

UNIVERSIDAD DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

Dinámica de la acetilación de *Escherichia coli* para
mejorar sus capacidades biotecnológicas

Gema Lozano Terol

2022

UNIVERSIDAD DE MURCIA

Facultad de Química

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular B e
Inmunología

**Dinámica de la acetilación de *Escherichia coli* para
mejorar sus capacidades biotecnológicas**

TESIS DOCTORAL

Gema Lozano Terol

DIRECTORES

Dra. Teresa de Diego Puente

Dr. Manuel Cánovas Díaz

Murcia, 2022

Durante su doctorado, Gema Lozano Terol ha sido beneficiaria de una Beca de Formación de Personal Investigador (FPI, Fundación Séneca, ref: 20715/FPI/18) y de una ayuda para estancias cortas de investigación (Fundación Séneca) en la Universidad de Kent.

Esta Tesis Doctoral ha sido financiada por los proyectos MICINN BIO2014-54411-C2-1-R, MCIU RTI2018-094393-B-C21, Fundación Séneca 20786/PI/18 y EPIC-XS-0000347.

Durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral, Gema Lozano Terol ha contribuido a las siguientes publicaciones:

Artículos científicos:

- Gallego-Jara J, Écija Conesa A, de Diego Puente T, **Lozano Terol G**, Cánovas Díaz M. Characterization of CobB kinetics and inhibition by nicotinamide. PLoS One. 2017; 12: 1–19. doi: 10.1111/mmi.12950
- Gallego-Jara J, **Lozano Terol G**, Écija Conesa A, Zambelli B, Cánovas Díaz M, de Diego Puente T. Characterization of acetyl-CoA synthetase kinetics and ATP-binding. Biochim Biophys Acta - Gen Subj. 2019; 1863: 1040–1049. doi: 10.1016/j.bbagen.2019.03.017
- **Lozano Terol G**, Gallego-Jara J, Sola Martínez RA, Cánovas Díaz M, De Diego Puente T. Engineering protein production by rationally choosing a carbon and nitrogen source using *E. coli* BL21 acetate metabolism knockout strains. Microb Cell Fact. 2019; 18:1–19. doi: 10.1186/s12934-019-1202-1
- Sola Martínez RA, Pastor Hernández JM, **Lozano Terol G**, Gallego-Jara J, García-Marcos L, Cánovas Díaz M, et al. Data preprocessing workflow for exhaled breath analysis by GC/MS using open sources. Sci Rep. 2020; 10 :1–11. doi: 10.1038/s41598-020-79014-6
- Gallego-jara J, **Lozano Terol G**, Sola-Martinez RA, Cánovas Díaz M, De Diego Puente T. A Compressive Review about Taxol®: History and Future Challenges. Molecules. 2020; 25 :1–24. doi: 10.3390/molecules25245986
- Ecija-conesa A, Gallego-jara J, **Lozano Terol G**, Browning F, Busby SJW, Wolfe AJ, et al. An ideal spacing is required for the control of Class II CRP-dependent promoters by the status of CRP K100. FEMS Microbiol Lett. 2020; 327 :1–9. doi: 10.1093/femsle/fnaa164
- **Lozano Terol G**, Gallego-jara J, Sola Martinez RA, Martinez Vivancos A, Canovas Diaz M, De Diego Puente T. Impact of the Expression System on Recombinant Protein Production in *Escherichia coli* BL21. Front Microbiol. 2021 ;12 :1–12. doi: 10.3389/fmicb.2021.682001
- Sola-Martínez RA, **Lozano Terol G**, Gallego-Jara J, Morales E, Cantero-Cano E, Sanchez-Solis M, et al. Exhaled volatilome analysis as a useful tool to discriminate asthma with other coexisting atopic diseases in women of childbearing age. Sci Rep. 2021 ;11 :1–17. doi: 10.1038/s41598-021-92933-2

- Gallego-Jara J, Ortega Á, **Lozano Terol G**, Sola Martínez RA, Cánovas Díaz M, de Diego Puente T. Bacterial Sirtuins Overview: An Open Niche to Explore. *Front Microbiol.* 2021 ;12 :1–15. doi: 10.3389/fmicb.2021.744416

- Sola Martínez RA., Sánchez-Solís M, **Lozano Terol G**, Gallego-Jara J, García-Marcos L, Cánovas M, de Diego Puente T. Relationship between lung function and exhaled volatile organic compounds in healthy infants. *Pediatric Pulmonology.* 2022; 57: 1282-1292. doi: 10.1002/ppul.25849

- **Lozano Terol G**, Gallego-jara J, Sola Martinez RA, Martinez Vivancos A, Canovas Diaz M, De Diego Puente T. Regulation of the pyrimidine biosynthetic pathway by lysine acetylation of *E. coli* OPRTase. *Bajo revisión.*

- **Lozano Terol G**, Gallego-jara J, Sola Martinez RA, Martinez Vivancos A, Canovas Diaz M, Zenezini Chiozzi R, De Diego Puente T. Influence of carbon and nitrogen source on *E. coli* acetylome. *Bajo preparación.*

Capítulos de libro:

- Gallego-Jara J, **Lozano Terol G**, Sola Martínez RA, Cánovas Díaz M, de Diego Puente T. Engineering of microbial cell factories for production of plant-based natural products. In: *Microbial Cell Factories Engineering for Production of Biomolecules.* 2021. p. 381–92. ISBN: 9780128214770

Contribuciones a Congresos:

- **Lozano Terol G**, Gallego-Jara J, Écija Conesa A, de Diego Puente T and Cánovas Diaz M. PaaK *Escherichia coli* Characterization and study of its regulation by Post-Translational Modifications (PTM) lysine acetylation (Comunicación oral). I Jornadas Interdisciplinarias de Jóvenes Investigadores. 30-31 Octubre 2017, Murcia (España).

- **Lozano Terol G**, Gallego-Jara J, Écija Conesa A, de Diego Puente T and Cánovas Diaz M. PaaK *Escherichia coli* Characterization and study of its regulation by Post-Translational Modifications (PTM) lysine acetylation (Póster). II Jornadas IMIB-Arrixaca. 27 Noviembre 2017, Murcia (España).

- **Lozano Terol G**, Gallego-Jara J, Écija Conesa A, de Diego Puente T and Cánovas Diaz M. Study of acetate metabolism using different carbon and nitrogen sources in *Escherichia coli* (Comunicación oral). IV Jornadas Doctorales de la Universidad de Murcia. 29-31 Mayo 2018, Murcia (España).
- **Lozano Terol G**, Gallego-Jara J, Écija Conesa A, de Diego Puente T and Cánovas Diaz M. Study of acetate metabolism of *Escherichia coli*: evaluation of nitrogen and carbon sources influence (Comunicación oral corta y Póster). II Jornadas Españolas de Biocatálisis 2018. 25-26 Junio 2018, Oviedo (España).
- **Lozano Terol G**, Gallego-Jara J, Écija Conesa A, Cánovas Diaz M and de Diego Puente T. Study of the expression of recombinant proteins employing diverse carbon and nitrogen sources in *E. coli* BL21 (Comunicación oral). II Congreso Interdisciplinar de Jóvenes Investigadores. 22-23 Octubre 2018, Murcia (España).
- **Lozano Terol G**, Gallego-Jara J, Écija Conesa A, Cánovas Diaz M and de Diego Puente T. Evaluation of the influence of carbon and nitrogen source in *Escherichia coli* acetate metabolism (Póster). III Jornadas Científicas del Imib-Arrixaca. 19-20 Noviembre 2018, Murcia (España).
- **Lozano Terol G**, Gallego-Jara J, Écija Conesa A, Cánovas Diaz M and de Diego Puente T. Optimization of recombinant proteins production in *E. coli* BL21 using different culture conditions and knockout strains (Comunicación oral). V Jornadas Doctorales de la Universidad de Murcia. 29-31 Mayo 2019, Murcia (España).
- **Lozano Terol G**, Gallego-Jara J, Écija Conesa A, Cánovas Diaz M and de Diego Puente T. Gene expression study of *E. coli* growing in glucose and acetate as carbon sources (Comunicación oral). Congreso Nacional de Biotecnología, Biotec 2019. 10-13 Junio 2019, Vigo (España).
- Gallego-Jara J, Puche Candel A, **Lozano Terol G**, Cánovas Diaz M and de Diego Puente T. Nicotinate phosphoribosyltransferase *Escherichia coli* characterization (Póster). Congreso Nacional de Biotecnología, Biotec 2019. 10-13 Junio 2019, Vigo (España).
- Gallego-Jara J, **Lozano Terol G**, Ortega Retuerta A, Cánovas Diaz M and de Diego Puente T. Active and thermostable *E. coli* large-oligomer protein (Póster). Congreso Nacional de Biotecnología, Biotec 2019. 10-13 Junio 2019, Vigo (España).

- Gallego-Jara J, **Lozano Terol G**, Cánovas Diaz M and de Diego Puente T. Calorimetric Study of an *E. coli* Large-Oligomer Protein (Comunicación oral). The 12th European Congress of Chemical Engineering and the 5th European Congress of Applied Biotechnology, ECCE12-ECAB5. 15-19 Septiembre 2019, Florencia (Italia).
- **Lozano Terol G**, Gallego-Jara J, Écija Conesa A, Cánovas Diaz M and de Diego Puente T. Study of differential gene expression profile of *E. coli* growing in glucose and acetate (Póster). The 12th European Congress of Chemical Engineering and the 5th European Congress of Applied Biotechnology, ECCE12-ECAB5. 15-19 Septiembre 2019, Florencia (Italia).
- **Lozano Terol G**, Gallego-Jara J, Cánovas Diaz M and de Diego Puente T. Study of Carbamoyl phosphate synthase of *E. coli* regulation (Comunicación oral). I Symposium on Chemical and Physical Sciences for Young Researchers. 22-23 Octubre 2020, Murcia (España) (Online).
- Sola Martínez RA, **Lozano Terol G**, Gallego-Jara J, Cánovas Diaz M and de Diego Puente T. Development of a platform to analyse human exhaled volatile organic compounds: workflow for biomarker discovery (Póster). I Symposium on Chemical and Physical Sciences for Young Researchers. 22-23 Octubre 2020, Murcia (España) (Online).
- **Lozano Terol G**, Gallego-Jara J, Sola Martínez RA, Cánovas Diaz M and de Diego Puente T. Comparison of Acetate Overflow between *E. coli* BL21 and *E. coli* K12 Strains using Different Carbon and Nitrogen Sources (Póster). International Conference on Cell and Experimental Biology (CEB-2020). 9-11 Diciembre 2020, Boston (USA) (Online).
- **Lozano Terol G**, Gallego-Jara J, Cánovas Diaz M and de Diego Puente T. Continuous intracellular pH measurement: *Escherichia coli* culture medium pH dependence (Póster). 13th European Symposium on Biochemical Engineering Sciences. 4-7 Mayo 2021, Eslovenia (Online).
- Sola Martínez RA, **Lozano Terol G**, Gallego-Jara J, Cánovas Diaz M and de Diego Puente T. Assessment of season of measurement impact on disease biomarker discovery by exhaled volatilome analysis (Póster). 17th Annual Conference of the Metabolomics Society (Metabolomics 2021). 22-24 Junio 2021, (Online)
- de Diego Puente T, Martínez-Vivancos A, **Lozano Terol G**, Sola Martínez RA, Gallego-Jara J and Cánovas Diaz M. Carbamoyl Phosphate synthetase of *Escherichia coli*: study of its

regulation (Póster). The 43rd Congress of the Spanish Society of Biochemical and Molecular Biology. 19-22 Julio 2021, Barcelona (España) (Online).

- **Lozano Terol G**, Gallego-Jara J, Sola Martínez RA, Cánovas Diaz M and de Diego Puente T. Influence of ori and promoter strength on recombinant protein production in *E. coli* BL21 (Póster). The 13th European Congress of Chemical Engineering and the 6th European Congress of Applied Biotechnology, ECCE13-ECAB6. 20-23 Septiembre 2021, (Online).

- Martínez-Vivancos A, **Lozano Terol G**, Gallego-Jara J, Sola Martínez RA, Cánovas Diaz M and de Diego Puente T. Study of Carbamoyl phosphate synthetase enzyme in *Escherichia coli* (Póster). II Symposium on Chemical and Physical Sciences for Young Researchers. 24-25 Marzo 2022, Murcia (España).

Agradecimientos

Me gustaría dedicar unas palabras a todas aquellas personas que, de alguna manera, han contribuido al desarrollo de esta Tesis Doctoral.

A mis directores de tesis, Teresa y Manolo, muchas gracias por vuestra gran implicación a lo largo de estos años. Manolo, gracias por darme la oportunidad de realizar la tesis bajo vuestra supervisión, por el trabajo de estos años y por tu trato siempre tan amable. Teresa, gracias infinitas por todo, por tu nivel de implicación, por estar pendiente de hasta el último detalle siempre y por enseñarme tanto. Sin duda estos años no habrían sido lo mismo sin ti. Gracias por preocuparte no solo del trabajo, sino también de lo personal.

Julia, millones de gracias por todo, por enseñarme todo lo que sé de laboratorio y por ser tan buena y paciente conmigo. Gracias por ayudarme en todo, esta tesis es una realidad gracias a ti. Últimamente pienso mucho en la suerte que tengo de tenerte de compañera, y en que, sin duda, Teresa y tú sois para mí un ejemplo de lo que me gustaría llegar a ser.

Rosalba, que suerte he tenido de tener una gran amiga como compañera de laboratorio. Gracias por todo, por ser tan atenta, por estar siempre que lo he necesitado, por nuestras charlas tranquilizadoras y por alegrarte siempre que me ha pasado algo bueno. Pasar estos años juntas ha sido una de las mejores cosas de esta etapa.

Al resto de los compañeros de laboratorio a lo largo de estos años, gracias por los buenos ratos compartidos. Ana, muchas gracias por enseñarme tanto en los primeros años, fue un placer compartir esta experiencia contigo. Adrián, gracias por estos últimos años, por sacarme siempre una sonrisa y por tu apoyo. David, gracias por estar siempre para cuando te necesitamos y por ser un gran compañero. Álvaro, gracias por tu apoyo y ayuda. Pedro, Susana, José María, Elena, Rocío, Ángela, Miguel, Laura y Rebeca, muchas gracias por vuestra simpatía y por hacer del Departamento un lugar alegre.

Al personal de la Universidad de Murcia, muchas gracias por vuestro trabajo, en especial a Mamen, por ser tan amable, y a Alejandro Torrecillas del Servicio de Apoyo a la Investigación, por toda su ayuda.

Riccardo, thank you very much for teaching me so much about mass spectrometry, and for how attentive you have been during the months of work that followed. José Luis, muchas gracias por acogerme en tu grupo y por ser tan atento.

A mis amigos, muchas gracias por apoyarme en todo, por preocuparos por mí y por estar siempre que lo necesito. Colo, gracias por quererme tanto, por aguantar mi mal humor, apoyarme y animarme siempre, y por hacerme ver las cosas desde otro punto de vista.

Por último, me gustaría dar las gracias a mi familia. A mis primos, mis tíos y mi abuela, por estar siempre conmigo y quererme tanto. A mi hermano, muchas gracias por preocuparte por mí y ayudarme siempre que te necesito. A mis padres, nunca os digo lo agradecidos que estamos Miguel y yo de todo lo que habéis hecho para que pudiéramos ser lo que quisiéramos. Muchas gracias por todo lo que me habéis enseñado, por quererme tanto y por apoyarme en todo.

Resumen

Escherichia coli (*E. coli*) es uno de los microorganismos más estudiados, ya que se conoce su genoma completo, así como su proteoma y transcriptoma, lo que lo ha posicionado como uno de los microorganismos más utilizados con fines biotecnológicos y como modelo de investigación [1]. Además de por el gran conocimiento que se posee sobre este organismo, *E. coli* se utiliza en gran medida porque presenta una serie de ventajas como su alta tasa de crecimiento, su bajo nivel de riesgo, la posibilidad de crecer en multitud de medios de cultivo y su capacidad para producir y almacenar una gran concentración de proteínas heterólogas. Así, hoy en día cerca del 30% de las proteínas aprobadas como biofármacos se producen en esta bacteria [2]-[4]. Sin embargo, el uso de *E. coli* como organismo huésped para producir proteínas recombinantes puede conllevar una serie de inconvenientes, como la formación de cuerpos de inclusión, el desajuste metabólico, el desbordamiento del acetato y el conocimiento limitado de algunas de sus modificaciones postraduccionales, como la acetilación de lisinas [5]-[8].

La carga metabólica o desajuste metabólico es una consecuencia del desequilibrio celular debido a la expresión de un gen heterólogo que requiere un alto nivel de energía y precursores esenciales, por lo que el desajuste metabólico dependerá principalmente del sistema de expresión empleado, y también del estado metabólico y energético de la célula [8], [9]. El desbordamiento del acetato es uno de los principales inconvenientes derivados del empleo de *E. coli* en bioprocesos. Este fenómeno también depende del estado metabólico de la bacteria, ya que se produce cuando *E. coli* crece rápidamente en un medio con una alta concentración de nutrientes, lo que provoca un desequilibrio entre el catabolismo de los nutrientes y la respiración celular que causa la acumulación de acetil-Coenzima A (acetil-CoA). El acetil-CoA se transforma en acetato, que se excreta al medio extracelular, para reincorporarse posteriormente al metabolismo, en un ciclo fútil que provoca una pérdida de carbonos y energía [6], [10]. El desbordamiento del acetato, por tanto, implica una disminución del crecimiento celular y una reducción del rendimiento en los procesos de producción, por lo que se han desarrollado multitud de estrategias para eliminar o reducir este inconveniente [5], [11], [12].

La N ϵ -acetilación de las lisinas es una modificación postraducciona que está relacionada con el metabolismo del acetato a través de los intermediarios acetil-CoA y acetil-fosfato (acetil-P), que actúan como dadores de grupos acetilos [6], [13]. Esta modificación se produce en muchas enzimas del metabolismo central y está implicada en

la regulación de los procesos metabólicos, los procesos de traducción, la virulencia bacteriana, la localización celular y las interacciones de las proteínas con otras moléculas [14], [15]. Puede producirse de forma enzimática, por la acción de las lisín-acetiltransferasas, o no enzimática, en cuyo caso el nivel de acetilación depende de la reactividad de la lisina y de la concentración de los dadores de acetilo [15]. Además, esta modificación puede ser revertida por la acción de las desacetilasas, siendo CobB la única conocida en *E. coli* [16].

Todos estos procesos, que implican limitaciones a la hora de utilizar *E. coli* como huésped para la ingeniería metabólica, dependen en mayor o menor medida del metabolismo de la bacteria y de sus flujos, por lo que el estudio del metabolismo central y su regulación es la clave del éxito de la optimización celular. Los flujos a través del metabolismo central pueden ser modulados según las condiciones de cultivo empleadas [17]. Así, *E. coli* puede crecer utilizando diferentes fuentes de carbono, pero prefiere las que provocan una mayor tasa de crecimiento, las cuales son transportadas por el Sistema de Fosfoenolpiruvato Fosfotransferasa (sistema PTS). El consumo de este tipo de fuente de carbono suprime el consumo de otras fuentes de carbono no PTS, mediante un mecanismo conocido como Represión Catabólica del Carbono [18]. En cuanto a la fuente de nitrógeno, *E. coli* consume preferentemente las basadas en amonio inorgánico que las basadas en otros compuestos como péptidos, aminoácidos o nucleótidos [19].

El objetivo principal de esta Tesis Doctoral fue comprender el papel de la regulación de la acetilación de lisinas en el control de las redes bioquímicas del metabolismo central de *E. coli* para mejorar sus capacidades biotecnológicas. Este objetivo puede dividirse en varios subobjetivos: 1) Optimizar la producción de proteínas recombinantes en *E. coli* utilizando diferentes condiciones de cultivo, y empleando cepas deficientes genes del metabolismo del acetato y la acetilación de lisinas. 2) Conocer las implicaciones derivadas del uso de diferentes sistemas de expresión de proteínas recombinantes en el desajuste metabólico y en el nivel de expresión proteica final. 3) Conocer si la ruta de biosíntesis de pirimidinas *de novo* en *E. coli* puede ser regulada por la acetilación de lisinas. 4) Estudiar las implicaciones del uso de diferentes fuentes de nitrógeno y carbono en el acetiloma y el proteoma de *E. coli*.

Los principales resultados obtenidos se enumeran a continuación:

Los Capítulos 3 y 4 están dedicados al estudio y optimización de la expresión de proteínas recombinantes en *E. coli* BL21. En el capítulo 3 nos centramos en cómo la

acetilación de lisinas y los flujos a través del metabolismo del acetato podrían estar implicados en los procesos de producción de proteínas recombinantes en esta bacteria, y qué estrategias podrían desarrollarse para aumentar el rendimiento del proceso. Para ello, se utilizó la proteína reportera GFP, cuya expresión se estudió mediante dos enfoques simultáneos: el uso de la cepa silvestre y de cepas deficientes en la acetilación de lisinas ($\Delta patZ$ y $\Delta cobB$) y en el metabolismo de acetato (Δacs , $\Delta ackA$ y Δpta), y la evaluación de diferentes medios de cultivo. Se utilizaron dos fuentes de nitrógeno, una basada en amonio inorgánico, el medio MM9, y otra basada en péptidos, el medio TB7, que se complementaron con una fuente de carbono PTS, la glucosa, o una fuente de carbono no PTS, el glicerol. Bajo estas condiciones, se analizaron los parámetros estequiométricos, la concentración extracelular de acetato y el nivel de expresión de GFP y su grado de acetilación. Los resultados mostraron que la composición del medio de cultivo y la cepa huésped afectaban al nivel de acetilación de la proteína recombinante. En cuanto a la producción de la proteína, el uso de un medio complejo, TB7, suplementado con glicerol aumentó la producción de la proteína recombinante, a pesar de conllevar una excreción no despreciable de acetato. Además, la mayor producción de proteína recombinante se produjo en la cepa $\Delta ackA$, en la que se encontró un aumento de 4 a 5 veces en la producción de GFP con respecto a la cepa silvestre, siendo este aumento mayor cuando se empleó TB7-glicerol. Por último, la concentración de acetato en esta cepa era insignificante, por lo que una baja pérdida de carbono puede ser la responsable de la redirección óptima de los flujos del metabolismo hacia la producción de proteínas recombinantes.

En el Capítulo 4 se analizó y optimizó la producción de proteínas recombinantes en *E. coli* BL21. El origen de replicación junto con el sistema promotor son los principales factores que influyen en el nivel de expresión de la proteína. En este capítulo, se utilizó el mismo vector para construir diferentes plásmidos combinando dos orígenes de replicación, de alto (pMB1') y bajo (p15A) número de copias, y 4 promotores de diferente fuerza (P_{T7lac} , P_{trc} , P_{tac} , y P_{BAD}). El nivel de expresión proteica se estudió utilizando la proteína reportera YFP. Además, se emplearon dos cepas, *E. coli* BL21 silvestre y *E. coli* BL21 $\Delta ackA$, y se analizó la expresión en medio complejo, TB7, con glucosa o glicerol como fuente de carbono. Los resultados mostraron, en general, un mayor nivel de expresión de la proteína recombinante derivado del uso de los vectores de bajo número de copias, concretamente, el mayor nivel de expresión resultó del empleo del origen p15A y del promotor P_{trc} . Además, se observó que el nivel de expresión de la proteína depende de la

carga metabólica derivada de la replicación del vector, y que cuanto mayor es la expresión de la proteína, mayor es el nivel de proteína insoluble. En este sentido, no encontramos una clara dependencia del uso de las diferentes fuentes de carbono con el nivel de expresión, pero observamos un menor nivel de expresión en la cepa $\Delta ackA$ cuando se empleó el vector de alto número de copias, probablemente debido a un mayor desajuste metabólico en esta cepa. Por lo tanto, es importante analizar los vectores de expresión utilizados, ya que la combinación entre el número de copias y la fuerza del promotor determinará el desajuste metabólico producido y, en consecuencia, el nivel de proteína soluble expresada.

Los Capítulos 5 y 6 están dedicados al estudio de la acetilación de lisinas en *E. coli*. En particular, el Capítulo 5 se centra en el estudio de la regulación por acetilación de lisinas de la ruta de biosíntesis de pirimidinas *de novo*. Para investigar qué puntos de la ruta podrían ser bloqueados o activados por esta modificación, se llevó a cabo un análisis de los metabolitos de la ruta a nivel intracelular y extracelular en la cepa silvestre y en la cepa $\Delta cobB$. La delección de CobB, la única desacetilasa conocida en *E. coli*, conduce a un aumento del nivel global de acetilación. Los resultados mostraron un posible bloqueo de la enzima OPRTasa en la cepa $\Delta cobB$. La enzima OPRTasa es la quinta enzima de la vía de biosíntesis de pirimidinas *de novo*, y forma OMP a partir de orotato y PRPP. Para estudiar la regulación de la acetilación de la OPRTasa, se llevó a cabo la acetilación *in vitro* de la enzima, y se utilizó la técnica basada en la expansión del código genético para purificar la OPRTasa con lisinas permanentemente acetiladas en las posiciones 26 y 103. La acetilación dio lugar a una disminución de la actividad, especialmente en el caso de la OPRTasa acetilada en la K103, cuya actividad fue insignificante. Además, esta disminución de la actividad se revirtió mediante la desacetilación con CobB. Para determinar el posible efecto de la acetilación de la OPRTasa *in vivo*, se realizó un ensayo de complementación de la cepa $\Delta pyrE$ con las enzimas acetiladas, la cual presentó un perfil similar al de la cepa $\Delta pyrE$. Por tanto, los resultados mostraron la regulación de la ruta de biosíntesis de pirimidinas *de novo* por la acetilación de la OPRTasa en *E. coli*, lo que puede tener importantes consecuencias debido a la relevancia de la vía y a lo altamente conservada que está esta enzima.

En el Capítulo 6, se llevó a cabo un estudio de proteómica cuantitativa sin marcaje del acetiloma de *E. coli* creciendo en diferentes condiciones de cultivo. Se cultivó *E. coli* K12 empleando dos fuentes de carbono diferentes, glucosa o glicerol, y dos fuentes de nitrógeno, TB7 o MM9, y se tomaron muestras en fase de crecimiento exponencial y

estacionaria. Así, se analizó la implicación de tres variables, fuente de carbono, fuente de nitrógeno y fase de crecimiento, en el nivel de acetilación de esta bacteria. Las muestras derivadas del enriquecimiento mediante anticuerpos anti-acetil-lisina (acetiloma) y las muestras del proteoma total se sometieron a un ensayo de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas, y se analizaron mediante cuantificación sin marcaje. Los resultados mostraron las mayores diferencias en el proteoma con el uso de distintas fuentes de nitrógeno, mientras que el uso de diferentes fuentes de carbono no produjo cambios importantes en la abundancia de proteínas. En cuanto al acetiloma, el mayor nivel de acetilación se relacionó con el uso del medio complejo, TB7, y en menor medida con la fase estacionaria y el uso de glucosa como fuente de carbono. Además, estos resultados coincidieron con el nivel de acetato extracelular medido, por lo que el desbordamiento de acetato es determinante para el nivel de acetilación. Por su parte, la identidad de las lisinas acetiladas dependió de las condiciones de cultivo en las que se habían identificado. Asimismo, se observó que un gran número de enzimas pertenecientes al metabolismo central estaban acetiladas de forma diferencial entre las condiciones, lo que sugiere que están reguladas de forma distinta en cada condición estudiada, y que los flujos a través del metabolismo central pueden variar. Por tanto, las distintas condiciones de cultivo, especialmente la fuente de nitrógeno utilizada, pueden determinar tanto el nivel de acetilación como la identidad de las lisinas acetiladas.

Por último, las principales conclusiones a las que se ha llegado a partir de los resultados de esta Tesis Doctoral son: 1) La producción de proteínas recombinantes se ve favorecida utilizando un medio complejo y glicerol como fuente de carbono. 2) La utilización de la cepa $\Delta ackA$ puede suponer un aumento de 5 veces en la producción de proteínas recombinantes cuando se emplea el sistema de expresión óptimo. 3) El desajuste metabólico producido por la transcripción de vectores heterólogos conduce a una disminución de la producción de proteínas recombinantes cuando se emplean sistemas de expresión de alto número de copias con promotores fuertes. 4) La ruta de biosíntesis de pirimidinas *de novo* es regulada por acetilación de lisinas en la enzima OPRTasa. La acetilación de la OPRTasa en las lisinas 26 y 103 produce una disminución de la actividad que puede ser revertida por la desacetilasa CobB. 5) La abundancia relativa de proteínas en *E. coli* depende de las condiciones de cultivo, y la identidad y el número de lisinas acetiladas depende de la abundancia de las proteínas. 6) El nivel de acetilación en *E. coli* depende principalmente del desbordamiento de acetato, siendo mayor en medio complejo. 7) Se han encontrado lisinas con diferencias en su nivel de acetilación

entre las distintas condiciones de cultivo en el ciclo del glioxilato, el ciclo de los ácidos tricarbóxicos y la asimilación del nitrógeno, por lo que estas vías podrían estar reguladas por acetilación.

Referencias

- [1] F. R. Blattner *et al.*, "The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12," *Science* (80-.), vol. 277, no. 5331, pp. 1453–1462, 1997, doi: 10.1126/science.277.5331.1453.
- [2] Z. D. Blount, "The unexhausted potential of *E. coli*," *Elife*, vol. 4, pp. 1–12, 2015, doi: 10.7554/eLife.05826.
- [3] M. N. Baeshen *et al.*, "Production of Biopharmaceuticals in *E. coli*: Current Scenario and Future Perspectives," *J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 25, no. 7, pp. 953–962, 2015, doi: 10.4014/jmb.1412.12079.
- [4] C. J. Huang, H. Lin, and X. Yang, "Industrial production of recombinant therapeutics in *Escherichia coli* and its recent advancements," *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 39, no. 3, pp. 383–399, 2012, doi: 10.1007/s10295-011-1082-9.
- [5] M. De Mey, S. De Maeseneire, W. Soetaert, and E. Vandamme, "Minimizing acetate formation in *E. coli* fermentations," *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 34, no. 11, pp. 689–700, 2007, doi: 10.1007/s10295-007-0244-2.
- [6] V. Bernal, S. Castaño-Cerezo, and M. Cánovas, "Acetate metabolism regulation in *Escherichia coli*: carbon overflow, pathogenicity, and beyond," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 100, no. 21, pp. 8985–9001, 2016, doi: 10.1007/s00253-016-7832-x.
- [7] F. Baig, L. P. Fernando, M. A. Salazar, R. R. Powell, T. F. Bruce, and S. W. Harcum, "Dynamic transcriptional response of *Escherichia coli* to inclusion body formation," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 111, no. 5, pp. 980–999, 2014, doi: 10.1002/bit.25169.
- [8] J. Mairhofer, T. Scharl, K. Marisch, M. Cserjan-puschmann, and G. Striedner, "Comparative Transcription Profiling and In-Depth Characterization of Plasmid-Based and Plasmid-Free *Escherichia coli* Expression Systems under Production Conditions," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 79, no. 12, pp. 3802–3812, 2013, doi: 10.1128/AEM.00365-13.
- [9] Z. Li and U. Rinas, "Recombinant protein production-associated metabolic burden reflects anabolic constraints and reveals similarities to a carbon overfeeding response," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 118, no. 1, pp. 94–105, 2021, doi: 10.1002/bit.27553.
- [10] A. J. Wolfe, "The Acetate Switch," *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 69, no. 1, pp. 12–50, 2005, doi: 10.1128/MMBR.69.1.12.
- [11] S. Castaño-Cerezo, V. Bernal, T. Röhrig, S. Termeer, and M. Cánovas, "Regulation of acetate metabolism in *Escherichia coli* BL21 by protein Ne-lysine acetylation," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 99, no. 8, pp. 3533–3545, 2015, doi: 10.1007/s00253-014-6280-8.

-
- [12] M. A. Eiteman and E. Altman, "Overcoming acetate in *Escherichia coli* recombinant protein fermentations," *Trends Biotechnol.*, vol. 24, no. 11, pp. 530–536, 2006, doi: 10.1016/j.tibtech.2006.09.001.
- [13] M. L. Kuhn *et al.*, "Structural, kinetic and proteomic characterization of acetyl phosphate-dependent bacterial protein acetylation," *PLoS One*, vol. 9, no. 4, pp. 1–26, 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0094816.
- [14] M. Liu, L. Gou, Y. Fu, M. Huo, Q. Qi, and G. Zhao, "Bacterial protein acetylation and its role in cellular physiology and metabolic regulation," *Biotechnol. Adv.*, vol. 53, no. 107842, pp. 1–12, 2021, doi: 10.1016/j.biotechadv.2021.107842.
- [15] D. G. Christensen *et al.*, "Mechanisms, detection, and relevance of protein acetylation in prokaryotes," *MBio*, vol. 10, no. 2, pp. 1–20, Mar. 2019, doi: 10.1128/mBio.02708-18.
- [16] J. Gallego-Jara, Á. Ortega, G. Lozano Terol, R. A. Sola Martínez, M. Cánovas Díaz, and T. de Diego Puente, "Bacterial Sirtuins Overview: An Open Niche to Explore," *Front. Microbiol.*, vol. 12, pp. 1–15, 2021, doi: 10.3389/fmicb.2021.744416.
- [17] M. Mori *et al.*, "From coarse to fine: the absolute *Escherichia coli* proteome under diverse growth conditions," *Mol. Syst. Biol.*, vol. 17, no. e9536, pp. 1–23, 2021, doi: 10.15252/msb.20209536.
- [18] J. Deutscher, "The mechanisms of carbon catabolite repression in bacteria," *Curr. Opin. Microbiol.*, vol. 11, no. 2, pp. 87–93, 2008, doi: 10.1016/j.mib.2008.02.007.
- [19] L. Reitzer, "Nitrogen Assimilation and Global Regulation in *Escherichia coli*," *Annu. Rev. Microbiol.*, vol. 57, pp. 155–176, 2003, doi: 10.1146/annurev.micro.57.030502.090820.

Summary

E. coli is one of the most widely studied microorganisms, since its complete genome is known, as well as its proteome and transcriptome, which has positioned it as one of the most widely used microorganisms for biotechnology purposes and as a model for research [1]. In addition to the great knowledge of this organism, *E. coli* is largely used because it presents a series of advantages such as its high growth rate, its low risk level, the possibility of growing in a multitude of culture media and its capacity to produce and store a large concentration of heterologous proteins. Thus, nowadays about 30% of the proteins approved as biopharmaceuticals are produced in this bacterium [2]–[4]. However, the use of *E. coli* as a host organism to produce recombinant proteins can involve a number of drawbacks, such as the formation of inclusion bodies, the metabolic burden, the acetate overflow and the limited knowledge of some posttranslational modifications, such as lysine acetylation [5]–[8].

Metabolic burden is a consequence of cellular imbalance due to the expression of a heterologous gene that requires a high level of energy and essential precursors, therefore the metabolic burden will depend mainly on the expression system employed, and also on the metabolic and energetic state of the cell [8], [9]. As the acetate overflow, it is one of the main drawbacks derived from the use of *E. coli* in bioprocesses. Acetate overflow also depends on the metabolic state of the bacteria, as it occurs when *E. coli* grows rapidly in a medium with a high concentration of nutrients, leading to an imbalance between nutrient catabolism and cellular respiration, which causes acetyl-Coenzyme A (acetyl-CoA) accumulation. Acetyl-CoA is transformed into acetate, which is excreted into the extracellular medium, to be subsequently reincorporated into the metabolism, in a futile cycle that causes a loss of carbons and energy [6], [10]. The overflow of acetate, therefore, implies a decrease in cell growth and a reduction of the yield in the production processes, so a multitude of strategies have been developed to eliminate or reduce this disadvantage [5], [11], [12].

N ϵ -acetylation of lysines is a posttranslational modification that is related to acetate metabolism through acetyl-CoA and acetyl-phosphate (acetyl-P) intermediates, which act as acetyl group donors [6], [13]. This modification occurs in many enzymes of central metabolism and is involved in the regulation of metabolic processes, translational processes, bacterial virulence, cellular localization and interactions of proteins with other molecules [14], [15]. It can occur enzymatically, by the action of acetyltransferases, or

non-enzymatically, in which case the level of acetylation depends on the reactivity of the lysine and the concentration of the acetyl donors [15]. Furthermore, this modification can be reverted by the action of deacetylases, CobB being the only known in *E. coli* [16].

All these processes, which imply limitations when using *E. coli* as the host for metabolic engineering, depend to a greater or lesser extent on the metabolism of the bacterium and the fluxes through it, therefore the study of the central metabolism and its regulation is the key to successful cell optimization. The fluxes through the central metabolism may be modulated according to the culture conditions employed [17]. *E. coli* can grow using different carbon sources, but prefers those that cause a higher growth rate, which are transported by the Phosphoenolpyruvate Phosphotransferase System (PTS system). The consumption of this type of carbon source suppresses the consumption of other non-PTS carbon sources by a mechanism known as Catabolic Carbon Repression [18]. As for the nitrogen source, *E. coli* preferentially consumes those based on inorganic ammonium than those based on other compounds such as peptides, amino acids or nucleotides [19].

The main objective of this PhD Thesis was to understand the role of lysine acetylation regulation in the control of biochemical networks of *E. coli* central metabolism to enhance its biotechnological capabilities. This objective can be divided into several sub-objectives: 1) To optimize the production of recombinant proteins in *E. coli* by using different culture conditions and by employing strains deficient in acetate metabolism and lysine acetylation genes. 2) To know the implications derived from the use of different recombinant protein expression systems in the metabolic burden and in the protein expression level. 3) To know if the *de novo* pyrimidine biosynthesis pathway can be regulated by lysine acetylation in *E. coli*. 4) To study the implications of the use of different nitrogen and carbon sources in the acetylome and proteome of *E. coli*.

The main results obtained are listed below:

Chapters 3 and 4 are dedicated to the study and optimization of recombinant protein expression in *E. coli* BL21. In Chapter 3 we focused on how lysine acetylation and the fluxes through acetate metabolism could be involved in recombinant protein production processes in this bacterium, and what strategies could be developed to increase the yield of the process. To this end, the GFP reporter protein was used, and its expression was studied using two approaches simultaneously: the use of the wild-type strain and strains deficient in lysine acetylation ($\Delta patZ$ and $\Delta cobB$) and acetate

metabolism (Δacs , \DeltaackA and Δpta) genes, and the evaluation of different culture media. Two nitrogen sources were used, one based on inorganic ammonium, MM9 medium, and the other based on peptides, TB7 medium, which were supplemented with a PTS carbon source, glucose, or a non-PTS carbon source, glycerol. Under these conditions, the stoichiometric parameters, the extracellular concentration of acetate, and the level of GFP expression and its degree of acetylation were analysed. The results showed that the composition of culture and host strain affected the level of acetylation of the recombinant protein. Regarding protein production, the use of complex medium, TB7, supplemented with glycerol increased the production of recombinant protein, despite producing a not negligible amount of acetate. Moreover, the highest recombinant protein production occurred in the \DeltaackA strain, in which a 4- to 5-fold increase in GFP production was found with respect to the wild-type strain, this increase being the greatest when TB7-glycerol was employed. Finally, the acetate concentration in this strain was negligible, so a low carbon loss may be responsible for optimal redirection of metabolic fluxes to recombinant protein production.

Regarding Chapter 4, the production of recombinant proteins in *E. coli* BL21 was analysed and optimized. The origin of replication together with the promoter system are the main factors influencing the protein expression level. In this chapter, the same vector backbone was used, to build different plasmids by combining two replication origins, high (pMB1') and low (p15A) copy number, and 4 different strength promoters (P_{T7lac} , P_{trc} , P_{tac} , and P_{BAD}). The level of protein expression was studied using the YFP reporter protein. In addition, two strains were employed, *E. coli* BL21 wild-type and *E. coli* BL21 \DeltaackA , and expression was analysed in complex medium, TB7, with glucose or glycerol as carbon source. The results showed, in general, a higher level of recombinant protein expression derived from the use of the low copy number vectors, specifically, the highest level of expression resulted from the employ of the p15A origin and the P_{trc} promoter. In addition, it was observed that the level of protein expression depends on the metabolic burden derived from the vector replication and the protein expression, and that the higher the protein expression, the higher the level of insoluble protein. In this sense, we did not find a clear dependence of the use of the different carbon sources with the level of expression, but we observed a lower level of expression in the \DeltaackA strain when the high copy number vector was employed, probably due to a higher level of metabolic burden in this strain. Therefore, it is important to analyse the expression vectors used, since the

combination between the copy number and the promoter strength will determine the metabolic burden produced, and consequently the level of soluble protein expressed.

Chapters 5 and 6 are dedicated to the study of lysine acetylation in *E. coli*. In particular, Chapter 5 is focused on the study of the regulation by lysine acetylation of the *de novo* pyrimidine biosynthesis pathway. To investigate which points of the pathway might be blocked or further activated by this modification, an analysis of the metabolites of the pathway at the intracellular and extracellular level was carried out in the wild-type strain and in the $\Delta cobB$ strain. Deletion of CobB, the only known deacetylase in *E. coli*, leads to an increase in the overall acetylation level. The results showed a possible blockage of OPRTase enzyme in the $\Delta cobB$ strain. OPRTase enzyme is the fifth enzyme of the *de novo* pyrimidine biosynthesis pathway, and forms OMP from orotate and PRPP. To study the acetylation regulation of OPRTase, *in vitro* acetylation of the enzyme was carried out, and a technique based on the genetic code expansion was used to purify OPRTase with permanently acetylated lysines at positions 26 and 103. Acetylation resulted in a decrease in activity, especially for OPRTase acetylated at K103, whose activity was negligible. Moreover, this decrease in activity was reverted by deacetylation with CobB. In order to determine the possible effect of OPRTase acetylation *in vivo*, a complementation assay of the $\Delta pyrE$ strain with acetylated enzymes was performed, which presented a similar profile to the $\Delta pyrE$ strain. Therefore, the results showed the regulation of the *de novo* pyrimidine biosynthesis pathway by OPRTase acetylation in *E. coli*, which may have important consequences due to the relevance of the pathway and to the highly conserved nature of this enzyme.

In Chapter 6, a label-free quantitative proteomics study of the *E. coli* acetylome growing under different culture conditions was carried out. *E. coli* K12 was grown employing two different carbon sources, glucose and glycerol, and two nitrogen sources, TB7 and MM9, simultaneously, and samples were taken in exponential and stationary growth phase. Therefore, we analysed the implication of three variables, carbon source, nitrogen source and growth phase, on the acetylation level of this bacterium. The samples derived from the enrichment using anti-acetyl-lysine antibodies (acetylome) and the samples of the total proteome were subjected to mass spectrometry assay and analysed by label free quantification. The results showed the greatest differences at the proteome level with the use of distinct nitrogen sources, while the use of different carbon sources did not lead to major changes in protein abundance. As for the acetylome, the highest level of acetylation was related to the use of complex medium, TB7, and to a lesser extent

to the stationary phase and the use of glucose as a carbon source. Furthermore, these results agreed with the level of extracellular acetate measured, so the acetate overflow is critical for the acetylation level. The identity of acetylated lysines depended on the culture conditions under which it has been identified. Similarly, a large number of enzymes belonging to the central metabolism were observed to be acetylated with differences between conditions, which suggests that they are regulated differently in each condition studied, and that the fluxes through the central metabolism are distinct. Therefore, the different culture conditions, especially the nitrogen source used, can determine both the acetylation level and the identity of the acetylated peptides.

Finally, the main conclusions reached from the results of this thesis are: 1) The production of recombinant proteins is favoured using complex medium and glycerol as a carbon source. 2) The utilization of the $\Delta ackA$ strain can result in a 5-fold increase in recombinant protein production when the optimal expression system is employed. 3) The metabolic burden produced by the transcription of heterologous vectors leads to a decrease in recombinant protein production when high copy number expression systems with strong promoters are employed. 4) The *de novo* pyrimidine biosynthesis pathway is regulated by lysine acetylation of the OPRTase enzyme. Acetylation of OPRTase at lysines 26 and 103 results in decreased activity that can be reversed by CobB deacetylase. 5) The relative abundance of proteins in *E. coli* depends on culture conditions, and the identity and number of acetylated lysines depends on the abundance of proteins. 6) The level of acetylation in *E. coli* depends, mainly, on acetate overflow, being higher in complex medium. 7) Lysines with differences in their acetylation level between culture conditions have been found in the glyoxylate cycle, the tricarboxylic acid cycle and nitrogen assimilation, so these pathways could be regulated by acetylation.

References

- [1] F. R. Blattner *et al.*, "The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12," *Science* (80-.), vol. 277, no. 5331, pp. 1453–1462, 1997, doi: 10.1126/science.277.5331.1453.
- [2] Z. D. Blount, "The unexhausted potential of *E. coli*," *Elife*, vol. 4, pp. 1–12, 2015, doi: 10.7554/eLife.05826.
- [3] M. N. Baeshen *et al.*, "Production of Biopharmaceuticals in *E. coli* : Current Scenario and Future Perspectives," *J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 25, no. 7, pp. 953–962, 2015, doi: 10.4014/jmb.1412.12079.
- [4] C. J. Huang, H. Lin, and X. Yang, "Industrial production of recombinant therapeutics

- in *Escherichia coli* and its recent advancements,” *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 39, no. 3, pp. 383–399, 2012, doi: 10.1007/s10295-011-1082-9.
- [5] M. De Mey, S. De Maeseneire, W. Soetaert, and E. Vandamme, “Minimizing acetate formation in *E. coli* fermentations,” *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 34, no. 11, pp. 689–700, 2007, doi: 10.1007/s10295-007-0244-2.
- [6] V. Bernal, S. Castaño-Cerezo, and M. Cánovas, “Acetate metabolism regulation in *Escherichia coli*: carbon overflow, pathogenicity, and beyond,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 100, no. 21, pp. 8985–9001, 2016, doi: 10.1007/s00253-016-7832-x.
- [7] F. Baig, L. P. Fernando, M. A. Salazar, R. R. Powell, T. F. Bruce, and S. W. Harcum, “Dynamic transcriptional response of *Escherichia coli* to inclusion body formation,” *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 111, no. 5, pp. 980–999, 2014, doi: 10.1002/bit.25169.
- [8] J. Mairhofer, T. Scharl, K. Marisch, M. Cserjan-puschmann, and G. Striedner, “Comparative Transcription Profiling and In-Depth Characterization of Plasmid-Based and Plasmid-Free *Escherichia coli* Expression Systems under Production Conditions,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 79, no. 12, pp. 3802–3812, 2013, doi: 10.1128/AEM.00365-13.
- [9] Z. Li and U. Rinas, “Recombinant protein production-associated metabolic burden reflects anabolic constraints and reveals similarities to a carbon overfeeding response,” *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 118, no. 1, pp. 94–105, 2021, doi: 10.1002/bit.27553.
- [10] A. J. Wolfe, “The Acetate Switch,” *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 69, no. 1, pp. 12–50, 2005, doi: 10.1128/MMBR.69.1.12.
- [11] S. Castaño-Cerezo, V. Bernal, T. Röhrig, S. Termeer, and M. Cánovas, “Regulation of acetate metabolism in *Escherichia coli* BL21 by protein Ne-lysine acetylation,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 99, no. 8, pp. 3533–3545, 2015, doi: 10.1007/s00253-014-6280-8.
- [12] M. A. Eiteman and E. Altman, “Overcoming acetate in *Escherichia coli* recombinant protein fermentations,” *Trends Biotechnol.*, vol. 24, no. 11, pp. 530–536, 2006, doi: 10.1016/j.tibtech.2006.09.001.
- [13] M. L. Kuhn *et al.*, “Structural, kinetic and proteomic characterization of acetyl phosphate-dependent bacterial protein acetylation,” *PLoS One*, vol. 9, no. 4, pp. 1–26, 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0094816.
- [14] M. Liu, L. Gou, Y. Fu, M. Huo, Q. Qi, and G. Zhao, “Bacterial protein acetylation and its role in cellular physiology and metabolic regulation,” *Biotechnol. Adv.*, vol. 53, no. 107842, pp. 1–12, 2021, doi: 10.1016/j.biotechadv.2021.107842.
- [15] D. G. Christensen *et al.*, “Mechanisms, detection, and relevance of protein acetylation in prokaryotes,” *MBio*, vol. 10, no. 2, pp. 1–20, Mar. 2019, doi: 10.1128/mBio.02708-18.
- [16] J. Gallego-Jara, Á. Ortega, G. Lozano Terol, R. A. Sola Martínez, M. Cánovas Díaz, and T. de Diego Puente, “Bacterial Sirtuins Overview: An Open Niche to Explore,” *Front. Microbiol.*, vol. 12, pp. 1–15, 2021, doi: 10.3389/fmicb.2021.744416.
- [17] M. Mori *et al.*, “From coarse to fine: the absolute *Escherichia coli* proteome under diverse growth conditions,” *Mol. Syst. Biol.*, vol. 17, no. e9536, pp. 1–23, 2021, doi:

10.15252/msb.20209536.

[18] J. Deutscher, "The mechanisms of carbon catabolite repression in bacteria," *Curr. Opin. Microbiol.*, vol. 11, no. 2, pp. 87–93, 2008, doi: 10.1016/j.mib.2008.02.007.

[19] L. Reitzer, "Nitrogen Assimilation and Global Regulation in *Escherichia coli*," *Annu. Rev. Microbiol.*, vol. 57, pp. 155–176, 2003, doi: 10.1146/annurev.micro.57.030502.090820.

Índice de abreviaturas

- μ_{\max} : velocidad de crecimiento específico
- **α -KG**: α -cetoglutarato
- **2PG**: 2-fosfoglicerato
- **3PG**: 3-fosfoglicerato
- **6PGLN**: 6-fosfoglucono- δ -lactona
- **6PGNT**: 6-fogluconato
- **AceA**: isocitrato liasa
- **AceK**: isocitrato deshidrogenasa quinasa/isocitrato deshidrogenasa fosfatasa
- **acetil-CoA**: acetil-Coenzima A
- **acetil-P**: acetil-fosfato
- **AckA**: acetato quinasa
- **AcKRS3**: aminoacil-ARNt sintetasa modificada
- **Acs**: acetil-CoA sintetasa
- **ActP**: transportador del acetato
- **ADNc**: ADN complementario
- **ADP**: adenosina 5-difosfato
- **AlaRS**: alanil-tARN-sintetasa
- **AMPc**: Adenosín monofosfato cíclico
- **AmtB**: transportador de amonio
- **ArcA**: proteína de control de la respiración aeróbica
- **ARNm**: ARN mensajero
- **ARNr**: ARN ribosómico
- **ARNt**: ARN de transferencia
- **ATCasa**: aspartato carbamoiltransferasa
- **ATP**: adenosina 5-trifosfato
- **BSA**: seroalbúmina bovina
- **CASP**: N-carbamoil-L-aspartato
- **ciclo TCA**: ciclo de los ácidos tricarbónicos
- **CIT**: citrato
- **CoASH**: coenzima A
- **CP**: carbamoil fosfato
- **CPSasa**: carbamoil fosfato sintetasa
- **Cra**: el activador represor de catabolitos
- **Crp**: proteína receptora de AMPc
- **CTP**: citidina 5-trifosfato
- **CyaA**: adenilato ciclasa
- **DHAP**: dihidroxiacetona-fosfato
- **DHO**: dihidroorotato
- **DHOasa**: dihidroorotasa
- **DHODH**: dihidroorotato deshidrogenasa
- **DnaA**: proteína iniciadora de la replicación cromosomal
- **DNS**: ácido dinitrosalicílico
- **DO₆₀₀**: densidad óptica medida a 600 nm
- **DPG**: 1,3-bifosfoglicerato
- ***E. coli***: *Escherichia coli*
- **E4P**: eritrosa-4-fosfato
- **EI**: enzima I
- **EII**: enzima II (dominio intermembrana (EIIBC); dominio citoplasmático (EIIA))
- **F1P**: fructosa-1-fosfato
- **F6P**: fructosa-6-fosfato
- **FBP**: fructosa-1,6-bifosfato
- **FCh**: fold change
- **FDA**: Administración de alimentos y medicamentos de Estados Unidos
- **FDR**: tasa de falsos descubrimientos
- **Fnr**: regulador transcripcional de la transición de condiciones aerobias a anaerobias
- **FUM**: fumarato
- **G6P**: glucosa-6-fosfato
- **GAP**: gliceraldehído 3-fosfato
- **GapA**: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
- **Gdh**: glutamato deshidrogenasa
- **GFP**: proteína verde fluorescente
- **GlpD**: glicerol-3-fosfato deshidrogenasa
- **GlpF**: transportador del glicerol
- **GlpK**: glicerol quinasa

- **Glta**: citrato sintetasa
- **Gly**: glicerol
- **Gly3P**: glicerol-3-fosfato
- **GNAT**: N-acetiltransferasas relacionadas con Gcn5
- **GoGat**: glutamato sintetasa
- **GOX**: glioxilato
- **GpmA**: fosfoglicerato mutasa dependiente de 2,3-bifosfoglicerato
- **Gs**: glutamina sintetasa
- **HDACs**: histonas desacetilasas
- **HPr**: proteína portadora de histidina
- **IcdA**: isocitrato deshidrogenasa
- **ICT**: isocitrato
- **IPTG**: Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
- **KATs**: enzimas lisín-acetiltransferasas
- **KDACs**: desacetilasas
- **KDPGNT**: 2-ceto-3-deoxi-D-gluconato-6-fosfato
- **K_M**: constante de Michaelis
- **Lacl**: proteína represora del promotor *lac*
- **LC-MS/MS**: cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas
- **MAL**: malato
- **MBP**: Proteína de unión a maltosa
- **MCC**: metabolismo central del carbono
- **Mdh**: malato deshidrogenasa
- **MPT**: modificación postraduccional
- **MUS**: MM9-glucosa-estacionaria
- **MUX**: MM9-glucosa-exponencial
- **MYS**: MM9-glicerol-estacionaria
- **MYST**: llamado así por los miembros MOZ, Ybf2/ Sas3, Sas2 y Tip60
- **MYX**: MM9-glicerol-exponencial
- **NAD⁺**: nicotinamida adenina dinucleótido
- **NADPH**: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
- **NAM**: nicotinamida
- **NAMPT**: nicotinamida fosforibosiltransferasa
- **NATs**: N-acetiltransferasas
- **Ntr**: respuesta regulada por nitrógeno
- **OAA**: oxaloacetato
- **OMP**: orotidina 5'-monofosfato
- **OMPDC**: orotidina 5'-fosfato descarboxilasa
- **OPRTasa**: orotato fosforibosiltransferasa
- **OPRTasa-103AcK**: orotato fosforibosiltransferasa con la K103 permanentemente acetilada
- **OPRTasa-26AcK**: orotato fosforibosiltransferasa con la K26 permanentemente acetilada
- **ori**: origen de replicación
- **p300/CBP**: proteína de unión a E1A p300 /proteína de unión al elemento de respuesta al AMP cíclico (CREB)
- **pb**: pares de bases
- **PBS**: tampón fosfato salino (del inglés phosphate-buffered saline)
- **PCA**: análisis de componentes principales
- **PckA**: fosfoenolpiruvato carboxiquinasa
- **Pdh**: piruvato deshidrogenasa
- **PEP**: fosfoenolpiruvato
- **Pgk**: fosfoglicerato quinasa
- **Pi**: fosfato inorgánico
- **PoxB**: piruvato oxidasa
- **Ppc**: fosfoenolpiruvato carboxilasa
- **PPI**: pirofosfato
- **PRPP**: 5-fosfo-D-ribosil- α -1-pirofosfato

- **PRPP**: 5-fosfo- α -D-ribosa 1-difosfato
- **PRTasas**: fosforibosiltransferasas
- **Pta**: fosfotransacetilasa
- **PVDF**: fluoruro de polivinilideno
- **PykAF**: piruvato quinasa
- **PYR**: piruvato
- **qRT-PCR**: PCR cuantitativa a tiempo real
- **q_s**: velocidad específica de consumo de carbono
- **R5P**: ribosa-5-fosfato
- **RCC**: Represión Catabólica por Carbono
- **RFU**: unidades de fluorescencia relativa
- **rpm**: revoluciones por minuto
- **RpoD**: factor sigma de la ARN polimerasa
- **RpoS**: factor sigma de la ARN polimerasa
- **rrs**: gen del 16S ARNr
- **RU5P**: ribulosa-5-fosfato
- **S7P**: pseudoheptulosa-7-fosfato
- **sARN**: pequeño ARN no codificante
- **SatP**: simportador del acetato y succinato
- **SD**: Shine-Dalgarno
- **SDC**: desoxicolato de sodio
- **Sir2**: Regulador Silencioso de la Información 2
- **Sistema PTS**: Sistema Fosfoenolpiruvato Fosfotransferasa
- **SLIC**: clonación independiente de secuencia y ligación
- **SRC**: coactivador de receptores de esteroides
- **SUC**: succinato
- **SucAB**: α -cetoglutarato deshidrogenasa
- **SUC-CoA**: succinil-coenzima A
- **TAFII**: factores asociados a la TBP
- **TktAB**: transketolasa
- **TopA**: topoisomerasa I
- **TpiA**: triosa-fosfato isomerasa
- **TUS**: TB7-glucosa-estacionaria
- **TUX**: TB7-glucosa-exponencial
- **TYS**: TB7-glicerol-estacionaria
- **TYX**: TB7-glicerol-exponencial
- **UMP**: uridina 5-monofosfato
- **UTP**: uridina 5-trifosfato
- **VHb**: hemoglobina de *Vitreoscilla stercoraria*
- **wt**: cepa silvestre
- **X5P**: xilulosa-5-fosfato
- **YFP**: proteína amarilla fluorescente Kringle
- **Y_{x/s}**: rendimiento en biomasa
- **Zwf**: glucosa-6-fosfato deshidrogenasa

Índice

Resumen	i
Summary	ix
Índice de abreviaturas	xvii
Índice	xxi
<hr/>	
Capítulo 1: Introducción	1
<hr/>	
<i>Escherichia coli</i> y su importancia como organismo modelo	3
<hr/>	
Metabolismo central de <i>E. coli</i>	4
<hr/>	
Metabolismo central del carbono (MCC) en <i>E. coli</i> y su regulación	4
Metabolismo de la glucosa	9
Metabolismo del glicerol	10
Metabolismo del acetato	11
Metabolismo del nitrógeno	15
<hr/>	
Regulación postraduccional por Nε-acetilación de lisinas	17
<hr/>	
Nε-acetilación de lisinas: acetilación enzimática	19
Nε-acetilación de lisinas: acetilación no enzimática o química	19
Desacetilación de lisinas	20
Importancia de la Nε-acetilación en <i>E. coli</i>	21
Técnicas para el estudio de la Nε-acetilación	23
<hr/>	
Producción de proteínas recombinantes en <i>E. coli</i>	25
<hr/>	
Selección del hospedador y del vector de expresión para optimizar la producción de proteínas recombinantes	26
Estrategias para aumentar la producción de proteínas recombinantes en <i>E. coli</i>	29
<hr/>	
Referencias	32
<hr/>	
Capítulo 2: Objetivos	49
<hr/>	
Capítulo 3: Optimización de la producción de proteínas recombinantes mediante la elección racional de la fuente de carbono y nitrógeno utilizando cepas de <i>E. coli</i> BL21 deficientes en genes del metabolismo del acetato	53
<hr/>	
Resumen	55
<hr/>	
Introducción	56
<hr/>	
Materiales y Métodos	59
<hr/>	
Resultados	62
<hr/>	
Discusión	76
<hr/>	

Referencias	87
Anexo	93
Capítulo 4: Impacto del sistema de expresión sobre la producción de proteínas recombinantes en <i>Escherichia coli</i> BL21	101
Resumen	103
Introducción	103
Materiales y Métodos	106
Resultados	110
Discusión	119
Referencias	125
Anexo	131
Capítulo 5: Regulación de la ruta de biosíntesis de pirimidinas por acetilación de la OPRTasa de <i>Escherichia coli</i>	133
Resumen	135
Introducción	135
Materiales y Métodos	139
Resultados	147
Discusión	160
Referencias	167
Anexo	174
Capítulo 6: Influencia de la fuente de carbono y nitrógeno sobre el acetiloma de <i>E. coli</i>	181
Resumen	183
Introducción	184
Materiales y Métodos	186
Resultados	191
Discusión	215
Referencias	224
Anexo	230
Capítulo 7: Conclusiones/Conclusions	233
Discusión final	235
Conclusiones	240
Conclusions	242
Referencias	244

Capítulo 1

Introducción

***Escherichia coli* y su importancia como organismo modelo**

Escherichia coli, *E. coli*, es un bacilo anaerobio facultativo de tipo Gram-negativo, cuyas dimensiones son 1 x 0,35 µm, aproximadamente. Esta bacteria puede presentar flagelos y fibras amiloides, denominadas curli, que emplea para su movimiento y para su adhesión a superficies u otras bacterias. *E. coli* fue descubierta en 1885 por el microbiólogo y pediatra Theodor Escherich en heces de lactantes, y fue denominada inicialmente *Bacterium coli commune* [1]. Filogenéticamente, *E. coli* es miembro de la familia Enterobacteriaceae, a la cual también pertenecen bacterias de los géneros *Salmonella*, *Enterobacter*, *Klebsiella* y *Serratia*, entre otros, y cuyo hábitat natural es el tracto intestinal de algunas especies de animales. Así, *E. coli* se encuentra principalmente formando parte del microbioma intestinal de mamíferos, aves, reptiles y peces, aunque también puede adaptarse para sobrevivir fuera de este entorno, y está presente en agua, suelos y plantas [2].

La presencia de esta bacteria en multitud de nichos y su fácil aislamiento y manejo han hecho que sea uno de los microorganismos más ampliamente estudiados, siendo uno de los primeros en los que se ha secuenciado su genoma completo [3]. Además, presenta una serie de características que han permitido su implantación como organismo modelo en los ámbitos de la genética, biología molecular y la biotecnología. Entre estas características destacan su consideración como microorganismo de bajo riesgo (nivel de bioseguridad 1), su elevada velocidad de crecimiento en multitud de medios de cultivo sin requerimientos especialmente costosos, la posibilidad de escalado de los procesos en los que se emplea, la alta capacidad para la expresión de proteínas y otros compuestos, el conocimiento completo de su genoma, la disponibilidad de una gran multitud de herramientas para su manipulación genética, el amplio conocimiento de su transcriptoma, proteoma y metaboloma, y la elevada plasticidad genómica, que le permite adaptarse a distintas condiciones [4]. Por todas estas razones, esta bacteria es uno de los hospedadores microbianos más ampliamente utilizados como vector de expresión para la producción de proteínas recombinantes, DNA plasmídico o biofármacos, tanto en el ámbito de la investigación como en el campo de la biotecnología industrial [4]–[6].

Además, en los últimos años, el estudio de la microbiota, en la que *E. coli* es predominante, y su interacción con las células del huésped ha suscitado un gran interés, ya que se ha identificado una relación entre el desequilibrio microbiano y enfermedades

como la inflamación intestinal crónica y el cáncer colorrectal. Además, también se ha comprobado la influencia del microbioma sobre el metabolismo, la eficacia y la toxicidad de determinados fármacos [7], [8].

Por todo lo anterior, el estudio del metabolismo de *E. coli*, de sus factores de virulencia y de su regulación, es esencial para el control, la optimización y la adecuación de esta para distintos fines.

Metabolismo central de *E. coli*

El metabolismo central es un proceso bioquímico fundamental que convierte los nutrientes en energía y precursores elementales, lo que permite a las células mantener sus estructuras, crecer y responder a los cambios de su entorno [9]–[11]. Por ello, es importante un conocimiento profundo del metabolismo central del carbono y de la asimilación del nitrógeno, así como la regulación de los mismos, para comprender los mecanismos de adaptación de la bacteria y poder maximizar los flujos encaminados a la producción de compuestos industriales por su parte.

Metabolismo central del carbono (MCC) en *E. coli* y su regulación

El metabolismo central del carbono (MCC) está implicado en el transporte al interior de la célula de las principales fuentes de carbono y su oxidación [12]. Los principales metabolitos producidos por *E. coli* son derivados de intermediarios o cofactores de las rutas del MCC, por lo que su estudio es esencial en ingeniería metabólica [12], [13]. Además, el MCC juega un papel importante en la coordinación entre la disponibilidad de nutrientes y la progresión del ciclo celular [14]–[16]. Las principales rutas del MCC son la glicólisis, la gluconeogénesis, el ciclo de los ácidos tricarbónicos (ciclo TCA), el ciclo del glioxilato, el metabolismo del acetato, las reacciones anapleróticas, la ruta de las pentosas fosfato y el Sistema Fosfoenolpiruvato Fosfotransferasa (PTS) [9], [12] (Figura 1). Las distintas fuentes de carbono pueden entrar por diversos nodos a la ruta de la glicólisis para ser metabolizadas. En la segunda parte de la glicólisis, el fosfoenolpiruvato (PEP) puede ser convertido a piruvato mediante la piruvato quinasa (PykAF) o puede pasar a oxalacetato mediante la reacción anaplerótica de la fosfoenolpiruvato carboxilasa (Ppc), conectando directamente la ruta con el ciclo TCA. El PEP también está implicado en la cascada de fosforilación para el transporte de azúcares,

conectando la ruta glicolítica con la disponibilidad del azúcar, como se explicará más adelante. El último producto de la glicólisis, el piruvato, es oxidado a acetil-CoA (acetil-Coenzima A) mediante la piruvato deshidrogenasa (Pdh). El acetil-CoA participa en distintos tipos de reacciones e interconecta la glicólisis con el metabolismo de lípidos, el metabolismo del acetato, el ciclo TCA y el ciclo del glioxilato. Por lo tanto, los productos finales de la glicólisis, PEP y piruvato, pueden entrar al ciclo TCA a través del acetil-CoA o mediante reacciones anapleróticas. Las denominadas reacciones anapleróticas reponen los intermedios del ciclo TCA que fueron utilizados con fines anabólicos. Así, en condiciones gluconeogénicas, los intermedios del ciclo TCA, oxalacetato o malato, se convierten en piruvato y PEP por descarboxilación, y de esta forma el nodo PEP-piruvato-oxalacetato proporciona los precursores para la gluconeogénesis. Por lo tanto, el enlace metabólico entre la glicólisis, la gluconeogénesis y el ciclo TCA está representado por el nodo PEP-piruvato-oxalacetato. En cuanto al ciclo de las pentosas fosfato, la rama oxidativa de la vía suministra energía reductora para los procesos biosintéticos celulares, pues genera NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato) a través de la oxidación de la glucosa-6-fosfato (G6P) por la G6P deshidrogenasa (Zwf) [12], [17]–[19] (Figura 1).

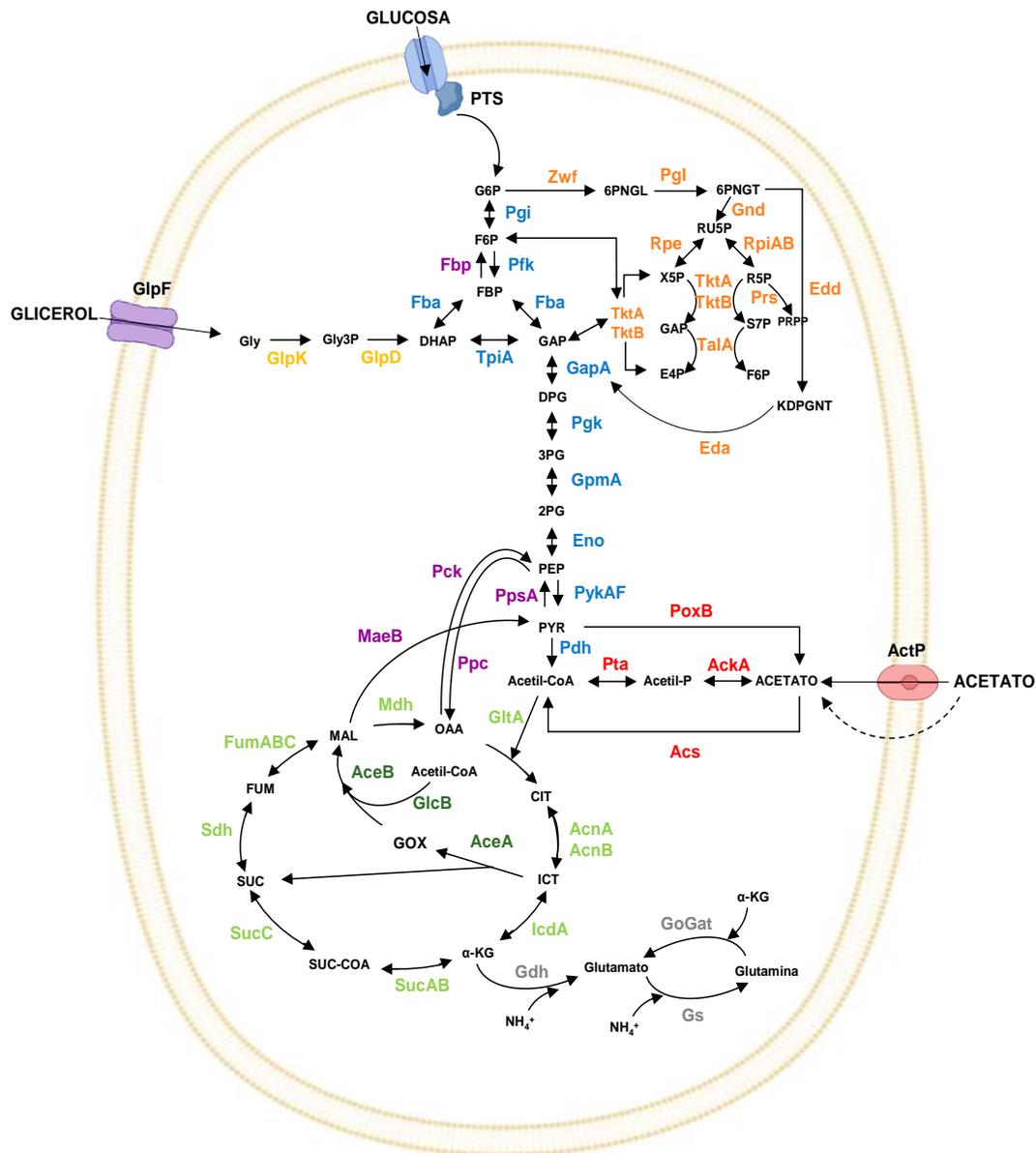


Figura 1: Rutas principales del metabolismo central del carbono de *E. coli*. Enzimas marcadas en colores por rutas: glicólisis (azul), incorporación de glicerol (amarillo), ruta de las pentosas fosfato (naranja), metabolismo del acetato (rojo), ciclo TCA (verde), ciclo del glioxilato (verde oscuro), gluconeogénesis (morado) y asimilación de nitrógeno (gris). Se muestra el sistema de transporte de fuentes de carbono de tipo PTS, como la glucosa, el transportador del acetato (ActP) y el transportador del glicerol (GlpF). Abreviaturas de los metabolitos: Gly, glicerol; Gly3P, glicerol-3-fosfato; G6P, glucosa-6-fosfato; F6P, fructosa-6-fosfato; FBP, fructosa-1,6-bifosfato; DHAP, dihidroxiacetona-fosfato; GAP, gliceraldehído 3-fosfato; DPG, 1,3-bifosfoglicerato; 3PG, 3-fosfoglicerato; 2PG, 2-fosfoglicerato; PEP, fosfoenolpiruvato; PYR, piruvato; 6PGLN, 6-fosfoglucono- δ -lactona; 6PGNT, 6-fogluconato; RU5P, ribulosa-5-fosfato; R5P, ribosa-5-fosfato; X5P, xilulosa-5-fosfato; S7P, pseudoheptulosa-7-fosfato; E4P, eritrosa-4-fosfato; KDPGNT, 2-ceto-3-deoxi-D-gluconato-6-fosfato; PRPP, 5-fosfo-D-ribosil- α -1-pirofosfato; Acetil-CoA, acetil coenzima A; Acetil-P, acetil fosfato; CIT, citrato; ICT, isocitrato; GOX, glioxilato; α -KG, α -cetoglutarato; SUC-CoA, succinil-coenzima A; SUC, succinato; FUM, fumarato; MAL, malato; OAA, oxalacetato.

E. coli es capaz de consumir una gran variedad de fuentes de carbono, aunque prefiere aquellas a partir de las cuales se obtiene mayor energía y velocidad de crecimiento, lo que permite una mejor supervivencia en el medio. Así, la presencia de estas fuentes de carbono (como la glucosa) inhibe la utilización de otras fuentes de carbonos secundarias, en un fenómeno conocido como Represión Catabólica por Carbono (RCC), a través del cual se reprime o se previene la transcripción de los genes necesarios para el consumo de la fuente secundaria [20]. La RCC regula entre el 5 y el 10% de los genes del genoma de *E. coli*, y el sistema de transporte PTS juega el principal papel en la regulación de esta respuesta [10], [21].

El sistema PTS puede transportar más de 20 carbohidratos distintos al interior celular (como glucosa, manosa o fructosa), por lo que se distingue entre fuentes de carbono PTS, que se consumen preferencialmente, y fuentes de carbono no PTS que no utilizan este sistema. El sistema PTS involucra enzimas de la membrana y del citoplasma que participan en la cascada de fosforilación para la transferencia del grupo fosforilo del PEP al azúcar importado [21], [22] (Figura 2). Las enzimas comunes a todos los sistemas PTS son la enzima I (EI) y la proteína portadora de histidina (HPr), mientras que la enzima II (EII) es específica del sustrato y está formada por dos dominios, el dominio intermembrana (EIIBC) y el dominio citoplasmático (EIIA) [17], [21]. Por lo tanto, cuando se transporta un carbohidrato PTS, el estado de fosforilación de las enzimas PTS cambia, reflejando la disponibilidad de carbohidratos y el estado energético de la célula. Así, la regulación de la RCC se produce por la modulación del estado de fosforilación de la EIIA. En presencia de sustratos rápidamente metabolizables de tipo PTS, EIIA se encuentra principalmente desfosforilada, pues el fosfato se transfiere hacia el azúcar [23]. EIIA desfosforilada puede interactuar con las permeasas de multitud de fuentes de carbono no PTS como la lactosa, la melibiosa y la maltosa, inhibiendo su transporte y la utilización de carbohidratos no PTS. En esta línea, EIIA desfosforilada también puede interactuar con la enzima glicerol quinasa inhibiendo su actividad, y por ende el empleo de glicerol como sustrato. Este mecanismo, que evita que la célula reciba los inductores (azúcares no PTS) requeridos para la expresión de los operones catabólicos, se denomina exclusión de inductores [21], [24]. Por su parte, el α -KG (α -cetoglutarato) regula el consumo de fuentes de carbono de tipo PTS mediante la inhibición alostérica de la EI [25]. El estado de fosforilación de EIIA, está implicado en otro mecanismo de regulación de la RCC, pues cuando EIIA se encuentra mayoritariamente fosforilada, porque no hay glucosa presente, activa la adenilato ciclasa (CyaA) y conduce a un aumento del nivel de AMPc (adenosín

monofosfato cíclico) intracelular [21], [24], [26]. El AMPc se une y activa a Crp (proteína receptora de AMPc), el cual es un factor de transcripción global de *E. coli* que regula la transcripción de una gran cantidad de genes. Así, la formación del complejo Crp-AMPc activa la transcripción de genes que permiten la utilización y metabolización de fuentes de carbono de tipo no PTS [17], [24] (Figura 2).

