

Ingeniería de vías metabólicas en *Escherichia coli* para la producción de shikimato como precursor para la síntesis de compuestos antivirales contra influenza.

Larisa Cortés-Tolalpa, Susy Beatriz Carmona, Ania Cervantes-Salinas, Marco Antonio García, Guillermo Gosset, Adelfo Escalante*, Francisco Bolívar

¹*Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. Av. Universidad 2001. Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, 62210. México. *adelfo@ibt.unam.mx. Tel. (Fax):*

+52(55)5622 7648

RESUMEN

La influenza es una enfermedad respiratoria altamente infecciosa causada por retrovirus de la Familia Ortomixoviridae que poseen en su superficie dos glicoproteínas, la hemaglutinina y la neuraminidasa (NA). Las características biológicas de estos virus hacen que exista la posibilidad permanente de brotes de influenza con el riesgo de convertirse en pandemia. En la actualidad se emplea el inhibidor de la actividad de la NA, oseltamivir fosfato (OSF), elaborado por síntesis química a partir del shikimato (SHK) extraído de plantas de anís estrella chino para el tratamiento de influenza estacional, aviar y humana. Se ha estimado que en el caso de una pandemia, la capacidad de producción de SHK y OSF sería insuficiente para proteger a grandes poblaciones, particularmente de países en desarrollo. Una alternativa para la obtención de SHK es por procesos biotecnológicos utilizando cepas bacterianas modificadas por ingeniería de vías metabólicas (IVM). La aplicación de la IVM en *Escherichia coli* para la producción de SHK ha permitido la obtención de cepas sobreproductoras modificadas en el metabolismo central de carbono y en la vía de síntesis de compuestos aromáticos. En esta revisión se describen las aproximaciones de IVM aplicadas a cepas de *E. coli* para obtener derivadas sobreproductoras de SHK.

Palabras clave: *Escherichia coli*, ingeniería de vías metabólicas, shikimato, compuestos antivirales, influenza.

ABSTRACT

Influenza is a highly infectious respiratory disease caused by retroviruses members of the Ortomixoviridae Family. These viruses have on their surface two glycoproteins, hemagglutinin and neuraminidase (NA). The biological characteristics of these viruses cause a permanent possibility of

influenza outbreaks caused by mutant strains with the risk of a pandemic. Nowadays, sialic acid analogs such as oseltamivir phosphate (OSF), synthesized from shikimate (SHK) is used to inhibit the activity of viral NA in the treatment of seasonal, avian and human influenza. It has been estimated that in the case of a global pandemic of influenza, the present capacity of OSF production could be insufficient to protect large populations, particularly in developing countries. Thus, alternative biotechnological strategies with engineered strains to produce SHK have gained relevance. Application of metabolic engineering pathway (MEP) in *Escherichia coli* strains, in order to improve SHK production by fermentation, have resulted in overproducing strains in which some genes from central carbon metabolism and the common aromatic pathway have been modified. This review describes several MEP approaches applied to *E. coli* to obtain overproducing strains of SHK.

Key words: *Escherichia coli*, metabolic engineering, shikimic acid, antiviral drugs, influenza.

INTRODUCCIÓN

La influenza es una enfermedad respiratoria altamente infecciosa causada por virus miembros de la Familia Ortomixoviridae, los cuales son retrovirus que poseen en su superficie dos glicoproteínas, la hemaglutinina (HA) y la neuraminidasa (NA) (Figura 1), que definen las características antigénicas de cepas particulares de estos virus. Con base en la antigenicidad de estas proteínas, se clasifican 16 subtipos de HA (H1-H16) y 9 subtipos de NA (N1-N9). Las NA de los virus de influenza aviar que se han detectado en circulación pertenecen a dos grupos filogenéticos distintos: el grupo 1, conformado por los subtipos N1, N4, N5 y N8, mientras que el grupo 2 contiene a los subtipos N2, N3, N6, N7 y N9. Estas dos proteínas juegan un papel fundamental en el proceso de infección de células blanco y la liberación de nuevas partículas de virus: durante el proceso de infección, una vez que el virus ha entrado a las vías respiratorias y

ha alcanzado sus células blanco, la HA se une a los receptores de ácido siálico (AS) de la célula a infectar y permite la entrada del virus. Una vez que el virus se ha replicado, se libera por acción de la NA, la cual corta en un sitio específico al receptor de AS de la célula infectada a los cuales se encuentran adheridos los nuevos virus formados en la célula, permitiendo así su liberación y la continuación del proceso de infección de otras células blanco (Figura 1). Se propone que los virus de influenza aviar H5N1 y los de influenza humana H3N2 y H1N1 tienen diferentes células blanco receptoras en el tracto respiratorio humano: mientras que los virus derivados de humanos reconocen preferentemente los enlaces de SA α 2,6 Galactosa (Gal) localizados en las células epiteliales de las mucosas nasales, senos paranasales, faringe, tráquea y bronquios, mientras que los virus de aves reconocen los enlaces de AS α 2,3Gal localizados en las vías respiratorias bajas, en la pared alveolar y las uniones entre los

