalosa, utilización de aminoácidos y metabolismo de carbono, así como inhibir el crecimiento por completo como se ha observado en las inactivaciones totales del gen. Además, se ha observado que cuando se reduce la expresión normal *rpoD* se simula el fenotipo de la respuesta estricta (Gao et al., 2016; Magnusson et al., 2003; Pletnev et al., 2020; Singh et al., 2011). Mostrando la diversidad de efectos generados por alterar la secuencia de este factor de transcripción, algunos estudios han encontrado mejoras en la tasa de crecimiento de cepas con impedimentos en el crecimiento (específicamente cepas de genoma reducido y con ausencia del sistema de fosfotransferasa) que contienen factores RpoD con sustituciones de aminoácido (Aguilar et al., 2012; Choe et al., 2019).

Para la producción de metabolitos, se han realizado experimentos demostrando que utilizar gTME puede obtener mejores resultados que ciertas modificaciones por método racional. Esto es el caso para el aumento en producción de metabolitos como el licopeno (7%), el ácido hialurónico (34%), y L-tirosina (114%), el estudio donde se identificó la mejora de producción de licopeno no se describió la mutante, pero en los otros dos casos ambas cepas mutantes surgieron de un factor RpoD truncado que conservaba únicamente las regiones 3 y 4 (Alper & Stephanopoulos, 2007; Santos et al., 2012; Yu et al., 2008). En el caso específico de producción de PR, se han realizado dos estudios de gTME donde se han generado mutantes de *rpoD* con mejoras en la producción de proteína. El primer caso es en la producción de receptor de neurotensina 1 en ratas (NTR1) que es una proteína integral de membrana en eucariontes. En este estudio se encontró que una mutación puntual (*rpoD* E575V) permitía un mejor crecimiento a 20 °C y un rendimiento 4 veces mayor de NTR1 funcional que la cepa silvestre. Se cree que este efecto se obtuvo a partir de alentar y alargar temporalmente la biosíntesis y crecimiento del organismo a través de alterar la capacidad de RpoD de competir por la ARNP. En otro estudio, se sometió a *E. coli* 66C4 (derivada de la W3110) a procesos de gTME que resultaron en una mutante con sustituciones de aminoácido y

regiones truncadas que producía los anticuerpos IgG mAb1 y mAb2 a un título de 130mg/L en cultivo de matraz agitado, el más alto reportado para producción de anticuerpos de este tipo de cultivos utilizando a *E. coli* como hospedero (McKenna et al., 2019; Tomatis et al., 2019).

Un resumen de los fenotipos y características importantes encontradas en la revisión bibliográfica para este factor sigma se encuentra en la **tabla 2**. De la revisión realizada fue evidente que se pueden obtener cepas con fenotipos útiles a través de modificaciones en secuencia o expresión del factor, pero en la bibliografía disponible ninguna de las modificaciones mejoro el crecimiento o utilización de nutrientes en condiciones sin un tipo específico de estrés. Para fenotipos de resistencia a estrés o de producción de metabolitos o proteína recombinante, en cambio, se encontraron diversos ejemplos de cepas con *rpoD* mutado. Interesantemente, no parece existir una región que comúnmente es alterada y se han encontrado ejemplos con sustituciones de aminoácido individuales y múltiples, así como delección de pocos residuos hasta la delección de regiones enteras. Cabe resaltar, que una alteración que sí se repitió en más de una ocasión fue el caso de tener al factor RpoD truncado con solo las regiones 3 y 4 conservadas, aunque en ninguna investigación se ha encontrado una explicación mecánica que explique porque esta modificación estructural provoca el fenotipo resultante.

Tabla 2: Fenotipos por modificaciones en expresión y/o secuencia de *rpoD*.

Generalidades	Resistencias	Crecimiento	Producción
- Fase exponencial. - 1,643 sitios de unión. - Autorregulación. - Esencial.	- pH (3.17) [SA y DA]. - Antibióticos (kanamicina e imipenem) [SA]. - Presiones hidrostáticas altas [SA]. - Solventes orgánicos (etanol, butanol y ciclohexano) [SA y DA gTME].	- Efectos negativos en uso de aminoácidos, metabolismo de carbono, síntesis de trehalosa y nucleótidos. [SA puntual]. - Fenotipo de respuesta estricta [InEx].	- Licopeno (107% título) [M gTME]. - Ácido hialurónico (138% título) [DA gTME]. - L-tirosina (114% título) [DA gTME]. - Proteína membranal NTR1 (400% productividad receptor/v cultivo) [SA] IgG mAb1 y mAb2 (260% título) [SA DA gTME].

La tabla muestra las generalidades del factor sigma, y los fenotipos encontrados al realizar cambios en la secuencia o expresión del factor. Especificaciones del fenotipo se describen entre paréntesis y el tipo de alteración en la cea se abrevia entre corchetes. [SA] Sustitución de aminoácidos, [DA] Delección de aminoácidos, [gTME] se utilizó ingeniería de factores globales de transcripción, [InEx] Expresión reducida.

6.1.2. Factor σ^{54} (*rpoN*)

RpoN de *E. coli* es considerada la proteína arquetipo de la familia σ^{54} y es estructural y funcionalmente diferente al resto de los factores sigma de la familia σ^{70} . Entre las diferencias se puede encontrar que RpoN necesita la acción de proteínas activadoras para poder iniciar la transcripción (Merrick, 1993; Bonocora et al., 2015). Se han identificado a través de análisis ChIP-chip 180 sitios de unión a ADN en *E. coli* por parte de RpoN, aunque hay estimaciones por medio de análisis ChIP-seq que sugieren que podrían existir más de 250 sitios de unión y los datos en Ecocyc detallan que contiene 55 unidades de transcripción en su regulón (Keseler et al., 2021). Entre estos sitios de unión, se sabe que RpoN regula la expresión de *rpoD* y *rpoH*, pero es regulado por RpoD, RpoS, RpoE y FliA (Bonocora et al., 2015; Cho et al., 2014). Originalmente se había establecido que la función de RpoN era dirigir la transcripción a genes relacionados con la asimilación y metabolismo de nitrógeno. Sin embargo, debido a la investigación realizada a lo largo de décadas sobre este factor de transcripción se ha encontrado que puede estar asociado también a otras funciones de regulación de metabolitos o de recursos energéticos para prevenir su agotamiento, catabolismo de formiato, virulencia y patogénesis, síntesis de flagelo y como respuesta a ciertas condiciones adversas (Bonocora et al., 2015; Reitzer & Schneider, 2001; Zhao et al., 2010).

El gen *rpoN* no es esencial y se han observado distintos fenotipos interesantes en cepas de *E. coli* con delección, sobreexpresión o mutaciones en este factor sigma. Primeramente, se han encontrado fenotipos resistentes a pH y a compuestos antimicrobianos. La resistencia a condiciones ácidas fue observada en cepas patogénicas de *E. coli* y el aumento de resistencia es notorio en cultivos con 2 horas de exposición a pH = 2, siendo 9.56×10^3 c.f.u. mL⁻¹ en cepas con delección total de *rpoN* comparado al 10 c.f.u. mL⁻¹ en el control. Cabe resaltar que esta resistencia fue observada con crecimiento en fase exponencial, pero no en fase estacionaria (Mitra et al., 2012, 2014; Riordan et al., 2010). Así mismo, en experimentos de evolución dirigida, se ha identificado a un RpoN mutado (mutación no especificada en el estudio)

en fenotipos resistentes a pH altos, pero no ha sido estudiado a fondo (Hamdallah et al., 2018). Otros fenotipos resistentes se han encontrado asociados a mutaciones en este factor sigma son la resistencia al antibiótico novobiocina (*rpoN::Tn10*) y al bromuro de cetiltrimetilamonio (delección 36-ELQQ-39), sin embargo no se ha encontrado una explicación mecanística de estos fenotipos (Milija et al., 1999; Nakata et al., 2010).

Los diferentes cambios en estructura y expresión en *rpoN* también pueden tener impacto sobre la tasa de crecimiento y la utilización de recursos como fuente de carbono y nitrógeno. Esta relación ha sido encontrada, entre otras cosas, por una relación que tiene el operón del factor sigma con el sistema de fosfotransferasa, los cambios de expresión de *rpoN* en condiciones limitantes de nitrógeno y carbono (Kumar & Shimizu, 2010; Löffler et al., 2017; B. S. Powell et al., 1995). Así mismo, en el estudio de García en 2020, se encontró que la delección total *rpoN* causaba una disminución de la velocidad de crecimiento en medio mínimo con respecto a la cepa silvestre (García, 2020). Esto resulta interesante dado que también se ha reportado que cepas con delección o inactivación total del factor sigma son auxotróficas para glutamina, no crecen en medio M9 y que son incapaces de utilizar el acetoacetato como fuente de carbono (Milija et al., 1999; Nakata et al., 2010; Reitzer & Schneider, 2001). Esta información y otros detalles sobre la asimilación, anabolismo y catabolismo de compuestos nitrogenados y su relación con *rpoN* se pueden consultar en las fuentes aquí citadas, especialmente las revisiones de Reitzer y Schneider en 2001 y Reitzer en 2003 (Carmona & de Lorenzo, 1999; B. S. Powell & Court, 1998; Reitzer, 2003; Reitzer & Schneider, 2001; Schneider et al., 2013; Wong et al., 1994). Además de esto, la delección total o inactivación de *rpoN* parece tener efectos negativos en la motilidad de *E. coli* y aumenta la capacidad de formación de biopelículas (Belik et al., 2008; Dong et al., 2011; Zhao et al., 2010).

En cuanto a aspectos de producción, *rpoN* no ha sido explorado a la profundidad de *rpoD* para generar cepas de producción. Sin embargo, existen 3 ejemplos de cepas con mejoras en producción a través de modificaciones en la actividad de *rpoN*. En el primero se realizó la delección del factor sigma, a través del cual se logró aumentar la producción de un copolímero de lactato y 3-hidroxiбутirato (P(LA-co-3HB)), la cepa mutante aumento la concentración final del polímero (de 5.3 g/L a 6.2 g/L) y el % de lactato en él (de 18.6%

a 26.2%) (Kadoya et al., 2015). En el segundo caso se observó por primera vez la expresión de sintasas de policétidos tipo II funcionales en *E. coli*, lo cual se obtuvo después de inducir la sobreexpresión de *rpoN* (Stevens et al., 2013). En el tercer y último estudio se generaron mutantes al azar del activador de *rpoN*, denominado *fhIA*. A través de una de estas mutantes (específicamente FhIA133 con 5 sustituciones de aminoácidos) se logró aumentar la producción de hidrógeno hasta 9 veces comparado a la cepa silvestre JW2701-1 (Sanchez-Torres et al., 2009).

Un resumen de los fenotipos y características importantes encontradas en la revisión bibliográfica para *rpoN* se encuentra en la **tabla 3**. Al observar dicha tabla se puede notar algunas diferencias con respecto a el caso de *rpoD* y la tabla 2. Entre ellas es que la mayoría de los fenotipos útiles encontrados surgen a partir de deleciones totales del gen, lo cual no se observa en *rpoD* porque es esencial. Así mismo, no se han encontrado fenotipos asociados a la modificación de expresión o deleción de *rpoN* con un aumento en la producción de proteína recombinante. Esto no significa que esto no sea posible, pues abre la posibilidad de utilizar otros mecanismos para obtener mutantes de *rpoN* y explorar su utilidad para la producción de PR.

Tabla 3: Fenotipos por modificaciones en expresión y/o secuencia de *rpoN*.

Generalidades	Resistencias	Crecimiento	Producción
- Necesita proteínas activadoras. -Asociado a asimilación de nitrógeno. - Mas de 250 sitios de unión. - No esencial.	- pH fase exp (2) [DT]. - pH altos (10) [no especificada]. - Antibióticos (novobiocina y bromuro de cetiltrimetilamonio) [InT10 y DA].	- Auxotrofia para glutamina [DT]. - Incapacidad de procesar acetato* [DT]. - Disminución de motilidad [DT]. - Aumento de capacidad de formar biopelículas [DT]. - Disminución de velocidad de crecimiento medio mínimo [DT].	- P(La-co-3HB) (116% g/L) [DT]. - Expresión de sintasas de policétidos tipo II funcionales [SbEx]. - Producción de hidrogeno (900% tasa nmol/min mg) [SA activador].

La tabla muestra las generalidades del factor sigma, y los fenotipos encontrados al realizar cambios en la secuencia o expresión del factor. Especificaciones del fenotipo se describen entre paréntesis y el tipo de alteración en la cea se abrevia entre corchetes. [DT] deleción total, [InT10] Inactivación por Tn10, [SbEx] Sobreexpresión, [SA] Sustitución de aminoácidos.

6.1.3. Factor σ^{38} (*rpoS*)

RpoS es el principal factor sigma involucrado en la expresión genética durante la fase estacionaria y la respuesta general a condiciones de estrés en *E. coli*, lo que permite que este organismo pueda resistir a condiciones adversas realizando cambios globales en el transcriptoma bajo ciertos estímulos (Battesti et al., 2011, 2015). Este factor de transcripción tiene el mayor número de sitios de unión, sin contar a RpoD, de todos los factores sigma de *E. coli* con 903 sitios de unión y 228 unidades de transcripción registradas en Ecocyc. Sin embargo, *rpoS* sólo parece estar regulado por un factor sigma (RpoD) pero intercede en la regulación todos los factores sigma a excepción de *fliA* (Cho et al., 2014; Keseler et al., 2021). La función de RpoS es la expresión de genes para la respuesta a distintos tipos de estrés, entre ellos podemos encontrar hiperosmolaridad, estrés oxidativo, bajas o altas temperaturas, inanición, disminuciones de pH, parece tener un papel en aspectos de virulencia en cepas patógenas (Weber et al., 2005; Mata et al., 2017; Guo et al., 2019). Este gen no es considerado esencial por lo que se han generado cepas que carecen del gen *rpoS* o este se encuentra mutado, mutaciones en este factor sigma puede generar cambios en la expresión de más de 1,000 genes (Dong & Schellhorn, 2009; Goodall et al., 2018).

Como es de esperarse dado su papel en la expresión de genes asociados a estrés, se ha observado que se pueden obtener cepas resistentes a distintos tipos de estrés al alterar la secuencia y expresión a este factor sigma. La sobreexpresión de RpoS ha conferido resistencia a condiciones ácidas debajo de pH 4 causadas por ácido acético, ácido butírico, ácido láctico y ácido propiónico. Incluso se ha observado que aumentar la expresión de este factor sigma aumenta la sobrevivencia a desafíos de pH 2 (Bak et al., 2014; Gaida et al., 2013; Jin et al., 2009; Run & Tian, 2018). En cambio, en estudios de pH alcalino (pH 9), se encontró que la expresión disminuida podía aumentar la resistencia al medio alcalino pero la delección total del gen provocaba pérdida de esta resistencia, la explicación de este fenómeno es que una alta actividad de este factor sigma provoca una disminución de la adecuación, pero su ausencia provoca la incapacidad de sobrevivir al estrés (Hamdallah et al., 2018). Inserciones a través de transposón también han generado cepas con alteraciones en la secuencia de *rpoS* de *E. coli* con una mayor capacidad de sobrevivencia a largo plazo, generando una resistencia a la inanición hasta

9 días de cultivo, sin embargo, no se estudio el alelo de forma aislada para ofrecer una explicación mecanística (Conter et al., 2001). En otros experimentos se ha observado que inducir la sobreexpresión de *rpoS* también puede generar resistencia a n-butanol (1% v/v), presión hidrostática alta (800MPa), estrés oxidativo por H₂O₂, altas temperaturas (54 C), alta concentración de NaCl (2.5M) y estrés múltiple (Appukuttan et al., 2016; Gayán et al., 2020; Xu et al., 2021). Aunado a esto, se ha encontrado que la delección total del gen tiene efectos negativos en la resistencia a antibióticos y a la presión osmótica alta (Cebrián et al., 2015; Padgen et al., 2020; Stasic et al., 2012; Tkachenko et al., 2017).

