

## Generación de un Sistema para la Integración y Expresión de Genes en el Cromosoma de *Escherichia coli*

Andrea Sabido, Alfredo Martínez, Francisco Bolívar, Guillermo Gosset\*  
*Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología, UNAM. Av. Universidad 2001, Col. Chamilpa. C. P. 62210, Cuernavaca, Morelos.*

\*Autor correspondiente: [gosset@ibt.unam.mx](mailto:gosset@ibt.unam.mx)

### RESUMEN

A partir del desarrollo de la tecnología del DNA recombinante, un gran número de genes se han aislado, caracterizado y expresado en diferentes células hospedero. Generalmente, los plásmidos han sido las herramientas moleculares utilizadas por excelencia, para expresar genes heterólogos de manera extracromosomal en *Escherichia coli*. No obstante, también se han desarrollado nuevas metodologías que permiten integrar y modificar genes a nivel del cromosoma bacteriano. En nuestro laboratorio, se generó el plásmido de expresión pLoxGentrc, el cual presenta un casete de resistencia a gentamicina escindible por el sistema Cre/loxP y secuencias que permiten la clonación y expresión de genes de interés bajo el control del promotor fuerte *trc*. El uso de este plásmido como templado para la generación de productos de PCR, permite integrar y expresar genes heterólogos en cualquier posición del genoma de *E. coli*. Para validar este sistema, se decidió utilizar como ejemplo al gen heterólogo *melA* de *Rhizobium etli* CFN42 y se evaluó el efecto de su expresión sobre la síntesis de melanina. Los rendimientos obtenidos correspondieron con un 50% y 75% de melanina a partir de tirosina comparadas con el máximo teórico ( $1.15 \text{ g}_{\text{Mel}}/\text{g}_{\text{Tyr}}$ ), para las cepas que expresan *melA* a partir de plásmido y en cromosoma, respectivamente. El sistema desarrollado permite la generación de cepas de *E. coli* capaces de expresar uno o más genes, de forma más estable que aquellas que los expresan en plásmidos. Las cepas generadas con este sistema podrán ser utilizadas en estudios básicos o como cepas de producción robustas en procesos biotecnológicos.

**Palabras clave:** plásmidos, integración cromosomal, promotor *trc*

### ABSTRACT

Since the advent of recombinant DNA technology, a large number of different genes have been isolated, characterized and expressed in a host cell. Plasmids have been the molecular tools par excellence for heterologous gene expression in *Escherichia coli*. However, new methods have also been developed to allow the stable integration of genes into the bacterium chromosome. For this purpose we developed the expression plasmid pLoxGentrc, which is composed of a removable

gentamycin-resistance cassette by the action of the *Cre/loxP* recombination system. In addition, this plasmid contains sequences for the efficient cloning and expression of a target gene under the control of the strong *trc* promoter. The use of this plasmid as a template for the generation of PCR products allows the integration and expression of heterologous genes in any *E. coli* chromosomal loci. In order to characterize this system we cloned the *melA* gene from *Rhizobium etli* CFN42 into the expression plasmid pLoxGen*trc*. We determined the effect of *melA* expression on the synthesis of melanin in two strains, one of them with the plasmid carrying the *melA* gene, while the other strain had the PCR product containing *melA* integrated into the *lacZ* locus of the W3110 parental strain chromosome. Melanin yields of 50% and 75% from tyrosine were obtained for each strain respectively, compared with the theoretical maximum.

**Key words:** *plasmids, chromosomal integration, trc promoter*

## INTRODUCCIÓN

A partir del desarrollo de tecnologías como la del DNA recombinante ha sido posible la generación de microorganismos con la capacidad de sobreproducir compuestos de interés industrial (Nielsen, 2001). La bacteria *Escherichia coli* ha sido utilizado en procesos biotecnológicos, como cepa hospedero para la expresión de genes propios, así como de otras especies (heterólogos) con el objetivo de producir proteínas y metabolitos específicos. Generalmente, es necesario un nivel de expresión alto de los genes de interés para producir grandes cantidades de la proteína requerida, para lo cual se hace uso de plásmidos en los que se introduce el DNA foráneo bajo el control de un promotor fuerte. Una vez expresado el gen de interés en la célula, la proteína resultante puede proveer al hospedero de nuevas capacidades metabólicas, como son la habilidad de producir nuevos metabolitos o bien sobreproducir compuestos nativos.

A pesar de la versatilidad y utilidad de los plásmidos como vectores de clonación, es sabido que la presencia de múltiples copias y la alta expresión del DNA que contienen, representa una “carga metabólica” para el organismo hospedero, ocasionando frecuentemente efectos adversos en su metabolismo, como lo es una disminución en la tasa específica de crecimiento ( $\mu$ ) de la bacteria (Glick, 1995). Sin embargo, si el interés es obtener una gran cantidad de una proteína en particular, entonces resulta conveniente el uso de vectores de expresión en multicopia.

En nuestro laboratorio se han construido un conjunto de vectores, muchos de ellos derivados de pBR322, que permiten introducir en la bacteria el DNA clonado y estabilizarlo de forma extracromosómica (Bolívar *et al.*, 1977). Entre estos derivados, destacan una familia de tres plásmidos (pBRINT-Ts) que además permiten integrar material genético en el locus cromosomal *lacZ* de *E. coli*, reduciendo de esta manera el