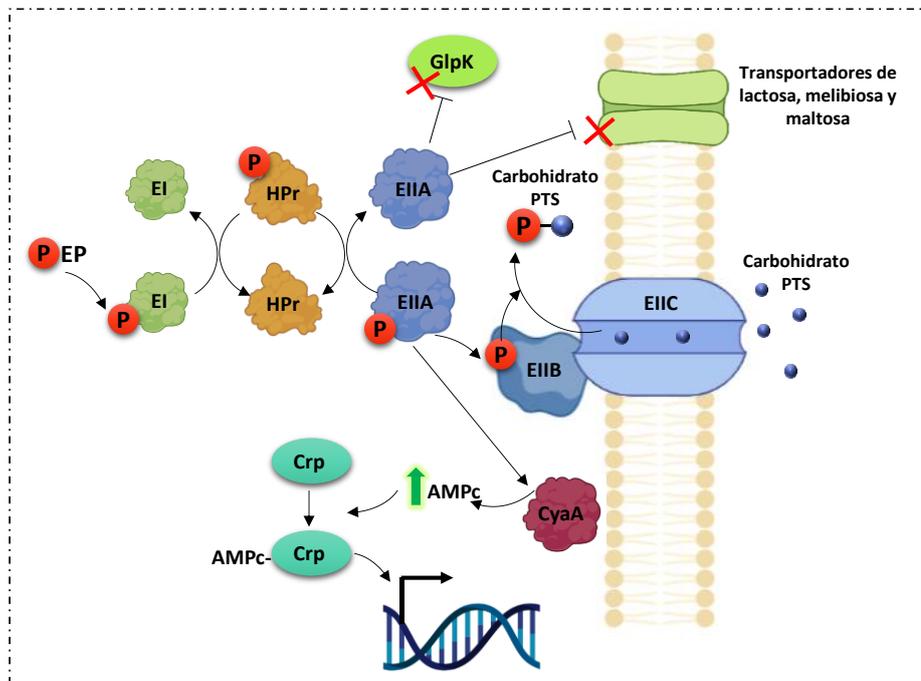


Figura 2: Sistema PTS en *E. coli* con la cascada de fosforilación. Círculo rojo con P indica fosforilación. Se muestra la regulación por parte de EIIA desfosforilada (exclusión de inductores), y la activación de la expresión de genes controlados por Crp derivada de la acción de EIIA fosforilada.

Las vías metabólicas centrales de *E. coli* están controladas por una serie de factores de transcripción globales que dependen de las fuentes de carbono disponibles y de las condiciones de cultivo, y que tienen un impacto simultáneo en el equilibrio del metabolismo central, la respiración y la eficiencia del crecimiento. Los factores de transcripción predominantes son Crp, el activador represor de catabolitos (Cra o FruR) y la proteína de control de la respiración aeróbica (ArcA), los cuales regulan la expresión de los genes de la glicólisis, la gluconeogénesis, del complejo piruvato deshidrogenasa, el metabolismo del acetato, el ciclo TCA y el ciclo del glioxilato. Se sabe que estos factores de transcripción globales tienen efectos opuestos en la expresión de los genes de las vías metabólicas [27], [28]. Así, ArcA actúa sobre los genes del ciclo TCA y del ciclo del glioxilato, y su actividad depende del estado redox de las quinonas. Un alto nivel de quinonas oxidadas impide la fosforilación de ArcA, lo que a su vez, alivia la represión de

los genes del ciclo TCA y del glioxilato, mientras que un alto nivel de quinonas reducidas conduce a la fosforilación de ArcA y a la represión resultante de estos genes [29]. En cuanto a Crp, este es el principal factor de transcripción en la RCC, por lo que está implicado en la activación de la expresión de los genes para la asimilación de distintas fuentes de carbono y, además, activa también los genes de la piruvato deshidrogenasa y el ciclo TCA [17]. Cra provoca la represión de la mayoría de los genes de la glicólisis, de la ruta de las pentosas fosfato, así como de los genes del complejo piruvato deshidrogenasa, mientras que activa la transcripción de los genes del ciclo TCA, del ciclo del glioxilato, de la vía gluconeogénica y de la transferencia de electrones [27], [30]. Además, Cra se inactiva por su unión a fructosa-1-fosfato (F1P) o fructosa-1,6-bifosfato (FBP). Estos catabolitos están presentes en altas concentraciones durante el crecimiento en presencia de azúcares, pero en baja concentración durante el crecimiento en presencia de sustancias gluconeogénicas. Por lo tanto, Cra permite un crecimiento bacteriano óptimo en fuentes de carbono pobres, redirigiendo y reprimiendo el flujo de la glicólisis, y activando el ciclo del glioxilato y la vía respiratoria [27], [31]. Así, en *E. coli*, el AMPc, la FBP y la F1P pueden explicar por sí solos la mayor parte de la regulación transcripcional del metabolismo central, a través de su interacción con los dos principales factores de transcripción Crp y Cra [32]. Mientras que el complejo Crp-AMPc controla principalmente el inicio de la utilización de la fuente de carbono y la activación del ciclo TCA, Cra influye en la dirección del flujo de carbono reprimiendo la glicólisis [27], [33].

Metabolismo de la glucosa

La glucosa es considerada la mejor fuente de carbono para *E. coli* por su alto valor metabolizable, y es consumida preferentemente debido a que es transportada por el sistema PTS. El consumo de glucosa por parte de la bacteria provoca unos flujos elevados a través de la glicólisis que se traducen en altas tasas de crecimiento, y dan lugar a un bajo grado de fosforilación de la EIIA. Todo ello conlleva una inhibición de los sistemas de transporte de otras fuentes de carbono y unos niveles de AMPc muy bajos, que impiden la activación de Crp, y por tanto, la activación de la expresión de genes para el metabolismo de fuentes de carbono alternativas [17], [26] (Figura 2).

El metabolismo de la glucosa comienza con su captación a través del sistema PTS y es metabolizada para obtener energía, poder reductor y metabolitos precursores esenciales a través de la glicólisis. Así, tal y como se ha indicado previamente, la glucosa

participa en el metabolismo en varias vías interconectadas del MCC entre las que se encuentran la glicólisis, la gluconeogénesis, la vía de las pentosas fosfato, el ciclo TCA, la desviación del glioxilato, las reacciones anapleróticas y la producción y asimilación de acetato [12] (Figura 1).

Cuando la bacteria crece empleando glucosa en condiciones aerobias, el rápido flujo a través de la glicólisis conlleva un desequilibrio entre el catabolismo de la glucosa y la respiración celular, lo que provoca un cuello de botella en el nodo del piruvato, la acumulación de acetil-CoA y su consiguiente conversión en acetato. El acetato es excretado al medio extracelular mediante un mecanismo que se conoce como desbordamiento de acetato, en el cual *E. coli* puede convertir hasta el 50% de la glucosa en acetato en condiciones de abundancia de nutrientes [34]. La fermentación del acetato es ineficaz, ya que produce unos 14 ATP (adenosina 5-trifosfato) menos por glucosa consumida que la fosforilación oxidativa [35]. A pesar de ello, el metabolismo de desbordamiento es fundamental para maximizar el flujo glicolítico, y para que en condiciones de riqueza de nutrientes, *E. coli* aumente la tasa de crecimiento a expensas del rendimiento en biomasa y el ATP [14], [26]. Por tanto, la optimización de estas vías es objeto de estudio en ingeniería metabólica para conseguir un uso más eficiente de la glucosa como fuente de carbono en el desarrollo de bioprocesos cuando se utiliza *E. coli* como hospedador. Esta desviación del flujo de carbono al metabolismo del acetato será explicada más detalladamente en el apartado de Metabolismo del acetato por su particularidad en *E. coli*.

Metabolismo del glicerol

El glicerol es una fuente de carbono de tipo no PTS que tiene relevancia desde el punto de vista biotecnológico debido a que es un compuesto fácilmente disponible y barato, pues se genera como subproducto durante los procesos de producción de biodiésel y bioetanol. Por lo tanto, su empleo para la conversión en productos de valor añadido es de gran interés [36]. En *E. coli* el glicerol entra al interior celular por el transportador GlpF, y es incorporado al metabolismo central como dihidroxiacetona-fosfato (DHAP), un metabolito que puede participar tanto en los procesos gluconeogénicos como en los glicolíticos. El glicerol se convierte en DHAP mediante su fosforilación por la glicerol quinasa (GlpK), para dar glicerol-3-fosfato (Gly3P), y su posterior deshidrogenación por la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (GlpD) (Figura 1).

Además, el Gly3P es un metabolito clave que participa en varias vías, incluidas las vías glicolíticas, la de las pentosas fosfato y la biosíntesis de fosfolípidos [24], [37].

Las proteínas implicadas en el metabolismo del glicerol están codificadas por los genes del regulón *glp*. Este está controlado positivamente por Crp-AMPc, por lo que la expresión de estos genes está sujeta a RCC. Además, la actividad de la enzima GlpK, como se ha mencionado en el apartado anterior, está regulada por la exclusión de inductores mediada por la RCC (Figura 2). Así, GlpK es inhibida por la FBP (intermedio de la glicólisis) y por el EIIA desfosforilado, los cuales se encuentran en altas concentraciones cuando el flujo a través de la glicólisis es elevado por la utilización de una fuente de carbono de tipo PTS [24], [37]–[39].

El glicerol es considerado una fuente de carbono de baja energía, pues durante su metabolización se produce una menor cantidad de ATP que cuando se emplean otras fuentes de carbono como la glucosa [35], [39]. Es ampliamente conocido que *E. coli* desarrolla respuestas de estrés calórico cuando crece bajo la limitación de carbono, y que estas respuestas forman parte de la respuesta general al estrés que implican varios cambios en la fisiología celular [39]. Por tanto, cuando se utiliza el glicerol como única fuente de carbono se produce una respuesta de estrés que incluye una activación del proceso gluconeogénico de reciclaje de carbono. Así, se ha observado un aumento de la sobreexpresión de los genes y las proteínas de las rutas gluconeogénicas, del ciclo del glioxilato, de la parte alta del ciclo TCA y de la reincorporación del acetato [39]–[41]. Esto provoca una disminución relevante de la acumulación de acetato, y el flujo de carbono se redirige a través de la sección inferior del ciclo TCA, permitiendo el reciclaje gluconeogénico de carbono a través de la derivación de glioxilato [39], [41].

Metabolismo del acetato

El acetato se encuentra de forma ubicua en los entornos naturales y es uno de los ácidos grasos de cadena corta con mayor disponibilidad en el intestino. Este compuesto, por tanto, puede ser empleado como fuente de carbono para las Enterobacterias presentes, así como para otras bacterias de la microbiota intestinal [42]. Desde el punto de vista biotecnológico, se están dedicando grandes esfuerzos de ingeniería de bioprocesos para permitir la producción sostenible de productos químicos de valor añadido empleando acetato como fuente de carbono [35]. En *E. coli* y otros microorganismos, el acetato está implicado en la regulación de procesos funcionales,

como la formación de biofilms, la motilidad, la respuesta a estrés, las respuestas fisiopatológicas y la colonización de entornos [34], [43], [44].

Como se ha mencionada, cuando *E. coli* crece en un exceso de fuente de carbono, principalmente glucosa, excreta acetato al medio extracelular (desbordamiento de acetato) y posteriormente lo reincorpora para metabolizarlo cuando la glucosa ya es limitante en el medio. La acumulación y excreción de acetato es debida al desequilibrio entre el catabolismo de las fuentes de carbono y la respiración celular para la producción de energía [34]. Así, la mayor parte del carbono entra al ciclo TCA para su metabolismo, pero cuando hay un exceso de glucosa, el ciclo TCA está limitado y la acumulación del acetil-CoA conduce a su excreción en forma de acetato [34], [45], [46]. Esta excreción de acetato se debe a la necesidad de reponer Coenzima A (CoASH), y constituye una respuesta celular global que permite equilibrar un rápido crecimiento celular con la síntesis de biomasa [19], [47], [48]. El acetato es reincorporado y consumido por la bacteria como una fuente de carbono de tipo no PTS. Aunque esta molécula puede atravesar libremente la membrana, su difusión puede verse saturada, por lo que existen dos transportadores específicos de acetato, el ActP y el simportador de acetato/succinato SatP [47], [49]. La actividad del simportador SatP está ligada a la fase de crecimiento exponencial, mientras que la permeasa ActP es más activa en la fase estacionaria [50], [51], lo que sugiere que el transporte transmembrana facilitado es el principal mecanismo de captación de acetato en *E. coli*.

El desbordamiento de acetato es uno de los mayores inconvenientes en el desarrollo de procesos biotecnológicos que emplean esta bacteria como organismo hospedador, pues inhibe el crecimiento celular al reducir el pH del medio y disminuye el rendimiento de los productos al consumir equivalentes de carbono. Por tanto, este fenómeno compromete la formación de compuestos de pequeño peso molecular, la transcripción de ADN plasmídico y la producción de proteínas recombinantes [34], [52], [53]. En este sentido, se han desarrollado multitud de estrategias para eliminar los efectos adversos producidos por el desbordamiento de acetato [52], [53]. Las vías responsables del desbordamiento de acetato en *E. coli* son la vía Pta-AckA, la de Acs y la de PoxB.

La vía Pta-AckA convierte el acetil-CoA en acetato en dos pasos. La enzima fosfotransacetilasa (Pta) convierte el acetil-CoA y el fosfato inorgánico (Pi) en acetil-P (acetil-fosfato) y CoASH, y la enzima acetato quinasa (AckA) utiliza acetil-P y ADP (adenosina 5-difosfato) para formar acetato y ATP [47], [54] (Figura 3). Esta vía es la

principal productora de acetato en la fase exponencial de crecimiento [55], y acopla el metabolismo energético con los del carbono y el fósforo, por lo que tiene un importante papel catabólico [47]. Esta ruta es reversible, puede operar en ambas direcciones reincorporando el acetato al metabolismo central, y constituye una ruta de alta capacidad debido al elevado nivel en el que están presentes estas enzimas [19], [54]. Sin embargo, se considera una ruta de baja afinidad (constante de Michaelis, K_M , de 7-10 mM), por lo que consume el acetato cuando este se encuentra a concentraciones elevadas en el medio extracelular (>8mM) [47], [54]–[56]. Los genes codificantes para estas enzimas forman el operón *pta-ackA*, y su transcripción está regulada por el regulador transcripcional de la transición de condiciones aerobias a anaerobias (Fnr), por ArcA y forma parte del regulón del sistema de dos componentes CreBC [28], [34]. Además, un estudio reciente ha mostrado la regulación negativa de la expresión de *ackA* mediante un sARN (pequeño ARN no codificante) que se produce por el procesamiento del operón *sdhCDABsucABCD*, el cual codifica para las enzimas del ciclo TCA [57].

La otra vía de producción del acetato es catalizada por la enzima piruvato oxidasa, PoxB de manera unidireccional. Esta ruta es de menor importancia que la vía Pta-AckA y se encuentra menos expresada, aunque es la dominante en la fase estacionaria de crecimiento [55], [58]. PoxB es una proteína de membrana que produce acetato y CO_2 directamente a partir de la descarboxilación oxidativa del piruvato, acoplando la oxidación del sustrato a la cadena de transporte de electrones a través de la ubiquinona [59] (Figura 3). La expresión de *poxB* depende del factor sigma RpoS, que es necesario para la transcripción de gran número de genes inducidos en la fase estacionaria, y se ve activada bajo condiciones de estrés o limitación de glucosa [39], [60]. A pesar de su escasa función en la formación de acetato, se cree que PoxB puede actuar disminuyendo el estrés oxidativo, preservando la reserva de CoASH, proporcionando energía y contribuyendo a la eficiencia metabólica de *E. coli* [47], [59].

La principal ruta de asimilación de acetato durante la fase estacionaria es llevada a cabo de forma irreversible por la enzima acetil-CoA sintetasa (Acs). Acs convierte el acetato y el ATP en el intermedio acetil-AMP, produciendo PPI, tras ello el acetil-AMP reacciona con CoASH para formar acetil-CoA, liberando AMP (Figura 3). Acs es una enzima de alta afinidad (K_M 200 μM) adecuada para metabolizar el acetato cuando se encuentra a bajas concentraciones en el medio extracelular (<8mM) [61], [62]. El gen *acs* forma parte del operón *acs-yfcH-actP*, junto con otros dos genes: *yfcH*, que codifica para una proteína de la membrana interna de función desconocida, y *actP*, que codifica la permeasa [19],

[50]. La expresión de *acs* está fuertemente controlada por muchos factores, y se ve afectada por la limitación de carbono y la baja presión de oxígeno [63]. Así, la expresión de *acs* está regulada por los factores sigma RpoS y RpoD, por el regulador de oxígeno Fnr, por RCC (Crp-AMPC) y por las proteínas nucleoides Fis y IHF [63], [64]. Fis regula negativamente la expresión de *acs* durante la fase exponencial de crecimiento y Crp-AMPC la regula positivamente durante la fase estacionaria [47], [63]. En consecuencia, la expresión de este sistema es alta en la fase estacionaria, cuando se ha consumido la fuente de carbono principal, permitiendo el consumo del acetato como fuente de carbono de tipo no PTS. Además, Acs está regulada postraduccionalmente por acetilación de lisinas en un mecanismo conservado para las acil-CoA sintetetas formadoras de AMP [34], [65]. La actividad de Acs en *E. coli* se ve reducida por acetilación en el residuo K609 a través de la lisín-acetiltransferasa PatZ y su efecto puede ser revertido por la desacetilada CobB [66], [67] (Figura 3).

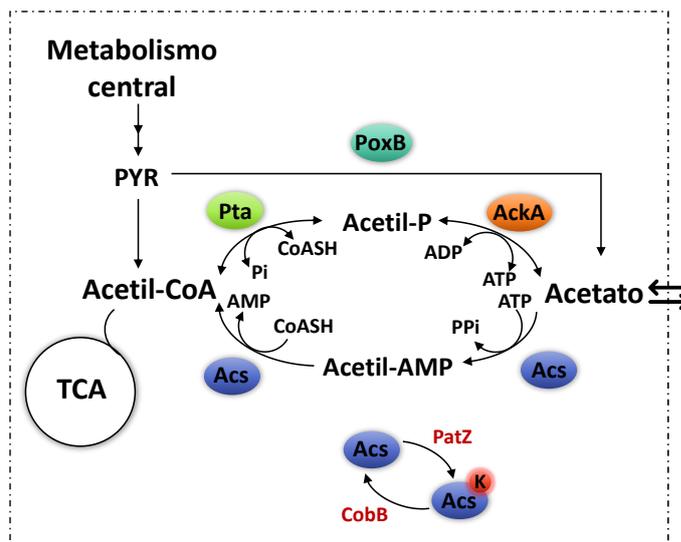


Figura 3: Metabolismo del acetato en *E. coli*. Rutas de producción, PoxB y Pta-AckA, y consumo de acetato, Acs y Pta-AckA, en *E. coli*. Se indica la regulación de Acs por acetilación de lisinas, mediante las enzimas PatZ y CobB.

Atendiendo a las distintas vías, se ha sugerido que la acumulación de acetato a elevadas velocidades de crecimiento se produce, principalmente, como resultado de la reducción de la capacidad de asimilación debido a la regulación a la baja de Acs por RCC [46]. Esto provocaría que el acetato no se asimilara hasta que no se ha consumido la fuente de carbono de tipo PTS. Este consumo diaúxico o secuencial de sustratos, se ha mantenido durante mucho tiempo, sin embargo, en estudios recientes se ha demostrado que *E. coli* puede consumir glucosa y acetato simultáneamente en un medio con exceso

de glucosa [56]. En este estudio se muestra que la vía Pta-AckA por sí sola puede realizar tanto la producción como el consumo de acetato en caso de exceso de glucosa. Así, cuando la concentración externa de acetato está por debajo de un valor umbral de 8 mM se produce acetato, y cuando está por encima de este valor umbral, el acetato se consume, permitiendo un ajuste fino del metabolismo del acetato en función de su disponibilidad. En estas condiciones, la vía Pta-AckA resulta ser central para ambas direcciones de flujo, mientras que las rutas alternativas (Acs o PoxB) no desempeñan prácticamente ningún papel [56].

La importancia del metabolismo del acetato también se debe a la gran relevancia de sus intermediarios acetil-P, acetil-CoA y acetil-AMP. El acetil-CoA conecta las vías de la glicólisis con el metabolismo del acetato y el ciclo TCA, y participa en multitud de reacciones [19]. Además, estos metabolitos actúan como dadores de acetilo en el proceso de acetilación de lisinas que se detallará más adelante. Por su parte el acetil-P actúa también como agente fosforilador en la regulación de muchas proteínas. Por ejemplo, el acetil-P fosforila proteínas relacionadas con las vías de transducción de señales, como CheY-CheA y reguladores globales de la concentración de fosfato, como PhoP-PhoQ, [68], [69]. También se ha demostrado que la síntesis de acetil-P es vital para la regulación de las porinas de la membrana externa, la patogénesis, la degradación de proteínas dañadas y la regulación de varios factores de virulencia [46].

Metabolismo del nitrógeno

El nitrógeno es un elemento esencial para todos los organismos, pues forma parte de muchos metabolitos intracelulares. *E. coli* es capaz de asimilar una gran variedad de fuentes de nitrógeno como aminoácidos, nucleobases y sus derivados, nitratos y otros compuestos nitrogenados, aunque el amonio es considerado la fuente de nitrógeno preferente en esta bacteria, pues sustenta la mayor velocidad de crecimiento [70], [71]. Así, el uso de fuentes de nitrógeno distintas al amonio requiere de su transformación en este para ser asimiladas. La asimilación del nitrógeno a partir del amonio es un proceso esencial que da como productos la glutamina y el glutamato [70]. Por lo tanto, la glutamina y el glutamato proporcionan el nitrógeno para las transaminasas, la formación del resto de aminoácidos, la síntesis de nucleótidos de purina y pirimidina, y la gran mayoría de los compuestos que contienen nitrógeno [70], [72], [73]. El proceso de asimilación del amonio comienza con su entrada al interior celular. Este puede difundir a

través de la membrana celular o ser transportado por la proteína transportadora AmtB [74]. Tras la entrada al interior celular, *E. coli* convierte el esqueleto de carbono del α -KG y el amonio en glutamato y glutamina, a través de dos vías alternativas formadas por la glutamato deshidrogenasa (Gdh), y por la glutamina sintetasa (Gs) y la glutamato sintetasa (GoGat). La vía de la Gdh convierte el α -KG y el amonio directamente en glutamato. La vía Gs-GoGat implica las actividades combinadas de la Gs, que amina el glutamato para formar glutamina, y la GoGat, que transfiere el grupo amida de la glutamina al α -KG para producir dos moléculas de glutamato [70], [73] (Figura 4). La vía de la Gdh no consume ATP, pero presenta una menor afinidad por el amonio que la Gs. Por lo tanto, se encarga de la asimilación del nitrógeno durante el crecimiento en medios con alto contenido de amonio y bajo nivel energético. Sin embargo, la vía Gs-GoGat funciona durante el crecimiento en medios con bajo contenido de amonio y alto nivel energético [70], [71].

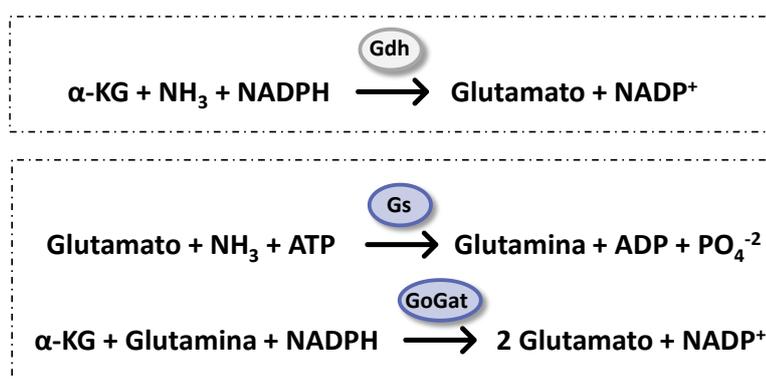


Figura 4: Reacciones de asimilación del amonio en *E. coli*. Vía de asimilación de la Gdh (arriba) y vía de asimilación Gs-GoGat (abajo).

Debido a que el nitrógeno forma parte de muchos componentes esenciales de la célula, la asimilación y utilización de este se encuentran ampliamente reguladas. Así pues, la limitación del nitrógeno en *E. coli* supone la puesta en marcha de la respuesta regulada por nitrógeno (Ntr), que conlleva la expresión de unos 100 genes, entre los que destaca el gen *glnA*, el cual codifica para la enzima Gs [70]. La Gs constituye el punto preferente de regulación de las vías de asimilación, pues la transcripción y la actividad catalítica de esta enzima están controladas y dependen de las concentraciones intracelulares de glutamina y α -KG [72]. La concentración de glutamina es el principal indicador del nivel de nitrógeno intracelular, así, las altas concentraciones de glutamina indican suficiencia de nitrógeno, mientras que las bajas concentraciones de glutamina indican limitación de nitrógeno y la puesta en marcha la Ntr [75], [76].

Asimismo, el metabolismo y asimilación del nitrógeno se encuentran relacionados con el metabolismo del carbono mediante el α -KG [77]. El α -KG es una molécula clave en la señalización del equilibrio entre el metabolismo del carbono y del nitrógeno, pues es un intermediario del TCA y aporta el esqueleto carbonado en la asimilación del amonio [70], [78]. Así, en condiciones de limitación de nitrógeno se reduce el flujo de α -KG fuera del ciclo TCA, los niveles de α -KG aumentan, lo que lleva a la represión de la captación de glucosa y a la inhibición de la síntesis de AMPc por la adenilato ciclasa, proporcionando circuitos de coordinación entre la asimilación de carbono y nitrógeno [25], [77], [79]. Además de esta conexión, existen otros vínculos que relacionan ambos metabolismos. Así, Crp regula la expresión de genes de la asimilación del nitrógeno [80] y existe un sistema similar al sistema PTS pero relacionado con el nitrógeno, PTSNtr, que es inhibido por glutamina y estimulado por α -KG. [77].

Regulación postraducciona por Nε-acetilación de lisinas

Las proteínas se sintetizan a partir de un conjunto de 20 aminoácidos, y una vez que han sido sintetizadas pueden ser modificadas mediante la unión covalente de grupos químicos a la cadena lateral o al esqueleto peptídico, lo que aumenta la complejidad y variabilidad de las proteínas sintetizadas [81]–[83]. La mayoría de estas modificaciones se dan tras la síntesis de la cadena polipeptídica, por lo que se denominan modificaciones postraduccionales (MPTs), y los grupos que se unen van desde pequeños grupos químicos, como metilo o fosfato, hasta cadenas polipeptídicas u otras estructuras complejas [81]. Estas modificaciones pueden repercutir en las propiedades químicas de los residuos a los que se unen o de las regiones adyacentes, influyendo en la carga neta de la proteína, sus propiedades de unión, su conformación y su función. De este modo, las MPTs desempeñan un papel crucial en la respuesta a cambios en las condiciones extracelulares e intracelulares, actuando como sensores, influyendo en las interacciones proteicas, la localización celular, la síntesis y el recambio proteico, el ciclo celular, la virulencia de ciertos organismos, y las interacciones entre proteínas, entre otros efectos [82], [84], [85]. Además, estas modificaciones pueden ser revertidas por enzimas especializadas, lo que les confiere una mayor capacidad reguladora [81], [84].

Las MPTs se encuentran conservadas y actualmente se conocen más de 200 tipos, entre los que se encuentran la fosforilación, la acetilación, la succinilación, la glicosilación, la ubiquitinación, la lipidación y la metilación, entre otras [81], [86]. La fosforilación de

proteínas es considerada una de las MPTs más importantes, y ha sido ampliamente estudiada en muchos organismos. Sin embargo, en los últimos años, el avance en las técnicas de proteómica y en las herramientas bioinformáticas ha permitido ahondar en el conocimiento de otras importantes MPTs y en las implicaciones de estas en el metabolismo de los organismos [81], [83], [87].

La acetilación de proteínas es una MPT que está siendo objeto de muchos estudios en la actualidad, debido a su capacidad reguladora, su alta prevalencia y a su conservación en todos los dominios de la vida [88], [89]. La acetilación de las proteínas se produce a través de una reacción de sustitución acil nucleófila entre un nucleófilo y un grupo acetilo activado, que suele estar en forma de acetil-CoA o acetil-P [90].

La acetilación de proteínas puede ser de dos tipos dependiendo de donde se dé. Así, la N α -acetilación se da en el grupo amino alfa de los aminoácidos terminales de las proteínas, y la N ϵ -acetilación se da en el grupo épsilon amino de las lisinas internas de las proteínas [89], [91]. La N α -acetilación es una MPT irreversible catalizada por N-acetiltransferasas (NATs) que transfieren el grupo acetilo del acetil-CoA al residuo N-terminal de la proteína [92]. La N α -acetilación está implicada en la estabilidad, la actividad, la localización celular y puede, incluso, marcar proteínas para su degradación [93]. Esta modificación es muy frecuente en arqueas y eucariotas, se estima que en mamíferos el 80% de las proteínas se encuentran acetiladas. Sin embargo, en bacterias esta modificación se considera poco frecuente, estimándose en *E. coli* que puede afectar a un 1% del proteoma [89].

La lisina es un aminoácido que contiene un grupo ϵ -amino cargado positivamente a pH fisiológico en el extremo de la cadena lateral [94]. Así pues, la N ϵ -acetilación altera la carga de la cadena lateral, incrementa el tamaño de la proteína y le confiere una mayor hidrofobicidad, lo que puede afectar a la estabilidad, la conformación, la localización, la actividad y la interacción de las proteínas modificadas con otras moléculas, regulando los flujos metabólicos y otros procesos fisiológicos [88], [89], [95], [96]. Esta modificación es abundante y se encuentra ampliamente distribuida por todos los dominios de la vida. Así, la N ϵ -acetilación fue descubierta en histonas en 1968 [97], y desde ese momento se han llevado a cabo multitud de estudios sobre la implicación de la acetilación en las histonas y la consiguiente regulación de la expresión génica [89], [98]. Además de la acetilación de histonas, se ha demostrado que la N ϵ -acetilación puede actuar sobre proteínas de un gran número de rutas distintas en diferentes organismos, y que esta MPT está relacionada con

el desarrollo de enfermedades como el cáncer, enfermedades neurodegenerativas y cardiovasculares [95], [99], [100]. Por otro lado, la Nε-acetilación en procariotas ha sido menos estudiada, fue descubierta en bacterias en 1992 en la proteína CheY [101], y tras ello ha sido ampliamente estudiada, identificando su abundancia y su implicación en la regulación de procesos biológicos [94].

Nε-acetilación de lisinas: acetilación enzimática

En la Nε-acetilación, la transferencia del grupo acetilo desde el dador a la lisina puede darse a través de enzimas o sin la implicación de estas. La acetilación enzimática de lisinas se da por medio de las enzimas lisín-acetiltransferasas (KATs), también conocidas como histonas acetiltransferasas, debido a su descubrimiento en la acetilación de histonas [88]. Las KATs son un gran grupo de enzimas que pertenecen a distintas familias: MYST (llamado así por los miembros MOZ, Ybf2/Sas3, Sas2 y Tip60), p300/CBP (proteína de unión a E1A p300 /proteína de unión al elemento de respuesta al AMP cíclico (CREB)), N-acetiltransferasas relacionadas con Gcn5 (GNAT), TAFII (factores asociados a la TBP) y SRC (coactivador de receptores de esteroides) [94], [102]–[105]. La mayoría de las enzimas de estas familias están presentes solamente en eucariotas, siendo GNAT la familia predominante en procariotas [106]. Estas familias no presentan homología de secuencia, pero sí una región conservada de unión al acetil-CoA [107]. El mecanismo general de la Nε-acetilación mediada por KATs consiste en la formación de un grupo ε-amino neutro por desprotonación que ataca al carbono carbonilo del acetil-CoA donante, lo que conduce a la acetilación de la lisina y a la liberación de CoASH [108] (Figura 5). En bacterias, la KAT mejor caracterizada es PatZ (también conocida como YfiQ, Pat o Pka) que pertenece a la familia GNAT y fue descubierta en *Salmonella enterica* (*S. enterica*) [65], presentando homólogos en multitud de bacterias [89]. En *E. coli*, PatZ es la KAT mejor caracterizada, aunque existen otras lisín-acetiltransferasas descubiertas recientemente, entre las que destaca YiaC [109].

Nε-acetilación de lisinas: acetilación no enzimática o química

En eucariotas, especialmente en las mitocondrias, el acetil-CoA puede actuar como dador de grupos acetilo y acetilar proteínas sin la necesidad de la implicación de las KATs [110]. Esta acetilación no enzimática se descubrió en histonas en 1970 [111], y gracias al

desarrollo de las técnicas de espectrometría de masas se ha revelado la importancia y la abundancia de esta acetilación química en multitud de proteínas [112], [113]. La acetilación no enzimática también ha sido detectada en procariontes, siendo en este caso el principal dador de acetilos el acetil-P [114]–[117] (Figura 5). Recientemente se ha descubierto que, en procariontes, el número de lisinas acetiladas por este proceso es superior a las acetiladas mediante acetilación enzimática [114], [115]. A diferencia de la acetilación enzimática, en la que las KATs reconocen específicamente las proteínas y residuos a acetilar, la acetilación no enzimática depende de la reactividad de la lisina. Una lisina susceptible de ser acetilada químicamente está determinada por el microambiente en el que se encuentra, su pKa, la accesibilidad debida a la estructura tridimensional y la concentración de los dadores de acetilo [89], [115]. El proceso de la acetilación química comienza con la desprotonación de la lisina objetivo, que puede darse por la presencia de un aminoácido cercano cargado negativamente o por una molécula de agua, por lo que el pKa de la lisina y el pH del medio son factores importantes. Tras ello, la lisina activada incorpora el grupo acetilo del acetil-P mediante un ataque nucleofílico mediado por aminoácidos cercanos cargados positivamente o, dependiendo del pH, por el grupo ϵ -amino de la lisina [115], [118], [119]. La concentración de los dadores de acetilo acetil-CoA y acetil-P, también factores determinantes en la acetilación de lisinas, depende de la ruta Pta-AckA (Figura 3), por lo que cualquier perturbación del flujo a través de esta ruta puede influir en la formación y consumo de estos metabolitos, y por tanto en el nivel de acetilación [94], [114], [115].

Desacetilación de lisinas

La N ϵ -acetilación puede ser revertida por las desacetilasas (KDACS) inicialmente conocidas como histonas desacetilasas (HDACS). Estas enzimas se dividen en dos familias, la familia Rpd3/Hda1 dependiente de zinc, que a su vez se divide en Clase I, Clase II y Clase IV, y la familia de sirtuínas dependientes de NAD⁺ (nicotinamida adenina dinucleótido), que forman la Clase III [88], [120], [121]. La primera familia de enzimas lleva a cabo la desacetilación de lisinas por medio de una hidrólisis, liberando el grupo acetilo en forma de acetato. Las enzimas de esta familia están implicadas en la regulación de la transcripción de determinados procesos celulares y en la transducción de señales [121]. Por su parte, las sirtuínas utilizan el NAD⁺ como co-sustrato, transfiriendo el grupo acetilo de la lisina a la ribosa del NAD⁺, dando como productos una molécula de nicotinamida

(NAM), la lisina desacetilada y 2'-O-acetil-ADP-ribose [122] (Figura 5). Estas enzimas se encuentran muy conservadas en todos los dominios de la vida. Así, en el año 2000, se identificó la primera sirtuína en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*), conocida como sirtuína Sir2 (Regulador Silencioso de la Información 2) [123]. En humanos las sirtuínas se clasifican en siete tipos, de Sirt1 a Sirt7 [120], y están implicadas en la regulación de procesos de transcripción y metabolismo, y también actúan como supresores de tumores, así como en el proceso de envejecimiento celular [124]. Además, se ha demostrado que estas sirtuínas son capaces de eliminar otros grupos acilo que varían en longitud de carbono, saturación y diversidad química [125]. En bacterias, la sirtuína CobB, identificada inicialmente en *S. enterica*, es la más estudiada y ampliamente distribuida, con homólogos en multitud de especies [94], [120]. Curiosamente, esta sirtuína no parece mostrar preferencia por las lisinas acetiladas vía enzimática o no enzimática, pudiendo desacetilar ambas. Aunque no se tiene claro el mecanismo de especificidad de CobB frente a sus sustratos, se piensa que puede depender de la accesibilidad a los mismos [126]. Además, CobB también es capaz de eliminar otros grupos como succinilo, propionilo o lipoilo [89], [120], [127].

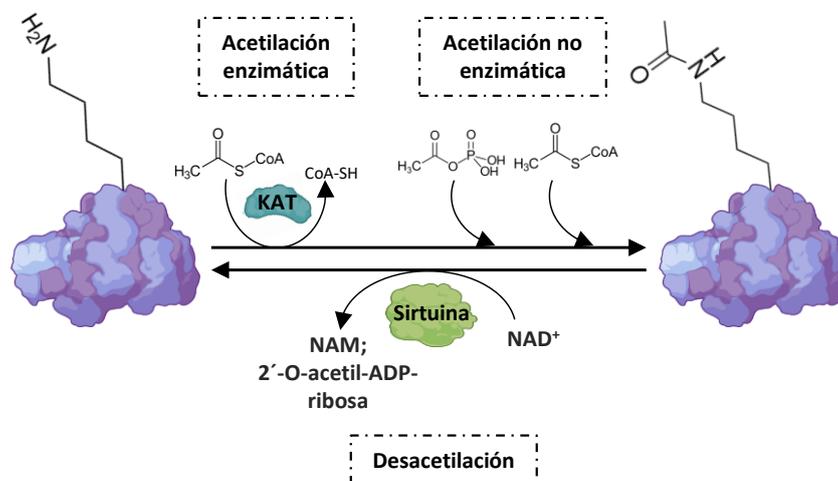


Figura 5: Mecanismos de la Nε-acetilación y desacetilación. Aparecen los procesos de acetilación enzimática, acetilación no enzimática y desacetilación.

Importancia de la Nε-acetilación en *E. coli*

La Nε-acetilación en *E. coli* es un mecanismo que está siendo ampliamente estudiado en los últimos años debido a que se ha demostrado que regula multitud de procesos celulares, aunque todavía se desconocen muchos de sus efectos. Además, se han detectado un gran número de proteínas acetiladas bajo distintas condiciones de

cultivo y/o fases de crecimiento celular [89], [94], [116]. Por lo tanto, se necesitan mayores esfuerzos para caracterizar los factores que modulan la dinámica del acetiloma en *E. coli*, que influyen en su plasticidad fenotípica y que, a su vez, pueden afectar a su uso biotecnológico.

En *E. coli* la KAT más caracterizada es PatZ, pero en un estudio reciente se ha demostrado que existen otras KATs, como YiaC [109]. El sustrato más estudiado de PatZ es Acs, que es acetilada en su residuo 609, lo que inhibe su actividad, y por tanto, bloquea la reincorporación del acetato mediante esta ruta [65], [128]. Además, PatZ es capaz de autoacetilarse, promoviendo la formación de un octámero activo, regulando así su actividad y estabilidad [67]. En cuanto a la acetilación no enzimática, se ha demostrado que en *E. coli* este tipo de modificación es responsable de la mayoría de las acetilaciones encontradas en estudios de acetiloma [114], [115]. Como se ha comentado, esta acetilación depende de la concentración de dadores de acetilo, acetil-CoA y acetil-P, la cual depende a su vez de la ruta Pta-AckA. Diversos estudios han demostrado que la delección de *ackA* o *pta* provoca un aumento o una disminución, respectivamente, del nivel de acetilación general [114], [115]. Del mismo modo, una elevada concentración de fuente de carbono puede conllevar un aumento de la concentración de estos dadores de acetilo, y por tanto del nivel de acetilación global [129], [130].

Muchas enzimas del metabolismo central de *E. coli* son reguladas por esta MPT. Así, además de Acs, recientemente se ha demostrado que enzimas tales como la malato deshidrogenasa, la citrato sintasa y la isocitrato deshidrogenasa se encuentran reguladas por acetilación, ajustándose de este modo el flujo a través del ciclo TCA [131]–[133]. En *E. coli*, al igual que en otros organismos, la acetilación de CheY de forma no enzimática aumenta su actividad y regula la quimiotaxis bacteriana. Por otro lado, se ha demostrado que la acetilación también puede regular la síntesis de proteínas, pues la actividad de la alanil-tARN-sintetasa (AlaRS) implicada en este proceso, se ve reducida por la acetilación [134]. Del mismo modo, en esta bacteria la acetilación también se da en los sistemas de dos componentes, pues la acetilación de la diguanilato ciclasa reduce su actividad, lo que tiene consecuencias sobre la producción de c-di-GMP [135]. Por último, la acetilación también está implicada en los procesos de replicación, transcripción y recombinación del ADN. Así, la acetilación inhibe la actividad de la proteína iniciadora de la replicación cromosomal (DnaA) y de la topoisomerasa I (TopA), regulando la iniciación de la replicación y el estado de enrollamiento del ADN, respectivamente [136], [137]. Además, la acetilación de los factores de transcripción RcsB y Crp regula la movilidad celular, la

respuesta al estrés y la transcripción de una gran cantidad de genes de los promotores de tipo II [66], [138].

Técnicas para el estudio de la Nε-acetilación

Debido a la gran importancia de esta y otras MPTs, se necesitan técnicas sofisticadas y sensibles que permitan avanzar en el estudio de la complejidad de los procesos biológicos mediados por la Nε-acetilación en los distintos organismos. Los recientes avances en la proteómica basada en la espectrometría de masas permiten la identificación y cuantificación de miles de sitios de MPTs en un solo experimento. Esto es consecuencia del desarrollo de estrategias de enriquecimiento de la muestra, de nuevos instrumentos de alto rendimiento y de algoritmos bioinformáticos con rigurosas estrategias de búsqueda y asignación [89], [139]. La espectrometría de masas puede emplearse para estudiar las MPTs de forma específica e identificar sitios de acetilación de proteínas concretas, o de forma global, para caracterizar cuantitativamente el acetiloma y determinar cómo las abundancias relativas de acetilación de proteínas cambian dinámicamente bajo diversas condiciones [140].

Para llevar a cabo estos estudios es importante el flujo de trabajo y las condiciones seleccionadas. Habitualmente, las proteínas y péptidos son marcados para su detección y la comparación de la abundancia relativa entre las distintas condiciones. El marcaje isotópico estable con aminoácidos marcados en el medio de cultivo (SILAC) implica que las proteínas formadas quedan marcadas, tras lo cual son extraídas, digeridas, y las muestras de las diferentes condiciones se mezclan a cantidades iguales para su posterior análisis [141]. Otro método de marcaje es el empleo de etiquetas con masas idénticas (isotópicas), que varían en términos de distribución de isótopos pesados, sobre los péptidos una vez digeridos (TMT o iTRAQ), por lo que cuando son marcados pueden mezclarse para ser analizados [142], [143]. Sin embargo, los enfoques de cuantificación sin marcaje “label-free” están siendo cada vez más empleados, pues suponen una reducción en el número de pasos del flujo de trabajo, lo que implica una menor variabilidad derivada del manejo de la técnica entre las muestras, y también un menor coste de reactivos [144]. Además, debido a la baja estequiometría de los sitios de acetilación, las técnicas de enriquecimiento específicas empleando anticuerpos anti-acetil-lisina son esenciales para lograr la detección y caracterización de estos sitios, por lo que es recomendable su empleo tras la digestión proteica [89]. Una vez realizado el

enriquecimiento, las muestras pasan a ser analizadas en el equipo de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS) para, posteriormente, llevar a cabo el estudio de las mismas con herramientas bioinformáticas (Figura 6).

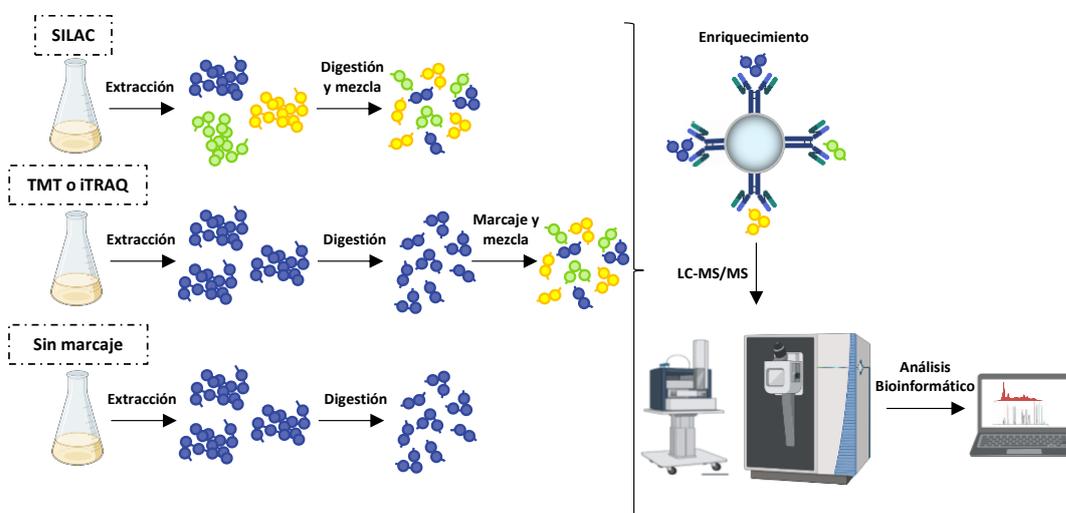


Figura 6: Esquema del flujo de trabajo en un estudio del acetiloma por LC-MS/MS. En la figura aparecen, de forma esquemática, las distintas opciones de marcaje, el enriquecimiento, el análisis por LC-MS/MS y el posterior análisis bioinformático.

Esta técnica ha sido empleada en *E. coli* para conocer, tanto la acetilación enzimática como no enzimática, así como la implicación de distintos factores que influyen en los niveles de acetilación. El primer acetiloma analizado en *E. coli* se realizó en 2008 [145], y desde ese momento se han estudiado los sitios regulados por CobB y PatZ, la existencia de otras lisín-acetiltransferasas, el efecto de la delección de *ackA* y *pta*, y el empleo de distintas fuentes de carbono en los niveles de acetilación globales [66], [109], [114], [115], [127], [129], [130], [146], [147].

Por otro lado, para conocer el efecto de la acetilación de una lisina en concreto en una proteína se ha usado normalmente la sustitución de esta por una arginina, que mimetiza el estado no acetilado, y por una glutamina, que mimetiza el acetilado [89], pero estas estrategias suelen ser bastante inexactas para conocer el impacto real de la acetilación de la lisina a nivel molecular. Sin embargo, recientemente se ha desarrollado una técnica que permite la introducción de una lisina acetilada en la posición deseada, empleando el concepto de expansión del código genético, el cual ha sido empleado para estudiar otras MPTs y para crear proteínas con fines biotecnológicos. Esta técnica consiste en la mutación génica del codón de la lisina a modificar por la secuencia del codón de terminación TAG denominado ámbar. Dentro del mismo plásmido que contiene la

secuencia modificada de la proteína, o en otro plásmido, se encuentra la secuencia del ARNt supresor ($MbARNt_{CUA}$), que reconoce el codón ámbar, y también una aminoacil-ARNt sintetasa modificada (AcKRS3) que cargará una acetil-lisina en el ARNt supresor con el consumo de una molécula de ATP [116], [148] (Figura 7). De este modo, el estudio de las implicaciones de la acetilación de una lisina específica se realiza sobre una proteína con esa lisina permanentemente acetilada en todos los casos, lo que supone un gran avance para conocer el impacto real de la acetilación de la lisina a nivel molecular, además de poder generar proteínas a la carta en el campo biotecnológico.

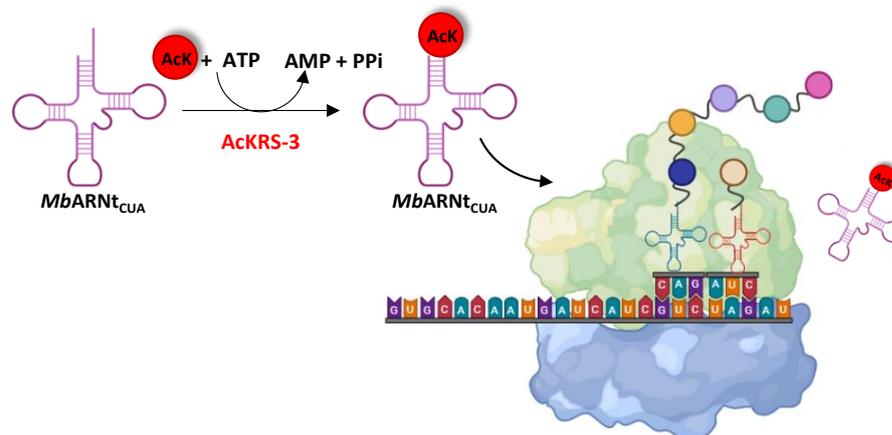


Figura 7: Introducción de una lisina acetilada en una posición concreta mediante la técnica basada en la expansión del código genético. Unión de la lisina acetilada al ARNt supresor ($MbARNt_{CUA}$) por la AcKRS-3 y proceso de traducción.

Producción de proteínas recombinantes en *E. coli*

El uso de proteínas en los campos de la medicina, la nutrición, los detergentes, los textiles, el papel, los polímeros y los plásticos, entre otros, es de gran interés desde hace décadas. En los inicios de la biotecnología, estas proteínas eran extraídas de sus fuentes naturales, animales o plantas, lo que suponía un bajo rendimiento del proceso y precios muy elevados del producto final. Con el desarrollo de la tecnología del ADN recombinante durante las últimas décadas del pasado siglo, surgió el empleo de organismos hospedadores capaces de producir proteínas recombinantes en grandes cantidades [149]–[151]. La primera proteína recombinante aprobada por la FDA (Administración de alimentos y medicamentos de Estados Unidos) fue la insulina humana producida en *E. coli* en el año 1982 [152]. A partir de este momento, el uso de esta técnica se ha generalizado, pues la capacidad de expresar y purificar la proteína recombinante deseada en gran cantidad permite su caracterización bioquímica, su uso en procesos industriales y el

desarrollo de productos comerciales como biofármacos. Además, el coste del producto final es más bajo, y puede ser manipulado genéticamente para mejorar las cualidades y características de las proteínas producidas, y por tanto su función posterior [150], [153], [154].

Selección del hospedador y del vector de expresión para optimizar la producción de proteínas recombinantes

Antes de llevar a cabo la producción de una proteína recombinante es necesario evaluar y seleccionar cada una de las variables y factores determinantes, pues influirán en el rendimiento final de la expresión de la misma [153]. Entre todos, lo primero a seleccionar es el organismo hospedador. Se han empleado gran número de organismos para la producción de proteínas recombinantes, entre los que se encuentran bacterias, levaduras, hongos, células de insectos, células de mamífero, plantas y animales [150].

Entre los huéspedes de expresión recombinante más utilizados, *E. coli* es, con diferencia, el organismo más usado, debido a su extraordinaria trazabilidad genética, su relativa facilidad de cultivo y el bajo costo de este, su elevada capacidad para expresar y almacenar proteínas exógenas, y la amplia caracterización de su genoma y transcriptoma [3], [4], [151]. Además, en la actualidad hay disponibles una gran variedad de herramientas, tales como vectores de expresión, diferentes cepas, promotores, técnicas de modificación genética, etc, para su uso en este microorganismo, por lo que alrededor del 30% de las proteínas recombinantes usadas como biofármacos se producen en él [6], [151], [155]. No obstante, la ausencia de una maquinaria adecuada para llevar a cabo algunas modificaciones postraduccionales, como la glicosilación, la baja formación de puentes disulfuro, el distinto procesamiento proteolítico, la formación de cuerpos de inclusión, y el uso de codones distintos supone que algunas proteínas de organismos eucariotas no puedan ser producidas en *E. coli* con una elevada efectividad [6], [149], [150], [155]. Sin embargo, se han desarrollado distintas estrategias para solventar estos problemas, y poder producir proteínas glicosiladas o con puentes disulfuro en *E. coli* [149], [156], [157]. No obstante, existen otros organismos empleados para la producción de proteínas recombinantes que pueden realizar estas modificaciones. Entre ellos destacan las levaduras y hongos, que presentan el inconveniente de que poseen un elevado número de proteasas, y las células de insecto y de mamífero, que aunque pueden llevar a cabo MPTs complejas, dan lugar a rendimientos más bajos [150], [158]. Por tanto, el uso

de *E. coli* como organismo hospedador es ventajoso, siempre que no se requieran MPTs complejas [150], [159]. Además, recientemente se está estudiando el empleo de sistemas libres de células basados en *E. coli*, lo que puede suponer ventajas en la eficiencia del proceso de producción [160].

E. coli presenta una gran variedad de cepas idóneas para la producción de proteína recombinante, con características concretas para determinados fines [6]. Así, la cepa de *E. coli* más empleada en la expresión de proteínas es la cepa BL21. Esta cepa carece de las proteasas Lon y OmpT, lo que estabiliza la expresión de algunas proteínas recombinantes, presenta una menor acumulación de acetato y una mayor permeabilidad de la membrana [161], [162]. Dentro de las cepas de tipo B (derivadas de BL21) existen cepas con distintas características, así la BL21 DE3 expresa la ARN polimerasa del fago T7 bajo el control del promotor *lacUV5*, la BL21 *plysS* contienen un vector que produce la lisozima T7 para reducir la sobreexpresión basal, y la cepa Lemo21 posee la lisozima *lysY*, que también permite moldear la expresión [163]. En cuanto a las cepas BL21 C41 y C43, presentan unos niveles más bajos de ARN polimerasa, lo que puede ser beneficioso para la producción de proteínas que resultan tóxicas para la célula [164]. La cepa Turner posee una permeasa que permite la entrada uniforme del inductor de expresión isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido o IPTG a todas las células, lo que reduce la concentración necesaria de inductor [165]. Por su parte, las cepas Rosetta y CodonPlus, derivadas también de BL21, permiten la expresión de proteínas con codones poco frecuentes en *E. coli* que expresan los ARNt de estos codones [165], [166].

Tras la elección de la cepa, un paso clave para optimizar la expresión de proteína recombinante es la selección del vector de expresión. El vector de expresión debe contener las unidades estructurales básicas que permitan la expresión de proteínas, como son el origen de replicación, el promotor, el sitio de unión al ribosoma, el codón de inicio, el codón de parada y un terminador [165]. El origen de replicación (*ori*) es la secuencia a partir de la cual comienza la replicación del vector, y de ella depende el número de copias de este dentro de la célula, que puede ir de un bajo (10 copias) a un alto número de copias (700 copias) [167]. Entre los *ori* de bajo número de copias destacan el ColE1 (15 a 20 copias/célula), el p15A (10 copias/célula), el pSC101 (5 copias/célula) y el pMB1 (15 a 20 copias/célula) [167]–[169]. En cuanto a los de alto número de copias, mutaciones en el ColE1 y en el pMB1 puede conducir a *oris* de hasta 700 copias por célula [170], [171]. La selección del número de copias es crítica para el proceso de expresión, pues un número de copias muy bajo puede conllevar una baja cantidad de ARNm, y por tanto, de proteína,

mientras que un número de copias muy elevado puede conllevar un desajuste metabólico debido a la necesidad de muchos recursos celulares para su mantenimiento [6], [172].

El ori y el sistema promotor son determinantes del nivel de expresión de la proteína recombinante. Los promotores pueden ser fuertes o débiles, siendo un promotor fuerte aquel que puede llevar a que la proteína recombinante suponga entre un 10-30% o más del total de la proteína celular [6], [165]. Además, el promotor debe estar finamente regulado para limitar la producción basal de proteína antes de la inducción, pues puede provocar un desajuste metabólico cuando la proteína expresada es tóxica para la célula [173]. Hay muchos tipos de promotores disponibles, siendo el más estudiado el promotor *lac*. Este promotor es inducible por lactosa, una fuente de carbono de tipo no PTS, por lo que está sujeto a RCC [174]. El promotor mutante *lacUV5* reduce el efecto de la RCC, sin embargo, ambos promotores presentan una gran expresión basal, debida a la baja expresión de la proteína represora del promotor, *Lacl*. Para reducir la expresión basal, se emplea un promotor de *lacI* mutado, el *lacI^q*, que aumenta la expresión de *Lacl* hasta en 10 veces [167]. En la actualidad se emplean promotores sintéticos híbridos de promotores *lac*, un ejemplo de ellos son el promotor *tac* y el *trc*. Estos promotores se consideran promotores fuertes y están bien caracterizados. El promotor *tac* combina secuencias de los promotores *trp* (triptófano) y *lac*, y presenta una eficiencia 10 veces superior a la de estos. El promotor *trc* es derivado del *tac*, pues presenta 1 par de bases extra entre las secuencias consenso -35 y -10 con respecto al promotor *tac* [167], [175]. Por otro lado, uno de los promotores más usados es el promotor T7. Los genes regulados por el promotor T7 son transcritos por la ARN polimerasa del bacteriófago T7 presente en algunas cepas de *E. coli*, como la BL21 (DE3), que lleva una copia cromosómica de la polimerasa controlada por el promotor *lacUV5* [161]. Esta polimerasa es cinco veces más rápida que la polimerasa de *E. coli*, por lo que el T7 se considera un promotor muy fuerte [176], [177]. Para reducir la expresión basal de los genes controlados por el promotor T7, se emplea el promotor *T7lac*, el cual incluye un operador *lac*, que es reprimido por *Lacl* en ausencia del inductor [178]. Estos tres promotores son inducibles por lactosa o por el compuesto no metabolizable isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG). Otros promotores presentan una regulación positiva, como por ejemplo el promotor BAD, que conllevan menor expresión basal. La proteína AraC tiene la doble función de represor/activador en este promotor. En ausencia del inductor arabinosa, AraC reprime la traducción al unirse al ADN bacteriano. Al añadir el inductor, AraC actúa como activador y promueve la transcripción desde el promotor BAD, por lo que la arabinosa es

absolutamente necesaria para la inducción [179]. Además, existen otro tipo de promotores como los inducibles por temperatura, pL o pR del bacteriófago lambda. Estos promotores están reprimidos por el represor cI857, sensible a la temperatura, el cual bloquea la transcripción a 28-37°C y se activa con un aumento de la temperatura a 42°C durante un corto periodo de tiempo [180].

Por último, los otros factores importantes son la secuencia de unión al ribosoma, también conocida como secuencia Shine-Dalgarno (SD), su distancia con el codón de inicio y el codón de terminación. La eficiencia de la traducción depende de estos factores y se ha demostrado que la estructura secundaria de la secuencia SD y su longitud son importantes [181]. Del mismo modo, se ha comprobado que el codón de terminación TAA es más eficiente que los otros codones, por lo que se prefiere su empleo [165].

Además de la elección del sistema de expresión, la producción de proteínas recombinantes puede depender de otros factores como el medio de cultivo empleado, la temperatura, la velocidad de agitación o el crecimiento celular. Así, la manipulación del medio de cultivo es una manera rápida y poco costosa de aumentar la producción de proteínas [6], [165]. Normalmente con un medio complejo se obtiene mayor expresión de proteínas, aunque esta es menos controlada, por lo que para la producción de algunos compuestos recombinantes que requieren un gran control se emplean medios definidos [6], [182].

Estrategias para aumentar la producción de proteínas recombinantes en *E. coli*

Como ya hemos comentado con anterioridad, el empleo de *E. coli* como organismo hospedador conlleva algunas desventajas, las cuales pueden ser subsanadas mediante el empleo de distintas estrategias. Así pues, la expresión del gen de una proteína heteróloga con codones poco frecuentes en *E. coli* puede verse obstaculizada debido a la escasez de los ARNt de esos codones. Este problema se puede solucionar mediante la optimización de la secuencia del gen, o mediante el empleo de cepas como Rosetta o CodonPlus, mencionadas anteriormente [166], [183].

Otro problema importante en la producción de proteínas recombinantes utilizando *E. coli* es la acumulación de estas proteínas, principalmente como agregados insolubles en forma de cuerpos de inclusión. La extracción de las proteínas de esas formaciones es un proceso tedioso, pues requiere en muchos casos la desnaturalización y

renaturalización de la proteína [184]. Para reducir la formación de estos cuerpos de inclusión se llevan a cabo estrategias como la coexpresión de chaperonas, que ayudan a la solubilización y el correcto plegamiento de las proteínas [151], [185], [186]. Además, para aumentar la solubilidad de una proteína se puede expresar fusionada con otra. Entre estas proteínas de fusión destacan la proteína de unión a maltosa (MBP) [187], la proteína A de sustancia de utilización N (NusA) [188], la tiorredoxina (Trx) [189], la pequeña etiqueta modificadora de ubiquitina (SUMO) [190] o la glutatión-S-transferasa (GST) [191]. Muchas de estas proteínas pueden permitir otras funciones, este es el caso de la MBP, que al igual que la cola de polihistidinas, puede emplearse como proteína de afinidad para facilitar la purificación [167], [187]. La MBP, junto con la Trx y la NusA, son las que presentan una mayor capacidad de solubilización, además, la Trx incluso puede ayudar a la formación de puentes disulfuro en la proteína recombinante [189].

Por otro lado, se han desarrollado estrategias de ingeniería metabólica que dirigen los flujos del metabolismo central, eliminando los cuellos de botella y aumentando el suministro de precursores para redirigirlos hacia la producción de proteínas recombinantes. Se ha demostrado que la síntesis de proteínas recombinantes consume aproximadamente dos tercios de la energía producida por *E. coli*, lo que se conoce como desajuste metabólico. Para aumentar la producción de ATP se ha sobreexpresado la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (Pck), lo que conduce a una mayor producción de proteína recombinante [192]. Otra forma de aumentar la expresión de proteínas recombinantes en *E. coli*, consiste en aumentar la producción de los precursores esenciales obtenidos mediante la ruta de las pentosas fosfato, sobreexpresando la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Zwf) [193]. Del mismo modo, la delección del sistema del alarmón ppGpp y del regulador global RpoS aumenta la producción de proteína [194], [195]. En esta línea, se ha observado un aumento de la expresión de proteínas recombinantes cuando se sobreexpresa el gen *glpK* para el metabolismo del glicerol [196]. En general, la mayoría de las estrategias están dirigidas a la reducción de la formación del acetato, debido a su gran impacto en la producción de proteínas recombinantes. Así, la expresión de la NADH oxidasa de *Streptococcus pneumoniae* unida a la delección del regulador ArcA, supone una reducción de la formación de acetato y un aumento en la producción de proteínas [197]. Otra forma de reducir el desbordamiento del acetato es a través del sistema PTS, así, la modificación de la secuencia promotora del regulador Mlc del sistema PTS reduce el desbordamiento de acetato e incrementa la expresión de proteína recombinante [198]. Del mismo modo, la delección de los genes del sistema PTS

supone una disminución del desbordamiento del acetato y un aumento de la producción de proteínas [199]. Asimismo, la delección de los reguladores globales ArcA e IclR también conlleva una reducción del acetato producido, y por ende un incremento de la expresión de proteínas [52], al igual que la sobreexpresión de la enzima acetolactato sintetasa de *Bacillus subtilis*, la cual dirige el exceso de piruvato a acetolactato, impidiendo el desbordamiento de acetato [200]. Por último, se ha llevado a cabo la delección de los genes del metabolismo del acetato, *pta*, *poxB* y *ackA*, obteniéndose un aumento en la producción de proteínas recombinantes en todos los casos [201]–[203].

Referencias

- [1] T. H. Escherich, "The intestinal bacteria of the neonate and breast-fed infant," *Rev. Infect. Dis.*, vol. 11, no. 2, pp. 352–356, 1989, doi: 10.1093/clinids/11.2.352.
- [2] D. L. Hartl and D. E. Dykhuizen, "The population genetics of pathogenic *Escherichia coli*," *Annu. Rev. Genet.*, vol. 18, pp. 31–68, 1984, doi: 10.1038/s41579-020-0416-x.
- [3] F. R. Blattner *et al.*, "The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12," *Science (80-.)*, vol. 277, no. 5331, pp. 1453–1462, 1997, doi: 10.1126/science.277.5331.1453.
- [4] Z. D. Blount, "The unexhausted potential of *E. coli*," *Elife*, vol. 4, pp. 1–12, 2015, doi: 10.7554/eLife.05826.
- [5] N. S. Mccarty and R. Ledesma-amaro, "Synthetic Biology Tools to Engineer Microbial Communities for Biotechnology," *Trends Biochem. Sci.*, vol. 37, no. 2, pp. 181–197, 2019, doi: 10.1016/j.tibtech.2018.11.002 181.
- [6] C. J. Huang, H. Lin, and X. Yang, "Industrial production of recombinant therapeutics in *Escherichia coli* and its recent advancements," *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 39, no. 3, pp. 383–399, 2012, doi: 10.1007/s10295-011-1082-9.
- [7] J. K. Nicholson *et al.*, "Host-Gut Microbiota Metabolic Interactions," *Science (80-.)*, vol. 336, no. 6086, pp. 1262–1267, 2012, doi: 10.1126/science.1223813.
- [8] I. D. Wilson and J. K. Nicholson, "Gut Microbiome Interactions with Drug Metabolism , Efficacy and Toxicity," *Transl. Res.*, vol. 179, pp. 204–222, 2017, doi: 10.1016/j.trsl.2016.08.002.Gut.
- [9] P. Millard, K. Smallbone, and P. Mendes, "Metabolic regulation is sufficient for global and robust coordination of glucose uptake, catabolism, energy production and growth in *Escherichia coli*," *PLoS Comput. Biol.*, vol. 13, no. 2, pp. 1–24, 2017, doi: 10.1371/journal.pcbi.1005396.
- [10] M. Tong, S. French, S. S. El Zahed, W. K. Ong, P. D. Karp, and E. D. Brown, "Gene dispensability in *Escherichia coli* grown in thirty different carbon environments," *MBio*, vol. 11, no. 5, pp. 1–20, 2020, doi: 10.1128/mBio.02259-20.
- [11] A. Martínez-Antonio, S. C. Janga, H. Salgado, and J. Collado-Vides, "Internal-sensing machinery directs the activity of the regulatory network in *Escherichia coli*," *Trends Microbiol.*, vol. 14, no. 1, pp. 22–27, 2006, doi: 10.1016/j.tim.2005.11.002.
- [12] M. Papagianni, "Recent advances in engineering the central carbon metabolism of industrially important bacteria," *Microb. Cell Fact.*, vol. 11, no. 50, pp. 1–13, 2012, doi: 10.1186/1475-2859-11-50.
- [13] M. Trauchessec *et al.*, "Mass spectrometry-based workflow for accurate quantification of *Escherichia coli* enzymes: How proteomics can play a key role in metabolic engineering," *Mol. Cell. Proteomics*, vol. 13, no. 4, pp. 954–968, 2014, doi: 10.1074/mcp.M113.032672.
- [14] C. S. Westfall and P. A. Levin, "Comprehensive analysis of central carbon metabolism reveals multiple connections between nutrients, biosynthetic capacity, and cell morphology in *Escherichia coli*," *Plos Genet.*, vol. 14, no. 2, pp.

- 1–25, 2017, doi: 10.1101/191585.
- [15] N. S. Hill, P. J. Buske, Y. Shi, and P. A. Levin, “A Moonlighting Enzyme Links *Escherichia coli* Cell Size with Central Metabolism,” *PLoS Genet.*, vol. 9, no. 7, pp. 1–14, 2013, doi: 10.1371/journal.pgen.1003663.
- [16] S. Vadia *et al.*, “Fatty acid availability sets cell envelope capacity and dictates microbial cell size,” *Curr. Biol.*, vol. 27, no. 12, pp. 1757–1767, 2017, doi: 10.1016/j.cub.2017.05.076.Fatty.
- [17] A. Kremling, K. Bettenbrock, and E. Gilles, “Analysis of global control of *Escherichia coli* carbohydrate uptake,” *BMC Syst. Biol.*, vol. 1, no. 42, pp. 1–16, 2007, doi: 10.1186/1752-0509-1-42.
- [18] U. Sauer and B. J. Eikmanns, “The PEP-pyruvate-oxaloacetate node as the switch point for carbon flux distribution in bacteria,” *FEMS Microbiol. Rev.*, vol. 29, no. 4, pp. 765–794, 2005, doi: 10.1016/j.femsre.2004.11.002.
- [19] S. Castaño-Cerezo, S. Renilla, V. Bernal, and M. Cánovas, “An insight into the role of phosphotransacetylase (*pta*) and the acetate/acetyl-CoA node in *Escherichia coli*,” *Microb. Cell Fact.*, vol. 8, no. 54, pp. 1–19, 2009, doi: 10.1186/1475-2859-8-54.
- [20] V. Baldazzi, D. Ropers, Y. Markowicz, D. Kahn, J. Geiselman, and H. de Jong, “The carbon assimilation network in *Escherichia coli* is densely connected and largely sign-determined by directions of metabolic fluxes,” *PLoS Comput. Biol.*, vol. 6, no. 6, pp. 1–12, 2010, doi: 10.1371/journal.pcbi.1000812.
- [21] B. Görke and J. Stülke, “Carbon catabolite repression in bacteria: Many ways to make the most out of nutrients,” *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 6, no. 8, pp. 613–624, 2008, doi: 10.1038/nrmicro1932.
- [22] K. Bettenbrock, S. Fischer, A. Kremling, K. Jahreis, T. Sauter, and E. D. Gilles, “A quantitative approach to catabolite repression in *Escherichia coli*,” *J. Biol. Chem.*, vol. 281, no. 5, pp. 2578–2584, 2006, doi: 10.1074/jbc.M508090200.
- [23] J. Deutscher, “The mechanisms of carbon catabolite repression in bacteria,” *Curr. Opin. Microbiol.*, vol. 11, no. 2, pp. 87–93, 2008, doi: 10.1016/j.mib.2008.02.007.
- [24] J. Deutscher, C. Francke, and P. W. Postma, “How Phosphotransferase System-Related Protein Phosphorylation Regulates Carbohydrate Metabolism in Bacteria,” *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 70, no. 4, pp. 939–1031, 2006, doi: 10.1128/mnbr.00024-06.
- [25] C. D. Doucette, D. J. Schwab, N. S. Wingreen, and J. D. Rabinowitz, “A-Ketoglutarate Coordinates Carbon and Nitrogen Utilization Via Enzyme I Inhibition,” *Nat. Chem. Biol.*, vol. 7, no. 12, pp. 894–901, 2011, doi: 10.1038/nchembio.685.
- [26] A. Kremling, J. Geiselman, D. Ropers, and H. de Jong, “Understanding carbon catabolite repression in *Escherichia coli* using quantitative models,” *Trends Microbiol.*, vol. 23, no. 2, pp. 99–109, 2015, doi: 10.1016/j.tim.2014.11.002.
- [27] A. Perrenoud and U. Sauer, “Impact of global transcriptional regulation by ArcA, ArcB, Cra, Crp, Cya, Fnr, and Mlc on glucose catabolism in *Escherichia coli*,” *J. Bacteriol.*, vol. 187, no. 9, pp. 3171–3179, 2005, doi: 10.1128/JB.187.9.3171-3179.2005.

