



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

Estudio transcriptómico de la cepa W3110 de
Escherichia coli en presencia de ácido cumárico

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestro en Ciencias Bioquímicas

PRESENTA:

B. E. José Ignacio Rodríguez Ochoa

TUTOR:

Dr. Guillermo Gosset Lagarda

Instituto de Biotecnología, UNAM

COMITÉ TUTORAL:

Dra. Rosa María Gutiérrez Ríos

Instituto de Biotecnología, UNAM

Dr. José Utrilla Carreri

Centro de Ciencias Genómicas, UNAM

Cuernavaca, Morelos. Septiembre 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Ingeniería de Vías Metabólicas, Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología, UNAM, dirigido por el Dr. Guillermo Gosset Lagarda

Cuernavaca, Morelos. 2020

Agradecimientos

- Agradezco al Dr. Guillermo Gosset Lagarda por darme la oportunidad de trabajar en este proyecto de investigación, por su orientación y formación profesional a mi persona.
- A mi comité tutorial, Dr. José Utrilla Carreri, por sus valiosos comentarios y facilitarme recursos necesarios para poder llevar a cabo los experimentos de esta investigación. A la Dra. Rosa María Gutiérrez Ríos, por sus observaciones y comentarios a través de los exámenes tutorales, por facilitarme material y equipo necesario para realizar los experimentos de este trabajo.
- A los investigadores principales del Laboratorio de Ingeniería de Vías Metabólicas, Dr. Francisco Bolívar Zapata, Dr. Alfredo Martínez Jiménez, Dr. Adelfo Escalante Lozada y Dr. Luis Caspeta Guadarrama. Por apoyar en la realización del presente proyecto a través de comentarios, observaciones, recursos y por facilitar la posibilidad de realizar esta investigación.
- A los técnicos del Laboratorio, Dra. Noemí Flores Mejía, por su valioso apoyo técnico en los experimentos de extracción de RNA y RT-qPCR, Q.I Luz María Martínez Mejía, por su apoyo técnico en los métodos de biología molecular y la valiosa enseñanza en el transcurso de la realización del presente trabajo, M.C. Georgina Teresa Hernández Chávez, por su apoyo técnico en experimentos de HPLC, y facilitarme el material necesario para trabajar, siempre con la gran amabilidad y felicidad que la caracteriza.
- A los miembros de mi jurado, Dr. José Luis Puente García (presidente), Dr. Edmundo Catillo Rosales (secretario), Dra. Susana Brom Klanner (vocal), Dr. Adrián Ochoa Leyva (vocal) y Dr. Lorenzo Segovia Forcella (vocal). Por la evaluación del presente trabajo.
- A mis compañeros del Laboratorio, Fidel, Ángeles, Rubén, Emily, Karlita, Daniel Rodríguez, Dante “El patrón”, Juan Carlos, y todos mis compañeros del laboratorio IVM, por hacer amena y divertida la estancia en el laboratorio y por su valiosa amistad.

- Al personal del laboratorio, Biol. Manuel Saucedo Ramírez, C.P. Rubí Margarita Robledo López, Sra. Aurelia González Guzmán. Por su valioso apoyo en el laboratorio.
- Al personal de la Unidad Universitaria de Secuenciación Masiva y Bioinformática del IBt.
- Al personal de Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN del IBt.
- Al apoyo del donativo PAPIIT IT200217
- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el apoyo de becas durante la realización de este proyecto.
- Al Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México.

Agradezco a mi familia, por apoyarme y estar conmigo desde siempre. A mi madre Silvia, por brindarme la educación y el amor para desarrollarme como persona. A mi padre Pedro, por apoyarme y educarme para tomar el camino profesional en el que me he desarrollado. A mis hermanos, Aldo y Pedro, por siempre apoyarme en mis decisiones y ser una guía en el camino de mi vida.

“La mente no es un vaso por llenar, sino una lámpara por encender”

“Plutarco”

Índice

Resumen.....	6	4.1 RT-qPCR.....	45
I. Introducción.....	8	5. Respuesta transcriptómica en presencia de 5 mM de pHCA.....	52
II. Fenilpropanoides.....	9	6. Evaluación de la fusión <i>aaeX::gfpmut2</i> como biosensor de pHCA.....	60
III. Antecedentes.....	12	7. Regulación transcripcional del operón <i>aaeXAB</i>	66
3.1 Vía del shikimato y síntesis de L-Tir.....	12	VII. Conclusiones.....	73
3.2 Sistema PTS.....	15	Métodos suplementarios.....	75
3.3 Glicerol como fuente de carbono.....	17	Resultados suplementarios....	84
3.4 Toxicidad y genes que responden al pHCA.....	17	Referencias.....	87
3.5 Efectos prebióticos del pHCA....	20		
IV. Justificación.....	21		
-Pregunta de investigación...	23		
-Hipótesis.....	23		
-Objetivo.....	23		
-Objetivos particulares.....	23		
V. Metodología.....	24		
VI. Resultados.....	31		
1. Genotipificación de la cepa W3110.....	31		
2. Crecimiento en pHCA.....	32		
3. Respuesta transcripcional dinámica.....	34		
4. Respuesta transcripcional.....	43		

Resumen

El ácido cumárico (pHCA, ácido para-hidroxicinámico) es un metabolito aromático de plantas, y comúnmente está presente en la dieta humana. El pHCA y derivados de este, como el ácido cafeico (3,4-DHCA, ácido 3,4-dihidroxicinámico) tienen efectos positivos en la salud. Estos compuestos tienen aplicaciones en la industria farmacéutica, cosmética y de materiales. Se han empleado procesos biotecnológicos con cepas recombinantes de *Escherichia coli* para la producción de pHCA. Para comprender la respuesta fisiológica de *E. coli* al pHCA, en este trabajo se realizó un análisis transcriptómico de la cepa W3110 de *E. coli*, adicionando 5 mM de pHCA.

En el perfil transcriptómico se observó una inducción de genes de estrés ácido (*yhcN*), de resistencia a antibióticos (*marRAB*) y genes de chaperonas y proteasas, como *ibpBA*, *clpB*, *dnaKJ*, *spy*, *groL*, *htpG*, *hslUV*, *lon*, lo que sugiere que el pHCA genera daño oxidativo a proteínas, adicionalmente, se observó la inducción de genes relacionados al anabolismo de diferentes aminoácidos, como valina e isoleucina (*ilvDEA*), leucina (*leuOABD*), triptófano (*trpFCBA*), treonina (*thrABC*) y lisina (*lysA*), probablemente para recuperar las proteínas dañadas. Se observó una fuerte inducción de los genes *aaeB* y *aaeA* del operón *aaeXAB*, que codifica para un sistema de exportación de ácidos aromáticos. Los genes que fueron mayormente reprimidos codifican para proteínas importadoras de diferentes sustratos, como *ompD* (familia de porinas), *kdpF* (importador de K⁺), *frvA* (permeasa PTS de especificidad desconocida) y *yiaMNO* (importador de 2-3-dioxo-L-gluconato), esta respuesta pudo deberse a un estrés osmótico a causa de la pérdida de permeabilidad de la membrana plasmática.

El entendimiento de los efectos fisiológicos y metabólicos del pHCA en *E. coli*, puede ser de utilidad para el diseño de cepas productoras de pHCA, o derivados de este compuesto.

I. Introducción

Los fenilpropanoides, son una familia de compuestos aromáticos sintetizados principalmente en plantas, donde cumplen funciones de protección a diferentes tipos de estrés biótico y abiótico, así como en la síntesis de lignina. Los compuestos pHCA y 3,4-DHCA son intermediarios de la vía de síntesis de los fenilpropanoides, y son de gran interés industrial, ya que son precursores de fármacos (Su Jin Le, 2018), antioxidantes (Hiroko Mori, 2009), saborizantes, cosméticos (Yong Chool Boo, 2019) y biopolímeros (Kaneko, 2006). La extracción a partir de plantas o la síntesis química, requieren del uso de solventes orgánicos y derivados del petróleo, respectivamente, en procesos caros y contaminantes. Una alternativa económica y ambientalmente amigable, es la síntesis en procesos de fermentación con microorganismos modificados genéticamente.

Se han desarrollado cepas modificadas de *E. coli* para producir pHCA (Vargas Tah, 2015, Joseph A. 2008) y 3,4-DHCA (J.L. Rodrigues, 2015), sin embargo, los rendimientos son bajos para competir con los otros métodos. Es importante entender las interacciones metabólicas y regulatorias, así como el efecto fisiológico del pHCA en *E. coli*, para el diseño de mejores cepas productoras.

Actualmente existen múltiples métodos analíticos y bioinformáticos para estudiar cuantitativamente la respuesta sistémica de las células en condiciones particulares, y a diferentes niveles del flujo de la información biológica. Los estudios transcriptómicos han facilitado estudiar la respuesta sistémica a nivel de regulación en la expresión génica, así como circuitos de señalización y efectos metabólicos y fisiológicos. Los datos obtenidos por estudios transcriptómicos son de gran importancia en la optimización de fenotipos de producción (Michael C. 2005).

Es interesante también analizar los mecanismos de tolerancia y biotransformación del pHCA presente en la dieta, por los microorganismos del intestino humano, como *E. coli*.

II. Fenilpropanoides

La estructura básica de estos compuestos consiste en un anillo fenólico con una cadena lateral C3, la cual se modifica para la síntesis de la variedad de compuestos de esta familia, como flavonoides, isoflavonoides, estilbenos, auronas, antocianinas, taninos, suberina, ligninanos y lignina. (Fig. 1).

La vía de síntesis de los fenilpropanoides comienza con la desaminación de los aminoácidos aromáticos fenilalanina y tirosina, catalizado por las enzimas fenil amonia liasa (PAL) y tirosin amonia liasa (TAL), generando ácido cinámico y ácido cumárico, respectivamente (Fig. 1), por lo que es una continuación de la vía sintética de los aminoácidos aromáticos, también conocida como vía del shikimato.

El primer intermediario de esta vía es el ácido cumárico (ácido para-hidroxicinámico, pHCA) producido directamente por la desaminación de tirosina, o bien mediante la hidroxilación del ácido cinámico (CA) por la enzima cinamato 4-hidroxilasa (C4H). Una segunda hidroxilación del ácido cumárico por la enzima cinamato 3-hidroxilasa (C3H) produce ácido cafeico (Fig 2.), y es un paso que dirige la vía hacia la síntesis de los monómeros de lignina, como son los ácidos sinápico y ferúlico, conocidos como ácidos hidroxicinámicos.

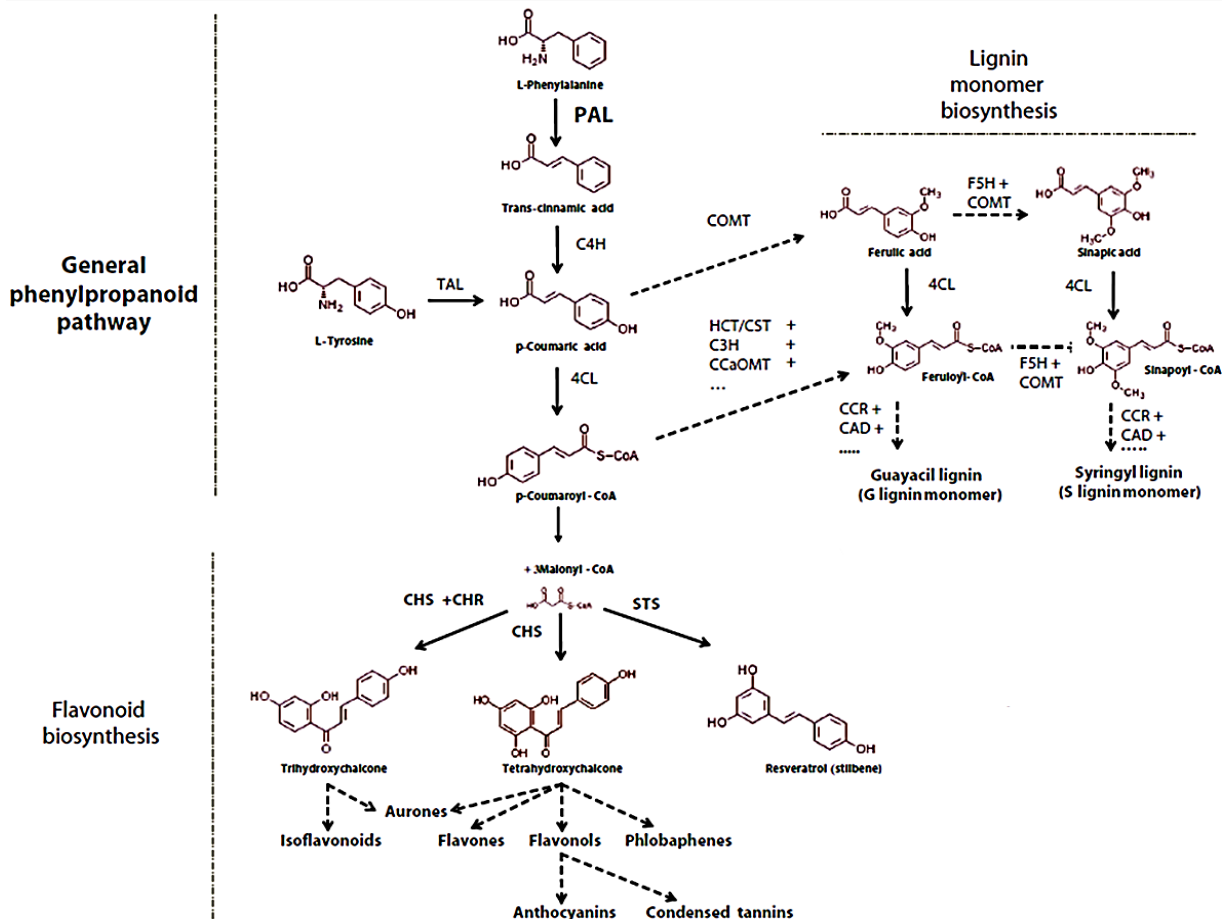


Fig. 1. Vía de síntesis de los fenilpropanoides. Tomado de Giovanni Emiliani, 2009

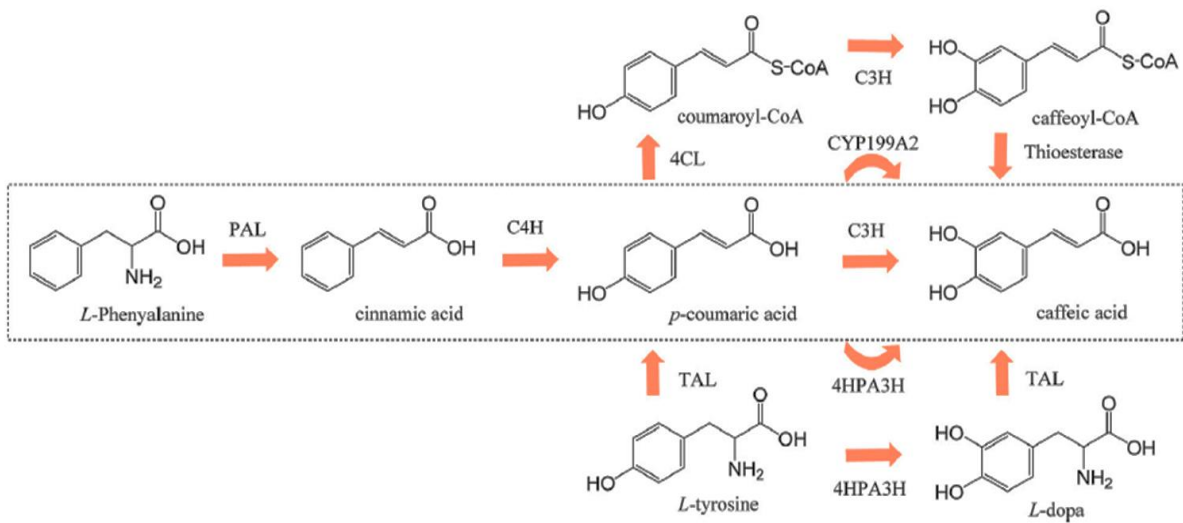


Fig. 2. Vía de síntesis de ácido cumárico (pHCA) y ácido cafeico (3,4-DHCA). Tomado de J.L. Rodrigues et al. 2015

El pHCA puede encontrarse en dátiles (2.89 mg/100g), arándano rojo (3.93 mg/100g), vino tinto (0.55 mg/100ml), salvia (4.95 mg/100g), tomillo (4.95 mg/100g), orégano (5.75 mg/100g), romero (3.67 mg/100g), clavo (8.49 mg/100g), cacahuete (2.53 mg/100g); mientras que el 3,4-DHCA se encuentra en mayor cantidad en bayas de aronia (141.14 mg/100g), arándano rojo (6.34 mg/ 100g), jugos de ciruela (5.10 mg/100ml), salvia (26.40 mg/ 100g), tomillo (21.28 mg/100g), menta verde (25 mg/100g), canela (24.20 mg/100g), anís estrella chino (20.20 mg/100g), orégano (10.70 mg/100g) (<http://phenol-explorer.eu/contents/polyphenol/454>).

Los compuestos pHCA y 3,4-DHCA se pueden encontrar en forma libre, pero es más común que se encuentren esterificados con alcoholes, aminas, monosacáridos y oligosacáridos, y en la pared celular de plantas se encuentran esterificados con polisacáridos y lignina o eterificados con lignina (Xun F. et. al., 2005) (Sun RC. Et. al., 2001); la forma libre de estos compuestos se purifica utilizando solventes orgánicos como dietil éter, etil acetato y cloroformo. La fracción esterificada es extraída por saponificación, y la eterificada a través de tratamientos ácidos o tratamiento con altas concentraciones de NaOH (4 M, 170 °C, 2 horas). (Kehan Pei, 2015). (Fig. 3). Debido a la similitud en la naturaleza química de estos compuestos, es complicado obtener extracciones puras de un compuesto específico (Rossi et al., 2003; Nayak et al., 2013).

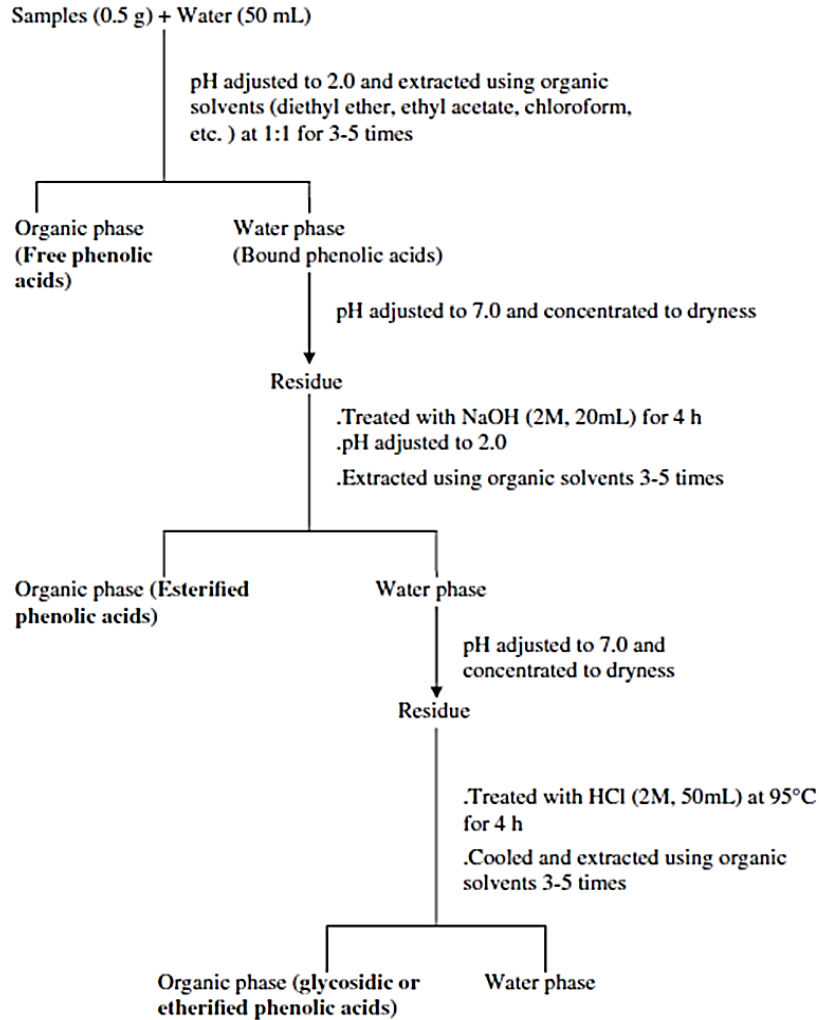


Figure 2. Determination procedure for free and bound phenolic acids

Fig. 3. Esquema de métodos de extracción de ácidos fenólicos a partir de materia prima vegetal. Tomado de Kehan Peit et. al. 2016

Debido al uso de estos potenciales contaminantes para el medio ambiente, los altos gastos energéticos, el uso de materia vegetal para su extracción, y el poco control de los cambios que pueden sufrir los conjugados durante el procesamiento y almacenamiento para su uso en las aplicaciones mencionadas, se ha propuesto su producción a través de ingeniería de vías metabólicas (IVM) en *E. coli*

III. ANTECEDENTES

En nuestro grupo de investigación se han desarrollado estrategias de IVM en *E. coli* para la producción de pHCA a partir de diferentes azúcares o glicerol (Vargas Tah et. al. 2015, Camacho Zaragoza et. al. 2016), las cuales involucran la expresión heteróloga de la enzima PAL/TAL de *Rhodotorula glutinis*, el incremento del flujo de carbono hacia la vía del shikimato a través de la sobreexpresión de la enzima transcetolasa A (*tktA*) y la expresión del gen *aroG^{fbr}*, el cual codifica para la enzima DAHPS (3-desoxi-7-fosfoheptulonato sintasa) insensible a regulación alostérica. (Fig. 5).

3.1 Incremento del flujo de carbono hacia la vía del shikimato y síntesis de L-tirosina

La disponibilidad de L-Tirosina (L-Tir) es necesaria para la síntesis de pHCA. Para obtener una mayor disponibilidad de L-Tir, es necesario manipular el metabolismo central para dirigir el flujo de carbono hacia la vía de síntesis de aminoácidos aromáticos, también conocida como vía del shikimato; a través del incremento de los precursores del primer intermediario de la vía, eritrosa-4-fosfato (E4P) y fosfoenolpiruvato (PEP). Para ello, se ha sobreexpresado la enzima transcetolasa (TktA), codificada por el gene del mismo nombre, y se eliminó el sistema PTS (Sistema fosfotransferasa), el cual consume 1 mol de PEP para fosforilar 1 mol de glucosa para su incorporación al metabolismo. La condensación de estos 2 intermediarios (E4P y PEP) genera el primer intermediario de la vía del shikimato, 3-desoxi-D-arabino-heptulosonato-7-fosfato (DAHP) a través de la enzima DAHP sintasa. En *E. coli*, la actividad DAHP sintasa es catalizado por 3 isoformas, AroF, AroG y AroH, este paso es regulada por un mecanismo alostérico de retroalimentación por los aminoácidos que finalizan la vía, L-Tir, L-Fen y Trp, respectivamente; una de las estrategias para incrementar el flujo en la síntesis de aminoácidos es expresar una enzima mutante insensible a regulación por retroalimentación, AroG^{fbr} (por sus siglas en inglés, feedback-resistant), ya que esta enzima aporta el 80% de la actividad DAHP sintasa (Fig. 5). Se ha demostrado que

la sobreexpresión de AroG^{fb}r junto con TktA incrementa al doble la disponibilidad de DAHP. (Gosset et al., 1996, Chávez-Béjar et al., 2008).

La enzima PAL/TAL de *R. glutinis* puede utilizar como sustrato L-Fen y L-Tir, tiene mayor afinidad hacia tirosina (L-Tir) (K_m L-Fen: 126 μ M, K_m L-Tir: 68 μ M) (Xue et al. 2007), sin embargo, la expresión de la enzima PAL/TAL de *R. glutinis* en *E. coli* produce en mayor cantidad ácido cinámico (CA) que pHCA, debido a que la eficiencia catalítica por L-Fen es mayor que L-Tir (L-Fen $K_{cat}/K_M=1.9 \times 10^4$ mM⁻¹ s⁻¹, L-Tir $K_{cat}/K_M=0.52 \times 10^3$ mM⁻¹ s⁻¹). Una estrategia para mejorar la relación pHCA/CA se realizó eliminando la vía de síntesis de L-Fen, a través de la eliminación del gene *pheA*, el cual codifica para la enzima Corismato Mutasa-Prefenato Deshidrogenasa (descarboxilasa, Proteína P) (CM-PD). La cepa W(*pheA*⁻), en conjunto con la sobreexpresión de los genes *aroG^{fb}r* y *tktA*, mostró un incremento de 10 veces en la producción de pHCA en comparación con la cepa isogénica *pheA*⁺ (Vargas Tah et al. 2015).

A partir del último intermediario común en la vía de síntesis de aminoácidos aromáticos, el corismato, la síntesis de L-Tir en *E. coli* procede a través de la enzima CM-PD (NAD⁺ oxidoreductasa, Proteína T), codificada por el gene *tyrA*. Esta enzima posee dos dominios catalíticos, el dominio corismato mutasa genera prefenato (PPA) a partir de corismato, y el dominio prefenato deshidrogenasa, que cataliza la conversión de prefenato a 4-hidroxifenilpiruvato (HPP); finalmente una transaminasa genera L-Tir (Fig 4). La enzima CM-PD es el paso de control primario para el flujo a la vía de L-Tir, la cual es regulada alostéricamente por L-Tir, particularmente en el dominio PD. Algunas estrategias para incrementar el flujo hacia la síntesis de L-Tir, se han realizado a través de la expresión de una enzima mutante CM-PD^{fb}r (insensibles a regulación) del dominio PD, logrando un incremento de 2-4 veces los títulos de L-Tir en comparación con la cepa isogénica. (Lütke-Eversloh et al. 2005) (Takai et al. 2005).

La enzima ciclohexadienil deshidrogenasa (TyrC), codificada por el gene *tyrC* se encuentra comúnmente en plantas y algunos microorganismos, como *Zymomonas mobilis*, y naturalmente es insensible a regulación alostérica por L-Tir. La expresión

de esta enzima, en conjunto con el dominio CM nativo de la enzima CM-PD, mostró un incremento de 6.8 veces la producción de L-Tir en comparación con la cepa isogénica que solo expresa la enzima CM-PD (Chavéz-Béjar et. al. 2008)

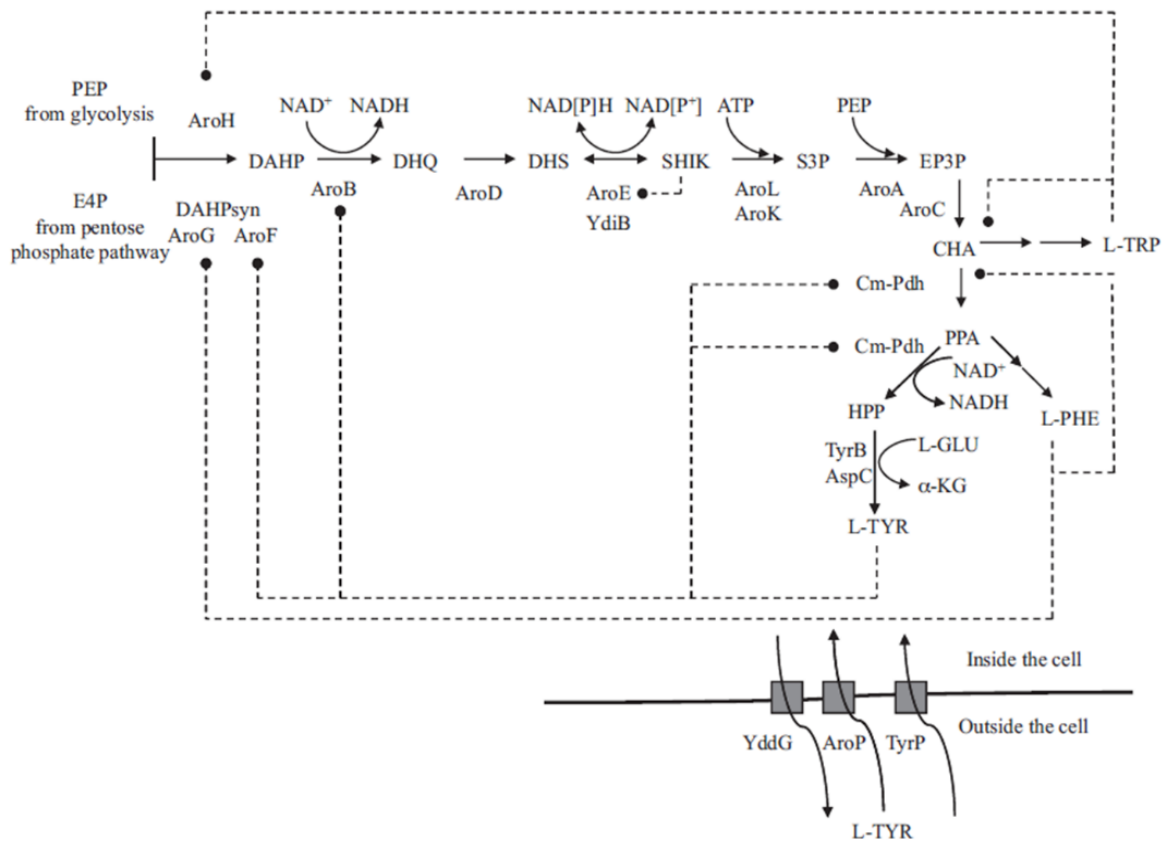


Fig. 4. Vía del shikimato y síntesis de L-Tir. Abreviaciones: PEP, fosfoenolpiruvato; E4P, eritrosa-4-fosfato; DAHP, 3-desoxi-D-arabino-heptusolonato-7-fosfato; DHQ, 3-dehidroquinato; DHS, 3-dehidroshikimato; SHIK, shikimato; S3P, shikimato-3-fosfato; EP3P, 5-enoilpiruvilshikimato-3-fosfato; CHA, corismato; PPA, prefenato; HPP, 4-hidroxifenilpiruvato; L-GLU, L-glutamato; KG, cetoglutarato; DAHPsyn, DAHP sintasa; AroB, DHQ sintasa; AroD, DHQ, deshidratasa; AroE, SHIK deshidrogenasa; YdiB, SHIK deshidrogenasa; AroK/AroL, SHIK kinase I/II; AroA, EP3P sintasa; AroC, CHA sintasa; Cm-Pdh, corismato mutasa-prefenato deshidrogenasa de *E. coli*; TyrB, L-Tir aminotransferasa; AspC, aspartato aminotransferasa; AroP, sistema de transporte general; TyrP, L-Tir sistema de transporte específico; YddG, sistema de transporte de aromaticos. Tomado de Chávez-Béjar et. al., 2012.