problema de la carga metabólica en la célula (debida al mantenimiento del número de copias del plásmido y a la expresión del gen de interés), así como la inestabilidad segregacional (Le Borgne *et al.*, 1998 y 2001). Otro de estos derivados, es el plásmido pLox1, el cual se desarrolló con el objetivo de eliminar los genes de resistencia a antibióticos del cromosoma bacteriano a través del sistema Cre/loxP, lo cual permite incrementar el repertorio de marcadores de selección disponibles para su uso en *E. coli* y otras bacterias (Palmeros *et al.*, 2000). Por otra parte, existen métodos actuales de reemplazo alélico que permiten, a través del uso de productos de PCR, insertar genes en cualquier locus del cromosoma bacteriano (Datsenko & Wanner, 2000; Kolisnychenko *et al.*, 2002; Fukiya *et al.*, 2004). En estos sistemas, la integración génica ya no está restringida a un determinado sitio en el cromosoma. Sin embargo, estas metodologías están diseñadas únicamente para llevar a cabo la inactivación de genes en el cromosoma de *E. coli*. Por esta razón, sería ideal generar nuevas herramientas moleculares, basadas tanto en el uso de plásmidos como de sistemas actuales de integración, que permitan no sólo inactivar sino también expresar genes a nivel cromosomal y que éstos sean estables, es decir, que logren contender con la pérdida de genes y con el efecto de carga metabólica, ambos factores impuestos tanto por la segregación como por el efecto multicopia de los plásmidos respectivamente. Por otra parte, el diseño de dichas herramientas

podrá permitir que la expresión cromosomal del gen de interés, pueda ser regulable o bien constitutiva, eliminando en este último caso la necesidad de un inductor. Asimismo, estas metodologías prescindirían del uso de antibióticos, lo cual tendría un importante impacto en reducir el costo de un proceso de producción.

En nuestro laboratorio estamos interesados en el desarrollo, la caracterización y el refinamiento de nuevas herramientas para ser utilizadas en el aislamiento y la manipulación del material genético. A partir de los resultados obtenidos de los vectores y sistemas generados por nuestro grupo, y basándonos en una metodología similar a la desarrollada por Datsenko & Wanner (2000), en este proyecto planteamos el desarrollo de un sistema molecular que permita integrar y expresar genes en el cromosoma de *E. coli*, de manera regulable y sin dejar marcadores de resistencia a antibióticos en las cepas modificadas. Al integrar genes en el cromosoma, se puede lograr contender con la pérdida de éstos como consecuencia de la segregación de los plásmidos.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### *Medios, preparación del inóculo y condiciones de crecimiento*

Las cepas utilizadas en este trabajo son mantenidas y crecidas rutinariamente en medio Luria-Bertani (LB) líquido o solidificado (Sambrook *et al.*, 1989). Para determinar el crecimiento y producción de melanina, se partió de una asada de glicerol congelado a -

# Artículos

70°C en LB y se transfirió a 50 mL de medio mínimo M9 suplementado con 2g/L de glucosa. Cuando los cultivos alcanzaron fase exponencial, se inoculó en medio mínimo fresco M9 suplementado con 0.1 mM de IPTG (Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido), 40 µg/mL de CuSO<sub>2</sub>, 2 g/L de glucosa y 0.4 g/L de L-tirosina en polvo, para iniciar a una densidad óptica a 600 nm (DO<sub>600</sub>) de aproximadamente 0.1. El antibiótico añadido se utilizó a una concentración final de 10 µg/ml de gentamicina cuando las cepas tenían plásmido y de 5 µg/ml para la integración en cromosoma. Todos los cultivos se realizaron en matraces bafleados de 250 mL a 30°C y 300 rpm en una incubadora de

agitación marca New Brunswick Scientific, modelo C24KC.

## Cepas y plásmidos

Las cepas de *E. coli* y los plásmidos utilizados y construidos en este trabajo se describen en la tabla 1. La cepa XL1-Blue de *E. coli* se utilizó para la propagación y amplificación de vectores del tipo pBR322 y derivados termo-sensibles del pSC101, así como en los experimentos de clonación y construcción de los plásmidos. La cepa W3110 se utilizó como hospedera para la integración del gen *lacZ* en el cromosoma bacteriano.

**Tabla 1.** Cepas y plásmidos utilizados y construidos en este trabajo.

Cepas	Características	Referencia
XL1-Blue	<i>supE44, hsdR17, recA1, endA1, gyrA46</i> (Na <sup>1</sup> <sup>R</sup> ), <i>thi, relA1, lac- F'</i> [ <i>traD36 proAB<sup>+</sup> lac<sup>f</sup> lacZΔM15</i> , Tn10 (Tet <sup>R</sup> )]. Cepa transformable a eficiencias altas y deficiente en los sistemas de recombinación homóloga. El F' de esta cepa permite la selección de colonias blancas/azules en XGal.	(Sambrook <i>et al.</i> , 1989)
W3110 Trp <sup>+</sup>	F <sup>-</sup> , λ <sup>-</sup> , INV ( <i>rnnD-rnnE</i> )1, RecA <sup>+</sup> , Lac <sup>+</sup> , Trp <sup>+</sup> por transducción generalizada con el fago P1.	Colección del laboratorio.
W3110/pTrc <i>melA</i>	Igual que la cepa W3110 Trp <sup>+</sup> pero Cb <sup>R</sup> y expresando el gen <i>melA</i> bajo regulación del P <sub>trc</sub> .	(Cabrera <i>et al.</i> , 2006)
W3110/pLoxGentrc	Igual que la cepa W3110 Trp <sup>+</sup> , pero Gm <sup>R</sup> y transformada con un plásmido de expresión en el que es posible clonar cualquier gen bajo regulación del P <sub>trc</sub> .	Este trabajo
W3110/pLoxGentrc <i>melA</i>	Igual que la cepa anterior y productora de melanina debido a la clonación del gen <i>melA</i> .	Este trabajo