- [28] Z. Li, M. Nimtz, and U. Rinas, "The metabolic potential of *Escherichia coli* BL21 in defined and rich medium," *Microb. Cell Fact.*, vol. 13, no. 45, pp. 1–17, 2014.
- [29] D. Georgellis, O. Kwon, and E. C. C. Lin, "Quinones as the redox signal for the Arc two-component system of bacteria," *Science (80-.)*, vol. 292, no. 5525, pp. 2314–2316, 2001, doi: 10.1126/science.1059361.
- [30] D. Sarkar, K. A. Z. Siddiquee, M. J. Araúzo-Bravo, T. Oba, and K. Shimizu, "Effect of *cra* gene knockout together with *edd* and *iclR* genes knockout on the metabolism in *Escherichia coli*," *Arch. Microbiol.*, vol. 190, no. 5, pp. 559–571, 2008, doi: 10.1007/s00203-008-0406-2.
- [31] Y. J. Son, J. N. Phue, L. B. Trinh, S. J. Lee, and J. Shiloach, "The role of Cra in regulating acetate excretion and osmotic tolerance in *E. coli* K-12 and *E. coli* B at high density growth," *Microb. Cell Fact.*, vol. 10, no. 52, pp. 1–9, 2011, doi: 10.1186/1475-2859-10-52.
- [32] K. Kochanowski, L. Gerosa, S. F. Brunner, D. Christodoulou, Y. V Nikolaev, and U. Sauer, "Few regulatory metabolites coordinate expression of central metabolic genes in *Escherichia coli*," *Mol. Syst. Biol.*, vol. 13, no. 903, pp. 1–14, 2017, doi: 10.15252/msb.20167402.
- [33] D. Kim *et al.*, "Systems assessment of transcriptional regulation on central carbon metabolism by Cra and CRP," *Nucleic Acids Res.*, vol. 46, no. 6, pp. 2901–2917, 2018, doi: 10.1093/nar/gky069.
- [34] V. Bernal, S. Castaño-Cerezo, and M. Cánovas, "Acetate metabolism regulation in *Escherichia coli*: carbon overflow, pathogenicity, and beyond," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 100, no. 21, pp. 8985–9001, 2016, doi: 10.1007/s00253-016-7832-x.
- [35] R. Kutscha and S. Pflügl, "Microbial upgrading of acetate into value-added products—examining microbial diversity, bioenergetic constraints and metabolic engineering approaches," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 21, no. 8777, pp. 1–30, 2020, doi: 10.3390/ijms21228777.
- [36] J. M. Clomburg and R. Gonzalez, "Anaerobic fermentation of glycerol: A platform for renewable fuels and chemicals," *Trends Biotechnol.*, vol. 31, no. 1, pp. 20–28, 2013, doi: 10.1016/j.tibtech.2012.10.006.
- [37] K. Martínez *et al.*, "Coutilization of glucose and glycerol enhances the production of aromatic compounds in an *Escherichia coli* strain lacking the phosphoenolpyruvate : carbohydrate phosphotransferase system," *Microb. Cell Fact.*, vol. 7, no. 1, pp. 1–12, 2008, doi: 10.1186/1475-2859-7-1.
- [38] P. Yu and D. W. Pettigrew, "Linkage between Fructose 1 , 6-Bisphosphate Binding and the Dimer - Tetramer Equilibrium of *Escherichia coli* Glycerol Kinase : Critical Behavior Arising from Change of Ligand Stoichiometry †," *Biochemistry*, vol. 42, pp. 4243–4252, 2003, doi: 10.1021/bi027142l.
- [39] K. Martínez-Gómez *et al.*, "New insights into *Escherichia coli* metabolism: carbon scavenging, acetate metabolism and carbon recycling responses during growth on glycerol," *Microb. Cell Fact.*, vol. 11, no. 46, pp. 1–21, 2012, doi: 10.1186/1475-2859-11-46.
- [40] L. P. K. Shimizu, "Global metabolic regulation analysis for *Escherichia coli* K12 based

- on protein expression by 2-dimensional electrophoresis and enzyme activity measurement," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 61, pp. 163–178, 2003, doi: 10.1007/s00253-002-1202-6.
- [41] M. Oh and J. C. Liao, "Gene Expression Profiling by DNA Microarrays and Metabolic Fluxes in *Escherichia coli*," *Biotechnol. Prog.*, vol. 16, no. 2, pp. 278–286, 2000, doi: 10.1021/bp000002n.
- [42] I. Rowland *et al.*, "Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components," *Eur. J. Nutr.*, vol. 57, no. 1, pp. 1–24, 2018, doi: 10.1007/s00394-017-1445-8.
- [43] T. Lynnes, B. M. Prüß, and P. Samanta, "Acetate metabolism and *Escherichia coli* biofilm: New approaches to an old problem," *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 344, no. 2, pp. 95–103, 2013, doi: 10.1111/1574-6968.12174.
- [44] S. Herold, J. C. Paton, P. Srimanote, and A. W. Paton, "Differential effects of short-chain fatty acids and iron on expression of *iha* in Shiga-toxigenic *Escherichia coli*," *Microbiology*, vol. 155, no. 11, pp. 3554–3563, 2009, doi: 10.1099/mic.0.029454-0.
- [45] S. Chohnan, H. Izawa, H. Nishihara, and Y. Takamura, "Changes in Size of Intracellular Pools of Coenzyme A and Its Thioesters in *Escherichia coli* K-12 Cells to Various Carbon Sources and Stresses," *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, vol. 62, no. 6, pp. 1122–1128, 1998, doi: 10.1271/bbb.62.1122.
- [46] K. Valgepea, K. Adamberg, R. Nahku, P.-J. Lahtvee, L. Arike, and R. Vilu, "Systems biology approach reveals that overflow metabolism of acetate in *Escherichia coli* is triggered by carbon catabolite repression of acetyl-CoA synthetase.," *BMC Syst. Biol.*, vol. 4, no. 166, pp. 1–13, 2010, doi: 10.1186/1752-0509-4-166.
- [47] A. J. Wolfe, "The Acetate Switch," *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 69, no. 1, pp. 12–50, 2005, doi: 10.1128/MMBR.69.1.12.
- [48] M. Basan *et al.*, "Overflow metabolism in *E. coli* results from efficient proteome allocation," *Nature*, vol. 528, no. 7580, pp. 99–104, 2015, doi: 10.1038/nature15765.
- [49] D. D. Axe and J. E. Bailey, "Transport of lactate and acetate through the energized cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 47, no. 1, pp. 8–19, 1995, doi: 10.1002/bit.260470103.
- [50] R. Gimenez, M. F. Nuñez, J. Badia, J. Aguilar, and L. Baldoma, "The Gene *yjcG*, Cotranscribed with the Gene *acs*, Encodes an Acetate Permease in *Escherichia coli*," *J. Bacteriol.*, vol. 185, no. 21, pp. 6448–6455, 2003, doi: 10.1128/JB.185.21.6448-6455.2003.
- [51] J. Sá-Pessoa *et al.*, "SATP (YaaH), a succinate-acetate transporter protein in *Escherichia coli*," *Biochem. J.*, vol. 454, no. 3, pp. 585–589, 2013, doi: 10.1042/BJ20130412.
- [52] H. Waegeman, S. De Lausnay, J. Beauprez, J. Maertens, M. De Mey, and W. Soetaert, "Increasing recombinant protein production in *Escherichia coli* K12 through metabolic engineering," *N. Biotechnol.*, vol. 30, no. 2, pp. 255–261, 2013, doi: 10.1016/j.nbt.2011.11.008.
- [53] M. De Mey, S. De Maeseneire, W. Soetaert, and E. Vandamme, "Minimizing

- acetate formation in *E. coli* fermentations," *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 34, no. 11, pp. 689–700, 2007, doi: 10.1007/s10295-007-0244-2.
- [54] H. Kakuda, K. Hosono, K. Shiroishi, and S. Ichihara, "Identification and Characterization of the *ackA* (Acetate Kinase A)-*pta* (Phosphotransacetylase) Operon and Complementation Analysis of Acetate Utilization by an *ackA-pta* Deletion Mutant of *Escherichia coli*," *J. Biochem*, vol. 116, no. 4, pp. 916–922, 1994, doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a124616.
- [55] C. R. Dittrich, G. N. Bennett, and K. Y. San, "Characterization of the acetate-producing pathways in *Escherichia coli*," *Biotechnol. Prog.*, vol. 21, no. 4, pp. 1062–1067, 2005, doi: 10.1021/bp050073s.
- [56] B. Enjalbert, P. Millard, M. Dinclaux, J.-C. Portais, and F. Létisse, "Acetate fluxes in *Escherichia coli* are determined by the thermodynamic control of the Pta-AckA pathway," *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 42135, pp. 1–11, 2017, doi: 10.1038/srep42135.
- [57] F. De Mets, L. Van Melderen, and S. Gottesman, "Regulation of acetate metabolism and coordination with the TCA cycle via a processed small RNA," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 116, no. 3, pp. 1043–1052, 2019, doi: 10.1073/pnas.1815288116.
- [58] J. N. Phue, S. B. Noronha, R. Hattacharyya, A. J. Wolfe, and J. Shiloach, "Glucose metabolism at high density growth of *E. coli* B and *E. coli* K: Differences in metabolic pathways are responsible for efficient glucose utilization in *E. coli* B as determined by microarrays and Northern blot analyses," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 90, no. 7, pp. 805–820, 2005, doi: 10.1002/bit.20478.
- [59] A. M. Abdel-Hamid, M. M. Attwood, and J. R. Guest, "Pyruvate oxidase contributes to the aerobic growth efficiency of *Escherichia coli*," *Microbiology*, vol. 147, no. 6, pp. 1483–1498, 2001, doi: 10.1099/00221287-147-6-1483.
- [60] Y. -Y Chang, A. -Y Wang, and J. E. Cronan, "Expression of *Escherichia coli* pyruvate oxidase (PoxB) depends on the sigma factor encoded by the *rpoS(katF)* gene," *Mol. Microbiol.*, vol. 11, no. 6, pp. 1019–1028, 1994, doi: 10.1111/j.1365-2958.1994.tb00380.x.
- [61] V. J. Starai and J. C. Escalante-Semerena, "Acetyl-coenzyme A synthetase (AMP forming)," *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 61, no. 16, pp. 2020–2030, 2004, doi: 10.1007/s00018-004-3448-x.
- [62] S. Kumari, R. Tishel, M. Eisenbach, and A. J. Wolfe, "Cloning, Characterization, and Functional Expression of *acs*, the Gene Which Encodes Acetyl Coenzyme A Synthetase in *Escherichia coli*," *J. Bacteriol.*, vol. 177, no. 10, pp. 2878–2886, 1995, doi: 10.1128/jb.177.10.2878-2886.1995.
- [63] S. Kumari *et al.*, "Regulation of Acetyl Coenzyme A Synthetase in *Escherichia coli*," *J. Bacteriol.*, vol. 182, no. 15, pp. 4173–4179, 2000, doi: 10.1128/JB.182.15.4173-4179.2000.
- [64] S. Kumari, E. J. Simel, and A. J. Wolfe, " σ^{70} is the principal sigma factor responsible for transcription of *acs*, which encodes acetyl coenzyme a synthetase in *Escherichia coli*," *J. Bacteriol.*, vol. 182, no. 2, pp. 551–554, 2000, doi: 10.1128/JB.182.2.551-554.2000.
- [65] V. J. Starai and J. C. Escalante-Semerena, "Identification of the Protein Acetyltransferase (Pat) Enzyme that Acetylates Acetyl-CoA Synthetase in

- Salmonella enterica*," *J. Mol. Biol.*, vol. 340, pp. 1005–1012, 2004, doi: 10.1016/j.jmb.2004.05.010.
- [66] S. Castaño-Cerezo *et al.*, "Protein acetylation affects acetate metabolism, motility and acid stress response in *Escherichia coli*," *Mol. Syst. Biol.*, vol. 10, no. 762, pp. 1–15, 2014, doi: 10.15252/msb.20145227.
- [67] T. De Diego Puente *et al.*, "The protein acetyltransferase PatZ from *Escherichia coli* is regulated by autoacetylation-induced oligomerization," *J. Biol. Chem.*, vol. 290, no. 38, pp. 23077–23093, 2015, doi: 10.1074/jbc.M115.649806.
- [68] A. H. Klein, A. Shulla, S. A. Reimann, D. H. Keating, and A. J. Wolfe, "The intracellular concentration of acetyl phosphate in *Escherichia coli* is sufficient for direct phosphorylation of two-component response regulators," *J. Bacteriol.*, vol. 189, no. 15, pp. 5574–5581, 2007, doi: 10.1128/JB.00564-07.
- [69] W. R. McCleary and J. B. Stock, "Acetyl phosphate and the activation of two-component response regulators," *J. Biol. Chem.*, vol. 269, no. 50, pp. 31567–31572, 1994, doi: 10.1016/s0021-9258(18)31731-9.
- [70] L. Reitzer, "Nitrogen Assimilation and Global Regulation in *Escherichia coli*," *Annu. Rev. Microbiol.*, vol. 57, pp. 155–176, 2003, doi: 10.1146/annurev.micro.57.030502.090820.
- [71] W. C. van Heeswijk, H. V. Westerhoff, and F. C. Boogerd, "Nitrogen Assimilation in *Escherichia coli*: Putting Molecular Data into a Systems Perspective," *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 77, no. 4, pp. 628–695, 2013, doi: 10.1128/mnbr.00025-13.
- [72] L. Wang, L. Lai, Q. Ouyang, and C. Tang, "Flux balance analysis of ammonia assimilation network in *E. coli* predicts preferred regulation point," *PLoS One*, vol. 6, no. 1, pp. 1–10, 2011, doi: 10.1371/journal.pone.0016362.
- [73] J. A. Leigh and J. A. Dodsworth, "Nitrogen Regulation in Bacteria and Archaea," *Annu. Rev. Microbiol.*, vol. 61, pp. 349–377, 2007, doi: 10.1146/annurev.micro.61.080706.093409.
- [74] E. Soupene, L. He, D. Yan, and S. Kustu, "Ammonia acquisition in enteric bacteria: Physiological role of the ammonium/methylammonium transport B (AmtB) protein," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 95, no. 12, pp. 7030–7034, 1998, doi: 10.1073/pnas.95.12.7030.
- [75] P. J. Senior, "Regulation of nitrogen metabolism in *Escherichia coli* and *Klebsiella aerogenes*: studies with the continuous culture technique," *J. Bacteriol.*, vol. 123, no. 2, pp. 407–418, 1975, doi: 10.1128/jb.123.2.407-418.1975.
- [76] P. Jiang, A. E. Mayo, and A. J. Ninfa, "*Escherichia coli* Glutamine Synthetase Adenylyltransferase (ATase, EC 2.7.7.49): Kinetic Characterization of Regulation by PII, PII-UMP, Glutamine, and α -Ketoglutarate," *Biochemistry*, vol. 46, no. 13, pp. 4133–4146, 2007, doi: 10.1021/bi0620510.
- [77] F. M. Commichau, K. Forchhammer, and J. Stülke, "Regulatory links between carbon and nitrogen metabolism," *Curr. Opin. Microbiol.*, vol. 9, no. 2, pp. 167–172, 2006, doi: 10.1016/j.mib.2006.01.001.
- [78] M. Maheswaran and K. Forchhammer, "Carbon-source-dependent nitrogen regulation in *Escherichia coli* is mediated through glutamine-dependent GlnB signalling," *Microbiology*, vol. 149, no. 8, pp. 2163–2172, 2003, doi:

- 10.1099/mic.0.26449-0.
- [79] J. Daniel and A. Danchin, “2-Ketoglutarate as a possible regulatory metabolite involved in cyclic AMP-dependent catabolite repression in *Escherichia coli* K12,” *Biochimie*, vol. 68, no. 2, pp. 303–310, 1986, doi: 10.1016/S0300-9084(86)80027-X.
- [80] X. J. Mao, Y. X. Huo, M. Buck, A. Kolb, and Y. P. Wang, “Interplay between CRP-cAMP and PII-Ntr systems forms novel regulatory network between carbon metabolism and nitrogen assimilation in *Escherichia coli*,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 35, no. 5, pp. 1432–1440, 2007, doi: 10.1093/nar/gkl1142.
- [81] B. Macek, K. Forchhammer, J. Hardouin, E. Weber-Ban, C. Grangeasse, and I. Mijakovic, “Protein post-translational modifications in bacteria,” *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 17, no. 11, pp. 651–664, 2019, doi: 10.1038/s41579-019-0243-0.
- [82] M. M. Müller, “Post-Translational Modifications of Protein Backbones: Unique Functions, Mechanisms, and Challenges,” *Biochemistry*, vol. 57, no. 2, pp. 177–185, 2018, doi: 10.1021/acs.biochem.7b00861.
- [83] L. Chen and A. Kashina, “Post-translational Modifications of the Protein Termini,” *Front. Cell Dev. Biol.*, vol. 9, pp. 1–14, 2021, doi: 10.3389/fcell.2021.719590.
- [84] P. Beltrao, P. Bork, N. J. Krogan, and V. Van Noort, “Evolution and functional cross-talk of protein post-translational modifications,” *Mol. Syst. Biol.*, vol. 9, no. 714, pp. 1–13, 2013, doi: 10.1002/msb.201304521.
- [85] G. Duan and D. Walther, “The Roles of Post-translational Modifications in the Context of Protein Interaction Networks,” *PLoS Comput. Biol.*, vol. 11, no. 2, pp. 1–23, 2015, doi: 10.1371/journal.pcbi.1004049.
- [86] P. Minguez *et al.*, “Deciphering a global network of functionally associated post-translational modifications,” *Mol. Syst. Biol.*, vol. 8, no. 599, pp. 1–14, 2012, doi: 10.1038/msb.2012.31.
- [87] S. Prabakaran, G. Lippens, H. Steen, and J. Gunawardena, “Imprisonment and the Basis for Dynamic Information Encoding,” *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.*, vol. 4, no. 6, pp. 565–583, 2012, doi: 10.1002/wsbm.1185.Post-translational.
- [88] A. J. Wolfe, “Bacterial protein acetylation: new discoveries unanswered questions,” *Curr. Genet.*, vol. 62, no. 2, pp. 335–341, 2016, doi: 10.1007/s00294-015-0552-4.
- [89] D. G. Christensen *et al.*, “Mechanisms, detection, and relevance of protein acetylation in prokaryotes,” *MBio*, vol. 10, no. 2, pp. 1–20, Mar. 2019, doi: 10.1128/mBio.02708-18.
- [90] K. L. Hentchel and J. C. Escalante-Semerena, “Acylation of Biomolecules in Prokaryotes: a Widespread Strategy for the Control of Biological Function and Metabolic Stress,” *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 79, no. 3, pp. 321–346, 2015, doi: 10.1128/mmbr.00020-15.
- [91] A. Drazic, L. M. Myklebust, R. Ree, and T. Arnesen, “The world of protein acetylation,” *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1864, no. 10, pp. 1372–1401, 2016, doi: 10.1016/j.bbapap.2016.06.007.
- [92] T. Arnesen, “Towards a Functional Understanding of Protein N-Terminal

- Acetylation," *PLoS Biol.*, vol. 9, no. 5, pp. 1–5, 2011, doi: 10.1371/journal.pbio.1001074.
- [93] K. T. Nguyen, S. H. Mun, C. S. Lee, and C. S. Hwang, "Control of protein degradation by N-terminal acetylation and the N-end rule pathway," *Exp. Mol. Med.*, vol. 50, no. 91, pp. 1–8, 2018, doi: 10.1038/s12276-018-0097-y.
- [94] M. Liu, L. Gou, Y. Fu, M. Huo, Q. Qi, and G. Zhao, "Bacterial protein acetylation and its role in cellular physiology and metabolic regulation," *Biotechnol. Adv.*, vol. 53, no. 107842, pp. 1–12, 2021, doi: 10.1016/j.biotechadv.2021.107842.
- [95] S. Zhao *et al.*, "Regulation of Cellular Metabolism by Protein Lysine Acetylation," *Science (80-.)*, vol. 327, no. 5968, pp. 1000–1004, 2010, doi: 10.1126/science.1179689.
- [96] Y. Xiong and K. L. Guan, "Mechanistic insights into the regulation of metabolic enzymes by acetylation," *J. Cell Biol.*, vol. 198, no. 2, pp. 155–164, 2012, doi: 10.1083/jcb.201202056.
- [97] G. Vidali, E. L. Gershey, and V. G. Allfrey, "Chemical Studies of Histone Acetylation," *J. Biol. Chem.*, vol. 243, no. 24, pp. 6361–6366, 1968, doi: 10.1016/s0021-9258(18)93148-0.
- [98] T. Jenuwein and C. D. Allis, "Translating the Histone Code," vol. 293, pp. 1074–1080, 2001, doi: 10.1126/science.1063127.
- [99] X. J. Yang, "The diverse superfamily of lysine acetyltransferases and their roles in leukemia and other diseases," *Nucleic Acids Res.*, vol. 32, no. 3, pp. 959–976, 2004, doi: 10.1093/nar/gkh252.
- [100] A. Tapias and Z. Q. Wang, "Lysine Acetylation and Deacetylation in Brain Development and Neuropathies," *Genomics, Proteomics Bioinforma.*, vol. 15, no. 1, pp. 19–36, 2017, doi: 10.1016/j.gpb.2016.09.002.
- [101] R. Barak, M. Welch, A. Yanovsky, M. Eisenbach, and K. Oosawa, "Acetyladenylate or Its Derivative Acetylates the Chemotaxis Protein CheY in Vitro and Increases Its Activity at the Flagellar Switch," *Biochemistry*, vol. 31, no. 41, pp. 10099–10107, 1992, doi: 10.1021/bi00156a033.
- [102] B. R. Sabari, D. Zhang, C. D. Allis, and Y. Zhao, "Metabolic regulation of gene expression through histone acylations," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 18, no. 2, pp. 90–101, 2017, doi: 10.1038/nrm.2016.140.
- [103] B. M. Dancy and P. A. Cole, "Protein lysine acetylation by p300/CBP," *Chem. Rev.*, vol. 115, no. 6, pp. 2419–2452, 2015, doi: 10.1021/cr500452k.
- [104] V. Sapountzi and J. Côté, "MYST-family histone acetyltransferases: Beyond chromatin," *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 68, no. 7, pp. 1147–1156, 2011, doi: 10.1007/s00018-010-0599-9.
- [105] R. Marmorstein and S. Y. Roth, "Histone acetyltransferases: Function, structure, and catalysis," *Curr. Opin. Genet. Dev.*, vol. 11, no. 2, pp. 155–161, 2001, doi: 10.1016/S0959-437X(00)00173-8.
- [106] L. Favrot, J. S. Blanchard, and O. Vergnolle, "Bacterial GCN5-Related N-Acetyltransferases: From Resistance to Regulation," *Biochemistry*, vol. 55, no. 7, pp. 989–1002, 2016, doi: 10.1021/acs.biochem.5b01269.

- [107] H. Yuan and R. Marmorstein, "Histone acetyltransferases: Rising ancient counterparts to protein kinases," *Biopolymers*, vol. 99, no. 2, pp. 98–111, 2013, doi: 10.1002/bip.22128.
- [108] F. Dyda, D. C. Klein, and A. B. Hickman, "Gcn5-Related N-Acetyltransferases: A Structural Overview," *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, vol. 29, pp. 81–103, 2000, doi: 10.1146/annurev.biophys.29.1.81.
- [109] D. G. Christensen *et al.*, "Identification of Novel Protein Lysine Acetyltransferases in *Escherichia coli*," *MBio*, vol. 9, no. 5, pp. 1–23, 2018, doi: 10.1128/mBio.
- [110] F. Hosp *et al.*, "Lysine acetylation in mitochondria: From inventory to function," *Mitochondrion*, vol. 33, pp. 58–71, 2017, doi: 10.1016/j.mito.2016.07.012.
- [111] W. K. Paik, D. Pearson, H. W. Lee, and S. Kim, "Nonenzymatic acetylation of histones with acetyl-CoA," *BBA Sect. Nucleic Acids Protein Synth.*, vol. 213, no. 2, pp. 513–522, 1970, doi: 10.1016/0005-2787(70)90058-4.
- [112] A. M. James, C. L. Smith, A. C. Smith, A. J. Robinson, K. Hoogewijs, and M. P. Murphy, "The Causes and Consequences of Nonenzymatic Protein Acylation," *Trends Biochem. Sci.*, vol. 43, no. 11, pp. 921–932, 2018, doi: 10.1016/j.tibs.2018.07.002.
- [113] B. Schwer *et al.*, "Calorie Restriction Alters Mitochondrial Protein Acetylation Bjoern," *Aging Cell*, vol. 8, no. 5, pp. 604–606, 2010, doi: 10.1111/j.1474-9726.2009.00503.x.Calorie.
- [114] B. Weinert *et al.*, "Acetyl-Phosphate is a critical determinant of Lysine Acetylation in *E.coli*," *Mol. Cell*, vol. 51, no. 2, pp. 265–272, 2013, doi: 10.1016/j.molcel.2013.06.003.
- [115] M. L. Kuhn *et al.*, "Structural, kinetic and proteomic characterization of acetyl phosphate-dependent bacterial protein acetylation," *PLoS One*, vol. 9, no. 4, pp. 1–26, 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0094816.
- [116] M. Lammers, "Post-translational Lysine Ac(et)ylation in Bacteria: A Biochemical, Structural, and Synthetic Biological Perspective," *Front. Microbiol.*, vol. 12, no. 757179, pp. 1–45, 2021, doi: 10.3389/fmicb.2021.757179.
- [117] S. Kosono *et al.*, "Changes in the acetylome and succinylome of *Bacillus subtilis* in response to carbon source," *PLoS One*, vol. 10, no. 6, pp. 1–24, 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0131169.
- [118] J. Baeza *et al.*, "Stoichiometry of site-specific lysine acetylation in an entire proteome," *J. Biol. Chem.*, vol. 289, no. 31, pp. 21326–21338, 2014, doi: 10.1074/jbc.M114.581843.
- [119] M. M. Wang, D. You, and B. C. Ye, "Site-specific and kinetic characterization of enzymatic and nonenzymatic protein acetylation in bacteria," *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 14790, pp. 1–12, 2017, doi: 10.1038/s41598-017-13897-w.
- [120] J. Gallego-Jara, Á. Ortega, G. Lozano Terol, R. A. Sola Martínez, M. Cánovas Díaz, and T. de Diego Puente, "Bacterial Sirtuins Overview: An Open Niche to Explore," *Front. Microbiol.*, vol. 12, pp. 1–15, 2021, doi: 10.3389/fmicb.2021.744416.
- [121] X. Yang and E. Seto, "The Rpd3 / Hda1 family of lysine deacetylases : from bacteria and yeast to mice and men," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 9, pp. 206–218, 2008,

doi: 10.1038/nrm2346.

- [122] H. Yuan and R. Marmorstein, "Structural Basis for Sirtuin Activity and Inhibition *," *J. Biol. Chem.*, vol. 287, no. 51, pp. 42428–42435, 2012, doi: 10.1074/jbc.R112.372300.
- [123] J. Landry *et al.*, "The silencing protein SIR2 and its homologs are NAD-dependent protein deacetylases," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 97, no. 11, pp. 5807–5811, 2000, doi: 10.1073/pnas.110148297.
- [124] C. O'Callaghan and A. Vassilopoulos, "Sirtuins at the crossroads of stemness, aging, and cancer," *Aging Cell*, vol. 16, no. 6, pp. 1208–1218, 2017, doi: 10.1111/acer.12685.
- [125] J. L. Feldman, J. Baeza, and J. M. Denu, "Activation of the protein deacetylase SIRT6 by long-chain fatty acids and widespread deacylation by Mammalian Sirtuins," *J. Biol. Chem.*, vol. 288, no. 43, pp. 31350–31356, 2013, doi: 10.1074/jbc.C113.511261.
- [126] A. Abouelfetouh *et al.*, "The *E. coli* sirtuin CobB shows no preference for enzymatic and nonenzymatic lysine acetylation substrate sites," *Microbiologyopen*, vol. 4, no. 1, pp. 66–83, 2015, doi: 10.1002/mbo3.223.
- [127] G. Colak *et al.*, "Identification of lysine succinylation substrates and the succinylation regulatory enzyme CobB in *Escherichia coli*," *Mol. Cell. Proteomics*, vol. 12, no. 12, pp. 3509–3520, 2013, doi: 10.1074/mcp.M113.031567.
- [128] J. Gallego-Jara, G. Lozano Terol, A. Écija Conesa, B. Zambelli, M. Cánovas Díaz, and T. de Diego Puente, "Characterization of acetyl-CoA synthetase kinetics and ATP-binding," *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.*, vol. 1863, no. 6, pp. 1040–1049, 2019, doi: 10.1016/j.bbagen.2019.03.017.
- [129] B. Schilling *et al.*, "Protein acetylation dynamics in response to carbon overflow in *Escherichia coli*," *Mol. Microbiol.*, vol. 98, no. 5, pp. 847–863, 2015, doi: 10.1111/mmi.13161.
- [130] B. Schilling *et al.*, "Global lysine acetylation in *Escherichia coli* results from growth conditions that favor acetate fermentation," *J. Bacteriol.*, vol. 201, no. 9, pp. 1–9, 2019, doi: 10.1101/457929.
- [131] S. Venkat, H. Chen, P. Mcguire, A. Stahman, and Q. Gan, "Characterizing lysine acetylation of *Escherichia coli* type II citrate synthase," *FEBS J.*, vol. 286, pp. 2799–2808, 2019, doi: 10.1111/febs.14845.
- [132] S. Venkat *et al.*, "Characterizing Lysine Acetylation of Isocitrate Dehydrogenase in *Escherichia coli*," *J. Mol. Biol.*, vol. 430, no. 13, pp. 1901–1911, 2019, doi: 10.1016/j.jmb.2018.04.031.Characterizing.
- [133] S. Venkat, C. Gregory, J. Sturges, Q. Gan, and C. Fan, "Studying the Lysine Acetylation of Malate Dehydrogenase," *J. Mol. Biol.*, vol. 429, no. 9, pp. 1396–1405, 2017, doi: 10.1016/j.jmb.2017.03.027.
- [134] T. Umehara, S. Kosono, D. Soll, and K. Tamura, "Lysine Acetylation Regulates Alanyl-tRNASynthetase Activity in *Escherichia coli*," *Genes (Basel)*, vol. 9, no. 473, pp. 1–16, 2018, doi: doi.org/10.3390/genes9100473.
- [135] Z. Xu *et al.*, "Interplay between the bacterial protein deacetylase CobB and the

- second messenger c-di-GMP," *EMBO J.*, vol. 38, no. e100948, pp. 1–18, 2019, doi: 10.15252/embj.2018100948.
- [136] Q. Zhang *et al.*, "Reversible lysine acetylation is involved in DNA replication initiation by regulating activities of initiator DnaA in *Escherichia coli*," *Sci. Rep.*, vol. 6, no. 30837, pp. 1–13, 2016, doi: 10.1038/srep30837.
- [137] Q. Zhou, Y. N. Zhou, and D. J. Jin, "Deacetylation of topoisomerase I is an important physiological function of *E. coli* CobB," *Nucleic Acids Res.*, vol. 45, no. 9, pp. 5349–5358, 2017, doi: 10.1093/nar/gkx250.
- [138] A. Ecija-conesa *et al.*, "An ideal spacing is required for the control of Class II CRP-dependent promoters by the status of CRP K100," *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 327, pp. 1–9, 2020, doi: 10.1093/femsle/fnaa164.
- [139] S. Doll and A. L. Burlingame, "Mass Spectrometry-Based Detection and Assignment of Protein Posttranslational Modifications," *ACS Chem. Biol.*, vol. 10, pp. 63–71, 2015, doi: 10.1021/cb500904b.
- [140] L. K. Pino, J. Rose, A. O. Broin, S. Shah, and B. Schilling, "Emerging mass spectrometry-based proteomics methodologies for novel biomedical applications," *Biochem. Soc. Trans.*, vol. 48, pp. 1953–1966, 2020, doi: doi.org/10.1042/BST20191091.
- [141] S. Ong *et al.*, "Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture , SILAC , as a Simple and Accurate Approach to Expression Proteomics *," *Mol. Cell. Proteomics*, vol. 1, no. 5, pp. 376–386, 2002, doi: 10.1074/mcp.M200025-MCP200.
- [142] J. Zecha *et al.*, "TMT Labeling for the Masses : A Robust and Cost-efficient , In-solution Labeling Approach Authors TMT Labeling for the Masses : A Robust and," *Mol. Cell. Proteomics*, vol. 18, no. 7, pp. 1468–1478, 2019, doi: 10.1074/mcp.TIR119.001385.
- [143] S. Wiese, K. A. Reidegeld, H. E. Meyer, and B. Warscheid, "Protein labeling by iTRAQ : A new tool for quantitative mass spectrometry in proteome research," *Proteomics*, vol. 7, pp. 340–350, 2007, doi: 10.1002/pmic.200600422.
- [144] J. Cox, M. Y. Hein, C. A. Luber, I. Paron, N. Nagaraj, and M. Mann, "Accurate Proteome-wide Label-free Quantification by Delayed Normalization and Maximal Peptide Ratio Extraction , Termed MaxLFQ," *Technol. Innov. Resour.*, vol. 13, no. 9, pp. 2513–2526, 2014, doi: 10.1074/mcp.M113.031591.
- [145] B. J. Yu, J. A. Kim, J. H. Moon, S. E. Ryu, and J. G. Pan, "The diversity of lysine-acetylated proteins in *Escherichia coli*," *J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 18, no. 9, pp. 1529–1536, 2008, doi: 7509 [pii].
- [146] B. T. Weinert, S. Satpathy, B. K. Hansen, D. Lyon, L. J. Jensen, and C. Choudhary, "Accurate quantification of site-specific acetylation stoichiometry reveals the impact of Sirtuin deacetylase CobB on the *E. coli* acetylome," *Mol. Cell. Proteomics*, vol. 16, no. 5, pp. 759–769, 2017, doi: 10.1074/mcp.M117.067587.
- [147] K. Zhang, S. Zheng, J. S. Yang, Y. Chen, and Z. Cheng, "Comprehensive profiling of protein lysine acetylation in *Escherichia coli*," *J. Proteome Res.*, vol. 12, no. 2, pp. 844–851, 2013, doi: 10.1021/pr300912q.
- [148] S. de Boor *et al.*, "Small GTP-binding protein Ran is regulated by posttranslational lysine acetylation," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 112, no. 28, pp. 3679–3688, 2015,

doi: 10.1073/pnas.1505995112.

- [149] M. Kamionka, "Engineering of Therapeutic Proteins Production in *Escherichia coli*," *Curr. Pharm. Biotechnol.*, vol. 12, no. 2, pp. 268–274, 2011, doi: 10.2174/138920111794295693.
- [150] A. L. Demain and P. Vaishnav, "Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms," *Biotechnol. Adv.*, vol. 27, no. 3, pp. 297–306, 2009, doi: 10.1016/j.biotechadv.2009.01.008.
- [151] K. Kim, D. Choe, D. H. Lee, and B. K. Cho, "Engineering biology to construct microbial chassis for the production of difficult-to-express proteins," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 21, no. 990, pp. 1–25, 2020, doi: 10.3390/ijms21030990.
- [152] I. S. Johnson, "Human Insulin from Recombinant DNA Technology," *Science (80-.)*, vol. 219, no. 4585, pp. 632–637, 1983, doi: 10.1126/science.6337396.
- [153] N. K. Tripathi and A. Shrivastava, "Recent Developments in Bioprocessing of Recombinant Proteins: Expression Hosts and Process Development," *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 7, no. 420, pp. 1–35, 2019, doi: 10.3389/fbioe.2019.00420.
- [154] C. P. S. Badenhorst and U. T. Bornscheuer, "Getting Momentum: From Biocatalysis to Advanced Synthetic Biology," *Trends Biochem. Sci.*, vol. 43, no. 3, pp. 180–198, 2018, doi: 10.1016/j.tibs.2018.01.003.
- [155] M. N. Baeshen *et al.*, "Production of Biopharmaceuticals in *E. coli*: Current Scenario and Future Perspectives," *J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 25, no. 7, pp. 953–962, 2015, doi: 10.4014/jmb.1412.12079.
- [156] M. Wacker *et al.*, "N-Linked Glycosylation in *Campylobacter jejuni* and Its Functional Transfer into *E. coli*," *Science (80-.)*, vol. 298, no. 5599, pp. 1790–1793, 2002, doi: 10.1126/science.298.5599.1790.
- [157] R. Freudl, "Signal peptides for recombinant protein secretion in bacterial expression systems," *Microb. Cell Fact.*, vol. 17, no. 52, pp. 1–10, 2018, doi: 10.1186/s12934-018-0901-3.
- [158] X. Su, G. Schmitz, and M. Zhang, "Heterologous Gene Expression in Filamentous Fungi," in *BS:AAM*, vol. 81, Elsevier, 2012, pp. 1–61.
- [159] L. Sanchez-Garcia, L. Martín, R. Mangues, N. Ferrer-Miralles, E. Vázquez, and A. Villaverde, "Recombinant pharmaceuticals from microbial cells: a 2015 update," *Microb. Cell Fact.*, vol. 15, no. 33, pp. 1–7, 2016, doi: 10.1186/s12934-016-0437-3.
- [160] S. Smolskaya, Y. A. Logashina, and Y. A. Andreev, "*Escherichia coli* extract-based cell-free expression system as an alternative for difficult-to-obtain protein biosynthesis," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 21, no. 928, pp. 1–21, 2020, doi: 10.3390/ijms21030928.
- [161] F. W. Studier, P. Daegelen, R. E. Lenski, S. Maslov, and J. F. Kim, "Understanding the Differences between Genome Sequences of *Escherichia coli* B Strains REL606 and BL21(DE3) and Comparison of the *E. coli* B and K-12 Genomes," *J. Mol. Biol.*, vol. 394, no. 4, pp. 653–680, 2009, doi: 10.1016/j.jmb.2009.09.021.
- [162] S. Castaño-Cerezo, V. Bernal, T. Röhrig, S. Termeer, and M. Cánovas, "Regulation of acetate metabolism in *Escherichia coli* BL21 by protein Nε-lysine acetylation,"

- Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 99, no. 8, pp. 3533–3545, 2015, doi: 10.1007/s00253-014-6280-8.
- [163] S. Schlegel *et al.*, “Optimizing membrane protein overexpression in the *Escherichia coli* strain Lemo21(DE3),” *J. Mol. Biol.*, vol. 423, no. 4, pp. 648–659, 2012, doi: 10.1016/j.jmb.2012.07.019.
- [164] B. Miroux and J. E. Walker, “Over-production of Proteins in *Escherichia coli*: Mutant Hosts that Allow Synthesis of some Membrane Proteins and Globular Proteins at High Levels,” *J. Mol. Biol.*, vol. 260, no. 3, pp. 289–298, 1996, doi: 10.1006/jmbi.1996.0399.
- [165] B. C. Joseph, S. Pichaimuthu, and S. Srimeenakshi, “An Overview of the Parameters for Recombinant Protein Expression in *Escherichia coli*,” *J. Cell Sci. Ther.*, vol. 6, no. 5, pp. 1–7, 2015, doi: 10.4172/2157-7013.1000221.
- [166] H. Tegel, S. Tourle, J. Ottosson, and A. Persson, “Increased levels of recombinant human proteins with the *Escherichia coli* strain Rosetta(DE3),” *Protein Expr. Purif.*, vol. 69, no. 2, pp. 159–167, 2010, doi: 10.1016/j.pep.2009.08.017.
- [167] G. L. Rosano and E. A. Ceccarelli, “Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Advances and challenges,” *Front. Microbiol.*, vol. 5, no. 172, pp. 1–17, 2014, doi: 10.3389/fmicb.2014.00172.
- [168] P. T. Chansb, H. Ohmorill, J. Tomizawall, and J. Lebowitzs, “Nucleotide Sequence and Gene Organization of ColE1 DNA,” *J. Biol. Chem.*, vol. 260, no. 15, pp. 8925–8935, 1985, doi: 10.1016/S0021-9258(17)39438-3.
- [169] A. C. Y. Chang and S. N. Cohen, “Construction and Characterization of Amplifiable Multicopy DNA Cloning Vehicles Derived from the P15A Cryptic Miniplasmid,” *J. Bacteriol.*, vol. 134, no. 3, pp. 1141–1156, 1978, doi: 10.1128/jb.134.3.1141-1156.
- [170] S. Lin-Chao, W. -T Chen, and T. -T Wong, “High copy number of the pUC plasmid results from a Rom/Rop-suppressible point mutation in RNA II,” *Mol. Microbiol.*, vol. 6, no. 22, pp. 3385–3393, 1992, doi: 10.1111/j.1365-2958.1992.tb02206.x.
- [171] M. Betlach, V. Hershfield, L. Chow, W. Brown, H. Goodman, and H. W. Boyer, “A restriction endonuclease analysis of the bacterial plasmid controlling the *ecoRI* restriction and modification of DNA,” *Fed. Proc.*, vol. 35, no. 9, pp. 2037–2043, 1976.
- [172] J. Mairhofer, T. Scharl, K. Marisch, M. Cserjan-puschmann, and G. Striedner, “Comparative Transcription Profiling and In-Depth Characterization of Plasmid-Based and Plasmid-Free *Escherichia coli* Expression Systems under Production Conditions,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 79, no. 12, pp. 3802–3812, 2013, doi: 10.1128/AEM.00365-13.
- [173] M. A. Goldstein and R. H. Doi, “Prokaryotic promoters in biotechnology,” *Biotechnol. Annu. Rev.*, vol. 1, pp. 105–128, 1995, doi: 10.1016/S1387-2656(08)70049-8.
- [174] B. L. Wanner, R. Kodaira, and F. C. Neidhardt, “Regulation of *lac* operon expression: Reappraisal of the theory of catabolite repression,” *J. Bacteriol.*, vol. 136, no. 3, pp. 947–954, 1978, doi: 10.1128/jb.136.3.947-954.1978.
- [175] H. A. de Boer, L. J. Comstock, and M. Vasser, “The *tac* promoter: a functional hybrid derived from the *trp* and *lac* promoters,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 80, no.

- 1, pp. 21–25, 1983, doi: 10.1073/pnas.80.1.21.
- [176] F. W. Studier, A. H. Rosenberg, J. J. Dunn, and J. W. Dubendorff, “Use of T7 RNA Polymerase to Direct Expression of Cloned Genes,” *Methods Enzymol.*, vol. 185, pp. 60–89, 1990, doi: 10.1109/MSP.2007.273050.
- [177] N. Mertens, E. Remaut, and W. Fiers, “Versatile, multi-featured plasmids for high-level expression of heterologous genes in *Escherichia coli*: overproduction of human and murine cytokines,” *Gene*, vol. 164, no. 1, pp. 9–15, 1995, doi: 10.1016/0378-1119(95)00505-Z.
- [178] J. W. Dubendorf and F. W. Studier, “Controlling basal expression in an inducible T7 expression system by blocking the target T7 promoter with *lac* repressor,” *J. Mol. Biol.*, vol. 219, no. 1, pp. 45–59, 1991, doi: 10.1016/0022-2836(91)90856-2.
- [179] R. Schleif, “AraC protein, regulation of the l-arabinose operon in *Escherichia coli*, and the light switch mechanism of AraC action,” *FEMS Microbiol. Rev.*, vol. 34, no. 5, pp. 779–796, 2010, doi: 10.1111/j.1574-6976.2010.00226.x.
- [180] N. A. Valdez-Cruz, L. Caspeta, N. O. Pérez, O. T. Ramírez, and M. A. Trujillo-Roldán, “Production of recombinant proteins in *E. coli* by the heat inducible expression system based on the phage lambda pL and/or pR promoters,” *Microb. Cell Fact.*, vol. 9, no. 18, pp. 1–16, 2010, doi: 10.1186/1475-2859-9-18.
- [181] M. H. De Smit and J. Van Duin, “Secondary structure of the ribosome binding site determines translational efficiency: A quantitative analysis,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 87, no. 19, pp. 7668–7672, 1990, doi: 10.1073/pnas.87.19.7668.
- [182] J. Shiloach and R. Fass, “Growing *E. coli* to high cell density - A historical perspective on method development,” *Biotechnol. Adv.*, vol. 23, no. 5, pp. 345–357, 2005, doi: 10.1016/j.biotechadv.2005.04.004.
- [183] J. F. Kane, “Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*,” *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 6, no. 5, pp. 494–500, 1995, doi: 10.1016/0958-1669(95)80082-4.
- [184] A. Singh, V. Upadhyay, A. K. Upadhyay, S. M. Singh, and A. K. Panda, “Protein recovery from inclusion bodies of *Escherichia coli* using mild solubilization process,” *Microb. Cell Fact.*, vol. 14, no. 41, pp. 1–10, 2015, doi: 10.1186/s12934-015-0222-8.
- [185] O. Kolaj, S. Spada, S. Robin, and J. G. Gerard, “Use of folding modulators to improve heterologous protein production in *Escherichia coli*,” *Microb. Cell Fact.*, vol. 8, no. 9, pp. 1–17, 2009, doi: 10.1186/1475-2859-8-9.
- [186] L. M. Bui *et al.*, “mRNA Engineering for the Efficient Chaperone-Mediated Co-Translational Folding of Recombinant Proteins in *Escherichia coli*,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 20, no. 3163, pp. 1–19, 2019, doi: 10.3390/ijms20133163.
- [187] R. B. Kapust and D. S. Waugh, “*Escherichia coli* maltose-binding protein is effective in promoting solubility,” *Protein Sci.*, vol. 8, no. 8, pp. 1668–1674, 1999, doi: 10.1110/ps.8.8.1668.
- [188] G. D. Davis, C. Elisee, D. M. Mewham, and R. G. Harrison, “New Fusion Protein Systems Designed to Give Soluble Expression in *Escherichia coli*,” *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 65, no. 4, pp. 382–388, 1999, doi: 10.1002/(SICI)1097-0290(19991120)65:4<382::AID-BIT2>3.0.CO;2-I.

- [189] E. R. LaVallie, E. A. DiBlasio, S. Kovacic, K. L. Grant, P. F. Schendel, and J. M. McCoy, "A Thioredoxin Gene Fusion Expression System That Circumvents Inclusion Body Formation in the *E. coli* Cytoplasm," *Biotechnology*, vol. 11, no. 2, pp. 187–193, 1993, doi: 10.1038/nbt0293-187.
- [190] T. R. Butt, S. C. Edavettal, J. P. Hall, and M. R. Mattern, "SUMO fusion technology for difficult-to-express proteins," *Protein Expr. Purif.*, vol. 43, no. 1, pp. 1–9, 2005, doi: 10.1016/j.pep.2005.03.016.
- [191] D. B. Smith and K. S. Johnson, "Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase," *Gene*, vol. 67, no. 1, pp. 31–40, 1988, doi: 10.1016/0378-1119(88)90005-4.
- [192] H. J. Kim, Y. D. Kwon, S. Y. Lee, and P. Kim, "An engineered *Escherichia coli* having a high intracellular level of ATP and enhanced recombinant protein production," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 94, no. 4, pp. 1079–1086, 2012, doi: 10.1007/s00253-011-3779-0.
- [193] S. Flores, R. De Anda-Herrera, G. Gosset, and F. G. Bolívar, "Growth-Rate Recovery of *Escherichia coli* Cultures Carrying a Multicopy Plasmid, by Engineering of the Pentose-Phosphate Pathway," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 87, no. 4, pp. 485–494, 2004, doi: 10.1002/bit.20137.
- [194] N. Dedhia, R. Richins, A. Mesina, and W. Chen, "Improvement in Recombinant Protein Production in ppGpp-Deficient *Escherichia coli*," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 53, no. 4, pp. 379–386, 1997, doi: 10.1002/(SICI)1097-0290(19970220)53:4<379::AID-BIT4>3.0.CO;2-K.
- [195] M. Rahman, M. R. Hasan, T. Oba, and K. Shimizu, "Effect of *rpoS* Gene Knockout on the Metabolism of *Escherichia coli* During Exponential Growth Phase and Early Stationary Phase Based on Gene Expressions, Enzyme Activities and Intracellular Metabolite Concentrations," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 94, no. 3, pp. 585–595, 2006, doi: 10.1002/bit.20858.
- [196] A. B. Singh and K. J. Mukherjee, "Supplementation of Substrate Uptake Gene Enhances the Expression of rhIFN- β in High Cell Density Fed-Batch Cultures of *Escherichia coli*," *Mol. Biotechnol.*, vol. 54, no. 2, pp. 692–702, 2013, doi: 10.1007/s12033-012-9611-y.
- [197] G. N. Vemuri, M. A. Eiteman, and E. Altman, "Increased Recombinant Protein Production in *Escherichia coli* Strains With Overexpressed Water-Forming NADH Oxidase and a Deleted ArcA Regulatory Protein," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 94, no. 3, pp. 538–542, 2006, doi: 10.1002/bit.20853.
- [198] S. Cho, D. Shin, E. J. Geun, S. Heu, and S. Ryu, "High-level recombinant protein production by overexpression of Mlc in *Escherichia coli*," *J. Biotechnol.*, vol. 119, no. 2, pp. 197–203, 2005, doi: 10.1016/j.jbiotec.2005.03.008.
- [199] M. S. Wong, S. Wu, T. B. Causey, G. N. Bennett, and K.-Y. San, "Reduction of acetate accumulation in *Escherichia coli* cultures for increased recombinant protein production," *Metab. Eng.*, vol. 10, pp. 97–108, 2008, doi: 10.1016/j.ymben.2007.10.003.
- [200] A. A. Aristidou, K. Y. San, and G. N. Bennett, "Metabolic Engineering of *Escherichia coli* To Enhance Recombinant Protein Production through Acetate Reduction," *Biotechnol. Prog.*, vol. 11, no. 4, pp. 475–478, 1995, doi: 10.1021/bp00034a019.

-
- [201] K. A. Bauer, A. Ben-Bassat, M. Dawson, V. T. De La Puente, and J. O. Neway, "Improved Expression of Human Interleukin-2 in High-Cell-Density Fermentor Cultures of *Escherichia coli* K-12 by a Phosphotransacetylase Mutant," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 56, no. 5, pp. 1296–1302, 1990, doi: 10.1128/aem.56.5.1296-1302.1990.
- [202] A. R. Lara, C. Vazquez-Limón, G. Gosset, F. Bolívar, A. López-Munguía, and O. T. Ramírez, "Engineering *Escherichia coli* to Improve Culture Performance and Reduce Formation of By-Products During Recombinant Protein Production Under Transient Intermittent Anaerobic Conditions," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 94, no. 6, pp. 1164–1175, 2006, doi: 10.1002/bit.20954.
- [203] T. S. Kim *et al.*, "Reduction of acetate and lactate contributed to enhancement of a recombinant protein production in *E. coli* BL21," *J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 25, no. 7, pp. 1093–1100, 2015, doi: 10.4014/jmb.1503.03023.

Capítulo 2

Objetivos

Objetivos

Escherichia coli (*E. coli*) es uno de los microorganismos más empleados para la producción de compuestos de interés, principalmente, proteínas recombinantes y ADN plasmídico. El gran conocimiento que se tiene de esta bacteria y las ventajas que se derivan de su uso han convertido a *E. coli* en el microorganismo más utilizado con fines biotecnológicos y como modelo celular en investigación. Sin embargo, el empleo de esta bacteria como hospedador conlleva una serie de desventajas, entre las que destaca el desbordamiento del acetato. Cuando *E. coli* crece rápidamente en un medio con un elevado nivel de nutrientes, se produce la acumulación de acetil-Coenzima A (acetil-CoA), el cual es transformado a acetato. El acetato se excreta al medio extracelular, y posteriormente se reincorpora al metabolismo, provocando una disminución del crecimiento celular y de la formación de biomasa que afecta al rendimiento de la expresión de productos biológicos. Este proceso de formación de acetato está relacionado con una modificación postraduccional, la acetilación de lisinas, por medio de los intermediarios acetil-CoA y acetil-fosfato (acetil-P), que actúan como dadores de acetilo. La acetilación de lisinas es responsable de la regulación de multitud de procesos metabólicos, y su nivel depende, principalmente, de la reactividad de las lisinas a las que afecta y la concentración de acetil-P y acetil-CoA. Por lo tanto, las condiciones de cultivo y la utilización de distintas fuentes de nutrientes pueden determinar el estado energético celular, los flujos del metabolismo central del carbono y el nivel de acetilación. En este sentido, esta Tesis Doctoral tiene como finalidad comprender como la regulación por acetilación de lisinas influye en el control de las redes bioquímicas del metabolismo central de *E. coli* y así, esclarecer el impacto de las condiciones de cultivo sobre la dinámica de la acetilación de proteínas que la célula utiliza para aumentar su propia aptitud. Este avance permitirá diseñar estrategias racionales, tanto por ingeniería de cepas como por la selección de medios de cultivo, para aumentar las capacidades biotecnológicas de la bacteria. Con este fin, los principales objetivos son:

- Maximizar la expresión de proteínas recombinantes en *E. coli* BL21 mediante la redirección del metabolismo del acetato, empleando dos estrategias de forma simultánea, la manipulación de la composición del medio de cultivo y la eliminación de genes implicados en el metabolismo del acetato y la acetilación de lisinas (**Capítulo 3**).

- Analizar el efecto de distintos sistemas de expresión sobre la producción de proteínas recombinantes en *E. coli* BL21. Se estudiarán dos factores determinantes del sistema de expresión, como son, el origen de replicación y la fuerza del promotor, para reducir el desajuste metabólico y aumentar la expresión de proteína recombinante (**Capítulo 4**).
- Estudiar la potencial regulación de la ruta de biosíntesis de nucleótidos de pirimidinas *de novo* mediante Nε-acetilación de lisinas. Identificar las enzimas reguladas por acetilación y las consecuencias que esta modificación puede tener sobre su función biológica y sobre el control de la ruta (**Capítulo 5**).
- Analizar el proteoma y el acetiloma de *E. coli* en distintas condiciones de cultivo (glucosa o glicerol como fuente de carbono, y MM9 o TB7 como fuente de nitrógeno) y fases de crecimiento (exponencial y estacionaria). Relacionar las diferencias en la abundancia de proteínas y el nivel de acetilación con las implicaciones sobre la regulación diferencial del metabolismo de *E. coli* creciendo bajo estas diferentes condiciones de cultivo (**Capítulo 6**).

Capítulo 3

Optimización de la producción de proteínas recombinantes mediante la elección racional de la fuente de carbono y nitrógeno utilizando cepas de E. coli BL21 deficientes en genes del metabolismo del acetato

Los resultados presentados en este capítulo están basados en la publicación:

Gema Lozano Terol, Julia Gallego-Jara, Rosa Alba Sola Martínez, Manuel Cánovas Díaz and Teresa de Diego Puente

Engineering protein production by rationally choosing a carbon and nitrogen source using *E. coli* BL21 acetate metabolism knockout strains

Microbial Cell Factories. 2019; 18:151. doi: 10.1186/s1293 4-019-1202-1.

Resumen

Escherichia coli es una bacteria ampliamente empleada en la industria biotecnológica para la producción de bio-productos de elevado interés, como son las proteínas recombinantes. Sin embargo, el crecimiento aeróbico rápido de *E. coli* con glucosa puede conllevar desventajas que afectan al bioproceso, como el desbordamiento de acetato. La acumulación de acetato provoca una disminución de la biomasa celular y la producción de la proteína recombinante deseada. Además, este proceso está relacionado con la modificación postraduccional de proteínas por acetilación de lisinas, la cual afecta a enzimas involucradas en la vía. El metabolismo del acetato forma parte del metabolismo central de la bacteria, y este a su vez está influenciado por la fuente de carbono y nitrógeno empleadas para su crecimiento. Por lo tanto, el estudio del metabolismo central de *E. coli* y su regulación es esencial para la optimización de la producción de biomasa y de proteínas recombinantes en general. En este estudio nuestro objetivo fue encontrar las condiciones más favorables para llevar a cabo la producción de proteínas recombinantes en *E. coli* BL21 empleando dos enfoques distintos. Por un lado, la manipulación de la composición del medio de cultivo, y por otro la eliminación de los genes implicados en el metabolismo del acetato y la acetilación de lisinas. Con este fin evaluamos la sobreexpresión de proteínas en *E. coli* BL21 tanto silvestre como en cinco cepas deficientes en genes implicados en el metabolismo del acetato (Δacs , \DeltaackA and Δpta) y de la acetilación de lisinas (\DeltapatZ and \DeltacobB), creciendo en medio mínimo MM9 (fuente de nitrógeno basada en amonio inorgánico) o medio complejo TB7 (fuente de nitrógeno basada en péptidos) suplementado con glucosa (fuente de carbono PTS) o glicerol (fuente de carbono no PTS). Los resultados demuestran una dependencia entre la producción de proteínas recombinantes y el metabolismo del acetato con la fuente de carbono y nitrógeno empleadas. El uso de medio complejo suplementado con glicerol como fuente de carbono indujo un incremento de la producción de proteína recombinante. Además, el uso de glicerol en lugar de glucosa supone una alternativa más eficiente y sostenible de los recursos, pues el glicerol es el subproducto mayoritario obtenido de la síntesis de biodiesel. La eliminación del gen *ackA* provocó un aumento de cinco veces en la producción de proteína con respecto a la cepa silvestre, y una reducción en la excreción de acetato. Estos resultados mostraron que el empleo de distintas fuentes de carbono y nitrógeno y de las cepas que no presentan desbordamiento de acetato, pueden redirigir los flujos de carbono de *E. coli* para mejorar el rendimiento final del bioproceso de producción de las proteínas recombinantes deseadas.

Introducción

Escherichia coli (*E. coli*) es una bacteria Gram-negativa caracterizada por su elevada velocidad de crecimiento, la simplicidad de su genoma, su fácil manejo y su capacidad para crecer bajo diferentes condiciones de cultivo. Por todas estas ventajas, *E. coli* es uno de los organismos más estudiados, y es ampliamente empleado como modelo en procesos biológicos, biotecnológicos y en multitud de industrias para la producción de fármacos y otros bio-productos de elevado interés [1], [2]. En consecuencia, es esencial un conocimiento más profundo del metabolismo central de *E. coli* y de su regulación, para optimizar los procesos industriales basados en el uso de esta bacteria.

E. coli es ampliamente empleada como organismo huésped en la producción de proteínas recombinantes con interés industrial y farmacéutico [3]. Para conseguir este objetivo de la forma más eficiente es importante mantener un equilibrio energético entre el metabolismo del huésped y la producción de las proteínas recombinantes. A pesar de todas las ventajas que ofrece esta bacteria, el uso de *E. coli* puede conllevar la producción de subproductos como el acetato, el cual implica una disminución de la biomasa y de la producción de proteínas recombinantes [4], [5]. Por esta razón, se han desarrollado diversas estrategias para limitar la acumulación y el desbordamiento de acetato, como son el uso de diferentes medios y condiciones de cultivo [6]–[8], el empleo de la ingeniería genética para limitar la acumulación de este compuesto, la expresión de sARNs (pequeños ARNs no codificantes) y la potenciación de la actividad respiratoria [9]–[15]. Otra alternativa es la selección de la cepa más adecuada, ya que a pesar de que la cepa K12 (cepa de tipo K) es la cepa de *E. coli* más estudiada, *E. coli* BL12 (cepa de tipo B) es la más empleada para la producción de proteínas recombinantes, porque entre otras diferencias, carece de algunas proteasas, alcanza un mayor rendimiento en biomasa y produce menos acetato que *E. coli* K12, incluso en un medio con exceso de glucosa [13], [16].

E. coli es capaz de crecer empleando distintas fuentes de carbono, aunque muestra preferencia por algunas de ellas a través de un mecanismo conocido como Represión Catabólica por Carbono (RCC). La fuente preferida por la bacteria es la glucosa por ser de mayor valor metabólico. Las fuentes de carbono preferentes (glucosa, fructosa o galactosa) son las reconocidas por el Sistema de transporte Fosfoenolpiruvato Fosfotransferasa (sistema PTS), por lo que son conocidas como fuentes de tipo PTS, frente a las fuentes de carbono de tipo no PTS, (glicerol y acetato), cuyo transporte al interior celular no depende de este sistema. Desde un punto de vista biotecnológico el glicerol es

ampliamente utilizado como fuente de carbono por ser una alternativa más barata, ya que es un subproducto de la síntesis de biodiesel [17]. En cuanto a las fuentes de nitrógeno, *E. coli* es capaz de usar distintas compuestos de nitrógeno para crecer, pero preferentemente consume amonio inorgánico [18]. Además, se ha demostrado una conexión entre el metabolismo del carbono y el del nitrógeno a través del α -cetoglutarato, α -KG, un intermediario clave del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (ciclo TCA), que es requerido para la conversión del amonio en glutamato [19], [20].

El metabolismo del acetato ha sido muy estudiado en *E. coli*. Este metabolito es excretado y posteriormente reincorporado (desbordamiento del acetato) al interior celular, principalmente cuando se emplea glucosa como fuente de carbono [5]. Tres rutas catalizadas por las enzimas Pta-AckA, Acs y PoxB son las responsables del desbordamiento de acetato en *E. coli*. La ruta Pta-AckA está formada por las enzimas fosfotransacetilasa (Pta) y acetato quinasa (AckA), encargadas de la conversión reversible de acetato en acetil-CoA (acetil-Coenzima A) a través del intermedio acetil-P (acetil-fosfato) [21], [22]. Por su parte, la acetil-CoA sintetasa (Acs) cataliza la conversión de acetato en acetil-CoA a través de un intermedio acetil-AMP de forma irreversible. Además, esta ruta es de elevada afinidad y se encuentra altamente regulada, mientras que la ruta Pta-AckA es de baja afinidad [23]–[25]. Por último, PoxB (piruvato oxidasa) cataliza una ruta de producción de acetato a través de la descarboxilación del piruvato (Figura 1).

La N ϵ -acetilación de lisinas es una modificación postraduccional que está relacionada con el metabolismo del acetato y los flujos de carbono a través de los metabolitos intermedios acetil-P y acetil-CoA [26], [27]. Esta modificación puede alterar la actividad y conformación de algunas proteínas, induciendo su agregación [28], y está implicada en múltiples procesos como el metabolismo celular, las interacciones proteína-proteína o proteína-DNA, y la localización celular [13], [29], [30]. Así pues, su regulación y abundancia son factores relevantes en la producción de proteínas recombinantes. La N ϵ -acetilación puede ocurrir mediante un mecanismo químico empleando los metabolitos acetil-CoA y acetil-P como dadores de acetilo, o a través de un mecanismo enzimático con el empleo de lisín-acetiltransferasas y desacetilasas [31]. PatZ es la acetiltransferasa mejor caracterizada en *E. coli* y pertenece a la familia de las GNATs [32]. En cuanto a la reversibilidad de este proceso, CobB es la única desacetilasa conocida en *E. coli* y pertenece a la familia de las sirtuínas [31], [33] (Figura 1).

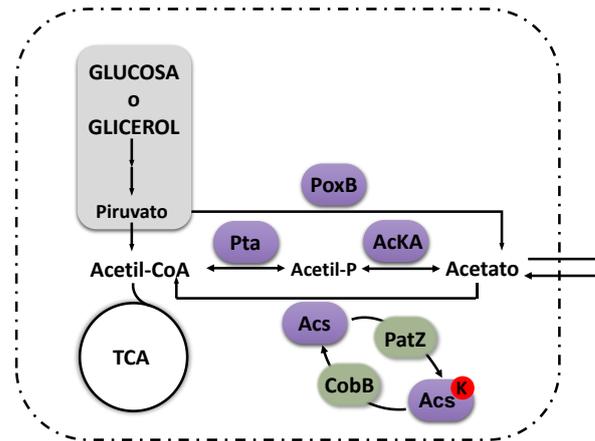


Figura 1: Metabolismo del acetato de *E. coli*. En morado se muestran las enzimas responsables del metabolismo del acetato, PoxB, Pta, AcKA y Acs. En verde se muestran las enzimas relacionadas con la acetilación de lisinas PatZ y CobB. La regulación por acetilación de Acs se muestra indicándola con una lisina en rojo.

El principal objetivo de este estudio fue redirigir el metabolismo del acetato a través del empleo de distintas fuentes de carbono y nitrógeno para optimizar la sobreexpresión de proteínas recombinantes producidas en *E. coli* y determinar el nivel de acetilación de estas. Para alcanzar este objetivo empleamos la proteína verde fluorescente (GFP) como modelo y reportera para monitorizar la sobreexpresión de la proteína mediante la medida del nivel de fluorescencia generada. En el presente estudio, *E. coli* BL21 silvestre (wt) y cinco cepas mutantes implicadas en el metabolismo del acetato (Δacs , $\Delta ackA$ y Δpta) y en la acetilación de lisinas ($\Delta patZ$ y $\Delta cobB$) fueron crecidas en medio mínimo MM9 (fuente de nitrógeno basada en amonio inorgánico) o en medio complejo TB7 (fuente de carbono basada en péptidos), suplementado con glucosa (fuente de carbono PTS) o glicerol (fuente de carbono no PTS). Bajo estas condiciones han sido evaluados la velocidad de crecimiento, los parámetros estequiométricos, la concentración extracelular de los ácidos orgánicos, los niveles de sobreexpresión de la proteína recombinante GFP y su nivel de acetilación. Así, la optimización del bioproceso se reduce tanto a seleccionar la combinación adecuada de condiciones de crecimiento, como a generar los factores genéticos que den lugar al mayor rendimiento en la producción de las proteínas deseadas.

Materiales y Métodos

Plásmidos y cepas

Las cepas de *E. coli*, los plásmidos y los cebadores empleados en este estudio se muestran en la Tabla S1 del Anexo. La cepa *E. coli* BL21 (DE3) se adquirió en Sigma-Aldrich, y las cepas deficientes en determinados genes del metabolismo del acetato y la acetilación de lisinas fueron construidas empleando el método de la recombinasa Red del fago lambda [34]. El plásmido de sobreexpresión pRSETA-GFP (cuya expresión del gen recombinante está controlada por el promotor P_{T7}) fue adquirido de Invitrogen.

Análisis del crecimiento celular y estudio de los metabolitos por HPLC

Las células quimiocompetentes *E. coli* BL21 (DE3) wt y las cepas deficientes fueron transformadas por choque térmico a 42 °C con el plásmido pRSETA-GFP y fueron crecidas en medio mínimo MM9 (10 mM de (NH₄)₂SO₄, 8,5 mM de NaCl, 40 mM de Na₂HPO₄, 20 mM de KH₂PO₄, 185 μM de FeCl₃, 175 μM de EDTA, 7 μM de ZnSO₄, 7 μM de CuSO₄ · 5 H₂O, 7 μM de MnSO₄, 7 μM de CoCl₂, 1 mM de MgSO₄, 0,1 mM de CaCl₂ y 1 μM de tiamina · HCl, pH 7,4) o en medio complejo TB7 (10 g/L de triptona tamponada a pH 7 con 100 mM de fosfato potásico) suplementado con glucosa (20 mM) o glicerol (40 mM) como fuente de carbono. Los cultivos fueron inoculados a una densidad óptica determinada a λ =600 nm (DO₆₀₀) inicial de 0,05 unidades a partir precultivos crecidos. Se determinó la velocidad específica de crecimiento [35], y se calcularon los parámetros cinéticos y estequiométricos tal y como se indica por Martínez-Gómez et al. [36].

Para cuantificar los metabolitos extracelulares, se tomó una muestra de 1 mL del cultivo en diferentes fases de crecimiento, las células fueron aisladas por centrifugación, y se preservó el sobrenadante. Los metabolitos extracelulares fueron analizados mediante un HPLC equipado con un refractómetro diferencial y detectores UV (Shimadzu Scientific Instruments) empleando una columna de exclusión iónica (ICSep Coregel 87H3, Transgenomic). La fase móvil fue H₂SO₄ 5 mM que fluyó a 0,5 mL min⁻¹ y 65 °C. El consumo de glucosa se determinó por el método del ácido dinitrosalicílico (DNS) [37]. Se llevó a cabo un estudio estadístico empleando el software analítico Prism v7 (GraphPad).

PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR)

La cepa *E. coli* BL21 (DE3) wt creció en medio mínimo MM9 suplementado con glucosa (20 mM) o glicerol (40 mM) como fuente de carbono. Las células fueron aisladas por centrifugación en fase exponencial de crecimiento, cuando la DO_{600} alcanzó un valor de 1, y se preservaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta que se produjo la extracción del ARN. El ARN total fue purificado empleando el kit comercial Vantage™ Total RNA Purification Kit (Origene) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN residual fue eliminado usando el producto RNase-Free DNase Set (Qiagen), y la concentración y la pureza del ARN fue determinada empleando un espectrofotómetro Nano-Drop 2000 (Thermo Fisher Scientific). Los ADNc (ADN complementario) fueron sintetizados a partir de 1 μg de ARN empleando el producto TaqMan™ Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems), siguiendo el protocolo del fabricante. Los experimentos de qRT-PCR se llevaron a cabo en el QuantStudio™ 5 Flex (Applied Biosystems) utilizando Power SYBR™ Green PCR Master Mix (Invitrogen), según el protocolo del fabricante. Las condiciones de amplificación fueron de 2 min a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ y luego 10 min a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$, seguidos de 40 ciclos de 2 pasos a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 15 s y $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 1 min, y un ciclo de disociación final de $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 15 s, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 1 min y $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 15 s. Las secuencias de los cebadores empleadas en este estudio se muestran en la Tabla S1 del Anexo. Se eligió el gen *rrs* (gen del 16S ARNr) como control interno para normalizar los datos, y se empleó el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ para analizar los resultados [38]. Los valores relativos de transcripción de determinados genes de *E. coli* BL21 wt creciendo en glicerol como fuente de carbono se expresaron en comparación con los valores de la misma cepa creciendo en glucosa como fuente de carbono. Todos los experimentos se realizaron a partir de al menos 3 ADNc diferentes de cada condición de crecimiento, y se realizó un triplicado de cada gen estudiado.

Análisis de la sobreexpresión de GFP

Las células quimiocompetentes *E. coli* BL21 (DE3) wt y las cepas deficientes transformadas con el vector de expresión pRSETA-GFP crecieron en placas multipocillo, y se monitorizaron simultáneamente el crecimiento celular a DO_{600} y la fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 487 nm y de emisión de 509 nm empleando un lector de placas (Synergy H1 Hybrid Multi-Mode Reader). Para ello, se esterilizaron placas de 96 pocillos y se prepararon con 200 μL de medio mínimo MM9 o medio complejo TB7

suplementado con glucosa (20 mM) o glicerol (40 mM) como fuente de carbono. Los cultivos se inocularon a una OD_{600} inicial de 0,05 unidades con precultivos en fase de crecimiento exponencial, y se indujeron con 0,1 mM de IPTG (Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido) a una OD_{600} de 0,5 unidades. Las placas de 96 pocillos se cubrieron con una lámina adhesiva permeable al gas (Sigma-Aldrich) para evitar la evaporación y permitir la aireación. Los cultivos se realizaron por quintuplicado con agitación orbital doble a 37 °C durante 24 h. Se registraron los datos de fluorescencia correspondientes con la expresión de GFP durante el crecimiento, y los valores máximos de fluorescencia, pertenecientes a la fase estacionaria de crecimiento, se normalizaron con respecto a los valores de DO_{600} (fluorescencia relativa). Los datos resultantes se expresaron como el nivel de expresión en relación con el obtenido para la cepa wt. Se realizó un análisis estadístico de los datos utilizando el software analítico Prism v7 (GraphPad Software, Inc.).

Purificación de la proteína

Las células quimiocompetentes *E. coli* BL21 (DE3) wt y las cepas defectivas fueron transformadas mediante un choque térmico a 42 °C con el vector de expresión pRSETA-GFP. Los cultivos crecieron toda la noche a 30 °C con agitación orbital (250 rpm). El medio de cultivo empleado fue medio mínimo MM9 o medio complejo TB7 suplementado con glucosa (20 mM) o glicerol (40 mM) como fuente de carbono. Los cultivos fueron inoculados a una DO_{600} inicial de 0,05 unidades con precultivos en fase de crecimiento exponencial, y cuando alcanzaron una DO_{600} de 0,5 unidades, fueron inducidos con 0,1 mM de IPTG. Las células fueron aisladas por centrifugación (20 min; 4500 x g), y tras ello, resuspendidas en tampón de unión (50 mM de fosfato de potasio, 500 mM de NaCl, 25 mM de imidazol a pH 8). Posteriormente se lisaron por sonicación durante 2 min (20 s cada ciclo) empleando un sonicador Vibra Cell sonicator (Sonicator Sonics & Materials). Los lisados se centrifugaron a 14000 x g durante 30 min a 4 °C. Los sobrenadantes se introdujeron en una columna de níquel de 5 mL His-Trap HP (GE Healthcare), que fue previamente equilibrada en tampón de unión. Las proteínas eluyeron utilizando un gradiente lineal de imidazol de 0 a 500 mM a una velocidad de flujo de 5 mL min⁻¹. A continuación, se cambió el tampón de proteínas por el tampón A (fosfato potásico 50 mM, pH 7,5) utilizando una columna de desalado HiPrep™ 26/10 (GE Healthcare) a una velocidad de flujo de 9 mL min⁻¹.

Análisis por Western blot

El nivel de acetilación de la proteína GFP fue analizado mediante inmunoensayo por Western blot. La cantidad de proteína estudiada fue normalizada tras la medida de la concentración de proteína purificada. Las muestras fueron separadas por electroforesis SDS-PAGE, y tras ello, transferidas a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) empleando un sistema de transferencia semiseca (Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell, Bio-Rad). Las membranas fueron bloqueadas con 1% (p/v) de seroalbúmina bovina (BSA) en TBST (50 mM de Tris-HCl, 150 mM de NaCl, 0,05% de Tween-20, pH 7,5) durante 1 h. A continuación, las muestras se incubaron con un anticuerpo primario monoclonal de conejo contra la acetil-lisina (ImmuneChem) a una dilución de 1:2000 durante toda la noche a 4 °C. La membrana se lavó 3 veces durante 10 min, cada una, con TBST y luego se incubó con un anticuerpo secundario anti-conejo de cabra conjugado con HRP (Santa Cruz Biotechnology) a una dilución de 1:15000 durante 1 h a temperatura ambiente. La membrana se lavó 6 veces durante 5 min cada vez con TBST. Finalmente, la membrana se incubó durante 10 min con el sustrato quimioluminiscente SuperSignal™ West Pico (Thermo Fisher Scientific) y se reveló con un Amersham Imager 600 (GE Healthcare). Se utilizó el software ImageJ Gel Analyzer para la cuantificación densitométrica. Se llevó a cabo un protocolo para eliminar los anticuerpos de las membranas, y se incubaron con un anticuerpo primario monoclonal de ratón anti-Xpress a una dilución de 1:3000 (Invitrogen) para emplearlo como control de carga, mientras que el anticuerpo secundario fue un anticuerpo de cabra anti-ratón conjugado con HRP (Invitrogen) a una dilución de 1:15.000.

Resultados

Caracterización fisiológica de las cepas sobreexpresando el vector pRSETA-GFP

Para determinar la velocidad de crecimiento específica (μ_{max}), el rendimiento en biomasa ($Y_{x/s}$) y la velocidad específica de consumo de carbono (q_s) de los cultivos de *E. coli* BL21 wt y las cepas mutantes ($\Delta patZ$, $\Delta cobB$, Δacs , $\Delta ackA$ y Δpta) sobreexpresando pRSETA-GFP, todas las cepas fueron crecidas en medio mínimo MM9 o complejo TB7 suplementado con glucosa 20 mM o glicerol 40 mM. Las velocidades específicas de crecimiento se muestran en la Tabla 1, y el rendimiento en biomasa y la velocidad específica de consumo de carbono en la Tabla 2. El crecimiento celular, determinado por

DO₆₀₀, y la concentración extracelular de acetato, glucosa y glicerol de los cultivos se muestran en el Anexo (Figuras S1 a S6).

Tabla 1: Velocidades específicas de crecimiento para las cepas de *E. coli* BL21 creciendo en las diferentes condiciones de cultivo.

	μ_{\max} (h ⁻¹)			
	TB7-Glucosa ^a	TB7-Glicerol ^a	MM9-Glucosa ^a	MM9-Glicerol ^a
wt	0,99 ± 0,09	1,00 ± 0,11	0,45 ± 0,03	0,38 ± 0,02
$\Delta patZ$	0,86 ± 0,01	0,74 ± 0,02	0,49 ± 0,01	0,43 ± 0,01
$\Delta cobB$	0,78 ± 0,03	0,72 ± 0,01	0,43 ± 0,04	0,32 ± 0,01
Δacs	0,99 ± 0,06	1,05 ± 0,06	0,53 ± 0,03	0,43 ± 0,01
$\Delta ackA$	0,62 ± 0,01	0,58 ± 0,02	0,47 ± 0,01	0,40 ± 0,02
Δpta	0,80 ± 0,04	0,44 ± 0,06	0,14 ± 0,01	0,26 ± 0,03

^a Cada valor es la media de tres experimentos independientes con una desviación estándar inferior al 10%.

Se observaron diferencias en los valores de velocidad específica entre medios de cultivo. En general, se obtuvo una mayor μ_{\max} en TB7 que en MM9, con un incremento del 30-60% en TB7, dependiendo de la cepa. Mientras que se obtuvo una menor μ_{\max} empleando glicerol que con el empleo de glucosa, aunque en este caso, las diferencias fueron marcadamente menos pronunciadas. Los valores más elevados de μ_{\max} en medio complejo fueron obtenidos para las cepas wt y Δacs . Las cepas mutantes asociadas a la acetilación de lisinas, $\Delta patZ$ y $\Delta cobB$, mostraron un perfil similar a la cepa wt, pero un valor de μ_{\max} inferior en medio TB7. Las mayores diferencias con respecto a la cepa silvestre fueron observadas para las cepas mutantes Δpta y $\Delta ackA$. En medio mínimo, la velocidad específica de crecimiento de la cepa $\Delta ackA$ fue similar a la de la wt, mientras que en medio complejo TB7, este valor disminuyó en un 39% con respecto al valor de la cepa silvestre. La delección del gen *pta* afectó en gran medida el crecimiento celular en todas las condiciones, y la μ_{\max} se redujo entre un 40 y un 70% en comparación con la cepa wt, excepto en medio TB7 con glucosa (Tabla 1).

Tabla 2: Parámetros estequiométricos, rendimiento en biomasa ($Y_{x/s}$) y velocidad específica de consumo de carbono (q_s).

	$Y_{x/s}$ (g/mmolC)				q_s (mmolC/gh)			
	TB7 ^a Glucosa	TB7 ^a Glicerol	MM9 ^a Glucosa	MM9 ^a Glicerol	TB7 ^a Glucosa	TB7 ^a Glicerol	MM9 ^a Glucosa	MM9 ^a Glicerol
wt	0,013	0,007	0,016	0,009	-34,49	-63,34	-13,20	-18,91
$\Delta patZ$	0,012	0,006	0,013	0,009	-32,39	-57,28	-17,73	-22,19
$\Delta cobB$	0,012	0,006	0,010	0,008	-30,62	-52,80	-19,64	-17,84
Δacs	0,015	0,008	0,013	0,007	-31,71	-60,96	-18,46	-27,23
$\Delta ackA$	0,020	0,009	0,018	0,006	-14,64	-31,08	-12,36	-30,96
Δpta	0,018	0,002	0,007	0,006	-21,03	-32,62	-9,75	-21,31

^a Cada valor es la media de tres experimentos independientes con una desviación estándar inferior al 10%.

En referencia al rendimiento en biomasa, $Y_{x/s}$ fue mayor en medio suplementado con glucosa que con glicerol, y no se encontraron diferencias entre medio mínimo o complejo en las distintas cepas. Todas las cepas mostraron un comportamiento similar con respecto a la cepa wt, excepto las cepas relacionadas con el metabolismo del acetato, $\Delta ackA$ y Δpta . Los valores más bajos de $Y_{x/s}$ fueron observados para la cepa con la delección en el gen *pta*, excepto en medio TB7 con glucosa, donde el rendimiento en biomasa fue superior al de la cepa wt. Sin embargo, la cepa $\Delta ackA$ mostró los valores más elevados de $Y_{x/s}$, excepto en medio MM9 con glicerol. Con respecto a la velocidad específica de consumo de carbono, obtuvimos valores más elevados en glicerol que en glucosa, y en TB7 que en MM9. Cabe destacar que observamos diferencias en las cepas Δpta y $\Delta ackA$ con respecto al resto de cepas, ya que estas cepas mostraron los valores más bajos de q_s en medios complejos y medios mínimos, respectivamente (Tabla 2).