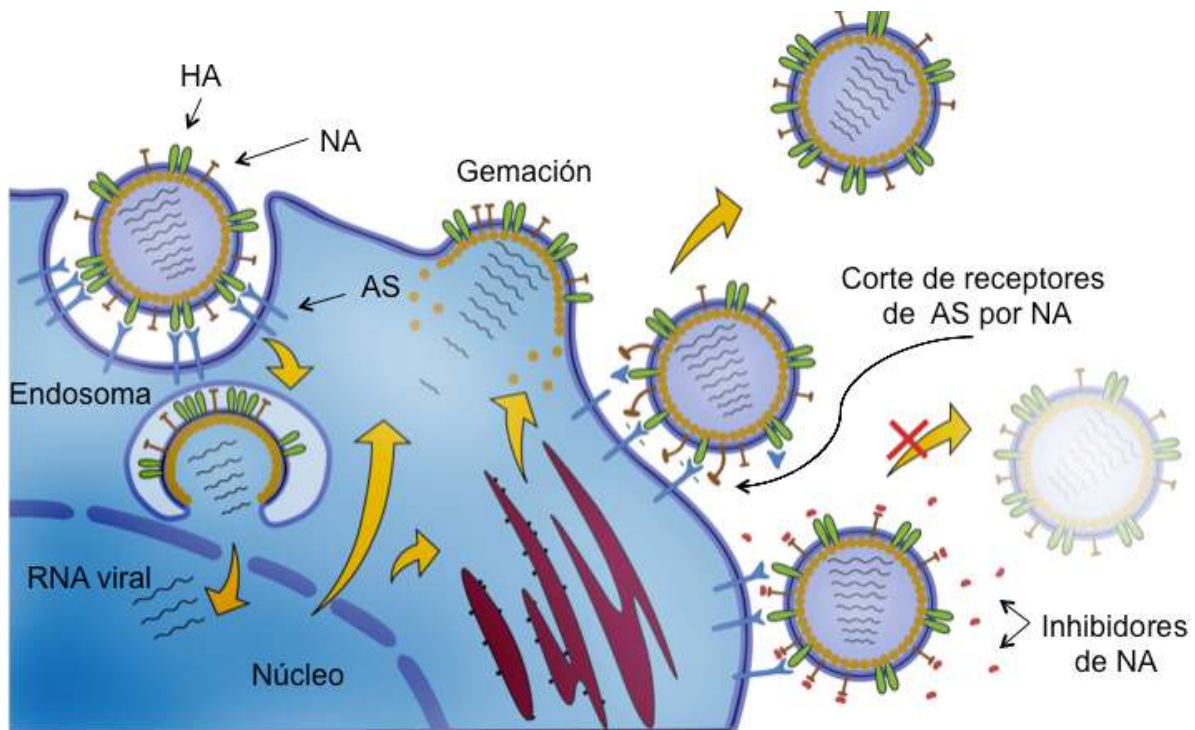


Fig. 1. Mecanismo de infección de virus de influenza a células blanco. Después de que el virus de influenza se une a los receptores de ácido siálico (AS) de la superficie celular por medio de la hemaglutinina (HA), los virus son internalizados por endocitosis. El pH ácido de los endosomas permite la fusión de su membrana con la del virus y el flujo de H⁺ a través de los canales M2 libera el RNA viral al citoplasma. La replicación y transcripción del RNA viral ocurre en el núcleo. El empacamiento y gemación de los nuevos virus ocurre a nivel de la membrana citoplasmática. Los nuevos virus están unidos a los receptores de AS por la HA y la neuraminidasa (NA) corta en enlaces específicos AS-galactosa permitiendo la liberación del virus de la célula infectada. Los inhibidores de la NA se unen a ésta inhibiéndola y evitando de este modo la liberación de virus de la célula. Figura adaptada de Moscona (2005); De Clerq (2006); Morens *et al.* (2009).

bronquios respiratorios y los alveolos. De este modo, los virus de influenza aviar H5N1 pueden causar una enfermedad severa en las vías respiratorias bajas en humanos ya que se adhieren predominantemente a los pneumocitos tipo II, los macrófagos alveolares y las células ciliadas bronquiales. Independientemente del tipo y origen del virus de influenza así como del tipo de célula blanco, sin la NA, la infección de estos virus

estaría limitada a un solo ciclo de replicación (Moscona, 2005; De Clercq, 2006; Neumann *et al.*, 2009).

Las diferentes combinaciones en los subtipos de HA y NA de los virus de influenza han generado variedades que han sido responsables de cuatro pandemias de esta enfermedad: la pandemia de 1919 o Influenza española causada por la cepa

H1N1, la de 1957 o influenza asiática causada por la cepa H2N2, la de 1968 o influenza de Hong Kong causada por la cepa H3N2 y la más reciente en el siglo XXI, la pandemia de influenza humana causada por la cepa tipo A/H1N1.

De acuerdo al origen de los virus responsables de estas cuatro pandemias de influenza, se han propuesto tres mecanismos por los cuales podría surgir una nueva variedad pandémica: **a.** por la transmisión directa de un virus (o una mutación de éste) de animales (aves) al humano y la posterior transmisión a otros humanos, tal como ocurrió en la pandemia de influenza española; **b.** a través de la recombinación de un virus de influenza aviar con un virus de influenza humana, tal y como ocurrió en la pandemia de influenza asiática y en la pandemia de Hong Kong (De Clercq, 2009; Morens *et al.*, 2009) y **c.** como resultado de una compleja serie de eventos de recombinación entre virus de influenza aviar, porcina y humana, como ocurrió recientemente con la pandemia de influenza humana en 2009 (Morens *et al.*, 2009; Neumann *et al.*, 2009). Por otro lado, la variación temporal de los tipos de HA y NA permite a los virus de influenza estacional evadir la respuesta inmune humana obligando a redefinir la formulación de nuevas vacunas cada año. Por todas estas razones, la influenza es una enfermedad que ha recibido gran atención tanto por autoridades sanitarias nacionales como internacionales (De Clercq, 2006; Neumann *et al.*, 2009).

La posibilidad de lograr inhibir la actividad de las NA virales se propuso por primera vez en la década de 1970, basándose en la habilidad de diversos análogos del AS de generar un estado de transición con la NA, sin embargo, no fue posible desarrollarlos hasta contar con modelos tridimensionales de la estructura de la NA viral que revela la ubicación y estructura de su sitio activo (Moscona, 2005; Lou, 2006). En la actualidad existen dos inhibidores de NA comercialmente disponibles, el Zanamivir (Relenza®) producido por GlaxoSmithKline y el Osetamivir (Tamiflú®) producido por Hoffman-La Roche, ambos poseen una estructura similar a la del sustrato natural de las NA, por lo que es capaz de unirse a la cavidad del sitio activo en la interacción energética más favorable. El Zanamivir posee una estructura que es parecida al AS y es administrado por inhalación, lo que libera al compuesto directamente al tracto respiratorio, mientras que el Osetamivir fue diseñado como un análogo del AS, incluyendo la adición de una cadena lipofílica lateral, que permite su administración de forma oral (Moscona, 2005; De Clercq, 2006). Ya que los inhibidores actúan como análogos del estado de transición del AS estos pueden unirse indistintamente a cualquier enlace AS-Gal (vías respiratorias superiores o inferiores).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha recomendado al Tamiflú® como el principal antiviral para planes de pandemia (Jefferson *et al.*, 2009) ya que ha sido aprobado como el único medicamento oral disponible tanto para la profilaxis como para

el tratamiento de la influenza H5N1 y recientemente para el tratamiento de influenza humana A/H1N1 tras pruebas de laboratorio en las que ha demostrado ser efectivo, disminuyendo eficaz y tempranamente los síntomas ocasionados por el virus (Liang-Deng *et al.*, 2009). Al suministrarse el Tamiflú®, el compuesto que interactúa directamente con la enzima NA es el oseltamivircoxilato, así al ser administrado el pro-fármaco como oseltamivirfosfato, éste es metabolizado y el coxilato actúa sobre las moléculas virales (Rusell *et al.*, 2006).

Actualmente el Tamiflú® es elaborado a partir del shikimato (SHK). La mejor ruta desarrollada hasta ahora a escala industrial es la empleada por la compañía farmacéutica Hoffman-La Roche y se basa principalmente en la extracción del SHK de los frutos del anís estrella chino (*Illicium verum*). La síntesis del OSF a partir del SHK consta de hasta 12 pasos, que aunados a la extracción y purificación a partir de la planta resultan en un proceso complicado, costoso y poco productivo (Liang-Deng *et al.*, 2009). A pesar de las complicaciones en su producción, los laboratorios Hoffman-La Roche tenían hasta el 2008 un nivel de producción de 400 millones de dosis al año, el cual en caso de una pandemia no sería suficiente para proveer a la población mundial (Bertelliet *al.*, 2008).

Una alternativa a la extracción del SHK de la planta de anís estrella chino, es su producción por procesos biotecnológicos utilizando cepas bacterianas modificadas genéticamente capaces de sobreproducir

este compuesto. En este contexto, y ante la amenaza de una nueva pandemia causada por una nueva variedad de virus influenza aviar o humana con una mayor letalidad, diversos gobiernos y grupos de investigación en diferentes países están trabajando en proyectos encaminados a la obtención del SHK para la producción de OSF. En esta revisión se presenta el estado actual de la aplicación de la ingeniería de vías metabólicas (IVM) a la producción de SHK en cepas de *Escherichia coli* en sistemas de fermentación.