# Artículos

W3110/ <i>lacZ::P<sub>trc</sub>melA, loxP-aacC1-loxP</i>	Derivada de la cepa W3110 con un casete de expresión ( <i>P<sub>trc</sub>melA, loxP-aacC1-loxP</i> ) integrado en el gen cromosomal <i>lacZ</i> .	Este trabajo
<b>Plásmidos</b>	<b>Características</b>	<b>Referencia</b>
pKD46	Amp <sup>R</sup> , porta los genes $\gamma$ , $\beta$ y <i>exo</i> de la recombinasa Red del fago $\lambda$ bajo regulación de <i>P<sub>araB</sub></i> y con las funciones de replicación termosensibles del plásmido pSC101.	(Datsenko & Wanner, 2000)
pTrc99A	Amp <sup>R</sup> , presenta el promotor fuerte híbrido <i>trc</i> formado por la secuencias de la caja -35 de <i>P<sub>trp</sub></i> y -10 de <i>P<sub>lacUV5</sub></i> , el sitio de unión a ribosoma de <i>lacZ</i> , un MCS de pUC18 y los terminadores ribosomales <i>rrnB</i> . Reprimido por el producto del gene <i>lacI<sup>f</sup></i> e inducible por IPTG.	(Amann <i>et al.</i> , 1988)
pTrc <i>melA</i>	Derivado del pTrc99A y además tiene clonado el gen <i>melA</i> que codifica para la tirosinasa de <i>Rhizobium etli</i> .	(Cabrera <i>et al.</i> , 2006)
pLoxGen4	Amp <sup>R</sup> , Gm <sup>R</sup> , derivado del vector pLox1 (20 copias por célula) que lleva clonado el gen <i>aacC1</i> (Gm <sup>R</sup> ) entre las secuencias <i>loxP</i> .	(Palmeros <i>et al.</i> , 2000)
pLoxGen <i>trc</i>	Derivado de pLoxGen4 con la inserción de un fragmento proveniente de pTrc99A, el cual lleva el gen que codifica para el represor <i>lacI</i> , la secuencia de <i>P<sub>trc</sub></i> , el sitio múltiple de clonación (MCS) y los terminadores <i>rrnB</i> .	Este trabajo
ploxGen <i>trc</i> <i>melA</i>	Derivado de pLoxGen <i>trc</i> y además tiene clonado el gen <i>melA</i> que codifica para la tirosinasa de <i>Rhizobium etli</i> .	Este trabajo

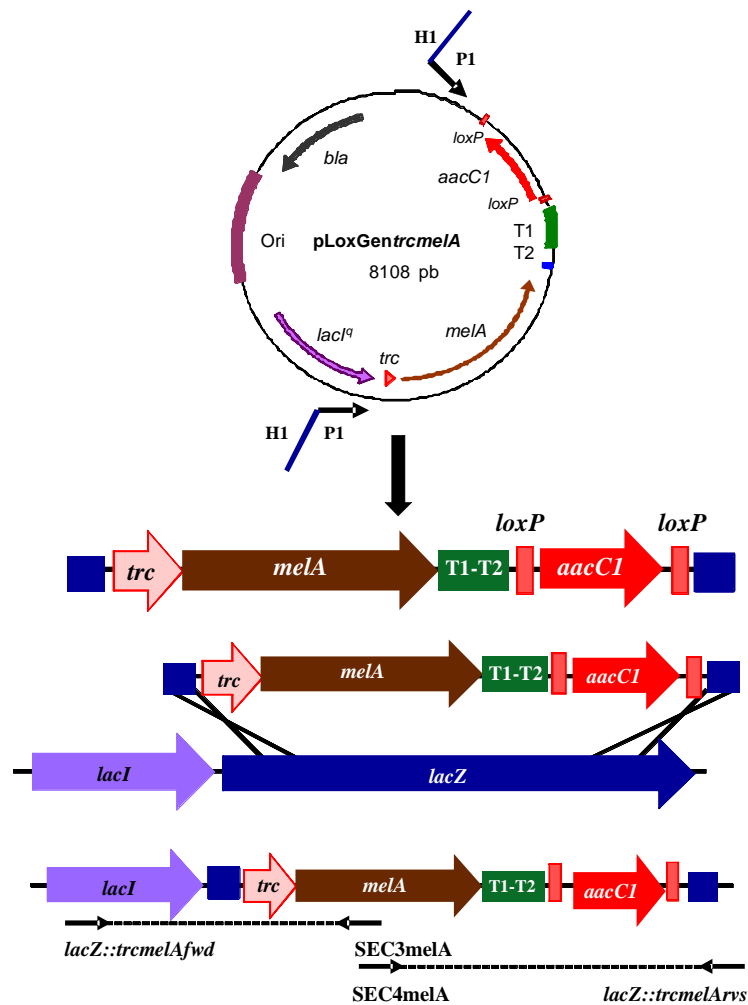
## Generación de productos de PCR e integración cromosomal

Mediante una estrategia metodológica similar al sistema de inactivación cromosomal de genes de Datsenko & Wanner (2000), se utilizó como templado el plásmido pLoxGen*trc**melA* para obtener un producto

de PCR de aproximadamente 3.7 Kb, el cual contiene el gen que codifica para el casete de resistencia a gentamicina (*aacC1*) flanqueado por sitios *loxP* y el gen *melA* bajo control de *P<sub>trc</sub>*. Este producto está flanqueado en su extremo 3' por 20 pb homólogas al pLoxGen*trc**melA* y en su extremo 5' por 45

pb homólogas al gen cromosomal *lacZ* que se desea inactivar. Para todas las reacciones de PCR, se utilizó la enzima *Elongasa* (Invitrogen, Inc.). Los productos de PCR fueron purificados de gel de agarosa y digeridos con la enzima *DraI*, cuyos sitios de restricción se localizan en el plásmido

*pLoxGentrcmeIA*, fuera de la región a amplificar. Posteriormente la cepa W3110 de *E. coli* que expresaba previamente el plásmido pKD46 (Datsenko & Wanner, 2000), se transformó con 4  $\mu$ L del producto de PCR, dejándose recuperar en medio SOC por aproximadamente 4 horas a 30°C y 300 rpm.



**Fig. 1.** Estrategia para la integración y expresión de genes en el cromosoma de *E. coli*. H1 y H2: región de homología con *lacZ*; P1 y P2: región de homología con *pLoxGentrcmeIA*.