Análisis de los ácidos orgánicos

Las concentraciones extracelulares de ácidos orgánicos fueron evaluadas para *E. coli* BL21 wt y las cepas deficientes ($\Delta patZ$, $\Delta cobB$, Δacs , $\Delta ackA$ y Δpta) sobreexpresando pRSETA-GFP en medio mínimo MM9 o medio complejo TB7, suplementado con glucosa o glicerol como fuente de carbono. Las concentraciones de acetato, piruvato, lactato, formiato, citrato y α -cetoglutarato fueron analizadas, pero solo se detectó acetato. Las concentraciones extracelulares de acetato se muestran en la Figura 2 y la velocidad específica de producción y consumo de acetato en la Tabla 3.

Tabla 3: Velocidad específica de producción y consumo de acetato.

	Velocidad específica de producción de acetato (mmol/gh)				Velocidad específica de consumo de acetato (mmol/gh)			
	TB7 ^a		MM9 ^a		TB7 ^a		MM9 ^a	
	Glucosa	Glicerol	Glucosa	Glicerol	Glucosa	Glicerol	Glucosa	Glicerol
wt	13,62	7,80	0,35	0,14	7,02	5,16	0,11	0,11
$\Delta patZ$	9,79	13,90	0,27	0,16	6,85	6,80	0,13	0,07
$\Delta cobB$	16,49	11,10	0,54	0,38	1,70	2,04	0,20	0,08
Δacs	11,06	10,54	0,38	0,18	1,70	2,29	0,20	0,02
$\Delta ackA$	0,12	2,79	0,09	0,11	0,21	1,87	0,11	0,05
Δpta	0,17	3,64	0,08	0,07	0,20	1,41	0,06	0,06

^a Cada valor es el promedio de tres experimentos independientes con una desviación estándar menor al 10%.

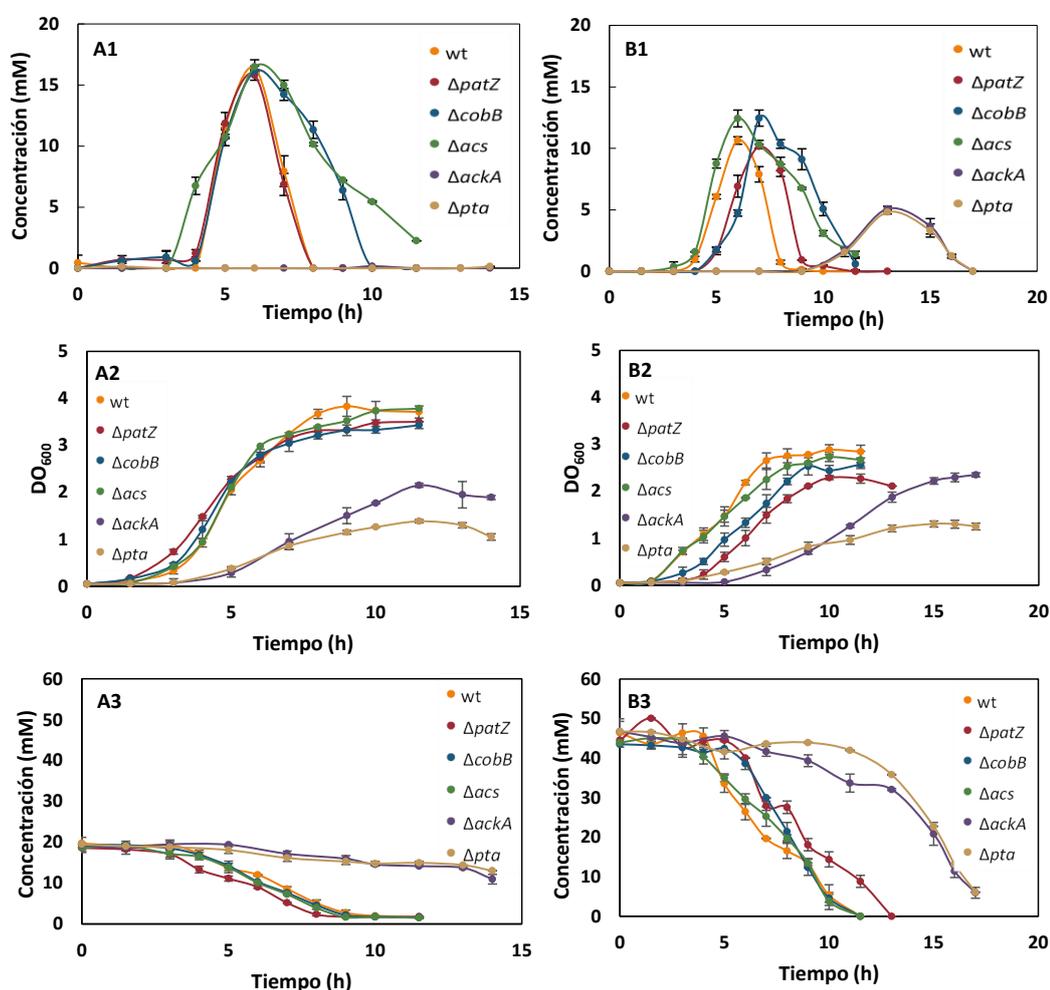


Figura 2: Concentraciones extracelulares de acetato, glucosa y glicerol, y crecimiento celular a DO₆₀₀. Concentración extracelular de acetato detectada para *E. coli* BL21 wt, $\Delta patZ$, $\Delta cobB$, Δacs , $\Delta ackA$ y Δpta creciendo en TB7-glucosa (A1) y TB7-glicerol (B1). Concentración extracelular de glucosa (A2) y glicerol (B2), y crecimiento celular en TB7-glucosa (A3) y TB7-glicerol (B3) para *E. coli* BL21 wt, $\Delta patZ$, $\Delta cobB$, Δacs , $\Delta ackA$ y Δpta .

El acetato extracelular se acumuló desde el inicio de la fase exponencial de crecimiento y fue reincorporado al metabolismo a partir de la mitad de la fase exponencial en *E. coli* BL21 wt. Sin embargo, en las cepas $\Delta cobB$ y Δacs esta reincorporación se alargó hasta el inicio de la fase estacionara de crecimiento, siendo más lento que en el resto en todas las condiciones de cultivo (Figura 2). Estos mutantes mostraron una disminución de 2,7 y 2,5 veces en la velocidad de consumo de acetato con respecto a la cepa silvestre en TB7 en ambas fuentes de carbono (Tabla 3). Las velocidades de producción y consumo de acetato fueron superiores en el medio suplementado con glucosa que en el suplementado con glicerol. No obstante, la velocidad de producción de acetato no fue significativamente diferente entre las distintas cepas, con la excepción de las cepas $\Delta ackA$ y Δpta . Estas cepas mutantes mostraron una disminución de alrededor de 2,7 veces tanto en la velocidad de producción como de consumo de acetato con respecto a la cepa silvestre en TB7-glicerol, y en cambio, no se detectó acetato extracelular en TB7-glucosa. Estos mutantes también mostraron los valores más bajos de la velocidad de consumo de acetato. La excreción de acetato en medio mínimo fue insignificante cuando se comparó con la obtenida para medio complejo TB7, tal y como se muestra en el Anexo (Figuras S1 a S6) y en la Tabla 3. Las concentraciones máximas de acetato detectadas en cada condición y cepa se muestran en la Figura 3A, la concentración extracelular de acetato normalizada con respecto al valor máximo obtenido para *E. coli* BL21 wt se muestra en la Figura 3B, y la relación concentración extracelular de acetato/ q_s expresada como porcentaje, tomando como 100% la relación en *E. coli* BL21 wt creciendo en TB7-glucosa, se muestra en la Figura 3C

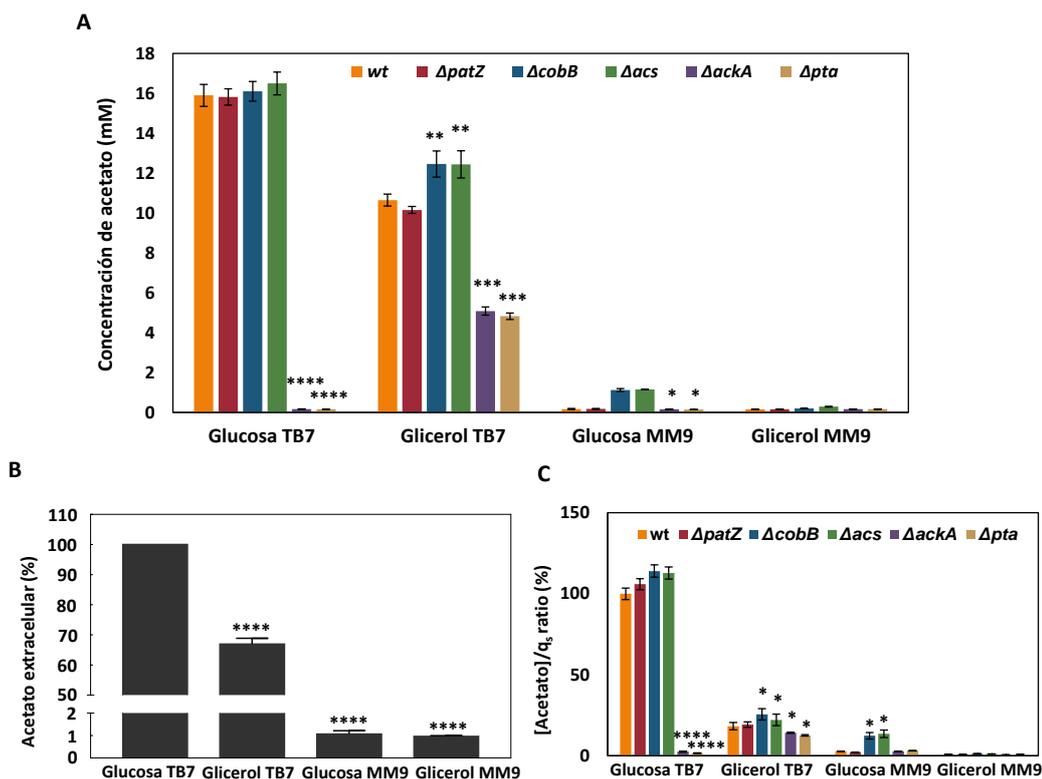


Figura 3: Concentraciones máximas de acetato extracelular. (A) Concentraciones máximas de acetato extracelular detectadas para *E. coli* BL21 wt y las cepas mutantes creciendo en medio MM9 o TB7 suplementado con glucosa o glicerol como fuentes de carbono. (B) Concentraciones máximas de acetato extracelular de *E. coli* BL21 wt en porcentaje relativo al valor para *E. coli* BL21 wt en TB7-glucosa. (C) Ratio concentración extracelular de acetato/ q_s expresado como porcentaje relativo al valor para *E. coli* BL21 wt en TB7-glucosa. Se emplearon las pruebas estadísticas ANOVA de dos vías (A y C) y ANOVA de una vía (B) para evaluar las diferencias significativas entre las cepas mutantes y la cepa wt en cada condición (A y C), y para conocer las diferencias significativas entre el valor en TB7-glucosa y el resto de las condiciones para la cepa wt (B) (p -valor < 0.0001 (****), < 0.001 (***), < 0.01 (**), < 0.05(*)).

Se observaron diversas diferencias en las concentraciones máximas de acetato extracelulares dependiendo del medio de cultivo y la cepa estudiada (Figura 3). Para *E. coli* wt, encontramos una mayor concentración de acetato extracelular cuando la bacteria crecía en medio complejo, de 10,6 a 16 mM dependiendo de la fuente de carbono, y una concentración más baja cuando la bacteria crecía en medio mínimo, aproximadamente 0,16 mM o valores inferiores (Figura 3A). Observamos una clara dependencia de la concentración de acetato con respecto a la fuente de carbono empleada, como se puede observar en la Figura 3B, y que la relación concentración extracelular de acetato/ q_s mostró un patrón similar al observado para las concentraciones máximas de acetato extracelular (Figura 3C). En cuando al empleo de glicerol, se observó una reducción en la

concentración de acetato de más del 30% con respecto al empleo de glucosa, y esta reducción fue más pronunciada en medio complejo (Figura 3).

Del mismo modo, observamos que las concentraciones extracelulares de acetato se vieron alteradas en los mutantes relacionados con el metabolismo del acetato y la acetilación de lisinas. Las mayores concentraciones de acetato de todos los mutantes se obtuvieron para las cepas Δacs y \DeltacobB . Las diferencias entre estas cepas y el resto fueron más notables en el caso del empleo del medio mínimo, en el cual mostraron unos valores de 1 mM aproximadamente, mientras que para el resto de las cepas la concentración de acetato fue muy baja, en torno a 0,16 mM. En cuanto a las cepas en las que se han eliminado los genes *pta* y *ackA*, la concentración extracelular de acetato fue casi imperceptible en todos los medios, excepto para TB7-glicerol, aunque con unos valores inferiores al resto de cepas en ese medio (Figura 3A).

Mientras los ácidos orgánicos extracelulares eran analizados, se detectó un compuesto con una absorción a 280 nm que fue identificado por LC-MS/MS (cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas) como ácido orótico. El orotato es un intermediario de la ruta de biosíntesis de pirimidinas *de novo* que puede ser excretado durante el crecimiento, lo que podría suponer una menor eficiencia en el consumo de carbono, limitando la formación de biomasa y macromoléculas [39], y por tanto, afectar a la producción de proteínas recombinantes. El orotato fue excretado al medio extracelular durante la fase de crecimiento exponencial, y no fue totalmente reincorporado al metabolismo de la bacteria (Figura S7 del Anexo). Las concentraciones máximas de orotato extracelular se muestran en la Figura 4.

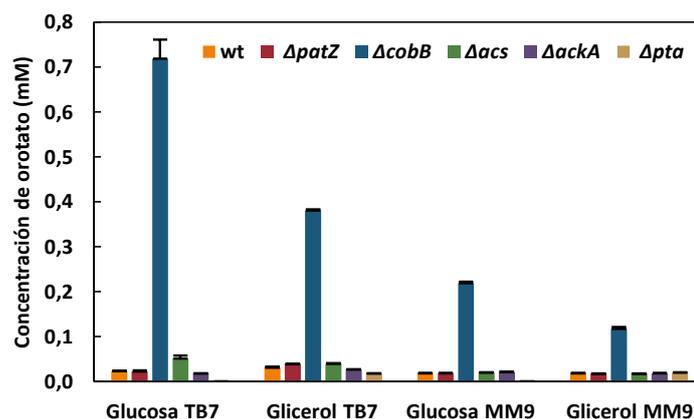


Figura 4: Concentraciones máximas de orotato extracelular. Concentraciones máximas de orotato extracelular detectadas para *E. coli* BL21 wt y las cepas mutantes creciendo en medio MM9 o TB7 suplementado con glucosa o glicerol como fuente de carbono.

En general, se observó que el orotato fue casi imperceptible para las distintas cepas en todas las condiciones de estudio (aproximadamente 0,02 mM) sin grandes diferencias, excepto para las cepas Δacs , $\Delta cobB$ y Δpta . En la cepa Δpta no se excretó orotato durante su crecimiento empleando glucosa como fuente de carbono. En cuanto a la cepa Δacs , esta mostró diferencias con respecto a la cepa silvestre en TB7, con unas concentraciones entre un 40 y un 60% superiores en este medio. Sin embargo, la cepa con las mayores concentraciones de orotato fue la cepa $\Delta cobB$ (de 0,8 a 0,12 mM), con un incremento de 35 veces con respecto a la cepa wt en TB7-glucosa. Además, la concentración de orotato en la cepa $\Delta cobB$ fue mayor en medio complejo que en medio mínimo y en glucosa que en glicerol (Figura 4).

Determinación del nivel de transcripción relativo por qRT-PCR

El desequilibrio entre el catabolismo de la fuente de carbono y el metabolismo respiratorio en *E. coli* conlleva la acumulación de acetil-CoA, y consecuentemente, el desbordamiento del acetato. La Represión Catabólica por Carbono y la regulación del metabolismo central del carbono juegan un rol importante en el equilibrio del metabolismo. Bajo estas condiciones los reguladores transcripcionales predominantes son la proteína receptora del AMPc (Crp), el activador represor de catabolitos (Cra) y la proteína de control de la respiración aeróbica (ArcA) [5].

Se llevó a cabo un ensayo qRT-PCR para analizar las diferencias en la actividad de estos reguladores globales y su relación con la redirección de los flujos de carbono. Los genes analizados (*acs*, *aceA*, *ppsA*, *glpK*, *acnB*, *aceE*, *gapA* y *tpiA*) son regulados por estos factores de transcripción y pertenecen a diferentes rutas del metabolismo central del carbono de *E. coli* (Figura 5). La transcripción relativa de estos genes (Fold change, FCh) se basó en los niveles de expresión en *E. coli* BL21 wt creciendo en glicerol frente al crecimiento en glucosa empleando un medio definido (Figura 5).

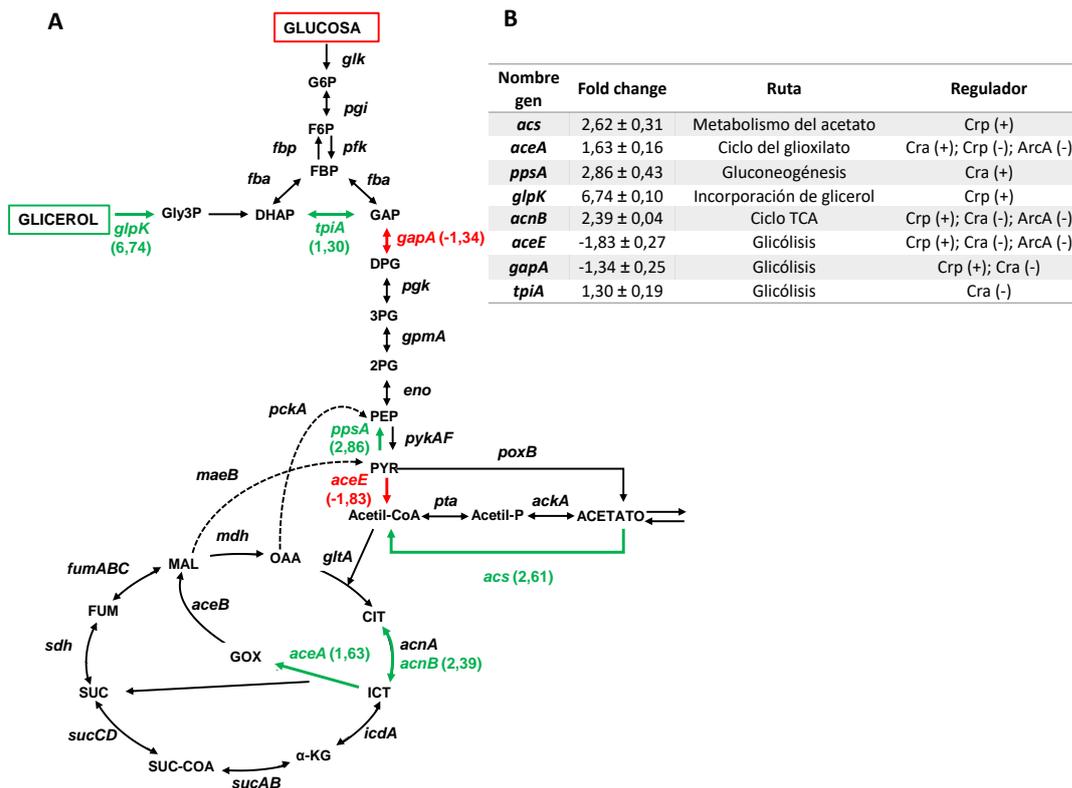


Figura 5: Valores relativos de transcripción génica en *E. coli* BL21 wt. Transcripción génica relativa de *E. coli* BL21 wt creciendo en glicerol, en comparación con *E. coli* BL21 wt creciendo en glucosa. (A) Los genes del metabolismo central estudiados se muestran en rojo (menos expresados en glicerol con respecto a en glucosa) o en verde (sobrexpresados en glicerol con respecto a en glucosa). Abreviaturas de los metabolitos: Gly3P, glicerol-3-fosfato; G6P, glucosa-6-fosfato; F6P, fructosa-6-fosfato; FBP, fructosa-1,6-bifosfato; DHAP, dihidroxiacetona fosfato; GAP, gliceraldehído-3-fosfato; DPG, 1,3-bifosfoglicerato; 3PG, 3-fosfoglicerato; 2PG, 2-fosfoglicerato; PEP, fosfoenolpiruvato; PYR, piruvato; acetil-CoA, acetil coenzima A; acetil-P, acetil fosfato; CIT, citrato; ICT, isocitrato; GOX, glioxilato; α -KG, α -cetoglutarato; SUC-CoA, succinil-coenzima A; SUC, succinato; FUM, fumarato; MAL, malato; OAA, oxalacetato. (B) La tabla muestra los cambios (Fold change) del nivel de transcripción de los genes seleccionados en el crecimiento con glicerol en comparación con el crecimiento con glucosa, la ruta a la que pertenecen y los reguladores globales que regulan positiva (+) o negativamente (-) su expresión.

Como era de esperar, *glpK* (gen que codifica para la glicerol quinasa GlpK) fue el gen con mayor sobreexpresión de los seleccionados en el crecimiento con glicerol. La

expresión de este gen es activada por Crp-AMPc [36], y GlpK cataliza el paso limitante de la utilización del glicerol [40]. En cuanto a los genes seleccionados pertenecientes a la glicólisis, *tpiA* (gen de la triosa fosfato-isomerasa) fue sobreexpresado en glicerol y *gapA* (gen de la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa) fue sobreexpresado en crecimiento con glucosa, pero el cambio en la expresión no fue profundamente afectado. La expresión de ambos genes es reprimida por Cra, y la expresión de *gapA* es activada por Crp-AMPc [41]. El gen *aceE*, que codifica para la piruvato deshidrogenasa, fue menos expresado en *E. coli* creciendo en medio con glicerol, y su expresión es activada por Crp-AMPc e inhibida por Cra y ArcA [41]. En cuanto a los genes seleccionados del metabolismo del acetato, la expresión del gen *acs*, que codifica para la acetil-CoA sintetasa, fue mayor en *E. coli* creciendo en glicerol, y esta depende de la activación por Crp-AMPc [41]. En el ciclo TCA, *acnB* (gen que codifica para la aconitasa B) fue sobreexpresado en crecimiento con glicerol y su expresión es regulada positivamente por Crp-AMPc y reprimida por Cra y ArcA [36], [41]. En cuanto al ciclo del glioxilato, estudiamos la transcripción relativa del gen *aceA* de la isocitrato liasa, cuya expresión fue menor en *E. coli* BL21 creciendo en glicerol. La expresión de este gen es activada por Cra y regulada negativamente por ArcA y Crp-AMPc [42], [43]. Por último, el gen *ppsA* que codifica para la fosfoenolpiruvato sintetasa fue sobreexpresado en glicerol, con un valor similar a *acs* y *acnB*, y su expresión es activada por Cra [42] (Figura 5).

Sobreexpresión de la proteína GFP

Con el fin de evaluar la producción de proteína recombinante en *E. coli* BL21 wt y las cepas mutantes se empleó la proteína GFP. *E. coli* BL21 wt y las cepas defectivas, portando el vector de expresión pRSETA-GFP, crecieron en TB7-glicerol, y tras 24 h de crecimiento, una cantidad igual de células fue sembrada en LB-agar, y se obtuvieron las imágenes de la fluorescencia en todos los cultivos (Figura S8 del Anexo). Se ha demostrado que la fluorescencia de la proteína GFP solo puede ser emitida cuando la proteína tiene la correcta estructura terciaria [44], [45]. Por lo tanto, asumiendo que la fluorescencia de la GFP es un indicador de la expresión funcional de proteínas recombinantes, la mayor producción funcional de GFP a las 24h se detectó en la cepa $\Delta ackA$, seguida de $\Delta cobB$ y Δpta .

Las intensidades de fluorescencia fueron también registradas durante el crecimiento celular, y el mayor nivel de expresión de GFP fue observado cuando las

bacterias alcanzaron la fase estacionaria de crecimiento (Figura S9 del Anexo). Los efectos de las mutaciones sobre los niveles máximos de expresión de GFP (en relación con la cepa silvestre) para cada cepa en diferentes medios de cultivo se muestran en la Figura 6.

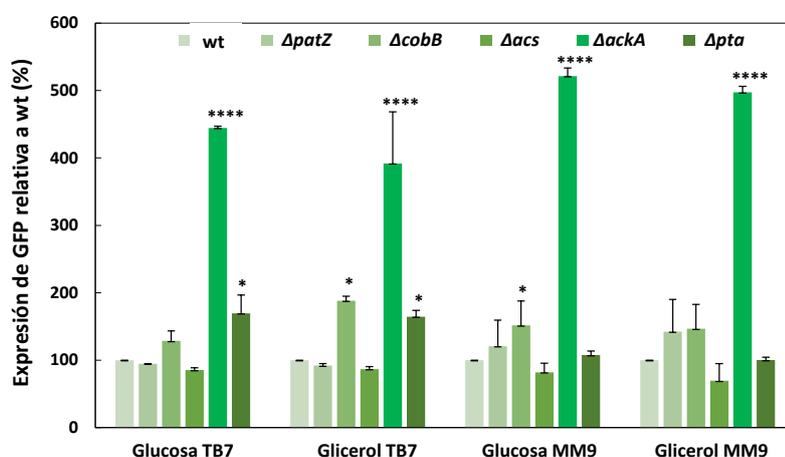


Figura 6: Porcentaje de expresión de GFP. Porcentaje de expresión de GFP en relación con la cepa wt para las cepas *E. coli* BL21 wt y las cepas mutantes en cada medio de crecimiento. Se realizó un análisis estadístico de tipo ANOVA de dos vías para evaluar las diferencias significativas entre los mutantes y la cepa wt en cada condición (p-valor < 0,0001 (****), < 0,05(*)).

Los perfiles de sobreexpresión de proteínas siguieron un patrón similar en todas las condiciones de cultivo. La mayor expresión de GFP fue observada para la cepa $\Delta ackA$ (p-valor < 0.0001) en todos los medios de cultivo, con un incremento en la expresión de 4 a 5 veces con respecto a la cepa silvestre. La cepa Δacs , por su parte, mostró los niveles más bajos de expresión de GFP, aunque en este caso no se observaron diferencias significativas con respecto a la cepa wt. El mutante Δpta obtuvo un incremento de 1,6 veces en la expresión de GFP con respecto a wt en TB7, con un p-valor < 0,05, mientras que no se observaron diferencias significativas en la expresión de este mutante en medio mínimo. Finalmente, la expresión de GFP en la cepa $\Delta cobB$ también conllevó un incremento en comparación con la cepa wt en todos los medios de cultivo, siendo significativamente superior a la cepa silvestre en TB7-glicerol y MM9-glucosa (p-valor < 0,05) (Figura 6).

Para concretar el efecto de la composición de los distintos medios de cultivo en los niveles de expresión de GFP, los resultados de la Figura 6 se separaron en distintas figuras por cada cepa, y el nivel de expresión de GFP se indicó como intensidad de fluorescencia relativa normalizada a los valores de DO_{600} (Figura 7).

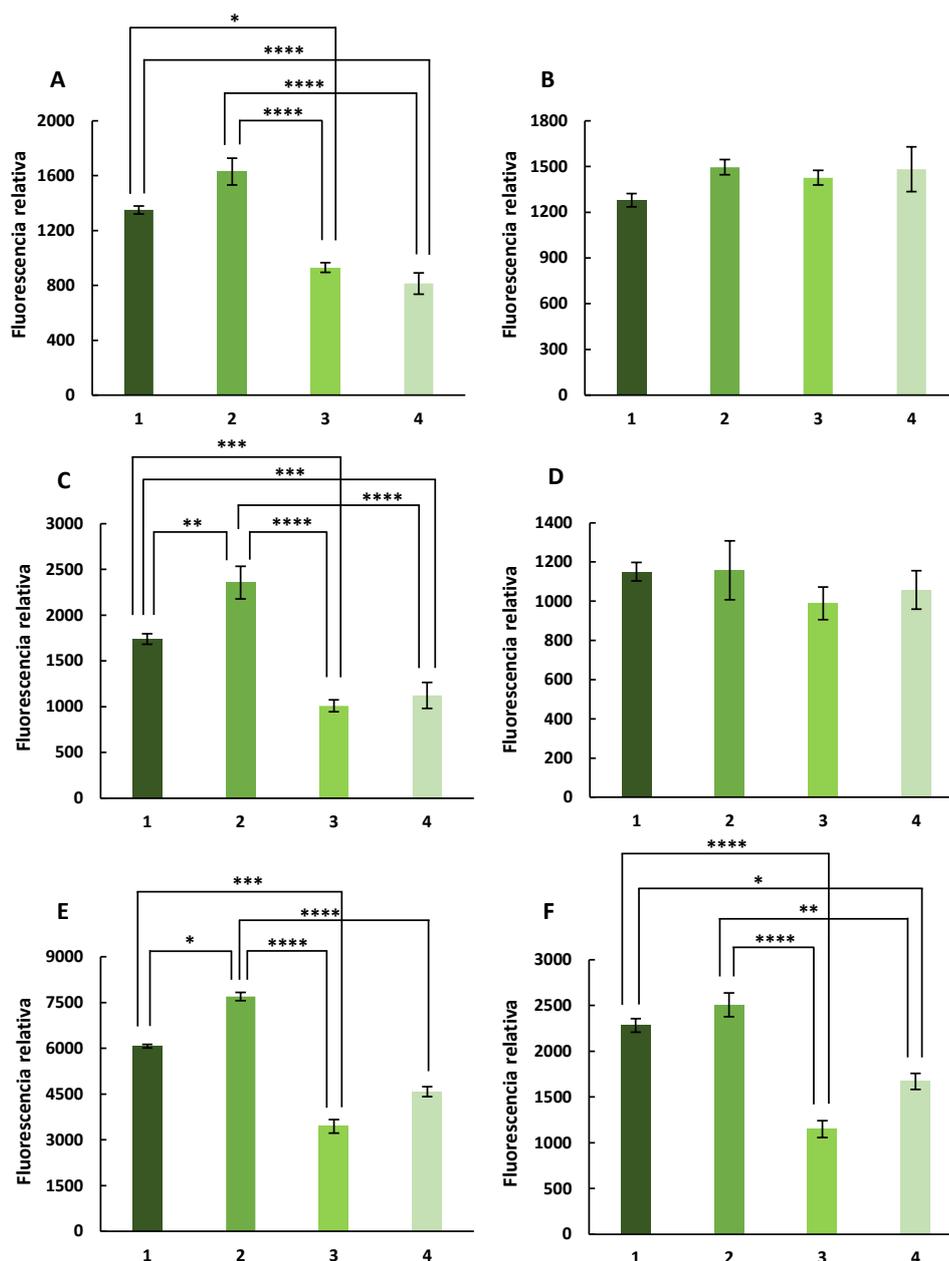


Figura 7: Intensidad de fluorescencia relativa para cada cepa creciendo en las diferentes condiciones de cultivo. *E. coli* BL21 wt (A) y cepas con deleciones ($\Delta patZ$ (B), $\Delta cobB$ (C), Δacs (D), $\Delta ackA$ (E) y Δpta (F)). TB7-glucosa (1) TB7-glicerol (2), MM9-glucosa (3) y MM9-glicerol (4). Se realizó un análisis estadístico mediante ANOVA de dos vías comparando la fluorescencia relativa entre los medios de cultivo de cada cepa (p-valor < 0,0001 (****), < 0,001 (***), < 0,01 (**), < 0,05(*)).

E. coli wt mostró mayores niveles de sobreexpresión de GFP en medio complejo que en medio mínimo (Figura 7). Sin embargo, no observamos diferencias significativas cuando comparamos entre las fuentes de carbono. Por el contrario, las cepas $\Delta cobB$ y $\Delta ackA$ mostraron diferencias significativas entre todas las condiciones de cultivo, con la mayor sobreexpresión de GFP en TB7 suplementado con glicerol. Las cepas restantes

mostraron el mismo perfil, con la mayor sobreexpresión de GFP sustentada por el medio de cultivo TB7-glicerol.

Análisis del nivel de acetilación de GFP

Para estudiar el nivel de acetilación de GFP bajo las diferentes condiciones de cultivo en *E. coli* BL21 wt y las cepas mutantes, se llevó a cabo un análisis mediante Western blot. Realizamos dos tipos de inmunoensayos con dos enfoques diferentes utilizando dos anticuerpos: el anticuerpo anti-Xpress (control de carga) y el anticuerpo anti-acetil-lisina (nivel de acetilación). Así, comparamos, en cada cepa, el nivel de acetilación de la proteína GFP purificada entre los distintos medios de cultivo. Sin embargo, no observamos diferencias significativas entre los niveles de acetilación dentro de una misma cepa (datos no mostrados). Por otro lado, realizamos una comparación, en cada medio de cultivo, de los niveles de acetilación de la GFP purificada entre las distintas cepas (Figura 8). Para evaluar las diferencias, realizamos un análisis densitométrico de los ensayos de Western blot.

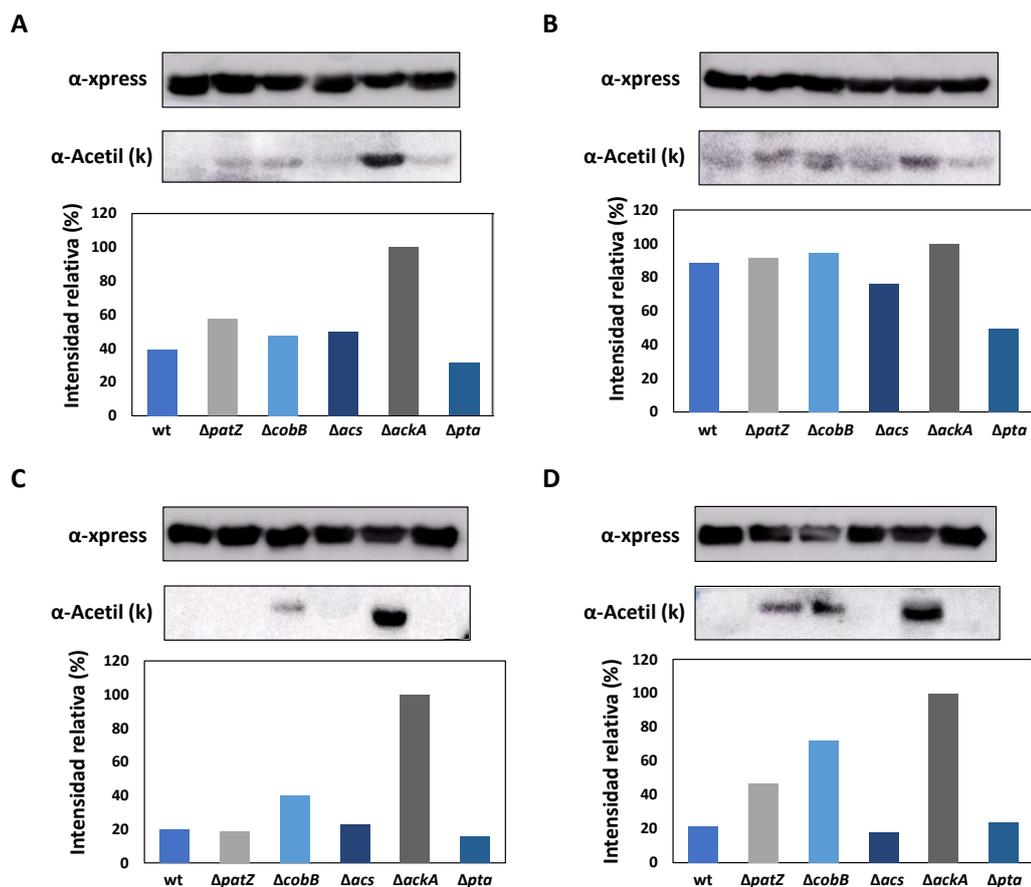


Figura 8: Western blots anti-acetil lisina y anti-Xpress. Western blots anti-acetil lisina y anti-Xpress de todas las cepas en diferentes medios de cultivo, incluyendo TB7-glucosa (A), TB7-glicerol (B), MM9-glucosa (C) y MM9-glicerol (D). Los gráficos representan la intensidad relativa de las bandas de los Western blots anti-acetil-lisina estudiados por densitometría. Las membranas de Western blot tienen el siguiente orden: wt (calle 1), $\Delta patZ$ (calle 2), $\Delta cobB$ (calle 3), Δacs (calle 4), $\Delta ackA$ (calle 5) y Δpta (calle 6).

Se detectó el mismo patrón de acetilación para todas las condiciones, correspondiendo el mayor nivel de acetilación a la cepa $\Delta ackA$. Además, se observaron menos diferencias entre los niveles de acetilación en medio complejo que en medio mínimo, y en glicerol que en glucosa. Con respecto a cada medio de cultivo, en TB7-glucosa, se observó un aumento (aproximadamente del 60%) en el nivel de acetilación de la GFP en la cepa $\Delta ackA$ con respecto a la wt. En TB7-glicerol, casi no se encontraron diferencias en el nivel de acetilación de la GFP, excepto en el caso la cepa Δpta , que mostró una disminución de 2 veces en el nivel de acetilación en comparación con la cepa wt. Por otro lado, en medio mínimo con ambas fuentes de carbono (glucosa y glicerol), la GFP mostró un perfil de acetilación similar, correspondiendo el nivel de acetilación más elevado a la GFP purificada a partir de $\Delta ackA$ (aproximadamente un 80% más que la GFP

de wt). Para estas condiciones, la GFP obtenida de $\Delta cobB$ también mostró un nivel de acetilación más elevado que la wt (Figura 8).

Al mismo tiempo, evaluamos el estado global de las proteínas purificadas a partir de todas las condiciones de cultivo en *E. coli* BL21 wt y las cepas deficientes mediante el análisis del espectro de fluorescencia de la GFP. En todas las condiciones probadas, la GFP mostró el mismo espectro de fluorescencia con una emisión máxima de fluorescencia a 509 nm, lo que podría indicar la misma conformación nativa de la GFP purificada de todos los cultivos y cepas empleados. Además, no se observó ninguna relación entre el nivel de acetilación de la lisina y la estructura terciaria nativa de la proteína.

Discusión

E. coli ha sido ampliamente utilizada como hospedador en la producción de proteínas recombinantes de interés industrial o terapéutico debido a la simplicidad y el bajo coste de su empleo, a pesar de algunas desventajas que implica su utilización [1]–[3], [46]. Entre estas desventajas destaca el metabolismo del desbordamiento de acetato, el cual es producido en cultivos de alta densidad cuando se emplea glucosa como fuente de carbono, incluso cuando el oxígeno no es limitante [5], [47]. La producción de acetato es el resultado de un desequilibrio entre las capacidades de *E. coli* para producir y asimilar acetil-CoA, el principal precursor del acetato. Por esto, el reequilibrio de los flujos de carbono de esta bacteria es clave para maximizar la producción de biomasa y macromoléculas, tales como las proteínas recombinantes.

En este estudio evaluamos los diferentes factores que son relevantes para la producción de proteínas recombinantes, como la fuente de carbono y nitrógeno empleadas y la acumulación extracelular de acetato, mediante el uso de ingeniería metabólica para eliminar los genes del metabolismo del acetato. Nuestro último fin fue seleccionar las condiciones más favorables para sobreexpresar proteínas recombinantes, empleando *E. coli* BL21 como organismo hospedador.

En los cultivos con MM9 la fuente de carbono fue consumida completamente durante la fase exponencial del crecimiento, y los cultivos alcanzaron la fase estacionaria cuando la glucosa o el glicerol se agotaron (Figuras S1 a S6 del Anexo). Sin embargo, en los cultivos en TB7 la fuente de carbono no fue consumida completamente en la fase exponencial de crecimiento. Este comportamiento había sido observado previamente por

Wolfe et al. [27], quienes sugirieron que los medios complejos basados en péptidos eran limitantes en magnesio para el crecimiento celular. En estos cultivos, cuando el acetato y la glucosa o el glicerol estaban presentes, *E. coli* BL21 y las cepas defectivas derivadas de esta, eran capaces de consumir ambas fuentes de carbono de forma simultánea [13], [48].

En cuanto a los parámetros del crecimiento, la μ_{\max} fue superior en medio complejo que en medio mínimo y en medio suplementado con glucosa que con glicerol (Tabla 1). Además, observamos una relación entre la fuente de nitrógeno empleada, la fuente de carbono y la velocidad de crecimiento, teniendo un mayor efecto la fuente de nitrógeno que la fuente de carbono. Así pues, las diferencias en los valores de μ_{\max} entre ambas fuentes de carbono fueron más pronunciadas en medio MM9 que en TB7, en un rango del 10 al 20% (Tabla 1). Este resultado indicó que la glucosa fue una mejor fuente de carbono en un medio de cultivo basado en amonio inorgánico que en uno basado en péptidos. Este hecho fue observado también por Bren et al. [20], quienes sugirieron que las células de *E. coli* crecían más lentamente en glucosa cuando se empleaba una fuente de nitrógeno basada en un solo aminoácido, debido a los elevados niveles de intermediarios del ciclo TCA y los bajos niveles de AMPc. En contraposición, la velocidad específica de consumo de sustrato se vio sustancialmente afectada tanto por la fuente de nitrógeno como de carbono, mientras que el rendimiento de biomasa se vio más afectado por la fuente de carbono, aumentando 2 veces más con la glucosa que con el glicerol, ya que la glucosa tiene mayor valor metabólico que el glicerol

Como se ha comentado, la excreción de acetato supone un gran inconveniente para los procesos biotecnológicos, pues las concentraciones de acetato por encima de 40 mM pueden afectar sustancialmente a la producción de proteínas recombinantes [49]. La producción aeróbica de acetato fue máxima en los cultivos con TB7, mientras que prácticamente no se detectó en el medio mínimo, y la concentración extracelular de acetato aumentó 1,5 veces más con glucosa que con glicerol en *E. coli* BL21 wt (Figuras 2 y 3). Este hecho puede ser explicado por el desequilibrio entre el consumo de glucosa y las demandas para la biosíntesis y la producción de energía [47]. Además, la formación de acetato durante el crecimiento rápido en medio rico se ve agravada por la elevada disponibilidad de aminoácidos libres en el medio [41]. Por otro lado, si atendemos a las cepas mutantes, la delección de *ackA* y *pta* implicó una concentración extracelular de acetato insignificante en TB7-glucosa, y una reducción de 4,5 veces en TB7-glicerol con respecto a la cepa wt. En el caso de la cepa $\Delta ackA$ tan solo se observó una reducción en la μ_{\max} con respecto a la cepa silvestre (Tabla 1 y 2; Figura 3). Otros estudios han empleado

esta estrategia para reducir el desbordamiento de acetato con resultados muy similares. Phue et al. [50] observaron una disminución de 2 veces en la acumulación de acetato y una menor reducción en los valores de μ_{\max} y $Y_{X/S}$ en una cepa doble mutante de *E. coli* Δpta - $\Delta ackA$. Asimismo, se ha mostrado el mismo perfil para esta cepa doble mutante [51] y una reducción de 14 veces en la producción de acetato para la cepa Δpta [22]. La ingeniería de las vías centrales del metabolismo del carbono es otra estrategia empleada para evitar el desbordamiento del acetato, por lo que la sobreexpresión de Mlc (regulador del sistema PTS) supuso una disminución de 2 veces en la producción de acetato, y ninguna diferencia en los valores de μ_{\max} e $Y_{X/S}$ en comparación con la cepa wt [52]. Del mismo modo, la doble delección de *pkvf* y *pkvA* (genes que codifican para la piruvato quinasa) implicó una reducción en la producción de acetato y en la μ_{\max} con respecto a la cepa silvestre [53]. Además, muchos estudios han centrado sus esfuerzos en la ingeniería de los reguladores del metabolismo central, tales como IclR y ArcA, los cuales reprimen el ciclo del glioxilato y el ciclo TCA. Así, cuando se elimina el regulador IclR se produce una reducción de dos veces en la $Y_{X/S}$ y la formación de acetato [54]. Además, la delección de estos dos reguladores, cepa $\Delta iclR$ - $\Delta arcA$, supuso una reducción en la producción de acetato del 70%, un incremento en el rendimiento en biomasa y una reducción del 38% en la μ_{\max} con respecto a la cepa wt [55]. Por último, una nueva estrategia implicó una reducción en la producción de acetato del 50 al 90% sin cambios en la μ_{\max} y la $Y_{X/S}$, mediante el aumento de la actividad respiratoria por la expresión de la hemoglobina de *Vitreoscilla stercoraria* (VHb) [15]. Por lo tanto, la reducción en la concentración de acetato observada en nuestro estudio es una de las mayores, y en la cepa $\Delta ackA$ solo fue afectada la μ_{\max} . Además, la gran producción de proteínas recombinantes soportada por esta cepa revela una pérdida de carbono despreciable (Figuras 3 y 6).

El nivel de transcripción relativa de los genes regulados por Crp-AMPc, Cra y ArcA, está relacionado con la actividad de estos factores de transcripción y con las diferencias observadas en el metabolismo cuando *E. coli* BL21 crece empleando glucosa o glicerol como fuente de carbono. En cuanto a ArcA, este regulador reprime la expresión de los genes del ciclo TCA y del ciclo del glioxilato [41], sin embargo observamos una sobreexpresión de *acnB* y *aceA* en crecimiento en glicerol (Figura 5). Durante el crecimiento rápido en glicerol, la influencia represora de ArcA sobre los genes del ciclo TCA podría ser sobrepasada por la influencia activadora de Crp-AMPc [41]. Además, Crp se activa por su unión al AMPc en ausencia de una fuente de carbono PTS, y regula positivamente la transcripción de los genes de utilización de fuentes de carbono no PTS,

de la vía glicolítica inferior, del ciclo TCA y del complejo piruvato deshidrogenasa [41], [56]. Del mismo modo Cra es reprimido por la fructosa-1,6-bisfosfato (FBP), causa una fuerte represión de la expresión de los genes de la glicolisis y el complejo de la piruvato deshidrogenasa, y activa la expresión de los genes gluconeogénicos y del ciclo del glioxilato [41], [57]. Nuestros resultados concuerdan con una mayor actividad de los reguladores Crp-AMPC y Cra en crecimiento con glicerol en comparación con el crecimiento en glucosa, ya que observamos una sobreexpresión en los genes del ciclo TCA, del metabolismo del acetato, de la utilización del glicerol, de la gluconeogénesis y del ciclo del glioxilato, mientras que los genes de la vía glicolítica y de la piruvato deshidrogenasa estaban menos expresados (Figura 5). Además, nuestros resultados indicarían que se produce un incremento en el flujo a través del ciclo TCA, el ciclo del glioxilato, el consumo de acetato y la gluconeogénesis cuando *E. coli* BL21 crece empleando glicerol como única fuente de carbono, lo que explicaría una menor pérdida de carbono y desbordamiento de acetato bajo estas condiciones. Sin embargo, bajo condiciones de crecimiento en glucosa, la formación de acetyl-CoA puede verse favorecida, y por consiguiente esto puede promover el desbordamiento del acetato. Todos estos datos mostraron la relevancia de la correcta regulación del metabolismo central del carbono, y el beneficio del empleo del glicerol como fuente de carbono, una fuente de carbono no PTS, lo que permitiría la mejor captación de carbono y una mayor eficacia en su rendimiento.

Todo lo expuesto refleja la regulación competitiva de las vías metabólicas centrales a través de los reguladores transcripcionales globales Cra, Crp y ArcA. Martínez-Gómez et al. [36] analizaron el nivel relativo de transcripción en la cepa *E. coli* K12 JM101 cultivada en glicerol con respecto a la misma cepa cultivada en glucosa. Ese estudio mostró el mismo perfil de expresión que el obtenido en nuestro estudio, aunque ambas cepas presentan diferencias en las características genotípicas y fenotípicas [58].

La producción de proteínas recombinantes fue evaluada mediante la monitorización de la fluorescencia de la proteína reportera GFP en los diferentes medios de cultivo (Figuras 6 y 7). La producción de proteína recombinante se vio incrementada en dos veces en TB7 con respecto al medio mínimo (Figura 7). La mayor producción de proteínas en TB7 puede deberse a la elevada velocidad de crecimiento y rendimiento en biomasa conseguidos en este medio (Tablas 1 y 2), ya que se ha publicado que la producción de proteínas recombinantes es mayor en los cultivos que crecen a un ritmo elevado, a pesar de las elevadas concentraciones de acetato [59]. Además, en otro trabajo donde se evaluaba la influencia de los medios ricos y definidos sobre *E. coli* BL21, se

mostró que una gran fracción de los recursos son dirigidos a la síntesis de enzimas requeridas para la producción de aminoácidos durante el crecimiento en medio definido, mientras que estos recursos pueden ser redirigidos a otras funciones en las células creciendo rápidamente en medio rico (Figura 9). En este estudio, se detectó una mayor expresión de enzimas implicadas en la síntesis y el plegamiento de proteínas en el medio rico que en el medio definido [41], lo que sugiere una posible mayor sobreexpresión de proteínas en medio TB7 que en MM9. Con respecto a la fuente de carbono, los niveles de expresión de proteínas fueron mayores cuando los cultivos se complementaron con glicerol (entre un 20 y un 30% más que en TB7-glucosa) (Figura 7), pues se vieron favorecidos por la baja producción de acetato con respecto al empleo de la glucosa (Figura 3).

La Figura 9 muestra un modelo simplificado para el metabolismo central de *E. coli* BL21 en las diferentes condiciones de crecimiento aeróbico empleadas en este estudio. El grosor de las flechas representa el flujo perteneciente a las vías en estas condiciones de crecimiento, atendiendo a los datos de qRT-PCR, q_s y las velocidades de producción/consumo de acetato (Tablas 2 y 3 y Figura 5). Nuestros resultados revelaron que el medio de crecimiento óptimo para la producción de GFP era el medio rico suplementado con glicerol utilizando *E. coli* BL21 wt (Figura 9A2). Sin embargo, el efecto de la fuente de carbono en el flujo de la producción de GFP fue menos importante que el de la fuente de nitrógeno. Además, la supresión de los distintos genes tuvo un impacto significativo en la producción de proteínas.

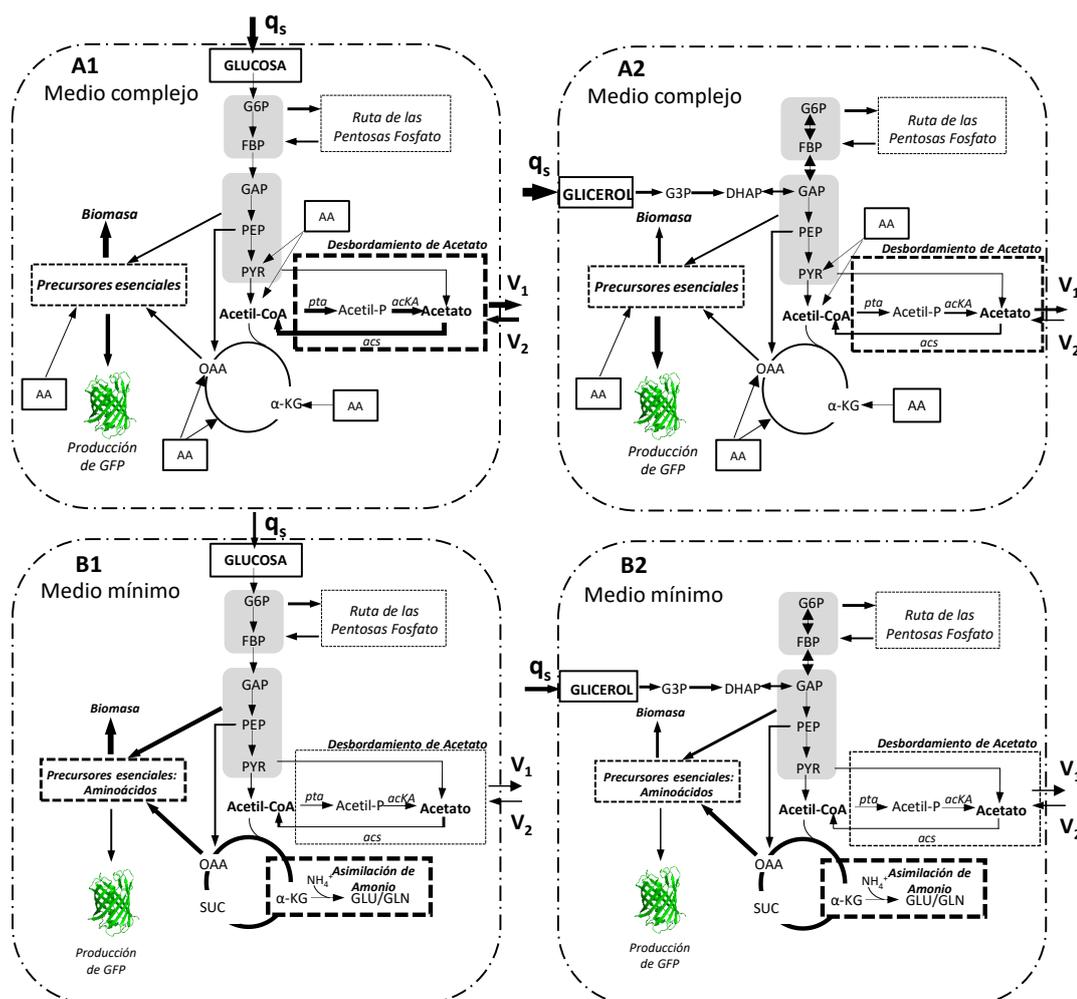


Figura 9: Rutas del metabolismo central de *E. coli* BL21 en diferentes condiciones de crecimiento aeróbico. (A) Medio rico suplementado con glucosa (A1) o glicerol (A2). (B) Medio mínimo suplementado con glucosa (B1) o glicerol (B2). El grosor de las flechas representa el flujo relativo comparando los distintos cultivos. (q_s , (Tabla 2); v_1 , velocidad de producción de acetato y v_2 , velocidad de consumo de acetato (Tabla 3)).

La cepa $\Delta patZ$ mostró un comportamiento fisiológico similar al de la cepa wt. La sobreexpresión de GFP y los niveles de acetilación no se vieron afectados por la delección de *patZ* (Tablas 1 y 2, Figuras 2-8). Estos resultados revelan que esta lisín-acetiltransferasa sólo tiene efectos menores en la acetilación global [60], pues la mayoría de la acetilación de lisinas en *E. coli* es el resultado de la acetilación no enzimática debida a la acumulación de intermediarios metabólicos, principalmente acetil-P, en condiciones que favorecen la formación de acetato [61], [62]. Además, recientemente, se han identificado 4 lisín-acetiltransferasas nuevas en *E. coli* RimI, YiaC, YjaB, y PhnO [63].

CobB es la única desacetilasa conocida de *E. coli*, aunque se ha observado que otras proteínas en *E. coli*, como Acs o Pta, pueden actuar como desacetilasas [64], [65]. En este

estudio, la delección de *cobB* exhibió una fisiología similar a la de la cepa wt (Tablas 1 y 2). Sin embargo, la cepa $\Delta cobB$ mostró una reducción de 2,5 veces con respecto a la cepa silvestre en la asimilación de acetato, y esta fue similar a la del mutante *acs* (Figura 2 y Tabla 3). En *E. coli*, la actividad de Acs está regulada por desacetilación mediada por CobB [60], [66] (Figura 1). Como resultado, la delección de la sirtuína puede provocar un incremento en el nivel de acetilación de Acs, el cual puede inducir una inhibición total o parcial de la actividad de esta enzima, y como consecuencia, un bloqueo de la incorporación del acetato por la ruta Acs, que puede ser compensado, en parte, por la vía Pta-AckA. Sin embargo, en la cepa $\Delta cobB$, la producción de GFP se vio incrementada de 1,3 a 2 veces con respecto a la cepa wt, observándose la mayor diferencia en TB7-glicerol (Figuras 6 y 7). Además de este hecho, la producción extracelular de orotato fue detectada en muy baja concentración en *E. coli* BL21 wt y las cepas defectivas en todos los medios, con excepción de la cepa $\Delta cobB$. Este mutante mostró concentraciones entre 0,12 y 0,72 mM, muy por encima del umbral de 0,05 mM obtenido en el resto de las cepas, aunque esta concentración de orotato extracelular no implicaría una elevada pérdida de carbono, y por lo tanto una inhibición del crecimiento celular. Este metabolito permite la interconexión entre 3 vías: la biosíntesis de pirimidinas *de novo*, la asimilación de amonio y el ciclo TCA a través del α -KG (Figura 10). Se ha demostrado que CobB controla la actividad de la isocitrato liasa [60], y por tanto, el flujo a través del ciclo del glioxilato podría verse disminuido por el incremento de acetilación en el mutante $\Delta cobB$. Bajo estas condiciones, se produciría un incremento del flujo hacia el ciclo TCA, el cual resulta a su vez en un aumento de la concentración de α -KG, y finalmente, en un aumento del flujo a través de la ruta de biosíntesis de pirimidinas y una mayor concentración de orotato. Tampoco se puede descartar que la ruta de biosíntesis de pirimidinas *de novo* se encuentre regulada por acetilación de lisinas en alguna de sus enzimas. Además, se ha observado que las enzimas del ciclo del glioxilato son menos abundantes en la cepa $\Delta cobB$ [60], [67]. De hecho, el nodo del isocitrato es crítico en el control de la proporción de carbono destinado al crecimiento celular y a la producción de energía, lo que podría tener un impacto en la producción de proteínas. Todas estas observaciones se vieron agravadas además por la disponibilidad de aminoácidos libres (Figura 10). Sin embargo, los elevados valores de expresión de GFP en esta cepa podrían deberse a la importancia de la acetilación de lisinas como modificación que puede regular la actividad de algunas proteínas implicadas en el proceso de transcripción de los genes. Por lo tanto, el incremento de acetilación debe desencadenar un aumento en la producción de proteínas, pues se ha informado de que los sitios de acetilación regulados por CobB están

relacionados con la transcripción, la traducción y la unión al ADN [61]. En concordancia con nuestros resultados, un estudio publicado recientemente sugirió que *E. coli* $\Delta cobB$ puede producir mayores niveles de proteína recombinante, pues hace frente al estrés celular derivado de la producción de proteínas recombinantes mejor que la cepa wt [28]. Además, los niveles de acetilación de la proteína GFP observados en la cepa $\Delta cobB$ fueron similares a los de la cepa silvestre en medios complejos, pero fueron mayores en medio mínimo. Estos resultados sugieren un rol más relevante de esta desacetilasa en medio definido, lo que podría deberse a un mayor control sobre el metabolismo del acetato y la acetilación no enzimática bajo estas condiciones [68]. En la Figura 10 se muestra un modelo simplificado del metabolismo central de la cepa $\Delta cobB$.

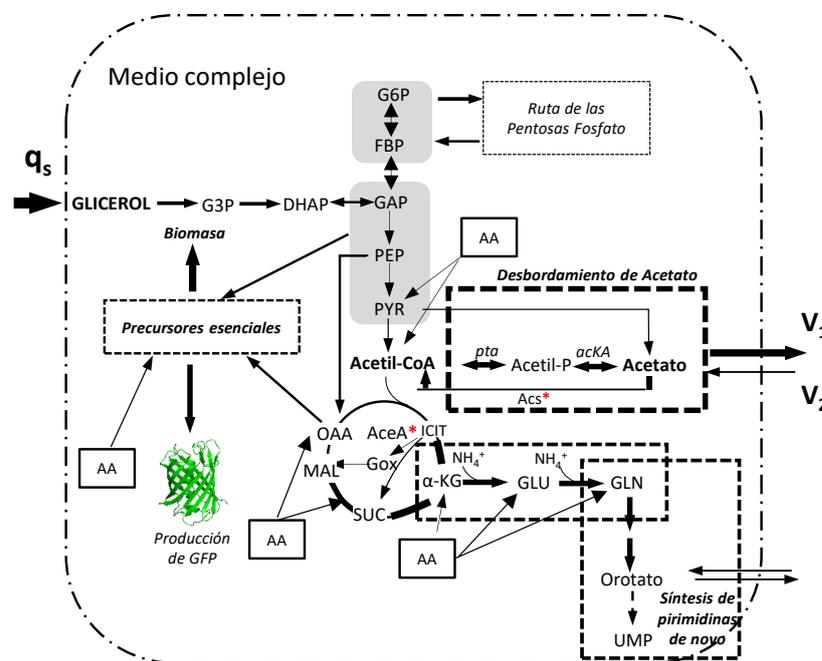


Figura 10: Modelo simplificado de la red metabólica central de *E. coli* $\Delta cobB$ creciendo en medio TB7-glicerol. Los asteriscos rojos indican proteínas reguladas por acetilación. (q_s , (Tabla 2); v_1 , velocidad de producción de acetato y v_2 , velocidad de consumo de acetato (Tabla 3)).

Acs cataliza la vía de elevada afinidad de incorporación de acetato en *E. coli*. En este estudio observamos que la cepa con la delección de *acs* mostraba una expresión de GFP ligeramente inferior a la de la cepa wt en MM9, aunque estos resultados no fueron estadísticamente significativos (Figura 6). En el medio TB7, la delección de *acs* disminuyó la eficiencia de la reincorporación de acetato, pero la producción de GFP no se vio sustancialmente afectada. Δacs mostró valores elevados de μ_{max} e $Y_{X/S}$, y estos valores fueron comparables a los de la cepa wt (Tablas 1 y 2). Algunos estudios realizados en *E. coli* K12 no mostraron diferencias en los valores de μ_{max} entre la cepa wt y la mutante Δacs

[54], [69], a pesar de que *acs* se expresa más en las cepas B y de que su supresión no parece tener efecto en la tasa de crecimiento. Se ha demostrado que la activación de la RCC y la represión de *acs* en *E. coli* tienen lugar simultáneamente antes del inicio del metabolismo de desbordamiento [69], y recientemente se ha observado que la vía Pta-AckA resulta ser esencial para ambas direcciones de flujo, mientras que las rutas alternativas (Acs o PoxB) no desempeñan prácticamente ningún papel cuando se consume glucosa [25]. En general, el comportamiento de la cepa Δacs fue similar al de la cepa silvestre, incluyendo el nivel de acetilación de GFP detectado en esta cepa.

Por otro lado, la delección de la vía Pta-AckA provocó las mayores diferencias con respecto a la cepa wt en todos los parámetros evaluados en este estudio. La cepa $\Delta ackA$ mostró el mayor nivel de expresión de GFP en todos los medios de crecimiento celular empleados (Figura 6), siendo la mayor diferencia de 5,5 veces superior a la cepa silvestre en MM9. Estas diferencias en expresión fueron estadísticamente significativas en todos los casos con un p-valor $< 0,0001$. La expresión de GFP en la cepa Δpta también se vio incrementada de 1,4 a 1,7 veces con respecto a la cepa wt en medio complejo (Figura 6). Estas cepas mostraron los valores más bajos de acetato extracelular (Figura 3A), lo cual era esperable, pues la delección de esta vía ha sido ampliamente empleada como mecanismo para controlar la acumulación de acetato [4], [50], [51], [54]. En TB7-glicerol el acetato extracelular detectado pudo ser formado por PoxB, mostrando una disminución de 4,5 veces en la velocidad de producción de acetato con respecto a la cepa wt que emplea la vía Pta-AckA además de la vía PoxB. De este modo, se ha demostrado que *E. coli* creciendo en glicerol puede activar algunos importantes genes gluconeogénicos [36] o del funcionamiento de vías biosintéticas en las que el acetato es un subproducto metabólico [69]. Estos mutantes mostraron una disminución de aproximadamente 2,8 veces en la velocidad de consumo de acetato a través de Acs en comparación con la cepa silvestre (Tabla 3). El papel esencial que desempeñan estas enzimas en el desbordamiento del metabolismo del acetato de *E. coli* quedó demostrado por las grandes diferencias observadas en la velocidad de crecimiento [22], [50], [51] (Tabla 1). Las delecciones de *pta* y *ackA* limitaron la velocidad específica de consumo de fuente de carbono, y la fuente de carbono no fue consumida completamente durante la fase exponencial de crecimiento en los cultivos con medio complejo, concretamente cuando el medio fue suplementado con glucosa (Figuras S5 y S6 del Anexo). Sin embargo, los valores de $Y_{x/s}$ en la cepa $\Delta ackA$ fueron mayores que para la cepa wt en todas las condiciones de cultivo excepto en MM9-glicerol, mientras que en el mutante *pta*, el

rendimiento en biomasa fue menor que en la cepa silvestre (Tabla 2). Estos mutantes también aumentaron aproximadamente 2 h el tiempo de adaptación para crecer en todos los medios en comparación con la cepa parental, disminuyeron la producción de acetato, y la cepa $\Delta ackA$ pudo acumular acetyl-P, que es un compuesto de alta energía que actúa como donante de fosforilo. Estos resultados indicaron que, aunque la cepa $\Delta ackA$ presentaba dificultades para crecer en medios basados en péptidos, mostraba una adecuada distribución de flujos con una pérdida insignificante de carbono a favor de la máxima producción de proteínas (Figuras 4 y 11).

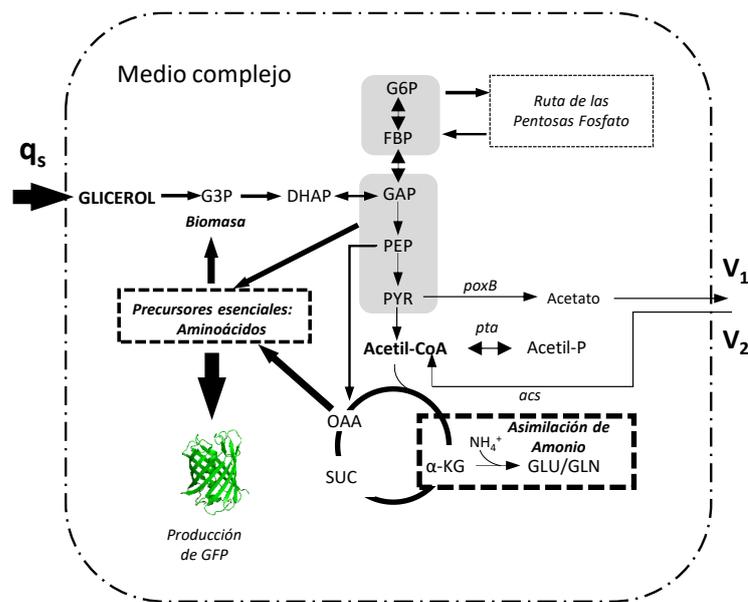


Figura11: Modelo simplificado de la red metabólica central de la cepa *E. coli* $\Delta ackA$ creciendo en TB7-glicerol. (q_s , (Tabla 2); v_1 , velocidad de producción de acetato y v_2 , velocidad de consumo de acetato (Tabla 3)).

Dos trabajos previos han mejorado la producción de proteínas recombinantes mediante la delección de los genes *pta* y *ackA*. Así, en 2003, Kim et al. emplearon una estrategia basada en el empleo del ARN antisentido para bloquear la síntesis de Pta y AckA, con la que obtuvieron un aumento de 1,6 a 2 veces en la producción de GFP con respecto a la cepa wt [70]. En otro estudio, una cepa doble mutante $\Delta pta-ackA$ produjo un incremento de 1,56 veces en la producción de proteína recombinante con respecto a la cepa silvestre [71]. Nuestros datos mostraron los mayores niveles de sobreexpresión reportados hasta la fecha, obteniendo un incremento de 3,9 a 5 veces con respecto a la cepa silvestre empleando la cepa $\Delta ackA$ (Figura 6).

Por otro lado, en todos los tipos de medio de cultivo empleados el mayor nivel de acetilación se corresponde con la GFP purificada de la cepa $\Delta ackA$ (Figura 8). Este elevado

nivel de acetilación puede ser debido a la acumulación de acetil-P (Figura 1), el cual actúa como dador de grupos acetilo en la acetilación no enzimática. Por el contrario, los niveles de acetilación más bajos fueron observados para la GFP purificada de la cepa Δpta . Este bajo nivel de acetilación puede ser explicado por el bloqueo de la producción de acetil-P en este mutante (Figura 1). Estos dos patrones de acetilación han sido observados previamente [61], [62]. Como se ha comentado, la acumulación de acetil-P favorece la acetilación no enzimática, que puede afectar a la regulación de los procesos metabólicos. Por lo tanto, es un aspecto a tener en cuenta cuando este mutante se emplea para la producción de proteínas. Además, la GFP purificada a partir de la cepa $\Delta ackA$ mostró la misma conformación nativa que la GFP purificada a partir del resto de las condiciones ensayadas, sin que se observara una relación entre el nivel de acetilación de la lisina y la conformación nativa de la proteína.

En resumen, el objetivo de este estudio fue mejorar el rendimiento de la producción de proteínas recombinantes mediante un bioproceso basado en el metabolismo de *E. coli* BL21, abordando diferentes estrategias simultáneamente. Así, el uso de diversas fuentes de carbono y nitrógeno y de cepas defectivas del metabolismo del acetato puede redirigir los flujos de carbono a diferentes vías y afectar al rendimiento final del bioproceso. Concluimos que el uso del medio complejo TB7 y del glicerol como fuente de carbono implica un aumento de la producción de proteínas utilizando *E. coli* BL21 wt o sus derivados mutantes. Además, el empleo de la cepa *E. coli* $\Delta ackA$ produjo un aumento, de hasta 5 veces, en la producción de proteínas con respecto a la cepa wt, y mostró una adecuada distribución de flujos, ya que se detectó una insignificante concentración de acetato extracelular, lo que aumenta la eficacia en el rendimiento del metabolismo del carbono. Por último, hay que tener en cuenta el nivel de acetilación de la proteína producida, que se ve alterado por el medio de cultivo y los flujos metabólicos.

Referencias

- [1] Z. D. Blount, "The unexhausted potential of *E. coli*," *Elife*, vol. 4, pp. 1–12, 2015, doi: 10.7554/eLife.05826.
- [2] M. Kamionka, "Engineering of Therapeutic Proteins Production in *Escherichia coli*," *Curr. Pharm. Biotechnol.*, vol. 12, no. 2, pp. 268–274, 2011, doi: 10.2174/138920111794295693.
- [3] C. J. Huang, H. Lin, and X. Yang, "Industrial production of recombinant therapeutics in *Escherichia coli* and its recent advancements," *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 39, no. 3, pp. 383–399, 2012, doi: 10.1007/s10295-011-1082-9.
- [4] M. De Mey, S. De Maeseneire, W. Soetaert, and E. Vandamme, "Minimizing acetate formation in *E. coli* fermentations," *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 34, no. 11, pp. 689–700, 2007, doi: 10.1007/s10295-007-0244-2.
- [5] V. Bernal, S. Castaño-Cerezo, and M. Cánovas, "Acetate metabolism regulation in *Escherichia coli*: carbon overflow, pathogenicity, and beyond," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 100, no. 21, pp. 8985–9001, 2016, doi: 10.1007/s00253-016-7832-x.
- [6] A. A. Aristidou, K. Y. San, and G. N. Bennett, "Improvement of Biomass Yield and Recombinant Gene Expression in *Escherichia coli* by Using Fructose as the Primary Carbon Source," *Biotechnol. Prog.*, vol. 15, no. 1, pp. 140–145, Feb. 1999, doi: 10.1021/bp980115v.
- [7] M. Kesson, P. Hagander, and J. P. Axelsson, "Avoiding acetate accumulation in *Escherichia coli* cultures using feedback control of glucose feeding," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 73, no. 3, pp. 223–230, 2001, doi: 10.1002/bit.1054.
- [8] C. H. Chou, G. N. Bennett, and K. Y. San, "Effect of Modulated Glucose Uptake on High-Level Recombinant Protein Production in a Dense *Escherichia coli* Culture," *Biotechnol. Prog.*, vol. 10, no. 6, pp. 644–647, Nov. 1994, doi: 10.1021/bp00030a009.
- [9] M. A. Eiteman and E. Altman, "Overcoming acetate in *Escherichia coli* recombinant protein fermentations," *Trends Biotechnol.*, vol. 24, no. 11, pp. 530–536, Nov. 2006, doi: 10.1016/j.tibtech.2006.09.001.
- [10] W. R. Farmer and J. C. Liao, "Reduction of aerobic acetate production by *Escherichia coli*," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 63, no. 8, pp. 3205–3210, 1997.
- [11] H. Waegeman, S. De Lausnay, J. Beauprez, J. Maertens, M. De Mey, and W. Soetaert, "Increasing recombinant protein production in *Escherichia coli* K12 through metabolic engineering," *N. Biotechnol.*, vol. 30, no. 2, pp. 255–261, 2013, doi: 10.1016/j.nbt.2011.11.008.
- [12] A. Negrete and J. Shiloach, "Constitutive expression of the sRNA GadY decreases acetate production and improves *E. coli* growth," *Microb. Cell Fact.*, vol. 14, no. 148, pp. 1–10, 2015, doi: 10.1186/s12934-015-0334-1.
- [13] S. Castaño-Cerezo, V. Bernal, T. Röhrig, S. Termeer, and M. Cánovas, "Regulation of acetate metabolism in *Escherichia coli* BL21 by protein Ne-lysine acetylation," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 99, no. 8, pp. 3533–3545, 2015, doi: 10.1007/s00253-014-6280-8.