Al igual que en cepas mutantes de *rpoN* y *rpoD*, existen cambios en la cinética de crecimiento de *E. coli* cuando se altera la estructura o expresión de *rpoS*. De forma general, se reporta que mutantes con delección total en *rpoS* tienen una adecuación, tasa de crecimiento específico máximo y afinidad a la glucosa igual o mayor en condiciones limitantes de carbono con respecto a la silvestre tanto en medios complejos (LB) como mínimos minerales. Contrario a esto, en condiciones sin limitaciones de carbono, se ha observado que la eliminación de este factor sigma causó una caída en la densidad óptica de los cultivos en medio LB y M9 (Franchini et al., 2015; García, 2020). Además de esto, se ha observado que la delección total de *rpoS* en la cepa JWK2711 reduce el tiempo para llegar a la fase estacionaria, disminuye el crecimiento máximo e inhabilita la utilización de acetato; contradictoriamente se ha reportado que la delección de *rpoS* en JW5437 alivia el efecto de sobre flujo metabólico y suprimió la acumulación de acetato en condiciones de alta concentración de glucosa (Rahman et al., 2006; Suryadarma et al., 2012). Otros efectos encontrados han sido la mejora de biosíntesis de aminoácidos proteínogénicos a través de carbono derivado de metanol en cepas con sobreexpresión de *rpoS* y una disminución significativa de unidades formadoras de colonia en medios con inanición de nitrógeno para mutantes con *rpoS* inactivado (Bennett et al., 2020; Kabir et al., 2004).

Las cepas con cambios en expresión y secuencia en *rpoS* con mejoras en la producción también han sido estudiadas en cierta medida. Para la producción de metabolitos se tienen varios ejemplos donde la delección total de *rpoS* tienen efectos

positivos. Ejemplos de esto son la producción de 1-propanol, del polímero P(LA-co-3HB) y triptófano (Ding et al., 2021; Jun Choi et al., 2012; Kadoya & Kodama, 2015). En cuanto a la producción de proteínas, se ha encontrado cambios en la expresión de *rpoS* en cepas con mejoras en la expresión y proteína recombinante, en la cepa CWML2 con un aumento de expresión y en una cepa con interferencia de biosíntesis a través de CRISPR con una reducción en la expresión del factor sigma (Landberg et al., 2020; Weikert et al., 2000). Así mismo, se ha observado anteriormente la utilización de segmentos 5' del promotor de *rpoS* o induciendo la expresión de RpoS en fase exponencial puede aumentar la expresión de proteína recombinante (Kang et al., 2008; Mulyanti et al., 2021) pero, solo se encontró en la bibliografía consultada un caso donde se exploró específicamente la modificación de *rpoS* a través de su inactivación por inserción de transposón 10 para la producción de proteína recombinante (específicamente beta galactosidasa) y se logró un aumento del cuádruple de la actividad volumétrica de la enzima recombinante con respecto a la silvestre (Chou et al., 1996).

Un resumen de los fenotipos y características importantes encontradas en la revisión bibliográfica para para *rpoS* se encuentra en la **tabla 4**. Algo que resalta es la gran cantidad de fenotipos que se han encontrado para los 3 parámetros buscados (resistencias, crecimiento y producción) y que gran parte de ellas surgen por cambios en la expresión, ya sea un aumento, disminución o inactivación total. Aunque es claro debido a su papel en la respuesta a estrés, estos resultados muestran que alterar la expresión de *rpoS* tiene un buen potencial de generar cepas con fenotipos interesantes, y que la alteración de su estructura no ha sido estudiada a fondo, lo cual abre una avenida interesante.

Tabla 4: Fenotipos por modificaciones en expresión y/o secuencia de *rpoS*.

Generalidades	Resistencias	Crecimiento	Producción
-Respuesta a estrés y fase estacionaria.	- pH (2) [SbEx]. - pH (9) [InEx]. - Inanición (9 días)	- Adecuación, tasa de crecimiento específico máximo y afinidad a la glucosa mayor o igual (condiciones limitantes de carbono) [DT].	- 1-propanol (129% g/g glucosa) [DT]. -P(LA-co-3HB) (109% g/L) [DT].
- 903 sitios de unión.	[InT10]. - n-butanol,	- Caída en densidad óptica (condiciones sin limitación de carbono) [DT].	-Triptófano (483% g/L) [M sin sentido].
-No esencial.	presión hidrostática alta, H2O2, altas temperaturas, alta	- Reducción de tiempo a fase estacionaria, disminución de	-CWML2 (hallazgo) [SbEx]. -CRIPSRI (hallazgo) [InEx].

concentración NaCl, estrés múltiple [SbEx]. -Efectos negativos resistencia antibióticos y presión osmótica alta [DT]	crecimiento máximo, incapacidad de utilizar acetato [DT]. -Alivia efecto desbordamiento metabólico y suprime acumulación de acetato en condiciones de alta concentración de glucosa [DT]. -Aumento de biosíntesis de aminoácidos proteogénicos a través de carbono derivado de metanol [SbEx]. -Menor crecimiento (iniciación N) [DT].	-Segmento 5' inducción para cepa productora de PHB. - SOD (~150%) [expresión en fase exponencial]. -Beta galactosidasa (400% actividad volumétrica) [InTn10].
---	---	---

La tabla muestra las generalidades del factor sigma, y los fenotipos encontrados al realizar cambios en la secuencia o expresión del factor. Especificaciones del fenotipo se describen entre paréntesis y el tipo de alteración en la ceba se abrevia entre corchetes. , [SbEx] Sobreexpresión, , [InEx] Expresión reducida [DT] delección total, [InT10] Inactivación por Tn10.

6.1.4. Factor σ^{32} (*rpoH*)

RpoH es el factor sigma encargado de regular los genes de respuesta a choque térmico por señales citoplasmáticas (a diferencia de RpoE). Entre los genes que se encuentran en su regulón con 99 unidades de transcripción (el cual incluye 312 sitios de unión a ADN en *E coli*) se han identificado distintas proteínas chaperonas y proteasas (Solís, 2001; Narberhaus & Balsiger, 2003; Nonaka et al., 2006; Cho et al., 2014; Keseler et al., 2021). Este factor sigma solo parece interceder en la regulación de un factor sigma (*rpoD*), pero RpoS, RpoN, RpoE y RpoD interceden en la regulación de *rpoH* (Cho et al., 2014). Los niveles intracelulares de este factor de transcripción se mantienen muy bajos durante el crecimiento a 30° C y aumenta al aumentar la temperatura. A 42° C se acumula en grandes cantidades para dirigir la ARN polimerasa a los promotores de genes de choque térmico.

En su mayoría, las mutaciones de *rpoH* parecen tener efectos deletéreos en el crecimiento o aumentar la sensibilidad a distintos tipos de estrés. Solamente en 2 estudios se encontró que en cepas con resistencia a presiones hidrostáticas elevadas de 800 MPa (MG1655) y en cepas producto de evolución para resistencia a choque térmico (O157:H7 ATCC 43888), existía un aumento de expresión de *rpoH* comparada a la cepa silvestre (Gayán et al., 2016, 2020). Distintos estudios sobre genes esenciales (como los realizados para la biblioteca Keio, PEC o TraDIS) muestran que *rpoH* es un gen esencial (Goodall et al., 2018). Sin embargo, en la determinación de la esencialidad de los genes

en cada biblioteca se utilizan ciertas condiciones de crecimiento de las cepas mutantes como una temperatura de 37° C. En el caso de *rpoH*, se ha observado que una célula de *E. coli* sí puede ser viable con una delección en este gen si esta crece en temperaturas iguales o menores a 20° C o con mutaciones de supresión de la letalidad (Zhou et al., 1988).

En algunos estudios se sugiere que mutantes con delección total en *rpoH* si pueden crecer a temperaturas mayores a 20° C (Díaz-Acosta et al., 2006; Rowbury & Goodson, 1993), pero sería importante evaluar si las cepas utilizadas no tuvieran alguna de estas mutaciones supresoras de esencialidad. De forma interesante, en uno de estos estudios se observa que las cepas con delección en *rpoH* son sensibles a choque térmico y a estrés oxidativo, pero solo durante fase exponencial (Díaz-Acosta et al., 2006). Mutantes con delección en *rpoH* se observaron con crecimiento más lento que una célula silvestre en cualquier temperatura, y la temperatura mínima rodeaba los 10 °C. Además de lo mencionado, se ha descrito que cepas donde se altera la secuencia de *rpoH* son hipersensibles a la presencia de antibióticos, luz UV, etanol, metales pesados, pH ácido, y estrés oxidativo (Zhou et al., 1988; Solís, 2001; Rowbury & Goodson, 1993; Kogoma & Yura, 1992; J. K. Powell & Young, 1991; LaRossa et al., 1995).

Debido a los efectos deletéreos que existen en las mutantes de *rpoH* hay pocos estudios relacionados con cepas de producción. Sin embargo, existen algunos estudios donde se encontraron mejoras en producción a través de cambios en la actividad o estructura de este factor sigma. El primero fue un aumento en el título y rendimiento para la producción del policétido 6-deoxi-eritronolida B a través de la sobreproducción de RpoH (Yang et al., 2015). Así mismo, se logró suprimir la proteólisis de una proteína de fusión heteróloga con la mutación sin sentido *rpoH165* (Goldberg et al., 1989). Finalmente, la producción de 5 proteínas heterólogas distintas fue mejorada hasta 8 veces la concentración de la silvestre a través de la mutación de sustitución de aminoácido (Arg-268-Cis) denominada *rpoH358* (Obukowicz et al., 1992). Cabe mencionar que estos estudios específicos sobre la relación entre proteína recombinante y mutaciones en *rpoH* tienen más de 25 años de ser publicados y no parece existir nuevas publicaciones en el tema.

Un resumen de los fenotipos y características importantes encontradas en la revisión bibliográfica para para *rpoH* se encuentra en la **tabla 5**. En contraste con los factores ya revisados, los fenotipos útiles encontrados para cambios en estructura y expresión de *rpoH* son pocos (5) y dos de ellos fueron hallazgos al estudiar cepas mutantes, y no estudios donde se exploraba la modificación de *rpoH*. Observando la tabla, se puede notar que se pueden lograr efectos positivos si se altera la expresión o secuencia del factor y estas se centran en aspectos de resistencia a estrés y producción, pero su delección total parece provocar un fenotipo muy frágil.

Tabla 5: Fenotipos por modificaciones en expresión y/o secuencia de *rpoH*.

Generalidades	Resistencias	Crecimiento	Producción
- Respuesta a choque térmico señales citoplasmáticas.	- Presiones hidrostáticas altas (hallazgo DVL1) [SbEx].	- Crecimiento a temperaturas de 10° a 20° [DT].	- Policéitido 6-deoxy eritronolida B (152% título) [SbEx].
-Poca transcripción a temperaturas menores a 30°.	-Resistencia a choque térmico (hallazgo evolución dirigida 10 ⁶ mayor resistencia a 60°) [SbEx].	-Hipersensibilidad a antibióticos, UV etanol, metales pesados, pH ácido y estrés oxidativo [DT].	- Supresión de proteólisis de una proteína fusión heteróloga [Mss].
-Esencial a temperaturas mayores a 20°.			- Aumento de acumulación 5 proteínas heterólogas [SA].

La tabla muestra las generalidades del factor sigma, y los fenotipos encontrados al realizar cambios en la secuencia o expresión del factor. Especificaciones del fenotipo se describen entre paréntesis y el tipo de alteración en la cea se abrevia entre corchetes. , [SbEx] Sobreexpresión, [DT] delección total, [Mss] Mutación sin sentido, [SA] Sustitución de aminoácido.

6.1.5. Factor σ^{28} (*fliA*)

FliA es conocido como el factor sigma de quimiotaxis y síntesis de flagelo (Kundu et al., 1997; Shimada et al., 2017). Se han identificado 51 sitios de unión al ADN en el genoma de *E coli* con 34 unidades de transcripción registradas en Ecocyc. y FliA controla la transcripción de 6 operones de clase 3 para la síntesis de flagelo (entre ellos está el gen de las subunidades de flagelina), componentes del motor, y factores reguladores de la quimiotaxis (Cho et al., 2014; Fitzgerald et al., 2014; Keseler et al., 2021). De todos los factores sigma, este es el único donde no se ha identificado que es regulado directamente por otro factor sigma. Sin embargo, sí interviene en la regulación de *rpoD* y de *rpoN*. Este gen no es esencial y se han observado distintas características en cepas con ausencia del gen *fliA* como lo es la ausencia de flagelo, la falta de síntesis de pili tipo

1, la incapacidad de formación de biopelículas y una falta de motilidad (Wood et al., 2006; Claret et al., 2007; Zhao et al., 2007).

Los cambios de fenotipo en las cepas con cambios en expresión y secuencia en *fliA* han sido menos exploradas que en los otros factores sigma ya mencionados, y en su mayoría estos estudios son específicamente sobre aspectos de motilidad. Sin embargo, estos cambios de motilidad pueden ser positivos, pues en un estudio de evolución dirigida donde se seleccionaba con base en tasa de crecimiento y quimiotaxis se aisló una cepa con una sustitución de aminoácido en FliA (R220W) que le provocaba una plasticidad notoria para aumentar la velocidad de nado y la tasa de crecimiento del cultivo (Yi & Dean, 2016). Además de esto, se ha observado que la delección de *fliA* confiere ventajas en el crecimiento de *E. coli* y disminuye la muerte celular basal sin presencia de estrés exógeno. Esto último fue observado en medio LB pero no en medio mínimo, y además, la ventaja parece solo estar presente en medios líquidos con agitación, y eliminarse o revertirse en medios sólidos, semisólidos o donde la movilidad representa una ventaja (Fontaine et al., 2007). En temas de producción, a través del método utilizado solo se encontró un artículo donde mostraban que la cepa mutante CWML2 derivada de MG1655 (la cual se reporta con características favorables para la producción de proteína recombinante, como lo es una tasa de crecimiento específico mayor, incrementos en los rendimientos de biomasa y mayor resistencia a distintos tipos de estrés) muestra un aumento en la expresión de FliA comparada a la silvestre, lo que confería cambios en la motilidad favorables (Weikert et al., 2000).

Un resumen de los fenotipos y características importantes encontradas en la revisión bibliográfica para *fliA* se encuentra en la **tabla 6**. Para el caso de este factor sigma, no se encontró ningún fenotipo asociado a la resistencia de algún tipo de estrés y los fenotipos útiles para producción de PR encontrados a partir de la modificación en la expresión o secuencia de este gen han sido limitados. En todo caso, parece ser que su potencial es mayor si se busca características que modifiquen motilidad, crecimiento y formación de biopelículas.

Tabla 6: Fenotipos por modificaciones en expresión y/o secuencia de *fliA*.

Generalidades	Resistencias	Crecimiento	Producción
---------------	--------------	-------------	------------

- Quimiotaxis y síntesis del flagelo. -51 sitios de unión.	NA.	- Ausencia de flagelo, pili tipo 1, formación de biopelículas y motilidad [DT]. -Aumento de plasticidad en velocidad de nado y tasa de crecimiento [SA] -Disminución de muerte basal sin presencia de estrés exógeno (medios líquidos con agitación) [DT].	- Hallazgo en cepa CWML2 con aumento de expresión de FliA. [SbEx]
---	-----	--	---

La tabla muestra las generalidades del factor sigma, y los fenotipos encontrados al realizar cambios en la secuencia o expresión del factor. Especificaciones del fenotipo se describen entre paréntesis y el tipo de alteración en la cea se abrevia entre corchetes. [SbEx] Sobreexpresión, [DT] delección total, [SA] Sustitución de aminoácido.

6.1.6. Factor σ^{24} (*rpoE*)

RpoE es uno de los factores sigma de función extracitoplasmática, es decir, que se encuentra en el citoplasma unido a la membrana interna acoplado a un sistema transmembranal que responde a estímulos del ambiente. Este factor de transcripción responde a señales de estrés en el periplasma que interfieren con el plegamiento de proteínas de membrana como el choque térmico, la sobreexpresión de proteínas de membrana o mutaciones en chaperonas. Los productos de los genes controlados por RpoE se requieren para el correcto plegamiento de proteínas de membrana externa, biosíntesis de fosfolípidos y lipopolisacáridos, transducción de señales, y la expresión de proteínas de membrana interna y externa (Solís, 2001; Egler et al., 2005; Hayden & Ades, 2008). Se han identificado 65 regiones promotoras para RpoE y 82 unidades de transcripción en su regulón, entre ellas para su autoregulación y la regulación de *rpoD*, *rpoH* y *rpoN*, Solamente los factores RpoD y RpoS actúan sobre la regulación de RpoE (Cho et al., 2014; Keseler et al., 2021).