Para seleccionar las clonas con la integración deseada se verificó su resistencia a gentamicina y su fenotipo *lacZ* en placas

de LB sólido con 33  $\mu$ g/mL de X-Gal (5-Bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido) e IPTG 100  $\mu$ M. Todas las

integraciones se verificaron mediante PCR amplificaban cada uno de los extremos donde ocurrió la integración: *lacZ::trcmeIAfwd* (GTGGAAGCTGCCTGCACTAA) y *SEC3meIA* (ATTGTCCTTGCCGTCGGGCG) para uno de los extremos y *lacZ::trcmeIArvs* (GTGGCGAACGATGAGCCAAT) y *SEC4meIA* (ATCGGTGGCTGGATGCCGGA) para el extremo contrario (Fig. 1 y 5).

### *Determinación del crecimiento bacteriano y la síntesis de melanina*

El crecimiento bacteriano se cuantificó en función de la turbidez, midiendo la absorbancia de los cultivos a 600 nm en un espectrofotómetro Beckman DU-70. Una vez que la célula alcanza la fase estacionaria e inicia la producción de melanina, el crecimiento se obtiene a partir de la resta de la  $DO_{600nm}$  del medio de cultivo con células, de la  $DO_{600nm}$  del sobrenadante libre de células, ya que la melanina interfiere con la absorbancia de las células a 600 nm (Lagunas-Muñoz *et al.*, 2006). La absorbancia resultante es convertida a peso seco mediante la relación  $1 DO_{600nm} = 0.37$  gDCW/L (DCW = peso seco de células) (Hernández-Montalvo *et al.*, 2001). Para cuantificar la melanina, se midió la  $DO_{400nm}$  en el sobrenadante y se convirtió a peso seco utilizando la relación  $1 DO_{400nm} = 0.0676$  g/L eumelanina. Este último valor representa el inverso del coeficiente de extinción de la eumelanina (Lagunas-Muñoz *et al.*, 2006).

utilizando 2 pares de oligonucleótidos que

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### *Construcción del plásmido de expresión pLoxGentrc*

Con el objetivo de evitar la redundancia de sitios de restricción entre el plásmido receptor y el producto de PCR que se desea clonar, se trabajó con el plásmido pLoxGen4 (Palmeros *et al.*, 2000). Asimismo, se eliminó de este plásmido el sitio que reconoce la enzima *HindIII* y se verificó mediante secuenciación realizando un alineamiento local (Fig. 2). De igual manera, se confirmó su eliminación, así como la generación de un nuevo sitio, *NheI* (**GCT AGC**), mediante patrón de restricción (Fig.3a, carril 4, 6 y 7). Posteriormente, se amplificó mediante PCR un fragmento proveniente del pTrc99A, el cual lleva el gene que codifica para el represor *lacI* bajo el control del promotor *lacI<sup>f</sup>*, la secuencia del promotor fuerte *trc* ( $P_{trc}$ ), el sitio múltiple de clonación (MCS) y los terminadores ribosomales *rrnB* (T1 y T2). Este producto de PCR se clonó en el plásmido pLoxGen4 $\Delta$ *HindIII* para dar lugar al pLoxGentrc (No. de acceso GenBank: JF934954).

Una vez generado dicho plásmido, se transformó en la cepa XL1-Blue y se realizó un tamizado de las clonas utilizando la enzima *NcoI*. La digestión del pLoxGentrc con esta enzima generó un fragmento esperado de 6.3 Kb (Fig. 3B), el cual corresponde con el tamaño del plásmido generado.

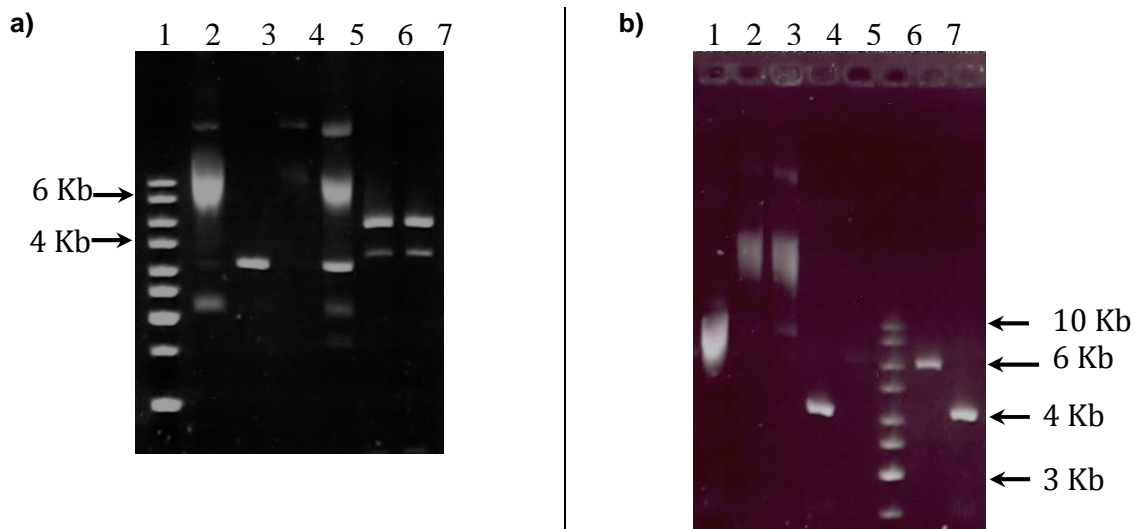


Alignment: Local DNA homologies.  
 Parameters: Both strands. Method: FastScan - Max Score

Mol 1 pLoxGen4 (1-4239) Mol 2 pLoxGensinHindIII (1-475)  
 Number of sequences to align: 2  
 Settings: Similarity significance value cutoff: >= 60%

pLoxGen4	682	cagtgccaagct---taaggtgcacggcccacgtggccactagtacttctcgaggtcga
pLoxGensinHi	123	cagtgccaagctagcttaaggtgcacggcccacgtggccactagtacttctcgaggtcga
pLoxGen4	738	cggtatcgataagctggatccataacttcgtataatgtatgctatacgaagttactagc
pLoxGensinHi	183	cggtatcgataagctggatccataacttcgtataatgtatgctatacgaagttactacc

**Fig. 2.** Comprobación de la pérdida del sitio *HindIII* mediante alineamiento local de la secuencia del pLoxGen4 (GenBank: AJ401048). En sombreado se muestran las regiones homólogas; las líneas punteadas dentro del alineamiento representa ausencia de bases; enmarcados se señalan el nuevo sitio *NheI* ••••, el MCS-Left — y uno de los sitios de recombinación *loxP* —•—.