- [14] A. Negrete, N. Majdalani, J. N. Phue, and J. Shiloach, "Reducing acetate excretion from *E. coli* K-12 by over-expressing the small RNA *sgrS*," *N. Biotechnol.*, vol. 30, no. 2, pp. 269–273, 2013, doi: 10.1016/j.nbt.2011.11.007.
- [15] T. E. Pablos, J. C. Sigala, S. Le Borgne, and A. R. Lara, "Aerobic expression of *Vitreoscilla* hemoglobin efficiently reduces overflow metabolism in *Escherichia coli*," *Biotechnol. J.*, vol. 9, no. 6, pp. 791–799, 2014, doi: 10.1002/biot.201300388.
- [16] F. W. Studier, P. Daegelen, R. E. Lenski, S. Maslov, and J. F. Kim, "Understanding the Differences between Genome Sequences of *Escherichia coli* B Strains REL606 and BL21(DE3) and Comparison of the *E. coli* B and K-12 Genomes," *J. Mol. Biol.*, vol. 394, no. 4, pp. 653–680, 2009, doi: 10.1016/j.jmb.2009.09.021.
- [17] J. M. Clomburg and R. Gonzalez, "Anaerobic fermentation of glycerol: A platform for renewable fuels and chemicals," *Trends Biotechnol.*, vol. 31, no. 1, pp. 20–28, 2013, doi: 10.1016/j.tibtech.2012.10.006.
- [18] L. Reitzer, "Nitrogen Assimilation and Global Regulation in *Escherichia coli*," *Annu. Rev. Microbiol.*, vol. 57, pp. 155–176, 2003, doi: 10.1146/annurev.micro.57.030502.090820.
- [19] F. M. Commichau, K. Forchhammer, and J. Stülke, "Regulatory links between carbon and nitrogen metabolism," *Curr. Opin. Microbiol.*, vol. 9, no. 2, pp. 167–172, 2006, doi: 10.1016/j.mib.2006.01.001.
- [20] A. Bren, J. O. Park, B. D. Towbin, E. Dekel, J. D. Rabinowitz, and U. Alon, "Glucose becomes one of the worst carbon sources for *E. coli* on poor nitrogen sources due to suboptimal levels of cAMP," *Sci. Rep.*, vol. 6, no. 24834, pp. 1–10, 2016, doi: 10.1038/srep24834.
- [21] H. Kakuda, K. Hosono, K. Shiroishi, and S. Ichihara, "Identification and Characterization of the *ackA* (Acetate Kinase A)-*pta* (Phosphotransacetylase) Operon and Complementation Analysis of Acetate Utilization by an *ackA-pta* Deletion Mutant of *Escherichia coli*," *J. Biochem.*, vol. 116, no. 4, pp. 916–922, 1994, doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a124616.
- [22] S. Castaño-Cerezo, S. Renilla, V. Bernal, and M. Cánovas, "An insight into the role of phosphotransacetylase (*pta*) and the acetate/acetyl-CoA node in *Escherichia coli*," *Microb. Cell Fact.*, vol. 8, no. 54, pp. 1–19, 2009, doi: 10.1186/1475-2859-8-54.
- [23] V. J. Starai and J. C. Escalante-Semerena, "Acetyl-coenzyme A synthetase (AMP forming)," *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 61, no. 16, pp. 2020–2030, 2004, doi: 10.1007/s00018-004-3448-x.
- [24] S. Kumari, R. Tishel, M. Eisenbach, and A. J. Wolfe, "Cloning, Characterization, and Functional Expression of *acs*, the Gene Which Encodes Acetyl Coenzyme A Synthetase in *Escherichia coli*," *J. Bacteriol.*, vol. 177, no. 10, pp. 2878–2886, 1995, doi: 10.1128/jb.177.10.2878-2886.1995.
- [25] B. Enjalbert, P. Millard, M. Dinclaux, J.-C. Portais, and F. Létisse, "Acetate fluxes in *Escherichia coli* are determined by the thermodynamic control of the Pta-AckA pathway," *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 42135, pp. 1–11, 2017, doi: 10.1038/srep42135.
- [26] B. Schilling *et al.*, "Protein acetylation dynamics in response to carbon overflow in *Escherichia coli*," *Mol. Microbiol.*, vol. 98, no. 5, pp. 847–863, 2015, doi:

10.1111/mmi.13161.

- [27] D. G. Christensen, J. S. Orr, C. V. Rao, and J. Wolfe, "Increasing Growth Yield and Decreasing Acetylation in *Escherichia coli* by Optimizing the Carbon-to-Magnesium Ratio in Peptide-Based Media," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 83, no. 6, pp. 1–13, 2017.
- [28] D. Kuczyńska-Wiśnik, M. Moruno-Algara, K. Stojowska-Swędryńska, and E. Laskowska, "The effect of protein acetylation on the formation and processing of inclusion bodies and endogenous protein aggregates in *Escherichia coli* cells," *Microb. Cell Fact.*, vol. 15, no. 189, pp. 1–10, 2016, doi: 10.1186/s12934-016-0590-8.
- [29] L. Xie *et al.*, "Proteome-wide lysine acetylation profiling of the human pathogen *Mycobacterium tuberculosis*," *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 59, pp. 193–202, 2015, doi: 10.1016/j.biocel.2014.11.010.
- [30] S. Zhao *et al.*, "Regulation of Cellular Metabolism by Protein Lysine Acetylation," *Science (80-.)*, vol. 327, no. 5968, pp. 1000–1004, 2010, doi: 10.1126/science.1179689.
- [31] V. Bernal *et al.*, "Regulation of bacterial physiology by lysine acetylation of proteins," *N. Biotechnol.*, vol. 31, no. 6, pp. 586–595, 2014, doi: 10.1016/j.nbt.2014.03.002.
- [32] T. De Diego Puente *et al.*, "The protein acetyltransferase PatZ from *Escherichia coli* is regulated by autoacetylation-induced oligomerization," *J. Biol. Chem.*, vol. 290, no. 38, pp. 23077–23093, 2015, doi: 10.1074/jbc.M115.649806.
- [33] J. Gallego-Jara, A. Écija Conesa, T. de Diego Puente, G. Lozano Terol, and M. Cánovas Díaz, "Characterization of CobB kinetics and inhibition by nicotinamide," *PLoS One*, vol. 12, no. 12, pp. 1–19, 2017, doi: 10.1371/journal.pone.0189689.
- [34] K. A. Datsenko and B. L. Wanner, "One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 97, no. 12, pp. 6640–6645, 2000, doi: 10.1073/pnas.120163297.
- [35] U. Sauer *et al.*, "Metabolic Flux Ratio Analysis of Genetic and Environmental Modulations of *Escherichia coli* Central Carbon Metabolism," *J. Bacteriol.*, vol. 181, no. 21, pp. 6679–6688, 1999, doi: 10.1128/JB.181.21.6679-6688.1999.
- [36] K. Martínez-Gómez *et al.*, "New insights into *Escherichia coli* metabolism: carbon scavenging, acetate metabolism and carbon recycling responses during growth on glycerol," *Microb. Cell Fact.*, vol. 11, no. 46, pp. 1–21, 2012, doi: 10.1186/1475-2859-11-46.
- [37] G. Lorenz Miller, "Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar.," *Anal. Chem.*, vol. 31, no. 3, pp. 426–428, 1959.
- [38] K. J. Livak and T. D. Schmittgen, "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method," *Methods*, vol. 25, no. 4, pp. 402–408, 2001, doi: 10.1006/meth.2001.1262.
- [39] K. Valgepea, K. Adamberg, and R. Vilu, "Decrease of energy spilling in *Escherichia coli* continuous cultures with rising specific growth rate and carbon wasting," *BMC Syst. Biol.*, vol. 5, no. 1, pp. 1–11, 2011, doi: 10.1186/1752-0509-5-106.

- [40] C. D. Herring *et al.*, “Comparative genome sequencing of *Escherichia coli* allows observation of bacterial evolution on a laboratory timescale,” *Nat. Genet.*, vol. 38, no. 12, pp. 1406–1412, 2006, doi: 10.1038/ng1906.
- [41] Z. Li, M. Nimtz, and U. Rinas, “The metabolic potential of *Escherichia coli* BL21 in defined and rich medium,” *Microb. Cell Fact.*, vol. 13, no. 45, pp. 1–17, 2014.
- [42] Y. J. Son, J. N. Phue, L. B. Trinh, S. J. Lee, and J. Shiloach, “The role of Cra in regulating acetate excretion and osmotic tolerance in *E. coli* K-12 and *E. coli* B at high density growth,” *Microb. Cell Fact.*, vol. 10, no. 52, pp. 1–9, 2011, doi: 10.1186/1475-2859-10-52.
- [43] Z. Zhang, G. Gosset, R. Barabote, C. S. Gonzalez, W. A. Cuevas, and M. H. Saier, “Functional interactions between the carbon and iron utilization regulators, Crp and Fur, in *Escherichia coli*,” *J. Bacteriol.*, vol. 187, no. 3, pp. 980–990, 2005, doi: 10.1128/JB.187.3.980-990.2005.
- [44] C. W. Cody, D. C. Prasher, W. M. Westler, F. G. Prendergast, and W. W. Ward, “Chemical Structure of the Hexapeptide Chromophore of the *Aequorea* Green-Fluorescent Protein,” *Biochemistry*, vol. 32, no. 5, pp. 1212–1218, 1993, doi: 10.1021/bi00056a003.
- [45] G. S. Waldo, B. M. Standish, J. Berendzen, and T. C. Terwilliger, “Rapid protein-folding assay using green fluorescent protein,” *Nat. Biotechnol.*, vol. 17, no. 7, pp. 691–695, 1999, doi: 10.1038/10904.
- [46] J. A. Glaser, “White Biotechnology,” *EMBO Rep.*, vol. 4, no. 9, pp. 835–837, 2005, doi: 10.1007/s10098-005-0018-3.
- [47] A. J. Wolfe, “The Acetate Switch,” *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 69, no. 1, pp. 12–50, 2005, doi: 10.1128/MMBR.69.1.12.
- [48] H. Waegeman, J. Maertens, • Joeri Beauprez, M. De Mey, and W. Soetaert, “Effect of *iclR* and *arcA* deletions on physiology and metabolic fluxes in *Escherichia coli* BL21 (DE3),” *Biotechnol Lett*, vol. 34, no. 2, pp. 329–337, 2012, doi: 10.1007/s10529-011-0774-6.
- [49] J. N. Phue, S. B. Noronha, R. Hattacharyya, A. J. Wolfe, and J. Shiloach, “Glucose metabolism at high density growth of *E. coli* B and *E. coli* K: Differences in metabolic pathways are responsible for efficient glucose utilization in *E. coli* B as determined by microarrays and Northern blot analyses,” *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 90, no. 7, pp. 805–820, 2005, doi: 10.1002/bit.20478.
- [50] J. N. Phue, S. J. Lee, J. B. Kaufman, A. Negrete, and J. Shiloach, “Acetate accumulation through alternative metabolic pathways in *ackA-pta-poxB*-triple mutant in *E. coli* B (BL21),” *Biotechnol. Lett.*, vol. 32, no. 12, pp. 1897–1903, 2010, doi: 10.1007/s10529-010-0369-7.
- [51] C. R. Dittrich, G. N. Bennett, and K. Y. San, “Characterization of the acetate-producing pathways in *Escherichia coli*,” *Biotechnol. Prog.*, vol. 21, no. 4, pp. 1062–1067, 2005, doi: 10.1021/bp050073s.
- [52] S. Cho, D. Shin, E. J. Geun, S. Heu, and S. Ryu, “High-level recombinant protein production by overexpression of Mlc in *Escherichia coli*,” *J. Biotechnol.*, vol. 119, no. 2, pp. 197–203, 2005, doi: 10.1016/j.jbiotec.2005.03.008.
- [53] G. A. L. Gonçalves, D. M. F. Prazeres, G. A. Monteiro, and K. L. J. Prather, “De novo

- creation of MG1655-derived *E. coli* strains specifically designed for plasmid DNA production," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 97, no. 2, pp. 611–620, 2013, doi: 10.1007/s00253-012-4308-5.
- [54] J. Contiero, C. Beatty, S. Kumari, C. L. DeSanti, W. R. Strohl, and A. Wolfe, "Effects of mutations in acetate metabolism on high-cell-density growth of *Escherichia coli*," *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 24, no. 6, pp. 421–430, 2000, doi: 10.1038/sj.jim.7000014.
- [55] H. Waegeman *et al.*, "Effect of *iclR* and *arcA* knockouts on biomass formation and metabolic fluxes in *Escherichia coli* K12 and its implications on understanding the metabolism of *Escherichia coli* BL21 (DE3)," *BMC Microbiol.*, vol. 11, no. 70, pp. 1–17, 2011, doi: 10.1186/1471-2180-11-70.
- [56] B. Görke and J. Stülke, "Carbon catabolite repression in bacteria: Many ways to make the most out of nutrients," *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 6, no. 8, pp. 613–624, 2008, doi: 10.1038/nrmicro1932.
- [57] D. Sarkar, K. A. Z. Siddiquee, M. J. Araúzo-Bravo, T. Oba, and K. Shimizu, "Effect of *cra* gene knockout together with *edd* and *iclR* genes knockout on the metabolism in *Escherichia coli*," *Arch. Microbiol.*, vol. 190, no. 5, pp. 559–571, 2008, doi: 10.1007/s00203-008-0406-2.
- [58] M. J. Han, "Exploring the proteomic characteristics of the *Escherichia coli* B and K-12 strains in different cellular compartments," *J. Biosci. Bioeng.*, vol. 122, no. 1, pp. 1–9, 2016, doi: 10.1016/j.jbiosc.2015.12.005.
- [59] A. M. Sandén *et al.*, "Limiting factors in *Escherichia coli* fed-batch production of recombinant proteins," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 81, no. 2, pp. 158–166, 2003, doi: 10.1002/bit.10457.
- [60] S. Castaño-Cerezo *et al.*, "Protein acetylation affects acetate metabolism, motility and acid stress response in *Escherichia coli*," *Mol. Syst. Biol.*, vol. 10, no. 762, pp. 1–15, 2014, doi: 10.15252/msb.20145227.
- [61] B. Weinert *et al.*, "Acetyl-Phosphate is a critical determinant of Lysine Acetylation in *E.coli*," *Mol. Cell*, vol. 51, no. 2, pp. 265–272, 2013, doi: 10.1016/j.molcel.2013.06.003.
- [62] M. L. Kuhn *et al.*, "Structural, kinetic and proteomic characterization of acetyl phosphate-dependent bacterial protein acetylation," *PLoS One*, vol. 9, no. 4, pp. 1–26, 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0094816.
- [63] D. G. Christensen *et al.*, "Identification of Novel Protein Lysine Acetyltransferases in *Escherichia coli*," *MBio*, vol. 9, no. 5, pp. 1–23, 2018, doi: 10.1128/mBio.
- [64] S. Baron and M. Eisenbach, "CheY acetylation is required for ordinary adaptation time in *Escherichia coli* chemotaxis," *FEBS Lett.*, vol. 591, no. 13, pp. 1958–1965, 2017, doi: 10.1002/1873-3468.12699.
- [65] R. Barak, K. Prasad, A. Shainskaya, A. J. Wolfe, and M. Eisenbach, "Acetylation of the Chemotaxis Response Regulator CheY by Acetyl-CoA Synthetase Purified from *Escherichia coli*," *J. Mol. Biol.*, vol. 342, no. 2, pp. 383–401, 2004, doi: 10.1016/j.jmb.2004.07.020.
- [66] V. J. Starai, I. Celic, R. N. Cole, J. D. Boeke, and J. C. Escalante-Semerena, "Sir2-Dependent Activation of Acetyl-CoA Synthetase by Deacetylation of Active Lysine,"

- Science* (80-), vol. 298, no. 5602, pp. 2390–2392, Dec. 2002, doi: 10.1126/science.1077650.
- [67] X. He, S. Tao, H. Jiang, C. Liu, F. Wu, and S. Guo, “Global identification of CobB interactors by an *Escherichia coli* proteome microarray,” *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*, vol. 46, no. 7, pp. 548–555, 2014, doi: 10.1093/abbs/gmu038.
- [68] A. J. Wolfe, “Bacterial protein acetylation: new discoveries unanswered questions,” *Curr. Genet.*, vol. 62, no. 2, pp. 335–341, 2016, doi: 10.1007/s00294-015-0552-4.
- [69] K. Valgepea, K. Adamberg, R. Nahku, P.-J. Lahtvee, L. Arike, and R. Vilu, “Systems biology approach reveals that overflow metabolism of acetate in *Escherichia coli* is triggered by carbon catabolite repression of acetyl-CoA synthetase.,” *BMC Syst. Biol.*, vol. 4, no. 166, pp. 1–13, 2010, doi: 10.1186/1752-0509-4-166.
- [70] J. Y. H. Kim and H. J. Cha, “Down-regulation of acetate pathway through antisense strategy in *Escherichia coli*: Improved foreign protein production,” *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 83, no. 7, pp. 841–853, 2003, doi: 10.1002/bit.10735.
- [71] T. S. Kim *et al.*, “Reduction of acetate and lactate contributed to enhancement of a recombinant protein production in *E. coli* BL21,” *J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 25, no. 7, pp. 1093–1100, 2015, doi: 10.4014/jmb.1503.03023.

Anexo

Tabla S1: lista de plásmidos empleados en este estudio.

Plásmido	Descripción	Fuente
pKD13	Amp ^R /Kam ^R , casete de resistencia flanqueado por regiones FRT	Yale <i>E. coli</i> Genetic Stock Center
pRSETA-GFP	Amp ^R , pRSETA con el gen que codifica para la GFP. Promotor T7	Invitrogen
pKD46	Amp ^R . Este plásmido es sensible a la temperatura de replicación a 30°C y expresa de la recombinasa Red del fago lambda inducible por la arabinosa	Yale <i>E. coli</i> Genetic Stock Center

Table S2: Cebadores empleados en este estudio.

Cebadores	Secuencia 5' → 3'
Cebadores usados para la construcción de las cepas mutantes	
<i>patZ</i> KO Fwd	GTTAGAAAGCGTTTAAAATCATTCCGGTCACTTCTGCGGGAGACCGGTAT GATTCCGGGGATCCGTCGACC
<i>patZ</i> KO Rev	TTAAGTGGTCAACATTTCCAGTACCTTACTCATGATTCTCGCGCTGG GCTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG
<i>cobB</i> KO Fwd	GTGGTGCGGCCTTCTACATCTAACCGATTAACAACAGAGGTTGCTAT GATTCCGGGGATCCGTCGACC
<i>cobB</i> KO Rev	CCCCTTGCAGGCCTGATAAGCGTAGTGCATCAGGCAATGCTTCCCGCTT TTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG
<i>acs</i> KO Fwd	AACGCTTATGCCACATATTATTAACATCCTACAAGGAGAACAAAAGCAT GATTCCGGGGATCCGTCGACC
<i>acs</i> KO Rev	GTTACCGACTCGCATCCGGCAATTGTGGGTTACGATGGCATCGCGATA GCTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG
<i>ackA</i> KO Fwd	TGGCTCCCTGACGTTTTTTTAGCCACGTATCAATTATAGGTACTTCCATG ATTCCGGGGATCCGTCGACC
<i>ackA</i> KO Rev	GCACCGCCAGCTGAGCTGGCGGTGTGAAATCAGGCAGTCAGGCGGCT CGCTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG
<i>pta</i> KO Fwd	GCTGTTTTGTAACCCGCCAAATCGGCGGTAACGAAAGAGGATAAACCG TGATTCCGGGGATCCGTCGACC
<i>pta</i> KO Rev	GCAGCGCAAAGCTGCGGATGATGACGAGATTACTGCTGTGTCAGAC TGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG
<i>patZ</i> Check Fwd	GCTATCTGGCAGGAAAAACG
<i>patZ</i> Check Rev	GCAGACGACATAAGCGGGCA
<i>cobB</i> Check Fwd	TGTTCCGCGCATTGAACGC
<i>cobB</i> Check Rev	AACGCCTTATCCGGCCAC
<i>acs</i> Check Fwd	GCGTGATCTGTGCCCAAAT

Tabla S2: (Continuación)

Cebadores	Secuencia 5' → 3'
Cebadores usados para la construcción de las cepas mutantes	
<i>acs</i> Check Rev	AATGCCTGATGCGACGCTGT
<i>ackA</i> Check Fwd	GCAGTGCATGATGTTAATC
<i>ackA</i> Check Rev	TTATCCTCTTTCGTTACCG
<i>pta</i> Check Fwd	AACGAAGAAGTGGTTATCGC
<i>pta</i> Check Rev	AGTGATTATTTCCGGTTCAG
K1	CAGTCATAGCCGAATAGCCT
K2	CGGTGCCCTGAATGAACTGC
Cebadores usados para el ensayo qRT-PCR	
<i>acs</i> Fwd	ACACACCATTCTGCCAACA
<i>acs</i> Rev	TGTTGATACATCGCTCGTACTG
<i>aceA</i> Fwd	TGCACGGTGAGTCGAAAAAA
<i>aceA</i> Rev	TAGACTGCTTCAATACCCGCTTT
<i>ppsA</i> Fwd	CCTCCCTGGGTGAAATGATTA
<i>ppsA</i> Rev	GGCGGTTGTGGCGAAA
<i>glpK</i> Fwd	GTGGCGCAGTAGCAAACAATT
<i>glpK</i> Rev	ACTTCCGGGCGCTCAAC
<i>acnB</i> Fwd	GGCGAGAAGATCGACGAAGT
<i>acnB</i> Rev	GCACGGAAGTGACCGATGTT
<i>aceE</i> Fwd	CGTGAAGAAGGTGTTGAGCG
<i>aceE</i> Rev	TTGCTGATACCTGTGCCTGC
<i>gapA</i> Fwd	GAAAGGCGTTCTGGGCTACA
<i>gapA</i> Rev	GCAAACCTCGCCGTTGAAA
<i>tpiA</i> Fwd	AACTCCGGCTCAGGCACAG
<i>tpiA</i> Rev	AGCCGCCGTAATGATC
<i>rrsA</i> Fwd	CCTTACGACCAGGGCTACACA
<i>rrsA</i> Rev	CACTTTATGAGGTCCGCTTGCT

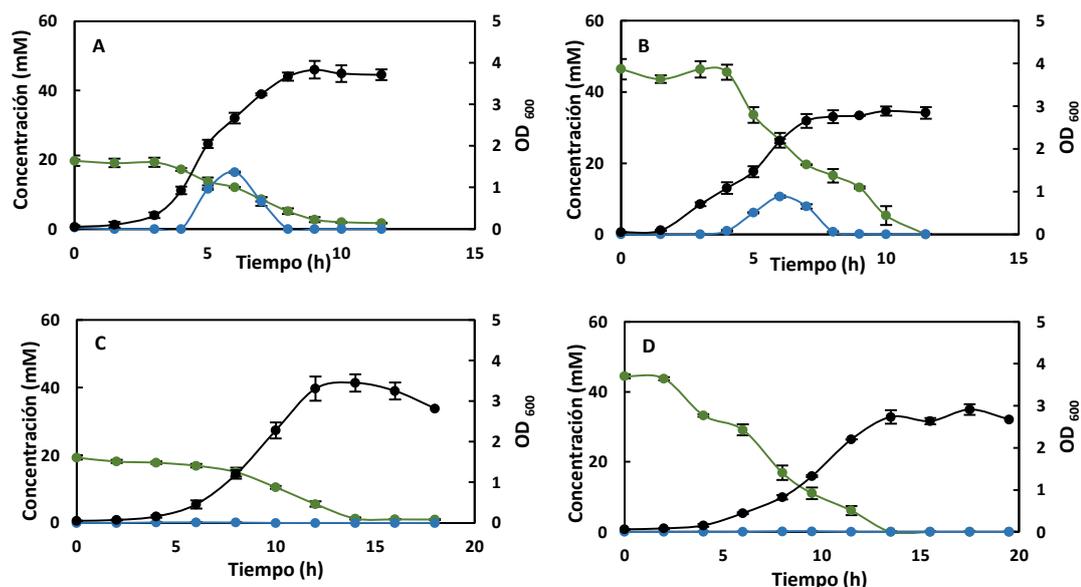


Figura S1: Crecimiento de *E. coli* wt a DO_{600} y concentración extracelular de glucosa, glicerol y acetato. Crecimiento de *E. coli* BL21 wt (negro), concentración extracelular de acetato (azul) y consumo de glucosa o glicerol (verde) en TB7-glucosa (A), TB7-glicerol (B), MM9-glucosa (C) y MM9-glicerol (D).

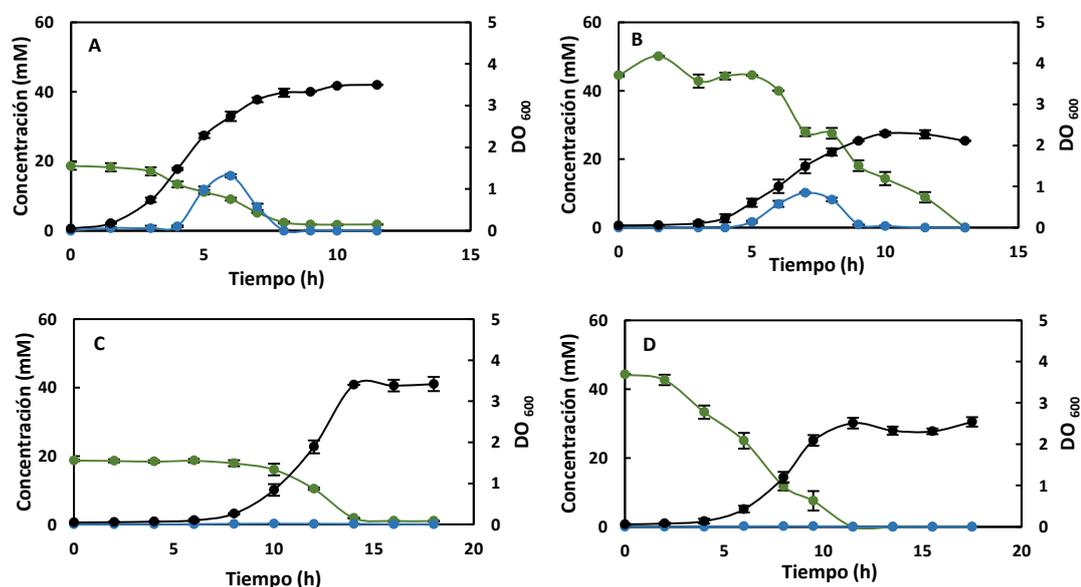


Figura S2: Crecimiento de *E. coli* $\Delta patZ$ a DO_{600} y concentración extracelular de glucosa, glicerol y acetato. Crecimiento de *E. coli* BL21 $\Delta patZ$ (negro), concentración extracelular de acetato (azul) y consumo de glucosa o glicerol (verde) en TB7-glucosa (A), TB7-glicerol (B), MM9-glucosa (C) y MM9-glicerol (D).

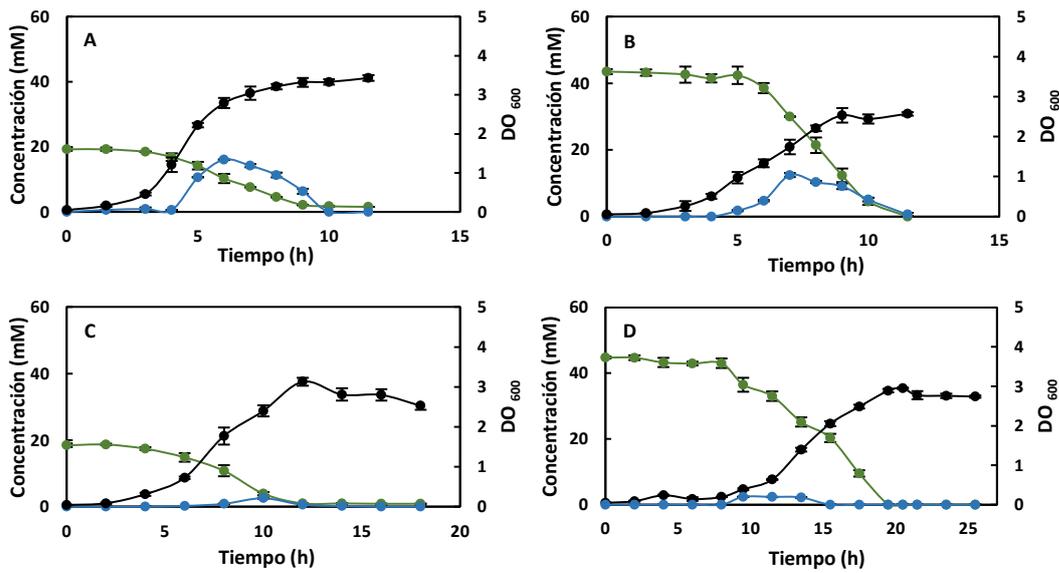


Figura S3: Crecimiento de *E. coli* $\Delta cobB$ a DO_{600} y concentración extracelular de glucosa, glicerol y acetato. Crecimiento de *E. coli* BL21 $\Delta cobB$ (negro), concentración extracelular de acetato (azul) y consumo de glucosa o glicerol (verde) en TB7-glucosa (A), TB7-glicerol (B), MM9-glucosa (C) y MM9-glicerol (D).

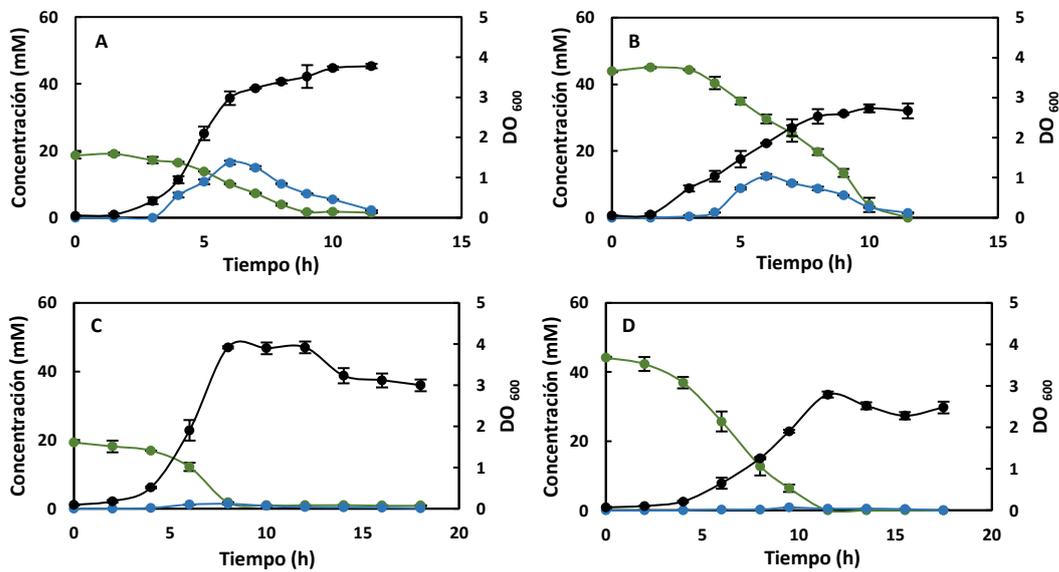


Figura S4: Crecimiento de *E. coli* Δacs a DO_{600} y concentración extracelular de glucosa, glicerol y acetato. Crecimiento de *E. coli* BL21 Δacs (negro), concentración extracelular de acetato (azul) y consumo de glucosa o glicerol (verde) en TB7-glucosa (A), TB7-glicerol (B), MM9-glucosa (C) y MM9-glicerol (D).

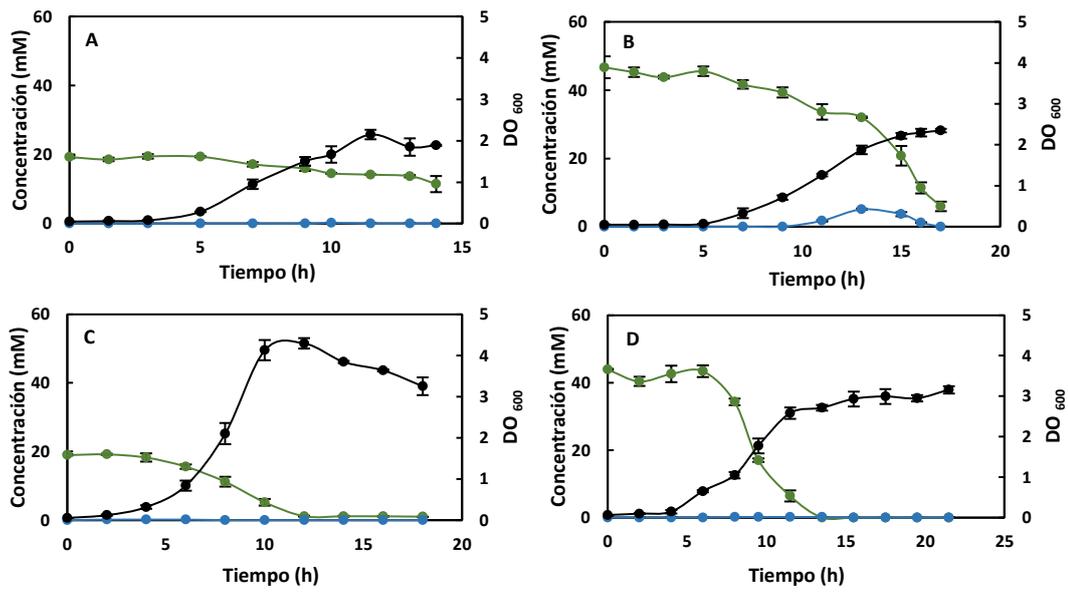


Figura S5: Crecimiento de *E. coli* $\Delta ackA$ a DO_{600} y concentración extracelular de glucosa, glicerol y acetato. Crecimiento de *E. coli* BL21 $\Delta ackA$ (negro), concentración extracelular de acetato (azul) y consumo de glucosa o glicerol (verde) en TB7-glucosa (A), TB7-glicerol (B), MM9-glucosa (C) y MM9-glicerol (D).

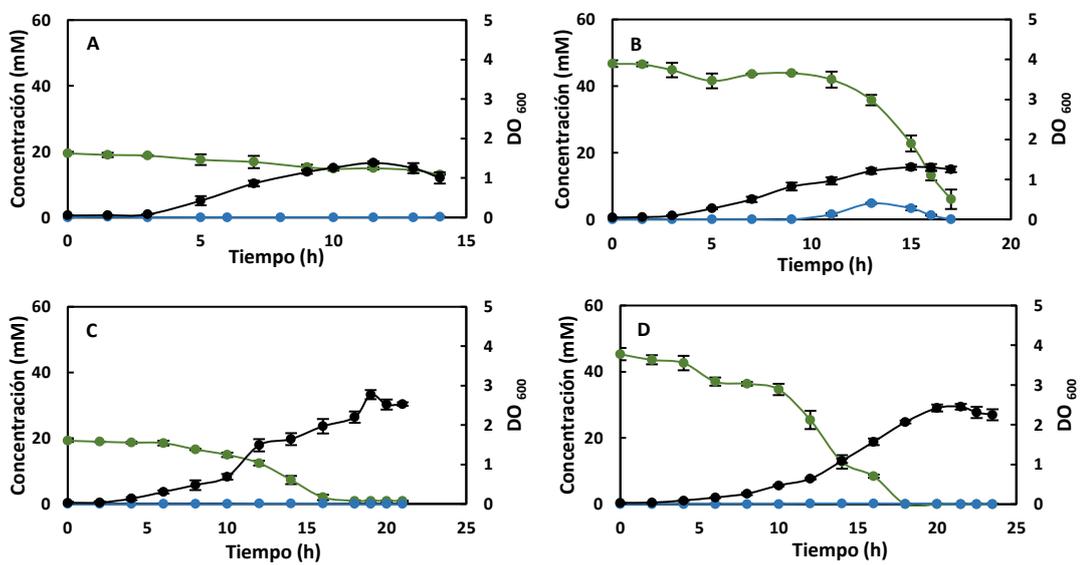


Figura S6: Crecimiento de *E. coli* Δpta a DO_{600} y concentración extracelular de glucosa, glicerol y acetato. Crecimiento de *E. coli* BL21 Δpta (negro), concentración extracelular de acetato (azul) y consumo de glucosa o glicerol (verde) en TB7-glucosa (A), TB7-glicerol (B), MM9-glucosa (C) y MM9-glicerol (D).

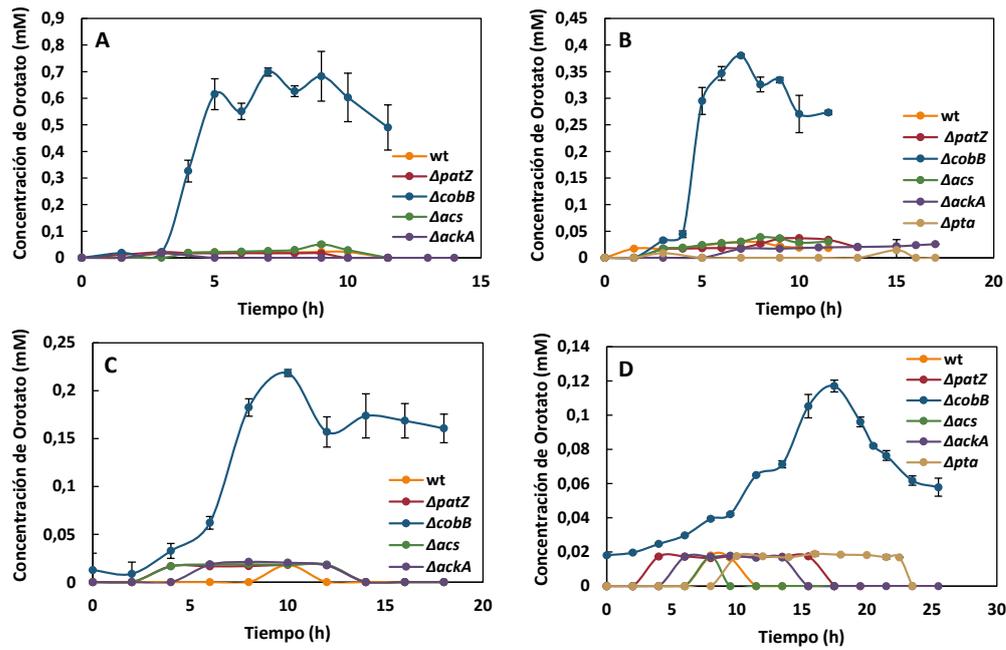


Figura S7: Concentración extracelular de orotato. Concentración extracelular de orotato detectada para *E. coli* BL21 wt, $\Delta patZ$, $\Delta cobB$, Δacs , $\Delta ackA$ y Δpta a creciendo en TB7-glucosa (A), TB7-glicerol (B), MM9-glucosa (C) y MM9-glicerol (D).

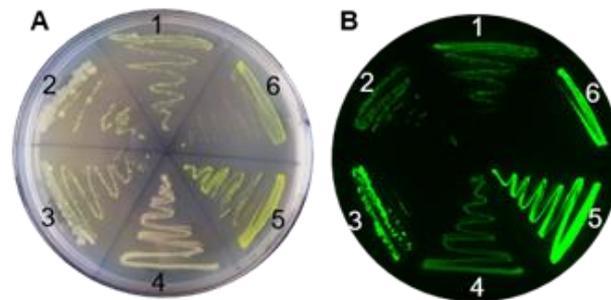


Figura S8: Imágenes de fluorescencia de GFP. Imágenes de fluorescencia de la GFP de las células sembradas *E. coli* BL21 wt (1), $\Delta patZ$ (2), $\Delta cobB$ (3), Δacs (4), $\Delta ackA$ (5) y Δpta (6) expresando GFP. (A) Imagen de la placa. (B) Imagen de fluorescencia de la placa obtenida con un filtro Cy2 que permite la detección de la fluorescencia de GFP con el equipo Amersham Imager 600 (GE Healthcare).

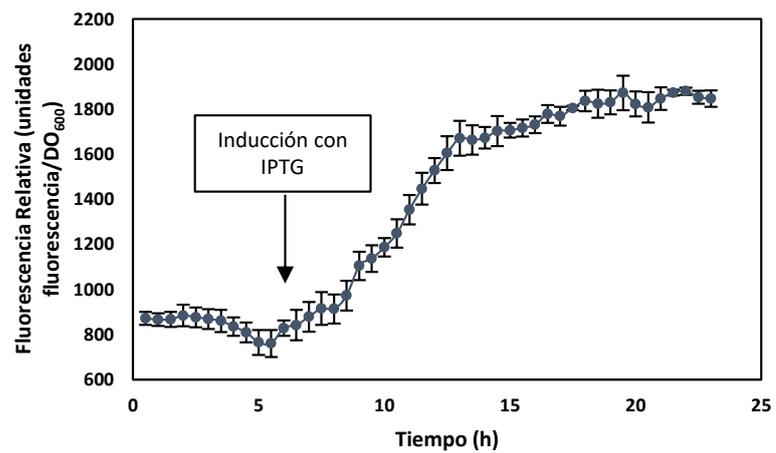


Figura S9: Fluorescencia relativa detectada durante el crecimiento de *E. coli* BL21 wt en TB7-glicerol.

Capítulo 4

Impacto del sistema de expresión sobre la producción de proteínas recombinantes en Escherichia coli BL21

Los resultados presentados en este capítulo están basados en la publicación:

Gema Lozano Terol, Julia Gallego-Jara, Rosa Alba Sola Martínez, Adrián Martínez
Vivancos, Manuel Cánovas Díaz and Teresa de Diego Puente

**Impact of the Expression System on Recombinant Protein Production in
Escherichia coli BL21**

Frontiers in Microbiology. 2021; 12:682001. doi: 10.3389/fmicb.2021.682001.

Resumen

Actualmente, la producción de proteínas recombinantes para aplicaciones médicas, académicas o industriales es esencial para el sector industrial y económico. Las proteínas recombinantes son obtenidas en su mayoría mediante fermentación microbiana, siendo *Escherichia coli* uno de los organismos huésped más empleados. A pesar de ello, hay algunos problemas asociados con la producción de proteínas recombinantes en *E. coli*, como son la formación de cuerpos de inclusión, el desajuste metabólico, o el sistema ineficiente de translocación/transporte de algunas proteínas expresadas. Optimizar la transcripción de genes heterólogos es esencial para evitar estos inconvenientes y desarrollar procesos biotecnológicos competitivos. En este estudio, la expresión de la proteína reportera YFP fue evaluada bajo el control de cuatro promotores de diferente fuerza de expresión (P_{T7lac} , P_{trc} , P_{tac} , and P_{BAD}) y dos orígenes de replicación (alto número de copias, pMB1', y bajo número de copias, p15A). Además, el estudio ha sido llevado a cabo en las cepas de *E. coli* BL21 wt y $\Delta ackA$ creciendo en medio rico con glucosa y glicerol como fuentes de carbono. Los resultados mostraron que el desajuste metabólico asociado con la transcripción y traducción de genes externos implica una disminución de la expresión de proteína recombinante. Por tanto, se concluye que es necesario encontrar un equilibrio entre el número de copias del plásmido y la tasa de transcripción del promotor para maximizar la expresión de proteínas recombinantes solubles. Los resultados obtenidos representan un importante avance en el estudio del sistema de expresión más adecuado para mejorar tanto la cantidad como la calidad de las proteínas recombinantes producidas en distintos bioprocesos.

Introducción

La expresión de genes heterólogos y autólogos es un método empleado en diversos campos biotecnológicos como la ingeniería metabólica, la biocatálisis *in vivo*, o en la producción de proteínas recombinantes u otros metabolitos de elevado valor [1]–[3]. Así, la estrategia seguida en un proceso biotecnológico normalmente incluye la expresión de enzimas concretas o de una ruta biosintética completa necesaria para conseguir los compuestos de interés [4], [5]. La expresión de proteínas recombinantes es influenciada por condiciones físicas y transcripcionales, tales como la temperatura, la velocidad de agitación, la fuerza del promotor o el número de copias del vector empleado [6]–[11].

Escherichia coli (*E. coli*) ha sido tradicionalmente, y todavía es, el microorganismo huésped más empleado en biotecnología. Esta bacteria presenta una serie de ventajas para ser utilizada en la expresión de proteínas heterólogas, como son su elevada velocidad de crecimiento, la variedad de medios de cultivo en los que es capaz de crecer, o el gran número de herramientas biológicas disponibles para llevar a cabo modificaciones genéticas [12]–[16]. A pesar de las ventajas, también hay algunos problemas asociados con la producción de proteínas recombinantes en *E. coli*, como la formación de cuerpos de inclusión, la ineficiente translocación proteica (citoplasma, periplasma y medio extracelular) o la carga metabólica [17]–[19]. Algunas estrategias desarrolladas para solucionar estos inconvenientes se centran en la suplementación de precursores esenciales o el uso de cocultivos [20]–[24]. La carga o desajuste metabólico hace referencia al desequilibrio que sufre una célula huésped cuando se expresa un gen heterólogo. Este desequilibrio está asociado a las restricciones energéticas y de precursores debido a la transcripción y traducción de proteínas no esenciales para la célula huésped. Por tanto, el desajuste metabólico se refleja en la alteración de parámetros fisiológicos, como la tasa de crecimiento, y en la regulación a la baja de varias vías metabólicas esenciales para la célula [17], [25], [26]. Para minimizar el desequilibrio metabólico, se han desarrollado multitud de plásmidos con el fin de optimizar cada proceso biotecnológico de forma independiente, eligiendo entre diferentes promotores y orígenes de replicación, ambos responsables del nivel de expresión del gen o genes de interés [27]–[33].

Uno de los principales factores que afectan al desajuste metabólico es la fuerza del promotor. Los promotores derivados del promotor *lac* (P_{T7lac} , P_{trc} , y P_{tac}) están basados en una regulación negativa por Lacl , y la expresión es inducida por lactosa o por el compuesto no metabolizable isopropil- β -D-1tiogalactopiranosido (IPTG), empleado como análogo de la lactosa. Sin embargo los plásmidos pBAD portan un promotor BAD (P_{BAD}) positivamente regulado por AraC e inducido por la L-arabinosa [34]–[37]. Los promotores P_{trc} , y P_{tac} son considerados promotores fuertes y están bien caracterizados. Los genes regulados por el promotor P_{T7} son transcritos por la ARN polimerasa del bacteriófago t7 presente en algunas cepas de *E. coli*, como BL21 (DE3) [38]. Esta polimerasa es cinco veces más veloz que la ARN polimerasa propia de *E. coli*, por lo que P_{T7lac} es considerado un promotor muy fuerte [39], [40]. Aunque con un sistema diferente de inducción que los promotores de tipo *lac*, el promotor P_{BAD} es considerado un promotor de fuerza media, con una menor fuerza de expresión que los promotores P_{T7lac} , P_{trc} , y P_{tac} [41].

El origen de replicación (ori) del replicón es el principal componente que afecta al número de copias de un vector de expresión, y por tanto, a la carga metabólica en la célula [29], [42]. Hay muchos orígenes diferentes, incluyendo procariotas, eucariotas, virales y otros indefinidos [29]. Concretamente, para las enterobacterias hay grandes diferencias en el número de copias debidas a distintos orígenes [43]. Por ejemplo, pMB1 (también conocido como pBR322) está relacionado con un número medio de copias (15-20 copias/célula), algunos derivados de pMB1, como pMB1', presentan un mayor número de copias (500-700 copias/célula), mientras que el p15A está relacionado con un bajo número de copias (10-20 copias/célula) [44].

En este estudio ha sido evaluada la expresión de la proteína recombinante amarilla fluorescente Kringle (YFP) en *E. coli* BL21 (DE3) empleando diferentes sistemas de expresión. Para ello, se seleccionaron los promotores P_{T7lac} , P_{trc} , P_{tac} y P_{BAD} para controlar la expresión de YFP. Las diferencias entre los promotores han sido analizadas en gran número de trabajos, aunque en la mayoría de ellos, el estudio de la expresión ha sido llevado a cabo empleando distintos plásmidos molde [7], [45]–[47]. En el presente trabajo, los promotores seleccionados fueron clonados en un vector pet con dos orígenes de replicación distintos (pMB1' y p15A, alto y bajo número de copias, respectivamente). La inducción se analizó con dos fuentes de carbono diferentes: glucosa y glicerol. Además, se utilizaron los sistemas de expresión de proteínas construidos en una cepa *E. coli* BL21 $\Delta ackA$, que muestra una mayor producción de proteínas recombinantes que la cepa BL21 de tipo silvestre debido al escaso acetato producido y excretado al medio extracelular [10], [48], [49].

En conjunto, los resultados tratan de arrojar luz sobre el proceso de selección de vectores de expresión y cepas para optimizar un bioproceso de producción de proteínas recombinantes, esencial para lograr un rendimiento exitoso. Además, los resultados contribuyen a aumentar el conocimiento sobre la influencia del desajuste metabólico para obtener modelos de biología sintética que permitan predecir el comportamiento de la célula huésped y desarrollar células que constituyan biofábricas robustas [50], [51].

Materiales y Métodos

Construcción de los vectores de expresión

Todas las cepas y cebadores empleados en este estudio se muestran en la Tabla 1, y los plásmidos construidos junto con los empleados como molde en la Tabla 2.

Tabla 1: Cebadores y cepas empleados en este estudio.

Cebador	Secuencia 5' → 3'	
PT7 <i>Sall</i> Fwd	GGTGGTGTCTGACTCACTGCCCGCTTCCAGT	
PT7 <i>HindIII</i> Rev	GGTGGTAAGCTTAGAGGGGAATTGTTATCCGC	
PTrc <i>Sall</i> Fwd	GTTGTTGTCTGACGACACCATCGAATGGTGCAA	
PTrc <i>EcoRI</i> Rev	GTTGTTGAATTCTTGTATCCGCTCACAATTCC	
PTac <i>Sall</i> Fwd	GTTGTTGTCTGACGACACCATCGAATGGTGCAA	
PTac <i>HindIII</i> Rev	GTTGTTAAGCTTCCGGGAATTCTGTTTCCTGT	
PBAD <i>SpeI</i> Fwd	GTTGTTACTAGTTTATGACAACCTTGACGGCTAC	
PBAD <i>EcoRI</i> Rev	GTTGTTGAATTCAAAAAACGGGTATGGAGAAACAG	
p15A <i>PacI</i> Fwd	GGTGGTTTAATTAAGGAAGATGCCAGGAAGATACT	
p15A <i>SwaI</i> Rev	GGTGGTATTTAAATTTTCGTTCCACTGAGCGTCA	
pSFYFP <i>SwaI</i> Fwd	GGTGGTATTTAAATTTCCGAACCTCCAAGGCC	
pSFYFP <i>PacI</i> Rev	GGTGGTTTAATTAAGTTTCGATAGCCCAAGGTAACCAA	
Cepa	Descripción	Fuente
Top10F'	F'[<i>lacI</i> ^q Tn10(tetR)] <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 deoR nupG recA1</i> <i>araD139</i> Δ(<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL</i> (StrR) <i>endA1</i> λ-	Invitrogen
BL21 (DE3)	F- <i>ompT gal dcm lon hsdSB(rB- mB-)</i> λ(DE3)	Promega
BL21 (DE3) Δ <i>ackA</i>	F- <i>ompT gal dcm lon hsdSB(rB- mB-)</i> λ(DE3). <i>ackA::KanR</i>	[10]

Tabla 2: Plásmidos usados y construidos en este estudio.

Plásmido	Descripción	Fuente
pet28a-<i>mbp</i>	<i>ori</i> pMB1, <i>lacI</i> promotor T7, Kan ^R , proteína de fusión Proteína de unión a maltosa (MBP)	Depósito del laboratorio
pTrcECT	<i>ori</i> pMB1, <i>lacI</i> , promotor Trc, Amp ^R . expresión de <i>ectABC</i> (operón biosintético de ectoínas de <i>Halomonas elongata</i>)	pTrcECT fue amablemente cedido por Xixian Xie [52]
pZ8-pTac	<i>ori</i> p15A, <i>lacI</i> , promotor Tac, Kan ^R	pZ8-Ptac fue amablemente cedido por Timothy Lu [53]
pBAD24	<i>ori</i> pMB1, promotor de la arabinosa PBAD, Amp ^R	Depósito del laboratorio
pSF-pA-PromMCS-KrYFP (pSF-pMB1'-YFP)	<i>ori</i> pMB1', sin promotor, Amp ^R . Expresión de Kringle YFP	Oxgene
pSF-p15A-YFP	<i>ori</i> p15A, sin promotor, Amp ^R . Expresión de Kringle YFP	Este estudio
pSF-pMB1'-T7-YFP	<i>ori</i> pMB1', <i>lacI</i> , promotor T7, Amp ^R . Expresión de Kringle YFP	Este estudio
pSF-pMB1'-Trc-YFP	<i>ori</i> pMB1', <i>lacI</i> , promotor Trc, Amp ^R . Expresión de Kringle YFP	Este estudio
pSF-pMB1'-Tac-YFP	<i>ori</i> pMB1', <i>lacI</i> , promotor Tac, Amp ^R . Expresión de Kringle YFP	Este estudio
pSF-pMB1'-BAD-YFP	<i>ori</i> pMB1', promotor de la arabinosa PBAD, Amp ^R . Expresión de Kringle YFP	Este estudio
pSF-p15A-T7-YFP	<i>ori</i> p15A, <i>lacI</i> promotor T7, Amp ^R . Expresión de Kringle YFP	Este estudio
pSF-p15A-Trc-YFP	<i>ori</i> p15A, <i>lacI</i> , promotor Trc, Amp ^R . Expresión de Kringle YFP	Este estudio
pSF-p15A-Tac-YFP	<i>ori</i> p15A, <i>lacI</i> , promotor Tac, Amp ^R . Expresión de Kringle YFP	Este estudio
pSF-p15A-BAD-YFP	<i>ori</i> p15A, promotor de la arabinosa PBAD, Amp ^R . Expresión de Kringle YFP	Este estudio

Para construir los vectores de expresión se empleó el plásmido pSF-pA-PromMCSKrYFP (pSF-pMB1'-YFP) como molde. Para reemplazar el *ori* derivado de pMB1 (denominado pMB1'), se amplificó el vector pSF-pMB1'-YFP, a excepción de la región del *ori* pMB1', empleando la pareja de cebadores pSFYFP *Swal* Fwd y pSFYFP *PacI* Rev. El *ori* p15A fue amplificado del vector pZ8-pTac utilizando los cebadores p15A *PacI* Fwd y p15A *Swal* Rev. Ambos productos de amplificación fueron digeridos con las enzimas de restricción *PacI* y *Swal*, y ligados para obtener el vector pSF-p15A-YFP con el origen de replicación p15A. Así, la construcción de los vectores de expresión fue llevada a cabo empleando estos dos plásmidos como molde, mediante la inserción del promotor y la región reguladora del mismo en el sitio de multiclonación de cada vector. La región promotora de P_{T7} y el operador regulatorio *lac* (promotor *lacI^q*, *lacO* y gen *lacI*) fueron

amplificados del vector *pet28a-mbp*, empleando los cebadores PT7 *Sall* Fwd y PT7 *HindIII* Rev, y la región amplificada y los vectores molde fueron digeridos con las enzimas de restricción *Sall* y *HindIII*, para posteriormente ser ligados y obtener los plásmidos pSF-pMB1'-T7-YFP y pSF-p15A-T7-YFP. Las secuencias que codifican para el promotor P_{trc} y el operador regulatorio *lac* fueron amplificados del vector pTrcECT, mediante el empleo de los cebadores PTrc *Sall* Fwd y PTrc *EcoRI* Rev; ambos plásmidos y el producto de la PCR fueron digeridos con las enzimas de restricción *Sall* y *EcoRI*, y fueron ligados para generar los vectores pSF-pMB1'-trc-YFP y pSF-p15A-trc-YFP. La construcción de los vectores pSF-pMB1'-tac-YFP y pSF-p15A-tac-YFP fue llevada a cabo a partir de la amplificación de las regiones del promotor P_{tac} y el operador regulatorio *lac* del vector pZ8-pTac, empleando los cebadores PTac *Sall* Fwd y PTac *HindIII* Rev. Las secuencias amplificadas y los vectores molde fueron digeridos con las enzimas de restricción *Sall* y *HindIII*, y ligados para generar los plásmidos completos. El promotor P_{BAD} y el gen regulatorio *araC* fueron amplificados del vector pBAD24 usando los cebadores PBAD *SpeI* Fwd y PBAD *EcoRI* Rev. El producto de la PCR fue digerido con las enzimas de restricción *SpeI* y *EcoRI* e insertado para generar los vectores pSF-pMB1'-BAD-YFP y pSF-p15A-BAD-YFP.

Análisis del crecimiento y la expresión

Las cepas de *E. coli* BL21 (DE3) silvestre (wt) y $\Delta ackA$ se hicieron quimiocompetentes por el método del cloruro de rubidio [54]. Las células quimiocompetentes fueron transformadas por choque térmico a 42 °C con los vectores construidos. Las células transformadas crecieron en el lector de placas multipocillo Synergy H1 Hybrid Multi-Mode Reader para medir de forma simultánea el crecimiento a 600 nm (densidad óptica, DO₆₀₀) y la fluorescencia, con una longitud de onda de 520 nm para la excitación y 542 nm para la emisión. Así, las placas de 96 pocillos fueron esterilizadas y se rellenaron con 200 μ L de medio TB7 (10 g/L de triptona tamponado a pH 7 con 100 mM de K₂HPO₄) con glucosa (20 mM) o glicerol (40 mM) como fuente de carbono. Para evitar la evaporación y permitir la aireación, las placas multipocillo fueron cubiertas con una lámina adhesiva permeable al gas (Sigma Aldrich). Los cultivos fueron inoculados con preinóculos en crecimiento exponencial a una DO₆₀₀ inicial de 0,05 unidades, y fueron inducidos a una DO₆₀₀ de 0,5 unidades con IPTG o L-arabinosa a concentraciones de 0 a 2 mM. Los cultivos fueron crecidos en triplicado con crecimiento

doble orbital a 37 °C durante 48 horas. El crecimiento específico fue determinado según se describe previamente en Lozano et al., 2019 [10].

Determinación de la concentración de YFP

Para cuantificar la proteína YFP producida, los cultivos crecieron y cuando llegaron a la fase estacionaria se centrifugaron a 4000 x g durante 15 minutos a 4 °C. Las células fueron lisadas mediante sonicación durante 2 minutos (ciclos de 40 segundos cada uno), empleando el sonicador Vibra Cell (Sonicator Sonics & Material). Los lisados fueron analizados por electroforesis SDS-PAGE con geles de acrilamida al 10% usando la cubeta Mini-PROTEAN Tetra Cell (Biorad), seguido por la tinción con Coomassie (Thermo Fisher Scientific). Se construyó una curva estándar para calcular la concentración de YFP mediante análisis densitométrico utilizando el software ImageJ Gel Analyzer [55].

Estudio de la solubilidad de la proteína recombinante producida

Para evaluar la solubilidad de la proteína YFP sobreexpresada, las células quimiocompetentes transformadas con los vectores construidos crecieron toda la noche a 37 °C con agitación orbital (250 rpm). El medio de cultivo y la concentración de inductor fueron las seleccionadas en el análisis de la expresión. Los cultivos fueron centrifugados (4500 x g durante 20 min) y las células fueron resuspendidas en tampón nativo (50 mM de K_2HPO_4 , 500 mM de NaCl, pH 8). Las células fueron lisadas por sonicación durante 2 minutos (ciclos de 40 segundos cada uno) usando el sonicador Vibra Cell (Sonicator Sonics & Materials). Los lisados fueron sometidos a centrifugación a 14000 x g durante 30 minutos a 4 °C para obtener los sobrenadantes (extracto de proteínas solubles). Los restos celulares fueron resuspendidos de nuevo en tampón de desnaturalización (50 mM de K_2HPO_4 , 500 mM de NaCl, 6 M de urea, pH 8) e incubados bajo agitación durante 30 minutos. Por último, las muestras fueron centrifugadas a 14000 x g durante 30 minutos a 4 °C para obtener los sobrenadantes (extracto de proteínas insolubles). Para analizar la solubilidad de la proteína YFP se llevó a cabo electroforesis SDS-PAGE en geles de acrilamida al 10%. Los geles de proteínas se realizaron bajo condiciones desnaturalizantes empleando una cubeta Mini-PROTEAN Tetra Cell (Biorad), seguido por la tinción con Coomassie (Thermo Fisher Scientific). El software ImageJ Gel Analyzer fue empleado para la cuantificación densitométrica [55].

Resultados

Construcción de los distintos vectores de expresión

Para evaluar la influencia del origen de replicación en la expresión de proteínas recombinantes en *E. coli* BL21, fueron seleccionados el ori p15A (de 10 a 20 copias por célula) y un ori de alto número copias derivado de pMB1 (500-700 copias/célula), denominado pMB1' [44], [56]. Para evitar la influencia de otros componentes del vector en la expresión, se eligió una estructura base común para todas las construcciones, con la misma secuencia del sitio de unión ribosomal (secuencia Shine Delgarno), el vector pSF-pMB1'-YFP (origen pMB1') (Tabla 2). El vector pSF-p15A-YFP fue construido a partir de este mismo vector, por lo que presenta la misma secuencia a excepción del origen (p15A). El sistema promotor es otro aspecto importante a tener en cuenta a la hora de elegir un vector para llevar a cabo la producción de proteínas recombinantes. Nosotros seleccionamos los promotores procariontas ampliamente empleados P_{T7lac}, P_{trc}, P_{tac} y P_{BAD}. Los tres primeros están basados en la regulación negativa por LacI^Q y el promotor BAD es inducido por L-arabinosa. Un esquema de los plásmidos construidos en este estudio se muestra en la Figura 1. Los plásmidos resultantes fueron denominados pSF-pMB1'-T7lac-YFP (6131 pares de bases, pb), pSF-pMB1'-trc-YFP (6059 pb), pSF-pMB1'-tac-YFP (5969 pb), pSF-pMB1'-BAD-YFP (5815 pb), pSF-p15A-T7lac-YFP (5749 pb), pSF-p15A-trc-YFP (5677 pb), pSF-p15A-tac-YFP (5587 pb) y pSF-p15A-BAD-YFP (5433 pb).

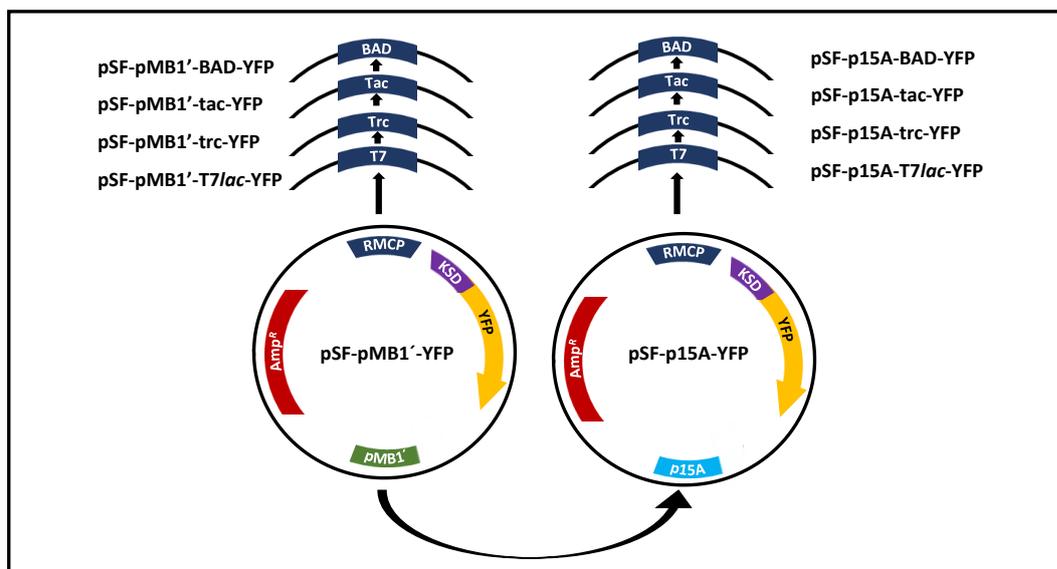
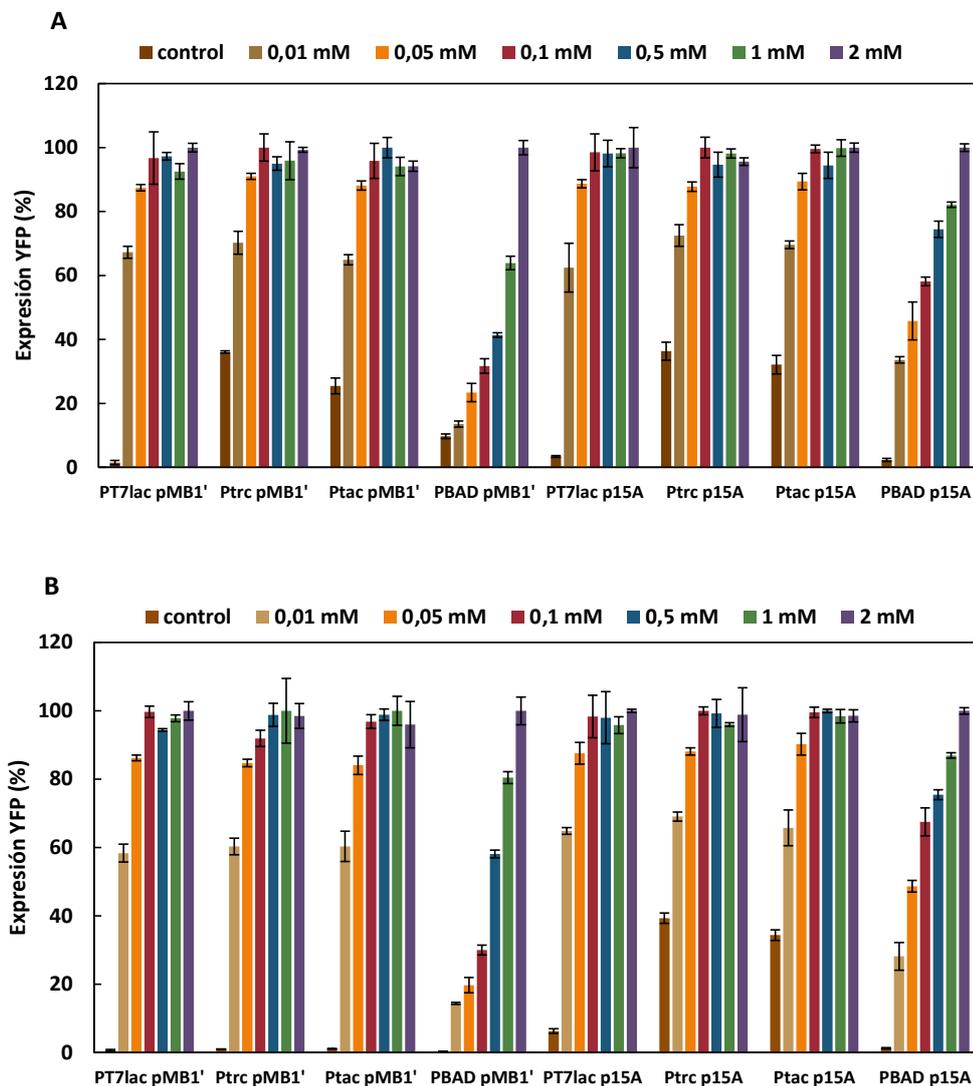


Figura 1: Esquema de los vectores de expresión construidos en este estudio. RMCP, región de multiclonación del promotor; KSD, secuencias Kozak y Shine-Dalgarno; YFP, secuencia de la proteína amarilla fluorescente YFP; Amp^R, resistencia a ampicilina.

Expresión de la proteína YFP bajo diferentes condiciones de inducción

Conocer el comportamiento de un sistema de expresión bajo diferentes concentraciones de inductor es esencial para optimizar el proceso de expresión de proteínas. En este capítulo, se evaluaron diferentes condiciones de inducción para analizar la expresión de la YFP recombinante de los plásmidos construidos. Así, el IPTG y la L-arabinosa fueron empleados a concentraciones de 0 (control), 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1 y 2 mM, y la expresión observada en cada condición fue normalizada con respecto a la máxima expresión de cada vector (Figura 2).



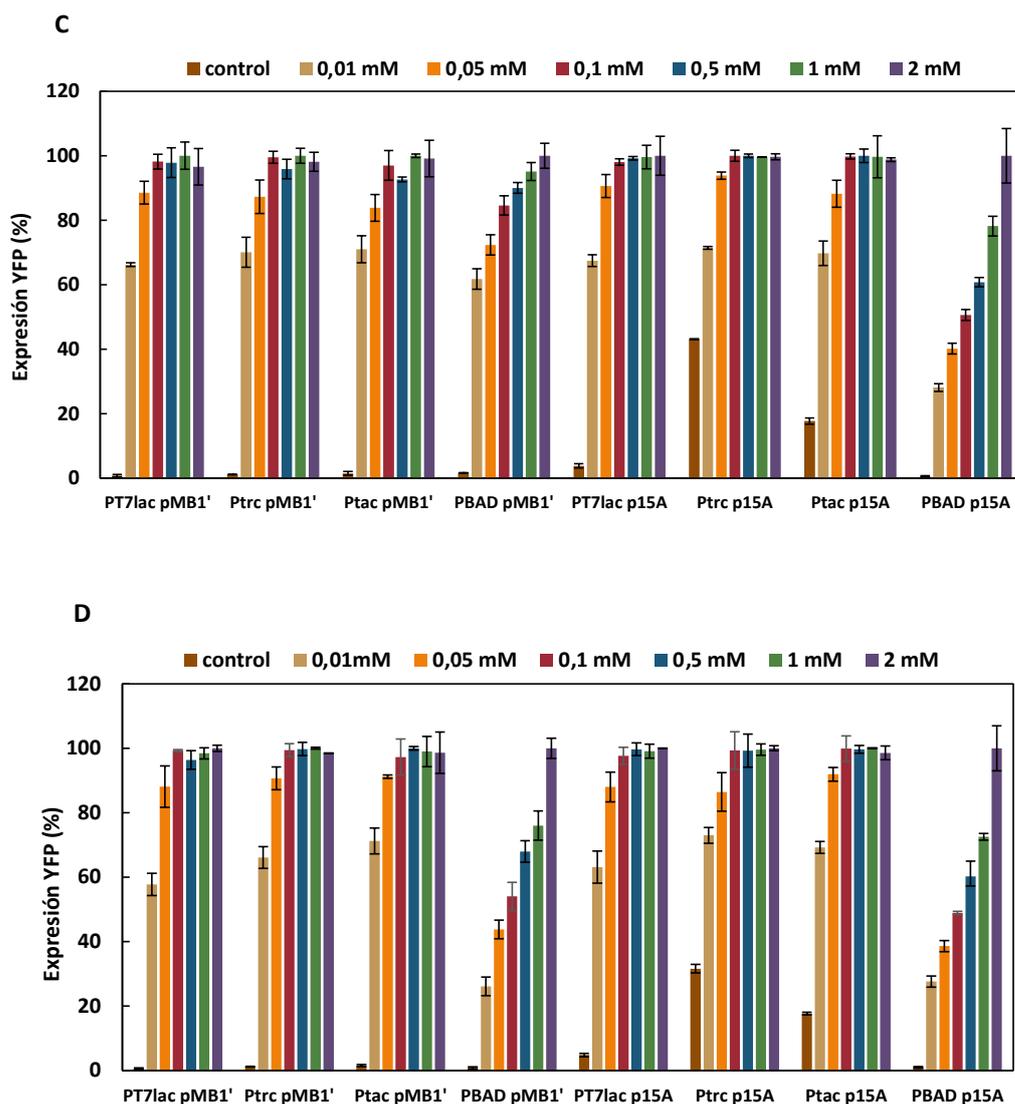


Figura 2: Porcentaje de expresión de proteína YFP con respecto a la expresión máxima para cada vector bajo las diferentes concentraciones de inductor. La expresión de YFP seleccionada fue la mayor conseguida para la fase estacionaria de crecimiento. (A) *E. coli* wt creciendo con glucosa como fuente de carbono. (B) *E. coli* wt creciendo con glicerol como fuente de carbono. (C) *E. coli* Δ ackA creciendo con glucosa como fuente de carbono. (D) *E. coli* Δ ackA creciendo con glicerol como fuente de carbono.

Como se muestra en la Figura 2, todos los vectores basados en el promotor *lac* mostraron la mayor expresión de YFP a 0,1 mM de IPTG, y la adición de concentraciones crecientes no conllevó un aumento en el nivel de expresión de YFP. Sin embargo, la inducción de la expresión con el promotor P_{BAD} fue aumentando conforme aumentaba la concentración de L-arabinosa, y fue necesario adicionar una concentración de 2 mM de este inductor para alcanzar la máxima expresión. Además, los perfiles de inducción fueron similares en los cultivos de glucosa y glicerol, y también para la cepa de *E. coli* wt y la cepa

$\Delta ackA$. A partir de estos resultados, se seleccionó 0,1 mM como la concentración óptima de IPTG para los vectores basados en *lac*, y 2 mM de L-arabinosa para los vectores con P_{BAD} .

Las mayores diferencias en los perfiles de inducción entre medios, promotores y cepas se dieron en la inducción basal. Como se muestra la Figura 2, en la mayoría de las condiciones ensayadas se observó una expresión basal sin inductor transcurrido un largo periodo de tiempo desde el inicio del cultivo (véase también la expresión del control en la Figura 3A). En todas las condiciones, la expresión basal fue insignificante en el vector basado en el promotor P_{BAD} . La mayor expresión basal se observó empleando los vectores con promotores P_{trc} y P_{tac} , siendo más elevada en combinación con el ori p15A, para ambas cepas y fuentes de carbono. Además, estos promotores combinados con el ori pMB1' presentaron una elevada expresión basal sobre todo cuando se empleó la cepa wt creciendo con glucosa. Sin embargo, los vectores con el P_{T7lac} mostraron una baja expresión basal en todos los casos.

Influencia de la concentración del inductor en el tiempo de expresión de la proteína YFP

Con el fin de profundizar en la influencia de la concentración del inductor en la producción de YFP, se calcularon las velocidades de expresión de todos los cultivos (datos no mostrados), pero estas velocidades no se vieron afectadas por la concentración del inductor. Sin embargo, la influencia de la concentración de inductor se reflejó, fundamentalmente, en la disminución del tiempo de expresión de YFP (Figura 3).

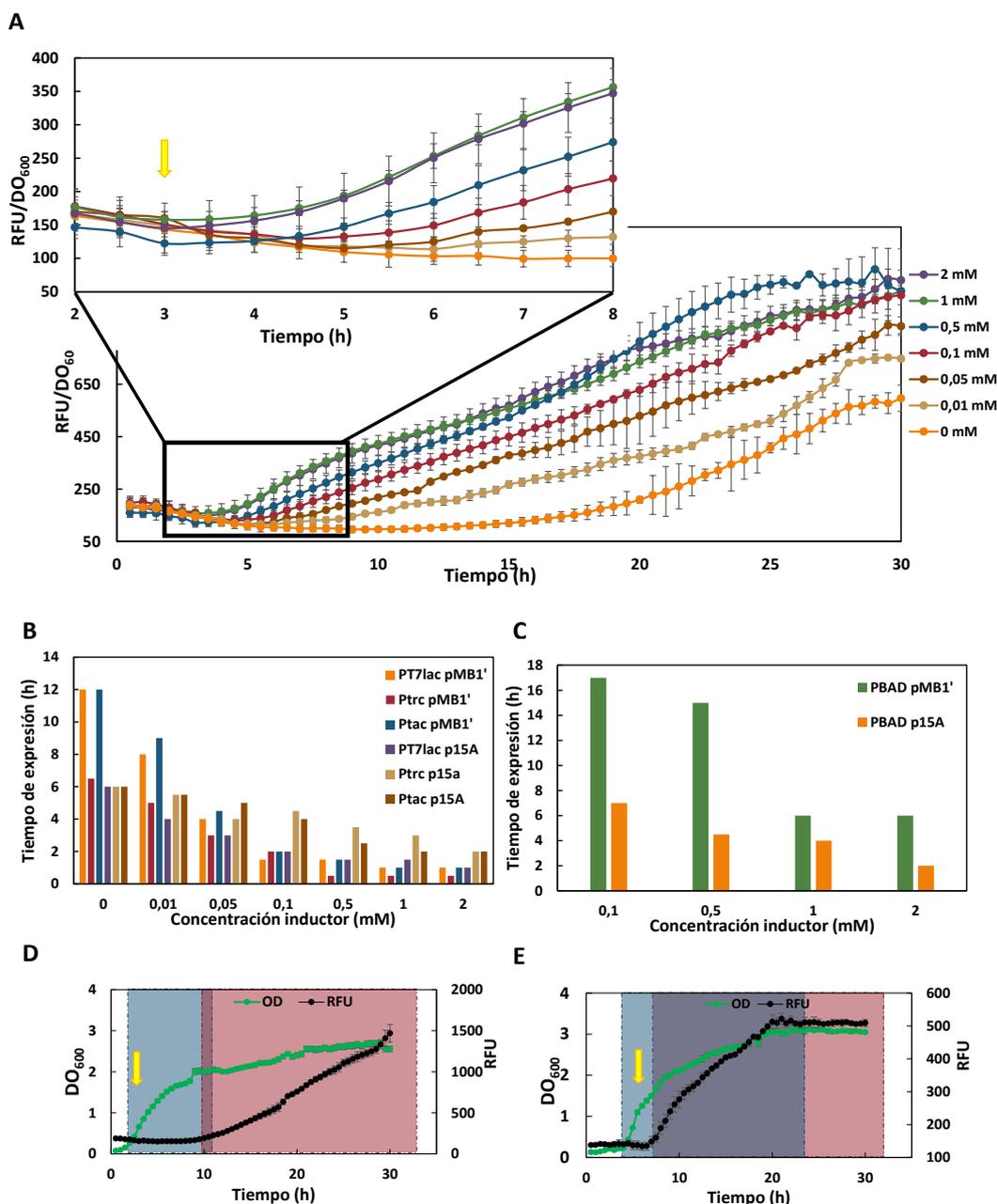


Figura 3: Dependencia del tiempo de expresión de YFP con respecto a la concentración de inductor. (A) Expresión de YFP en *E. coli* wt portando el vector pSF-pMB1'-tac-YFP y creciendo con glucosa como fuente de carbono a diferentes concentraciones de IPTG. La flecha amarilla indica el tiempo de inducción con IPTG. RFU: unidades de fluorescencia relativa en unidades arbitrarias. (B) Tiempo de expresión de YFP (en horas tras la adición de IPTG) de *E. coli* wt portando los diferentes plásmidos *lac* construidos, y creciendo en TB7 suplementado con glucosa como fuente de carbono a diferentes concentraciones de IPTG. (C) Tiempo de expresión de YFP (en horas tras la adición de L-arabinosa) de *E. coli* wt portando los plásmidos PBAD construidos, y creciendo en TB7 suplementado con glucosa como fuente de carbono a diferentes concentraciones de L-arabinosa. (D) *E. coli* wt portando el vector pSF-pMB1'-BAD-YFP creciendo con glucosa como fuente de carbono. (E) *E. coli* wt portando el vector pSF-pMB1'-BAD-YFP creciendo con glicerol como fuente de carbono. Los puntos verdes muestran el crecimiento a DO₆₀₀, mientras que los puntos negros muestran la RFU. El cuadrado gris corresponde al crecimiento del cultivo, y el cuadrado rosa indica la expresión de YFP. El cuadrado púrpura indica las horas en las que el cultivo está creciendo y expresando YFP simultáneamente. La flecha amarilla muestra el tiempo de inducción con L-arabinosa 2 mM.