En células sin estrés la actividad de RpoE es baja debido a regulación negativa del factor, pero es probable que su actividad no sea completamente inhibida ya que este factor de transcripción regula la expresión de diversos genes esenciales y se cree que esta es la principal razón por la que este gen es considerado como esencial en estudios como la biblioteca Keio o TraDIS debido a que al eliminar este gen cesa la transcripción de genes esenciales para el crecimiento celular y estabilidad de la membrana. Sin embargo, se ha observado que se puede realizar la delección total de este gen y obtener una cepa viable utilizando modificaciones que suprimen la esencialidad del gen *rpoE*

como lo es la sobreexpresión de *ptsN* y *yhbW*, los cuales codifican para una proteína reguladora de la actividad y/o expresión de transportadores de potasio en el sistema PTS y una monooxigenasa sin función definida, respectivamente (Hayden & Ades, 2008; Goodall et al., 2018).

Existe poca evidencia de cepas con cambios en la secuencia en *rpoE* con mejoras en resistencia a estrés, pues en su mayoría las mutantes en este factor sigma son más sensibles a él. Cuando esto se ha reportado resulta por una sobreexpresión de RpoE que elimina algún fenotipo sensible a temperatura o estrés en la membrana causada por mutaciones en otros genes (Egler et al., 2005; Hart et al., 2019; Ono et al., 2009; Vidovic et al., 2018; Warr et al., 2021). Solamente en un caso se menciona una mutación de sustitución de aminoácido llamada *rpoE_S2R* la cual parece permitir una respuesta más rápida al estrés periplásmico, pero en el estudio se sugiere que esta mutación disminuye la aptitud de *E. coli* (Konovalova et al., 2016). También se estableció una participación del factor en la regulación de condiciones limitantes de nitrógeno y carbono al mismo tiempo midiendo la transcripción de genes en su regulón (Löffler et al., 2017). Estos son los principales puntos relevantes que fueron encontrados en la bibliografía disponible y existe una ausencia de estudios que evalúen la producción de proteína u otros metabolitos.

Un resumen de los fenotipos y características importantes encontradas en la revisión bibliográfica para *rpoE* se encuentra en la **tabla 7**. De los factores sigma estudiados, este es el único donde no se encontró ninguna cepa con modificaciones en su expresión o estructura que tuviera alguna ventaja en la producción de PR o algún metabolito. Así mismo, en cuanto al crecimiento solo se ha establecido una relación en las condiciones limitantes de carbono y nitrógeno, pero no se ha explorado las modificaciones de estructura o expresión. A falta de más estudios donde se explore la mutación azarosa del factor y la utilización de mutaciones supresoras de su esencialidad, el potencial que se observa en este factor como diana de modificaciones para producción de PR es reducido.

Tabla 7: Fenotipos por modificaciones en expresión y/o secuencia de *rpoE*.

Generalidades	Resistencias	Crecimiento	Producción
---------------	--------------	-------------	------------

-Factor sigma extracitoplasmático. -Señales de estrés del periplasma. -65 regiones promotoras. -Autorregula -Esencial. -Sobreexpresar <i>ptsN</i> y <i>yhbW</i> suprime esencialidad.	- Supresión de fenotipos sensibles a temperatura o estrés por otras mutaciones [SbEx]. - Aumento de la rapidez de respuesta a estrés periplásmico, pero disminución de aptitud [SA].	- Se ha establecido que existe una participación del factor sigma en la regulación de condiciones limitantes de nitrógeno y carbono.	-NA.
--	---	--	------

La tabla muestra las generalidades del factor sigma, y los fenotipos encontrados al realizar cambios en la secuencia o expresión del factor. Especificaciones del fenotipo se describen entre paréntesis y el tipo de alteración en la cea se abrevia entre corchetes. [SbEx] Sobreexpresión, [SA] Sustitución de aminoácido.

6.1.7. Factor σ^{19} (*fecI*)

El factor sigma es el segundo factor sigma extracitoplasmático de *E. coli*. *FecI* tiene la función de dirigir la transcripción de los operones *fecABCDE* y *fecIR* que son necesarios para el transporte de citrato férrico. El factor de transcripción es activado por la presencia de citrato férrico en el medio y su actividad es permitida en condiciones de inanición por hierro (Braun et al., 2003; Moraleda-Muñoz et al., 2019). Solo se han identificado 7 sitios de unión de este factor sigma en el genoma de *E. coli* y una sola unidad de transcripción, y su expresión solo es regulada por RpoD y RpoS mientras que no regula a ningún factor sigma (Cho et al., 2014; Keseler et al., 2021). En algunos estudios donde se han generado cepas con delección en *fecI*, se muestra una ausencia de FecA (la proteína transmembranal receptora de citrato férrico que induce la actividad de FecR y FecI) y no se lograba inducir la expresión de genes *fec* de transporte, aun en condiciones de inanición de hierro (Ochs, Angerer, et al., 1995; Ochs, Veitinger, et al., 1995).

En cuanto a condiciones de crecimiento sin limitaciones de hierro, mutantes con ausencia de este factor sigma parecen crecer de la misma forma que una cepa silvestre (García, 2020). Además de esta alteración fenotípica esperada, se ha encontrado que cepas con delección en *fecI* tienen una mayor producción del polímero P(LA-co-3HB) que la cepa silvestre (5.7 g/L y 5.3 g/L respectivamente) aunque muestran una disminución en la proporción de unidades de lactato (medido como el porcentaje del peso total) en el polímero con peso molecular variable (Kadoya & Kodama, 2015). Así mismo,

sobreexpresar *FecI* ha mostrado un aumento en la transcripción de genes heterólogos como *oxyB* lo que sugiere que puede regular positivamente la transcripción de otros clústeres de genes biosintéticos (Stevens et al., 2013).

Un resumen de los fenotipos y características importantes encontradas en la revisión bibliográfica para para *fecI* se encuentra en la **tabla 8**. Aun siendo el factor sigma con regulón más pequeño, se lograron encontrar algunas características interesantes al eliminar y sobre expresar este factor sigma. Entre ellas encontramos que la delección tanto aumenta la producción del polímero P(LA-co-3HB) y que no se encuentran efectos negativos en el crecimiento. Esto señala que, aunque el tamaño de su regulón limita el impacto que tienen las alteraciones en secuencia y expresión del gen, aún se pueden obtener fenotipos útiles.

Tabla 8: Fenotipos por modificaciones en expresión y/o secuencia de *fecI*.

Generalidades	Resistencias	Crecimiento	Producción
<ul style="list-style-type: none"> - Factor sigma extracitoplasmático. - Controla sistema de transporte de citrato férrico. - Operón <i>fecABCDE</i> y <i>fecIR</i>. - 7 sitios de unión. - Activado por presencia de citrato férrico y se permite su actividad en condiciones de inanición de hierro. 	<ul style="list-style-type: none"> - Incapacidad de transportar citrato férrico en condiciones de inanición de hierro [DT]. 	<ul style="list-style-type: none"> - Sin efectos negativos en el crecimiento [DT]. 	<ul style="list-style-type: none"> - Mayor producción de P(LA-co-3HB) que la cepa silvestre con una disminución en la proporción de unidades de lactato (107% g/L) [DT]. - Aumento de transcripción de genes heterólogos como <i>oxyB</i> lo cual sugiere que se podría promover la transcripción de proteínas heterólogas [SbEx].

La tabla muestra las generalidades del factor sigma, y los fenotipos encontrados al realizar cambios en la secuencia o expresión del factor. Especificaciones del fenotipo se describen entre paréntesis y el tipo de alteración en la cea se abrevia entre corchetes. [DT] Delección total, [SbEx] Sobreexpresión.

6.1.8. Interacción entre factores sigma y sus regulones

Al entender las generalidades de cada factor sigma resulta obvia su importancia en la regulación de los genes en el genoma de *E. coli* y el gran número de genes regulados por estos factores de transcripción. Sin embargo, la actividad regulatoria de los factores sigma no es simple y está influenciada por una gran cantidad de proteínas regulatorias. Uno de los puntos más importantes de entender es que los regulones de los factores sigma forman una red compleja. Esto se da debido a que existen muchos promotores

para diferentes genes que pueden ser reconocidos por más de un factor sigma. Esto genera una superposición extensa entre los regulones de los factores sigma que afectan la dinámica de expresión de los genes (Wade et al., 2006). En un estudio de Cho y colaboradores se encontraron más de 1000 sitios donde se unen más de un factor sigma en *E. coli* (Cho et al., 2014). La relevancia de esto va más allá de esta superposición, pues implica que las alteraciones en la expresión y actividad de un factor sigma puede alterar la expresión de genes fuera de su propio regulón.

La principal forma en que un factor sigma altera la expresión de genes bajo el control de otro factor sigma es a través de la unión competitiva a la ARNP. Esto ocurre debido a que la cantidad de ARNP disponible en la célula es limitada y a que la cantidad de factores sigma supera la cantidad de ARNP (como se ha determinado por diversos experimentos de cuantificación de proteínas a través de western blot cuantitativo), por lo que los factores sigma compiten por unirse a las moléculas de ARNP y transcribir los genes que cada factor regula (Grigorova et al., 2006). Por lo tanto, si se altera la cantidad de un factor sigma y/o la afinidad de este factor sigma a la ARNP (lo cual puede ocurrir debido a cambios en la temperatura o en la osmolaridad) se puede alterar la expresión de genes de otros factores sigma (Mauri y Klumpp, 2014; Ramnaresh Gupta & Chatterji, 2016). Esto se ha observado por alteración en cambios en los niveles de transcripción positivos y negativos cuando ocurren modificaciones en RpoD y RpoS y entre los genes regulados por RpoS, RpoN y FliA cuando se altera la concentración de alguno de estos tres factores sigma (Cho et al., 2014; Dong et al., 2011). Estas redes complejas a su vez son las que permiten los fuertes cambios fenotípicos que permiten que las bacterias se adapten a las condiciones cambiantes de su entorno como es el caso de la respuesta estricta mediada por alarmona que altera los niveles de expresión de los factores sigma modificando así la capacidad de ellos por competir por la RNAP (Jishage et al., 2002). Teniendo en cuenta la red regulatoria de los factores sigma de *E. coli* y la evidencia existente (ya mencionada en esta revisión) del potencial que tienen los factores sigma como dianas de modificación genética para generar fenotipos útiles para la producción de PR como lo es la resistencia a estrés o la captación de nutrientes, resulta muy interesante estudiar experimentalmente y de forma conjunta como su alteración puede impactar en la producción de proteínas recombinantes.

6.2. Propuesta experimental

En la presente propuesta se busca sugerir una estrategia experimental para evaluar los cambios en la producción de proteína recombinante por parte de cepas mutantes con delección en los distintos factores sigma de *E. coli*. Esta propuesta se construyó utilizando como base las observaciones y el trabajo realizado por García en el 2020 y la bibliografía disponible sobre el tema. La serie de experimentos pretende evaluar la producción de proteína recombinante a través de la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP) por medio de un vector de expresión ya diseñado. La expresión de GFP será evaluada en distintas condiciones de temperatura, pH y de disponibilidad de nutrientes para poder caracterizar y entender los cambios fenotípicos que pueden existir al cambiar la red regulatoria de transcripción de *E. coli* y observar si alguno de estos fenotipos favorece la producción de proteína recombinante.

Se propone evaluar estas variables en cepas con delección en *rpoN*, *rpoS*, *rpoH*, *fliA* y *fecI*. La delección se limita a estos 5 factores sigma ya que son estos los que, de acuerdo con la revisión bibliográfica realizada, pueden ser eliminados del genoma de *E. coli* sin perder viabilidad en ausencia de mutaciones supresoras de esencialidad. La secuencia general del método propuesto se divide en 3 bloques principales: la obtención de las 5 cepas mutantes en subunidades sigma a utilizar; la caracterización del crecimiento de cada cepa en condiciones de estrés generales y específicas a las funciones asociadas al factor sigma eliminado; y, por último, los experimentos necesarios para medir y comparar la eficiencia de producción de proteína recombinante en las cepas.

6.2.1. Obtención, identificación, y caracterización de cepas mutantes

La obtención de las cepas BW25113 $\Delta rpoN$, BW25113 $\Delta rpoS$, BW25113 $\Delta fliA$, y BW25113 $\Delta fecI$ resulta más sencilla debido a que corresponden a las cepas de la biblioteca Keio (Baba et al., 2006), y ya han sido caracterizadas en el trabajo de García en el 2020, por lo que solo será necesario comprobar por PCR la ausencia de los genes correspondientes (García, 2020). En cuanto a la cepa $\Delta rpoH$, la cual no se encuentra en la colección Keio debido a que se consideró esencial en el experimento de Baba y sus colaboradores (2006), se generará a través de la delección del gen. Esto se realizará utilizando la cepa BW25113 y la técnica de sustitución por recombinación con casete de kanamicina para tener consistencia con lo realizado por Baba y sus colaboradores en la

construcción de la biblioteca Keio (Baba et al., 2006). Todas las cepas de *E. coli* que serán utilizadas y generadas se pueden observar en el **Anexo 1**.

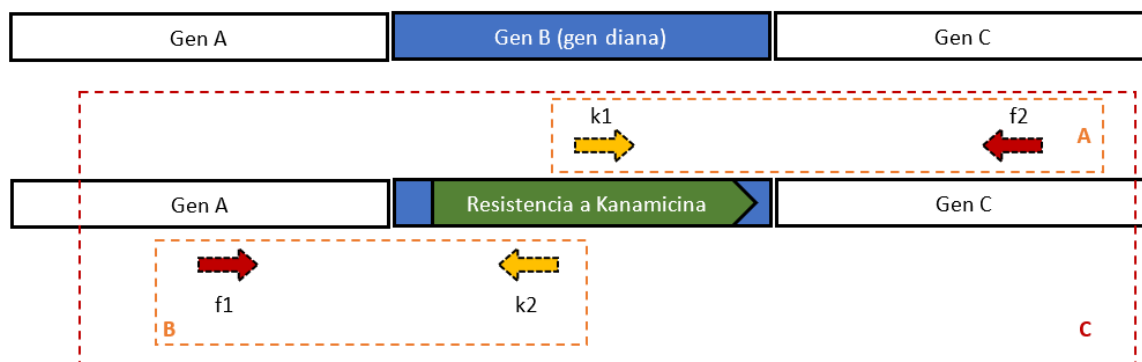
Obtención de cepa BW25113 $\Delta rpoH$

La elaboración de la cepa BW25113 $\Delta rpoH$ se realizará través de la integración de un fragmento de ADN (producto de PCR) obtenido a partir del plásmido pKD13. Este fragmento contiene el casete de resistencia a kanamicina flanqueado por las secuencias FRT (sitio de reconocimiento para la recombinasa FLP) y por secuencias de 50 pares de bases homólogas a la secuencia cromosoma del gen *rpoH*. Los procedimientos generales de cultivo, generación de fragmentos de PCR, y electroporación se detallan en el método utilizado por Baba y sus colaboradores (Baba et al., 2006). Sin embargo, se realizará una modificación en la temperatura de incubación y cultivo posterior a la electroporación que será de 15° C para evitar la muerte de las mutantes por efecto de la pérdida de *rpoH* (Zhou et al., 1988).

Verificación de mutaciones por PCR

Para verificar la delección en la cepa BW25113 $\Delta rpoH$ generada, se realizará el método por PCR propuesto por Datsenko y Wanner en el 2000 y utilizado por Baba y sus colaboradores (Baba et al., 2006; Datsenko & Wanner, 2000) y puede ser observada de forma gráfica en la **figura 4**. Esta verificación requiere la realización de 2 PCR distintas utilizando los oligonucleótidos k1 y k2 (internos a la secuencia de kanamicina) junto con dos oligonucleótidos flanqueantes del locus del gen objetivo, lo que comprueba la inserción del gen de kanamicina en el locus esperado. Por lo tanto, se utilizarán los oligonucleótidos k1 y k2, y se diseñarán 2 oligonucleótidos flanqueantes de locus llamados f1 y f2 de cada subunidad sigma. Estos oligos serán diseñados siguiendo el método descrito por García en el 2020 para la verificación por PCR del resto de las mutantes de la biblioteca Keio utilizadas. Los plásmidos que se utilizarán se pueden observar en el **Anexo 2**. Así mismo, dependiendo de los recursos disponibles, podría llegar a ser más simple realizar un PCR convencional y secuenciar el fragmento amplificado.

Figura 4. Diagrama de confirmación por PCR de delección de gen por casete de kanamicina.



En la figura 4 se muestra el gen B (en un locus entre el gen A y gen C) que fue eliminado por un casete de kanamicina. Para confirmar la delección del gen se utilizan dos PCR: una utiliza los oligos k1 y f2 (A), y otra utiliza f1 y k2 (B). Estas dos PCR permiten confirmar que el casete de kanamicina fue insertado en el locus correcto del genoma. Si el gen no fue eliminado, no existirán productos de la PCR por ausencia de kanamicina o por su ubicación incorrecta. Así mismo, si la longitud del segmento de ADN es notoriamente distinta antes y después de la inserción del casete de resistencia, se podría utilizar únicamente los oligos f1 y f2 (C).