3.2 Sistema PTS Una de las modificaciones para incrementar la disponibilidad de PEP es la eliminación del sistema fosfotransferasa fosfoenolpiruvato:azúcares (PTS), un mecanismo de transporte activo utilizado por bacterias involucrado en incorporar azúcares dentro de la célula, donde la fuente de energía está dado por el PEP. Aproximadamente, el 50% del PEP disponible en *E. coli* es utilizado por este sistema de transporte. (Rodríguez et. al. 2014). Debido al interés en la disponibilidad de PEP para la producción de fenilpropanoides, se han diseñado cepas de *E. coli* mutantes PTS⁻, las cuales muestran velocidades muy bajas de consumo de glucosa y crecimiento, siendo poco útiles en procesos de producción. Para esto, se han evolucionado mutantes PTS⁻ que muestren una tasa de crecimiento mayor con el fin de seleccionar un fenotipo PTS⁻ glucosa⁺. La caracterización de estas cepas mostro un mecanismo PTS-independiente en la incorporación de glucosa que involucra otros importadores como la permeasa de galactosa (GalP) y glucokinasa (GlcK), la cual fosforila la glucosa citoplasmática usando ATP como donador de fosfato. (Flores et al., 1996, 2002). Se han utilizado estas cepas con fenotipo PTS⁻ glucosa⁺ para producción de pHCA (Vargas-Tah et. al., 2015) expresando las modificaciones mencionadas anteriormente en estas cepas (expresión heteróloga de enzimas PAL/TAL, AroG^{fbr} y sobreexpresión de TktA). (Fig. 5)

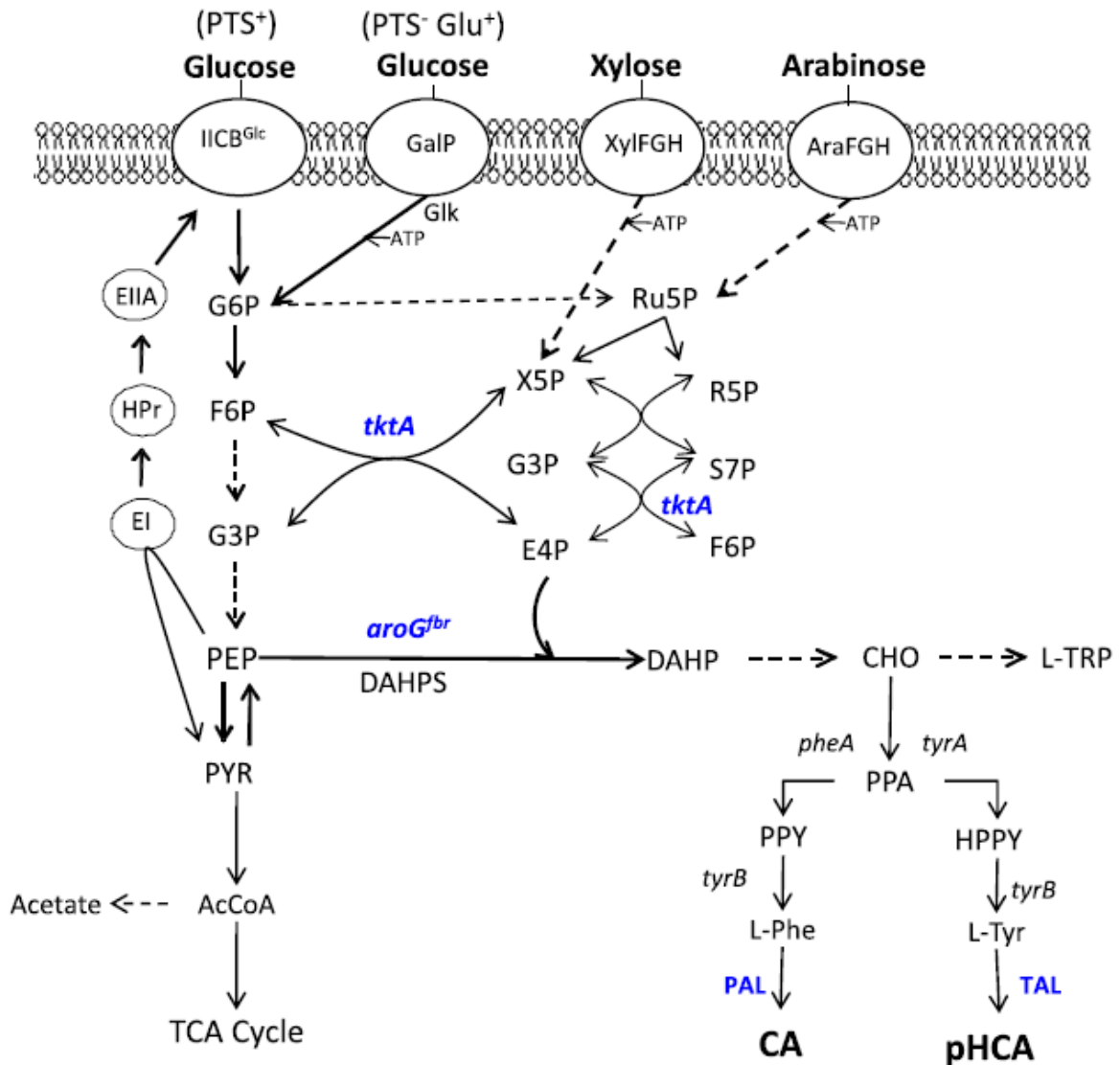


Fig. 5. Estrategia de IVM empleadas para la producción de pHCA en *E. coli*. Tomado de Vargas Tah, 2015.

Una alternativa para incrementar la disponibilidad de PEP es usar fuentes de carbono PTS-independientes, como es el glicerol. El glicerol ha ganado importancia en procesos de producción por IVM debido a que es un subproducto en la producción del biodiesel y es una fuente de carbono barata.

3.3 Glicerol como fuente de carbono.

Utilizar glicerol en procesos de producción de pHCA tiene importantes ventajas. La primera, ya antes mencionada, es un recurso económico al ser un producto de desecho en la industria oleoquímica, como en la producción de biodiesel y jabones. El costo de glicerol (2012) es de 0.13-0.24 USD por Kg (Nicol et. al. 2012), y su aprovechamiento en procesos de bioconversión, es de importancia en la implementación de estrategias de economía circular.

El glicerol se incorpora al metabolismo central de *E. coli* en un intermediario glucolítico, dihidroxiacetona (DHCA), el cual puede continuar su oxidación hacia la vía de los ácidos tricarbónicos (TCA) o ser un intermediario gluconeogénico. La incorporación de esta fuente de carbono es PTS independiente, y existe una permeasa específica de glicerol (GlpF), lo que beneficiaría la disponibilidad de PEP como sustrato para la vía del shikimato. Se ha reportado que usando glicerol como fuente de carbono, y la sobreexpresión de *aroG^{ibr}* y *tktA*, el título de aminoácidos aromáticos incrementa 10 veces, comparado con una fermentación en glucosa. Además se observó una menor producción de acetato en fermentaciones utilizando glicerol, el cual es un producto indeseable en los procesos. (Martínez Gómez et. al. 2012).

Por estas razones, decidimos determinar la respuesta transcriptómica de *E. coli* al pHCA, utilizando glicerol como fuente de carbono.

3.4 Toxicidad y genes que responden al pHCA.

Se sabe que el pHCA es antimicrobiano (Zaixiang Lou, 2012, Mirzoeva, 1997), una de las características por lo que son de interés farmacéutico, sin embargo, en un proceso de producción usando microorganismos puede ser un paso limitante. Los mecanismos de toxicidad del pHCA en bacterias Gram negativas que se han reportado, son principalmente dos, la pérdida de la permeabilidad de la membrana externa y plasmática, y una subsecuente liberación del contenido citoplasmático, y por la acidificación del protoplasma celular, afectando la fuerza iónica intracelular, y

las interacciones moleculares de los componentes celulares (Campos et. al. 2009, Zaixiang Lou et. al., 2012).

El estudio de la respuesta transcriptómica de *E. coli* al pHCA, nos podría dar información de los mecanismos de tolerancia, así como los efectos metabólicos y fisiológicos, e identificar genes candidatos a regulación para el diseño de cepas resistentes al pHCA, y optimizar el proceso metabólico para su síntesis.

Los genes, así como los efectos fisiológicos inducidos por el pHCA que se han reportado en la literatura, se enlistan a continuación:

- El operón *aaeXAB*, codifica para un sistema de exportación de 3 componentes, dos transmembranales (*aaeA* y *aaeB*) y uno soluble (*aaeX*). Se reportó que este operón se induce fuertemente con ácidos carboxílicos aromáticos, como el ácido para-hidroxibenzoico (pHBA), salicilato y el pHCA. También se demuestra que el regulador AaeR, regula positivamente al operón *aaeXAB* tras la adición de ácidos carboxílicos aromáticos (Van Dyk et. al. 2004). AaeR, es un regulador de tipo LysR, comúnmente involucrados en regular el metabolismo de aminoácidos. (Maddocks et. al., 2008).
- En un estudio transcriptómico de *Lactobacillus plantarum* tras la adición de 1.5 mM de pHCA (Reverón et. al. 2012), se identificaron incrementadas funciones relacionadas al transporte y metabolismo de aminoácidos, una respuesta de estrés oxidativo a proteínas, funciones relacionadas a detoxificación y degradación del pHCA y una alteración del metabolismo de nitrógeno hacia la producción de metionina, posiblemente para contender con un daño oxidativo de proteínas. Además, se observó una disminución de procesos relacionados a crecimiento, como traducción, metabolismo y transporte de nucleótidos y biogénesis de membrana celular.
- En una cepa de *S. cerevisiae* productora de pHCA (Borja et. al. 2019), se identificaron sobreexpresados genes relacionados a transporte, procesos biosintéticos y funciones de membrana. Así como una disminución de expresión de genes relacionados a procesos metabólicos de carbohidratos y traducción, así como de óxido-reducción y transporte de amonio.

- En *E. coli*, se realizó un estudio transcriptómico tras la adición de 0.25 g/L de ácido ferúlico (ácido hidroxicinámico, derivado del pHCA) (Siseon Lee et. al., 2012); se encontraron sobreexpresados genes relacionados a transporte membranal, respuesta a estrés oxidativo de proteínas, además, el operón *marRAB*, involucrado en resistencia a diferentes xenobióticos; así como blancos transcripcionales del regulador MarA, como el gen *inaA*. También reportan una fuerte respuesta del operón *aaeXAB*. Se reporta una disminución en genes relacionados a la traducción, asimilación de sulfatos y transporte de fosfatos.
- En *Pseudomonas putida*, utilizando una biblioteca de mutantes Tn-seq (inserción aleatoria de transposones) (Calero et. al. 2017), se identificaron genes necesarios para la tolerancia a pHCA, la mayoría involucrados en estabilidad de membrana y transportadores de la familia ABC; por lo que se propone que para mejorar la tolerancia a pHCA en *P. putida*, es necesario mejorar estos dos procesos.

Es de particular interés identificar si en *E. coli* existe un operón o genes involucrados en la degradación del pHCA, siendo una función importante a ser regulada para el diseño de una cepa productora de pHCA o derivados de este.

- En *E. coli* se han identificado los operones *hpaBCDEFGHIX* y *mhpABCDFI*, involucrados en degradar ácido 3,4-hidroxifenilacético y ácido 3-hidroxicinámico, respectivamente (Díaz et. al. 2001). Debido a que el operón *mhp* está involucrado en la degradación de ácido 3-hidroxicinámico, hipotetizamos que también pueda degradar pHCA (ácido 4-hidroxicinámico).

Son interesantes los diferentes contextos en los que se han estudiado los efectos fisiológicos y transcriptómicos de compuestos fenólicos, en microorganismos. Por ejemplo, en la implementación de procesos de fermentación utilizando hidrolizados lignocelulosicos como fuente de carbono, los cuales contienen pHCA, ácido ferúlico y ácido sinápico, entre otros, proveniente de la fracción de lignina. Se sabe que la

presencia de estos compuestos en hidrolizados, son tóxicos para microorganismos fermentadores, y un paso limitante en la implementación de procesos. Por ello, resultó interesante estudiar los mecanismos de tolerancia de *E. coli* al ácido ferúlico, con el objetivo de mejorar cepas fermentadoras de hidrolizados lignocelulosicos. (Siseon Lee et. al. 2012).

En otro estudio (F. M. Campos, 2005), se buscó entender los efectos tóxicos de los ácidos hidroxicinámicos en bacterias ácido lácticas fermentadoras de vino, las cuales, suelen ser benéficas en la producción de vino tinto y algunos vinos blancos.

El estudio transcriptómico de *L. plantarum* al pHCA (Reverón et. al. 2012), se realizó para comprender como este microorganismo comensal humano, tolera y biotransforma este compuesto, que puede estar presente en la dieta humana; y esto fue de particular interés debido a que se ha reportado que el pHCA puede fungir como un prebiótico intestinal humano.

3.5 Evidencia de los efectos prebióticos del pHCA consumido en la dieta.

Existen abundantes estudios que han relacionado al consumo de compuestos fenólicos de plantas, presentes en distintos alimentos y bebidas, como un factor que promueve una microbiota intestinal “benéfica”, como son del genero *Bifidobacteria* y *Lactobacillus*, y evitando el crecimiento de bacterias patógenas como *Salmonella* y *Helicobacter pilory*. (D. Hervert-Hernandez, 2014). Además, se ha reportado que la digestión de compuestos fenólicos es principalmente llevada a cabo por la microbiota intestinal (Van Duynhoven, 2011), y que los productos biotransformados, son los que poseen las propiedades prebióticas a través de diferentes mecanismos. (Andreas R. Rechner, 2002). Otro reporte demostró que en un modelo de carcinogénesis de colón en murinos, los extractos de polifenoles, entre ellos el pHCA, tuvo efectos anticarcinogénicos, identificando como factores anticáncer, un cambio de la microbiota intestinal y un menor daño oxidativo al DNA. (Piero Dolara, 2005).

A través de un estudio transcriptómico de *E. coli* al pHCA, se podría aportar conocimiento en los diferentes contextos por los que ha sido de interés este tipo de estudios.

IV. Justificación

A través de un estudio transcriptómico de la cepa W3110 de *E. coli*, se espera poder identificar genes que participen en el transporte, degradación, resistencia al pHCA, efectos metabólicos y la red de regulación transcripcional. La información obtenida a través de este estudio será de relevancia en la implementación de estrategias para el mejoramiento de cepas de producción, así como el desarrollo y optimización de un sistema de cocultivo para producir compuestos derivados del pHCA, como el ácido cafeico (3,4- DHCA), entre otros.

En nuestro grupo, se ha probado la producción de resveratrol con un método de cocultivo de dos cepas metabólicamente distintas, donde una cepa sintetiza pHCA y una segunda cepa biotransforma el pHCA a resveratrol. (Zaragoza et. al. 2016), utilizando únicamente glicerol como precursor. (Fig. 6).

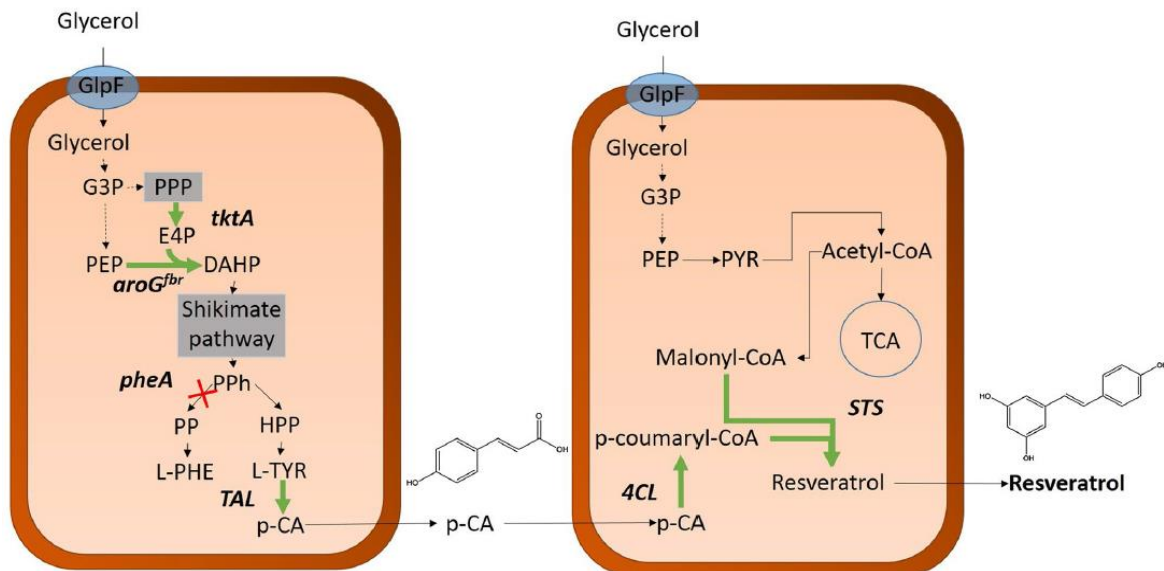


Fig. 6. Cocultivo de *E. coli* para producción de resveratrol a partir de glicerol (Zaragoza et. al. 2016). *tktA* (trancetolasa A), *aroG^{fbr}* (3-desoxy-7-fosfoheptulonato sintasa), *pheA* (corismato mutasa/prefenato deshidratasa), TAL (Tirosin amonia liasa, de *R. glutinis*), 4CL

(4-coumaroil CoA ligasa), STS (estilbeno sintasa), p-CA (ácido para-cumárico). Tomado de Zaragoza et. al. 2016

Utilizando una aproximación de cocultivo, para producción de 3,4-DHCA se lograría a través de la expresión de los genes *hpaBC* de *E. coli*, que codifican para la enzima 4-hidroxifenilacetato-3-hidroxilasa (4HPA3H), involucrada en la hidroxilación del pHCA.

Eventualmente, mejorando el proceso de cocultivo, se podría usar como un chasis para la producción de otros compuestos derivados del pHCA, como resveratrol, naringenina, amentramidas, estireno, entre otros.

Pregunta de investigación

¿El perfil transcriptómico de *E. coli* W3110 en presencia de pHCA, permitirá la identificación de genes involucrados en los efectos metabólicos, fisiológicos y de regulación?

Hipótesis

El pHCA inducirá una respuesta transcriptómica específica, incluyendo genes de degradación y exportadores de este compuesto, así como de adaptación al daño celular.

Objetivo

Determinar la respuesta transcriptómica en la cepa W3110 de *E. coli* al pHCA.

Objetivos particulares.

- Determinar la concentración de pHCA que reduce la velocidad de crecimiento (reducción del 28-33%, Rau. et. al. 2006) en medio M9 con 10 g/L de glicerol.
- Estudiar la regulación transcripcional dinámica en presencia de pHCA, de genes reportados en la literatura, *aaeXAB*, *marRAB*, y de estrés oxidativo de proteínas como *clpB*, *clpP*, *groE*, *groS*, *dnaK*. Determinar tiempo de muestreo para perfil transcriptómico.
- Determinar la respuesta transcriptómica por RNA-Seq de la cepa W3110 de *E. coli* en presencia de una concentración de pHCA y tiempo de muestreo, determinado en los dos puntos anteriores.

V. Metodología

- Condiciones de cultivo

Se utilizó la cepa W3110 de *E. coli* para todos los experimentos. La cepa fue genotipificada realizando una PCR de una secuencia de inserción única de esta cepa (InsD) con los primers csgC y ymdA (Tabla. 2)

Para los experimentos de las cinéticas de crecimiento y fluorescencia, se hizo un pre inoculo en un tubo de vidrio de 16X150 mm con 4 mL de medio Luria Bertani (LB) y se cultivaron a 300 rpm, 37 °C por ~12 horas. Posteriormente se tomó el volumen necesario para inocular 0.1 OD₆₀₀ en otro tubo de 16X150 mm con 4 mL de medio mínimo mineral con sales M9 (Na₂HPO₄·7H₂O 12.8 g/L, KH₂PO₄ 3 g/L, NaCl 0.5 g/L, NH₄Cl 1 g/L), MgSO₄ 250 mg/L, CaCl₂ 11.1 mg/L, y tiamina 10 µg/L, y como fuente de carbono se adicionó 10 g/L de glicerol. Para las cepas con el plásmido pUA66 con resistencia a kanamicina, se suplementaron los medios con 30 µg/L de este antibiótico.

Las soluciones de pHCA probadas se disolvieron de dos maneras, una solución en agua milli Q esteril (pH 7, ajustado con NaOH 1M) 190 mM y otra disuelto en etanol absoluto 500 mM.

- Tasa de crecimiento

Se realizaron cinéticas de crecimiento mediante lecturas espectrofotométricas leyendo la OD₆₀₀ cada 20 minutos por 24 horas en un lector de microplacas (Biotek, Vermont, USA). El volumen del cultivo fue de 150 µL en cada pozo y se inició con un inoculo de 0.05 OD proveniente del cultivo de adaptación en medio M9. Para todos los experimentos, se preparó una alícuota de 1 mL volumen final en un tubo eppendorf de 1.5 mL con medio M9, el volumen necesario para 0.05 OD proveniente del cultivo en medio M9 y el volumen necesario para las concentraciones probadas de pHCA, utilizando ambos métodos de disolución. Para los grupos controles, se

agregó o no, el mismo volumen de etanol absoluto necesario para cada concentración de pHCA probada. Para el blanco, se agregó a dos pozos solo medio M9 con la misma concentración de pHCA de todas las concentraciones probadas y el valor de OD se restó al valor de OD con el inóculo para cada concentración.

Durante la cinética, se mantuvieron en agitación (567 cpm) constante a 37 °C. Las microplacas se sellaron con una mica plástica adherible, la cual fue pinchada con una aguja, para asegurar las condiciones aeróbicas.

- Determinación de la respuesta transcripcional dinámica en presencia de pHCA.

Para estudiar la respuesta transcripcional dinámica de los genes seleccionados, los cuales se muestran en la Tabla. 1, se utilizó una librería de reporteros transcripcionales fluorescentes de *E. coli* MG1655 (Uri Alon, 2006). Los plásmidos pUA66 para cada promotor, fueron purificados y transformados en la cepa W3110. Se realizaron cinéticas de crecimiento y fluorescencia en microplacas de 96 pozos negros usando las mismas condiciones para la determinación de la velocidad específica de crecimiento, además se detectó la fluorescencia con una longitud de excitación de 410 nm y una de emisión de 520 nm. Se añadió el pHCA a la hora 5 de la cinética. Las lecturas de OD y GFP se graficaron como se muestra en la figura Métodos 1.

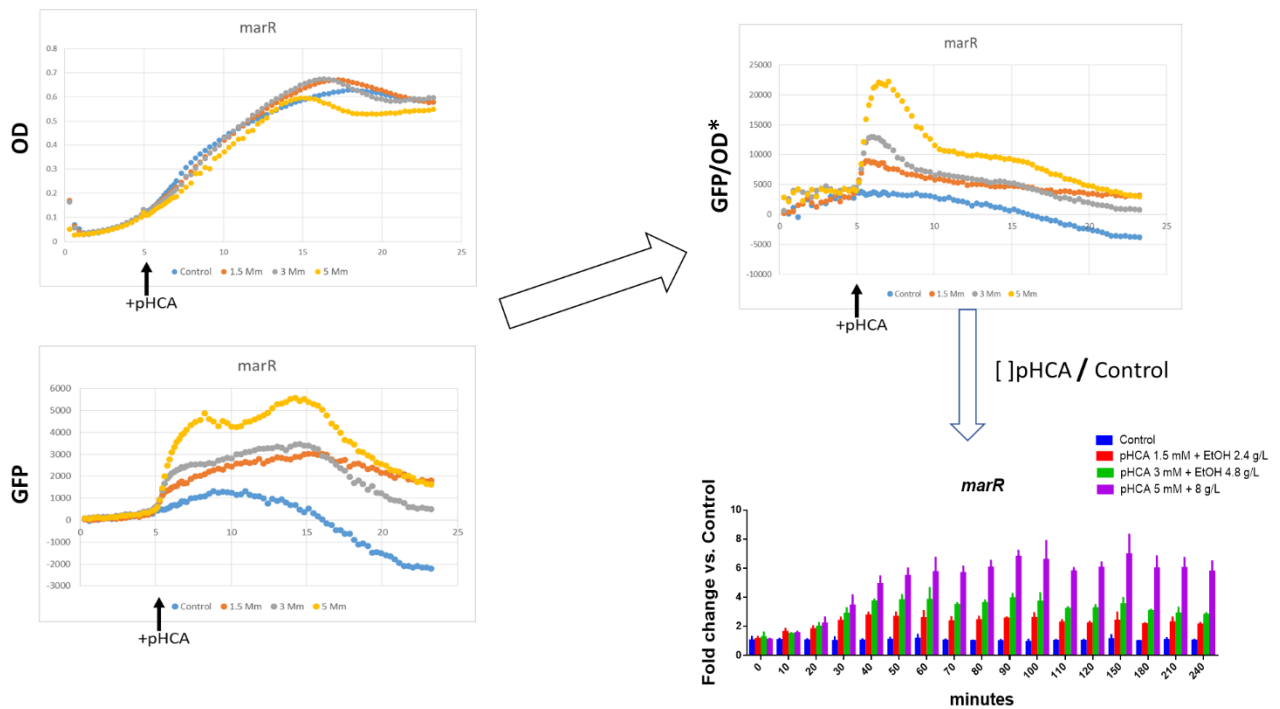
Gen	Función	Regulación
aaeX	Exportación de ácidos carboxílicos aromáticos	aaeR (+)
aaeR	Regulador del operón aaeXAB	CRP (+)
clpB	chaperona	σ^{32}
clpP	serin proteasa	σ^{32}
dnaK	chaperona	σ^{32}
dnaJ	co-chaperona	σ^{32}
groE	chaperonina	σ^{32}
htpG	chaperona	σ^{32}
inaA	putative lipopolysaccharide kinase InaA	RobA, MarA, SoxS (+)
marR	DNA-binding transcriptional repressor MarR	MarA, SoxS, CRP, RobA (+)

Tabla 1. Genes seleccionados para estudiar su regulación transcripcional dinámica en presencia de pHCA, usando el promotor respectivo del gen fusionado al gen *gfpmut2*, en el plásmido pUA66.

Para las cinéticas de fluorescencia en presencia de pHCA, se utilizaron los promotores indicados en la Tabla 1 regulando la expresión de la proteína verde fluorescente GFPmut2. Los gráficos de “Veces de cambio vs. Control” se obtuvieron dividiendo el valor de GFP/OD para cada tiempo, y cada concentración, entre el valor de GFP/OD del control (Fig. 5).

A las 5 horas de haber iniciado la cinética, se agregó el pHCA disuelto de ambas maneras mencionadas anteriormente (pH 7 y EtOH), a diferentes concentraciones (1.5, 3 y 5 mM). Para los grupos controles, se adicionó o no, el mismo volumen de etanol absoluto necesario para cada una de las concentraciones de pHCA probadas. Para determinar el tiempo de inducción, se tomó como mínimo un incremento de 2 veces la fluorescencia específica (GFP/OD)* respecto al control.

*GFP/OD= (GFP promotor-GFP sin promotor)/ (OD cepa con promotor-OD blanco con la misma concentración de pHCA).



Métodos 1. Ejemplo del experimento realizado con las cepas utilizando el plásmido pUA66 con los promotores seleccionados. Para las gráficas de “Veces de cambio”, estas comienzan al tiempo 0 en el que se agregó el pHCA y se hicieron lecturas cada 10 minutos por dos horas, posteriormente fueron cada 20 minutos.

-Extracción de DNA y PCR

Para la extracción de DNA genómico de la cepa W3110, se tomaron 300 μ L de un cultivo saturado en LB, y se calentó en agua hirviendo por 10 minutos en un tubo eppendorf de 1.5 mL, posteriormente se centrifugo a 10 krpm por 2 minutos y se tomaron 100 μ L del sobrenadante.