Puesto que se observó un mismo perfil de expresión en todos los cultivos que llevaban vectores basados en *lac*, en la Figura 3A se muestra la expresión de YFP de *E. coli* wt portando el vector pSF-pMB1'-tac-YFP y creciendo con glucosa como fuente de carbono a diferentes concentraciones de IPTG. En todos los casos, al aumentar la concentración de inductor, la expresión de la proteína recombinante se observó a tiempos más cortos. En la Figura 3B, se muestra el tiempo de expresión (en horas tras la adición del inductor) con respecto a la concentración de inductor añadida para *E. coli* wt creciendo en TB7-glucosa y transformada con los seis vectores *lac* construidos. Como puede observarse, en ausencia de inductor, la expresión basal comenzó a las 6-17 h post-inducción. Sin embargo, con 0,1 mM de IPTG y concentraciones superiores, la expresión de YFP se observó a las 1-4 h después de la inducción. Por su parte, los cultivos con vectores P_{BAD} no mostraron expresión hasta que la L-arabinosa estaba a 0,1 mM (Figura 3C). Además, los tiempos de expresión fueron mucho más largos en P_{BAD} que en los vectores basados en *lac* cuando la glucosa era la única fuente de carbono, mientras que mostraron un comportamiento similar cuando se empleó glicerol (Figuras 3D y E).

Efectos de los diferentes sistemas de expresión y condiciones en la expresión de la proteína YFP

Para comparar la expresión de la proteína recombinante YFP con los diferentes vectores construidos bajo las condiciones de inducción seleccionadas (0,1 mM de IPTG y 2 mM de L-arabinosa), se realizaron triplicados de cada combinación en la misma placa multipocillo. De este modo, fue posible comparar la expresión de YFP en *E. coli* wt y en la cepa mutante $\Delta ackA$ creciendo con glucosa o glicerol como fuente de carbono y transformada con cada plásmido. La Figura 4 muestra la expresión observada en la fase estacionaria de crecimiento en cada cultivo. La expresión se muestra en porcentaje con respecto a la máxima expresión alcanzada en *E. coli* wt creciendo con glicerol como fuente de carbono y transformada con el plásmido pSF-p15A-trc-YFP. Además, se cuantificó la YFP expresada en mg de proteína/L de cultivo. Finalmente, se llevó a cabo el análisis estadístico ANOVA de dos vías con Graphpad Prism 7.0 para evaluar las diferencias estadísticamente significativas entre la condición de máxima expresión observada para cada vector con respecto a las demás condiciones de ese mismo vector (p -valor < 0,0001 (****), < 0,001 (***), < 0,01 (**), y < 0,05(*)).

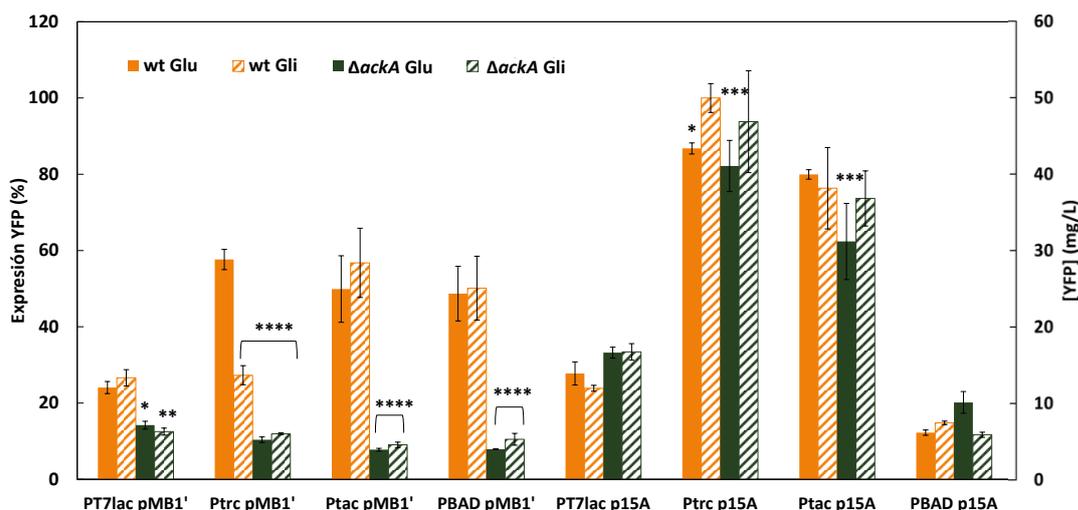


Figura 4: Expresión de YFP en *E. coli* wt o en la cepa mutante deficiente en *ackA* creciendo con glucosa o glicerol como fuentes de carbono y portando los diferentes vectores del sistema de expresión. La expresión se muestra como un porcentaje con respecto a la expresión en *E. coli* wt transformada con el plásmido pSF-p15A-trc-YFP creciendo con glicerol (100%). El eje Y secundario muestra la concentración de YFP (mg/L de cultivo). La expresión de *E. coli* wt se muestra en naranja y la de *E. coli* $\Delta ackA$ en verde. Los cultivos con glucosa se muestran en barras sólidas, mientras que los cultivos con suplemento de glicerol se muestran en barras rayadas.

Los resultados muestran que la mayor expresión fue alcanzada con los vectores de bajo número de copias, los cuales contenían el origen p15A combinado con los promotores P_{trc} y P_{tac} , obteniendo una concentración de proteína de 53,06 mg/L de cultivo para P_{trc} -p15A. Por el contrario, los vectores con el promotor P_{BAD} mostraron una mayor expresión de YFP con los oris de alto número de copias. Respecto a la cepa hospedadora, observamos como en el caso de los vectores de alto número de copias, pMB1', el empleo de la cepa silvestre supone una mayor expresión de proteína recombinante con respecto a la cepa $\Delta ackA$, con un p-valor $< 0,0001$ en el caso de los promotores P_{trc} , P_{tac} y P_{BAD} , y un p-valor $< 0,01$ y $0,05$ en el caso del promotor P_{T7lac} . Sin embargo, en el caso de los vectores con ori p15A, la expresión en la cepa $\Delta ackA$ fue similar a la de la cepa silvestre. En cuanto al empleo de glucosa o glicerol, no observamos un patrón de mayor expresión relacionado con la fuente de carbono, ya que no mostraron diferencias significativas, solamente en el caso del empleo del promotor P_{trc} , en el cual la expresión de YFP fue mayor en wt en glucosa que en glicerol con el ori pMB1' (p-valor $< 0,0001$), y mostró el perfil contrario con el ori p15A (p-valor $< 0,05$).

Para aumentar el conocimiento sobre la relación entre la expresión de la YFP y el crecimiento celular, se calcularon las velocidades de crecimiento de los cultivos con la

mayor expresión de YFP observada para cada vector. Además, la velocidad de crecimiento de las cepas wt y $\Delta ackA$ sin ningún plásmido y con el vector de expresión sin ningún promotor también fueron calculadas. Las curvas de crecimiento de las cepas sin vector y con vectores sin promotor se muestran en la Figura S1 (Anexo), y las velocidades de crecimiento se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3: Velocidades de crecimiento. Velocidades de crecimiento calculadas para las cepas sin plásmido y con vectores sin promotor que crecen con glucosa o glicerol como fuentes de carbono. También se calcularon las velocidades de crecimiento de los cultivos con la mayor expresión de YFP observada para cada vector.

	Cepa <i>E. coli</i>	Fuente de carbono	Vector de expresión	Velocidad de crecimiento, μ_{max} (h^{-1})
wt Glu	BL21 wt	Glucosa	Sin vector	$0,99 \pm 0,04$
wt Gli	BL21 wt	Glicerol	Sin vector	$0,72 \pm 0,03$
wt Glu pMB1'	BL21 wt	Glucosa	Sin promotor (ori pMB1')	$0,54 \pm 0,05$
wt Gli pMB1'	BL21 wt	Glicerol	Sin promotor (ori pMB1')	$0,43 \pm 0,03$
wt Glu p15A	BL21 wt	Glucosa	Sin promotor (ori p15A)	$0,63 \pm 0,03$
wt Gli p15A	BL21 wt	Glicerol	Sin promotor (ori p15A)	$0,53 \pm 0,10$
$\Delta ackA$ Glu	BL21 $\Delta ackA$	Glucosa	Sin vector	$0,56 \pm 0,05$
$\Delta ackA$ Gli	BL21 $\Delta ackA$	Glicerol	Sin vector	$0,50 \pm 0,07$
$\Delta ackA$ Glu pMB1'	BL21 $\Delta ackA$	Glucosa	Sin promotor (ori pMB1')	$0,19 \pm 0,02$
$\Delta ackA$ Gli pMB1'	BL21 $\Delta ackA$	Glicerol	Sin promotor (ori pMB1')	$0,18 \pm 0,02$
$\Delta ackA$ Glu p15A	BL21 $\Delta ackA$	Glucosa	Sin promotor (ori p15A)	$0,42 \pm 0,03$
$\Delta ackA$ Gli p15A	BL21 $\Delta ackA$	Glicerol	Sin promotor (ori p15A)	$0,30 \pm 0,03$
P _{T7lac} pMB1'	BL21 wt	Glucosa	pSF-pMB1'-T7lac-YFP	$0,31 \pm 0,03$
P _{trc} pMB1'	BL21 wt	Glucosa	pSF-pMB1'-trc-YFP	$0,21 \pm 0,01$
P _{tac} pMB1'	BL21 wt	Glicerol	pSF-pMB1'-tac-YFP	$0,22 \pm 0,01$
P _{BAD} pMB1'	BL21 wt	Glicerol	pSF-pMB1'-BAD-YFP	$0,17 \pm 0,02$
P _{T7lac} p15A	BL21 $\Delta ackA$	Glicerol	pSF-p15A-T7lac-YFP	$0,24 \pm 0,03$
P _{trc} p15A	BL21 wt	Glicerol	pSF-p15A-trc-YFP	$0,50 \pm 0,05$
P _{tac} p15A	BL21 wt	Glucosa	pSF-p15A-tac-YFP	$0,65 \pm 0,05$
P _{BAD} p15A	BL21 $\Delta ackA$	Glicerol	pSF-p15A-BAD-YFP	$0,28 \pm 0,04$

Las cepas *E. coli* wt y $\Delta ackA$ sin plásmidos mostraron las mayores velocidades de crecimiento. Sin embargo, el mutante deficiente en el gen *ackA* mostró aproximadamente la mitad de la velocidad de crecimiento con respecto a la cepa wt. Cuando se transformaron con los vectores sin promotores, las cepas mostraron una gran disminución de la velocidad de crecimiento con respecto a las cepas vacías, siendo esta disminución mayor con el empleo de los vectores que contenían el ori pMB1', que conlleva un alto número de copias. El uso de glucosa como fuente de carbono supuso un leve aumento de la velocidad de crecimiento con respecto al uso del glicerol. La

sobreexpresión proteica supuso una reducción de aproximadamente el 50% de la velocidad de crecimiento en el caso del empleo de los sistemas de expresión con ori pMB1', mientras que la expresión de proteínas en los vectores con bajo número de copias no conllevó una disminución de la velocidad con respecto a las cepas que contenían el vector sin promotor (Tabla 3).

Para comparar todas las condiciones, se llevó a cabo un análisis estadístico ANOVA de dos vías de la expresión máxima de YFP alcanzada con cada vector (Figura 5). La Figura 5 muestra diferencias significativas de la expresión máxima de cada vector en comparación con la expresión de YFP con pSF-p15A-trc-YFP, la más alta observada.

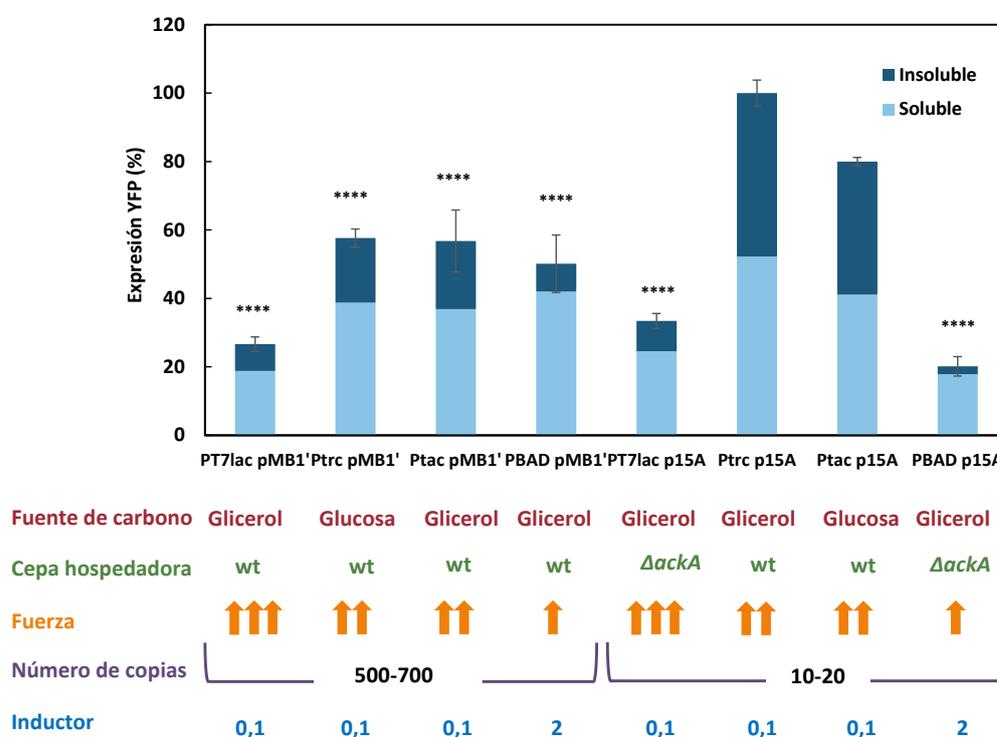


Figura 5: Porcentaje soluble e insoluble de YFP medido para cada vector de expresión. La fluorescencia se indica en porcentaje, siendo el 100% la observada con el vector pSF-p15A-trc-YFP. La fuente de carbono, la cepa huésped, la fuerza del promotor, la concentración del inductor (mM) y las copias del vector (número de copias) se muestran bajo el gráfico. El análisis estadístico mediante ANOVA de una vía se llevó a cabo con Graphpad Prism 7.0 para comparar las diferencias entre la condición con más expresión con respecto al resto (p-valor < 0,0001 (****), < 0,001 (***), < 0,01 (**), y < 0,05(*)).

La mayor expresión se observó para el vector pSF-p15A-trc-YFP. La expresión de YFP para el resto de los vectores, excepto las correspondientes al plásmido pSF-p15A-tac-YFP, fueron significativamente menores. Así, para los vectores de bajo número de copias, el promotor P_{trc} logró una expresión tres veces mayor que el P_{T7lac} y 5,5 veces mayor que

el P_{BAD} . Del mismo modo, la sobreexpresión con los sistemas de expresión que contienen el ori pMB1' conlleva una reducción la expresión de YFP del 40 al 70% con respecto al empleo del sistema de expresión con P_{trc} y el ori p15A.

Estudio de la solubilidad de la proteína recombinante YFP

Uno de los mayores inconvenientes para obtener altos rendimientos de proteínas recombinantes con *E. coli* es la formación de cuerpos de inclusión y la precipitación de proteínas, debido a la alta expresión, el plegamiento incorrecto, la agregación o la baja actividad de las chaperonas [57]. La precipitación de proteínas recombinantes implica, además de una disminución del rendimiento del proceso de producción, un aumento del estrés celular [19]. Para conocer el porcentaje de proteína YFP soluble e insoluble, se realizaron cultivos con *E. coli* creciendo en las condiciones correspondientes a la máxima expresión observada para cada vector (Figura 5). Cuando los cultivos alcanzaron la fase estacionaria, se analizaron las fracciones solubles/insolubles por electroforesis SDS-PAGE y posterior análisis densitométrico. Los geles de electroforesis se muestran en la Figura S2 (Anexo). Los resultados de la Figura 5 mostraron que la proteína YFP insoluble estaba presente en todos los cultivos. Sin embargo, los cultivos en los que la YFP fue expresada bajo el control del promotor P_{BAD} mostraron la menor fracción insoluble. Además, los cultivos que contenían los vectores pSF-p15A-trc-YFP y pSF-p15A-tac-YFP, cuya expresión de YFP fue la más alta, mostraron un porcentaje similar de proteínas solubles e insolubles. No se mostró un perfil que relacionara la fuente de carbono, la cepa o el origen de replicación con la formación de proteína insoluble.

Discusión

La producción de proteínas recombinantes se ha convertido en un proceso esencial para la obtención de fármacos y otros productos biológicos de gran interés industrial y académico. *E. coli*, como modelo procarionta, suele ser el huésped de elección para producir proteínas u otros metabolitos, especialmente cuando estas proteínas no requieren complejas modificaciones postraduccionales [30]. Una de las ventajas de *E. coli* como huésped es la gran variedad de sistemas de expresión disponibles. Estos vectores de expresión tienen diferentes componentes entre los que se encuentran los promotores y el tipo de orígenes de replicación, que son esenciales para modular la expresión de las

proteínas de interés. Así, uno de los aspectos más importantes a considerar cuando se diseña un proceso de producción de proteínas recombinantes es la elección del sistema promotor. Este, junto con el sistema de replicación, determinará el nivel de proteína recombinante expresada. En este capítulo, se llevó a cabo la construcción de vectores con una estructura base común para evitar la influencia de otros componentes del vector. Se eligieron dos oris distintos, el pMB1', que da lugar a un alto número de copias (500-700 copias por célula), y el p15A, relacionado con un bajo número de copias (10-20 copias por célula). En cuanto al sistema promotor, se seleccionaron 4 promotores procariontes ampliamente empleados, tres de ellos basados en la regulación negativa por LacI^Q (P_{T7lac}, P_{trc} y P_{tac}), y uno inducido por L-arabinosa (P_{BAD}) (Figura 1). Además, analizamos el nivel de expresión de estos sistemas en dos cepas de *E. coli*, la cepa silvestre y la cepa deficiente en el gen *ackA*, y empleando dos fuentes de carbono distintas, glucosa y glicerol.

Antes de desarrollar un bioproceso es esencial analizar las condiciones de inducción para, conjuntamente, maximizar la expresión proteica y optimizar el uso de los recursos. En este estudio observamos que la expresión de YFP para los plásmidos con promotores *lac* fue máxima empleando una concentración de IPTG de 0,1 mM, mientras que para obtener la expresión más elevada con los promotores P_{BAD} se necesitó la adición de mayores concentraciones de L-arabinosa, seleccionándose la concentración óptima de 2mM (Figura 2). La diferencia en la concentración óptima de los inductores es probablemente una consecuencia de la expresión "todo o nada". Los promotores *lac* y P_{BAD} dan lugar a una expresión génica conocida como todo o nada cuando se inducen con lactosa natural o L-arabinosa, respectivamente. Este fenómeno se refiere a que, a concentraciones subsaturantes de inductor, no se obtiene un nivel homogéneo de inducción, sino cultivos en los que hay un porcentaje de células totalmente inducidas y otro que no lo está. Por su parte, el inductor IPTG es un análogo de la lactosa no metabolizable que puede atravesar libremente la pared celular y la membrana, por lo que se consiguen cultivos homogéneos a diferentes concentraciones, y esto permite optimizar la expresión de forma más ajustada y utilizar menores concentraciones de inductor [58]. Sin embargo, hasta el momento no se ha encontrado ningún análogo de la L-arabinosa que permita eliminar este fenómeno [59].

En cuanto a la expresión basal sin inductor, esta fue diferente en los vectores con distintos promotores (Figuras 2 y 3A, B y C). La expresión basal fue muy baja en los vectores basados en el promotor P_{BAD}, ya que AraC reprime totalmente la traducción y la L-arabinosa es absolutamente necesaria para la inducción. La proteína AraC reprime la

traducción uniéndose a dos sitios en el ADN bacteriano, y el complejo proteína-ADN previene eficazmente la unión de la ARN polimerasa [60]. Por contra, la expresión basal con los vectores con promotores P_{trc} y P_{tac} fue la más elevada. Se ha mostrado que los promotores *lac* tienen una transcripción con “fugas”, es decir, la transcripción no está totalmente reprimida por la baja expresión del represor LacI y parte de la transcripción se produce cuando el inductor está ausente [30]. Este hecho se observó en los cultivos transformados con los vectores P_{trc} y P_{tac} con ori p15A, a pesar de llevar la versión mejorada del promotor del gen *lacI* ($LacI^Q$) que conlleva niveles más altos de expresión de LacI (casi 10 veces) [61]. Sin embargo, $P_{T7/lac}$ mostró una baja expresión basal, a pesar de ser un promotor *lac*, debido a la doble represión (tanto del promotor $P_{T7/lac}$ como de la ARN polimerasa del fago T7). Este hecho es algo para tener en cuenta, pues la expresión basal observada en los vectores con promotores P_{trc} y P_{tac} podría suponer un inconveniente cuando se sobreexpresa una proteína tóxica para la célula.

Para analizar por completo la influencia de la concentración del inductor en la producción de YFP, se analizó el tiempo de expresión de la proteína tras la adición del inductor (Figura 3). La expresión basal comenzó a las 6-12 h post-inducción en los vectores basados en promotores de tipo *lac*, debido, como se ha comentado, a la insuficiente represión por la baja expresión de LacI [30]. Sin embargo, con 0,1 mM de IPTG, la expresión de YFP se observó a las 1-4 h tras la inducción, gracias a la inducción homogénea en todo el cultivo celular [58]. Los cultivos con vectores P_{BAD} no mostraron expresión basal, y solo se observó la expresión de YFP a partir de la concentración de L-arabinosa de 0,1 mM, debido al fenómeno comentado anteriormente de “todo o nada” [58] (Figura 3C). Además, los tiempos de expresión fueron mucho más largos en P_{BAD} que en los vectores basados en *lac* cuando la glucosa era la única fuente de carbono debido a la Represión Catabólica por Carbono (RCC) [62], pues la glucosa (fuente de carbono PTS) inhibe el transporte y metabolismo de la L-arabinosa (fuente de carbono no PTS) hasta que no se ha consumido completamente (Figuras 3D y E). Por lo tanto, el promotor de P_{BAD} está regulado por este fenómeno, además de la inducción con L-arabinosa. Debido a la naturaleza no PTS del glicerol, el fenómeno de RCC no se observó cuando los cultivos fueron suplementados con esta fuente de carbono (Figura 3E).

Una vez analizado el sistema de inducción, estudiamos la sobreexpresión de YFP con los diferentes plásmidos construidos empleando las condiciones seleccionadas. La mayor expresión de YFP fue alcanzada con los vectores de bajo número de copias que contenían el ori p15A (Figura 4). En concreto, la mayor sobreexpresión de YFP se dio

empleando el vector pSF-p15A-trc-YFP. El análisis cuantitativo con este vector reveló una concentración máxima de YFP de 53,09 mg/L de cultivo, la cual coincide con otros estudios centrados en la producción de GFP en *E. coli* [63], [64]. Por el contrario, P_{BAD} mostró una mayor expresión de YFP con los plásmidos con el ori pMB1', relacionados con un elevado número de copias, probablemente debido a la menor fuerza del promotor BAD con respecto al *lac* [41]. Los vectores de alto número de copias se han asociado previamente a una menor producción de proteínas que los plásmidos de bajo y medio número de copias [65], [66]. Así, la combinación de un origen de replicación con alto número de copias y un promotor fuerte, probablemente, provocó una carga o desajuste metabólico, que desencadenó una disminución de la producción de YFP. Este desajuste metabólico ha sido, y sigue siendo, ampliamente estudiado, ya que implica una pérdida de productividad [50]. De esta manera, no sólo la producción de proteínas recombinantes, sino también la presencia del plásmido en la célula huésped provoca tanto consecuencias metabólicas y fisiológicas, como alteraciones en la tasa de crecimiento o la expresión diferencial de enzimas metabólicas esenciales, e incluso inestabilidad del plásmido [66].

Para ahondar en el conocimiento de la relación entre la expresión de la YFP y el desajuste metabólico, se calcularon las velocidades de crecimiento de las cepas sin plásmido, las cepas con plásmido sin promotor y de los cultivos con la mayor expresión de YFP observada para cada vector (Tabla 3). Las cepas *E. coli* wt y $\Delta ackA$ sin plásmidos mostraron las mayores velocidades de crecimiento. Cuando se introdujo el vector sin promotor la velocidad de crecimiento disminuyó, lo que revela un desajuste metabólico debido a la replicación y el mantenimiento del ADN plasmídico adicional en la célula [50]. Al comparar las cepas que contenían vectores pMB1' con p15A, los plásmidos con un número de copias elevado provocaron una mayor disminución de la velocidad de crecimiento. El conocimiento de por qué se produce este desajuste metabólico es aún insuficiente, ciertos estudios apuntan a un colapso en la maquinaria de traducción celular ante un exceso de ARNm extrínseco del gen/genes heterólogos, lo que está en concordancia con las velocidades de crecimiento observadas en este estudio (Tabla 3) [17], [25]. Además, la disminución de la velocidad de crecimiento también mostró una dependencia de la fuerza del promotor, aunque menor que la del origen de replicación. Este resultado pone de manifiesto que el desajuste metabólico se debe principalmente a la transcripción y, en menor medida, a la traducción de proteínas recombinantes, algo que se ha discutido recientemente [67].

El glicerol se ha convertido en una potencial alternativa a la glucosa debido a su bajo costo y a que es un subproducto de la producción de biodiesel [68]. Los resultados obtenidos en este estudio mostraron una expresión similar en los cultivos creciendo con glucosa o glicerol como fuente de carbono, por lo tanto, el glicerol puede ser una buena alternativa sin involucrar una disminución en el rendimiento final. En cuanto a la cepa deficiente en *ackA*, la expresión con vectores de alto número de copias fue menor que la observada para la cepa silvestre. Sin embargo, cuando se emplearon plásmidos de bajo número de copias, la cepa $\Delta ackA$ mostró una expresión similar a la de wt. La baja expresión observada con pMB1' se debió probablemente a un aumento del desajuste metabólico causado por la delección del gen *ackA*, lo que concuerda con las bajas velocidades de crecimiento (Tabla 3). Así, el mutante deficiente en el gen *ackA* mostró aproximadamente la mitad de la velocidad de crecimiento de wt. En estudios anteriores se observó un aumento de la expresión de la proteína recombinante cuando se utilizó la cepa *E. coli* BL21 $\Delta ackA$ como huésped, pues la delección de *ackA* evita el desbordamiento de acetato y el desperdicio de energía asociado a él. Sin embargo, en ninguno de estos estudios se utilizó un plásmido con un número de copias tan elevado como con el empleo de pMB1' [10], [48], [49]. Hasta donde sabemos, este es el primer estudio de expresión realizado en *E. coli* BL21 $\Delta ackA$ con un plásmido de alto número de copias y un promotor fuerte.

Por último, para optimizar un proceso de producción de proteínas recombinantes a gran escala, es esencial determinar qué proporción de la proteína se agregará y precipita y qué fracción permanece en forma soluble, y por lo tanto funcional para la mayoría de las aplicaciones posteriores. Esta diferencia observada en la cantidad de proteína precipitada según el plásmido de expresión utilizado es muy relevante, ya que es inútil lograr una alta expresión si la mayor parte de la proteína precipita junto con los restos celulares. Por lo tanto, este aspecto debe ser estudiado previamente a la hora de seleccionar un sistema de expresión, especialmente si nos encontramos ante una proteína con solubilidad limitada. En este estudio observamos una relación entre la mayor expresión de proteína recombinante con la mayor proporción de proteína insoluble (Figura 5). Por lo que no se mostró un perfil de dependencia de la solubilidad de la proteína con respecto al vector empleado.

Se sabe que el desajuste metabólico asociado a la expresión de proteínas heterólogas en huéspedes microbianos es uno de los principales inconvenientes para lograr altos rendimientos de proteínas recombinantes. Como se ha demostrado en este

estudio, los efectos negativos de este desequilibrio pueden minimizarse ajustando la expresión del gen heterólogo mediante el equilibrio entre el número de copias del vector y la fuerza del promotor. Por lo tanto, los estudios sobre el número de copias del plásmido, combinados con el tipo de origen de replicación y las características del promotor, proporcionan información importante para mejorar la biología sintética en la aplicación del método de producción de proteínas y metabolitos heterólogos [69], [70]. En conclusión, los resultados muestran la importancia de la optimización del sistema de transcripción según las características de cada proceso para lograr un resultado exitoso.

Referencias

- [1] L. Sanchez-Garcia, L. Martín, R. Mangues, N. Ferrer-Miralles, E. Vázquez, and A. Villaverde, "Recombinant pharmaceuticals from microbial cells: a 2015 update," *Microb. Cell Fact.*, vol. 15, no. 33, pp. 1–7, 2016, doi: 10.1186/s12934-016-0437-3.
- [2] C. P. S. Badenhorst and U. T. Bornscheuer, "Getting Momentum: From Biocatalysis to Advanced Synthetic Biology," *Trends Biochem. Sci.*, vol. 43, no. 3, pp. 180–198, 2018, doi: 10.1016/j.tibs.2018.01.003.
- [3] N. S. Mccarty and R. Ledesma-amaro, "Synthetic Biology Tools to Engineer Microbial Communities for Biotechnology," *Trends Biochem. Sci.*, vol. 37, no. 2, pp. 181–197, 2019, doi: 10.1016/j.tibtech.2018.11.002 181.
- [4] R. Assenberg, P. T. Wan, S. Geisse, and L. M. Mayr, "Advances in recombinant protein expression for use in pharmaceutical research," *Curr. Opin. Struct. Biol.*, vol. 23, no. 3, pp. 393–402, 2013, doi: 10.1016/j.sbi.2013.03.008.
- [5] J. Gallego-Jara, T. de Diego, Á. del Real, A. Écija-Conesa, A. Manjón, and M. Cánovas, "Lycopene overproduction and in situ extraction in organic-aqueous culture systems using a metabolically engineered *Escherichia coli*," *AMB Express*, vol. 5, no. 65, pp. 1–11, 2015, doi: 10.1186/s13568-015-0150-3.
- [6] A. A. Aristidou, K. Y. San, and G. N. Bennett, "Improvement of Biomass Yield and Recombinant Gene Expression in *Escherichia coli* by Using Fructose as the Primary Carbon Source," *Biotechnol. Prog.*, vol. 15, no. 1, pp. 140–145, Feb. 1999, doi: 10.1021/bp980115v.
- [7] S. Balzer, V. Kucharova, J. Megerle, R. Lale, T. Brautaset, and S. Valla, "A comparative analysis of the properties of regulated promoter systems commonly used for recombinant gene expression in *Escherichia coli*," *Microb. Cell Fact.*, vol. 12, no. 26, pp. 1–14, 2013, doi: 10.1186/1475-2859-12-26.
- [8] D. Niu *et al.*, "Highly efficient L-lactate production using engineered *Escherichia coli* with dissimilar temperature optima for L-lactate formation and cell growth," *Microb. Cell Fact.*, vol. 13, no. 78, pp. 1–11, 2014, doi: 10.1186/1475-2859-13-78.
- [9] V. Bernal, S. Castaño-Cerezo, and M. Cánovas, "Acetate metabolism regulation in *Escherichia coli*: carbon overflow, pathogenicity, and beyond," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 100, no. 21, pp. 8985–9001, 2016, doi: 10.1007/s00253-016-7832-x.
- [10] G. Lozano Terol, J. Gallego-Jara, R. A. Sola Martínez, M. Cánovas Díaz, and T. De Diego Puente, "Engineering protein production by rationally choosing a carbon and nitrogen source using *E. coli* BL21 acetate metabolism knockout strains," *Microb. Cell Fact.*, vol. 18, no. 151, pp. 1–19, 2019, doi: 10.1186/s12934-019-1202-1.
- [11] J. Wu, S. Cheng, J. Cao, J. Qiao, and G. R. Zhao, "Systematic Optimization of Limonene Production in Engineered *Escherichia coli*," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 67, no. 25, pp. 7087–7097, 2019, doi: 10.1021/acs.jafc.9b01427.
- [12] C. J. Huang, H. Lin, and X. Yang, "Industrial production of recombinant therapeutics in *Escherichia coli* and its recent advancements," *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 39, no. 3, pp. 383–399, 2012, doi: 10.1007/s10295-011-1082-9.
- [13] Z. D. Blount, "The unexhausted potential of *E. coli*," *Elife*, vol. 4, pp. 1–12, 2015, doi: 10.7554/eLife.05826.

- [14] C. Sathesh-Prabu and S. K. Lee, "Genome editing tools for *Escherichia coli* and their application in metabolic engineering and synthetic biology," in *Emerging Areas in Bioengineering*, W.-V. V. G. & (Germany: C. HoNam Co), Ed. 2017, pp. 305–319.
- [15] V.-M. N. Idalia and F. Bernardo, "*Escherichia coli* as a Model Organism and Its Application in Biotechnology," in *Escherichia coli - Recent Advances on Physiology, Pathogenesis and Biotechnological Applications*, S. Amidou., 2017, pp. 253–274.
- [16] W. Xu, E. Klumbys, E. L. Ang, and H. Zhao, "Emerging molecular biology tools and strategies for engineering natural product biosynthesis," *Metab. Eng. Commun.*, vol. 10, no. e00108, pp. 1–12, 2020, doi: 10.1016/j.mec.2019.e00108.
- [17] J. Mairhofer, T. Scharl, K. Marisch, M. Cserjan-puschmann, and G. Striedner, "Comparative Transcription Profiling and In-Depth Characterization of Plasmid-Based and Plasmid-Free *Escherichia coli* Expression Systems under Production Conditions," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 79, no. 12, pp. 3802–3812, 2013, doi: 10.1128/AEM.00365-13.
- [18] L. Marschall, P. Sagmeister, and C. Herwig, "Tunable recombinant protein expression in *E. coli*: promoter systems and genetic constraints," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 101, no. 2, pp. 501–512, 2017, doi: 10.1007/s00253-016-8045-z.
- [19] F. Baig, L. P. Fernando, M. A. Salazar, R. R. Powell, T. F. Bruce, and S. W. Harcum, "Dynamic transcriptional response of *Escherichia coli* to inclusion body formation," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 111, no. 5, pp. 980–999, 2014, doi: 10.1002/bit.25169.
- [20] C. Gurramkonda, S. K. Gudi, and B. S. Koritala, "Strategies for the Production of Soluble Recombinant Proteins Using *Escherichia coli*: A Review," *J. Mol. Biol. Biotechnol.*, vol. 3, no. 1:6, pp. 1–8, 2018.
- [21] C. Slouka, J. Kopp, D. Strohmer, J. Kager, O. Spadiut, and C. Herwig, "Monitoring and control strategies for inclusion body production in *E. coli* based on glycerol consumption," *J. Biotechnol.*, vol. 296, pp. 75–82, 2019, doi: 10.1016/j.jbiotec.2019.03.014.
- [22] C. J. Chiang, M. C. Hu, and Y. P. Chao, "A Strategy to Improve Production of Recombinant Proteins in *Escherichia coli* Based on a Glucose-Glycerol Mixture and Glutamate," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 68, no. 33, pp. 8883–8889, 2020, doi: 10.1021/acs.jafc.0c03671.
- [23] J. Kumar, A. S. Chauhan, R. L. Shah, J. A. Gupta, and A. S. Rathore, "Amino acid supplementation for enhancing recombinant protein production in *E. coli*," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 117, no. 8, pp. 2420–2433, 2020, doi: 10.1002/bit.27371.
- [24] R. Wang, S. Zhao, Z. Wang, and M. A. Koffas, "Recent advances in modular co-culture engineering for synthesis of natural products," *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 62, pp. 65–71, 2020, doi: 10.1016/j.copbio.2019.09.004.
- [25] J. Tan *et al.*, "Independent component analysis of *E. coli*'s transcriptome reveals the cellular processes that respond to heterologous gene expression," *Metab. Eng.*, vol. 61, pp. 360–368, 2020, doi: 10.1016/j.ymben.2020.07.002.
- [26] Z. Li and U. Rinas, "Recombinant protein production-associated metabolic burden reflects anabolic constraints and reveals similarities to a carbon overfeeding response," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 118, no. 1, pp. 94–105, 2021, doi: 10.1002/bit.27553.

- [27] A. Zaslaver *et al.*, “A comprehensive library of fluorescent transcriptional reporters for *Escherichia coli*,” *Nat. Methods*, vol. 3, no. 8, pp. 623–628, 2006, doi: 10.1038/nmeth895.
- [28] M. De Mey, J. Maertens, G. J. Lequeux, W. K. Soetaert, and E. J. Vandamme, “Construction and model-based analysis of a promoter library for *E. coli*: An indispensable tool for metabolic engineering,” *BMC Biotechnol.*, vol. 7, no. 34, pp. 1–14, 2007, doi: 10.1186/1472-6750-7-34.
- [29] Z. Wang, L. Jin, Z. Yuan, G. Wegrzyn, and A. Wegrzyn, “Classification of plasmid vectors using replication origin, selection marker and promoter as criteria,” *Plasmid*, vol. 61, no. 1, pp. 47–51, 2009, doi: 10.1016/j.plasmid.2008.09.003.
- [30] G. L. Rosano and E. A. Ceccarelli, “Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Advances and challenges,” *Front. Microbiol.*, vol. 5, no. 172, pp. 1–17, 2014, doi: 10.3389/fmicb.2014.00172.
- [31] J. Yang, A. J. Ruff, S. N. Hamer, F. Cheng, and U. Schwaneberg, “Screening through the PLICable promoter toolbox enhances protein production in *Escherichia coli*,” *Biotechnol. J.*, vol. 11, no. 12, pp. 1639–1647, 2016, doi: 10.1002/biot.201600270.
- [32] A. J. Jervis *et al.*, “SelProm: A Queryable and Predictive Expression Vector Selection Tool for *Escherichia coli*,” *ACS Synth. Biol.*, vol. 8, no. 7, pp. 1478–1483, 2019, doi: 10.1021/acssynbio.8b00399.
- [33] G. L. Rosano, E. S. Morales, and E. A. Ceccarelli, “New tools for recombinant protein production in *Escherichia coli*: A 5-year update,” *Protein Sci.*, vol. 28, no. 8, pp. 1412–1422, 2019, doi: 10.1002/pro.3668.
- [34] B. Müller-Hill, L. Crapo, and W. Gilbert, “Mutants that mke more lac repressor.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 59, no. 4, pp. 1259–1264, 1968, doi: 10.1073/pnas.59.4.1259.
- [35] A. E. Silverstone, R. R. Arditti, and B. Magasanik, “Catabolite-insensitive revertants of *lac* promoter mutants.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 66, no. 3, pp. 773–779, 1970, doi: 10.1073/pnas.66.3.773.
- [36] K. Terpe, “Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: From molecular and biochemical fundamentals to commercial systems,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 72, no. 2, pp. 211–222, 2006, doi: 10.1007/s00253-006-0465-8.
- [37] T. Brautaset, R. Lale, and S. Valla, “Positively regulated bacterial expression systems,” *Microb. Biotechnol.*, vol. 2, no. 1, pp. 15–30, 2009, doi: 10.1111/j.1751-7915.2008.00048.x.
- [38] J. N. Phue, J. L. Sang, L. Trinh, and J. Shiloach, “Modified *Escherichia coli* B (BL21), a superior producer of plasmid DNA compared with *Escherichia coli* K (DH5 α),” *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 101, no. 4, pp. 831–836, 2008, doi: 10.1002/bit.21973.
- [39] F. W. Studier, A. H. Rosenberg, J. J. Dunn, and J. W. Dubendorff, “Use of T7 RNA Polymerase to Direct Expression of Cloned Genes,” *Methods Enzymol.*, vol. 185, pp. 60–89, 1990, doi: 10.1109/MSP.2007.273050.
- [40] N. Mertens, E. Remaut, and W. Fiers, “Versatile, multi-featured plasmids for high-level expression of heterologous genes in *Escherichia coli*: overproduction of human and murine cytokines,” *Gene*, vol. 164, no. 1, pp. 9–15, 1995, doi:

10.1016/0378-1119(95)00505-Z.

- [41] L. M. Guzman, D. Belin, M. j. Carson, and J. Beckwith, "Tight Regulation, Modulation, and High-Level Expression by Vectors Containing the Arabinose PBAD Promoter," *J. Bacteriol.*, vol. 177, no. 4, pp. 4121–4130, 1995, doi: 10.1128/jb.177.14.4121-4130.1995.
- [42] C. D. Smolke and J. D. Keasling, "Effect of copy number and mRNA processing and stabilization on transcript and protein levels from an engineered dual-gene operon," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 78, no. 4, pp. 412–424, 2002, doi: 10.1002/bit.10218.
- [43] M. Jahn, C. Vorpahl, T. Hübschmann, H. Harms, and S. Müller, "Copy number variability of expression plasmids determined by cell sorting and droplet digital PCR," *Microb. Cell Fact.*, vol. 15, no. 211, pp. 1–12, 2016, doi: 10.1186/s12934-016-0610-8.
- [44] S. Lin-Chao, W. -T Chen, and T. -T Wong, "High copy number of the pUC plasmid results from a Rom/Rop-suppressible point mutation in RNA II," *Mol. Microbiol.*, vol. 6, no. 22, pp. 3385–3393, 1992, doi: 10.1111/j.1365-2958.1992.tb02206.x.
- [45] S. K. Lee and J. D. Keasling, "A propionate-inducible expression system for enteric bacteria," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 71, no. 11, pp. 6856–6862, 2005, doi: 10.1128/AEM.71.11.6856-6862.2005.
- [46] Y. J. Choi *et al.*, "Novel, versatile, and tightly regulated expression system for *Escherichia coli* strains," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 76, no. 15, pp. 5058–5066, 2010, doi: 10.1128/AEM.00413-10.
- [47] H. Wu, J. Pei, Y. Jiang, X. Song, and W. Shao, "pHsh vectors, a novel expression system of *Escherichia coli* for the large-scale production of recombinant enzymes," *Biotechnol. Lett.*, vol. 32, no. 6, pp. 795–801, 2010, doi: 10.1007/s10529-010-0223-Y.
- [48] J. Y. H. Kim and H. J. Cha, "Down-regulation of acetate pathway through antisense strategy in *Escherichia coli*: Improved foreign protein production," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 83, no. 7, pp. 841–853, 2003, doi: 10.1002/bit.10735.
- [49] T. S. Kim *et al.*, "Reduction of acetate and lactate contributed to enhancement of a recombinant protein production in *E. coli* BL21," *J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 25, no. 7, pp. 1093–1100, 2015, doi: 10.4014/jmb.1503.03023.
- [50] G. Wu, Q. Yan, J. A. Jones, Y. J. Tang, S. S. Fong, and M. A. G. Koffas, "Metabolic Burden: Cornerstones in Synthetic Biology and Metabolic Engineering Applications," *Trends Biotechnol.*, vol. 34, no. 8, pp. 652–664, 2016, doi: 10.1016/j.tibtech.2016.02.010.
- [51] M. J. Mühlmann, E. Forsten, S. Noack, and J. Büchs, "Prediction of recombinant protein production by *Escherichia coli* derived online from indicators of metabolic burden," *Biotechnol. Prog.*, vol. 34, no. 6, pp. 1543–1552, 2018, doi: 10.1002/btpr.2704.
- [52] Y. Ning, X. Wu, C. Zhang, Q. Xu, N. Chen, and X. Xie, "Pathway construction and metabolic engineering for fermentative production of ectoine in *Escherichia coli*," *Metab. Eng.*, vol. 36, pp. 10–18, 2016, doi: 10.1016/j.ymben.2016.02.013.
- [53] S. Cleto, J. V. K. Jensen, V. F. Wendisch, and T. K. Lu, "*Corynebacterium glutamicum*

- Metabolic Engineering with CRISPR Interference (CRISPRi),” *ACS Synth. Biol.*, vol. 5, no. 5, pp. 375–385, 2016, doi: 10.1021/acssynbio.5b00216.
- [54] D. Hanahan, “Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids,” *J. Mol. Biol.*, vol. 166, no. 4, pp. 557–80, Jun. 1983, doi: 10.1016/s0022-2836(83)80284-8.
- [55] C. T. Rueden *et al.*, “ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data,” *BMC Bioinformatics*, vol. 18, no. 529, pp. 1–26, 2017, doi: 10.1186/s12859-017-1934-z.
- [56] G. Selzer, T. Som, T. Itoh, and J. ichi Tomizawa, “The origin of replication of plasmid p15A and comparative studies on the nucleotide sequences around the origin of related plasmids,” *Cell*, vol. 32, no. 1, pp. 119–129, 1983, doi: 10.1016/0092-8674(83)90502-0.
- [57] G. J. Gopal and A. Kumar, “Strategies for the production of recombinant protein in *Escherichia coli*,” *Protein J.*, vol. 32, no. 6, pp. 419–425, 2013, doi: 10.1007/s10930-013-9502-5.
- [58] A. Khlebnikov and J. D. Keasling, “Effect of *lacY* expression on homogeneity of induction from the Ptac and Ptrc promoters by natural and synthetic inducers,” *Biotechnol. Prog.*, vol. 18, no. 3, pp. 672–674, 2002, doi: 10.1021/bp010141k.
- [59] T. Afroz, K. Biliouris, Y. Kaznessis, and C. L. Biesel, “Bacterial sugar utilization gives rise to distinct single-cell behaviors,” *Mol. Microbiol.*, vol. 93, no. 6, pp. 1093–1103, 2014, doi: 10.1111/mmi.12695.
- [60] R. Schleif, “AraC protein, regulation of the l-arabinose operon in *Escherichia coli*, and the light switch mechanism of AraC action,” *FEMS Microbiol. Rev.*, vol. 34, no. 5, pp. 779–796, 2010, doi: 10.1111/j.1574-6976.2010.00226.x.
- [61] P. Penumetcha, K. Lau, X. Zhu, K. Davis, T. T. Eckdahl, and A. M. Campbell, “Improving the Lac System for Synthetic Biology,” *Bios*, vol. 81, no. 1, pp. 7–15, 2010, doi: 10.1893/011.081.0104.
- [62] B. Görke and J. Stülke, “Carbon catabolite repression in bacteria: Many ways to make the most out of nutrients,” *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 6, no. 8, pp. 613–624, 2008, doi: 10.1038/nrmicro1932.
- [63] F. N. Chew, W. S. Tan, H. C. Boo, and B. T. Tey, “Statistical optimization of green fluorescent protein production from *Escherichia coli* BL21(DE3),” *Prep. Biochem. Biotechnol.*, vol. 42, no. 6, pp. 535–550, 2012, doi: 10.1080/10826068.2012.660903.
- [64] J. C. Frago Jiméneez *et al.*, “Growth-dependent recombinant product formation kinetics can be reproduced through engineering of glucose transport and is prone to phenotypic heterogeneity,” *Microb. Cell Fact.*, vol. 18, no. 26, pp. 1–16, 2019, doi: 10.1186/s12934-019-1073-5.
- [65] K. L. Jones, S. W. Kim, and J. D. Keasling, “Low-copy plasmids can perform as well as or better than high-copy plasmids for metabolic engineering of bacteria,” *Metab. Eng.*, vol. 2, no. 4, pp. 328–338, 2000, doi: 10.1006/mben.2000.0161.
- [66] F. Silva, J. A. Queiroz, and F. C. Domingues, “Evaluating metabolic stress and plasmid stability in plasmid DNA production by *Escherichia coli*,” *Biotechnol. Adv.*, vol. 30, no. 3, pp. 691–708, 2012, doi: 10.1016/j.biotechadv.2011.12.005.

- [67] Z. Li and U. Rinas, "Recombinant protein production associated growth inhibition results mainly from transcription and not from translation," *Microb. Cell Fact.*, vol. 19, no. 83, pp. 1–11, 2020, doi: 10.1186/s12934-020-01343-y.
- [68] J. M. Clomburg and R. Gonzalez, "Anaerobic fermentation of glycerol: A platform for renewable fuels and chemicals," *Trends Biotechnol.*, vol. 31, no. 1, pp. 20–28, 2013, doi: 10.1016/j.tibtech.2012.10.006.
- [69] D. Koma, T. Kishida, H. Yamanaka, K. Moriyoshi, E. Nagamori, and T. Ohmoto, "*Escherichia coli* chromosome-based T7-dependent constitutive overexpression system and its application to generating a phenylalanine producing strain," *J. Biosci. Bioeng.*, vol. 126, no. 5, pp. 586–595, 2018, doi: 10.1016/j.jbiosc.2018.05.014.
- [70] F. S. Shariati, M. Keramati, V. Valizadeh, R. A. Cohan, and D. Norouzian, "Comparison of *E. coli* based self-inducible expression systems containing different human heat shock proteins," *Sci. Rep.*, vol. 11, no. 4576, pp. 1–10, 2021, doi: 10.1038/s41598-021-84188-8.

Anexo

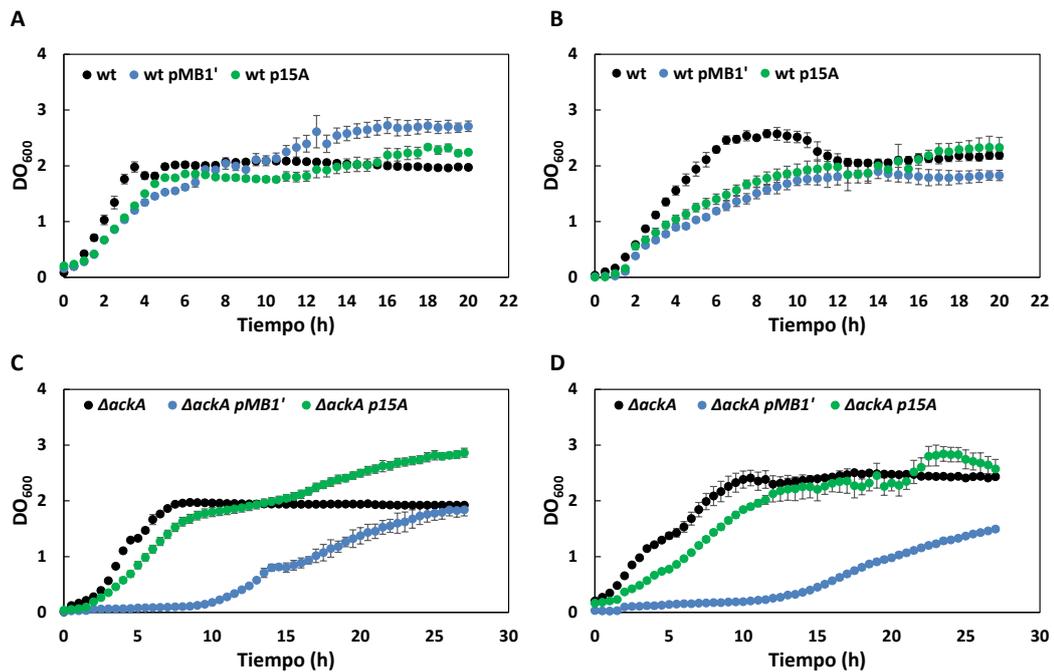


Figura S1: Cepas de *E. coli* BL21 wt y $\Delta ackA$ sin ningún plásmido y conteniendo los vectores de expresión de alto (pMB1') y bajo (p15A) número de copias sin ningún promotor creciendo a DO₆₀₀. (A) *E. coli* BL21 wt vacía o con vectores creciendo en TB7 suplementado con glucosa. (B) *E. coli* BL21 wt vacía o con vectores creciendo en TB7 suplementado con glicerol. (C) *E. coli* BL21 $\Delta ackA$ vacía o con vectores creciendo en TB7 suplementado con glucosa. (D) *E. coli* BL21 $\Delta ackA$ vacía o con vectores creciendo en TB7 suplementado con glicerol.

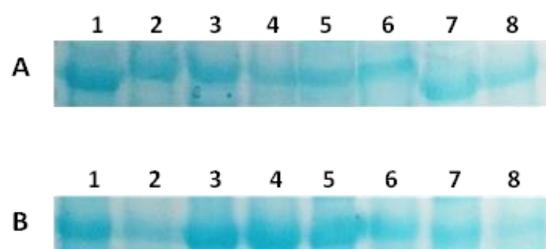


Figura S2: Geles de electroforesis SDS-PAGE de las fracciones de proteínas solubles/insolubles correspondientes a la YFP. (A) Fracciones con YFP soluble/insoluble expresadas con vectores de expresión de alto número de copias (pSF-pMB1'-YFP). (B) Fracciones con YFP soluble/insoluble expresadas con vectores de expresión de bajo número de copias (pSF-p15A-YFP). Calle 1, fracción de YFP soluble expresada bajo control P_{T7lac}. Calle 2, fracción de YFP insoluble expresada bajo control P_{T7lac}. Calle 3, fracción de YFP soluble expresada bajo control P_{trc}. Calle 4, fracción insoluble de YFP expresada bajo control de P_{trc}. Calle 5, fracción de YFP soluble expresada bajo control P_{tac}. Calle 6, fracción de YFP insoluble expresada bajo control de P_{tac}. Calle 7, fracción de YFP soluble expresada bajo control de P_{BAD}. Calle 8, fracción de YFP insoluble expresada bajo control de P_{BAD}.

Capítulo 5

Regulación de la ruta de biosíntesis de pirimidinas por acetilación de la OPR Tasa de Escherichia coli

*Los resultados presentados en este capítulo forman parte de un manuscrito que
está bajo revisión.*

Resumen

La ruta de biosíntesis de pirimidinas *de novo* es una vía esencial debido a la relevancia de sus productos, sus implicaciones en la salud y su conservación entre organismos. En este estudio, investigamos la regulación por acetilación de proteínas de la ruta de biosíntesis de pirimidinas *de novo* en *Escherichia coli*. Para ello se cuantificaron los metabolitos intracelulares y extracelulares de la ruta, evidenciándose un posible bloqueo de esta por acetilación de la enzima OPRTasa. La acetilación química de la OPRTasa con acetil-P implicó una disminución en su actividad enzimática. Para probar el efecto de la acetilación en esta enzima, se seleccionaron los residuos K26 y K103 y se generaron proteínas específicamente acetiladas en estos residuos (OPRTasa-26AcK y OPRTasa-103AcK). El estudio de estas dos proteínas acetiladas reveló grandes diferencias en los parámetros cinéticos, destacando que la k_{cat} de estos mutantes mostró una fuerte disminución de 300 y 150 veces para la OPRTasa-103AcK y de 19 y 6,3 veces para la OPRTasa-26AcK, en las reacciones directa e inversa, respectivamente. Los estudios *in vivo* de esta enzima sugirieron que la acetilación transcurría por un mecanismo no enzimático dependiente de acetil-P y que, además, era revertido por la desacetilasa CobB. Se realizó un ensayo de complementación de una cepa deficiente en el gen *pyrE* con la OPRTasa-26AcK y la OPRTasa-103AcK, y se midió la formación de curli, los parámetros estequiométricos y la excreción de orotato. La complementación con las enzimas acetiladas presentó un perfil muy similar al de la cepa $\Delta pyrE$, especialmente en el caso de la complementación con la OPRTasa-103AcK. Estos resultados apuntan a una regulación de la ruta de biosíntesis de pirimidina *de novo* por acetilación de lisinas de la OPRTasa en *E. coli*. Este hallazgo es de gran relevancia debido al papel esencial de esta ruta y de la enzima OPRTasa como diana para tratamientos antimicrobianos, antivirales y contra el cáncer.

Introducción

Los nucleótidos de pirimidina y purina son compuestos esenciales en todos los organismos vivos, ya que son los componentes básicos de los ácidos nucleicos. Asimismo, son necesarios para la biosíntesis de fosfolípidos y glucógeno, y están involucrados en el metabolismo intermediario como constituyentes de coenzimas, reactivos de fosforilación, moléculas de señal metabólica y moduladores alostéricos [1], [2]. Los nucleótidos de purina y pirimidina se sintetizan *de novo* o se reutilizan a partir de nucleósidos y bases

libres exógenas en las rutas de rescate o salvamento. La ruta de biosíntesis de nucleótidos pirimidina *de novo* está evolutivamente conservada entre los organismos para sintetizar uridina 5-monofosfato (UMP), el precursor de todos los nucleótidos de pirimidina, que posteriormente se transforma en UTP (uridina 5-trifosfato) y CTP (citidina 5-trifosfato) [1], [3], [4]. En *Escherichia coli* (*E. coli*), el bicarbonato se convierte en UMP en seis pasos, en los que intervienen el L-aspartato, la L-glutamina y el 5-fosfo- α -D-ribose 1-difosfato (PRPP). El primer paso, llevado a cabo por la enzima carbamoil fosfato sintetasa (CPSasa; EC 6.3.5.5), es común para la biosíntesis de pirimidinas y la de arginina. La CPSasa sintetiza carbamoil fosfato (CP) a partir de bicarbonato, ATP (adenosina 5-trifosfato) y L-glutamina [5]. El CP se condensa con el L-aspartato para formar N-carbamoil-L-aspartato (CASP) por la aspartato carbamoiltransferasa (ATCasa; EC 2.1.3.2) [6]. El tercer paso, realizado por la dihidroorotasa (DHOasa; EC 3.5.2.3), consiste en la ciclación del CASP para formar el dihidroorotato (DHO), el primer compuesto de anillo de pirimidina de la ruta [7]. Posteriormente, el DHO se oxida a orotato por la acción de la dihidroorotato deshidrogenasa (DHODH; EC 1.3.5.2) [8]. El quinto paso lo lleva a cabo la orotato fosforribosiltransferasa (OPRTasa; EC 2.4.2.10), y consiste en la formación del primer nucleótido de pirimidina, la orotidina 5'-monofosfato (OMP), por la condensación del orotato y el PRPP [9]. Finalmente, el OMP es descarboxilado a UMP por la orotidina 5'-fosfato descarboxilasa (OMPDC; EC 4.1.1.23) [10] (Figura 1).

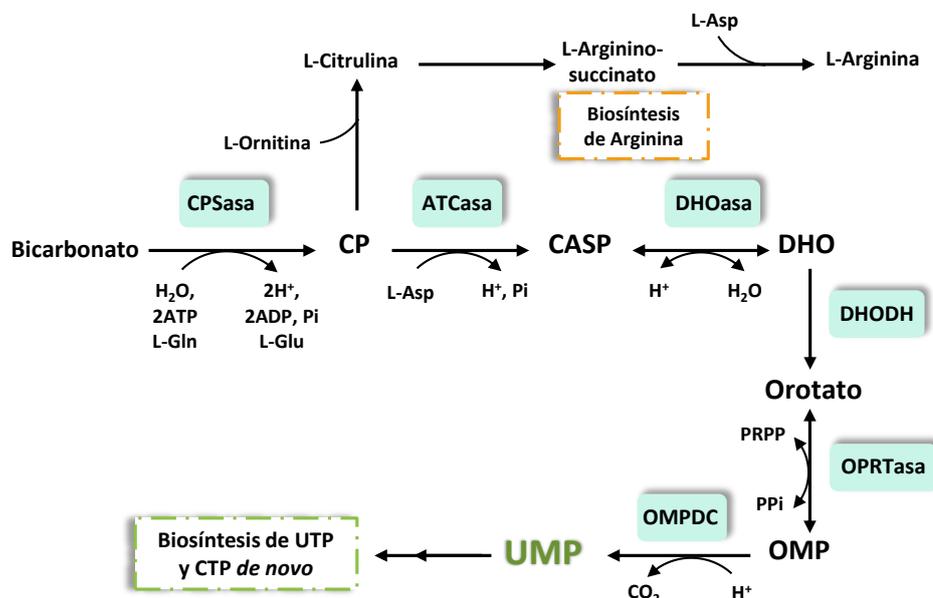


Figura 1: Ruta de biosíntesis de pirimidinas *de novo* en *E. coli*. CPSasa, enzima carbamoil fosfato sintetasa; CP, carbamoil fosfato; CASP, N-carbamoil-L-aspartato; ATCasa, aspartato carbamoiltransferasa; DHOasa, dihidroorotasa; DHO, dihidroorotato; DHODH, dihidroorotato deshidrogenasa; OPRTasa, orotato fosforribosiltransferasa; OMP, orotidina 5'-monofosfato; OMPDC, orotidina 5'-fosfato descarboxilasa; UMP, uridina 5-monofosfato.

La ruta biosintética de pirimidinas *de novo* está regulada a nivel de expresión génica y a nivel enzimático por control alostérico, con la finalidad de conservar recursos debido a la relevancia de los productos de esta ruta y sus implicaciones en la salud [2]. En humanos, la deficiencia celular de pirimidinas desencadena la señalización inmunitaria innata [11], y la mutación o deficiencia de algunos genes de la vía conduce a trastornos metabólicos graves, como la aciduria orótica hereditaria [12], y trastornos neurológicos [13], como el síndrome de Miller [14]. Curiosamente, se ha encontrado un desequilibrio en esta vía en el cerebro de pacientes con enfermedad de Alzheimer, por lo que la suplementación con uridina podría usarse como tratamiento para esos pacientes [15]. Además, la regulación al alza de algunas enzimas de esta ruta indica un mal pronóstico en pacientes con cáncer, por lo que estos genes son dianas anticancerígenas atractivas para inhibir la proliferación celular y la metástasis [16]–[19]. Asimismo, la replicación viral se basa en el anfitrión para el suministro de nucleótidos, por lo tanto, las enzimas de esta ruta son objetivos para los tratamientos antivirales [20]–[23]. También, la inhibición de las enzimas de la biosíntesis de pirimidinas se emplea para el tratamiento de infecciones por microorganismos y parásitos [24]–[27].

En este trabajo nos centramos en la OPRTasa, la quinta enzima de la ruta de biosíntesis de pirimidinas *de novo*, que pertenece a la familia de las fosforribosiltransferasas (PRTasas). Las enzimas PRTasas juegan un papel clave en el metabolismo de nucleótidos de pirimidina y purina y en la biosíntesis de triptófano e histidina [28]. Las PRTasas constituyen dos grupos evolutivos basados en diferentes arquitecturas del sitio activo. Las enzimas de tipo I, entre las que se encuentran las OPRTasas, muestran un pliegue de Rossmann y una arquitectura del sitio activo expuesta al solvente, mientras que el sitio activo de las enzimas de tipo II constituye una arquitectura de barril TIM [29]. Este último grupo incluye la nicotinamida fosforribosiltransferasa (NAMPT) cuya actividad está regulada por acetilación [30]. En humanos, las enzimas PRTasas han sido ampliamente estudiadas y los cambios en la secuencia de ADN de sus genes están asociados con patologías como la litiasis por 2,8-dihidroxiadenina, el síndrome de Lesch-Nyhan y la aciduria orótica [31].

Además, la enzima OPRTasa contribuye a la fosforilación y activación del profármaco de quimioterapia 5-fluorouracilo [32] y constituye una diana atractiva para tratamientos antiparasitarios o antimicrobianos [24], [25]. La OPRTasa está codificada por el gen *pyrE* cuya expresión está regulada por la atenuación transcripcional [2], [33]–[35]. Es importante señalar que la acetilación de la OPRTasa se ha detectado en varios estudios

de análisis proteómico de *E. coli* [36]–[41], pero se desconoce el impacto de la acetilación en la enzima.

la Nε-acetilación de lisinas es una importante modificación postraduccional de proteínas (MPT) que controla muchos procesos celulares [42]. En *E. coli*, la lisín-acetiltransferasa (KAT) más estudiada es PatZ [43], también conocida como Pka y YfiQ, aunque se han identificado otras enzimas lisín-acetiltransferasas, como YiaC [37]. Sin embargo, la evidencia acumulada indica que la principal vía de acetilación en esta bacteria es la vía no enzimática dependiente de acetil-fosfato (acetil-P), y la acetilación global se correlaciona positivamente con la concentración de acetil-P intracelular en respuesta al estado energético [36], [38], [44]. Además, la acetilación de lisinas puede revertirse mediante la única desacetilasa dependiente de NAD⁺ (nicotinamida adenina dinucleótido) conocida en *E. coli* llamada CobB [44], [45].

El presente estudio tiene como objetivo revelar si la ruta de biosíntesis de pirimidinas *de novo* en *E. coli* puede estar regulada mediante acetilación de lisinas. Para alcanzar este objetivo, se midieron las concentraciones intracelulares y extracelulares de los metabolitos de la ruta en la cepa deficiente en la desacetilasa CobB y en la cepa silvestre (wt). Los resultados mostraron diferencias significativas en las concentraciones de ácido orótico y UMP entre ambas cepas, lo que sugirió una regulación de la ruta por acetilación de lisinas a nivel de la enzima OPRTasa. Se observó una actividad más baja para la OPRTasa acetilada *in vitro* y se seleccionaron dos residuos de lisina de la enzima, K26 y K103, para modificarlos mediante la estrategia de expansión del código genético. La acetilación de los residuos K26 y K103 de la OPRTasa implicó una gran pérdida de actividad *in vitro*. Además, los ensayos de complementación *in vivo* de una cepa deficiente en el gen *pyrE* suplementada con la OPRTasa con los residuos K26 o K103 acetilados, no mostraron recuperación de las funciones de la OPRTasa control, con un comportamiento similar al de la cepa $\Delta pyrE$. Estos resultados indican una regulación de la ruta de biosíntesis de pirimidinas *de novo* por acetilación de lisinas de la OPRTasa, una enzima esencial de la ruta de síntesis de pirimidinas *de novo* y un objetivo atractivo para tratamientos antimicrobianos, antivirales y anticancerígenos.

Materiales y Métodos

Biología molecular: construcción de plásmidos e incorporación de Nε-acetil-lisina en las posiciones K26 y K103 de la OPRTasa

Todas las cepas, plásmidos y cebadores empleados en este estudio se enumeran en la Tabla S1 del Anexo. Todas las enzimas de biología molecular empleadas se adquirieron de Thermo Fisher Scientific. Las cepas deficientes *E. coli* K12 BW25113 $\Delta pyrE$ y *E. coli* BL21 (D3) $\Delta yiaC$ se construyeron empleando el método de la recombinasa Red del fago lambda [46]. Para sobreexpresar la proteína OPRTasa, el gen *pyrE* se insertó en los plásmidos pRSET-A o pET28a-*mbp*, obteniéndose los vectores pRSET-*pyrE* y pET28a-*mbp-pyrE*. Por su parte, para sobreexpresar la proteína ATCasa, se insertó el gen *pyrBI* en el vector pRSET-A, dando lugar al plásmido pRSET-*pyrBI*.

Para incorporar específicamente la Nε-acetil-L-lisina en las posiciones K26 o K103 de la proteína OPRTasa se empleó la técnica de la expansión del código genético. Para ello, se utilizó el vector modificado pRSF-Duet-1 [47] (amablemente cedido por el Prof. Michael Lammers, de la Universidad de Colonia) que codifica para la acetil-lisil-ARNt-sintetasa sintéticamente evolucionada, AcKRS3, y el codón supresor ámbar ARNt_{CUA}, MbARNt_{CUA} (derivado de *Methanosarcina barkeri*). El gen *pyrE* fue modificado en las posiciones 26 o 103 por mutagénesis dirigida a partir del vector pET28a-*mbp-pyrE* para incorporar un codón de parada ámbar (TAG) en estas posiciones. Los genes *mbp-pyrE*^{26ambar} y *mbp-pyrE*^{103ambar} se amplificaron por PCR a partir de los vectores pET28a-*mbp-pyrE*^{26ambar} y pET28a-*mbp-pyrE*^{103ambar} y se clonaron en el vector pRSF-Duet-1-acetil-ARNt-sintetasa AcKRS3/MbtRNA_{CUA}, para obtener los vectores pRSF-*mbp-pyrE*^{26Ack} y pRSF-*mbp-pyrE*^{103Ack}.

Para la complementación de *E. coli* K12 $\Delta pyrE$ con las proteínas OPRTasa, OPRTasa-26Ack y OPRTasa-103Ack, se construyeron plásmidos con promotor P_{BAD} inducido positivamente por L-arabinosa (pSF-pMB1'-BAD-*mbp-pyrE*, pRSF-BAD-*mbp-pyrE*^{26Ack} y pRSF-BAD-*mbp-pyrE*^{103Ack}). El gen *mbp-pyrE* y el vector pSF-pMB1'-BAD-YFP [48] se amplificaron por PCR para construir el plásmido pSF-pMB1'-BAD-*mbp-pyrE* mediante clonación independiente de secuencia y ligación (SLIC) [49]. Para construir los otros dos plásmidos, se amplificaron por PCR el promotor P_{BAD}, el regulador *araC* del plásmido pBAD24, y los vectores pRSF-*mbp-pyrE*^{26Ack} y pRSF-*mbp-pyrE*^{103Ack}. Los vectores pRSF-BAD-*mbp-pyrE*^{26Ack} y pRSF-BAD-*mbp-pyrE*^{103Ack} se construyeron mediante el método de SLIC.

Ensayo de unión al Rojo Congo

Las cepas de *E. coli* K12 wt, *E. coli* K12 $\Delta cobB$, *E. coli* K12 $\Delta pyrE$ y *E. coli* K12 $\Delta pyrE$ transformada con los vectores pSF-pMB1'-BAD-*mbp-pyrE*, pRSF-BAD-*mbp-pyrE*^{26Ack} y pRSF-BAD-*mbp-pyrE*^{103Ack} se cultivaron 16 h a 37°C en medio TB7 (10 g/L de triptona tamponada a pH 7,0 con fosfato de potasio 100 mM) con glicerol 40 mM. Se utilizó glicerol para la correcta expresión de las proteínas con el promotor P_{BAD}. La expresión de proteínas se indujo durante 8 h mediante la adición de 2 mM de arabinosa, y para la expresión de proteínas acetiladas, también se añadieron nicotinamida 20 mM y Nε-acetil-L-lisina 10 mM. Se sembró una alícuota de 5 µL de cada cultivo de las distintas cepas en placas YESCA (extracto de levadura 0,5 g/L, casaminoácidos 10 g/L y agar 20 g/L) suplementadas con Rojo Congo 30 µg/mL y Azul de Coomassie 10 µg/mL (medio CR). Las placas se incubaron durante 20 h a 30 °C, y la unión del colorante se detectó mejor después de la incubación a 4 °C durante 48 h. Cuando fue necesario se añadió ampicilina 100 µg/mL o kanamicina 30 µg/mL.

Cuantificación de metabolitos intracelulares y extracelulares de la ruta de biosíntesis de pirimidinas de *novo*

Las cepas de *E. coli* K12 wt y *E. coli* K12 $\Delta cobB$ se cultivaron por duplicado a 37 °C con agitación (250 rpm) en medio mínimo MM9 (10 mM de (NH₄)₂SO₄, 8,5 mM de NaCl, 40 mM de Na₂HPO₄, 20 mM de KH₂PO₄, 185 µM de FeCl₃, 175 µM de EDTA, 7 µM de ZnSO₄, 7 µM de CuSO₄ · 5 H₂O, 7 µM de MnSO₄, 7 µM de CoCl₂, 1 mM de MgSO₄, 0,1 mM de CaCl₂ y 1 µM de tiamina · HCl, pH 7,4) suplementado con glucosa 20 mM. Se seleccionó el medio MM9 para reducir posibles interferencias en el posterior análisis de las muestras. Para el procedimiento de *quenching*, que permitió detener el metabolismo celular lo más rápidamente posible, se empleó el método desarrollado por Spura et al [50]. Se transfirieron rápidamente muestras de 20 mL de cultivo en diferentes tiempos de crecimiento a un tubo Falcon de 50 mL preenfriado (-20 °C) con 20 mL de solución de *quenching* (etanol al 40 % (v/v) y NaCl al 0,8 % (p/v)) y se enfrió, aproximadamente -5°C, en un baño con solución de etilenglicol a -20°C. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a -11 °C durante 5 min a 4000 x g. Los sedimentos celulares se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido. La extracción de metabolitos del sedimento celular se llevó a cabo mediante un método de congelación y descongelación con tampón de extracción (acetonitrilo/metanol/agua (2:2:1)) a -20 °C [51]. Los sedimentos se

resuspendieron en 1 mL de tampón de extracción y se sometieron a tres ciclos de congelación-descongelación (N_2 líquido-baño de etilenglicol a $-20\text{ }^\circ\text{C}$), y luego las muestras se centrifugaron a $-9\text{ }^\circ\text{C}$ durante 10 min a $16000 \times g$. Posteriormente, el sobrenadante se evaporó a sequedad con un evaporador al vacío y las muestras se almacenaron a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ hasta que la plataforma de análisis estuvo preparada, para evitar una posible degradación metabólica. Para el análisis, las muestras se resuspendieron en 0,5 mL de agua de HPLC por 1 unidad de DO_{600} (densidad óptica a 600 nm) del cultivo original y el automuestreador se mantuvo a $4\text{ }^\circ\text{C}$. Para cuantificar los metabolitos extracelulares, se tomó 1 mL de cultivo en los mismos puntos del crecimiento y se centrifugó a $4\text{ }^\circ\text{C}$ durante 1 min a $12000 \times g$. Los sedimentos celulares se desecharon. Los sobrenadantes se evaporaron en un evaporador al vacío y se resuspendieron en agua HPLC antes del análisis.

La separación y el análisis de las muestras se realizaron con un sistema LC-MS/MS (cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas) que consta de un HPLC Agilent 1290 Infinity II Series (Agilent Technologies) conectado a un espectrómetro de masas Agilent 6550 Q-TOF (Agilent Technologies) utilizando una interfaz de electropulverización doble Agilent Jet Stream Dual (AJS-Dual ESI). Las muestras se analizaron con dos métodos diferentes, uno para el OMP y otro para el resto de los metabolitos (CP, L-arginina, L-aspartato, L-glutamina, L-glutamato, ATP, CASP, DHO, ácido orótico y UMP).