**Fig. 3. a)** Patrón de restricción del pLoxGen4Δ*HindIII*. Carril 1: Marcador 1 Kb plus, 2: pLoxGen4 (superenrollado), 3: pLoxGen4 digerido con *HindIII*, 4: pLoxGen4Δ*HindIII* digerido con *HindIII*, 5: pLoxGen4 digerido con *NheI* (observar que el perfil es idéntico al del carril 2, únicamente las bandas inferiores se encuentran más teñidas en este caso que con respecto al carril 1), 6 y 7: clonas 21 y 35 digeridas con *NheI*. **b)** Patrón de restricción de las clonas 21 y 35. Carril 1: pLoxGen4 (superenrollado), 2: pLoxGentrc clona 21, 3: pLoxGentrc clona 35, 4 y 8: pLoxGen4 digerido con *NcoI* (4.2 Kb) 5: clona 21 digerida con *NcoI* (6.3 Kb), 6: marcador 1 Kb plus, 7: clona 35 digerida con *NcoI* (6.3 Kb).

Con la finalidad de verificar la integridad de las cajas -10 y -35 del  $P_{trc}$ , ya que a partir

de este promotor se expresará el gen de interés, se secuenció el DNA plasmídico de 2



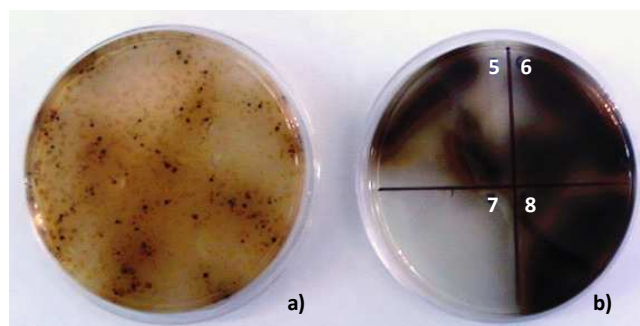
clonas (21 y 35), confirmándose su integridad. Asimismo, el marco de lectura del casete *loxP-aacC1-loxP* se encontró en fase (datos no mostrados).

El plásmido pLoxGentrc permite la clonación y la expresión de cualquier gen de interés bajo el control del  $P_{trc}$ . Este vector posee un sitio de unión a ribosoma para la traducción eficiente del gen que se quiere expresar. Además, la presencia del sitio único *NcoI* (CCA TGG) corriente abajo del  $P_{trc}$ , permite la expresión directa de cualquier gen que porte dicho sitio de restricción en su codón de inicio (Amann *et al.*, 1988). Por otra parte, la presencia de dos sitios múltiples de clonación, uno corriente arriba del casete *loxP-aacC1-loxP* y el segundo proveniente del plásmido pTrc99A (MCS<sub>trc</sub>), permiten el uso de varias enzimas de restricción para la inserción de secuencias de DNA adicionales. Por su parte, la presencia del gen que

codifica para el represor LacI en este plásmido permite la regulación del  $P_{trc}$  mediante la adición de IPTG. Por lo tanto, el plásmido pLoxGentrc puede utilizarse en cepas *lacI*<sup>-</sup>.

### Construcción del plásmido pLoxGentrcmelA

Para validar la funcionalidad del vector generado, el gen *melA* obtenido de *Rhizobium etli* CFN42 se clonó en el plásmido pLoxGentrc. Posteriormente la cepa W3110 de *E. coli* se transformó con el plásmido generado, pLoxGentrcmelA, y las transformantes se seleccionaron con base en su coloración café, resultado de la síntesis del polímero eumelanina (Fig. 4a). Finalmente, para verificar la integridad del gen *melA* se enviaron a secuenciar las clonas 5, 6 y 8 (Fig. 4b) y no se observaron cambios en su secuencia nucleotídica (datos no mostrados).



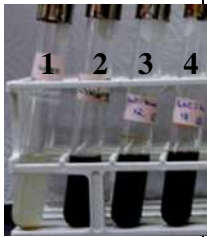
**Fig. 4.** Producción de melanina por la cepa de *E. coli* W3110/pLoxGentrcmelA. **a)** Transformantes crecidas en placas de LB sin tirosina; **b)** Clonas seleccionadas de (a) en cajas de LB suplementadas con 0.4 g/L de tirosina. Control negativo: clona 7.

## *Integración del gen heterólogo melA en el gen cromosomal lacZ de E. coli*

Utilizando una metodología similar a la de Datsenko & Wanner (2000), el plásmido pLoxGentrcmelA se utilizó como templado para la generación de un producto de PCR de 3.7 pb, el cual contiene el gen que codifica para el casete de resistencia a gentamicina flanqueado por sitios *loxP* y el gen *melA* bajo control de  $P_{trc}$ . Se eligió interrumpir el gen cromosomal *lacZ* debido a que la enzima codificada por este gen confiere un fenotipo característico y fácilmente reconocible a las

cepas que lo expresan. Además, su eliminación no compromete la sobrevivencia de la bacteria en un medio con glucosa. Finalmente, la cepa W3110 fue transformada con el producto de PCR, obteniéndose un total de 14 transformantes, de las cuales 2 presentaron coloración “blanca” en presencia de X-Gal y resistencia al antibiótico gentamicina. Asimismo, se verificó que ambas mutantes expresaran el gen *melA* y como consecuencia fueran capaces de producir melanina (Tabla 2).

**Tabla 2.** Cuantificación de las transformantes de la cepa W3110 con el producto de PCR que expresa el casete de expresión. El recuadro sombreado muestra el número de colonias en las que ocurrió la sustitución del gen cromosomal *lacZ* por el producto de PCR. En la fotografía, 1:W3110, 2:W3110/pLoxGentrcmelA, 3 y 4:W3110/*lacZ::trcmelA*, *loxP-aacC1-loxP* clona 12 y 18 respectivamente.