La extracción de DNA plasmídico se realizó por el método de miniprep. Brevemente, se tomó 1 mL de un cultivo saturado en LB de la cepa con el plásmido, se centrifugó a 10 krpm por 1 minuto, el pellet con las bacterias fue lavado con 1 mL de Solucion I (Sacarosa 20%, Tris-HCl 0.05 M, EDTA 0.05 M, pH 8), se centrifugó 10 krpm por 1 minuto y se resuspendio el pellet en 150 μ L de Solución I. Se adicionaron 250 μ L

de Solución II (1:1 SDS % : NaOH 0.4 N) y se mantuvo en hielo por 10 minutos, posteriormente se adicionaron 350 μ L de Solución III ($\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$ 3 M, pH 4.8, ajustado con CH_3COOH glacial) y se mantuvo en hielo por 15 minutos. Se centrifugó a 15 krpm por 10 minutos, se obtuvo el sobrenadante y se puso en un tubo de 1.5 mL, se precipitó con 600 μ L de Isopropanol y se centrifugó a 15 krpm por 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y el pellet fue lavado con 1 mL de EtOH 70%, se centrifugó 15 krpm por 10 minutos, se descartó el sobrenadante y el pellet fue resuspendido en 50 μ L de TE (Trisma Base 10 mM, EDTA 1 mM pH 8). Se adicionaron 5 μ L de RNAsa (0.1 g en 10 mL de una solución de $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$ 100 mM, EDTA 0.3 mM).

Para la genotipificación de la cepa, la PCR se realizó utilizando la enzima Taq DNA Pol (Thermo Fisher), para la obtención de la secuencia regulatoria *aaeX*, se usó la enzima de alta fidelidad, Phusion High-Fidelity DNA Pol (Thermo Fisher). Los primers utilizados se enlistan en la Tabla 2.

Primer	Secuencia	Tm
csgC	ACAACGCGACCGCTCATCAG	64 °C
ymdA	CGTCACATGCCGGTTCCACA	63 °C
aaeXF	CGGGATCCCAAACACCACGATAACGG	65 °C
aaeXR	CCGCTCGAGCTGATGGACGAAACGCTCA	69 °C

Tabla 2. Primers utilizados para genotipificar la cepa W3110 (*csgC*-*ymdA*) y para la amplificación del promotor del gen *aaeX*. (*aaeX_F*-*aaeX_R*)

- Cultivos para RNA-Seq

Se realizaron cinéticas en matraces bafleados de 250 mL con 50 mL de medio M9 con 10 g/L de glicerol, a 300 rpm y 37 °C. Cuando la OD=1, se añadió 500 μ L de una solución 500 mM de pHCA disuelto en etanol absoluto y se tomaron muestras a los 20 y 60 minutos. La solución de pHCA fue preparada al momento de utilizarla para evitar su oxidación. Para los grupos controles se añadió el mismo volumen de

etanol y se tomó una muestra a los 60 minutos. Además se tomó una muestra del cultivo sin adición, 60 minutos después de llegar a 1 OD. Cada una de las muestras se realizó por triplicado de experimentos independientes. La extracción de RNA se realizó con el método de fenol caliente. (Metodología suplementaria 1).

- RT-qPCR

A partir del RNA purificado por el método de fenol caliente, se trató con DNAsa (Ambion) y se sintetizó cDNA utilizando el kit RevertAid™ H Minus de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Fermentas). Para cada reacción, se utilizaron 5 µg de RNA y 10 pmol/µL de una mezcla de oligonucleótidos reversos. Las condiciones de amplificación fueron 10 minutos a 95 °C, y un ciclo de dos pasos a 95 °C por 15 s y 60 °C por 60 s para un total de 40 ciclos. El tamaño de los amplicones fue de 101 pb. La concentración final de los primers fue 0.2 µM. Se añadió 5 ng de cDNA para cada gene estudiado. La reacción de RT-qPCR se realizó en un equipo ABI Prism 7300 (Perkin Elmer/Applied Biosystems) usando el kit MaximaR SYBR Green/ROX qPCR Master Mix 2x (Fermentas LifeSciences) siguiendo las instrucciones del proveedor. Los experimentos se realizaron por triplicado para cada gene (Tabla 3), de 3 experimentos independientes por cada experimento. Se incluyó una reacción control sin templado para cada gene. Para evaluar la eficiencia del PCR, se realizaron estándares y las reacciones de qPCR mostraron eficiencias altas de amplificación (90-100%), $R^2 > 0.99$ y pendientes entre -3.3 - -3.8. Los experimentos de qPCR cumplen con los requisitos de MIQE (Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments). La técnica de cuantificación para analizar los datos fue por el método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ descrito por Livak y Schmittgen. Todos los datos se normalizaron utilizando el gene *ihfB* como control. Para cada valor de transcripción para cada gene analizado, se le asignó el valor de 1 al control, y se comparó contra cada condición. Todos los datos obtenidos se grafican como niveles de expresión relativo respecto al control.

- **Eliminación de rRNA y construcción de librería de cDNA.**

Se utilizó el kit Zymo-Seq RiboFree™ Total RNA Library Kit Cat. No. R3000, Zymo Research, siguiendo las instrucciones del proveedor, para la eliminación del rRNA y la construcción de la biblioteca de cDNA. El diagrama del procedimiento se muestra en Metodología suplementaria 2.

- **Análisis de expresión diferencial utilizando como referencia la cepa silvestre *E. coli* W3110**

Las lecturas de RNA-seq fueron cuantificadas por Salmon utilizando parámetros por defecto (Patro R et al. 2015), usando el genoma de la cepa de *E. coli* W3110 como referencia

(ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/all/GCF/000/010/245/GCF_000010245.2_ASM1024v1/GCF_000010245.2_ASM1024v1_cds_from_genomic.fna.gz).

El análisis de expresión diferencial se realizó utilizando EdgeR (Robinson MD y Smyth GK, 2008). Los contrastes hechos se detallan en el script de EdgeR. Brevemente, se consideraron los valores de expresión de la cepa silvestre con etanol obtenida después de 60 min de cultivo como base para determinar los genes diferencialmente expresados en las muestras cultivadas con ácido cumárico obtenidas a los 20 y 60 minutos del cultivo. Además, usamos el Benjamini-Hochberg (BH) como método de ajuste del p-value. Los genes expresados diferencialmente fueron los que tenían un valor $p < 0.05$, además consideramos como diferencialmente expresados aquellos genes con valores de expresión por debajo de -3 y por encima de 1.5. Obtuvimos una lista de genes expresados diferencialmente para cada cepa mutante contra su respectivo par. Después, convertimos los identificadores RefSeq en la base de datos de Uniprot (<http://www.uniprot.org>) utilizando la herramienta de mapeo Retrieve/ID para obtener los nombres de los genes, las descripciones, los números de acceso de Uniprot y los bnumber. Los scripts utilizados para cada procedimiento se encuentran en Métodos suplementarios 3.

VI. Resultados

1. Genotipificación de la cepa W3110

Para la comprobación del fondo genético de la cepa W3110, se realizó una PCR de la secuencia de inserción (IS2) de 924 bp (23.8 centisomes, 86°), localizada entre los genes *csgC* (23.79 centisomes, 86°) y *ymdA* (23.83 centisomes, 86°), utilizando los primers enlistados en la Tabla 2. El amplicón utilizando estos primers tiene un tamaño de 1858 pb en la cepa W3110 y de 667 pb en la cepa MG1655 (Fig.1).

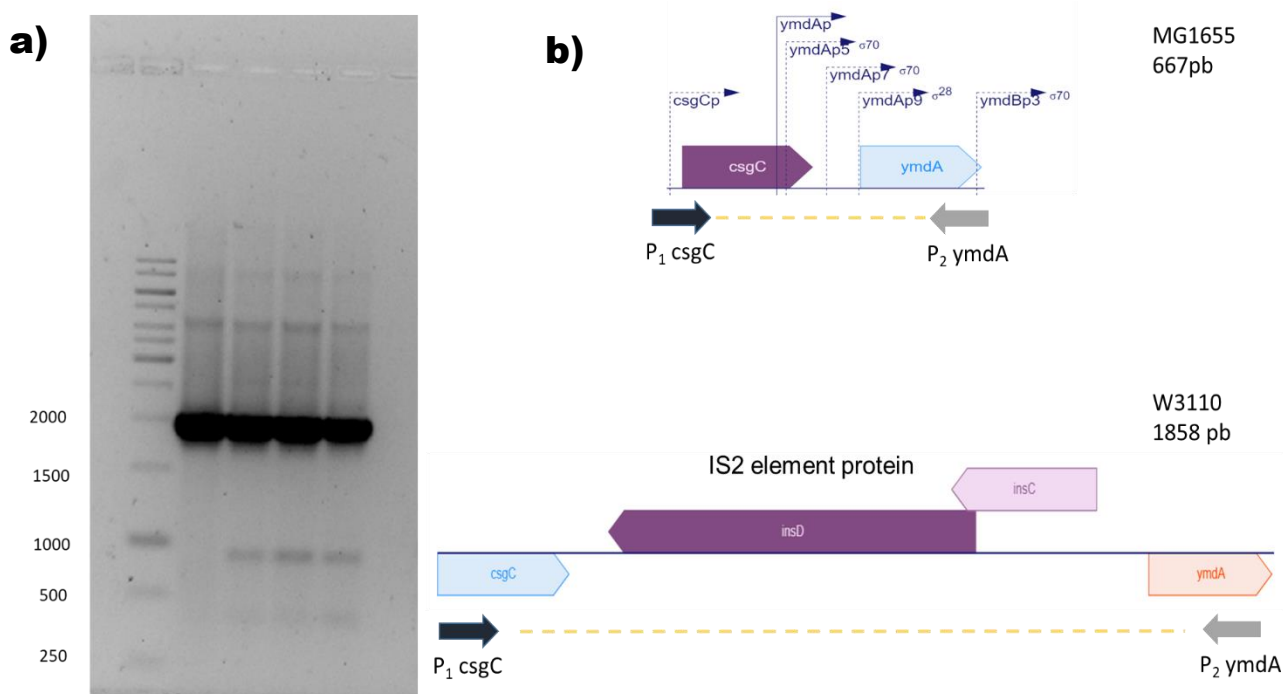


Fig. 1. Genotipificación de la cepa W3110 de *E. coli*. A) amplicón utilizando los primers *csgC* y *ymdA* (se utilizaron distintas diluciones de DNA: 1, 1:10, 1:100 y 1:1000). B) Región intergénica de los genes *csgC* y *ymdA* de la cepa MG1655 y W3110.

2. Crecimiento de *E. coli* W3110 en presencia de pHCA

Para definir la concentración de pHCA que se utilizaría para el estudio transcriptómico, se estudió la velocidad específica de crecimiento (μ) en presencia de 0, 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30 y 40 mM de pHCA. Debido a la baja solubilidad del pHCA en agua, se probaron dos métodos de disolución ; se preparó un stock 190 mM de pHCA disuelto en agua ajustando el pH a 7 con NaOH (Van Dyk, 2004, Monnappa, 2013), ya que el pHCA es más soluble a pH alcalino (Fig.2) y se encontraría ionizado ($pK_{a1}=4.3$), por otro lado, se utilizó un stock 500 mM disuelto en etanol, el cual se encontraría en su forma conjugada (Van Dyk, 2004, Inés Reverón, 2012). Respecto a estas soluciones, se ha reportado que la forma ionizada del pHCA es menos permeable a la membrana plasmática, que en su forma conjugada, en este caso, la solución en etanol. (Castelli et. al. 1999).

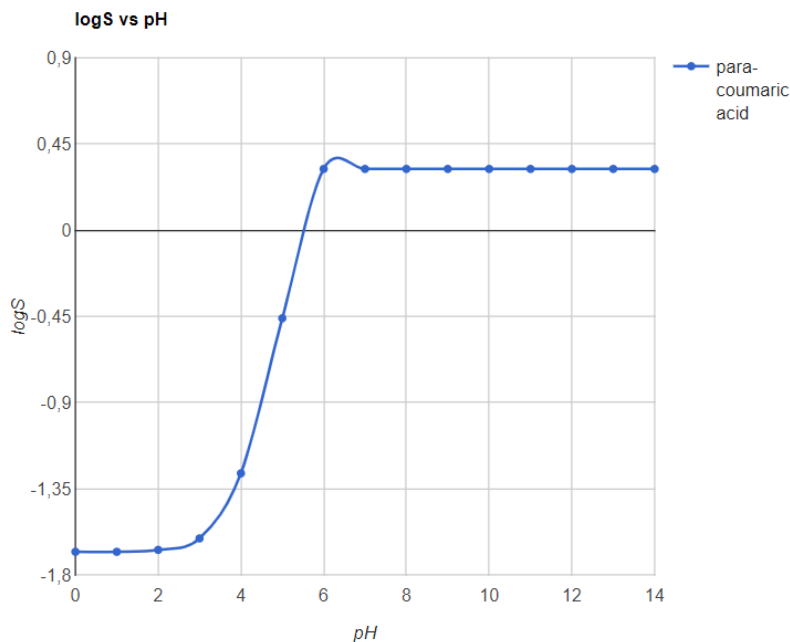


Fig. 2 Efecto del pH en la solubilidad del pHCA en agua ($\log S < 0$ insoluble, $\log S > 0$ soluble). (<https://disco.chemaxon.com/apps/demos/solubility/>)

En la Fig. 3, se puede observar que el pHCA disuelto en etanol resultó más tóxico que la solución a pH 7, donde se observa que a la concentración de 20 mM de pHCA en etanol, no hay crecimiento, mientras que con la solución de pHCA pH 7 a la

misma concentración, se mantiene el 59% del crecimiento respecto al control, y un 28% de crecimiento a la concentración más alta probada, que fue de 40 mM. Esta diferencia de la toxicidad del pHCA en estas dos soluciones, concuerda con lo reportado en otros trabajos (Van Dyk et. al. 2004, Castelli et. al. 1999), donde se discute que es causado por la diferencia de la permeabilidad en su forma conjugada (en etanol), o ionizada (pH 7). Para conocer la influencia derivada por el volumen de etanol utilizado para cada concentración de pHCA probada, se realizaron cinéticas y se calculó la μ . En esos experimentos se puede también observar el efecto tóxico del etanol, el cual es menor al observado por el pHCA.

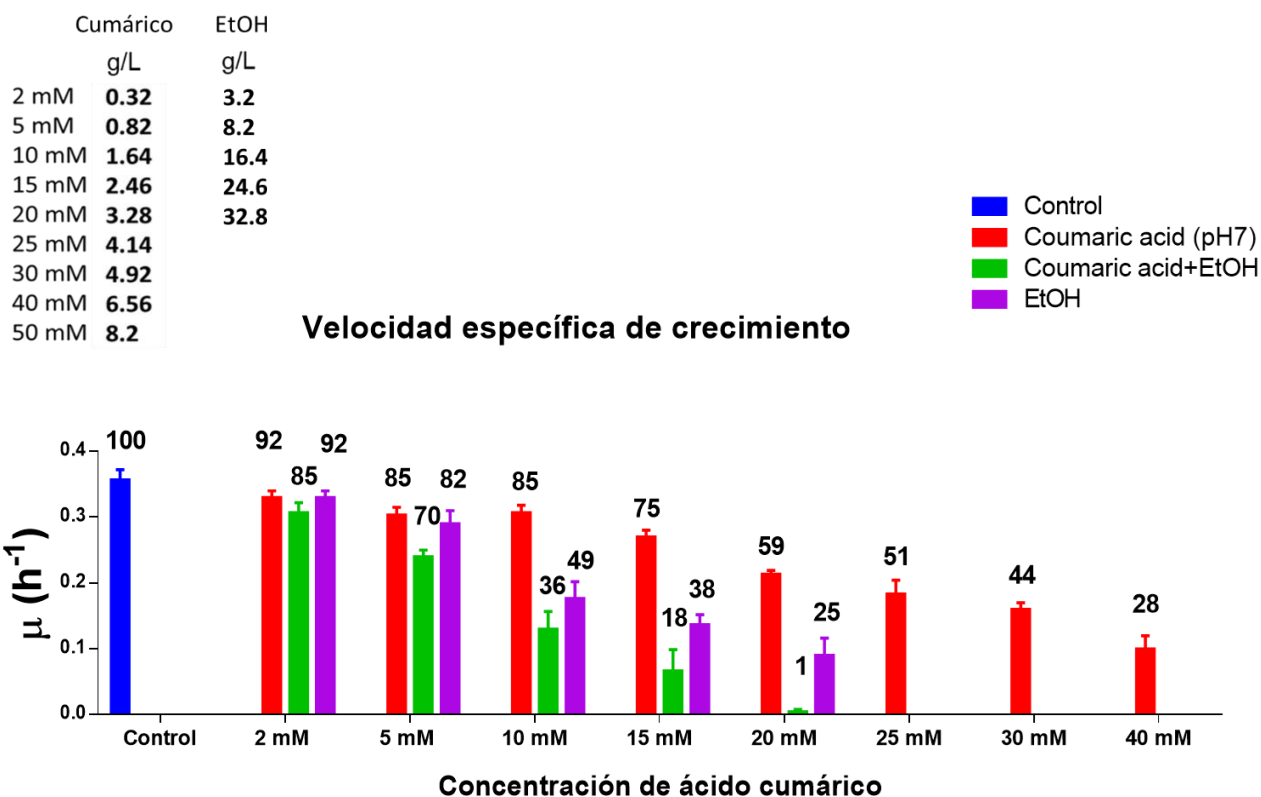


Fig. 3. Velocidad específica de crecimiento (μ) de la cepa W3110 de *E. Coli* en presencia de pHCA disuelto a pH 7 y disuelto en etanol absoluto en medio mínimo M9. Los números sobre las barras son el porcentaje respecto al control.

Con base en los datos obtenidos se concluyó utilizar la concentración de 5 mM de pHCA disuelto en etanol, tomando como referencia lo reportado por Rau et. al. 2006,

donde propone que para estudiar la respuesta de estrés a algún compuesto, este no debe disminuir en más del 28-33% la μ , ya que se podría dar una respuesta de estrés general debido a la disminución en la μ , siendo poco específica del compuesto. Se decidió utilizar la solución disuelta en etanol tomando de referencia los antecedentes de trabajos similares.

3. Respuesta transcripcional dinámica

El perfil transcriptómico es variable en el tiempo de respuesta, por ello, para determinar un tiempo de muestreo posterior a la adición de pHCA, decidimos evaluar algunos de los genes reportados que responden al pHCA (Antecedentes 3.4 pp 17-19), de una manera dinámica, utilizando una biblioteca de reporteros transcripcionales fluorescentes (Alon et. al. 2006). Con este experimento, se determinó el tiempo de muestreo para extracción de RNA, posterior a la adición de pHCA.

Se estudió la regulación dinámica de los genes de chaperonas y proteasas reportados (Tabla 1) que respondieron al pHCA en *L. plantarum* (Reveron et. al. 2012), así como los reportados en *E. coli* BL21 en presencia de ácido ferúlico (A.K. Monnappa et. al. 2013), los cuales son *marRAB* e *inaA*. La fusión del promotor del operón *aaeXAB* se estableció como un control positivo de este experimento, ya que se sabe que el pHCA induce fuertemente este operón (Van Dyk et. al. 2004; A.K. Monnappa et. al. 2013., Lee et. al. 2012) (Tabla. 1).

Debido a que el promotor del operón *aaeXAB* no se encontró en la librería de reporteros transcripcionales utilizada (Alon et. al. 2006), este se obtuvo a partir del promotor del regulador *aaeR*, el cual sí se encontraba en la librería. Ya que ambos promotores comparten la secuencia de DNA pero se transcriben divergentemente (Fig. 4b), se planteó dirigir en sentido contrario la clonación del promotor de *aaeR* y así controlar la expresión de GFP por el promotor de *aaeXAB*; para ello, se realizó una amplificación del promotor de *aaeR* por medio de PCR con los mismos primers que se utilizaron para amplificar esta región (Tabla 2, *aaexF* y *aaexR*); pero

intercambiando los sitios de clonación para dirigir la clonación en sentido contrario (Fig. 4a). Se verificó la obtención del promotor de *aaeX* cualitativamente inoculando la cepa con este promotor en medio M9 sólido con 15 mM de pHCA, posteriormente se observó en un transiluminador de luz UV ($\lambda=400$ nm). (Fig. 4c)

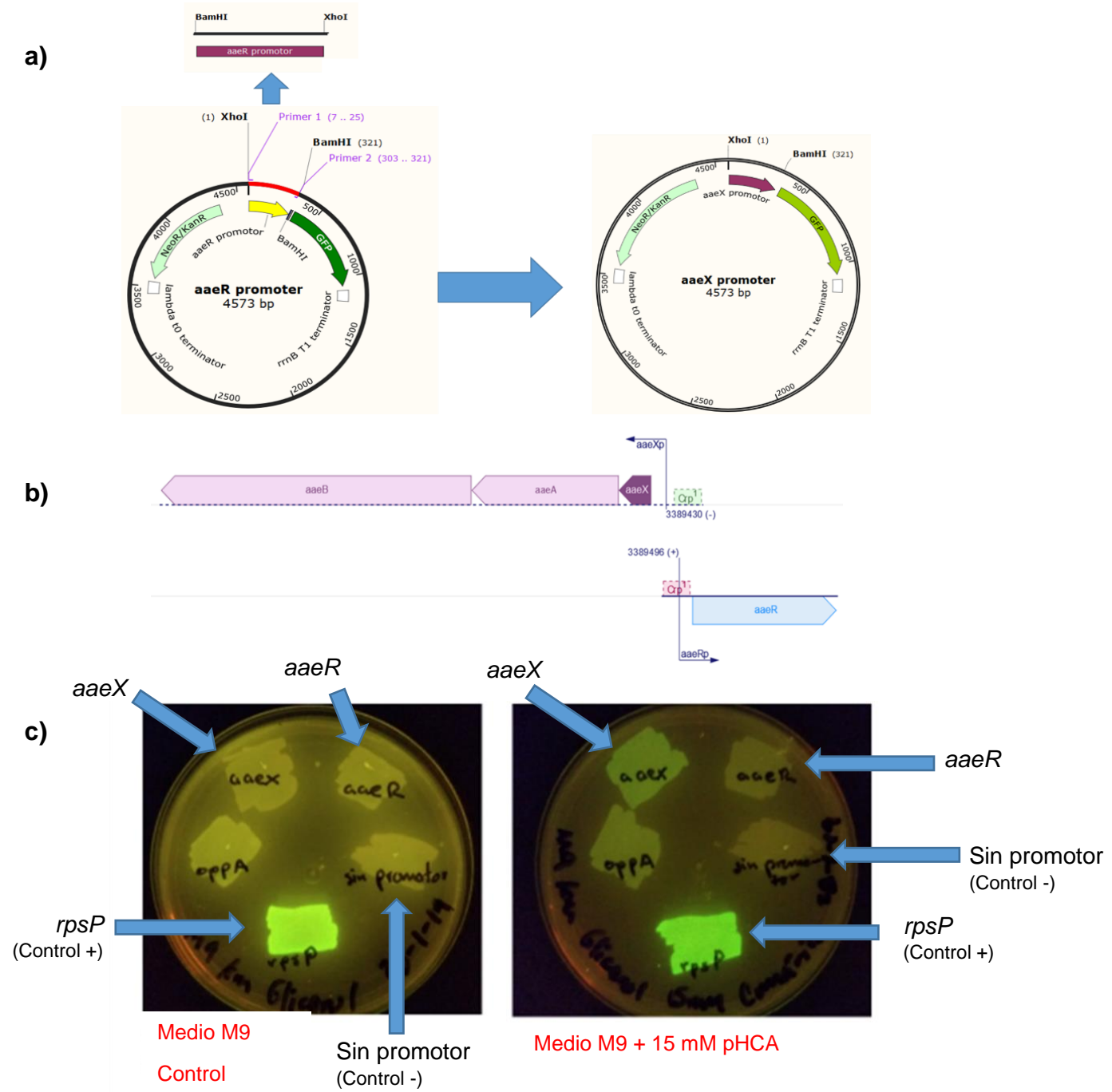


Fig. 4. Obtención del promotor del gen *aaeX*. A) Estrategia para dirigir en sentido contrario la clonación del promotor de *aaeR* para regular la expresión de GFP por el promotor del gen *aaeX*. B) Promotores del operón *aaeXAB* y *aaeR*. C) Comprobación fenotípica de la obtención del promotor del gen *aaeX*.

- Sistema de excreción de pHCA, *aaeXAB*

El promotor del gen *aaeX*, el cual se estableció como control positivo, mostró un incremento de 3, 4 y 5 veces de cambio para cada concentración probada (1.5, 3, 5 mM, respectivamente). Este incremento se observó a los 20 minutos de la adición de pHCA y fue dosis dependiente. (Fig. 5).

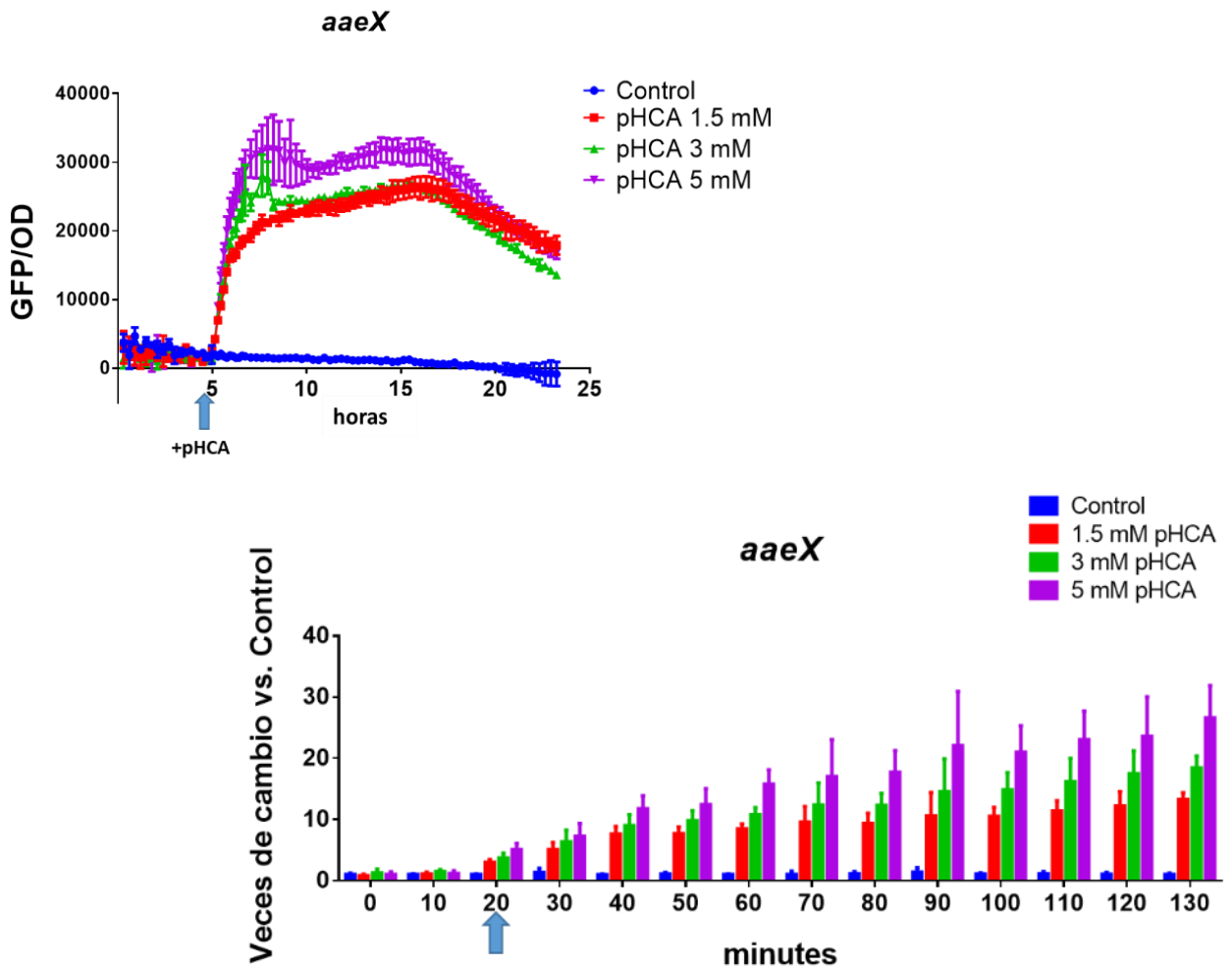


Fig. 5. Respuesta transcripcional dinámica del promotor *aaeX*. Arriba, cinética de GFP/OD, adicionando pHCA en la hora 5 (flecha). Abajo, grafica de veces de cambio vs. control, cada 10 minutos, por dos horas posterior a la adición de pHCA. La flecha indica el tiempo en el que se detecta un incremento mayor de 2 veces el valor de GFP/OD.

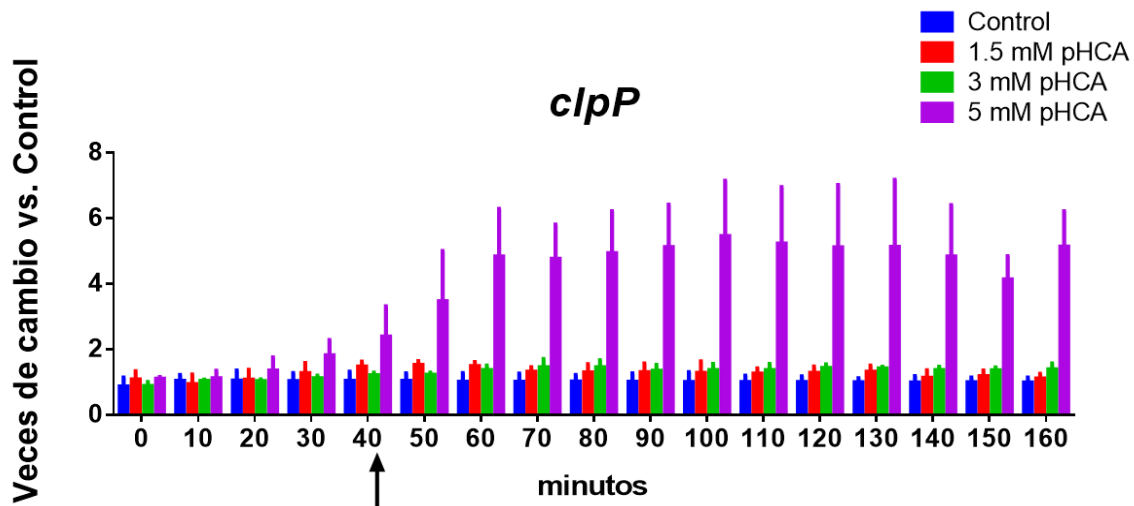
No se observó respuesta del regulador *aaeR* posterior a la adición de pHCA (Resultado anexo 1).