Para el análisis de todos los metabolitos, las muestras se inyectaron en una columna de HPLC Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 ($2,1 \times 100\text{ mm}$, $1,8\text{ }\mu\text{m}$) termostaticada a $40\text{ }^\circ\text{C}$, con un flujo de $0,4\text{ mL/min}$. Se utilizaron los disolventes A (agua MilliQ con ácido fórmico al $0,1\%$) y B (acetonitrilo con ácido fórmico al $0,1\%$) para la separación de compuestos. El programa de elución consistió en 2% de fase B durante 1 min y luego un gradiente de 2 a 100% de fase B en 9 min. Se mantuvo 100% de solvente B por 2 min y luego otro gradiente de 100 a 2% de fase B en 1 min. Finalmente, se mantuvo la fase B al 2% durante 2 min más. El espectrómetro de masas se hizo funcionar en el modo positivo. La presión del gas del nebulizador se ajustó a 30 psi, mientras que el flujo de gas de secado se ajustó a 16 L/min a una temperatura de $130\text{ }^\circ\text{C}$, y el flujo de gas envolvente se ajustó a 11 L/min a una temperatura de $300\text{ }^\circ\text{C}$. Los voltajes de pulverización capilar, boquilla, fragmentador y octopolo 1 RF Vpp fueron 4000 V , 500 V , 350 V y 750 V , respectivamente. Los escaneos de MS Data se adquirieron en el rango de $50\text{-}500\text{ m/z}$ en modo de rango dinámico extendido de 2 GHz con 4 espectros/s y 250 ms/espectro . Se midieron tres energías de colisión (0 , 10 y 40 V) en cada ciclo. Se usó la masa de referencia en $121,0509$ para la

corrección de masa durante el análisis. Para analizar el OMP, las muestras se inyectaron en una columna de HPLC Agilent HILIC Plus (4,6 x 100 mm, 3,5 μm), a una velocidad de flujo de 0,5 mL/min. La columna se equilibró a 40°C. Se usaron los disolventes A (metanol con acetato de amonio 5 mM) y B (acetato de amonio 5 mM) para la separación de compuestos. El programa de elución consistió en 2% de fase B durante 2 min y luego un gradiente de 2 a 100% de fase B en 4 min. Se mantuvo 100% de disolvente B durante 1 min y luego otro gradiente de 100 a 2% de fase B en 0,5 min. Finalmente, se mantuvo la fase B al 2% durante 1,5 min más. El espectrómetro de masas se hizo funcionar en el modo negativo. La presión del gas del nebulizador se ajustó a 30 psi, mientras que el flujo de gas de secado se ajustó a 16 L/min a una temperatura de 150°C, y el flujo de gas envolvente se ajustó a 12 L/min a una temperatura de 300°C. Los voltajes de pulverización capilar, boquilla, fragmentador y octopolo 1 RF Vpp fueron 4000 V, 1000 V, 360 V y 750 V, respectivamente. Los escaneos de MS Data se adquirieron en el rango de 50-500 m/z en modo de rango dinámico extendido de 2 GHz con 4 espectros/s y 250 ms/espectro. Se midieron tres energías de colisión (0, 10 y 40 V) en cada ciclo. Se utilizó una masa de referencia de 112,985587 para la corrección de la masa durante el análisis. El análisis de datos se realizó con el software MassHunter Qualitative Analysis Navigator (Agilent Technologies, Rev. B.08.00).

Los estándares de todos los compuestos estudiados se sometieron al proceso de extracción para comprobar que los compuestos no se deterioraban y cuantificar la recuperación para las curvas de calibración (Figura S1 del Anexo). Las concentraciones de metabolitos intracelulares se dan en términos del volumen ocupado por las células, estimado a partir de un volumen celular de 0,7 μm^3 y un número de células de $7,5 \times 10^8$ células/mL por unidad de DO_{600} .

Expresión y purificación de proteínas

La cepa de *E. coli* BL21 (DE3) wt se transformó con los vectores de sobreexpresión pET28a-*mbp-pyrE*, pRSET-*pyrBI*, pET28a-*mbp-cobB*, pRSF-*mbp-pyrE*^{26AcK} o pRSF-*mbp-pyrE*^{103AcK} y se cultivó en medio Luria-Bertani, LB (10 g/L de triptona, 5 g/L de extracto de levadura y 5 g/L de NaCl), a 37 °C con agitación orbital (200 rpm) hasta que la DO_{600} alcanzó 0,5-0,6 unidades, momento en el que se indujo la sobreexpresión de proteínas con IPTG 0,2 mM. Para la sobreexpresión de las proteínas OPRTasa-26AcK y OPRTasa-103AcK, los cultivos se suplementaron con N ϵ -acetil-L-lisina 10 mM y nicotinamida 20 mM 30 min

antes de la inducción. Después de la inducción, las células se cultivaron durante 16 h a 20 °C con agitación orbital (200 rpm). Las cepas de *E. coli* BL21 (DE3) wt y $\Delta ackA$, Δpta , $\Delta patZ$, $\Delta yiaC$ y $\Delta cobB$ se transformaron con el vector pRSET-*pyrE* y se cultivaron en medio TB7 suplementado con glucosa 20 mM (para promover la acetilación) a 37 °C con agitación orbital (200 rpm). Los cultivos se indujeron con IPTG 0,4 mM a 0,6-0,8 unidades de DO₆₀₀, y se cultivaron a 20°C con agitación orbital (200 rpm) durante 16 h. Los sedimentos celulares se recogieron mediante centrifugación a 4 °C durante 20 min a 4000 x g y se resuspendieron en tampón de unión (50 mM de fosfato de potasio, 25 mM de imidazol, 500 mM de NaCl, pH 8). Las células se lisaron por sonicación durante 2 min (20 s cada pulso) empleando un sonicador Vibra Cell (Sonicator Sonics & Materials) y los lisados se centrifugaron durante 30 min a 4 °C y 12000 x g. Los sobrenadantes se introdujeron en una columna His-Trap HP de 5 mL cargada con Ni (II) (GE Healthcare) previamente equilibrada en tampón de unión. Las proteínas se eluyeron utilizando un gradiente lineal de imidazol de 0 a 500 mM a un flujo de 5 mL/min. El tampón de proteína se cambió a tampón de conservación (150 mM de Tris-HCl, 50 mM de NaCl, pH 7,5) empleando una columna de desalación HiPrep™ 26/10 (GE Healthcare) a una velocidad de flujo de 9 mL/min.

Ensayo de acetilación no enzimática y de desacetilación *in vitro*

El ensayo de acetilación no enzimática *in vitro* se realizó en tampón de conservación. Se incubaron 50 µg de enzima con 10 mM de acetil-P a 37°C durante 6 h con agitación orbital (200 rpm) en un volumen total de 100 µL. Se realizó una reacción control bajo las mismas condiciones, pero sin acetil-P.

La reacción de desacetilación se realizó en tampón de conservación suplementado con NAD⁺ 1 mM. El ensayo se llevó a cabo mezclando 50 µg de enzima con 100 µg de CobB en un volumen total de 100 µL. La reacción se incubó durante 6 h a 37°C con agitación orbital (200 rpm). Se llevó a cabo una reacción de control sin NAD⁺. Para separar las proteínas de CobB, las reacciones se cargaron en una columna de intercambio aniónico (Hi-trap Q HP, GE Healthcare). La columna se equilibró previamente con tampón de conservación y las proteínas se separaron utilizando un gradiente lineal de NaCl de 0,05 a 1 M a una velocidad de flujo de 5 mL/min.

Medida de la actividad enzimática

La actividad de la OPRTasa se analizó como se ha descrito previamente [52]. Los ensayos se realizaron en tampón de conservación, con la adición de 5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de orotato y 1 mM de PRPP para la reacción directa, y 3 mM de MgCl₂, 2 mM de PPI y 0,1 mM de OMP para la reacción inversa. Las reacciones se llevaron a cabo a 30°C en un volumen total de 100 µL y se iniciaron con la adición de la OPRTasa. El ensayo se monitorizó por la disminución de la absorbancia a 295 nm causada por la conversión de orotato en OMP en la reacción directa, o por el aumento de la absorbancia a 295 nm causado por la formación de orotato en la reacción inversa. La actividad específica se calculó utilizando el coeficiente de extinción del orotato a 295 nm (3950 M⁻¹cm⁻¹). Una unidad de actividad se definió como la cantidad de enzima necesaria para convertir 1 µmol de orotato en OMP por minuto (reacción directa) o 1 µmol de OMP en orotato por minuto (reacción inversa), ambas a 30°C. Las reacciones se realizaron por triplicado. Para determinar los parámetros cinéticos la concentración de orotato varió de 0,5 a 200 µM a PRPP 1 mM, la concentración de PRPP varió de 12,5 a 1000 µM a orotato 0,2 mM, la concentración de PPI varió de 0,005 a 2 mM a OMP 0,1 mM y la de OMP varió de 0,001 a 0,1 mM a PPI 2 mM. Los parámetros cinéticos se determinaron empleando el software analítico Prism v7 (GraphPad Software, Inc.) y las desviaciones estándar se determinaron a partir de los replicados.

La medida de la actividad de la aspartato carbamoyltransferasa se realizó como había sido descrito previamente [53].

Cuantificación de metabolitos extracelulares y estudio fisiológico

E. coli K12 wt, *E. coli* K12 Δ cobB, *E. coli* K12 Δ pyrE y *E. coli* K12 Δ pyrE transformada con los vectores pSF-pMB1'-BAD-*mbp-pyrE*, pRSF-BAD-*mbp-pyrE*^{26AcK} o pRSF-BAD-*mbp-pyrE*^{103AcK} se cultivaron en medio TB7 suplementado con glicerol 40 mM. Se utilizó glicerol para la correcta expresión de la proteína bajo el control del promotor P_{BAD}. Los cultivos se indujeron con 2 mM de arabinosa a 0,3 unidades de DO₆₀₀, y para la expresión de las proteínas acetiladas se añadieron nicotinamida 20 mM y Nε-acetil-L-lisina 10 mM antes de la inducción. Se calcularon los parámetros cinéticos y estequiométricos, y se determinó la velocidad de crecimiento específica [54]. Para cuantificar el consumo de glicerol y la concentración de orotato extracelular se tomó 1 mL de cada uno de los cultivos a diferentes tiempos de crecimiento. Las muestras se centrifugaron a 4°C durante 1 min a

12000 x g, y los sobrenadantes se congelaron hasta su análisis. Los metabolitos extracelulares y el consumo de glicerol se analizaron por HPLC utilizando una columna de exclusión iónica (ICSep Coregel 87H3, Transgenomic), y detectores UV y de índice de refracción (Shimadzu Scientific Instruments). La fase móvil fue 5 mM de H₂SO₄ a un flujo de 1 mL/min y 65°C.

Identificación de la acetilación de proteínas mediante LC-MS/MS

Para identificar las lisinas acetiladas de las proteínas se llevó a cabo un ensayo LC-MS/MS. Las proteínas se alquilaron mediante incubación con yodoacetamida 100 mM durante 30 min en la oscuridad a temperatura ambiente. Las muestras se digirieron con 1 µg de Tripsina Gold (Promega) (1:100 p/p) durante 3 h a 37 °C, y la reacción se detuvo mediante la adición de ácido fórmico al 0,1 %. Los péptidos trípticos se secaron empleando un evaporador al vacío, y luego se separaron y analizaron por LC-MS/MS.

La separación y el análisis de los péptidos trípticos de las muestras se realizaron con un sistema LC-MS/MS que consta de un HPLC Agilent 1290 Infinity II Series (Agilent Technologies) conectado a un espectrómetro de masas Agilent 6550 Q-TOF (Agilent Technologies) utilizando una interfaz de electropulverización dual Agilent Jet Stream Dual (AJS-Dual ESI). Las muestras de la digestión con tripsina se resuspendieron en 20 µl de tampón A, que consiste en agua/acetonitrilo/ácido fórmico (94,9:5:0,1). La muestra se inyectó en una columna HPLC de mapeo de péptidos Agilent AdvanceBio (2,7 µm, 100 × 2,1 mm, Agilent Technologies), termostaticada a 50 °C, con un flujo de 0,4 mL/min. Los péptidos digeridos se eluyeron usando un gradiente lineal de 0-40 % de fase B (agua/acetonitrilo/ácido fórmico, 10:89,9:0,1) durante 40 min, seguido de un gradiente lineal de 40-95 % de fase B durante 8 min. Se mantuvo la fase B al 95% durante 3 min. El espectrómetro de masas se hizo funcionar en el modo positivo. La presión del gas del nebulizador se ajustó a 35 psi, mientras que el flujo de gas de secado se ajustó a 14 L/min a una temperatura de 300 °C, y el flujo de gas envolvente se ajustó a 11 L/min a una temperatura de 250 °C. Los voltajes RF Vpp de pulverización capilar, boquilla, fragmentador y octopolo fueron de 3500 V, 100 V, 360 V y 750 V, respectivamente. Los datos de perfil se adquirieron para escaneos MS y MS/MS en modo de rango dinámico extendido a 4 GHz. El rango de masas de MS y MS/MS fue de 50-1700 m/z y las velocidades de escaneo fueron de 8 espectros/s para MS y de 3 espectros/s para MS/MS. Se utilizó el modo Auto MS/MS con selección de precursores por abundancia y un máximo

de 20 precursores seleccionados por ciclo. Se utilizó una energía de colisión en rampa con una pendiente de 3,68 y un desplazamiento de -4,28. El mismo ion fue rechazado después de dos espectros consecutivos. El procesamiento y análisis de datos se realizó en Spectrum Mill MS Proteomics Workbench (Rev B.06.00.201, Agilent Technologies).

Ensayo de transferencia Western

Para estudiar la acetilación de las proteínas, las muestras se separaron por electroforesis SDS-PAGE con acrilamida al 10 % y se transfirieron a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF) empleando una unidad de transferencia semiseca (Trans-Blot Turbo Transfer System, Bio-Rad). Las membranas se incubaron con un anticuerpo primario monoclonal de conejo anti-acetil-lisina (Anti-AcK) (ImmuneChem) y con un anticuerpo secundario anti-conejo de cabra conjugado con HRP (Santa Cruz Biotechnology). Finalmente, la membrana se incubó con sustrato quimioluminiscente SuperSignal™ West Pico (Thermo Fisher Scientific) durante 10 min y se reveló con un analizador quimioluminiscente Amersham Imager 600 (GE Healthcare). Para estudiar la expresión de las proteínas OPRTasa-26AcK y OPRTasa-103AcK se empleó el anticuerpo primario monoclonal de ratón anti-(His)₆ (Thermo Fisher Scientific), y como anticuerpo secundario un anticuerpo anti-ratón de cabra conjugado con HRP (Invitrogen) (la sobreexpresión de las proteínas específicamente acetiladas se muestra en la Figura S2 del Anexo).

Calorimetría diferencial de barrido

Se utilizó la técnica de calorimetría diferencial de barrido (DSC) para el análisis termodinámico de la desnaturalización y la estabilidad de la ATCasa control y de las muestras acetiladas y desacetiladas. Se empleó un microcalorímetro MicroCal PEAQ-DSC (Malvern Panalytical). Las muestras se hicieron pasar de 30 a 100°C a una velocidad de 1,25°C/min, y se utilizó como control el tampón que contiene las proteínas (150mM de Tris-HCl, 50 mM de NaCl, pH 7,5). Los valores de los parámetros medidos se estudiaron y relativizaron con respecto a la concentración de proteínas utilizando el software Origin 7.0.

Resultados

Quantificación de los metabolitos intracelulares y extracelulares de la ruta de biosíntesis de pirimidinas *de novo* en *E. coli* wt y *E. coli* $\Delta cobB$

El ácido orótico y otros metabolitos intermediarios de la ruta de biosíntesis de pirimidinas se excretan durante el crecimiento de algunas cepas de *E. coli* [55]–[57]. En un trabajo anterior, encontramos un aumento de 35 veces en la excreción de orotato en la cepa deficiente en el gen de la desacetilasa *cobB* con respecto a la cepa wt [58]. Esta gran diferencia probablemente no puede explicarse únicamente con el control del nodo α -cetoglutarato por acetilación de la isocitrato liasa, por lo que pensamos que, simultáneamente, podría ocurrir una regulación por acetilación de la ruta de biosíntesis de pirimidinas en ausencia de CobB, lo que contribuiría al elevado aumento de la excreción de orotato. De acuerdo con esta propuesta, analizamos la producción de fibras curli mediante un ensayo de unión al Rojo Congo en la cepa wt y el mutante $\Delta cobB$ como una medida indirecta de la perturbación de la biosíntesis de UMP. Garavaglia et al. [59] demostraron que la inactivación de la ruta de biosíntesis de pirimidinas afecta la producción de curli y celulosa en *E. coli*. Además, las fibras de amiloide de curli se unen al colorante Rojo Congo y muestran un fenotipo rojo en medio agar suplementado con este colorante (medio RC). Como resultado de estos ensayos, la cepa wt mostró un fenotipo medio RC más oscuro que el mutante $\Delta cobB$ (Figura 2), lo que podría indicar una producción alterada de curli debido a una menor síntesis de pirimidinas en este mutante.

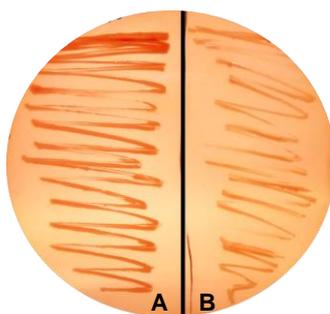
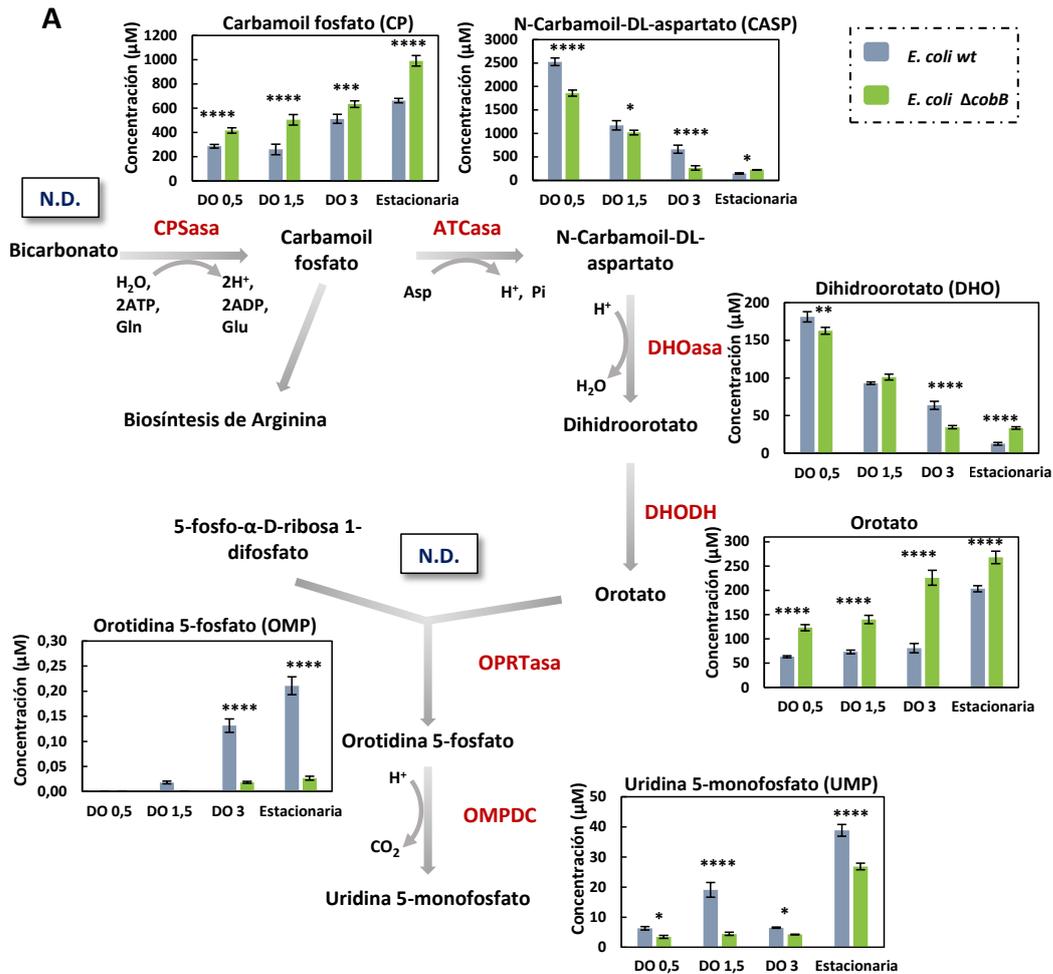
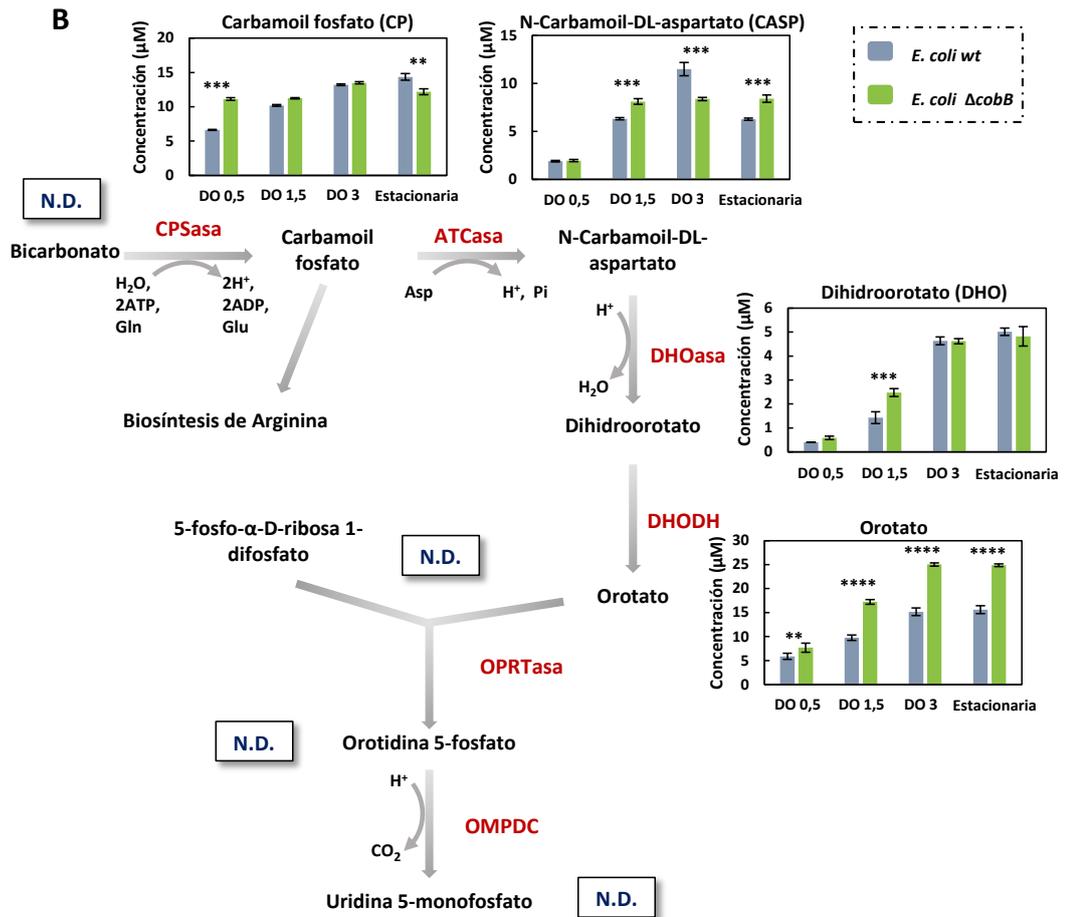


Figura 2: Ensayo de unión al Rojo Congo (RC) de las cepas *E. coli* wt (A) y $\Delta cobB$ (B). Ambas cepas se cultivaron en medio RC a 30 °C durante 20 h y se detectó la unión del colorante después de la incubación a 4 °C durante 48 h. La imagen se analizó con el software de código abierto ImageJ y se seleccionaron 9 puntos espaciados regularmente en cada parte de la placa, A y B, con la herramienta Multi-Point. La intensidad promedio de cada conjunto de puntos múltiples fue $897,7 \pm 44$ para A y $345,1 \pm 43$ para B.

En vista de estos prometedores resultados, medimos la concentración intracelular y extracelular de los metabolitos de la ruta de biosíntesis de pirimidinas *de novo* mediante

LC-MS/MS en las cepas de *E. coli* wt y $\Delta cobB$. Las muestras se tomaron en diferentes momentos de crecimiento: antes de la fase de crecimiento exponencial (DO₆₀₀ 0.5), en la fase de crecimiento exponencial (DO₆₀₀ 1.5), en la fase de crecimiento exponencial largo (DO₆₀₀ 3) y en la fase estacionaria (Estacionaria) (Figura S3 del Anexo). Se analizaron los principales metabolitos intermediarios de la ruta y otros relacionados, tales como, bicarbonato, CP, CASP, DHO, ácido orótico, PRPP, OMP, UMP, L-glutamina, L-glutamato, ATP y L-aspartato (Figura 3A, B y C).





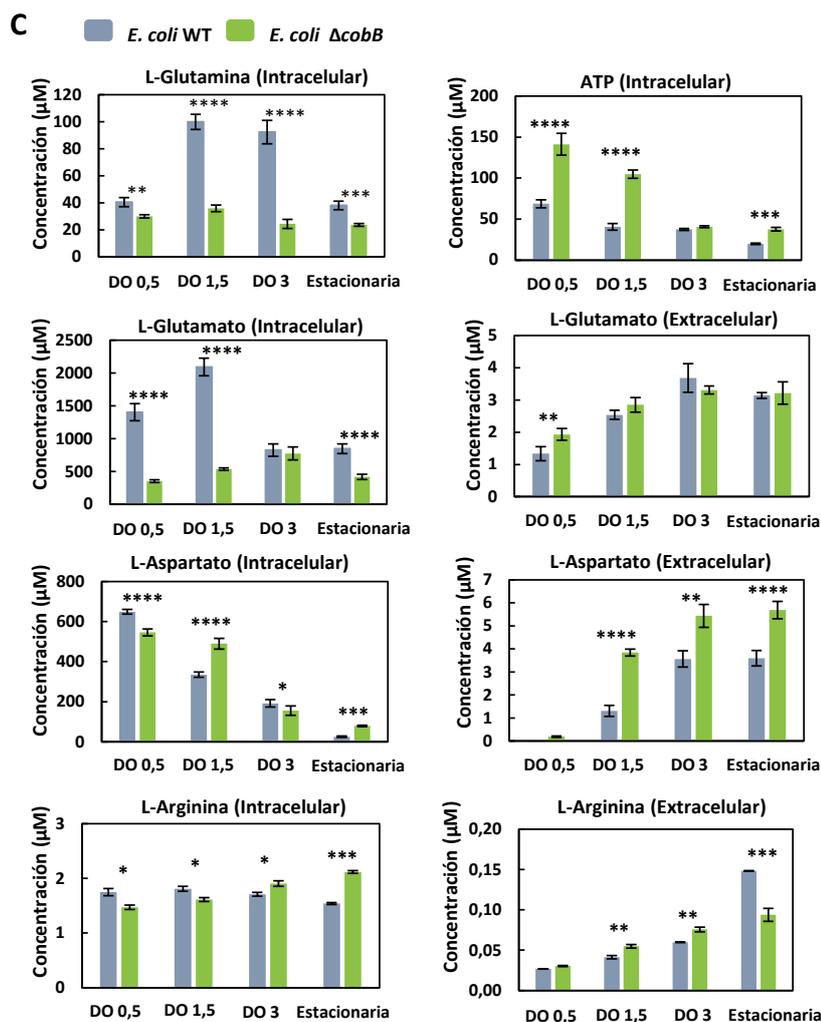


Figura 3: Concentración intracelular y extracelular de los metabolitos de la ruta de biosíntesis de pirimidinas. Las cepas *E. coli* K12 wt (barras grises) y *E. coli* $\Delta cobB$ (barras verdes) se cultivaron en medio mínimo MM9 suplementado con 20 mM de glucosa. N.D.: no detectado. DO hace referencia a DO_{600} . (A) Concentración intracelular de los metabolitos CP, CASP, DHO, ácido orótico, OMP y UMP de la ruta de biosíntesis de pirimidinas *de novo* para ambas cepas a diferentes tiempos de crecimiento. (B) Concentración extracelular de los metabolitos CP, CASP, DHO y ácido orótico de la ruta de biosíntesis de pirimidinas *de novo* en ambas cepas a diferentes tiempos de crecimiento. (C) Concentración intracelular y extracelular de otros metabolitos que intervienen en la ruta (Glu, Gln, Asp, Arg y ATP) en ambas cepas y a diferentes tiempos de crecimiento. Se realizó una prueba ANOVA de dos vías para identificar diferencias en las concentraciones entre ambas cepas (p-valor < 0,0001 (****). < 0,001 (***). < 0,01 (**). y < 0,05 (*)).

Los perfiles de producción o consumo de los principales metabolitos de la síntesis de UMP se muestran en la Figura 3A. No se detectó ni bicarbonato ni PRPP en las condiciones del estudio. Observamos una concentración significativamente mayor de CP en la cepa $\Delta cobB$ que en la cepa wt en todas las muestras (p-valor < 0,001). Los siguientes dos metabolitos de la ruta, CASP y DHO, mostraron un perfil opuesto, con una disminución en la concentración a lo largo del tiempo de cultivo, y con una tendencia similar en ambas cepas. En cuanto al ácido orótico, se detectó una concentración significativamente mayor

en la cepa $\Delta cobB$ que en la cepa wt (p -valor $< 0,0001$), y sus valores fueron de 123,1 a 267,9 μM en la cepa $\Delta cobB$, y de 63,3 a 203,3 μM en la cepa wt. El siguiente metabolito de la ruta, el OMP, no se detectó en las primeras etapas del crecimiento del cultivo, sin embargo, se detectó en la fase tardía del cultivo, con mayor abundancia en la cepa wt. El último metabolito de la ruta, el UMP, mostró valores más altos en wt que en la cepa $\Delta cobB$ en todas las muestras (p -valor $< 0,05$ y $< 0,0001$), con un rango de 6,3 a 38,8 μM en wt y de 3,4 a 26,8 μM en la cepa $\Delta cobB$. En resumen, los perfiles de concentración de ácido orótico y OMP sugirieron una actividad diferente de la enzima OPRTasa en ambas cepas, lo que resultó en una concentración final de UMP más baja para la cepa $\Delta cobB$.

En cuanto a los metabolitos extracelulares que se muestran en la Figura 3B, no observamos excreción de OMP ni UMP. Además, todos los metabolitos cuantificados mostraron el mismo perfil con un aumento de la concentración durante el crecimiento del cultivo. Las mayores diferencias entre cepas se observaron en los compuestos CASP y orotato. El CASP mostró una concentración más baja en la cepa $\Delta cobB$ en las muestras de DO_{600} 1,5 y estacionaria (p -valor < 0.001), y el comportamiento opuesto en la muestra de DO_{600} 3 (p -valor < 0.001). Por último, el ácido orótico fue el metabolito con mayores diferencias de concentración extracelular entre ambas cepas, con un p -valor $< 0,0001$ y mayor concentración en la cepa $\Delta cobB$, lo que también apoya un bloqueo de la ruta metabólica a nivel de la enzima OPRTasa en esta cepa.

Respecto a la concentración de los otros metabolitos que participan en la primera reacción de la ruta, ATP, glutamina y glutamato [5], estos mostraron un perfil diferente (Figura 3C). El ATP no fue excretado al medio extracelular pero la concentración intracelular de ATP fue significativamente mayor en $\Delta cobB$ que en la cepa wt y disminuyó durante el tiempo de cultivo. Con respecto a las concentraciones intracelulares de glutamato y glutamina, se detectaron valores más altos en wt que en la cepa $\Delta cobB$ (p -valor < 0.01 y < 0.0001). La glutamina no se excretó al medio extracelular, pero el glutamato se excretó casi sin diferencia entre ambas cepas. El primer producto de la vía, el CP, también está involucrado en la biosíntesis de arginina [5], por lo que medimos la concentración de arginina intracelular y extracelular, pero no observamos diferencias relevantes entre ambas cepas. Finalmente, el aspartato participa en la reacción de la ATCasa [6] y mostró una mayor concentración extracelular en $\Delta cobB$ (p -valor $< 0,01$ y $< 0,0001$).

Teniendo en cuenta todos los resultados, aunque existen otras diferencias entre wt y $\Delta cobB$, la más relevante es la baja concentración de OMP y la acumulación de ácido orótico en $\Delta cobB$, lo que sugiere un bloqueo a nivel de la OPRTasa en este mutante que podría deberse a un evento de regulación por acetilación. Otra diferencia apreciable fue una concentración significativamente mayor de CP y aspartato en $\Delta cobB$ en comparación con la cepa wt, lo que también podría indicar una regulación diferente de la enzima ATCasa entre ambas cepas.

Medida de la actividad enzimática de la OPRTasa acetilada *in vitro*

Para comprobar si la acetilación de lisinas implicaba cambios en la actividad de la ATCasa o de la OPRTasa, purificamos ambas enzimas y las sometimos a un proceso de acetilación química utilizando 10 mM de acetil-P, y también a una reacción de desacetilación con CobB. Aunque la acumulación de CP podría sugerir que la actividad de la ATCasa está alterada, no se observaron diferencias en las medidas de actividad entre la enzima purificada, acetilada y desacetilada. En cambio, se detectó una señal intensa en las bandas de la ATCasa control y de la ATCasa acetilada, mientras que la enzima desacetilada no mostró ninguna señal por Western blot con anticuerpos anti-acetil-lisina. A continuación, realizamos pruebas de termoestabilidad por DSC, que mostraron una disminución de los valores de T_m para los dos picos, en torno a 5-10 °C, en la ATCasa desacetilada con respecto a las ATCasas acetilada y control (Figura S4 del Anexo). Los eventos de desnaturalización de esta enzima han sido expuestos en estudios anteriores [60]. Por lo tanto, la acetilación de la ATCasa no parece afectar a la actividad enzimática, pero podría promover la estabilidad térmica de la enzima. Sin embargo, estos resultados no descartan que la ATCasa sea acetilada en otras circunstancias por las KATs.

Del mismo modo, se midió la actividad de la OPRTasa y se llevó a cabo un Western blot para conocer su nivel de acetilación (Figura 4).

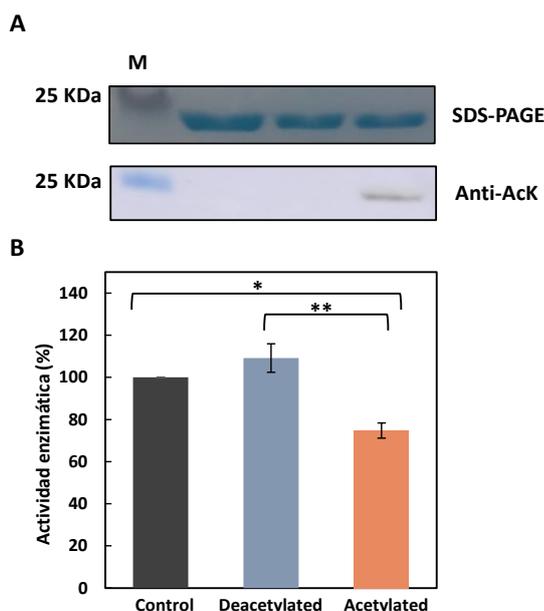


Figura 4: Western blot y actividad enzimática de la OPRTasa purificada (control), la OPRTasa sometida a una reacción de desacetilación (Desacetilada) y la OPRTasa sometida a una reacción de acetilación (Acetilada). (A) SDS-PAGE y Western blot anti-acetil-lisina (Anti-AcK) de la OPRTasa control (calle 1), la OPRTasa desacetilada (calle 2) y la OPRTasa acetilada (calle3). El marcador de masa molecular (M) está incluido en el lado izquierdo. (B) Actividad enzimática relativa de la OPRTasa control, la OPRTasa desacetilada y la OPRTasa acetilada. La actividad de la muestra de la OPRTasa control se ajustó al 100%. Se llevó a cabo una prueba de ANOVA de una vía para identificar diferencias significativas entre las actividades enzimáticas relativas (p-valor < 0,01 (**)) y < 0,05(*)).

Para el ensayo de Western blot se utilizó el anticuerpo anti-acetil-lisina (Figura 4A). No observamos señal en las muestras control y la desacetilada, mientras que se detectó un ligero aumento de la señal en la muestra acetilada. Posteriormente, medimos la reacción directa catalizada por la OPRTasa, con PRPP y orotato como sustratos, y observamos una disminución del 25,2 % en la actividad enzimática de la OPRTasa acetilada con respecto al control (p-valor < 0,05). Esta pérdida de actividad fue mayor al comparar las muestras desacetilada y acetilada, con una disminución del 34,4 % (p-valor < 0,01) (Figura 4B). Por lo tanto, concluimos que la acetilación pudo ser la responsable de la disminución de la actividad observada en la OPRTasa.

Medida de la actividad enzimática y caracterización cinética de la OPRTasa-26AcK y la OPRTasa-103AcK

Los estudios proteómicos de *E. coli* han detectado 4 lisinas sujetas a acetilación en la OPRTasa, K19, K26, K103 y K194 [36]–[41]. Dos de estos residuos, la K26 y la K103, tienen un papel esencial en la catálisis de la OPRTasa en los organismos en los que se

conservan, incluido *E. coli* [9], [61], [62]. Por lo tanto, seleccionamos estos dos residuos de lisina para estudiar el efecto de la acetilación sobre los mismos. Con este fin, empleamos el enfoque de expansión del código genético para incorporar específicamente Nε-acetil-L-lisinas en estas posiciones [47]. Las proteínas específicamente acetiladas y la OPRTasa control no acetilada fueron purificadas de *E. coli* BL21. Los ensayos de desacetilación se llevaron a cabo sobre la OPRTasa-26AcK y la OPRTasa-103AcK en presencia de la desacetilasa CobB. Se midió la actividad de la enzima control, las desacetiladas y las acetiladas, y se realizó un ensayo Western blot (Figura 5).

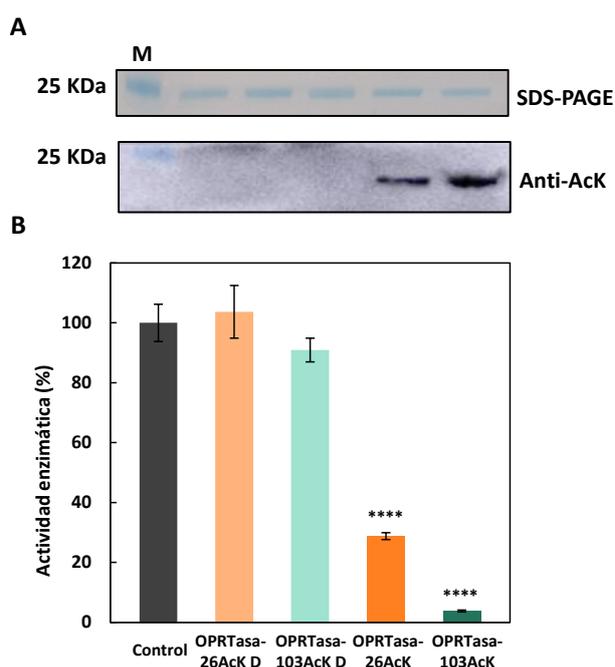


Figura 5: Western blot y actividad enzimática de las enzimas OPRTasa (control), OPRTasa-26AcK desacetilada (OPRTasa-26AcK D), OPRTasa-103AcK desacetilada (OPRTasa-103AcK D), OPRTasa-26AcK y OPRTasa-103AcK. (A) SDS-PAGE y Western blot anti-acetil-lisina (Anti-AcK) de las muestras OPRTasa control (calle 1), OPRTasa-26AcK D (calle 2), OPRTasa-103AcK D (calle 3), OPRTasa-26AcK (calle 4) y OPRTasa-103AcK (calle 5). El marcador de masa molecular (M) está incluido en el lado izquierdo. (B) Actividades enzimáticas relativas de la OPRTasa control, la OPRTasa-26AcK D, la OPRTasa-103AcK D, la OPRTasa-26AcK y la OPRTasa-103AcK. La actividad de la muestra de la OPRTasa control se ajustó al 100%. Se realizó una prueba de ANOVA de una vía para identificar diferencias significativas entre las actividades enzimáticas relativas de las muestras con respecto a la muestra control (p -valor $< 0,0001$ (****)).

Para comprobar el nivel de acetilación de las muestras, realizamos un ensayo Western blot (Figura 5A), que no mostró acetilación detectable en las muestras desacetiladas y control, mientras que la OPRTasa-26AcK y la OPRTasa-103AcK generaron una señal clara con el anticuerpo anti-acetil-lisina. Por tanto, la ausencia de acetilación detectable en las muestras de proteínas desacetiladas mostró que ambas lisinas

acetiladas podían ser dianas de la desacetilasa de CobB *in vitro*. La reacción directa para producir OMP se midió en la OPRTasa control, la OPRTasa-26AcK, la OPRTasa-103AcK, la OPRTasa-26AcK D y la OPRTasa-103AcK D (Figura 5B). El efecto de la acetilación en la OPRTasa-26AcK y la OPRTasa-103AcK condujo a una fuerte disminución de la actividad enzimática con respecto a la muestra control (p -valor $< 0,0001$). Observamos una pérdida de actividad del 71,2 % para la OPRTasa-26AcK, mientras que la acetilación en la K103 eliminó prácticamente la actividad enzimática (pérdida del 96,2 %). Tras someter las muestras a la reacción de desacetilación con CobB, observamos una recuperación de la actividad en ambos casos, sin diferencias significativas con la actividad de la OPRTasa control. Los resultados demostraron la importancia de estos residuos para la actividad catalítica de la OPRTasa, que CobB reconoce como sustratos *in vitro*.

Para comprender el papel de la acetilación en los residuos K26 y K103, se llevó a cabo la caracterización cinética de la reacción directa (Tabla 1A) e inversa (Tabla 1B) de la OPRTasa control y de los mutantes acetilados y desacetilados.

Tabla 1A: Parámetros cinéticos. Parámetros cinéticos de la OPRTasa de *E. coli*, las proteínas mutantes acetiladas (OPRTasa-26AcK y OPRTasa-103AcK) y desacetiladas (OPRTasa-26AcK D y OPRTasa-103AcK D) a 30°C para la reacción directa.

Enzima	Orotato			PRPP	
	k_{cat} (s^{-1})	K_M (μM)	k_{cat}/K_M ($mM^{-1} s^{-1}$)	K_M (μM)	k_{cat}/K_M ($mM^{-1} s^{-1}$)
OPRTasa control	32 ± 2	43 ± 5	739	111 ± 12	286
OPRTasa-26AcK	$1,7 \pm 0,2$	96 ± 10	18	119 ± 9	14
OPRTasa-103AcK	$0,11 \pm 0,01$	44 ± 6	2,6	241 ± 24	0,5
OPRTasa-26AcK D	$28 \pm 2,3$	63 ± 7	450	123 ± 10	228
OPRTasa-103AcK D	$25 \pm 1,7$	46 ± 5	550	140 ± 13	160

Tabla 1B: Parámetros cinéticos. Parámetros cinéticos de la OPRTasa de *E. coli*, las proteínas mutantes acetiladas (OPRTasa-26AcK y OPRTasa-103AcK) y desacetiladas (OPRTasa-26AcK D y OPRTasa-103AcK D) a 30°C para la reacción inversa.

Enzima	OMP			PPi	
	k_{cat} (s^{-1})	K_M (μM)	k_{cat}/K_M ($mM^{-1} s^{-1}$)	K_M (μM)	k_{cat}/K_M ($mM^{-1} s^{-1}$)
OPRTasa control	$19 \pm 0,7$	15 ± 1	1257	36 ± 2	525
OPRTasa-26AcK	$3,2 \pm 0,2$	64 ± 7	50	104 ± 8	31
OPRTasa-103AcK	$0,14 \pm 0,0$	21 ± 2	6,8	115 ± 9	1,2
OPRTasa-26AcK D	$17 \pm 0,2$	14 ± 1	1215	55 ± 6	310
OPRTasa-103AcK D	$18 \pm 0,2$	18 ± 2	985	40 ± 4	457

Los parámetros cinéticos de la OPRTasa control obtenidos en este trabajo son del mismo orden de magnitud que los informados en otros estudios [63]. La acetilación de la lisina 26 implicó una disminución de 19 y 6,3 veces en la k_{cat} , tanto de la reacción directa como de la inversa (Tabla 1A y 1B), con respecto a la OPRTasa control. Por el contrario, el valor de la K_M para el PRPP no se vio afectado por la acetilación de la K26 (Tabla 1A), mientras que aumentó 4 veces para el OMP, y los valores de K_M para la reacción inversa aumentaron 2 y 3 veces para el orotato y el PPI, respectivamente, en relación con los valores control (Tabla 1B). Al mismo tiempo, la desacetilación de la OPRTasa-26Ack supuso una recuperación de los parámetros cinéticos al nivel de la OPRTasa control.

Por otro lado, la acetilación de la lisina 103 resultó en una severa reducción de los valores del número de recambio y de la eficiencia de la enzima, medida por el ratio k_{cat}/K_M . Los valores de k_{cat} para las reacciones directa e inversa fueron 0,11 y 0,14 s^{-1} , lo que representó una disminución de 300 y 150 veces, respectivamente. En cuanto a los valores de K_M , se observaron diferencias menos pronunciadas que para los valores de k_{cat} y k_{cat}/K_M . Así, se detectaron aumentos de 2 y 3 veces para los valores de K_M para el PRPP y el PPI con respecto a la OPRTasa control, mientras que no se detectaron diferencias para los valores de K_M para el orotato y el OMP. Al igual que para el mutante K26, la desacetilación de la lisina 103 condujo a una restauración de los parámetros cinéticos (Tabla 1).

Estudio del mecanismo de acetilación *in vivo* de la OPRTasa

Para comprender el mecanismo *in vivo* que conduce a la acetilación de la OPRTasa y la consiguiente pérdida de actividad, llevamos a cabo la purificación de la proteína a partir de diferentes cepas mutantes de *E. coli*. Estas cepas son deficientes en las KATs YiaC y PatZ, en la desacetilasa CobB, y en las enzimas AckA (acetato quinasa) y Pta (fosfato acetiltransferasa). La eliminación de las enzimas AckA y Pta está relacionada con un aumento y una disminución del nivel de acetilación, debido a que son las encargadas del consumo y formación de acetil-P, respectivamente [36], [38]. Por lo tanto, la OPRTasa se purificó a partir de *E. coli* BL21 wt, $\Delta patZ$, $\Delta yiaC$, $\Delta cobB$, $\Delta ackA$ y Δpta en cultivos en medio TB7 suplementado con glucosa 20 mM, y se midió la actividad enzimática de la reacción directa para las proteínas purificadas (Figura 6).

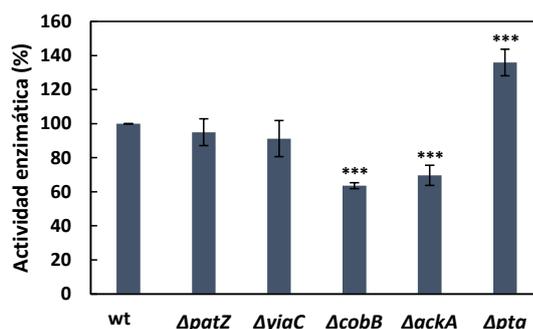


Figura 6: Actividades enzimáticas relativas de las OPRTasas purificadas de *E. coli* BL21 wt, $\Delta patZ$, $\Delta yiaC$, $\Delta cobB$, $\Delta ackA$ y Δpta . La actividad de la OPRTasa de wt se fijó al 100%. Se llevó a cabo una prueba ANOVA de una vía para identificar diferencias significativas entre las actividades enzimáticas relativas de las muestras con respecto a la OPRTasa de la muestra wt (p -valor $< 0,001$ (***)).

La actividad de la OPRTasa purificada de las cepas $\Delta cobB$, $\Delta ackA$ y Δpta mostró diferencias significativas con respecto a la OPRTasa de wt (p -valor $< 0,001$). La OPRTasa purificada a partir de un escenario de alto nivel de acetilación ($\Delta ackA$) mostró una reducción de la actividad del 30 % con respecto a la OPRTasa de wt, y la OPRTasa de una cepa con bajo nivel de acetilación (Δpta) mostró un aumento de la actividad del 35 % con respecto a la de wt. Por el contrario, no se observaron diferencias significativas en la actividad enzimática de las OPRTasas purificadas de $\Delta patZ$ y $\Delta yiaC$ con respecto a la de wt. La eliminación de la única desacetilasa conocida de *E. coli* implicó una reducción del 36 % en la actividad con respecto a la OPRTasa de wt. Para comprobar que esta disminución de la actividad se debía a la acetilación de algunas de sus lisinas se analizó mediante LC-MS/MS la OPRTasa purificada del mutante *cobB*, detectando la lisina K26 acetilada.

Ensayo de complementación de la cepa $\Delta pyrE$ con la OPRTasa control, la OPRTasa-26AcK y la OPRTasa-103AcK, y estudio fisiológico de las cepas

Para conocer las consecuencias fisiológicas de la acetilación permanente en las lisinas 26 y 103 de la OPRTasa *in vivo*, llevamos a cabo un ensayo de complementación de una cepa deficiente en el gen *pyrE* con plásmidos P_{BAD} que contenían la OPRTasa control, la OPRTasa-26AcK y la OPRTasa-103AcK. Para este propósito, *E. coli* K12 wt, $\Delta cobB$, $\Delta pyrE$, $\Delta pyrE$ + OPRTasa, $\Delta pyrE$ + OPRTasa-26AcK y $\Delta pyrE$ + OPRTasa-103AcK se cultivaron en medio TB7 suplementado con 40 mM de glicerol induciendo la sobreexpresión con arabinosa. Tras ello se analizó el fenotipo del medio RC (Figura 7), se estudió la

caracterización fisiológica y se cuantificó el orotato extracelular. La expresión de la OPRTasa, la OPRTasa-26AcK y la OPRTasa-103AcK en las condiciones de este estudio se verificó mediante Western blot (Figura S2 del Anexo).



Figura 7: Ensayo de unión al Rojo Congo de *E. coli* K12 wt, $\Delta cobB$, $\Delta pyrE$, $\Delta pyrE$ + OPRTasa, $\Delta pyrE$ + OPRTasa-26AcK y $\Delta pyrE$ + OPRTasa-103AcK. Las cepas se cultivaron en medio RC y a 30 °C durante 20 h y posteriormente, la placa se incubó a 4°C durante 48 h.

El ensayo de unión a RC mostró un fenotipo de medio RC más oscuro para la cepa wt que para la cepa $\Delta cobB$ (Figura 7), y se observó un fenotipo blanco para la cepa $\Delta pyrE$, lo que indica una supresión en la ruta de biosíntesis de pirimidinas. La complementación de la cepa $\Delta pyrE$ con la OPRTasa control supuso un aumento del fenotipo rojo, recuperando la formación de curli al nivel de la cepa wt. Sin embargo, la complementación de la cepa $\Delta pyrE$ con la OPRTasa-26AcK y la OPRTasa-103AcK no mostró el fenotipo oscuro, aunque hubo un aumento en la formación de curli con respecto a la cepa $\Delta pyrE$. Este ligero aumento en el fenotipo rojo fue mayor en la cepa que sobreexpresaba la OPRTasa-26AcK que con la OPRTasa-103AcK, de acuerdo con la mayor actividad medida *in vitro* para la OPRTasa-26AcK que para la OPRTasa con la K103 acetilada.

Para analizar los parámetros fisiológicos, se determinó la velocidad específica de crecimiento (μ_{max}), el rendimiento en biomasa ($Y_{x/s}$) y la velocidad específica de consumo de carbono (q_s) para todas las cepas (Tabla 2). Estos datos corroboraron los efectos fisiológicos obtenidos en cada prueba de complementación, con unos valores similares para la cepa wt y la $\Delta cobB$, y una reducción de estos para la cepa $\Delta pyrE$. La suplementación de la cepa $\Delta pyrE$ con las OPRTasa control supuso la recuperación de los valores a niveles de la cepa wt, pero la complementación con las enzimas acetiladas mostró unos valores muy similares a la cepa $\Delta pyrE$ sin suplementar.

Tabla 2. Parámetros estequiométricos. Velocidad específica de crecimiento (μ_{max}), rendimiento en biomasa ($Y_{x/s}$) y velocidad específica de consumo de carbono (q_s) de *E. coli* K12 wt, $\Delta cobB$, $\Delta pyrE$, $\Delta pyrE + OPRTasa$, $\Delta pyrE + OPRTasa-26AcK$ y $\Delta pyrE + OPRTasa-103AcK$ creciendo en TB7 con glicerol.

	μ_{max} (h^{-1})	$Y_{x/s}$ (g/mmolC)	q_s (mmolC/gh)
wt	0,988 ± 0,050	0,0107	-64,710
$\Delta cobB$	0,959 ± 0,005	0,0095	-63,484
$\Delta pyrE$	0,418 ± 0,008	0,0031	-22,516
$\Delta pyrE + OPRTasa$	0,850 ± 0,028	0,0074	-51,940
$\Delta pyrE + OPRTasa-26AcK$	0,652 ± 0,026	0,0039	-31,119
$\Delta pyrE + OPRTasa-103AcK$	0,543 ± 0,018	0,0034	-32,388

Además, para estudiar la implicación de la acetilación de estos residuos en el crecimiento celular, se midieron las concentraciones extracelulares de orotato y de glicerol (Figura 8), observando varias diferencias entre las cepas.

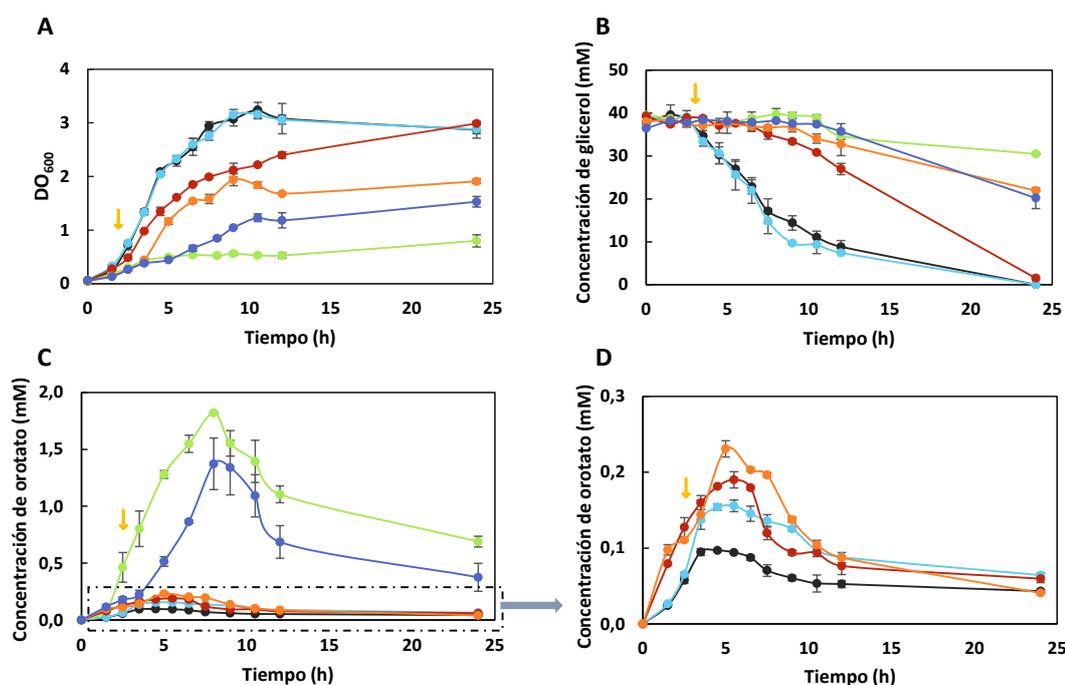


Figura 8: Crecimiento celular a DO_{600} (A) y concentración extracelular de glicerol (B) y orotato (C, D). 8D presenta los datos de 8C que se encuentran en el recuadro con un eje Y alterado para observar mejor las diferencias en las cepas específicas. *E. coli* K12 wt (negro ●), $\Delta cobB$ (azul claro ●), $\Delta pyrE$ (verde ●), $\Delta pyrE + OPRTasa$ (rojo ●), $\Delta pyrE + OPRTasa-26AcK$ (naranja ●) y $\Delta pyrE + OPRTasa-103AcK$ (azul ●) creciendo en TB7 suplementado con glicerol. La flecha amarilla indica el tiempo de inducción.

En la cepa wt, el glicerol se consumió totalmente y la excreción de orotato fue la más baja de todas las cepas analizadas, con un máximo de 0,09 mM (Figuras 8B, C y D). Con respecto a la cepa $\Delta cobB$, la excreción de orotato fue 1,7 veces superior con respecto

a la de cepa wt (Figuras 8C y D). La eliminación del gen *pyrE* condujo a un cambio profundo en el perfil de crecimiento celular y la concentración de orotato extracelular. Esta cepa solo creció hasta una DO_{600} de 0,8 unidades, es decir, 4 veces menos que la cepa wt, y apenas consumió glicerol, solo el 22,8 % del total (Figuras 8A y B). La diferencia más drástica en esta cepa estuvo en la excreción de orotato, que fue 19 veces mayor que la excreción observada en wt, con un máximo de 1,82 mM (Figura 8C). La complementación de la cepa $\Delta pyrE$ con la proteína OPRTasa implicó la recuperación de un perfil similar al de la cepa wt. Después de la inducción de la expresión de la OPRTasa a las 3 h de cultivo, hubo un aumento en el crecimiento celular y del consumo de la fuente de carbono, alcanzando el nivel de la cepa wt a las 24 h de cultivo (Figuras 8A y B). El mayor cambio en la cepa $\Delta pyrE$ después de la complementación con la OPRTasa se observó en la concentración de orotato extracelular, ya que la concentración máxima fue de 0,19 mM, es decir, 10 veces menos que sin la suplementación con la OPRTasa (Figura 8C y D). Por el contrario, la complementación de la cepa $\Delta pyrE$ con el mutante OPRTasa acetilado en la lisina 103 mostró casi el mismo comportamiento que la cepa $\Delta pyrE$, lo que implica un bajo crecimiento celular y un consumo incompleto de la fuente de carbono (Figuras 8A y B). Además, la suplementación de la cepa $\Delta pyrE$ con la proteína OPRTasa-103AcK produjo una excreción de orotato muy similar a la de la cepa no complementada, con un máximo de 1,37 mM, 15 veces mayor que la de la cepa wt (Figura 8C). De manera similar, la complementación de la cepa deficiente en *pyrE* con la OPRTasa-26AcK mostró un comportamiento similar a la complementación con la proteína OPRTasa-103AcK. Así, el glicerol no se consumió por completo (Figura 8B), mientras que el crecimiento celular fue mayor que en la cepa $\Delta pyrE$ complementada con OPRTasa-103AcK y la concentración máxima de excreción de orotato fue de 0,24 mM, solo 2,7 veces mayor que la de la cepa wt (Figuras 8A, C y D). Todos estos resultados, junto con el ensayo RC (Figura 7) y los parámetros estequiométricos (Tabla 2) destacaron la baja actividad de la proteína OPRTasa acetilada en las lisinas 26 o 103 *in vivo*, y la relevancia de estas acetilaciones para los parámetros fisiológicos y el desarrollo celular normal.

Discusión

La hipótesis de regulación por acetilación de esta ruta se basó en un estudio previo en el que observamos un aumento de 35 veces en la concentración extracelular de orotato en el mutante $\Delta cobB$ con respecto a la cepa *E. coli* BL21 wt [58]. En ese estudio,

asumimos que el aumento del nivel de acetilación de la isocitrato liasa en la cepa $\Delta cobB$ podría implicar una disminución del flujo a través del ciclo de glioxilato y, por lo tanto, un aumento del flujo a través del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (ciclo TCA) que implica un aumento en la concentración de α -cetoglutarato (α -KG) [64]. Sin embargo, este hecho no tiene por qué ser la única causa de la elevada concentración extracelular de orotato en la cepa $\Delta cobB$. En el presente estudio, el fenotipo de medio RC más oscuro que mostró la cepa wt con respecto al mutante $\Delta cobB$ (Figura 2) indicó una biosíntesis de pirimidinas más baja en la cepa deficiente en *cobB*. Este hecho junto con la acumulación de orotato en $\Delta cobB$ podría indicar un bloqueo de la ruta metabólica por acetilación. Además, algunas proteínas de la vía se han identificado como diana de la desacetilasa CobB [65] y aparecen acetiladas en diversos estudios del acetiloma de *E. coli* [36]–[41].

Para determinar si había un bloqueo de la ruta de biosíntesis de pirimidinas *de novo* por acetilación de lisinas, se estudió la concentración de metabolitos intracelulares y extracelulares en las cepas wt y $\Delta cobB$, y los resultados derivados reforzaron nuestra hipótesis (Figura 3). La concentración del producto final de la ruta y precursor de todas las pirimidinas, el UMP, fue significativamente mayor en la cepa wt que en la cepa $\Delta cobB$ (Figura 3A), lo cual fue consistente con los resultados del medio RC (Figura 2). A pesar de la menor concentración final de UMP en la cepa $\Delta cobB$, observamos dos metabolitos en los que la concentración en este mutante fue significativamente mayor que en la cepa wt, estos fueron el CP y el orotato (Figura 3A). Estos datos apoyarían una regulación de la OPRTasa por acetilación.

Seguidamente, se realizaron ensayos de Western blot y de actividad enzimática de la OPRTasa purificada, desacetilada con CobB y acetilada químicamente con acetil-P 10 mM (Figura 4). La desacetilación de la OPRTasa, verificada por Western blot (Figura 4A), implicó un ligero aumento de la actividad enzimática (Figura 4B), mientras que la acetilación de la enzima condujo a una disminución significativa de su actividad (Figura 4B). Además, a través de la incorporación específica de N ϵ -acetil-L-lisina en las posiciones K26 o K103 de la proteína OPRTasa, proporcionamos evidencias bioquímicas del efecto de la acetilación/desacetilación en la actividad de la enzima OPRTasa. La actividad enzimática se vio fuertemente afectada por la acetilación en la K26 y la K103, con una pérdida del 71,2% y 96,2%, respectivamente, lo que implica casi la desaparición de la actividad enzimática en la OPRTasa-103AcK (Figura 5). La desacetilación de las enzimas OPRTasa-26AcK y OPRTasa-103AcK con la desacetilasa CobB *in vitro*, revirtió los cambios

producidos recuperando la actividad enzimática y los parámetros cinéticos a valores similares a los del control OPRTasa (Figura 5 y Tabla 1).

Varios estudios han demostrado la importancia de estos residuos de lisina en las OPRTasas de *E. coli* y otros microorganismos [9], [24], [29], [62], [66], pero hasta donde sabemos, el efecto de la acetilación en la K26 y la K103 aún no se ha estudiado. Las OPRTasas de *E. coli* y *Salmonella enterica* (*S. enterica*) comparten más del 97 % de identidad en sus secuencias y el mismo pliegue general [9], [66] (Figura S5), por lo que hemos utilizado estructuras de *S. enterica* para mostrar los efectos de la acetilación (Figura 9). La gran mayoría de las estructuras de las OPRTasas analizadas se componen de dos subunidades con un bucle flexible que se asienta en el sitio catalítico de la subunidad adyacente para interactuar con el sustrato PRPP [62], [66]–[68]. Atendiendo a la posición y las interacciones de los residuos de lisina estudiados, se ha informado que la K26 está involucrada en la unión del OMP, el orotato y, en menor medida, del PRPP [61]. El esqueleto de nitrógeno de la K26 forma un enlace de hidrógeno con el grupo carboxilato del OMP y el orotato, y el grupo ϵ -amino de la K26 forma enlaces de hidrógeno con un grupo hidroxilo del OMP y con la región 5'-fosfato del PRPP [9], [29], [62], [66], [69] (Figura 9). Por lo tanto, la acetilación del grupo ϵ -amino de la K26 sería responsable de cierta distorsión de la arquitectura y de la carga electrostática en el centro activo de la enzima, lo que daría como resultado un aumento de la K_M para el orotato, el PPI y el OMP, y una disminución de la k_{cat} de 6 y 19 veces, para la reacción inversa y directa, respectivamente (Tabla 1). Estos resultados fueron similares a los obtenidos en otros estudios para la mutación de la lisina en esta posición por una glutamina o una alanina [70]. Con respecto a la OPRTasa-103AcK, la unión covalente del radical acetilo al grupo ϵ -amino del residuo de lisina involucró los mayores cambios catalíticos, ya que la actividad enzimática se vio fuertemente afectada, con una reducción de la k_{cat} de 300 y 150 veces para la reacción directa e inversa, e incrementos en la K_M para los sustratos PRPP y PPI (Tabla 1). Además, estos resultados confirman el papel esencial de la K103 para la catálisis, hecho que había sido observado previamente cuando la lisina se sustituyó por glutamina o alanina [70]. La K103 pertenece al bucle flexible altamente conservado de la OPRTasa (residuos 99-109), que permanece en una conformación abierta sin el sustrato y se mueve a una conformación cerrada para interactuar con los sustratos unidos y secuestrarlos del solvente [9], [66], [67]. Por lo tanto, la K103 se mueve al sitio catalítico de la subunidad adyacente e interactúa con la fracción pirofosfato del PRPP, forma un enlace de hidrógeno intrabucle a través del grupo ϵ -amino con el carboxilato del E107, lo que ayuda a liberar

PPI después del recambio catalítico. Asimismo, la K103 interacciona a través del nitrógeno de la cadena lateral con el oxígeno del carbonilo de la G109 [9], [29], [62], [66], [68] (Figura 9). En consecuencia, el aumento de tamaño de la cadena lateral y la neutralización de la carga positiva provocada por la acetilación de la K103 implicaría una distribución de carga y un plegamiento del bucle ineficientes y, por tanto, un impedimento para el desarrollo de la actividad catalítica como observamos en este estudio (Figura 5 y Tabla 1).

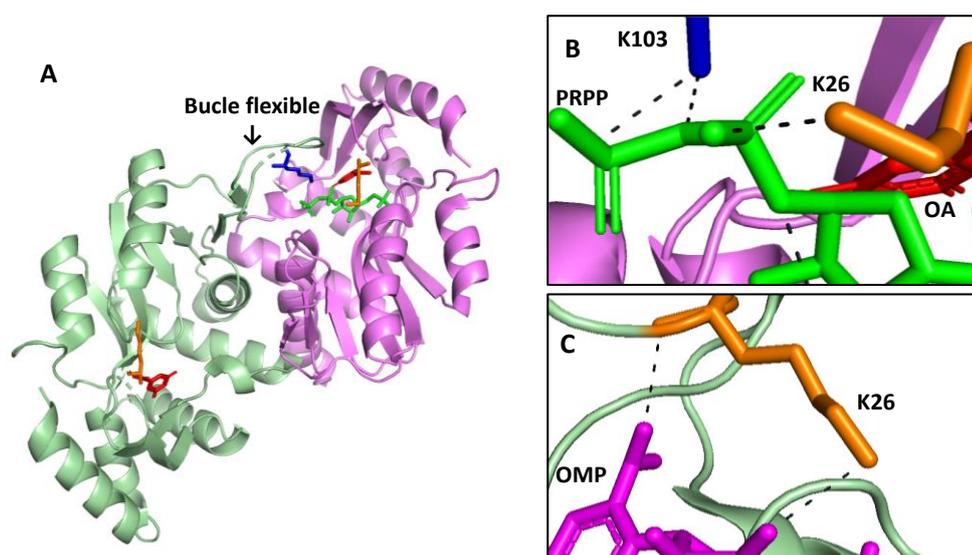


Figura 9: Estructura cristalográfica de la OPRTasa de *S. enterica*. Las dos subunidades se colorearon con verde y morado. La K103 está marcada en azul y la K26 está identificada en naranja. (A) y (B) OPRTasa con PRPP (verde) y orotato (rojo) (ID PDB: 1LH0). (C) OPRTasa con OMP (púrpura) (ID de PDB: 1STO). Los enlaces de hidrógeno detectados entre los grupos NH_3^+ de las lisinas, K26 o K103, y los sustratos PRPP y OMP se muestran en líneas discontinuas.

Además, se demostró la acetilación *in vivo* de la OPRTasa de *E. coli*, ya que la proteína purificada de mutantes relacionados con esta modificación mostró una actividad enzimática diferente. Específicamente, la actividad de la OPRTasa disminuyó cuando se expresó en las cepas ΔackA o ΔcobB y aumentó en la cepa Δpta (Figura 6). Los resultados sugieren que la acetilación de la OPRTasa podría derivar de la acumulación de intermediarios metabólicos paralelos al consumo de glucosa, principalmente acetil-P, que favorecen la acetilación no enzimática [36], [38]. Los resultados coincidieron con los estudios del proteoma en los que se encontró la OPRTasa acetilada en los residuos de lisina 26 y 103 en condiciones que favorecen la acetilación química, como son una alta concentración de glucosa como fuente de carbono y en la fase estacionaria de crecimiento [36], [38]–[40]. Además, no se observaron diferencias significativas en la actividad enzimática de la OPRTasa purificada de wt, ΔpatZ y ΔyiaC , aunque no se puede descartar

que otra lisín-acetiltransferasa pueda estar implicada en la regulación de la acetilación de la OPRTasa.

Los efectos fisiológicos de la inactivación de la OPRTasa debido a la acetilación de lisinas se muestran en las Figuras 7 y 8 y la Tabla 2. La complementación del mutante $\Delta pyrE$ con la OPRTasa devolvió un perfil similar a la cepa wt (Figuras 7 y 8). En cuanto a la acetilación permanente en la K103 de la OPRTasa, resultó en un comportamiento análogo al observado para la cepa $\Delta pyrE$ (Figuras 7 y 8 y Tabla 2). Estos resultados implicaban que la OPRTasa-103AcK no era lo suficientemente activa *in vivo* para complementar la delección del gen *pyrE*. Por su parte, la acetilación de la K26 en la OPRTasa impidió que se restableciera el fenotipo wt. Sin embargo, la enzima se vio menos afectada por esta acetilación que por la acetilación en la posición 103, ya que la biosíntesis de pirimidinas y el crecimiento celular fueron mayores, y la excreción de orotato fue significativamente menor (Figuras 7 y 8 y Tabla 2). Finalmente, la implicación de la acetilación permanente, tanto de la K26 como de la K103, en el comportamiento fisiológico y el perfil de excreción de orotato fue mayor que la derivada de la delección de *cobB*. Esto podría deberse a que en el mutante $\Delta cobB$ la acetilación de estas lisinas no es tan completa y homogénea como en las proteínas mutantes OPRTasa-26AcK y OPRTasa-103AcK.

Es significativo que los residuos K26 y K103 estén ampliamente conservados entre las OPRTasas de diferentes organismos. Por eso llevamos a cabo la alineación de secuencias de las OPRTasas de diversos organismos procariotas y eucariotas importantes, empleados como modelo o responsables del desarrollo de diversas enfermedades (*E. coli*, *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*), *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*), *S. enterica*, *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), *Clostridium botulinum* (*C. botulinum*), *Bacillus anthracis* (*B. anthracis*), *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*), *Homo sapiens*, *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), *Rhodopseudomonas palustris* (*R. palustris*) y *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*)) y el estudio mostró que la K103 está conservada en todos los organismos excepto en *C. botulinum*, mientras que la K26 está menos conservada, pues no se encuentra en algunas bacterias Gram-positivas ni en *R. palustris* (Figura 10).

<i>P. falciparum</i>	SSYIKE-----MKKLLKVVLLKYKALKFGEFLKSKRKSNYFFSSG-VLNNIVSSNIIC	113
<i>S. cerevisiae</i>	PIMLED-----YQKNFLELAIECQALRFGSFKLKSGRESPYFFNLG-LFNTGKLLSNLA	54
<i>E. coli</i>	---MKP-----YQRQFIEFALSQVLFKFGFTLKSGRKSPLYFFNAG-LFNTGRDLALLG	50
<i>S. enterica</i>	---MKP-----YQRQFIEFALNKQVLFKFGFTLKSGRKSPLYFFNAG-LFNTGRDLALLG	50
<i>P. aeruginosa</i>	---MQA-----YQRDFIRFAIERGVLRFGFTLKSGRTSPYFFNAG-LFDSGLALARLG	50
<i>C. botulinum</i>	-----MSNIN---VIDILKESDALLEGHFLSSGRHSNRYCQCAKLLQCPQKAEKVI	49
<i>B. anthracis</i>	---MKK-----EIASHLLLEIGAVFLQPNPFTWASGGMKSPIYCDNRLTSLYPKVRQTIA	51
<i>B. subtilis</i>	NQILKQ-----IIAKHLLDIQAVFLRPNEPFTWASGILSPIYCDNRLTSLFPEVRNDVA	57
<i>Homo sapiens</i>	-----MAVARAALGPLVTGLYDQAFKFGDFVLSGLSSPIYIDLRGIVSRPRLLSQVA	54
<i>C. elegans</i>	PVVMKVAASPQIETDFFENLYQMECFRTGEFYLSGQMTPIYIDLRRIMSSPRLRMAA	76
<i>R. palustris</i>	PPVSKS--ASRAR----LADIIRARSFGRGEITLASGRKSDFYFNLKPTMCDPEGAALLA	79
<i>M. tuberculosis</i>	---MAG--PDRAE----LAELVRRLLSVVHGRVTLSSGREADYVDLRRATLHHRASALIG	51
	. * : : .	
<i>P. falciparum</i>	FLLSELILKNKLSFDYLLGASYKGIPIVSLTSHFLFES--KKYSNIFYLYDRKENKKEYGD	171
<i>S. cerevisiae</i>	TAYAIAIIQSDLKFDVIFGPAKGIPLAAIVCVKLAIEGGKFNQIYAFNRKEAKDHGE	114
<i>E. coli</i>	RFYAEALVDSGIEFDLLFGPAYKGIPIATTTAVALAEHH---DLPLPYCFNRKEAKDHGE	107
<i>S. enterica</i>	RFYAEALVDSGIEFDLLFGPAYKGIPIATTTAVALAEHH---DKDLPYCFNRKEAKDHGE	107
<i>P. aeruginosa</i>	RFYAEAVIDSGIDFDVLFGPAYKGIPLAATTAVALEQH---QRDLPMCFNRKEAKDHGE	107
<i>C. botulinum</i>	SVIAEKLKE--VDFNIIVGPAMGGVIVSYELARQT-----NKPGLFAERKEKGVICI	98
<i>B. anthracis</i>	AGLEELIKEHFPTVEVIAGTATAGIAHAHWSDRM-----DLPMCYVRSKAKGHGK	102
<i>B. subtilis</i>	SGISKLVKEHFPEAEMIAGTATAGIPHAALAADHL-----NLPICYVRSKAKAHGK	108
<i>Homo sapiens</i>	DILFQTAQNAISFDTVCGVPYALPLATVICSTN-----QIPMLIRRKETKDYGT	105
<i>C. elegans</i>	QAMCEKIVASNLKFDYVVGVPYAALPLATLVSDIL-----NVPMIMKRKEKAYGT	127
<i>R. palustris</i>	ELTFDALRD--DELDFIGGLEMGAVPLAGALQLSYLK----NHPIAAFFVRKKKKEHGA	133
<i>M. tuberculosis</i>	RLMRELTAD--WDYSVVGGLTLGADPVATAIMH---AP----GRPIDAFVVRKSKAKHGM	102
	. : * .	