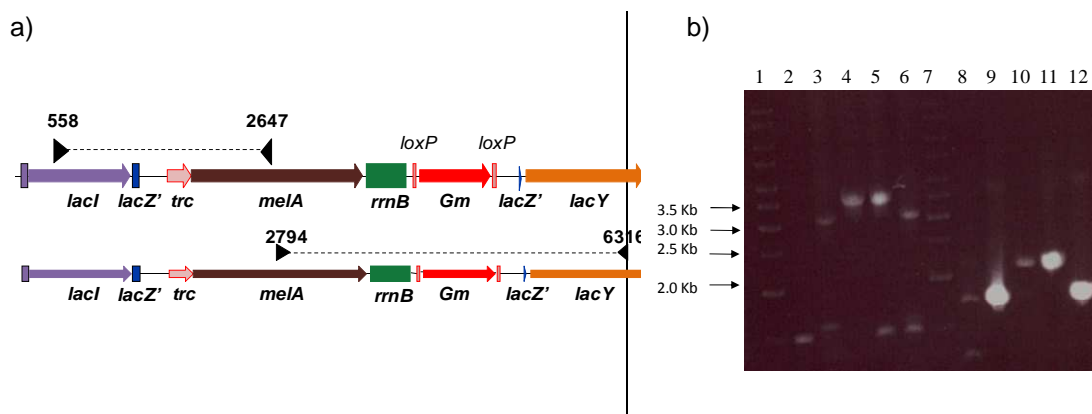
Coloni as totales	No. de colonias	Fenotipo			
		Anb <sup>R</sup>	<i>lacZ</i>	<i>melA</i> <sup>+</sup>	
16	14	Cb <sup>R</sup> Gm <sup>R</sup>	+ (azul)	√	
	2	Cb <sup>S</sup> Gm <sup>R</sup>	- (blan co)	√	

En los experimentos realizados, encontramos una mayoría de transformantes resistentes a antibiótico que contienen el plásmido templado y no el producto de PCR (Tabla 2 y Fig. 5b, carril 6 y 12), al parecer éstas escaparon de la digestión con *Dral*, (lo cual se hizo para eliminar el DNA

plasmídico). Aparentemente, estos resultados se deben al uso del plásmido pLoxGentrcmelA como templado, el cual no se trata de un plásmido suicida ni termosensible, por lo que se sugiere utilizar otro tipo de enzimas como *DpnI*, para eliminar el DNA metilado (no-amplificado), o

bien obtener el fragmento de interés a partir de la digestión del pLoxGentrcmeIA, y una vez liberado el DNA lineal utilizarlo como templado para la reacción de PCR. Como se menciona en la metodología, en este trabajo el producto de PCR obtenido a partir del plásmido templado pLoxGentrcmeIA, fue digerido con *DraI* y la banda correspondiente purificada de gel de agarosa. Finalmente, la

integración del casete de expresión se confirmó mediante amplificación por PCR obteniéndose fragmentos de aproximadamente 2.1 Kb y 3.5 Kb que corresponden con la integración del casete de expresión (Fig.5b). Las colonias derivadas de W3110 con la integración cromosomal verificada se nombraron W3110/*lacZ::trcmelA, loxP-aacC1-loxP*.



**Fig. 5.** Comprobaciones por PCR de las integraciones en el gen *lacZ*. **a)** Esquema representativo en donde se indica en la parte superior de los genes, la posición en la cual hibridan los dos pares de oligonucleótidos utilizados: ***lacZ::trcmelA*fwd(558)-*SEC3meIA*(2647)** y ***lacZ::trcmelArvs*(6316)-*SEC4meIA*(2794)** respectivamente, **b)** gel analítico en donde 1: Marcador 1Kb plus, con oligos ***lacZ::trcmelArvs-SEC4meIA***: 2: DNA cromosomal de W3110 3: pLoxGentrcmeIA y 6: clona "azul" Cb<sup>R</sup>Gm<sup>R</sup>, 4 y 5: candidatas W3110/*lacZ::trcmelA, loxP-aacC1-loxP* (3.5 Kb), 7: Marcador 1Kb plus, con oligos ***lacZ::trcmelA*fwd-*SEC3meIA***: 8, 9 y 12: controles negativos, igual que 2, 3 y 6, 10 y 11: candidatas W3110/*lacZ::trcmelA, loxP-aacC1-loxP* (2.1 Kb).

A pesar de que existe un sistema de inactivación de genes cromosomales ya reportado, el cual utiliza a la recombinasa Flp y los sitios de reconocimiento *frt* (Datsenko & Wanner, 2000), en nuestro sistema al tiempo que se lleva a cabo la inactivación, es posible la expresión de genes en cromosoma. Por otra parte, no se excluye la posibilidad de

trabajar con ambos sistemas, siendo una de las ventajas el alternar el uso de las recombinasas Cre y Flp, ya que de esta manera se disminuye la recombinación sitio-específica entre los sitios *loxP* que se vayan acumulando en el cromosoma de la bacteria, pudiendo con ello ocasionar deleciones de grandes segmentos de DNA cromosomal.

*Efecto de la expresión del gen heterólogo melA en el cromosoma de la cepa silvestre W3110 de E. coli sobre su capacidad de sintetizar melanina* Una vez validado nuestro sistema de integración cromosomal, se llevó a cabo la caracterización de la cepa W3110/*lacZ::trcmelA*, *loxP-aacC1-loxP*. La presencia del gen silvestre *lacI* en el cromosoma de *E. coli*, regula de manera negativa a *trc* y por lo tanto la expresión de *melA*, por lo que es necesaria la adición al medio de cultivo del inductor gratuito IPTG. Así mismo, se caracterizó la cepa W3110/pLoxGentrc*melA*, en este caso el plásmido posee tanto la versión mutante del represor LacI (mutación denominada I<sup>q</sup> que genera un cambio de una C por una T en la caja -35 del P<sub>*lacI*</sub>, incrementando el número del represor a 100 moléculas/célula), así como la versión cromosomal silvestre, lo que hace la expresión del gen de interés igualmente regulable.