INGENIERÍA DE VÍAS METABÓLICAS

La IVM se puede definir como el mejoramiento de las propiedades celulares y de la capacidad de formación de un determinado producto de interés, a través de la modificación de reacciones metabólicas específicas o la introducción de nuevas mediante el uso de la tecnología del DNA recombinante (Stephanopoulos *et al.*, 1998).

El punto de partida en la aplicación de la IVM para la producción de un compuesto de interés es la selección de un microorganismo con un fondo genético y fisiológico muy bien caracterizado, para entonces aplicar alguna o varias de las siguientes estrategias (Stephanopoulos & Sinskey, 1993; LaDucca *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2008):

- i. Incremento de la disponibilidad de la fuente de carbono utilizada como sustrato para la obtención de precursores destinados a la biosíntesis del producto de interés.
- ii. Incremento en la disponibilidad de los intermediarios provenientes del

catabolismo de la fuente de carbono a través del metabolismo central de carbono (MCC).

- iii. Mejoramiento de las enzimas que catalizan las reacciones que canalizan a los intermediarios del MCC a la vía de interés.
- iv. Identificación y bloqueo de la vía o vías que pudieran representar pérdida de carbono.
- v. Identificación y mejoramiento de las reacciones limitantes de la vía de interés.
- vi. Eliminación de los mecanismos de control transcripcional y alostérico de la vía.
- vii. Modulación de la expresión de genes involucrados en la vía de interés.

PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS AROMÁTICOS EN *ESCHERICHIA COLI*: LA VÍA DEL SHIKIMATO

La vía del SHK es la ruta metabólica por la cual se sintetiza el precursor común para la formación de aminoácidos aromáticos y otros compuestos de interés biológico. La vía se encuentra presente en plantas, hongos y bacterias, pero no en animales. Consta de 7 pasos enzimáticos por los cuales los intermediarios del MCC, eritrosa-4-fosfato (E4P) y el fosfoenolpiruvato (PEP) (intermediarios de la vía de las pentosas

fosfato y de la glicólisis, respectivamente), son condensados y transformados para formar como producto final corismato (COR) (Figura 2). El número de enzimas implicadas varía dependiendo del organismo, sin embargo todos comparten los mismos intermediarios y producen el mismo producto final, el COR.

La primera enzima de la vía es la 3-deoxi-D-arabinoheptuloso-7-P (DAHP) sintasa (DAHPS) que condensa a la E4P y el PEP, para formar DAHP, el primer intermediario de la vía. En *E. coli* esta enzima ha sido ampliamente estudiada: posee 3 isoenzimas, AroF, AroG y AroH, codificadas respectivamente por *aroF*, *aroG* y *aroH*. La presencia de las tres isoenzimas provee a *E. coli* la capacidad de un control estricto del primer paso de la vía de síntesis de aminoácidos aromáticos, permitiendo a la vez una actividad enzimática residual en presencia de un exceso de aminoácidos aromáticos que provee a la célula de precursores para la síntesis de otros compuestos aromáticos (Hudson & Davidson, 1984). Aunque estas tres isoenzimas catalizan la misma reacción, cada una de ellas es inhibida por los aminoácidos aromáticos tirosina, fenilalanina y triptófano,

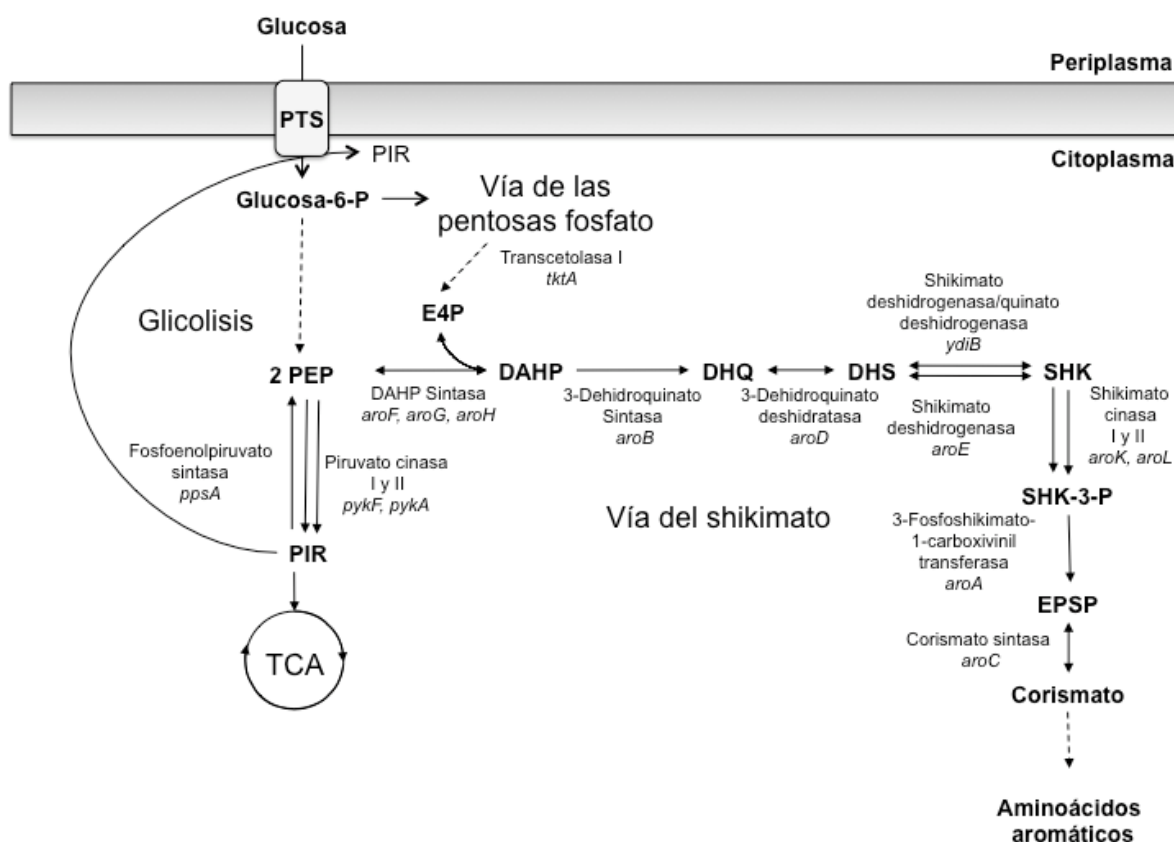


Fig. 2. Metabolismo central de carbono y vía de síntesis de compuestos aromáticos en *E. coli*. PTS⁻ Sistema de fosfotransferasa de glucosa dependiente de PEP; ciclo de los ácidos tricarbóxicos (TCA). Se presentan los nombres de los genes y las enzimas que codifican, respectivamente.

