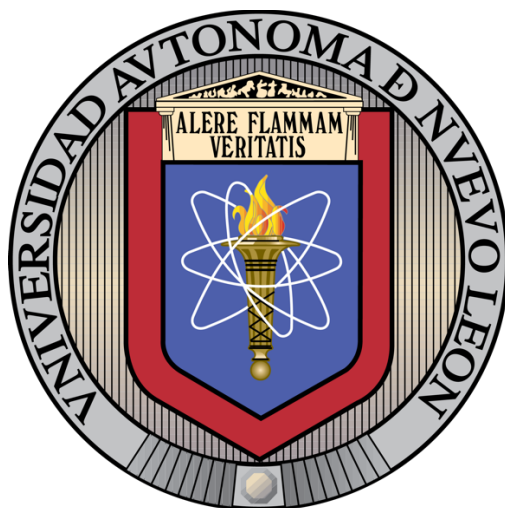


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



**USO DE ARN ANTI-SENTIDO PARA EL CONTROL DEL FLUJO  
METABÓLICO EN LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO SHIKÍMICO**

Por

**JORDY ALEXIS LERMA ESCALERA**

**Como requisito parcial para obtener el Grado de MAESTRO EN CIENCIAS con  
Orientación en Microbiología Aplicada.**

**Junio, 2021**

**USO DE RNA ANTI-SENTIDO PARA EL CONTROL DEL FLUJO  
METABÓLICO EN LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO SHIKÍMICO**

**Comité de tesis**

---

Dra. María Elena Cantú Cárdenas  
Asesor

---

Dr. José Rubén Morones Ramírez  
Co-Asesor

---

Dra. Pilar del Carmen Morales San Claudio  
Comité tutorial

---

Dr. Xristo Zárate Kalfópulos  
Comité tutorial

---

Dr. Angel León Buitimea  
Comité tutorial

## DEDICATORIA

Esta tesis de maestría es la culminación de años formando parte de “*The nanobiotechnology research group*”. A lo largo de esos años me enfrente a innumerables retos de los cuales hubiera sido imposible superar sin el apoyo de mi familia. Esta tesis esta dedicada a Felix Lerma Vargas (mi padre), María del Rosario Escalera Chávez (mi madre), Albert Issac Lerma Escalera. Quienes siempre me brindaron su apoyo, cariño y consejo cuando más lo necesite. Esta tesis es para mi padre, por inculcarme esta curiosidad científica que me ha llevado tan lejos y por cada sacrificio que hiciste para que yo pudiera lograr mis sueños. Esta tesis es para mi madre, por darme tu cariño cuando más lo necesitaba, para animarme a no desistir cuando sentía que los retos me superaban. Esta tesis es para mi hermano, que a lo largo de los años a sido mi principal mentor, por que me has enseñado a equivocarme y aprender de esos errores, a tener mente fría en el laboratorio y que no existen malos resultados, solo resultados. Los amo a cada uno de ustedes y cada uno de mis éxitos siempre se los dedicare por que gracias a ustedes hoy se que nada es imposible.

***«Si he logrado ver más lejos ha sido porque he subido a hombros de gigantes»***

*-Sir Isaac Newton*

## AGRADECIMIENTOS

En esta tesis de maestría es el resultado de un proyecto en el cual estuvieron involucrado muchas personas e instutos y que sin ninguno de ellos esto no sería posible. Me gustaría por medio de esta sección agradecer a cada uno de ellos.

Quiero agradecer a la Facultad de Ciencias Químicas por brindarme los recursos y el conocimiento que fue elemental para el desarrollo de este proyecto. A CONACYT por brindarme el apoyo economico necesario para que me pudiera enfocar unicamente en mi crecimiento profesional

Al Dr. José Ruben Morones Ramirez, por confiar en mi y darme la oportunidad de desarrollarme como el gran investigador en que me he convertido, gracias por permitirme enfrentarme a tantos desafíos que ayudaron a ser un mejor profesionista y una mejor persona. A la Dra. María Elena Cantú Cardenas que siempre estuvo al pendiente de mi apoyandome y dandome su asesoría cuando mas lo necesite.

A mi comité tutorial, que sacrificaron de su tiempo para revisar cada uno de mis avances, desde que el proyecto estuviera cimentado en bases solidas y cientificas, hasta guiarme y aconsejarme en cada paso que di para concluir esta tesis de maestría.

Al grupo de investigación "*The nanobiotechnology research group*" que mas que mis compañero o amigos son mi otra familia. Jav, Paco, Ángel, gracias por ser otros mentores para mi, apoyarme cuando me surgía alguna duda y compartirme de su experiencia en el laboratorio y en la vida. Geo, Luis, Paco y Alex son los mejores

compañeros de laboratorio que pude feliz, gracias por ser mas ameno cada día en el laboratorio, no importa lo pesado que fuera el día siempre que estuvieran ustedes sabía que me la iba a pasar bien. A todos los mencionados, **GRACIAS TOTALES.**

## TABLA DE CONTENIDO

| Sección   | Página    |
|---|-----------|
| <b>LISTA DE TABLAS.....</b>   | <b>8</b>  |
| <b>LISTA DE FIGURAS.....</b>  | <b>9</b>  |
| <b>NOMENCLATURA.....</b>  | <b>10</b> |
| <b>RESUMEN.....</b>   | <b>13</b> |
| <b>ABSTRACT.....</b>  | <b>14</b> |
| <b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>   | <b>15</b> |
| <b>2. ANTECEDENTES.....</b>   | <b>22</b> |
| 2.1. Ingeniería metabólica para la producción de ácido shikímico.....                                   | 22        |
| 2.2. ARN anti-sentido.....  | 25        |
| <b>3. HIPÓTESIS.....</b>  | <b>27</b> |
| <b>4. OBJETIVOS.....</b>  | <b>28</b> |
| 4.1. Objetivo general.....  | 28        |
| 4.2. Objetivos específicos.....   | 28        |
| <b>5. ESTRATEGIA GENERAL.....</b>   | <b>29</b> |
| <b>6. MÉTODOS.....</b>  | <b>30</b> |
| 6.1. Diseño del sistema ARNas-Hfq.....  | 30        |
| 6.2. Diseño y síntesis del casete de expresión.....   | 31        |
| 6.3. Transformación bacteriana.....   | 32        |
| 6.4. Digestión enzimática con <i>Bam</i> HI.....  | 33        |
| 6.5. Producción de ácido shikímico a nivel matraz en medio mínimo M9.....                               | 34        |
| 6.6. Cuantificación de azúcares reductores mediante el método de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS)..... | 35        |
| 6.7. Cuantificación de ácido shikímico mediante micro-colorimetría.....                                 | 36        |
| <b>7. RESULTADOS.....</b>   | <b>39</b> |
| 7.1. Casete de expresión del sistema ARNas-Hfq.....   | 39        |
| 7.2. Transformación bacteriana del plásmido pBR322-AS y selección de colonias transformadas.....        | 40        |
| 7.3. Adaptación del protocolo de cuantificación de ácido shikímico a microplacas...                     | 43        |
| 7.4. Producción de ácido shikímico a nivel matraz en medio mínimo M9.....                               | 44        |
| <b>8. DISCUSIÓN.....</b>  | <b>48</b> |
| 8.1. Diseño de asAroL y pBR322-AS.....  | 48        |

|            |  |           |
|------------|--|-----------|
| 8.2.       | Producción de ácido shikímico y control del flujo metabólico ..... | 49        |
| <b>9.</b>  | <b>CONCLUSIÓN</b> .....  | <b>52</b> |
| <b>10.</b> | <b>PERSPECTIVA</b> .....   | <b>53</b> |

## LISTA DE TABLAS

|  |    |
|--|----|
| Tabla 1. Cóctel de la digestión enzimática de pBR322-AS con <i>Bam</i> HI  | 36 |
| Tabla 2. Cóctel de la muestras de la curva de calibración de DNS   | 38 |
| Tabla 3. Instrucciones para preparar las muestras de la cuantificación de ácido shikímico con el protocolo original de Yoshida y Hasegawa (1957) | 39 |
| Tabla 4. Instrucciones para preparar las muestras de la cuantificación de ácido shikímico con el protocolo modificado                            | 40 |
| Tabla 5. Instrucciones para preparar las muestras de la curva de calibración de rango 5ug/mL a 35ug/mL de la cuantificación de ácido shikímico.  | 41 |
| Tabla 6. Instrucciones para preparar las muestras de la curva de calibración de rango 5ug/mL a 200ug/mL de la cuantificación de ácido shikímico. | 41 |
| Tabla 7. Resultados de la cuantificación mediante espectrofotometría UV-VIS de barrido espectral   | 46 |
| Tabla 8. Secuencias de unión a Hfq, porcentaje de represión y efectos <i>off-target</i> .  | 54 |



## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| Figura 1. Estrategias clásicas para regular el flujo metabólico.  | 16 |
| Figura 2. Alternativas para el control del flujo metabólico.  | 18 |
| Figura 3. Regulación por ARNas mediada por Hfq.   | 19 |
| Figura 4. Regulación de la reacción shikimato → shikimato-3-fosfato mediante ARNas mediado por Hfq  | 20 |
| Figura 5. Resumen de la estrategia implementada por Liu y colaboradores (2016) para la producción de ácido shikímico en <i>Escherichia coli</i> . | 22 |
| Figura 6. Resumen de la estrategia implementada por Gu y colaboradores (2016) para la producción de ácido shikímico en <i>Escherichia coli</i>    | 23 |
| Figura 7. Resumen de la estrategia implementada por Lee y colaboradores (2017) para la producción de ácido shikímico en <i>Escherichia coli</i>   | 24 |
| Figura 8. Estrategia general para el control del flujo metabólico en la producción de ácido shikímico en <i>Escherichia coli</i> JW5947-1         | 29 |
| Figura 9. Resultados del diseño de asAroL y pBR322  | 39 |
| Figura 10. Resultados del alineamiento local de la secuencia TBR con la herramienta en línea Nucleotide BLAST                                     | 40 |
| Figura 11. Resultados de la transformación bacteriana por electroporación.  | 41 |
| Figura 12. Extracción y caracterización de pBR322-AS.   | 42 |
| Figura 13. Curvas de calibración de la cuantificación de ácido shikímico por microcolorimetría.   | 44 |
| Figura 14. Cinéticas de crecimiento   | 45 |
| Figura 15. Producción de ácido shikímico.   | 46 |
| Figura 16. Consumo de azúcares reductores.  | 46 |
| Figura 17. Rendimiento en la producción de ácido shikímico  | 47 |

## NOMENCLATURA

|                |  |
|----------------|--|
| °C             | Grados Celsius   |
| 5'UTR          | Región no traducida en el extremo 5' del<br>ARN mensajero                |
| ARN            | Ácido ribonucleico   |
| ARNas          | Ácido ribonucleico anti-sentido  |
| ARNm           | Ácido ribonucleico mensajero   |
| <i>aroB</i>    | Gen que codifica para la 3-deshidroquinato sintasa                       |
| <i>aroD</i>    | Gen que codifica para la 3-deshidroquinato<br>deshidratasa               |
| <i>aroE</i>    | Gen que codifica para la shikimato deshidrogenasa                        |
| <i>aroG</i>    | Gen que codifica para la Fosfo-2-deshidro-3-<br>desoxiheptonato aldolasa |
| <i>aroK</i>    | Gen que codifica para la shikimato quinasa I                             |
| <i>aroL</i>    | Gen que codifica para la shikimato quinasa II                            |
| asAroL         | ARN anti-sentido dirigido al gen <i>aroL</i>                             |
| <i>dam</i>     | Gen que codifica para la ADN adenina metilasa                            |
| <i>damX</i>    | Gen que codifica para la proteína de división celular<br>DmaX            |
| <i>DHQ-SDH</i> | Gen que codifica para las enzimas DHQ sintasa y<br>las SHK quinasa       |
| DNS            | Ácido 3,5-dinitrosalicílico  |
| <i>E.coli</i>  | <i>Escherichia coli</i>  |
| <i>fabB</i>    | Gen que codifica para la 3-oxoacil- [proteína                            |

|                     |  |
|---------------------|--|
|                     | transportadora de acilo] sintasa 1   |
| <i>fabD</i>         | Gen que codifica para la malonil CoA-acil proteína transportadora transacilasa   |
| <i>fabF</i>         | Gen que codifica para la 3-oxoacil- [proteína transportadora de acilo] sintasa 1 |
| <i>fabH</i>         | Gen que codifica para la 3-oxoacil- [proteína transportadora de acilo] sintasa 3 |
| <i>galP</i>         | Gen que codifica para la Simportador de galactosa-protón                         |
| <i>glk</i>          | Gen que codifica para la glucoquinasa  |
| <i>gph</i>          | Gen que codifica para la fosfoglicolato fosfatasa                                |
| Hfq                 | Proteína chaperona de ARN  |
| HBS                 | Sitio de unión a Hfq   |
| L                   | Litros   |
| LB                  | caldo Luria-Bertani  |
| M                   | Molar  |
| mg                  | miligramos   |
| min                 | minutos  |
| mL                  | mililitros   |
| mm                  | milímetros   |
| mol                 | moles  |
| ng                  | nanogramos   |
| MicF M7.4           | Secuencia de unión a Hfq   |
| P <sub>BAD</sub>    | Promotor inducible por arabinosa   |
| P <sub>Ltet01</sub> | Promotor inducible por anhidrotetraciclina                                       |

|             |   |
|-------------|---|
| <i>ppsA</i> | Gen que codifica para la fosfoenol piruvato sintasa                             |
| <i>pta</i>  | Gen que codifica para la fosfato acetiltransferasa                              |
| <i>ptsG</i> | Gen que codifica para el componente EIICB específico de glucosa del sistema PTS |
| RBS         | Sitio de unión a ribosoma   |
| rpm         | Revoluciones por minuto   |
| <i>rpe</i>  | Gen que codifica para la ribulosa-fosfato 3-epimerasa                           |
| <i>rpsM</i> | Gen que codifica para la proteína ribosómica 30S S13                            |
| TBR         | Región de unión al gen diana  |
| <i>tktA</i> | Gen que codifica para la transcetolasa  |
| <i>tetR</i> | Regulador transcripcional de los genes de resistencia a tetraciclina            |
| <i>trpR</i> | Gen que codifica para la proteína reguladora del operón del triptófano          |
| <i>trpS</i> | Gen que codifica para la triptófano-tRNA ligasa                                 |
| ug          | Microgramos   |
| uL          | Microlitros   |
| UV-VIS      | Rango ultra violeta y luz visible   |
| V           | Volts   |