Cuando la cepa silvestre W3110 se transformó con el plásmido pLoxGentrc, su observó un decremento considerable en su  $\mu$  del 41% con respecto a la cepa W3110. Por su parte, como consecuencia de la expresión del gen *melA* en dicho plásmido, la  $\mu$  de la cepa W3110/pLoxGentrc*melA* disminuyó aún más, de 0.27 a 0.13 h<sup>-1</sup>, es decir un 52% con respecto a la cepa W3110 (Tabla 3). En este caso, no sólo incrementa el tamaño del plásmido (8.0 Kb), sino que ahora se expresan dos genes (*aacC1* y *melA*). Además, el promotor híbrido P<sub>*trc*</sub> a partir del cual se transcribe *melA* es tan fuerte que existe una expresión basal incluso en

ausencia del inductor (datos no mostrados). Debido a lo anterior, es lógico pensar que la carga metabólica en la cepa W3110/pLoxGentrc*melA* es mayor con respecto a la cepa W3110/pLoxGentrc. Por otro lado, cuando el gen *melA* se integra en el cromosoma de la cepa W3110, la  $\mu$  de esta cepa se recupera en un 96% con respecto a la silvestre; mientras que comparada con la cepa W3110/pLoxGentrc*melA*, la integración en cromosoma de dicho gen ocasionó un incremento del doble en su  $\mu$ . En cuanto a la producción de melanina, la cepa W3110/*lacZ::trcmelA*, *loxP-aacC1-loxP* logró acumular 0.35 g/L de melanina al final del cultivo (Fig. 6b), lo cual corresponde con un Y<sub>Mel/Tyr</sub> del 75% respecto al máximo teórico (1.15 g<sub>Mel</sub>/g<sub>Tyr</sub>), el cual se obtuvo considerando que cada molécula de tirosina da origen a una molécula de ácido 5,6-dihidroindol-2-carboxílico, siendo ésta el monómero que conforma la eumelanina (Lagunas-Muñoz *et al.*, 2006). Por su parte, la velocidad específica de producción de melanina (q<sub>Mel</sub>) en dicha cepa incrementó en un 67% con respecto a la cepa con plásmido (Tabla 3).

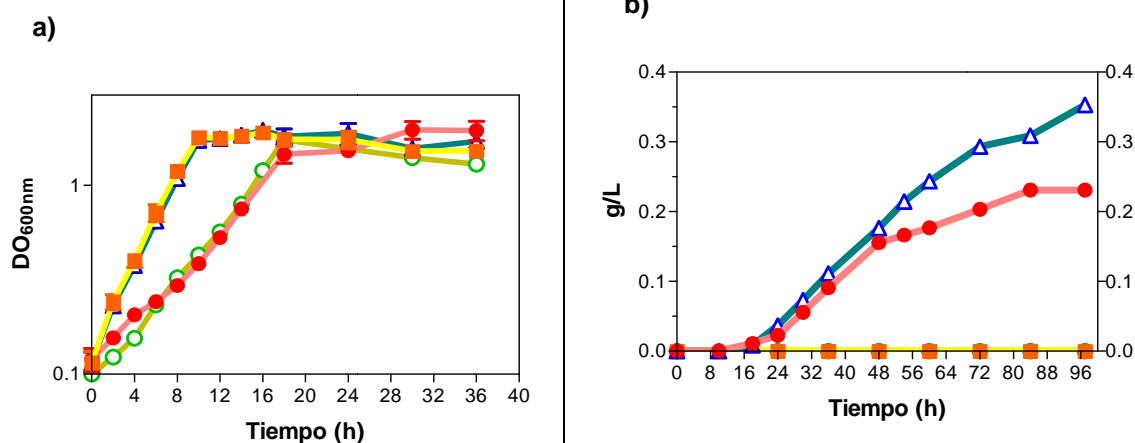
La integración en cromosoma de una copia del gen heterólogo *melA* resultó ser la mejor estrategia para incrementar la producción de melanina en la cepa W3110 bajo las condiciones utilizadas en este estudio, ya que se elimina la carga metabólica impuesta por la expresión de *melA* en multicopia, restableciéndose de esta manera la  $\mu$  de la cepa W3110/*lacZ::trcmelA*,

*loxP-aacC1-loxP* con respecto a la de la silvestre. Asimismo, el sistema de integración y expresión, diseñado y caracterizado en este trabajo, contribuyó a mejorar la cepa productora de melanina, al eliminar la necesidad del antibiótico. Por otro lado, este

sistema también puede ser utilizado para realizar una integración directamente sobre el gen silvestre *lacI*, con lo cual se inactivaría la síntesis del represor y se lograría la eliminación del uso del inductor IPTG.

**Tabla 3.** Comparación de parámetros cinéticos entre las diferentes cepas generadas en este estudio. DW: peso seco.

	W3110	W3110/ pLoxGentrc	W3110/pLox Gentrc <i>melA</i>	W3110/ <i>lacZ::trcme IA, loxP- aacC1-loxP</i>
$\mu$ ( $h^{-1}$ )	$0.27 \pm 0.005$	$0.16 \pm 0.002$	$0.13 \pm 0.005$	$0.26 \pm 0.007$
Melanina acumulada (g/L)	----	----	$0.23 \pm 0.016$	$0.35 \pm 0.012$
$q_{Mel}$ (mg Mel/ g DW x h)	----	----	$3.73 \pm 0.108$	$6.23 \pm 0.235$
$Y_{Mel/Tyr}$ (%)	----	----	49	75



**Fig. 6.** Caracterización del **a)** crecimiento y **b)** producción de melanina en las cepas que expresan el gen heterólogo *melA* bajo control del promotor  $P_{trc}$ , a nivel multicopia  $\bullet$  W3110/pLoxGentrc*melA*, y monocopia  $\blacktriangle$  W3110/*lacZ::trcmeIA, loxP-aacC1-loxP*. También se muestran las cepas controles  $\blacksquare$  W3110 y  $\circ$  W3110/pLoxGentrc.