Caracterización el crecimiento de cepa $\Delta rpoH$

Para la caracterización del crecimiento de la cepa BW25113 $\Delta rpoH$ y su comparación con el de las otras cepas se realizarán cultivos en microplaca por triplicado en 2 distintos medios de cultivo (LB y M9) y la lectura de densidad óptica (OD) con el equipo BioTek Synergy™ H1 durante 24h. La utilización de ambos medios se realiza para poder observar si existen diferencias de los efectos si se utiliza un medio complejo o un medio mínimo. Esto se realizará a 15 °C (lo que implica la utilización de equipos de refrigeración) utilizando la cepa silvestre y las mutantes en el resto de los pozos de la microplaca. Previo a este cultivo en microplaca se preparará un preinóculo e inóculo siguiendo las especificaciones detalladas por García en el 2020, con la excepción de adaptar las temperaturas previas al cultivo en microplaca a 15° C, para evitar la muerte de la cepa $\Delta rpoH$.

6.2.2. Caracterización de crecimiento en condiciones de estrés

Teniendo una caracterización general del crecimiento de cada cepa, resulta importante conocer las limitaciones de cada cepa, especialmente si pueden ser potenciales productores de proteína recombinante pues en el proceso de producción las bacterias suelen ser sujetas a distintas condiciones de estrés. Es de especial interés conocer las condiciones que pueden afectar severamente a la cepa. Estas condiciones

son probablemente aquellas que en una cepa silvestre induzcan la actividad del factor sigma e interactúen con las funciones asociados a estos: asimilación de nitrógeno para RpoN, respuesta al estrés para RpoS y respuesta a choque térmico para RpoH. Teniendo en mente esta información se elaborarán los medios de cultivo y las condiciones para caracterizar el crecimiento en las respectivas condiciones de estrés.

Cultivo en microplaca

El crecimiento de cada una de las cepas mutantes y la cepa silvestre serán contrastadas a través del cultivo en microplaca. Este cultivo seguirá el siguiente procedimiento (con las respectivas variaciones según las condiciones de estrés):

- Preinóculo: Se tomará un asa de gliceroles de cada una de las cepas y se inoculará en 4mL de medio LB con kanamicina (50mg/ml) para las mutantes y sin antibiótico para la cepa silvestre a 37°C (15°C para la mutante $\Delta rpoH$), 300 revoluciones por minuto (rpm) durante 12 h para reactivar su crecimiento tras el periodo de crio-preservación.
- Inóculo: Tras el periodo de incubación del preinóculo, se medirá la densidad óptica a 600nm (OD600) y se realizará el inóculo a una nueva serie de tubos con medio LB y M9 frescos a 0.1 UDO. De nuevo se agregará el marcador de selección. Este nuevo cultivo se dejará incubar 16 horas.
- Preparar el cultivo en microplaca: En un microtubo de 1.5 mL se preparará la totalidad del nuevo inóculo que se usará para el cultivo en microplaca tomando en cuenta todas las repeticiones requeridas. Se preparará un nuevo inóculo con 1.5 ml de medio LB o M9 según el caso y con la respectiva adición de compuestos según la condición de estrés, al que se le agregará kanamicina (50mg/ml) y la cantidad de inóculo necesaria para que el cultivo estuviera a 0.05 UDO. Se agitará con vórtex y de inmediato se procederá con la inoculación en la microplaca.
- Adición a la microplaca: Antes de comenzar este protocolo, se establecerá un mapa de los pozos de la microplaca en los que se agregarán los cultivos para tener un punto de referencia, este mapa es distinto para cada condición de estrés por lo que se muestra un ejemplo en la **figura 5** y **6**. Se tomará una alícuota de 150 μ L del nuevo cultivo en microtubo y se agregará en cada uno de los pozos

destinados a los seis cultivos. Finalmente se añadirá medio sin inóculo en los espacios restantes para tomar esas medidas de referencia como blanco. Se cubrirá con una película especial estéril para evitar la evaporación y se iniciará la lectura de las densidades ópticas en el equipo BioTek Synergy™ H1. Cada cultivo de cepa se realizará por triplicado y siempre se incluirá la cepa silvestre como control y un blanco donde no se cultiva ninguna cepa.

- Lectura de DO: La lectura se tomará durante un periodo de 24 horas y los resultados se procesarán y graficarán en R.

Condiciones de crecimiento

Las condiciones de crecimiento involucrarán: temperatura, fuente de nitrógeno, fuente de carbono, pH, y presión osmótica. En todos los casos se podrán agregar condiciones en rangos intermedios a los aquí propuestos o extender a límites más extremos de cada condición. Esta propuesta permite un sondeo inicial en estas condiciones para realizar las comparaciones deseadas, pero según los resultados se podrá profundizar en diferentes condiciones y resistencias.

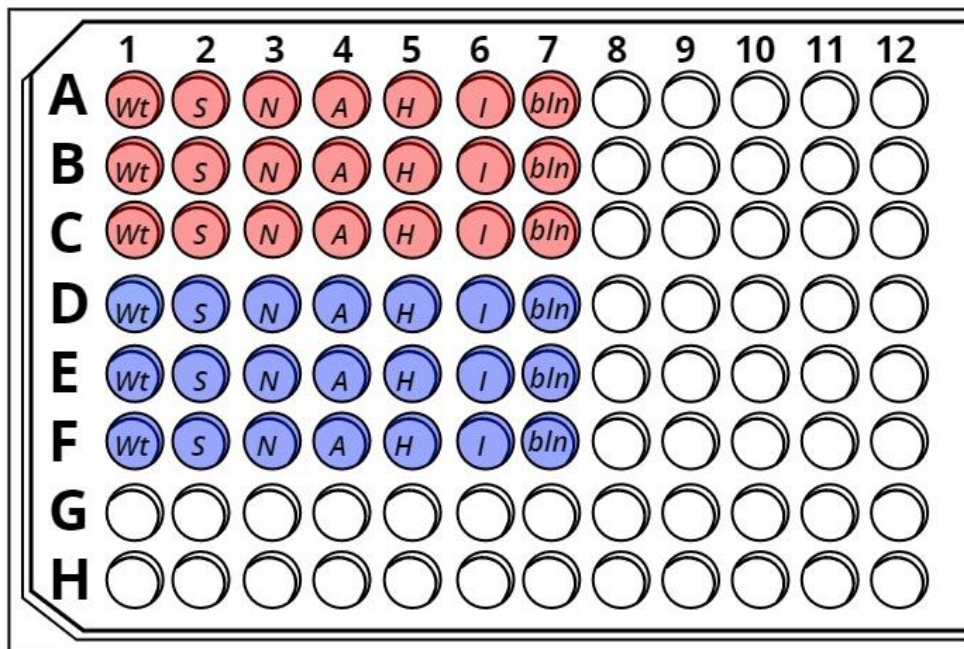
a) Temperatura

El control de la temperatura es un factor de suma importancia para el crecimiento de una cepa bacteriana y para su utilización como productor de PR. Esto se debe a que la temperatura de crecimiento afecta todas las reacciones e interacciones químicas que suceden en la célula. Específicamente en cuanto a la síntesis de proteína, se sabe que en *E. coli* la producción de proteína aumenta de la misma forma que la tasa de crecimiento de 25° C a 37° C. A temperaturas menores ocurren problemas en la iniciación de la traducción y en temperaturas mayores problemas en la estabilidad de las proteínas (Farewell & Neidhardt, 1998). Debido a esto, el intervalo de temperatura en el que *E. coli* puede crecer está bien estudiado y es de 10° C a 42° C, pero estos pueden variar dependiendo de distintas condiciones de cultivo, cepas y la incidencia de diversos tipos de estrés (Buchanan & Klawitter, 1992; Cebrián et al., 2008).

Teniendo esto en mente, los experimentos para observar los cambios de crecimiento según la temperatura seguirán el método explicado en la sección “cultivo en microplaca” de este trabajo, realizando el único cambio de la temperatura del cultivo. Primero se

realizarán cultivos de todas las cepas en medio M9 y medio LB en los rangos de temperatura de 20°, 25°, 30°, 35°, y 40° C. A partir de los datos resultantes de esos experimentos se realizará una segunda serie de cultivos variando grado a grado el intervalo de 5 grados de cultivo de mayor crecimiento obtenido en el experimento anterior, además de disminuir o aumentar, grado a grado, el límite inferior y superior de temperatura donde se observó crecimiento para cada cepa. Esto requerirá un uso de 5 microplacas de 96 pozos donde se pueden asignar 4 zonas de temperatura distintas, utilizando de 24 a 48 horas para cada cultivo, por lo que esta sección experimental tomaría de una a dos semanas. Un ejemplo del arreglo en microplaca se muestra en la **figura 5**.

Figura 5. Diagrama de disposición de cultivos en arreglo de 96 pozos para la condición de temperatura.



Ejemplo de microplaca de cultivos con temperatura como estrés. Este patrón se repetirá a distintas temperaturas descritas en el método, El color rojo representa medio LB y el azul medio M9. *Wt*, cepa silvestre; *S*, cepa $\Delta rpoS$; *N*, $\Delta rpoN$; *A*, cepa $\Delta fliA$; *H*, $\Delta rpoH$; *I*, $\Delta fecI$; *bln*, blanco.

b) Fuente de nitrógeno

En el caso del cultivo en distintas fuentes de nitrógeno, es claro que, debido a que los aminoácidos que componen a las proteínas necesitan nitrógeno en su composición, las fuentes de nitrógeno tienen un impacto en la producción de proteína recombinante y en

el crecimiento de las bacterias (Bren et al., 2016; Lozano Terol et al., 2019). *E. coli* puede utilizar una gran cantidad de compuestos como fuentes de nitrógeno, pero el amonio inorgánico es la fuente que promueve la mayor tasa de crecimiento. Los mecanismos de asimilación de nitrógeno convergen en la formación de glutamato, la cual se puede obtener de diferentes procesos de transaminación con otros aminoácidos, de la ruta de la glutamato deshidrogenasa, o de la ruta de la glutamina sintasa-glutamato sintasa. Debido a las características del metabolismo y asimilación de nitrógeno de *E. coli*, así como el papel de *rpoN* en ésta, se escogieron 5 fuentes distintas de nitrógeno para el experimento: amonio, glutamato, glutamina, arginina y adenosina (Reitzer, 2003; Reitzer & Schneider, 2001; van Heeswijk et al., 2013).

En este caso, los experimentos se dividirán en los cultivos de la cepa $\Delta rpoH$ realizados a 15° C y los del resto de las cepas a 37° C. Todos los cultivos serán en medio mínimo M9 donde se sustituirá la fuente de nitrógeno por cloruro de amonio, glutamina, arginina, y adenosina en una concentración de 9.35 mM cada una (Kiupakis & Reitzer, 2002).

c) Fuente de carbono

La fuente de carbono es también sumamente importante en el crecimiento y tiene un fuerte impacto en la producción de proteínas. *E. coli* es capaz de crecer en diferentes fuentes de carbón, creciendo de forma más rápida utilizando glucosa, pero esto puede variar dependiendo de las condiciones ambientales, como la fuente de nitrógeno. Esta bacteria consume glucosa de forma preferencial utilizando el sistema de regulación conocido como represión catabólica de carbono (CCR). Esta regulación se realiza principalmente en fuentes de carbono que utilizan el sistema de fosfotransferasa (PTS) para ingresar a la célula (Aidelberg et al., 2014; Bren et al., 2016; Lozano Terol et al., 2019).

De los azúcares que no necesitan el sistema PTS más utilizados está el glicerol, debido a su conveniencia y eficiencia. Aunque el uso de glicerol o glucosa puede tener diversas ventajas, un gran problema que surge al utilizar estas fuentes de carbono, especialmente durante la producción de proteína recombinante, es la producción excesiva de acetato. El acetato es conocido por inhibir la producción de proteína

recombinante y el crecimiento de biomasa. Sin embargo, el acetato puede ser usado como fuente de carbono y en 2015 Serena Leone y sus colaboradores reportaron un uso de acetato como fuente de carbono aunado a modificaciones de pH para la producción de la proteína recombinante MNEI (Leone et al., 2015). Con esta información en mente, se decidió utilizar la glucosa, glicerol y acetato a una concentración de 1 g/L como fuentes de carbono en medio mínimo para evaluar el efecto de las mutaciones sobre el crecimiento. Todas las cepas serán cultivadas a 37° C a excepción de $\Delta rpoH$ las cuales se cultivarán a 15° C.

d) pH

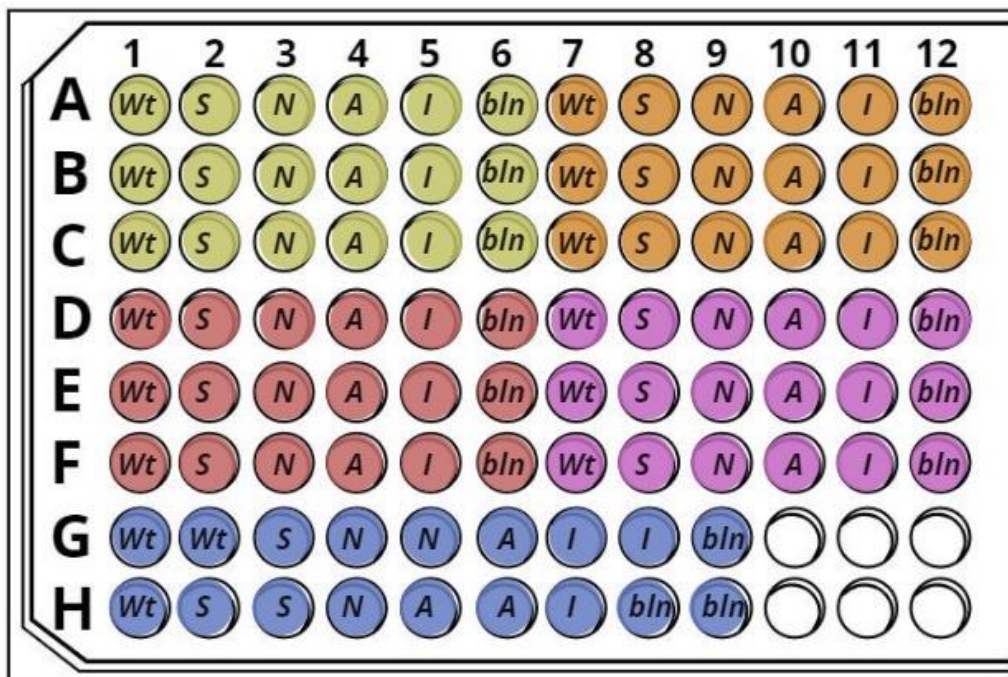
E. coli se ha observado creciendo a un amplio intervalo de pH y este puede variar según otros parámetros como la temperatura o la actividad acuosa (Presser et al., 1997, 1998). Normalmente el pH al que es estudiado esta bacteria se limita a rangos cercanos a pH neutro o dentro del rango relevante en la fisiología humana (4.5-8.5), pero el intervalo general de pH al que crece *E. coli* se encuentra entre 4 y 10. El pH, al igual que la temperatura, es una condición del medio que afecta todos los procesos de la célula en alguna medida, y especialmente puede afectar el plegado de las proteínas y su precipitación. Teniendo esto en mente, se decidió proponer cultivos donde se estudiará el efecto del pH inicial, desde pH 4 hasta pH 10 en incrementos de 0.5 obtenidos utilizando HCl y NaOH (ácidos y bases fuertes) para poder obtener los pH buscados modificando lo menos posible la presión osmótica.

e) Presión osmótica

E. coli es capaz de crecer en una gran variedad de presiones osmóticas desde soluciones muy diluidas hasta medios de cultivo con altas concentraciones molares de solutos electrolíticos y no electrolíticos (Record Jr et al., 1998). Esto resulta muy útil para la producción de proteína recombinante puesto que altas concentraciones de ciertos nutrientes, como las fuentes de C y N, en los cultivos facilitan bioprocesos en producción industrial. Sin embargo, *E. coli* tiene sus límites y la presión osmótica puede volverse un problema que inhiba el crecimiento y la actividad metabólica (Xiao et al., 2017). Las altas presiones osmóticas se pueden generar a través de compuestos iónicos (como lo serian ciertas fuentes de nitrógeno) o no iónicos (como la glucosa). Debido a que utilizar compuestos metabolizables dificulta la evaluación del efecto de la presión osmótica alta,

ya que pueden surgir nuevas variables como cambios en la demanda de oxígeno o la acumulación de compuestos metabólicos, utilizar compuestos no metabolizables resulta útil. Es por esto por lo que para evaluar la resistencia a presiones osmóticas altas se propone realizar el experimento utilizando NaCl y sacarosa debido a que *E. coli* no puede metabolizarlos. De acuerdo con los experimentos realizados por otros autores (Cheng et al., 2011; Cheung et al., 2009; Kazan et al., 1995), se propone incubar un inóculo en medio LB líquido con agitación a 37° C durante 2 horas. En este cultivo líquido se ejercerá el estrés osmótico para cada compuesto con concentraciones de 0M, 0.125M, 0.25M, 0.5M y 0.75M para NaCl y 0M, 0.25M, 0.5M, 1M y 1.5M para sacarosa (se utilizan estas concentraciones debido a que por cada mol de NaCl se generan 2 osmoles). Posterior al estrés ejercido por 2 horas se diluirán las células con PBS y serán cultivadas en la microplaca para evaluar la viabilidad de las células después de la inducción del estrés. Esta y otras condiciones de múltiples niveles podrán tomar una disposición en un cultivo de microplaca como lo muestra la **figura 6**.

Figura 6. Diagrama de disposición de cultivos en arreglo de 96 pozos para las condiciones de múltiples niveles.



Ejemplo de microplaca de cultivos con múltiples niveles de estrés. Los diferentes colores representarían los niveles de una condición, en una misma placa se podría agregar hasta 5 niveles de una condición de estrés o cultivo *Wt*, cepa silvestre; *S*, cepa $\Delta rpoS$; *N*, $\Delta rpoN$; *A*, cepa $\Delta fliA$; *H*, $\Delta rpoH$; *I*, $\Delta fecl$; *bln*, blanco.

6.2.3. Medición y comparación de producción de proteína recombinante

Por último, después de entender a mayor profundidad las limitantes de crecimiento de cada cepa mutante es necesario realizar los experimentos para medir la eficiencia de cada cepa como productora de proteína recombinante. Para llevar a cabo esto es necesario: realizar pruebas con el sistema de dos plásmidos para la producción de proteína recombinante bajo el control transcripcional de la ARN polimerasa del fago T7; insertar el sistema de dos plásmidos en las cepas mutantes; y medir la producción de proteína recombinante en cada cepa.

Evaluación del sistema de dos plásmidos

En primer lugar, se realizarán pruebas del plásmido pGFPT7 en una cepa que ya produce la polimerasa T7 (la cepa BL21DE3). Se cultivará la cepa BL21DE3 en medio mínimo M9 en distintas concentraciones del inductor IPTG (0.1, 0.2, 0.5, 1.0, y 1.5 mM). En cada caso, se monitoreará durante 24 horas la DO y la fluorescencia emitida a 503nm a través de una excitación a 475nm (Himmah et al., 2017; Ribeiro et al., 2019). Debido a que las cepas mutantes no producen la polimerasa T7 como lo hace la cepa BL21DE3, se probarán 2 plásmidos que producen esta polimerasa para evaluar cual sería mejor para expresar la polimerasa en conjunto con el plásmido pGFPT7 para la evaluación de las cepas. Esta evaluación se realizará con los plásmidos pN565 o pAR1219, y el plásmido pGFPT7 en la cepa silvestre BW25113. Habiendo transformado con el sistema de dos plásmidos pN565/pGFPT7 o pAR1219/pGFPT7, se realizarán las mismas pruebas con el inductor IPTG en las 5 concentraciones, por triplicado, monitoreando DO y fluorescencia durante 24 horas.

Por último, antes de evaluar la producción de GFP en las cepas mutantes, es necesario evaluar que no existan cambios en la producción de la polimerasa T7 en cada una de las cepas transformadas por el plásmido productor de T7 seleccionado. Esto puede llegar a ocurrir debido a que el promotor utilizado en los plásmidos es reconocido por el factor rpoD, y como ya fue explicado con anterioridad, modificaciones en la concentración intracelular de un factor sigma puede alterar la actividad de otros factores. Debido a esto, se evaluará si existen diferencias en la producción de T7 en cada cepa para confirmar si las diferencias de producción de GFP se deban a esto o a otros cambios en la economía celular. Esta evaluación se realizará insertando el gen de GFP en el

plásmido seleccionado, dentro del ORF de la polimerasa T7 y río abajo de dicho gen. De esta manera, se realiza la transformación de cada una de las cepas mutantes y la silvestre y se evalúa la DO y fluorescencia durante 24 horas en un cultivo por triplicado.

Transformación de cepas mutantes

Para prevenir problemas con cepas termosensibles como las mutantes de *rpoH* se optará por utilizar un protocolo de electroporación para la transformación de las bacterias con los sistemas de plásmidos. Utilizando bacterias electrocompetentes previamente preparadas, se agregó 1ug de ADN plasmídico a 40 uL de suspensión bacteriana y se transferirá la mezcla a un pozo previamente enfriado. Se colocará el pozo a la cámara de electroporación, electroporando a 1.8 kV, 25uF, con una constante de tiempo de 5 milisegundos. Rápidamente se recuperará la suspensión celular resuspendiendo en 1 mL de medio LB y transfiriéndolo a un tubo de vidrio previamente esterilizado. Las células serán posteriormente incubadas por 30 minutos a 37 °C (15 °C para mutantes de *rpoH*). Seguido de esta incubación se cultivará en medio selectivo para identificar las bacterias efectivamente transformadas. Este procedimiento se obtuvo del protocolo planteado por Gonzales y colaboradores en 2013 (Gonzales et al., 2013).

Evaluación en la producción de proteína recombinante

Para evaluar la producción de proteína recombinante en cada cepa transformada se cultivarán por triplicado en medio LB y medio M9. Las condiciones de cultivo serán 4 para cada cepa: condiciones fisiológicas estándar 37° C y pH 7 (con la excepción de 15° C para $\Delta rpoH$) en medio LB y medio M9, así como condiciones óptimas de temperatura y pH en medio LB y medio M9 de cada cepa mutante que fue determinada en los experimentos anteriores. Se monitoreará durante 24 horas la DO y la fluorescencia emitida a 503nm a través de una excitación a 475nm aprovechando la característica de bioluminiscencia que ofrece GFP (Himmah et al., 2017; Ribeiro et al., 2019)

6.2.4. Análisis estadístico

Teniendo en cuenta un total de 3 repeticiones independientes de cada experimento se puede analizar los datos obtenidos a través de una prueba de ANOVA o Kruskal-Wallis en caso de que no se cumplan los supuestos de normalidad. Las variables dependientes por comparar serán la DO máxima a la que se llega, el tiempo necesario para llegar a la DO máxima, y la fluorescencia en los experimentos de producción de

GFP, mientras que las variables independientes serían la mutante utilizada y la condición de cultivo. Este análisis estadístico aunado a una prueba *post hoc* permitirá identificar si existen diferencias significativas entre las variables dependientes de cada mutante entre ellas y con respecto a la silvestre. Igualmente, las pruebas permitirán encontrar si existen diferencias significativas entre los distintos niveles de las condiciones de cultivo. Este análisis se puede realizar a través de paquetería estadística utilizando R.

7. Discusión

7.1. Potencial de los factores sigma como dianas para el mejoramiento de cepas de producción

En primer lugar, RpoD muestra tener un alto potencial como diana de modificaciones para la formación de cepas de producción. Esto se demuestra ya que existen ejemplos donde su modificación, mediante cambios a la secuencia del gen, mejora las concentraciones de proteína producida. Además de esto, también puede generar cepas con cambios en la resistencia a distintas formas de estrés que pueden llegar darse durante un proceso de producción. Cabe resaltar que la mayoría de estas cepas han sido obtenidas a través de gTME, lo cual tiene la gran ventaja de poder ser aplicada a las cepas de producción ya existentes, mejorando el rendimiento en la producción de muchos productos biotecnológicos. Sin embargo, esta técnica es no racional, por lo que sería importante la exploración de las mutaciones específicas del gen que provocan los fenotipos deseados. Potencialmente, se podría explorar a mayor profundidad alteraciones en estructura y expresión que no sigan los métodos de gTME (que utiliza mutación azarosa por medio de PCR propensa a errores). Así mismo, se podría llevar las aplicaciones de gTME y otros fenotipos aún más lejos: Ya se sabe que se puede generar un fenotipo de resistencia múltiple utilizando dos factores sigma distintos en la misma bacteria, pero agregar la utilización de circuitos genéticos sintéticos para activar la expresión de un alelo de *rpoD* bajo ciertas condiciones y la de un *rpoD* distinto con un estímulo específico, se podría controlar el cambio fenotípico global. Una limitante de la exploración de mutantes de *rpoD* es que su delección resulta complicada ya que controla funciones esenciales, por lo que no se han reportado casos de fenotipos a través de la ausencia de este factor. Entre todos los factores sigma, este es el más estudiado en la

aplicación de su modificación y con un mayor potencial, pero no es el único que debería ser explorado.

En segundo lugar, mutaciones y la delección de los factores RpoS y RpoN ya han sido exploradas. Su delección, sobreexpresión, o mutación genera fenotipos que tienen mayor resistencia a ciertas condiciones o una mayor producción de ciertos metabolitos. En el caso específico de la proteína recombinante, no existe información específica sobre los efectos que podría provocar modificaciones en RpoN o su expresión, aunque las mejoras en producción de otros metabolitos y su influencia en la utilización de fuentes de nitrógeno abre la puerta a las posibilidades. Para RpoS, en cambio, sí existen ejemplos donde modificando el gen se obtienen cepas con fenotipo favorable para la producción de PR, sin embargo, la mayoría de estas modificaciones en el factor sigma no han sido el objetivo del estudio sino, más bien, un hallazgo en estas cepas, a excepción del estudio de Chou y colaboradores en 1996. Un caso especialmente llamativo es el de Mulyanti *et al*, donde el cambio favorable para producción de PR se obtuvo al unir el gen de *rpoS*, bajo un promotor de *rpoD*, con esto induciendo su expresión en fase exponencial (Mulyanti et al., 2021). Esto amplía las posibles aplicaciones de estos factores sigma. Dadas las interacciones que se ha encontrado entre estos dos factores sería importante que los estudios en producción de PR que modifiquen la expresión de uno de ellos tengan en cuenta la actividad de ambos. Además de eso, no se ha explorado el potencial de aplicar gTME y otras herramientas de evolución dirigida aplicada a estos factores sigma. Dada la evidencia ya existente de los fenotipos que puede generar cada factor sigma, y en especial la predominancia que muestra RpoS en fase estacionaria, existe un alto potencial en ser explorados como posibles dianas en la formación de cepas de producción.

A diferencia de los otros factores sigma ya mencionados, RpoE y RpoH han sido muy poco explorados en lo concerniente a cepas de producción debido a los efectos deletéreos de su alteración y a que estos genes son esenciales en condiciones de crecimiento a 37 °C. Específicamente en el caso de *rpoH*, la búsqueda bibliográfica logró encontrar ejemplos de experimentos, aunque realizados hace ya varias décadas, donde *rpoH* podía ser eliminado y *E. coli* era viable en temperaturas menores a 20°C. Aunado

a dicho hallazgo, se localizaron dos ejemplos donde mutantes de *rpoH* tenían fenotipos que aumentaban la producción de metabolitos y proteína recombinante, pero estos estudios se realizaron hace más de 25 años y no se encontró algún seguimiento experimental más actualizado (Goldberg et al., 1989; Obukowicz et al., 1992). A su vez, para *rpoE* se encontró que ciertas cepas de *E. coli* el gen no es esencial, y puede ser eliminado. Ambos casos abren la posibilidad de investigar a mayor profundidad las mutantes de estos genes. Además de esto, la fuerte relación que se ha observado entre los regulones de estos factores sigma y la expresión de proteínas chaperonas, la regulación de otros procesos metabólicos como la glucosilación de lípidos, el desarrollo de mutaciones puntuales, y la temperatura de crecimiento, continúan resaltando a estos dos genes como buenos puntos de exploración para cepas de producción. Sin embargo, las dificultades presentes debido a los efectos deletéreos de sus mutantes son un obstáculo que aún deben de ser abordados a mayor profundidad.

Por último, los factores de regulón más pequeño, Fecl y FliA, mostraron repercusiones menores en sus mutantes comparadas a los demás factores sigma. Aunque los cambios generados por la eliminación de estos genes pueden ser menor en comparación, sí podrían llegar a ser importantes, especialmente en el caso de *fliA* debido a su papel en la motilidad y su relación con el regulón de RpoS. Por lo tanto, su potencial como diana de mutaciones para la generación de cepas de producción es menor a cualquier otro factor sigma, pero el reducido efecto que tienen sobre la viabilidad celular y el crecimiento los vuelven un interesante objetivo de estudio, pues tienen el potencial de liberar espacio metabólico que buena beneficiar la producción de PR.

7.2. Información que se obtendrá del protocolo experimental

La propuesta experimental de este trabajo tiene el potencial de explorar 2 temas importantes: la comprobación de afirmaciones realizadas en la literatura referente a fenotipos observados en deleciones de *rpoH*, *rpoS* y *rpoN*; y la exploración de resistencias a distintos tipos de estrés en mutantes sin estos factores sigma, así como la producción de proteína recombinante. Los fenotipos que se buscarán replicar de experimentos pasados son la viabilidad y crecimiento de la mutante $\Delta rpoH$ a temperaturas menores a 20 °C realizada por Zhou y colaboradores en 1988, la contradicción encontrada en los estudios de Rahman y sus colaboradores en 2006 y de

Suryadarma y colaboradores en 2012 donde en el primero se sugiere que la delección total de *rpoS* la inhabilita a utilizar el acetato provocando su acumulación y en otro se menciona que se observó lo contrario (Rahman et al., 2006; Suryadarma et al., 2012) y, por último, la incapacidad de procesar acetato por la mutante $\Delta rpoN$ que fue reportada en una revisión de Reitzer y Schneider en 2001. Esta característica de la cepa $\Delta rpoN$ se citó como parte de los resultados de un experimento aun no publicado por Pybus y Reitzer; sin embargo, en dicho trabajo no se logró encontrar a través de las herramientas bibliográficas utilizadas. El resto de los experimentos permitirá evaluar muchas de las características de cada mutante descritas en la revisión bibliográfica y compararlas en el mismo contexto experimental de la producción de PR.

7.3. Perspectivas y futuros experimentos

La bibliografía revisada muestra que existen muchos otros temas y experimentos por explorar. Dentro de éstos sugeriré tres perspectivas interesantes que podrían ser investigadas en el futuro. En primer lugar, tenemos la aplicación de gTME en otros factores sigma diferentes a RpoD. Esto surge de observar la utilidad que ha mostrado esta técnica en la generación de fenotipos útiles; sin embargo, para *E. coli* solo ha sido aplicada a RpoD como se muestra en la **tabla 1**. A futuro, incluso se podría buscar aplicar gTME en más de un factor sigma a la vez, permitiendo alteraciones que potencialmente afecten todo el transcriptoma de *E. coli*. Además de esto, se pueden aprovechar los hallazgos en algunos factores sigma y observar si estos pueden aplicar a los demás. Como ejemplo sería explorar si generar factores sigma truncados que conserven solo las regiones 3 y 4, como se ha observado repetidamente para RpoD, puede ser útil para otros factores sigma de la misma familia estructural.

Otra avenida interesante es la profundización en cepas con delecciones en estos factores sigma. Por un lado, realizar múltiples delecciones para encontrar cuál es el mínimo de factores sigma necesarios para la sobrevivencia de *E. coli*, podría ser una estrategia rápida para generar un sistema de célula mínima no basado en un genoma mínimo, sino en un transcriptoma mínimo, puesto que las alteraciones de gran magnitud serán sobre la transcripción de los genes. Por otro lado, la dinámica de interacción a través de competición por la ARNP que caracteriza a los factores sigma podría ser explotada a través de la delección de estos factores o el control de su expresión y

actividad. Esto se podría utilizar para potenciar los efectos de factores sigma mutantes, ya que el traslape de los regulones llega a tener un cierto efecto amortiguante. Por ejemplo, si se reduce fuertemente la expresión de RpoS, la fuerte competencia que este factor puede generar con los más de 800 genes que comparte con RpoD se vería reducida, por lo tanto, podríamos esperar que las mutaciones en el gen *rpoD* tendrían efectos más drásticos.

Por último, en combinación con herramientas de biología sintética, la alta pleiotropía que generan las mutantes de factores sigma generando fuertes alteraciones fenotípicas a través de la mutación de un solo gen, abre la posibilidad de controlar el fenotipo de una sola cepa a través de la expresión de distintas mutantes en distintos tiempos de crecimiento. De ser posible, esta herramienta nos daría la capacidad de controlar la inducción de genes para la producción de ciertos metabolitos o proteínas en una cepa de producción, sino también de inducir junto con ellos el fenotipo que genere las condiciones celulares óptimas para dicha producción. Adjuntando ingeniería de factores sigma con herramientas de control dinámico de metabolismo podría potenciar el control que se ejerce sobre el estado metabólico de la célula. Ejemplos de esto podría ser la utilización de ARN de interferencia, o proteínas conocidas como antisigmas para suprimir transitoriamente la actividad de ciertos factores sigma, o acoplar la activación de sigmas mutados con circuitos de biología sintética que reaccionen a señales ambientales o metabólicas.

8. Conclusiones

La producción de proteína recombinante es y seguramente continuará siendo uno de los procesos biotecnológicos de mayor importancia a nivel mundial. Esto provoca que exista una acelerada producción de literatura científica en el tema, lo cual es especialmente el caso en cepas tan utilizadas como *E. coli* y en genes con impacto tan amplio en el fenotipo como los factores sigma. En el presente trabajo se realizó una revisión sistemática de la bibliografía disponible sobre los fenotipos útiles para la producción de proteína recombinante que se han observado en *E. coli* por la modificación en estructura o expresión de sus siete factores sigma. Además, se propuso una

estrategia experimental para evaluar el potencial de cada factor sigma en la producción de PR.

Se encontró que RpoD presenta un alto potencial que ha sido explorado y demostrado en diversos experimentos, y puede continuar siendo utilizado para generar cepas de producción. RpoS y RpoN muestran un alto potencial explorado en menor medida, lo cual abre una interesante avenida de investigación. Por otro lado, aunque el potencial de RpoE y RpoH se muestra menor que los casos anteriores, ha sido apenas abordado debido a restricciones que sus mutantes pueden generar en el crecimiento. Sin embargo, existen indicios que estos obstáculos podrían ser superados. Finalmente, los factores Fecl y FliA mostraron el menor potencial, probablemente debido al tamaño de su regulación en comparación al resto, pero su facilidad de ser eliminado sin causar problemas en el crecimiento también tiene interesantes aplicaciones.

La estrategia experimental propuesta permitirá evaluar muchas, aunque no todas, de las características descritas en la revisión y poder comparar el efecto de la delección de cada factor sigma en un mismo contexto de la producción de proteína recombinante. Esto pone en evidencia que la investigación de las aplicaciones de los factores sigma y sus mutantes para distintos procesos biotecnológicos, tiene un gran número de vertientes para futuros experimentos. La utilización de herramientas biosintéticas y de ingeniería genética acopladas a estos conocimientos podrían brindarnos la capacidad de entender e influenciar de nuevas formas el complejo espacio metabólico y su relación con el transcriptoma, tanto en *E. coli* como en otras bacterias. Esto tiene el potencial de ser sumamente útil y, sobre todo, muy interesante.

9. Referencias

- 1 Aguilar, C., Escalante, A., Flores, N., de Anda, R., Riveros-McKay, F., Gosset, G., Morett, E., & Bolívar, F. (2012). Genetic changes during a laboratory adaptive evolution process that allowed fast growth in glucose to an *Escherichia coli* strain lacking the major glucose transport system. *BMC Genomics*, 13(1), 385. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-385>
- 2 Aidelberg, G., Towbin, B. D., Rothschild, D., Dekel, E., Bren, A., & Alon, U. (2014). Hierarchy of non-glucose sugars in *Escherichia coli*. *BMC Systems Biology*, 8(1), 133. <https://doi.org/10.1186/s12918-014-0133-z>

- 3 Alper, H., & Stephanopoulos, G. (2007). Global transcription machinery engineering: A new approach for improving cellular phenotype. *Metabolic Engineering*, 9(3), 258–267. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2006.12.002>
- 4 Appukkuttan, D., Singh, H., Park, S.-H., Jung, J.-H., Jeong, S., Seo, H. S., Choi, Y. J., & Lim, S. (2016). Engineering synthetic multistress tolerance in *Escherichia coli* by using a deinococcal response regulator, DR1558. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(4), 1154–1166. <https://doi.org/10.1128/AEM.03371-15>
- 5 Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K. A., Tomita, M., Wanner, B. L., & Mori, H. (2006). Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: The Keio collection. *Molecular Systems Biology*, 2(1). <https://doi.org/10.1038/msb4100050>
- 6 Bak, G., Han, K., Kim, D., & Lee, Y. (2014). Roles of *rpoS*-activating small RNAs in pathways leading to acid resistance of *Escherichia coli*. *MicrobiologyOpen*, 3(1), 15–28. <https://doi.org/10.1002/mbo3.143>
- 7 Battesti, A., Majdalani, N., & Gottesman, S. (2011). The RpoS-mediated general stress response in *Escherichia coli*. *Annual Review of Microbiology*, 65(1), 189–213. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090110-102946>
- 8 Battesti, A., Majdalani, N., & Gottesman, S. (2015). Stress sigma factor RpoS degradation and translation are sensitive to the state of central metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(16), 5159–5164. <https://doi.org/10.1073/pnas.1504639112>
- 9 Belik, A. S., Tarasova, N. N., & Khmel', I. A. (2008). Regulation of biofilm formation in *Escherichia coli* K12: Effect of mutations in the genes HNS, STRA, LON, and RPON. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*, 23(4), 159–162. <https://doi.org/10.3103/S0891416808040010>
- 10 Bennett, R. K., Agee, A., Gerald Har, J. R., von Hagel, B., Siu, K.-H., Antoniewicz, M. R., & Papoutsakis, E. T. (2020). Triggering the stringent response enhances synthetic methanol utilization in *Escherichia coli*. *Metabolic Engineering*, 61, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2020.04.007>
- 11 Bonocora, R. P., Smith, C., Lapierre, P., & Wade, J. T. (2015). Genome-scale mapping of *Escherichia coli* σ_{54} reveals widespread, conserved intragenic binding. *PLoS Genetics*, 11(10), e1005552. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005552>
- 12 Braun, V., Mahren, S., & Ogierman, M. (2003). Regulation of the FecI-type ECF sigma factor by transmembrane signalling. *Current Opinion in Microbiology*, 6(2), 173–180. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(03\)00022-5](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(03)00022-5)
- 13 Bren, A., Park, J. O., Towbin, B. D., Dekel, E., Rabinowitz, J. D., & Alon, U. (2016). Glucose becomes one of the worst carbon sources for *E. coli* on poor nitrogen sources due to suboptimal levels of cAMP. *Scientific Reports*, 6(1), 24834. <https://doi.org/10.1038/srep24834>
- 14 Buchanan, R. L., & Klawitter, L. A. (1992). The effect of incubation temperature, initial pH, and sodium chloride on the growth kinetics of *Escherichia coli* 0157:H7. *Food Microbiology*, 9, 185–195.
- 15 Carmona, M., & de Lorenzo, V. (1999). Involvement of the FtsH (HflB) protease in the activity of σ_{54} promoters. *Molecular Microbiology*, 10.
- 16 Cebrián, G., Arroyo, C., Condón, S., & Mañas, P. (2015). Osmotolerance provided by the alternative sigma factors σ_B and *rpoS* to *Staphylococcus aureus* and

- Escherichia coli* is solute dependent and does not result in an increased growth fitness in NaCl containing media. *International Journal of Food Microbiology*, 214, 83–90. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.07.011>
- 17 Cebrían, G., Sagarzazu, N., Pagán, R., Condón, S., & Mañas, P. (2008). Resistance of *Escherichia coli* grown at different temperatures to various environmental stresses. *Journal of Applied Microbiology*, 105(1), 271–278. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03745.x>
- 18 Cheng, Y. L., Hwang, J., & Liu, L. (2011). The effect of sucrose-induced osmotic stress on the intracellular level of cAMP in *Escherichia coli* using Lac operon as an indicator. *Journal of Experimental Microbiology and Immunology*, 15, 15–21.
- 19 Cheung, C., Lee, J., Lee, J., & Shevchuk, O. (2009). The effect of ionic (NaCl) and non-ionic (sucrose) osmotic stress on the expression of β -galactosidase in wild type *E. coli* BW25993 and in the isogenic BW25993 Δ lacl mutant. *Journal of Experimental Microbiology and Immunology*, 13, 1–6.
- 20 Cho, B.-K., Kim, D., Knight, E. M., Zengler, K., & Palsson, B. O. (2014). Genome-scale reconstruction of the sigma factor network in *Escherichia coli*: Topology and functional states. *BMC Biology*, 12(1), 4. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-12-4>
- 21 Choe, D., Lee, J. H., Yoo, M., Hwang, S., Sung, B. H., Cho, S., Palsson, B., Kim, S. C., & Cho, B.-K. (2019). Adaptive laboratory evolution of a genome-reduced *Escherichia coli*. *Nature Communications*, 10(1), 935. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08888-6>
- 22 Chou, C.-H., Bennett, G. N., & San, K.-Y. (1996). Genetic manipulation of stationary-phase genes to enhance recombinant protein production in *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*, 50(6), 636–642. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19960620\)50:6<636::AID-BIT4>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19960620)50:6<636::AID-BIT4>3.0.CO;2-L)
- 23 Claret, L., Miquel, S., Vieille, N., Ryjenkov, D. A., Gomelsky, M., & Darfeuille-Michaud, A. (2007). The flagellar sigma factor FliA regulates adhesion and invasion of Crohn disease-associated *Escherichia coli* via a cyclic dimeric GMP-dependent pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 282(46), 33275–33283. <https://doi.org/10.1074/jbc.M702800200>
- 24 Conter, A., Gangneux, C., Suzanne, M., & Gutierrez, C. (2001). Survival of *Escherichia coli* during long-term starvation: Effects of aeration, NaCl, and the rpoS and osmC gene products. *Research in Microbiology*, 152(1), 17–26. [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(00\)01164-5](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(00)01164-5)
- 25 Cronan, J. E. (2014). *Escherichia coli* as an experimental organism. En John Wiley & Sons Ltd (Ed.), *ELS* (p. a0002026.pub2). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0002026.pub2>
- 26 Datsenko, K. A., & Wanner, B. L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(12), 6640–6645. <https://doi.org/10.1073/pnas.120163297>
- 27 Davis, M. C., Kesthely, C. A., Franklin, E. A., & MacLellan, S. R. (2017). The essential activities of the bacterial sigma factor. *Canadian Journal of Microbiology*, 63(2), 89–99. <https://doi.org/10.1139/cjm-2016-0576>
- 28 Díaz-Acosta, A., Sandoval, M. L., Delgado-Olivares, L., & Membrillo-Hernández, J. (2006). Effect of anaerobic and stationary phase growth conditions on the heat shock

- and oxidative stress responses in *Escherichia coli* K-12. *Archives of Microbiology*, 185(6), 429–438. <https://doi.org/10.1007/s00203-006-0113-9>
- 29 Ding, D., Bai, D., Li, J., Mao, Z., Zhu, Y., Liu, P., Lin, J., Ma, H., & Zhang, D. (2021). Analyzing the genetic characteristics of a tryptophan-overproducing *Escherichia coli*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 44(8), 1685–1697. <https://doi.org/10.1007/s00449-021-02552-4>
- 30 Dong, T., & Schellhorn, H. E. (2009). Global effect of RpoS on gene expression in pathogenic *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL933. *BMC Genomics*, 10(1), 349. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-349>
- 31 Dong, T., Yu, R., & Schellhorn, H. (2011). Antagonistic regulation of motility and transcriptome expression by RpoN and RpoS in *Escherichia coli*: Antagonistic control by RpoS and RpoN. *Molecular Microbiology*, 79(2), 375–386. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07449.x>
- 32 Duzenli, O., & Okay, S. (2020). Promoter engineering for the recombinant protein production in prokaryotic systems. *AIMS Bioengineering*, 7(2), 62–81. <https://doi.org/10.3934/bioeng.2020007>
- 33 Egler, M., Grosse, C., Grass, G., & Nies, D. H. (2005). Role of the extracytoplasmic function protein family sigma factor RpoE in metal resistance of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 187(7), 2297–2307. <https://doi.org/10.1128/JB.187.7.2297-2307.2005>
- 34 El Khoury, J. Y., Maure, A., Gingras, H., Leprohon, P., & Ouellette, M. (2019). Chemogenomic screen for imipenem resistance in Gram-negative bacteria. *MSystems*, 4(6). <https://doi.org/10.1128/mSystems.00465-19>
- 35 El-Baky, N. A., & Redwan, E. M. (2015). Therapeutic Alpha-Interferons Protein: Structure, Production, and Biosimilar. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 45(2), 109–127. <https://doi.org/10.1080/10826068.2014.907175>
- 36 Farewell, A., & Neidhardt, F. C. (1998). Effect of temperature on *In vivo* protein synthetic capacity in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 180(17), 4704–4710. <https://doi.org/10.1128/JB.180.17.4704-4710.1998>
- 37 Fitzgerald, D. M., Bonocora, R. P., & Wade, J. T. (2014). Comprehensive mapping of the *Escherichia coli* flagellar regulatory network. *PLoS Genetics*, 10(10), e1004649. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004649>
- 38 Fontaine, F., Stewart, E. J., Lindner, A. B., & Taddei, F. (2007). Mutations in two global regulators lower individual mortality in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 0(0), 071202153222001-???. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05988.x>
- 39 Franchini, A. G., Ihssen, J., & Egli, T. (2015). Effect of global regulators RpoS and cyclic-AMP/CRP on the catabolome and transcriptome of *Escherichia coli* K12 during Carbon- and energy-limited growth. *PLoS ONE*, 10(7), e0133793. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133793>
- 40 Gaida, S. M., Al-Hinai, M. A., Indurthi, D. C., Nicolaou, S. A., & Papoutsakis, E. T. (2013). Synthetic tolerance: Three noncoding small RNAs, DsrA, ArcZ and RprA, acting supra-additively against acid stress. *Nucleic Acids Research*, 41(18), 8726–8737. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt651>
- 41 Gao, X., Jiang, L., Zhu, L., Xu, Q., Xu, X., & Huang, H. (2016). Tailoring of global transcription sigma D factor by random mutagenesis to improve *Escherichia coli*

tolerance towards low-pHs. *Journal of Biotechnology*, 224, 55–63.

<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.03.012>

42 Gao, X., Yang, X., Li, J., Zhang, Y., Chen, P., & Lin, Z. (2018). Engineered global regulator H-NS improves the acid tolerance of *E. coli*. *Microbial Cell Factories*, 17(1), 118. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0966-z>

43 García, E. (2020). *Caracterización de mutantes en factores sigma de Escherichia coli*. Universidad Nacional Autónoma de México.

44 Gayán, E., Cambré, A., Michiels, C. W., & Aertsen, A. (2016). Stress-induced evolution of heat resistance and resuscitation speed in *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 43888. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(22), 6656–6663.

<https://doi.org/10.1128/AEM.02027-16>

45 Gayán, E., Van den Bergh, B., Michiels, J., Michiels, C. W., & Aertsen, A. (2020). Synthetic reconstruction of extreme high hydrostatic pressure resistance in *Escherichia coli*. *Metabolic Engineering*, 62, 287–297. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2020.09.008>

46 Goldberg, I., Salerno, A. J., Patterson, T., & Williams, J. I. (1989). Cloning and expression of a collagen-analog-encoding synthetic gene in *Escherichia coli*. *Gene*, 80(2), 305–314. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(89\)90294-1](https://doi.org/10.1016/0378-1119(89)90294-1)

47 Gonzales, M. F., Brooks, T., Pukatzki, S. U., & Provenzano, D. (2013). Rapid protocol for preparation of electrocompetent *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae*. *Journal of Visualized Experiments*, 80, 50684. <https://doi.org/10.3791/50684>

48 Goodall, E. C. A., Robinson, A., Johnston, I. G., Jabbari, S., Turner, K. A., Cunningham, A. F., Lund, P. A., Cole, J. A., & Henderson, I. R. (2018). *The essential genome of Escherichia coli K-12*. 9(1), 18.

49 Gopal, G. J., & Kumar, A. (2013). Strategies for the production of recombinant protein in *Escherichia coli*. *The Protein Journal*, 32(6), 419–425.

<https://doi.org/10.1007/s10930-013-9502-5>

50 Griffiths, A. J. F., Miller, J. H., Suzuki, D. T., Lewontin, R. C., & Gelbart, W. M. (2000). Tecnología del DNA recombinante. En *Genética* (Séptima edición, pp. 365–403). Mc Graw Hill.

51 Grigorova, I. L., Phleger, N. J., Mutalik, V. K., & Gross, C. A. (2006). *Insights into transcriptional regulation and □ competition from an equilibrium model of RNA polymerase binding to DNA*. 103, 5332–5337.

52 Guo, Y., Li, Y., Zhan, W., Wood, T. K., & Wang, X. (2019). Resistance to oxidative stress by inner membrane protein ElaB is regulated by OxyR and RpoS. *Microbial Biotechnology*, 12(2), 392–404. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13369>

53 Hamdallah, I., Torok, N., Bischof, K. M., Majdalani, N., Chadalavada, S., Mdluli, N., Creamer, K. E., Clark, M., Holdener, C., Basting, P. J., Gottesman, S., & Slonczewski, J. L. (2018). Experimental evolution of *Escherichia coli* K-12 at High pH and with RpoS induction. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(15).

<https://doi.org/10.1128/AEM.00520-18>

54 Harden, M. M., He, A., Creamer, K., Clark, M. W., Hamdallah, I., Martinez, K. A., Kresslein, R. L., Bush, S. P., & Slonczewski, J. L. (2015). Acid-Adapted Strains of *Escherichia coli* K-12 obtained by experimental evolution. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(6), 1932–1941. <https://doi.org/10.1128/AEM.03494-14>

- 55 Hart, E., O'Connell, A., Tang, K., Wzorek, J., Grabowicz, M., Kahne, D., & Silhavy, T. (2019). Fine-tuning of sigma E activation suppresses multiple assembly-defective mutations in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 201(11), e000745-18.
- 56 Hayden, J. D., & Ades, S. E. (2008). The extracytoplasmic stress factor, σ E, is required to maintain cell envelope integrity in *Escherichia coli*. *PLoS ONE*, 3(2), e1573. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001573>
- 57 Helmann, J. D. (2005). Sigma Factors in Gene Expression. En John Wiley & Sons, Ltd (Ed.), *Encyclopedia of Life Sciences* (p. a0000854.pub2). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1038/npg.els.0003829>
- 58 Himmah, K., Dluha, N., Anyndita, N. V. M., Rifa'i, M., & Widodo. (2017). *Design and evaluation of protein expression in a recombinant plasmid encoding epitope gp 350/220 of the Epstein-Barr virus (EBV)*. 030005. <https://doi.org/10.1063/1.4983432>
- 59 Jin, Y., Watt, R. M., Danchin, A., & Huang, J. (2009). Small noncoding RNA GcvB is a novel regulator of acid resistance in *Escherichia coli*. *BMC Genomics*, 10(1), 165. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-165>
- 60 Jishage, M., Kvint, K., Shingler, V., & Nyström, T. (2002). *Regulation of σ factor competition by the alarmone ppGpp*. 16, 1260–1270.
- 61 Jun Choi, Y., Hwan Park, J., Yong Kim, T., & Yup Lee, S. (2012). Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of 1-propanol. *Metabolic Engineering*, 14(5), 477–486. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2012.07.006>
- 62 Kabir, Md. S., Sagara, T., Oshima, T., Kawagoe, Y., Mori, H., Tsunedomi, R., & Yamada, M. (2004). Effects of mutations in the rpoS gene on cell viability and global gene expression under nitrogen starvation in *Escherichia coli*. *Microbiology*, 150(8), 2543–2553. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27012-0>
- 63 Kadoya, R., & Kodama, Y. (2015). Enhanced cellular content and lactate fraction of the poly(lactate-co-3-hydroxybutyrate) polyester produced in recombinant *Escherichia coli* by the deletion of σ factor RpoN. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 119(4), 427–429.
- 64 Kadoya, R., Kodama, Y., Matsumoto, K., & Taguchi, S. (2015). Indirect positive effects of a sigma factor RpoN deletion on the lactate-based polymer production in *Escherichia coli*. *Bioengineered*, 6(5), 307–311.
- 65 Kang, Z., Wang, Q., Zhang, H., & Qi, Q. (2008). Construction of a stress-induced system in *Escherichia coli* for efficient polyhydroxyalkanoates production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 79(2), 203–208. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1428-z>
- 66 Kazan, D., Camurdan, A., & Hortacsu, A. (1995). The Effect of Glucose Concentration on the Growth Rate and some Intracellular Components of a Recombinant *E. coli* Culture. *Process Biochemistry*, 30(3), 269–273.
- 67 Ke, T., Liu, J., Zhao, S., Wang, X., Wang, L., Li, Y., Lu, Y., & Hui, F. (2020). Using Global Transcription Machinery Engineering (GTME) and Site-Saturation Mutagenesis Technique to Improve Ethanol Yield of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 56(5), 563–568. <https://doi.org/10.1134/S0003683820050087>
- 68 Keseler, I. M., Gama-Castro, S., Mackie, A., Billington, R., Bonavides-Martínez, C., Caspi, R., Kothari, A., Krummenacker, M., Midford, P. E., Muñoz-Rascado, L., Ong, W. K., Paley, S., Santos-Zavaleta, A., Subhraveti, P., Tierrafría, V. H., Wolfe, A. J.,

- Collado-Vides, J., Paulsen, I. T., & Karp, P. D. (2021). The EcoCyc Database in 2021. *Frontiers in Microbiology*, 12, 711077. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.711077>
- 69 Khan, S., Ullah, M. W., Siddique, R., Nabi, G., Manan, S., Yousaf, M., & Hou, H. (2016). Role of Recombinant DNA Technology to Improve Life. *International Journal of Genomics*, 2016, 1–14. <https://doi.org/10.1155/2016/2405954>
- 70 Kiupakis, A. K., & Reitzer, L. (2002). ArgR-Independent induction and ArgR-dependent superinduction of the astCADBE Operon in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 184(11), 2940–2950. <https://doi.org/10.1128/JB.184.11.2940-2950.2002>
- 71 Kneifel, W., & Forsythe, S. (2017). Editorial: The many facets of *Escherichia coli*: from beneficial bug and genetic workhorse to dangerous menace for plant and creature. *FEMS Microbiology Letters*, 364(10). <https://doi.org/10.1093/femsle/fnx103>
- 72 Kogoma, T., & Yura, T. (1992). Sensitization of *Escherichia coli* cells to oxidative stress by deletion of the rpoH gene, which encodes the heat shock sigma factor. *Journal of Bacteriology*, 174(2), 630–632. <https://doi.org/10.1128/jb.174.2.630-632.1992>
- 73 Konovalova, A., Schwalm, J. A., & Silhavy, T. J. (2016). A suppressor mutation that creates a faster and more robust σ E envelope stress response. *Journal of Bacteriology*, 198(17), 2345–2351. <https://doi.org/10.1128/JB.00340-16>
- 74 Kumar, R., & Shimizu, K. (2010). Metabolic regulation of *Escherichia coli* and its gdhA, glnL, gltB, D mutants under different carbon and nitrogen limitations in the continuous culture. *Microbial Cell Factories*, 9(1), 8. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-9-8>
- 75 Kundu, T. K., Kusano, S., & Ishihama, A. (1997). Promoter selectivity of *Escherichia coli* RNA polymerase σ F holoenzyme involved in transcription of flagellar and chemotaxis genes. *Journal of Bacteriology*, 179(13), 4264–4269.
- 76 Landberg, J., Wright, N., Wulff, T., Herrgard, M., & Nielsen, A. (2020). CRISPR interference of nucleotide biosynthesis improves production of a single-domain antibody in *Escherichia coli*. 117(12), 3835–3848.
- 77 Langlais, C., & Korn, B. (2006). Recombinant Protein Expression in Bacteria. En *Encyclopedic Reference of Genomics and Proteomics in Molecular Medicine* (pp. 1609–1616). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/3-540-29623-9_4800
- 78 LaRossa, R., Smulski, D., & Van Dyk, T. (1995). Interaction of lead nitrate and cadmium chloride with *Escherichia coli* K-12 and *Salmonella typhimurium* global regulatory mutants. *Journal of Industrial Microbiology*, 14, 252–258.
- 79 Leone, S., Sannino, F., Tutino, M. L., Parrilli, E., & Picone, D. (2015). Acetate: Friend or foe? Efficient production of a sweet protein in *Escherichia coli* BL21 using acetate as a carbon source. *Microbial Cell Factories*, 14(1), 106. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0299-0>
- 80 Li, Z., & Rinas, U. (2020). Recombinant protein production associated growth inhibition results mainly from transcription and not from translation. *Microbial Cell Factories*, 19(1), 83. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01343-y>
- 81 Löffler, M., Simen, J. D., Müller, J., Jäger, G., Laghrami, S., Schäferhoff, K., Freund, A., & Takors, R. (2017). Switching between nitrogen and glucose limitation: Unraveling transcriptional dynamics in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, 258, 2–12. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.04.011>
- 82 Lozano Terol, G., Gallego-Jara, J., Sola Martínez, R. A., Cánovas Díaz, M., & de Diego Puente, T. (2019). Engineering protein production by rationally choosing a carbon

- and nitrogen source using *E. coli* BL21 acetate metabolism knockout strains. *Microbial Cell Factories*, 18(1), 151. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1202-1>
- 83 Magnusson, L. U., Nyström, T., & Farewell, A. (2003). Underproduction of $\zeta 70$ Mimics a Stringent Response. *Journal of Biological Chemistry*, 278(2), 968–973. <https://doi.org/10.1074/jbc.M209881200>
- 84 Mahalik, S., Sharma, A. K., & Mukherjee, K. J. (2014). Genome engineering for improved recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories*, 13(1), 177. <https://doi.org/10.1186/s12934-014-0177-1>
- 85 Mata, G. M. S. C., Ferreira, G. M., & Spira, B. (2017). RpoS role in virulence and fitness in enteropathogenic *Escherichia coli*. *PLoS ONE*, 12(6), e0180381. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180381>
- 86 Mauri, M., & Klumpp, S. (2014). A Model for Sigma Factor Competition in Bacterial Cells. *PLoS Computational Biology*, 10(10), e1003845. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003845>
- 87 McKenna, R., Lombana, T. N., Yamada, M., Mukhyala, K., & Veeravalli, K. (2019). Engineered sigma factors increase full-length antibody expression in *Escherichia coli*. *Metabolic Engineering*, 52, 315–323. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.12.009>
- 88 Merrick, M. J. (1993). In a class of its own σ the RNA polymerase sigma factor σ^{54} (σ^N). *Molecular Microbiology*, 10(5), 903–909. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1993.tb00961.x>
- 89 Milija, J., Lilic, M., Janjusevic, R., Jovanovic, G., & Savic, D. J. (1999). TRNA synthetase mutants of *Escherichia coli* K-12 are resistant to the gyrase inhibitor novobiocin. *Journal of Bacteriology*, 181, 5.
- 90 Mitra, A., Fay, P. A., Morgan, J. K., Vendura, K. W., Versaggi, S. L., & Riordan, J. T. (2012). Sigma factor N, liaison to an ntrC and rpoS dependent regulatory pathway controlling acid resistance and the LEE in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *PLoS ONE*, 7(9), e46288. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046288>
- 91 Mitra, A., Fay, P. A., Vendura, K. W., Alla, Z., Carroll, R. K., Shaw, L. N., & Riordan, J. T. (2014). σ^N -dependent control of acid resistance and the locus of enterocyte effacement in enterohemorrhagic *Escherichia coli* is activated by acetyl phosphate in a manner requiring flagellar regulator FlhDC and the σ^S antagonist FlhZ. *MicrobiologyOpen*, 3(4), 497–512. <https://doi.org/10.1002/mbo3.183>
- 92 Mogre, A., Veetil, R. T., & Seshasayee, A. S. N. (2017). Modulation of global transcriptional regulatory networks as a strategy for increasing kanamycin resistance of the translational elongation factor-G mutants in *Escherichia coli*. *G3 Genes/Genomes/Genetics*, 7(12), 3955–3966. <https://doi.org/10.1534/g3.117.300284>
- 93 Moraleda-Muñoz, A., Marcos-Torres, F. J., Pérez, J., & Muñoz-Dorado, J. (2019). Metal-responsive RNA polymerase extracytoplasmic function (ECF) sigma factors. *Molecular Microbiology*, 112(2), 385–398. <https://doi.org/10.1111/mmi.14328>
- 94 Mulyanti, D., Soewandhi, S. N., & Riani, C. (2021). Insertion of prpoD_rpoS fragment enhances expression of recombinant protein by dps auto-inducible promoter in *Escherichia coli*. *Molecular Biology Reports*, 48(8), 5833–5845. <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06562-z>
- 95 Nakata, K., Koh, M. M., Tsuchido, T., & Matsumura, Y. (2010). All genomic mutations in the antimicrobial surfactant-resistant mutant, *Escherichia coli* OW66, are

- involved in cell resistance to surfactant. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(5), 1895–1905. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2638-8>
- 96 Narberhaus, F., & Balsiger, S. (2003). Structure-function studies of *Escherichia coli* RpoH (σ 32) by In Vitro linker insertion mutagenesis. *Journal of Bacteriology*, 185, 8.
- 97 Nonaka, G., Blankschien, M., Herman, C., Gross, C. A., & Rhodius, V. A. (2006). Regulon and promoter analysis of the *E. coli* heat-shock factor, σ 32, reveals a multifaceted cellular response to heat stress. *2006*, 20, 1176–1789.
- 98 Obukowicz, M. G., Staten, N. R., & Krivi, G. G. (1992). Enhanced heterologous gene expression in novel rpoH mutants of *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(5), 1511–1523. <https://doi.org/10.1128/aem.58.5.1511-1523.1992>
- 99 Ochs, M., Angerer, A., Enz, S., & Braun, V. (1995). Surface signaling in transcriptional regulation of the ferric citrate transport system of *Escherichia coli*: Mutational analysis of the alternative sigma factor FecI supports its essential role in fec transport gene transcription. *Molecular Genetics and Genomics*, 250, 455–465.
- 100 Ochs, M., Veitinger, S., Kim, I., Weiz, D., Angerer, A., & Braun, V. (1995). Regulation of citrate-dependent iron transport of *Escherichia coli*: FecR is required for transcription activation by FecI. *Molecular Microbiology*, 15(1), 119–132. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.tb02226.x>
- 101 Ono, K., Kutsukake, K., & Abo, T. (2009). Suppression by enhanced RpoE activity of the temperature-sensitive phenotype of a degP ssrA double mutant in *Escherichia coli*. *Genes & Genetic Systems*, 84(1), 15–24. <https://doi.org/10.1266/ggs.84.15>
- 102 Padgen, M. R., Lera, M. P., Parra, M. P., Ricco, A. J., Chin, M., Chinn, T. N., Cohen, A., Friedericks, C. R., Henschke, M. B., Snyder, T. V., Spremo, S. M., Wang, J.-H., & Matin, A. C. (2020). EcAMSat spaceflight measurements of the role of σ s in antibiotic resistance of stationary phase *Escherichia coli* in microgravity. *Life Sciences in Space Research*, 24, 18–24. <https://doi.org/10.1016/j.lssr.2019.10.007>
- 103 Paget, M. (2015). Bacterial Sigma Factors and Anti-Sigma Factors: Structure, Function and Distribution. *Biomolecules*, 5(3), 1245–1265. <https://doi.org/10.3390/biom5031245>
- 104 Palomares, L. A., Estrada-Mondaca, S., & Ramírez, O. T. (2004). Production of Recombinant Proteins: Challenges and Solutions. En P. Balbas & A. Lorence, *Recombinant Gene Expression* (Vol. 267, pp. 015–052). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-774-2:015>
- 105 Pletnev, P., Pupov, D., Pshanichnaya, L., Esyunina, D., Petushkov, I., Nesterchuk, M., Osterman, I., Rubtsova, M., Mardanov, A., Ravin, N., Sergiev, P., Kulbachinskiy, A., & Dontsova, O. (2020). Rewiring of growth-dependent transcription regulation by a point mutation in region 1.1 of the housekeeping σ factor. *Nucleic Acids Research*, 48(19), 10802–10819. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa798>
- 106 Powell, B. S., & Court, D. L. (1998). Control of *ftsZ* expression, cell division, and glutamine metabolism in Luria-Bertani medium by the alarmone ppGpp in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 180(5), 1053–1062. <https://doi.org/10.1128/JB.180.5.1053-1062.1998>
- 107 Powell, B. S., Court, D. L., Inada, T., Nakamura, Y., Michotey, V., Cui, X., Reizer, A., Saier, M. H., & Reizer, J. (1995). Novel proteins of the phosphotransferase system

- encoded within the rpoN operon of *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 270(9), 4822–4839. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.9.4822>
- 108 Powell, J. K., & Young, K. D. (1991). Lysis of *Escherichia coli* by β -Lactams which bind penicillin-binding proteins Ia and Ib: Inhibition by heat shock proteins. *Journal of Bacteriology*, 173, 6.
- 109 Presser, K. A., Ratkowsky, D. A., & Ross, T. (1997). Modelling the growth rate of *Escherichia coli* as a function of pH and lactic acid concentration. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(6), 2355–2360. <https://doi.org/10.1128/AEM.63.6.2355-2360.1997>
- 110 Presser, K. A., Ross, T., & Ratkowsky, D. A. (1998). Modelling the growth limits (growth/No growth interface) of *Escherichia coli* as a function of temperature, pH, lactic acid concentration, and water activity. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(5), 1773–1779. <https://doi.org/10.1128/AEM.64.5.1773-1779.1998>
- 111 Rahman, M., Hasan, M. R., Oba, T., & Shimizu, K. (2006). Effect of rpoS gene knockout on the metabolism of *Escherichia coli* during exponential growth phase and early stationary phase based on gene expressions, enzyme activities and intracellular metabolite concentrations. *Biotechnology and Bioengineering*, 94(3), 585–595. <https://doi.org/10.1002/bit.20858>
- 112 Ramnaresh Gupta, K., & Chatterji, D. (2016). Sigma factor competition in *Escherichia Coli*: Kinetic and thermodynamic perspectives. En F. J. de Bruijn (Ed.), *Stress and Environmental Regulation of Gene Expression and Adaptation in Bacteria* (pp. 196–202). John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/9781119004813.ch16>
- 113 Record Jr, M. T., Courtenay, E. S., Cayley, D. S., & Guttman, H. J. (1998). Responses of *E. coli* to osmotic stress: Large changes in amounts of cytoplasmic solutes and water. *Trends in Biochemical Sciences*, 23(4), 143–148. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(98\)01196-7](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(98)01196-7)
- 114 Reitzer, L. (2003). Nitrogen assimilation and global regulation in *Escherichia coli*. *Annual Review of Microbiology*, 57(1), 155–176. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.57.030502.090820>
- 115 Reitzer, L., & Schneider, B. L. (2001). Metabolic context and possible physiological themes of σ^{54} -dependent genes in *Escherichia coli*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65, 23.
- 116 Rhodius, V. A., Segall-Shapiro, T. H., Sharon, B. D., Ghodasara, A., Orlova, E., Tabakh, H., Burkhardt, D. H., Clancy, K., Peterson, T. C., Gross, C. A., & Voigt, C. A. (2013). Design of orthogonal genetic switches based on a crosstalk map of σ s, anti- σ s, and promoters. *Molecular Systems Biology*, 9(1), 702. <https://doi.org/10.1038/msb.2013.58>
- 117 Ribeiro, V. T., Asevedo, E. A., de Paiva Vasconcelos, L. T. C., Filho, M. A. O., de Araújo, J. S., de Macedo, G. R., de Sousa Júnior, F. C., & dos Santos, E. S. (2019). Evaluation of induction conditions for plasmid pQE-30 stability and 503 antigen of *Leishmania i. Chagasi* expression in *E.a coli* M15. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(16), 6495–6504. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09948-z>
- 118 Riordan, J. T., Tietjen, J. A., Walsh, C. W., Gustafson, J. E., & Whittam, T. S. (2010). Inactivation of alternative sigma factor 54 (RpoN) leads to increased acid resistance, and alters locus of enterocyte effacement (LEE) expression in *Escherichia coli* O157: H7. *Microbiology*, 156, 719–730.

- 119 Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. (2014a). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*, 5. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00172>
- 120 Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. (2014b). Recombinant protein expression in microbial systems. *Frontiers in Microbiology*, 5. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00341>
- 121 Rowbury, R. J., & Goodson, M. (1993). PhoE porin of *Escherichia coli* and phosphate reversal of acid damage and killing and of acid induction of the CadA gene product. *Journal of Applied Bacteriology*, 74(6), 652–661. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1993.tb05199.x>
- 122 Rull, V. (2014). The most important application of science: As scientists have to justify research funding with potential social benefits, they may well add education to the list. *EMBO Reports*, 15(9), 919–922. <https://doi.org/10.15252/embr.201438848>
- 123 Run, S., & Tian, P. (2018). Improved tolerance of *Escherichia coli* to propionic acid by overexpression of sigma factor RpoS. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 54(3), 288–293. <https://doi.org/10.1134/S0003683818030122>
- 124 Sanchez-Torres, V., Maeda, T., & Wood, T. K. (2009). Protein engineering of the transcriptional activator FhlA to enhance hydrogen production in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(17), 5639–5646. <https://doi.org/10.1128/AEM.00638-09>
- 125 Santos, C. N. S., Xiao, W., & Stephanopoulos, G. (2012). Rational, combinatorial, and genomic approaches for engineering L-tyrosine production in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(34), 13538–13543. <https://doi.org/10.1073/pnas.1206346109>
- 126 Schneider, B. L., Hernandez, V. J., & Reitzer, L. (2013). Putrescine catabolism is a metabolic response to several stresses in *Escherichia coli*: Putrescine catabolism and stress. *Molecular Microbiology*, 88(3), 537–550. <https://doi.org/10.1111/mmi.12207>
- 127 Schumann, W., & Ferreira, L. C. S. (2004). Production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Genetics and Molecular Biology*, 27(3), 442–453.
- 128 Shimada, T., Tanaka, K., & Ishihama, A. (2017). The whole set of the constitutive promoters recognized by four minor sigma subunits of *Escherichia coli* RNA polymerase. *PLoS ONE*, 12(6), e0179181. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179181>
- 129 Shimada, T., Yamazaki, Y., Tanaka, K., & Ishihama, A. (2014). The whole set of constitutive promoters recognized by RNA Polymerase RpoD holoenzyme of *Escherichia coli*. *PLoS ONE*, 9(3), e90447. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090447>
- 130 Si, H.-M., Zhang, F., Wu, A.-N., Han, R.-Z., Xu, G.-C., & Ni, Y. (2016). DNA microarray of global transcription factor mutant reveals membrane-related proteins involved in n-butanol tolerance in *Escherichia coli*. *Biotechnology for Biofuels*, 9(1), 114. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0527-9>
- 131 Singh, S. S., Typas, A., Hengge, R., & Grainger, D. C. (2011). *Escherichia coli* σ 70 senses sequence and conformation of the promoter spacer region. *Nucleic Acids Research*, 39(12), 5109–5118. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr080>
- 132 Solís, M. (2001). *Análisis del gen regulador de la respuesta da estrés por calor, rpoH, en cepas de Escherichia coli aisladas de diferentes hospederos* [Maestra en Ciencias (Biología Celular)]. Universidad Nacional Autónoma de México.

- 133 Stasic, A. J., Wong, A. C. L., & Kaspar, C. W. (2012). Osmotic and desiccation tolerance in *Escherichia coli* O157:H7 requires rpoS (σ 38). *Current Microbiology*, 65(6), 660–665. <https://doi.org/10.1007/s00284-012-0210-8>
- 134 Stevens, D. C., Conway, K. R., Pearce, N., Villegas-Peñaranda, L. R., Garza, A. G., & Boddy, C. N. (2013). Alternative sigma factor over-expression enables heterologous expression of a type II polyketide biosynthetic pathway in *Escherichia coli*. *PLoS ONE*, 8(5), e64858. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064858>
- 135 Structural Genomics Consortium, Architecture et Fonction des Macromolécules Biologiques, Berkeley Structural Genomics Center, China Structural Genomics Consortium, Integrated Center for Structure and Function Innovation, Israel Structural Proteomics Center, Joint Center for Structural Genomics, Midwest Center for Structural Genomics, New York Structural GenomiX Research Center for Structural Genomics, Northeast Structural Genomics Consortium, Oxford Protein Production Facility, Protein Sample Production Facility, Max Delbrück Center for Molecular Medicine, RIKEN Structural Genomics/Proteomics Initiative, & SPINE2-Complexes. (2008). Protein production and purification. *Nature Methods*, 5(2), 135–146. <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.202>
- 136 Studier, W., & Moffatt, B. (1986). Use of Bacteriophage T7 RNA Polymerase to Direct Selective High-level Expression of CLoned Genes. 189, 113–130.
- 137 Suryadarma, P., Ojima, Y., Fukuda, Y., Akamatsu, N., & Taya, M. (2012). The rpoS deficiency suppresses acetate accumulation in glucose-enriched culture of *Escherichia coli* under an aerobic condition. *Frontiers of Chemical Science and Engineering*, 6(2), 152–157. <https://doi.org/10.1007/s11705-012-1287-0>
- 138 Tkachenko, A. G., Kashevarova, N. M., Tyuleneva, E. A., & Shumkov, M. S. (2017). Stationary-phase genes upregulated by polyamines are responsible for the formation of *Escherichia coli* persister cells tolerant to netilmicin. *FEMS Microbiology Letters*, 364(9). <https://doi.org/10.1093/femsle/fnx084>
- 139 Tomatis, P. E., Schütz, M., Umudumov, E., & Plückthun, A. (2019). Mutations in sigma 70 transcription factor improves expression of functional eukaryotic membrane proteins in *Escherichia coli*. *Scientific Reports*, 9(1), 2483. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39492-9>
- 140 Treviño-Quintanilla, L., Freyre-González, J., & Martínez-Flores, I. (2013). Anti-Sigma Factors in *E. coli*: Common Regulatory Mechanisms Controlling Sigma Factors Availability. *Current Genomics*, 14(6), 378–387. <https://doi.org/10.2174/1389202911314060007>
- 141 Tripathi, L., Zhang, Y., & Lin, Z. (2014). Bacterial Sigma Factors as Targets for Engineered or Synthetic Transcriptional Control. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2014.00033>
- 142 van Heeswijk, W. C., Westerhoff, H. V., & Boogerd, F. C. (2013). Nitrogen assimilation in *Escherichia coli*: Putting molecular data into a systems perspective. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 77(4), 628–695. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00025-13>
- 143 Vidovic, S., Medihala, P., Dynes, J. J., Daida, P., Vujanovic, V., Hitchcock, A. P., Shetty, D., Zhang, H., Brown, D. R., Lawrence, J. R., & Korber, D. R. (2018). Importance of the RpoE Regulon in Maintaining the Lipid Bilayer during Antimicrobial

- Treatment with the Polycationic Agent, Chlorhexidine. *PROTEOMICS*, 18(3–4), 1700285. <https://doi.org/10.1002/pmic.201700285>
- 144 Wade, J. T., Roa, D. C., Grainger, D. C., Hurd, D., Busby, S. J. W., Struhl, K., & Nudler, E. (2006). Extensive functional overlap between σ factors in *Escherichia coli*. *Nature Structural & Molecular Biology*, 13(9), 806–814. <https://doi.org/10.1038/nsmb1130>
- 145 Warr, A. R., Giorgio, R. T., & Waldor, M. K. (2021). Genetic analysis of the role of the conserved inner membrane protein CvpA in enterohemorrhagic *Escherichia coli* resistance to deoxycholate. *Journal of Bacteriology*, 203(6). <https://doi.org/10.1128/JB.00661-20>
- 146 Weber, H., Polen, T., Heuveling, J., Wendisch, V. F., & Hengge, R. (2005). Genome-wide analysis of the general stress response network in *Escherichia coli*: Σ S-dependent genes, promoters, and sigma factor selectivity. *Journal of Bacteriology*, 187, 1591–1603.
- 147 Weikert, C., Canonaco, F., Sauer, U., & Bailey, J. E. (2000). Co-overexpression of RspAB improves recombinant protein production in *Escherichia coli*. *Metabolic Engineering*, 2(4), 293–299. <https://doi.org/10.1006/mben.2000.0163>
- 148 Wong, C., Tintut, Y., & Gralla, J. (1994). The domain structure of Sigma 54 as determined by analysis of a set of deletion mutants. *Academic Press Limited*, 236, 81–90.
- 149 Wood, T. K., González Barrios, A. F., Herzberg, M., & Lee, J. (2006). Motility influences biofilm architecture in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72(2), 361–367. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0263-8>
- 150 Wycuff, D. R., & Matthews, K. S. (2000). Generation of an AraC-araBAD Promoter-Regulated T7 Expression System. *Analytical Biochemistry*, 277(1), 67–73. <https://doi.org/10.1006/abio.1999.4385>
- 151 Xiao, M., Zhu, X., Fan, F., Xu, H., Tang, J., Qin, Y., Ma, Y., & Zhang, X. (2017). Osmotolerance in *Escherichia coli* is improved by activation of copper efflux genes or supplementation with sulfur-containing amino acids. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(7), e03050-16, e03050-16. <https://doi.org/10.1128/AEM.03050-16>
- 152 Xu, G., Xiao, L., Wu, A., Han, R., & Ni, Y. (2021). Enhancing n-butanol tolerance of *Escherichia coli* by overexpressing of stress-responsive molecular chaperones. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 193(1), 257–270. <https://doi.org/10.1007/s12010-020-03417-4>
- 153 Yang, J., Xiong, Z.-Q., Song, S.-J., Wang, J.-F., Lv, H.-J., & Wang, Y. (2015). Improving heterologous polyketide production in *Escherichia coli* by transporter engineering. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(20), 8691–8700. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6718-7>
- 154 Yi, X., & Dean, A. M. (2016). Phenotypic plasticity as an adaptation to a functional trade-off. *ELife*, 5, e19307. <https://doi.org/10.7554/eLife.19307>
- 155 Yu, H., Tyo, K., Alper, H., Klein-Marcuschamer, D., & Stephanopoulos, G. (2008). A high-throughput screen for hyaluronic acid accumulation in recombinant *Escherichia coli* transformed by libraries of engineered sigma factors. *Biotechnology and Bioengineering*, 101(4), 788–796. <https://doi.org/10.1002/bit.21947>
- 156 Zhang, F., Qian, X., Si, H., Xu, G., Han, R., & Ni, Y. (2015). Significantly improved solvent tolerance of *Escherichia coli* by global transcription machinery

engineering. *Microbial Cell Factories*, 14(1), 175. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0368-4>

157 Zhao, K., Liu, M., & Burgess, R. R. (2007). Adaptation in bacterial flagellar and motility systems: From regulon members to 'foraging'-like behavior in *E. coli*. *Nucleic Acids Research*, 35(13), 4441–4452. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm456>

158 Zhao, K., Liu, M., & Burgess, R. R. (2010). Promoter and regulon analysis of nitrogen assimilation factor, σ^{54} , reveal alternative strategy for *E. coli* MG1655 flagellar biosynthesis. *Nucleic Acids Research*, 38(4), 1273–1283.

<https://doi.org/10.1093/nar/gkp1123>

159 Zhou, Y.-N., Kusukawa, N., Erickson, J. W., Gross, C. A., & Yura, T. (1988). Isolation and characterization of *Escherichia coli* mutants that lack the heat shock sigma factor *crs32*. *Journal of Bacteriology*, 170, 10.

10. Anexos

Anexo 1. Cepas para utilizar en la propuesta metodológica

Cepa	Genotipo	Fuente
BW25113	<i>lac^F rrnB_{T14} ΔlacZ_{WJ16} hsdR514 ΔaraBAD_{AH33} ΔrhaBAD_{LD78}</i>	(Baba et al., 2006)
ΔfliA	BW25113 ΔfliA	(Baba et al., 2006)
Δfecl	BW25113 Δfecl	(Baba et al., 2006)
ΔrpoN	BW25113 ΔrpoN	(Baba et al., 2006)
ΔrpoS	BW25113 ΔrpoS	(Baba et al., 2006)
ΔrpoH	BW25113 ΔrpoH	Este estudio
BL21(DE3)Gold	B F- dcm+ Hte ompT hsdS(rB- mB-) gal λ (DE3) endA Tetr	(Studier & Moffatt, 1986)

Anexo 2. Plásmidos para utilizar en la propuesta metodológica

Plásmido	Descripción	Fuente
pGFPT7	CmR, ori p15A, lacI PT7, GFP superGlo	(García, 2020)
pKD13	KmR, FRT-kan-FRT	(Datsenko & Wanner, 2000)
pN565	SmR, ori pSa, LacI, PT7	(Rhodius et al., 2013)
pAR1219	CmR, ori pBAD33, araC, PT7	(Wycuff & Matthews, 2000)