## RESUMEN

*Escherichia coli* es uno de los principales microorganismos productores de biomoléculas de interés industrial. Esto gracias al amplio conocimiento que se tiene de su genoma y las diferentes estrategias que se han desarrollado para su edición. Sin embargo, la producción de metabolitos intermediarios sigue siendo un reto para enfrentar. En este estudio exploramos el uso de de ARN anti-sentido mediado por la proteína chaperona Hfq para controlar el flujo metabólico de *E. coli* en la producción de ácido shikímico, el cual es un metabolito intermediario de la ruta de síntesis de aminoácidos aromáticos. Para esto, se diseñó un ARN anti-sentido que estaba compuesto por la secuencia MicF M7.4, la cual tiene afinidad a la proteína chaperona de ARN Hfq y la secuencia de unión al gen *aroL*. El ARN anti-sentido fue transformado en *E. coli* JW5947-1, la cual se caracteriza por ser *aroK* negativa, utilizando el vector de expresión pBR322 y el promotor P<sub>BAD</sub> para controlar la expresión de la secuencia. El uso del ARN antisentido dirigido al gen *aroL* en una cepa *aroK* negativa aumentó la producción total de ácido shikímico extracelular a nivel matraz a 12.86mg/L ( $\pm$  1.7mg/L) en comparación de la cepa wild-type que presentó una producción de 6.20 mg/L ( $\pm$  0.68mg/L). La cepa *E. coli* JW5947-1 pBR322-AS presentó un aumento en el rendimiento de la producción de ácido shikímico una vez inducida la expresión del ARN antisentido. Teniendo un rendimiento de 0.005 mol de ácido shikímico por cada mol de glucosa, a comparación de 0.0002 mol de ácido shikímico por cada mol de glucosa, rendimiento presente antes de la inducción. El cambio en el rendimiento después de la inducción nos sugiere que se logró controlar el flujo metabólico redirigiendo una parte de este a la producción de ácido shikímico.

## ABSTRACT

*Escherichia coli* is one of the most important microorganisms for the production of industrial interest biomolecules. This is because the extensive knowledge of its genome and the different tools that allow its edition. However, the production of intermediate metabolites is still a challenge. In this study we are tested the use of antisense RNA mediated by the chaperon protein Hfq in the production of extracellular shikimic acid in *E.coli*. The shikimic acid is an intermediate metabolite at the aromatic amino acid pathway. We designed an antisense RNA targeting to *aroL* gene. The asRNA it made up of two parts: the sequences MicF M7.4 that is the Hfq binding site and the target binding region. The asRNA will be transformed in *E. coli* JW5947-1 using the plasmid pBR322 and the promoter P<sub>BAD</sub> to controlling the asRNA expression. *E. coli* JW5947-1 is characterize by has deletion in *aroK*. The use of asRNA increasing the production of extracellular shikimic acid to 12.86mg/L ( ± 1.7mg/L) in comparison to the wild-type strain that only produce 6.20 mg/L ( ± 0.68mg/L) in the fermentation at flask level. Also, the yield increasing to 0.005 mol of shikimic acid for each mol of glucose after the induction of asRNA compared with the yield of 0.0002 mol of shikimic acid for each mol of glucose before the induction. The differences in the yield before and after induction suggests that the control of metabolic flux was successful.

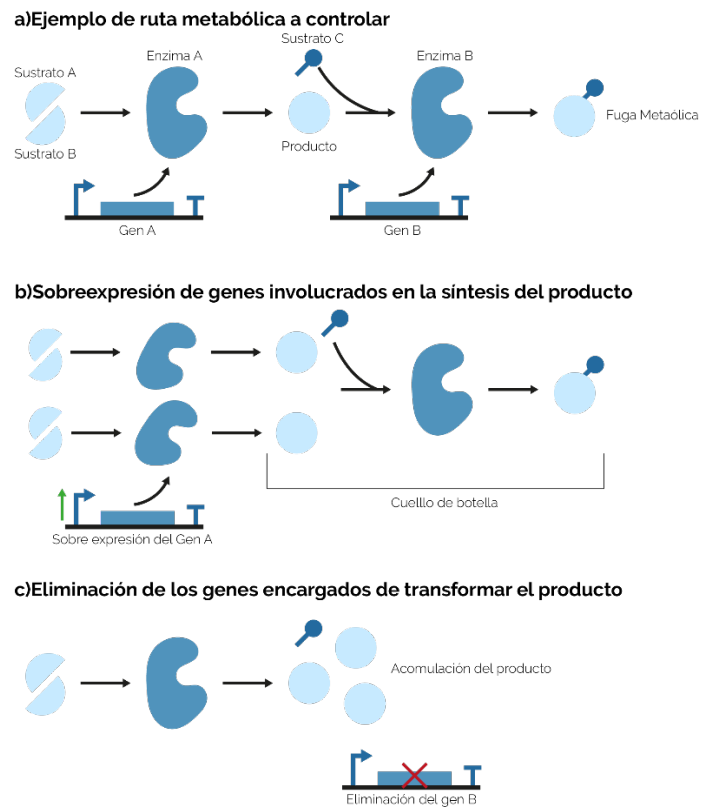
## 1. INTRODUCCIÓN

Uno de los principales microorganismos utilizados actualmente en la producción de biomoléculas de importancia farmacológica es *Escherichia coli*. Esta bacteria presenta un crecimiento rápido, tiene bajos costos de producción y posee un alto rendimiento (Baeshen et al., 2015). Sin embargo, cuando el producto de interés es un metabolito intermediario, o requiere de uno como precursor, es necesario la implementación de ingeniería metabólica para mejorar el rendimiento (He et al., 2015; Du et al., 2018; Martínez, Bolívar & Escalante, 2015).

Las técnicas clásicas de ingeniería metabólica involucran la adición, sobreexpresión y eliminación de genes (Figura 1). No obstante, se ha reportado que al realizar estas modificaciones se puede aumentar la carga metabólica del organismo, generando una disminución en el rendimiento y afectando las características que hacen a *E. coli* un organismo chasis ideal. (Stephanopoulos, 2012). Además, se pueden presentar grandes problemáticas si se llega a afectar un gen esencial para el crecimiento y desarrollo del organismo (Nakashima & Tamura, 2009).

Como alternativa a esto se ha propuesto sustituir los promotores nativos de los genes blanco por promotores regulables de manera exógena como se muestra en la Figura 2a.(Gu et al., 2016). Sin embargo, en muchos casos esto no es factible debido a la conformación en operones en la que se encuentran los genes procariontes, impidiendo la regulación exclusiva del gen de interés.

Otra alternativa es el uso de termómetros de ARN para controlar la traducción del gen de interés, como se muestra en la Figura 2b (Lerma-Escalera, 2016). Estos son secuencias en la región 5'UTR que a bajas temperaturas forman estructuras secundarias que impiden la unión del ribosoma con el sitio Shine-Dalgarno. Al aumentarse la temperatura estas estructuras secundarias se pierden permitiendo la traducción del ARNm (Nupert, Karcher & Bock, 2008). La desventaja del uso de estas estructuras radica en la necesidad de modificar regiones puntales del genoma, sin afectar a los genes colindantes, lo cual metodológicamente sigue siendo complicado.

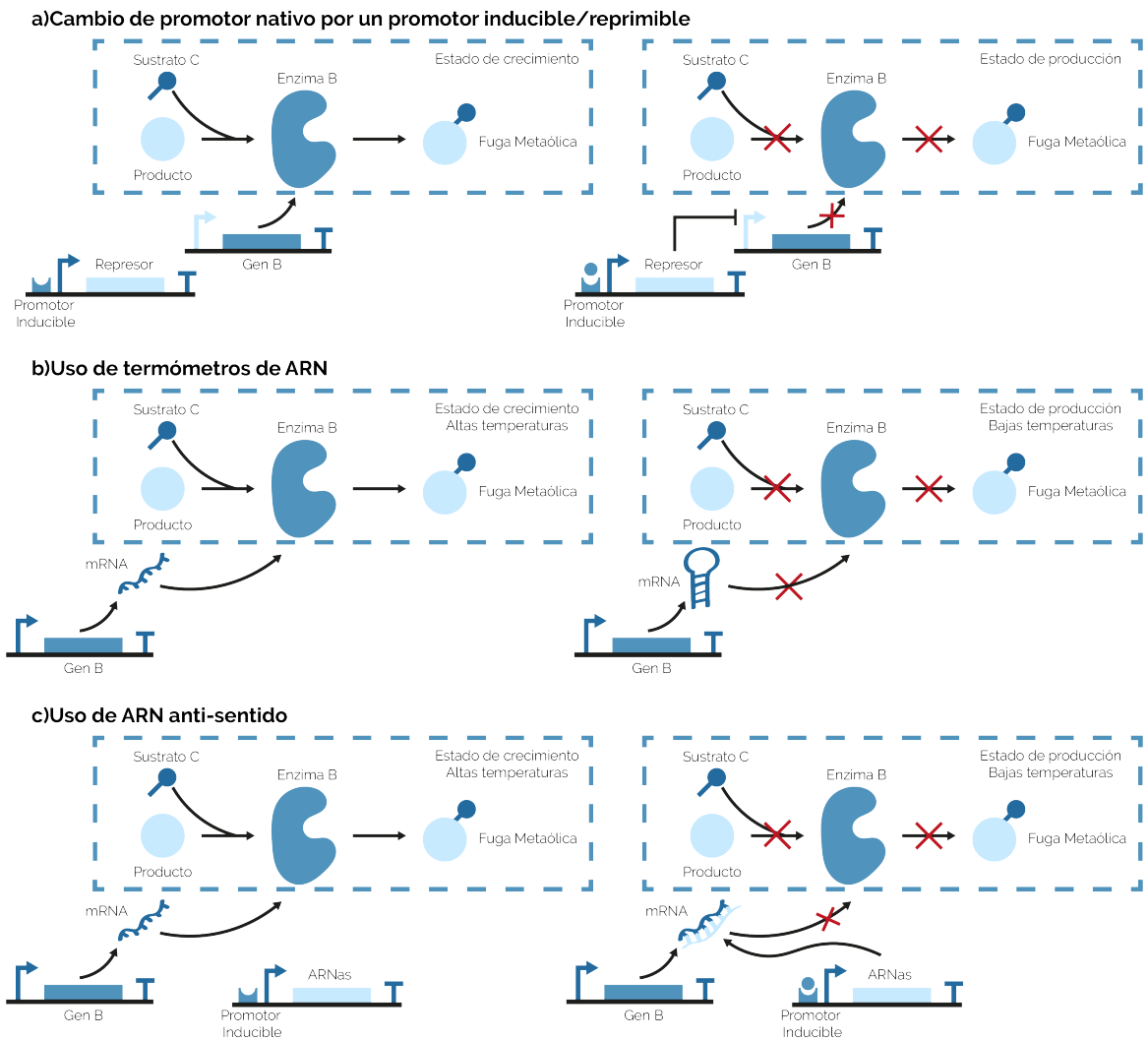


**Figura 1. Estrategias clásicas para regular el flujo metabólico.**a) **Ejemplo de ruta metabólica a controlar.** Se muestra el esquema de una ruta metabólica hipotética donde nuestro producto de interés industrial es sintetizado a partir del sustrato A y el sustrato B siendo la enzima A la catalizadora de esa reacción. A su vez el producto es modificado por el sustrato C y la enzima B, transformándolo en otro compuesto y convirtiéndose en una fuga metabólica. **b) Sobreexpresión de**



**los genes involucrados en la síntesis del producto.** En esta estrategia se sobre-expresa el gen A produciendo más enzima A por lo cual se aumenta la velocidad en la que el sustrato A y B se transforman en el producto; sin embargo, al tener la misma cantidad de enzima B el producto se transforma a la misma velocidad, provocando un cuello de botella donde se acumula el producto. **c) Eliminación de los genes encargados de transformar el producto.** En esta estrategia se elimina el gen B con la finalidad de que la bacteria no pueda producir la enzima B y de esta manera el producto no sea transformado y se pueda acumular para su posterior purificación.

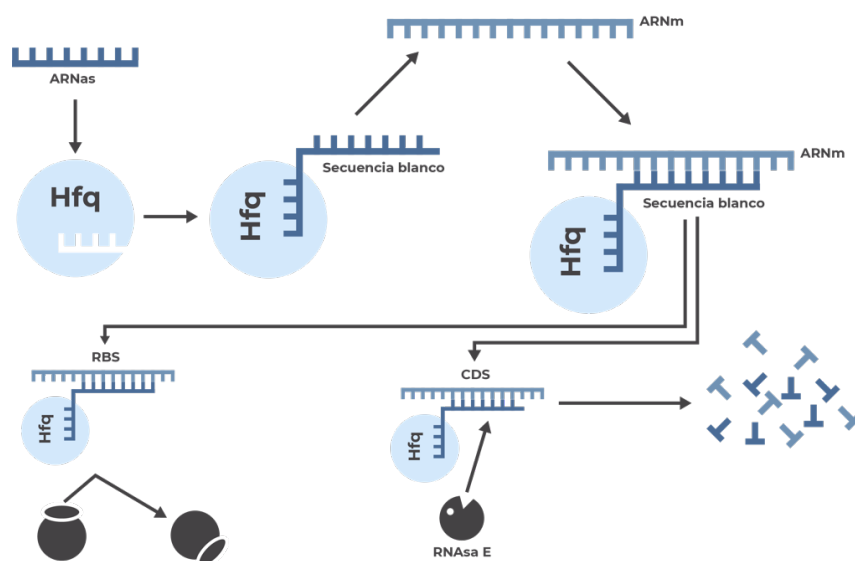
Ante estas desventajas se propone el uso de ARN anti-sentido para la regulación del flujo metabólico en *Escherichia coli* (Figura 2c). Los ARN anti-sentido (ARNas) son secuencias de ARN que regulan la traducción negativamente mediante dos principales mecanismos: el bloqueo de la formación del complejo ARN mensajero-ribosomas, mediante la unión del ARN anti sentido con el sitio de unión a ribosomas del ARN mensajero (ARNm) y la inducción de la degradación del ARNm al formar un ARN de doble cadena. Este método de regulación tiene la ventaja de ser capaz de regular en trans a un único gen, sin importar que se encuentre en un operón. (Sesto et al., 2013). Por lo tanto, se espera que permita regular el flujo metabólico sin necesidad de editar el genoma.