## CONCLUSIONES

El plásmido de expresión pLoxGentrc, permite la clonación y expresión regulada de genes bajo el control transcripcional del promotor fuerte  $P_{trc}$ . Este plásmido también fue diseñado para funcionar como templado de PCR, permitiendo la integración y expresión de genes en el cromosoma de *E. coli* en 4 pasos: 1) Generación del producto de PCR a partir del plásmido de expresión pLoxGentrc, el cual previamente expresa el gen de interés bajo control del promotor fuerte  $P_{trc}$ , 2) Transformación de la cepa hospedero y recombinación homóloga mediada por el sistema  $\lambda$ -Red, 3) Selección de las transformantes por su resistencia a gentamicina y 4) Opcionalmente, la eliminación del casete de resistencia. Asimismo, el uso del plásmido pLoxGentrc, permitió expresar el gen *melA* tanto a nivel multicopia como en monocopia, generando cepas productoras de melanina con la capacidad de crecer y sintetizar este pigmento, siendo ambas características más eficientes en la cepa que expresa *melA* en cromosoma que en multicopia. De esta manera, la herramienta molecular generada en este trabajo permitió la expresión estable de *melA*, evitando su pérdida así como el efecto de carga metabólica. Al verse disminuido este último factor, la  $\mu$  de la cepa

## AGRADECIMIENTOS

A Luz María Martínez y Mercedes Enzaldo por su apoyo técnico. Para la

que presenta el gen *melA* en cromosoma, incrementó en un 50% comparada con la cepa W3110/pLoxGentrc*melA*.

Una de las características relevantes de esta herramienta, es la de prescindir del uso de antibióticos, lo cual es una ventaja importante en los procesos de producción. Por otro lado, la integración génica ya no está restringida a un determinado sitio en el cromosoma, permitiendo la inserción de genes heterólogos en cualquier posición del genoma de *E. coli*, siempre y cuando no se trate de genes esenciales para el microorganismo. Dependiendo del sitio de inserción, es posible que la expresión cromosomal del gen de interés, pueda ser regulable o bien constitutiva, eliminando en este último caso la necesidad de un inductor.

Por su parte, la integración a cromosoma de una copia del gen heterólogo *melA*, resultó ser la mejor estrategia para la producción de melanina, lográndose un título 52% mayor que el alcanzado en la cepa W3110/pLoxGentrc*melA*.

Como consecuencia la  $q_{Mel}$  en la cepa W3110/*lacZ::trcmelA*, *loxP-aacC1-loxP*, incrementó un 67% comparada con la cepa que expresa *melA* en multicopia, para alcanzar finalmente un  $Y_{Mel/Tyr}$  del 75% con respecto al máximo teórico.

realización de este trabajo se contó con el apoyo económico del CONACyT a través del proyecto D43243.

## REFERENCIAS

- Amann E, Ochs B, Abel KJ (1988) Tightly regulated *tac* promoter vectors useful for the expression of unfused and fused proteins in *Escherichia coli*. *Gene*. 69: 301-315.
- Bolívar F, Rodríguez R, Greene P, Betlach M, Heyneker H, Boyer H, Crosa J & Falkow S (1977) Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene*. 2: 95-113.
- Cabrera N, Martínez A, Piñero S, Lagunas V, Tinoco R, de Anda R, Vázquez R, Bolívar F & Gosset G (2006) Expression of the *mela* gene from *Rhizobium etli* CFN42 in *Escherichia coli* and characterization of the encoded tyrosinase. *Enzym Microb Tech*. 38: 772-779.
- Datsenko K & Wanner B (2000) One step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *PNAS*. 97: 6640-6645.
- Fukiya S, Mizoguchi H & Mori H (2004) An improved method for deleting large regions of *Escherichia coli* K-12 chromosome using a combination of *Cre/loxP* and  $\lambda$  Red. *FEMS Microbiol Lett*. 234: 325-331.
- Glick B (1995) Metabolic load and heterologous gene expression. *Biotechnol Adv*. 13: 247-261.
- Hernández-Montalvo V, Valle F, Bolívar F & Gosset G (2001) Characterization of sugar mixtures utilization by an *Escherichia coli* mutant devoid of the phosphotransferase system. *Appl Microbiol Biotechnol*. 57:186-191.
- Kolisnychenko V, Plunkett G, Herring C, Fehér T, Pósfai J, Blattner F & Pósfai G (2002) Engineering a reduced *Escherichia coli* genome. *Genome Res*. 12: 640-647.
- Lagunas-Muñoz V, Cabrera-Valladares N, Bolívar F, Gosset G & Martínez A (2006) Optimum melanin production using recombinant *Escherichia coli*. *J Appl Microbiol*. 101: 1002-1008.
- Le Borgne S, Palmeros B, Valle F, Bolívar F & Gosset G (1998) pBRINT-T<sub>s</sub>: a plasmid family with a temperature-sensitive replicon, designed for chromosomal integration into the *lacZ* gene of *Escherichia coli*. *Gene*. 223: 213-219.
- Le Borgne S, Palmeros B, Valle F, Bolívar F & Gosset G (2001) Improvement of the pBRINT-T<sub>s</sub> plasmid family to obtain marker-free chromosomal insertion of cloned DNA in *E. coli*. *BioTechniques*. 30: 252-256.
- Nielsen J (2001) Metabolic engineering. *Appl Microbiol Biotechnol*. 55: 263-283.
- Palmeros B, Wild J, Szybalski W, Le Borgne S, Hernández G, Gosset G, Valle F & Bolívar F (2000) A family of removable cassettes designed to obtain antibiotic-resistance free genomic modifications of *Escherichia coli* and other bacteria. *Gene*. 247: 255-264.
- Sambrook J, Fritsch E & Maniatis T (1989) Molecular cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY.