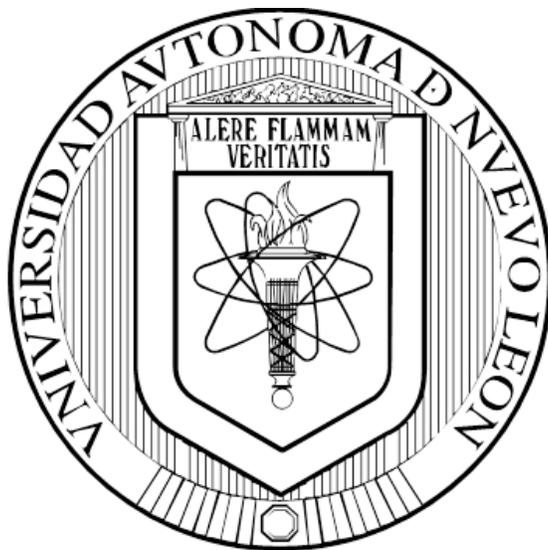


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



TESIS

REGULACIÓN DEL FLUJO METABÓLICO EN *Escherichia coli*
MEDIANTE EL USO DE TERMORREGULADORES DE RNA, PARA
INCREMENTAR LA PRODUCCIÓN DE UN PRECURSOR
TERAPÉUTICO (SHIKIMATO)

PRESENTA

ALBERT ISSAC LERMA ESCALERA

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA
APLICADA

JUNIO, 2016

REGULACIÓN DEL FLUJO METABÓLICO EN *Escherichia coli* MEDIANTE EL USO
DE TERMORREGULADORES DE RNA, PARA INCREMENTAR LA PRODUCCIÓN
DE UN PRECURSOR TERAPÉUTICO (SHIKIMATO).

Aprobación de Tesis:

Dr. José Rubén Morones Ramírez
Presidente

Dr. Xristo Zárate Kalfópulos
Secretario

Dra. María Elena Cantú Cárdenas
Vocal

REGULACIÓN DEL FLUJO METABÓLICO EN *Escherichia coli* MEDIANTE EL USO
DE TERMORREGULADORES DE RNA, PARA INCREMENTAR LA PRODUCCIÓN
DE UN PRECURSOR TERAPÉUTICO (SHIKIMATO).

Revisión de Tesis:

Dr. José Rubén Morones Ramírez
ASESOR

Dr. Xristo Zárate Kalfópulos
COMITÉ TUTORIAL

Dra. María Elena Cantú Cárdenas
COMITÉ TUTORIAL

Dr. Alberto Gómez Treviño
COMITÉ TUTORIAL

Dra. María Aracely Hernández Ramírez
SUBDIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Agradecimientos

"Si un hombre no está agradecido por lo que tiene, es probable que no sea agradecido por lo que tendrá." —Frank A. Clark.

Por medio de este apartado quiero agradecer de todo corazón a todas las personas que me han estado apoyando en este momento tan importante de mi vida, que no solo me ha cambiado profesional y académicamente, si no que también ha traído grandes enseñanzas como persona.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada, sin la cual esta etapa habría sido aún más difícil.

A la Universidad Autónoma de Nuevo León y a la Facultad de Ciencias Químicas, a las cuales estoy orgulloso de pertenecer, gracias por tantas enseñanzas. Me comprometo a siempre inculcar los conocimientos adquiridos en estos recintos.

A mis asesores de Tesis: Dr. Rubén Morones y Dr. Claudio Moreno. Gracias por su confianza, su apoyo incondicional y sus enseñanzas, pero sobre todo por su amistad. Para mí ustedes son un ejemplo a seguir como profesores, investigadores y amigos.

A mí comité tutorial: Dra. María Elena Cantú, gracias por su paciencia y apoyo, una excelente profesora de la cual he aprendido muchas cosas en el transcurso de estos 2 años. Dr. Xristo Zárate y Dr. Alberto Gómez, gracias por su confianza hacia mí, por su apoyo y consejos especialmente en los momentos más difíciles y complicados por los que pase en esta investigación.

A todos mis profesores: Dr. Juan Villareal, Dra. Teresa Garza, Dr. Allan Blanco, Dr. Ulrico López y el Dr. Luis Álvarez, gracias. Por todas sus enseñanzas, por sus consejos y por estar siempre al pendiente de mí.

A todos mis amigos, que están conmigo siempre.

Dedicatoria

A mis padres: Félix Lerma Vargas y María de Rosario Escalera Chavéz, y a mi hermano: Jordy Alexis Lerma Escalera.

Ustedes siempre han sido mis maestros de la vida, mi inspiración para todos los días intentar ser un mejor de lo que fui ayer. Me han cultivado de valores, conocimientos y lecciones de vida que son invaluable, pero sobre todo, siempre lo han hecho con el amor que siempre les caracteriza, enseñándome que no hay nada más importante en esta vida que la familia.

Para ustedes siempre será dedicado todo mi esfuerzo y trabajo, por ustedes soy la persona de la cual estoy orgulloso ser, y no tengo nada más que agradecerles su constante entrega, sacrificio y amor.

Los ama su hijo y hermano, Albert Issac Lerma Escalera.

Índice general

Nomenclatura	3
Lista de figuras	9
Lista de tablas	10
Resumen	11
1. Introducción	13
2. Antecedentes	21
2.1. Ingeniería Metabólica	21
2.2. Biología sintética	22
2.3. Termorreguladores de RNA	24
2.4. Shikimato	25
2.4.1. Shikimato como materia prima para la producción de Oseltamivir . .	26
2.4.2. Producción de ácido shikímico en <i>Escherichia coli</i>	28
3. Enfoque, Hipótesis y Objetivos	30
3.1. Enfoque.	30
3.2. Hipótesis.	32
3.3. Objetivo General.	32
3.4. Objetivos Específicos.	32
4. Metodología	33
4.1. Diseño y Estructuración de genes sintéticos.	33
4.2. Construcción de la cepa	36
4.2.1. Preparación de las alícuotas de reserva y trabajo: Genes sintéticos y oligonucleótidos.	37
4.2.2. Preparación de la cepa <i>Escherichia coli</i> DH5 α electrocompetente . .	37
4.2.3. Transformación de la cepa de <i>Escherichia coli</i> DH5 α electrocompetente usando los plásmidos que contienen los genes sintéticos	38
4.2.4. Selección de colonias transformadas y extracción de DNA plasmídico (Protocolo de lisis alcalina: mini preparación).	39
4.2.5. Electroforesis de agarosa (DNA plasmídico).	40
4.2.6. PCR de Extracción.	40
4.2.7. Electroforesis de agarosa (PCR de extracción)	41
4.2.8. Purificación de productos de PCR de extracción.	41

4.2.9. Integración sitio dirigida de fragmentos lineales al genoma.	42
4.2.10. Extracción de DNA genómico.	43
4.2.11. PCR de Identificación.	43
4.2.12. Electroforesis de agarosa (PCR de identificación)	44
4.3. Producción y detección de shikimato	45
4.3.1. Producción y extracción de ácido shikímico	45
4.3.2. Detección y cuantificación ácido shikímico	45
5. Resultados y Discusiones	47
5.1. Diseño y Estructuración de genes sintéticos.	47
5.2. Construcción de cepa	54
5.3. Producción y detección de ácido shikímico	57
6. Conclusiones	62
Anexos	63
Bibliografía	65

Nomenclatura

GENES, PROTEÍNAS Y PLÁSMIDOS

aroA:

Gen que codifica para la enzima 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa.

aroB:

Gen que codifica para la enzima 3-dehidroquinato sintasa.

aroC:

Gen que codifica para la enzima corismato sintasa.

aroD:

Gen que codifica para la enzima 3-dehidroquinato deshidratasa.

aroE:

Gen que codifica para la enzima shikimato deshidrogenasa.

aroF:

Isoforma de la enzima 3-deoxi-D-arabinoheptuloseonato 7-fosfato sintasa, codificada por el gen *aroF*.

aroG:

Isoforma de la enzima 3-deoxi-D-arabinoheptuloseonato 7-fosfato sintasa, codificada por el gen *aroG*.

aroH:

Isoforma de la enzima 3-deoxi-D-arabinoheptuloseonato 7-fosfato sintasa, codificada por el gen *aroH*.

aroK:

Gen que codifica para la enzima shikimato cinasa I.

aroL:

Gen que codifica para la enzima shikimato cinasa II.

pkM208:

Plásmido proveniente del grupo de trabajo del Dr. Kenan Murphy.

ydiB:

Gen que codifica para la enzima quinato 5-dehidrogenasa.

ORGANISMOS

Escherichia coli:

También conocida por la abreviación de su nombre, *E. coli*. Se trata de una enterobacteria—la más estudiada en la actualidad—que ha sido durante mucho tiempo el organismo privilegiado para la investigación de los mecanismos básicos de la genética molecular. La mayoría de nuestros conceptos actuales de la biología molecular, incluyendo nuestra comprensión de la replicación del ADN, el código genético, la expresión génica, y la síntesis de proteínas, derivan de los estudios de en este organismo.

SIGLAS

DNA: (*ing*).

Deoxyribonucleic Acid, ácido desoxiribonucleico.

DNTP's: (*ing*).

Deoxynucleotide triphosphate, deoxinucleótido trifosfato.

GYT:

Medio glicerol, extracto de levadura y triptona (fórmula en anexos).

IPTG:

Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido.

KEGG: (*ing*).

Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (<http://www.kegg.jp>).

KH₂PO₄:

Fosfato de potasio mono básico.

LB:

Medio Luria-Bertani (fórmula en anexos).

M9:

Medio mínimo 9 (fórmula en anexos).

NADH:

Dinucleótido de nicotinamida y adenina (en su forma reducida).

NCBI: (*ing*).

National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov).

NH₂⁻

Grupo amino.

PCR: (*ing*).

Polimerase chain reaction, reacción en cadena de la polimerasa.

RBS: (*ing*).

Ribosome Binding Site, sitio de unión a ribosoma.

RNA: (*ing*).

Ribonucleic Acid: Ácido ribonucleico.

TAE:

Solución tampón compuesta por tris base, ácido acético y EDTA.

UTR: (*ing*).

Untranslated region, región no traducible.

UV:

Ultravioleta

UNIDADES

cm:

Centímetros.

h:

Horas.

kg:

Kilogramos.

min:

Minutos.

mL:

Mililitros.

ng:

Nanogramos.

nm:

Nanometros.

pH:

Potencial de hidrógeno.

ppm:

Partes por millón.

rpm:

Revoluciones por minuto.

s:

Segundos.

μm :

Micrómetros.

μM :

Micromolar.

μL :
Microlitros.

μg :
Microgramos.

$^{\circ}\text{C}$:
Grados Celsius.

%:
Por ciento.

Índice de figuras

1.1. Representación esquemática del diseño y la ingeniería de un microorganismo para la biosíntesis. El diseño de un microorganismo para un propósito biosintético en particular implica la selección de chasis adecuado, bloques de construcción y herramientas de montaje de DNA. El microorganismo diseñado puede entonces ser diseñado con estos componentes. La optimización del sistema de biosíntesis se produce por la regulación de la expresión génica, y la mejora de flujo metabólico a través de modelado de redes, organización espacial y el diseño de proteínas. La integración de estos principios y mejoras puede dar lugar a un diseñado esquemático biosintético para la producción de alto nivel de compuestos valiosos (Quin, 2014).	17
2.1. Los termorreguladores de RNA son estructuras localizadas en la región 5' UTR de algunos RNA mensajeros. Debido a la complementariedad nucleotídica, dichos forman estructuras secundarias en las cuales queda secuestrado el sitio de unión a ribosoma (RBS), evitando a que éste realice la traducción. Sin embargo, al aumentar la temperatura estas estructuras se destruyen hasta liberar el RBS llevándose a cabo la traducción molecular.	24
2.2. A. Estructuras del ácido shikímico y B. Síntesis química del Osetamivir usando el ácido shikímico como precursor (Ghosh, 2012).	27
2.3. Síntesis química del ácido shikímico mediante la reacción Diels-Alder (Smismman, 1959) con base en (Ghosh, 2012).	28
3.1. En esta figura se representa el enfoque propuesto. 1) La etapa de producción de biomasa, en la cual se usará una temperatura de 37°C que permitirá la traducción a la enzima clave, que subsecuentemente dirigirá el flujo metabólico a las funciones vitales. 2) La etapa de producción del shikimato, en la cual se usará una temperatura de 25°C en la cual la enzima clave estará ausente, de esta forma se obtendrá la acumulación del shikimato.	31

4.1.	En esta figura observamos la estructura general de las piezas que fueron diseñadas para la construcción de la cepa. A) Pieza que codifica para una proteína amarillo fluorescente con sitios de homología para el gen silvestre <i>aroL</i> . B) Gen sintético <i>aroL</i> controlado por el termorregulador U6—el cual trabaja en un rango de temperaturas de 25°C a 37°C aproximadamente (Neupert, 2009)—, con el cual podemos controlar la tasa de traducción en respuesta a los cambios de temperatura. Dicho gen cuenta con sitios de homología compatibles con el gen silvestre <i>pkyF</i> . C) Pieza sintética que cuenta con una región separadora flanqueada por dos terminadores de la transcripción útiles para provocar un silenciamiento en el gen silvestre <i>aroK</i> . Todas las piezas cuentan con las regiones: EX: Estas secuencias ha sido diseñadas para la producción de fragmentos lineales del gen sintético—clonado en el plásmido pUC57—por medio de una PCR (Estas secuencias son totalmente sintéticas y no se encuentran en el genoma de <i>E. coli</i>). RH: Secuencias de homología. Estas son necesarias para llevar a cabo la recombinación sitio específica. ID: Secuencias útiles para la identificación de la pieza ya integrada en el genoma de manera sitio-específica, por medio de una PCR (estas secuencias son totalmente sintéticas y no se encuentran en el genoma de <i>E. coli</i>). TT: Terminador de la transcripción. Se utilizaron dos, uno al inicio y otro al final; el que se encuentra al inicio tiene como finalidad evitar un cambio en el marco de lectura.	35
4.2.	Diagrama general de la construcción de la cepa modificada genéticamente. A. Transformación de <i>E. coli</i> con el plásmido pKM208, dicho codifica para una triada de enzimas que permiten la integración de fragmentos lineales. B. Realización de una PCR a los plásmidos que contienen las secuencias diseñadas con el fin de redirigir el flujo metabólico, para obtener un gran número de copias lineales. C. Integración de los fragmentos lineales al genoma de <i>E. coli</i> mediada por la inducción del plásmido pKM208. D. Extracción de DNA genómico y comprobación de la integración de las piezas por medio de una PCR dirigida al antes mencionado. E. Comprobación de la existencia de los amplicones esperados por medio de una electroforesis en gel de agarosa.	36
5.1.	Resultado de PCR <i>in silico</i> dirigido al genoma de <i>Escherichia coli</i>	47
5.2.	Gel de electroforesis al 0.8 % de agarosa teñido con GelRed 6x (GenScript). En esta figura se aprecian las conformaciones del DNA plasmídico y la de los plásmidos: pKM208, pUC57-YFP, pUC57- <i>aroL</i> y pUC57- <i>aroK</i>	54
5.3.	Gel de electroforesis al 1.5 % de agarosa teñido con GelRed 6x (GenScript). PCR de extracción: en el primer carril tenemos el marcador de peso molecular "PCR plus" de la marca GenScript, y en los carriles 3, 4 y 7 tenemos los amplicones de las piezas YPF, <i>aroL</i> y <i>aroK</i> respectivamente.	55
5.4.	Comparación de cepa silvestre de <i>Escherichia coli</i> (izquierda) contra cepa transformada (derecha)—la cual contiene el gen de la proteína amarillo fluorescente—irradiadas con luz UV en transiluminador.	55

5.5. Gel de electroforesis al 0.8% de agarosa teñido con GelRed 6x (GenScript). En dicho gel se puede observar la integridad del DNA genómico.	56
5.6. Gel de electroforesis al 1.5% de agarosa teñido con GelRed 6x (GenScript). PCR de identificación: en el primer carril tenemos el marcador de peso molecular "PCR plus" de la marca GenScript, y en el segundo carril tenemos tres bandas correspondientes a los amplicones provenientes de la PCR de DNA genómico (YFP, <i>aroL</i> y <i>aroK</i> integrados al genoma).	56
5.7. Curva de calibración de concentración de azúcares reductores realizada mediante distintas concentraciones de glucosa (0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 mg/mL).	58
5.8. Curva de calibración de ácido shikímico realizada mediante distintas concentraciones de un estándar de ácido shikímico (3 ppm, 6 ppm, 12 ppm, 20 ppm, 30 ppm y 60 ppm).	58
5.9. Cromatograma de las muestras—cepa silvestre (parte superior) y cepa modificada (parte inferior)—donde podemos observar que el tiempo de retención es de 7 minutos. Se obtuvo un promedio de área de 6690.6 y 12679.7 para la cepa silvestre y la cepa modificada, respectivamente.	59
5.10. Comparación en la producción de shikimato entre la cepa silvestre y la cepa modificada. A) Comparación del promedio de las áreas bajo la curva del tiempo de retención reportado entre ambas cepas. B) Comparación de la concentración promedio de ácido shikímico obtenido por ambas cepas—tomando como referencia la curva de calibración realizada. C) Comparación de la concentración promedio de ácido shikímico después de haber normalizado las muestras a 1 de OD ₆₀₀ . Obteniendo un aumento del 33% en la producción de shikimato por parte de la cepa modificada.	60
5.11. Análisis de varianza de un factor (ANOVA) de los resultados en la producción de shikimato entre la cepa silvestre y la cepa modificada genéticamente. Los resultados muestran una diferencia significativa entre ambas cepas con una probabilidad del 99%.	61

Índice de tablas

- 5.1. En esta tabla tenemos la lista de primer's diseñados para la obtención de fragmentos lineales y la identificación de piezas integradas al genoma con sus respectivas secuencias y temperaturas de desnaturalización.
Nota: La temperara de alineamiento de ambos pares de primer's corresponde a 53 °C. 48
- 5.2. En esta tabla observamos los resultados de la producción de shikimato en *E. coli* fraccionada en 2 fases. Al pasar las 20 horas de producción a 37°C, la cepa silvestre alcanzó una OD₆₀₀ de 2, por otro lado la cepa modificada obtuvo una OD₆₀₀ de 4. En cuanto al consumo de glucosa de la cepa silvestre es del 98% y de la cepa modificada del 93%. En la segunda parte del proceso de 20 horas a 25°C, la cepa silvestre alcanzó una OD₆₀₀ de 3.1 y la cepa modificada una OD₆₀₀ de 4.3. El consumo de glucosa de la cepa Silvestre en esta etapa es del 68% y de la cepa modificada del 86%. 57

Resumen

Albert Issac Lerma Escalera

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Químicas

Fecha de graduación: Mayo, 2016.

Candidato para el grado de Maestría en Ciencias con Orientación en Microbiología Aplicada

Título del estudio: Regulación del flujo metabólico en *Escherichia coli* mediante el uso de termorreguladores de RNA, para incrementar la producción de un precursor terapéutico (Shikimato).

Área de Estudio: Biología Sintética

Número de páginas: 73

Propósito y método del estudio: Actualmente existe un gran interés por la manufactura de muchos productos biológicos con alto interés económico en industrias que varían desde la farmacéutica hasta la agrícola, los cuales, debido a su demanda en aumento, se están buscando nuevos procedimientos que nos permitan obtener ciertas características deseadas. Entre estas características encontramos un incremento en la producción, una reducción en los costos económicos, y que dichos procesos tengan un menor impacto al medio ambiente. A consecuencia de esto, se han propuesto procesos en microorganismos, empero, no todos los metabolitos pueden ser producidos en estos fácilmente. La regulación del flujo metabólico de manera sintética viene de la necesidad de maximizar la producción de ciertos metabolitos de interés, los cuales en la actualidad, carecen de una síntesis óptima debido a la naturaleza del metabolito y el papel que desarrolla en el organismo.

Contribuciones y conclusiones: La idea principal de este trabajo consiste en controlar el flujo metabólico mediante el uso de termorreguladores de RNA—pequeños fragmentos de RNA que regulan la traducción mediante los cambios de temperatura—para incrementar la producción del ácido shikímico, debido a que el empleo de tales nos permite controlar el uso de la fuente de carbono para el crecimiento en biomasa o para la síntesis de nuestro metabolito de interés. De tal forma se pueden obtener las condiciones necesarias para un mejor rendimiento.

En este trabajo se realizaron las transformaciones de las secuencias diseñadas que emplean el uso de termorreguladores de RNA para la regulación de flujo metabólico, obteniendo una cepa capaz de regular el consumo de glucosa mediante los cambios de temperatura. En el presente trabajo obtenemos un aumento en la producción de shikimato de un 33 % en la cepa modificada con respecto a la cepa control, esto como consecuencia del control del flujo metabólico mediado por los termorreguladores de RNA.

Capítulo 1

Introducción

Desde los inicios de la civilización se ha recurrido a la biotecnología para la obtención de productos de origen biológico con alto interés económico. En la actualidad dichos productos tienen una gran importancia en industrias como la alimenticia, farmacéutica, ganadera, agrícola y energética. Sin embargo, debido a la demanda en aumento de estos productos se están buscando nuevos procedimientos que nos permitan un incremento en la producción, una reducción en los costos económicos, y que dichos procesos tengan un menor impacto al medio ambiente (Buchholz *et al.*, 2014).

Los procesos biotecnológicos han evolucionado considerablemente a través del tiempo. En sus orígenes éstos eran llevados a cabo por medio de conocimientos empíricos, es decir, en la mayoría se conocían las condiciones en las que podríamos producir nuestro metabolito de interés, sin embargo, no teníamos el conocimiento de como ocurrían estos, lo que nos limitaba a llevar a cabo procesos ya establecidos por años sin realizar modificaciones que pudieran favorecerles. Con el paso de los años, áreas como la bioquímica y la biología molecular nos permitieron conocer un poco más sobre cómo funcionaban los organismos vivos, lo que ocasionó poder entender dichos procesos (Quin *et al.*, 2014).

Gracias a los conocimientos relacionados con el funcionamiento de los microorganismos y debido a un aumento de la demanda para la producción rápida y barata de diferentes moléculas microbianas en un entorno industrial éstos microbios han sido adaptados para la producción de compuestos útiles. Incluso, actualmente éstos pueden ser diseñados y fabricados para un propósito en especial, gracias a los avances recientes en la secuenciación del genoma, la ingeniería metabólica y la biología sintética. Los procesos metabólicos pueden ser optimizados para aumentar la producción y/o mantener el flujo en equilibrio. Se está avanzando hacia el diseño y creación de microbios totalmente sintéticos para propósitos biosintéticos. Juntas, estas tecnologías emergentes facilitarán la producción de microorganismos de diseño para la biosíntesis (Quin *et al.*, 2014; Stephanopoulos, 1999).

Puede sonar un poco descabellado imaginar un mundo donde microorganismos producen la electricidad que ilumina nuestros hogares y escuelas, el combustible que se utiliza en nuestros coches, los productos farmacéuticos que nos mantienen sanos y los alimentos que comemos, sin embargo, muchas de estas aplicaciones ya están a nuestro alcance (Smid *et al.*, 2010; Lovley, 2012; Giddings *et al.*, 2013; Lan *et al.*, 2013). Los microorganismos son una plataforma útil para la biosíntesis de productos deseables, evidenciado por su larga historia de adaptación para las industrias alimentaria y farmacéutica. Éstos, crecen rápidamente en fuentes de carbono relativamente baratas, el tamaño del cultivo puede ser fácilmente escalable para aumentar la producción y los procesos metabólicos naturales de microorganismos pueden ser aprovechados para producir cantidades significativas de compuestos útiles (Buchholz *et al.*, 2014). Por lo tanto, no es sorprendente que metabolitos primarios microbianos (por ejemplo vitaminas, nucleótidos, etanol y ácidos orgánicos) y metabolitos secundarios (por ejemplo, antibióticos, compuestos reductores del colesterol y compuestos antitumorales) tengan un valor de mercado mundial de varios miles de millones de dólares (Singh, 2010).

Sin embargo, la biotecnología industrial microbiana no ha estado exenta de inconvenientes. Tradicionalmente, los rendimientos y repertorio de productos se limitan a la capacidad na-

tural de las vías de biosíntesis microbiana existentes. Este problema ha sido parcialmente abordado mediante la exploración de la diversidad microbiana de encontrar otras especies que han tenido que evolucionar para ser más eficientes en la producción de uno o varios compuestos en particular (Thornburg, 2010), empero, las condiciones de laboratorio para el cultivo de los microbios recientemente descubiertas a menudo requieren la optimización extensa, y la caracterización de las vías biosintéticas responsables de producir los metabolitos de interés es un proceso que consume tiempo. Por lo tanto, estas medidas sólo han proporcionado una solución provisional y temporal al reto de ser capaces de manipular totalmente la producción biosintética de una amplia gama de productos deseables y valiosos sobre demanda (Quin, 2014).

Con el amanecer de la era postgenómica se produjo un cambio revolucionario en la forma en que entendemos y vemos rutas biosintéticas microbianas (Gross, 2009). Una gran cantidad de información sobre el genoma microbiano está disponible a través de bases de datos como NCBI, GenomeNet, y JGI. Junto con nuestro conocimiento bioquímico de la función de la enzima, y nuestra capacidad para sintetizar DNA a partir de cero, tenemos un conjunto de herramientas de gran alcance para el descubrimiento y diseño de nuevas redes biosintéticas (Sagt, 2013). La última década ha sido testigo de increíbles avances en nuestra capacidad de adaptar las enzimas microbianas y los procesos metabólicos para nuestros propósitos, gracias a los avances en los campos de la ingeniería metabólica, la evolución de la enzima, y la biología sintética (Bornscheuer *et al.*, 2012; Bar-Even, 2013; Wang *et al.*, 2013). Ahora, podemos programar fábricas microbianas mediante la combinación de diversas enzimas en un huésped heterólogo para producir compuestos que antes eran inalcanzables (Lee *et al.*, 2012).

Nuevas y preexistentes vías metabólicas pueden ser optimizadas por medio de un control estricto sobre la expresión de las enzimas involucradas en la ruta de interés (Boyle *et al.*, 2012). Incluso tenemos la capacidad de crear más allá de lo dispuesto por la naturaleza con el advenimiento de técnicas como la ingeniería *de novo* de enzimas para llevar a cabo reacciones no naturales (Golynskiy *et al.*, 2010), y la construcción de las células bacterianas con genomas mínimos y sintéticos (Gibson *et al.*, 2010).

La ingeniería metabólica es la mejora dirigida de las propiedades celulares a través de la modificación de las reacciones bioquímicas específicas o la introducción de otras nuevas, con el uso de tecnología de DNA recombinante. Como tal, la ingeniería metabólica enfatiza la modificación de las vías metabólicas y se basa en los flujos metabólicos como determinantes de la fisiología celular y medidas de control metabólico. La combinación de métodos analíticos para cuantificar los flujos y su control con técnicas de biología molecular para implementar modificaciones genéticas es la esencia de la ingeniería metabólica (Andrianantoandro *et al.*, 2006).

Hoy en día la ingeniería metabólica nos brinda un gran número de herramientas que nos permiten el mejoramiento en la producción de un metabolito de interés. Sin embargo, es de suma importancia la elección adecuada de las metodologías a emplear, ya que varían dependiendo del origen y tipo de metabolito que deseamos producir (Keasling, 2010). Un obstáculo se encuentra comúnmente en la optimización del flujo metabólico con el fin de maximizar los rendimientos. Los cuellos de botella pueden ser causados por suministro insuficiente del precursor o la actividad enzimática subóptima. Una gran cantidad de herramientas y técnicas están disponibles para eludir estos problemas, incluyendo el análisis de flujo metabólico, visualización de la red, el modelado de proteínas y el diseño, y la organización espacial de las vías (Delebecque *et al.*, 2011; Mills *et al.*, 2013; Poblete-Castro *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013).

Con la aparición de la biología sintética se ha revolucionado la forma en la que idealizamos y

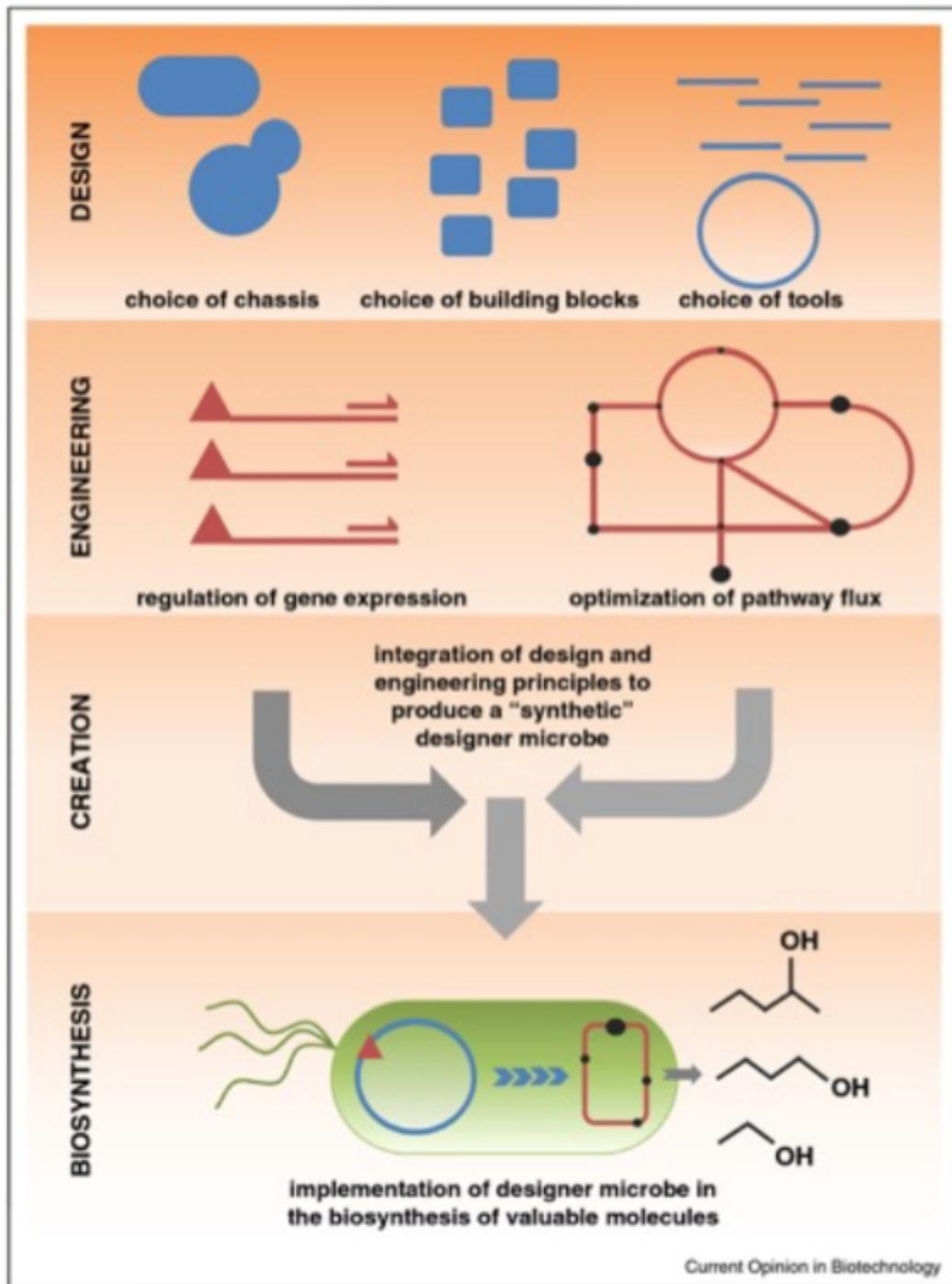


Figura 1.1: Representación esquemática del diseño y la ingeniería de un microorganismo para la biosíntesis. El diseño de un microorganismo para un propósito biosintético en particular implica la selección de chasis adecuado, bloques de construcción y herramientas de montaje de DNA. El microorganismo diseñado puede entonces ser diseñado con estos componentes. La optimización del sistema de biosíntesis se produce por la regulación de la expresión génica, y la mejora de flujo metabólico a través de modelado de redes, organización espacial y el diseño de proteínas. La integración de estos principios y mejoras puede dar lugar a un diseño esquemático biosintético para la producción de alto nivel de compuestos valiosos (Quin, 2014).

empleamos la ingeniería en los sistemas biológicos. (Andrianantoandro *et al.*, 2006) Ya que se enfoca en la expresión y regulación de genes para proporcionar nuevas funciones o haciendo más eficientes las ya existentes, combinando modelos de los dispositivos genéticos generados cada vez más realistas (Figura 1.1).

El escenario ideal sería la creación de una fábrica microbiana perfecta desde cero, sin la necesidad de modificar u optimizar sistemas ya existentes. El progreso hacia este objetivo ya se ha hecho con el desarrollo de *Mycoplasma mycoides*, el primer microbio con un genoma sintetizado químicamente (Gibson *et al.*, 2010). Varios años de intensa investigación fueron necesarios para producir este microbio (Glass, 2012), tiempo durante el cual se crearon las técnicas avanzadas de trasplante de genoma (Lartigue *et al.*, 2007) y el montaje del genoma (Gibson *et al.*, 2009), y desde entonces han sido aplicados en la ingeniería de otros sistemas (Noskov *et al.* 2009) . Por otra parte, los esfuerzos para modelar el requisito mínimo del genoma de un microbio han estado en curso desde hace varios años, y podrían conducir al desarrollo de fábricas de células minimizadas altamente eficientes para un propósito determinado (Gil *et al.*, 2004; Hashimoto *et al.*, 2005; Shuler, 2012). De igual forma, se han creado sistemas libres de células abstractos, utilizando conjuntos de ácidos grasos y de liposomas para albergar los componentes mínimos de la vida, la racionalización de nuevas vías de producción (Budín *et al.*, 2012). Si bien estos avances son muy prometedores para la biotecnología microbiana, actualmente tiene una comprensión limitada de las redes metabólicas celulares necesarias, y nos enfrentamos a muchos desafíos en la creación de microbios sintéticos (Porcar *et al.*, 2011).

Actualmente se ha logrado utilizar la biología sintética para la regulación de genes, que a su vez controlan la producción de proteínas. La regulación de la expresión génica es uno de los elementos de control clave para cualquier vía de biosíntesis microbiana manipulada, y es necesaria para garantizar una expresión suficiente de las enzimas, para evitar la colocación de carga metabólica excesiva en el hospedero, y para optimizar el flujo metabólico. La predicción y el modelado de la fuerza de los promotores y elementos reguladores (Rhodius *et al.*, 2012; Salis *et al.*, 2009) ofrece un enfoque *in silico* para la armonización de circuitos metabólicos. La creación de bibliotecas de promotores y regiones reguladoras aportan un nuevo nivel de diversidad que puede ser útil para la expresión optimizada de una ruta biosintética (Blount *et al.*, 2009).

Por otro lado, no se ha logrado tener el control del metabolismo de manera sintética para poder dirigir el flujo metabólico, lo que da como resultado un mayor control y la maximización en la producción en un proceso biotecnológico (Stephanopoulos, 2012). La importancia de poder llevar a cabo la regulación del flujo metabólico de manera sintética viene de la necesidad de maximizar la producción de ciertos metabolitos de alto interés, sin embargo su producción actual no es la óptima debido a la naturaleza del metabolito y el papel que desarrolla en el organismo que se produce.

Un ejemplo de lo anteriormente mencionado es el ácido shikímico, el cual es un metabolito de alto valor farmacéutico, alimenticio y cosmético. Dicho compuesto se produce actualmente por medio de extractos de algunas plantas, sin embargo este compuesto también es producido por algunas bacterias. Actualmente la forma más popular para obtener el ácido shikímico es de *Illicium anisatum*, nombre científico del anís estrella. Sin embargo, este proceso es complicado y requiere de compuestos como metanol, formaldehído y tolueno a altas temperaturas, lo que lo hace un proceso peligroso. Debido a las complicaciones del proceso, el ritmo actual de la producción del fármaco se ve afectado (Bradley, 2005; Basili & Franzini, 2006).

Por tales razones se buscan nuevas formas para obtención del ácido shikímico, las cuales sean más simples y tengan un impacto mínimo en el medio ambiente; buscando siempre un aumento en la producción. En *Escherichia coli* el ácido shikímico juega un rol importante debido a que es precursor en la producción de aminoácidos aromáticos, los cuales son esenciales para la generación de proteínas, tanto estructurales como funcionales, las cuales llevan a cabo procesos vitales para la célula (Escalante, 2010).

Los termorreguladores de RNA (o termómetros de RNA) son sensores térmicos de RNA que controlan la traducción por medio de cambios en la temperatura. Termómetros de RNA sintéticos son ampliamente aplicables tanto en la investigación básica, como en la biotecnología. Ellos representan herramientas sencillas, de tamaño mínimo para inducir o reprimir transgenes, y expresar controladamente genes endógenos (Neupert, 2009).

La idea principal de éste trabajo consiste en el uso de termorreguladores de RNA—pequeños fragmentos de RNA que regulan la traducción mediante los cambios de temperatura—para incrementar la producción del ácido shikímico, debido a que el empleo de tales nos permite controlar el uso de la fuente de carbono para el crecimiento en biomasa o para la producción de nuestro metabolito de interés. De tal forma se pueden obtener las condiciones necesarias para un mejor rendimiento.

Capítulo 2

Antecedentes

2.1. Ingeniería Metabólica

Las características y funciones de los organismos son producto de una regulada red de miles de reacciones químicas, las cuales son catalizadas por enzimas. Dichas características son utilizadas por el humano para lograr importantes aplicaciones prácticas, no obstante estas redes metabólicas evolucionaron en un entorno natural y muchas veces no están optimizadas para lograr los objetivos deseados (Bailey, 1991).

La ingeniería metabólica tiene como objetivo la optimización del metabolismo nativo con la finalidad de lograr de manera eficiente la producción de características, funciones o metabolitos de interés. Dicha área de estudio emplea herramientas moleculares y bioquímicas para el mejoramiento en reacciones específicas del metabolismo; ya sea añadiendo nuevos intermediarios en las rutas metabólicas ya existentes, modificando la regulación de las mismas, o por medio de la creación de rutas totalmente nuevas (Stephanopoulos, 2012). Para lograr dicho objetivo, se emplean estrategias como la adición de genes no existentes, la sobre expresión y/o silenciamiento de genes nativos, que posteriormente causan un cambio en el flujo metabólico, produciendo la cantidad óptima de metabolitos de interés. Estos cambios son determinados de manera cuantitativa mediante la estimación del cambio en el flujo metabólico hacia la producción de ciertos metabolitos que son necesarios para dichas propiedades deseadas. En resumen, la esencia de la ingeniería metabólica es la combinación de métodos analíticos para cuantificar el flujo metabólico y su modificación mediante técnicas de biología molecular

(Stephanopoulos *et al.*, 1999; Stephanopoulos, 2012).

Se ha atribuido gran potencial a la ingeniería metabólica para la producción de sustancias de gran interés utilizando sustratos simples, fácilmente disponibles y de bajo costo. La producción natural de estos compuestos en microorganismos ha ido sustituyendo los procesos actuales de producción que se derivan del uso de recursos no renovables o recursos naturales limitados (Keasling, 2010).

2.2. Biología sintética

Siendo un área emergente no se tiene una definición concreta de la biología sintética, sin embargo podríamos considerarla como el área de estudio que se enfoca en la expresión y regulación de genes exógenos para proporcionar nuevas funciones a organismos que originalmente no las poseen, y la aplicación de los principios de la ingeniería sobre los sistemas vivos.

El origen de la biología sintética no está bien establecido, algunos investigadores consideran que ésta surge de la accesibilidad y eficiencia en la síntesis química del DNA, otros argumentan que la construcción del primer contador genético y el primer interruptor genético fueron el parteaguas para el nacimiento de ésta área. (Stephanopoulos, 2012) A pesar que con los ya mencionados acontecimientos no se puede establecer a ciencia exacta el origen de la biología sintética, ambos son una parte fundamental de ella, ya que la producción de diversos y complejos circuitos genéticos regulados de manera precisa, en parte, son un fruto de la accesibilidad en la síntesis química de DNA.

Se puede mencionar que esta tecnología es distinta a la biotecnología, ya que esta solo se enfoca en la modificación de organismos ya existentes desde un punto de vista empírico y tradicional haciendo uso de la ingeniería genética, en donde paradójicamente es llamada ingeniería sin poseer un aspecto ingenieril cuantificable, un aspecto que se intenta ensamblar dentro de la biología sintética otorgándole mayor precisión al diseño biológico (Pleiss, 2006).

Los biólogos sintéticos se catalogan en dos clases principalmente, una clase utiliza moléculas artificiales para reproducir ciertos comportamientos emergentes de la biología natural para el desarrollo de vida artificial, en donde a esta área se le conoce también como biología inorgánica. El otro enfoque es la utilización de piezas genéticas intercambiables provenientes de organismos naturales para ensamblarlas dentro de sistemas biológicos y que funcionen artificialmente fuera del organismo original (Pleiss, 2006).

Es un campo aun en desarrollo que podría adoptar una estructura que resultaría extremadamente exitosa en la historia de la industria ya que los beneficios potenciales de éste campo son enormes, en donde prácticamente abarcaría un mercado potencial más amplio que el de la biotecnología. Es un enfoque con un gran futuro por su carácter unificador generando así cada vez más desarrollo biológico-tecnológico, un enfoque cuantitativo y organizado que representa una nueva área de oportunidad con un mundo enorme de aplicaciones (Pleiss, 2006).

2.3. Termorreguladores de RNA

Los termorreguladores de RNA (o termómetros de RNA) son sensores térmicos de RNA que controlan la traducción por medio de cambios en la temperatura. Se basan en un principio simple: solo ocurre la traducción al alcanzar la temperatura de fusión que permite eliminar las estructuras secundarias que forman en la región no traducida 5' de RNA, ya que a temperaturas bajas dichas estructuras evitan, por topología, que el ribosoma se una a la región Shine-Delgarno, de esta manera evita que el RNA mensajero sea traducido (Figura 2.1). Al igual que los *riboswitches*, el termorregulador depende de las atracciones generadas por sus propias secuencias, sin embargo como ventaja los termorreguladores no dependen de la interacción con ligandos para inducir un cambio en su conformación, ya que estos solo dependen de los cambios de temperaturas para lograr lo antes mencionado (Neupert, 2009).

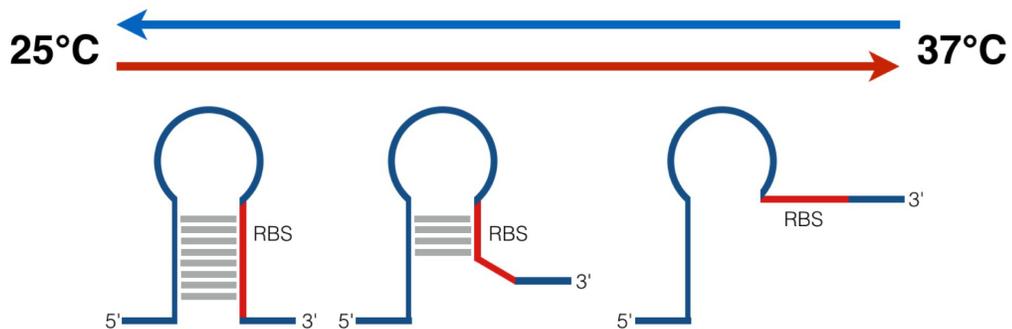


Figura 2.1: Los termorreguladores de RNA son estructuras localizadas en la región 5' UTR de algunos RNA mensajeros. Debido a la complementariedad nucleotídica, dichos forman estructuras secundarias en las cuales queda secuestrado el sitio de unión a ribosoma (RBS), evitando a que éste realice la traducción. Sin embargo, al aumentar la temperatura estas estructuras se destruyen hasta liberar el RBS llevándose a cabo la traducción molecular.

De manera natural podemos encontrar a los termómetros de RNA en los procesos biológicos controlados, a los que con sensatez deben ser regulados en respuesta a cambios de temperatura, esto incluye las respuestas de choque térmico bacterianas (Morita *et al.*, 1999). En contra parte, se ha empezado a realizar el diseño *de novo* de los termorreguladores de manera sencilla, mediante el cálculo de la topología y los cambios provocados que sufren debido a la temperatura, por medio de modelos basados en la secuencia primaria del RNA. Como

ejemplo encontramos los diseñados por Neupert, estos se ubican sobre la secuencia de unión al ribosoma (región Shine-Dalgarno) y permiten la traducción a partir de temperaturas específicas. Entre ellos se encuentra el llamado U6, que a una temperatura de 37°C permite la traducción. Éste fue elegido para utilizarse en el presente trabajo (Neupert, 2009).

Termómetros de RNA sintéticos son ampliamente aplicables tanto en la investigación básica, como en la biotecnología. Ellos representan herramientas sencillas, de tamaño mínimo para inducir o reprimir, no sólo transgenes, si no también la expresión controlada de genes endógenos (Neupert, 2009).

2.4. Shikimato

El shikimato es un metabolito intermediario involucrado en la síntesis de algunos aminoácidos. Debido a sus características es de suma importancia en la industria alimentaria y farmacéutica. Actualmente es usado como materia prima para la síntesis del oseltamivir, el cual es un anti-viral empleado para contrarrestar la influenza (Bradley, 2005).

Actualmente la forma más popular para obtener el ácido shikímico es de *Illicium anisatum*, nombre científico de anís estrella. Posteriormente mediante síntesis química el ácido shikímico es convertido al oseltamivir. Sin embargo, este proceso es complicado y requiere de compuestos como metanol, formaldehído y tolueno a altas temperaturas, lo que lo hace un proceso peligroso. Debido a las complicaciones del proceso, el ritmo actual de la producción del fármaco se ve afectado. De tal forma que se estima que se necesitaría una década para producir lo suficiente para tratar al 20 % de la población mundial (Bradley, 2005; Basili & Franzini, 2006).

Por tales razones se buscan nuevas formas para obtención del ácido shikímico—abordadas en los siguientes subcapítulos—, las cuales sean más simples y tengan un impacto mínimo en el medio ambiente; buscando siempre un aumento en la producción.

2.4.1. Shikimato como materia prima para la producción de Osetamivir

La influenza es una enfermedad respiratoria altamente infecciosa de origen vírico, la cual es responsable de una gran tasa de morbilidad y mortalidad debido a las epidemias anuales y a las pandemias inesperadas (Kuri-Morales, 2006; Magano, 2009).

Se estima que entre un 10 % y 20 % de la población de Estados Unidos es afectada por esta enfermedad, lo que ocasiona aproximadamente 110,000 hospitalizaciones y 20,000 defunciones al año. Esto resulta en un gasto económico estimado de 12 billones de dólares anuales (Magano, 2009). La influenza estacional se distribuye mundialmente durante todo el año—con preferencia en los meses de invierno—afectando un gran sector poblacional del país debido a la facilidad de contagio, la cual representa un problema prioritario (Kuri-Morales 2006).

Tan solo en México la tendencia actual de casos de influenza se han incrementado 3 veces en comparación al año pasado (Secretaría de Salud de México, 2016). Debido a esto es de suma importancia la prevención de la influenza por medio de la vacunación. Sin embargo—debido a complicaciones como la insuficiencia del tiempo necesario para vacunar a la mayoría de la población y el corto tiempo del efecto de las vacunas, aunado a que es imposible precisar los tiempos para predecir una próxima aparición de pandemia—es de vital importancia saber que una pandemia de influenza podría comprometer la eficacia de atención a la salud, por lo tanto es necesario tener una capacidad de respuesta adecuada (Kuri-Morales, 2006).

Como una alternativa a las vacunas contra la influenza se emplean principalmente el uso de antivirales que van dirigidos a la inhibición de la neuroamidasa. Como principal ejemplo tenemos el Osetamivir (Tamiflu)(Fig. 2.2a), el cual es sintetizado a partir del ácido shikímico (ácido 3,4,5-trihidroxil-1-ciclohexen-1-carboxílico) (Fig. 2.2a) (Magano, 2009; Ghosh, 2012). Debido a sus características, el ácido shikímico es un atractivo precursor para la manufactura de una amplia gama de compuestos con alto valor comercial. Dentro de esta gama de

compuestos se encuentran fármacos como el Oseltamivir (Fig.2.2b) (Abrecht, 2004).

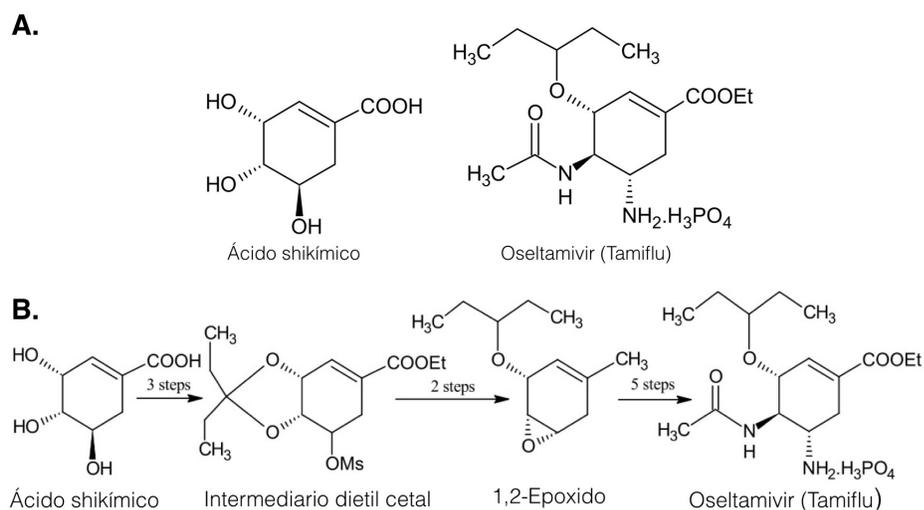


Figura 2.2: A.Estructuras del ácido shikímico y Oseltamivir B. Síntesis química del Oseltamivir usando el ácido shikímico como precursor (Ghosh, 2012).

Debido a que el ácido shikímico está involucrado en la síntesis de los aminoácidos aromáticos en plantas (Herrmann, 1999), la producción actual se lleva a cabo principalmente mediante extracciones de semillas de algunas plantas—siendo la más relevante *Illicium anisatum* (Ghosh2012). Sin embargo, este proceso presenta algunas desventajas, entre las cuales se encuentran un mayor tiempo de producción, alto impacto ambiental y bajo rendimiento—1kg de ácido shikímico por cada 30kg de semillas de *I. anisatum* (Ohira, 2009). Otra metodología para la obtención de ácido shikímico es mediante su síntesis química—reportada por primera vez en los años 60 mediante la reacción Diels-Alder (Fig.2.3) (Ghosh,2012)—, sin embargo su tasa de producción es relativamente baja—se han reportado rendimientos entre el 15 % y 55 % (Ghosh, 2012)—y la metodología es demasiado costosa para implementarla comercialmente (Raghavendra, 2009).

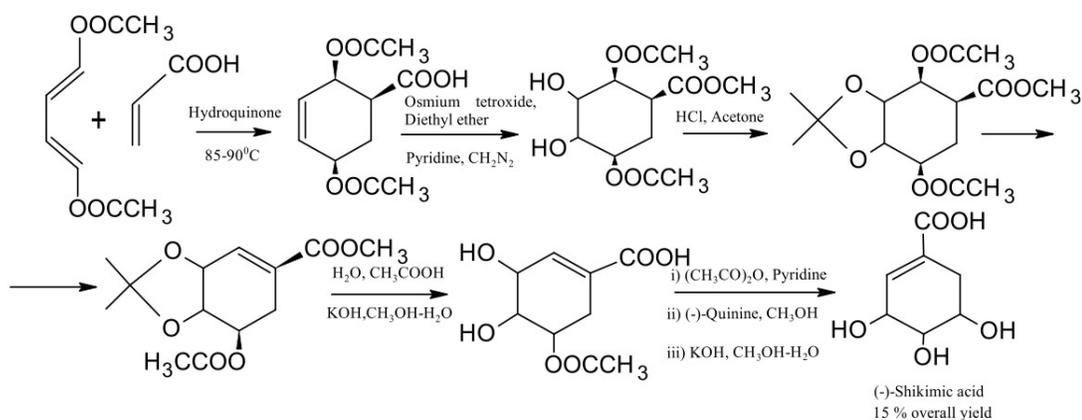


Figura 2.3: Síntesis química del ácido shikímico mediante la reacción Diels-Alder (Smitsman, 1959) con base en (Ghosh, 2012).

Por lo anteriormente mencionado, es necesario buscar nuevas alternativas para la producción de ácido shikímico. El uso de microorganismos para la producción de este metabolito ha ido en aumento debido a su fácil producción. *Escherichia coli* ha sido modificada genéticamente—mediante la sobre-expresión o remoción de genes involucrados en la vía metabólica del shikimato—para su implementación en la sobreproducción del shikimato (Ghosh, 2012). Sin embargo, su producción de éste está involucrado directamente con la biosíntesis de los aminoácidos aromáticos, dichas modificaciones causan una dependencia a éstos—elevando los costos debido a que los aminoácidos tienen que incluirse en el medio.

2.4.2. Producción de ácido shikímico en *Escherichia coli*

Escherichia coli y muchos otros microorganismos sintetizan metabolitos aromáticos a partir de la vía del shikimato, que inicia con la reacción de condensación del fosfoenolpiruvato y de la eritrosa-4-fosfato, intermediarios de la glicólisis y de la vía de las pentosas fosfato, respectivamente, para formar 3-deoxi-D-arabino heptulose-7-fosfato. Esta primera reacción de la vía del shikimato, es catalizada en *E. coli* por cada una de las tres isoformas de la enzima 3-deoxi-D-arabinoheptulose-7-fosfato sintasa, AroF, AroG y AroH, codificadas por los genes *aroG*, *aroF* y *aroH*, respectivamente. Estos genes están sujetos a control transcripcional y alostérico por la fenilalanina, tirosina y triptófano, respectivamente. El 3-deoxi-D-arabinoheptulose-7-fosfato es convertido a 3-dehidroquinato, por acción

de la enzima 3-dehidroquinato sintasa, codificada por el gen *aroB*. El 3-dehidroquinato es deshidratado para producir 3-dehidroshikimato por acción de la enzima 3-dehidroquinato deshidratasa, codificada por el gen *aroD*. El 3-dehidroquinato es reducido a shikimato con el consumo de NADH por la enzima shikimato deshidrogenasa, codificada por la enzima *aroE*. El shikimato es convertido a shikimato-3-P, por las enzimas Shikimato cinasa I y II, codificadas respectivamente por los genes *aroK* y *aroL*. El shikimato-3-P es convertido a 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato, por la enzima 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa, codificada por el gen *aroA*. Este último intermediario es convertido a corismato por la enzima corismato sintasa, codificada por el gen *aroC*. El corismato es un precursor común para la síntesis de metabolitos aromáticos primarios y de diversos metabolitos aromáticos secundarios (Herrmann *et al.*, 1999; Escalante *et al.*, 2010).

Realizando un análisis de la literatura observamos que la mayoría de las estrategias par acumular el shikimato se basan en la eliminación de los genes *aroK* y *aroL*, entre otros, sin embargo con estas estrategias la cepa es dependiente de aminoácidos aromáticos, lo que hace al proceso poco ideal. Debido a esto, nosotros abordamos una alternativa a estas estrategias.

Capítulo 3

Enfoque, Hipótesis y Objetivos

3.1. Enfoque.

Como ha sido descrito en el Capítulo 1, se están buscando nuevos procedimientos que nos permitan remplazar a los actuales con motivo de aumentar la producción de metabolitos de alto valor, y al mismo tiempo procurar que dichos procesos tengan un menor impacto al medio ambiente.

Debido a ésto, se han realizado numerosos intentos para resolver este problema. Como se menciona anteriormente, actualmente se utilizan técnicas moleculares como la duplicación y eliminaciones de genes para aumentar la acumulación de algunos metabolitos, empero, el uso de estas no son útiles en metabolitos que participan en funciones vitales de la célula.

En éste trabajo se propone el uso de termorreguladores para el control en la producción de enzimas involucradas en la catálisis de reacciones implicadas con el shikimato. Al hacer uso del control generado por estos interruptores genéticos podemos manipular la dirección del flujo metabólico, que puede ser dirigido tanto a las funciones vitales como al cúmulo del mencionado producto, y de esta forma establecer una estrategia de producción.

Haciendo empleo de la dualidad inherente que proporciona un termorregulador en control de la traducción del catalizador que interviene en las reacciones claves (37°C : "encendido", 25°C : "apagado"), se propone un proceso que esta fraccionado en dos etapas (Fig.3.3)

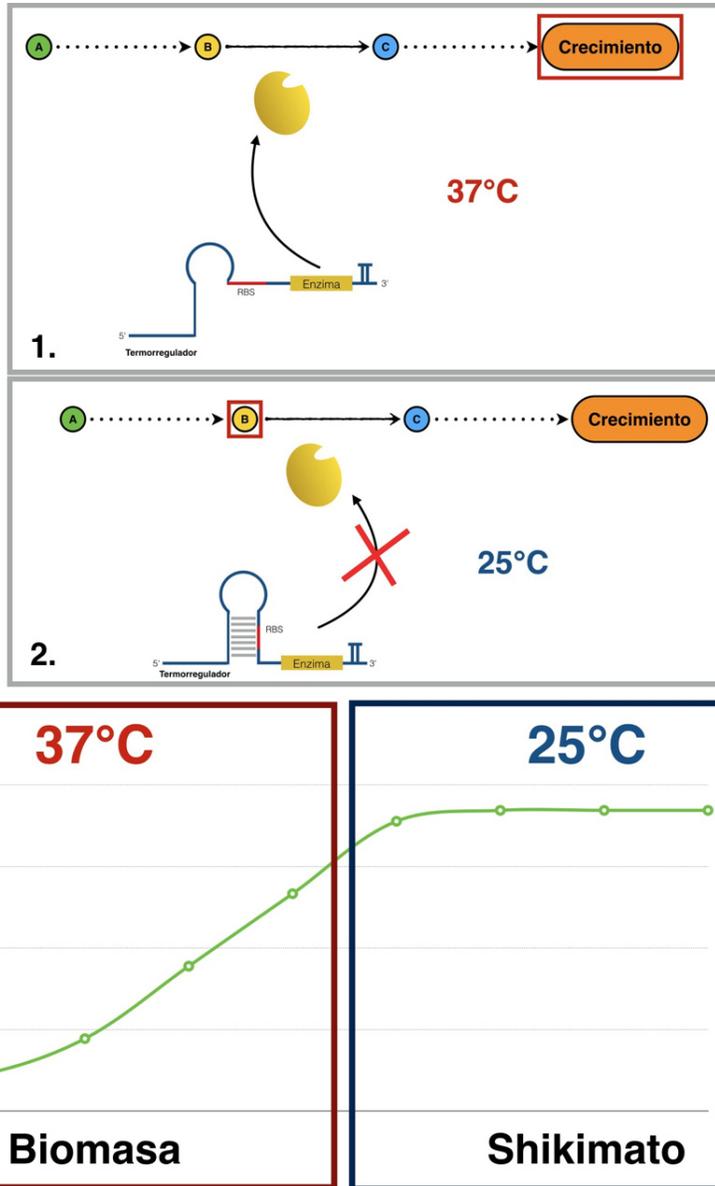


Figura 3.1: En esta figura se representa el enfoque propuesto. 1) La etapa de producción de biomasa, en la cual se usará una temperatura de 37°C que permitirá la traducción a la enzima clave, que subsecuentemente dirigirá el flujo metabólico a las funciones vitales. 2) La etapa de producción del shikimato, en la cual se usará una temperatura de 25°C en la cual la enzima clave estará ausente, de esta forma se obtendrá la acumulación del shikimato.

3.2. Hipótesis.

El control en el flujo metabólico mediado por el uso de termorreguladores de RNA provocará un aumento en la producción de ácido shikímico a comparación de la cepa silvestre.

3.3. Objetivo General.

Aumentar la producción de ácido shikímico en *Escherichia coli* DH5 α mediante el uso de termorreguladores de RNA que controlen el flujo metabólico.

3.4. Objetivos Específicos.

1. Diseñar genes sintéticos que sean útiles para la regulación del flujo metabólico en *Escherichia coli* DH5 α .
2. Obtener una cepa de *Escherichia coli* DH5 α transformada con las secuencias sintéticas diseñadas previamente.
3. Aislar e identificar las colonias recombinantes obtenidas.
4. Detectar y medir la producción de ácido shikímico en la cepa recombinante de *Escherichia coli*.

Capítulo 4

Metodología

4.1. Diseño y Estructuración de genes sintéticos.

Para comprobar el concepto de que podemos manipular la dirección del flujo metabólico mediante el empleo de termorreguladores de RNA, nos enfocamos específicamente en la quinta reacción de la vía del ácido shikímico—en la cual el ácido shikímico es convertido a ácido shikímico-3 fosfato (Morell H & Sprinson DB, 1968). Esta reacción es catalizada por dos isoenzimas: shikimato cinasa I—codificada por el gen *aroK*—y shikimato cinasa II—codificada por el gen *aroL*.

Fueron diseñados tres genes sintéticos, los cuales fueron estructurados de tal forma que cada uno tenga un funcionamiento y regulación adecuada. Por otra parte, todos los genes contienen aditamentos que permiten que sean integrados al genoma e identificados cuando esto ocurra (Figura 4.1). También, se realizó el diseño de los primers utilizados tanto para la obtención de fragmentos lineales—secuencias de extracción o EX—, como para la identificación de los genes integrados en el genoma—secuencias de identificación o ID (Tabla 5.1). Para tener un precedente de que los primer's diseñados son exclusivos para los genes sintéticos se realizó una prueba *in silico*, en donde se asegura que éstos no amplifiquen ninguna región del genoma del género *Escherichia*.

La estrategia consiste en sustituir el gen *aroL* de la cepa salvaje integrando un gen que codifica una proteína amarillo fluorescente—la cual servirá como marcador de que se llevó a cabo la integración correctamente. Posteriormente, el gen sintético diseñado con el *aroL* regulado por medio del termorregulador U6 previamente descrito por Neupert en el 2009—es integrado en el genoma substituyendo el gen silvestre *pkvF*—el cual se encuentra involucrado en la acumulación del fosfoenol piruvato (precursor del ácido shikímico). Por último se integra una pieza sintética con terminadores de la transcripción en el gen silvestre *aroK*, esto con el fin de controlar el flujo de shikimato totalmente con la expresión de la enzima shikimato cinasaII—de la cual es controlada su producción empleando el termorregulador.

La búsqueda de todas las piezas—tales como el promotor, genes codificantes de enzimas, terminadores transcripcionales y otras secuencias accesorias—se llevó a cabo en bases de datos como KEGG y NCBI (National Center for Biotechnology Information).

Estructurados dichos genes y primer's, se solicitó su síntesis a una casa comercial (BIOBASIC INC. y T4 oligo respectivamente)

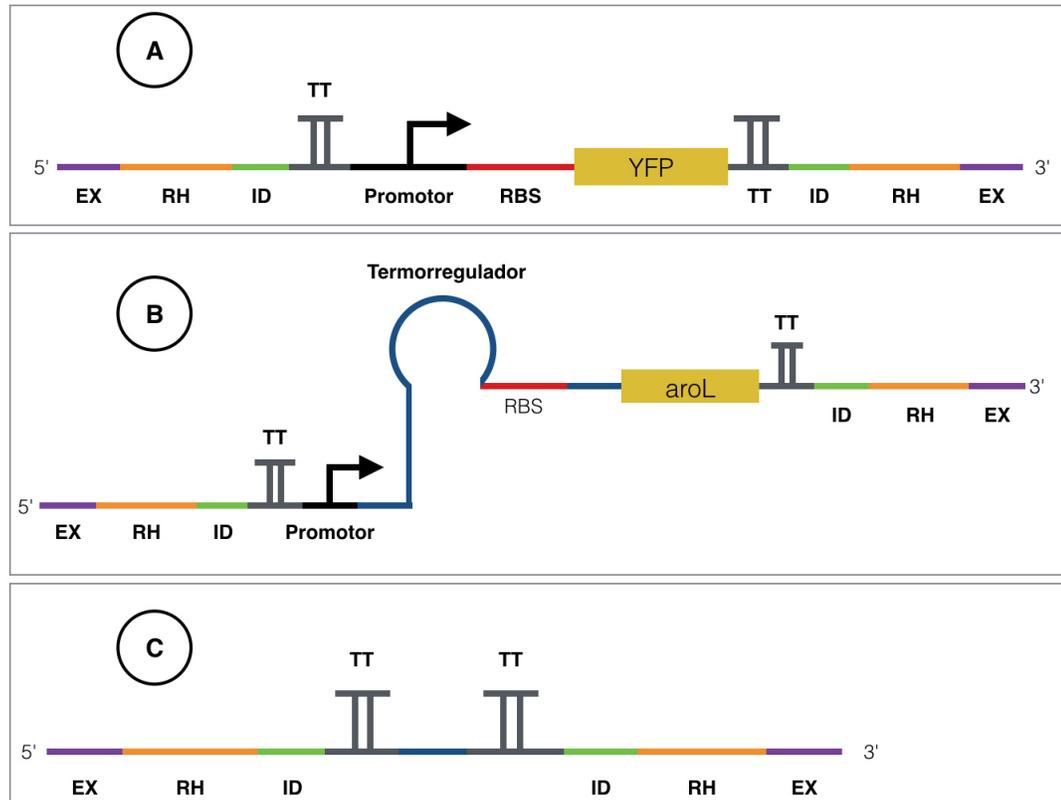


Figura 4.1: En esta figura observamos la estructura general de las piezas que fueron diseñadas para la construcción de la cepa. **A)** Pieza que codifica para una proteína amarillo fluorescente con sitios de homología para el gen silvestre *aroL*. **B)** Gen sintético *aroL* controlado por el termorregulador U6—el cual trabaja en un rango de temperaturas de 25°C a 37°C aproximadamente (Neupert, 2009)—, con el cual podemos controlar la tasa de traducción en respuesta a los cambios de temperatura. Dicho gen cuenta con sitios de homología compatibles con el gen silvestre *psyF*. **C)** Pieza sintética que cuenta con una región separadora flanqueada por dos terminadores de la transcripción útiles para provocar un silenciamiento en el gen silvestre *aroK*.

Todas las piezas cuentan con las regiones:

EX: Estas secuencias han sido diseñadas para la producción de fragmentos lineales del gen sintético—clonado en el plásmido pUC57—por medio de una PCR (Estas secuencias son totalmente sintéticas y no se encuentran en el genoma de *E. coli*).

RH: Secuencias de homología. Estas son necesarias para llevar a cabo la recombinación sitio específica.

ID: Secuencias útiles para la identificación de la pieza ya integrada en el genoma de manera sitio-específica, por medio de una PCR (estas secuencias son totalmente sintéticas y no se encuentran en el genoma de *E. coli*).

TT: Terminador de la transcripción. Se utilizaron dos, uno al inicio y otro al final; el que se encuentra al inicio tiene como finalidad evitar un cambio en el marco de lectura.

4.2. Construcción de la cepa

El diagrama general de la construcción de la cepa se muestra en la Figura 4.2.

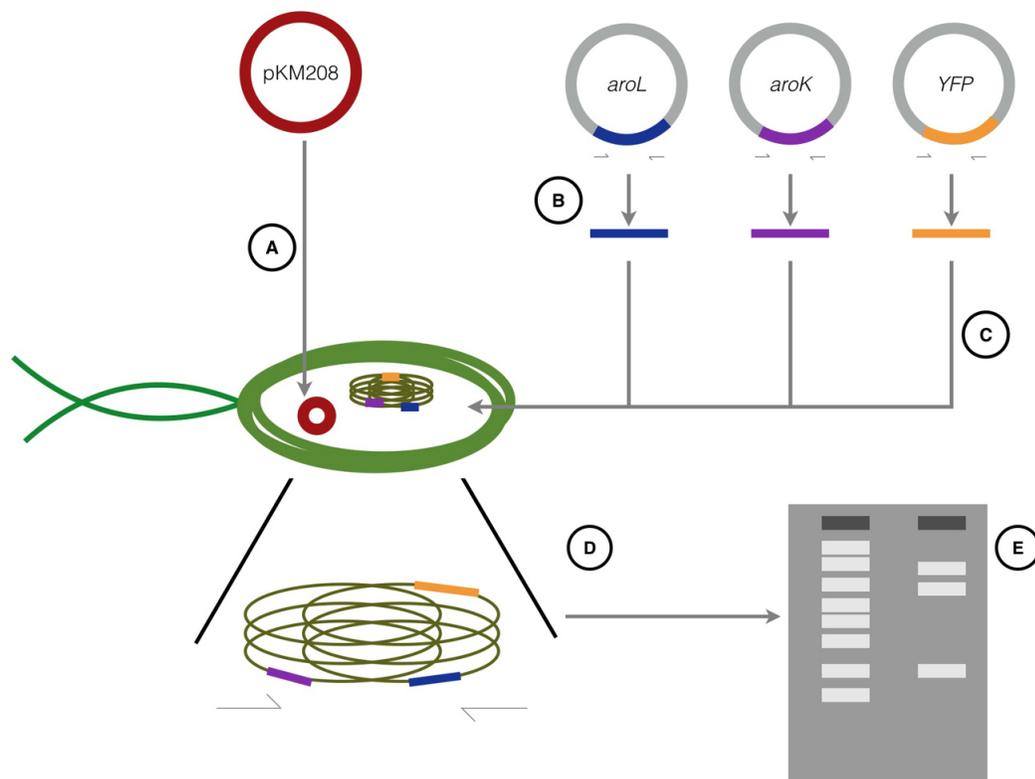


Figura 4.2: Diagrama general de la construcción de la cepa modificada genéticamente.

A. Transformación de *E. coli* con el plásmido pKM208, dicho codifica para una triada de enzimas que permiten la integración de fragmentos lineales.

B. Realización de una PCR a los plásmidos que contienen las secuencias diseñadas con el fin de redirigir el flujo metabólico, para obtener un gran número de copias lineales.

C. Integración de los fragmentos lineales al genoma de *E. coli* mediada por la inducción del plásmido pKM208.

D. Extracción de DNA genómico y comprobación de la integración de las piezas por medio de una PCR dirigida al antes mencionado.

E. Comprobación de la existencia de los amplicones esperados por medio de una electroforesis en gel de agarosa.

4.2.1. Preparación de las alícuotas de reserva y trabajo: Genes sintéticos y oligonucleótidos.

Oligonucleótidos:

Se realizó una alícuota de reserva de cada oligonucleótido a una concentración final de 100 μM . Posteriormente, se realizó una dilución 1:10 para obtener una alícuota de trabajo, de dicha alícuota se usaron 2 μL por cada 50 μL de reacción de PCR.

Genes sintéticos:

Se solicitó la síntesis de los genes diseñados, por las casas comerciales GenScript y BioBasic (recibidos en los plásmidos pUC57-Amp y pUC57-Kan). Dichos genes se obtuvieron liofilizados a una concentración de 4 μg . Se realizó una reserva de cada gen sintético a una concentración final de 1 μM . Posteriormente, se realizó una dilución 1:10 para obtener una alícuota de trabajo, de dicha alícuota se usó 1 μL para llevar a cabo la transformación de cada plásmido.

4.2.2. Preparación de la cepa *Escherichia coli* DH5 α electrocompetente

Para llevar a cabo la transformación por electroporación, se realizó la preparación de la cepa electro-competente siguiendo el protocolo mencionado a continuación (modificación Sambrook, 2012):

REACTIVOS, MEDIOS, MATERIAL & EQUIPOS:

Incubadora con agitación, centrífuga con refrigeración, espectrofotómetro UV/visible, matraz con 30 mL de medio LB Miller estéril, tubos 1.5 mL estériles, celdas para espectrofotómetro, pipetas de 1 mL, 200 μL y 20 μL , puntillas estériles (amarillas y azules), agua miliQ, medio GYT estéril, solución estéril de glicerol 10 %, tubos de vidrio con 5 mL de medio LB Miller líquido estériles.

PROCEDIMIENTO:

Se inoculó una colonia en 5 a 10 mL de caldo LB (con antibiótico si es el caso), e incubó toda la noche. Del cultivo anterior se ajustó 30 mL a una OD₆₀₀ de 0.05 en un matraz nuevo. Posteriormente, se creció el cultivo bacteriano en los tubos a 37°C con una agitación de 200 rpm hasta una OD₆₀₀ de 0.4. Se pre-enfrió: centrifuga, H₂O miliQ, tubos de 1.5 mL, glicerol 10 % y medio GYT (A partir de aquí todo se realizó a 4°C), y al obtener una OD₆₀₀ de 0.4, se tomó 1.5 mL, se pasaron a un tubo, y se centrifugó a 4500 rpm x 5 min a 4°C.

Se realizaron los siguientes lavados:

Lavado 1: Se agregó 1 mL de agua miliQ fría a cada tubo, se re-suspendió cuidadosamente con la micro-pipeta. Se centrifugó a 14000 rpm x 1 min a 4°C.

Lavado 2: Se agregó 500 µL de agua miliQ fría a cada tubo, se re-suspendió cuidadosamente con la micro-pipeta. Se centrifugó a 14000 rpm x 1 min a 4°C.

Lavado 3: Se agregó 20 µL de glicerol 10 % frío a cada tubo, se re-suspendió cuidadosamente con la micropipeta. Se centrifugó a 14000 rpm x 1 min a 4°C.

Por último se agregó 20 µL de medio GYT frío a cada tubo, se re-suspendió cuidadosamente con la micropipeta. Las alícuotas resultantes fueron almacenadas a -20°C.

4.2.3. Transformación de la cepa de *Escherichia coli* DH5α electrocompetente usando los plásmidos que contienen los genes sintéticos

Los plásmidos de clonación en los cuales se recibieron las piezas sintetizadas, fueron transformados por electroporación en una cepa de *Escherichia coli* DH5α con el fin de tener múltiples copias de éstos, y así tener una cantidad considerable de DNA plasmídico para poder trabajar. El protocolo que se llevó a cabo se menciona a continuación (modificación Sambrook, 2012):

REACTIVOS, MEDIOS, MATERIAL & EQUIPOS:

Células electrocompetentes, 100 ng de DNA plasmídico, medio GYT, placas de Agar-LB, Electroporador: Eppendorf Eporator, Termomixer Eppendorf, tubos de 1.5 mL estériles, celdas para electroporación 0.2 cm.

PROCEDIMIENTO:

Se tomó una alícuota de electrocompetentes (20 μ L), se agregó aproximadamente 100 ng del plásmido y fueron incubadas 1 min en hielo (se incluyeron controles). Posteriormente, las bacterias fueron transferidas con el DNA a la celda de 0.2cm (previamente enfriada), y fue realizada la electroporación dando un pulso a 2500V. Inmediatamente, se agregó 1 mL de medio GTY, y se transfirieron las células resuspendidas a tubos de 1.5 mL e incubados de 1 h a 2 h a 37°C en el termomixer. Para finalizar, las alícuotas fueron cultivadas por extensión en cajas petri con Agar-LB junto con el antibiótico (50 ppm) o marcador correspondiente.

4.2.4. Selección de colonias transformadas y extracción de DNA plasmídico (Protocolo de lisis alcalina: mini preparación).

Se seleccionaron las colonias transformadas exitosamente, se cultivaron en medio líquido toda la noche, posteriormente se extrajo el DNA plasmídico por medio de lisis alcalina usando el siguiente protocolo (modificación Sambrook, 2012):

REACTIVOS, MEDIOS, MATERIAL & EQUIPOS:

Soluciones I,II,III (anexo), etanol absoluto, etanol 70 %, agua miliQ con RNA'sas (10 mg/mL, tubos 1.5 mL estériles, centrífuga, incubadora, congelador -20°C, *vortex*.

PROCEDIMIENTO:

Para iniciar, se centrifugó 1.5 mL de cultivo a 14,000 rpm/30 s y se tiró el sobrenadante en un recipiente con jabón.

Se agregaron 200 μL de Sol I: se mezcló en *vortex* e incubó 5 min a temperatura ambiente. (Hasta que la pastilla se desbarato, se puede usar una micropipeta para re-suspender la pastilla).

Se agregaron 200 μL Sol II: se mezcló por inversión e incubó 5 min a temperatura ambiente.

Se agregaron 200 μL Sol III: se mezcló por inversión e incubó 5 min en hielo.

Se centrifugó a 14,000 rpm/5 min.

El sobrenadante fue tomado para pasarlo a un tubo nuevo y fue agregado etanol 100% 1 mL, después, se incubó $-20^{\circ}\text{C}/10$ min (Desde 10 min a 2 h). Al haber transcurrido dicho tiempo, fue centrifugado a 14,000 rpm/10 min y se eliminó el sobrenadante. Se agregaron 200 μL de etanol 70% y llevar a *vortex* (La pastilla puede soltarse del tubo, si no lo logra dejarla así), y nuevamente se centrifugó a 14,000 rpm/5 min, y fue retirado el sobrenadante con puntilla. Posteriormente, se dejó secar la pastilla a 37°C entre unos 5 a 10 min en incubadora. Finalmente, se agregaron 20 μL de agua miliQ con RNAsa y fue resuspendido en *vortex*.

Se corrió un gel de agarosa al 0.7% y/o almacenar a 4°C .

4.2.5. Electroforesis de agarosa (DNA plasmídico).

Se corrió un gel de DNA plasmídico, con el fin de observar su integridad, en un gel de agarosa al 0.7% usando la solución tampón TAE al 1X, cargando en el gel una mezcla de 1.5 μL de jugo azul (anexo), 1.5 μL de *GelRed* y 3-5 μL de cada muestra (modificación Sambrook, 2012).

4.2.6. PCR de Extracción.

Se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa dirigida a las secuencias de extracción para la amplificación de los genes de interés presentes en el plásmido, y de esta manera tener una gran cantidad de fragmentos lineales de los genes sintéticos, que posteriormente serán

integrados. El protocolo usado se menciona a continuación (modificación Sambrook, 2012).

RECCIÓN 1X (50 μ L CONCENTRACIÓN FINAL):

Buffer 10X: 5 μ L
dNTP's 10mM: 1 μ L
Primer derecho 10mM: 2 μ L
Primer izquierdo 10mM: 2 μ L
Taq polimerasa(GenScript) : 0.25 μ L
DNA: aproximadamente 100ng
H2O miliQ: Completar a 50 μ L

PROGRAMA:

Desnaturalización inicial: 5 min a 95°C
Desnaturalización: 1 min a 95°C (20 ciclos)
Alineamiento: 1 min a 53°C (20 ciclos)
Polimerización: 2 min a 72°C (20 ciclos)
Extensión final: 5 min a 95°C

4.2.7. Electroforesis de agarosa (PCR de extracción)

Se corrió un gel de los ampliaciones producto de la PCR de extracción, con el fin de observar su adecuada amplificación y su integridad, en un gel de agarosa al 1.5 %—debido a que el tamaño de los fragmentos varían desde más de 1 kpb hasta 250 pb aproximadamente—usando la solución tampón TAE al 1X, usando una mezcla 1.5 μ L de jugo azul, 1.5 μ L de GelRed y 3-5 μ L de cada muestra (modificación Sambrook, 2012).

4.2.8. Purificación de productos de PCR de extracción.

Se purificaron los productos de la PCR de extracción para aumentar la probabilidad de éxito en la transformación, eliminando sales de los buffer que puedan interferir en la electroporación. Se usó el siguiente protocolo (Murphy, *et al*, 2003):

PROCEDIMIENTO: Para iniciar, se precipitaron los productos de PCR usando 5 μ L de

acetato de sodio 3M pH 7 y 150 μ L al 100 % de etanol. Se mezcló bien e incubó durante 5 min a -80°C o 30 min a -20°C , posteriormente fueron centrifugados a 14000 rpm durante 5 min. Se lavó cuidadosamente la pastilla formada con 500 μ L de etanol al 70 %, y nuevamente se centrifugó a 14000 rpm durante 5 min. Por último, se secó la pastilla a 37°C entre 5 y 10 min, y fue re-suspendida en 5 μ L de Tris-HCl 10 mM pH 8.

4.2.9. Integración sitio dirigida de fragmentos lineales al genoma.

Para llevar a cabo la integración sitio dirigida de los productos del PCR de extracción se siguió el protocolo propuesto por Murphy y colaboradores. con algunas modificaciones (Murphy, *et al*, 2003).

REACTIVOS, MEDIOS, MATERIAL & EQUIPOS:

Incubadora con agitación, centrífuga con refrigeración, espectrofotómetro UV/visible, Electroporador: Eppendorf Eporator, Termomixer Eppendorf, matraz con 30 mL medio LB Miller, tubos de vidrio con 5 mL de medio LB Miller estériles, tubos 1.5 mL estériles, celdas para electroporación 0.2 cm, celdas para espectrofotómetro, pipetas de 1mL, 200 μ L y 20 μ L, puntillas estériles (amarillas y azules), *E. coli* transformada con pKM208, productos de PCR de extracción, IPTG, agua miliQ, medio GYT estéril, solución estéril de glicerol 10 %, placas de Agar-LB

PROCEDIMIENTO:

Una colonia de *E. coli* ya transformada con el plásmido pKM208 fue inoculada en 5 a 10 mL cultivo de LB con ampicilina 100 ppm, fue incubada toda la noche a 30°C . Del cultivo anterior se ajustó 30 mL a una OD600 de 0.05 en un nuevo matraz y se incubó a 30°C con una agitación de 200 rpm hasta una OD600 0.4. Se pre-enfrió equipo y materiales a 4°C , y al ser alcanzada la densidad óptica deseada, se tomaron 1.5 mL y fueron pasados a un tubo de la misma capacidad, para que el IPTG fuera agregado a una concentración final 1 mM. Se incubó a 42°C por 1.5 h a 4500 rpm por 5 min a 4°C y se realizarón los siguientes lavados:

Lavado 1: Se agregaron 1 mL de agua miliQ fría a cada tubo, se re-suspendió cuidadosamente con la micro-pipeta. Se centrifugó a 14000 rpm x 1 min a 4°C.

Lavado 2: Se agregaron 500 µL de agua miliQ fría a cada tubo, se re-suspendió cuidadosamente con la micro-pipeta. Se centrifugó a 14000 rpm x 1 min a 4°C.

Lavado 3: Se agregaron 20 µL de glicerol 10 % frío a cada tubo, se re-suspendió cuidadosamente con la la micropipeta. Se centrifugó a 14000 rpm x 1 min a 4°C.

Posteriormente, se agregaron 20 µL de medio GYT frío a cada tubo, se re-suspendió cuidadosamente con la micropipeta.

Por cada alícuota (20 µL), se agregaron aproximadamente 500 ng del producto de PCR purificado e incubó 1 min en hielo (incluyendo control negativo sin producto de PCR). A continuación, las bacterias con el DNA fueron agregadas a la celda de 0.2 cm y se realizó la electroporación dando un pulso a 2500V, inmediatamente, fue agregado 1 mL de medio GTY, y se pasó a tubos de 1.5 mL e incubar de 1 h a 2 h a 37°C en el termomixer. Finalmente, las alícuotas fueron cultivadas por extensión en cajas petri con Agar-LB.

4.2.10. Extracción de DNA genómico.

Para comprobar que la cepa fue transformada exitosamente se seleccionaron las colonias obtenidas y se realizó la extracción de DNA genómico usando el *kit* comercial *One-4-ALL Genomic DNA Miniprep Kit* de la marca BIOBASIC, usando el protocolo señalado en su instructivo.

4.2.11. PCR de Identificación.

Se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa dirigida a las secuencias de identificación de los genes integrados en el genoma, y de esta manera identificar que la integración sitio dirigida fue llevada a cabo correctamente. El protocolo usado se menciona a continuación

(modificación Sambrook, 2012).

RECCIÓN 1X (50 μ L CONCENTRACIÓN FINAL):

Buffer 10X: 5 μ L

dNTP's 10mM: 1 μ L

Primer derecho 10mM: 2 μ L

Primer izquierdo 10mM: 2 μ L

Taq polimerasa: 0.25 μ L

DNA: aproximadamente 200ng

H2O miliQ: Completar a 50 μ L

PROGRAMA:

Desnaturalización inicial: 10 min a 95°C

Desnaturalización: 1 min a 95°C (40 ciclos)

Alineamiento: 1 min a 53°C (40 ciclos)

Polimerización: 2 min a 72°C (40 ciclos)

Extensión final: 5 min a 95°C

4.2.12. Electroforesis de agarosa (PCR de identificación)

Se corrió un gel de los amplicones producto de la PCR de identificación, con el fin de observar su adecuada amplificación y su integridad, en un gel de agarosa al 1.5 % usando el buffer TAE al 1X, cargando en el gel una mezcla de 1.5 μ L de jugo azul, 1.5 μ L de GelRed y 3-5 μ L de cada muestra (modificación Sambrook, 2012).

4.3. Producción y detección de shikimato

4.3.1. Producción y extracción de ácido shikímico

PRODUCCIÓN:

Para la producción de ácido shikímico se tomó una colonia, tanto de la cepa silvestre como la cepa transformada con el termorregulador, y se inoculó en 30 mL de medio M9 con 0.4 % de glucosa por toda la noche. Se hicieron nuevos cultivos en 100 mL (por triplicado) de medio M9 con 0.4 % de glucosa para ambas cepas y fueron ajustados con una densidad óptica de 0.05 a 600nm usando los cultivos iniciales, posteriormente estos fueron incubados a 37°C por 20 horas. Transcurridas las 20 horas se midió la densidad óptica a 600 nm y la concentración de glucosa mediante la determinación de azúcares reductores empelando DNS (Gonçalves *et al.*, 2010), se agregó glucosa (en solución previamente esterilizada por filtración) a una concentración final de 200 mg por matraz y se incubaron por otras 20 horas a 25°C. Tras acabar la última fase de incubación se midió tanto densidad óptica a 600nm, como la concentración de glucosa final y la producción de shikimato.

EXTRACCIÓN:

Tras transcurrir las 20 horas de producción de shikimato a una temperatura de 25°C, se tomó 1.5 mL de cada cultivo y se pasaron a un micro-tubo de 1.5 mL, se centrifugaron a 1400 rpm por un minuto, y con cuidado se tomó 1mL del sobre-nadante a tubos nuevos (Escalante *et al.*, 2010).

4.3.2. Detección y cuantificación ácido shikímico

La cuantificación del ácido shikímico se llevó a cabo por HPLC-PDA de acuerdo con el método reportado por Avula y colaboradores (Avula *et al.*, 2009) con una ligera modificación. Las muestras, previamente purificadas en membranas de nylon (0.45µm, VWR, Radnor, PA, USA), fueron inyectadas (10µL) en el sistema de HPLC, que se compone de una bomba cuaternaria, un muestreador automático, y un detector de matriz de diodos (1260 Infinity,

Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE.UU.).

El ácido shikímico se separó en una columna NH_2^- Fide 4,6 250 mm, 5 m, (Luna, Phenomenex, Torrance, CA, EE.UU.) y se mantuvo a 30°C. Las fases móviles consistían en: 10 mM de KH_2PO_4 que se ajustó a pH 4.8 con ácido ortofosfórico (fase A) y metanol (fase B). El programa de elución fue: 0/50, 12/50, 20/0, 30/0 y 45/50 (min/% Fase A) a un flujo constante de 1 mL / min. Los datos cromatográficos fueron procesados con el software OpenLAB CDS ChemStation (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE.UU.).

La longitud de onda de detección fue a 210 nm y el ácido shikímico se identificó por comparación del tiempo de retención con un el de estándar (pureza del 99%) . Para la cuantificación de ácido shikímico, se preparó un par de curvas estándar del compuesto, una en un rango de 3-60 mg/L (ppm) y otra de 50-250 mg/L.

Capítulo 5

Resultados y Discusiones

5.1. Diseño y Estructuración de genes sintéticos.

El resultado de la prueba de PCR en *in silico* (San Millán RM *et al.*, 2013) utilizando los primer's (ID) diseñados ante el genoma de varias cepas de la especie *Escherichia coli* nos arroja que estos no amplifican en ninguna región del genoma de las especies probadas (Figura 5.1). Lo que nos deja un precedente para poder utilizar este par de primers para identificar secuencias sintéticas integradas en el genoma de *E.coli*

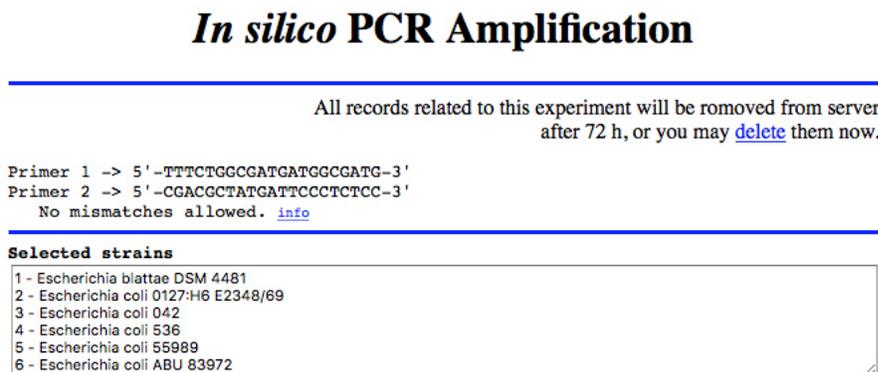


Figura 5.1: Resultado de PCR *in silico* dirigido al genoma de *Escherichia coli*.

En el presente trabajo abordó el uso de los termorreguladores para el control del flujo metabólico en microorganismos, como una opción o herramienta para la maximización en la producción de metabolitos de alto interés,—el shikimato en este caso—en la cual se tienen como ventajas ante uso de plantas o vegetales de consumo humano (Becerra-Moreno *et al.*, 2015), la producción en reactores evitando el uso de extensiones grandes de tierra cultivable

y del uso de alimentos comestibles para la producción. Por otro lado, como se ha demostrado en otros trabajos (Chen *et al.*, 2012; Escalante *et al.*, 2010), la eliminación de los genes *aroK*, *aroL*, *ydiB*, *pkyF* y *pkyA*; y sobre-expresión de genes como *tktA*, *glk*, *aroE* y *aroB* en *E.coli*, puede conducir a una acumulación de shikimato, sin embargo, es necesaria una gran cantidad de fuente de carbono y el uso de aminoácidos aromáticos—los cuáles son económicamente costosos y no convenientes en procesos ha gran escala.

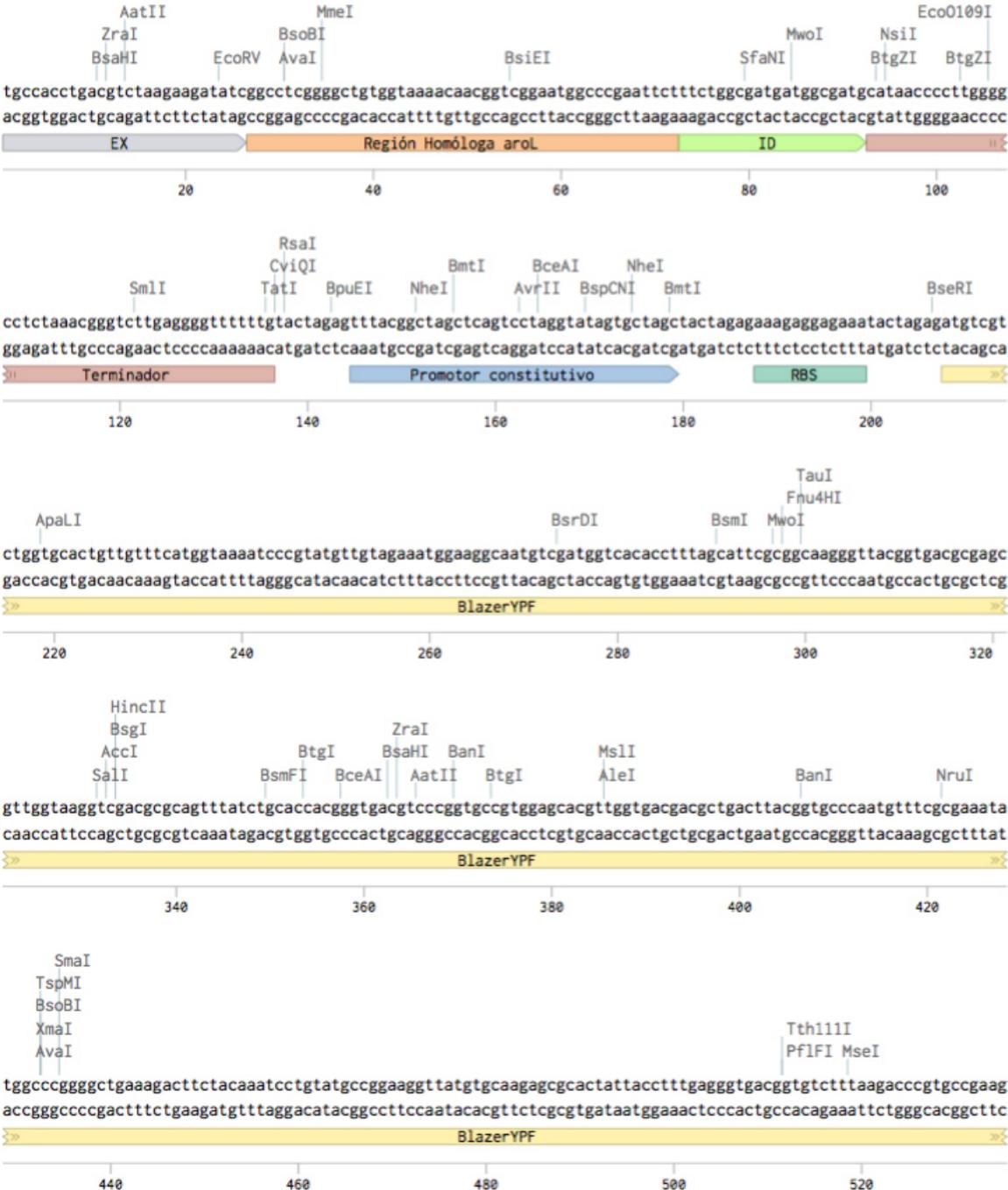
En el 2003, Murphy y colaboradores (Murphy, *et al.*, 2003) emplearon la metodología de integración de fragmentos lineales mediada por el uso de un plásmido que expresa genes del fago red λ . En este trabajo se usan regiones de homología como secuencias accesorias—las cuales fueron agregadas por PCR, a comparación de lo realizado en este trabajo, donde se sintetizó la pieza ya con estas regiones—, las cuales tenían un tamaño aproximado de 50pb por extremo, un porcentaje de G/C aproximadamente de 50. El diseño de las regiones de homología se realizaron con base en dichas características, al mismo tiempo ya diseñadas se alinearon con el genoma de *E. coli* para restringir la integración al lugar deseado.

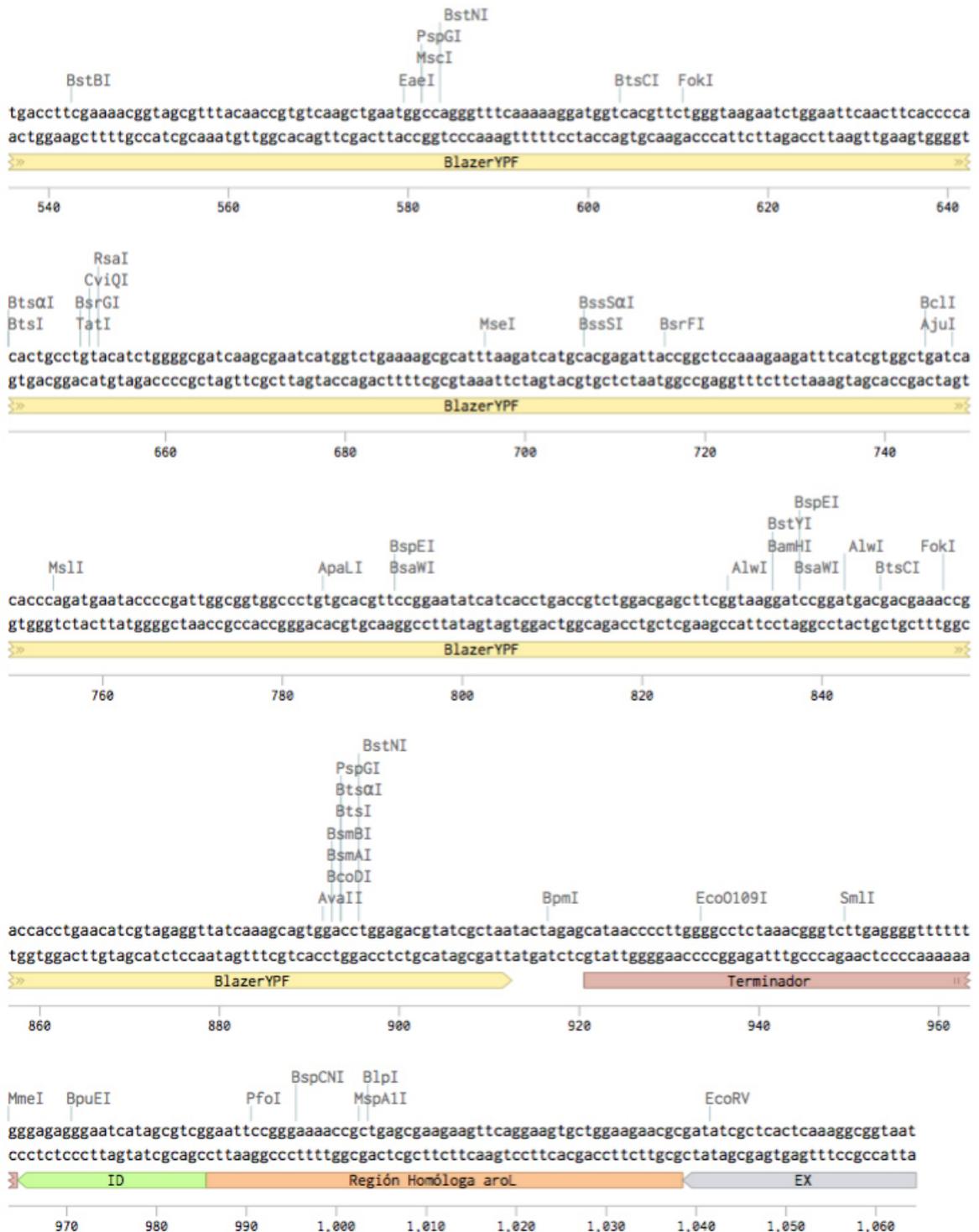
Primer	Secuencia	Temperatura de desnaturalización
EX <i>forward</i>	TGC CAC CTG ACG TCT AAG AAG ATA TC	58°C
EX <i>reverse</i>	ATT ACC GCC TTT GAG TGA GCG ATA TC	59°C
ID <i>forward</i>	TTT CTG GCG ATG ATG GCG ATG	59°C
ID <i>reverse</i>	CGA CGC TAT GAT TCC CTC TCC	58°C

Tabla 5.1: En esta tabla tenemos la lista de primer's diseñados para la obtención de fragmentos lineales y la identificación de piezas integradas al genoma con sus respectivas secuencias y temperaturas de desnaturalización.

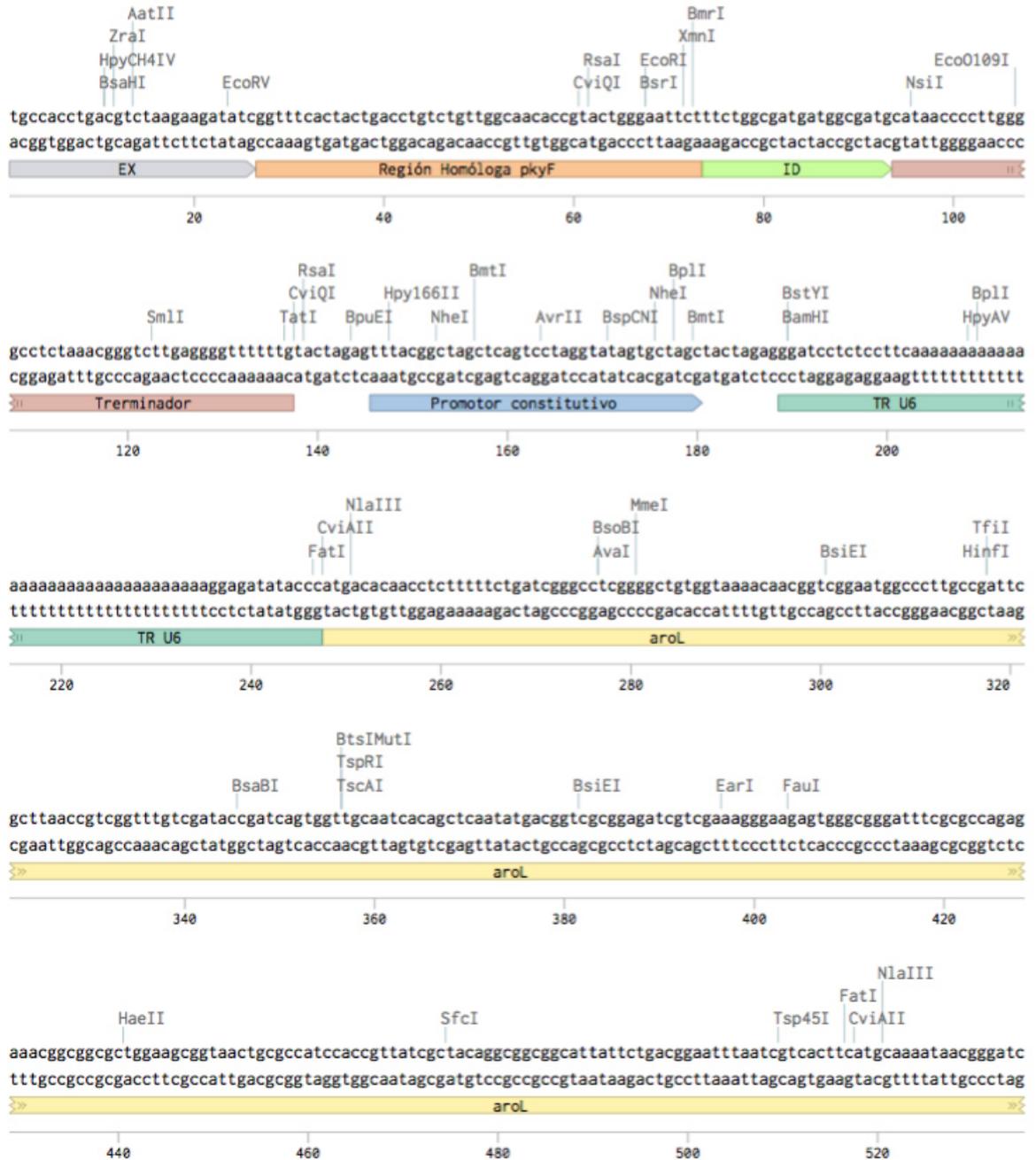
Nota: La temperara de alineamiento de ambos pares de primer's corresponde a 53 °C.

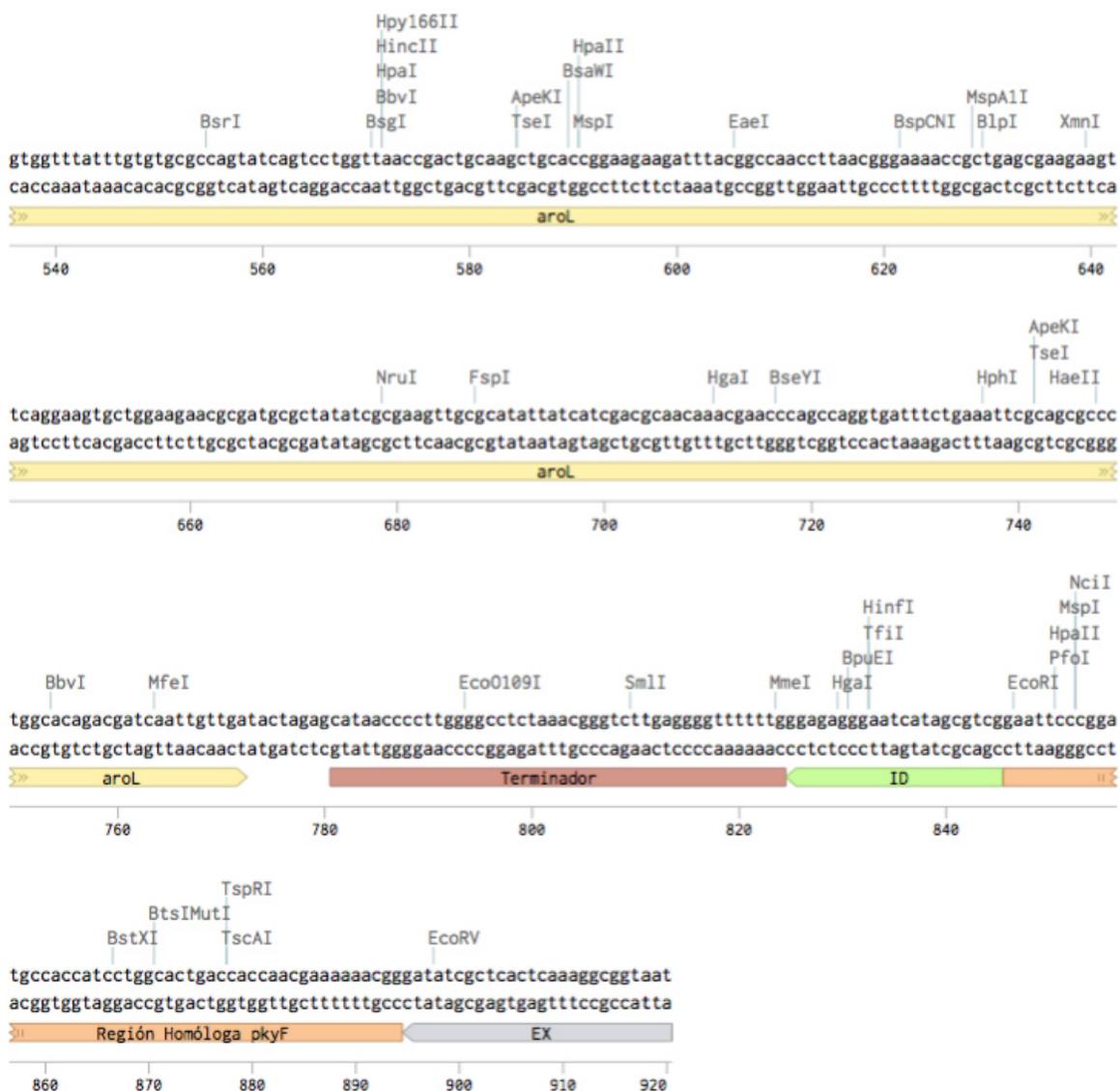
YFP:aroL (1064 bp)



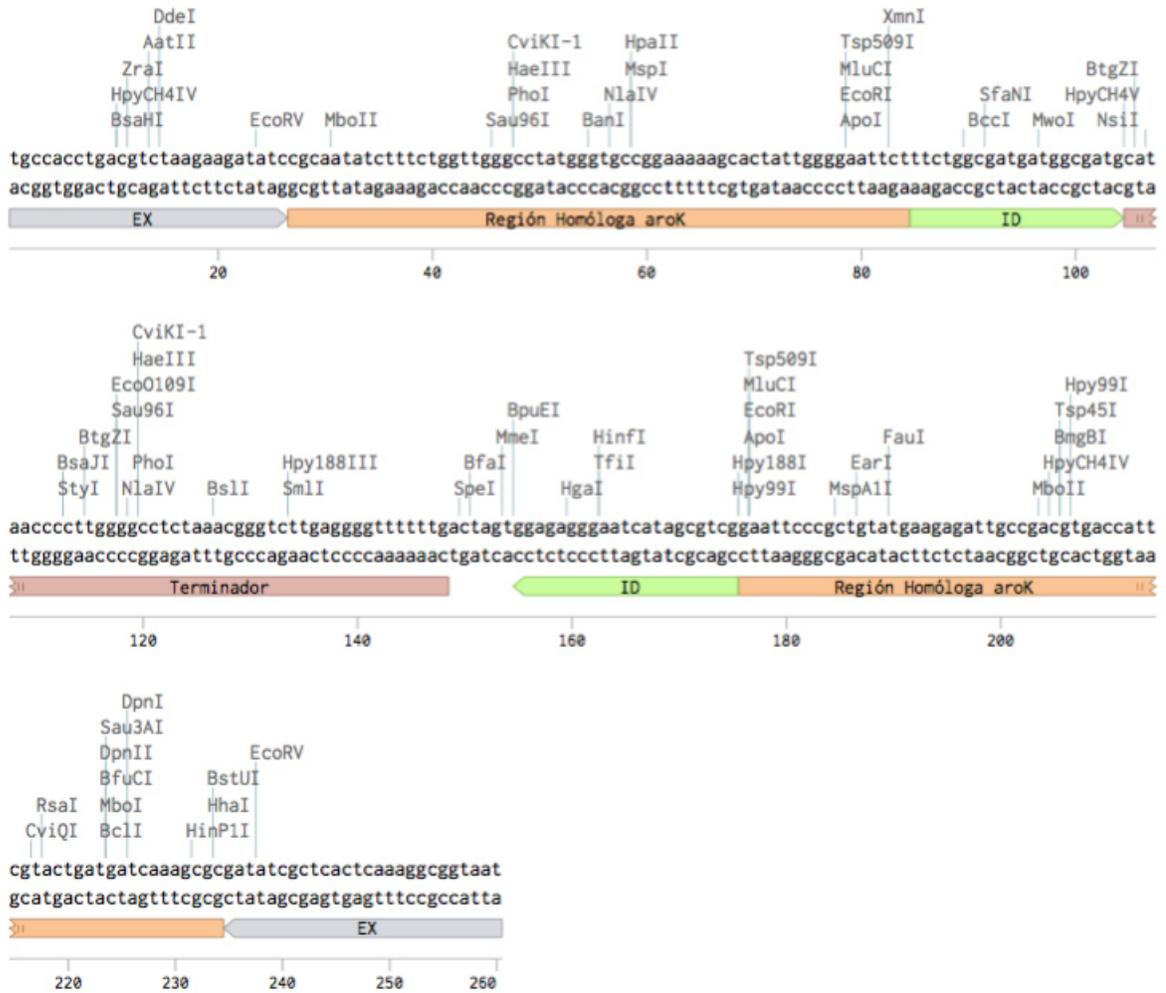


aroL:pkyF (920 bp)





TT:aroK (260 bp)



5.2. Construcción de cepa

Como evidencia de la construcción de la cepa con las piezas diseñadas tenemos el gel de electroforesis de la extracción de DNA plasmídico (Figura 5.2)—en el cual podemos constatar la integridad de los plásmidos integrados en *Escherichia coli*.

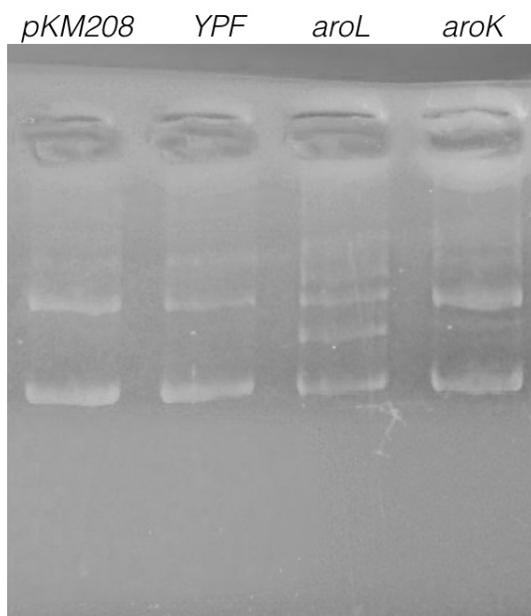


Figura 5.2: Gel de electroforesis al 0.8% de agarosa teñido con GelRed 6x (GenScript). En esta figura se aprecian las conformaciones del DNA plasmídico y la de los plásmidos: pKM208, pUC57-YFP, pUC57-*aroL* y pUC57-*aroK*.

A partir del DNA plasmídico se realizó una PCR de extracción (PCR dirigida a la región EX) con el fin de obtener una cantidad suficiente de fragmentos lineales para poder posteriormente realizar la integración. Como resultado de dicha PCR, se obtuvo un gel de electroforesis (Figura 5.3), en donde las bandas correspondieron a los tamaños teóricos esperados al compararlas con el marcador "PCR plus" de la marca GenScript—el cual cuenta con bandas en un rango de 100pb a 3kpb.

Como resultado de la integración de los fragmentos lineales de YFP, *aroL* y *aroK* por medio de electroporación a una cepa de *E. coli* DH5 α —la cual contenía el plásmido pKM208—obtuvimos una cepa que emite una fluorescencia amarilla, las cuales son resultantes de la expresión del

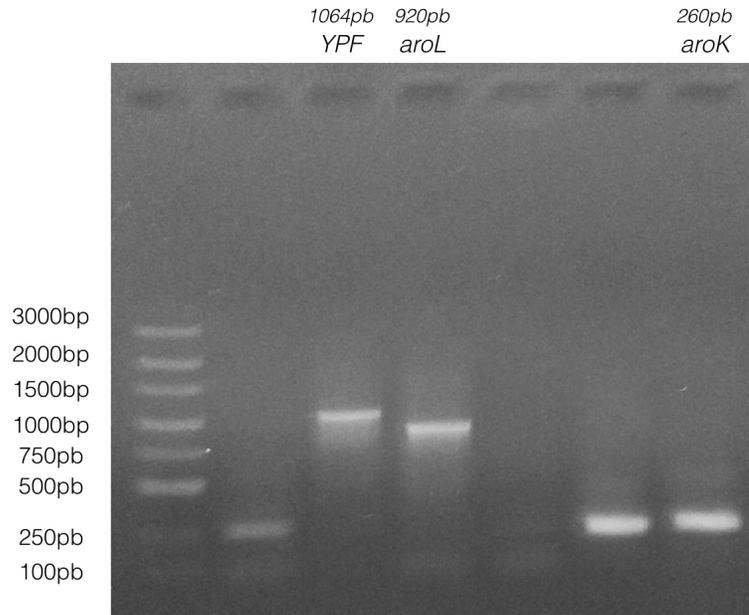


Figura 5.3: Gel de electroforesis al 1.5 % de agarosa teñido con GelRed 6x (GenScript). PCR de extracción: en el primer carril tenemos el marcador de peso molecular "PCR plus" de la marca GenScript, y en los carriles 3, 4 y 7 tenemos los amplicones de las piezas YPF, *aroL* y *aroK* respectivamente.

gen YFP integrado en el genoma (Figura 5.4). De igual forma se obtuvo como evidencia el gel de electroforesis de la extracción de DNA genómico (Figura 5.5) y una PCR de identificación (dirigido a las regiones ID) para cerciorarse que los fragmentos se hayan integrado correctamente, la cual se evidencio con un gel de electroforesis (Fig. 5.6) en donde las bandas correspondieron a los tamaños teóricos esperados al compararlas con el marcador "PCR plus" de la marca GenScript.



Figura 5.4: Comparación de cepa silvestre de *Escherichia coli* (izquierda) contra cepa transformada (derecha)—la cual contiene el gen de la proteína amarillo fluorescente—irradiadas con luz UV en transiluminador.

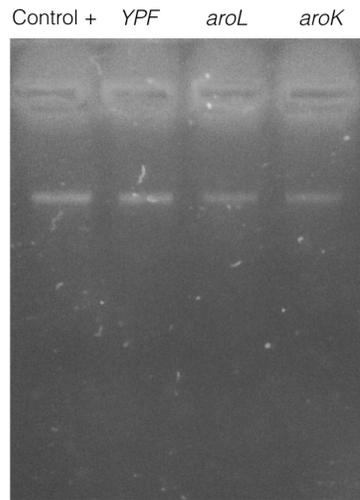


Figura 5.5: Gel de electroforesis al 0.8% de agarosa teñido con GelRed 6x (GenScript). En dicho gel se puede observar la integridad del DNA genómico.

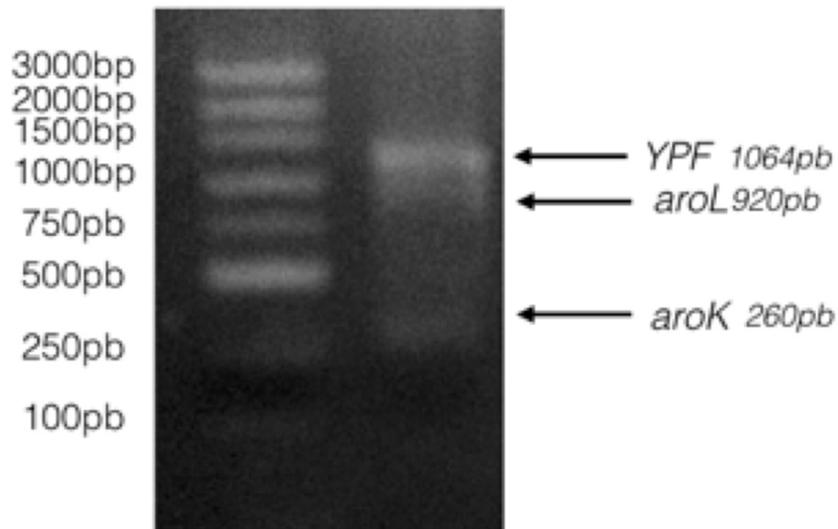


Figura 5.6: Gel de electroforesis al 1.5% de agarosa teñido con GelRed 6x (GenScript). PCR de identificación: en el primer carril tenemos el marcador de peso molecular "PCR plus" de la marca GenScript, y en el segundo carril tenemos tres bandas correspondientes a los amplicones provenientes de la PCR de DNA genómico (*YPF*, *aroL* y *aroK* integrados al genoma).

5.3. Producción y detección de ácido shikímico

De la fase de producción de shikimato tanto en la cepa control, como la cepa modificada genéticamente obtuvimos los siguientes datos (Tabla 5.2): en la fase de producción de biomasa a 37°C observamos un mayor aumento en la densidad óptica (OD₆₀₀) por parte de la cepa modificada a comparación de la cepa control, 4 y 2 respectivamente—lo cual sugerimos que pudo ser causado por el cambio de promotores regulables por los aminoácidos aromáticos (cepa silvestre), por los promotores constitutivos (cepa modificada)—, y con un consumo de glucosa similar, 93 % y 98 % respectivamente, empero, en la fase de producción de shikimato a 25°C la cepa control aumento en densidad óptica hasta 3.1 con un consumo de 68 %. El aumento de la densidad óptica de la cepa modificada en esta etapa solo fue de 0.4 unidades más a comparación de la hora 20, haciendo uso de un 86 % de la glucosa disponible, con lo que podemos sugerir que la fuente de carbono puede ser dirigida para la producción del metabolito de interés.

Para la cuantificación de azúcares reductores fue realizada una curva de calibración la cual es mostrada en la figura 5.7.

	Hora 0 (37°C)		Hora 20 (Cambio de 37°C a 25°C)		Hora 40 (25°C)	
	Densidad Óptica (OD600)	Consumo de glucosa (%)	Densidad Óptica (OD600)	Consumo de glucosa (%)	Densidad Óptica (OD600)	Consumo de glucosa (%)
Cepa silvestre	0.05	0	2	98	3.1	68
Cepa modificada	0.05	0	4	93	4.3	86

Tabla 5.2: En esta tabla observamos los resultados de la producción de shikimato en *E. coli* fraccionada en 2 fases. Al pasar las 20 horas de producción a 37°C, la cepa silvestre alcanzó una OD₆₀₀ de 2, por otro lado la cepa modificada obtuvo una OD₆₀₀ de 4. En cuanto al consumo de glucosa de la cepa silvestre es del 98 % y de la cepa modificada del 93 %. En la segunda parte del proceso de 20 horas a 25°C, la cepa silvestre alcanzó una OD₆₀₀ de 3.1 y la cepa modificada una OD₆₀₀ de 4.3. El consumo de glucosa de la cepa Silvestre en esta etapa es del 68 % y de la cepa modificada del 86 %.

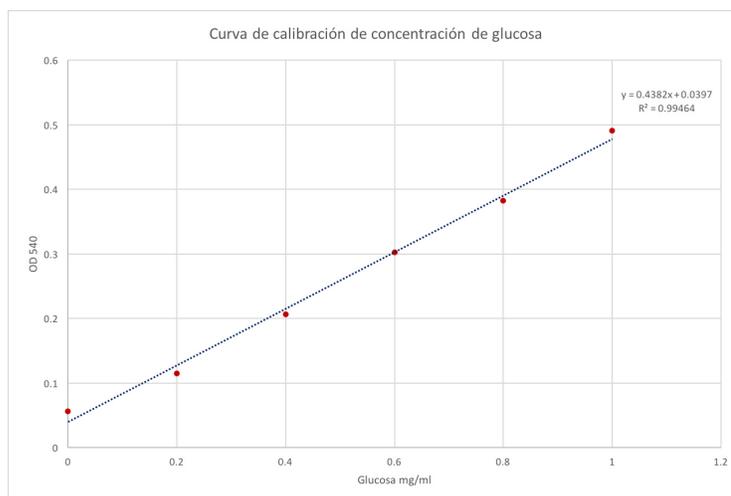


Figura 5.7: Curva de calibración de concentración de azúcares reductores realizada mediante distintas concentraciones de glucosa (0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 mg/mL).

En la cuantificación por cromatografía obtuvimos un tiempo de retención del shikimato de 7.5 minutos en ambas cepas, el cual coincide con nuestro estándar auténtico (ácido shikímico $\geq 99\%$, Sigma Aldrich, Inc., St. Louis, MO 63103 USA). De acuerdo con la curva de calibración realizada (Figura 5.8), los promedios de las áreas obtenidas son de 6690.6 para la cepa silvestre y de 12679.7 para la cepa modificada, corresponden a una concentración promedio de 4.25 mg/L y 7.84 mg/mL respectivamente (Figura 5.9).

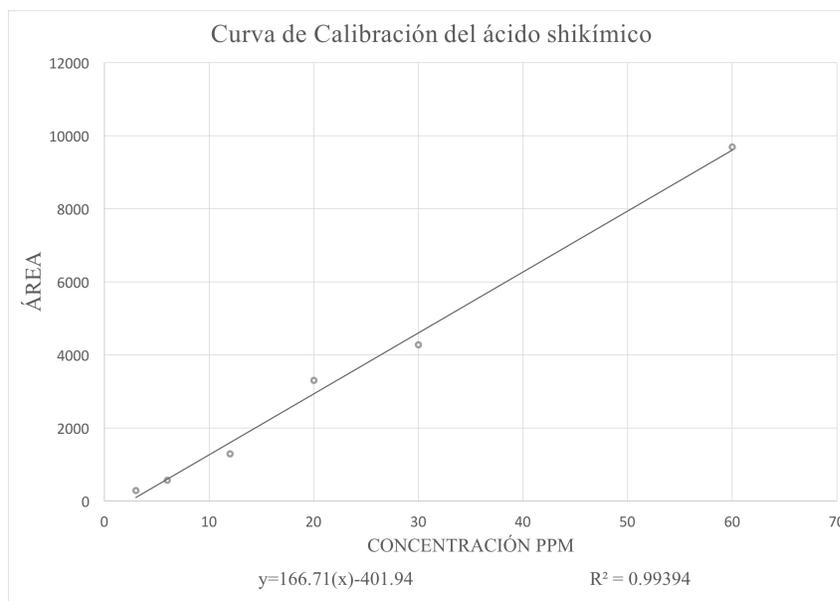


Figura 5.8: Curva de calibración de ácido shikímico realizada mediante distintas concentraciones de un estándar de ácido shikímico (3 ppm, 6 ppm, 12 ppm, 20 ppm, 30 ppm y 60 ppm).

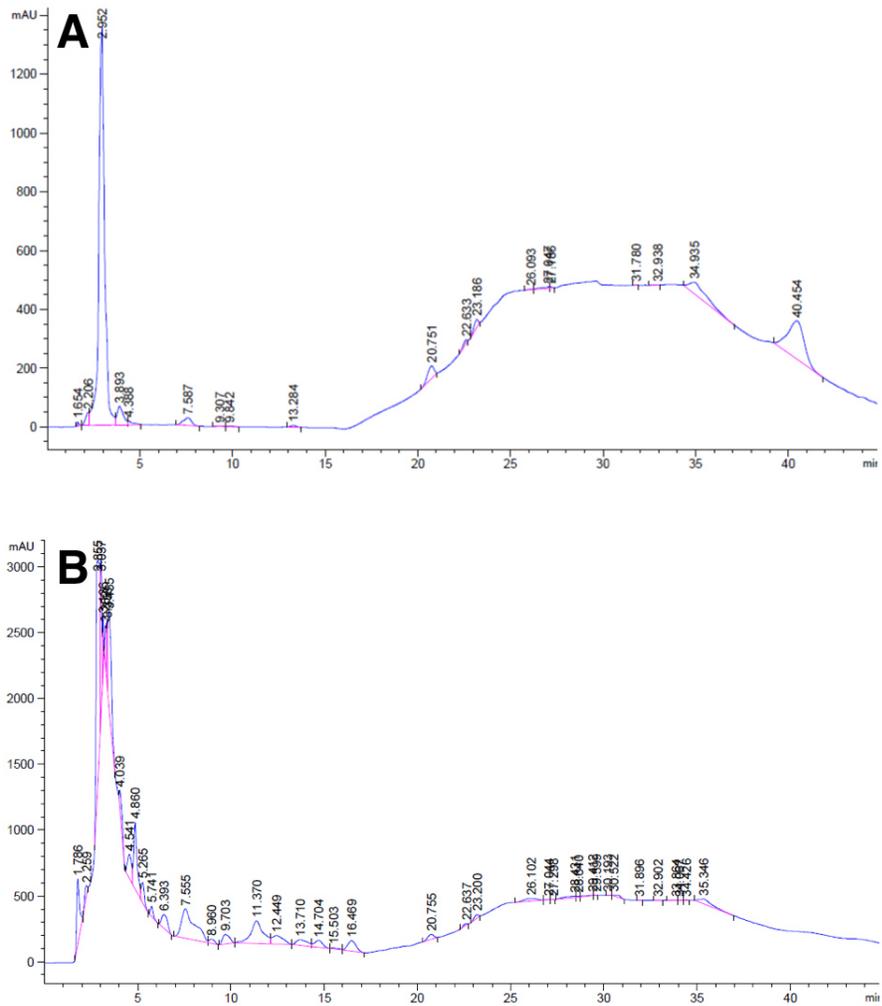


Figura 5.9: Cromatograma de las muestras—cepa silvestre (parte superior) y cepa modificada (parte inferior)—donde podemos observar que el tiempo de retención es de 7 minutos. Se obtuvo un promedio de área de 6690.6 y 12679.7 para la cepa silvestre y la cepa modificada, respectivamente.

Seguidamente de la normalización de las cepas respecto a la OD₆₀₀, obtenemos un aumento en la producción de shikimato de un 33 % en la cepa modificada con respecto a la cepa control (Figura 5.10).

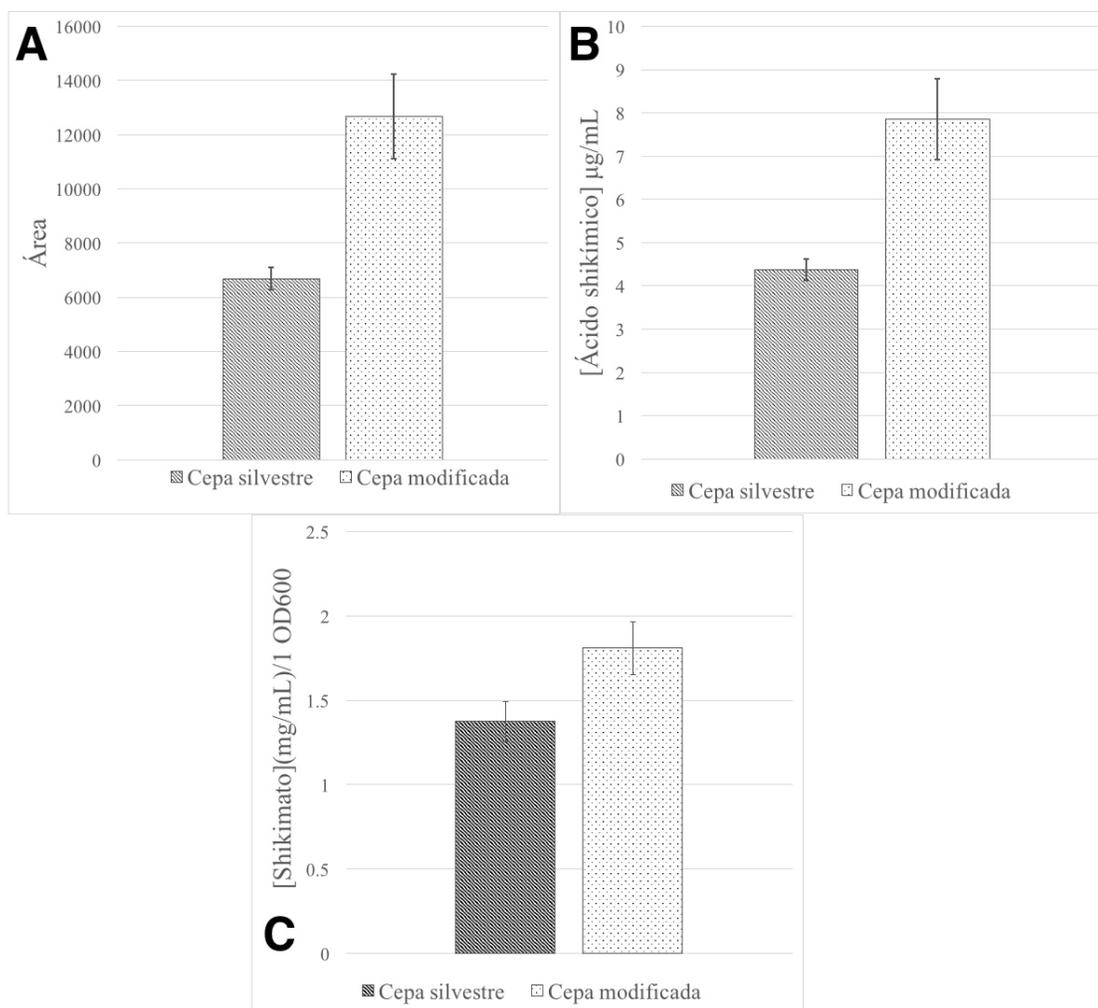


Figura 5.10: Comparación en la producción de shikimato entre la cepa silvestre y la cepa modificada. **A)** Comparación del promedio de las áreas bajo la curva del tiempo de retención reportado entre ambas cepas. **B)** Comparación de la concentración promedio de ácido shikímico obtenido por ambas cepas—tomando como referencia la curva de calibración realizada. **C)** Comparación de la concentración promedio de ácido shikímico después de haber normalizado las muestras a 1 de OD₆₀₀. Obteniendo un aumento del 33 % en la producción de shikimato por parte de la cepa modificada.

Finalmente, se realizó un análisis de varianza de un factor para comprobar que había una diferencia significativa en la producción de shikimato entre ambas cepas, tomando en cuenta que ambas siguieron el mismo protocolo de producción (Figura 5.11), teniendo como resultado una diferencia significativa en la producción de shikimato entre ambas cepas con un 99 % de probabilidad, dando sustento a la hipótesis planteada.

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Cepas silvestre	3	4.124216462	1.374738821	0.013942192
Cepa Modificada	3	5.680962577	1.893654192	0.033109404

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.403909745	1	0.403909745	17.168801	0.014335416	7.708647422
Dentro de los grupos	0.094103192	4	0.023525798			
Total	0.498012937	5				

Figura 5.11: Análisis de varianza de un factor (ANOVA) de los resultados en la producción de shikimato entre la cepa silvestre y la cepa modificada genéticamente. Los resultados muestran una diferencia significativa entre ambas cepas con una probabilidad del 99 %.

Actualmente, no se ha encontrado en la literatura consultada ningún trabajo que haya podido controlar el flujo metabólico de manera extrínseca y reversible, la cual es el mayor aporte de esta investigación. Esta tecnología abre las puertas a más investigación en el área, esperando que en un futuro, al combinar las técnicas moleculares ya existentes haya un mejor control y un aumento considerable en la producción de metabolitos de alto valor, en comparación a los datos ya existentes (Chen *et al.*, 2012; Escalante *et al.*, 2010). En este trabajo se construyó una cepa con secuencias diseñadas para este fin, las cuales examinando las evidencias moleculares (presencia de fluorescencia en la cepa resultante y geles de electroforesis de extracciones de DNA y PCRs dirigidos específicamente para las regiones diseñadas de la cepa construida por medio de primers específicos), evidencian la correcta construcción de la antes mencionada. En el 2009 Nuepert y colaboradores, comprobaron en su trabajo que la presencia de el termorregulador U6 era el encargado de la sobre expresión de la proteína verde fluorescente a la que regulaba. En este trabajo se realizaron retrotranscripción y PCR dirigida al RNA de dicho gen, obteniendo como resultado la misma cantidad de RNA mensajero. De esta forma concluyeron que los cambios de temperatura no influía en la cantidad de proteína producida, siendo el termorregulador el único responsable. Gracias a esta antecedente, aunado con el aumento significativo de la producción de shikimato en la cepa transformada y regulada con el termorregulador de RNA, nosotros atribuimos el cambio en la producción a este fenómeno. Teniendo un control del flujo metabólico para la producción de shikimato.

Capítulo 6

Conclusiones

En el presente trabajo se estableció una estrategia para el redireccionamiento del flujo metabólico, en la cual se puede controlar la fuente de carbono para la producción de biomasa y de shikimato. Para lograr esto, se realizó el diseño de los genes sintéticos, los cuales, fueron útiles para la regulación del flujo metabólico *Escherichia coli* DH5 α .

Mediante la transformación con las secuencias sintéticas diseñadas previamente, se obtuvo una cepa recombinante de *Escherichia coli* DH5 α , la cual fue indentificada y aislada con éxito.

Ya diseñada y construida nuestra cepa recombinante de *Escherichia coli* DH5 α se detectó y midió la producción de shikimato, obteniendo como resultado un aumento en la producción de shikimato mediante el uso de termorreguladores de RNA que controlan el flujo metabólico.

Por último, debido a las evidencias presentadas podemos concluir que fue posible control en el flujo metabólico mediado por el uso de termorreguladores de RNA.

Anexos

Medio GYT

10 % (v/v) de glicerol.
0.125 % (m/v) de extracto de levadura.
0.25 % (m/v) de triptona.
Esterilizar por filtración (Sambrook *et al.*, 2012).

Medio LB

Para un litro (usar agua desionizada):
10g de triptona.
5g de extracto de levadura.
10g de NaCl.
Esterilizar en autoclave (Sambrook *et al.*, 2012).

Medio M9

1X de sales M9:
**5X de sales M9 para un litro contiene:
-64g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
-15g KH_2PO_4
-2.5g NaCl
-5g NH_4Cl

2mM MgSO_4
0.1mM CaCl_2
0.4 % de fuente de carbono.
Agua estéril.
Esterilizar sales en autoclave y el resto por filtración (Sambrook *et al.*, 2012).

Soluciones para extracción de DNA plasmídico (lisis alcalina)

Solución I (200mL)

5mL de Tris HCl 1M (pH 8.0)
4mL de EDTA 0.5M (pH 8.0)
Aforar con agua destilada a 200mL

Solución II (200mL)

4mL de NaOH 10N

2.0g SDS

Aforar con agua destilada a 200mL

Solución III (200mL)

58.8g de acetato de potasio

23.0mL de ácido acético

Aforar con agua destilada a 200mL

TAE buffer (1L a 10X)

48.4g de Tris base

11.4mL de ácido acético glacial

3.7g de EDTA

Jugo azul 1X

3 ml Glicerol absoluto (Concentración final, 30 %)

25 mg Azul de Bromofenol (Concentración final 0.25 %)

25 mg Xilencianol (Concentración final 0.25 %)

H₂O destilada hasta 10mL

Bibliografía

Andrianantoandro E, Basu S, Karig DK, Weiss R (2006). Synthetic biology: new engineering rules for an emerging discipline. *Molecular systems biology*, **2**: 1-13.

Bailey JE (1991). Toward a science of metabolic engineering. *Science*, 252: 1668-1675.

Bar-Even A, Tawfik DS (2013). Engineering specialized metabolic pathways—is there a room for enzyme improvements?. *Current opinion in biotechnology*, **24**: 310-319.

Becerra-Moreno A, Redondo-Gil M, Benavides J, Nair V, Cisneros-Zevallos L and Jacobo-Velázquez DA (2015). Combined effect of water loss and wounding stress on gene activation of metabolic pathways associated with phenolic biosynthesis in carrot. *Front. Plant Sci*, **6**:837.

Blount BA, Weenink T, Vasylechko S, Ellis T (2012). Rational diversification of a promoter providing fine-tuned expression and orthogonal regulation for synthetic biology. *PLoS ONE*, **7**: e33279.

Bornscheuer UT, Huisman GW, Kazlauskas RJ, Lutz S, Moore JC, Robins K (2012). Engineering the third wave of biocatalysis. *Nature*, **485**: 185-194.

Boyle PM, Silver PA (2012). Parts plus pipes: synthetic biology approaches to metabolic engineering. *Metabolic engineering*, **14**: 223-232.

Buchholz K, Collins J (2013). The roots—a short history of industrial microbiology and biotechnology. *Applied microbiology and biotechnology*, **97**: 3747-3762.

Buchholz K, Collins J (2014). Concepts in biotechnology: history, science and business. John Wiley & Sons.

Budin I, Debnath A, Szostak JW (2012). Concentration-driven growth of model protocell membranes. *J Am Chem Soc*, **134**: 20812-20819.

Chen K, Dou J, Tang S, Yang Y, Wang H, Fang H, Zhou C (2012). Deletion of the *aroK* gene is essential for high shikimic acid accumulation through the shikimate pathway in *E. coli*. *Bioresource technology*, **119**:141-147.

Escalante A, Calderón R, Valdivia A, de Anda R, Hernández G, Ramírez OT, Bolívar F (2010). Metabolic engineering for the production of shikimic acid in an evolved *Escherichia coli* strain lacking the phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system. *Microbial cell factories*, **9**: 21.

DeFeyter RC, Pittard J (1986). Purification and properties of shikimate kinase II from *Escherichia coli* K-12. *Journal of bacteriology*, **165**: 331-333.

Delebecque CJ, Lindner AB, Silver PA, Aldaye FA (2011). Organization of intracellular reactions with rationally designed RNA assemblies. *Science*, **333**: 470-474.

Glass JI (2012). Synthetic genomics and the construction of a synthetic bacterial cell. *Perspect Biol Med*, **55**: 473-489.

Gibson DG, Young L, Chuang RY, Venter JC, Hutchison CA 3rd, Smith HO (2009). Enzy-

matic assembly of DNA molecules up to severalhundred kilobases. *Nat Methods*, **6**: 343-345.

Gibson DG, Glass JI, Lartigue C, Noskov VN, Chuang RY, Algire MA, Benders GA, Montague MG, Ma L, Moodie MM (2010). Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. *Science*, **329**: 52-56.

Giddings LA, Newman DJ (2013). Microbial natural products: molecular blueprints for antitumor drugs. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, **40**: 1181-1210.

Gil R, Silva FJ, Pereto J, Moya A (2004). Determination of the core of a minimal bacterial gene set. *Microbiol Mol Biol Rev*, **68**:518-537.

Golynskiy MV, Seelig B (2010). De novo enzymes: From computational design to mRNA display. *Trends in biotechnology*, **28**: 340-345.

Gonçalves C, Rodriguez-Jasso RM, Gomes N, Teixeira JA, Belo I (2010). Adaptation of dinitrosalicylic acid method to microtiter plates. *Anal. Methods*, **2**:2046-2054.

Gosset G, Yong-Xiao J, Berry A (1996). A direct comparison of approaches for increasing carbon flow to aromatic biosynthesis in *Escherichia coli*. *Journal of industrial microbiology*, **17**: 47-52.

Gross H (2009). Genomic mining—a concept for the discovery of new bioactive natural products. *Current opinion in drug discovery & development*, **12**: 207-219.

Hashimoto M, Ichimura T, Mizoguchi H, Tanaka K, Fujimitsu K, Keyamura K, Ote T, Yamakawa T, Yamazaki Y, Mori H (2005). Cell size and nucleoid organization of engineered *Escherichia coli* cells with a reduced genome. *Mol Microbiol*, **55**: 137-149.

Herrmann KM, Weaver LM (1999). The shikimate pathway. *Annual review of plant biology*, **50**: 473-503.

Kwon JY, Singh NJ, Kim HN, Kim SK, Kim KS, Yoon J (2004). Fluorescent GTP-sensing in aqueous solution of physiological pH. *Journal of the American Chemical Society*, **126**: 8892-8893.

Lan EI, Liao JC (2013). Microbial synthesis of n-butanol, isobutanol, and other higher alcohols from diverse resources. *Bioresource technology*, **135**: 339-349.

Lartigue C, Glass JI, Alperovich N, Pieper R, Parmar PP, Hutchison CA 3rd, Smith HO, Venter JC (2007). Genometransplantation in bacteria: changing one species to another. *Science*, **317**: 632-638.

Lee JW, Na D, Park JM, Lee J, Choi S, Lee SY (2012). Systems metabolic engineering of microorganisms for natural and non-natural chemicals. *Nature chemical biology*, **8**: 536-546.

Lovley DR (2012). Electromicrobiology. *Annual review of microbiology*, **66**: 391-409.

Malcovati M, Valentini G, Kornberg HL (1973). Two forms of pyruvate kinase in *E. coli*: their properties and regulation. *Acta vitaminologica et enzymologica*, **27**: 96.

Mills JH, Khare SD, Bolduc JM, Forouhar F, Mulligan VK, Lew S, Seetharaman J, Tong L, Stoddard BL, Baker D (2013). Computational design of an unnatural amino acid dependent metalloprotein with atomic level accuracy. *J Am Chem Soc*, **135**: 13393-13399.

Morell H, Sprinson DB (1968). "Shikimate kinase isoenzymes in *Salmonella typhimurium*." *J Biol Chem*, **243**: 676-7.

Morita MT, Tanaka Y, Kodama TS, Kyogoku Y, Yanagi H, Yura T (1999). Translational induction of heat shock transcription factor 32: evidence for a built-in RNA thermosensor. *Genes & development*, **13**: 655-665.

Noskov VN, Karas BJ, Young L, Chuang RY, Gibson DG, Lin YC, Stam J, Yonemoto IT, Suzuki Y, Andrews-Pfannkoch C (2009). Assembly of large, high G + C bacterial DNA fragments in yeast. *ACS Synth Biol*, **1**: 267-273.

Muñoz ME, Ponce E (2003). Pyruvate kinase: current status of regulatory and functional properties. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, **135**: 197-218.

Murphy KC, Campellone KG (2003). Lambda Red-mediated recombinogenic engineering of enterohemorrhagic and enteropathogenic *E. coli*. *BMC molecular biology*, **4**: 11.

Neupert J, Bock R (2009). Designing and using synthetic RNA thermometers for temperature—controlled gene expression in bacteria. *Nature protocols*, **4**: 1262-1273.

Ponce E, Martínez A, Bolívar F, Valle F (1998). Stimulation of glucose catabolism through the pentose pathway by the absence of the two pyruvate kinase isoenzymes in *Escherichia coli*. *Biotechnology and bioengineering*, **58**: 292-295.

Porcar M, Danchin A, de Lorenzo V, Dos Santos VA, Krasnogor N, Rasmussen S, Moya A (2011). The ten grand challenges of synthetic life. *Syst Synth Biol*, **5**: 1-9.

Peskov K, Mogilevskaya E, Demin O (2012). Kinetic modelling of central carbon metabolism in *Escherichia coli*. *FEBS Journal*, **279**: 3374-3385.

Pleiss J (2006). The promise of synthetic biology. *Applied microbiology and biotechnology*, **73**: 735-739.

Poblete-Castro I, Binger D, Rodrigues A, Becker J, Martins DosSantos VA, Wittmann C (2013). In-silico-driven metabolic engineering of *Pseudomonas putida* for enhanced production of poly-hydroxyalkanoates. *Metab Eng*, **15**: 113-123.

Ponce E (1999). Effect of growth rate reduction and genetic modifications on acetate accumulation and biomass yields in *Escherichia coli*. *Journal of bioscience and bioengineering*, **87**: 775-780.

Quin MB, Schmidt-Dannert C (2014). Designer microbes for biosynthesis. *Current opinion in biotechnology*, **29**: 55-61.

Rhodium VA, Mutalik VK, Gross CA (2012). Predicting the strength of UP-elements and full-length *E. coli* sigmaE promoters. *NucleicAcids Res*, **40**: 2907-2924.

Sagt CM (2013). Systems metabolic engineering in an industrial setting. *Applied microbiology and biotechnology*, **97**: 2319-2326.

Salis HM, Mirsky EA, Voigt CA (2009). Automated design of synthetic ribosome binding sites to control protein expression. *Nat Biotechnol*, **27**: 946-950.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (2012). Molecular cloning: A laboratory manual, 4th ed (Vol. 1, pp. 11-15). New York: Cold spring harbor laboratory press.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (2012). Molecular cloning: A laboratory manual, 4th ed

(Vol. 1, pp. 94-99). New York: Cold spring harbor laboratory press.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (2012). Molecular cloning: A laboratory manual, 4th ed (Vol. 1, pp. 177-183). New York: Cold spring harbor laboratory press.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (2012). Molecular cloning: A laboratory manual, 4th ed (Vol. 2, pp. 470-477). New York: Cold spring harbor laboratory press.

San Millán RM, Martínez-Ballesteros I, Rementeria A, Garaizar J, Bikandi J (2013). Online exercise for the design and simulation of PCR and PCR-RFLP experiments. *BMC Research Notes*, **6**:513.

Shuler ML (2012). Modeling life. *Ann Biomed Eng*, **40**:1399-1407.

Singh BK (2010). Exploring microbial diversity for biotechnology: The way forward. *Trends in biotechnology*, **28**: 111-116.

Smid EJ, Hugenholtz J (2010). Functional genomics for food fermentation processes. *Annual review of food science and technology*, **1**: 497-519.

Stephanopoulos G, Aristidou AA, Nielsen J (1998). Metabolic engineering: principles and methodologies. *Academic press*.

Stephanopoulos G (1999). Metabolic fluxes and metabolic engineering. *Metabolic engineering*, **1**: 1-11.

Stephanopoulos G (2012). Synthetic biology and metabolic engineering. *ACS synthetic biology*, **1**: 514-525.

Thornburg CC, Zabriskie TM, McPhail K L (2010). Deep-Sea Hydrothermal Vents: Potential Hot Spots for Natural Products Discovery. *Journal of natural products*, **73**: 489-499.

Wang Q, Tang B, Song L, Ren B, Liang Q, Xie F, Zhuo Y, Liu X, Zhang L (2013). 3D Scape CS: application of three dimensional, parallel, dynamic network visualization in Cytoscape. *BMC Bioinformatics*, **14**:322.

Wang YH, Wei KY, Smolke CD (2013). Synthetic biology: advancing the design of diverse genetic systems. *Annual review of chemical and biomolecular engineering*, **4**: 69-102.

Whipp MJ, Pittard AJ (1995). A reassessment of the relationship between *aroK*-and *aroL*-encoded shikimate kinase enzymes of *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, **177**: 1627-1629.

Resumen Autobiográfico

ALBERT ISSAC LERMA ESCALERA

Candidato para el grado de
Maestro en Ciencias con Orientación en Microbiología Aplicada

Tesis: Regulación del flujo metabólico en *Escherichia coli* mediante el uso de termorreguladores de RNA, para la producción de un precursor terapéutico (Shikimate).

Edad: 24 años

Campo de estudio: Biología Sintética

Biografía:

Datos personales: Nacido en Ciudad Victoria, Tamaulipas el 20 de Agosto de 1991, hijo de Félix Lerma Vargas y María del Rosario Escalera Chávez.

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Licenciado en Biotecnología Genómica en el 2013.