**Figura 2. Alternativas para el control del flujo metabólico.** Las estrategias alternas para el control del flujo metabólico consisten en crear dos estados, uno de crecimiento y otro de producción. El cambio entre estos estados se realiza mediante un estímulo químico o físico externo. **A) Cambio de promotor nativo por un promotor inducible/reprimible.** Esta estrategia consiste en cambiar el promotor nativo del gen que se desea regular (el cual generalmente es constitutivo) por un promotor sensible a un estímulo externo. Esta estrategia generalmente se complementa con el diseño de un circuito genético el cual nos permite que al no haber inductor la bacteria este en un estado de crecimiento expresando el gen con normalidad y posteriormente al agregar el inductor se deje expresar el gen rompiendo la ruta metabólica y generando una acumulación de producto. **c) Uso de termómetros de ARN.** Esta técnica consiste en sustituir el sitio de unión a ribosoma (RBS) por un termómetro de ARN con la finalidad de controlar el gen de interés mediante temperatura, de esta manera se puede llevar a cabo el estado de crecimiento a una temperatura alta (ejemplo 37°C) y cambiar la temperatura para inducir el estado de producción. **d) Uso de ARN antisentido.** Esta técnica consiste en regular de manera

trans la expresión del gen de interés mediante el uso de un ARN anti-sentido regulado por un promotor inducible que al estar en presencia del inductor produciría el ARNs el cual se uniría al mRNA del gen de interés impidiendo la traducción de éste, generando el cambio de un estado de crecimiento a un estado de producción.

Aunado a las ventajas que presenta el uso de ARN anti-sentido para la regulación de la expresión génica, se puede utilizar la proteína Hfq para mediar la interacción entre el ARNs y el ARNm como se muestra en la Figura 3. Hfq es una proteína chaperona nativa de *E. coli* que interactúa con pequeños RNA reguladores, dándole estabilidad y permitiendo la interacción entre ARN regulador – ARN diana. Esto mediante motivos de secuencias conservadas que posee la proteína y le permite formar complejos Hfq-ARNs (Møller *et al.*, 2002).

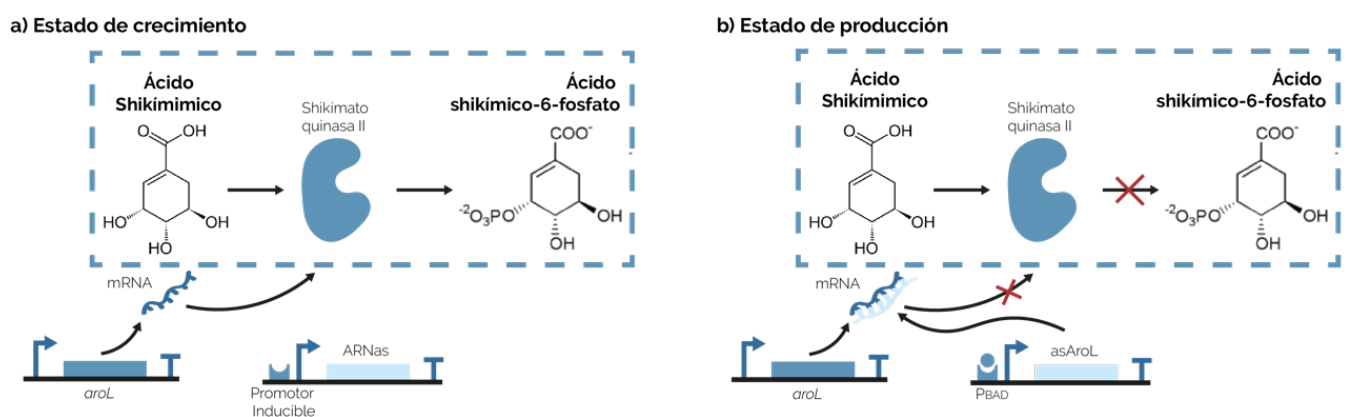


**Figura 3. Regulación por ARNs mediada por Hfq.** La regulación por ARNs mediada por Hfq consiste en la unión entre Hfq y el ARNs para brindarle protección y facilitar la unión con el ARNm. La unión ARNs-ARNm impedirá la traducción del ARNm impidiendo la unión RBS-Ribosoma o induciendo la degradación del ARN de doble cadena por RNAsas.

Los ARN anti-sentido tienen gran potencial para regular rutas metabólicas esenciales con la finalidad de producir biomoléculas de interés industrial. La ruta de los aminoácidos aromáticos es altamente estudiada debido a la gran variedad de metabolitos de interés industrial que se pueden producir a partir de esta (Averesch & Krömer, 2018). Entre ellos se encuentra el ácido shikímico, el cual es precursor del oseltamivir, uno de los principales fármacos para tratar la influenza.

En este proyecto se evaluará la capacidad de los ARN anti-sentido para controlar el flujo metabólico, con la finalidad de producir ácido shikímico extracelular. Para esto, se diseñará un ARN anti-sentido dirigido al gen *aroL* el cual junto con el gen *aroK* es responsable de transformar el shikimato en shikimato-3-fosfato.

Se transformará una cepa de *Escherichia coli* JW5947-1 con el plásmido pBR322-asAroL. El cual contará con el promotor P<sub>BAD</sub> regulando la expresión de un ARNas dirigido al gen *aroL*. La cepa a usar se caracteriza por ser *aroK* negativa, por lo cual al inducir la producción del ARNas se bloqueará la reacción shikimato → shikimato-3-fosfato, provocando la acumulación del shikimato (Figura 4).



**Figura 4. Regulación de la reacción shikimato a shikimato-6-fosfato mediante ARNs mediado por Hfq. a) Estado de crecimiento.** En el estado de crecimiento no se expresará *asAroL* por lo cual la shikimato quinasa II se expresará con normalidad y el ácido

shikímico se transformará en ácido shikímico-6-fosfato, lo que permitirá a *E.coli* crecer con normalidad. **b) Estado de producción.** Se inducirá la expresión de asAroL el cual impedirá la traducción del gen *aroL* evitando la transformación del ácido shikímico provocando su acumulación

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Ingeniería metabólica para la producción de ácido shikímico.

La importancia tanto clínica como industrial del ácido shikímico ha generado múltiples estudios en los que se busca producir este metabolito en *Escherichia coli*. En estos estudios se presentan diferentes estrategias de ingeniería metabólica. Liu y colaboradores (2016) integraron los genes *aroG*, *aroB*, *tktA*, *aroB*, *glk*, *galP* (en el operón del fosfoenol piruvato) y *ppsA* (en el operón de la tirosina) en la cepa de *Escherichia coli* BW25113 la cual no tiene los genes *aroL* y *aroK* (Figura 5). Sin embargo, la ausencia de los genes *aroL* y *aroK* causa una dependencia de la presencia de aminoácidos aromáticos en el medio (Gu et al., 2016).

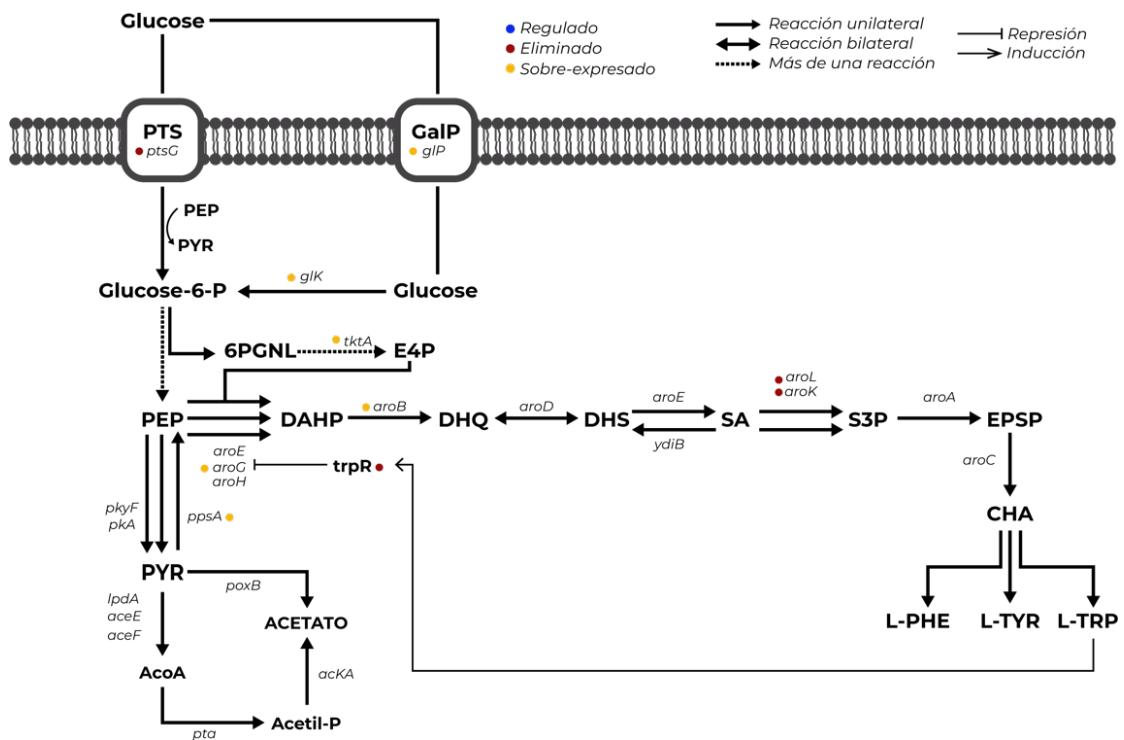


Figura 5. Resumen de la estrategia implementada por Liu y colaboradores (2016) para la producción de ácido shikímico en *Escherichia coli*.

Ante esta desventaja, Gu y colaboradores (2016) crearon un circuito genético para controlar la expresión de *aroK*. Para esto, sustituyeron el promotor nativo de este gen por el promotor P<sub>LtetO1</sub> el cual se regula negativamente ante *tetR*. A su vez, *tetR* es regulado por el promotor P<sub>BAD</sub>, el cual es activado por arabinosa. De esta manera *aroK* es reprimida indirectamente al agregar arabinosa al medio. Además, se eliminaron los genes *pta*, *ptsG*, *aroL*, *trpR* y *pkyF*. Fueron clonados en el plásmido pUC19 los genes *aroE*, *aroD* y *aroB* para su sobreexpresión. Sin embargo, en el genoma *aroK* se encuentra en operón por lo cual, al sustituir su promotor nativo también se afecta los genes *aroB*, *damX*, *dam*, *rpe*, *gph* y *trpS* los cuales, con excepción de *aroB*, están involucrados en otros procesos celulares (Figura 6).

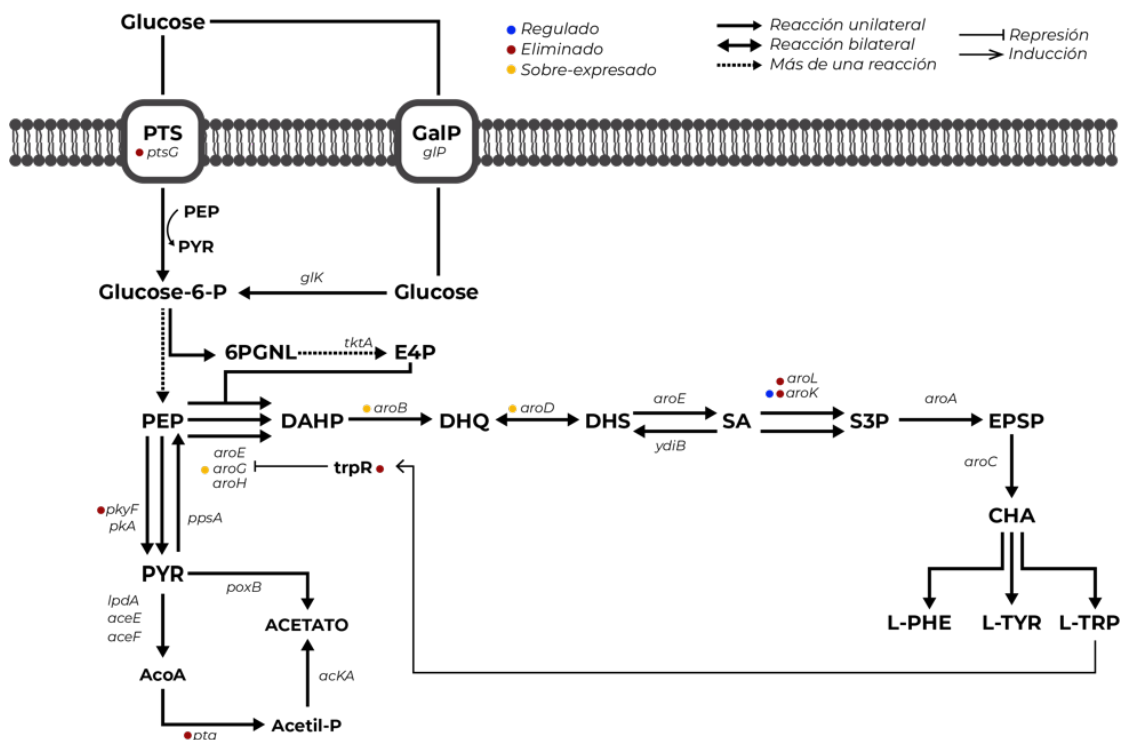


Figura 6. Resumen de la estrategia implementada por Gu y colaboradores (2016) para la producción de ácido shikímico en *Escherichia coli*

Lerma (2016), propuso el uso de los termómetros de ARN para controlar mediante cambios de temperatura la expresión de *aroL* en la cepa de *Escherichia coli* *JW5947-1* la cual no tiene el gen *aroK*. Como resultado, logró producir tres veces más ácido shikímico en comparación de la cepa chasis. Para esto, sustituyó el gen *aroL* presente en el genoma, por una nueva versión que contenía un termómetro de ARN en el lugar del sitio de unión a ribosoma. Si bien este enfoque es innovador, cuenta con la desventaja que se tiene que sustituir en el genoma cada gen que se desea regular cuidando no afectar a genes aledaños.

