



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA MOLECULAR Y BIOPROCESOS

INGENIERÍA CELULAR PARA INCREMENTAR LA PRODUCCIÓN
DE ADN PLASMÍDICO POR UNA CEPA DE *ESCHERICHIA COLI* CON
UN SISTEMA ALTERNO DE TRANSPORTE DE GLUCOSA

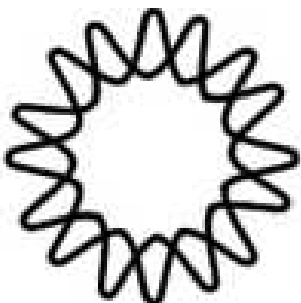
T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

P R E S E N T A

ING. GHEORGHE MANUEL BORJA ZAMFIR

TUTOR: DR. ALVARO R. LARA



CUERNAVACA, MORELOS

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

RESUMEN

El empleo de vectores no virales (plásmidos) para fines terapéuticos está cobrando cada vez mayor importancia, como lo evidencia el creciente número de evaluaciones clínicas empleando dichos vectores. Este tipo de vectores contiene elementos para su replicación en el hospedero (bacteria) y elementos para expresar la proteína antigénica de interés. Esto permite estimar que en un futuro cercano la demanda de ADN plasmídico (ADNp) aumentará sustancialmente. La producción de ADNp se realiza empleando *Escherichia coli* (*E. coli*) en cultivos de alta densidad celular para maximizar el rendimiento volumétrico. Sin embargo, lograr altas densidades celulares en cultivos por lote usualmente no es posible, principalmente debido a la producción de metabolitos de desecho (especialmente acetato), que afectan la fisiología de *E. coli* en el cultivo. Una solución a este problema ha sido el empleo de una cepa modificada genéticamente en su sistema natural de transporte de sustrato (sistema de fosfotransferasa, PTS), la cual presenta un muy bajo sobreflujo metabólico y con ello una muy baja producción de acetato. A pesar de las ventajas de dicha cepa (denominada VH33), los rendimientos de ADNp logrados han sido relativamente bajos ($Y_{p/x} = 1.16$ mg/g). En este trabajo, se mejoró la producción de ADNp por la cepa VH33. Para ello, se efectuaron las siguientes modificaciones a nivel cromosomal de dicha cepa. Se inactivó el gene *recA* para desregular el origen de replicación del plásmido. Con esto se logró un rendimiento de ADNp de 3.28 mg/g en cultivos de matraz agitado. Por otro lado, se inactivó un gen que codifica para un represor de enzimas clave de síntesis de precursores de ADN (*deoR*) y también un gene que codifica para un transportador de nucleótidos que regula la expresión de genes de esta vía (*nupG*). Al generar la mutante triple VH33 *recA deoR nupG*, se obtuvo un rendimiento específico de 4.22 mg/g y se mantuvieron niveles de acetato seis veces menor que la cepa parental (W3110). El desempeño de esta cepa triple mutante fue evaluado en cultivos por lote en biorreactores empleando 100 g/L de glucosa y se comparó con la cepa comercial más ampliamente usada para la producción de ADNp (DH5 α). Bajo estas condiciones, los cultivos de la cepa DH5 α alcanzaron una densidad celular de 20 g/L y una concentración máxima de producto de 70 mg/L, en tanto que la concentración de acetato fue de hasta 9 g/L. En contraste, los cultivos de la cepa triple mutante alcanzaron una densidad celular de 40 g/L mientras que la acumulación de acetato extracelular fue de sólo 2 g/L y se llegó a una concentración máxima de ADNp de 182 mg/L, con $Y_{p/x}$ de 4.45 mg/g. Este valor es, hasta donde se tiene conocimiento, la concentración más alta de ADNp alcanzada en cultivos por lote. Por lo tanto, la cepa desarrollada en el presente trabajo, representa una opción muy atractiva para la producción de ADNp en cultivos de alta densidad celular en modo lote.

Índice

RESUMEN	2
Introducción	14
1.1. Características de los plásmidos empleados con fines terapéuticos	15
1.2. Replicación del plásmido	18
1.2.1. Regulación de plásmido pColE1	19
1.2.2. Sistemas de Partición	23
1.3. Cepas empleadas para la producción de vacunas de ADN	25
1.4. Cultivos de alta densidad celular de <i>Escherichia coli</i>	28
1.4.1. Sistema natural de transporte de glucosa	30
1.4.2. Modificaciones al sistema de transporte de glucosa en la cepa VH33	33
1.5. Posibles modificaciones genéticas efectuadas en VH33 para incrementar la producción de ADNp.....	35
1.5.1. Endonucleasa A.....	35
1.5.2. Propiedades de la proteína reguladora RecA	37
1.5.3. Síntesis de nucleótidos	40
1.5.4. Transporte de nucleótidos (<i>nupG</i>).....	44
1.5.3. Mutación en <i>deoR</i>	44
1.6. Hipótesis	46
1.7. Objetivo General.....	46
1.7.1. Objetivos específicos	46
2. Material y métodos	47
2.1. Material biológico	47
2.2. Plásmido pHN, modelo de vacuna de ADN	48
2.3. Plásmidos empleados para la mutagénesis dirigida en <i>E. coli</i>	49

2.3.1. Plásmido pKD32	49
2.3.3. Plásmido pCP20 (FLP “helper plasmid”)	51
2.4. Técnicas moleculares.....	51
2.4.1. Extracción de ADN plasmídico	51
2.4.2. Electroforesis de ADN en gel de agarosa	52
2.4.3. Extracción de bandas de ADN de los geles de agarosa	53
2.4.4. Transformación por electroporación	53
2.5. Transducción con el bacteriófago P1 _{vir}	55
2.5.1. Obtención de lisados	55
2.5.2. Titulación de lisados	56
2.5.3. Transducción.....	56
2.6. Técnicas de mutagénesis bacteriana.....	57
2.6.1. Inactivación de genes cromosómicos utilizando fragmentos de PCR	57
2.6.2. Generación del fragmento P1-P4 por PCR	57
2.6.3. Transformación de cepas con el fragmento P1-P4 e inserción en el cromosoma bacteriano.....	58
2.6.3. Eliminación de la resistencia al antibiótico.....	60
2.6.4 Amplicones para la comprobación del inserto y escisión del gen de resistencia a antibiótico en la cepa de interés.....	60
2.7 Sistemas de cultivo de <i>E. coli</i>	61
2.7.1 Medios de cultivo para la caracterización de crecimiento.	61
2.7.2 Antibióticos.....	63
2.7.3 Cultivos en matraz.....	64
2.7.4 Cultivos en biorreactor.....	64
2.8. Métodos analíticos para el seguimiento de los cultivos.	65
2.8.3. Cuantificación de acetato por cromatografía de alta resolución (HPLC).	66

2.9 Cálculos cinéticos y estequiométricos.....	68
2.9.1. Cálculo de velocidades específicas de conversión.....	68
2.9.2. Cálculos de rendimientos.....	69
3. Resultados y discusión.....	70
3.1 Comprobación de las mutantes.....	70
3.1. Caracterización de crecimiento y consumo de sustrato.....	73
3.1.1. Desempeño de las cepas W3110, DH5 α y VH33.....	74
3.1.2 Desempeño de las construcciones de <i>endA</i> y <i>recA</i> en la cepa VH33.....	75
3.1.3 Desempeño de las cepas mutantes en la síntesis de nucleótidos.....	79
3.2. Cultivos de de las cepas DH5 α y de la cepa de VH33 $\Delta(\textit{deoR nupG recA})$ en un biorreactor instrumentado.....	88
3.2.1. Cultivos de baja densidad celular.....	88
3.2.1. Cultivos de alta densidad celular en modo lote.....	91
4. Conclusiones.....	96
Referencias.....	99

Índice de Tablas

Tabla 1. Genotipos para la producción de ADNp en las cepas W3110 y DH5 α	26
Tabla 2. Cepas comúnmente reportadas para la producción de ADNp.....	27
Tabla 3 Material biológico.....	47
Tabla 4. Secuencias de los oligonucleótidos empleados para la inactivación cromosomal.....	58
Tabla 5. Secuencias de los oligonucleótidos para la comprobación de las inserciones cromosomales.....	59
Tabla 6. Tamaños de los productos de PCR para la comprobación del inserto.....	61
Tabla 7. Medio PD 10X.....	62
Tabla 8. Elementos traza 500X.....	63
Tabla 9. Antibióticos empleados.....	63
Tabla 10. Parámetros cinéticos y estequiométricos de las cepas W3110, DH5 α y mutantes en <i>recA</i> y <i>endA</i> de VH33.....	79
Tabla 11. Parámetros cinéticos y estequiométricos de las mutantes en la síntesis de nucleótidos.....	82
Tabla 12. Comparación de los rendimientos de ADNp en modo lote obtenidos en este trabajo con los reportados por otros grupos.....	95

Índice de Figuras

Figura 1. Elementos básicos de un vector para vacuna basada en ADN.....	16
Figura 2. Mecanismos de control de inicio de la replicación en plásmidos basados en <i>iterones</i>	20
Figura 3. Región del origen de replicación <i>ori</i> de ColE1.....	22
Figura 4. Visión general de la partición de plásmidos.....	25
Figura 5 Transporte de azúcares mediado por el sistema fosfotransferasa dependiente de fosfoenolpiruvato (PTS).....	30
Figura 6 . Modelo general de la regulación de la expresión génica por el PTS en gram-negativos.....	32
Figura 7. Vía metabólica empleada por <i>E. coli</i> en la introducción de glucosa mediante el sistema PTS (sistema fosfotransferasa) y GalP (galactosa permeasa).....	34
Figura 8. Esquema general de la reacción de la endonucleasa I.....	36
Figura 9. Elementos de la replicación del plásmido pHN.....	40
Figura 10. Síntesis de nucleótidos púricos.....	41
Figura 11. Esquema general de síntesis de desoxirribonucleótidos.....	43
Figura 12. Mapa simplificado del plásmido pHN.....	48
Figura 13. Mapa simplificado del plásmido pKD32.....	49
Figura 14. Mapa simplificado del plásmido pKD46.....	50
Figura 15. Correlación entre la concentración de biomasa medida como peso seco.....	66
Figura 16. Cromatograma típico para la cuantificación de acetato.....	67
Figura 17. Curva tipo para la cuantificación de acetato en las muestras de los cultivos de <i>E. coli</i>	67
Figura 18. Determinación de los rendimientos en los cultivos de <i>E. coli</i>	69
Figura 19. Construcciones de <i>endA</i> y <i>recA</i> en VH33.....	70
Figura 20. Construcciones de <i>endA</i> y <i>recA</i> en VH33.....	71

Figura 21. Comprobación para las construcciones de <i>deoR</i> y <i>nupG</i>	72
Figura 22 Comprobación para las construcciones de <i>deoR</i> y <i>nupG</i> II.	73
Figura 23. Perfiles de crecimiento de las cepas W3110, DH5 α , VH33, VH33 $\Delta endA$, VH33 $\Delta recA$ y VH33 $\Delta(endA recA)$ en cultivos en matraz agitado.....	1
Figura 24. Perfil de crecimiento de mutantes VH33 $\Delta deoR$, VH33 $\Delta nupG$, VH33 $\Delta(deoR nupG)$, VH33 $\Delta(nupG recA)$, VH33 $\Delta(deoR recA)$ VH33 $\Delta(deoR nupG recA)$	81
Figura 25 Niveles de superenrrollamiento del ADNp producido por las cepas estudiadas en cultivos en matraz agitado.....	85
Figura 26. Correlación entre el rendimiento específico y la velocidad de crecimiento de las cepas W3110 y sus derivadas empleadas en este trabajo..	87
Figura 27. Cultivo de DH5 α en modo lote con 5g/L de glucosa.	89
Figura 28. Cultivo de VH33 $\Delta(nupG deoR recA)$ en modo lote con 5 g/L de glucosa.	90
Figura 29. Cultivo de DH5 α en modo lote con 100 g/L de glucosa.....	92
Figura 30. Cultivo de VH33 $\Delta(nupG deoR recA)$ en modo lote con 100 g/L de glucosa.	93

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México en el laboratorio del Dr. Tonatiuh Ramírez Reivich y en el Laboratorio de Biosistemas de la Universidad Autónoma Metropolitana-Cuajimalpa bajo la asesoría del Dr. Alvaro R. Lara.

Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo de los siguientes proyectos: Financiamiento proporcionado por CONACyT (84447-Z y 126663) y PROMEP (47410089).

A mis padres

Veni, Vidi, Vici.

Agradecimientos

Al Dr. Alvaro R. Lara por su asesoría durante todo el desarrollo del proyecto y por su apoyo incondicional.

Al Dr. Octavio Tonatiuh Ramírez Reivich por su apoyo permanente.

A los miembros de mi comité tutorial su guía durante el desarrollo del presente trabajo:

Dra. Blanca Lilia Barrón Romero

Dr. José Adelfo Lozada Escalante

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

Dra. Clarita Olvera Carranza

Dra. Cinthia Ernestina Núñez López

Dra. Sylvie Le Borgne Le Gall

Dr. Guillermo Gosset Lagarda

Dr. Carlos Felipe Peña Malacara

A Karin Levy, M. en C. Vanesa Hernández, M en C. Ana Ruth Pastor, por su apoyo técnico y logístico.

A los miembros de los grupos OTR y EG por sus observaciones constructivas durante el desarrollo del presente trabajo.

A los Amigos, son muchas las personas especiales a las que quiero agradecer su amistad, apoyo, ánimo y compañía en las diferentes etapas de mi vida. Siempre están aquí conmigo en mi corazón. Sin importar en dónde estén y si alguna vez llegan a leer estas líneas, quiero darles las gracias por formar parte de mí, por todo lo que me han brindado y por todos los momentos mágicos.

Introducción

Los productos para terapia génica y vacunación especializada basados en ADNp representan una herramienta biotecnológica emergente en el mercado mundial. LA FDA (Food and Drug Administration) define como vacunas de DNA a los plásmidos purificados que contienen una o más secuencias de inducir la respuesta inmune en contra de un patógeno (FDA, 2007). Actualmente existen en el mercado cuatro vacunas de ADN para aplicaciones veterinarias (Kutzler and Weiner, 2008). Además existen numerosos vectores de vacunación especializada en diversos procedimientos clínicos en evaluación. Recientemente se han contabilizado, se han reportado 72 tratamientos en fase I, 20 en fase II y 2 en fase III (Ulmer *et al.*, 2006; Kutzler and Weiner, 2008). La producción de ADNp es llevada a cabo normalmente en *E. coli*. Debido al potencial incremento en la demanda de ADNp, es necesario desarrollar procesos eficientes de fermentación y cepas con altos rendimientos. Para alcanzar este objetivo, el presente trabajo se enfocó en mejorar la producción de ADNp en una cepa de *E. coli* generada en el Instituto de Biotecnología de la UNAM. Dicha cepa, denominada VH33, tiene inactivado el sistema natural de transporte de glucosa (PTS) además tiene un sistema alternativo de transporte de glucosa (GalP⁺). Esta modificación confiere a la cepa ventajas como una baja producción de acetato, debido a que la velocidad de internalización de glucosa es 60 % menor por la permeasa de galactosa (GalP) que al ser transportada por el PTS, que es el nativo de *E. coli* (Lara *et al.*, 2008). El acetato es altamente indeseable, ya que tiene un impacto negativo en la velocidad de crecimiento y en los rendimientos de producto y biomasa. En este trabajo se realizaron modificaciones a nivel cromosomal de la cepa VH33 desde dos perspectivas: incrementar el número de copias al eliminar la recombinasa *recA* e incrementar la síntesis de precursores de ADN mediante la inactivación de los genes *deoR* y *nupG*. Una vez obtenidas estas construcciones, se realizaron cultivos en modo lote con una baja (5 g/L) y una alta (100 g/L) concentración de glucosa, para caracterizar su perfil de crecimiento, consumo de sustrato, formación de producto y topología del mismo cuando la bacteria fue cultivada bajo condiciones controladas.

1. Antecedentes

1.1 Características de los plásmidos empleados con fines terapéuticos.

Los plásmidos son elementos genéticos extracromosómicos con capacidad para autorreplicarse de forma controlada con ayuda de factores codificados en el ADN cromosómico del huésped y de forma coordinada con la división celular bacteriana (Lipps, 2008). En la mayoría de los casos son circulares, pudiendo variar en tamaño (<1-500 Kb) y en número de copias (1-500 copias/célula). La mayoría de los plásmidos son moléculas circulares de doble cadena sin extremos libres, esto es, cada nucleótido de cada hebra está unido de forma covalente al siguiente. A este tipo de plásmidos se les ha llamado ADN CCC (Covalently Closed Circular ó isoforma circular relajada), aunque también existen plásmidos lineales en diferentes especies bacterianas y fúngicas. Los plásmidos se mantienen en las poblaciones bacterianas a través de procesos de transferencia vertical y horizontal. Aunque se suele considerar material genético dispensable, la mayoría de los plásmidos proporcionan una gran variedad de fenotipos a sus huéspedes, reportándoles algún tipo de ventaja adaptativa. Ejemplos de ello pueden ser la capacidad para degradar compuestos orgánicos, fijar nitrógeno, conferir resistencia a radiación, antibióticos o metales pesados. Así, los plásmidos pueden constituir entre un 1 y un 15% del genoma de muchas especies bacterianas (Holmes *et al.*, 1995) y representan vehículos portadores de genes que, dependiendo del número de copias del plásmido, se encuentran en dosis más elevadas que en el cromosoma, y además pueden dispersarse por transferencia genética horizontal.

El ADNp es utilizado de manera rutinaria en experimentos de laboratorio para la transferencia y modificación de información genética. Desde que se demostró que los plásmidos que codifican para una proteína viral pueden desencadenar una respuesta inmune ó celular sin tener efectos secundarios como las vacunas tradicionales, los plásmidos han cobrado una creciente relevancia como vector en terapia génica y vacunación basada en ADN (Donnelly *et al.*, 2003). Los plásmidos usados para este fin están contruidos específicamente para codificar una proteína de interés, y son posteriormente administrados *in vivo* transfectando a las células de mamífero. Estos plásmidos están diseñados para

expresar un antígeno de interés resultando en una producción *in situ* del antígeno (para vacunas) ó una proteína terapéutica (para aplicaciones en terapia génica). El ADNp usado en este fin debe de contener elementos para la replicación y selección en hospederos bacterianos y para la expresión del antígeno en células eucariotas (Figura 1), además de cumplir con ciertas características de calidad y seguridad. Los elementos requeridos para la replicación en bacterias incluyen un origen de replicación y secuencias como RNAI/RNAII necesarias para la replicación, un gene de selección necesario para la selección de transformantes exitosas en el hospedero bacteriano y generar una presión de selección para mantener una población predominante bacteriana que contiene el plásmido.

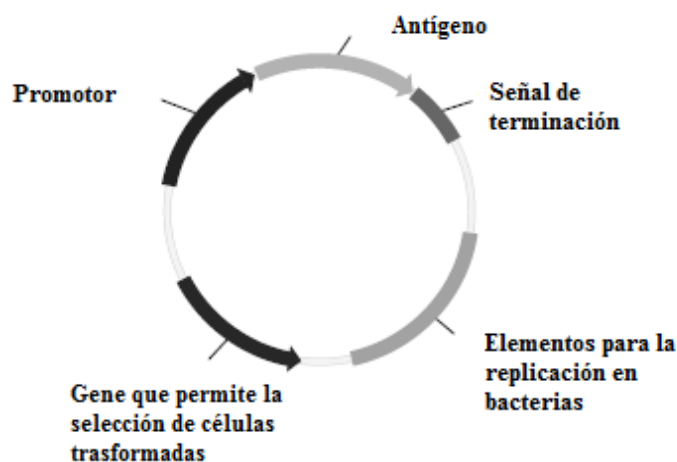


Figura 1. Elementos básicos de un vector para vacuna basada en ADN.

Los elementos de expresión en células eucariotas consisten en: promotor, terminador de la transcripción y el gene de interés (pueden ser varios genes). Entre los promotores de mamífero más empleados se pueden mencionar al promotor de citomegalovirus (CMV), promotor de virus de simio (SV40) (Leite *et al.*, 1989; Chapman *et al.*, 1991), factor de elongación 1- α (EF-1- α) y de ubiquitina humana C (UbC). El promotor de CMV ha sido el más efectivo que SV40 (Krieg, 2002) y UbC (Barouch *et al.*, 2005) además de contener un intrón A que mejora la expresión de la proteína de interés (Chapman *et al.*, 1991).

Estudios realizados en células animales han demostrado que el nivel de expresión de la proteína antigénica se ve disminuida hasta dos veces si el promotor está metilado ya sea con secuencias dam ó dcm (Butler, 1996; Wagner, 2008).

La función de esta metilación es prevenir la degradación del ADN del huésped en presencia de las actividades enzimáticas sintetizadas por las bacterias llamadas endonucleasas de restricción. Estas enzimas reconocen secuencias específicas de nucleótidos del ADN. El papel de este sistema en las células procarióticas (llamadas sistema de restricción de modificación) es degradar ADNs viral extraño. Puesto que los ADNs virales no están modificados por la metilación son degradados por las enzimas de restricción del huésped. El genoma del huésped metilado es resistente a la acción de estas enzimas (Horton *et al.*, 2005).

El gen *dcm* codifica para la metilasa de DNA que metila los residuos de citocina con la secuencia 5'-CC*AGG-3' ó 5'-CC*TGG-3' a 5-metil-citocina (5mC). La metilasa *dam* codifica una metilasa de DNA que metila la adenosina con la secuencia 5'-GA*TC-3' a N6-metiladenosina (6mA). La metilación es un aspecto importante a considerar en el diseño de vectores de vacunas de ADN, ya que en vertebrados no se encuentran secuencias metiladas. Por lo tanto los vectores empleados no deben de tener este tipo de secuencias ya que podría existir un rechazo inmune en los pacientes (Lobner-Olesen *et al.*, 2005).

Existen en el mercado cuatro vacunas de tipo veterinario basadas en ADN plasmídico (Kutzler and Weiner, 2008). En el 2008 se reportaron 115 ensayos clínicos de vacunas de ADN, dos de ellos están en las últimas pruebas para su aprobación en el mercado (Kutzler and Weiner, 2008), lo que implica una demanda creciente de este insumo en el futuro cercano. Para tales aplicaciones, las dosis empleadas deben de ser del orden de miligramos (Novosad *et al.*, 2006; Tavel *et al.*, 2007) dependiendo del tipo vacuna, lo que implica un reto para la producción de ADNp.

La FDA ha emitido la recomendación de que el ADNp para ser empleado como medicamento debe encontrarse en forma superenrollada al menos en un 80 % (FDA, 2007). Aunque dicha recomendación no está plenamente justificada, se basa en estudios que han mostrado que dicha isoforma es más efectiva para la expresión del gene terapéutico en el paciente que la isoforma relajada o la lineal (Lahijani *et al.*, 1996; Prazeres *et al.*, 1999). Además la FDA sugiere que el contenido de ADNp de la isoforma superenrollada debe contener mínimo un 80% de esta isoforma, para reducir el riesgo de recombinación inespecífica con el cromosoma del hospedero y/o la recombinación viral

(Williams *et al.*, 2009). Además el contenido de ADN cromosomal del hospedero no debe de ser mayor a 10 ng por dosis de ADN de hospedero. Por otro lado, la cantidad de RNA y proteínas no debe de exceder el 1% de las dosis empleadas (Lahijani *et al.*, 1996; WHO, 2007).

1.2 Replicación del plásmido

En cuanto a su estructura genética, los plásmidos contienen una región esencial con genes y secuencias implicados en su replicación y el control de la misma. La organización de esta región es determinante y corresponde, en general, a la descrita en el modelo del replicón (del Solar *et al.*, 1998). Los elementos esenciales del plásmido incluyen un sitio de origen de replicación, genéricamente llamado *ori*, que es característico de cada replicón y éste sería el elemento que actúa en *cis* según el citado modelo. Algunos plásmidos codifican proteínas implicadas en el inicio de la replicación del plásmido, denominadas proteínas Rep, siendo éstas el elemento que actúa en *trans*.

Una característica que define a los plásmidos es su replicación autónoma y autocontrolada. Existen tres mecanismos básicos de replicación de plásmidos circulares: tipo Theta, desplazamiento de la cadena y círculo rodante (Bouet *et al.*, 2007). Los mecanismos de regulación de la replicación de plásmidos difieren de los del cromosoma bacteriano en el número de nuevos plásmidos que se añaden por cada ciclo celular que depende del número de plásmidos preexistentes en la célula: a mayor número, menor número de copias son hechas. Esto permite a los plásmidos mantener su número de copias dentro de un intervalo relativamente constante. Los plásmidos presentan mecanismos de control negativo para ajustar las fluctuaciones en su número de copia (Bouet *et al.*, 2007). Este mecanismo de control lo llevan a cabo inhibidores que son producidos constitutivamente y cuya concentración se incrementa con el número de copias del plásmido. Al igual que en el cromosoma, y a pesar de presentar diferentes mecanismos de control, los plásmidos usan un mecanismo que tiende a limitar la concentración de la proteína iniciadora. Este mecanismo es suficiente para el control de la iniciación en varios plásmidos donde el mecanismo

inhibidor de la replicación es una molécula de ARN antisentido (Summers, 1996). En otros sistemas, como en los plásmidos tipo ColE1, el propio iniciador resulta ser una molécula de ARN, no una proteína y el inicio de la replicación es controlado por este ARN (del Solar *et al.*, 1998). La mayoría de los plásmidos usados para fines terapéuticos son derivados del tipo ColE1 y se replican mediante el mecanismo Theta regulados por ARN antisentido, el cual se describe en la siguiente sección.

1.2.1. Regulación de plásmido pColE1.

En los plásmidos cuyo control de la replicación es ejercido por RNA antisentido (asRNA), estas pequeñas moléculas de RNA complementarias de otras moléculas de RNA juegan un papel fundamental en el inicio de la replicación. La unión del RNA antisentido a su blanco tiene diferentes consecuencias dependiendo del plásmido. Mientras que en plásmidos tipo ColE1 inhibe la formación de una molécula de RNA esencial para la replicación, en otros plásmidos, como los pertenecientes a la familia IncB inhibe la traducción del RNA mensajero de la proteína RepA que lleva a cabo el primer paso de la replicación, que es la apertura del origen (Betteridge *et al.*, 2004).

Se han propuesto cuatro mecanismos que podrían limitar el inicio de la replicación en plásmidos que presentan iterones (secuencias invertidas repetidas que se encuentran río arriba o río abajo del sitio de origen de replicación) basados en la proteína RepA, es preciso detallar una característica de la proteína iniciadora RepA: la capacidad de ésta de estar presente en forma de monómero y/o en forma de dímero. Los monómeros de RepA son los que pueden unirse específicamente a los iterones y servir así de iniciadores de la replicación. Los dímeros no pueden hacerlo, pero sí se unen a otras secuencias de ADN próximas a *repA*, que son secuencias inversas repetidas (IR), funcionando como reguladores de la expresión del gen *rep* (Pal y Chatteraj, 1988).

De los cuatro mecanismos (Figura 2) que se detallan a continuación, los tres primeros hacen referencia a una limitación para el iniciador (RepA) y solo el último implica

inactivación del origen. Éste está considerado como el verdadero motor de la regulación y los otros tres de importancia menor (Paulsson y Ehrenberg, 1998).

Mecanismo 1: Autorregulación transcripcional. Se reduce la síntesis de iniciador RepA. La unión de los monómeros a los iterones de *ori* tiene un doble papel de iniciación y autorrepresión. Se trata de un mecanismo de homeostasis ampliamente conocido en la naturaleza, por el cual es posible mantener los niveles de un producto genético dentro de unos márgenes estrechos. La unión de la proteína (como dímero) a su región promotora bloquea la transcripción del propio gen. Un importante incremento en el número de copias de plásmido, sólo implica un muy pequeño aumento en la concentración de iniciador. Así la concentración de RepA se mantiene dentro de unos límites y la iniciación de la replicación está estrictamente regulada. Pero este mecanismo no es suficiente para evitar el exceso de replicación. Para prevenirla, el nivel de iniciador tras un episodio de replicación debe disminuir por debajo del nivel que permitió la replicación en primer lugar (Paulsson y Ehrenberg, 1998).

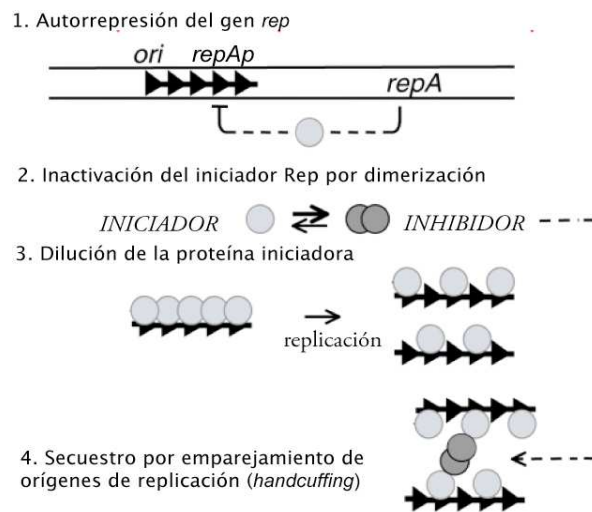


Figura 2. Mecanismos de control de inicio de la replicación en plásmidos basados en *iterones*. El segmento de flechas continuas representa los iterones y los círculos a RepA en monómeros y dímeros (adaptado de Paulsson, 2006).

Mecanismo 2: Dimerización. Como se ha expuesto, los dímeros no están bien adaptados para unirse a los iterones y son por lo tanto inactivos como iniciadores. Sin embargo, sí se

unen a las IR que son parcialmente homólogas a los iterones para inhibir el promotor del iniciador. Es posible que la dimerización de la proteína sea una manera de limitar la disponibilidad de los monómeros como iniciadores, más que un simple mecanismo de autorregulación, y poder retrasar así el inicio de la replicación. Actualmente se sabe que los dímeros participan en el proceso de esposado, actuando como inhibidores directos del proceso de replicación y no como simples coadyuvantes (Paulsson y Ehrenberg, 1998).

Mecanismo 3: Ajuste de la cantidad de iniciador. Tras una replicación la cantidad de proteína se reajusta distribuyéndose a los *oris* de las copias hijas o incluso a los iterones que existen fuera de *ori*, de tal forma que ninguno llegue a estar saturado. Esto debería impedir la iniciación, ya que se requiere una saturación completa de todos los iterons de *ori* para la iniciación (Paulsson y Ehrenberg, 1998).

Mecanismo 4: Esposado. Los plásmidos se emparejan, uniéndose entre ellos, a través del acoplamiento entre sus iterones. La regulación del número de copias está controlada por la concentración de iterones disponibles en la célula hospedadora y no sólo por la cantidad de RepA viable. La forma en que se emparejan los plásmidos es la siguiente: una proteína en forma de dímero crea un puente entre dos monómeros unidos a iterones de diferentes orígenes, de tal forma que se crea una estructura tetramérica monómero–dímero–monómero. A altas concentraciones de plásmido, la presencia de dímeros hace más probable la inactivación de la replicación por este mecanismo que el potencial incremento de la iniciación que se podría dar por un pequeño incremento en la cantidad de RepA-monómero. Adicionalmente, el mecanismo de esposado puede colaborar con el de auto-represión, ya que puede reducir el nivel de proteína iniciadora (monómero) tras una replicación, y generar así un control homeostático sin llegar a generar inactivación de *ori*, ya que las reacciones de esposado se dan con alto número de copias de plásmido. La relación dímero/monómero es el parámetro crítico que decide entre iniciación e inactivación y depende de la cantidad total de proteína, lo cual viene determinado por la autorregulación (Das *et al.*, 2005).

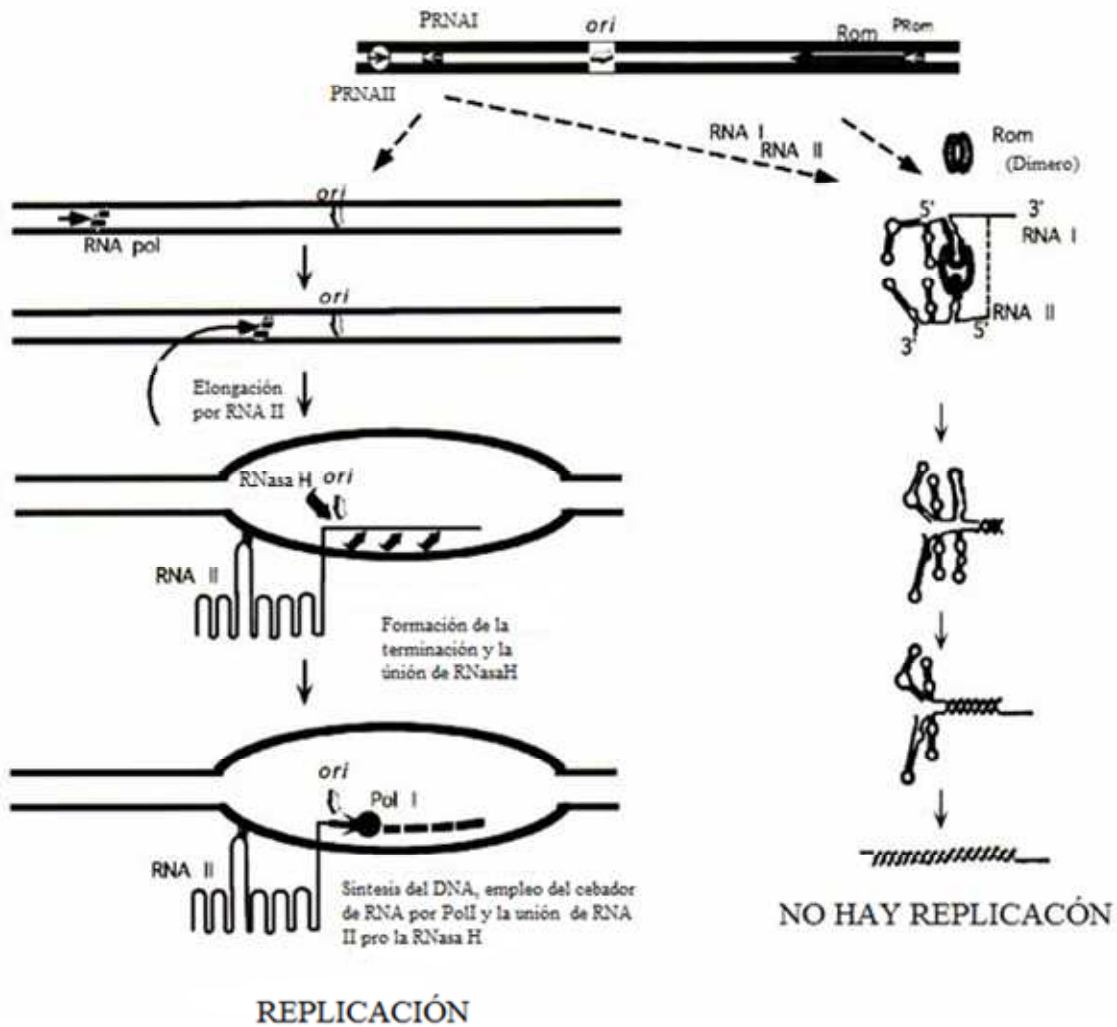


Figura 3. Región del origen de replicación ori de ColE1. De izquierda a derecha se presentan los lugares de síntesis de RNA II y RNA I, la zona del origen de replicación (ori) y el sitio de ensamblaje de la proteína Rom. Adaptado de Das et al., 2005.

ColE1 es el prototipo de plásmido multicopia que replica mediante mecanismo tipo theta (Figura 3). Entre los plásmidos ColE1 se encuentran los plásmidos artificiales pBR, pUC o pBluescript. A diferencia de otros plásmidos, no requiere proteína iniciadora del huésped, (DnaA), pero sí la DNA polimerasa Pol I del hospedero para la replicación.

El origen de replicación abarca una zona de aproximadamente 1 kb que incluye: (i) secuencias que promueven la síntesis de RNA II, el cebador de la cadena de síntesis

continua, (ii) secuencias que permiten la hibridación estable de RNA II al DNA, (iii) secuencias que permiten el procesamiento del dúplex RNA-DNA por la RNasa HI, que genera el extremo 3' necesario para el comienzo de la síntesis de DNA por Pol I, (iv) un sitio para el ensamblaje del primosoma, sitio *pas*, que permite la carga de la helicasa DnaB y la primasa DnaG para la síntesis de la cadena discontinua, (v) cercana al sitio *pas* existe una secuencia de unión a DnaA, que puede ser usado para la carga del complejo DnaB-DnaC vía DnaA, además de una secuencia rica en A+T, (vi) un sitio de unión de IHF y (vii) una secuencia de terminación de la cadena discontinua *terH*, que determina la unidireccionalidad de la replicación.

El origen de replicación se encuentra situado a 555 pb del inicio de síntesis del RNA II. Este RNA II es procesado específicamente por la RNasa H, procesamiento requerido para la transición de la síntesis de RNA a la de DNA, que es llevada a cabo por Pol I. La disponibilidad de extremos 3'-OH libres para Pol I es limitante para el comienzo de la síntesis. La hibridación del RNA II con un RNA I antisentido impide que el precebador RNA II hibride con el DNA, inhibiendo el inicio de la replicación. El RNA I es sintetizado a partir de un promotor constitutivo por lo que el número de copias de RNA I depende del número de copias del plásmido. La proteína Rop/Rom interactúa con el RNA antisentido y con el pre-cebador incrementando la eficiencia de formación del complejo RNA I/RNA II (Figura 3).

1.2.2 Sistemas de Partición

Evitar la pérdida del plásmido durante el crecimiento celular es responsabilidad de los sistemas de partición. Estos sistemas aseguran que al menos una copia vaya en cada célula hija en cada división. La división de la célula bacteriana no necesariamente implica que se repartan equitativamente las copias que contenga de un plásmido determinado, sobre todo si se trata de plásmidos de bajo número de copias (F, P1, R1). Si no existieran mecanismos que controlen el reparto de las copias, habría una alta probabilidad de que células no contengan dichos plásmidos. Dejar al azar la repartición de copias no aseguraría la

continuidad. Los sistemas de partición son sistemas activos, funcionalmente muy similares a la mitosis (Gerdes *et al.*, 2000; Bouet *et al.*, 2007).

Los sistemas de partición requieren de tres elementos: Una serie de secuencias *cis* repetidas, llamadas genéricamente *parS*; el gen de una ATPasa: *para*; y el gen de la proteína que se une al centrómero: *parB*. Estas dos últimas proteínas se unen en el sitio *parS* formando un complejo núcleo-proteico. Estos elementos actúan de forma independiente a la región de replicación de su sitio de replicación (*ori*). Se conocen dos tipos de ATPasa, y los sistemas de partición se pueden dividir en dos en función de cuál de ellas posean. El primero posee una ATPasa relacionada con la superfamilia de *Walker-box* que entre otros agrupa a los plásmido F y P1. El plásmido R1 pertenece al segundo grupo cuya ATPasa pertenece a la superfamilia *actin/hps70*.

ParB se une al sitio *parS* (Figura 4). Este complejo se puede agrandar gracias a la unión no específica de más moléculas ParB al ADN de alrededor. Las ATPasas ParA reconocen su plásmido interactuando específicamente con ParB en el complejo. Ese hecho provoca que ParA forme uniones metaestables que empujan cada copia hacia uno de los polos, quedando situados en regiones celulares concretas. La Figura 4 representa el caso más común que es el de plásmidos como F y P1 (Bouet *et al.*, 2007).

Un modelo de este tipo podría ser aplicado a los sistemas de partición existentes del plásmido pColE1. Este mecanismo de separación de moléculas hijas proporcionaría un sencillo procesamiento de los emparejamientos de plásmidos que ocurre en la primera fase del proceso de partición. Asumiendo que las parejas de plásmidos podrían asociarse con los filamentos antiparalelos en prácticamente cualquier punto de los mismos, ello haría posible que un gran número de plásmidos diferentes pudieran utilizar un mismo aparato sin interferir unos con otros. Esta asociación podría ocurrir de diversas maneras y dependería de las proteínas del hospedador así como de las constituyentes de los filamentos. Por tanto el hospedador proporcionaría el motor que guiaría el movimiento mientras que el plásmido únicamente proporcionaría las bases para el emparejamiento, asociación a los filamentos y su separación entre sí. Después de la asociación a los filamentos antiparalelos, las parejas de plásmidos se separarían por un cambio conformacional en el complejo como resultado

de la fosforilación catalizada por la actividad ATPásica de las proteínas A. El movimiento a lo largo de los filamentos implicaría bien un movimiento del motor en relación a los mismos, o bien un movimiento de los filamentos con respecto a la célula. En la Figura 4 se detalla el mecanismo en que el complejo de partición, compuesto por la proteína A (ParA, ParS, etc.) y la proteína E (ParB,) posiblemente unidas a un componente de la membrana y a un motor sintetizado total o parcialmente por el hospedero bacteriano, iniciaría el emparejamiento específico entre moléculas plasmídicas. Los plásmidos emparejados se unirían entonces a los filamentos antiparalelos anclados en si membrana celular. La hidrólisis del ATP por la proteína A provocaría la separación de los plásmidos que serian conducidos a los extremos opuestos de la célula (Bouet *et al.*, 2007).

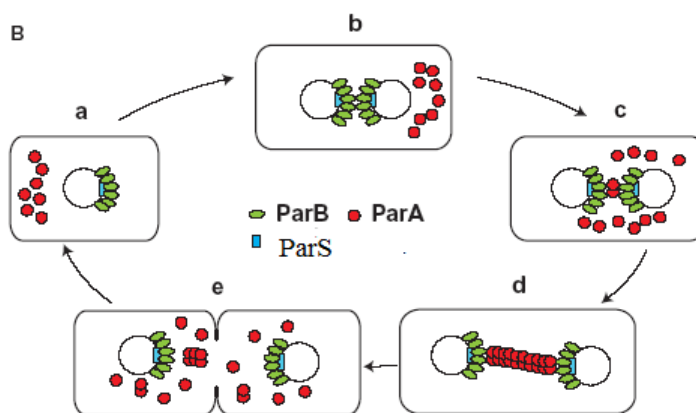


Figura 4. Visión general de la partición de plásmidos (Bouet *et al.*, 2007).

1.3 Cepas empleadas para la producción de vacunas de ADN

La producción de plásmidos para vacunas de ADN se ha abordado desde diversos puntos, tales como el desarrollo de cepas (Okonkowski *et al.*, 2005), medios de cultivo (Okonkowski *et al.*, 2005); (O'Kennedy *et al.*, 2000; Wang, 2001), y estrategias de inducción por temperatura (Carnes *et al.*, 2006a). La cepa seleccionada para la producción debe producir un alto número de copias del plásmido de interés, poseer alta estabilidad segregacional y mantener un alto nivel de superenrollamiento del plásmido. También debe tener una baja tasa de mutación y de intercambio de información genética con el plásmido.

El ADNp con fines terapéuticos es típicamente producido en cepas no patógenas de *E. coli* derivadas de su progenitora *E. coli* K-12, como las cepas DH5 α (Carnes *et al.*, 2006a). La tabla 1 compara los genotipos de la cepa W3110 (derivada directa de K-12 y cepa de la que se derivan las cepas desarrolladas en el presente trabajo) y la cepa DH5 α .

Además de DH5 α , otras cepas como DH5 (Listner *et al.*, 2006), DH1 (Cooke *et al.*, 2004; Rozkov *et al.*, 2004) JM108 (Huber, 2005) SCS1-L (Singer *et al.*, 2009) o DH10B (Lahijani *et al.*, 1996) han sido reportadas para la producción de ADNp, debido a su fondo genético. En la tabla 2 se presentan los genotipos relevantes de las cepas más reportadas para la producción de ADN plasmídico. Como se puede observar en la tabla 1, varias de estas cepas son comerciales. Hasta el momento no existe una cepa que pueda ser catalogada como la mejor productora en general.

Tabla 1. Genotipos para la producción de ADNp en las cepas W3110 y DH5 α

Genotipo	W3110	DH5 α	Efecto del gen suprimido	Referencia
F	(-)	(-)	Requerido para la infección con vectores M13	(Frost <i>et al.</i> , 1994)
λ	(-)	(-)	Permite la infección por fago λ	(Leach and Stahl, 1983)
<i>endA1</i>	(+)	(-)	Previene la degradación de la doble cadena de ADN	(Schoenfeld, 1995)
<i>recA1</i>	(+)	(-)	Desregula el origen de replicación del plásmido. Incrementa la estabilidad segregacional	(Kuzminov, 1999)
<i>deoR</i>	(+)	(-)	Desregula la expresión de genes de síntesis de desoxirribosa	(Casali, 2003)
<i>nupG</i>	(+)	(-)	Desregula la expresión de genes de síntesis de desoxirribosa	(Casali, 2003)

En un estudio reciente se evaluó la producción de ADNp y su superenrollamiento por 17 diferentes cepas de *E. coli* (Yau *et al.*, 2008). Se evaluó la producción de dos plásmidos de diferente tamaño (5.8 y 6.9 kb). Los autores concluyeron que no es posible establecer una correlación directa entre el genotipo de las cepas estudiadas y el rendimiento y

superenrollamiento del ADNp producido. Sin embargo, la cepa DH5 α consistentemente se encontró como una de las mejores productoras. Debido a esto y a que los valores de producción de ADNp más altos reportados se han logrado con esta cepa (Carnes, 2009), la cepa DH5 α será usada para la comparación de los resultados obtenidos en el presente trabajo.

1.3.1 Modificación genética de *E. coli* para incrementar la producción de ADNp.

Hasta el momento, existen pocos ejemplos reportados sobre la modificación genética de *E. coli* para incrementar la cantidad de ADNp producido. Recientemente, el empleo de una cepa BL21 modificada, derivada de *E. coli* B, ha mostrado altos rendimientos como cepa de producción (Phue *et al.*, 2008).

Tabla 2. Cepas comúnmente reportadas para la producción de ADNp.

Cepa	Genotipo	Fuente
B	LE392.23 [F2 <i>lacIqZ::M15 proAB Tn10</i> (Tetr)]	ATCC33849
K-12	F- λ - <i>ilvG- rfb-50 rph-1</i>	ATCC33849
BL21	B λ - <i>dcm ompT hsdS gal</i>	Stratagene
DH1	F- λ - <i>supE44 hsdR17 recA1 gyrA96 relA1 endA1 thi-1</i>	ATCC33849
DH5α	F- <i>_80lacZ_M15_(lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17(rk-mk+) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1</i>	Invitrogen
JM105	F- Δ (<i>lac proAB</i>) <i>lacIq thi repsL endA1 slcB15 hadR4 traD36 proAB</i> Δ (ZM15)	Pharmacia
JM109	<i>e14-(McrA-) recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17(rK-mK+) supE44 relA1-(lac-proAB)</i> [F' <i>traD36 proAB lacIqZ</i> Δ M15]	Promega

Se ha reportado que al emplear una cepa BL21 Δ *recA* se logró una mayor producción de ADNp en comparación con la comercial DH5 α (Phue *et al.*, 2008). En las mismas condiciones, las cepas derivadas de BL21 presentaron menor acumulación de acetato y mejoraron la asimilación de glucosa. Cuando se empleó glicerol como fuente de carbono, el

desempeño de BL21 $\Delta recA$ fue mejor que DH5 α en términos de rendimiento volumétrico. En contraste, no hubo una diferencia notable en el rendimiento específico.

Desde el punto de vista metabólico, la cepa B comparada con la K-12, produce menos acetato, incluso cuando el medio contiene altas concentraciones de glucosa. Este fenómeno se atribuye a que esta cepa tiene más activo el ciclo del glioxilato y consecuentemente las vías de oxidación del acetato están más activas (Phue *et al.*, 2005) (Tabla 2).

Nuestro grupo de trabajo ha reportado que la cepa VH33 (W3110 PTS⁻ GalP⁺) es capaz de producir más del doble de ADNp que su cepa parental (W3110), y debido a su baja producción de acetato, alcanzó altas densidades celulares en modo lote (Soto *et al.*, 2011).

Además de la menor producción de acetato, se ha sugerido que el flujo de carbono hacia la vía de las pentosas fosfato, incrementado en las cepas PTS⁻ (Flores *et al.*, 2002) podría beneficiar la producción de bases nitrogenadas necesarias para la síntesis de ADN. Dicha hipótesis se vio reforzada cuando el flujo de carbono a través de la piruvato cinasa fue reducido al inactivar el gene *pykA* en VH33, lo que condujo a un incremento de casi el doble de la cantidad de ADNp producido por VH33 (Pablos *et al.*, 2011). Sin embargo, los rendimientos alcanzados por VH33 y VH33 *pykA* son todavía inferiores a los alcanzados por cepas comerciales. Por ello, en el presente trabajo se desarrollaron cepas derivadas de VH33 con una mayor capacidad de producción de ADNp y que mantienen las ventajas de proceso de VH33 como la baja producción de acetato y obtener altas densidades celulares en modo lote con medio mínimo suplementado con una fuente de carbono (glucosa).

1.4. Cultivos de alta densidad celular de *Escherichia coli*

Una forma de aumentar la productividad de los bioprocesos es aumentar al máximo la cantidad de biocatalizador (células) en el biorreactor. Los cultivos de alta densidad celular de *E. coli* llegan a concentraciones de biomasa (medida como peso seco) de al menos 40 g/L (aunque no existe una concentración universalmente aceptada para emplear el término de “alta densidad celular”). Para lograr esto, se deben añadir cantidades de glucosa (la fuente usual de carbono) mayores a 80 g/L. En el caso de *E. coli*, la cantidad de glucosa

inicial rara vez excede los 20 g/L de glucosa, principalmente debido a la acumulación de metabolitos de desecho como el acetato, que tiene un impacto negativo en la fisiología microbiana. El acetato es producido por *E. coli* bajo condiciones aerobias debido al sobreflujo metabólico, definido como un desbalance de la vía glicolítica y la vía de los ácidos tricarbónicos (Eiteman y Altman, 2006). Una estrategia típica para evitar el sobreflujo metabólico y obtener altas densidades celulares es la operación del cultivo en modo lote alimentado, el cual consiste en una fase lote de corta duración seguida de una fase de alimentación de sustrato a una tasa tal que se evite el sobreflujo metabólico. La alimentación del sustrato puede manejarse con un perfil constante o con incremento lineal. También puede operarse una tasa de alimentación con incremento exponencial, lo que permite además controlar la velocidad específica de crecimiento de las células y con ello mantener condiciones fisiológicas relativamente definidas (Lara, 2011).

El cultivo por lote alimentado es el modo de operación más usado en la industria. Posee la ventaja de que se evita el sobreflujo metabólico y debido a que la velocidad específica de crecimiento es reducida, la velocidad de consumo de oxígeno se disminuye también, lo que es relevante ya que la velocidad de transferencia de oxígeno de los biorreactores suele ser limitante para la obtención de altas densidades celulares de cultivos aerobios (Knabben *et al.*, 2010; Lara, 2011). Sin embargo, los cultivos por lote alimentado tienen una serie de desventajas: requieren de sistemas de control sofisticados e información fisiológica de la cepa que no siempre están disponibles en etapas tempranas de desarrollo del producto, la operación de cultivos alimentados a escala industrial usualmente resulta en gradientes espaciales de sustrato y oxígeno disuelto debido al mezclado ineficiente a escala industrial (De Anda *et al.*, 2006; Lara, 2011), además de que resultan considerablemente más largos, comparados a cultivos por lote (Lara, 2011).

Por lo tanto, es necesario contar con alternativas a los cultivos alimentados que permitan una operación más sencilla en etapas tempranas de desarrollo de productos. Una alternativa para evitar el sobre flujo metabólico fue reportada por De Anda y col. (2006), consistente en la sustitución del sistema PTS por un sistema alternativo como transporte de glucosa que introduce la glucosa a una velocidad menor. Esta modificación reduce de manera considerable la producción de acetato (De Anda *et al.*, 2006) y ha permitido alcanzar altas densidades celulares en modo lote, como se explicará enseguida.

1.4.1 Sistema natural de transporte de glucosa

El sistema natural mediante el cual *E. coli* transporta glucosa es el sistema fosfotransferasa dependiente de fosfoenolpiruvato o PTS. El PTS es un complejo enzimático cuya principal función es transportar azúcares a través de la membrana fosforilándolos simultáneamente. La energía utilizada para este proceso proviene del enlace fosfato de alta energía del fosfoenolpiruvato (PEP). Este grupo fosfato es transferido, a través de una serie de proteínas citoplasmáticas componentes del PTS, hasta una proteína de membrana encargada de transportar y fosforilar los azúcares del medio, como se muestra en la Figura 5.

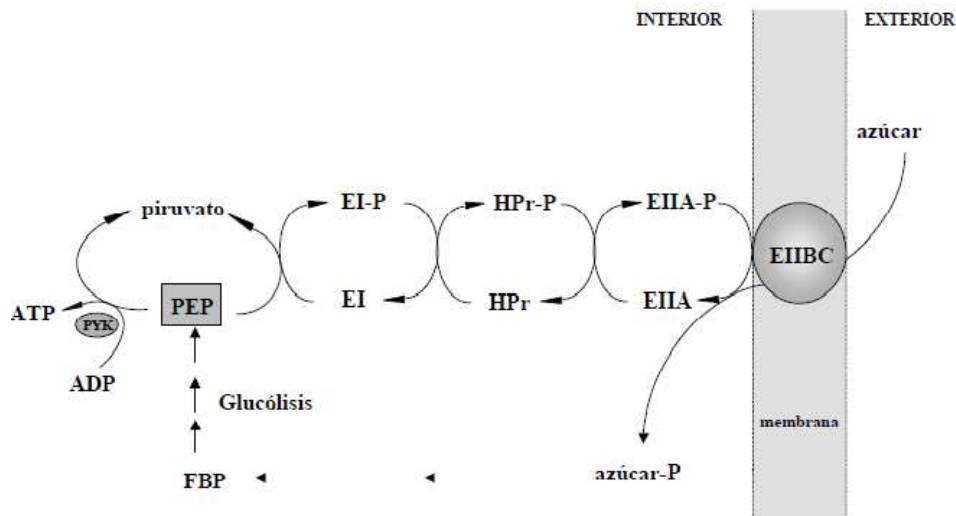


Figura 5. Transporte de azúcares mediado por el sistema fosfotransferasa dependiente de fosfoenolpiruvato (PTS) y su relación con la glucólisis. PYK: piruvato cinasa; FBP fructosa-1,6-bisfosfato (adaptado de Saier y Reizer, 1995).

Las dos primeras proteínas que intervienen en la cadena de fosforilación son los elementos citoplasmáticos del PTS comunes para todos los azúcares: la enzima I (EI) y la HPr (heat-stable protein). La siguiente proteína de la cadena, la enzima II (EII), es específica de cada azúcar. Esta proteína está formada por tres o cuatro dominios (EIIA, EIIB, EIIC y EIID), según la familia de azúcares a la que pertenezca (Reizer *et al.*, 1995). Cuando la enzima II está formada por tres dominios, EIIA y EIIB son los encargados de la transferencia del grupo fosfato mientras que EIIC es una proteína de membrana encargada de la

translocación del azúcar. En el caso de ser cuatro dominios, EIID sería parte de la proteína de membrana mientras que EIIA, EIIB y EIIC mantendrían la misma función. La secuencia de la cascada de fosforilación, que se puede ver en la Figura 5, sería la siguiente: después de la autofosforilación de la enzima I a expensas del PEP, la EI cataliza la fosforilación de HPr en el residuo de histidina en posición 15, dando lugar a P-His-HPr. El grupo fosfato es transferido posteriormente desde el HPr hasta la enzima IIA específica de azúcar que a su vez cede el grupo fosfato a su correspondiente enzima IIB. P-enzima IIB y el dominio transmembrana IIC correspondiente catalizan la entrada y la fosforilación simultánea de los carbohidratos (Postma *et al.*, 1993). Los componentes del PTS específicos para cada azúcar son inducibles por sus propios azúcares o análogos, evitándose así la síntesis innecesaria de enzimas metabólicos si el azúcar no está presente.

Además de la función de transporte, el PTS juega también un papel en la regulación del metabolismo. Dadas sus características, el PTS puede considerarse como un sistema de transducción de señal que percibe las condiciones ambientales, sobre todo en lo referente a la disponibilidad de nutrientes, y las trasmite a la célula dependiendo del estado de fosforilación de sus componentes. Los fenómenos que se desencadenan cuando el PTS se pone en funcionamiento son: la regulación de enzimas y proteínas por fosforilación dependiente del PTS, la represión/activación por catabolito (RC/AC) y la exclusión del inductor (Ramseier *et al.*, 1993; Saier y Ramseier, 1996) .

La fosforilación de HPr en la histidina 15, da lugar a P-His-HPr puede transferir el grupo fosfato hasta otras proteínas no-PTS como la glicerol cinasa (Deutscher *et al.*, 1986) o hacia antiterminadores y activadores transcripcionales que poseen dominios denominados PRD con varios sitios de fosforilación reconocidos por P-His-HPr (Tortosa *et al.*, 1997; Stulke *et al.*, 1998; Lindner *et al.*, 1999). En todos los casos, la fosforilación dependiente de P-His-HPr permite la activación de las proteínas no-PTS.

Además de la fosforilación en el residuo de His-15, la proteína HPr puede también sufrir una fosforilación dependiente de ATP, en el residuo de serina 46, catalizada por el enzima bi-funcional HPr cinasa/fosfatasa (Galinier *et al.*, 1997; Brochu and Vadeboncoeur, 1999; Kravanja *et al.*, 1999; Reizer *et al.*, 1999). Esta fosforilación sólo ha sido demostrada en

bacterias Gram-positivas siendo P-Ser-HPr participe en un mecanismo de represión/activación catabólica (RC/AC), exclusivo de estas bacterias. La mayoría de estos estudios han sido llevados a cabo en *Bacillus subtilis* ya que se poseen mutantes en los diferentes elementos que participan en este fenómeno y sobre todo porque existe un mutante puntual *ptsHI*, que resulta al reemplazar la Ser-46 de HPr por un residuo de alanina, y ha sido utilizado para estudiar *in vivo* el papel de la fosforilación de la Ser-46 en la represión catabólica (Deutscher *et al.*, 1986).

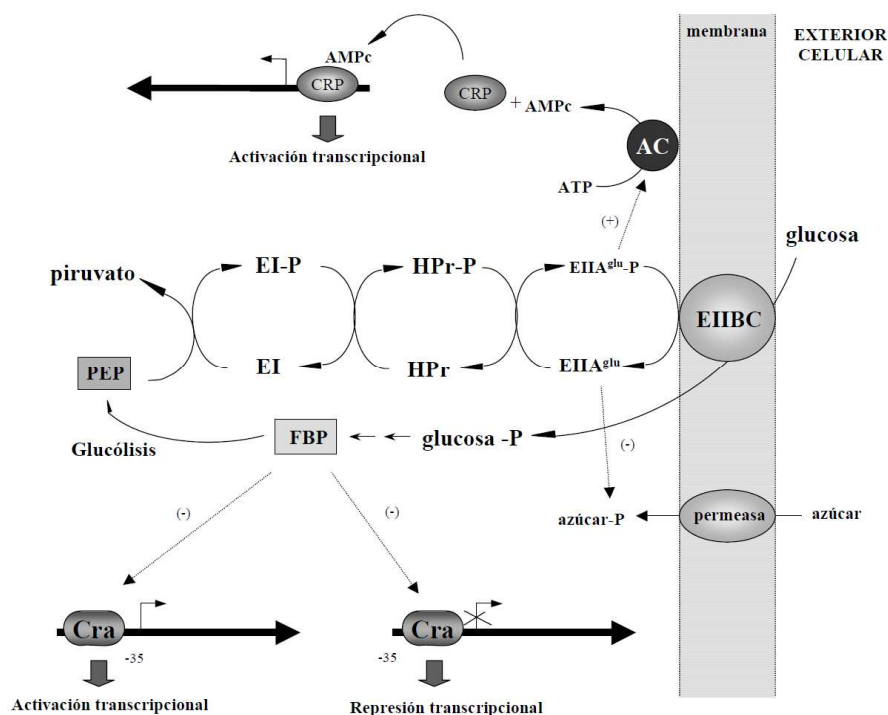


Figura 6. Modelo general de la regulación de la expresión génica por el PTS en gram-negativos. (Adaptado de Kimata *et al.*, 1997).

En *E. coli* creciendo en ausencia de glucosa, se acumula la forma fosforilada de la proteína EIIA^{Gluc} (P-EIIA^{Gluc}) que es capaz de interactuar con la enzima adenilato-ciclasa promoviendo la formación de AMPc (Botsford and Harman, 1992; Reizer *et al.*, 1995). El activador transcripcional CRP (cAMP receptor protein) unido al AMPc, interacciona con los promotores de ciertos operones catabólicos permitiendo el acoplamiento entre la expresión de éstos y la presencia de glucosa en el medio (Figura 6) (Kolb *et al.*, 1993). En este caso, el mecanismo de represión catabólica sería de control positivo ya que es necesaria la unión del complejo CRP-AMPc para activar la transcripción de los genes

reprimidos (Botsford and Harman, 1992; Postma *et al.*, 1993). Además, CRP puede actuar sobre algunos promotores coordinadamente con otros reguladores transcripcionales generales como FNR (que responde al estado redox de la célula) integrando así varias señales (Sawers *et al.*, 1997).

Por otro lado, cuando la célula está transportando glucosa se produce la acumulación de la forma no fosforilada de EIIA^{Glc}. Esta proteína media el fenómeno de exclusión del inductor interaccionando con permeasas de transporte de otras fuentes de carbono inhibiendo su entrada en la célula (Saier and Ramseier, 1996). Esto hace que las fuentes alternativas de carbono permanezcan en el exterior celular evitando que los operones catabólicos correspondientes se induzcan (Kimata *et al.*, 1997).

1.4.2 Modificaciones al sistema de transporte de glucosa en la cepa VH33

Una manera de reducir el sobreflujo metabólico es reducir la velocidad de transporte de glucosa en *E. coli*. Hernández-Montalvo y col. (2003) reportaron la sustitución del PTS (el cuál fue inactivado en el cromosoma al eliminar el gene *ptsH*) por la permeasa de galactosa (GalP) y la glucocinasa (Figura 7). GalP puede transportar, además de galactosa, otros azúcares tales como glucosa (De Anda *et al.*, 2006). Además, GalP es independiente de PEP, de manera que reemplaza la función de la proteína EIIA^{Glc} (mencionada en la sección 1.4.1) en el sistema PTS (Chen *et al.*, 1997). La permeasa de galactosa es un transportador de tipo “simporter”, que acarrea glucosa simultáneamente con un protón al interior de la célula. Esta proteína es codificada por el gene *galP* (Figura7). La velocidad de transporte de glucosa a través de GalP es considerablemente menor (15.6 $\mu\text{g}/\text{min}\cdot\text{g}_{\text{prot}}$) comparada con el PTS (126 $\mu\text{g}/\text{min}\cdot\text{g}_{\text{prot}}$) (Gosset, 2005). Si bien la acumulación de acetato fue eliminada, la velocidad específica de crecimiento fue severamente afectada en mutantes de PTS. De Anda y col. (2006) reportaron la sobreexpresión cromosomal de *galP*, el cuál fue colocado bajo el control del promotor híbrido *trc*, que además adquirió la característica de ser constitutivo al introducirse en una cepa *lacI*. Con esta construcción, la cepa mutante tuvo velocidades de crecimiento cercanas a las de la cepa nativa (W3110), en medio complejo.

Dicha cepa fue utilizada en modo lote empleando hasta 100 g/L de glucosa inicial, lo que permitió alcanzar 52 g/L de biomasa en comparación con los 34 g/L alcanzados por W3110 (Lara *et al.*, 2008). El acetato acumulado bajo estas condiciones por la cepa llegó a tan solo 2 g/L, mientras que W3110 alcanzó casi 14 g/L. Una de los resultados más interesantes es que la cepa nativa cultivada con altas concentraciones de glucosa produjo más de 8 g/L de proteína recombinante (proteína verde fluorescente, GFP), mientras que la cepa nativa produjo solamente 4 g/L.

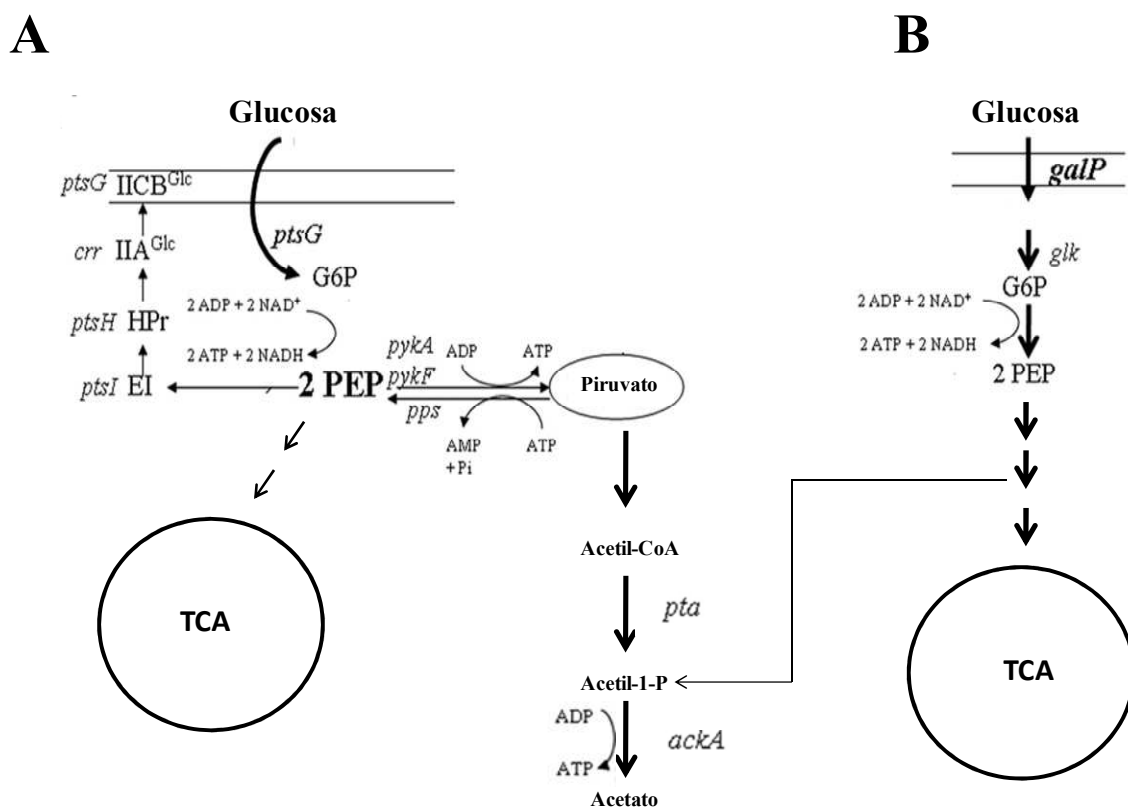


Figura 7. Vía metabólica empleada por *E. coli* en la introducción de glucosa mediante el sistema PTS (sistema fosfotransferasa) y GalP (galactosa permeasa).

La cepa VH33 sin transformar ha sido cultivada en un medio mineral en modo lote empleando hasta 130 g/L de glucosa inicial (Knabben *et al.*, 2010). En este caso, sólo se produjeron 0.4 g/L de acetato. La alta demanda de oxígeno presentada en este tipo de cultivos fue exitosamente cubierta aumentando la solubilidad del oxígeno en el biorreactor operándolo con una sobrepresión de más de 4 bar (Knabben *et al.*, 2010). Otra alternativa para confrontar la alta demanda de oxígeno en cultivos de alta densidad celular en modo

lote de la cepa VH33 ha sido la expresión una hemoglobina heteróloga, con lo que se ha logrado aumentar el rendimiento de biomasa y la velocidad de crecimiento bajo condiciones microaerobias (Pablos *et al.*, 2011). La cepa VH33 también ha sido evaluada para la producción de ADNp en cultivos de alta densidad celular en modo lote. En dichos experimentos, se observó que el contenido específico de ADNp ($Y_{p/x}$) de VH33 fue del doble que la cepa W3110, y la cantidad de ADNp obtenida por VH33 también duplicó la de W3110 (Soto *et al.*, 2011). Se ha planteado como hipótesis para la mayor producción de ADNp por VH33, además de un mayor aprovechamiento del carbono debido a un menor sobreflujo metabólico, el hecho de que cepas PTS⁻ presentan un mayor flujo de carbono hacia la vía de las pentosas fosfato (Flores *et al.*, 2002), lo que en consecuencia puede resultar en mayor disponibilidad de precursores para la síntesis de nucleótidos. Sin embargo, el valor de $Y_{p/x}$ (1.5-2.0 mg/g) de la cepa VH33 (Soto *et al.*, 2011) es pequeño comparado con el obtenible por cepas comerciales como DH5 α , la cual tiene valores de $Y_{p/x}$ de 5.0-8.0 mg/g a una temperatura de 37 °C (Lara *et al.*, 2011). Por lo tanto, a pesar de las claras ventajas de bioproceso de la cepa VH33, es necesario rediseñar el metabolismo de dicha cepa para mejorar el rendimiento de ADNp y hacerla atractiva para aplicaciones comerciales, lo que motivó el desarrollo del presente trabajo. En la siguiente sección se revisarán las implicaciones que sobre la síntesis de ADN y ADNp tienen las mutaciones a los genes de interés para éste trabajo.

1.5. Posibles modificaciones genéticas efectuadas en VH33 para incrementar la producción de ADNp

1.5.1. Endonucleasa A

El producto del gene *endA* es una endonucleasa tipo I, una proteína periplásmica de 12 kDa. Tiene como sustrato el DNA en secuencias internas (*endo*) no metiladas (Keseler *et al.*, 2005; Riley *et al.*, 2006); además tiene unión a DNA de cadena. Esta enzima se une al extremo 3' del enlace fosfodiéster, dejando productos con extremos 5'. En su dominio catalítico una histidina tiene función de base, el cual forma una molécula de agua al cortar

el grupo fosfato del DNA. Su actividad es dependiente de magnesio, lo que se debe a que este ión estabiliza la transición del estado del fosfoanión y forma un protón disponible del grupo 3'-OH (Casali, 2003), como se puede observar en la Figura 8.

La función biológica de las endonucleasas es el reconocimiento de DNA no metilado exógeno, de este modo confiere protección al hospedero ya que su genoma está metilado (Samson y Cairns, 1977). También se ha demostrado que la actividad de esta enzima es dependiente de la fase de crecimiento y se ha reportado que su actividad específica es hasta 300 veces más alta en la fase exponencial que en la fase estacionaria (Rudd, 2000).

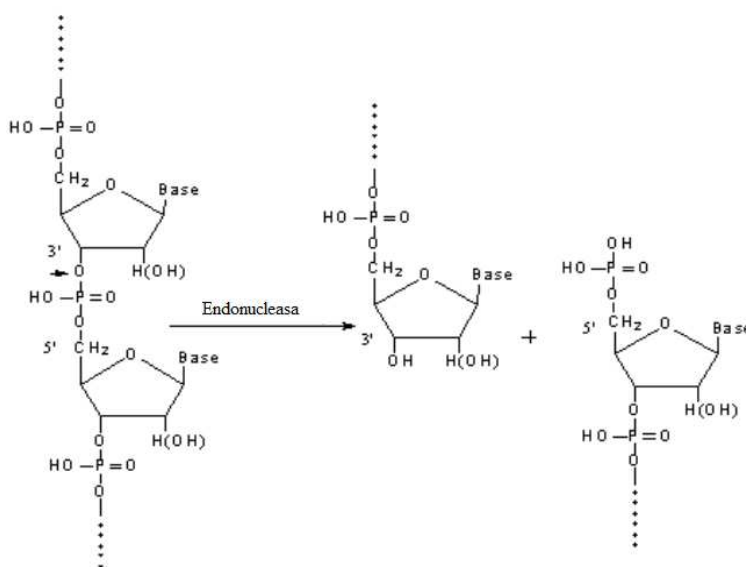


Figura 8. Esquema general de la reacción de la endonucleasa I.

Se ha demostrado que mutantes en *endA* incrementan la calidad del plásmido durante su purificación siempre y cuando la replicación del plásmido no sea por círculo rodante ya que en este tipo de replicación una de sus hebras contiene un extremo 3'-OH que puede ser empleado como sustrato por este tipo de enzimas (Friedhoff *et al.*, 1999; Casali, 2003). En el presente trabajo, se inactivó el gene *endA* con la finalidad de reducir la posible degradación del ADNp en VH33, ya que en principio la endonucleasa I podría identificarlo como ADN ajena al microorganismo y degradarlo.

1.5.2. Propiedades de la proteína regulatoria RecA

La proteína RecA tiene un peso de aproximadamente 38 kDa y está formada por 352 aminoácidos (Roca y Cox, 1997). Esta proteína tiene varias funciones bioquímicas: en la recombinación homóloga al catalizar reacciones de intercambio entre cadenas; al actuar sobre la proteína represora LexA sirve como proteína reguladora para inducir la respuesta SOS ante el daño al ADN; y es requerida para reparar lesiones en el ADN durante la respuesta SOS.

El aspecto fundamental de todas sus actividades es la unión con DNA de la que resulta un filamento nucleoprotéico (Lusetti *et al.*, 2004). El primer paso que es también el más lento, consiste en la unión de un monómero de *RecA* con DNA, generalmente de una sola hebra, aunque eventualmente llega a darse con el de doble hebra (Howard-Flanders *et al.*, 1984). A partir de la unión del primer monómero, rápidamente, de manera cooperativa, se van agregando más monómeros en dirección 5'-3', formando así un filamento helicoidal que en presencia de ATP está extendido, es decir presenta 6 monómeros de *RecA* y 18 nucleótidos por vuelta de hélice que es su forma activa (Egelman y Stasiak, 1986). Cuando no hay ATP el filamento está plegado y es inactivo.

RecA tiene una función primordial en la recombinación homóloga, puesto que ya formado el filamento nucleoprotéico, se encarga de acarrear y aparear a esta hebra de DNA con una secuencia homóloga en la misma o en otra molécula de doble hebra para así realizar el intercambio. Esto es especialmente importante en eventos de reparación de rupturas de doble hebra originadas, ya sea por la acción directa de agentes como la radiación ionizante o bien por el colapso de la horquilla de replicación al encontrar un corte de una hebra en el DNA39. Para llevar a cabo este papel de recombinasa interactúa con la enzima RecBCD que a partir del sitio recombinogénico se genera DNA de cadena sencilla y facilita la unión de los monómeros de *RecA*40. Por otra parte, además de su papel como co-proteasa en la degradación de LexA, *RecA* es también la responsable de la degradación de UmuC necesaria para que pase a su estado activo UmuC' y se una con UmuD para llevar a cabo su función como polimerasa V en la síntesis trans-lesión.

La proteína RecA actúa como regulador positivo y la proteína LexA como represor de la expresión de RecA. LexA es un dímero formado por dos subunidades cada una de 22.7 kDa, unidas a través de sus extremos carboxílicos (Brent y Ptashne, 1981; Schnarr *et al.*, 1985; Thomas y MacPhee, 1987). Gracias a la atracción de los extremos amino, el dímero reconoce y se pega a una secuencia consenso conocido como “caja SOS”, presente en todos los operadores de los genes pertenecientes a esta vía, e impide el reconocimiento por la polimerasa de RNA con lo que bloquea la transcripción. Cuando ocurre alguna lesión o se interrumpe la síntesis de DNA se genera una señal que promueve el paso de la proteína *RecA* al llamado estado activo y donde funciona como co-proteasa al promover la autodegradación de LexA por la ruptura del enlace peptídico Ala 84-Gly 85 que se encuentra a la mitad de la proteína (Fernandez De Henestrosa *et al.*, 2000). En este estado LexA es incapaz de unirse a la caja SOS con lo que se incrementa la expresión de los genes de la respuesta SOS.

Durante el proceso de síntesis semiconservativa de DNA, la horquilla de duplicación puede encontrar lesiones o deformaciones en la estructura helicoidal del DNA que detienen o bloquean a la polimerasa, dando lugar a huecos o regiones de una hebra a los que se une *RecA* para iniciar el proceso que conduce a la activación de SOS (Sassanfar y Roberts, 1990). Los anillos de ciclobutano, también conocidos como dímeros de pirimidina, que resultan de la exposición a la luz ultravioleta son un ejemplo clásico de este tipo de deformaciones en la hélice de DNA. Otro caso es el de las rupturas dobles, en donde es necesaria la intervención de diversas enzimas como helicasas o nucleasas, para que finalmente se forme el sustrato que pueda reconocer *RecA* y se inicie la respuesta SOS (Brena-Valle y Serment-Guerrero, 1998; Tavera, 2003).

Dentro de la célula existen diferentes enzimas que compiten por estas estructuras, ya sea para degradarlas (exonucleasas de una hebra) o bien para estabilizarlas, como es la proteína llamada single-strand binding protein (SSB) (Umezú *et al.*, 1993; Whitby y Lloyd, 1995). En este último caso es necesario que RecA sustituya a SSB para que se puedan reparar dichas estructuras. Se ha demostrado que un complejo formado por las proteínas RecF, RecO y RecR se encarga de retirar a SSB del DNA de cadena sencilla y de facilitar la unión con *RecA* (Umezú *et al.*, 1993; Whitby y Lloyd, 1995).

Hasta el momento se ha establecido que un total de 43 genes son controlados por el dúo LexA/RecA (Courcelle *et al.*, 2001). Dentro de la vía hay genes involucrados tanto en la reparación como en la tolerancia a daño genético. Se encuentran también genes de distintas polimerasas de DNA como Pol II, Pol IV y Pol V, codificadas respectivamente por *polB*, *umuC* y *dinB*, todas ellas responsables de la síntesis trans-lesión, llamada así porque ésta continúa aún ante la presencia de daño en el DNA. Mientras que la tasa de error de Pol II es baja, tanto la de Pol IV como la de Pol V son altas, lo que a su vez explica la razón de que la reparación de DNA, que ambas llevan a cabo durante la respuesta SOS, dé por resultado un aumento en la cantidad de mutaciones (Fuchs *et al.*, 2000; Finkel *et al.*, 2002). La inactivación de *recA* en *E. coli* aumentaría por lo tanto la estabilidad del ADNp y la integridad de su secuencia al impactar sobre las polimerasas de menor fidelidad y al reducir la recombinación de ADN en las cepas (Yau *et al.*, 2008).

Además como se ha discutido anteriormente RecA tiene una actividad de co-proteasa el cual interviene en la regulación de la replicación del plásmido de interés pHN. Como se ha mencionado anteriormente el plásmido modelo pHN está regulado por RNA antisentido, además, tiene un segundo sistema de control de número de copias que depende del represor transcripcional Cop que tiene una doble función (Summers, 1996; Wagner y Brantl, 1998). Así la unión de Cop en forma de dímero regula la transcripción de *rep* lo cual provoca la disminución de la transcripción de su mRNA y, consecuentemente, la del número de copias del plásmido. La segunda función pasaría por prevenir la transcripción convergente entre los RNA con sentido y anti sentido. Por otro lado, en ausencia de Cop se favorece la transcripción a partir del promotor de Rep, el cual daría lugar al RNA antisentido. En presencia de Cop, la represión que ésta genera sobre la transcripción de Rep, permite una disminución de la transcripción del gen *rep* (Figura 9) (Summers, 1996).

La proteína Cop regula de manera negativa la expresión de la proteína Rom, esta última necesaria para estailizar el complejo Rom/Rop, necesario para iniciar la replicación del plásmido. La proteína RecA realice un corte proteolítico sobre la proteína Cop y la vuelva activa. Al realizar la mutante en RecA la expresión de Rom se incrementa, resultando en un incremento en el número de copias del plásmido (Summers, 1996).

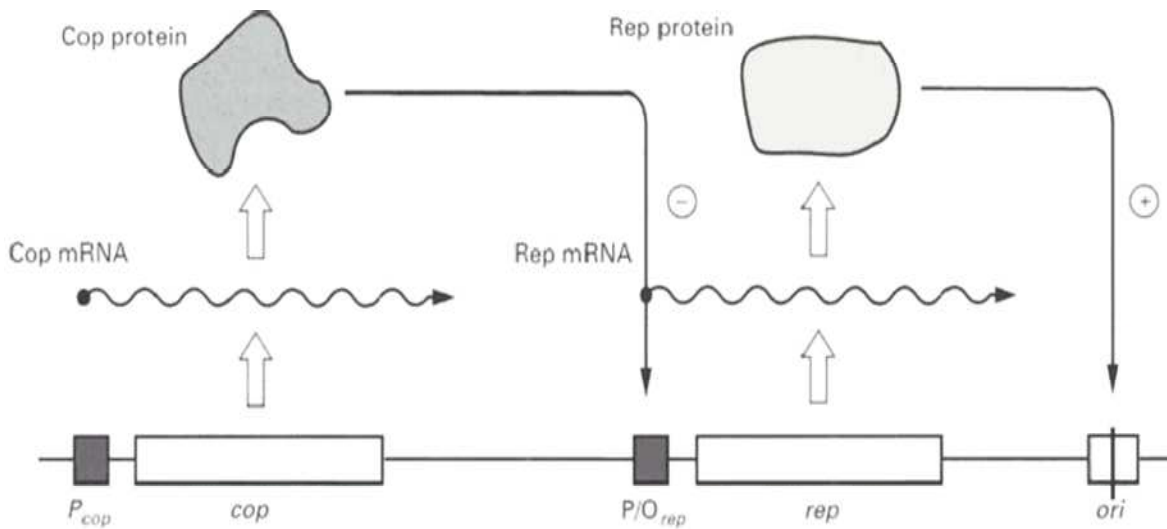


Figura 9. Elementos de la replicación de plásmidos tipo ColE1.

1.5.3. Síntesis de nucleótidos

Síntesis de nucleótidos púricos

El anillo de purina se construye mediante la unión de una serie de precursores. Los átomos de nitrógeno y parte de los átomos de carbono del anillo púrico proceden de la glicina, el aspartato y la glutamina; el tetrahidrofolato y el CO_2 aportan los restantes átomos de carbono. La síntesis se inicia con la activación de la molécula de ribosa-5-fosfato (Ratushny *et al.*, 2006):



La enzima que cataliza esta reacción es la PRPP sintetasa, siendo la misma tanto para los nucleótidos púricos como para los pirimídicos. El paso siguiente, constituye la etapa clave en la síntesis *de novo* de los nucleótidos púricos, y en ella el primer grupo amino se

incorpora al carbono 1 de la pentosa activada, formándose un intermediario denominado 5'-fosforribosilamina (Ratushny *et al.*, 2006):



Las nueve reacciones siguientes realizan la incorporación de los átomos del anillo púrico aportados por los elementos descritos, con gasto energético en forma de ATP, obteniendo el metabolito púrico inosinato (IMP), con una base púrica denominada hipoxantina. A partir de este intermediario, y ya en rutas diferenciadas de dos reacciones, se obtienen el nucleótido AMP o adenilato y el GMP o guanilato (Figura 10).

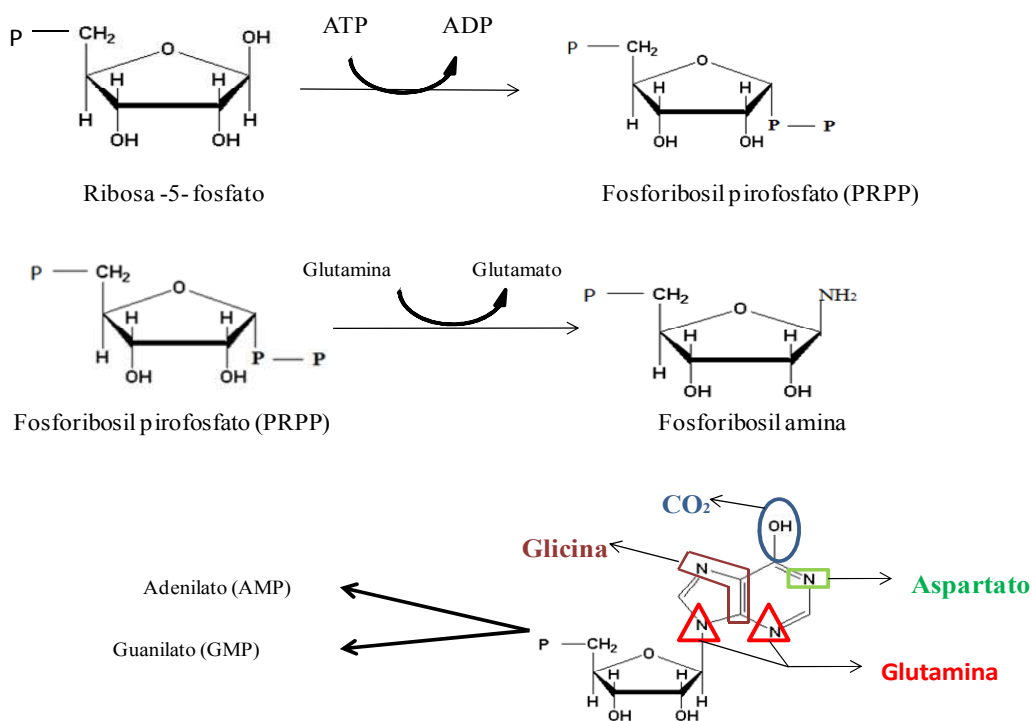


Figura 10. Síntesis de nucleótidos púricos

La síntesis de recuperación es más económica que la síntesis *de novo*, la ruta metabólica utilizada es mucho más simple y muy distinta de la descrita para la síntesis *de novo*. La reacción general que tiene lugar es la siguiente: la base nitrogenada reacciona con la ribosa activada para formar el nucleótido (Ratushny *et al.*, 2006):



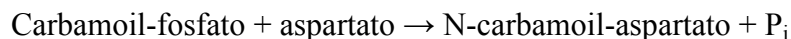
Sin embargo, dada la naturaleza del medio de cultivo empleado en este trabajo, no se espera que la síntesis de recuperación sea relevante.

Síntesis de nucleótidos pirimidícos

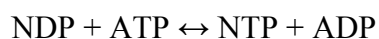
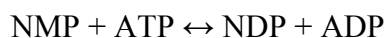
En este tipo de nucleótidos el proceso de ensamblaje se realiza de forma diferente a los púricos, puesto que el anillo de pirimidina se forma en primer lugar, para en un segundo paso unirse al fosforribosilpirofosfato. Las moléculas precursoras para la síntesis de las bases nitrogenadas pirimidínicas son un aminoácido, el aspartato y un metabolito intermediario del ciclo de la urea, el carbamoil-fosfato. El carbamoil-fosfato que sirve para la síntesis pirimidínica se sintetiza en el citoplasma, a diferencia del que se utiliza en la síntesis de urea que se forma en la mitocondria. Cada una de estas reacciones está catalizada por una isozima distinta de la carbamoil-fosfato sintetasa (Ratushny *et al.*, 2006).



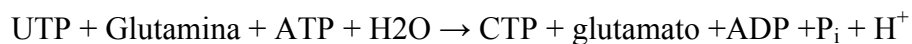
La segunda reacción constituye la etapa clave en la síntesis, y es catalizada por la aspartato transcarbamilasa,



Este producto pasa por una deshidratación que permite su ciclación y una oxidación para formar el anillo inicial, o primario, de pirimidina denominado orotato. La incorporación de fosforribosilpirofosfato da lugar a la formación del nucleótido pirimidínico uridilato o UMP. Los nucleótidos activados, con dos o tres grupos fosfato, se obtienen a partir de los nucleótidos monofosfatados por incorporación de grupos fosfato cedidos por el ATP. Estas reacciones son catalizadas por un grupo de enzimas denominadas nucleótido monofosfato cinasas.



La síntesis del nucleótido pirimidínico de citosina se realiza a partir de UTP, por acción de la citidilato sintetasa (Huppe *et al.*, 1993):



Síntesis de desoxirribonucleótidos

Los desoxirribonucleótidos se sintetizan a partir de los correspondientes ribonucleótidos, mediante la reducción del carbono 2' de la molécula de ribosa para dar 2'-desoxirribosa (Figura 11). La enzima que cataliza esta reacción es la ribonucleótido reductasa, que utiliza como sustratos todos los ribonucleótidos tanto en forma di como trifosfatada. La reacción que tiene lugar es (Ratushny *et al.*, 2006):

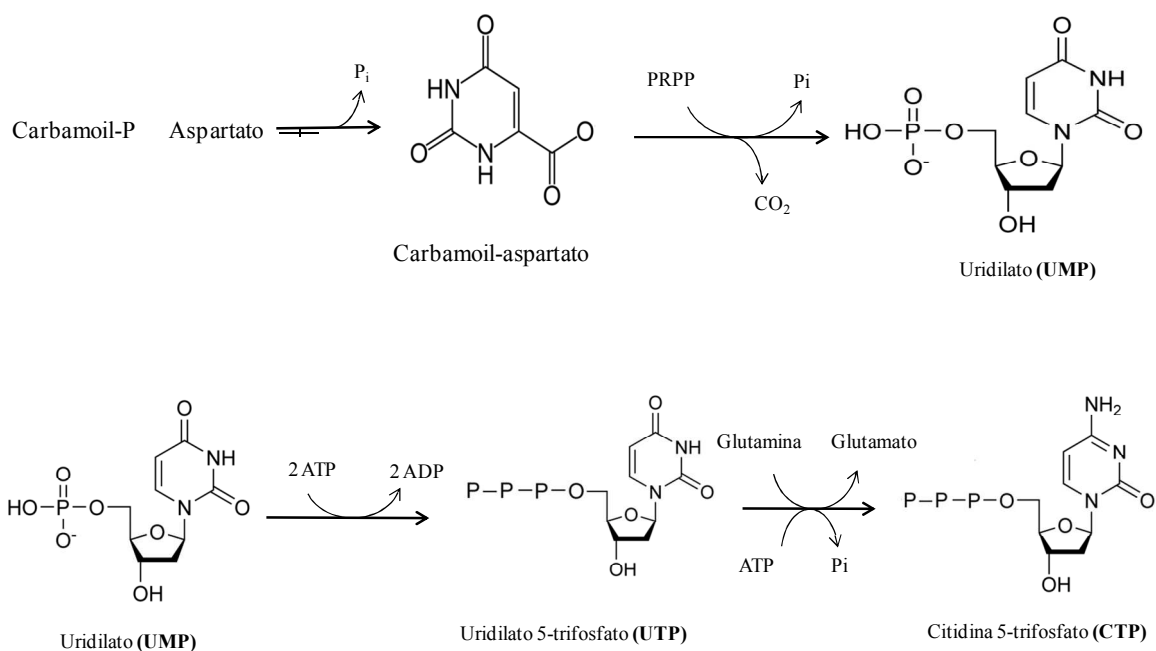
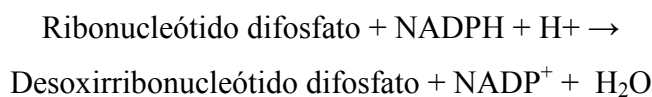


Figura 11. Esquema general de síntesis de desoxirribonucleótidos.

En la formación de los desoxirribonucleótidos, aparece el desoxiuridilarato (dUMP) que no es un componente del ADN; para convertir este compuesto en el desoxirribonucleótido que tenga de base pirimidínica timina se lleva a cabo una reacción catalizada por la timidilato sintasa, que metila el UMP obteniéndose TMP, utilizando como donador de grupos metilo al tetrahidrofolato. La biosíntesis de nucleótidos púricos y pirimidínicos está regulada mediante mecanismos de retroinhibición por producto final. La formación de los nucleótidos hace que aumente su concentración en la célula y provoca la disminución de la actividad de las enzimas reguladoras o alostéricas, que están situadas en el inicio de las rutas sintéticas (Ratushny *et al.*, 2006).

1.5.4. Transporte de nucleótidos (*nupG*)

En *E. coli* existen dos sistemas de transporte de nucleótidos. Los sistemas descritos son NupG y NupC pertenecientes a la familia de MFS (Major Facilitator Superfamily). Los dos sistemas difieren en la especificidad, el sistema NupC transporta guanosina y deoxiguanosina mientras que el sistema NupG transporta todos los nucleótidos (Hansen *et al.*, 1987).

La expresión de NupG está regulada por las proteínas represoras CytR y DeoR además de ser activada por cAMP receptor del sistema de represión catabólica (PRC). Se ha demostrado que la inactivación de NupG incrementa la síntesis de nucleótidos empleados principalmente como precursores para fármacos virales sugiriendo que posiblemente este participando en un sistema de transducción de señales ó un sistema de dos componentes (Munch-Petersen, 1983).

1.5.3. Mutación en *deoR*

DeoR es una proteína que regula de manera negativa la expresión de NupG además de regular negativamente el operón *deo*. Este operón codifica para cuatro enzimas

involucradas en la ruta de síntesis de nucleótidos, están consisten en: timina fosforilasa, purina fosforilasa, fosfopentomutasa y deoxyriboaldolasa, codificadas por *deoA*, *deoD*, *deoB* y *deoC*, respectivamente. La iniciación de la transcripción de este operón empieza 600 bases río abajo, denominada región reguladora, esta contiene tres sitios de unión a *deoR* (Mortensen *et al.*, 1989; Zeng y Saxild, 1999). Por lo tanto, se espera que al inactivar el gene *deoR*, se contribuya a desregular la síntesis de nucleótidos y con ello aumentar la disponibilidad de bloques de construcción de ADN, lo que puede repercutir positivamente en el rendimiento específico de ADNp producido por VH33.

1.6. Hipótesis

La inactivación de los genes *enda*, *recA*, *nupG* y *deoR* en una cepa de *Escherichia coli* PTS⁻ GalP⁺ (VH33) incrementará el rendimiento específico de ADNp y permitirá obtener cantidades de ADNp superiores a las previamente reportadas en cultivos de alta densidad celular en modo lote, sin afectar el bajo sobreflujo metabólico de la cepa VH33.

1.7. Objetivo General

Modificar genéticamente la cepa *Escherichia coli* PTS⁻ GalP⁺ (VH33) para incrementar el rendimiento específico de ADN plasmídico y evaluar su comportamiento de la cepa desarrollada en cultivos de alta densidad celular en modo lote.

1.7.1. Objetivos específicos

- Inactivar los genes *enda*, *recA*, *nupG*, *deoR*, en la cepa VH33.
- Realizar combinaciones de inactivaciones de los genes *enda*, *recA*, *nupG* y *deoR* en VH33.
- Evaluar el desempeño de las cepas modificadas en matraz agitado y seleccionar la mejor combinación para incrementar el rendimiento de ADNp.
- Realizar cultivos de baja densidad celular en modo lote empleando 5 g/L de glucosa inicial, para cotejar los parámetros cinéticos y estequiométricos con respecto a los resultados en cultivos de matraz agitado
- Realizar cultivos de alta densidad celular en modo lote empleando 100 g/L de glucosa inicial para evaluar su comportamiento bajo condiciones de proceso y comparar contra una cepa comercial bajo las mismas condiciones.

2. Material y métodos

2.1. Material biológico

Las cepas de *E. coli* empleadas para la clonación y la producción de ADNp en este trabajo, son descritas en la tabla 3.

Tabla 3. Material biológico

Cepa	Genotipo	Fuente
W3110	F ⁻ λ ⁻ rph-1 INV(rrnD, rrnE)	Donada por Dr. Guillermo Gosset
W3110 <i>recA</i> ⁻	F ⁻ λ ⁻ rph-1 INV(rrnD, rrnE) <i>recA</i>	Este trabajo
W3110 <i>endA</i> ⁻	F ⁻ λ ⁻ rph-1 INV(rrnD, rrnE) <i>endA</i>	Este trabajo
W3110 <i>nupG</i> ⁻	F ⁻ λ ⁻ rph-1 INV(rrnD, rrnE) <i>nupG</i>	Este trabajo
W3110 <i>deoR</i> ⁻	F ⁻ λ ⁻ rph-1 INV(rrnD, rrnE) <i>deoR</i>	Este trabajo
DH5α	Δ(<i>argF-lacZ</i>) Δ(<i>lacZ</i>)M15 <i>gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17</i>	Colección del laboratorio
VH33	W3110 PTS ⁻ GalP ⁺	Donada por Dr. Guillermo Gosset
VH33 <i>recA</i> ⁻	W3110 PTS ⁻ GalP ⁺ <i>recA</i> ⁻	Este trabajo
VH33 <i>endA</i> ⁻	W3110 PTS ⁻ GalP ⁺ <i>endA</i> ⁻	Este trabajo
VH33 <i>recA</i> ⁻ <i>endA</i> ⁻	W3110 PTS ⁻ GalP ⁺ <i>recA</i> ⁻	Este trabajo
VH33 <i>nupG</i> ⁻	W3110 PTS ⁻ GalP ⁺ <i>nupG</i> ⁻	Este trabajo
VH33 <i>deoR</i> ⁻	W3110 PTS ⁻ GalP ⁺ <i>deoR</i> ⁻	Este trabajo
VH33 <i>nupG</i> ⁻ <i>deoR</i> ⁻	W3110 PTS ⁻ GalP ⁺ <i>nupG</i> ⁻ <i>deoR</i> ⁻	Este trabajo
VH33 <i>recA</i> ⁻ <i>nupG</i> ⁻	W3110 PTS ⁻ GalP ⁺ <i>recA</i> ⁻ <i>nupG</i> ⁻	Este trabajo
VH33 <i>recA</i> ⁻ <i>deoR</i> ⁻	W3110 PTS ⁻ GalP ⁺ <i>recA</i> ⁻ <i>deoR</i> ⁻	Este trabajo
VH33 <i>recA</i> ⁻ <i>deoR</i> ⁻ <i>nupG</i> ⁻	W3110 PTS ⁻ GalP ⁺ <i>recA</i> ⁻ <i>deoR</i> ⁻ <i>nupG</i> ⁻	Este trabajo

2.2. Plásmido pHN, modelo de vacuna de ADN

En este trabajo se empleó el plásmido pcDNA HN176-MuV (6.1 Kb) el cual está basado en el plásmido pcDNA3.1" de Invitrogen y tiene insertado un gen que codifica para un antígeno que genera respuesta inmune contra la parotiditis (Hemaglutinin Neuraminidasa-HN-) (Herrera *et al.*, 2010). Tiene un promotor CMV basado en la secuencia de citomegalovirus humano, permite la expresión la proteína recombinante en mamíferos (Williams *et al.*, 2009). Además un promotor T7 que permite la transcripción *in vitro* en el sentido y la secuenciación del inserto. Por otro lado contiene un promotor en el sitio de origen SV40 que permite la expresión de resistencia a neomicina y la replicación episomal expresando el antígeno T SV40 permitiendo la resistencia a neomicina esto último permite la selección de células transfectantes estables de mamífero (Postel, 1985). También contiene una señal SV40 de poliadenilación el cual permite la terminación eficiente y la poliadenilacion del mRNA. La secuencia de origen pUC permite la replicación de alto número de copias en *E. coli*. Por último para mantener la selección en cepas bacterianas posee un gen de resistencia a ampicilina (β -lactamasa) (Figura 14).

El plásmido pcDNA HN176-MuV (denominado en este trabajo como pHN) se empleó como modelo de vacuna de ADN y fue amablemente donado por la Dra. Blanca L. Barrón Castillo de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional.

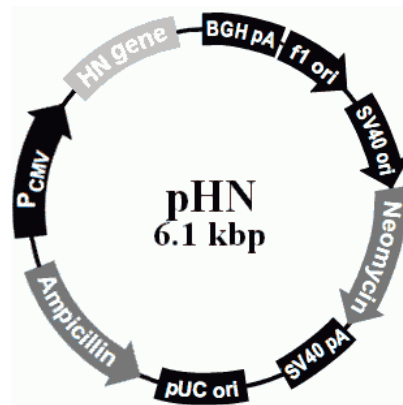


Figura 12. Mapa simplificado del plásmido pHN.

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

A continuación se describen las características de los plásmidos empleados en este trabajo.

2.3.1. Plásmido pKD32

Plásmido molde utilizado para generar por PCR el fragmento P1-P4. Posee un gen de resistencia a cloramfenicol flanqueado por sitios FRT (FLP “recognition target”), los cuales serán reconocidos por la FLP recombinasa para la posterior escisión del cromosoma bacteriano (Datsenko y Wanner, 2000) (Figura 12).

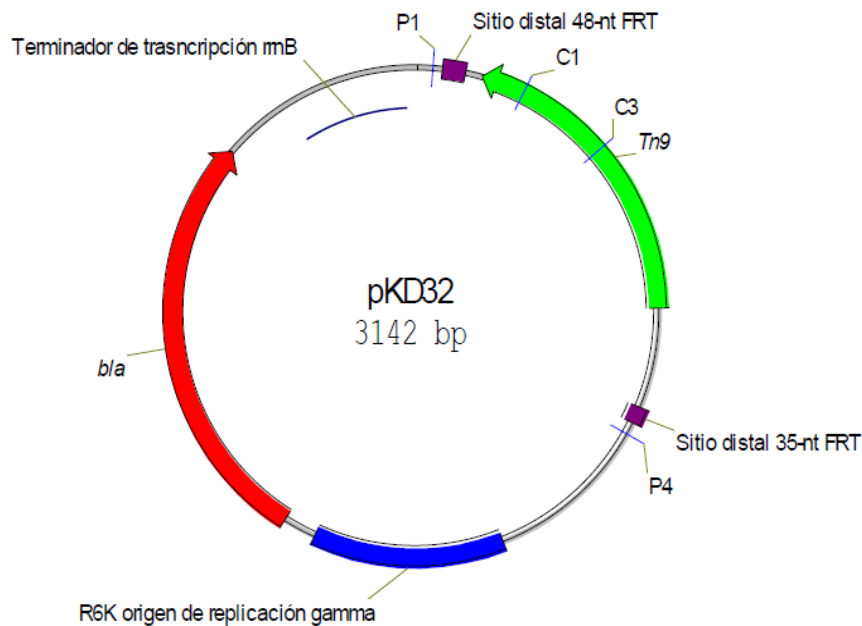


Figura 13. Mapa simplificado del plásmido pKD32 (detalles en el texto).

2.3.2. Plásmido pKD46 (Red helper plasmid) y sistema Red.

Este plásmido es de bajo número de copias (Datsenko y Wanner, 2000), además se caracteriza por poseer un replicón sensible a temperatura (para permitir su posterior eliminación de las etapas transformantes) y tener clonado el sistema Red bajo el control de un promotor inducible por arabinosa (P_{araB}), de forma de prevenir recombinación inespecífica. El sistema Red incluye tres genes: γ , β y exo cuyos productos son *Gamma*, *Beta* y *Exo* respectivamente. *Gam* inhibe la exonucleasa V del complejo de recombinación RecBCD del hospedero, de forma que *Beta* y *Exo* puedan acceder a los extremos del ADN para promover la recombinación. Además, este sistema incluye el terminador nativo *tl3* río abajo de exo (Figura 13).

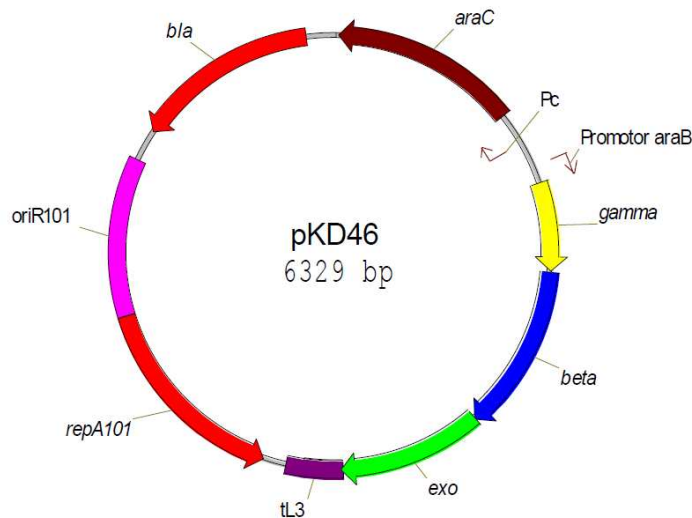


Figura 14. Mapa simplificado del plásmido pKD46 (detalles en el texto).

2.3.3. Plásmido pCP20 (FLP “helper plasmid”)

Plásmido resistente a ampicilina y cloramfenicol (Amp-Cm) construido por Cherepanov (Cherepanov y Wackernagel, 1995). Este plásmido posee un replicón sensible a temperatura y un gene que codifica la enzima FLP recombinasa bajo un promotor inducible por temperatura. La expresión de esta enzima nos permite escindir el gen de resistencia en el cromosoma bacteriano, por la acción de la enzima FLP, dejando una pequeña secuencia de nucleótidos y sin efectos polares de los genes río abajo.

2.4. Técnicas moleculares

En este trabajo emplearon algunas técnicas de la tecnología de ADN recombinante. Los protocolos se encuentran descritos en manuales de laboratorio (Orkin, 1990) y en las instrucciones de las casas comerciales de kits específicos. A continuación se exponen las generalidades de los procedimientos y métodos empleados.

2.4.1. Extracción de ADN plasmídico

En el presente trabajo se empleó un kit comercial QIAquick de QIAGEN que se fundamenta en la lisis alcalina de células bacterianas, seguido de una adsorción de ADN plasmídico a la sílica en presencia de una alta concentración de sales. El procedimiento consta de dos etapas:

a) Lisis alcalina de las bacterias

Las bacterias son lisadas bajo condiciones alcalinas con una solución que posee dodecil sulfato sódico (SDS) y NaOH en presencia de RNasa A. El SDS solubiliza los fosfolípidos y componentes protéicos de la membrana celular, conduciendo a la lisis y liberación de los

componentes celulares, mientras que las condiciones alcalinas desnaturalizan el cromosoma y los plásmidos, así como las proteínas. El tiempo de lisis optimizado permite una liberación máxima del ADN plasmídico sin liberar ADN cromosómico. El lisado es subsecuentemente neutralizado con una solución de acetato de potasio y ajustado a condiciones de unión de alta fuerza iónica. En este paso, el ADN plasmídico vuelve a renaturalizarse rápidamente y permanece en solución, mientras que la mayor parte del ADN cromosómico, restos celulares y proteínas precipitan junto con el SDS, el cual forma una sal con el potasio (Birnboim, 1988).

b) Adsorción y elución del ADN plasmídico

Después de la lisis alcalina, los lisados crudos centrifugados son cargados a tubos-filtros conteniendo membranas de sílica gel que permiten la adsorción selectiva del ADN plasmídico a una elevada concentración de sales. Los componentes celulares desnaturalizados son eliminados por filtración, mientras que el ADN plasmídico es posteriormente recuperado eluyéndose con una solución tampón baja en sales (Orkin, 1990; Li *et al.*, 2007).

2.4.2. Electroforesis de ADN en gel de agarosa

La electroforesis en gel de agarosa se basa en la separación de fragmentos de ADN sometidos a un campo eléctrico en presencia de una malla (polímero de agarosa) que dificulta la migración hacia el ánodo.

La técnica de separación de moléculas o fragmentos por electroforesis en geles de agarosa permite no solo identificar fragmentos de ADN, sino obtenerlos para posteriores operaciones. La separación de ADN depende de varios parámetros, tales como la longitud de ADN, su conformación estructural, el tamaño del poro del gel y la intensidad de la corriente aplicada. La carga neta negativa del ADN permite su migración en un campo

eléctrico hacia el ánodo a una velocidad inversamente proporcional al logaritmo de su peso molecular. Así, mientras más pequeña es una molécula de ADN más fácilmente migrará a través del gel. La separación simultánea de un marcador de peso molecular conocido permite establecer, por comparación del patrón de bandas, el peso molecular de una muestra (Orkin, 1990).

2.4.3. Extracción de bandas de ADN de los geles de agarosa

Para recuperar un fragmento de ADN separado electroforéticamente, se ha empleado el kit comercial QIAquick Gel Extraction de QIAGEN. Esta técnica posee 4 etapas, las cuales incluyen (Margulies y Kaguni, 1996; Ahmed *et al.*, 2005).

- Solubilizar el fragmento del gel que contiene el ADN de interés en una solución tampón.
- Filtración y eliminación de contaminantes. En esta etapa, el ADN es absorbido a la membrana de sílica en presencia de alta concentración de sales, mientras que el resto de los contaminantes pasan a través de la columna.
- Lavado de la columna para eliminar eficientemente las impurezas como: sales, nucleótidos sin incorporar, agarosa, bromuro de etidio, detergentes (DMSO) estos últimos no se adhieren a la membrana, pasando a través de la membrana.
- Elución de ADN con una solución tampón Tris-HCl 10 mM a pH8.5

2.4.4. Transformación por electroporación

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

Debido a que la técnica descrita por Datsenko y Wanner (2000) requiere hacer transformación del plásmido pKD46 y recombinación de DNA lineal en un solo paso, número de colonias es generalmente bajo. Por ello se recomienda obtener una densidad óptica de 3.0 a 5.0 unidades.

Las cepas a modificar se transformaron con el plásmido pKD46 por el método químico de CaCl_2 y se sembraron en medio LB con ampicilina. A partir de una colonia se sembró en medio SOB y L-arabinosa (1mM) incubándose a 30°C hasta una $D.O_{600\text{nm}}$ entre 0.6-1.0. Posteriormente se concentraron por centrifugación y se lavaron 4 veces con agua MiliQ fría estéril, utilizándose inmediatamente para la transformación.

La electroporación se realiza empleando 25 μL del producto de PCR (aproximadamente 1.5– 2 μg DNA totales) y 100 μL de la cepa a transformar, previamente transformadas con el plásmido pKD46. Las condiciones de operación fueron: $V=2500$, $C= 25 \mu\text{F}$, $R=200 \Omega$, $t=5\text{ms}$. A las células electroporadas se añade 1 mL de LB inmediatamente se incuban 1 h a 37 °C con agitación. Se siembran en placas LB con cloramfenicol y se seleccionan las transformantes Cm^r .

2.4.5 Transformación de células competentes obtenidas mediante tratamiento con CaCl_2

El método de transformación bacteriana por el método de CaCl_2 tiene como fundamento al neutralizar las cargas negativas de la columna de fosfatos del ADN y los fosfolípidos de la membrana celular, permitiendo así que ingrese el plásmido a la célula (Panja *et al.*, 2006).

Obtención de células competentes de *E. coli*: a partir de un inóculo en medio LB se realizó una dilución 1:50 en medio de cultivo fresco, y se incubó a 37 °C hasta fase exponencial temprana, es decir, hasta una absorbancia de 0.2 - 0.3 a 600 nm. Se incubó un volumen de cultivo 10 min en hielo, y se centrifugó a 3000 x g durante 10 min y a una temperatura de 4 °C. A continuación se resuspendieron las células en la mitad de volumen de CaCl_2 50 mM

frío, y se centrifugaron de nuevo en las mismas condiciones pero sólo durante 5 minutos. Finalmente se resuspendieron en un volumen de CaCl₂ que representaba 1/20 parte del volumen inicial. Esta suspensión se incubó en hielo desde un mínimo de 30 min hasta un máximo de 24 h antes de la transformación (Cohen *et al.*, 1972).

2.5. Transducción con el bacteriófago P1_{vir}

La transducción es el método de recombinación genética por el cual se introduce un ácido nucléico exógeno en una célula por medio de un vector viral. El bacteriófago P1 HT int4 (Schmiege, 1972) se utilizó en este trabajo para introducir mutaciones en las cepas por recombinación homóloga. Este fago P1 presenta dos mutaciones, HT e *int*, que le confieren respectivamente una elevada frecuencia de transducción, y una deficiencia en la integración del DNA del bacteriófago en el cromosoma de la cepa receptora, evitando así la lisogenia.

2.5.1 Obtención de lisados

Se incubaron 10⁷ partículas del fago P1_{vir} de un lisado preexistente, con 1 mL de un cultivo en fase exponencial de la cepa dadora en medio LB suplementado con CaCl₂ 5 mM. A continuación se incubó la mezcla durante 20 min a 37 °C sin agitación para permitir la adsorción del bacteriófago a la célula. Después del tiempo de incubación, se añadía 3 mL de agar blando (suplementado con CaCl₂ 2 mM y glucosa 0.1%) y se realizó estriado por agotamiento sobre placas de LB-agar (con CaCl₂ 2 mM y glucosa 0.1%), finalmente se dejó solidificar el agar y se incubaron las placas de 16-24 h a 37 °C.

La capa de agar-blando fue recogida en un tubo de centrifuga. Para ello, se añadieron 4 mL de LB y se barrió la placa con un asa de vidrio, añadiendo a continuación unas gotas de cloroformo y dejando la mezcla 1 h a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo se separaron los restos celulares por centrifugación (3000 rpm por 30 min). Al sobrenadante

obtenido, correspondiente al lisado fágico, se le añadieron unas gotas de cloroformo para conservarlo a 4 °C y evitar una posible contaminación bacteriana.

2.5.2. Titulación de lisados

A partir de un cultivo de la cepa receptora crecido en medio LB suplementado con CaCl₂ 2 mM y se realizó un inóculo con una dilución de 1:50, que se dejó crecer hasta 0.6 D.O. A continuación se mezclaron 100 µL de células más 100 µL de diferentes diluciones del fago en LB (10⁻², 10⁻⁴, 10⁻⁶, 10⁻⁸) y se incubaron 15 min a 37 °C sin agitación. Posteriormente se añadieron 4 mL de agar-blando (suplementado con CaCl₂ 2 mM, glucosa 0.1 %) y se vertió sobre placas de LB-agar (suplementadas con CaCl₂ 2 mM, glucosa 0.1 %). Las placas se incubaron a 37 °C durante 18-24 h (sin invertir). La titulación del lisado se calculó a partir del recuento del número de calvas de lisis.

2.5.3. Transducción

A partir de un cultivo en fase estacionaria de la cepa receptora, se realizó un inóculo con una dilución de 1:50, en LB y se dejó crecer hasta mitad de la fase exponencial. A continuación se recogieron las células por centrifugación (3,000 rpm por 10 min), se resuspendieron en 3 mL de tampón MC y se realizaron mezclas de 1 mL de células, más diferentes concentraciones de lisado fágico obtenido sobre la cepa adecuada, para obtener varias multiplicidades de infección (generalmente 100 µL, 10 µL y 1 µL). Las mezclas se incubaron a 37 °C sin agitación durante 15 min para permitir la adsorción del fago y luego se añadieron 0.2 mL de tampón citrato 0.1 M para inhibir la readsorción del bacteriófago. Finalmente se plaquearon 100 µL sobre placas con las resistencias adecuadas para la selección de las células transductantes y se incubaron durante 18 - 24 h a 37 °C.

2.6. Técnicas de mutagénesis bacteriana

2.6.1. Inactivación de genes cromosómicos utilizando fragmentos de PCR

Con esta metodología descrita por Datsenko y Wanner (2000) es posible reemplazar una secuencia cromosómica por un gen de resistencia a antibiótico, generado por PCR, utilizando oligonucleótidos con extensiones homólogas correspondientes al gen a inactivar. Estas extensiones permitirán la recombinación del producto de PCR mediante la recombinasa Red del fago λ en las regiones flanqueantes al gen. Después de la selección de mutantes, la resistencia al antibiótico puede ser eliminada utilizando un plásmido auxiliar que expresa la recombinasa FLP, actuando sobre la repetición directa FRT adyacente al gen de la resistencia.

2.6.2. Generación del fragmento P1-P4 por PCR

El gene de resistencia a Cloramfenicol (Cm) del plásmido pKD3 se amplificó utilizando oligonucleótidos que en su extremo 5' contienen secuencias homólogas (de 40 nucleótidos) al gen objeto de mutación (H1 y H2). El diseño de H1 y H2 se realizo a partir de los alineamientos en la base de datos del Instituto Pasteur, se extrajeron secuencias con longitud mínima de 40 nucleótidos con un contenido mínimo 50 % de GC, de los genes de interés como se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4. Secuencias de los oligonucleótidos empleados para la inactivación cromosomal.

Gen	Oligo-nucleótido	Secuencia 5'-3'	nt	%GC
<i>recA</i>	<i>recA1</i>	GTTGCGGCCTAAAGAGACATCTACTCTCGCTTCCGCATCG-ATGGGAATTAGCCATGGTCC	60	53
<i>recA</i>	<i>recA2</i>	CAACAGAACATATTGACTATCCGGTATTACCCGGCATGAC-TGTAGGCTGGAGCTGCTTCG	60	50
<i>endA</i>	<i>endA1</i>	AAGCGCATTGCACATACGGGTTATGATTGCCCTGCACCTT-CATGGGAATTAGCCATGGTC	60	51
<i>endA</i>	<i>endA2</i>	GGCCCGCGTTGGCCGAAGGTATCAATAGTTTTTCTCAGG-TGTAGGCTGGAGCTGCTTCG	60	56
<i>nupG</i>	<i>nupG1</i>	ATGTGCTTTTTCAAACACTCATCCGCATCACGATGTGAGG-TGTAGGCTGGAGCTGCTTCG	60	55
<i>nupG</i>	<i>nupG2</i>	TTGAACATCGCCATGAACGCGAAGGCCAGAACCACGGAGT-ATGGGAATTAGCCATGGTCC	60	52
<i>deoR</i>	<i>deoR1</i>	CACGTCGCGAAGAGCGTATCGGGCAGCTGCTGCAAGAATT-TGTAGGCTGGAGCTGCTTCG	60	56
<i>deoR</i>	<i>deoR2</i>	TTTACTGTGGTCGACAACCAGCACATGCTTTTGCGCCATC-ATGGGAATTAGCCATGGTCC	60	53

Las propiedades termodinámicas de los oligonucleótidos diseñados fueron calculadas con Gene Runner v3.05 (Hastings Software, NY) y se aceptaron solo aquellas cuya T_m , según la fórmula termodinámica estuviera en el rango de 44 a 90 °C y que no formaran estructuras secundarias con T_m superior a 37 °C, en el extremo 3' de los oligonucleótidos H1 y H2 se les añadieron las secuencia correspondiente a P1 y P2 el cual hibrida con el plásmido pKD3 (de 20 nucleótidos), la secuencia de P1 y P2 es la reportada por Datsenko y Wanner (2000).

2.6.3 Transformación de cepas con el fragmento P1-P4 e inserción en el cromosoma bacteriano

Debido a que esta técnica requiere ejecutar una electroporación y recombinación de ADN lineal en un solo paso, el número de colonias transformadas es generalmente bajo. Por ello, se recomienda obtener una alta densidad de células competentes.

Las cepas competentes se transformaron con el plásmido pKD46 y se sembraron en placas con medio LB con ampicilina. Se sembró una colonia en medio SOB con ampicilina y L-arabinosa 1 mM, incubándolas hasta una absorbancia a 600 nm de 0.6 - 1.0. Posteriormente se concentraron por centrifugación y se lavaron con agua fría estéril, empleándolas inmediatamente para la transformación.

La electroporación se realizó empleando 10 µL del producto de PCR P1-P4 (aproximadamente 50-60 µg/µL de DNA) con 60 µL de células. A las células electroporadas se añade 1 mL de LB inmediatamente y se incuban 1 h a 37 °C con agitación. Se sembraron en placas de LB con cloramfenicol (Cm) y se seleccionan las transformantes (Cm^r).

Los oligonucleótidos empleados para la comprobación de la inserción del fragmento P1-P4 en el cromosoma se muestran en la Tabla (5). Para el diseño de estos oligonucleótidos se tomo en consideración que estuviera mínimo 500 pb río arriba y río abajo de la secuencia H1 y H2, para obtener amplicones específicos de la comprobación del inserto y posterior su eliminación del cromosoma.

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

Gen	Oligo-nucleótido	Secuencia 5'-3'	nt	%GC
<i>recA</i>	<i>recA1</i>	ATGGGAATTAGCCATGGTCC	20	53
<i>recA</i>	<i>recA2</i>	TGTAGGCTGGAGCTGCTTCG	20	52
<i>endA</i>	<i>endA1</i>	CGTGGCTGACCAGCTCATCT	20	51
<i>endA</i>	<i>endA2</i>	TGCAGGTCGCTTCACGACTC	20	51
<i>nupG</i>	<i>nupG1</i>	CTTCGCGGATTATCTGCTGA	20	50
<i>nupG</i>	<i>nupG2</i>	GTGGCAGGATTATCCGACAT	20	50
<i>deoR</i>	<i>deoR1</i>	GTCCGGTAATGACGCCTGTA	20	55
<i>deoR</i>	<i>deoR2</i>	CAACGACTTGCCTGTATTGG	20	55

Se seleccionaron los oligonucleótidos con un % de GC mayor a 50 % y una T_m mayor a 37 °C. Además se seleccionaron aquellos oligonucleótidos para los cuales todos los registros reportados por BLASTn con Valor E “*Expected Value*” inferior a 0.05 correspondieran a genes con función equivalente a los genes del alineamiento original (los resultados de BLASTn son más significativos cuando su valor E es menor, pero el valor E tiende a ser conservativo cuando la secuencia de búsqueda es muy corta, de manera que para secuencias de longitud menor a 40 nucleótidos los resultados con valor E < 0.05 se pueden considerar específicos (Altschul *et al.*, 1998).

2.6.3. Eliminación de la resistencia al antibiótico

Una vez comprobada la mutación por PCR, se transformó con el plásmido pCP20, que codifica para la recombinasa FLP inducible por temperatura (43 °C), contiene resistencia a ampicilina y cloramfenicol, y tiene un origen de replicación termosensible. Las células transformadas se sembraron en medio sólido con ampicilina (Thacker *et al.*, 2006) a 30 °C, y se incubó a esta temperatura durante 16 h.

Los transformantes obtenidos se sembraron en medio sólido no selectivo a 43 °C para favorecer la pérdida del plásmido, ya que la mayoría de pérdidas de la resistencia flanqueada por sitios FRT es simultánea a la pérdida del plásmido pCP20. Aún así, se realizaron sucesivas estrías a 43 °C en medio sólido. Para finalizar, se comprobó por PCR colonia con los oligonucleótidos de la tabla 5 que la resistencia a cloramfenicol se había perdido y que el gen cromosomal original estaba inactivado.

2.6.4 Amplicones para la comprobación del inserto y escisión del gen de resistencia a antibiótico en la cepa de interés.

Se diseñaron los oligonucleótidos de comprobación (tabla 6) de manera específica que los amplicones tuvieran tamaños significativamente diferentes para poder diferenciarlos al

inactivar los genes de interés. La longitud esperada de los amplicones de cada gene específico se muestra en la tabla 4. Cabe destacar que para la comprobación de *endA* y *recA* el oligonucleótido de en dirección 3'-5' se diseñó para que hibridara a la mitad del gen de resistencia a Cm, solo para las comprobaciones de las cepas VH33 $\Delta recA$, VH33 $\Delta endA$, VH33 $\Delta recA endA$. Debido a que la cepa VH33 $\Delta recA$ presentó un rendimiento mayor a su progenitora VH33 se empleo esa construcción para hacer las muaciones en *nupG* y *deor*, y se volvieron a diseñar oligonucleótidos para *recA*, *nupG* y *deor* se de manera específica río arriba y río abajo de las regiones de homología H1 y H2, respectivamente, en el cromosoma.

Tabla 6. Tamaños de los productos de PCR para la comprobación del inserto.

Gen	Tamaño del amplicón	Tamaño del amplicón
<i>endA</i>	630	N.D
<i>recAI</i>	1100	N.D
<i>recAII</i>	2100	1100
<i>nupG</i>	1800	800
<i>deoR</i>	2100	1100

2.7 Sistemas de cultivo de *E. coli*

2.7.1 Medios de cultivo para la caracterización de crecimiento.

La composición de los medios de cultivo empleados para el cultivo de las cepas reportadas se describe en la tabla 7. Para los inóculos y matraces, el medio consistió de la misma composición y cantidad de nutrientes, con una concentración inicial de glucosa de 5 g/L proveniente de una solución al 650 g/L, previamente esterilizada. Para la preparación del medio se disolvieron cantidades requeridas de K₂HPO₄, KH₂PO₄, (NH₄)₂SO₄, (NH₄)Cl y citrato de sodio en un volumen adecuado de agua destilada. Además se ajustó el pH a 7.2 con NaOH 2M, la solución se esterilizó por 30 min a 121 °C y 15 psi.

Por separado se prepararon soluciones stock de MgSO₄·7H₂O (a 500 g/L), glucosa (a 650 g/L) y metales traza (descrita en la tabla 8) y se esterilizaron por separado a 121 °C y

15 psi por 30 min. De igual modo, se prepararon soluciones stock de tiamina y ampicilina y se esterilizaron por filtración.

Tabla 7. Medio PD 10X.

Componente	g/L
K ₂ HPO ₄	17
KH ₂ PO ₄	5.3
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.5
(NH ₄)Cl	1.0
Ácido cítrico (Citrato Sodio)	1.0
Tiamina-HCL	0.01
Ampicilina	0.1
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.0
Solución de elementos traza.	2 mL/L

Todas las soluciones preparadas se mezclaron en las cantidades adecuadas para obtener el volumen requerido de medio de cultivo, también se empleó una solución amortiguadora de pH de ácido-3-N-morfolino propanosulfónico (MOPS) al 20 mM en los cultivos de matraz, cabe destacar que tiene un pK_a de 7.2 y es un excelente buffer en cultivos biológicos cercanos a pH neutro (Good *et al.*, 1966; Ferguson *et al.*, 1980; Thomas y Hodes, 1981; Good, 1983) Esta precaución se tomó para evitar fluctuaciones de pH en cultivos en matraz debido al consumo de fosfatos y amonio, y a la probable producción de acetato.

Tabla 8. Elementos traza 500X

Componente	g/L
Na EDTA	7.05
CoCl ₂ - 7 H ₂ O	1.25
MnCl ₂ - 4 H ₂ O	7.5
CuCl ₂ - 2 H ₂ O	0.75
H ₃ BO ₃	1.5
NaMoO ₄ - 2 H ₂ O	1.05
Zn (CH ₃ COO) 2 H ₂ O	16.9
Citrato Férrico	50.4

2.7.2 Antibióticos

Los diferentes medios de cultivo se suplementaron con antibióticos. Estos antibióticos se añadieron al medio estéril a partir de una solución concentrada conservada a -20 °C (Orkin, 1990). En la tabla 9 se muestran las concentraciones finales a las que fueron utilizadas los antibióticos, según la localización del gen de la resistencia o el medio de cultivo.

Tabla 9. Antibióticos empleados

Antibiótico	Concentración en el medio (µg/ml)
Ampicilina	25 ^a - (50 -100) ^b
Cloramfenicol	12,5 ^a -50 ^b

^a Para resistencias cromosómicas

^b Para resistencias contenidas en plásmidos de medio-elevado número de copias

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

Cloramfenicol: se preparó a una concentración de 100 mg/mL en etanol absoluto.

2.7.3 Cultivos en matraz

Los estudios de crecimiento de las cepas listadas en la tabla 1 se realizaron por triplicado en matraces Erlenmeyer de 500 mL de capacidad, con un volumen de operación de 125 mL de medio de cultivo mínimo (PD), a 37 °C y 200 rpm en una incubadora con un diámetro de agitación circular de 19 mm, con 5 g/L de glucosa. En condiciones de esterilidad, el medio PD se inoculó con una cantidad de biomasa tal que la absorbancia a 600 nm inicial del cultivo fuera de 0.25. Para la inoculación del matraz se partió de un precultivo sembrado con 100 µL provenientes de un criovial y crecido en medio PD por 18 h.

2.7.4 Cultivos en biorreactor

Los cultivos en modo lote de las cepas de *E. coli* VH33 $\Delta(recA nupG deoR)$ y DH5 α en biorreactor instrumentado se realizaron con concentraciones iniciales bajas (5g/L) y altas (100g/L) de glucosa. Los cultivos se llevaron a cabo en un sistema fermentación BioFlo 110 (New Brunswick Scientific, Edison, NJ) en biorreactores con capacidad nominal de 2.5 L, con un volumen de operación de 1.6 L. Se empleó el software AFS-BioCommand Bioprocessing Software (New Brunswick Scientific, Edison, NJ) para controlar los parámetros operacionales adquirir los datos. La temperatura de los cultivos se controló a 37 °C, la tensión de oxígeno disuelto (TOD) se mantuvo al menos en 30 % de saturación mediante incrementos en la velocidad de agitación y mezclando la corriente de aire a la entrada del biorreactor con oxígeno puro. También se incrementó el flujo de aire a la entrada del fermentador de manera gradual de 0.75 hasta 2 volúmenes de aire por volumen de medio por minuto (vvm) para contender la alta demanda de oxígeno de los cultivos de alta densidad

celular de. El pH se controló a un valor de 7.2 mediante la adición automática de NH_4OH al 15 % y H_3PO_4 al 15 % (v/v). La formación de espuma en el medio de cultivo fue controlada mediante la adición bajo demanda de agente antiespumante a base de silicón.

2.8. Métodos analíticos para el seguimiento de los cultivos.

2.8.1. Determinación de Biomasa.

a) Medición de la absorbancia del cultivo (D.O. $_{600\text{nm}}$)

La concentración de biomasa se determinó en base en la densidad óptica medida a una longitud de onda de 600 nm. Para esto se extrajeron muestras del matraz y se mezclaron en cantidades adecuadas de agua destilada para diluir las concentraciones necesarias (diluciones entre 1:2 y 1:200).

b) Determinación del peso seco celular

El peso seco de las células que se encuentran en una suspensión se obtuvo por el secado de un volumen en un horno a 80 °C hasta peso constante por 16 h. Para esto se tomaron de 1.5 a 6 mL de caldo de cultivo, se centrifugaron a 10,000 rpm por 10 min y posteriormente la biomasa se lavó con solución salina de NaCl a 0.85 %, se centrifugaron las muestras obtenidas se centrifugaron y se seco a la temperatura indicada hasta peso constante. La concentración de biomasa como peso seco se calculó con los pesos de los tubos vacío y con biomasa seca y tomando en cuenta el volumen de caldo de cultivo empleado.

c) Correlación entre el peso seco celular D.O. $_{600\text{nm}}$

Se determinó la correlación entre peso seco y D.O. $_{600\text{nm}}$ de la cepa VH33 para poder calcular los pesos secos obtenidos en matraces. La Figura 15 representa la correlación obtenida de D.O. $_{600\text{nm}}$ vs $\text{g}_{\text{PS}}/\text{L}$ de la cepa VH33 en medio PD. Los datos se ajustan a una recta con una pendiente de 0.4809 D.O. $_{600\text{nm}}/\text{g}_{\text{PS}}$ con una $r^2 = 0.99$.

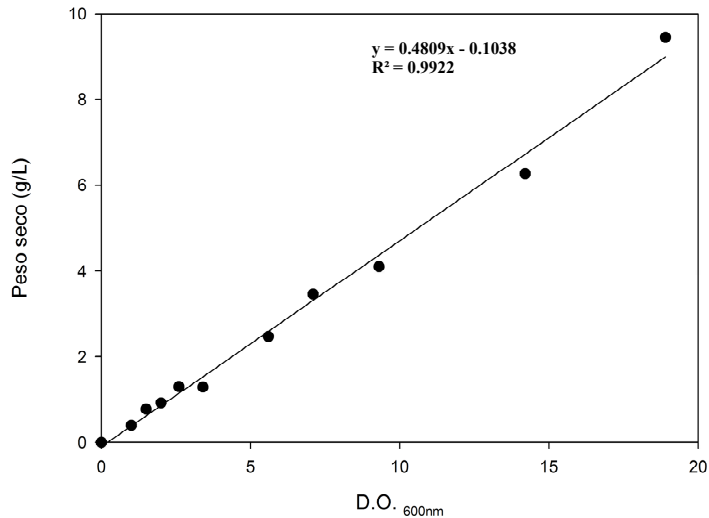


Figura 15. Correlación entre la concentración de biomasa medida como peso seco

2.8.2. Cuantificación de glucosa.

Las muestras del caldo de cultivo se tomaron en condiciones de esterilidad y se centrifugaron por 10,000 rpm por 5 min para obtener un sobrenadante con la mínima carga bacteriana posible. La concentración de glucosa se cuantificó en el analizador bioquímico YSI 2700 (Yellow Spring Instruments), utilizando D-glucosa oxidasa inmovilizada (Stork *et al.*, 2005).

2.8.3. Cuantificación de acetato por cromatografía de alta resolución (HPLC).

Para determinar la concentración de acetato extracelular, las muestras de los cultivos fueron centrifugadas por 10 min a 10,000 rpm. El sobrenadante fue filtrado por membranas de 0.2 μ m. La cuantificación se realizó en un equipo de HPLC equipado con detectores de índice de refracción (IR) y de fotoarreglo de diodos (UV), utilizando una columna Aminex HPX 87H (Biorad). Como fase móvil se utilizó una solución de H₂SO₄ 5mM a un flujo de 0.5 mL/min y a temperatura de 50 °C. La Figura 16 muestra un cromatograma típico con el pico correspondiente al acetato empleando el método descrito.

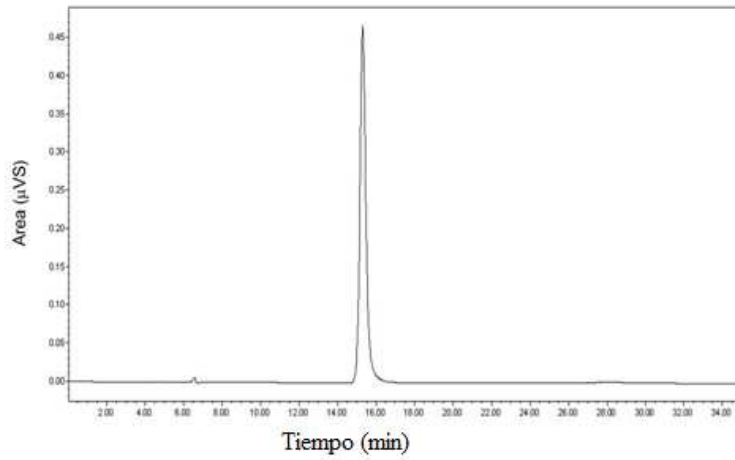


Figura 16. Cromatograma típico para la cuantificación de acetato.

Se construyó una curva tipo (Figura 17) con concentraciones de acetato conocidas e integrando los datos de área bajo la curva y absorbancia de los picos de acetato obtenidos. Los datos se ajustaron a una recta con una pendiente de 3587853 µVs/ (g/L) con un valor de $r^2 = 1$. Esta curva se empleó para calcular las concentraciones de acetato de cada muestra.

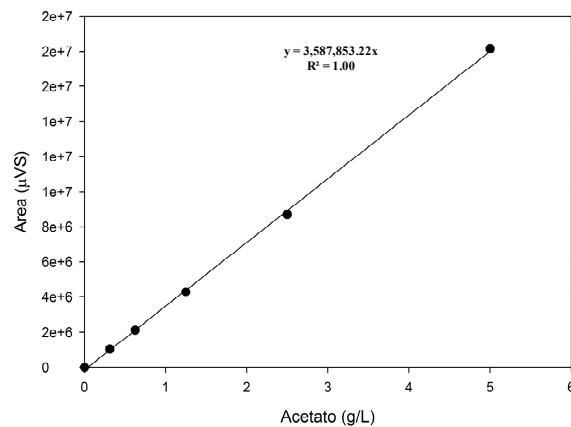


Figura 17. Curva tipo para la cuantificación de acetato en las muestras de los cultivos de *E. coli*.

2.8.4. Análisis densitométrico en geles de agarosa.

Después de la extracción de ADNp, los productos fueron analizados por densitometría. Se cargaron las muestras a un volumen constante de 20 μL con una concentración normalizada de 50 $\text{ng}/\mu\text{L}$ en un gel de agarosa al 0.8 % en buffer de Tris-borato/EDTA (Tris-borato, 0.045 M; EDTA, 0.001 M). La separación se llevó a cabo aplicando un voltaje constante de 100 V durante 40 min y se empleó bromuro de etidio como agente de tinción a una concentración de 0.02 $\mu\text{g}/\text{mL}$. El grado de superenrollamiento del plásmido pHN se determinó mediante densitometría de las poblaciones se relacionó la población que tuvo mayor migración con respecto al total de la muestra se obtuvo la proporción de ADNp superenrollado.

2.9 Cálculos cinéticos y estequiométricos

Los parámetros evaluados fueron: velocidad específica de crecimiento (μ); rendimiento biomasa/sustrato ($Y_{X/S}$); producto/biomasa ($Y_{P/X}$); velocidad específica de consumo de sustrato (q_S); producto final, así como la productividad específica (q_P), productividad volumétrica (Q_P), los cuales se determinaron durante la fase de crecimiento exponencial y fueron corregidos por factor de dilución. Las expresiones matemáticas empleadas para calcular dichos parámetros se detallan enseguida.

2.9.1. Cálculo de velocidades específicas de conversión.

La velocidad de crecimiento específica, fue calculada graficando el logaritmo de la concentración de biomasa (g_{PS}) vs t (h). La velocidad específica de crecimiento se obtuvo durante la fase de crecimiento exponencial, mediante el cálculo por regresión lineal

utilizando la ecuación de crecimiento exponencial ($X = X_0 e^{\mu t}$) y el método de mínimos cuadrados, obteniéndose en todos los casos analizados correlaciones mayores a 0.95.

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

Para la fase exponencial:

$$q_S = Y_{X/S} * \mu \quad (1)$$

$$q_P = Y_{P/X} / t \quad (2)$$

2.9.2. Cálculos de rendimientos.

Los rendimientos $Y_{X/S}$, $Y_{P/S}$ y $Y_{P/X}$, durante la fase de crecimiento exponencial fueron calculados mediante la determinación de la pendiente en la gráfica S vs X ó S vs P, como se muestra en la Figura 18.

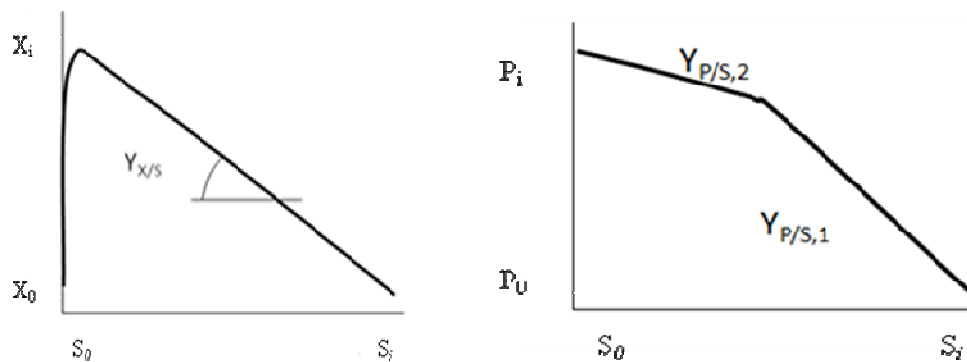


Figura 18. Determinación de los rendimientos en los cultivos de *E. coli*.

3. Resultados y discusión

3.1 Comprobación de las mutantes.

En esta sección se muestran las comprobaciones que se realizaron en las cepas de interés. Primeramente se realizaron inactivaciones con productos de PCR (Datsenko y Wanner 2000) de los genes *recA*, *endA*, *nupG* y *deoR* en la cepa W3110. Las cepas fueron seleccionadas primeramente con base en su resistencia al antibiótico cuando fueron cultivadas en medio LB sólido. Posteriormente, se comprobaron las inserciones mediante amplificación de la región de interés por PCR a partir del ADN genómico. Una vez comprobadas, estas inactivaciones se transfirieron a la cepa de interés empleando el fago P1 como vector, realizando las combinaciones deseadas. A continuación se muestran las comprobaciones de las inactivaciones en VH33.

3.1.1 Comprobación para las construcciones de *endA* y *recA*

En la Figura 19 se muestra una fotografía del gel de corrida de los productos de amplificación del ADN cromosómico de las cepas mutantes en *endA* y *recA*. Los pesos moleculares de los productos de PCR coinciden con lo esperado según la tabla 4 del capítulo 2.

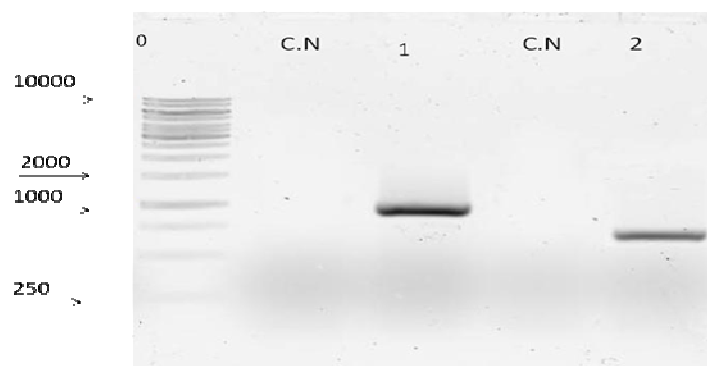


Figura 19. Construcciones de *endA* y *recA* en VH33. 0: marcador de peso molecular; C.N.: control negativo de la reacción; 1: producto de amplificación en la cepa VH33 *recA* Cm^r; 2: producto de amplificación en la cepa VH33 *endA* Cm^r.

En la Figura 20 se muestra una fotografía del gel de corrida de los productos de amplificación del ADN cromosómico de las cepa doble mutante VH33 $\Delta(endA\ recA)$. Para la construcción de esta cepa, primeramente se transformó la cepa VH33 $\Delta endA$ con el plásmido pCP20 para eliminar la resistencia a cloramfenicol. Una vez seleccionada la cepa que no presentara resistencia a Cm y comprobada por PCR se transdujo la mutación de *recA* a la cepa VH33 $\Delta endA$, se realizo la comprobación con el juego de oligonucleótidos *recAI* (ver tabla 4), dando lugar a la mutante doble VH33 $\Delta(endA\ recA)$. El producto de amplificación coincide con el producto esperado para *recA::Cm* que es un amplicón de 1100pb. Los pesos moleculares de los productos de PCR coinciden con lo esperado según la tabla 4 del capítulo 2. Cabe destacar que para las construcciones de $\Delta recA$ y $\Delta endA$ y la construcción doble se emplearon un juego diferente de oligonucleótidos, explicado en el capítulo 2.

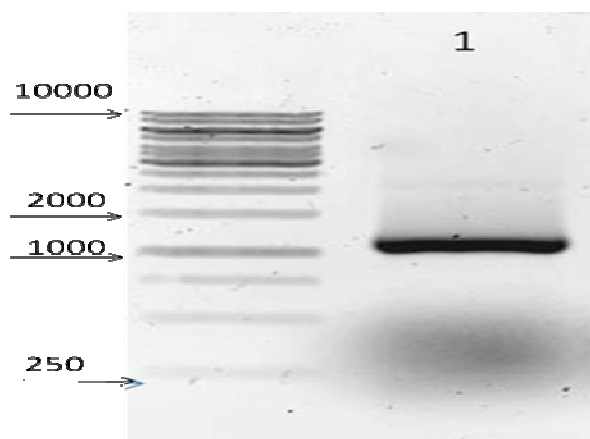


Figura 20. Construcciones de *endA* y *recA* en VH33. El carril del extremo izquierdo muestra el marcador de peso molecular; 1: producto de amplificación en la cepa VH33 *recA* Cm^r.

3.1.2 Comprobación para las construcciones de *deoR*, *nupG* y la construcción triple *nupG deoR recA*.

En la Figura 21 se muestra una fotografía del gel de los productos de amplificación del ADN cromosómico de las cepas mutantes en *deoR* y *nupG*. En el carril 1 se obtuvo un amplicón de 2,100 pares de bases, lo que coincide con el tamaño teórico esperado para *deoR::Cm*, originando el genotipo VH33 *deoR::Cm*. Por otro lado en el carril 2 se muestra

el genotipo VH33 $\Delta deoR$ al eliminar el gen de resistencia a cloramfenicol se obtuvo un amplicón de 1,100 pares de bases.

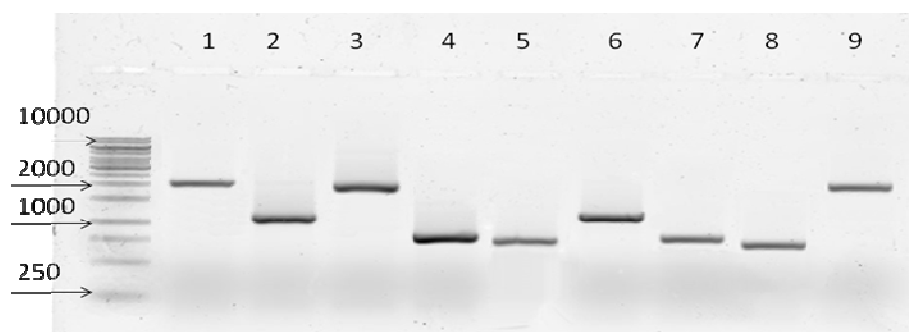


Figura 21. Comprobación para las construcciones de *deoR* y *nupG*. El carril del extremo izquierdo muestra el marcador de peso molecular; 1: *deoR* Cm⁺, 2,100 pb; 2: *deoR* Cm⁻, 1,100 pb; 3: *nupG* Cm⁺, 1,800 pb; 4: *nupG* Cm⁻, 800 pb; 5 y 6: *nupG deoR* Cm⁻, 800 pb y 1100pb; 7,8,9: *deoR nupG recA* Cm⁺, 1,100, 800 y 2,100 pb.

En el carril 3 se obtuvo un amplicón de 1,800 pb de bases, lo que corresponde al tamaño esperado (ver tabla 4) originando el genotipo VH33 *nupG::Cm*. Por otro lado, al eliminar el gen de resistencia a Cm se obtuvo el genotipo VH33 $\Delta nupG$ con un amplicon de 800 pb como se puede observar en el carril 4.

La construcción de la cepa doble VH33 $\Delta (nupG deoR)$ se transdujo el gen de *deoR::Cm* al genotipo de VH33 $\Delta nupG$, posteriormente eliminando el gene de resistencia, generando la cepa VH33 $\Delta (nupG deoR)$, las amplificaciones corresponden a los tamaños esperados de la tabla 4.

La construcción de la cepa triple VH33 $\Delta (nupG deoR recA)$ se transdujo el gen *recA::Cm* al genotipo VH33 $\Delta (nupG deoR)$, generando la mutante triple $\Delta (nupG deoR recA)$, las amplificaciones corresponden a los tamaños esperados de la tabla 4, en el carril 7,8 y 9 se pueden observar los amplicones de *deoR* Cm⁻ de 1100pb, *nupG* Cm⁻ de 800 pb y *recA::Cm* 2,100 pb.

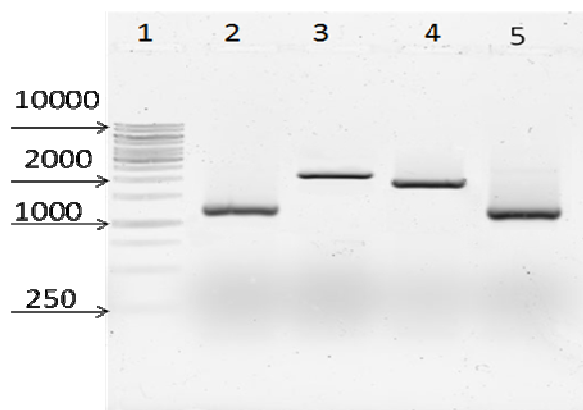


Figura 22. Comprobación para las construcciones de *deoR* y *nupG* II. 1: marcador de peso molecular; 2 y 3: *deoR recA* Cm^r, 1,100 y 2,100 pb; 4 y 5: *nupG recA* Cm^r, 1,800 y 1,100 pb.

En la Figura 22 se muestra una fotografía del gel de agarosa de los productos de amplificación del ADN cromosómico de la cepa mutante en VH33 (*recA deoR*). Para la construcción de esta cepa se transdujo el gen *recA::Cm* en el genotipo VH33 Δ (*deoR*). Los amplicones corresponden a los tamaños esperados (ver tabla 4). Para generar la cepa VH33 Δ (*recA deoR*) se transdujo el gene el gene *nupG::Cm* en el genotipo VH33 Δ (*recA*), en el carril 4 y 5 se pueden observar los amplicones esperados para la comprobación de esta mutante.

3.1. Caracterización de crecimiento y consumo de sustrato.

Las cepas W3110, DH5 α y las mutantes obtenidas en este trabajo se transformaron con el plásmido pHN (ver sección 2.3). La caracterización cinética fue realizada en cultivos por lote en matraces bafleados de 500 mL con un volumen de operación de 125 mL, empleando medio PD suplementado con 5 g/L de glucosa empleando como amortiguador de pH al MOPS (ver sección 2.8.4) a una concentración de 20 mM. Los perfiles cinéticos se muestran en la Figura 23, mientras que en las tablas 8 y 9 se reportan los parámetros cinéticos y estequiométricos relevantes obtenidos en los cultivos en matraz.

En esta sección de resultados y discusión se analizarán en primera instancia las cepas W3110, DH5 α , VH33, VH33 Δ *endA*, VH33 Δ *recA*, VH33 Δ (*endA recA*), y posteriormente las mutantes en la vía de síntesis de nucleótidos.

3.1.1. Desempeño de las cepas W3110, DH5 α y VH33

En la Figura 23a, se muestra el perfil de crecimiento de la cepa W3110, esta cepa alcanzó una concentración máxima de biomasa de 2.1 g/L, agotando la glucosa en su totalidad en 5 h. Los parámetros cinéticos y estequiométricos de esta construcción se muestran en la tabla 8. Se obtuvo una velocidad específica de crecimiento de 0.61 h⁻¹, con un rendimiento biomasa sustrato de 0.38 g/g. En términos de la velocidad específica de consumo de sustrato se obtuvo un valor de 1.66 g/g h. Por otro lado la concentración de acetato fue de 0.32 g/L. Se obtuvo un rendimiento producto biomasa de 0.5 mg/g. El perfil de crecimiento de la cepa DH5 α se muestra en la Figura 23b. La concentración máxima de biomasa alcanzada por esta cepa fue de 1.94 g/L, la velocidad específica de crecimiento fue de 0.39 h⁻¹ y consumió la glucosa en su totalidad en un tiempo de 8 h (Figura 23b). La q_s fue de 1.05 g/g h y la concentración máxima de acetato alcanzada fue de 0.6 g/L, lo que sugiere presenta un sobreflujo metabólico elevado comparado con la cepa W3110. En términos de producción de ADNp, la cepa DH5 α presentó un rendimiento de 6.56 mg/g, lo que es atribuible a su fondo genético (ver sección 2.1).

La cepa VH33, como se discutió en la introducción, tiene inactivado el sistema natural de transporte de glucosa (PTS) y expresando la permeasa de galactosa (GalP). El perfil de crecimiento de esta cepa se muestra en la Figura 23c, esta cepa alcanzó una concentración de biomasa máxima de 2.3 g/L, agotando la glucosa en su totalidad en 8 h. Los parámetros cinéticos y estequiométricos de esta cepa se resumen en la tabla 8, obteniendo una velocidad específica de 0.37 h⁻¹, con un rendimiento biomasa sustrato de 0.52 g/g. Por otro lado esta cepa obtuvo una velocidad específica de consumo de sustrato de 0.72 g/g h. Es interesante destacar que en esta construcción la velocidad específica de consumo de sustrato disminuyó un poco más de un 50%. Como consecuencia de este equilibrio la producción de acetato se ve disminuida en un 50% comparada con la cepa W3110 (tabla 8). En términos de rendimiento producto biomasa se incrementó de alrededor de dos veces el rendimiento de ADNp comparado con su progenitora W3110. Estos datos coinciden con lo reportado anteriormente por Soto y col. (2011) para la producción del plásmido pHN por la cepa VH33.

3.1.2 Desempeño de las construcciones de *endA* y *recA* en la cepa VH33

El producto de *endA* es una endonucleasa de tipo I, dependiente de magnesio, con un peso de 12 kD. Aunque no se ha encontrado actividad de esta enzima durante el crecimiento bacteriano, por otro lado se ha asociado la degradación de material genético durante la lisis celular (Lehman, 1962, 1963a, b). Diversos autores han propuesto que la inactivación de este gen celular mejora la estabilidad del ADNp (Phue *et al.*, 2005; Yau *et al.*, 2008; Williams *et al.*, 2009). Basados en esta información, una segunda modificación a VH33 consistió en inactivar el gene *endA*. El perfil de crecimiento de esta cepa se muestra en la Figura 23d. Esta cepa VH33 $\Delta endA$ construcción alcanzó una concentración de biomasa máxima de 1.99 g/L, agotando la glucosa en su totalidad a las 9 h de cultivo. Los parámetros cinéticos y estequiométricos de esta construcción se resumen en la tabla 10, obteniendo una velocidad específica de crecimiento máxima de 0.38 h^{-1} , y un rendimiento biomasa glucosa de 0.43 g/g. En términos de la velocidad específica de consumo de sustrato se obtuvo un valor de 0.99 g/g h . Por otro lado, no se observaron picos de acetato en las muestras de cultivos de la cepa VH33 $\Delta endA$

Las cepas mutantes en *recA* frecuentemente son mejores productoras de ADNp que las cepas con este gene activo (Schoenfeld, 1995; Carnes *et al.*, 2006b; Phue *et al.*, 2008). Por lo tanto, un primer paso para mejorar el desempeño de VH33 consistió en la inactivación de este gene. El desempeño de la cepa VH33 $\Delta recA$ se muestra en la Figura 23e. Se puede observar que la concentración máxima de biomasa alcanzada fue de 2.06 g/g, consumiendo la glucosa en su totalidad a las 9 h. Los parámetros cinéticos y estequiométricos de esta mutante se muestran en la tabla 10. Esta construcción alcanzó una μ de 0.38 h^{-1} y un rendimiento biomasa glucosa de 0.43 g/g. La concentración de acetato alcanzada por esta cepa fue de 0.08 g/L. Se obtuvo un rendimiento específico de ADNp ($Y_{p/x}$) alrededor de 7 veces mayor que el de la cepa progenitora W3110 y 2.5 veces mayor que el de la cepa VH33. La velocidad específica de consumo de sustrato (q_s) de esta mutante se incrementó aproximadamente un 20% con respecto a VH33, posiblemente se debió a que se utiliza más carbono para producir la energía necesaria para la síntesis de ADNp.

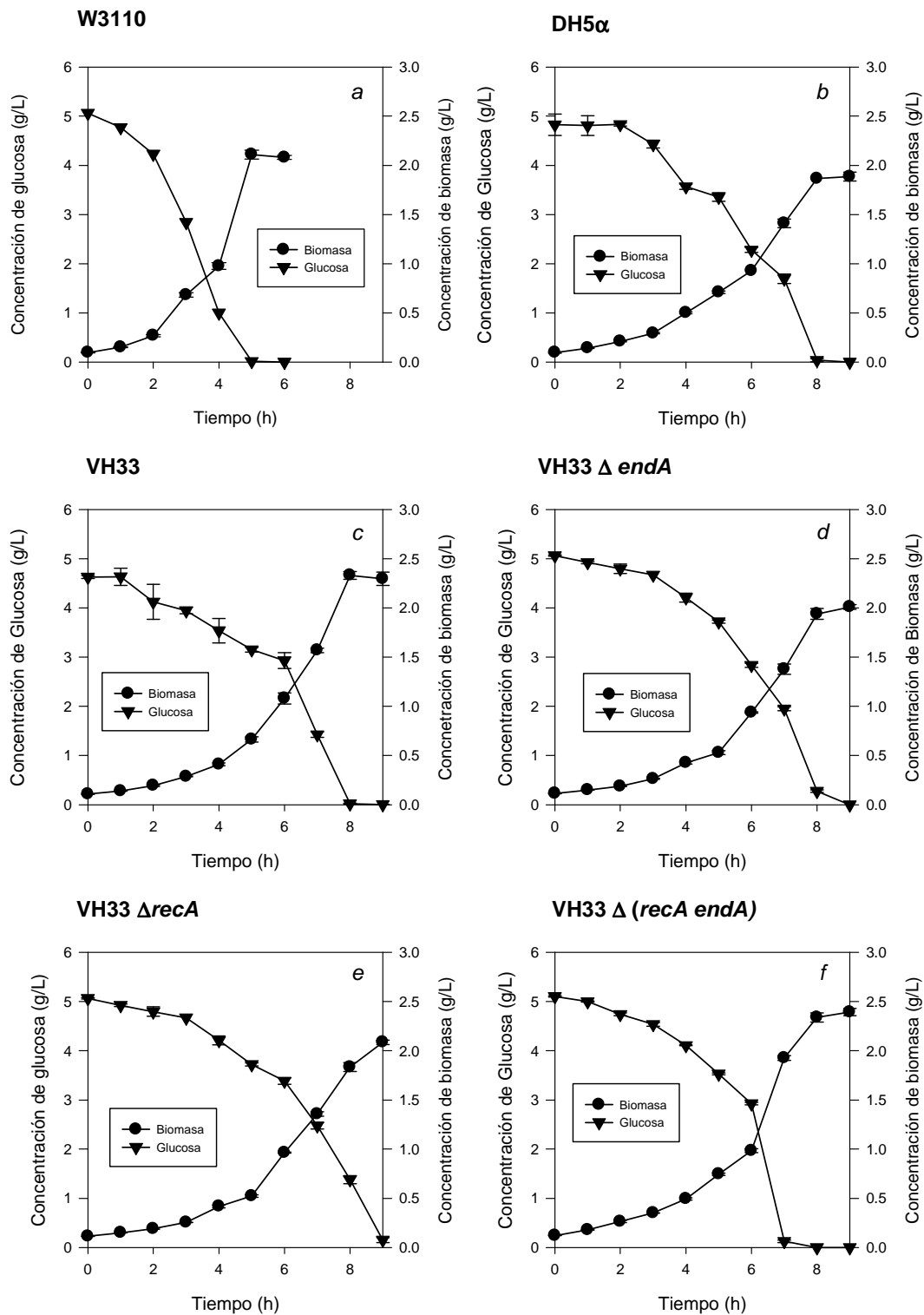


Figura 23. Perfiles de crecimiento de las cepas W3110, DH5 α , VH33, VH33 Δ endA, VH33 Δ recA y VH33 Δ (endA recA) en cultivos en matraz agitado.

La proteína RecA tiene una actividad proteolítica sobre la proteína RepA, implicada en el inicio de la replicación del plásmido de interés (pHN) y de la mayoría de los plásmidos derivados de pCO11 (Schnarr *et al.*, 1985). Al inactivar el gene *recA*, los niveles basales de la proteína *RepA* son incrementados (Summers, 1996), lo que favorece su unión a la secuencia de inicio de replicación (OriV) y con ello se incrementa el número de copias por célula.

Los plásmidos poseen sistemas de reparto (partición), que tienden a asegurar que una vez que el plásmido ha sido replicado, cada una de las células hijas va a recibir al menos una copia (Steck and Drlica, 1984; Lewis, 2001; Draper y Gober, 2002a). A falta de tal sistema, y si el reparto fuera aleatorio, de vez en cuando, las propias fluctuaciones de la segregación aleatoria harían que parte de la progenie no recibiera una copia, con lo que quedarían células ausentes del plásmido (Meijer *et al.*, 1995). El reparto de las copias a las células hijas se suele deber a las llamadas funciones *par*, que están cerca de los genes *rep* y de la región *ori*. Se trata de cortas secuencias de ADN que de alguna manera aún no aclarada, debe unirse a alguna zona de la membrana de la bacteria que se duplica durante la división celular, de modo que cada copia, unida a una de esas zonas, se segrega a una célula hija (Draper and Gober, 2002). Diversos autores (Kuzminov, 1999; Phue *et al.*, 2005) han reportado que en cepas $\Delta recA$ incrementan la estabilidad segregacional sin demostrar el mecanismo molecular o la interacción de las proteínas de este evento (Kato *et al.*, 1990). Dado que los genes *par* y *rep* están controlados bajo un mismo operón (Bouet *et al.*, 2007) al incrementar el número de copias del plásmido se necesita más proteína Rep, consecuentemente el nivel traducción de los genes *par* se vería incrementado, haciendo más eficiente la segregación a células hijas en cepas $\Delta recA$.

Cepas comerciales como DH5 α poseen mutaciones en ambos genes (*endA* y *recA*), la combinación de ambas mutaciones se probó en VH33. El perfil de crecimiento de la cepa VH33 $\Delta(recA\ endA)$ se muestra en la Figura 23f. Esta construcción alcanzó una concentración máxima de biomasa 2.31 g/L, agotando la glucosa a las 7 h de cultivo. Los parámetros y cinéticos y estequiométricos de esta construcción se muestran en la tabla 10, obteniendo una velocidad específica de 0.37 h⁻¹ y un rendimiento biomasa sustrato de

0.37 g/g. La velocidad específica de consumo de sustrato fue de 1.07 g/gh. Se obtuvo una concentración de acetato de 0.11 g/L.

En la construcción de la mutante doble VH33 Δ (*recA endA*), observamos un decremento en la cantidad de ADNp producido de alrededor de 10%, lo que coincide con datos previamente reportados por Phue y col. (2008) en estudios empleando la cepa BL21. Posiblemente el efecto de mutar *endA* tenga un efecto en el metabolismo tal que tenga que suplir la demanda de la endonucleasa por otra función con los resultados presentados. Sin embargo en la mutación simple *endA* no presenta el mismo comportamiento, puede ser a que no tenga un efecto significativo en la replicación del plásmido ya que sigue controlado por la proteína RecA, por tal motivo presenta una producción de ADNp idéntica a la de la cepa VH33.

La acumulación de acetato en la cepa DH5 α presentó un valor de 0.6 g/L mientras que la cepa nativa W3110 alcanzó un valor de 0.3 g/L. Comparando con DH5 α las cepas VH33, VH33 Δ *recA*, VH33 Δ *endA* y VH33 Δ (*recA endA*) alcanzaron una sexta parte de DH5 α en las mismas condiciones. Esto demuestra que las mutaciones adicionales en VH33 no afectaron su cualidad de producir solo pequeñas cantidades de acetato. Es importante señalar que la acumulación de acetato en cultivos celulares representa una pérdida de esqueletos de carbono y podría afectar la fisiología celular y el desempeño del bioproceso (Lara *et al.*, 2008), sin embargo se ha descrito que en concentraciones altas de glucosa la acumulación de acetato puede originarse como una respuesta de estrés no solamente debido al sobreflujo metabólico (Flores *et al.*, 2002; Bolívar *et al.*, 2005; Flores *et al.*, 2005).

Al realizar la mutante doble en *recA* y *endA*, no se observó un diferencia significativa en la producción de ADNp, esto es debido a que la endonucleasa de tipo I codificada por *endA* tiene como función reconocer secuencias de ADN no metiladas, además de que sus extremos 5' y 3' estén libres para poder tener actividad catalítica. El plásmido pHN no tiene ninguna secuencia de metilación por lo tanto cuando el producto de este gene está presente no tiene actividad catalítica, por lo tanto al inactivarlo no hay cambio significativo. Las virtuales ventajas de inactivar *endA* serían probablemente observadas en procesos de purificación a escala industrial.

Con estos datos podemos concluir que de las construcciones estudiadas en esta sección, la VH33 $\Delta recA$ es la más favorable debido a sus rendimientos específicos y su baja producción de acetato. Con base en estos resultados, se decidió emplear esta cepa como base para las modificaciones la síntesis de nucleótidos discutidas en la siguiente sección.

Tabla 10. Parámetros cinéticos y estequiométricos de las cepas W3110, DH5 α y mutantes en *recA* y *endA* de VH33.

	W3110	DH5 α	VH33	VH33 $\Delta recA$	VH33 $\Delta endA$	VH33 $\Delta(recA endA)$
X_{máx} (g/L)	2.1 ± 0.1	1.94 ± 0.29	2.3 ± 0.30	2.06 ± 0.21	1.99 ± 0.15	2.31 ± 0.18
P (mg/L)	1.14 ± 0.10	12.73 ± 0.10	2.78 ± 0.10	7.09 ± 0.10	2.81 ± 0.10	6.25 ± 0.10
Y_{x/s} (g/g)	0.38 ± 0.07	0.38 ± 0.13	0.52 ± 0.10	0.43 ± 0.10	0.38 ± 0.09	0.37 ± 0.12
Y_{p/x} (mg/g)	0.5 ± 0.02	6.56 ± 0.17	1.21 ± 0.12	3.43 ± 0.20	1.41 ± 0.11	2.7 ± 0.11
μ (h⁻¹)	0.61 ± 0.01	0.39 ± 0.01	0.37 ± 0.01	0.38 ± 0.01	0.38 ± 0.01	0.37 ± 0.01
q_s (g/g h)	1.66 ± 0.01	1.05 ± 0.09	0.72 ± 0.08	0.87 ± 0.05	0.99 ± 0.05	1.07 ± 0.08
Q_p (mg/g h)	0.21 ± 0.01	0.82 ± 0.02	0.15 ± 0.02	0.79 ± 0.05	0.15 ± 0.03	0.34 ± 0.02
q_p (mg/g h)	0.31 ± 0.01	2.59 ± 0.10	0.45 ± 0.05	1.15 ± 0.09	0.51 ± 0.04	1.01 ± 0.05
pH final	6.82 ± 0.01	6.70 ± 0.01	7.01 ± 0.01	7.04 ± 0.01	7.01 ± 0.01	7.00 ± 0.01
Conc. de acetato (g/L)	0.32 ± 0.03	0.62 ± 0.04	0.14 ± 0.01	0.08 ± 0.01	N.D	0.11 ± 0.02

* ND= No Detectado

3.1.3 Desempeño de las cepas mutantes en la síntesis de nucleótidos

Con base en lo discutido anteriormente, se decidió realizar las mutaciones en la síntesis de nucleótidos para determinar si la producción de ADNp está limitada por precursores de ADN.

El gene *deoR* está localizado inmediatamente río arriba del operón *deo*, que codifica para los genes: *deoA*, *deoB*, *deoC* y *deoD* que codifican para las enzimas necesarias para la síntesis de ácidos nucleicos. El gene *deoR* codifica una proteína represora que regula de manera negativa la expresión del operón. Mutantes en *deoR* presentan un nivel alto de las enzimas timina fosforilasa, purina fosforilasa, fosfopentomutasa y deoxirriboaldolasa, (Zeng and Saxild, 1999). Al presentar niveles altos de estas enzimas el equilibrio de la reacción se desplaza hacia la formación de nucleótidos de manera concomitante. Por otro lado, el gene *nupG* tiene una regulación sobre el nivel de expresión de enzimas involucradas en la síntesis de nucleótidos, ya que forma parte de un sistema de dos componentes (Keseler *et al.*, 2005). Mutantes en esta proteína confieren una velocidad de síntesis de nucleótidos mayor con respecto a las que contienen esta proteína (Rudd, 2000). Con base en lo anterior, se decidió inactivar dichos genes en la cepa VH33 Δ *recA*. En principio se estudió la mutación única en *nupG* y en *deoR* por separado.

En la Figura 24a se muestra el perfil de crecimiento de la cepa VH33 Δ *nupG*, esta construcción alcanzó una concentración máxima de biomasa de 2.28 g/L, agotando la glucosa a las 7 h de cultivo. Los parámetros cinéticos y estequiométricos de esta cepa se resumen en la tabla 11. Se obtuvo una velocidad específica de crecimiento de 0.49 h^{-1} , con un rendimiento biomasa sustrato de 0.42 g/g. En términos de la velocidad específica de consumo de sustrato se obtuvo un valor de 1.17 g/g. Por otro lado la concentración de alcanzada de acetato fue de 0.11 g/L, mientras que el contenido específico de ADNp fue de 1.37 mg/g.

El perfil de crecimiento de la cepa VH33 Δ *deoR* se muestra en la Figura 24b. Esta cepa alcanzó una concentración máxima de biomasa de 2.41 g/L, agotando la glucosa a las 7 h de cultivo. Los parámetros cinéticos y estequiométricos de esta construcción se muestran en la tabla 11. Se obtuvo una velocidad específica de crecimiento de 0.49 h^{-1} , con un rendimiento de biomasa sustrato de 0.42 g/g. La velocidad específica de consumo de sustrato de esta mutante fue de 1.17 g/g h, alcanzando una concentración de acetato de 0.11 g/L (tabla 11).

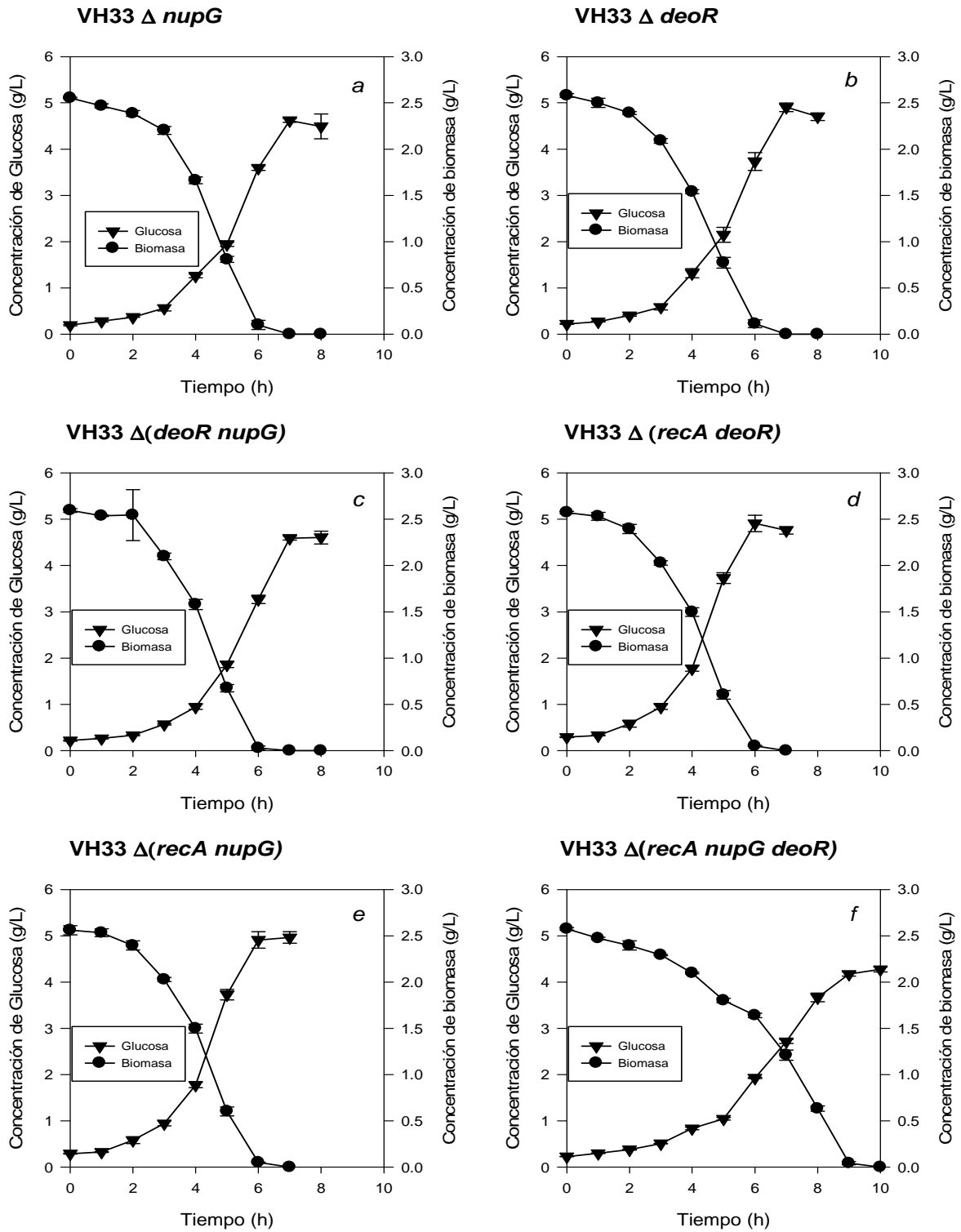


Figura 24. Perfil de crecimiento de mutantes VH33 Δ *deoR*, VH33 Δ *nupG*, VH33 Δ (*deoR nupG*), VH33 Δ (*nupG recA*), VH33 Δ (*deoR recA*), VH33 Δ (*deoR nupG recA*).

Se construyó una cepa que combinó las mutaciones en *deoR* y *nupG*. El perfil de crecimiento de la cepa doble mutante VH33 $\Delta(\textit{deoR nupG})$ se muestra en la Figura 24c. Se alcanzó una concentración de biomasa de 2.44 g/L. Agotando la glucosa en su totalidad en 6 h. Los parámetros cinéticos y estequiométricos se resumen en la tabla 11. Se obtuvo una velocidad específica de crecimiento de 0.44 h^{-1} , con un rendimiento de biomasa sustrato de 0.48 g/g. La velocidad específica de consumo de sustrato de esta mutante fue de 0.92 g/g h , obtenido una concentración de acetato de 0.08 g/L.

Tabla 11. Parámetros cinéticos y estequiométricos de las mutantes en la síntesis de nucleótidos.

	VH33 $\Delta\textit{nupG}$	VH33 $\Delta\textit{deoR}$	VH33 $\Delta(\textit{nupG deoR})$	VH33 $\Delta(\textit{deoR recA})$	VH33 $\Delta(\textit{nupG recA})$	VH33 $\Delta(\textit{nupG deoR recA})$
$X_{\text{máx}}$ (g/L)	2.28 ± 0.20	2.41 ± 0.20	2.44 ± 0.10	2.51 ± 0.18	2.49 ± 0.18	2.1 ± 0.10
P (mg/L)	2.80 ± 0.10	2.90 ± 0.10	2.70 ± 0.10	7.98 ± 0.10	6.7 ± 0.10	8.67 ± 0.10
$Y_{x/s}$ (g/g)	0.42 ± 0.30	0.42 ± 0.30	0.48 ± 0.10	0.48 ± 0.12	0.48 ± 0.12	0.47 ± 0.10
$Y_{p/x}$ (mg/g)	1.37 ± 0.13	1.37 ± 0.13	1.11 ± 0.11	3.8 ± 0.10	3.41 ± 0.10	4.12 ± 0.20
μ (h^{-1})	0.49 ± 0.01	0.49 ± 0.01	0.44 ± 0.03	0.37 ± 0.01	0.35 ± 0.01	0.35 ± 0.01
q_s (g/g h)	1.17 ± 0.05	1.17 ± 0.06	0.92 ± 0.03	1.31 ± 0.03	1.31 ± 0.03	1.33 ± 0.03
Q_p (mg/g h)	0.17 ± 0.03	0.17 ± 0.02	0.14 ± 0.02	0.42 ± 0.02	0.38 ± 0.02	0.46 ± 0.02
q_p (mg/g h)	0.67 ± 0.04	0.67 ± 0.06	0.48 ± 0.02	1.41 ± 0.05	1.2 ± 0.05	1.46 ± 0.10
pH final	6.89 ± 0.01	6.89 ± 0.01	7.06 ± 0.01	7.03 ± 0.01	7.08 ± 0.01	7.00 ± 0.01
Conc. de acetato (g/L)	0.11 ± 0.02	0.11 ± 0.03	0.08 ± 0.02	0.13 ± 0.01	0.1 ± 0.01	0.12 ± 0.02

Posteriormente, se combinaron las mutaciones mencionadas en la cepa VH33 $\Delta\textit{recA}$. El perfil de crecimiento de la cepa doble mutante VH33 $\Delta(\textit{deoR recA})$, se muestra en la Figura 24d. Se alcanzó una concentración máxima de biomasa de 2.51 g/L. La glucosa fue agotada en 7 h. Los parámetros cinéticos y estequiométricos se resumen en la tabla 11. Esta cepa creció a una velocidad específica en fase exponencial de 0.37 h^{-1} , con un rendimiento de

biomasa en sustrato de 0.48 g/g. La velocidad específica de consumo de sustrato fue de 1.31 g/g h, y se obtuvo una concentración máxima de acetato de 0.13 g/L.

El perfil de crecimiento de la cepa doble mutante VH33 $\Delta(nupG\ recA)$ se detalla en la Figura 24e. Esta cepa alcanzó una concentración máxima de biomasa de 2.49 g/L y agotó la glucosa en su totalidad en 7 h. Los parámetros cinéticos y estequiométricos se resumen en la tabla 10. Se obtuvo una velocidad específica de crecimiento de $0.35\ h^{-1}$, con un rendimiento de biomasa sustrato de 0.48 g/g. La velocidad específica de consumo de sustrato fue de 1.31 g/g h, y la concentración de acetato alcanzada fue de 0.1 g/L.

También se obtuvo una cepa que combinó las tres mutaciones, VH33 $\Delta(deoR\ nupG\ recA)$, cuyo perfil de crecimiento se detalla en la Figura 24f. Esta cepa alcanzó una concentración máxima de biomasa de 2.1 g/L y consumió el total de la glucosa en 9 h. Los parámetros cinéticos y estequiométricos se resumen en la tabla 11: la velocidad específica de crecimiento de esta cepa fue de $0.35\ h^{-1}$ y se obtuvo un rendimiento de biomasa en glucosa de 0.47 g/g. La velocidad específica de consumo de sustrato fue de 1.33 g/g h y la concentración de acetato alcanzada fue de 0.12 g/L.

Al realizar las mutaciones en *deoR* y *nupG* en VH33 sencillas y en combinación, no se observó un cambio significativo en el título de ADNp (ver tabla 11) comparado con la cepa VH33, manteniéndose en valores cercanos a 1.2 mg/g. Esto sugiere que la producción de ADNp no está limitada por la síntesis de nucleótidos o bien que la regulación de *recA* sigue prevaleciendo impidiendo una mayor acumulación de ADNp a pesar de la desregulación de la síntesis de nucleótidos. Al inactivar *nupG* ó *deoR* en VH33 $\Delta recA$, no se observó mejoría en el contenido específico de plásmido (ver tablas 10 y 11). Sin embargo, al combinar las inactivaciones de *recA*, *deoR* y *nupG*, se obtuvo un incremento en el contenido específico de ADNp de cerca del 30% comparado con la cepa VH33 $\Delta recA$ (tablas 10 y 11). El rendimiento producto sustrato $Y_{p/x}$ de la cepa triple mutante fue 4 veces mayor que el de la VH33 se incrementó hasta 4 veces el rendimiento producto biomasa, mientras que la producción de acetato se mantuvo en niveles muy bajos (alrededor de 0.1 g/L). Esto es interesante, ya que a pesar de que se observó un incremento en la q_s en la cepa triple mutante comparada con VH33, no hubo incremento en el sobreflujo metabólico,

lo que indica que el carbono se estaría dirigiendo en mayor grado hacia la generación de energía y precursores para la síntesis de ADN.

3.1.3 Efecto de las mutaciones en el nivel de superenrollamiento.

La topología del ADNp es un factor importante a evaluar durante la producción de esta molécula para fines terapéuticos, como se explicó en el Capítulo 1. Como parte de este trabajo, se analizó el grado de porcentaje de superenrollamiento de las diferentes cepas obtenidas.

En *E. coli* los niveles de superenrollamiento son mantenidas dentro de los límites precisos durante la fase de crecimiento exponencial por la acción de cuatro topoisomerasas: girasa, topoisomerasa I (Topo I), topoisomerasa III (Topo III) y topoisomerasa IV (Topo IV). La girasa y Topo IV son topoisomerasas tipo II dependientes de ATP que introducen superenrollamiento negativo y eliminan superenrollamiento positivo respectivamente (Champoux and Leppard, 2005). La topoisomerasa tipo I A es la responsable de eliminar el superenrollamiento negativo. Estas enzimas actúan conjuntamente para eliminar los cambios topológicos resultantes de la actuación de enzimas que se mueven sobre el DNA como la RNA polimerasa, manteniendo el superenrollamiento del plásmido en un nivel estacionario. Las topoisomerasas de tipo I que hidrolizan un enlace fosfodiéster en una cadena, hacen pasar la otra cadena a través del corte y vuelven a unir los extremos de la primera; como resultado, el índice de enlace de la molécula de ADN aumenta o disminuye. La topoisomerasa de tipo II hidrolizan los enlaces fosfodiéster en ambas cadenas y hacen pasar la otra cadena a través del corte uniéndolos de nuevo; de este modo, el índice de enlace varía dependiendo de cada enzima (Adachi *et al.*, 1984; Craigie and Mitsuuchi, 1986). El nivel de superenrollamiento regula la expresión de los genes de la girasa (*gyrA* y *gyrB*) y Topo I (*topA*). La relajación del superenrollamiento induce la expresión de *gyrA* y *gyrB* y reprime la expresión de *topA* (Dorman, 1996; Schneider *et al.*, 1997; Muskhelishvili *et al.*, 2006).

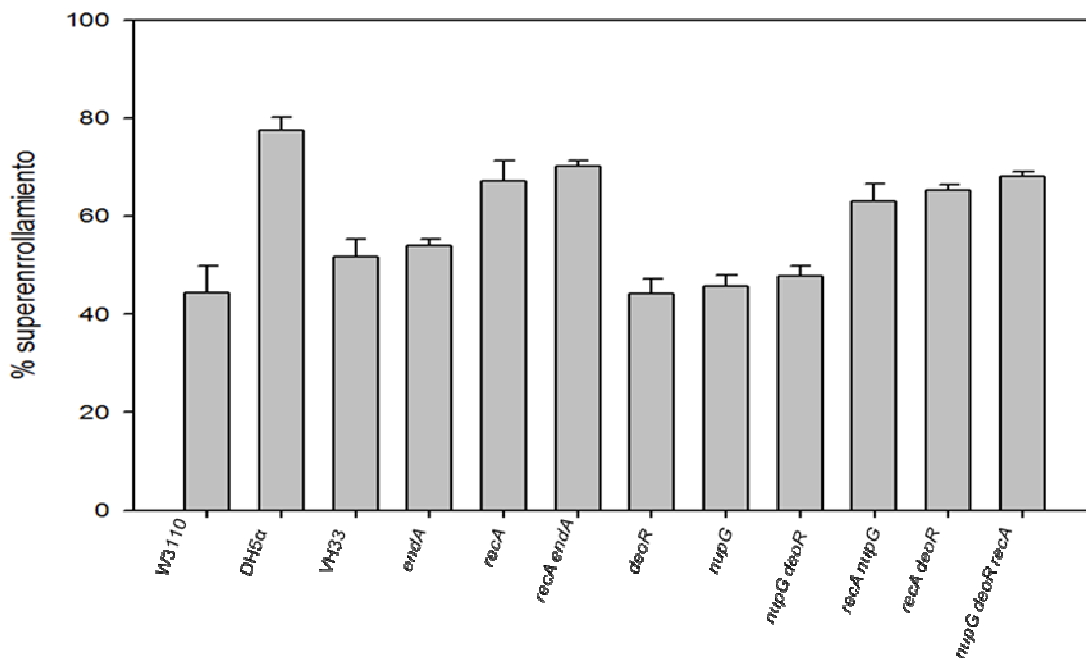


Figura 25. Niveles de superenrollamiento del ADNp producido por las cepas estudiadas en cultivos en matraz agitado.

La proteína *RecA* tiene un efecto regulatorio en el gene *topA* (Tse-Dinh *et al.*, 2011). Al eliminar la formación de esta proteína en las mutantes *recA*, el nivel basal de Topo I podría aumentar generando un nivel de superenrollamiento superior a la cepa progenitora. Por ejemplo, en la Figura 3 se observa que las cepas W3110 y VH33, las cuales contienen el gene *recA* intacto, produjeron ADNp con un porcentaje de superenrollamiento de alrededor de 50 %. En contraste, el ADNp producido por la cepa DH5α (la cual tienen inactivado el gene *recA*) presentó un porcentaje de superenrollamiento cercano al 80 %. La inactivación de *recA* en la cepa VH33, incluidas las diversas combinaciones de mutaciones extra, resultó en un porcentaje de superenrollamiento cercano al 80 % (Figura 3). Esto es una mejora notable respecto a lo obtenido por la cepa VH33. Por lo tanto, la cepa VH33 $\Delta(nupG deoR recA)$, con las mejoras en el contenido específico de plásmido y en el superenrollamiento del mismo, se perfila como una buena candidata para aplicaciones comerciales. Sin embargo, el nivel de superenrollamiento logrado por la cepa

VH33 triple mutante es inferior al de la cepa DH5 α . Esto podría deberse a que el genotipo de la cepa DH5 α presenta una inactivación del gene *gyrA* (tabla 2).

La mutación en *gyrA* puede provocar daños en el ADN cromosomal e incluso provocar la muerte celular. Los efectos de la inhibición de la girasa se pueden detectar experimentalmente en tres niveles: 1) global sobre el crecimiento bacteriano, replicación, transcripción y traducción, 2) local a nivel de transcripción de determinados genes, y 3) efectos sobre el superenrollamiento del plásmidos (Persmark *et al.*, 2006). Por lo tanto, dicha mutación podría causar efectos indeseables en cultivos industriales.

3.1.4 Relación entre la velocidad específica de crecimiento y el contenido específico de plásmido en las cepas mutantes.

Generalmente se asume que existe una relación inversa entre la velocidad de crecimiento y la el rendimiento específico de ADNp (Bushell *et al.*, 2006). Por ello se han empleado cultivos a una muy baja tasa de alimentación (hasta 0.05 h⁻¹) para incrementar el número de copias del plásmido y consecuentemente aumentar los rendimientos (Kim y Ryu, 1991; Ryan y Parulekar, 1991).

La Figura 26 compara la velocidad de crecimiento y el contenido específico de plásmido de las cepas estudiadas en el presente trabajo. Como se puede observar, las cepas W3110 y VH33 presentaron las velocidades de crecimiento más altas. A pesar de que la velocidad de crecimiento de la cepa VH33 fue ligeramente menor que la de W3110, su contenido específico de plásmido fue del doble. Las mutaciones realizadas en la síntesis de nucleótidos en la cepa VH33 redujeron la velocidad de crecimiento aunque no provocaron un efecto importante en el contenido específico de plásmido. Esto podría deberse a que la regulación de la replicación del plásmido sigue activa y por otro lado el flujo de carbono que se pueda desviar hacia la formación de estos compuestos puede metabolizarse nuevamente hacia energía de mantenimiento.

Es interesante observar que al eliminar el gen *endA* la velocidad específica disminuye sensiblemente pero su rendimiento específico se mantiene relativamente constante con respecto a las mutantes previamente discutidas, posiblemente la falta de este producto este originando un cambio en el ajuste metabólico de la cepa. Por otro lado al eliminar la recombinasa A que codifica el gen *recA*, el contenido específico de plásmido se incrementó a más del doble un poco más de dos veces comparada con VH33 mientras que la velocidad específica disminuyó sólo en aproximadamente un 10 %.

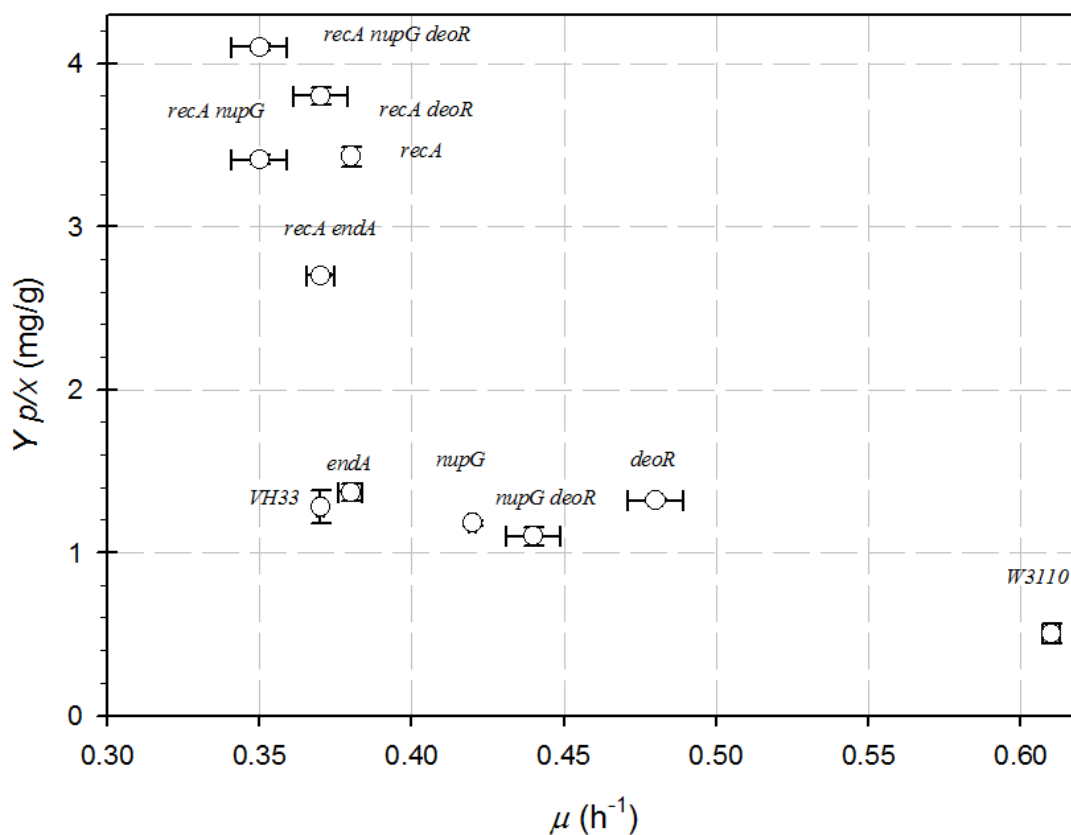


Figura 26. Correlación entre el rendimiento específico y la velocidad de crecimiento de las cepas W3110 y sus derivadas empleadas en este trabajo. Se indican los genes mutados en VH33.

Al realizar las mutaciones de *nupG* y *deoR* en el fondo genético de VH33 $\Delta recA$, no se observó un cambio significativo en el contenido específico de plásmido, aunque la mutación en *deoR* en VH33 $\Delta recA$ mejoró notoriamente la velocidad de crecimiento, lo que se ve reflejado en un mayor valor de Q_p (tablas 10 y 11). Podría atribuirse a la cantidad de nucleótidos formados al eliminar este represor sean metabolizados hacia las vías centrales generando energía disponible para el crecimiento celular.

Por otro lado al eliminar *nupG* la velocidad específica se vio reducida comparada con su progenitora VH33 $\Delta recA$, aunque ello no implicó un aumento en el contenido específico de ADN_p. Sin embargo al realizar la cepa triple mutante VH33 $\Delta(nupG\ deoR\ recA)$, el $Y_{p/x}$ se incrementó aproximadamente un 10 %, lo que sugiere que exista un efecto sinérgico de ambas mutaciones que no es atribuible a la disminución de la velocidad específica sino al efecto de la construcción de la cepa triple.

La Figura 26 demuestra que el valor de Q_p no es necesariamente un efecto de la velocidad específica de crecimiento. Es necesario destacar que este análisis se basó exclusivamente en cultivos en modo lote, es decir, bajo condiciones limitadas que conducen a la máxima velocidad de crecimiento alcanzable por cada cepa.

3.2. Cultivos de de las cepas DH5 α y de la cepa de VH33 $\Delta(deoR\ nupG\ recA)$ en un biorreactor instrumentado

3.2.1. Cultivos de baja densidad celular

Una vez que se seleccionó la cepa VH33 $\Delta(nupG\ deoR\ recA)$ como la mejor cepa obtenida en el presente trabajo, se evaluó su comportamiento en un biorreactor instrumentado y se comparó con la cepa DH5 α . Esto permitió determinar el porcentaje de superenrollamiento del plásmido durante el cultivo y la estabilidad del contenido específico de ADN_p, ya que en los experimentos en matraz se analizó solamente un punto del cultivo. La Figura 27 muestra el perfil de crecimiento de la cepa DH5 α bajo estas condiciones.

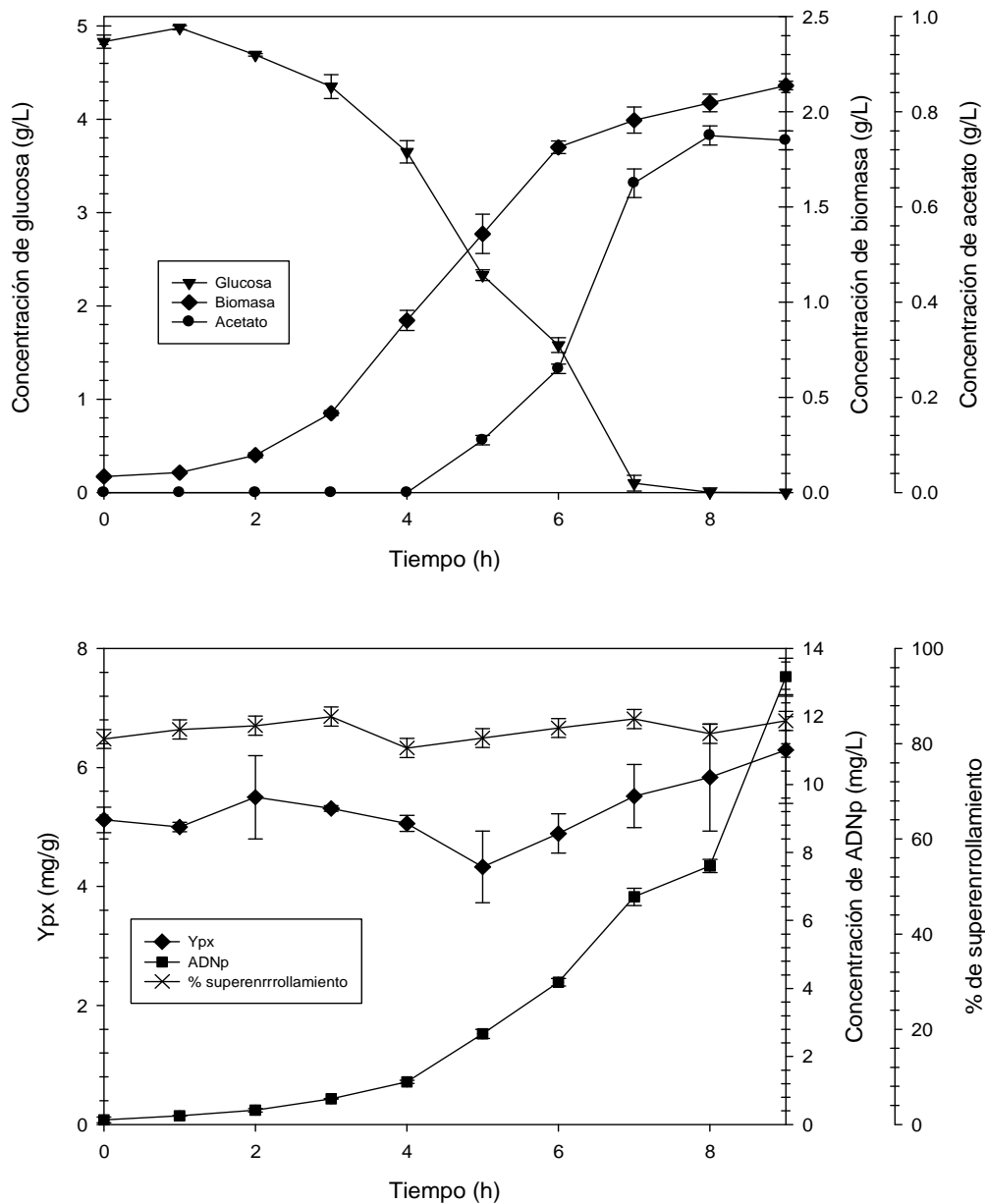


Figura 27. Cultivo de DH5 α en modo lote con 5 g/L de glucosa. Panel superior; producci3n de biomasa, acetato y consumo de glucosa; panel inferior: contenido espec3fico de ADN_p, producci3n de ADN_p y porcentaje de superenrollamiento del ADN_p

Se observa que la biomasa, acetato y ADN_p producidos llegan a las mismas cantidades que en cultivos en matraz (tabla 11). La producci3n de acetato se detect3 a partir de las 4 h de cultivo. El porcentaje de superenrollamiento del ADN_p se mantuvo en valores estables

ligeramente superiores al 80 % a lo largo del cultivo. El valor de $Y_{P/X}$ también se mantuvo estable en este cultivo, y coincide con lo reportado para matraces.

La Figura 28 muestra el perfil cinético de la cepa triple mutante en cultivo en biorreactor. Los valores de biomasa, acetato y ADNp alcanzados también reprodujeron lo reportado en matraces y el porcentaje de superenrollamiento se mantuvo estable a lo largo del cultivo.

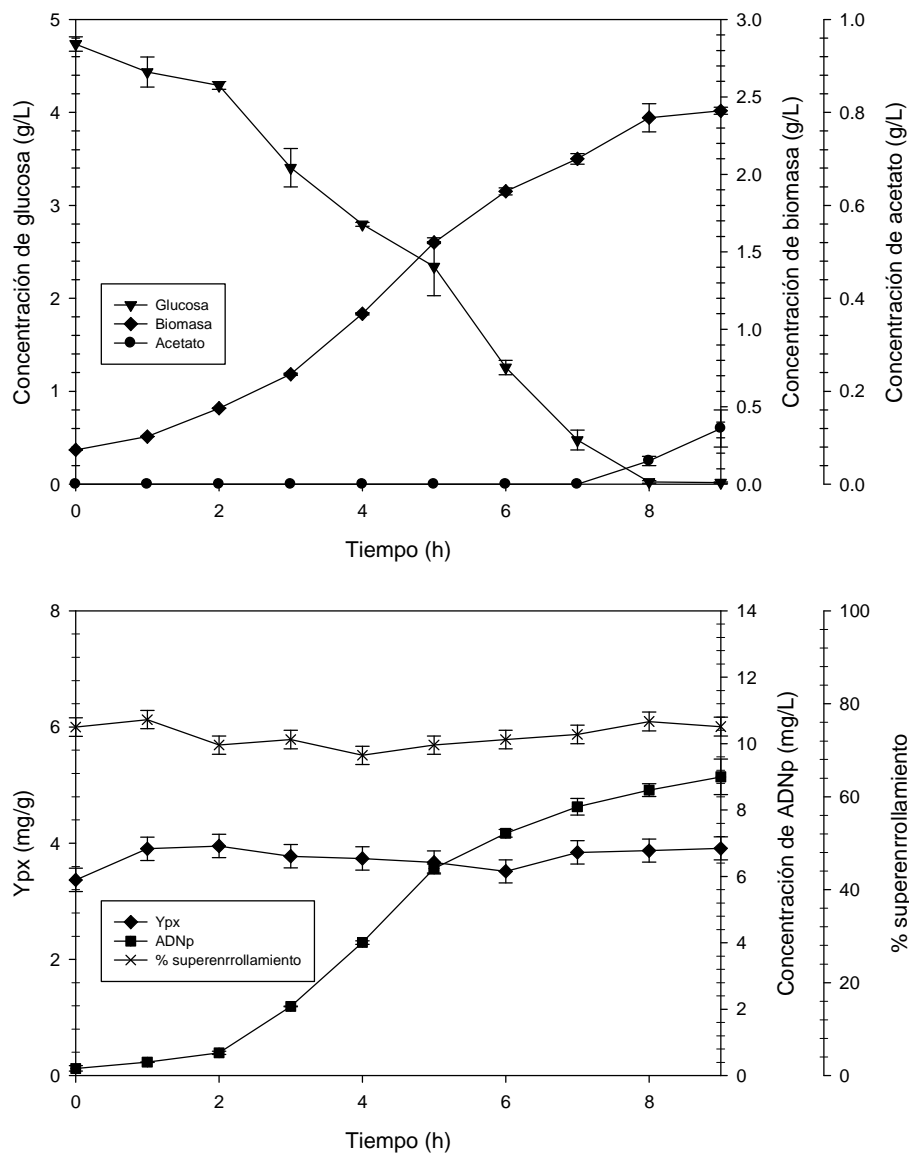


Figura 28. Cultivo de VH33 $\Delta(nupG\ deoR\ recA)$ en modo lote con 5 g/L de glucosa. Panel superior; producción de biomasa, acetato y consumo de glucosa; panel inferior: contenido específico de ADNp, producción de ADNp y porcentaje de superenrollamiento del ADNp.

Es importante resaltar que el contenido específico de ADNp se mantuvo muy estable en el cultivo, a diferencia de cultivos de la cepa VH33 en los que se reportó una disminución de $Y_{P/X}$ a lo largo de cultivos por lote (Soto *et al.*, 2011). Esta mejoría en el desempeño de la cepa triple mutante respecto a la cepa VH33 puede ser el resultado de una mayor estabilidad segregacional del plásmido conferida por la inactivación de *recA*.

3.2.1. Cultivos de alta densidad celular en modo lote

Los cultivos de alta densidad celular (concentraciones de biomasa por arriba de los 40 g/L), industrialmente son los más convenientes debido a las productividades alcanzables. En el caso de cepas de *E. coli*, los cultivos no exceden de 20 g/L de glucosa, se debe principalmente a la acumulación de metabolitos de desecho tales como el acetato que tienen un impacto negativo en la fisiología microbiana. Con la finalidad de evaluar las ventajas de la cepa triple mutante en cultivos de alta densidad celular en modo lote y comparar su desempeño con el de la cepa DH5 α , ambas cepas fueron cultivadas empleando una concentración inicial de glucosa de 100 g/L, bajo condiciones completamente aerobias (TOD de al menos 30 % de saturación) y con un valor de pH controlado a 7.2.

El perfil de crecimiento de la cepa DH5 α se muestra en la Figura 29. El acetato se acumuló hasta concentraciones de 9.5 ± 0.8 g/L. La velocidad específica de crecimiento bajo estas condiciones fue de 0.17 ± 0.02 h⁻¹ mientras que en cultivos de 5 g/L se obtuvo una velocidad específica de 0.45 ± 0.03 h⁻¹. Esta disminución en la velocidad de crecimiento en condiciones de altas concentraciones de glucosa ha sido reportada previamente (Lara *et al.*, 2008; Knabben *et al.*, 2010) (Soto *et al.*, 2011). Dicha disminución ha sido atribuida al efecto “tóxico” de altas concentraciones de glucosa o a una elevada presión osmótica en el medio concentrado. Por otro lado, se ha reportado que el acetato en concentraciones de 5 g/L inhibe fuertemente el crecimiento de *E. coli* (Luli and Strohl, 1990). Como se observa en la Figura 29, después de las 19 h de cultivo la concentración de acetato en el medio superó los 8 g/L y ello coincidió con una disminución del crecimiento microbiano, a pesar de que la concentración de glucosa residual era cercana a los 10 g/L. Debido a que el pH fue controlado mediante la adición de NH₄OH, y a que durante este cultivo fue necesaria la adición de una considerable cantidad de esta base, se podría especular que el amonio pudo

haber afectado el crecimiento, ya que se ha reportado que por encima de 6.5 g/L el amonio inhibe fuertemente el crecimiento de *E. coli* (Antoniou *et al.*, 1990). La suma de estos factores (medio de cultivo altamente concentrado, acumulación de acetato, posible efecto tóxico del amonio) afectaron en gran medida al rendimiento de biomasa de DH5 α , el cual tuvo un valor de 0.19 ± 0.03 g/g, lo que resulta en una disminución de 50 % con respecto a los cultivos con baja concentración de glucosa.

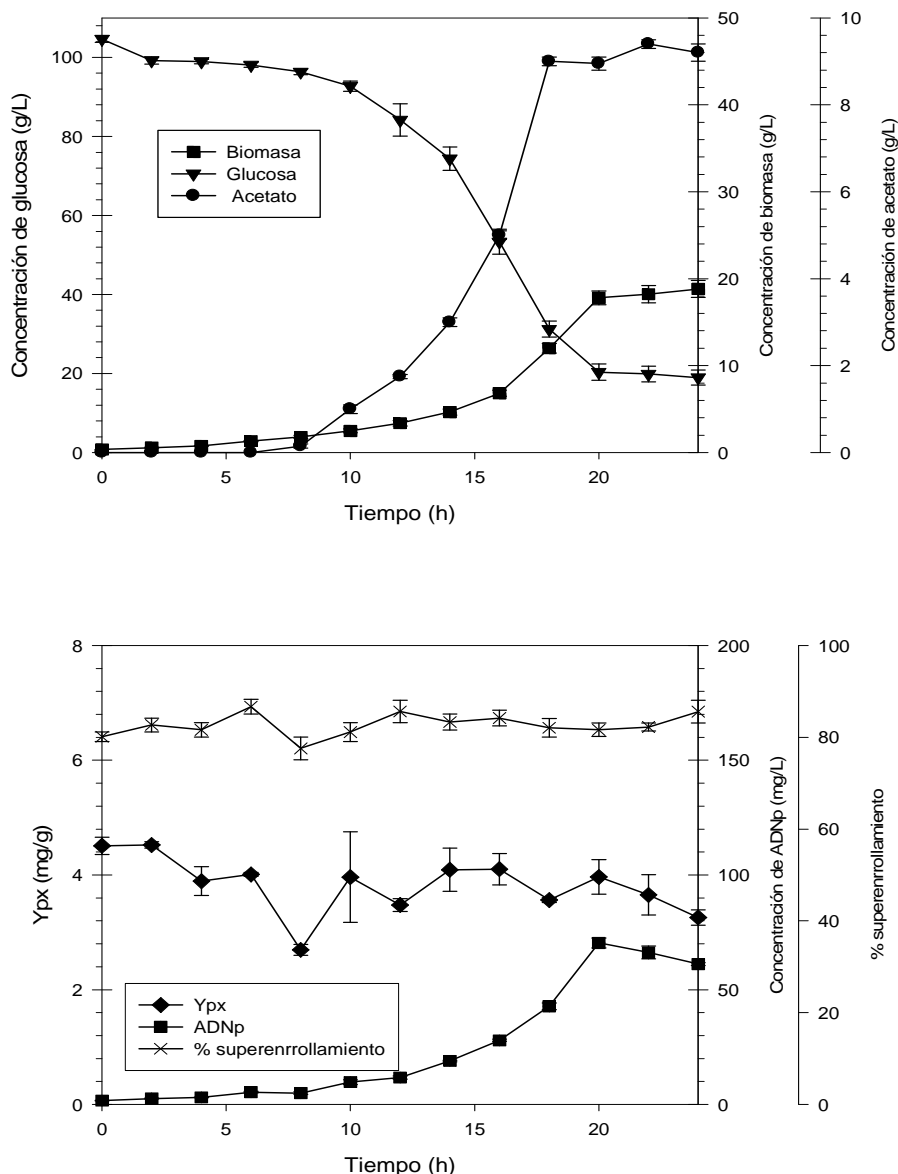


Figura 29. Cultivo de DH5 α en modo lote con 100 g/L de glucosa. Panel superior; producción de biomasa, acetato y consumo de glucosa; panel inferior: contenido específico de ADNp, producción de ADNp y porcentaje de superenrollamiento del ADNp.

Si bien el porcentaje de superenrollamiento del ADNp no fue afectado por las condiciones de cultivo (Figura 29), el contenido específico de ADNp de DH5 α disminuyó en aprox. 30 % con respecto a cultivos con bajas concentraciones de glucosa, y de hecho, se observó una disminución de este parámetro a lo largo del cultivo (Figura 29). Esto condujo a una pobre producción de ADNp, ya que solo se llegó a una concentración de 70 ± 4 mg/L.

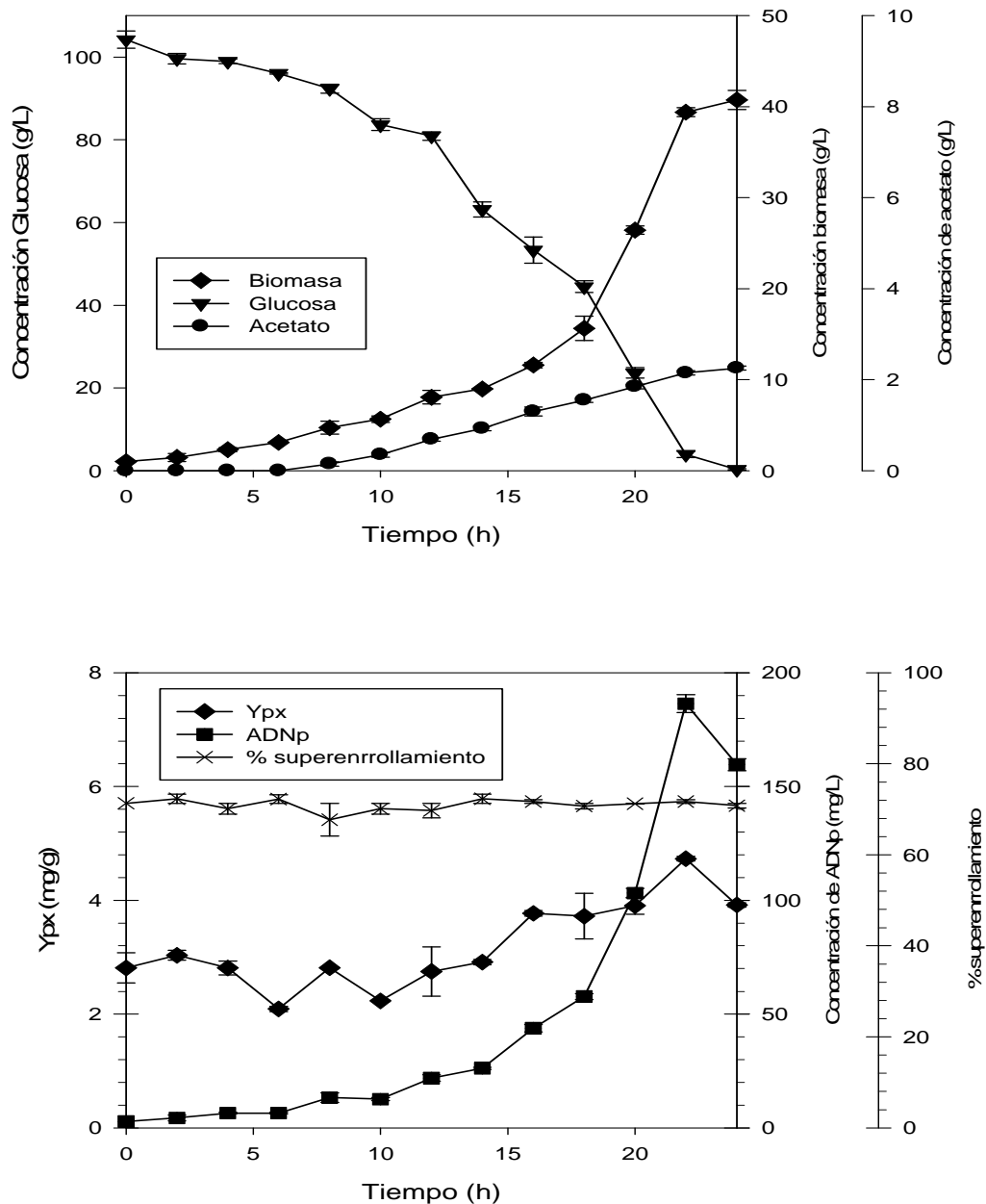


Figura 30. Cultivo de VH33 $\Delta(nupG deoR recA)$ en modo lote con 100g/L de glucosa. Panel superior; producción de biomasa, acetato y consumo de glucosa; panel inferior: contenido específico de ADNp, producción de ADNp y porcentaje de superenrollamiento del ADNp.

En la Figura 30 se muestra el perfil cinético de la cepa VH33 $\Delta(nupG\ deoR\ recA)$ cultivada en modo lote empleando 100 g/L de glucosa inicial. Las condiciones de cultivo fueron completamente aerobias (TOD de al menos 30 % de saturación) y pH de 7.2. Bajo estas condiciones, la velocidad específica de crecimiento de la cepa triple mutante descendió en un 50%, ($0.15 \pm 0.02\ h^{-1}$) comparada con el cultivo con baja concentración de glucosa.

Es posible que los factores de estrés mencionados anteriormente afecten de igual modo a esta cepa. A pesar de este efecto en la velocidad de crecimiento, la cantidad de acetato producida por la cepa triple mutante se mantuvo en valores relativamente bajos (alrededor de 2 g/L), lo que coincide con datos previamente reportados por Soto y col. (2011). Es importante destacar que las condiciones de cultivo no afectaron el grado de superenrollamiento del ADNp, ya que este se mantuvo relativamente constante en valores cercanos al 75 % (Figura 30). En contraste con cultivos reportados de la cepa VH33 bajo altas concentraciones de sustrato (Soto *et al.*, 2011), el contenido específico de ADNp de la cepa triple mutante no disminuyó a lo largo del cultivo. Por el contrario, se notó un ligero aumento en este parámetro durante las últimas 10 h del cultivo. Esto podría deberse a que la concentración de glucosa residual es considerablemente menor en esta etapa del cultivo (menor a 60 g/L) que al principio del mismo, lo que conduce a condiciones más favorables para *E. coli*. Es interesante resaltar que el rendimiento biomasa sustrato de la cepa triple VH33 $\Delta(nupG\ deoR\ recA)$ alcanzado es de $0.4 \pm 0.03\ g/g$, mientras que la cepa DH5 α disminuyó un 50 % comparada con el rendimiento reportado en 5 g/L, por las razones previamente discutidas.

Los cultivos de alta densidad celular en modo lote de la cepa VH33 $\Delta(nupG\ deoR\ recA)$ alcanzaron una concentración máxima de ADNp de $186 \pm 15\ mg/L$, lo que es un incremento de alrededor de 2 veces sobre la cepa comercial DH5 α . Esta concentración de ADNp es la mayor reportada, hasta donde se sabe, en cultivos en modo lote (ver tablas 11 y 12).

Con base en el desempeño obtenido por la cepa VH33 $\Delta(deoR\ nupG\ recA)$, es posible afirmar que esta cepa se perfila como una buena candidata para aplicaciones industriales y también para el desarrollo de productos en fase temprana, en donde usualmente se emplean matraces agitados o biorreactores de pequeña escala para la producción del plásmido de

interés. Bajo dichas condiciones, contar con una cepa y modo de cultivo sencillos y altamente productivos permitiría acelerar el desarrollo de productos y procesos (ver tabla 12).

Tabla 12. Comparación de los rendimientos de ADNp en modo lote obtenidos en este trabajo con los reportados por otros grupos.

Referencia	Cepa	Medio de cultivo	Fuente de Carbono	Qp (mg/L h)	Concentración de ADNp (mg/L)
(Voss <i>et al.</i> , 2004)	DH5 α	definido	Glicerol (52 g/L)	0.06	45
(Wang, 2001)	JM109	Definido suplementado con aminoácidos y nucleótidos.	Glucosa (5 g/L)	0.95	60
(Soto, 2011)	VH33	Mineral	Glucosa (100 g/L)	0.06	40
Este trabajo	VH33 $\Delta(nupG$ $deoR recA)$	Mineral	Glucosa (100 g/L)	0.19	187

4. Conclusiones

En el presente trabajo, se realizaron modificaciones genéticas en una cepa de *E. coli* con un sistema alternativo de transporte de glucosa (VH33), con la finalidad de incrementar la producción de ADNp. De las diferentes alternativas estudiadas, la inactivación combinada de los genes *recA*, *nupG* y *deoR* incrementaron a más del doble (4.33 mg/g) el contenido específico de ADNp en la cepa triple mutante, comparada con VH33.

La cepa triple mutante VH33 $\Delta(nupG\ deoR\ recA)$ retuvo además la ventaja de poseer un muy bajo sobreflujo metabólico. Ello permitió cultivarla exitosamente en modo lote empleando 100 g/L de glucosa, con lo que fue posible obtener más de 180 mg/L de ADNp, más del doble de lo producido por una cepa comercial bajo las mismas condiciones. Esto resulta una aportación particularmente valiosa para acelerar el desarrollo de productos basados en ADNp desde etapas tempranas, en los que la aplicación de métodos sofisticados de cultivo como el lote alimentado no siempre están disponibles.

Los resultados mostrados en la presente tesis muestran la utilidad de la ingeniería celular para mejorar los bioprocesos y para ofrecer alternativas de cultivo simples y productivas.

5. Perspectivas

Con base en los resultados obtenidos, surgen varias perspectivas que pueden conducir a la mejora de cultivos para la producción de ADNp empleando la cepa triple mutante VH33 $\Delta(nupG\ deoR\ recA)$:

- Toda vez que la desregulación de la síntesis de nucleótidos resultó útil para incrementar la producción de ADNp, es posible que incrementar el flujo de carbono hacia la vía de las pentosas fosfato sea benéfico para aumentar el contenido específico de ADNp. Esto podría lograrse mediante la sobreexpresión del gene que codifica para la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (*zwf*).
- El uso de medios de cultivo especialmente diseñados para la producción de ADNp ha logrado un sensible aumento en el contenido específico del mismo (Wang, 2001; Williams *et al.*, 2009). Podría evaluarse el uso de estos medios para el cultivo de la cepa VH33 $\Delta(nupG\ deoR\ recA)$, o bien la adición de aminoácidos específicos (Asp, Gln, Glu, Gly) al medio empleado en este trabajo con miras a mejorar la producción.
- Se ha observado que el uso de medios altamente concentrados reduce la velocidad de crecimiento y el rendimiento biomasa/sustrato de *E. coli* debido principalmente a la presión osmótica. Es necesario caracterizar la respuesta fisiológica a estas condiciones, ya que ello podría permitir nuevas modificaciones genéticas o al medio de cultivo para revertir dichos efectos.
- El uso de un cambio de temperatura (p. ej., de 37 a 42 °C) conduce a un incremento importante en el número de copias de plásmidos de la familia pUC. Esta alternativa podría ser evaluada para el caso particular de la cepa VH33 $\Delta(nupG\ deoR\ recA)$.

Producción Científica

- Impartición de clase “Modificación de genes en *Escherichia coli*”, Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Mayo 2010.
- Presentación Oral en el Congreso Nacional de Bioquímica. Realizado en Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, del 9 al 14 de Noviembre 2010.
- Manuscrito en preparación para ser sometido a Microbial Cell Factories, titulado: “Metabolic Engineering to Improve the Specific Yield of Plasmid DNA in an *Escherichia coli* Strain Engineered in the Substrate Uptake System”
- Solicitud de patente para de la cepa VH33 $\Delta(nupG\ deoR\ recA)$ y su cultivo de alta densidad celular en modo lote para la producción de ADN plasmídico. En trámite.

Referencias

Adachi, T., Mizuuchi, K., Menzel, R., Gellert, M., 1984. DNA-Sequence and Transcription of the Region Upstream of the *Escherichia-Coli GyrB*-Gene. *Nucleic Acids Research* 12, 6389-6395.

Ahmed, A.M., Kawamoto, H., Inouye, K., Hashiwata, Y., Sakaki, M., Seno, M., Shimamoto, T., 2005. Genomic analysis of a multidrug-resistant strain of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157 : H7 causing a family outbreak in Japan. *J Med Microbiol* 54, 867-872.

Altschul, S., Madden, T., Schaffer, A., Zhang, J.H., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D., 1998. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Faseb Journal* 12, A1326-A1326.

Antoniou, P., Hamilton, J., Koopman, B., Jain, R., Holloway, B., Lyberatos, G., Svoronos, S.A., 1990. Effect of Temperature and Ph on the Effective Maximum Specific Growth-Rate of Nitrifying Bacteria. *Water Res* 24, 97-101.

Barouch, D.H., Yang, Z.Y., Kong, W.P., Koriath-Schmitz, B., Sumida, S.M., Truitt, D.M., Kishko, M.G., Arthur, J.C., Miura, A., Mascola, J.R., Letvin, N.L., Nabel, G.J., 2005. A human T-cell leukemia virus type 1 regulatory element enhances the immunogenicity of human immunodeficiency virus type 1 DNA vaccines in mice and nonhuman primates. *J Virol* 79, 8828-8834.

Betteridge, T., Yang, J., Pittard, A.J., Praszkie, J., 2004. Role of RepA and DnaA proteins in the opening of the origin of DNA replication of an IncB plasmid. *J Bacteriol* 186, 3785-3793.

Birnboim, H.C., 1988. Citation Classic - a Rapid Alkaline Extraction Procedure for Screening Recombinant Plasmid DNA. *Cc/Life Sci*, 12-12.

Bolívar, F., Flores, S., Flores, N., de Anda, R., Gonzalez, A., Escalante, A., Sigala, J.C., Gosset, G., 2005. Nutrient-scavenging stress response in an *Escherichia coli* strain lacking the phosphoenolpyruvate: Carbohydrate phosphotransferase system, as explored by gene expression profile analysis. *J Mol Microb Biotech* 10, 51-63.

Botsford, J.L., Harman, J.G., 1992. Cyclic AMP in prokaryotes. *Microbiol Rev* 56, 100-122.

Bouet, J.Y., Nordstrom, K., Lane, D., 2007. Plasmid partition and incompatibility--the focus shifts. *Mol Microbiol* 65, 1405-1414.

- Brena-Valle, M., Serment-Guerrero, J., 1998. SOS induction by gamma-radiation in *Escherichia coli* strains defective in repair and/or recombination mechanisms. *Mutagenesis* 13, 637-641.
- Brent, R., Ptashne, M., 1981. Mechanism of action of the *lexA* gene product. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 4204-4208.
- Brochu, D., Vadeboncoeur, C., 1999. The HPr(Ser) kinase of *Streptococcus salivarius*: purification, properties, and cloning of the *hprK* gene. *J Bacteriol* 181, 709-717.
- Bushell, M.E., Rozkov, A., Avignone-Rossa, C.A., Ertl, P.F., Jones, P., O'Kennedy, R.D., Smith, J.J., Dale, J.W., 2006. Fed batch culture with declining specific growth rate for high-yielding production of a plasmid containing a gene therapy sequence in *Escherichia coli* DH1. *Enzyme Microb Tech* 39, 47-50.
- Butler, V.A., 1996. Points to consider on plasmid DNA vaccines for preventive infectious disease indications. . Center for Biologics Evaluation and Research Food and Drug Administration
- Carnes, A.E., Hodgson, C.P., Williams, J.A., 2006a. Inducible *Escherichia coli* fermentation for increased plasmid DNA production. *Biotechnol Appl Biochem* 45, 155-166.
- Carnes, A.E., Hodgson, C.P., Williams, J.A., 2006b. Inducible *Escherichia coli* fermentation for increased plasmid DNA production. *Biotechnol Appl Biochem* 45, 155-166.
- Carnes, A.E., Williams, J.A., Hodgson, C.P., 2009. Improved *E. coli* plasmid DNA production. . World Patent Application WO2009025690.
- Casali, N., 2003. *Escherichia coli* host strains. *Methods Mol Biol* 235, 27-48.
- Cohen, S.N., Chang, A.C.Y., Hsu, L., 1972. Nonchromosomal Antibiotic Resistance in Bacteria - Genetic Transformation of *Escherichia-Coli* by R-Factor DNA. *P Natl Acad Sci USA* 69, 2110-&.
- Cooke, J.R., McKie, E.A., Ward, J.M., Keshavarz-Moore, E., 2004. Impact of intrinsic DNA structure on processing of plasmids for gene therapy and DNA vaccines. *J Biotechnol* 114, 239-254.
- Courcelle, J., Khodursky, A., Peter, B., Brown, P.O., Hanawalt, P.C., 2001. Comparative gene expression profiles following UV exposure in wild-type and SOS-deficient *Escherichia coli*. *Genetics* 158, 41-64.
- Craigie, R., Mizuuchi, K., 1986. Role of DNA Topology in Mu-Transposition - Mechanism of Sensing the Relative Orientation of 2-DNA Segments. *Cell* 45, 793-800.

Champoux, J.J., Leppard, J.B., 2005. Human DNA topoisomerase I: relaxation, roles, and damage control. *Chromosoma* 114, 75-85.

Chapman, B.S., Thayer, R.M., Vincent, K.A., Haigwood, N.L., 1991. Effect of intron A from human cytomegalovirus (Towne) immediate-early gene on heterologous expression in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 19, 3979-3986.

Chen, W., Graham, C., Ciccarelli, R.B., 1997. Automated fed-batch fermentation with feedback controls based on dissolved oxygen (DO) and pH for production of DNA vaccines. *J Ind Microbiol Biotechnol* 18, 43-48.

Cherepanov, P.P., Wackernagel, W., 1995. Gene Disruption in *Escherichia-Coli* - Tcr and Km(R) Cassettes with the Option of Flp-Catalyzed Excision of the Antibiotic-Resistance Determinant. *Gene* 158, 9-14.

Das, N., Valjavec-Gratian, M., Basuray, A.N., Fekete, R.A., Papp, P.P., Paulsson, J., Chattoraj, D.K., 2005. Multiple homeostatic mechanisms in the control of P1 plasmid replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 2856-2861.

Davidson, A.H., Traub-Dargatz, J.L., Rodeheaver, R.M., Ostlund, E.N., Pedersen, D.D., Moorhead, R.G., Stricklin, J.B., Dewell, R.D., Roach, S.D., Long, R.E., Albers, S.J., Callan, R.J., Salman, M.D., 2005. Immunologic responses to West Nile virus in vaccinated and clinically affected horses. *J Am Vet Med Assoc* 226, 240-245.

De Anda, R., Lara, A.R., Hernandez, V., Hernandez-Montalvo, V., Gosset, G., Bolivar, F., Ramirez, O.T., 2006. Replacement of the glucose phosphotransferase transport system by galactose permease reduces acetate accumulation and improves process performance of *Escherichia coli* for recombinant protein production without impairment of growth rate. *Metab Eng* 8, 281-290.

del Solar, G., Giraldo, R., Ruiz-Echevarria, M.J., Espinosa, M., Diaz-Orejas, R., 1998. Replication and control of circular bacterial plasmids. *Microbiol Mol Biol Rev* 62, 434-464.

Deutscher, J., Pevec, B., Beyreuther, K., Kiltz, H.H., Hengstenberg, W., 1986. Streptococcal phosphoenolpyruvate-sugar phosphotransferase system: amino acid sequence and site of ATP-dependent phosphorylation of HPr. *Biochemistry* 25, 6543-6551.

Donnelly, J., Berry, K., Ulmer, J.B., 2003. Technical and regulatory hurdles for DNA vaccines. *Int J Parasitol* 33, 457-467.

Dorman, C.J., 1996. Flexible response: DNA supercoiling, transcription and bacterial adaptation to environmental stress. *Trends Microbiol* 4, 214-216.

Draper, G.C., Gober, J.W., 2002. Bacterial chromosome segregation. *Annual Review of Microbiology* 56, 567-597.

- Egelman, E.H., Stasiak, A., 1986. Structure of helical RecA-DNA complexes. Complexes formed in the presence of ATP-gamma-S or ATP. *J Mol Biol* 191, 677-697.
- Eiteman, M.A., Altman, E., 2006. Overcoming acetate in *Escherichia coli* recombinant protein fermentations. *Trends Biotechnol* 24, 530-536.
- FDA, 2007. Guidance for industry: considerations for plasmid DNA vaccines for infectious disease indications. US Food and Drug Administration.
- Ferguson, W.J., Braunschweiger, K.I., Braunschweiger, W.R., Smith, J.R., McCormick, J.J., Wasmann, C.C., Jarvis, N.P., Bell, D.H., Good, N.E., 1980. Hydrogen-Ion Buffers for Biological-Research. *Anal Biochem* 104, 300-310.
- Fernandez De Henestrosa, A.R., Ogi, T., Aoyagi, S., Chafin, D., Hayes, J.J., Ohmori, H., Woodgate, R., 2000. Identification of additional genes belonging to the LexA regulon in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 35, 1560-1572.
- Finkel, S.E., Yeiser, B., Pepper, E.D., Goodman, M.F., 2002. SOS-induced DNA polymerases enhance long-term survival and evolutionary fitness. *P Natl Acad Sci USA* 99, 8737-8741.
- Flores, N., Flores, S., Escalante, A., de Anda, R., Leal, L., Malpica, R., Georgellis, D., Gosset, G., Bolivar, F., 2005. Adaptation for fast growth on glucose by differential expression of central carbon metabolism and gal regulon genes in an *Escherichia coli* strain lacking the phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system. *Metabolic Engineering* 7, 70-87.
- Flores, S., Gosset, G., Flores, N., de Graaf, A.A., Bolivar, F., 2002. Analysis of carbon metabolism in *Escherichia coli* strains with an inactive phosphotransferase system by (13)C labeling and NMR spectroscopy. *Metab Eng* 4, 124-137.
- Friedhoff, P., Franke, I., Meiss, G., Wende, W., Krause, K.L., Pingoud, A., 1999. A similar active site for non-specific and specific endonucleases. *Nat Struct Biol* 6, 112-113.
- Frost, L.S., Ippen-Ihler, K., Skurray, R.A., 1994. Analysis of the sequence and gene products of the transfer region of the F sex factor. *Microbiol Rev* 58, 162-210.
- Fuchs, R.P.P., Napolitano, R., Janel-Bintz, R., Wagner, J., 2000. All three SOS-inducible DNA polymerases (Pol II, Pol IV and Pol V) are involved in induced mutagenesis. *Embo Journal* 19, 6259-6265.
- Galinier, A., Haiech, J., Kilhoffer, M.C., Jaquinod, M., Stulke, J., Deutscher, J., Martin-Verstraete, I., 1997. The *Bacillus subtilis* crh gene encodes a HPr-like protein involved in carbon catabolite repression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 8439-8444.

Garver, K.A., LaPatra, S.E., Kurath, G., 2005. Efficacy of an infectious hematopoietic necrosis (IHN) virus DNA vaccine in Chinook *Oncorhynchus tshawytscha* and sockeye *O. nerka* salmon. *Dis Aquat Organ* 64, 13-22.

Gerdes, K., Moller-Jensen, J., Bugge Jensen, R., 2000. Plasmid and chromosome partitioning: surprises from phylogeny. *Mol Microbiol* 37, 455-466.

Good, N.E., 1983. Citation Classic - Hydrogen-Ion Buffers for Biological-Research. *Cc/Life Sci*, 23-23.

Good, N.E., Winget, G.D., Winter, W., Connolly, T.N., Izawa, S., Singh, R.M.M., 1966. Hydrogen Ion Buffers for Biological Research. *Biochemistry* 5, 467-&.

Gosset, G., 2005. Improvement of *Escherichia coli* production strains by modification of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system. *Microb Cell Fact* 4, 14.

Hansen, S.E.W., Jensen, N., Munchpetersen, A., 1987. Studies on the Sequence and Structure of the *Escherichia-Coli* K-12 *nupg* Gene, Encoding a Nucleoside-Transport System. *European Journal of Biochemistry* 168, 385-391.

Holmes, M.L., Pfeifer, F., Dyall-Smith, M.L., 1995. Analysis of the halobacterial plasmid pHK2 minimal replicon. *Gene* 153, 117-121.

Herrera, E., Barcenas, P., Hernandez, R., Mendez, A., Perez-Ishiwara, G., Barron, B., 2010. A 176 amino acid polypeptide derived from the mumps virus HN ectodomain shows immunological and biological properties similar to the HN protein. *Virology* 7.

Horton, J.R., Liebert, K., Hattman, S., Jeltsch, A., Cheng, X., 2005. Transition from nonspecific to specific DNA interactions along the substrate-recognition pathway of dam methyltransferase. *Cell* 121, 349-361.

Howard-Flanders, P., West, S.C., Rusche, J.R., Egelman, E.H., 1984. Molecular mechanisms of general genetic recombination: the DNA-binding sites of RecA protein. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 49, 571-580.

Huber, H., Pacher, C., Necina, R., Kollmann, F., Reinisch, C., 2005. Method for producing plasmid DNA on a manufacturing scale by fermentation of the *Escherichia coli* K-12 strain JM108. World Patent Application.

Huppe, H.C., Farr, T.J., Turpin, D.H., 1993. Evidence for Redox Regulation of the Oxidative Pentose-Phosphate Pathway during Photosynthetic Nitrate Assimilation in an N-Limited Green-Alga. *Plant Physiol* 102, 44-44.

Kato, J., Nishimura, Y., Imamura, R., Niki, H., Hiraga, S., Suzuki, H., 1990. New Topoisomerase Essential for Chromosome Segregation in *Escherichia-Coli*. *Cell* 63, 393-404.

Keseler, I.M., Collado-Vides, J., Gama-Castro, S., Ingraham, J., Paley, S., Paulsen, I.T., Peralta-Gil, M., Karp, P.D., 2005. EcoCyc: a comprehensive database resource for *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* 33, D334-337.

Kim, J.Y., Ryu, D.D.Y., 1991. The Effects of Plasmid Content, Transcription Efficiency, and Translation Efficiency on the Productivity of a Cloned Gene Protein in *Escherichia-Coli*. *Biotechnology and Bioengineering* 38, 1271-1279.

Kimata, K., Takahashi, H., Inada, T., Postma, P., Aiba, H., 1997. cAMP receptor protein-cAMP plays a crucial role in glucose-lactose diauxie by activating the major glucose transporter gene in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 12914-12919.

Knabben, I., Regestein, L., Marquering, F., Steinbusch, S., Lara, A.R., Buchs, J., 2010. High cell-density processes in batch mode of a genetically engineered *Escherichia coli* strain with minimized overflow metabolism using a pressurized bioreactor. *J Biotechnol* 150, 73-79.

Kolb, A., Busby, S., Buc, H., Garges, S., Adhya, S., 1993. Transcriptional regulation by cAMP and its receptor protein. *Annu Rev Biochem* 62, 749-795.

Kravanja, M., Engelmann, R., Dossonnet, V., Bluggel, M., Meyer, H.E., Frank, R., Galinier, A., Deutscher, J., Schnell, N., Hengstenberg, W., 1999. The hprK gene of *Enterococcus faecalis* encodes a novel bifunctional enzyme: the HPr kinase/phosphatase. *Mol Microbiol* 31, 59-66.

Krieg, A.M., 2002. Vectors and methods for immunization or therapeutic protocol. United States Patent 6339068.

Kutzler, M.A., Weiner, D.B., 2008. DNA vaccines: ready for prime time? *Nat Rev Genet* 9, 776-788.

Kuzminov, A., 1999. Recombinational repair of DNA damage in *Escherichia coli* and bacteriophage lambda. *Microbiol Mol Biol Rev* 63, 751-813, table of contents.

Lahijani, R., Hulley, G., Soriano, G., Horn, N.A., Marquet, M., 1996. High-yield production of pBR322-derived plasmids intended for human gene therapy by employing a temperature-controllable point mutation. *Hum Gene Ther* 7, 1971-1980.

Lara, A.R., 2011. Producción de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. *Revista Mexicana de Ingeniera Química*. 10, 209-223.

Lara, A.R., Caspeta, L., Gosset, G., Bolivar, F., Ramirez, O.T., 2008. Utility of an *Escherichia coli* strain engineered in the substrate uptake system for improved culture performance at high glucose and cell concentrations: an alternative to fed-batch cultures. *Biotechnol Bioeng* 99, 893-901.

- Lara, A.R., Taymaz-Nikerel, H., Mashego, M.R., van Gulik, W.M., Heijnen, J.J., Ramirez, O.T., van Winden, W.A., 2009. Fast dynamic response of the fermentative metabolism of *Escherichia coli* to aerobic and anaerobic glucose pulses. *Biotechnol Bioeng* 104, 1153-1161.
- Leach, D.R., Stahl, F.W., 1983. Viability of lambda phages carrying a perfect palindrome in the absence of recombination nucleases. *Nature* 305, 448-451.
- Lehman, I.R., 1962. Novel Nuclease Activity in E Coli. *Fed Proc* 21, 378-&.
- Lehman, I.R., 1963a. Nucleases of E-Coli .1. A DNA-Specific Phosphodiesterase. *Method Enzymol* 6, 40-43.
- Lehman, I.R., 1963b. Nucleases of E-Coli .2. An Rna-Inhibitible Endonuclease. *Method Enzymol* 6, 44-49.
- Leite, J.P., Cousin, C., Heysen, A., D'Halluin, J.C., 1989. Negative effect of a cis-acting pBR322 element on adenovirus E1a gene expression. *Gene* 82, 351-356.
- Lewis, P.J., 2001. Bacterial chromosome segregation. *Microbiol-Uk* 147, 519-526.
- Li, G., Dong, B.X., Lan, O.Y., Qin, L., 2007. A rapid and simple method for screening large numbers of recombinant DNA clones. *J Rapid Meth Aut Mic* 15, 244-252.
- Lindner, C., Galinier, A., Hecker, M., Deutscher, J., 1999. Regulation of the activity of the *Bacillus subtilis* antiterminator LicT by multiple PEP-dependent, enzyme I- and HPr-catalysed phosphorylation. *Mol Microbiol* 31, 995-1006.
- Lipps, G., 2008. *Plasmids: Current Research and Future Trends*. Caister Academic Press.
- Listner, K., Bentley, L., Okonkowski, J., Kistler, C., Wnek, R., Caparoni, A., Junker, B., Robinson, D., Salmon, P., Chartrain, M., 2006. Development of a highly productive and scalable plasmid DNA production platform. *Biotechnol Prog* 22, 1335-1345.
- Lobner-Olesen, A., Skovgaard, O., Marinus, M.G., 2005. Dam methylation: coordinating cellular processes. *Curr Opin Microbiol* 8, 154-160.
- Luli, G.W., Strohl, W.R., 1990. Comparison of Growth, Acetate Production, and Acetate Inhibition of *Escherichia-Coli* Strains in Batch and Fed-Batch Fermentations. *Appl Environ Microb* 56, 1004-1011.
- Luong, R.H., Baer, K.E., Craft, D.M., Ettinger, S.N., Scase, T.J., Bergman, P.J., 2006. Prognostic significance of intratumoral microvessel density in canine soft-tissue sarcomas. *Vet Pathol* 43, 622-631.
- Lusetti, S.L., Drees, J.C., Stohl, E.A., Seifert, H.S., Cox, M.M., 2004. The DinI and RecX proteins are competing modulators of RecA function. *J Biol Chem* 279, 55073-55079.

- Margulies, C., Kaguni, J.M., 1996. Ordered and sequential binding of DnaA protein to oriC, the chromosomal origin of *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* 271, 17035-17040.
- Meijer, W.J.J., Deboer, A.J., Vantongeren, S., Venema, G., Bron, S., 1995. Characterization of the Replication Region of the Bacillus-Subtilis Plasmid Pls20 - a Novel Type of Replicon. *Nucleic Acids Research* 23, 3214-3223.
- Mortensen, L., Dandanell, G., Hammer, K., 1989. Purification and Characterization of the *deoR* Repressor of *Escherichia coli*. *Embo Journal* 8, 325-331.
- Munch-Petersen, A.M., 1983. Metabolism of nucleotides, nucleosides and nucleobases in microorganisms. Academic Press, London.
- Muskhelishvili, G., Blot, N., Mavathur, R., Geertz, M., Travers, A., 2006. Homeostatic regulation of supercoiling sensitivity coordinates transcription of the bacterial genome. *Embo Reports* 7, 710-715.
- Novosad, C.A., Bergman, P.J., O'Brien, M.G., McKnight, J.A., Charney, S.C., Selting, K.A., Graham, J.C., Correa, S.S., Rosenberg, M.P., Gieger, T.L., 2006. Retrospective evaluation of adjunctive doxorubicin for the treatment of feline mammary gland adenocarcinoma: 67 cases. *J Am Anim Hosp Assoc* 42, 110-120.
- O'Kennedy, R.D., Baldwin, C., Keshavarz-Moore, E., 2000. Effects of growth medium selection on plasmid DNA production and initial processing steps. *J Biotechnol* 76, 175-183.
- Okonkowski, J., Kizer-Bentley, L., Listner, K., Robinson, D., Chartrain, M., 2005. Development of a robust, versatile, and scalable inoculum train for the production of a DNA vaccine. *Biotechnol Prog* 21, 1038-1047.
- Orkin, S., 1990. *Molecular-Cloning - a Laboratory Manual*, 2nd Edition - Sambrook, J., Fritsch, E., Maniatis, T. *Nature* 343, 604-605.
- Pablos, T.E., Soto, R., Mora, E.M., Le Borgne, S., Ramirez, O.T., Gosset, G., Lara, A.R., 2011. Enhanced production of plasmid DNA by engineered *Escherichia coli* strains. *J Biotechnol*. En prensa.
- Pal, S.K., Chatteraj, D.K., 1988. P1 plasmid replication: initiator sequestration is inadequate to explain control by initiator-binding sites. *J Bacteriol* 170, 3554-3560.
- Panja, S., Saha, S., Jana, B., Basu, T., 2006. Role of membrane potential on artificial transformation of *E. coli* with plasmid DNA. *J Biotechnol* 127, 14-20.
- Paulsson, J., Ehrenberg, M., 1998. Trade-off between segregational stability and metabolic burden: a mathematical model of plasmid ColE1 replication control. *J Mol Biol* 279, 73-88.

Persmark, M., Weigl, D., Molloy, M.J., Clayton, T.M., Griffith, J., Smith, C.R., Steward, T., Merrill, B.M., DePrince, R.B., Jone, C.S., 2006. Characterization of a topologically aberrant plasmid population from pilot-scale production of clinical-grade DNA. *Journal of Biotechnology* 121, 1-12.

Phue, J.N., Lee, S.J., Trinh, L., Shiloach, J., 2008. Modified *Escherichia coli* B (BL21), a superior producer of plasmid DNA compared with *Escherichia coli* K (DH5alpha). *Biotechnol Bioeng* 101, 831-836.

Phue, J.N., Noronha, S.B., Hattacharyya, R., Wolfe, A.J., Shiloach, J., 2005. Glucose metabolism at high density growth of *E. coli* B and *E. coli* K: differences in metabolic pathways are responsible for efficient glucose utilization in *E. coli* B as determined by microarrays and Northern blot analyses. *Biotechnol Bioeng* 90, 805-820.

Postel, E.H., 1985. Enhancement of Genetic-Transformation Frequencies of Mammalian-Cell Cultures by Damage to the Cell-DNA. *Molecular & General Genetics* 201, 136-139.

Postma, P.W., Lengeler, J.W., Jacobson, G.R., 1993. Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiol Rev* 57, 543-594.

Prazeres, D.M., Ferreira, G.N., Monteiro, G.A., Cooney, C.L., Cabral, J.M., 1999. Large-scale production of pharmaceutical-grade plasmid DNA for gene therapy: problems and bottlenecks. *Trends Biotechnol* 17, 169-174.

Ramseier, T.M., Negre, D., Cortay, J.C., Scarabel, M., Cozzone, A.J., Saier, M.H., Jr., 1993. In vitro binding of the pleiotropic transcriptional regulatory protein, FruR, to the fru, pps, ace, pts and icd operons of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *J Mol Biol* 234, 28-44.

Ratushny, A.V., Smirnova, O.G., Usuda, Y., Matsui, K., 2006. Regulation of the pentose phosphate pathway in *Escherichia coli*: Gene network reconstruction and mathematical modeling of metabolic reactions. *Proceedings of the Fifth International Conference on Bioinformatics of Genome Regulation and Structure, Vol 2*, 40-44.

Reizer, J., Bachem, S., Reizer, A., Arnaud, M., Saier, M.H., Jr., Stulke, J., 1999. Novel phosphotransferase system genes revealed by genome analysis - the complete complement of PTS proteins encoded within the genome of *Bacillus subtilis*. *Microbiology* 145 (Pt 12), 3419-3429.

Reizer, J., Reizer, A., Saier, M.H., Jr., 1995. Novel phosphotransferase system genes revealed by bacterial genome analysis--a gene cluster encoding a unique Enzyme I and the proteins of a fructose-like permease system. *Microbiology* 141 (Pt 4), 961-971.

Riley, M., Abe, T., Arnaud, M.B., Berlyn, M.K., Blattner, F.R., Chaudhuri, R.R., Glasner, J.D., Horiuchi, T., Keseler, I.M., Kosuge, T., Mori, H., Perna, N.T., Plunkett, G., 3rd, Rudd, K.E., Serres, M.H., Thomas, G.H., Thomson, N.R., Wishart, D., Wanner, B.L., 2006.

Escherichia coli K-12: a cooperatively developed annotation snapshot--2005. *Nucleic Acids Res* 34, 1-9.

Roca, A.I., Cox, M.M., 1997. RecA protein: structure, function, and role in recombinational DNA repair. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 56, 129-223.

Rozkov, A., Avignone-Rossa, C.A., Ertl, P.F., Jones, P., O'Kennedy, R.D., Smith, J.J., Dale, J.W., Bushell, M.E., 2004. Characterization of the metabolic burden on *Escherichia coli* DH1 cells imposed by the presence of a plasmid containing a gene therapy sequence. *Biotechnol Bioeng* 88, 909-915.

Rudd, K.E., 2000. EcoGene: a genome sequence database for *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Res* 28, 60-64.

Ryan, W., Parulekar, S.J., 1991. Recombinant Protein-Synthesis and Plasmid Instability in Continuous Cultures of *Escherichia-Coli* Jm103 Harboring a High Copy Number Plasmid. *Biotechnology and Bioengineering* 37, 415-429.

Saier, M.H., Jr., Ramseier, T.M., 1996. The catabolite repressor/activator (Cra) protein of enteric bacteria. *J Bacteriol* 178, 3411-3417.

Samson, L., Cairns, J., 1977. A new pathway for DNA repair in *Escherichia coli*. *Nature* 267, 281-283.

Sassanfar, M., Roberts, J.W., 1990. Nature of the SOS-inducing signal in *Escherichia coli*. The involvement of DNA replication. *J Mol Biol* 212, 79-96.

Sawers, G., Kaiser, M., Sirko, A., Freundlich, M., 1997. Transcriptional activation by FNR and CRP: reciprocity of binding-site recognition. *Mol Microbiol* 23, 835-845.

Schmiege.H, 1972. Phage P22-Mutants with Increased or Decreased Transduction Abilities. *Molecular and General Genetics* 119, 75-&.

Schnarr, M., Pouyet, J., Granger-Schnarr, M., Daune, M., 1985. Large-scale purification, oligomerization equilibria, and specific interaction of the LexA repressor of *Escherichia coli*. *Biochemistry* 24, 2812-2818.

Schneider, R., Travers, A., Muskhelishvili, G., 1997. FIS modulates growth phase-dependent topological transitions of DNA in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* 26, 519-530.

Schoenfeld, T., 1995. Effects of bacterial strains carrying the endA1 genotype on DNA quality isolated with Wizard® Plasmid Purification Systems. *Promega Notes* 53, 12-20.

Singer, A., Eiteman, M.A., Altman, E., 2009. DNA plasmid production in different host strains of *Escherichia coli*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 36, 521-530.

Soto, R., Caspeta, L., Barrón, B., Gosset, G., Ramírez, O. T., Lara, A. R., 2011. High cell-density cultivation in batch mode for plasmid DNA production by a metabolically engineered *E. coli* strain with minimized overflow metabolism. *Biochemical Engineering Journal*. 56(3), 165-171.

Steck, T.R., Drlica, K., 1984. Bacterial Chromosome Segregation - Evidence for DNA Gyrase Involvement in Decatenation. *Cell* 36, 1081-1088.

Stork, A.D.M., Kemperman, H., Erkelens, D.W., Veneman, T.F., 2005. Comparison of the accuracy of the hemocue glucose analyzer with the Yellow Springs Instrument glucose oxidase analyzer, particularly in hypoglycemia. *Eur J Endocrinol* 153, 275-281.

Stulke, J., Arnaud, M., Rapoport, G., Martin-Verstraete, I., 1998. PRD--a protein domain involved in PTS-dependent induction and carbon catabolite repression of catabolic operons in bacteria. *Mol Microbiol* 28, 865-874.

Summers, D.K., 1996. *The Biology of Plasmids*. Wiley-Blackwell, Reino Unido.

Tavel, J.A., Martin, J.E., Kelly, G.G., Enama, M.E., Shen, J.M., Gomez, P.L., Andrews, C.A., Koup, R.A., Bailer, R.T., Stein, J.A., Roederer, M., Nabel, G.J., Graham, B.S., 2007. Safety and immunogenicity of a Gag-Pol candidate HIV-1 DNA vaccine administered by a needle-free device in HIV-1-seronegative subjects. *J Acquir Immune Defic Syndr* 44, 601-605.

Tavera, L., Breña, M., Pérez, M., Serment, J. & Balcázar, M., 2003. Response to alpha and gamma radiations of *Escherichia coli* strains defective in repair or protective mechanisms. *Radiat Meas* 36, 591-595.

Thacker, E.L., Holtkamp, D.J., Khan, A.S., Brown, P.A., Draghia-Akli, R., 2006. Plasmid-mediated growth hormone-releasing hormone efficacy in reducing disease associated with *Mycoplasma hyopneumoniae* and porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *J Anim Sci* 84, 733-742.

Thomas, J.M., Hodes, M.E., 1981. A New Discontinuous Buffer System for the Electrophoresis of Cationic Proteins at near-Neutral Ph. *Anal Biochem* 118, 194-196.

Thomas, S.M., MacPhee, D.G., 1987. RecA-independent mutagenesis in *Escherichia coli* may be subject to glucose repression. *Mutat Res* 180, 67-73.

Tortosa, P., Aymerich, S., Lindner, C., Saier, M.H., Jr., Reizer, J., Le Coq, D., 1997. Multiple phosphorylation of SacY, a *Bacillus subtilis* transcriptional antiterminator negatively controlled by the phosphotransferase system. *J Biol Chem* 272, 17230-17237.

Tse-Dinh, Y.C., Liu, I.F., Sutherland, J.H., Cheng, B., 2011. Topoisomerase I function during *Escherichia coli* response to antibiotics and stress enhances cell killing from stabilization of its cleavage complex. *J Antimicrob Chemoth* 66, 1518-1524.

- Ulmer, J.B., Wahren, B., Liu, M.A., 2006. Gene-based vaccines: recent technical and clinical advances. *Trends Mol Med* 12, 216-222.
- Umezū, K., Chi, N.W., Kolodner, R.D., 1993. Biochemical interaction of the *Escherichia coli* RecF, RecO, and RecR proteins with RecA protein and single-stranded DNA binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 3875-3879.
- Voss, C., Schmidt, T., Schleaf, M., Friehs, K., Flaschel, E., 2004. Effect of ammonium chloride on plasmid DNA production in high cell density batch culture for biopharmaceutical use. *J Chem Technol Biotechnol* 79, 57-62.
- Wagner, E.G.H., Brantl, S., 1998. Kissing and RNA stability in antisense control of plasmid replication. *Trends Biochem Sci* 23, 451-454.
- Wagner, H., 2008. The sweetness of the DNA backbone drives Toll-like receptor 9. *Curr Opin Immunol* 20, 396-400.
- Wang, Z., Le GW., Shi, YH, Wegrzyn, G. , 2001. Medium design for plasmid DNA production based on stoichiometric model. *Process Biochem* 36, 1085–1093.
- Wanner, B.L., Datsenko, K.A., 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *P Natl Acad Sci USA* 97, 6640-6645.
- Whitby, M.C., Lloyd, R.G., 1995. Altered SOS induction associated with mutations in *recF*, *recO* and *recR*. *Mol Gen Genet* 246, 174-179.
- WHO, 2007. Annex 1: Guidelines for assuring the quality and nonclinical safety evaluation of DNA vaccines. World Health Organization Technical Report Series No 941.
- Williams, J.A., Carnes, A.E., Hodgson, C.P., 2009. Plasmid DNA vaccine vector design: impact on efficacy, safety and upstream production. *Biotechnol Adv* 27, 353-370.
- Yau, S.Y., Keshavarz-Moore, E., Ward, J., 2008. Host strain influences on supercoiled plasmid DNA production in *Escherichia coli*: Implications for efficient design of large-scale processes. *Biotechnol Bioeng* 101, 529-544.
- Zeng, X.M., Saxild, H.H., 1999. Identification and characterization of a DeoR-specific operator sequence essential for induction of *dra-nupC-pdp* operon expression in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* 181, 1719-1727.