respectivamente. La isoenzima AroG posee al 80% de actividad de DAHPS, la AroF posee alrededor del 20%, mientras que la isoenzima AroH posee alrededor del 1% de actividad (Ray *et al.*, 1998). La segunda reacción de la vía es catalizada por la enzima dehidroquinato (DHQ) sintasa, codificada en *E. coli* por *aroB*. Esta enzima cataliza la transformación del DAHP a 3-dehidroquinato. Para llevar a cabo la reacción la enzima requiere como cofactor NAD⁺. La siguiente reacción de la vía es catalizada por la enzima DHQ deshidratasa, codificada en *E. coli* por *aroD*. En esta reacción, el DHQ sufre una

deshidratación obteniéndose 3-dehidroshikimato (DHS). El DHS es reducido para formar SHK. La reacción es catalizada por la enzima shikimato deshidrogenasa, codificada por *aroE* y requiere de NADPH como cofactor. En *E. coli* el SHK es convertido a shikimato-3-fosfato (SHK-3-P) por acción de las isoenzimas shikimato cinasa I y II codificadas respectivamente por *aroK* y *aroL*. Esta reacción requiere de ATP. El penúltimo paso consiste en la adición de una molécula de PEP al SHK-3-P para la obtención de 3-P-5-enolpiruvilshikimato (EPSP), reacción catalizada por la enzima

EPSP Sintasa. En *E. coli* esta enzima es codificada por *aroA*. La última reacción de la vía es catalizada por la enzima corismato sintasa, codificada por *aroC*, la cual añade un segundo doble enlace al anillo mediante la eliminación del P del EPSP dando COR como producto final (Herrmann, 1995; Herrmann & Weaver, 1999; Krämer *et al.*, 2003).

En *E. coli* se ha determinado que los genes que codifican para las enzimas DHQ sintasa (*aroB*), DHQ deshidratasa (*aroD*) y SHK deshidrogenasa (*aroE*) son expresadas de forma constitutiva mientras que la expresión de los genes que codifican a las DAHP sintasas (*aroF*, *aroG* y *aroH*) y la shikimato cinasa II (*aroL*) son regulados transcripcionalmente. Las reacciones catalizadas por las enzimas DHQ sintasa (*aroB*) y las SHK cinasas (*aroK* y *aroL*) son puntos limitantes de la vía y el SHK actúa como inhibidor por acumulación de producto final de la enzima SHK deshidrogenasa (Krämer *et al.*, 2003).

INGENIERÍA DE VÍAS METABÓLICAS EN *E. COLI* PARA LA PRODUCCIÓN DE SHIKIMATO

I. IVM DEL METABOLISMO CENTRAL DE CARBONO

E. coli ha sido utilizada como fondo genético y fisiológico para la producción de diferentes compuestos aromáticos (LaDucca *et al.*, 1999; Baez-Viveros *et al.*, 2004; Gosset, 2005; Baez-Viveros *et al.*, 2007; Chávez-Bejar *et al.*, 2008; Martínez *et al.*, 2008; Balderas-Hernández *et al.*, 2009; Escalante *et al.*, 2010). En este contexto,

diferentes grupos de investigación se han enfocado a la modificación de diversas cepas de esta bacteria para la producción de SHK como precursor para la síntesis del antiviral OSF, aplicando los principios de la IVM para la modificación de la capacidad de transporte de glucosa como fuente de carbono para la síntesis de los precursores del MCC PEP y E4P; un incremento en la disponibilidad de éstos precursores; su canalización a la vía del SHK y la acumulación final de SHK (Chandran *et al.*, 2003; Krämer *et al.*, 2003; Escalante *et al.*, 2010). Se ha determinado que la partición del flujo de carbono en el nodo del PEP, es la principal determinante del rendimiento de compuestos aromáticos sintetizados a partir de la glucosa en *E. coli*. En esta bacteria el transporte de glucosa a partir del medio extracelular se realiza por medio de las porinas LamB y OmpCF, localizadas en la membrana externa. Una vez en el periplasma, la glucosa es internalizada por el sistema de fosfotransferasa (PTS) de glucosa dependiente de PEP (PTS:Glc:PEP), el cual transporta y fosforila simultáneamente a este azúcar, para rendir glucosa-6-P, la cual es entonces catabolizada a través del MCC para rendir los intermediarios PEP y E4P. Este sistema de transporte no depende de ATP para la fosforilación de la glucosa pero si requiere de una molécula de PEP como donadora del grupo fosfato (P), generando una molécula de piruvato (PIR) (Figura 2). Esta situación representa una desventaja desde el punto de IVM, ya que de dos moléculas de PEP que se generan del catabolismo de una molécula de glucosa que entra a la célula, un PEP es invertido para la

fosforilación de la glucosa transportada por el sistema PTS:Glc:PEP, dejando solo una molécula de PEP disponible, que junto con la E4P, son utilizados como precursores que alimentan la vía del SHK. La principal estrategia empleada para aumentar la disponibilidad de PEP ha sido la inactivación del operón *ptsHI-crr* que codifica para los componentes citoplasmáticos del sistema PTS y que son los responsables de la transferencia del P del PEP al componente de membrana de este sistema involucrado en la traslocación de la glucosa, resultando en cepas con un fenotipo PTS⁻ que exhiben una afectación negativa en su capacidad de crecer en glucosa, pero con la disponibilidad de 2 moléculas de PEP (Flores *et al.*, 1996; LaDucca *et al.*, 1999; Gosset, 2005; Flores *et al.*, 2005; Flores *et al.*, 2007).

Las cepas PTS⁻ poseen una capacidad muy limitada para transportar glucosa por sistemas alternativos al PTS:glucosa:PEP, como son la permeasa de galactosa (GalP) o el sistema transportador de galactosa MglABC. Para mejorar su capacidad de crecer en glucosa se han desarrollado diversas estrategias como son el crecimiento en sistemas de quimiostato a diferentes tasas de alimentación de glucosa y la selección a diferentes tiempos de cultivo de mutantes que han recuperado su capacidad de crecer en este azúcar. Flores *et al.*, (1996; 2007), reportan la inactivación del sistema PTS en la cepa de *E. coli* JM101 por remplazo del operón *ptsHI-crr* con un gen que confiere resistencia a kanamicina. La cepa PTS⁻ resultante (PB11) redujo su velocidad

específica de crecimiento (μ) en medio mínimo M9 de 0.7 h^{-1} (cepa JM101) a 0.1 h^{-1} . Al crecer esta mutante PTS⁻ en quimiostato se aislaron cepas derivadas que incrementaron su capacidad de crecer en glucosa. De este modo se obtuvo una cepa denominada PB12 que incrementó su μ a 0.4 h^{-1} (Flores *et al.*, 1996; 2007) El análisis posterior de esta cepa permitió establecer que la glucosa es transportada principalmente por el sistema GalP y fosforilada por una glucocinasa para rendir glucosa-6-P. El análisis transcriptómico de esta cepa mostró un nivel de expresión de *galP* 13.1 veces mayor al de la cepa parental JM101 (Flores *et al.*, 2005). La inactivación del sistema PTS en la cepa de *E. coli* denominada VH32 (derivada de la cepa W3110) y la expresión de *galP* bajo control del promotor fuerte *trc* demostró también ser de gran utilidad para incrementar el transporte de glucosa, mejorando de manera importante la velocidad específica de crecimiento con respecto a la cepa parental. El análisis de las cepas PTS⁻glc⁺ PB12 y VH32 en sistemas de fermentación ha demostrado que producen una baja o nula concentración de ácido acético, aún en concentraciones iniciales elevadas de glucosa, lo que representa una gran ventaja para su uso como fondos genéticos y fisiológicos para la posterior aplicación de otras estrategias de IVM encaminadas a la sobreproducción de proteínas recombinantes y metabolitos de interés (Hernández-Montalvo *et al.*, 2003; De Anda *et al.*, 2006, Lara *et al.*, 2006; Balderas *et al.*, 2009). La

expresión heteróloga de sistemas de transporte y fosforilación de glucosa no dependientes de PEP como el facilitador de glucosa (Glf) de *Zymomonas mobilis*, codificado por *glf* acoplado a la actividad de la glucocinasa (*glk*) de *Z. mobilis* se ha utilizado también como una alternativa para restaurar la capacidad de transporte y fosforilación de glucosa en la cepa de *E. coli* PTS⁻ Sp1.1 (Chandran *et al.*, 2003; Yi *et al.*, 2003).

La inactivación del sistema PTS:Glu:PEP en diferentes fondos genéticos de *E. coli* ha demostrado tener un impacto importante en la disponibilidad de PEP, tal y como se describió previamente, sin embargo, diversos autores han incrementado la disponibilidad de PEP utilizando otras estrategias como la sobreexpresión de *ppsA*, que codifica para la enzima fosfoenolpiruvato sintasa permite reciclar el PIR a PEP (Chandran *et al.*, 2003), mientras que también se ha evaluado la inactivación de una o ambas de las enzimas de las piruvato cinasas I y II codificadas por *pykF* y *pykA*, respectivamente, y que son responsables de la transformación de PEP a PIR (Gosset *et al.*, 1996; LaDucca *et al.*, 1999; Escalante *et al.*, 2009) (Figura 3). Se ha determinado que el solo incremento en la disponibilidad de PEP no es suficiente para incrementar el flujo de carbono hacia la vía del SHK y que se requiere, de forma

concomitante, de una mayor disponibilidad del E4P para asegurar una máxima actividad de la DAHP sintasa. Para este fin se ha incrementado la disponibilidad de este compuesto como resultado de la sobreexpresión del gen *tktA* que codifica para la enzima transcetolasa I (LaDucca *et al.*, 1999; Baez-Viveros *et al.*, 2004; Gosset *et al.*, 2005; Baez-Viveros *et al.*, 2007; Martínez *et al.*, 2008; Balderas-Hernández *et al.*, 2009).

La inhibición por acumulación de producto que presentan en *E. coli* las isoenzimas AroFGH por los aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina y triptófano, respectivamente, representa un problema, muy importante en la producción de compuestos aromáticos, por lo que se han desarrollado y clonado en plásmido versiones insensibles a inhibición de *aroG* y *aroF* (*aroG^{fbr}* y *aroF^{fbr}*, fbr, feedback resistant, por sus siglas en inglés) (Chandran *et al.*, 2003; Escalante *et al.*, 2010). La inactivación del sistema PTS:Glc:PEP, junto con la sobreexpresión de *tktA* y *aroG^{fbr}*, la inactivación del flujo de PEP a PIR por inactivación de las enzimas piruvato cinasa I y/o II en combinación con la sobreexpresión de *ppsA* ha permitido un incremento en el flujo de carbono hacia la vía de síntesis de compuestos aromáticos en algunas cepas de *E. coli* de hasta 20X (LaDucca *et al.*, 1999).

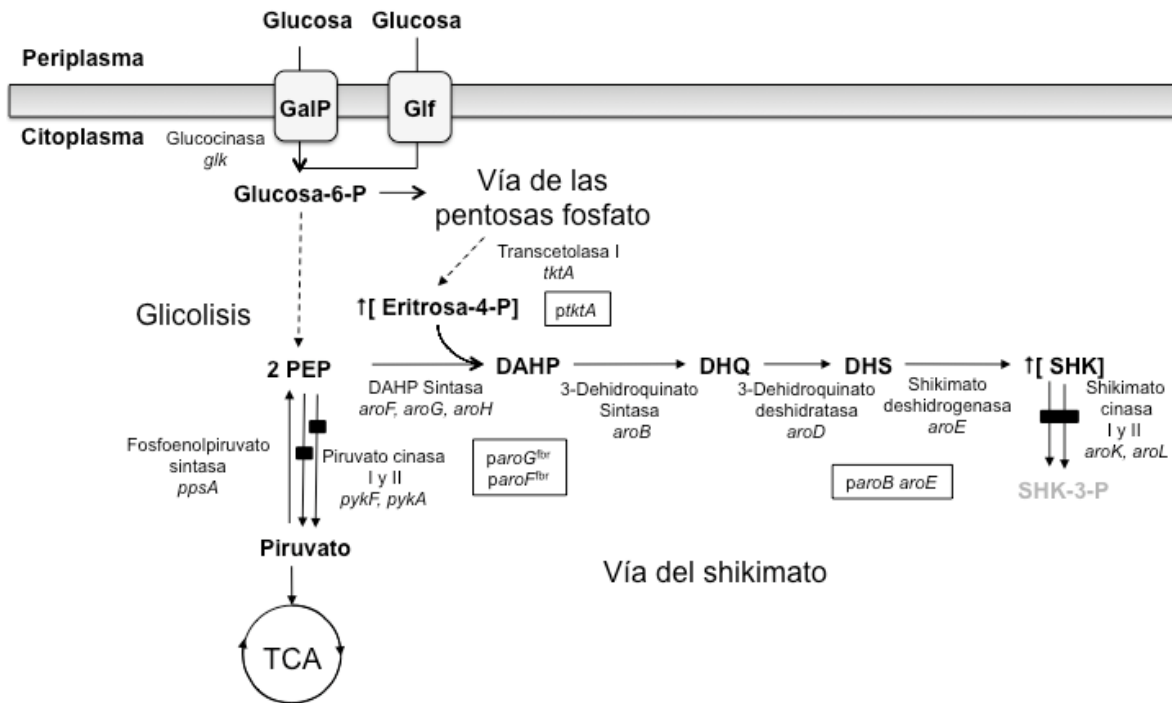


Fig. 3. Ingeniería de vías metabólicas en cepas de *E. coli* PTS⁻ para la sobreproducción de shikimato en sistemas de fermentación. Permeasa de galactosa (GalP), facilitador de glucosa de *Z. mobilis* (Gif), ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA). Se presentan los nombres de los genes y las enzimas que codifican, respectivamente. *ptkA*, *paroG^{fbr}*, *paroF^{fbr}*, *paroB aroE*, denotan la clonación de estos genes en diversos plásmidos. —, simboliza la interrupción de uno o varios genes. ↑ [], simboliza un incremento en la concentración del metabolito en cuestión. Las flechas continuas representan reacciones catalizadas por una sola enzima o isoenzimas. Las flechas punteadas representan diversas reacciones enzimáticas. Figura adaptada a partir de Chandran *et al.* (2003); Kramer *et al.* (2003); Johansson & Lidén (2006); Escalante *et al.* (2010).

II. INGENIERÍA DE VÍAS METABÓLICAS DE LA VÍA DEL SHIKIMATO

Algunas de las modificaciones del MCC descritas en la sección anterior han sido aplicadas de forma exitosa en diversas cepas de *E. coli* utilizadas como fondos genéticos para la producción de SHK (Chandran *et al.*, 2003; Krämer *et al.*, 2003; Johansson *et al.*, 2005; Escalante *et al.*, 2010), en combinación con algunas de las siguientes modificaciones realizadas en la vía del SHK (Tabla 1):

- Interrupción de la vía del SHK por inactivación de los genes *aroK* y *aroL*.

Con el fin de bloquear el flujo de SHK a SHK-3-P, se ha interrumpido la vía de forma parcial al inactivar *aroL* y mantener funcional a *aroK*, que codifican respectivamente para las enzimas de la shikimato cinasa I y II. La inactivación de *aroL* es una estrategia que permite la posibilidad de que *E. coli* pueda continuar sintetizando sus propios aminoácidos aromáticos y no requerir de la adición en el medio para satisfacer la auxotrofía generada por la doble inactivación de estas enzimas

ARTÍCULO DE REVISIÓN

(Johansson *et al.*, 2005). Sin embargo, esta estrategia resulta en una baja producción de SHK utilizando medio mineral suplementado con glucosa (Johansson *et al.*, 2005) o bien medio mineral suplementado con glucosa y extracto de levadura (Escalante *et al.*, 2010), resultado que confirma el papel secundario propuesto para la enzima SHK cinasa I. La doble interrupción de *aroK* y *aroL*, tiene como resultado el bloqueo total de la vía y un incremento considerable en la acumulación de SHK aunque se genera una auxotrofia triple (Figura 3) (Chandran *et al.*, 2003; Krämer *et al.*, 2003; Escalante *et al.*, 2010).

ii) Eliminación de las reacciones limitantes de la vía.

Como se describió previamente, en la vía del SHK las reacciones catalizadas por las enzimas DHQ sintasa y SHK sintasa que son codificadas por *aroB* y *aroE* respectivamente, son consideradas como los puntos limitantes de la vía, generando una acumulación de los intermediarios DAHP y DHS. Para contener con esta situación se ha clonado en plásmidos una copia adicional de los genes *aroB* y *aroE*, teniendo como resultado un incremento importante en la producción de SHK y una disminución en la concentración de los intermediarios DAHP y DHS (Tabla 1, Figura 3) (Chandran *et al.*, 2003; Escalante *et al.*, 2010).

Tabla 1. Producción y rendimientos de shikimato en cepas de *Escherichia coli*.

Cepa productora	Características	Producción (g SA/L)	Rendimiento (mol SA/mol glc)	Referencia
SP1.1/pKD12.138	<i>serA::aroB ΔaroL</i> <i>ΔaroK pSU18 aroF^{obr}</i> <i>Ptac aroE serA tktA</i>	52.00 ^{a,e}	0.180	Knop <i>et al.</i> (2001)
SP1.1pts/pSC6.090B	<i>serA::aroB ΔaroL</i> <i>ΔaroK PTS⁻ Ptac glf</i> <i>glk, aroF^{obr}, tktA, Ptac</i> <i>aroE, serA</i>	71.00 ^{b,e}	0.270	Chandran <i>et al.</i> (2003)
W3110.shik1	<i>ΔaroL aroG^{obr} trpE^{obr}</i> <i>pSGs26 aroF^{obr}</i>	6.85 ^{c,1}	0.059	Johansson <i>et al.</i> (2005)
PB12.SA22	<i>PTS⁻ ΔaroL ΔaroK</i> <i>pJLB aroG^{obr} tktA</i> <i>pTOPO aroB aroE</i>	7.05 ^{d,e}	0.290	Escalante <i>et al.</i> (2010)

^{a, b} Cultivo en lote alimentado con 1 L de volumen de trabajo. ^c Cultivos en quimiostato en reactores de 3.5 L de capacidad. ^d Cultivo en lote con 0.5 L de volumen de trabajo. ^e Medio mineral base suplementado con 25 g/L de glucosa y 15 g/L de extracto de levadura. ¹ Medio mineral base con limitación de fosfatos y concentración inicial de glucosa de 20 g/L, con una tasa de alimentación de 5 g/L al momento de agotarse el fosfato.

- ii) Interrupción del equilibrio hidroaromático en la vía del SHK y disminución en la formación de otros productos no deseados.

Se ha propuesto que en cepas de *E. coli* sobreproductoras de SHK, éste compuesto se acumula como consecuencia de dos posibles mecanismos: (a) La acumulación extracelular de SHK favorece su introducción a la célula a través de transportadores como ShiA, codificado por *shiA*, o bien, (b) como resultado de una posible deficiencia en el exporte de SHK al medio (a la fecha no se conocen los sistemas de excreción de SHK y otros compuestos intermediarios y co-productos de la vía común de aromáticos) (Knop *et al.*, 2001; Chandran *et al.*, 2003; Krämer, *et al.*, 2003; Johanson & Lidén, 2005;). Esta situación puede provocar una inversión en la dirección de las reacciones de $DHQ \rightarrow DHS \rightarrow SHK$. En la dirección de síntesis de DHQ a SHK, las reacciones son catalizadas por las enzimas dehidroquinato sintasa y SHK deshidrogenasa respectivamente, mientras que el flujo de SHK a DHQ es catalizado únicamente por la enzima quinato/SHK deshidrogenasa codificada por *ydiB*, resultando en la acumulación de DHS y DHQ con la subsecuente síntesis de otros compuestos como el AQ (a partir de DHQ) o el ácido gálico (AG) a

partir de DHS, que junto con sus precursores son excretados también al medio de cultivo y que son considerados como contaminantes en sistemas de producción (Figura 4). Se ha reportado la coproducción de hasta 4.4 g/L de DHS, 12.6 g/L de AQ con la producción de 27 g/L de SHK (Krämer *et al.*, 2003).

La formación de estos productos y particularmente el AQ, afecta de forma importante el proceso de recuperación y purificación de SHK (Krämer *et al.*, 2003). Para resolver este problema, de forma adicional a la clonación de una copia de *aroB* y *aroE* en plásmido, se han desarrollado algunas estrategias de fermentación para evitar la formación del equilibrio hidroaromático, tales como son el cultivo en sistemas de fermentación en lote alimentado con un exceso en la cantidad de glucosa alimentada (50-170 mM) resultando en la coproducción de 5 g/L de AQ por 70 g/L de SHK (Chandran *et al.*, 2003) o bien el desarrollo de cultivos en quimiostato con limitación de fosfatos, reportándose la ausencia de AQ bajo esta condición (Johansson & Lidén, 2006).

CONCLUSIONES

La producción de SHK por vía microbiana en sistemas de fermentación ha permitido la obtención de este compuesto de forma abundante y con pureza requerida para ser utilizado como precursor para la síntesis de

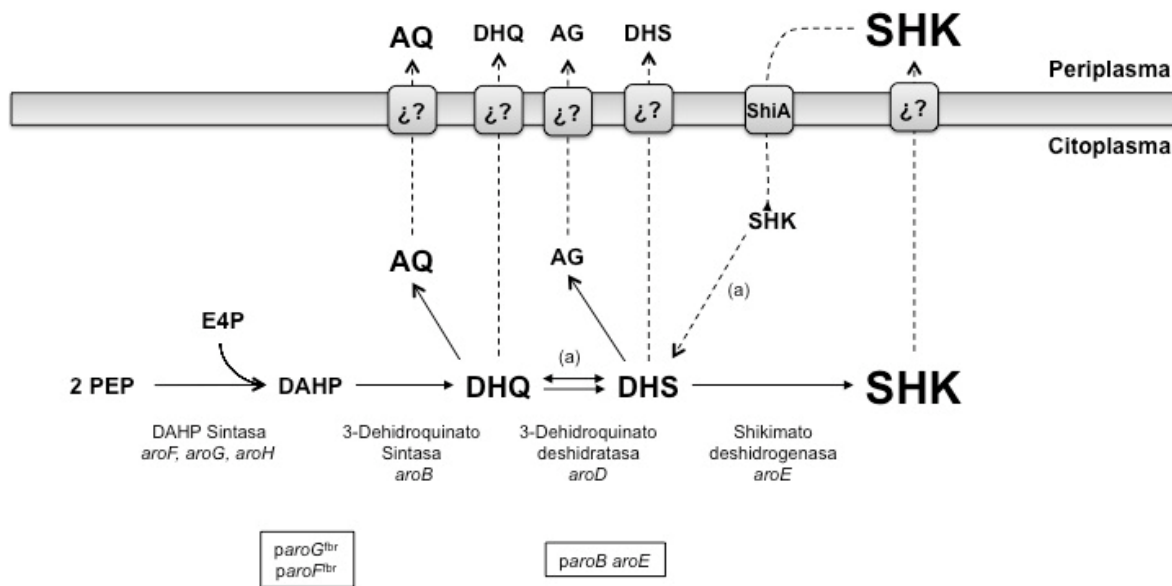


Fig. 4. Mecanismo propuesto para la formación del equilibrio hidroaromático en cepas de *E. coli* sobreproductoras de SHK. Las líneas punteadas presentan probables mecanismos de transporte. $paroG^{fbr}$, $paroF^{fbr}$, $paroB$ $aroE$ denotan la clonación de estos genes en diversos plásmidos. La diferencia en el tamaño del nombre de los compuestos denota nivel de concentración. Se presentan los nombres de los genes y las enzimas que codifican, respectivamente. (a) Quinato/SHK deshidrogenasa codificada por *ydiB*. Figura adaptada a partir de Knop *et al.* (2001); Krämer *et al.* (2003); Johansson & Lidén (2006).

inhibidores de la NA de virus de influenza estacionaria, de influenza pandémica humana y de virus de influenza aviar con potencial pandémico. Aunque se han aplicado con éxito diversas estrategias de IVM sobre el MCC y la vía del SHK en varios fondos genéticos de *E. coli* y se han evaluado en diferentes sistemas de fermentación (lote, lote alimentado y quimiostato), existen diversos aspectos que deben de ser atendidos con la finalidad de mejorar la producción y rendimiento de SHK, entre los que se destacan: (i) Incrementar la disponibilidad de los precursores del MCC PEP y E4P hacia la producción de SHK en cepas sobreproductoras, ya que aunque el mejor rendimiento reportado es de 0.29 mol

SHK/mol de glucosa, el rendimiento teórico máximo es de 0.86 (mol/mol); (ii) La posibilidad de utilizar en sistemas de fermentación cepas sin plásmidos para minimizar el efecto de carga metabólica sobre el crecimiento y producción de SHK, mediante la inserción en cromosoma de copias adicionales de los genes clonados como $aroG^{fbr}$, $aroF^{fbr}$, $aroB$ y $aroE$ bajo promotores fuertes o susceptibles de ser modulados; (iii) Minimizar la formación de compuestos aromáticos como el AQ y la acumulación de DHS, que afectan el rendimiento del SHK en sistemas de fermentación e interfieren con el proceso de extracción a partir de caldos de fermentación libres de células y (iv) Profundizar en el

conocimiento transcriptómico, proteómico y fluxómico de estas cepas en medios y condiciones de producción, lo que permitirá contar con mayores elementos para diseñar y redirigir nuevas estrategias de IVM para mejorar la capacidad de producción de este compuesto.

La influenza es una enfermedad que continuará estando presente en la vida cotidiana del hombre y a pesar de contar con compuestos antivirales y vacunas para su prevención y tratamiento, las características biológicas de estos virus hacen que exista la posibilidad permanente de brotes causados por nuevos virus de influenza con el riesgo real de convertirse en una nueva pandemia, por lo que resulta de gran importancia aumentar la disponibilidad de precursores para la síntesis de antivirales derivados del SHK. Por otro lado, la posibilidad del surgimiento de cepas mutantes de virus resistentes a los antivirales existentes en la actualidad requieren del desarrollo de nuevos antivirales que sean susceptibles de ser producidos también por vía microbiana en sistemas de fermentación.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el financiamiento otorgado por CONACYT proyectos 105782, 126793 y DGAPA-UNAM proyecto PAPIIT IN224709.

REFERENCIAS

Baez-Viveros JL, Osuna J, Hernandez-Chavez G, Soberon X, Bolivar F & Gosset G (2004) Metabolic engineering and protein directed evolution increase

the yield of L-phenylalanine synthesized from glucose in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* 87:516-524.

Baez-Viveros JL, Flores N, Juarez K, Castillo-Espana P, Bolivar F & Gosset G (2007) Metabolic transcription analysis of engineered *Escherichia coli* strains that overproduce L-phenylalanine. *Microb. Cell. Fact.* 6:1-20.

Balderas-Hernández VE, Sabido-Ramos A, Silva P, Cabrera-Valladares N, Hernández-Chávez G, Báez-Viveros JL, Martínez A, Bolívar F & Gosset G (2009) Metabolic engineering for improving anthranilate synthesis from glucose in *Escherichia coli*. *Microb. Cell. Fact.* 8:19.

Bertelli AAE, Mannari C, Santi S, Filippi C, Migliori M & Giovannini L (2008) Immunomodulatory activity of shikimic acid and quercetin in comparison with oseltamivir (Tamiflu) in a "in vitro" model. *J. Med. Virol.* 80:741-745.

Chandran SS, YiJ, Draths KM, von Daeniken R, Weber W & Frost JW (2003) Phosphoenolpyruvate availability and the biosynthesis of shikimic acid. *Biotechnol. Progr.* 19:808-804

Chávez-Bejar MI, Lara AR, Lopez H, Hernandez-Chavez G, Martinez A, Ramirez OT, Bolivar F & Gosset G (2008) Metabolic engineering of *Escherichia coli* for L-tyrosine production by expression of genes coding for the chorismate mutase domain of the native chorismate mutase prephenate dehydratase and a cyclohexadienyl dehydrogenase from *Zymomonas*

- mobilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:3284-3290.
- De Anda R, Lara AR, Hernández-Montalvo V, Gosset G, Bolivar F & Ramirez OT (2006) Replacement of the glucose phosphotransferase transport system by galactose permease reduces acetate accumulation and improves process performance of *Escherichia coli* for recombinant protein production without impairment of growth rate. *Metab. Eng.* 8:281-290.
- De Clercq E (2006) Antiviral agents active against influenza A viruses. *Nat. Rev. Drug. Disc.* 5:1015-1025.
- Escalante A, Valdivia A, Gosset G & Bolívar F (2009) Ingeniería de Vías metabólicas en *Escherichia coli* PTS- para la obtención de cepas sobreproductoras de shikimato. *Mens. Bioquim.* 13:171-180.
- Escalante A, Calderón R, Valdivia A, De Anda R, Hernández G, Ramírez OT, Gosset G & Bolívar F (2010) Metabolic engineering for the production of shikimic acid in an evolved *Escherichia coli* strain lacking the phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system. *Microb. Cell. Fact.* 9:1-12.
- Flores N, Leal L, Sigala JC, de Anda R, Escalante A, Martínez A, Ramirez OT, Gosset G & Bolivar F (2007) Growth recovery on glucose under aerobic conditions of an *Escherichia coli* strain carrying a phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system deletion by inactivating *arcA* and overexpressing the genes coding for glucokinase and galactose permease. *J. Mol. Microb. Biotechnol.* 13:105-116.
- Flores N, Xiao J, Berry A, Bolivar F & Valle F (1996) Pathway engineering for the production of aromatic compounds in *Escherichia coli*. *Nat. Biotechnol.* 14:620-623.
- Flores N, Flores A, Escalante A, de Anda R, Leal L, Malpica R, Georgellis D, Gosset G. & Bolivar F (2005) Adaptation for fast growth by differential expression of central carbon metabolism and gal regulon genes in an *Escherichia coli* strain lacking the phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system. *Metab. Eng.* 7:70-87
- Flores S, Flores N, de Anda R, Gonzalez A, Escalante A, Sigala JC, Gosset G & Bolivar F (2005) Nutrient-scavenging stress response in an *Escherichia coli* strain lacking the phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system, as explored by gene expression profile analysis. *J. Mol. Microb. Biotechnol.* 10:51-63.
- Gosset G, Yong-Xiao J & Berry A (1996) A direct comparison of approaches for increasing carbon flow to aromatic biosynthesis in *Escherichia coli*. *J. Ind. Microbiol.* 17:47-52.
- Gosset G (2005) Improvement of *Escherichia coli* production strains by modification of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system. *Microb. Cell. Fact.* 4:14.
- Hernández-Montalvo V, Martínez A, Hernandez-Chavez G, Bolívar F, Valle F & Gosset G (2003) Expression of *galP*

- and *glk* in a *Escherichia coli* PTS mutant restores glucose transport and increases glycolytic flux to fermentation products. *Biotechnol. Bioeng.* 83:687-694.
- Herrmann KM (1995) The shikimate pathway as an entry to aromatic secondary metabolism. *Plant Physiol.* 107:7-12.
- Herrmann KM & Weaver LM (1999) The shikimate pathway. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 50:473-503.
- Hudson GS & Davidson BE (1984) Nucleotide sequence and transcription of the phenylalanine and tyrosine operons of *Escherichia coli* K12. *J. Mol. Microbiol.* 180:1023-1051.
- Jefferson T, Jones M, Doshi P & Del Mar C (2009) Neuraminidase inhibitors for preventing and treating influenza in healthy adults: systematic review and meta-analysis. *Brit. Med. J.* 339:b5106
- Johansson L, Lindskog A, Silfversparre G, Cimander C, Nielsen KF & Lidén G (2005) Shikimic acid production by a modified strain of *E. coli* (W3110.shik1) under phosphate-limited and carbon-limited conditions. *Biotechnol. Bioeng.* 92:541-552.
- Johansson L & Lidén G (2006) Transcriptome analysis of a shikimic acid producing strain of *Escherichia coli* W3110 grown under carbon- and phosphate-limited conditions. *J. Biotechnol.* 126:528-545.
- Knop DR, Draths KM, Chandran SS, Barker JL & Frost JW (2001) Hydroaromatic equilibrium during biosynthesis of shikimic acid. *J. Am. Chem. Soc.* 123:10173-10182.
- Krämer M, Bongaerts J, Bovenberg R, Kremer S, Muller U, Orf S, Wubbolts M & Raeven L (2003) Metabolic engineering for microbial production of shikimic acid. *Metab. Eng.* 5:277-283.
- LaDuca RJ, Berry A, Chotani G, Dodge TC, Gosset G, Valle F, Liao JC, Yong-Xiao J & Power SD (1999) Metabolic pathway engineering of aromatic compounds. In: Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology. 2nd Ed. Demain AL and David JE (ed). ASM Press, Washington, D. C. pp 605-615.
- Lara AR, Vazquez-Limon C, Gosset G, Bolivar F, Lopez-Munguia A & Ramirez OT (2006) Engineering *Escherichia coli* to improve culture performance and reduce formation of by-products during recombinant protein production under transient intermittent anaerobic conditions. *Biotechnol. Bioeng.* 94:1164-1175.
- Lee S, Kim H, Park J, Park J & Kim T (2008) Metabolic engineering of microorganisms: general strategies and drug production. *Drug. Discov. Today.* 14:78-88.
- Liang-Deng N, Xiao-Xin S, Kwang H & Wei-Dong L (2009) A short and practical synthesis of oseltamivir phosphate (Tamiflu) from (-)-shikimic acid. *J. Org. Chem.* 74:3970-3973.
- Luo M (2006) Antiviral drugs fit for a purpose. *Nature.* 443:37-38.
- Martinez K, de Anda R, Hernandez G, Escalante A, Gosset G, Ramirez OT & Bolivar F (2008) Couitilization of glucose and glycerol enhances the production of

- aromatic compounds in an *Escherichia coli* strain lacking the phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system. *Microb. Cell. Fac.* 7:1-12.
- Morens DM, Taubenberg JK & Fauci AS (2009) The persistent legacy of the 1918 influenza virus. *New. Engl. J. Med.* 361: 225-229.
- Moscona A (2005) Drug therapy. Neuraminidase Inhibitors for Influenza. *New. Engl. J. Med.* 353:1363-1373.
- Neumann G, Noda T & Kawaoka Y (2009) Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. *Nature.* 459:931-9139.
- Ray J M, Yanofsky C & Bauerle R (1998) Mutational analysis of the catalytic and feedback sites of the tryptophan-sensitive 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 170: 5500-5506.
- Russell RJ, Haire LF, Stevens DJ, Collings PJ, Lin YP, Blackburn M, Hay AJ, Gamblin SJ & Skehel JJ (2006) The structure of H5N1 avian influenza neuraminidase suggests new opportunities for drug design. *Nature.* 443: 45-49.
- Stephanopoulos G & Sinskey A (1993) Metabolic engineering-methodologies and future prospects. *Trends Biotechnol.* 11: 392-396.
- Stephanopoulos G, Aristidou A & Nielsen J (1998) The essence of metabolic engineering. In: Stephanopoulos G, Aristidou A & Nielsen J (ed). Metabolic engineering: principles and methodologies. Academic. Press, San Diego, California. pp 1-20.
- Yi J, Draths KM, Li K & Frost JW (2003) Altered glucose transport and shikimate pathway product yields in *E. coli*. *Biotechnol. Progr.* 19: 1450–1459