Lee y colaboradores (2017) expresaron, en un plásmido, el gen *DHQ-SDH* proveniente de *Populus trichocarpa* (una planta leñosa) y el gen *aroK* el cual se encontraba regulado por el promotor *rpsM*. Dicho promotor es inactivado al estar en presencia de estrés nutricional. Para esto usaron la cepa de *Escherichia coli* *SK4/rpsM* la cual no tiene los genes *aroL* y *aroK*, además los genes *aroB*, *aroG*, *ppsA* y *tktA* se encuentran sobre-expresados. La desventaja de este enfoque se centra en la necesidad del uso de antibióticos, para mantener estable el plásmido que contiene el gen de interés (Figura 7).



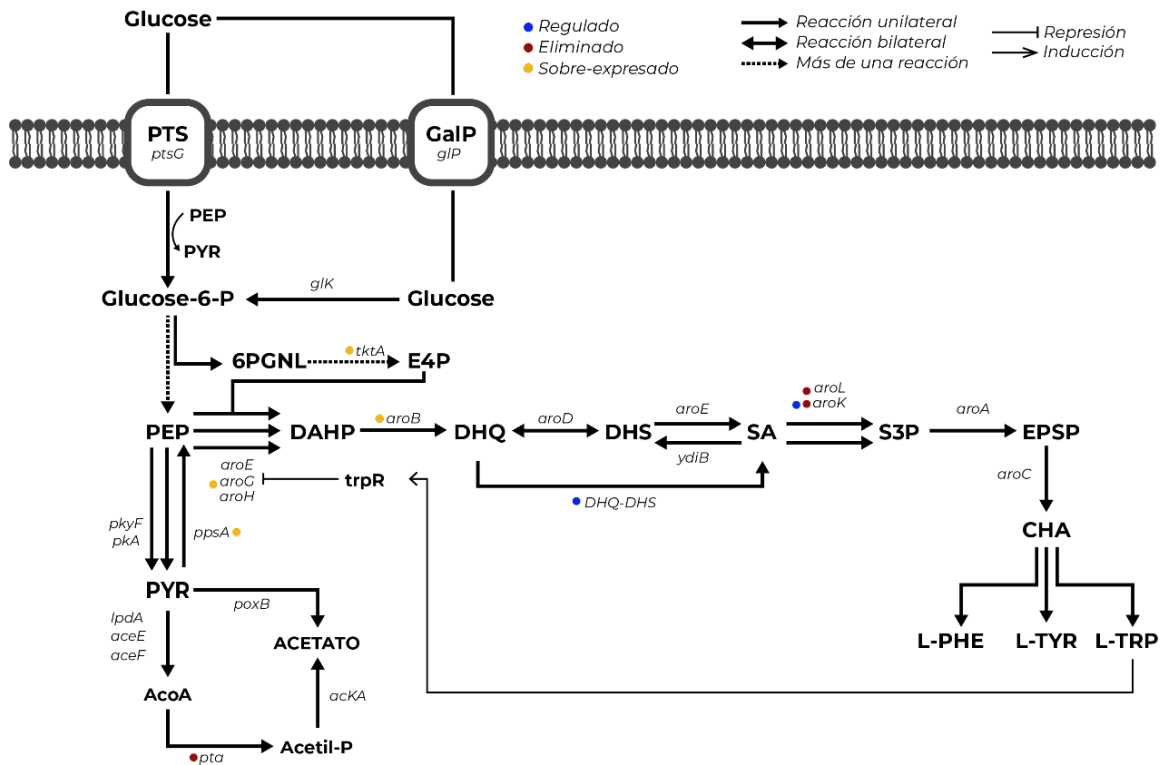


Figura 7. Resumen de la estrategia implementada por Lee y colaboradores (2017) para la producción de ácido shikímico en *Escherichia coli*

## 2.2. ARN anti-sentido.

Tummala, y colaboradores (2003) diseñaron ARN anti-sentidos para regular la enzima acetoacetato descarboxilasa (AADC) y la coenzima A-transferasa (CoAT) en *Clostridium acetobutylicum* con la finalidad de disminuir la producción de acetato. Los ARN anti-sentido lograron regular de manera negativa la expresión de *AADC* y *CoAT*. Sin embargo, solamente la regulación negativa de *CoAT* provocó una disminución en la producción de acetato.

Solomon y colaboradores (2012) crearon un circuito genético en el cual se regulaba la expresión de ARNs anti-sentido que reprimían la expresión de la

glucoquinasa. Como resultado lograron aumentar el rendimiento de la glucólisis y se disminuyó la cantidad de carbono que se convierte en acetato.

Yang y colaboradores (2015) emplearon ARN anti-sentido para regular condicionalmente la biosíntesis de ácidos grasos y lograr el enriquecimiento de malonil-CoA en *Escherichia coli*. Lograron un aumento de cinco veces la concentración intracelular de malonil-CoA gracias a la inhibición del gen *fabD*. Además, se logró mejorar la producción de 4-hidroxicumarina al ser regulados los genes *fabH*, *fabB* y *fabF* mediante los ARN anti-sentido.

Debido a las variaciones en el diseño de termómetros de ARN en los proyectos anteriores Hoynes-O'Connor y Moon (2016) analizaron diferentes características secuenciales y estructurales de los ARN anti-sentido. Ellos estudiaron el comportamiento de diferentes sitios de unión a Hfq, la termodinámica de la formación del complejo ARN anti-sentido-ARN mensajero y el porcentaje de desajuste requerido para el diseño de la región diana de anclaje. En base a estos estudios se elaboraron las condiciones óptimas para el diseño de los ARN anti-sentido.

### 3. HIPÓTESIS

El uso de un ARN anti-sentido mediado por la proteína chaperona Hfq y dirigido al gen *aroL* permitirá el control del flujo metabólico en la producción de ácido shikímico en *E. coli* JW5947-1.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo general

Controlar el flujo metabólico mediante la expresión de un ARN anti-sentido mediado por la proteína chaperona Hfq y dirigido al gen *aroL* en la producción de ácido shikímico en *E. coli* JW5947-1.

### 4.2. Objetivos específicos

- Diseñar un ARN anti-sentido dirigido a *aroL*.
- Diseñar el casete de expresión que contará con los ARNs anti-sentido diseñados.
- Transformar el casete de expresión en *Escherichia coli* JW5947-1.
- Comprobar que la concentración de inductor y la hora de inducción reportada en la literatura funcione en nuestro sistema.
- Producir y cuantificar ácido shikímico en medio M9 a nivel matraz.
- Determinar el rendimiento de ácido shikímico producido en comparación con la glucosa consumida.

## 5. ESTRATEGIA GENERAL

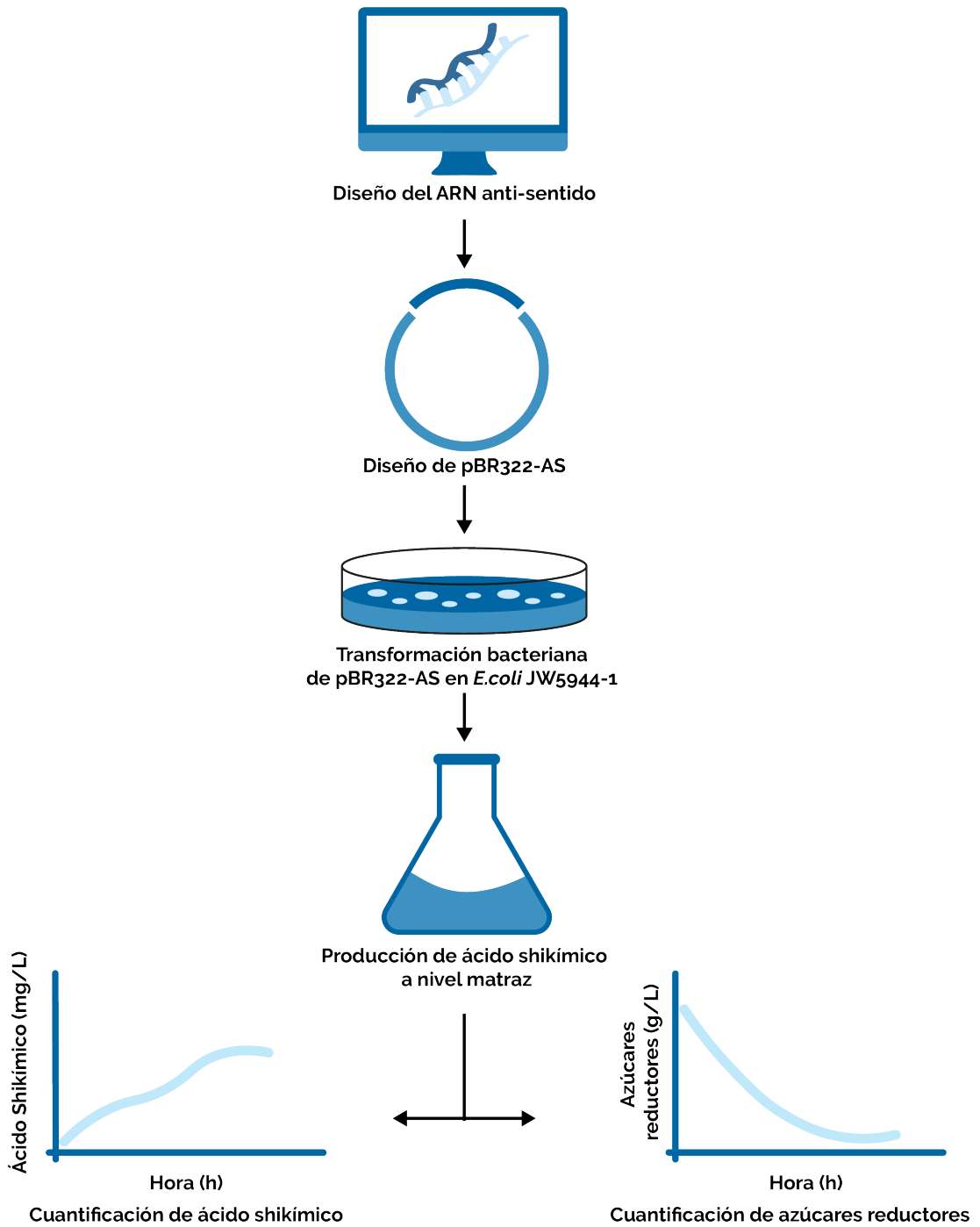


Figura 8. Estrategia general para el control del flujo metabólico en la producción de ácido shikímico en *Escherichia coli* JW5947-1

## 6. MÉTODOS

### 6.1. Diseño del sistema ARNas-Hfq

Para llevar a cabo la represión traduccional del gen *aroL* mediante el sistema ARNas-Hfq se diseñó el ARN anti-sentido asAroL, el cual está compuesto de dos partes: HBS (*Hfq binding site*) y TBR (*target binding region*). El HBS se comprende de una secuencia nucleotídica que se hibrida con los motivos conservados de Hfq permitiendo la unión entre la proteína chaperona y el ARNas. Tanto el nivel de represión como los efectos *off-target* de los ARNas están relacionados con la secuencia de HBS, en este proyecto se utilizó como criterio de selección la secuencia con menor efectos *off-target*, usando los resultados reportados por Hoynes-O'Connor y Moon (2016) como referencia.

Por otro lado, para diseñar el TBR, es necesario primero seleccionar el mecanismo de acción del ARNas, debido a la relación existente entre la región del ARNm al que se dirige el TBR con el mecanismo de acción. En este proyecto seleccionamos el bloqueo del complejo sitio de unión a ribosoma (RBS)-ribosoma como mecanismo de acción, por lo cual el TBR estará dirigido a esta región.

El TBR fue diseñado siguiendo el protocolo propuesto por Hoynes-O'Connor y Moon (2016). El TBR fue dirigido a la región 5' UTR del ARNm, el RBS y los primeros ocho codones de la secuencia, cubriendo con exactitud toda esta secuencia y con una longitud de mayor a los 15 nucleótidos.

Para obtener la secuencia del gen *aroL* primero se determinaron las cepas parentales de nuestra bacteria. Posteriormente se utilizó la plataforma en línea KEGG para determinar la secuencia del gen *aroL* y los 100 nucleótidos río abajo próximos a esta. Posteriormente se utilizó la plataforma en línea Ecocyc para encontrar la secuencia correspondiente al promotor nativo del gen de *aroL* de esta manera delimitar la región 5'UTR del ARNm. Por último, se utilizó la herramienta en línea Clustal W para realizar el alineamiento entre la región 5'UTR con la secuencia consenso del RBS ( 5'-AGGAGG – 3' ), para encontrar la secuencia correspondiente al RBS de nuestro gen. Durante este proceso se usó el programa en línea Benchling para realizar la anotación del gen. Finalmente, una vez diseñado el TBR, se usó el programa en línea Blast, para buscar similitudes de nuestra secuencia en el genoma de *E.coli* MG1655 lo cual nos podría indicar posibles efectos *off-target*.