Interesantemente, se observó un desfase en el tiempo de respuesta del promotor *aaeXAB* cuando se utilizó la solución pH 7 (pHCA ionizado) (Resultado anexo 2), lo cual, puede interpretarse como una diferencia de la permeabilidad del pHCA, de acuerdo a lo mencionado anteriormente (Van Dyk et. al. 2006).

Con base a lo observado con *aaeX*, se estableció un tiempo de respuesta de 20 minutos tras la adición de pHCA.

- Genes de chaperonas y proteasas

Para estudiar la respuesta de estrés oxidativo de proteínas, se seleccionaron algunos genes de chaperonas y proteasas (Tabla 3), los cuales son regulados por el factor σ^{32} . Los genes *clpB* y *clpP*, respondieron solo a la concentración de 5 mM, lo que se puede interpretar como la concentración a la que se induce un daño a proteínas por el pHCA. (Fig. 6).



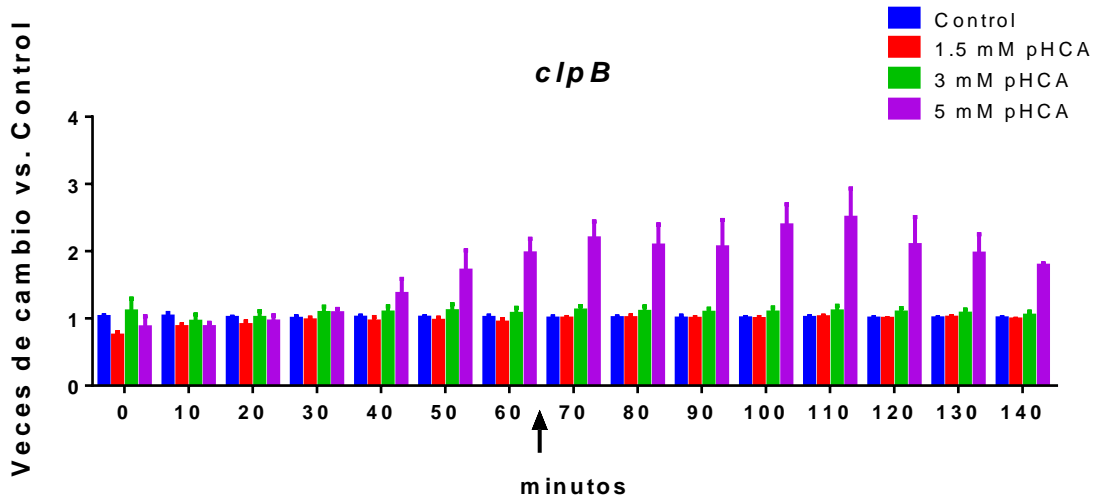
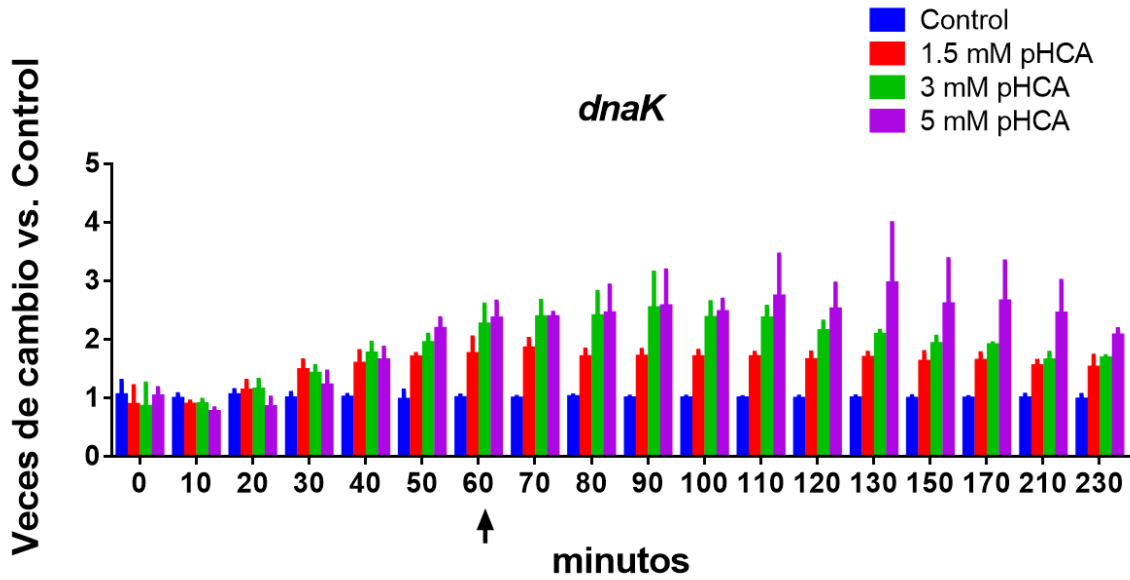


Fig. 6. Respuesta dinámica de los genes *clpP*, *clpB* y *dnaK* tras la adición de pHCA. La flecha indica el tiempo en el que se detecta un incremento mayor de 2 veces el valor de GFP/OD.

El gen *clpP* codifica para una serina proteasa, involucrado en la degradación de proteínas mal plegadas. ClpB es una chaperona inducida por choque térmico, esta proteína funciona en conjunto con el sistema de chaperonas DnaK, involucrados en solubilizar y reactivar agregados proteicos. La inducción de estas tres fusiones,

sugiere una respuesta a daño oxidativo de proteínas. Otros genes de chaperonas, como *htpG* y *groES*, también respondieron a la adición del pHCA. (Fig. 7).

No se observó respuesta de ninguno de los genes de estrés oxidativo al adicionar la misma concentración de pHCA, en su forma ionizada (pH 7), ni con el mismo volumen de etanol para cada concentración de pHCA estudiada. (Anexos 3).

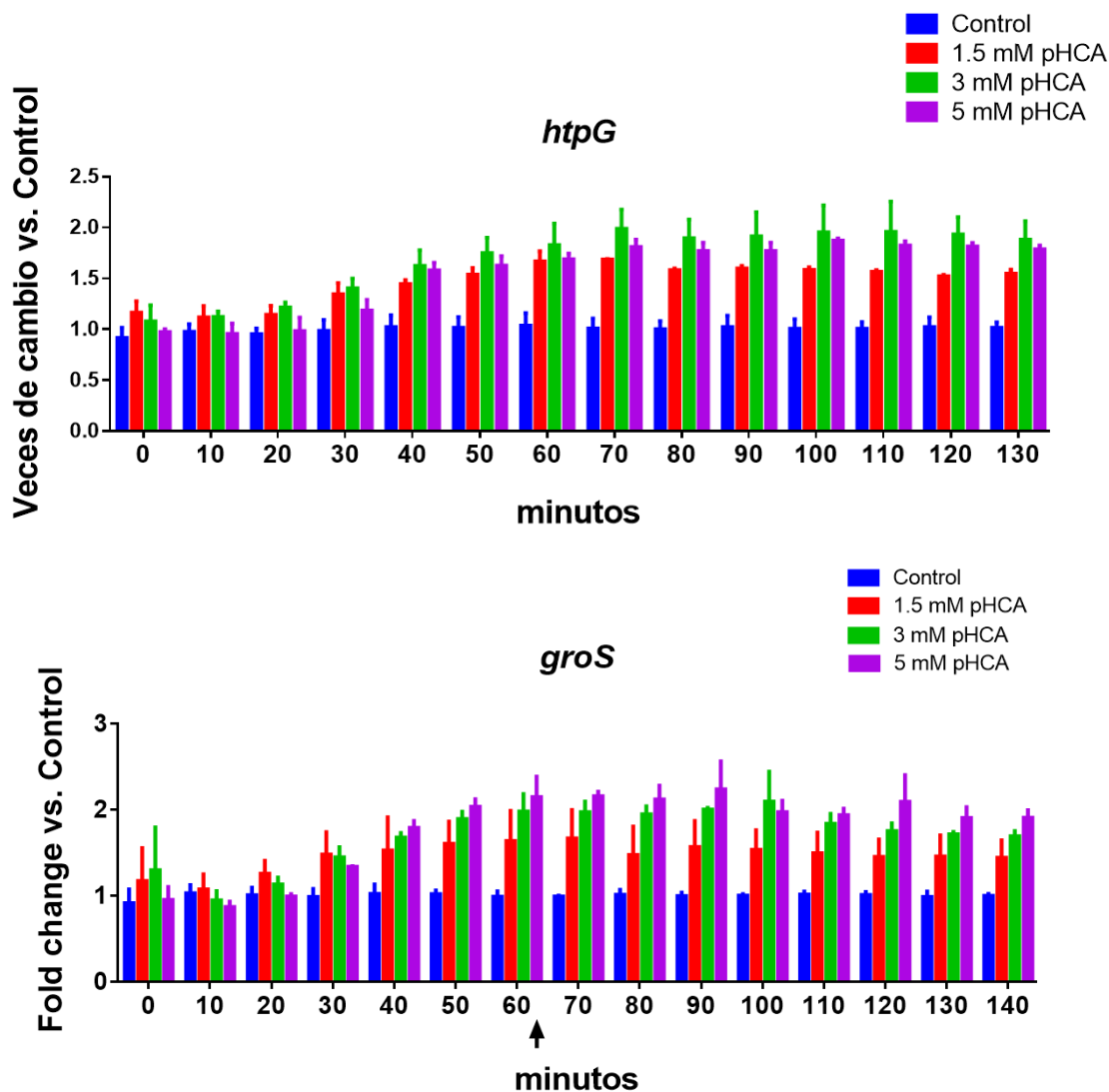


Fig. 7. Respuesta dinámica de los genes de chaperonas *htpG* y *groES*. La flecha indica el tiempo en el que se detecta un incremento mayor de 2 veces el valor de GFP/OD.

Todos los genes de estrés oxidativo de proteínas estudiados, son regulados por el factor σ^{32} (*rpoH*), principalmente involucrado en la respuesta a estrés térmico y proteínas mal plegadas.

El daño a proteínas causado por el pHCA se puede explicar por las propiedades quelantes de este compuesto (Hernández Georgina et. al. 2019), al coordinar cofactores metálicos de proteínas, causando su mal plegamiento. También se ha propuesto, que el daño a proteínas puede estar influenciado por la acidificación del protoplasma, afectando las interacciones electrostáticas en la estructura secundaria de las proteínas. (Campos et. al. 2009)

- Resistencia a xenobióticos, *marRAB*.

Se ha demostrado que el regulon MarR (“**m**ultiple **a**ntibiotic **r**esistance”) es inducido durante la exposición a distintos xenobióticos, como ácido salicílico (Cohen et. al. 1993) y compuestos fenólicos (Sulavik et. al. 1995), y regula la expresión de genes involucrados en resistencia a antibióticos, excreción y estrés oxidativo. (Aleksun et. al. 1999)

MarR es un regulador negativo del operón *marRAB*, el gen *marA* codifica para un activador transcripcional del mismo operón, así como de aproximadamente 80 genes. Tras la adición de ácido salicílico, se impide la homodimerización de MarR para unirse a su secuencia blanco, e impidiendo la regulación negativa del operón *marRAB*. (Fig. 8). (Cohen et. al. 1993)

Se observó una alta inducción de la fusión transcripcional de este operón con la adición de pHCA, así como del gen *inaA* (**i**nternal **a**cid-inducible), un blanco transcripcional de MarA, y que se ha reportado que responde en condiciones de pH ácido. (Fig. 8).

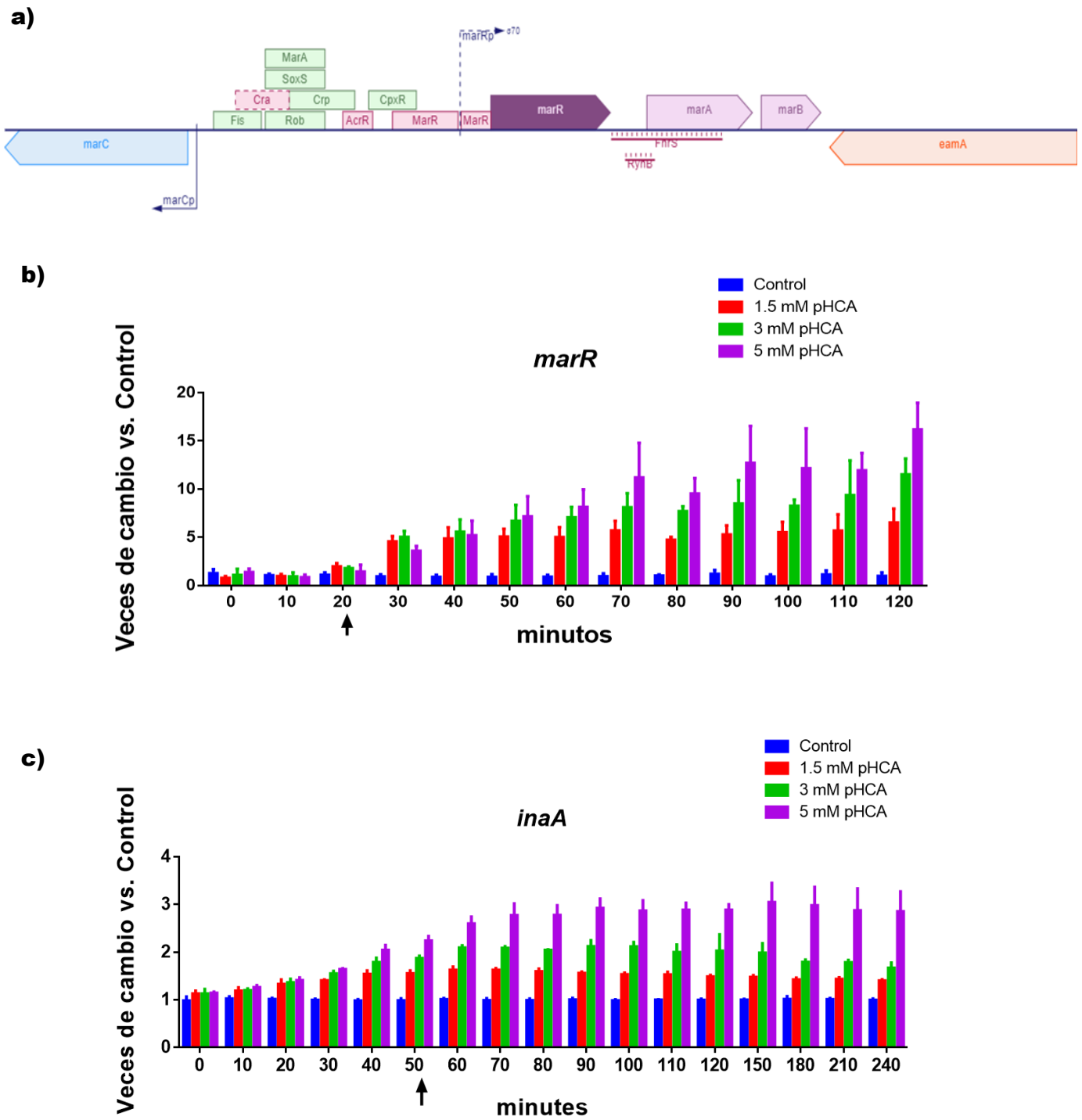
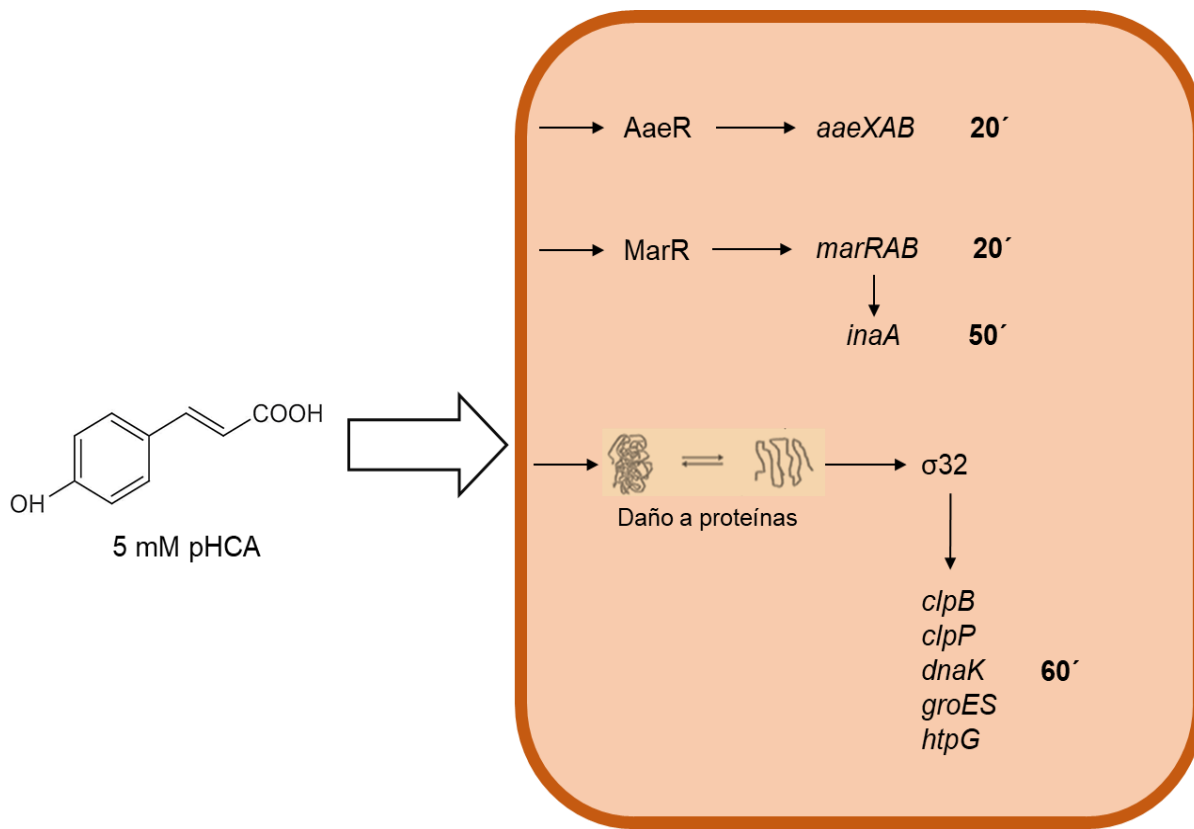


Fig. 8. Respuesta dinámica del operón *marRAB* e *inaA*. A) mapa del operón *marRAB* y factores de regulación de este operón. B) Respuesta dinámica del represor del operón, MarR. C) Respuesta dinámica del blanco transcripcional de MarA, *inaA*. La flecha indica el tiempo en el que se detecta un incremento mayor de 2 veces el valor de GFP/OD

Los genes seleccionados de la literatura (Van Dyk et. al. 2004) (Reverón et. al. 2012) (Lee et. al. 2012), respondieron con la adición de pHCA, observando un tiempo de respuesta de 20 minutos para los genes *aaeXAB* y *marRAB*, y de 60 minutos para los genes de chaperonas y proteasas, *clpB*, *clpP*, *dnaK*, *groS*. (Fig. 9).



E. coli W3110 F – λ -*rpoS*(Am) *rph-1* *Inv(rrnD-rrnE)*

Fig. 9. Respuesta observada utilizando reporteros transcripcionales fluorescentes tras la adición de 5 mM de pHCA.

Con esta evidencia, se determinó tomar muestras 20 y 60 minutos, posterior a la adición de 5 mM de pHCA para extracción de RNA.

4. Respuesta transcripcional en presencia de pHCA

Una vez establecidos los tiempos de muestreo y la concentración de pHCA que se usaría, se realizaron cultivos en matraz, y se adicionó 5 mM de pHCA cuando la OD=1. Se tomaron muestras a los 20 y 60 minutos de la adición de pHCA.

En la Fig. 10 se muestra la cinética de crecimiento, agregando 5 mM de pHCA cuando la OD=1.

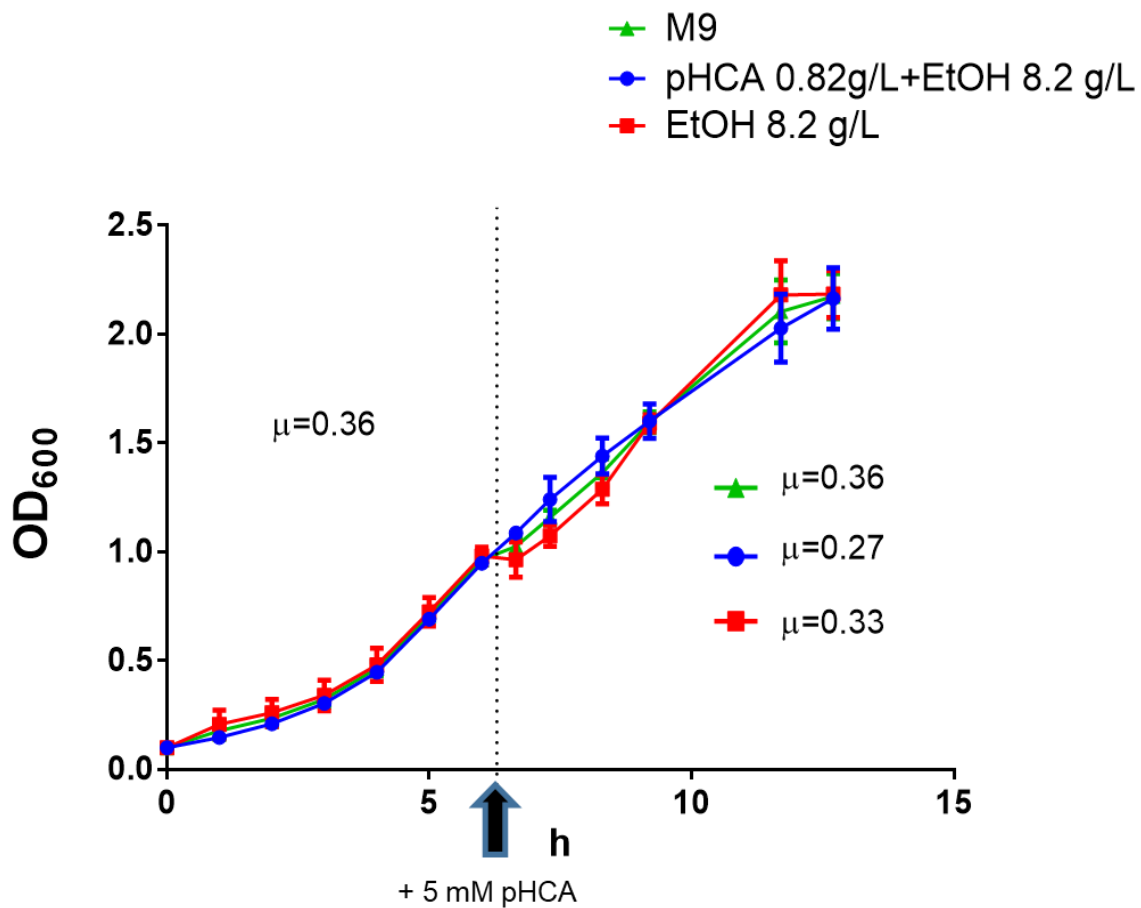


Fig.10 Cinética de crecimiento de la cepa W3110 de *E. coli* en medio M9 con 10 g/L de glicerol, en matraces bafleados de 250 mL con 50 mL de medio (relación del 20%, tamaño/volumen). Se adicionó 5 mM de pHCA cuando OD=1.

Se observó una disminución de la velocidad específica de crecimiento del 9.4% con la adición de solo EtOH (8.2 g/L), y del 25% con la adición de 5 mM de pHCA (0.82 g/L+8.2 g/L EtOH).

Para la extracción de RNA, se tomaron 4 diferentes muestras por triplicado:

1. 20 minutos posterior a la adición de pHCA
2. 60 minutos posterior a la adición de pHCA
3. 60 minutos posterior a la adición de EtOH
4. 60 minutos posterior de alcanzar 1 OD (sin adición)

Las muestras con pHCA, se tomaron del mismo cultivo.

La integridad del RNA fue evaluado observando dos parámetros tras correrlo en un gel de agarosa: la intensidad de la banda correspondiente a 23S era mayor que la 16S, y el barrido fue mínimo (Fig. 11).

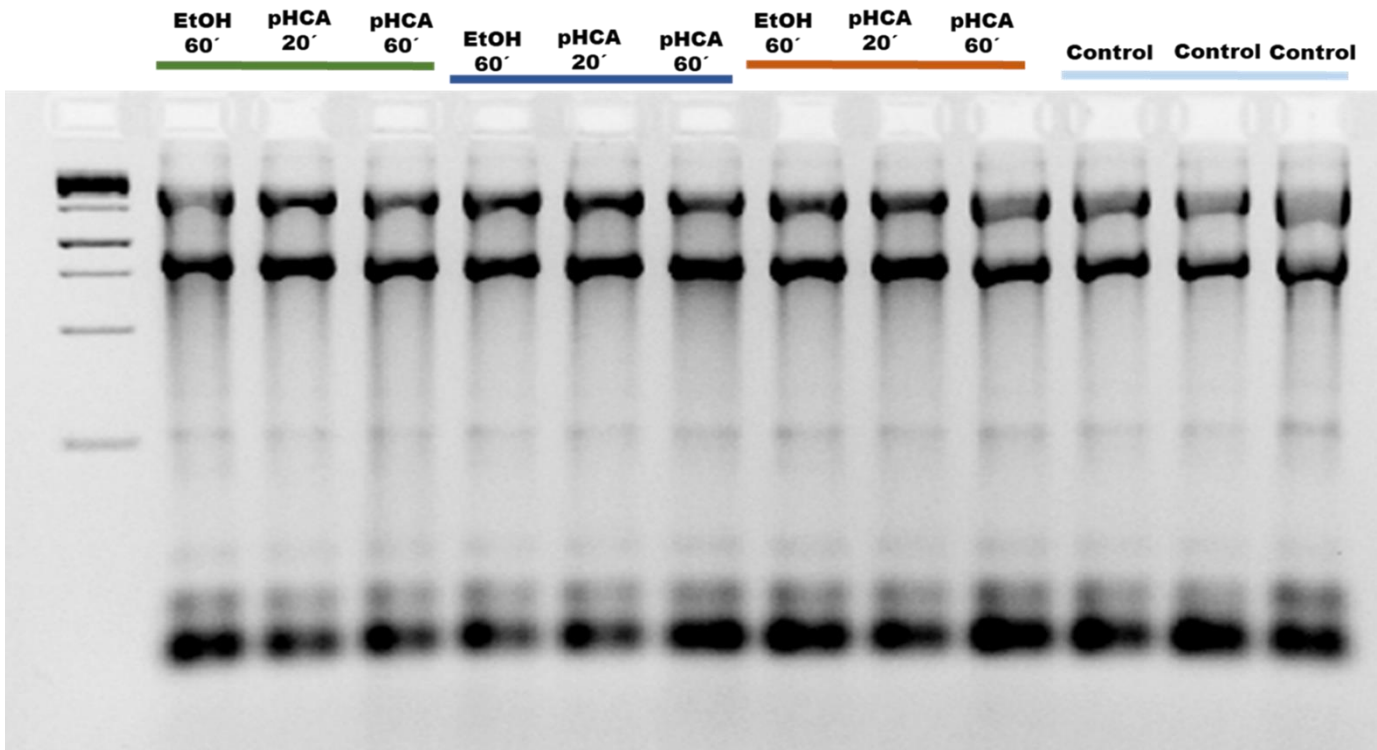


Fig. 11. Integridad de RNA

4.1 RT-qPCR

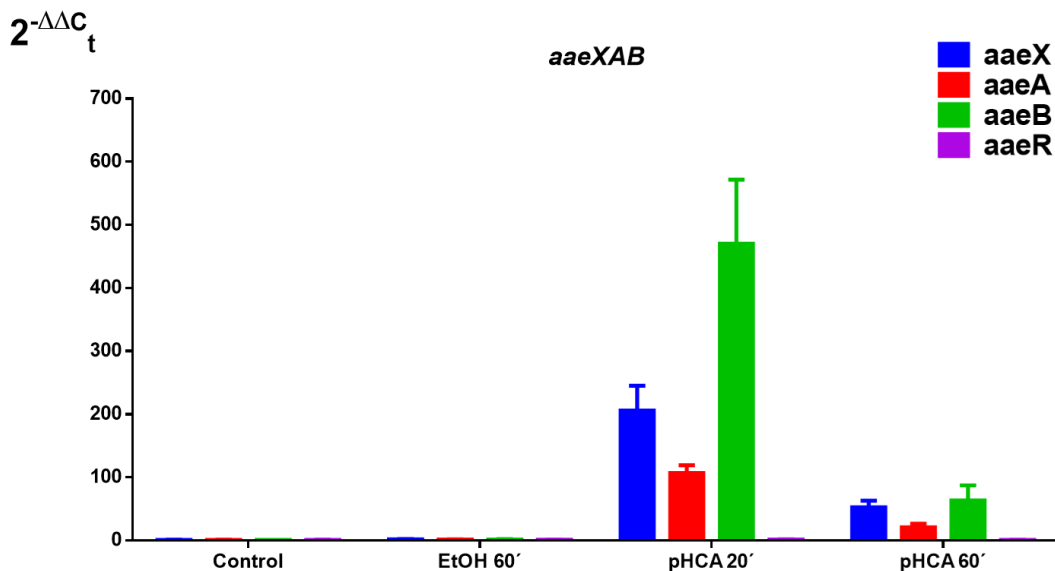
Se analizó por RT-qPCR la expresión de genes que se identificaron anteriormente utilizando fusiones transcripcionales fluorescentes, así como algunos relacionados (Tabla 3.)

Genes	Función	Regulación
<i>aaeXAB</i>	Sistema de exportación de ácidos carboxílicos aromáticos	AaeR (+)
<i>aaeR</i>	Regulador del operón <i>aaeXAB</i>	CRP (-)
<i>acrAB</i>	Bomba de eflujo de múltiples fármacos	MarA, Rob, SoxS (+)
<i>tolC</i>	Canal de membrana externa TolC	MarA, Rob, SoxS (+)
<i>clpB</i>	chaperona	σ_{32} (+)
<i>clpP</i>	serin proteasa	σ_{32} (+)
<i>clpX</i>	proteasa y chaperona	σ_{32} (+)
<i>dnaJ</i>	chaperona	σ_{32} (+)
<i>groL</i>	chaperonina GroEL	σ_{32} (+)
<i>marA</i>	Regulador transcripcional dual MarA	CRP, MarA, Rob, SoxS (+)
<i>marB</i>	Proteína de resistencia a múltiples antibióticos	CRP, MarA, Rob, SoxS (+)
<i>marR</i>	Represor transcripcional MarR	CRP, MarA, Rob, SoxS (+)
<i>inaA</i>	Lipoproteína quinasa putativa InaA	MarA, Rob, SoxS (+)

Tabla. 3. Genes estudiados por RT-qPCR de las muestras de RNA con y sin adición de pHCA.

Se observó un incremento en la expresión de 205 veces para el gene *aaeX*, 107 veces para el gene *aaeA* y de 470 veces del gene *aaeB*, teniendo el valor más alto el último gene del operón, correspondiente a una de las proteínas transmembranales (*aaeB*), seguido por *aaeX*, el cual es soluble y puede estar involucrado en facilitar el exporte del pHCA y por último el gen *aaeA*, el cual es otra proteína transmembranal. Se observa una mayor expresión a los 20 minutos que a los 60 minutos de la adición del pHCA, de 4, 5 y 7.5 veces para cada gene (*aaeX*,

aaeA, *aaeB*), confirmando el tiempo de respuesta observado previamente con la fusión transcripcional (Fig. 12).

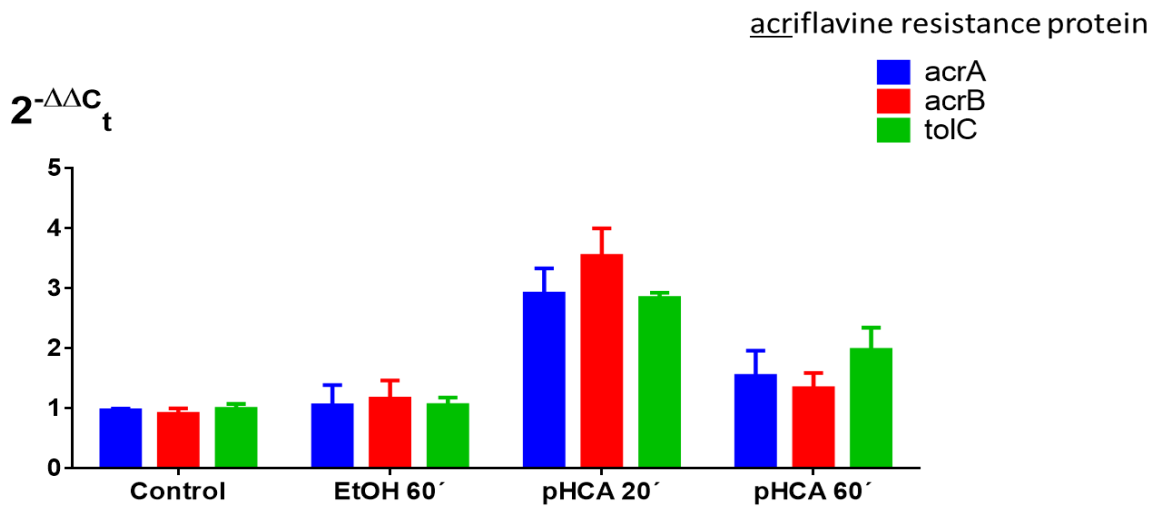


	$2^{-\Delta\Delta C_t}$			
	Control	EtOH 8.2 g/L 60'	pHCA 5 mM 20'	pHCA 5 mM 60'
<i>aaeX</i>	1.0	2.1	205.8	52.6
<i>aaeA</i>	0.9	1.7	107.0	20.9
<i>aaeB</i>	0.9	1.3	470.0	63.3
<i>aaeR</i>	1.0	1.1	1.7	0.8

Fig. 12. Expresión de los genes del operón *aaeXAB*. El $2^{-\Delta\Delta C_t}$ es un valor de expresión relativo al control.

Además, se analizó la expresión de los genes *acrA*, *acrB* y *tolC*, los cuales forman un sistema tripartita AcrAB-TolC, y son el principal sistema de exportación de xenobióticos en *E. coli* (MDR, resistencia multi-farmacos), los genes de este sistema son regulados por el regulador MarA. Se observó un incremento en la expresión de estos genes a los 20 minutos de la adición de pHCA, de 2.9, 3.5 y 2.8 para cada gene (*acrA*, *acrB* y *tolC*). (Fig. 13)

Bombas de exporte

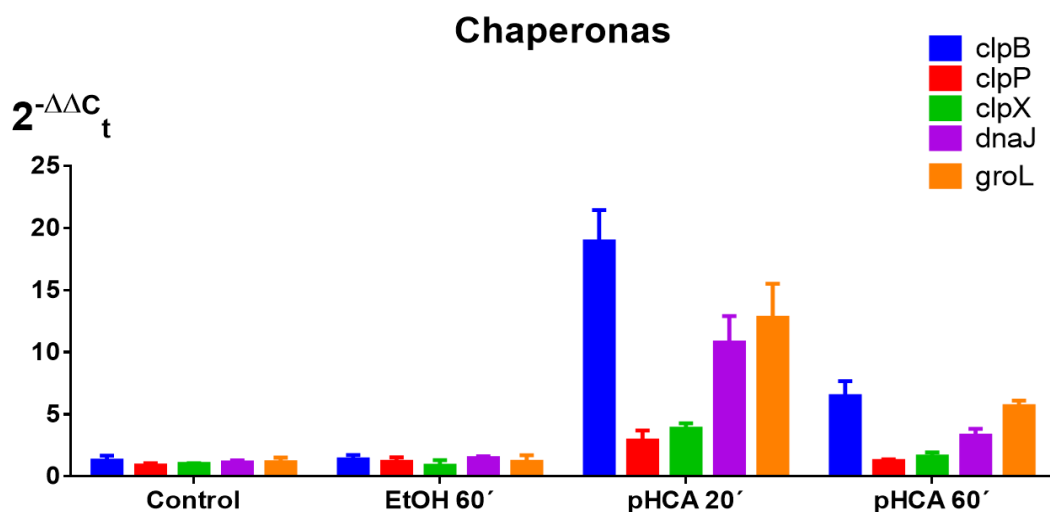


	2^{-ddct}			
	Control	EtOH 8.2 g/L 60'	pHCA 5 mM 20'	pHCA 5 mM 60'
<i>acrA</i>	1.0	1.0	2.9	1.5
<i>acrB</i>	0.9	1.2	3.5	1.3
<i>tolC</i>	1.0	1.1	2.8	2.0

Fig. 13. Expresión de los genes *acrA*, *acrB* y *tolC*. Principal sistema de exportación MDR de *E. coli*. El $2^{-\Delta\Delta C_t}$ es un valor de expresión relativo al control.

La respuesta de choque térmico y mal plegamiento de proteínas mediada por chaperonas, fue principalmente observado por el sistema DnaK/DnaJ/ClpB (Fig. 14). Este sistema funciona en conjunto en suprimir o revertir el agregado de proteínas desnaturalizadas. De igual modo, el complejo ClpX-ClpP, con actividad serín proteasa, revierte la agregación de proteínas. El gen *groL* codifica para la chaperonina GroEL, involucrada en el plegamiento dependiente de ATP de proteínas traducidas *de novo*. En conjunto, el perfil de expresión de respuesta a proteínas mal plegadas, mediada por el factor σ^{32} (RpoH), demuestra un daño oxidativo a proteínas inducido por el pHCA, como se ha reportado previamente (Lee et. al. 2012, Reverón et. al. 2012).

Se observó una mayor expresión a los 20 minutos que a los 60 minutos, a diferencia de lo observado previamente utilizando reporteros transcripcionales, donde el tiempo de respuesta fue a los 60 minutos. Esto puede deberse al tiempo de traducción y plegamiento de la GFP.



	2^{-ddct}			
	Control	EtOH 8.2 g/L 60'	pHCA 5 mM 20'	pHCA 5 mM 60'
<i>clpB</i>	1.3	1.4	18.9	6.5
<i>clpP</i>	0.9	1.2	3.3	1.2
<i>clpX</i>	1.0	1.1	3.8	1.6
<i>dnaJ</i>	1.1	1.5	10.8	3.3
<i>groL</i>	1.1	1.2	12.8	5.7

Fig. 14. Respuesta a choque térmico y daño a proteínas mediada por el factor σ^{32} . El $2^{-\Delta\Delta C_t}$ es un valor de expresión relativo al control

El operón *marRAB* respondió fuertemente al pHCA, similar a lo observado con el reportero transcripcional (Fig. 15). MarR es el regulador negativo del mismo operón, sin embargo, MarA tiene un papel como activador transcripcional de varios genes de resistencia a xenobióticos, como: *acnA*, *acrA*, *acrB*, *acrZ*, *aldA*, *dctR*, *decR*, *fpr*, *fumC*, *hdeA*, *hdeB*, *inaA*, *marA*, *marB*, *marR*, *miaB*, *miaC*, *miaD*, *miaE*, *miaF*, *nfo*,

nfsA, nfsB, poxB, pqiA, pqiB, pqiC, purA, putA, rimK, rob, slp, sodA, tolC, waaY, waaZ, xseA, ybjC, ybjN, ygiB, ygiC, yhiD, yncE, zwf. (<http://regulondb.ccg.unam.mx/>).

Se evaluó uno de los blancos transcripcionales de MarA, el gen *inaA*.

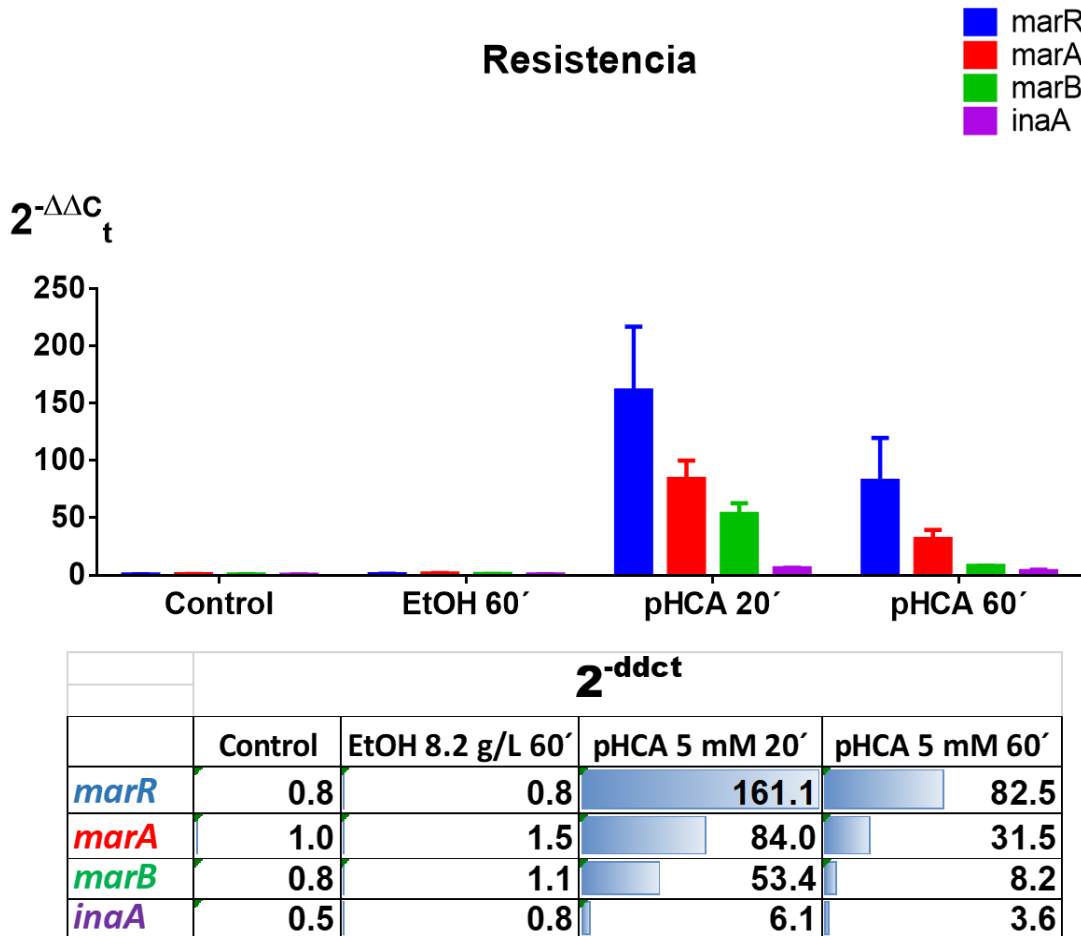


Fig. 15. Respuesta de resistencia a xenobióticos mediada por el operón *marRAB*. El $2^{-\Delta\Delta C_t}$ es un valor de expresión relativo al control

Entre los blancos transcripcionales de MarA se encuentra el sistema AcrAB-TolC, sin embargo, como se observó anteriormente, los valores de expresión de este sistema son relativamente bajos a comparación del sistema AaeXAB, del mismo modo que el gen *inaA*. Por lo que se hipotetiza que la respuesta de resistencia mediada por MarA, es dirigida por otros genes regulados por este factor.

Por último se estudió la respuesta transcripcional del operón *mhpABCDEF*, lo cual pudiera indicar su papel en la degradación del pHCA, ya que se ha reportado que está involucrado en la degradación del ácido 3-hidroxicinámico (Díaz et. al. 2001).

Aunque los niveles de transcrito no necesariamente correlacionan con el nivel de proteína, la regulación de este operón es mediada por MhpR, un regulador de tipo LysR (Fig. 16), similar al del sistema *AaeXAB*. Por lo que se espera que, en caso de que el pHCA sea un sustrato de este sistema, su presencia será sensada por MhpR, induciendo la expresión del operón *mhp*.

Como se observa el Fig. 17, no hubo cambio en la expresión de los genes de este operón, por lo que rechazamos la hipótesis de su participación en la degradación del pHCA (ácido 4-hidroxicinámico).

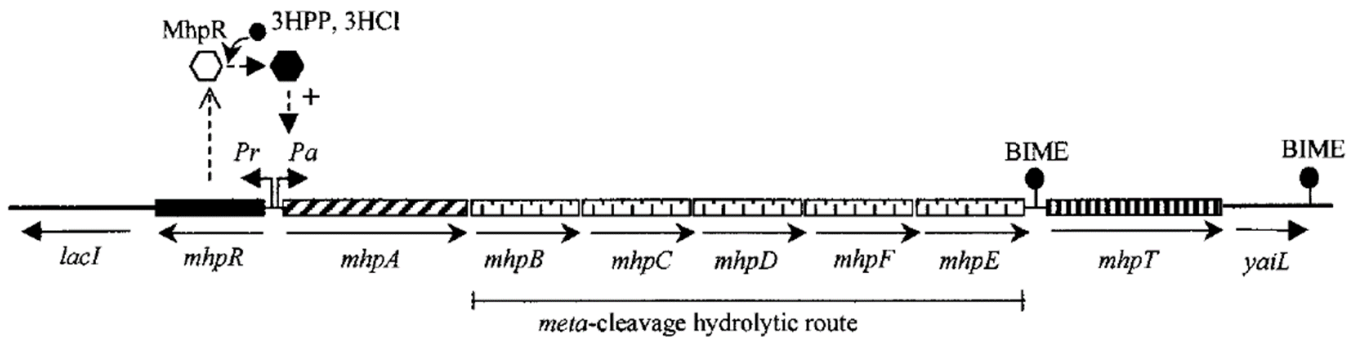
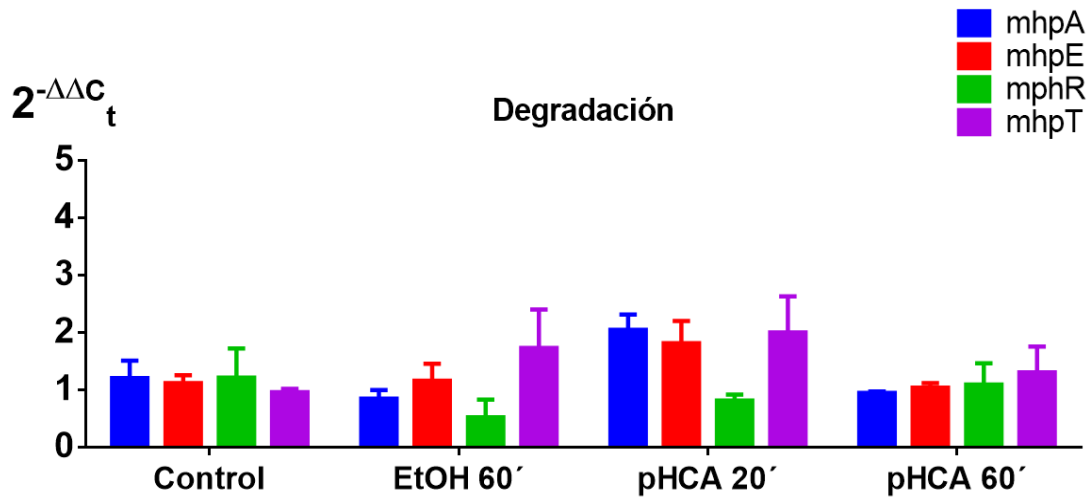


Fig. 16. Operón *mhpABCDEF* y regulación por MhpR. Abreviaciones: 3HPP, ácido 3-hidroxifenilpropionico; 3HCl, ácido 3-hidroxicinámico. Tomado de Díaz et. al. 2001



	2^{-ddct}			
	Control	EtOH 8.2 g/L 60'	pHCA 5 mM 20'	pHCA 5 mM 60'
<i>mhpA</i>	1.2	0.8	2.0	0.9
<i>mhpE</i>	1.1	1.2	1.8	1.0
<i>mphR</i>	1.2	0.5	0.8	1.1
<i>mhpT</i>	1.0	1.7	2.0	1.3

Fig. 17. Expresión del operón *mhp*. El $2^{-\Delta\Delta C_t}$ es un valor de expresión relativo al control

Una vez estudiado el perfil transcripcional por RT-qPCR, las muestras de RNA se procesaron para obtener una biblioteca de cDNA, y su posterior secuenciación masiva.

5. Respuesta transcriptómica de *E. coli* W3110 en presencia de 5 mM de pHCA

Con base en los resultados anteriores de RT-qPCR, se decidió estudiar el perfil transcriptómico global a los 20 minutos de la adición de 5 mM de pHCA.

De los genes sobreexpresados, dos términos GO (gene ontology) fueron significativamente incrementados. El término “transporte y metabolismo de aminoácidos”, de los cuales 12 genes incrementaron más de dos veces su expresión. Se identificaron sobreexpresados genes del metabolismo de los aminoácidos valina e isoleucina (*ilvDEA*), leucina (*leuOABD*), triptófano (*trpFCBA*), treonina (*thrABC*) y lisina (*lysA*). El segundo término GO, con 10 genes sobreexpresados más de dos veces, fue “modificación post-traducciona, recambio de proteínas y chaperonas”, la mayoría de los genes de este término correspondieron a chaperonas, chaperoninas y proteasas, como *ibpBA*, *clpB*, *dnaKJ*, *spy*, *groL*, *htpG*, *hslUV*, *lon* (Tabla 4). El incremento de estos dos términos GO sugiere que, en respuesta al daño oxidativo de proteínas, se incrementa la síntesis de aminoácidos para sintetizar nuevas proteínas.

El término GO “trafico intracelular, secreción y transporte vesicular” solo se observaron incrementados 3 genes, los genes *aaeA* y *aaeB*, y un exportador de alanina, *alaE*. Es evidente la participación del sistema AaeXAB en la exportación del pHCA.

El gene *yhcN* tuvo el valor mas alto de sobreexpresión, sin embargo, no se conoce su función, pero se ha encontrado sobreexpresado en pH ácido (Lee et al. 2010). El segundo gene con mayor valor de sobreexpresión fue *marA*, lo que demuestra su importante participación en la resistencia al pHCA.

Veces de cambio	Gene	Proteína	COG	Función COG
6.94	yhcN	Respuesta celular a pH ácido	S	Función desconocida
5.81	marA	Proteína de resistencia a multiples antibióticos MarA	K	Transcripción
5.52	ilvM	Subunidad pequeña 2 de isoenzima acetolactato sintasa (EC 2.2.1.6) (ALS-II) (AHAS-II)	E	Transporte y metabolismo de aminoácidos
5.19	trpA	Cadena alfa de triptófano sintasa (EC 4.2.1.20)	E	Transporte y metabolismo de aminoácidos
5.06	aaeB	Bomba de exporte de ácido p-hidroxibenzoico AaeB	U	Trafico intracelular, secreción y transporte vesicular
4.50	aaeA	Bomba de exporte de ácido p-hidroxibenzoico AaeA (pHBA efflux pump protein A)	U	Trafico intracelular, secreción y transporte vesicular
4.27	marR	Proteína de resistencia a multiples antibióticos MarR	K	Transcripción
4.22	trpB	Cadena beta de triptófano sintasa (EC 4.2.1.20)	E	Transporte y metabolismo de aminoácidos
3.94	ibpB	Proteína pequeña de choque térmico IbpB (16 kDa heat shock protein B)	O	Modificación postraduccional, recambio de proteínas y chaperonas
3.61	ilvE	Aminotransferasa de aminoácidos de cadena	E	Transporte y metabolismo de aminoácidos

		ramificada (BCAT) (EC 2.6.1.42) (Transaminasa B)		
3.46	nfsA	NADPH nitroreductasa sensible a oxígeno (EC 1.-.-) (Modulator of drug activity A)	C	Producción y conversión de energía
3.41	ilvD	Dihidroxiácido deshidratasa (DAD) (EC 4.2.1.9)	E	Transporte y metabolismo de aminoácidos
3.37	ibpA	Proteína pequeña de choque térmico IbpA (16 kDa heat shock protein A)	O	Modificación postraducciona, recambio de proteínas y chaperonas
3.33	clpB	Proteína chaperona ClpB (Heat shock protein F84.1)	O	Modificación postraducciona, recambio de proteínas y chaperonas
3.31	dnaK	Proteína chaperona DnaK (HSP70) (Heat shock 70 kDa protein)	O	Modificación postraducciona, recambio de proteínas y chaperonas
3.30	spy	Chaperona periplasmática Spy (Spheroplast protein Y)	O	Modificación postraducciona, recambio de proteínas y chaperonas
3.25	ilvA	Deshidratasa biosintética de treonina IlvA (EC 4.3.1.19) (Threonine deaminase)	E	Transporte y metabolismo de aminoácidos

3.21	thrC	Treonina sintasa (TS) (EC 4.2.3.1)	E	Transporte y metabolismo de aminoácidos
3.01	groS	10 kDa chaperonina (GroES protein) (Protein Cpn10)	O	Modificación postraducciona, recambio de proteínas y chaperonas
2.99	thrB	Homoserina cinasa (HK) (HSK) (EC 2.7.1.39)	F	Transporte y metabolismo de nucleótidos

Tabla 4. Genes sobreexpresados en respuesta a pHCA. Se muestran los genes que incrementaron mas de 3 veces.

Los términos GO que fueron mayormente reprimidos, son “transporte y metabolismo de iones inorgánicos”, del cual muchos de los genes de este término correspondieron a importadores como *kdpF* (importador de K⁺), *yiaN* (importador de 2,3-diceto-L-gluconato), *yaaU* (familia Sugar Porter, SP), *phnD* (sistema de importación fosfonato/fosfato), *ycjO* (transportador putativo ABC) y *fucP* (simporter de fucosa); y “transporte y metabolismo de carbohidratos”, de igual forma, varios genes corresponden a importadores, como *yiaO* (proteína periplasmática de unión a 2,3-diceto-L-gluconato), *frvA* (fosfotransferasa parecido a componente IIA de sistema PTS), *yiaM* (permeasa de 2,3-diceto-L-gluconato), *yagG* (simportador glucósido/catión), *cmtA* (componente IICB específico de manitol), *frwC* (permeasa IIC de fructosa), *araF* (proteína de unión periplasmática de L-arabinosa), *ydiN* (proteína transportadora de membrana interna) (Tabla 5). Esta disminución en la expresión de importadores ha sido reportado previamente (Lee et. al. 2012), y se hipotetiza que esta respuesta es causada por un estrés osmótico, a causa del daño membranal ocasionado por el pHCA, y consecuentemente, la pérdida de la permeabilidad de la membrana plasmática (Lou et. al. 2012). Otros genes relacionados al metabolismo de carbohidratos, fueron reprimidos por el pHCA, un

resultado similar a lo observado en *L. plantarum* (Reverón et. al. 2012), y que también puede estar relacionado al estrés osmótico, como una respuesta para controlar el exceso de carbono. (Tabla 5).

Veces de cambio	Gene	Proteína	COG	Función COG
-6.07	ompD	Pertenece a la familia de porinas gram-negativo	M	Biogénesis de pared celular/membrana/envoltura
-5.9	kdpF	Subunidad KdpF ATPasa transportadora de K ⁺ (ATP phosphohydrolase [potassium-transporting] F chain)	P	Transporte y metabolismo de iones inorgánicos
-5.66	yiaO	Proteína periplasmática YiaO de unión a 2,3-diceto-L-gluconato (2,3-DKG-binding protein)	G	Transporte y metabolismo de carbohidratos
-5.59	frvA	Componente EIIA parecido a sistema PTS de fructosa (Fructose-like phosphotransferase enzyme IIA component)	G	Transporte y metabolismo de carbohidratos
-5.39	phnM	Alfa-D-ribosa 1-metilfosfonato 5-trifosfato difosfatasa (RPnTP diphosphatase) (EC 3.6.1.63)	P	Transporte y metabolismo de iones inorgánicos
-5.38	yibV	Proteína YibV	S	Función desconocida
-5.15	ygjJ	Proteína sin caracterizar YgjJ	S	Función desconocida

-5.06	yiaM	Proteínas permeasa pequeña YiaM TRAP 2,3-diceto-L-gluconato	G	Transporte y metabolismo de aminoácidos
-5.04	yehK	Proteína sin caracterizar YehK	S	Función desconocida
-5.01	yiaW	Proteína de membrana interna YiaW	S	Función desconocida
-4.97	phnG	Alfa-D-ribosa 1-metilfosfonato 5-trifosfato sintetasa subunidad PhnG(EC 2.7.8.37)	P	Transporte y metabolismo de aminoácidos
-4.96	dicC	Proteína represora de inhibición de división DicB	K	Transcripción
-4.96	fixC	Proteína FixC	C	Producción y conversión de energía
-4.94	ymgG	UPF0757 proteína YmgG	S	Función desconocida
-4.93	ynbB	Uncharacterized protein YnbB	S	Función desconocida
-4.92	atoA	Acetato CoA-transferasa subunidad beta (EC 2.8.3.8)	I	Transporte y metabolismo de lípidos
-4.81	nrfD	Proteína NrfD (putative menaquinol-cytochrome c reductase subunit NrfD)	P	Transporte y metabolismo de iones inorgánicos
-4.81	napF	Proteína tipo ferredoxina NapF	C	Producción y conversión de energía
-4.75	phnI	Alfa-D-ribosa 1-metilfosfonato 5-trifosfato sintasa subunidad PhnI (RPnTP synthase subunit PhnI) (EC 2.7.8.37)	P	Transporte y metabolismo de iones inorgánicos

-4.75	yafT	Lipoproteína no caracterizada YafT	S	Función desconocida
-4.74	phnH	Alfa-D-ribosa 1-metilfosfonato 5-trifosfato sintasa subunidad PhnH (RPnTP synthase subunit PhnH) (EC 2.7.8.37)	P	Transporte y metabolismo de iones inorgánicos
-4.73	alpA	Activador transcripcional de unión al DNA AlpA (Prophage CP4-57 regulatory protein AlpA)	K	Transcripción
-4.72	caiT	Antiporter L-carnitina/gamma-butirobetaina	M	Biogénesis de pared celular/membrana/envoltura
-4.69	ssnA	Aminohidrolasa putativa SsnA (EC 3.-.-.-)	F	Transporte y metabolismo de nucleótidos
-4.64	phnF	Regulador transcripcional PhnF	K	Transcripción
-4.58	yiaN	2,3-diketo-L-gulonate TRAP transportador largo proteína permeasa YiaN	P	Metabolismo y transporte de iones inorgánicos
-4.52	lyx	L-xilulosa/3-ceto-L-gluconato cinasa (L-xylulokinase) (EC 2.7.1.-) (EC 2.7.1.53) (3-dehydro-L-gulonate kinase)	G	Transporte y metabolismo de carbohidratos
-4.52	elaD	Proteasa ElaD (EC 3.4.22.) (Deubiquitinase) (Deubiquitinating enzyme) (DUB) (Deubiquitinating protease)	O	Modificación postraduccional, recambio de proteínas y chaperonas

-4.51	yrhA	Proteína putativa no caracterizada YrhA	S	Función desconocida
-4.51	mhpA	3-(3-hidroxi-fenil)propionato/3-ácido hidroxicinámico hidroxilasa (3-HCI hydroxylase) (3-HPP hydroxylase) (EC 1.14.13.127)	CH	Producción y conversión de energía; transporte y metabolismo de coenzimas

Tabla 5. Genes reprimidos en respuesta a 5 mM de pHCA. Se muestran los genes que disminuyeron por debajo de 4.5 veces.

Con base en el perfil transcriptómico determinado, se puede concluir que el pHCA genera daño oxidativo y desnaturalización de proteínas, juzgado por la inducción de genes de chaperonas y proteasas. Además, la sobreexpresión de genes del metabolismo de distintos aminoácidos, puede estar involucrado en la recuperación de las proteínas mal plegadas.

El principal sistema de exportación de pHCA es el sistema AaeXAB, interesantemente solo se observó la sobreexpresión de los genes *aaeA* y *aaeB*, y no se encontró sobreexpresado el primer gene del operón, *aaeX*. Se sabe que las proteínas AaeA y AaeB son transmembranales y los componentes del sistema de exportación, y la proteína AaeX es soluble, posiblemente involucrado en el transporte intracelular.

El regulador transcripcional MarA, involucrado en regular la expresión de genes de resistencia a antibióticos, tiene una importante participación en la resistencia al pHCA. Se buscará estudiar los genes regulados por MarA que fueron diferencialmente expresados en este trabajo, con el objetivo de conocer a profundidad los mecanismos de tolerancia al pHCA.

La disminución en la expresión de genes que codifican para distintos importadores, sugiere, como se ha reportado en *L. plantarum* (Reverón et. al. 2012) y *E. coli* (Lee et. al. 2012), que es causado como una respuesta de estrés osmótico causado por el incremento de la permeabilidad membranal externa y plasmática (Zaixiang Lou et. al. 2012).

6. Evaluación de la fusión del promotor *aaeX::gfpmut2* como un biosensor de pHCA

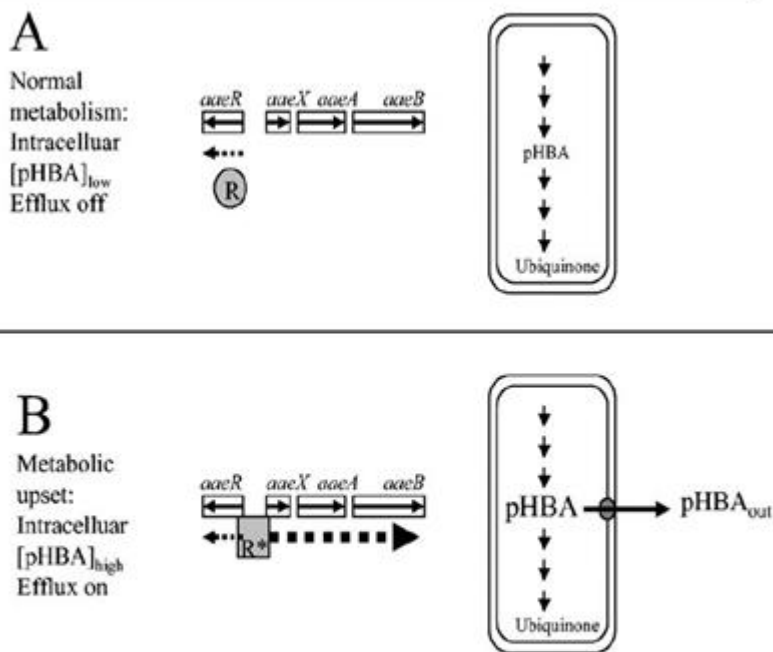
Fue de particular interés la fusión transcripcional fluorescente del gen *aaeX* obtenida anteriormente (Resultados 3, pp 34-35), para diversas aplicaciones que se discutirán a continuación.

1) Método analítico para hidrolizados lignocelulósicos

Tomando de referencia lo reportado en la literatura (Van Dyk, 2004), el regulador AaeR induce la transcripción del operón *aaeXAB*, en respuesta específicamente a ácidos carboxílicos aromáticos (Fig. 18).

Los compuestos de la familia de los ácidos hidroxicinámicos, cumplen con esta característica química, por lo que se planteó utilizar esta fusión como un método analítico para detectar estos compuestos en hidrolizados lignocelulósicos. Esto tiene una importante aplicación en la implementación de procesos de fermentación utilizando hidrolizados lignocelulósicos, debido a que los compuestos fenólicos provenientes de la lignina son tóxicos para los microorganismos, afectando la fermentación. El control y la detección de estos compuestos en hidrolizados es fundamental para su aplicación en procesos. La idea de utilizar la secuencia regulatoria del gen *aaeX* como reportero para valorar la presencia de fenólicos en hidrolizados lignocelulósicos, ya se ha reportado utilizando la fusión *aaeXAB::luxCDABE* (Monnappa et. al. 2013). Este reporte sirvió de evidencia para la aplicación de esta fusión como un biosensor de pHCA.

Se investigó la respuesta de la fusión *aaeX::gfpmut2* a otros fenilpropanoides relacionados, así como a tirosina y shikimato (Fig. 19).



C

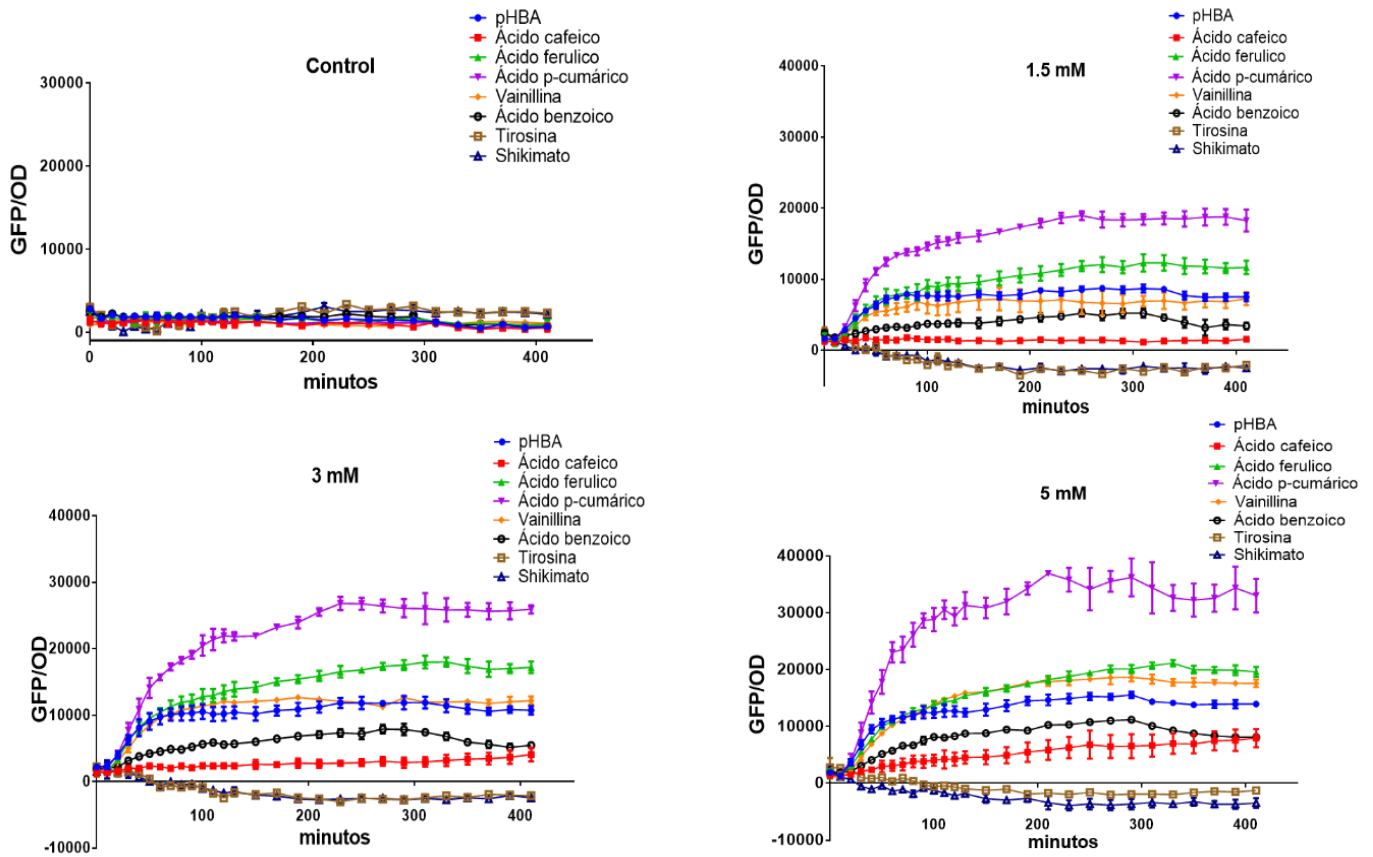
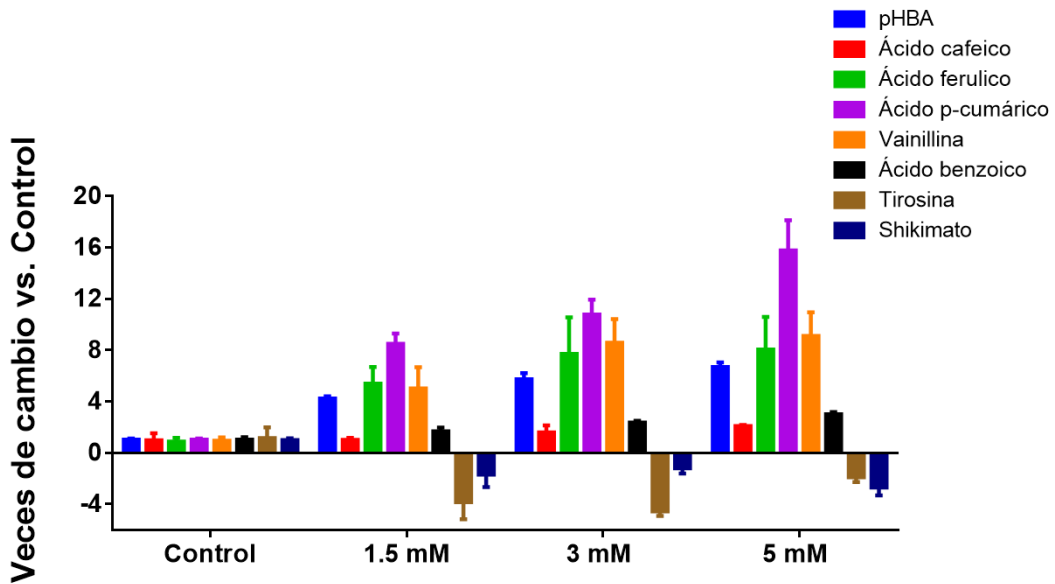
TABLE 3. Chemical sensitivities of *E. coli* strains with and without the YhcP efflux pump^a

Chemical	MIC ^b for:		Fold difference	Rank difference
	MG1655 (<i>yhcP</i> ⁺)	DPD2444 (<i>yhcP</i> ⁻)		
pHBA	100	12.5	8	4
6-Hydroxy-2-naphthoic acid	20	2.5	8	3
2-Hydroxycinnamate	20	10	2	2
1,5-Dihydroxynaphthalene	0.5	0.25	2	1
1,6-Dihydroxynaphthalene	0.5	0.25	2	1
2,7-Dihydroxynaphthalene	0.62	0.31	2	1
2-Naphthoic acid	20	10	2	1
Cinnamic acid	20	10	2	1
1,4-Naphthalenedicarboxylic acid	10	10	1	0
1-Hydroxy-2-naphthoic acid	0.62	0.62	1	0
1-Naphthoic acid	2.5	2.5	1	0
2,3-Dihydroxybenzoic acid	10	10	1	0
2,3-Naphthalenedicarboxylic acid	80	80	1	0
2,6-Dimethoxyphenol	5	5	1	0
3,4-Dihydroxycinnamate	0.62	0.62	1	0
3,5-Dimethoxy-4-hydroxycinnamate	10	10	1	0
3-Hydroxy-2-naphthoic acid	1.2	1.2	1	0
Benzoate	25	25	1	0
2-Biphenylcarboxylic acid	2.5	2.5	1	0
Dimethyl sulfoxide	20	20	1	0
Methyl paraben	3.8	3.8	1	0
Salicylate	100	100	1	0

^a Cultures were grown in Vogel-Bonner minimal medium with glucose as a carbon source and tetrazolium violet to aid visualization of growth.

^b Results for dimethyl sulfoxide are in percent, all other results are in millimolar.

Fig. 18. Regulación del operón *aaeXAB* por el regulador AaeR. A) Sin inducción del operón, concentración intracelular baja de pHBA (ácido para-hidroxibenzoico), AaeR no se une a su operador. B) Concentración alta de pHBA, AaeR se une a su operador, induciendo la expresión del operón *aaeXAB*. C) Compuestos que inducen la expresión de *aaeXAB*, Rank difference=0, no inducen la expresión. *yhcP*= *aaeR*. Tomado de Van Dyk et. al. 2004

A**B**

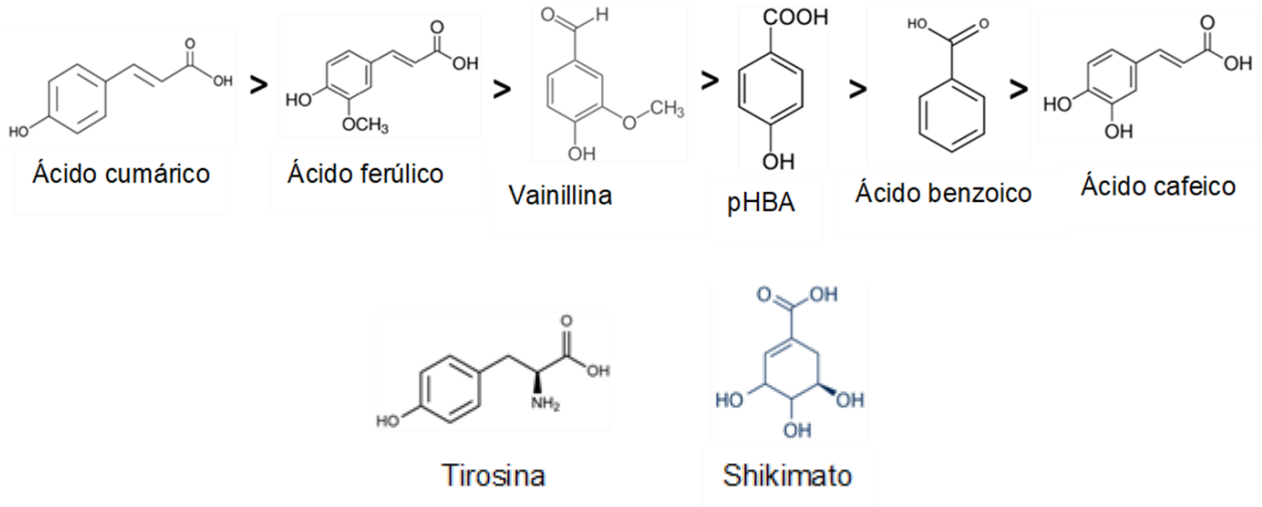
C

Fig. 19. Inducción de la fusión *aaeX::gfpmut2* a diferentes ácidos carboxílicos aromáticos, tirosina y shikimato. A) Cinéticas de fluorescencia específica (GFP/OD) induciendo con diferentes compuestos, con tres concentraciones probadas: 1.5, 3 y 5 mM. Se grafica a partir de la inducción (minuto 0). B) Veces de cambio de GFP/OD relativo al control, 60 minutos después de la inducción. C) Estructura de los compuestos que inducen la fusión *aaeX::gfpmut2*. De izquierda a derecha, mayor a menor inducción. pHBA, ácido para-hidroxibenzóico. La fusión no respondió a tirosina ni shikimato.

Los compuestos que inducen respuesta de la fusión *aaeX::gfpmut2*, forman parte estructural de la lignina, aportando evidencia importante en su aplicación como método analítico para detectar estos compuestos en hidrolizados lignocelulósicos.

2) Regulación de la expresión de genes de interés usando la región promotora de *aaeX*

Con la evidencia del experimento anterior, el pHCA es el compuesto que demostró una mayor inducción de la fusión *aaeX::gfpmut2*.

Una posible aplicación es utilizar la secuencia regulatoria del gen *aaeX*, como un regulador de la expresión de genes de interés, para su aplicación en un sistema de cocultivo. En el cual, al comenzar la producción de pHCA por una de las cepas, esto será la señal de inducción de la expresión de genes de interés en la segunda cepa, para biotransformar el pHCA a alguno de sus derivados que se desea producir (por

ejemplo, ácido cafeico o resveratrol, entre otros). Al utilizar un sistema de expresión de este tipo, se espera tener una regulación más fina, y con mayor precisión de acuerdo a la cantidad de pHCA que se está produciendo. Esta aplicación es relevante debido a que, al tener un mejor control de la expresión de la vía metabólica heterológica, se espera una menor carga metabólica en la cepa que biotransforma el pHCA, y por tanto, una mejora en la producción del compuesto de interés.

Para determinar el rango dinámico de respuesta, se realizó una curva de dosis/respuesta de la fusión *aaeX::gfpmut2* a varias concentraciones de pHCA (Fig. 20).

3) Mejoramiento catalítico de la enzima TAL para producción de pHCA, guiado por fluorescencia

Para esta aplicación de nuestro biosensor *aaeX::gfpmut2*, tomamos de referencia algunos reportes (Qian et. al. 2019, Raghavan et. al. 2019, Siedler S. et. al. 2017). En estos reportes, desarrollan y caracterizan un biosensor para distintos compuestos, posteriormente, realizan mutantes aleatorias, ya sea de una enzima que cataliza la síntesis del compuesto de interés, o por “knockouts aleatorios” de la cepa productora. Utilizando como guía el biosensor desarrollado, y haciendo uso de diferentes reporteros, fluorescentes o colorimétricos, seleccionan una versión mejorada de la enzima o de la cepa, en la producción del compuesto particular.

Utilizando la fusión *aaeX::gfpmut2*, se plantea realizar una biblioteca de mutantes aleatorias del gen que codifica para la enzima TAL, encargada de catalizar la síntesis de pHCA a partir de tirosina, y proceder a seleccionar una versión mejorada en la síntesis de pHCA, únicamente basados en la probabilidad, y guiándonos con la fluorescencia emitida por el biosensor *aaeX::gfpmut2*.

Para esta aplicación, también es de importancia definir el rango dinámico de detección del biosensor (Fig. 20).

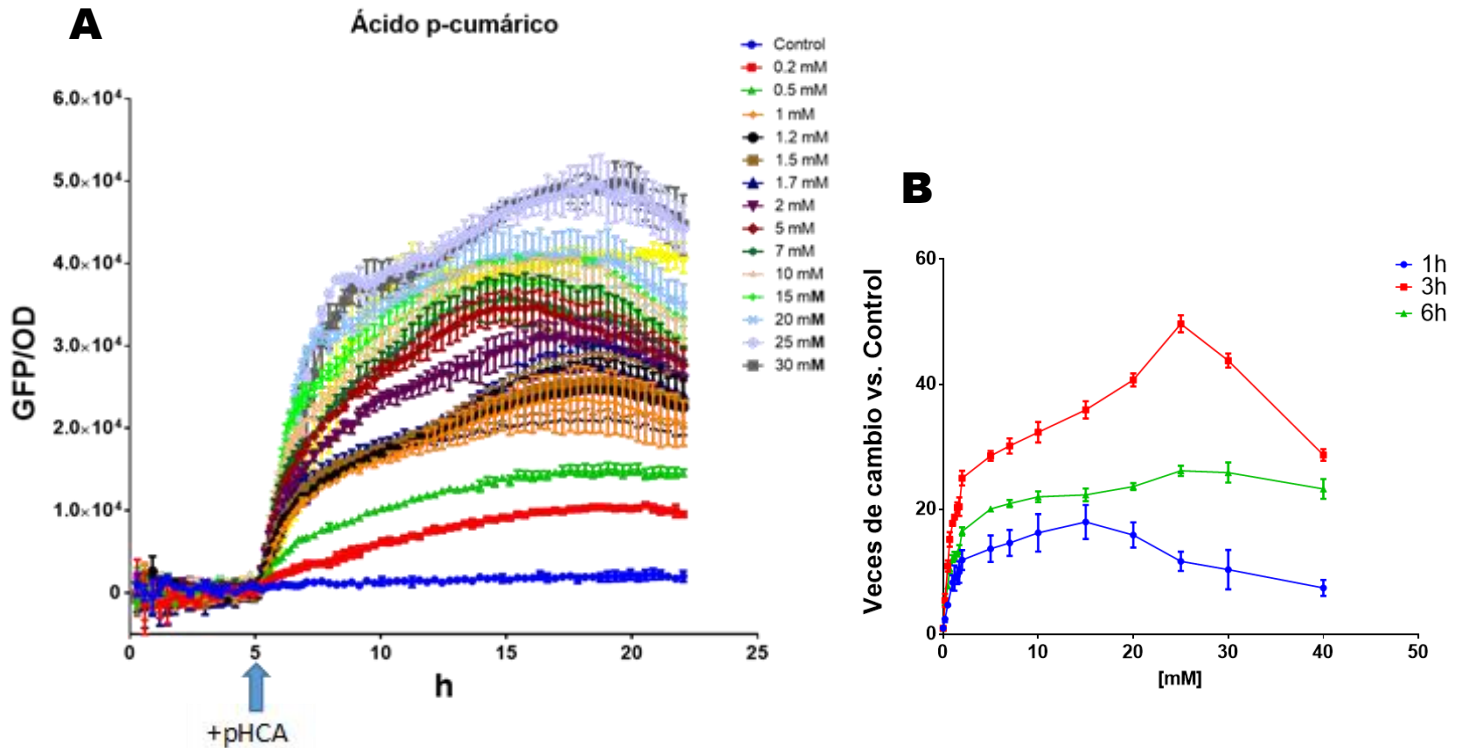


Fig. 20. Dinámica de respuesta de la fusión *aaeX::gfpmut2* al pHCA. A) Cinética de fluorescencia específica (GFP/OD), induciendo a la hora 5, con diferentes concentraciones de pHCA. B) Veces de cambio de GFP/OD relativo al control, a la hora 1, 3 y 6 posterior a la adición de pHCA para cada concentración probada.

Basándonos en la gráfica B de la Fig. 20, se puede observar que a la hora 3 se detecta la mayor señal para cada concentración probada, con una concentración de saturación de 25 mM, ya que a 30 mM la señal no fue lineal. La concentración mínima probada de 0.2 mM fue detectada por el biosensor, por lo que se establece un rango dinámico de detección de 0.2 mM-25 mM ($R^2=0.8$).

Con los experimentos mostrados en esta sección, se comprobó que la fusión *aaeX::gfpmut2*, responde específicamente a ácidos carboxílicos aromáticos.

Se plantearon importantes aplicaciones de este biosensor, las cuales, darán lugar al desarrollo de futuras investigaciones, y aplicaciones como sistema de expresión y para el desarrollo de una nueva versión de la enzima TAL. Se demostró el rango

dinámico de respuesta al pHCA, dando evidencia importante para su futura aplicación.

7. Regulación transcripcional del operón *aaeXAB*

Debido al particular interés de la secuencia regulatoria del operón *aaeXAB*, por las aplicaciones anteriormente mencionadas, decidimos estudiar la regulación de la expresión de este operón.

La evidencia de AaeR como regulador positivo, y su activación con ácidos carboxílicos aromáticos, fue demostrado por Van Dyk et. al., utilizando una fusión transcripcional *aaeX::luxCDABE*, similar al empleado en este trabajo. Para estudiar el papel de AaeR, realizaron el experimento de inducción con pHBA (ácido para-hidroxibenzoico) en una cepa $\Delta aaeR$, observando que no se daba la inducción de su reportero luminiscente. (Fig. 22).

TABLE 2. Bioluminescence response of the *yhcRQP-luxCDABE* gene fusion to pHBA^a

[pHBA], mM	Relative light units	
	<i>yhcS</i> ⁺ = <i>aaeR</i> ⁺	<i>yhcS</i> = $\Delta aaeR$
0	0.631	0.815
1.6	6.72	1.02
3.1	10.2	1.16
6.2	16.2	1.42
12.5	30.8	1.82
25	66.6	1.59
50	91.7	0.614
100	0.437	0.045

^a *E. coli* strains MG1655 carrying pDEW655 and DPD2433 carrying pDEW655 were used. Log-phase cultures in LB medium were treated with the indicated concentrations of pHBA for 30 min.

Fig. 21. Experimento de inducción de la fusión *aaeXAB::luxCDABE* (en este reporte, los genes del operón estaban identificados como *yhcRQP*, y el regulador *aaeR*, tenía el nombre de *yhcS*). Tomado y modificado de Van Dyk et. al. 2004

Como se puede observar en el experimento reportado, la cepa *aaeR+* responde al pHBA de manera dosis dependiente, sin embargo, cuando realizan el experimento en la cepa Δ *aaeR*, la fusión no responde a ninguna de las concentraciones de pHBA probadas. Tomando como referencia este dato, se plantea la siguiente dinámica de regulación (Fig. 23).

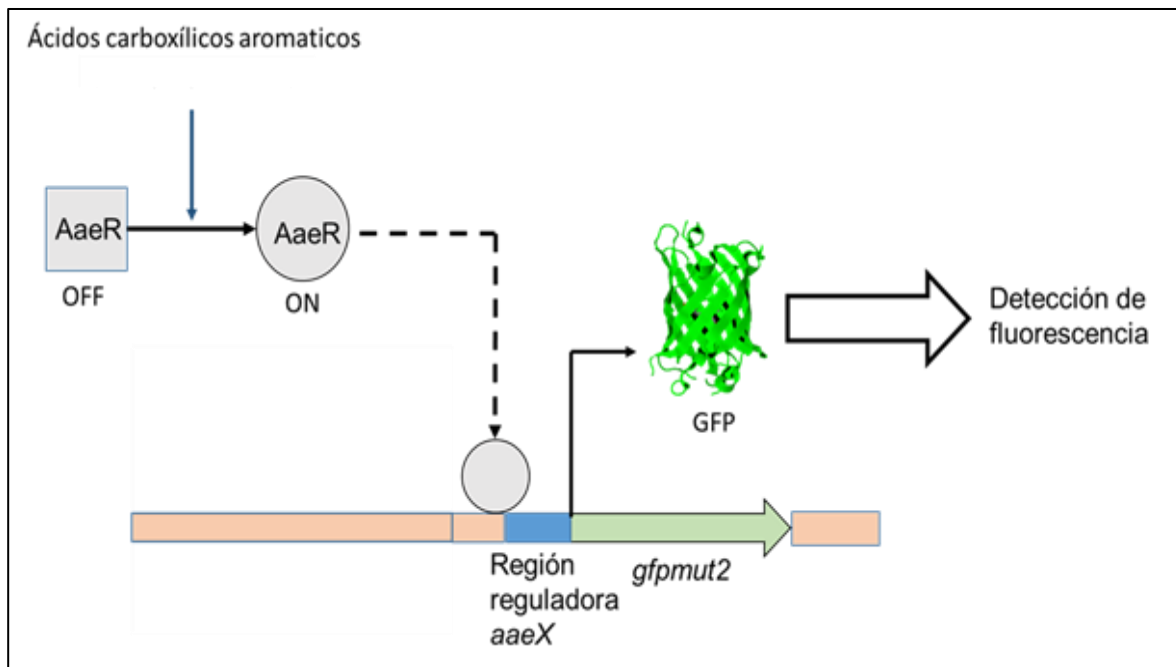
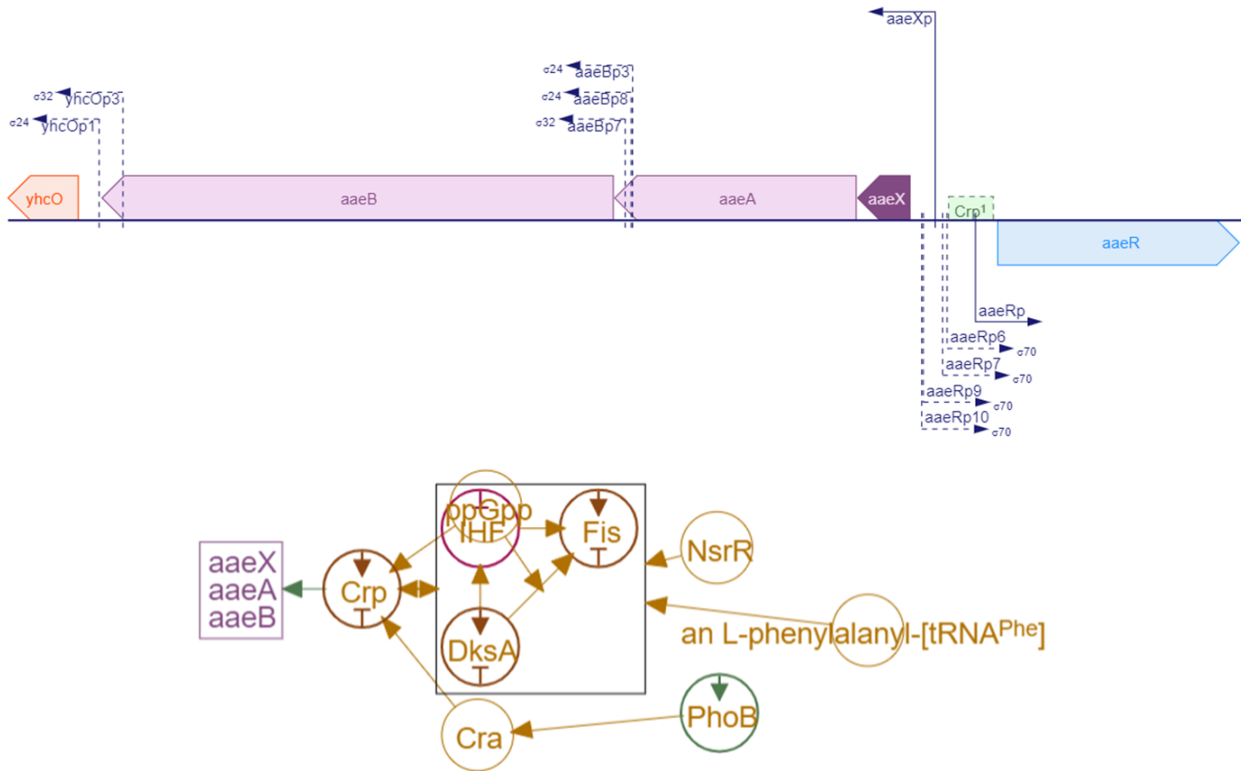


Fig. 22. Regulación de la fusión *aaeX:gfpmut2* por el regulador AaeR.

Al revisar la regulación reportada en bases de datos, como Regulon DB (<http://regulondb.ccg.unam.mx/>) y EcoCyc (<https://ecocyc.org/>), encontramos que el operón también tiene regulación por el regulador metabólico CRP (Fig. 24), inferido por similitud de secuencia consenso. Esto nos causó confusión, debido a que se reporta una regulación positiva por CRP, y no se menciona la regulación por AaeR.

A**B**

Operon					
Name:	aaeXAB				
Operon arrangement:	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Transcription unit</th> <th>Promoter</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>null</td> <td>aaeXp</td> </tr> </tbody> </table>	Transcription unit	Promoter	null	aaeXp
Transcription unit	Promoter				
null	aaeXp				
Transcriptional Regulation					
Activated by:	CRP				

Fig. 23. Regulación del operón *aaeXAB*. A) Base de datos de EcoCyc (<https://ecocyc.org/>) B) Base de datos de RegulonDB (<http://regulondb.ccg.unam.mx/>)

Decidimos evaluar la participación del regulador CRP en la regulación del operón *aaeXAB*.

Como una primera aproximación, se realizó el experimento de inducción en dos fuentes de carbono distintas. La primera, en glucosa, ya que se sabe que con esta fuente de carbono hay menor producción de cAMP, y por lo tanto, menor activación de CRP para su unión a su secuencia consenso. Y la segunda, en glicerol, al ser una fuente de carbono gluconeogénica, hay mayor síntesis de cAMP, y mayor activación de CRP (Fig. 25).

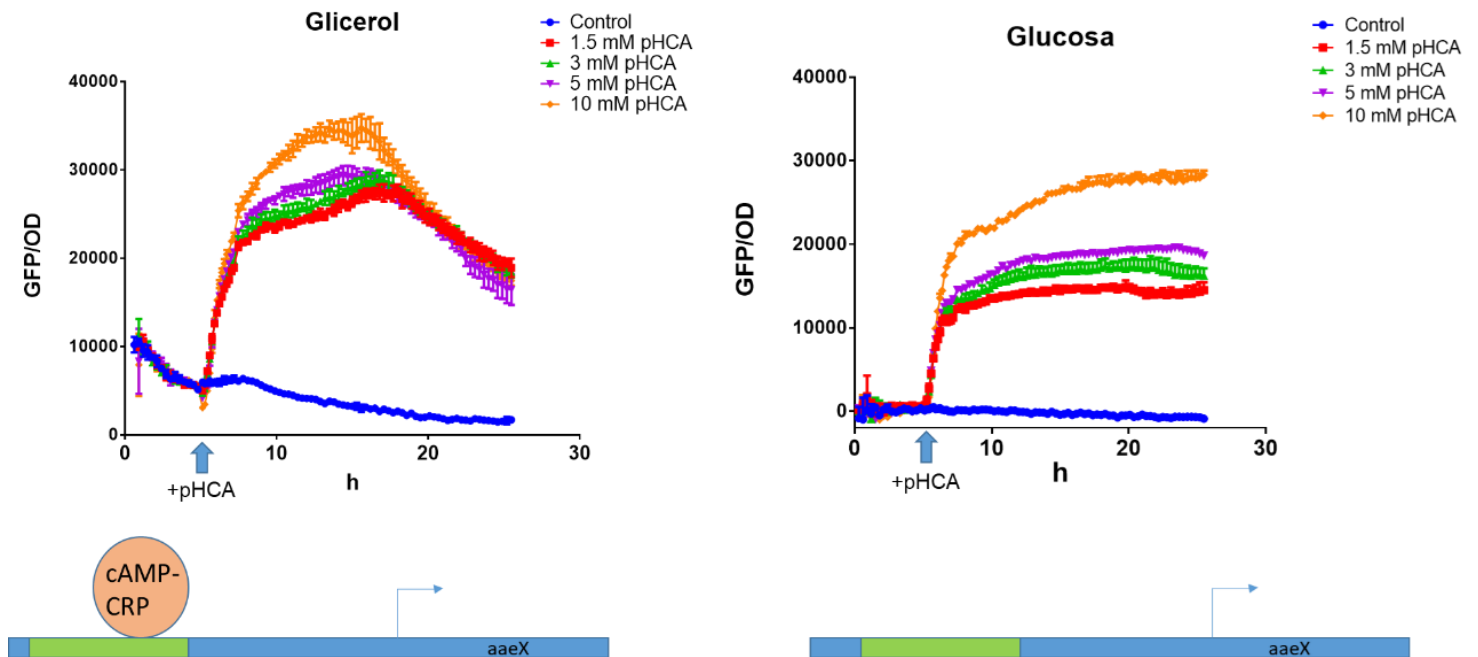


Fig. 24. Inducción de la fusión *aaeX::gfpmut2* con diferentes concentraciones de pHCA, en glicerol y glucosa.

Observamos que al realizar el experimento en glicerol, previo a la inducción, los valores de GFP/OD basales, eran mayores a comparación del experimento en glucosa. Esto nos dio evidencia que CRP, efectivamente regula positivamente a *aaeX*, sin embargo, tras la adición del pHCA, se da la inducción en ambas fuentes de carbono. Sin embargo, los valores de GFP/OD son mayores en glicerol que en glucosa; esta diferencia pudo deberse a la GFP producida previa a la inducción, ya que la producción de GFP es acumulativa, o la otra hipótesis es que se dé una mayor inducción cuando CRP se encuentra unido a su secuencia consenso.

Para estudiar la participación de cada regulador (CRP y AaeR), se procedió a realizar el experimento de inducción de la fusión *aaeX::gfpmut2*, en cepas de *E. coli* BW25113 de la colección de Keio (Baba et. al. 2006), mutantes Δcrp y $\Delta aaeR$, en ambas fuentes de carbono (Fig. 26).

La cepa Δcrp no muestra fluorescencia previa a la inducción en glicerol, y al agregar el pHCA, los valores de GFP/OD son similares en ambas fuentes de carbono. Al inducir la cepa $\Delta aaeR$, no se observó inducción de la fusión, sin embargo, de nuevo, los valores de GFP/OD en glicerol eran mayores a comparación del experimento en glucosa, previo a la inducción con pHCA.

Con este experimento se puede hipotetizar la siguiente dinámica de regulación. El regulador CRP efectivamente es un regulador positivo del operón, sin embargo, la regulación es basal, siendo AaeR el principal inductor de la expresión de este operón con la adición del inductor (pHCA). (Fig. 27).

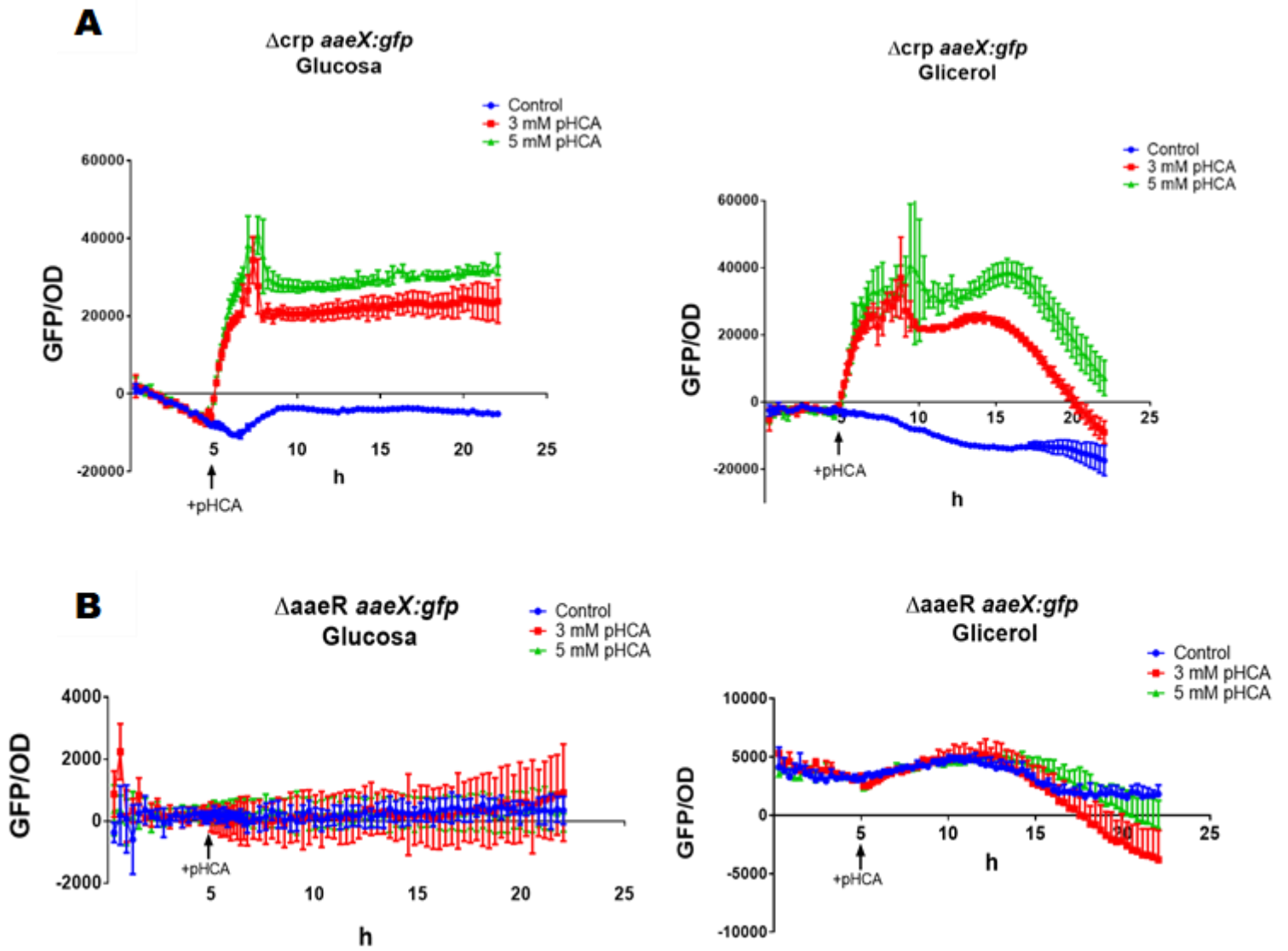


Fig. 25. Inducción con pHCA de la fusión *aaeX::gfpmut2* en una cepa Δcrp (A) y en una cepa $\Delta aaeR$ (B), en glucosa y glicerol.

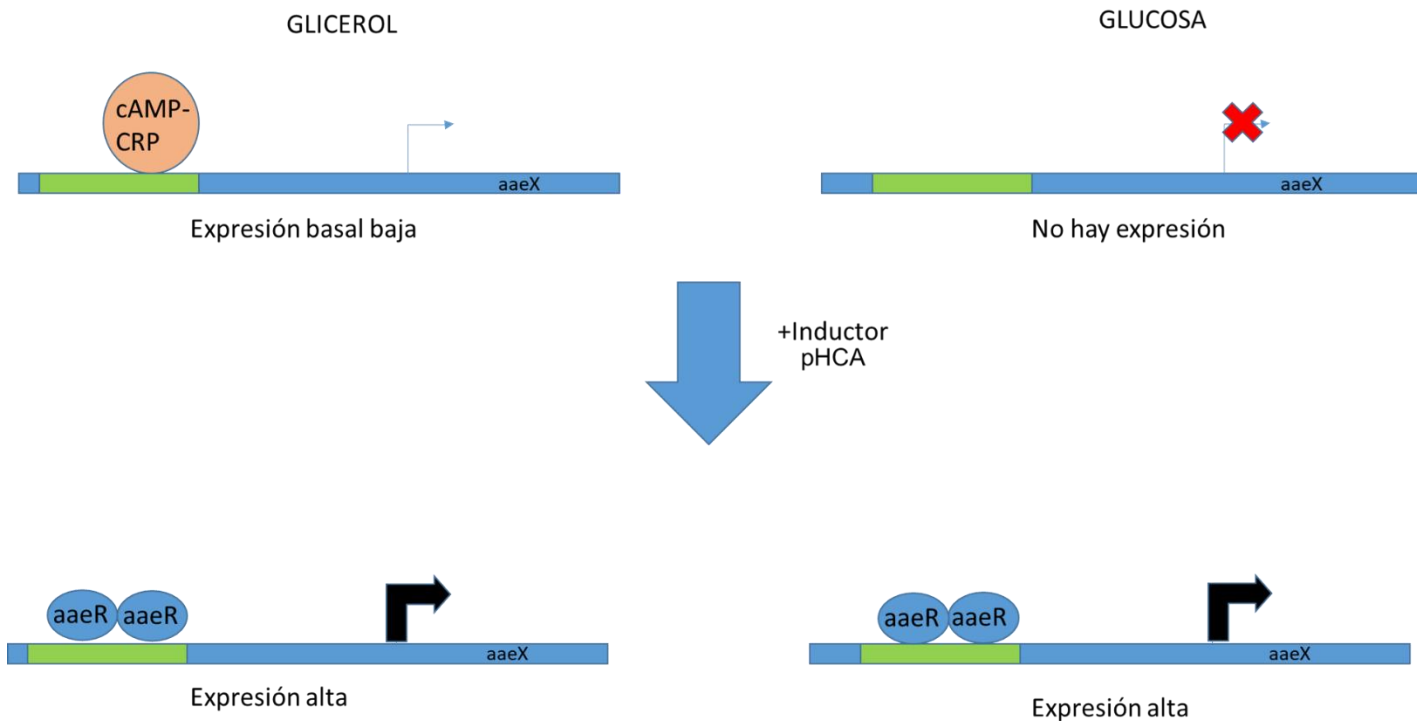


Fig. 26. Regulación del operón *aaeXAB* por los reguladores CRP y AaeR.

En esta sección, se concluye que ambos reguladores CRP y AaeR, regulan positivamente el operón *aaeXAB*, siendo CRP un regulador débil y manteniendo expresión basal del operón. Sin embargo, cuando la concentración intracelular de ácidos carboxílicos aromáticos incrementa, el regulador AaeR regula fuertemente la expresión del operón.

VII. Conclusiones

En el presente trabajo se estudió el efecto del pHCA en la velocidad específica de crecimiento de la cepa W3110 de *E. coli*, y se estudió la respuesta transcriptómica de esta cepa, posterior a la adición de pHCA 5 mM.

De acuerdo al perfil transcriptómico, los principales mecanismos de toxicidad del pHCA son, daño oxidativo y mal plegamiento de proteínas, y el incremento en la permeabilidad de la membrana plasmática, como se ha sugerido en otros trabajos (Zaixiang et. al. 2012, Lee et. al. 2012). Esto fue observado por el incremento de genes de chaperonas y proteasas, en conjunto con genes del metabolismo de diferentes aminoácidos como una respuesta al daño a proteínas, y la represión de genes que codifican para distintos importadores, como una respuesta de estrés osmótico. El regulador MarA tiene un papel importante en la resistencia al pHCA, por lo que se propone estudiar los genes regulados por este factor, para comprender los mecanismos de tolerancia a este compuesto. El sistema AaeXAB es el principal sistema de excreción de pHCA en *E. coli*.

La fusión *aaeX::gfpmut2* fue utilizada para estudiar la respuesta a diferentes ácidos carboxílicos aromáticos. Se observó que el pHCA es el compuesto que induce en mayor medida la expresión, seguido por el ácido ferúlico, vainillina, ácido parahidroxibenzoico, ácido benzoico y por último el ácido cafeico. La fusión no respondió a tirosina ni shikimato, demostrando la especificidad del regulador AaeR a ácidos carboxílicos aromáticos en la inducción de este operón.

Se plantearon diferentes posibles aplicaciones de esta secuencia regulatoria como un biosensor de pHCA. Para su futura aplicación como biosensor, se determinó el rango dinámico de respuesta al pHCA de 0.2 a 25 mM con una $R^2=0.8$. Con el desarrollo de este biosensor, se plantearon futuros proyectos de investigación.

Por último, se estudió la regulación de esta fusión transcripcional, la cual, estaba poco esclarecida en la literatura. Se propone que la secuencia regulatoria del operón *aaeXAB*, es regulado positivamente por CRP, manteniendo una expresión basal

baja, y con la adición de pHCA, el regulador AaeR induce fuertemente la expresión del operón.

Suplementarios

Metodología

1. Extracción de RNA

A partir del cultivo en las condiciones mencionadas (Metodología), se tomarón 10 mL en un tubo Falcon de 15 mL con 500 μ L de RNA Later, se centrifugó (Srovall Legend Mach 1.6R, Saint Herblain, USA) 8 krpm por 5 minutos a 4 °C y se eliminó el sobrenadante. La pastilla se almaceno a -70°C hasta su uso.

La extracción de RNA se realizó utilizando el método de “fenol caliente” que consta de lo siguiente:

1. La pastilla se resuspendió en 1 mL de solución I () y 100 μ L de lisozima, se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente.
2. Se adicionaron 2 mL de solución II () y se calentó a 60 °C por 5 minutos.
3. Se adicionaron 2 mL de fenol caliente equilibrado con agua y pH ácido (Invitrogen, Van Allen Way, USA) a una temperatura de 70 °C y se mezcló por vortex por 1 minuto.
4. Se centrifugo a 10 krpm por 10 minutos a 4°C para separación de fases.
5. Se recuperó la fase acuosa superior y se transfirió a otro tubo falcon de 15 mL libre de RNasa.
6. Se repitieron los pasos 3.4 y 5.
7. Se adicionaron 2 mL de una solución fenol:cloroformo (1:1) y se mezcló por vortex por 1 minutos.
8. Se centrifugo igual que en el paso 4 y se recuperó la fase acuosa superior.
9. Se precipitaron los ácidos nucleicos adicionando un volumen 1/10 de acetato de sodio (3M) y 2.5 volumentes de etanol absoluto, se mezcló por inversión y se almaceno a -20 °C toda la noche.
10. Se obtuvo el pellet de RNA centrifugando a una velocidad de 10 krpm por 15 min a 4 °C y se resuspendio en 300 μ L de agua estéril con inhibidor de RNAsas.

11. Se realizaron 3 extracciones consecutivas con cloroformo adicionando un volumen igual (300 μ L), vortex por 1 minuto y centrifugando 10 krpm por 10 minutos a 4 °C.
12. La última extracción se precipitó con 30 μ L de acetato de sodio 3M y 750 μ L de etanol absoluto, se almacenó a -20 °C toda la noche.
13. Se obtuvo el pellet de RNA centrifugando 13 krpm por 15 minutos y se resuspendió en TE con DEPC.
14. Se corrieron electroforesis en geles de agarosa 2% para ver la integridad utilizando 1 μ L de muestra.
15. Se determinó la concentración de RNA utilizando un espectrofotómetro UV-Vis (Nanodrop-2000c, Thermo Scientific, Wilmington, USA), así como las relaciones $OD_{260/280}$ Y $OD_{260/230}$.

Para la eliminación de DNA, las muestras fueron tratadas con DNAsa, utilizando el kit DNase I (Fermentas, Burlington, Canada).

1. En un tubo eppendorf de 600 μ L libre de RNAsas, se preparó la siguiente reacción: 8 μ L de la preparación de RNA (aprox. 12 μ g)+ 1 μ L buffer DNAsa + 1 μ L de DNAsa. Las muestras se incubaron por 30 minutos a 37 °C y posteriormente se añadieron 3 μ L de resina para detener la reacción, se dio vortex por 30 segundos y se centrifugaron 13 krpm por 2 minutos.
2. Se tomó la fase acuosa y se colocó en otro tubo libre de RNAsa.
3. Para comprobar la eliminación del DNA, se corrió otro gel como en el paso 14 anterior utilizando 1 μ L de la muestra.

2.- Eliminación de rRNA y construcción de biblioteca cDNA

El diagrama de flujo de trabajo del kit se resume en la siguiente figura.

Library Preparation Overview:

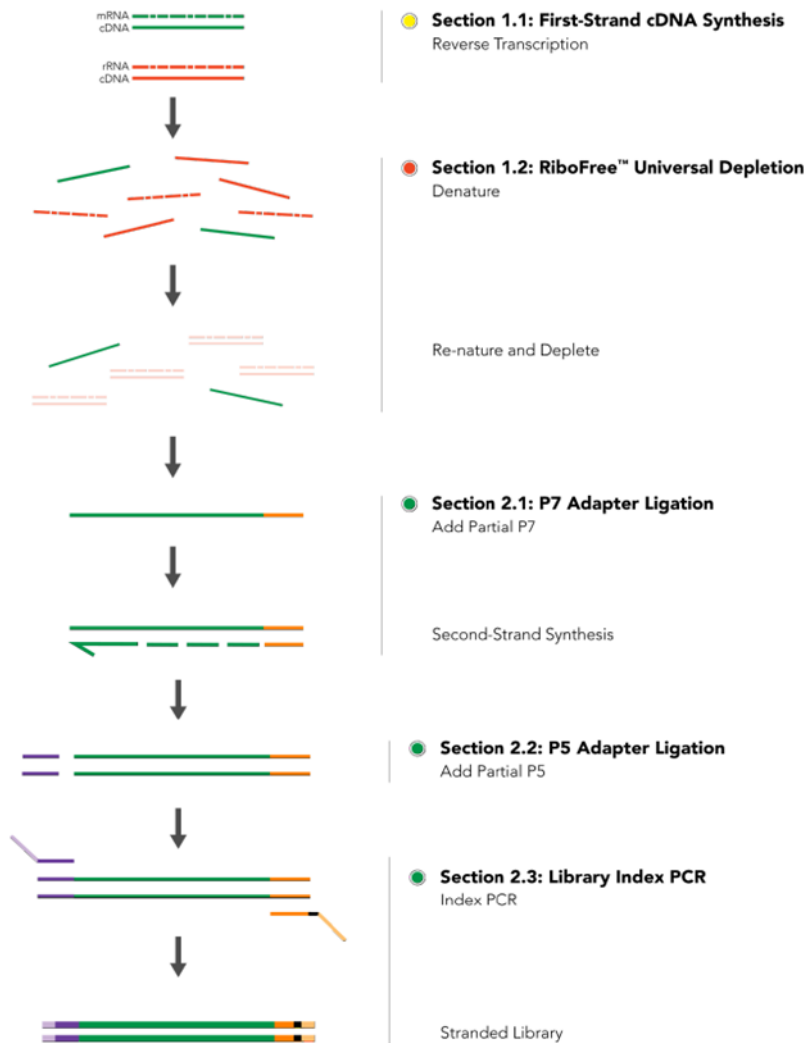


Fig. 1 Diagrama de flujo para la eliminación de rRNA y construcción de librería de cDNA.

3.- Scripts utilizados en el análisis de expresión diferencial

SCRIPTS

EdgeR

```
library(edgeR)
```

```
library(limma)
```

```
library(readr)
```

```
library(ggplot2)
```

```
setwd("colocar la direccion de la carpeta que contenga los archivos obtenidos de la cuantificación de SALMON")
```

```
EtOH_60_A <- read.table("A_salida_cds.quant/quant.sf", header = TRUE)
```

```
EtOH_60_D <- read.table("D_salida_cds.quant/quant.sf", header = TRUE)
```

```
EtOH_60_G <- read.table("G_salida_cds.quant/quant.sf", header = TRUE)
```

```
Cum_20_B <- read.table("B_salida_cds.quant/quant.sf", header = TRUE)
```

```
Cum_20_E <- read.table("E_salida_cds.quant/quant.sf", header = TRUE)
```

```
Cum_20_H <- read.table("H_salida_cds.quant/quant.sf", header = TRUE)
```

```
Cum_60_C <- read.table("C_salida_cds.quant/quant.sf", header = TRUE)
```

```
Cum_60_F <- read.table("F_salida_cds.quant/quant.sf", header = TRUE)
```

```
Cum_60_I <- read.table("I_salida_cds.quant/quant.sf", header = TRUE)
```

```
C_60_N <- read.table("N_salida_cds.quant/quant.sf", header = TRUE)
```

```
C_60_O <- read.table("O_salida_cds.quant/quant.sf", header = TRUE)
```

```
C_60_P <- read.table("P_salida_cds.quant/quant.sf", header = TRUE)
```

```
count=data.frame(EtOH_60_A$NumReads,EtOH_60_D$NumReads,EtOH_60_G$NumReads,Cum_20_B$NumReads,Cum_20_E$NumReads,Cum_20_H$NumReads,Cum_60_C$NumReads,Cum_60_F$NumReads,Cum_60_I$NumReads,C_60_N$NumReads,C_60_O$NumReads,C_60_P$NumReads)
```



```
colnames(count)=c("EtOH_60_A","EtOH_60_D","EtOH_60_G","Cum_20_B","Cum_20_E","Cum_20_H","Cum_60_C","Cum_60_F","Cum_60_I","C_60_N","C_60_O","C_60_P")
```

```
row.names(count)=EtOH_60_A$Name
```

```
cpm_log <- cpm(count, log = TRUE)
```

```
pca <- prcomp(t(cpm_log), scale. = TRUE)
```

```
plot(pca$x[, 1], pca$x[, 2], pch = ".", xlab = "PC1", ylab = "PC2")
```

```
text(pca$x[, 1], pca$x[, 2], labels = colnames(cpm_log))
```

```
summary(pca)
```

```
dim(count)
```

```
round(colSums(count)/1000000)
```

```
keep=rowSums(cpm(count) >= 1) >= 2
```

```
table(keep)
```

```
counts = count[keep,]
```

```
dim(counts)
```

```
colnames(counts)
```

```
group=(factor(sub("..$", "", colnames(counts))))
```

```
group
```

```
table(group)
```

```
dgelist <- DGEList(counts=counts, group=group)
```

```
dgelist$samples
```

```
normfactors <- calcNormFactors(dgelist)
```

```
normfactors
```

```
estdisp <- estimateDisp(dgelist)
```

```
estdisp
```

```
plotBCV(estdisp)
```

```
design <- model.matrix(~0+group, data=dgelist$samples)
```

```

design
fit <- glmQLFit(estdisp,design)
plotQLDisp(fit)

#####GRUPOS C_60 Cum_20 Cum_60
EtOH_60#####

##### SE ELIGE EL CONTRASTE SEGÚN SEA EL CASO
DEPENDIENDO DE LA LISTA DE DIFERENCIALES QUE SE PLANEA
OBTENER#####

#1contrast = makeContrasts("EtOH_60"="EtOH_60-C_60", levels =
dgelist$samples$group)

#2contrast = makeContrasts("Cum_60"="Cum_60-EtOH_60", levels =
dgelist$samples$group)

#3contrast = makeContrasts("Cum_tiempo"="Cum_20-Cum_60", levels =
dgelist$samples$group)

#4contrast = makeContrasts("Cum_20"="Cum_20-EtOH_60", levels =
dgelist$samples$group)

contrast
qlf=glmQLFTest(fit,contrast = contrast)
summary(qlf)
topTags(qlf)
dt1 =decideTestsDGE(qlf, adjust.method = "BH", p.value = 0.05, lfc = 0.0)

#write.table (dt1, file ="C:/Users/soull/Desktop/TRANSCRIPTOMA
NACHO/TICKETS/Descomprimidos/Cuantificacion_Salmon/mRNA/diferenciales_c
um_20_vs_cum_60.txt",sep= "\t", na="NA", row.names = TRUE)

table(dt1)
summary(dt1)
deGenes=rownames(qlf)[dt1!=0]

plotSmear(dgelist, de.tags = deGenes, ylab = "logFC", xlab = "Average
logCPM",cex = 0.5,lowess = TRUE)

topTable=topTags(qlf,n=Inf)$table
head(topTable)

```

```

#write.table (topTable, file
="C:/Users/soull/Desktop/resultados/NGS_INMEGEN_JFragoso/Salmon-R/quant-
salmon/Resultados por cepa EdgeR/topTable_chida.txt",sep= "\t", na="NA",
row.names = TRUE)

top1=topTable[topTable$PValue <= 0.05,]

#top1=top[top$FDR <= 0.01,]

summary(top1)

write.table (top1, file ="C:/Users/soull/Desktop/TRANSCRIPTOMA
NACHO/TICKETS/Descomprimidos/Cuantificacion_Salmon/mRNA/DIFF_CUM_60
vsET-OH_60.txt",sep= "\t", na="NA", row.names = TRUE)

#cnts <- read_delim("quant-salmon/Rexpresion_diff.txt","\t", escape_double =
FALSE, trim_ws = TRUE)

write.table (top1, file
="C:/Users/soull/Desktop/resultados/NGS_INMEGEN_JFragoso/Salmon-R/quant-
salmon/Resultados por cepa EdgeR/VH33-W3110.txt",sep= "\t", na="NA",
row.names = TRUE)

```

PERL

```

#!/usr/bin/perl

use strict;

#####Abriendo          archivos          de          entrada
#####

my $archivo1 = $ARGV[0];

open IN, "$archivo1"; #Archivos de expresion diferencial salidos de EdgeR o bien
listas de editados salidos de Retrive/ID de uniprot.org

#####Declarando
variables#####

my ($linea,$lfc,$signo);

my (@array);

#####Filtrando informacion por columnas
#####

```

```

while ($linea = <IN>){
chop $linea;
@array = split (/t/, $linea);

    if ($array[0] =~ m/^(WP/){
    $lfc = $array[1];

    if ($lfc <= -3){
    $signo = "DN";
    print "$array[0]\t$lfc\t$signo\n";
    }#if down-regulados
    else{$signo = "";}

    if ($lfc >= 1.5){
    $signo = "UP";
    print "$array[0]\t$lfc\t$signo\n";
    }#if down-regulados
    else{$signo = "";}

}
}#while

#####Cerrando archivos y programa
#####

close IN;
exit;

#####
#####

```


Resultados suplementarios

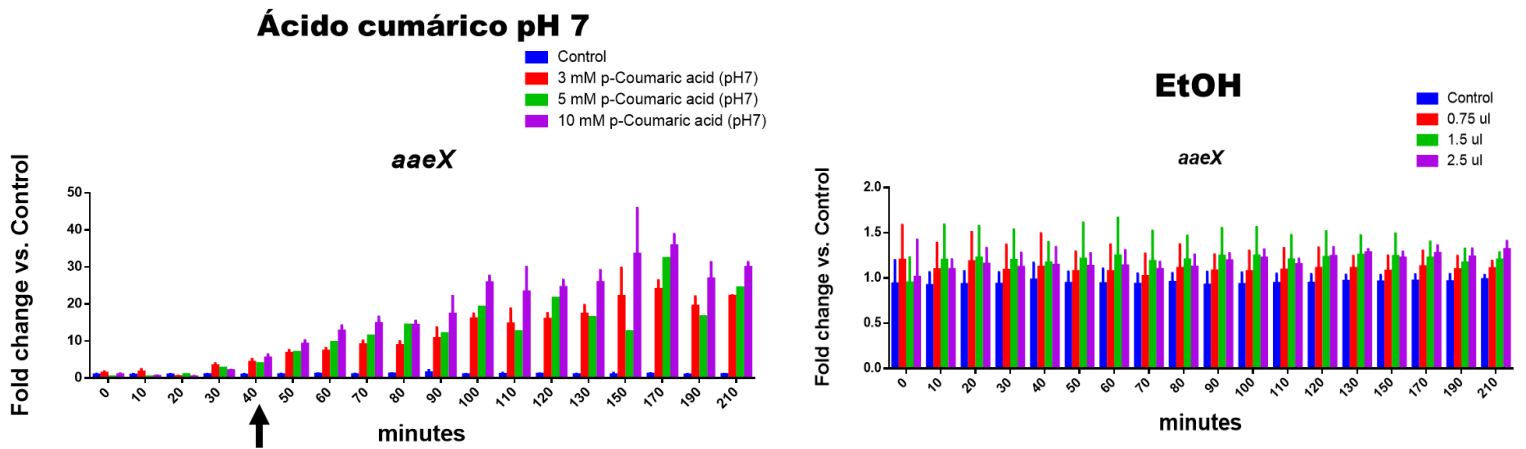
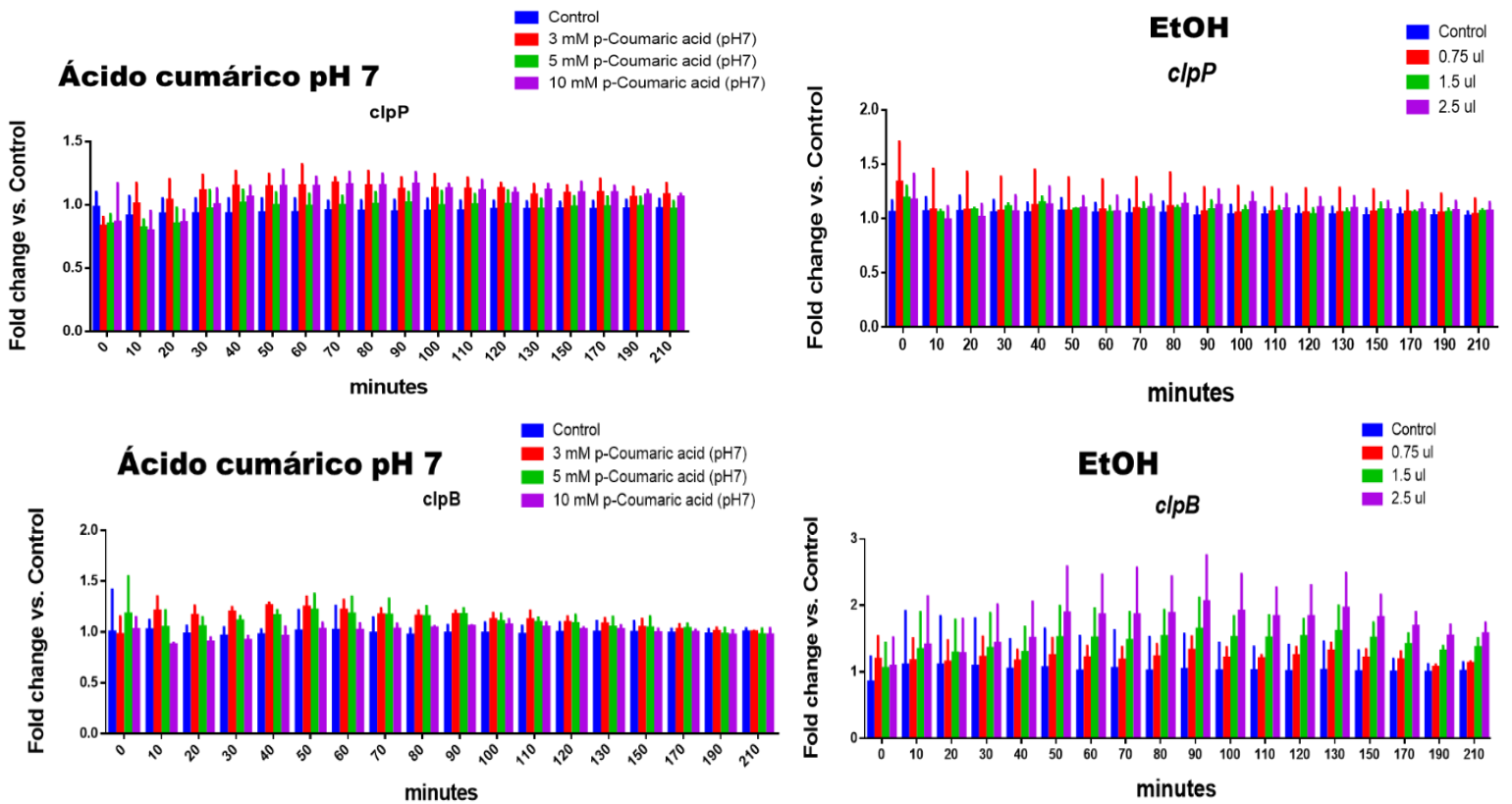


Fig. Suplementaria 1. Respuesta dinámica de la fusión *aaeX::gfpmut2* en presencia de pHCA pH7 y EtOH. La flecha indica el tiempo en el que se detecta un incremento mayor de 2 veces el valor de GFP/OD.



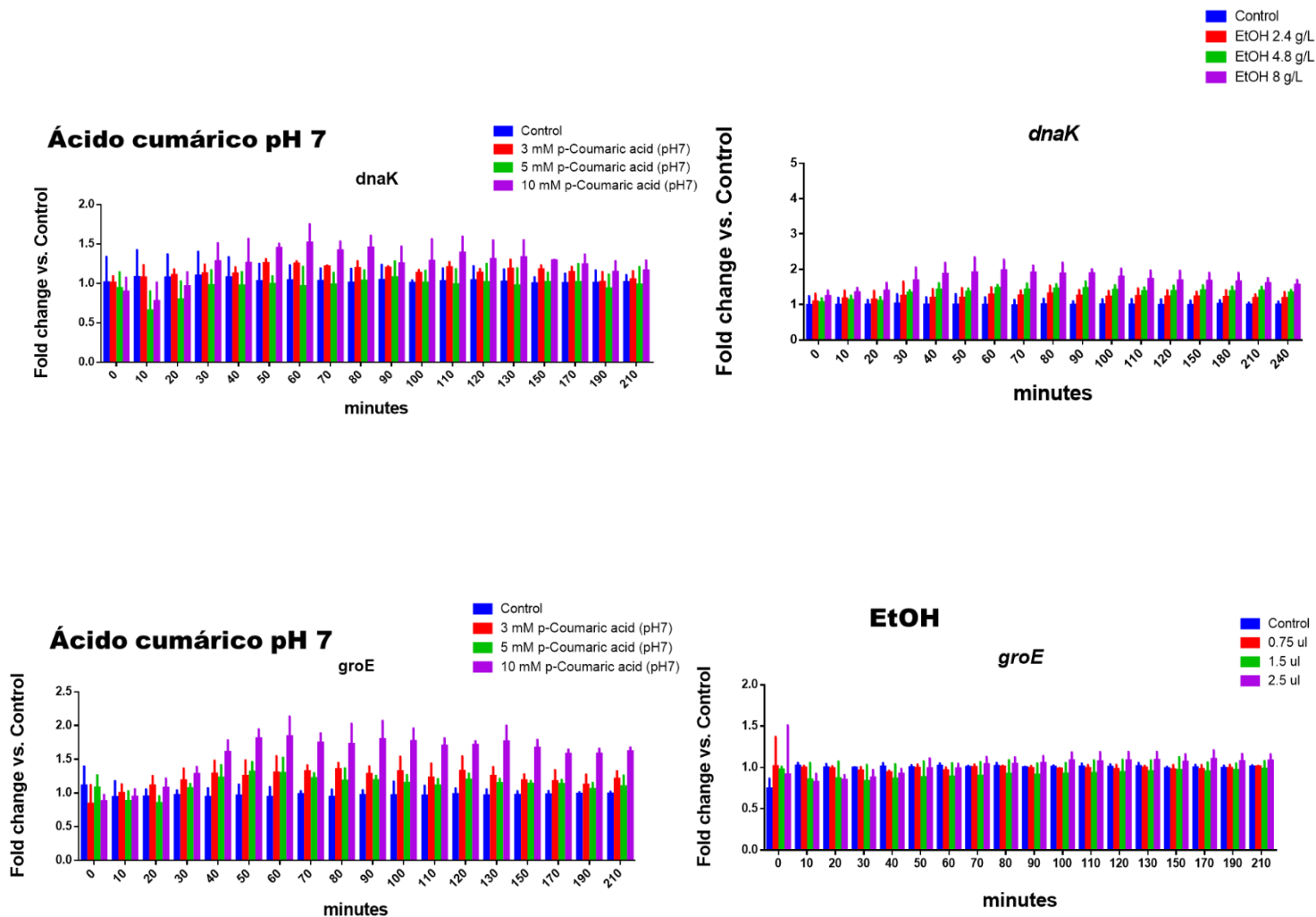


Fig. Suplementaria 2. Respuesta dinámica de genes de estrés oxidativo de proteínas, chaperonas, en presencia de pHCA pH 7 y EtOH.

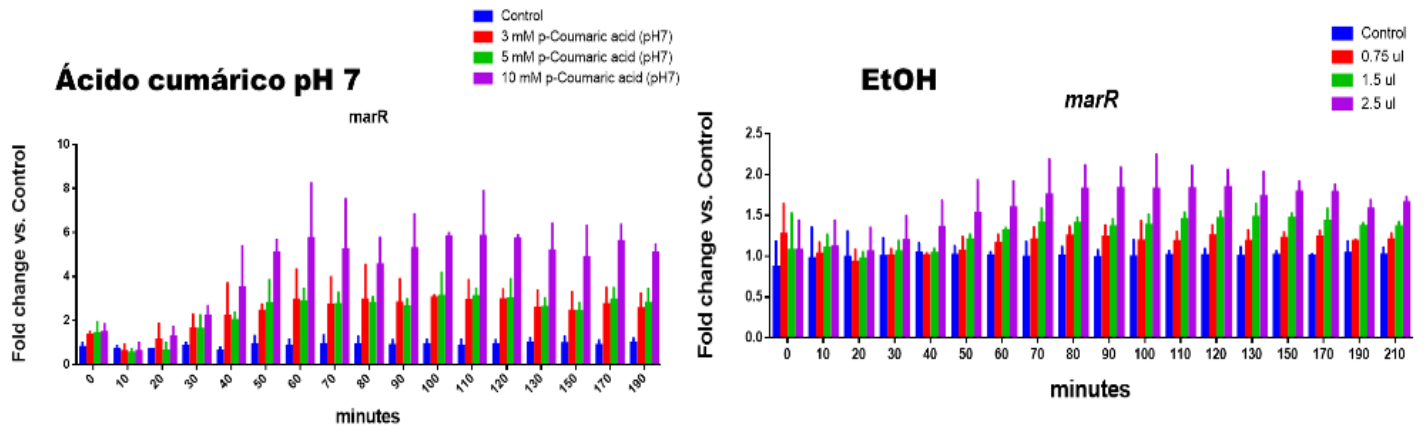


Fig. Suplementaria 3. Respuesta dinámica del gene *marR* en presencia de pHCA pH 7 y EtOH.

Referencias

- Ajay Kalanjana Monnappa , Siseon Lee , Robert J. Mitchell, (2013). Sensing of plant hydrolysate-related phenolics with an *aaeXAB::luxCDABE* bioreporter strain of *Escherichia coli*. *Bioresource Technology* 127 (2013) 429–434
- Alejandra Vargas-Tah and Guillermo Gosset, (2016). Production of cinnamic and p-hydroxycinnamic acids in engineered microbes. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 3:116. doi: 10.3389/fbioe.2015.00116
- Alejandra Vargas-Tah, Luz María Martínez, Georgina Hernández-Chávez, Mario Rocha, Alfredo Martínez, Francisco Bolívar and Guillermo Gosset (2015). Production of cinnamic and p-hydroxycinnamic acid from sugar mixtures with engineered *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories.* 14:6. DOI 10.1186/s12934-014-0185-1
- Alekshun MN, Levy SB. (1999). The *mar* regulon: multiple resistance to antibiotics and other toxic chemicals. *Trends Microbiol.* 1999 Oct;7(10):410-3.
- Alon Zaslaver, Anat Bren, Michal Ronen, Shalev Itzkovitz, Ilya Kikoin, Seagull Shavit, Wolfram Liebermeister, Michael G Surette, Uri Alon (2006). A comprehensive library of fluorescent transcriptional reporters for *Escherichia coli*. *Nature Methods.* Vol. 3 No. 8. DOI:10.1038/NMETH895.
- Andres R. Rechner, Gunter Kuhnle, Paul Bremner, Gary P. Hubbard, Kevin P. Moore, Catherine A. Rice-Evans. (2002). The metabolic fate of dietary polyphenols in humans. *Free Radical Biology & Medicine.* Vol. 33, No. 2, pp. 220–235, 2002.
- Baba Tomoya, Ara Takeshi, Hasegawa Miki, Takai Yuki, Okumura Yoshiko, Baba Miki, Datsenko A Kirill, Tomita Masaru, Wanner L Barry, Mori Hirotada (2006). Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol Syst Biol.* 2006; 2: 2006.0008. doi: 10.1038/msb4100050
- Borja M. Gheorghe, Rodríguez Angelica, Campbell Kate, Borodina Irina, Chen Yun, Nielsen Jens. (2019). Metabolic engineering and transcriptomic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* producing p-coumaric acid from xylose. *Borja et al. Microb Cell Fact* 18:191. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1244-4>
- Calero Patricia, Jensen I. Sheila, Bojanovic Klara, Lennen M. Rebecca, Koza Anna, Nielsen T. Alex (2017). Genome-wide identification of tolerance mechanisms toward p-coumaric acid in *Pseudomonas putida*. *Biotechnology and Bioengineering.* 2017;1–13. DOI: 10.1002/bit.26495
- Campos F.M, Couto J.A., Figueiredo A.R., Tóth I.V., Rangel A.O.S.S., Hogg T.A.. (2009). Cell membrane damage induced by phenolic acids on wine lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 135 (2009) 144–151

- Castelli Francesco, Uccella Nicola, Trombetta Domenico and Saija Antonella. (1999). Differences between coumaric and cinnamic acids in membrane permeation as evidence by time-dependent calorimetry. *J. Agric. Food. Chemm.* 1999, 47, 991-995
- Chávez-Béjar, M.I., Lara, A.R., López, H., Hernández-Chávez, G., Martínez, A., Ramírez, O.T., et al. (2008). Metabolic engineering of *Escherichia coli* for L-tyrosine production by expression of genes coding for the chorismate mutase domain of the native chorismate mutase-prephenate dehydratase and a cyclo-hexadienyl dehydrogenase from *Zymomonas mobilis*. *Appl. Environ. Microb.* 74, 3284-3290. doi:10.1128/AEM.02456-07
- Cohen SP, Levy SB, Foulds J, Rosner JL. (1993). Salicylate induction of antibiotic resistance in *Escherichia coli*: activation of the mar operon and a mar-independent pathway. *J Bacteriol.* 1993 Dec;175(24):7856-62.
- D. Hervert-Hernandez e I. Goñi (2014). Dietary polyphenols and human gut microbiota: Review. *Food Reviews International.* 27:154–169, 2011. DOI: 10.1080/87559129.2010.535233
- Díaz Eduardo, Ferrández Abel, Prieto A. María, García L. José. (2001). Biodegradation of Aromatic Compounds by *Escherichia coli*. *MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEW*, 1092-2172/01/\$04.000 DOI: 10.1128/MMBR.65.4.523–569.2001
- Giovanni Emiliani, Marco Fondi, Renato Fani, Simonetta Gribaldo. (2009). A horizontal gene transfer at the origin of phenylpropanoid metabolism: a key adaptation of plants to land. *Biology direct.* 4:7 doi:10.1186/1745-6150-4-7.
- Hans-Walter Heldt. *Plant Biochemistry* (2005). Elsevier Academic Press. pp 437-445
- Hernández-Chávez Georgina, Martínez Alfredo, Gosset Guillermo. (2019). Metabolic engineering strategies for caffeic acid production in *Escherichia coli*. *Electronic Journal of Biotechnology* 38 (2019) 19–26
- Hiroko Mori and Hideo Iwahashi. Antioxidant Activity of Caffeic Acid through a Novel Mechanism under UVA Irradiation *J. Clin. Biochem. Nutr.*, 45, 49–55, July (2009)
- Hüseyin Boz (2015). p-Coumaric acid in cereals: presence, antioxidant and antimicrobial effects. Review. *International Journal of Food Science and Technology.* 50, 2323–2328. doi:10.1111/ijfs.12898
- Inés Reverón, Blanca de las Rivas, Rosario Muñoz and Félix López de Felipe. (2012). Genome-wide transcriptomic responses of a human isolate of *Lactobacillus plantarum* exposed to p-coumaric acid stress. *Mol. Nutr. Food Res.*, 56, 1848–1859. DOI 10.1002/mnfr.201200384

- J.L. Rodrigues, R.G. Araújo, K.L.J. Prather, L.D. Kluskens, L.R. Rodrigues. (2015). Heterologous production of caffeic acid from tyrosine in *Escherichia coli*. *Enzyme and Microbial Technology* 71 36–44. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2015.01.001>
- Joseph A Chemler and Mattheos AG Koffas, (2008). Metabolic engineering for plant natural product biosynthesis in microbes. *Current Opinion in Biotechnology*, 19:597–605, DOI 10.1016/j.copbio.2008.10.011
- Kehan Pei, Juanying Ou, Junqing Huang, Shiyi Ou. (2015). p-Coumaric acid and its conjugates: dietary sources, pharmacokinetic properties and biological activities. *J Sci Food Agric* (2016); 96: 2952–2962. DOI 10.1002/jsfa.7578
- Lee J, Hiibel S R, Reardon K F, Wood T K. (2010). Identification of stress-related proteins in *Escherichia coli* using the pollutant cis-dichloroethylene. *J. Appl Microbiol.* 2010. Jun;108(6):2088-102. doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04611.x.
- Lütke-Eversloh T, Stephanopoulos G. Feedback inhibition of chorismate mutase/prephenate dehydrogenase (TyrA) of *Escherichia coli*: generation and characterization of tyrosine-insensitive mutants. *Appl Environ Microbiol* 2005;71:7224–8.
- Michael C. Jewett, Ana Paula Oliveira, Kiran Raosaheb Patil, Jens Nielsen. (2005). The role of high-throughput transcriptome analysis in metabolic engineering. *Biotechnology and bioprocess engineering*. 10: 385-399.
- M. Touaibia, J. Jean-François and J. Doiron, (2011). Caffeic Acid, A Versatile Pharmacophore: An Overview. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, Vol. 11, No. 8. 11, 695-713.
- Nayak, B., Liu, R.H. & Tang, J. (2013). Effect of processing on phenolic antioxidants of fruits, vegetables and grains – A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55, 887–918.
- Maddocks SE, Oyston PC (2008) Structure and function of the LysR-type transcriptional regulator (LTTR) family proteins. *Microbiology* 154(Pt 12):3609–3623
- Martin Holm Rau, Patricia Calero, Rebecca M. Lennen, Katherine S. Long and Alex T. Nielsen. (2016). Genome-wide *Escherichia coli* stress response and improved tolerance towards industrially relevant chemicals. *Microb Cell Fact* (2016) 15:176 DOI 10.1186/s12934-016-0577-5
- Karla Martínez-Gómez , Noemí Flores, Héctor M Castañeda, Gabriel Martínez-Batallar ,Georgina Hernández-Chávez, Octavio T Ramírez, Guillermo Gosset, Sergio Encarnación and Francisco Bolivar. (2012). New insights into *Escherichia coli* metabolism: carbon scavenging, acetate metabolism and carbon recycling responses during growth on glycerol. *Microbial Cell Factories* 2012, 11:46

- Stephen A. Bustin, Vladimir Benes, Jeremy A. Garson, Jan Hellemans, Jim Hugget, Mikael Kubist, Reinhold Mueller, Tania Nolan, Michael W. Pfaffl, Gregory L. Shipley, Jo Vandesompele, Carl T. Wittwer. (2009). The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry* 55:4
- O. K. Mirzoeva, R. N. Grishanin, P. C. Calder (1997). Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria. *Microbiol. Res.* (1997) 152,239-246
- Piero Dolara, Cristina Luceri, Carlotta De Filippo, Angelo Pietro Femia, Lisa Giovannelli, Giovanna Caderni, Cinzia Cecchini, Stefania Silvi, Carla Orpianesi, Alberto Cresci. (2005). Red wine polyphenols influence carcinogenesis, intestinal, microflora, oxidative damage and gene expression profiles of colonic mucosa in F344 rats. *Mutation Research*. 591 (2005) 237–246. doi:10.1016/j.mrfmmm.2005.04.022
- Qian Shuai. Li Ye, Cirino C. Patrick (2019). Biosensor-guided improvements in salicylate production by recombinant *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact.* 2019; 18: 18. doi: 10.1186/s12934-019-1069-1
- Raghavan SS, Chee S, Li J, Poschmann J, Nagarajan N, Jia Wei S, Verma CS, Ghadessy FJ. (2019). Development and application of a transcriptional sensor for detection of heterologous acrylic acid production in *E. coli*. *Microb Cell Fact.* 2019 Aug 19;18(1):139. doi: 10.1186/s12934-019-1185-y.
- Rodríguez Alberto, Martínez A Juan, Flores Noemí, Escalante Adelfo, Gosset Guillermo, Bolivar Francisco (2014). Engineering *Escherichia coli* to overproduce aromatic amino acids and derived compounds. *Microbial Cell Factories* 2014, 13:126
- Rossi, M., Giussani, E., Morelli, R., Lo Scalzo, R., Nani, R.C. & Torreggiani, D. (2003). Effect of fruit blanching on phenolics and radical scavenging activity of highbush blueberry juice. *Food Research International*, 36, 999–1005.
- Siedler S, Khatri NK, Zsohár A, Kjærboelling I, Vogt M, Hammar P, Nielsen CF, Marienhagen J, Sommer MOA, JoenssonHN. (2017). Development of a Bacterial Biosensor for Rapid Screening of Yeast p-Coumaric Acid Production. *ACS Synth Biol.* 2017 Oct 20;6(10):1860-1869. doi: 10.1021/acssynbio.7b00009.
- Siseon Lee, Dougu Nama, Joon Young Jung, Min-Kyu Oh, Byoung-In Sang, Robert J. Mitchell (2012). Identification of *Escherichia coli* biomarkers responsive to various lignin-hydrolysate compounds. *Bioresource Technology* 114, 450–456. doi:10.1016/j.biortech.2012.02.085
- Su Jin Lee, Geun Young Sim, Hyunook Kang, Won Seok Yeo, Bong-Gyu Kim, Joong-Hoon Ahn. (2018). Synthesis of avenanthramides using engineered

Escherichia coli. *Microbial cell factories*. 17:46 <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0896-9>

- Sulavik MC, Gambino LF, Miller PF. (1995). The MarR repressor of the multiple antibiotic resistance (mar) operon in *Escherichia coli*: prototypic member of a family of bacterial regulatory proteins involved in sensing phenolic compounds. *Mol Med*. 1995 May;1(4):436-46.
- Sun RC, Sun, XF and Zhang SH, Quantitative determination of hydroxycinnamic acids in wheat, rice, rye, and barley straws, maize stems, oil palm frond fiber, and fast-growing poplar wood. *J Agric Food Chem* 49:5122–5129 (2001).
- Tatsuo Kaneko, Tran Hang Thi, Dong Jian Shi and Mitsuru Akashi, (2006). Environmentally degradable, high-performance thermoplastics from phenolic phytomonomers. *Nature materials*, Vol. 5. doi:10.1038/nmat1778
- Tina K. Van Dyk, Lori J. Templeton, Keith A. Cantera, Pamela L. Sharpe, and F. Sima Sariaslani (2004). Characterization of the *Escherichia coli* AaeAB Efflux Pump: a Metabolic Relief Valve?. *J. of Bacteriology*. Vol. 186, No. 21. DOI: 10.1128/JB.186.21.7196–7204.2004
- Takai A, Nishi R, Joe Y, Ito H. l-tyrosine-producing bacterium and a method for producing l-tyrosine. Ajinomoto Co., Inc., 20050277179, 2005.
- Van Duynhoven, J., Vaughan, E. E., Jacobsa, D., Kempermana, R. et al., Metabolic fate of polyphenols in the human superorganism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2011, 108, 4531–4538.
- Xu F, Sun RC, Sun JX, Liu CF, He HB and Fan JS, Determination of cell wall ferulic and p-coumaric acids in sugarcane bagasse. *Anal Chim Acta* 552:207–217 (2005).
- Xue Zhixiong, Mc Cluskey Michael, Cantera Keith, Ben-Bassat Arie, Sariaslani F. Sima, Huang Lixuan. (2007). Improved production of p-hydroxycinnamic acid from tyrosine using a novel thermostable phenylalanine/tyrosine ammonia lyase enzyme. *Enzyme and Microbial Technology* 42 (2007) 58–64
- Yong Chool Boo.(2019). p-Coumaric Acid as An Active Ingredient in Cosmetics: A Review Focusing on its Antimelanogenic Effects. *Antioxidants* 2019, 8, 275; doi:10.3390/antiox8080275.
- Zaixiang Lou, Hongxin Wang, Shengqi Rao, Juntao Sun, Chaoyang Ma, Jing Li, (2012). p-Coumaric acid kills bacteria through dual damage mechanisms. *Food Control* 25, 550-554. doi:10.1016/j.foodcont.2011.11.022
- Zaragoza-Camacho M. José, Chávez-Hernández Georgina, Avitia Moreno Fabian, Iñiguez Ramírez René, Martínez Alfredo, Bolívar Zapata and Gosset Guillermo. (2016). Engineering of a microbial coculture of *Escherichia coli* strains for the

biosynthesis of resveratrol. *Microbial Cell Factories*. 15:163. DOI 10.1186/s12934-016-0562-z