## **6.2. Diseño y síntesis del casete de expresión**

Para el diseño del casete de expresión se usó la plataforma en línea Benchling que sirvió para armar la secuencia final que se envió a sintetizar. El casete, está compuesto por el promotor inducible por arabinosa P<sub>BAD</sub>, el cual se encuentra regulando la expresión de nuestro ARNs asAroL y esta flanqueado por el terminador T-BBa\_B106 al inicio y al final del casete. La secuencia final fue enviada a sintetizar a la casa comercial Biobasic, con las indicaciones de que fuera clonada en el plásmido pBR322 en el sitio de restricción de *EcoRI*. El plásmido fue nombrado pBR322-AS. Una vez recibido, el plásmido fue resuspendido en 200uL de agua ultra pura, para obtener una concentración final de 20ng/uL y fue almacenado a -20°C

### 6.3. Transformación bacteriana

El plásmido pBR322-AS fue transformado en *E. coli* JW5947-1 mediante electroporación siguiendo el protocolo de Sambrook, Fritsch y Maniatis (2012). Para la preparación de las bacterias electrocompetentes se inocularon 100uL de cultivo *overnight* de *E. coli* JW5947-1 en 4.9mL de caldo Luria-Bertani (LB) a 37°C durante 1 hora 30 minutos. Posteriormente se transfirió 1mL a tubos de plástico de 1.5mL y se hicieron lavados con agua ultra pura centrifugando a 9000rpm durante 2 minutos, retirando el sobrenadante y agregando 1mL de agua ultra pura estéril. Finalmente se realizó una última centrifugación a las mismas condiciones, pero resuspendiendo con 35uL de agua ultra pura estéril. Para la electroporación, se agregaron 1uL del vector pBR322-AS (con una concentración de 20ng/uL). Posteriormente, se transfirió el volumen total a una celda de electroporación con un gap de 2mm y se sometió a choque eléctrico a 2500V. Las células transformadas se transfirieron a un tubo de plástico de 1.5mL estéril, se les agregó 1mL de caldo LB y se dejaron incubando a 37°C durante 1h sin antibiótico. Por último, se plaquearon los cultivos en cajas Petri con Agar LB al 2% y se dejaron incubar toda la noche a 37°C. Las cajas Petri donde se sembró *E. coli* JW5947-1 transformada con el plásmido pBR322-AS contaban con los antibióticos ampicilina (0.05mg/mL), kanamicina (0.05mg/mL) y tetraciclina (0.015mg/mL). Mientras que el control solo contaba con el antibiótico kanamicina (0.05mg/mL).

De las placas con *E. coli* JW5947-1 pBR322-AS se seleccionaron 10 colonias y se inocularon en tubos de plástico con 5mL de caldo LB con ampicilina (0.05mg/mL), kanamicina (0.05mg/mL) y tetraciclina (0.015mg/mL) y se incubaron a 37°C con una agitación de 900rpm durante toda la noche. Posteriormente se seleccionó un cultivo al azar y se inocularon 100uL del cultivo en 4900uL de caldo LB con los



antibióticos antes mencionados y se dejó incubar dos horas a 37°C con una agitación de 900rpm. De ese cultivo se realizó una extracción de ADN plasmídico mediante el kit “*QuickClean II Plasmid Miniprep*”, de la casa comercial GenScript. Del DNA resultante se utilizaron 2uL para su cuantificación mediante espectrofotometría UV-VIS de barrido espectral con una abertura de 7mm. Para analizar la integridad del DNA plasmídico se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, se aplicaron 3uL de muestra.

#### 6.4. Digestión enzimática con *Bam*HI

Para confirmar que el plásmido transformado corresponda a pBR322-AS se realizó una digestión enzimática con *Bam*HI de la empresa Jena Biosciences, siguiendo el protocolo establecido por la empresa. El cóctel de la reacción se muestra en la Tabla 1. La totalidad de la reacción se corrió en un gel de electroforesis con una concentración de 1% de agarosa. Además, en el primer carril del gel se agregaron 3uL del marcador de peso molecular “*100-5000bp DNA Marker Plus, Ready-to-use*” de la empresa Bio Basic. A la par se realizó un corte enzimático *in silico* usando el programa en línea Benchling para determinar el tamaño de las bandas resultantes al realizar la digestión con la enzima *Bam*HI.

**Tabla 1. Cóctel de la digestión enzimática de pBR322-AS con *Bam*HI**

| Reactivo             | Concentración | Volumen (uL) |
|----------------------|---------------|--------------|
| Buffer Universal 10X | 10X           | 1uL          |
| DNA pBR322-AS        | 20ng/uL       | 8uL          |
| <i>Bam</i> HI        | 10u/uL        | 1uL          |

### 6.5. Producción de ácido shikímico a nivel matraz en medio mínimo M9

La producción de ácido shikímico a nivel matraz se realizó de acuerdo con la metodología de Escalante y colaboradores (2010) con algunas modificaciones. Antes de la producción se inocularon en matraces de 500mL, 100uL de *E. coli* JW5947-1 y *E. coli* JW5947-1 pBR322-AS en 50mL de medio mínimo M9 y se incubaron a 37°C con agitación de 300rpm durante toda la noche. El cultivo de *E. coli* JW5947-1 fue suplementado con kanamicina al 0.05mg/mL, mientras que al cultivo de *E. coli* JW5947-1 pBR322-AS se le agregó tetraciclina al 0.015mg/mL. Este proceso se repitió durante tres días, tomando el cultivo de la noche anterior como pre-inóculo, esto con el objetivo de adaptar la bacteria al medio mínimo.

Del último cultivo *overnight* se tomó 1mL de cada cepa para medir la densidad óptica mediante espectrofotometría UV-VIS a 600nm. Posteriormente se inocularon nuevos matraces de 500mL con 50mL de medio mínimo M9 ajustando la densidad óptica a 0.1 OD<sub>600nm</sub> con los antibióticos correspondientes a cada cepa. Para cada cepa se inocularon 3 matraces, donde cada uno correspondía a una repetición. Los matraces fueron incubados a 37°C con una agitación de 300rpm durante 12h, tomando una muestra de 1mL de cultivo cada 3h. En la hora 3 se realizó la inducción del promotor P<sub>BAD</sub> en los matraces con la cepa *E. coli* JW5947-1 pBR322-AS agregando 50uL de L-arabinosa 1M. Se analizó la densidad óptica mediante espectrofotometría UV-VIS de cada una de las muestras apenas fueran tomadas. Posteriormente se centrifugaron a 9,000rpm durante 5 min a 4°C y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo. El sobrenadante fue utilizado para cuantificar consumo de azúcares reductores y producción de ácido shikímico.

### 6.6. Cuantificación de azúcares reductores mediante el método de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS)

La cuantificación de azúcares reductores se realizó siguiendo el protocolo del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) reportado por Goncalves y colaboradores (2010). Para efectuar la cuantificación, primero se realizó una curva de calibración, con la finalidad de obtener la relación entre la densidad óptica a 540nm de las muestras con la concentración de azúcares reductores. Para esto se prepararon diferentes estándares de glucosa siguiendo las indicaciones de la Tabla 2 partiendo de un stock de 4mg/mL de glucosa. En seguida se calentaron los estándares a 95°C durante 5min. Posteriormente se agregaron 250uL de agua fría y se midieron los 300uL de reacción mediante espectrofotometría UV-VIS a 540nm. Para la cuantificación de la glucosa consumida durante la producción de ácido shikímico se siguió el mismo protocolo, con la modificación que la muestra estaba compuesta de 25uL del sobrenadante obtenido de la producción y 25uL de DNS.

**Tabla 2. Instrucciones para preparar los estándares de la curva de calibración de DNS**

| Estándar | Glucosa total (µg) | Vol. de stock de glucosa (µl) | Vol. H <sub>2</sub> O (µl) | Vol. DNS(µl) |
|----------|--------------------|-------------------------------|----------------------------|--------------|
| No. 1    | 100                | 25                            | 0                          | 25           |
| No. 2    | 90                 | 22.5                          | 2.5                        | 25           |
| No. 3    | 80                 | 20                            | 5                          | 25           |
| No. 4    | 70                 | 17.5                          | 7.5                        | 25           |
| No. 5    | 60                 | 15                            | 10                         | 25           |
| No. 6    | 50                 | 12.5                          | 12.5                       | 25           |
| No. 7    | 40                 | 10                            | 15                         | 25           |
| No. 8    | 30                 | 7.5                           | 17.5                       | 25           |
| No. 9    | 20                 | 5                             | 20                         | 25           |

|        |    |     |      |    |
|--------|----|-----|------|----|
| No. 10 | 10 | 2.5 | 22.5 | 25 |
| No. 11 | 0  | 0   | 25   | 25 |

### 6.7. Cuantificación de ácido shikímico mediante micro-colorimetría

La cuantificación de ácido shikímico se realizó con base en el protocolo publicado por Yoshida y Hasegawa (1957) y se le realizaron las adaptaciones pertinentes para su medición en microplaca de 96 pozos. La adaptación a microplaca de 96 pozos, se llevó a cabo reduciendo en 90% los volúmenes requeridos de cada reactivo en la reacción. Para comprobar que los cambios en el protocolo no afectarían la linealidad de la reacción se realizaron dos curvas de calibración, la primera con el protocolo original y la segunda con las adaptaciones. Los estándares para la curva de calibración se prepararon siguiendo las indicaciones de la Tabla 3 para el protocolo original y la Tabla.4 para el protocolo modificado.

**Tabla 3. Instrucciones para preparar los estándares de la cuantificación de ácido shikímico con el protocolo original de Yoshida y Hasegawa (1957)**

| Estándar | Concentración ác. shikímico ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) | Volumen de stock de ácido shikímico de $2000\mu\text{g}/\text{mL}$ ( $\mu\text{l}$ ) | Volumen $\text{H}_2\text{O}$ ( $\mu\text{l}$ ) |
|----------|---|--|--|
| No. 1    | 200   | 300  | 2700   |
| No. 2    | 160   | 240  | 2760   |
| No. 3    | 120   | 180  | 2820   |
| No. 4    | 80  | 120  | 2880   |
| No. 5    | 40  | 60   | 2940   |

**Tabla 4. Instrucciones para preparar los estándares de la cuantificación de ácido shikímico con el protocolo modificado**

| Estándar | Concentración ác. shikímico ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) | Volumen de stock de ácido shikímico de 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ( $\mu\text{l}$ ) | Volumen $\text{H}_2\text{O}$ ( $\mu\text{l}$ ) |
|----------|---|---|--|
| No. 1    | 200   | 30  | 270  |
| No. 2    | 160   | 24  | 276  |
| No. 3    | 120   | 18  | 282  |
| No. 4    | 80  | 12  | 288  |
| No. 5    | 40  | 6   | 294  |

La cuantificación de ácido shikímico consiste en agregar 1 volumen de peryodato a la muestra a analizar e incubar a 30°C durante 15min, posteriormente añadir 1 volumen de etiniliglicol e incubar a 30°C durante 5min, por último, agregar solución de 1 volumen de anilina y dejar incubar 5min a temperatura ambiente. Para parar la reacción se agrega 5 volúmenes de etanol al 95% y se agita. Después de este proceso la muestra cambia de incolora a un color rojizo, donde la intensidad del color depende de la cantidad de ácido shikímico. Las muestras fueron cuantificadas mediante espectrofotometría UV-VIS a 510nm.

Una vez comprobada la conservación de la linealidad en el protocolo modificado se analizó el límite mínimo de detección en el cual la técnica conservara su linealidad. Los estándares para esta segunda curva de calibración se prepararon siguiendo las indicaciones de la Tabla 5. Por último, conociendo el límite mínimo de detección se realizó una curva de calibración combinando los puntos de las dos curvas anteriores. Esta curva fue la que se utilizó al momento de analizar las muestras obtenidas de la producción a nivel matraz. Los estándares para la tercera curva de

calibración se prepararon siguiendo las indicaciones de la Tabla 6. Por último, fueron analizadas las muestras obtenidas de la producción de ácido shikímico a nivel matraz siguiendo el protocolo modificado. Los datos obtenidos fueron analizados mediante un análisis estadístico tipo t de student en el programa GraphPad Prims 9.

**Tabla 5. Instrucciones para preparar los estándares de la curva de calibración de rango 5ug/mL a 35ug/mL para la cuantificación de ácido shikímico.**

| Estándar | Concentración ác. shikímico ( $\mu\text{g/mL}$ ) | Volumen de stock de ácido shikímico de 200ug/mL ( $\mu\text{l}$ ) | Volumen H <sub>2</sub> O ( $\mu\text{l}$ ) |
|----------|--|---|--|
| No. 1    | 35   | 52.5  | 247.5                                      |
| No. 2    | 25   | 37.5  | 262.5                                      |
| No. 3    | 15   | 22.5  | 277.5                                      |
| No. 4    | 5  | 7.5   | 292.5                                      |

**Tabla 6. Instrucciones para preparar los estándares de la curva de calibración de rango 5ug/mL a 200ug/mL para la cuantificación de ácido shikímico.**

| Estándar | Concentración ác. shikímico ( $\mu\text{g/mL}$ ) | Volumen de stock de ácido shikímico de 2000ug/mL ( $\mu\text{l}$ ) | Volumen H <sub>2</sub> O ( $\mu\text{l}$ ) |
|----------|--|--|--|
| No. 1    | 200  | 30   | 270  |
| No. 2    | 130  | 19.5   | 280.5                                      |
| No. 3    | 65   | 9.75   | 290.25                                     |
| No. 4    | 5  | 7.5*   | 292.5                                      |

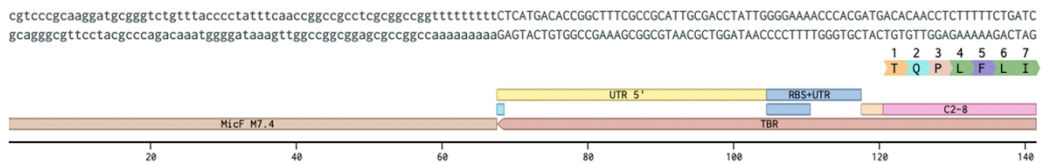
\* Los estándares se prepararon con un stock de 200ug/mL en lugar de 2000ug/mL.

## 7. RESULTADOS

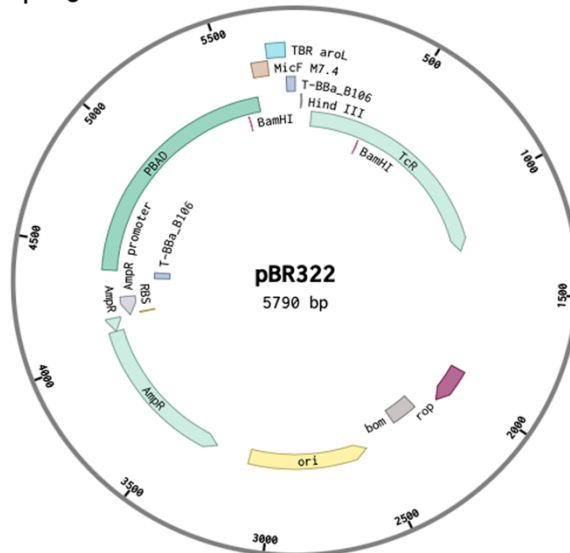
### 7.1. Casete de expresión del sistema ARNas-Hfq

Se diseñó el ARN anti-sentido asAroL con el objetivo de reprimir la traducción del gen *aroL*. asAroL está compuesto de dos partes: HBS y TBR. HBS se comprende de la secuencia MicF M7.4 la cual permitirá la unión de asAroL con la proteína chaperona Hfq. TBR se comprende del reverso complementario de la región 5'UTR del mRNA del gen *aroL* el RBS y los primeros ocho nucleótidos del gen (Figura 9).

#### a) ARN anti-sentido asAroL



#### b) Vector de expresión pBR322-AS



**Figura 9. Resultados del diseño de asAroL y pBR322** a) ARN anti-sentido asAroL. Esquematación de asAroL, la secuencia HBS electa, la región TBR diseñada, y las secciones del ARNm a las que va dirigida el TBR. b) Vector de expresión pBR322-AS. Esquematación del resultado final del vector de expresión pBR322-As el cual cuenta con el casete de expresión diseñado,

la resistencia a tetraciclina y ampicilina que forman parte del vector pBR322 así como el origen de replicación de bajas copias del mismo vector.

Una vez diseñado asAroL se realizó un alineamiento local de la secuencia TBR con la herramienta en línea *Nucleotide BLAST* marcando la opción de organismo *Escherichia coli* MG1655. Se obtuvieron 12 secuencias con una identidad del 100% a nuestra secuencia, sin embargo, al examinarlas estas correspondían al gen *aroL* de diferentes secuenciaciones o subcepas (Figura 10).

The screenshot shows the 'Sequences producing significant alignments' section of a BLAST search. It lists 12 sequences, all with a Max Score of 137, Total Score of 137, Query Cover of 100%, E value of 8e-33, and Per. Ident of 100.00%. The sequences are primarily from *Escherichia coli* MG1655 and related strains, as well as synthetic constructs.

| Description   | Max Score | Total Score | Query Cover | E value | Per. Ident | Accession                  |
|---|-----------|-------------|-------------|---------|------------|----------------------------|
| <input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655 chromosome, complete genome</a>             | 137       | 137         | 100%        | 8e-33   | 100.00%    | <a href="#">CP032867.1</a> |
| <input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655 strain K-12 chromosome</a>                  | 137       | 137         | 100%        | 8e-33   | 100.00%    | <a href="#">CP027060.1</a> |
| <input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655 strain K-12 chromosome, complete genome</a> | 137       | 137         | 100%        | 8e-33   | 100.00%    | <a href="#">CP028268.1</a> |
| <input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655 strain JW5437-1, complete genome</a>        | 137       | 137         | 100%        | 8e-33   | 100.00%    | <a href="#">CP014348.1</a> |
| <input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655, complete genome</a>                        | 137       | 137         | 100%        | 8e-33   | 100.00%    | <a href="#">CP014225.1</a> |
| <input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655, complete genome</a>                        | 137       | 137         | 100%        | 8e-33   | 100.00%    | <a href="#">CP012868.1</a> |
| <input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Synthetic Escherichia coli C321.deltaA substrain rEc.b.dC.12, complete sequence</a>   | 137       | 137         | 100%        | 8e-33   | 100.00%    | <a href="#">CP010456.1</a> |
| <input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Synthetic Escherichia coli C321.deltaA substrain rEc.y.dC.46, complete sequence</a>   | 137       | 137         | 100%        | 8e-33   | 100.00%    | <a href="#">CP010455.1</a> |
| <input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655, complete genome</a>                        | 137       | 137         | 100%        | 8e-33   | 100.00%    | <a href="#">CP009685.1</a> |
| <input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Synthetic Escherichia coli C321.deltaA, complete sequence</a>                         | 137       | 137         | 100%        | 8e-33   | 100.00%    | <a href="#">CP006998.1</a> |
| <input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655, complete genome</a>                        | 137       | 137         | 100%        | 8e-33   | 100.00%    | <a href="#">U00096.3</a>   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Escherichia coli chromosome minutes 6-8</a>   | 137       | 137         | 100%        | 8e-33   | 100.00%    | <a href="#">U73857.1</a>   |

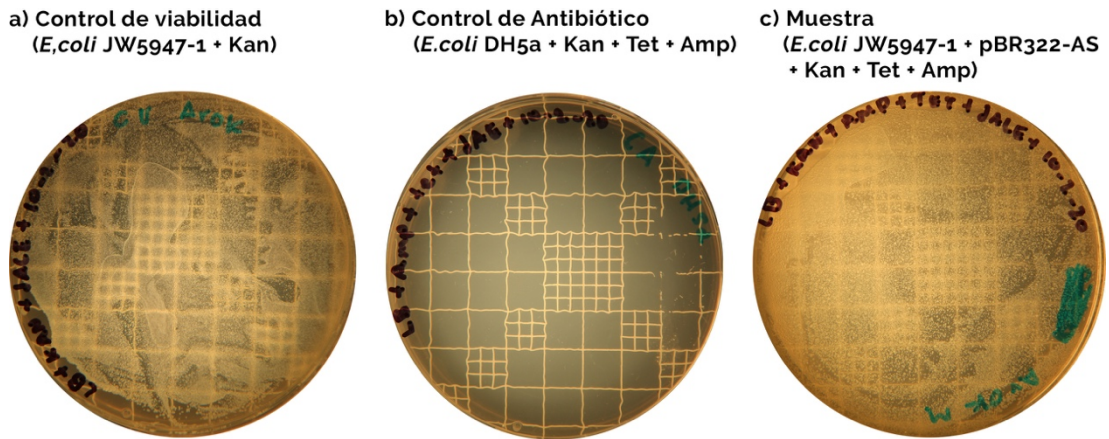
**Figura 10. Resultados del alineamiento local de la secuencia TBR con la herramienta en línea Nucleotide BLAST**

## 7.2. Transformación bacteriana del plásmido pBR322-AS y selección de colonias transformadas

Para la transformación del plásmido pBR322-AS en *E. coli* JW5947-1 se realizó el protocolo de transformación mediante electroporación. De dicho experimento se obtuvo un número incontable de colonias transformadas. De igual manera el control de viabilidad resultó positivo al presentar un número incontable de



colonias mientras que el control de antibióticos no presentó ningún crecimiento (Figura 11).



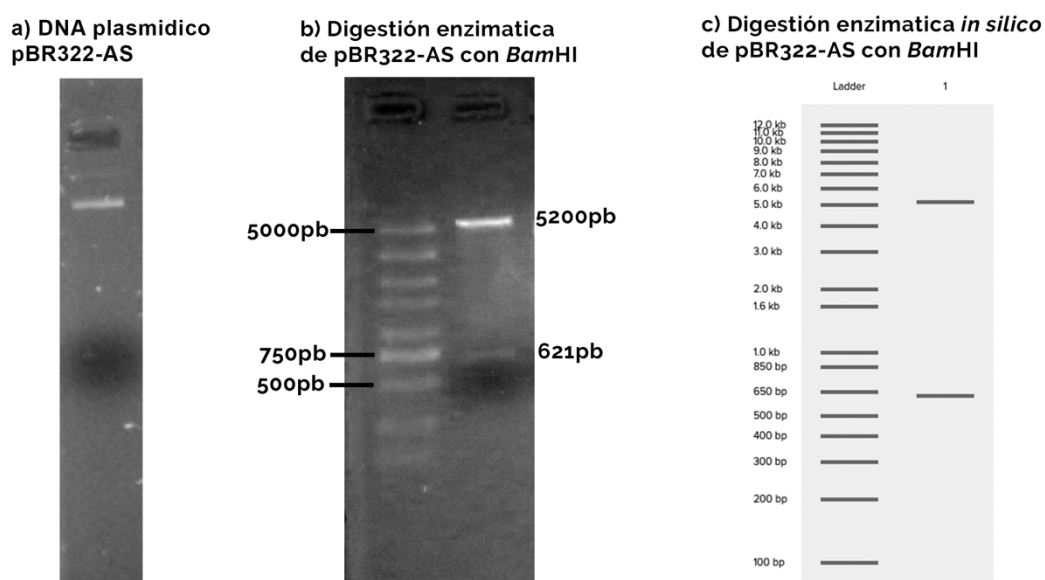
**Figura 11. Resultados de la transformación bacteriana por electroporación. a) Control de viabilidad.** El control de viabilidad corresponde a la cepa *E. coli* JW5947-1 resistente a kanamicina, inoculada en una placa de agar LB al 2% con 0.05mg/mL de kanamicina. **b) Control de antibióticos.** El control de antibióticos se comprende de una placa de agar LB al 2% con 0.05mg/mL de kanamicina, 0.05mg/mL de ampicilina y 0.015mg/mL de tetraciclina. En esta placa fue inoculada *E. coli* DH5a la cual es sensible a estos antibióticos. **c) Muestra.** La muestra se comprende de una placa de agar LB al 2% con 0.05mg/mL de kanamicina, 0.05mg/mL de ampicilina y 0.015mg/mL de tetraciclina en la cual fue inoculada *E. coli* JW5947-1 transformada con el plásmido pBR322-AS.

De la placa con bacterias transformadas se seleccionaron 10 colonias y se cultivaron en medio LB, de esas colonias se eligió una al azar y se realizó una extracción de ADN plasmídico. De la extracción de ADN plasmídico se obtuvieron 20 uL del plásmido a una concentración de 22.15ng/uL (tabla 6) y se observó su integridad en un gel de agarosa al 0.8% (Figura 12.a).

**Tabla 7. Resultados de la cuantificación mediante espectrofotometría UV-VIS de barrido espectral.**

| No. De Muestra | Concentración (ng/uL) | OD 260/280 | OD 260/230 |
|----------------|-----------------------|------------|------------|
| No. 1          | 22.15                 | 2.01       | 2.05       |

Para comprobar que el plásmido transformado es pBR322-AS, se realizó una digestión enzimática con *Bam*HI y se obtuvieron dos bandas una de aproximadamente 5000pb y otra entre las bandas de 500pb y 750pb. Una digestión enzimática *in silico* previa en la plataforma en línea Benchling nos indicó que el resultado del corte enzimático pBR322-AS con *Bam*HI son dos bandas una de 5200pb y otra de 621pb. Además, los sitios de restricción de *Bam*HI se encuentran en el plásmido PBAD y en el gen de resistencia a tetraciclina. Por lo cual, podemos asegurar que el plásmido transformado es pBR322-AS.



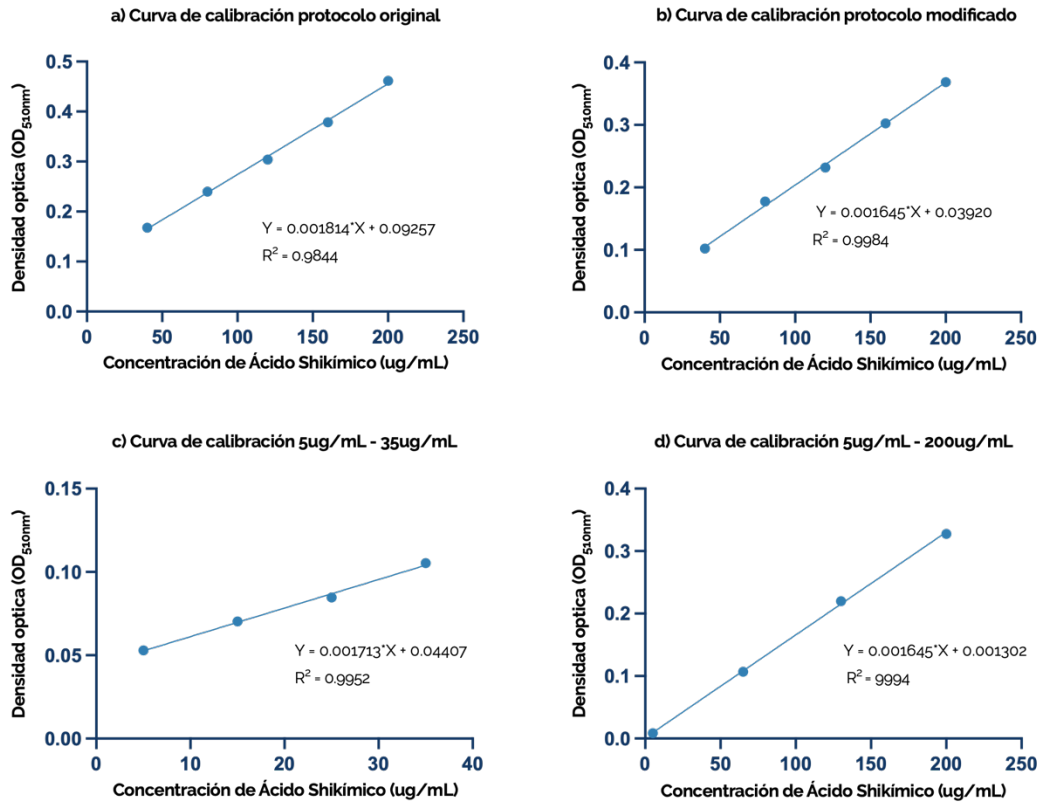
**Figura 12. Extracción y caracterización de pBR322-AS. a) DNA plasmídico pBR322-AS.** Gel de agarosa al 0.08% donde se corrieron 3uL de la extracción plasmídica de las colonias transformadas con pBR322-As. b) Digestión enzimática de pBR322-As con *Bam*HI. Gel de agarosa al 0.1% donde en el primer carril se corrieron 3uL del marcador de peso molecular “100-5000bp DNA

*Marker Plus, Ready-to-use*” y en el carril dos 10uL de la digestión de pBR322-AS con *Bam*HI. c) Digestión enzimática *in silico* de pBR322-AS. Gel de agarosa virtual. En el primer carril se observa un marcador de peso molecular mientras que en el segundo carril los fragmentos esperados de la digestión de pBR322-AS con *Bam*HI.

### **7.3. Adaptación del protocolo de cuantificación de ácido shikímico a microplacas**

Se adaptó el protocolo de cuantificación de ácido shikímico por microcolorimetría publicado por Yoshida y Hasegawa (1957) con la finalidad de poder procesar un alto número de muestras. Se realizaron dos curvas de calibración, una con el protocolo original y otra con el protocolo modificado, con el objetivo de garantizar que los cambios hechos en el protocolo no afectaran la linealidad de la técnica. La linealidad no resultó afectada al modificarse el protocolo obteniendo una  $R^2$  de 0.9844 en el protocolo original y de 0.9984 en el protocolo modificado (Figura 12 a y b).

Una vez comprobada la linealidad en el protocolo modificado se realizó una segunda curva de calibración donde se probaron concentraciones de ácido shikímico inferiores a 40ug/mL buscando el límite de detección inferior de la técnica. Se obtuvo una linealidad entre las concentraciones 5ug/mL – 35ug/mL de ácido shikímico con una  $R^2$  de 0.9952 (Figura 12 c). Por último, se hizo una curva de calibración con concentraciones de 5ug/mL a 200ug/mL y se obtuvo una  $R^2$  de 0.9994.



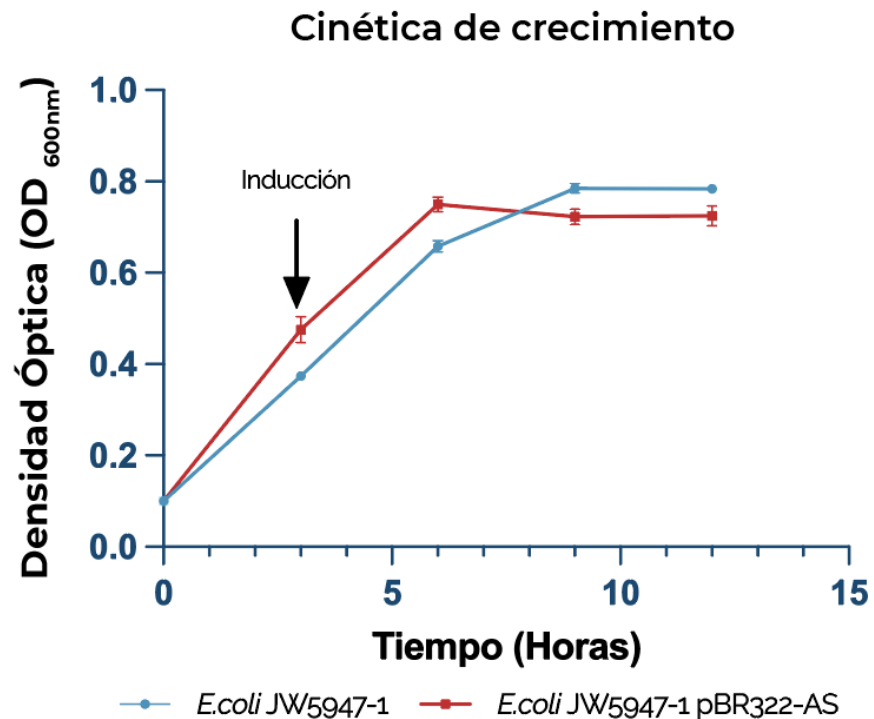
**Figura 13. Curvas de calibración de la cuantificación de ácido shikímico por microcolorimetría. a) Curva de calibración protocolo original.** Curva de calibración con un rango de 40ug/mL a 200ug/mL siguiendo el protocolo original de Yoshida y Hasegawa (1957). **b) Curva de calibración protocolo modificado.** Curva de calibración con un rango de 40ug/mL a 200ug/mL siguiendo el protocolo de Yoshida y Hasegawa (1957) con la modificación de una reducción del 90% en el volumen requerido de cada reactivo, **c) Curva de calibración 5ug/mL – 35ug/mL.** Curva de calibración con un rango de 5ug/mL a 35ug/mL realizado con el protocolo modificado. **d) Curva de calibración 5ug/mL a 200ug/mL.** Curva de calibración con un rango de 5ug a 100ug de glucosa total, realizado con el protocolo original.

#### 7.4. Producción de ácido shikímico a nivel matraz en medio mínimo M9

La producción de ácido shikímico se realizó a nivel matraz durante 12 horas a una temperatura de 37°C con una agitación de 300rpm con un muestreo cada 3 horas. Durante este proceso se monitoreó el crecimiento bacteriano, la producción de ácido

shikímico extracelular y el consumo de azúcares reductores. Cabe destacar que a la hora 3 de la cinética se llevó a cabo la inducción de la expresión del ARN antisentido asAroL.

*E. coli* JW5947-1 pBR322-AS llegó a fase estacionaria a la hora 6 de producción. De igual manera, presentó su punto máximo de producción de ácido shikímico extracelular ( $12.86\text{mg/L} \pm 1.7\text{mg/L}$ ) y consumió la mayoría de azúcares reductores a la hora 6. Por otro lado, *E. coli* JW5947-1 llegó a fase estacionaria y consumió la mayoría de los azúcares reductores hasta la hora 9. La producción máxima de ácido shikímico de esta cepa se obtuvo después de 12 horas de producción.



**Figura 14. Cinéticas de crecimiento.** Existe diferencia estadísticamente significativa entre las muestras, con excepción de la hora 0. ( $p < 0.05$ )

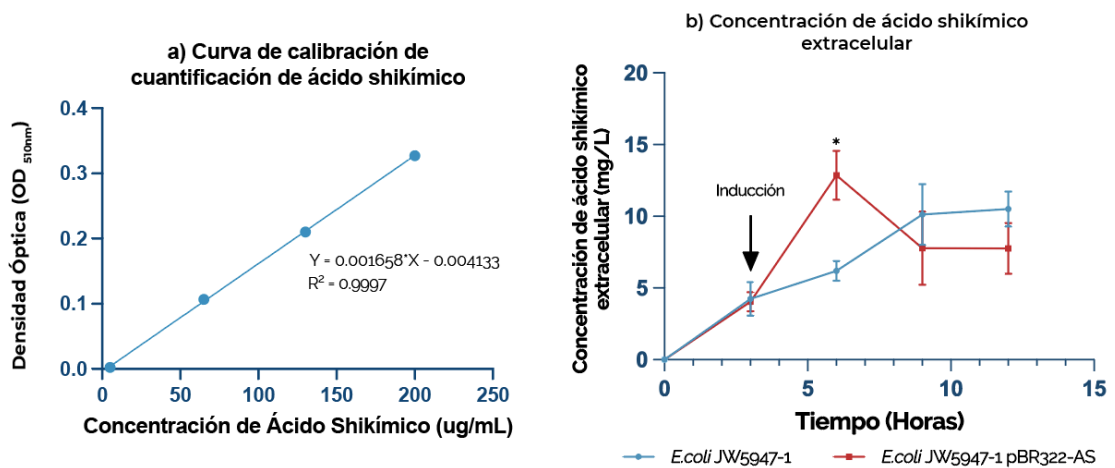


Figura 15. Cuantificación de concentración de ácido shikímico extracelular a) Curva de calibración de la cuantificación de ácido shikímico. b) Cinética de concentración de ácido shikímico extracelular. \*: existe diferencia estadísticamente significativa entre las muestras. ( $p < 0.05$ )

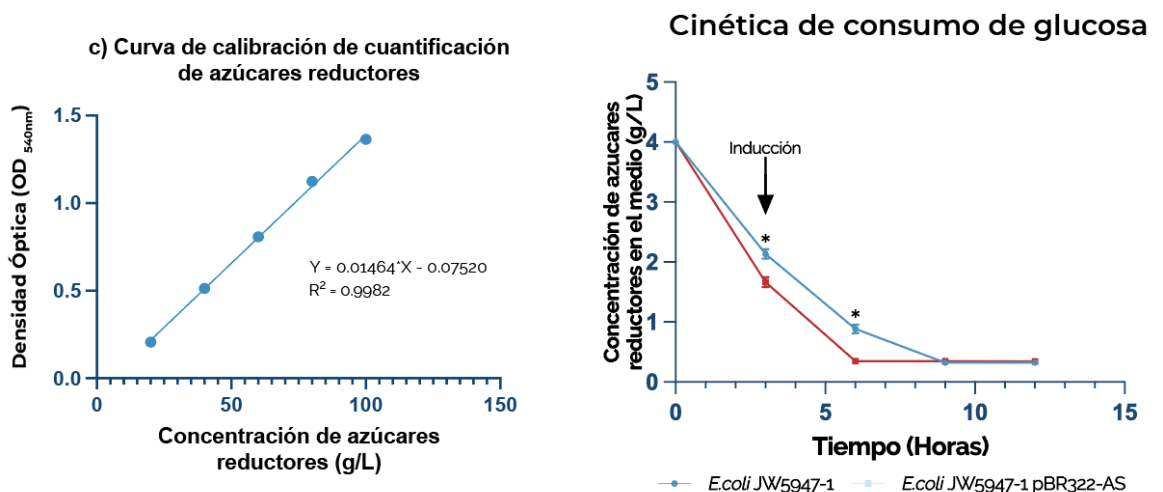


Figura 16. Cuantificación de azúcares reductores a) Curva de calibración de la cuantificación de azúcares reductores. b) Cinética de consumo de azúcares reductores. \*: existe diferencia estadísticamente significativa entre las muestras. ( $p < 0.05$ )

Se calculó el rendimiento de ácido shikímico extracelular producido con respecto a la glucosa consumida dividiendo la concentración de ácido shikímico extracelular entre el azúcar consumido. *E. coli* JW5947-1-AS presento una

concentración de ácido shikímico extracelular de  $12.86\text{mg/L} \pm 1.7\text{mg/L}$  a las 6 horas de producción, lo cual representa un incremento estadísticamente significativo con respecto a la cepa wild-type. (*E.coli* JW5947-1) que presentó una concentración  $6.20\text{mg/L} \pm 0.68\text{mg/L}$  de ácido shikímico extracelular. De igual manera se presentó un cambio en el rendimiento de *E.coli* JW5947-1 pBR322-AS de  $0.0829\text{mg/g}$  a  $0.1571\text{mg/g}$  después de la inducción de asAroL. El rendimiento de *E.coli* JW5947-1 pBR322-AS entre la hora 3 y la hora 6 es mayor estadísticamente significativo con respecto al rendimiento de *E.coli* JW5947-1 en el mismo lapso (Figura 17).

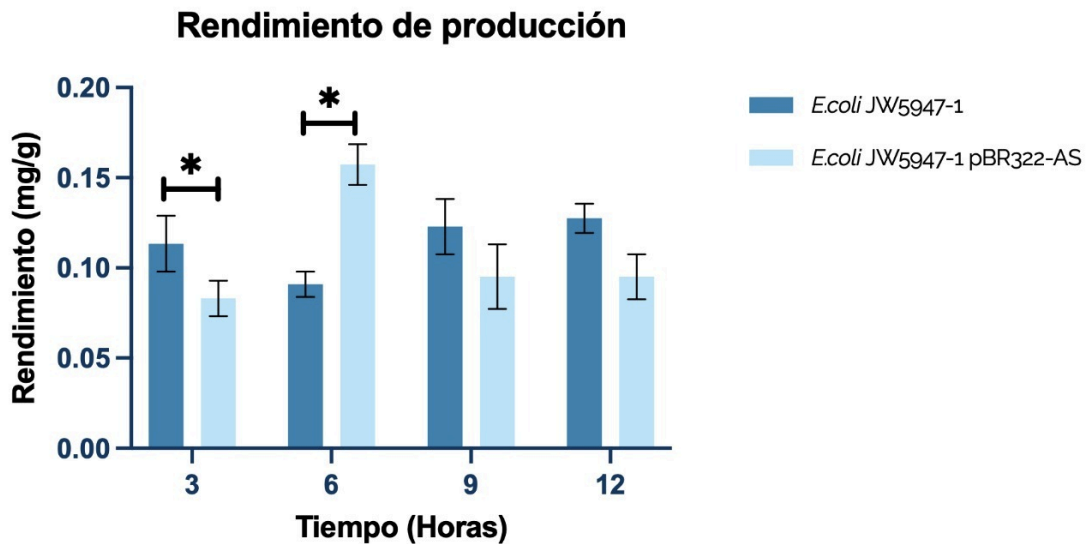


Figura 15. rendimiento en la producción de ácido \*: existe diferencia estadísticamente significativa entre las muestras. ( $p < 0.05$ )

## 8. DISCUSIÓN

### 8.1. Diseño de asAroL y pBR322-AS

En esta tesis se usó un ARN anti-sentido para controlar el flujo metabólico en la producción de ácido shikímico, el diseño de asAroL y pBR322-AS fue parte fundamental para lograr este objetivo. Se seleccionó que asAroL fuera mediado por la proteína Hfq la cual brinda de protección al ARN anti-sentido al formar estructuras monoméricas en forma de anillo en ausencia de un ARNm diana (Møller *et al.*, 2002). Se han reportado múltiples casos en los cuales Hfq funciona como cofactor para formar complejos ARN anti-sentido con el ARNm diana en procesos fisiológicos de *E. coli*. Un ejemplo es la regulación de proteínas inducidas por peróxido de hidrógeno reguladas por pequeños ARN de regulación (Zhang *et al.*, 1998). Para lograr la interacción entre asAroL con Hfq se le agregó al ARN anti-sentido una secuencia de unión a Hfq. Existen diferentes secuencias de unión a Hfq las cuales están fuertemente relacionada con el porcentaje de represión y los efectos *off-target* (tabla 8). Se eligió MicF M7.4 como la secuencia de unión a Hfq debido a los bajos efectos *off-target* que genera (Hoynes-O'Connor & Moon, 2016).

| HBS       | Represión | Efectos <i>off-target</i> |
|-----------|-----------|---------------------------|
| Spot42    | 76.9%     | +++++                     |
| MicC      | 67.2%     | +++                       |
| MicF      | 71.6%     | ++                        |
| MicF M7.4 | 69.8%     | +                         |
| SgrS      | 43.7%     | NA                        |

Tabla 8. Secuencias de unión a Hfq, porcentaje de represión y efectos *off-target*.



Por otro parte, la región que se une a la secuencia blanco (también llamada TBR) de *asAroL* está compuesta por el reverso complementario de la región 5'UTR, el RBS y los primeros ocho codones del ARNm de *aroL*. Esta región también es conocida como región iniciadora de la traducción (TIR por sus siglas en inglés *translation initiation region*), al unirse el ARN anti-sentido a esta región se impide la unión entre el ribosoma y el RBS. Se conoce que este mecanismo de inhibición de la traducción es altamente efectivo. Na y colaboradores (2013) usaron dicho mecanismo para diseñar pequeños ARNs regulatorios dirigidos a *murE* aumentando un 55% la producción de cadaverina en *E. coli*. Yoo y colaboradores (2013) diseñaron un protocolo por el cual pequeños ARNs regulatorios dirigidos a la sección TIR podrían ser utilizados para el estudio de ingeniería metabólica y los efectos de la eliminación de genes de interés en la fisiología celular.

## **8.2. Producción de ácido shikímico y control del flujo metabólico**

La capacidad de *asAroL* para controlar el flujo metabólico se analizó mediante la producción de ácido shikímico en *E. coli* JW5947-1 pBR322-AS en un ensayo a nivel matraz. Los resultados mostraron un cambio en el rendimiento de producción después de la inducción de *asAroL*. Este cambio puede ser causado por el bloqueo de *aroL* en una cepa *aroK* negativa. Gu y colaboradores (2016) presentaron un incremento en la acumulación de ácido shikímico después de la inducción de su circuito genético que reprimía la expresión de *aroK* en una cepa *aroL* negativa.

La producción final de ácido shikímico producido por *E. coli* JW5947-1 pBR322-AS (12.86mg/L  $\pm$  1.7mg/L) parece menor comparado con los trabajos reportados por Liu y colaboradores (2016) y Gu y colaboradores. Esto se debe en parte, a que estos trabajos no solo se enfocaron en el bloqueo de la reacción shikimato --> shikimato-6-fosfato, si no en la sobre expresión de diversos genes como: *aroG*, *aroB*, *tktA*, *aroE*, *glP*, *glK* y *ppsA*. Además, el medio de cultivo utilizado para la fermentación y la densidad óptica alcanzada juegan un rol importante en la producción total. Liu y colaboradores (2016) reportan una producción total de ácido shikímico a nivel matraz de 4.14g/L sin embargo la densidad óptica alcanzada es de 12 OD<sub>600nm</sub> mientras que Gu y colaboradores (2016) presentaron una producción total de 1.73 g/L de ácido shikímico en un ensayo a nivel matraz. Sin embargo, Lema (2016) reporto una producción de 6 mg/L al modificar los mismos genes y realizar su producción en el mismo medio que nosotros. Estas comparaciones destacan la importancia de usar un medio óptimo para la producción.

Sin embargo, además del incremento en la producción de ácido shikímico en comparación a la cepa silvestre *E.coli* JW5947-1 pBR322-AS presento otras ventajas. Por un lado, la cepa diseñada no presentó auxotrofia a comparación de la cepa reportada por Liu y colaboradores (2015). Este grupo de investigación dentro de las modificaciones a nivel genómico realizadas a *E.coli* eliminaron los genes *aroK* y *aroL* impidiendo a este organismo producir aminoácidos aromáticos. Lo cual, consecuentemente provocó la necesidad de adicionar dichos nutrientes al medio. En contraste, en la producción realizada en este trabajo se utilizó medio mínimo M9 el cual carece de aminoácido aromáticos. La diferencia entre ambas cepas radica principalmente en que, si bien ambas tienen eliminados el gen de *aroK*, en *E.coli*

JW59-47-1 pBR322-AS el gen de *aroL* se expresa con normalidad hasta que se induce la expresión del ARNas. Esto permite que en la primera etapa de la producción se produzcan los aminoácidos necesarios para que *E.coli* crezca sin la necesidad de añadir más al medio.

Otra ventaja presente es la selección del gen *aroL* para regular la reacción ácido shikímico a ácido shikímico-6-fosfato, en comparación de Gu y colaboradores (2016) quienes seleccionaron el gen *aroK*. El gen *aroL* tiene mayor afinidad por el ácido shikímico, por lo cual permite la transformación de este con una mayor velocidad, esto nos permitió que durante la etapa de crecimiento de produjera la suficiente cantidad de aminoácidos aromáticos de tal forma que no afectará su crecimiento y esto lo podemos corroborar al momento de comparar la OD máxima alcanzada en comparación a la de la cepa silvestre.

El uso de ARNas también trajo ventajas metodológicas, esto debido a que no fue requerido editar ninguna zona específica del genoma como lo reporta Lerma (2016) el cual para controlar el gen de *aroL* que sustituyó el RBS del gen mencionado anteriormente por el termómetro de ARN utilizado. Sin embargo, al no integrar el ARNas al genoma nos trajo como desventaja la necesidad de antibióticos para la producción del ácido shikímico. Sin embargo, en posteriores investigaciones este ARNas puede integrarse a una zona conocida y altamente reportada del genoma como lo es el operón de lactosa. Esto es gracias a que la regulación del ARNas es tipo *trans* y no requiere de estar cerca del gen o sección del genoma a regular.

## 9. CONCLUSIÓN

En este trabajo se exploró el uso de los ARN anti-sentido para controlar el flujo metabólico en la producción de ácido shikímico. Para lograr esto, se diseñó el ARN anti-sentido asAroL y su respectivo casete de expresión los cuales se sintetizaron en el vector pBR322.

Se realizó la producción de ácido shikímico a nivel matraz y se logró cuantificar tanto la concentración de ácido shikímico extracelular como el consumo de azúcares reductores. Se determinó el rendimiento antes y después de la inducción de asAroL. El cambio en el rendimiento después de la inducción nos permite concluir que se controló el flujo metabólico mediante el uso de asAroL.

## 10. PERSPECTIVA

En este proyecto se logró controlar el flujo metabólico en la producción de ácido shikímico mediante el uso de un ARN anti-sentido mediado por Hfq. Esta técnica puede reemplazar la eliminación de genes al momento de crear una cepa super productora. Sin embargo, para obtener altos rendimientos y que sea comercialmente rentable, esta estrategia debe de ser complementada con la sobreexpresión de diversos genes y la optimización del medio.

Para la creación de una cepa super productora se puede usar el circuito presentado por Yoo y colaboradores (2013) para crear un casete de expresión que contenga ARN anti-sentido dirigidos a *aroL*, *aroK*, *pta*, *trpR* y *ptsG*. A su vez se plantea la sobre expresión de *glP*, *glK*, *tktA*, *aroB*, *aroG* y *ppsA*. De igual manera la producción se puede realizar en un medio de fermentación parecido al reportado por Escalante y colaboradores (2010) el cual contiene una alta concentración de glucosa y extracto de levadura. Esto acompañado de modelos matemáticos de escalamiento y optimización del proceso.

### **Disposición de residuos.**

Los residuos generados durante la realización del proyecto de investigación serán gestionados siguiendo los lineamientos establecidos por el **Departamento de Medio Ambiente y Seguridad** de la Facultad de Ciencias Químicas utilizando los contenedores proporcionados y siguiendo el **procedimiento PR-CLB-SRR-000**.

## 11. LITERATURA CITADA

Averesch, N. J., & Krömer, J. O. (2018). Metabolic engineering of the shikimate pathway for production of aromatics and derived compounds—present and future strain construction strategies. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 6, 32.

Avula, B., Wang, Y. H., Ali, Z., Smillie, T. J., Fillion, V., Cuerrier, A., ... & Khan, I. A. (2009). RP-HPLC determination of phenylalkanoids and monoterpenoids in *Rhodiola rosea* and identification by LC-ESI-TOF. *Biomedical Chromatography*, 23(8), 865-872.

Baeshen, M. N., Al-Hejin, A. M., Bora, R. S., Ahmed, M. M., Ramadan, H. A., Saini, K. S., ... & Redwan, E. M. (2015). Production of biopharmaceuticals in *E. coli*: current scenario and future perspectives. *J Microbiol Biotechnol*, 25(7), 953-962.

Chandran, S. S., Yi, J., Draths, K. M., von Daeniken, R., Weber, W., & Frost, J. W. (2003). Phosphoenolpyruvate Availability and the Biosynthesis of Shikimic Acid. *Biotechnology Progress*, 19(3), 808–814. doi:10.1021/bp025769p

Du, J., Yang, D., Luo, Z. W., & Lee, S. Y. (2018). Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of indirubin from glucose. *Journal of biotechnology*, 267, 19-28.

Escalante, A., Calderón, R., Valdivia, A., de Anda, R., Hernández, G., Ramírez, O. T., ... & 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(1), 21.

Gonçalves, C., Rodriguez-Jasso, R. M., Gomes, N., Teixeira, J. A., & Belo, I. (2010). Adaptation of dinitrosalicylic acid method to microtiter plates. *Analytical Methods*, 2(12), 2046-2048.

Gu, P., Su, T., Wang, Q., Liang, Q., & Qi, Q. (2016). Tunable switch mediated shikimate biosynthesis in an engineered non-auxotrophic *Escherichia coli*. *Scientific reports*, 6, 29745.

He, W., Fu, L., Li, G., Jones, J. A., Linhardt, R. J., & Koffas, M. (2015). Production of chondroitin in metabolically engineered *E. coli*. *Metabolic engineering*, 27, 92-100.

Hoynes-O'Connor, A., & Moon, T. S. (2016). Development of design rules for reliable antisense RNA behavior in *E. coli*. *ACS synthetic biology*, 5(12), 1441-1454.

Keseler, I. M., Mackie, A., Santos-Zavaleta, A., Billington, R., Bonavides-Martínez, C., Caspi, R., ... & Latendresse, M. (2016). The EcoCyc database: reflecting new knowledge about *Escherichia coli* K-12. *Nucleic acids research*, 45(D1), D543-D550.

Lee, M. Y., Hung, W. P., & Tsai, S. H. (2017). Improvement of shikimic acid production in *Escherichia coli* with growth phase-dependent regulation in the



biosynthetic pathway from glycerol. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(2), 25.

Lerma-Escalera A.I. (2016) Regulación del flujo metabólico en *Escherichia coli* mediante el uso de termorreguladores de RNA, para incrementar la producción de un precursor terapéutico (shikimato). Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias Químicas. UANL.

Liu, X., Lin, J., Hu, H., Zhou, B., & Zhu, B. (2016). Site-specific integration and constitutive expression of key genes into *Escherichia coli* chromosome increases shikimic acid yields. *Enzyme and microbial technology*, 82, 96-104.

Martínez, J. A., Bolívar, F., & Escalante, A. (2015). Shikimic acid production in *Escherichia coli*: from classical metabolic engineering strategies to omics applied to improve its production. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 3, 145.

Møller, T., Franch, T., Højrup, P., Keene, D. R., Bächinger, H. P., Brennan, R. G., & Valentin-Hansen, P. (2002). Hfq: a bacterial Sm-like protein that mediates RNA-RNA interaction. *Molecular cell*, 9(1), 23–30. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(01\)00436-1](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(01)00436-1)

Na, D., Yoo, S. M., Chung, H., Park, H., Park, J. H., & Lee, S. Y. (2013). Metabolic engineering of *Escherichia coli* using synthetic small regulatory RNAs. *Nature Biotechnology*, 31(2), 170–174. doi:10.1038/nbt.2461

Nakashima, N., & Tamura, T. (2009). Conditional gene silencing of multiple genes with antisense RNAs and generation of a mutator strain of *Escherichia coli*. *Nucleic acids research*, 37(15), e103-e103.

Neupert, J., Karcher, D., & Bock, R. (2008). Design of simple synthetic RNA thermometers for temperature-controlled gene expression in *Escherichia coli*. *Nucleic acids research*, 36(19), e124-e124.

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

Sesto, N., Wurtzel, O., Archambaud, C., Sorek, R., & Cossart, P. (2013). The excludon: a new concept in bacterial antisense RNA-mediated gene regulation. *Nature Reviews Microbiology*, 11(2), 75.

Solomon, K. V., Sanders, T. M., & Prather, K. L. (2012). A dynamic metabolite valve for the control of central carbon metabolism. *Metabolic engineering*, 14(6), 661-671.

Stephanopoulos, G. (2012). *Synthetic biology and metabolic engineering*. *ACS synthetic biology*, 1(11), 514-525.

Tu, Z., He, G., Li, K. X., Chen, M. J., Chang, J., Chen, L., ... & Wu, X. (2005). An improved system for competent cell preparation and high efficiency plasmid

transformation using different *Escherichia coli* strains. *Electronic Journal of Biotechnology*, 8(1), 113-120.

Tummala, S. B., Welker, N. E., & Papoutsakis, E. T. (2003). Design of antisense RNA constructs for downregulation of the acetone formation pathway of *Clostridium acetobutylicum*. *Journal of bacteriology*, 185(6), 1923-1934.

Yang, Y., Lin, Y., Li, L., Linhardt, R. J., & Yan, Y. (2015). Regulating malonyl-CoA metabolism via synthetic antisense RNAs for enhanced biosynthesis of natural products. *Metabolic engineering*, 29, 217-226.

Yoshida, S., & Hasegawa, M. (1957). A microcolorimetric method for the determination of shikimic acid. *Archives of biochemistry and biophysics*, 70(2), 377-381.

Yoo, S. M., Na, D., & Lee, S. Y. (2013). Design and use of synthetic regulatory small RNAs to control gene expression in *Escherichia coli*. *Nature Protocols*, 8(9), 1694–1707. doi:10.1038/nprot.2013.105

Zhang, A., Altuvia, S., Tiwari, A., Argaman, L., Hengge-Aronis, R., & Storz, G. (1998). The OxyS regulatory RNA represses *rpoS* translation and binds the Hfq (HF-I) protein. *The EMBO journal*, 17(20), 6061-6068

Zhang, X., Tervo, C. J., & Reed, J. L. (2016). Metabolic assessment of *E. coli* as a Biofactory for commercial products. *Metabolic Engineering*, 35, 64–74. doi:10.1016/j.ymben.2016.01.007