Figura 10: Alineación de secuencias de proteínas OPRTasas de diferentes organismos eucariotas y procariotas. El recuadro naranja indica el residuo K26 y el recuadro azul indica el residuo K103 de la OPRTasa de *E. coli*.

Además de la importancia de la conservación de estas lisinas, la relevancia de este trabajo radica en que la ruta a la que pertenece la OPRTasa, y la propia enzima, son claves para el desarrollo de determinadas patologías humanas y, por tanto, dianas interesantes para su tratamiento. Esta enzima es de interés para el tratamiento de la tuberculosis causada por *M. tuberculosis* y la malaria causada por *P. falciparum* [24], [25]. Específicamente, en estudios sobre el acetiloma de este parásito, la lisina conservada homóloga a la lisina 26 de *E. coli* se ha detectado acetilada [71]. Por otro lado, la ruta de biosíntesis de pirimidinas también es un requisito para la proliferación de patógenos como *E. coli*, *S. enterica* y *B. anthracis* en sangre [72], para la colonización del tracto urinario por *E. coli* [73], y del intestino por *E. coli* y *S. enterica* [74], [75]. Además, esta vía es importante para la virulencia, la citotoxicidad y la resistencia a los antibióticos de *P. aeruginosa*, y se ha mostrado que la eliminación de *pyrE* provoca una disminución de los factores de virulencia de este microorganismo [76]. Sin embargo, la biosíntesis de pirimidinas no solo es importante para los organismos patógenos, sino que también se ha observado que es relevante para el metabolismo de diferentes fármacos por parte de la microbiota [77]. Así, la OPRTasa en la microbiota ayuda al metabolismo de fármacos quimioterapéuticos basados en fluoropirimidinas [78]. Al mismo tiempo, se ha informado

recientemente que el patrón de acetilación de la microbiota puede cambiar como consecuencia de diferentes enfermedades [79].

Los resultados de este trabajo revelan una regulación postraducciona crucial de la ruta de biosíntesis de pirimidinas *de novo* mediante la acetilación de lisinas de la OPRTasa, la quinta enzima de la vía. Además, la acetilación de lisinas en los residuos K26 o K103 de la OPRTasa, presumiblemente por un mecanismo químico, puede ser revertida por la sirtuína CobB de *E. coli*, lo que da una mayor dimensión al carácter regulador de esta modificación. Aunque esta enzima ha sido modificada por otras MPTs como la succinilación [80], propionilación [81], esta es la primera vez, hasta donde sabemos, que se informa de la regulación por acetilación de lisinas de una OPRTasa. Nuestro trabajo demuestra que la regulación de esta enzima por acetilación en *E. coli* puede tener importantes consecuencias para la salud humana a través del desarrollo de nuevos fármacos, y también representa un importante punto de partida para la investigación de enzimas homólogas.

Referencias

- [1] G. A. O'Donovan and J. Neuhard, "Pyrimidine Metabolism in Microorganisms," *Bacteriol. Rev.*, vol. 34, no. 3, pp. 278–343, 1970, doi: 10.1128/br.34.3.278-343.1970.
- [2] C. L. Turnbough and R. L. Switzer, "Regulation of Pyrimidine Biosynthetic Gene Expression in Bacteria: Repression without Repressors," *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 72, no. 2, pp. 266–300, 2008, doi: 10.1128/mmbr.00001-08.
- [3] R. Zrenner, M. Stitt, U. Sonnewald, and R. Boldt, "Pyrimidine and purine biosynthesis and degradation in plants," *Annu. Rev. Plant Biol.*, vol. 57, pp. 805–836, 2006, doi: 10.1146/annurev.arplant.57.032905.105421.
- [4] M. E. Jones, "Pyrimidine Nucleotide Biosynthesis in Animals: genes, enzymes and regulation of UMP biosynthesis," *Ann. Rev. Biochem.*, vol. 49, pp. 253–279, 1980, doi: 10.1146/annurev.bi.49.070180.001345.
- [5] F. Guillou, S. D. Rubino, R. S. Markovitz, D. M. Kinney, and C. J. Lusty, "*Escherichia coli* carbamoyl phosphate-synthetase: Domains of glutaminase and synthetase-subunit interaction," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 86, no. 21, pp. 8304–8308, 1989, doi: 10.1073/pnas.86.21.8304.
- [6] S. F. Nowlan and E. R. Kantrowitz, "Superproduction and rapid purification of *Escherichia coli* aspartate transcarbamylase and its catalytic subunit under extreme derepression of the pyrimidine pathway," *J. Biol. Chem.*, vol. 260, no. 27, pp. 14712–14716, 1985, doi: 10.1016/s0021-9258(17)38630-1.
- [7] M. Lee, C. W. Chan, S. C. Graham, R. I. Christopherson, J. M. Guss, and M. J. Maher, "Structures of Ligand-free and Inhibitor Complexes of Dihydroorotase from *Escherichia coli*: Implications for Loop Movement in Inhibitor Design," *J. Mol. Biol.*, vol. 370, no. 5, pp. 812–825, 2007, doi: 10.1016/j.jmb.2007.05.019.
- [8] R. L. Fagan and B. A. Palfey, "Roles in binding and chemistry for conserved active site residues in the class 2 dihydroorotate dehydrogenase from *Escherichia coli*," *Biochemistry*, vol. 48, no. 30, pp. 7169–7178, 2009, doi: 10.1021/bi900370s.
- [9] A. Henriksen, N. Aghajari, K. F. Jensen, and M. Gajhede, "A flexible loop at the dimer interface is a part of the active site of the adjacent monomer of *Escherichia coli* orotate phosphoribosyltransferase," *Biochemistry*, vol. 35, no. 12, pp. 3803–3809, 1996, doi: 10.1021/bi952226y.
- [10] P. Harris, J.-C. Navarro Poulsen, K. F. Jensen, and S. Larsen, "Substrate binding induces domain movements in orotidine 5'-monophosphate decarboxylase," *J. Mol. Biol.*, vol. 318, no. 4, pp. 1019–1029, 2002, doi: 10.1016/S0022-2836(02)00200-0.
- [11] H.-G. Sprenger *et al.*, "Cellular pyrimidine imbalance triggers mitochondrial DNA-dependent innate immunity," *Nat. Metab.*, vol. 3, pp. 636–650, 2021, doi: 10.1038/s42255-021-00385-9.
- [12] K. K. Harden and J. L. Robinson, "Deficiency of UMP Synthase in Dairy Cattle : A Model for Hereditary Orotic Aciduria," *J. Inherit. Metab. Dis.*, vol. 10, no. 3, pp. 201–209, 1987, doi: 10.1007/BF01800062.
- [13] J. Koch *et al.*, "CAD mutations and uridine-responsive epileptic encephalopathy,"

- Brain*, vol. 140, no. 2, pp. 279–286, 2017, doi: 10.1093/brain/aww300.
- [14] S. B. Ng *et al.*, “Exome sequencing identifies the cause of a Mendelian disorder,” *Nat. Genet.*, vol. 42, no. 1, pp. 30–35, 2010, doi: 10.1038/ng.499.Exome.
- [15] A. Pesini *et al.*, “Brain pyrimidine nucleotide synthesis and Alzheimer disease,” *Aging (Albany. NY.)*, vol. 11, no. 19, pp. 8433–8462, 2019, doi: 10.18632/aging.102328.
- [16] M. C. Lafita-navarro *et al.*, “Inhibition of the *de novo* pyrimidine biosynthesis pathway limits ribosomal RNA transcription causing nucleolar stress in glioblastoma cells,” *Plos Genet.*, vol. 16, no. 11, pp. 1–28, 2020, doi: 10.1371/journal.pgen.1009117.
- [17] S. Christian *et al.*, “The novel dihydroorotate dehydrogenase (DHODH) inhibitor BAY 2402234 triggers differentiation and is effective in the treatment of myeloid malignancies,” *Leukemia*, vol. 33, pp. 2403–2415, 2019, doi: 10.1038/s41375-019-0461-5.
- [18] A. D. Robinson, M. Eich, and S. Varambally, “Dysregulation of *de novo* nucleotide biosynthetic pathway enzymes in cancer and targeting opportunities,” *Cancer Lett.*, vol. 470, pp. 134–140, 2020, doi: 10.1016/j.canlet.2019.11.013.
- [19] A. Siddiqui and P. Ceppi, “A non-proliferative role of pyrimidine metabolism in cancer,” *Mol. Metab.*, vol. 35, no. 100962, pp. 1–12, 2020, doi: 10.1016/j.molmet.2020.02.005.
- [20] C. Yang *et al.*, “Novel AR-12 derivatives , P12-23 and P12- 34 , inhibit fl avivirus replication by blocking host *de novo* pyrimidine biosynthesis,” *Emerg. Microbes Infect.*, vol. 7, no. 187, pp. 1–11, 2018, doi: 10.1038/s41426-018-0191-1.
- [21] J.-C. Valle-Casuso *et al.*, “Replication of Equine arteritis virus is efficiently suppressed by purine and pyrimidine biosynthesis inhibitors,” *Sci. Rep.*, vol. 10, no. 10100, pp. 1–11, 2020, doi: 10.1038/s41598-020-66944-4.
- [22] S. Chen *et al.*, “Drug screening identifies gemcitabine inhibiting rotavirus through alteration of pyrimidine nucleotide synthesis pathway,” *Antiviral Res.*, vol. 180, no. 104823, pp. 1–6, 2020, doi: 10.1016/j.antiviral.2020.104823.
- [23] A. Lupan and O. Helynck, “Inhibition of Pyrimidine Biosynthesis Pathway Suppresses Viral Growth through Innate Immunity,” *Plos Pathog.*, vol. 9, no. 10, pp. 1–18, 2013, doi: 10.1371/journal.ppat.1003678.
- [24] S. Donini, D. M. Ferraris, R. Miggiano, A. Massarotti, and M. Rizzi, “Structural investigations on orotate phosphoribosyltransferase from *Mycobacterium tuberculosis* , a key enzyme of the *de novo* pyrimidine biosynthesis,” *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1180, pp. 1–11, 2017, doi: 10.1038/s41598-017-01057-z.
- [25] M. B. Cassera, Y. Zhang, K. Z. Hazleton, and V. L. Schramm, “Purine and Pyrimidine Pathways as Targets in *Plasmodium falciparum*,” *Curr. Top. Med. Chem.*, vol. 11, no. 16, pp. 2103–2115, 2012, doi: 10.2174/156802611796575948.
- [26] F. Assis de Gontijo, R. C. Pascon, L. Fernandes, J. J. Machado, J. A. Alsbaugh, and M. A. Vallim, “The role of the *de novo* pyrimidine biosynthetic pathway in *Cryptococcus neoformans* high temperature growth and virulence,” *Fungal Genet. Biol.*, vol. 70, pp. 12–23, 2015, doi: 10.1016/j.fgb.2014.06.003.The.

- [27] K. Tiwari and V. K. Dubey, "Fresh insights into the pyrimidine metabolism in the trypanosomatids," *Parasites and Vectors*, vol. 11, no. 87, pp. 1–15, 2018, doi: 10.1186/s13071-018-2660-8.
- [28] W. D. L. Musick and W. L. Nyhan, "Structural features of the phosphoribosyl-transferases and their relationship to the human deficiency disorders of purine and pyrimidine metabolism," *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, vol. 11, no. 1, pp. 1–34, 1981, doi: 10.3109/10409238109108698.
- [29] C. Grubmeyer, M. Riis Hansen, A. A. Fedorov, and S. C. Almo, "Structure of *Salmonella typhimurium* OMP synthase in a complete substrates complex," *Biochemistry*, vol. 51, no. 22, pp. 4397–4405, 2012, doi: 10.1021/bi300083p.Structure.
- [30] M. Jin Yoon *et al.*, "SIRT1-mediated eNAMPT secretion from adipose tissue regulates hypothalamic NAD⁺ and function in mice," *Cell Metab.*, vol. 21, no. 5, pp. 706–717, 2015, doi: 10.1016/j.cmet.2015.04.002.SIRT1-mediated.
- [31] W. L. Nyhan, "Disorders of purine and pyrimidine metabolism," *Mol. Genet. Metab.*, vol. 86, no. 1–2, pp. 25–33, 2005, doi: 10.1016/j.ymgme.2005.07.027.
- [32] J. Li and M. H. Bluth, "Pharmacogenomics of drug metabolizing enzymes and transporters : implications for cancer therapy," *Pharmgenomics. Pers. Med.*, vol. 4, pp. 11–33, 2011, doi: 10.2147/PGPM.S18861.
- [33] J. T. Andersen, P. Poulsen, and K. F. Jensen, "Attenuation in the *rph-pyrE* operon of *Escherichia coli* and processing of the dicistronic mRNA," *Eur. J. Biochem.*, vol. 206, no. 2, pp. 381–390, 1992, doi: 10.1111/j.1432-1033.1992.tb16938.x.
- [34] F. Bonekamp, H. D. Andersen, T. Christensen, and K. F. Jensen, "Codon-defined ribosomal pausing in *Escherichia coli* detected by using the *pyrE* attenuator to probe the coupling between transcription and translation," *Nucleic Acids Res.*, vol. 13, no. 11, pp. 4113–4123, 1985, doi: 10.1093/nar/13.11.4113.
- [35] P. Poulsen and K. F. Jensen, "Effect of UTP and GTP pools on attenuation at the *pyrE* gene of *Escherichia coli*," *Mol. Genet. Genomics*, vol. 208, no. 1–2, pp. 152–158, 1987, doi: 10.1007/BF00330436.
- [36] B. Weinert *et al.*, "Acetyl-Phosphate is a critical determinant of Lysine Acetylation in *E.coli*," *Mol. Cell*, vol. 51, no. 2, pp. 265–272, 2013, doi: 10.1016/j.molcel.2013.06.003.
- [37] D. G. Christensen *et al.*, "Identification of Novel Protein Lysine Acetyltransferases in *Escherichia coli*," *MBio*, vol. 9, no. 5, pp. 1–23, 2018, doi: 10.1128/mBio.
- [38] M. L. Kuhn *et al.*, "Structural, kinetic and proteomic characterization of acetyl phosphate-dependent bacterial protein acetylation," *PLoS One*, vol. 9, no. 4, pp. 1–26, 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0094816.
- [39] B. Schilling *et al.*, "Global lysine acetylation in *Escherichia coli* results from growth conditions that favor acetate fermentation," *J. Bacteriol.*, vol. 201, no. 9, pp. 1–9, 2019, doi: 10.1101/457929.
- [40] B. T. Weinert, S. Satpathy, B. K. Hansen, D. Lyon, L. J. Jensen, and C. Choudhary, "Accurate quantification of site-specific acetylation stoichiometry reveals the impact of Sirtuin deacetylase CobB on the *E. coli* acetylome," *Mol. Cell. Proteomics*, vol. 16, no. 5, pp. 759–769, 2017, doi: 10.1074/mcp.M117.067587.

- [41] G. Colak *et al.*, “Identification of lysine succinylation substrates and the succinylation regulatory enzyme CobB in *Escherichia coli*,” *Mol. Cell. Proteomics*, vol. 12, no. 12, pp. 3509–3520, 2013, doi: 10.1074/mcp.M113.031567.
- [42] B. Macek, K. Forchhammer, J. Hardouin, E. Weber-Ban, C. Grangeasse, and I. Mijakovic, “Protein post-translational modifications in bacteria,” *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 17, no. 11, pp. 651–664, 2019, doi: 10.1038/s41579-019-0243-0.
- [43] T. De Diego Puente *et al.*, “The protein acetyltransferase PatZ from *Escherichia coli* is regulated by autoacetylation-induced oligomerization,” *J. Biol. Chem.*, vol. 290, no. 38, pp. 23077–23093, 2015, doi: 10.1074/jbc.M115.649806.
- [44] A. J. Wolfe, “Bacterial protein acetylation: new discoveries unanswered questions,” *Curr. Genet.*, vol. 62, no. 2, pp. 335–341, 2016, doi: 10.1007/s00294-015-0552-4.
- [45] J. Gallego-Jara, A. Écija Conesa, T. de Diego Puente, G. Lozano Terol, and M. Cánovas Díaz, “Characterization of CobB kinetics and inhibition by nicotinamide,” *PLoS One*, vol. 12, no. 12, pp. 1–19, 2017, doi: 10.1371/journal.pone.0189689.
- [46] K. A. Datsenko and B. L. Wanner, “One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 97, no. 12, pp. 6640–6645, 2000, doi: 10.1073/pnas.120163297.
- [47] S. de Boor *et al.*, “Small GTP-binding protein Ran is regulated by posttranslational lysine acetylation,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 112, no. 28, pp. 3679–3688, 2015, doi: 10.1073/pnas.1505995112.
- [48] G. Lozano Terol, J. Gallego-jara, R. A. Sola Martinez, A. Martinez Vivancos, M. Canovas Diaz, and T. De Diego Puente, “Impact of the Expression System on Recombinant Protein Production in *Escherichia coli* BL21,” *Front. Microbiol.*, vol. 12, no. 682001, pp. 1–12, 2021, doi: 10.3389/fmicb.2021.682001.
- [49] M. Z. Li and S. J. Elledge, “Harnessing homologous recombination in vitro to generate recombinant DNA via SLIC,” *Nat. Methods*, vol. 4, no. 3, pp. 251–256, 2007, doi: 10.1038/NMETH1010.
- [50] J. Spura, L. C. Reimer, P. Wieloch, K. Schreiber, S. Buchinger, and D. Schomburg, “A method for enzyme quenching in microbial metabolome analysis successfully applied to gram-positive and gram-negative bacteria and yeast,” *Anal. Biochem.*, vol. 394, no. 2, pp. 192–201, 2009, doi: 10.1016/j.ab.2009.07.016.
- [51] D. Kim, F. Achcar, R. Breitling, K. E. Burgess, M. P. Barrett, and M. P. Barrett, “LC – MS-based absolute metabolite quantification : application to metabolic flux measurement in trypanosomes,” *Metabolomics*, vol. 11, no. 6, pp. 1721–1732, 2015, doi: 10.1007/s11306-015-0827-2.
- [52] P. Poulsen, K. F. Jensen, P. Valentin-Hansen, P. Carlsson, and L. G. Lundberg, “Nucleotide sequence of the *Escherichia coli pyrE* gene and of the DNA in front of the protein-coding region,” *Eur. J. Biochem.*, vol. 135, no. 2, pp. 223–229, 1983, doi: 10.1111/j.1432-1033.1983.tb07641.x.
- [53] S. C. Pastra-Landis, J. Foote, and E. R. Kantrowitz, “An Improved Colorimetric Assay for Aspartate and Ornithine Transcarbamylases,” *Anal. Biochem.*, vol. 118, no. 2, pp. 358–363, 1981, doi: 10.1016/0003-2697(81)90594-7.
- [54] K. Martínez-Gómez *et al.*, “New insights into *Escherichia coli* metabolism: carbon

- scavenging, acetate metabolism and carbon recycling responses during growth on glycerol," *Microb. Cell Fact.*, vol. 11, no. 46, pp. 1–21, 2012, doi: 10.1186/1475-2859-11-46.
- [55] K. Valgepea, K. Adamberg, and R. Vilu, "Decrease of energy spilling in *Escherichia coli* continuous cultures with rising specific growth rate and carbon wasting," *BMC Syst. Biol.*, vol. 5, no. 1, pp. 1–11, 2011, doi: 10.1186/1752-0509-5-106.
- [56] K. A. J. F. Jensen, "The *Escherichia coli* K-12 " Wild Types " W3110 and MG1655 Have an rph Frameshift Mutation That Leads to Pyrimidine Starvation Due to Low *pyrE* Expression Levels," *J. Bacteriol.*, vol. 175, no. 11, pp. 3401–3407, 1993, doi: 10.1128/jb.175.11.3401-3407.1993.
- [57] J. E. Womack and G. A. O'Donovan, "Orotic acid excretion in some wild-type strains of *Escherichia coli* K-12," *J. Bacteriol.*, vol. 136, no. 2, pp. 825–827, 1978, doi: 10.1128/jb.136.2.825-827.1978.
- [58] G. Lozano Terol, J. Gallego-Jara, R. A. Sola Martínez, M. Cánovas Díaz, and T. De Diego Puente, "Engineering protein production by rationally choosing a carbon and nitrogen source using *E. coli* BL21 acetate metabolism knockout strains," *Microb. Cell Fact.*, vol. 18, no. 151, pp. 1–19, 2019, doi: 10.1186/s12934-019-1202-1.
- [59] M. Garavaglia, E. Rossi, and P. Landini, "The pyrimidine nucleotide biosynthetic pathway modulates production of biofilm determinants in *Escherichia coli*," *PLoS One*, vol. 7, no. 2, pp. 1–10, 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0031252.
- [60] V. Edge, N. M. Allewell, and J. M. Sturtevant, "Differential Scanning Calorimetric Study of the Thermal Denaturation of Aspartate Transcarbamoylase of *Escherichia coli*," *Biochemistry*, vol. 27, no. 21, pp. 8081–8087, 1988, doi: 10.1021/bi00421a017.
- [61] C. Grubmeyer, E. Segura, and R. Dorfman, "Active site lysines in orotate phosphoribosyltransferase," *J. Biol. Chem.*, vol. 268, no. 27, pp. 20299–20304, 1993, doi: 10.1016/s0021-9258(20)80728-5.
- [62] L. González-Segura, J. F. Witte, R. W. McClard, and T. D. Hurley, "Ternary complex formation and induced asymmetry in orotate phosphoribosyltransferase," *Biochemistry*, vol. 46, no. 49, pp. 14075–14086, 2007, doi: 10.1021/bi701023z.
- [63] M. Shimosaka, Y. Fukuda, K. Murata, and A. Kimura, "Purification and properties of orotate phosphoribosyltransferases from *Escherichia coli* K-12, and its derivative purine-sensitive mutant," *J. Biochem.*, vol. 98, no. 6, pp. 1689–1697, 1985, doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a135440.
- [64] S. Castaño-Cerezo *et al.*, "Protein acetylation affects acetate metabolism, motility and acid stress response in *Escherichia coli*," *Mol. Syst. Biol.*, vol. 10, no. 762, pp. 1–15, 2014, doi: 10.15252/msb.20145227.
- [65] X. He, S. Tao, H. Jiang, C. Liu, F. Wu, and S. Guo, "Global identification of CobB interactors by an *Escherichia coli* proteome microarray," *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*, vol. 46, no. 7, pp. 548–555, 2014, doi: 10.1093/abbs/gmu038.
- [66] M. Roca *et al.*, "Elucidating the Catalytic Reaction Mechanism of Orotate Phosphoribosyltransferase by Means of X-ray Crystallography and Computational Simulations," *ACS Catal.*, vol. 10, no. 3, pp. 1871–1885, 2020, doi: 10.1021/acscatal.9b05294.

- [67] G. P. Wang, S. M. Cahill, X. Liu, M. E. Girvin, and C. Grubmeyer, "Motional dynamics of the catalytic loop in OMP synthase," *Biochemistry*, vol. 38, no. 1, pp. 284–295, 1999, doi: 10.1021/bi982057s.
- [68] G. P. Wang, M. R. Hansen, and C. Grubmeyer, "Loop residues and catalysis in OMP synthase," *Biochemistry*, vol. 51, no. 22, pp. 4406–4415, 2012, doi: 10.1021/bi300082s.
- [69] G. Scapin, C. Grubmeyer, and J. C. Sacchettini, "Crystal Structure of Orotate Phosphoribosyltransferase," *Biochemistry*, vol. 33, no. 6, pp. 1287–1294, 1994, doi: 10.1021/bi00172a001.
- [70] D. H. Ozturk, R. H. Dorfman, G. Scapin, J. C. Sacchettini, and C. Grubmeyer, "Locations and Functional Roles of Conserved Lysine Residues in *Salmonella typhimurium* Orotate Phosphoribosyltransferase," *Biochemistry*, vol. 34, no. 34, pp. 10755–10763, 1995, doi: 10.1021/bi00034a007.
- [71] J. Miao *et al.*, "Extensive lysine acetylation occurs in evolutionarily conserved metabolic pathways and parasite-specific functions during *Plasmodium falciparum* intraerythrocytic development," *Mol. Microbiol.*, vol. 89, no. 4, pp. 660–675, 2013, doi: 10.1111/mmi.12303.
- [72] S. Samant *et al.*, "Nucleotide biosynthesis is critical for growth of bacteria in human blood," *PLoS Pathog.*, vol. 4, no. 2, pp. 1–10, 2008, doi: 10.1371/journal.ppat.0040037.
- [73] F. K. Bahrani-Mougeot *et al.*, "Type 1 fimbriae and extracellular polysaccharides are preeminent uropathogenic *Escherichia coli* virulence determinants in the murine urinary tract," *Mol. Microbiol.*, vol. 45, no. 4, pp. 1079–1093, 2002, doi: 10.1046/j.1365-2958.2002.03078.x.
- [74] H.-J. Yang, L. Bogomolnaya, M. McClelland, and H. Andrews-Polymenis, "De novo pyrimidine synthesis is necessary for intestinal colonization of *Salmonella Typhimurium* in chicks," *PLoS One*, vol. 12, no. 10, pp. 1–15, 2017, doi: 10.1371/journal.pone.0183751.
- [75] J. Vogel-Scheel, C. Alpert, W. Engst, G. Loh, and M. Blaut, "Requirement of Purine and Pyrimidine Synthesis for Colonization of the Mouse Intestine by *Escherichia coli*," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 76, no. 15, pp. 5181–5187, 2010, doi: 10.1128/AEM.00242-10.
- [76] A. Niazy and L. E. Hughes, "Accumulation of Pyrimidine Intermediate Orotate Decreases Virulence Factor Production in *Pseudomonas aeruginosa*," *Curr. Microbiol.*, vol. 71, no. 2, pp. 229–234, 2015, doi: 10.1007/s00284-015-0826-6.
- [77] I. D. Wilson and J. K. Nicholson, "Gut Microbiome Interactions with Drug Metabolism, Efficacy and Toxicity," *Transl. Res.*, vol. 179, pp. 204–222, 2017, doi: 10.1016/j.trsl.2016.08.002.Gut.
- [78] T. A. Scott *et al.*, "Host-Microbe Co-metabolism Dictates Cancer Drug Efficacy in *C. elegans*," *Cell*, vol. 169, no. 3, pp. 442–456, 2017, doi: 10.1016/j.cell.2017.03.040.
- [79] X. Zhang *et al.*, "Widespread protein lysine acetylation in gut microbiome and its alterations in patients with Crohn's disease," *Nat. Commun.*, vol. 11, no. 4120, pp. 1–12, Dec. 2020, doi: 10.1038/s41467-020-17916-9.
- [80] B. T. Weinert *et al.*, "Lysine succinylation is a frequently occurring modification in

prokaryotes and eukaryotes and extensively overlaps with acetylation," *Cell Rep.*, vol. 4, no. 4, pp. 842–851, Aug. 2013, doi: 10.1016/j.celrep.2013.07.024.

- [81] H. Okanishi, K. Kim, R. Masui, and S. Kuramitsu, "Lysine propionylation is a prevalent post-translational modification in *thermus thermophilus*," *Mol. Cell. Proteomics*, vol. 13, no. 9, pp. 2382–2398, 2014, doi: 10.1074/mcp.M113.035659.

Anexo

Tabla S1: Plásmidos, cepas y cebadores empleados en este estudio.

Plásmido	Descripción	Fuente
pKD13	Amp ^R /Kam ^R , casete de resistencia flanqueado por las regiones FRT	Yale Genetic Center <i>E. coli</i> Stock Center
pKD46	Amp ^R , replicación del plásmido sensible a la temperatura a 30°C. Sistema de la recombinasa Red del fago lambda inducible por arabinosa	Yale Genetic Center <i>E. coli</i> Stock Center
pRSET-A	Amp ^R . ori pBR322, promotor P _{T7}	Invitrogen
pET28a- <i>mbp</i>	Kan ^R . Promotor P _{T7lac} , proteína de fusión unión a maltosa (MBP)	Depósito del laboratorio
pET28a- <i>mbp-cobB</i>	Kan ^R . Promotor P _{T7lac} , proteína de fusión MBP. Expresión de CobB	Depósito del laboratorio
pRSET- <i>pyrE</i>	Amp ^R . Promotor P _{T7} . Expresión de OPRTasa	Este estudio
pRSET- <i>pyrBI</i>	Amp ^R . Promotor P _{T7} . Expresión de ATCasa	Este estudio
pET28a- <i>mbp-pyrE</i>	Kan ^R . Promotor P _{T7lac} , proteína de fusión MBP. Expresión de OPRTasa	Este estudio
pET28a- <i>mbp-pyrE</i> ^{26ambar}	Kan ^R . Promotor P _{T7lac} , proteína de fusión MBP. Expresión de OPRTasa-26AcK	Este estudio
pET28a- <i>mbp-pyrE</i> ^{103ambar}	Kan ^R . Promotor P _{T7lac} , proteína de fusión MBP. Expresión de OPRTasa-103AcK	Este estudio
pRSF-Duet-1-acetyllysyl-tRNA-synthetase AcKRS3/ <i>MbtRNA</i> _{CUA}	Kan ^R . Promotor P _{T7} . Expresión de acetil-lisil-ARNt-sintetasa AcKRS3/ <i>MbARNt</i> _{CUA}	[47]
pRSF- <i>mbp-pyrE</i> ^{26AcK}	Kan ^R . Promotor P _{T7} . Vector de coexpresión. Proteína de fusión MBP. Expresión de acetil-lisil-ARNt-sintetasa AcKRS3/ <i>MbARNt</i> _{CUA} y OPRTasa-26AcK	Este estudio
pRSF- <i>mbp-pyrE</i> ^{103AcK}	Kan ^R . Promotor P _{T7} . Vector de coexpresión. Proteína de fusión MBP. Expresión de acetil-lisil-ARNt-sintetasa AcKRS3/ <i>MbARNt</i> _{CUA} y OPRTasa-103AcK	Este estudio
pSF-pMB1'-BAD-YFP	Amp ^R . Promotor P _{BAD} . Expresión de Kringle YFP	[48]
pSF-pMB1'-BAD- <i>mbp-pyrE</i>	Amp ^R . Promotor P _{BAD} . Proteína de fusión MBP. Expresión de OPRTasa	Este estudio
pRSF-BAD- <i>mbp-pyrE</i> ^{26AcK}	Kan ^R . Promotor P _{BAD} . Vector de coexpresión. Proteína de fusión MBP. Expresión de acetil-lisil-ARNt-sintetasa AcKRS3/ <i>MbARNt</i> _{CUA} y OPRTasa-26AcK	Este estudio
pRSF-BAD- <i>mbp-pyrE</i> ^{103AcK}	Kan ^R . Promotor P _{BAD} . Vector de coexpresión. Proteína de fusión MBP. Expresión de acetil-lisil-ARNt-sintetasa AcKRS3/ <i>MbARNt</i> _{CUA} y OPRTasa-103AcK	Este estudio

Tabla S1: (Continuación)

Cepa de <i>E. coli</i>	Descripción	Fuente
Top10F'	F'[lacI ^q Tn10(tet ^R)] <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) φ80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ <i>lacX74</i> <i>deoR</i> <i>nupG</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> Δ(<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1</i> λ-	Invitrogen
BL21 (DE3)	F- <i>ompT gal dcm lon hsdSB</i> (<i>rB- mB-</i>) λ(DE3)	Promega
K12 BW25113	<i>lacI</i> ⁺ <i>rrnB</i> _{T14} Δ <i>lacZ</i> _{WJ16} <i>hsdR514</i> Δ <i>araBAD</i> _{AH33} Δ <i>rhaBAD</i> _{LD} ₇₈ <i>rph-1</i> Δ(<i>araB-D</i>)567 Δ(<i>rhaD-B</i>)568 Δ <i>lacZ</i> 4787 (:: <i>rrnB-3</i>) <i>hsdR514</i> <i>rph-1</i>	Invitrogen
BL21 (DE3) Δ<i>ackA</i>	F- <i>ompT gal dcm lon hsdSB</i> (<i>rB- mB-</i>) λ(DE3) <i>ackA</i> :Kan ^R	[58]
BL21 (DE3) Δ<i>pta</i>	F- <i>ompT gal dcm lon hsdSB</i> (<i>rB- mB-</i>) λ(DE3) <i>pta</i> :Kan ^R	[58]
BL21 (DE3) Δ<i>patZ</i>	F- <i>ompT gal dcm lon hsdSB</i> (<i>rB- mB-</i>) λ(DE3) <i>patZ</i> :Kan ^R	[58]
BL21 (DE3) Δ<i>cobB</i>	F- <i>ompT gal dcm lon hsdSB</i> (<i>rB- mB-</i>) λ(DE3) <i>cobB</i> :Kan ^R	[58]
BL21 (DE3) Δ<i>yiaC</i>	F- <i>ompT gal dcm lon hsdSB</i> (<i>rB- mB-</i>) λ(DE3) <i>yiaC</i> :Kan ^R	Este estudio
K12 BW25113 Δ<i>pyrE</i>	<i>lacI</i> ⁺ <i>rrnB</i> _{T14} Δ <i>lacZ</i> _{WJ16} <i>hsdR514</i> Δ <i>araBAD</i> _{AH33} Δ <i>rhaBAD</i> _{LD} ₇₈ <i>rph-1</i> Δ(<i>araB-D</i>) 567 Δ(<i>rhaD-B</i>) 568 Δ <i>lacZ</i> 4787 (:: <i>rrnB-3</i>) <i>hsdR514</i> <i>rph-1</i> <i>pyrE</i> :Kan ^R	Este estudio
K12 BW25113 Δ<i>cobB</i>	<i>lacI</i> ⁺ <i>rrnB</i> _{T14} Δ <i>lacZ</i> _{WJ16} <i>hsdR514</i> Δ <i>araBAD</i> _{AH33} Δ <i>rhaBAD</i> _{LD} ₇₈ <i>rph-1</i> Δ(<i>araB-D</i>)567 Δ(<i>rhaD-B</i>) 568 Δ <i>lacZ</i> 4787 (:: <i>rrnB-3</i>) <i>hsdR514</i> <i>rph-1</i> <i>cobB</i> :Kan ^R	Depósito del laboratorio
Cebador	Secuencia 5' → 3'	
Cebadores empleados para la construcción de las cepas mutantes		
<i>pyrE</i> KO Fwd	AGTCGCCTTTTTTTGTCTGTAGAAAAGTAAGATGAGGAGCGAAGGCATGAT TCCGGGGATCCGTCGACC	
<i>pyrE</i> KO Rev	CCGGATGACTTTTCATCCGGCGAGTTTCTTTAAACGCCAAACTCTTCGCGTGTA GGCTGGAGCTGCTTCG	
<i>yiaC</i> KO Fwd	GTGAATGATCATGTGGTTGGCTGCTGTTGCTATCCGGGAAATAAACCATGATT CCGGGGATCCGTCGACC	
<i>yiaC</i> KO Rev	GGAAAAATACAACGGTCCGGAACTGACACTTACAGCGTTTGAACCACCGGTG TAGGCTGGAGCTGCTTCG	
<i>pyrE</i> check Fwd	ATCCATTGTAGCGACGAGAA	
<i>pyrE</i> check Rev	ATACCGCCCGACGGATGATT	
<i>yiaC</i> check Fwd	TTTGTCCGGCACCACAATCT	
<i>yiaC</i> check Rev	GTGCTGACCAAAGATCTCCC	
K1	CAGTCATAGCCGAATAGCCT	
K2	CGGTGCCCTGAATGAACTGC	
Cebadores empleados para la mutagénesis y la sobreexpresión		
<i>pyrE</i> pRSET Fwd	GGTGGTGAATTCATGAAACCATATCAGCGCCA	
<i>pyrE</i> pRSET Rev	GGTGGTAAGCTTTTAAACGCCAAACTCTTCGC	
<i>pyrE</i> pET28a Fwd	GGTGGTGAATTCATGAAACCATATCAGCGCCA	
<i>pyrE</i> pET28a Rev	GGTGGTAAGCTTTTAAACGCCAAACTCTTCGC	

Tabla S1: (Continuación)

Cebadores empleados para la mutagénesis y la sobreexpresión	
<i>pyrBI</i> pRSET Fwd	GGTGGTGGATCCATGGCTAATCCGCTATATCAG
<i>pyrBI</i> pRSET Rev	GGTGGTGAATTCTTAATTGGCCAGCACCACATT
<i>pyrE</i> ^{K26AMBAR} pET28a Fwd	GCGAGTTTACGCTGTAGTCCGGGCGCAAAGC
<i>pyrE</i> ^{K103AMBAR} pET28a Fwd	CTTTAACCGCAAAGAAGCATAGGACCACGGTGAAGGCGGC
<i>pyrE</i> ^{K103AMBAR} pET28a Rev	GCCGCCTTCACCGTGGTCTATGCTTCTTTGCGGTAAAG
<i>pyrE</i> ^{K26AMBAR} pRSF Fwd	GGTGGTCTGCAGATGAAAATCGAAGAAGGTAACT
<i>pyrE</i> ^{K26AMBAR} pRSF Rev	GGTGGTGGTACCTTAAACGCCAAACTCTTCGCG
<i>pyrE</i> ^{K103AMBAR} pRSF Fwd	GGTGGTCTGCAGATGAAAATCGAAGAAGGTAACT
<i>pyrE</i> ^{K103AMBAR} pRSF Rev	GGTGGTGGTACCTTAAACGCCAAACTCTTCGCG
pSF-BAD Fwd	AGAAGTTGTCTCCTCCTGCA
pSF-BAD Rev	TGGTGGGTACCTCCTTTGAA
<i>pyrE</i> pSF-BAD Fwd	TTCAAAGGAGGTACCCACCAATGGAACATCACCATCACCAT
<i>pyrE</i> pSF-BAD Rev	TGCAGGAGGAGACAACCTTCTTTAAACGCCAAACTCTTCGC
<i>P_{BAD}</i> <i>araC</i> Fwd	ACTTACATTAATTGCGTTGCGTTATGACAACCTGACGGCTAC
<i>P_{BAD}</i> <i>araC</i> Rev	TAAAGTTAAACAAAATTATTTCTACTATGGAGAAACAGTAGAGAGTT
<i>pRSF-pyrE</i> ^{26AcK/103AcK} Fwd	GTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTA
<i>pRSF-pyrE</i> ^{26AcK/103AcK} Rev	CGCAACGCAATTAATGTAAGT

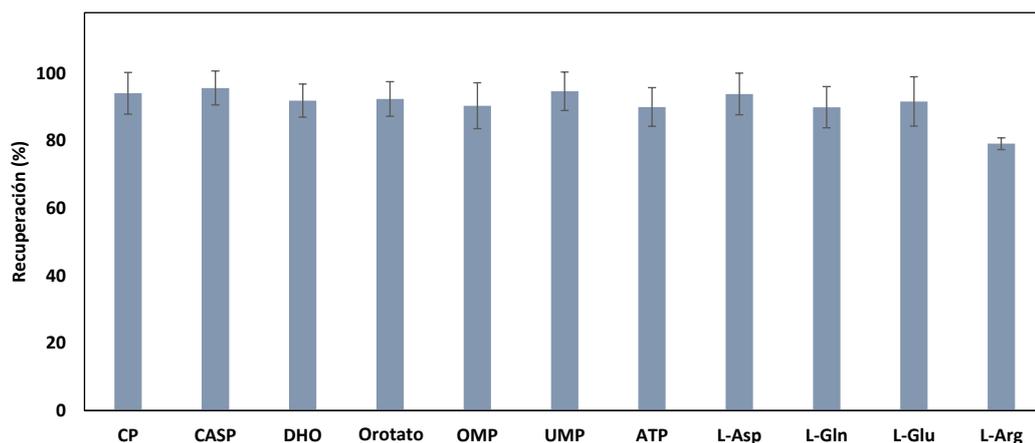


Figura S1: Recuperación de metabolitos intracelulares tras el protocolo de extracción. Tal y como se describe en el apartado de Material y Métodos.

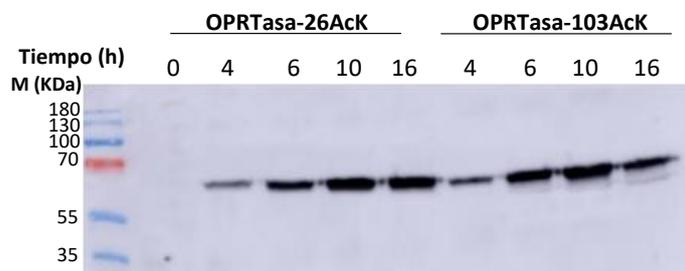


Figura S2: Western blot usando anticuerpo anti-(His)6 tag de cultivos de sobreexpresión de la OPRTasa-26AcK y la OPRTasa-103AcK en diferentes tiempos de crecimiento después de la inducción (tiempo 0). Para estos ensayos se tomaron muestras de cultivos de *E. coli* BL21 (DE3) transformados con los vectores pRSF-pMB1'-BAD-*mbp-pyrE*^{26AcK} y pRSF-pMB1'-BAD -*mbp-pyrE*^{103AcK} y creciendo en medio LB suplementado con Nε-acetil-L-lisina 10 mM y nicotinamida 20 mM, 30 min antes de la inducción. En el lado izquierdo aparece el peso molecular (M) del marcador.

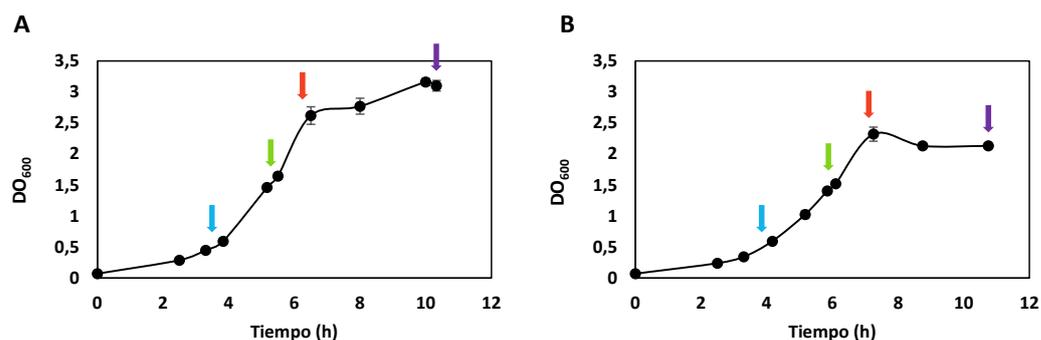


Figura S3: Crecimiento celular a DO_{600} de las cepas *E. coli* K12 wt y *E. coli* K12 $\Delta cobB$ para la cuantificación de metabolitos intracelulares y extracelulares. Cepas de *E. coli* K12 wt (A) y *E. coli* K12 $\Delta cobB$ (B) cultivadas a DO_{600} en medio mínimo suplementado con glucosa 20 mM. Las flechas indican el tiempo de cultivo en el que se tomaron las muestras para la cuantificación de metabolitos intracelulares y extracelulares: antes de la fase de crecimiento exponencial (DO_{600} 0,5) (azul), en una mitad de la fase de crecimiento exponencial (DO_{600} 1,5) (verde), al final de la fase exponencial (DO_{600} 3) (rojo) y en la fase estacionaria de crecimiento (Estacionaria) (morado).

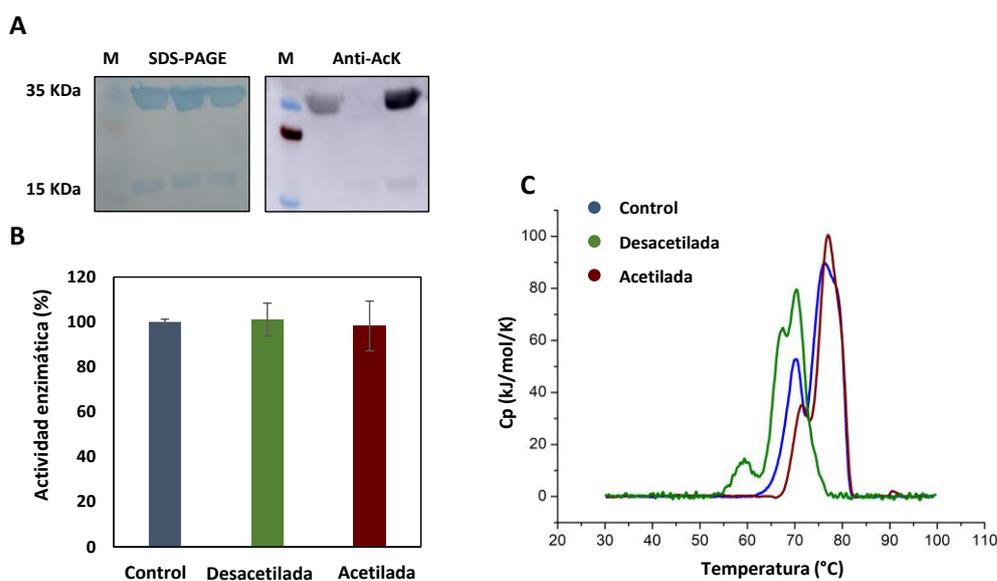


Figura S4: Análisis de la acetilación, la actividad enzimática y la termoestabilidad de la ATCasa control, la ATCasa desacetilada y la ATCasa acetilada. (A) SDS-PAGE y Western blot anti-acetil-lisina (Anti-AcK) de las muestras ATCasa control (calle 1), la ATCasa desacetilada (calle 2) y la ATCasa acetilada (calle 3). (B) Medida de la actividad enzimática de la ATCasa control, la ATCasa desacetilada y la ATCasa acetilada tomando como 100% el valor de la ATCasa control. (C) Análisis por DSC de la ATCasa control, la ATCasa desacetilada y la ATCasa desacetilada.

A

```

E. coli MKPYQRQFIEFALSQVLKFGFTLKSGRKSPYFFNAGLFNTGRDLALLGRFYAEALVDS 60
S. enterica MKPYQRQFIEFALNKQVLKFGFTLKSGRKSPYFFNAGLFNTGRDLALLGRFYAEALVDS 60
*****,*****

E. coli GIEFDLLFGPAYKGIPIATTTAVALAEHHDLDLPYCFNRKEAKDHGEGGNLVGSALQGRV 120
S. enterica GIEFDLLFGPAYKGIPIATTTAVALAEHHDKDLPYCFNRKEAKDHGEGGSLVGSALQGRV 120
*****,*****

E. coli MLVDDVITAGTAIRESMEIIQANGATLAGVLISLDRQERGRGEISAIQEVERDYNCKVIS 180
S. enterica MLVDDVITAGTAIRESMEIIQAHGATLAGVLISLDRQERGRGEISAIQEVERDYGCKVIS 180
*****,*****

E. coli IITLKDLIAYLEEKPEMAEHLAAVKAYREEFGV 213
S. enterica IITLKDLIAYLEEKPDMAEHLAAVRAYREEFGV 213
*****,*****

```

B

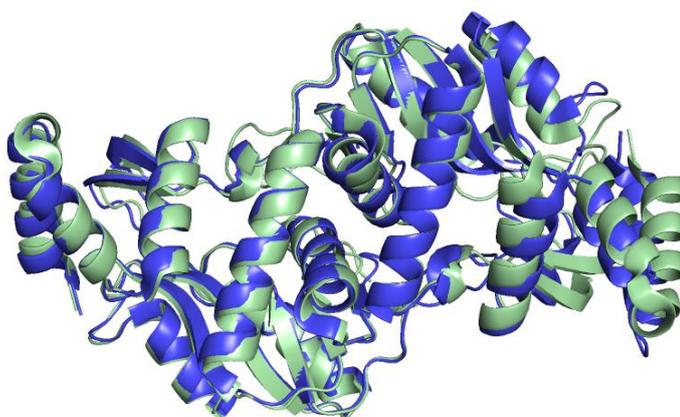


Figura S5: Alineación de la secuencia proteica y de las estructuras cristalizadas de las OPRTasas de *E. coli* y *S. enterica*. (A) Alineación de la secuencia proteica de las OPRTasas de *E. coli* y *S. enterica*. (B) Alineación de las estructuras cristalográficas de las OPRTasas de *E. coli* (verde) y *S. enterica* (azul).

Capítulo 6

Influencia de la fuente de carbono y nitrógeno sobre el acetiloma de E. coli

*Los resultados presentados en este capítulo forman parte de un manuscrito que
está bajo preparación.*

Resumen

La Nε-acetilación de lisinas es una modificación postraduccional muy relevante, pues está implicada en la regulación del metabolismo, en los procesos de traducción y transcripción, y se relaciona con algunas enfermedades. En los últimos años, su estudio en procariontes ha revelado la importancia de esta modificación también en estos organismos, y su gran prevalencia. Por tanto, comprender las funciones y los mecanismos de esta regulación tiene un gran impacto en múltiples dominios científicos, desde la bioingeniería hasta la ciencia biomédica. En este trabajo se analizaron las implicaciones del uso de distintas fuentes de carbono y de nitrógeno, y de la fase de crecimiento sobre el nivel de acetilación de *Escherichia coli*. Así, *E. coli* creció en MM9 (fuente de nitrógeno basada en amonio inorgánico) o TB7 (fuente de nitrógeno basada en péptidos) suplementado con glucosa (fuente de carbono de tipo PTS) o glicerol (fuente de carbono de tipo no PTS) como fuente de carbono, y se tomó muestra en la fase exponencial y la fase estacionaria de crecimiento. El estudio del proteoma y del acetiloma bajo estas condiciones de cultivo se llevó a cabo mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas, empleando una estrategia de cuantificación sin marcaje. Los resultados de estos procedimientos revelaron grandes diferencias en el proteoma, debidas sobre todo a la fuente de nitrógeno, y en menor medida a la fase de crecimiento. En cuanto al acetiloma, en este estudio se encontraron 7482 sitios de acetilación únicos, pertenecientes a 1817 proteínas. El número de lisinas acetiladas en cada condición dependió de las proteínas presentes en esa condición, y fue superior, en general, en medio mínimo. Atendiendo a las diferencias en el nivel de acetilación, se observó mayor grado de acetilación en TB7 que en MM9, en glucosa que en glicerol y en fase estacionaria que en fase exponencial. El mayor nivel de acetilación se correspondió con las muestras en las que se observó una mayor velocidad de crecimiento, relacionado con un aumento del desbordamiento de acetato, y, por tanto, un aumento en la concentración de los dadores de acetilo. Por último, se observaron diferencias en el nivel de acetilación de las enzimas del metabolismo central entre las distintas condiciones de cultivo, destacando las mayores diferencias en el ciclo de los ácidos tricarbónicos y el ciclo del glioxilato. Por lo tanto, este trabajo pone de manifiesto la importancia de la elección de las condiciones de cultivo, pues determinan tanto la identidad como el nivel de acetilación, lo que puede repercutir en la regulación del metabolismo central y la redirección de sus flujos.

Introducción

Escherichia coli (*E. coli*) es una bacteria ampliamente utilizada en procesos de producción de multitud de bioproductos y como organismo modelo, debido al amplio conocimiento que se tiene de su genoma, su transcriptoma y su proteoma. Sin embargo, es importante seguir profundizando en el conocimiento de su metabolismo y en los distintos procesos que afectan su regulación [1]–[3]. El análisis del proteoma y de las modificaciones postraduccionales (MPTs) proporciona gran información sobre el perfil de expresión génica y el control de la función proteica bajo determinadas condiciones, y en los últimos años los avances en la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS) han permitido profundizar en el conocimiento de este campo [4].

Las MPTs son fundamentales para la correcta regulación de la maquinaria celular, pues permiten modificar la actividad, localización o interacción de las proteínas una vez que han sido sintetizadas, aumentando la variabilidad de estas [5]. Entre estas modificaciones, la N ϵ -acetilación de lisinas tiene un papel esencial, ya que interviene en la regulación de diferentes procesos biológicos y está muy conservada en todos los ámbitos de la vida. Esta modificación ha sido ampliamente estudiada en eucariotas, y en los últimos años está adquiriendo una importante relevancia en procariotas [6], [7]. Así, según se ha demostrado recientemente, hasta el 40% de las proteínas pueden estar acetiladas en bacterias [6], [8]. La N ϵ -acetilación de lisinas ocurre a través de la transferencia de un grupo acetilo desde un dador, que puede ser acetil-CoenzimaA (acetil-CoA) o acetil-fosfato (acetil-P), al grupo ϵ -amino de la cadena lateral de la lisina [9]. Esta modificación está implicada en la regulación de varias funciones celulares entre las que destacan la transcripción, la reparación de daños en el ADN, la autofagia, la regulación del metabolismo, los factores que gobiernan la virulencia, la estabilidad de las proteínas, las interacciones proteína-proteína o la localización de las proteínas [10]–[12]. La acetilación de lisinas puede ocurrir de forma enzimática o de forma no enzimática [7], [11]. La acetilación enzimática ocurre mediante la transferencia del grupo acetilo del acetil-CoA a la lisina mediada por las lisín-acetiltransferasas (KATs). En *E. coli* la KAT más estudiada y mejor caracterizada es PatZ, que pertenece a la familia de las GNAT [13]. Por otro lado, la acetilación de lisinas puede darse sin la concurrencia de enzimas, mediante la transferencia del grupo acetilo, principalmente desde el acetil-P, al grupo ϵ -amino de la lisina [14]–[16]. Además, en los últimos años se ha demostrado que este tipo de acetilación contribuye en mayor medida al nivel global de acetilación en *E. coli*, por lo que su estudio es de gran importancia [14], [17]. En la acetilación no enzimática, la

modificación de la lisina depende de la reactividad de la misma, que a su vez está determinada por la concentración de los dadores de acetilo, el microambiente en el que se encuentra, su pKa y la accesibilidad de esta [6], [14], [15]. Además, la Nε-acetilación de lisinas es una modificación reversible que puede ser eliminada por la acción de las desacetilasas, siendo en el caso de *E. coli* CobB la única conocida y caracterizada [18], [19].

La acetilación no enzimática, como se ha mencionado, depende fundamentalmente de la concentración de dadores de acetilo, la cual está relacionada, a su vez, con el desbordamiento del acetato [20]–[23]. En concreto, la vía Pta-AckA, formada por las enzimas fosfato acetiltransferasa y acetato quinasa, respectivamente, es la responsable de la formación de acetil-P, y también constituye la principal ruta de formación y consumo de acetato en la fase exponencial, por lo que de ella depende, en gran medida, la concentración de acetil-CoA [24]–[26]. De este modo, se ha observado un aumento del nivel de acetilación en las cepas deficientes en *ackA* y una disminución en las deficientes en *pta* [14], [17], [27]. Además, el medio de cultivo empleado (fuentes de nitrógeno y carbono) determina un mayor o menor flujo a través de la glicólisis, y por tanto, la concentración de acetil-CoA y acetil-P y el consecuente nivel de acetilación [14], [20]–[22], [28]. En este sentido, *E. coli* puede consumir distintas fuentes de carbono, pero emplea preferencialmente aquellas que son transportadas al interior celular por el Sistema de transporte Fosfoenolpiruvato Fosfotransferasa (PTS). Este sistema está vinculado a un mecanismo conocido como Represión Catabólica por Carbono (RCC), el cual impide el consumo de otras fuentes secundarias no transportadas por el sistema PTS [29], [30]. Entre las fuentes de carbono de tipo PTS destaca la glucosa, sin embargo, el uso de otras fuentes de carbono como el glicerol (fuente de carbono no PTS) está generando gran interés debido a que es un subproducto de la síntesis de biodiesel, por lo que supone un aprovechamiento eficiente de los recursos [31]. En cuanto a la fuente de nitrógeno, *E. coli* consume preferentemente amonio inorgánico, presente normalmente en los medios de cultivo definidos, pero puede emplear otras fuentes de nitrógeno como péptidos u otros compuestos nitrogenados, que suelen formar parte de los medios de cultivo ricos [32], [33]. El uso de un medio de cultivo rico o definido supone diferencias en cuanto al crecimiento y la expresión diferencial de proteínas implicadas en el metabolismo central de la bacteria [34]. Por lo tanto, el empleo de distintos tipos de medio de cultivo tiene una gran repercusión en los flujos del metabolismo central de esta bacteria [34], [35].

En este capítulo nos centramos en el estudio de las consecuencias que tiene el empleo de distintas fuentes de carbono, glucosa (fuente de carbono de tipo PTS) y glicerol

(fuente de carbono de tipo no PTS), y distintas fuentes de nitrógeno, medio mínimo MM9 (fuente de carbono basada en amonio inorgánico) y medio complejo TB7 (fuente de carbono basada en péptidos), sobre el nivel de acetilación de *E. coli*. De este modo se estudió el nivel de acetilación en 4 condiciones de cultivo (TB7-glucosa, TB7-glicerol, MM9-glucosa y MM9-glicerol), y dentro de cada condición, en dos fases de crecimiento distintas, fase estacionaria y fase exponencial. Para ello, se llevó a cabo una cuantificación diferencial sin marcaje del proteoma y el acetiloma, mediante cromatografía líquida combinada con espectrometría de masas de alta resolución. Los resultados obtenidos comparando los cambios relativos entre las muestras biológicas mostraron las mayores diferencias en nivel de acetilación entre los cultivos con distintas fuentes nitrógeno, con un elevado nivel en TB7, y también un aumento de la acetilación asociado al empleo de glucosa y a la fase estacionaria de crecimiento. Estos resultados revelaron una correlación directa entre el nivel de acetilación y el desbordamiento del acetato desencadenado por la elevada velocidad de crecimiento. Además, se apreció una correlación entre la abundancia de las proteínas y la identidad de las lisinas acetiladas encontradas en cada condición. Asimismo, se observó un alto nivel de acetilación en las enzimas del metabolismo central, con diferencias entre las 3 variables estudiadas.

Materiales y Métodos

Cultivos celulares, lisis celular y proteólisis

La cepa *E. coli* K12 BW25113 creció empleando medio complejo TB7 (10 g/L de triptona tamponada a pH 7 con 100 mM de potasio de fosfato) o medio mínimo MM9 (10 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 8,5 mM de NaCl, 40 mM de Na_2HPO_4 , 20 mM de KH_2PO_4 , 185 μM de FeCl_3 , 175 μM de EDTA, 7 μM de ZnSO_4 , 7 μM de $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, 7 μM de MnSO_4 , 7 μM de CoCl_2 , 1 mM de MgSO_4 , 0,1 mM de CaCl_2 y 1 μM de tiamina $\cdot \text{HCl}$, pH 7,4), suplementados con glucosa 20 mM o glicerol 40 mM como fuente de carbono. Por tanto, se emplearon 4 condiciones de cultivo (TB7-glucosa, TB7-glicerol, MM9-glucosa y MM9-glicerol) y de cada una de ellas se realizaron 4 replicados biológicos. Los cultivos fueron inoculados a una densidad óptica inicial medida a 600 nm (DO_{600}) de 0,05 unidades, con preinóculos en fase de crecimiento exponencial. Se tomó muestra de cada uno de los cultivos en fase exponencial de crecimiento y en fase estacionaria (Figura S1 del Anexo), y las células fueron aisladas por centrifugación a 2000 x g durante 30 min a 4 °C. Las células fueron resuspendidas en tampón fosfato salino, PBS, y aisladas por centrifugación a 2000 x g

durante 20 min a 4 °C, proceso que se repitió dos veces. Tras ello, los sedimentos celulares se preservaron a -80 °C hasta la lisis celular.

Para la lisis, los sedimentos celulares se resuspendieron en tampón de lisis, que contenía desoxicolato de sodio (SDC) al 4% en tampón Tris-HCl 100 mM a pH 8,5. El empleo del SDC implica beneficios sobre el uso de la urea, pues esta provoca la carbamilación de lisinas que pueden interactuar también con los anticuerpos empleados en los procesos de inmunopurificación, lo que disminuye la selectividad y la sensibilidad del proceso [36]. Las muestras fueron incubadas con el tampón de lisis a 99 °C durante 10 min con agitación, tras ello se enfriaron a temperatura ambiente durante 15 minutos y se sonicaron durante 2 minutos y 30s (ciclos de 10 segundos cada uno) empleando el sonicador Vibra Cell (Sonicator Sonics & Materials). Tras la lisis celular las muestras se centrifugaron a 12000 x g durante 30 min a 4 °C, y se tomó 1,5 mg de proteínas de cada muestra para la proteólisis. Las proteínas fueron reducidas mediante la adición de DTT 10 mM durante 1 h a 37 °C, tras lo cual se alquilaron mediante la incubación con yodoacetamida 25 mM durante 30 min en oscuridad a temperatura ambiente. Las muestras fueron digeridas con Tripsina Gold (Promega) a una relación 1/50 (p/p) tripsina/proteína durante 16 h a 37 °C. La reacción de digestión se detuvo mediante la adición de ácido fórmico al 0,1%, y las muestras se siguieron acidificando hasta alcanzar una concentración del 0,5% y se limpiaron empleando las columnas Sep-Pak C18 3 cc Vac Cartridge (Waters). Los péptidos trípticos se secaron empleando un evaporador de vacío a 4 °C.

Enriquecimiento en péptidos acetilados

Los péptidos trípticos fueron resuspendidos en tampón de inmunoafinidad (50 mM de MOPS, 10 mM de Na₂HPO₄, 50 mM de NaCl, pH 7,2) y se midió la concentración de estos empleando el kit Pierce™ Quantitative Colorimetric Peptide Assay (Thermo Fisher Scientific). Una vez medida la concentración, se aislaron 50 µg de cada muestra para el análisis del proteoma. Para el enriquecimiento en péptidos acetilados se emplearon anticuerpos anti-acetil-lisina unidos a agarosa. Así, se tomó 1 mg de péptidos de cada muestra y se incubó con 1/4 de cada tubo del kit PTMScan acetyllsine motif [Ac-K] (Cell Signaling Technologies) durante 2 h a 4 °C en rotación, siguiendo las indicaciones del fabricante. Tras la incubación con los anticuerpos, los péptidos enriquecidos fueron eluidos con ácido trifluoroacético al 0,15%, y se desalaron y concentraron empleando las

placas Oasis HLB 96-well μ Elution Plate, para posteriormente ser secados mediante un evaporador de vacío a 4 °C.

Análisis LC-MS/MS

Se analizaron los péptidos acetilados procedentes del enriquecimiento (acetiloma), y los recogidos antes del enriquecimiento (proteoma). Ambos tipos de muestras se analizaron utilizando un sistema de cromatografía líquida de alto rendimiento Ultimate3000 (Thermo Fisher Scientific) acoplado en línea a un espectrómetro de masas Orbitrap EXPLORIS 480 (Thermo Fisher Scientific), tal y como se había descrito previamente [37], con pequeñas modificaciones. El tampón A consistía en agua acidificada con 0,1% de ácido fórmico, mientras que el tampón B era 80% acetonitrilo y 20% agua con 0,1% de ácido fórmico. Los péptidos se atraparon primero durante 1 minuto a 30 μ L/min con un 100% de tampón A en una trampa (0,3 mm por 5 mm con PepMap C18, 5 μ m, 100 Å; Thermo Fisher Scientific); tras el atrapamiento, los péptidos se separaron en una columna analítica de C18 de 50 cm (Poroshell 120 EC-C18, 2,7 μ m; Agilent Technologies). El gradiente fue de 9 a 40% de B en 40 min a 300 nL/min. A continuación, el tampón B pasó al 55% en 5 min y, finalmente, se aumentó al 99% para la etapa de limpieza. Los péptidos se ionizaron utilizando un voltaje de pulverización de 2 kV y un capilar calentado a 275 °C. El espectrómetro de masas se configuró para adquirir espectros de MS de barrido completo (relación masa/carga de 350 a 1400) para un tiempo de inyección máximo de 120 ms con una resolución de masa de 120000 y un valor objetivo de control de ganancia automático (AGC) de 3×10^6 . Los iones precursores más intensos se seleccionaron para la MS/MS en un ciclo completo de 1 s. En ambos tipos de muestras se utilizó la fragmentación HCD, con la lectura en el analizador de masas Orbitrap; para el proteoma completo se utilizó una resolución de 15000 (ventana de aislamiento de 2,4 Th), mientras que para los péptidos acetilados únicamente se utilizó una resolución de 30000, para tener la mayor calidad posible de los espectros modificados. Todos los demás parámetros fueron los mismos: el valor objetivo del AGC se fijó en 1×10^5 con un tiempo de inyección máximo "Auto" y una energía de colisión normalizada del 28%.

Análisis de los datos

Para el procesamiento de los archivos Raw del proteoma y el acetiloma procedentes del equipo se empleó el software MaxQuant (versión 2.0.3.1) integrado con el sistema de búsqueda Andromeda, que incluye la lista de contaminantes comunes. Los datos se enfrentaron a la base de datos FASTA del proteoma de referencia de *E. coli* K12 (diciembre de 2021; 4448 secuencias) descargada de Uniprot [38]. La identificación de los sitios acetilados se realizó utilizando una serie de parámetros en MaxQuant. Así, se escogió la tripsina como proteasa, permitiendo un máximo de tres fallos en el proceso de escisión. Se seleccionó la carbamidometilación (C) como modificación fija, y la oxidación (M), la acetilación (N-terminal), la desamidación (N y Q) y la acetilación de lisinas (K) como modificaciones variables, con un número máximo de modificaciones por péptido de 5. La longitud mínima de cada péptido fue fijada a 6 aminoácidos y la masa máxima a 5600 Da. La búsqueda fue realizada fijando la tolerancia de la masa a 20 ppm para la primera búsqueda y a 4,5 ppm para la búsqueda principal. La puntuación mínima de Andromeda para los péptidos modificados fue de 40, y la puntuación delta mínima para los péptidos modificados fue de 6. La tolerancia de masa para los fragmentos de la fragmentación con HCD fue de 20 ppm. La tasa de falsos descubrimientos (FDR) para la identificación de péptidos, proteínas y sitios de modificación se fijó en el 1%. Los parámetros empleados para procesar los datos del proteoma fueron idénticos a los expuestos, excepto por la eliminación de la acetilación de lisinas como modificación variable y la permisividad de 2 fallos en la acción de la tripsina. Las proteínas se cuantificaron utilizando la función MaxLFQ de MaxQuant [39], empleando sólo los péptidos no modificados y los que presentan oxidación (M) y acetilación (N-term) con al menos dos identificaciones de cada péptido requeridas para las comparaciones por pares de la abundancia entre las muestras.

Para conocer los cambios en la abundancia de proteínas y en el nivel de acetilación entre las distintas condiciones de cultivo se llevaron a cabo pruebas t de Student ($s_0 = 0,1$; FDR basado en permutaciones $\leq 0,05$), empleando el software Perseus (versión 1.6.15.0). Las pruebas t de Student se realizaron con los péptidos presentes en las dos muestras a comparar en al menos 3 de los 4 replicados biológicos. Previamente a la realización de las pruebas estadísticas se eliminaron los contaminantes y las secuencias reversas, y los datos se transformaron logarítmicamente. Además, en el caso de las muestras del acetiloma, sólo se utilizaron para el análisis posterior los sitios de acetilación con una probabilidad de localización mayor a 0,75, y los valores de las intensidades de los péptidos acetilados

fueron normalizados. Para la normalización, los valores de las intensidades de los péptidos acetilados fueron relativizados a los valores de las intensidades de las proteínas a las que pertenecen en cada muestra en concreto [40]. Un esquema del flujo general de trabajo, desde la realización de los cultivos hasta el análisis de las muestras, se expone en la Figura S2 del Anexo. Para el análisis exploratorio de los datos del acetiloma se llevó a cabo un análisis de componentes principales (PCA) incluido en la plataforma Perseus.

Para el análisis del motivo consenso de acetilación se empleó el software Icelogo [41], seleccionando los 15 residuos que rodeaban a cada lado la lisina acetilada. La anotación funcional de las proteínas acetiladas se llevó a cabo mediante el análisis de los términos GO (ontología genética), para lo que se utilizó la base de datos DAVID (base de datos para la anotación, la visualización y el descubrimiento integrado) [42]. Para el análisis de enriquecimiento en determinados términos GO, se empleó la corrección de Benjamini-Hochberg para el ajuste de los p-valor, y se estableció como umbral de significancia estadística un p-valor < 0,05.

Análisis del crecimiento celular y estudio de la concentración extracelular de acetato por HPLC

La cepa *E. coli* K12 BW25113 creció medio complejo TB7 o medio mínimo MM9, suplementado con glucosa (20 mM) o glicerol (40 mM) como fuente de carbono. Los cultivos fueron inoculados a una DO_{600} inicial de 0,05 unidades con preinóculos crecidos en fase exponencial, y se determinó la velocidad específica de crecimiento [43]. Para cuantificar la concentración extracelular de acetato se tomó una muestra de 1 mL de los cultivos a diferentes tiempos de crecimiento y se centrifugó a $12000 \times g$ durante 1 min a 4°C. El sobrenadante fue preservado a -20 °C hasta su análisis. Para analizar la concentración extracelular de acetato se usó un HPLC equipado con un refractómetro diferencial y detectores UV (Shimadzu Scientific Instruments) empleando una columna de exclusión iónica (ICSep Coregel 87H3, Transgenomic). La fase móvil fue H_2SO_4 5 mM que fluyó a $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ y 65 °C.

Resultados

Análisis del proteoma de *E. coli* en distintas condiciones de cultivo

Se llevó a cabo el análisis del proteoma de *E. coli* por espectrometría de masas sin marcaje para comparar la abundancia relativa de proteínas en función de las tres variables de cultivo, esto es, fuente de carbono (glucosa y glicerol), fuente de nitrógeno (medio mínimo, MM9 y complejo, TB7) y fase de crecimiento (exponencial y estacionaria). De este modo, obtuvimos 8 tipos de muestras en las que se combinaron las 3 variables distintas para cada cultivo: MM9-glucosa-exponencial (MUX), MM9-glucosa-estacionaria (MUS), MM9-glicerol-exponencial (MYX), MM9-glicerol-estacionaria (MYS), TB7-glucosa-exponencial (TUX), TB7-glucosa-estacionaria (TUS), TB7-glicerol-exponencial (TYX) y TB7-glicerol-estacionaria (TYS) (Tabla S1 del Anexo). Se estudiaron las diferencias en la presencia de proteínas entre las distintas condiciones de cultivo comparando las muestras con diagramas de Venn, y se observó como en todos los casos entre un 82 y un 92% de las proteínas coincidían entre las distintas condiciones (Figura S3 del Anexo).

Seguidamente llevamos a cabo un análisis estadístico de las diferencias en la abundancia de proteínas. Para ello se llevaron a cabo pruebas estadísticas t de Student en las que se compararon 2 a 2 las muestras, manteniendo constantes dos variables y variando solo una. Por lo tanto, las 12 comparaciones resultantes fueron: 4 para la fase de crecimiento, MUS vs MUX, MYS vs MYX, TUS vs TUX y TYS vs TYX; 4 para la fuente de carbono MUX vs MYX, MUS vs MYS, TUX vs TYX y TUS vs TYS; y 4 para la fuente de nitrógeno MUX vs TUX, MUS vs TUS, MYX vs TYX y MYS vs TYS. Para este análisis se tuvo en cuenta que las proteínas estuvieran presentes en al menos 3 de los 4 replicados biológicos en ambas muestras de cada comparativa.

Las proteínas con diferencias significativas entre distintas condiciones fueron aquellas que pasaron la corrección estadística ($\alpha = 0,1$; FDR basado en permutaciones $\leq 0,05$) y que presentaban un incremento o una reducción de su abundancia relativa del doble o la mitad, es decir, que presentaban unos valores de "Fold change", $Fch, \geq +1$ o ≤ -1 . Las proteínas con diferencias significativas en su abundancia relativa entre las distintas comparaciones y los valores de Fch de estas se muestran en las Tabla S2 del Anexo. El número de proteínas que presentaron $Fch \geq +1$ o ≤ -1 en cada una de las 12 comparativas realizadas se muestran en la Tabla 1A, y el promedio de estos Fch se muestran en la Tabla 1B. Además, el número de proteínas encontradas sólo en una condición (fase estacionaria, fase exponencial, glucosa, glicerol, MM9 y TB7), se muestran en la Tabla 1C.

Tabla 1A: Número de proteínas con cambios significativos en su abundancia entre las distintas condiciones. (Fch $\geq +1$: incremento de la abundancia; Fch ≤ -1 : reducción de la abundancia).

Fase de crecimiento	MUS vs MUX	MYS vs MYX	TUS vs TUX	TYS vs TYX
Proteína Fch $\geq +1$	140	132	213	184
Proteína Fch ≤ -1	77	122	82	75
Fuente de carbono	MUX vs MYX	MUS vs MYS	TUX vs TYX	TUS vs TYS
Proteína Fch $\geq +1$	0	30	10	0
Proteína Fch ≤ -1	0	43	43	0
Fuente de nitrógeno	MUX vs TUX	MUS vs TUS	MYX vs TYX	MYS vs TYS
Proteína Fch $\geq +1$	150	176	30	228
Proteína Fch ≤ -1	137	240	18	304

Tabla 1B: Promedio de los valores de los Fch de las proteínas con cambios significativos en su abundancia entre las distintas condiciones. (Fch $\geq +1$: incremento de la abundancia; Fch ≤ -1 : reducción de la abundancia).

Fase de crecimiento	MUS vs MUX	MYS vs MYX	TUS vs TUX	TYS vs TYX
Media Fch $\geq +1$	2,04	1,73	1,53	1,40
Media Fch ≤ -1	-1,42	-1,32	-1,58	-1,41
Fuente de carbono	MUX vs MYX	MUS vs MYS	TUX vs TYX	TUS vs TYS
Media Fch $\geq +1$	0	1,32	1,41	0
Media Fch ≤ -1	0	-1,96	-2,53	0
Fuente de nitrógeno	MUX vs TUX	MUS vs TUS	MYX vs TYX	MYS vs TYS
Media Fch $\geq +1$	2,48	2,29	1,42	2,08
Media Fch ≤ -1	-2,21	-1,78	-1,58	-1,74

Tabla 1C: Número de proteínas encontradas en una sola condición.

	Fase de crecimiento		Fuente de Carbono		Fuente de nitrógeno	
	Estacionaria	Exponencial	Glucosa	Glicerol	MM9	TB7
Nº proteínas	5	16	0	5	23	26

Atendiendo a la fase de crecimiento, podemos observar que, en todos los casos, se encontró mayor abundancia de proteínas en la fase estacionaria que en la fase exponencial (Tabla 1A). Este comportamiento fue más marcado en el caso de las muestras procedentes del crecimiento en medio complejo. En cuanto a la fuente de carbono, produjo menos diferencias, encontrándose proteínas con diferencias significativas en su abundancia únicamente en la comparativa de medio mínimo en fase estacionaria y medio complejo en fase exponencial. En ambos casos se obtuvo mayor abundancia de proteínas en glicerol que en glucosa (Tabla 1A). En el caso de las comparaciones de la fuente de nitrógeno, se observaron las mayores diferencias, encontrándose mayor abundancia de proteínas en MM9 en fase exponencial y en TB7 en fase estacionaria (Tabla 1A). Además, el número de proteínas encontradas en una única condición fue superior en MM9 y TB7,

y no se halló ninguna proteína única de las muestras con glucosa (Tabla 1C). Los promedios de los valores de Fch entre las distintas condiciones exhibieron este mismo perfil, pero sin grandes diferencias entre ellos (Tabla 1B).

Para observar las distribuciones de los datos del proteoma de las 12 comparativas, llevamos a cabo un diagrama de cajas con los valores de Fch, significativos y no significativos (Figura 1). En todos los casos observamos una distribución casi simétrica de los datos, ya que la mediana se situó en el centro de las cajas y coincidió con la media. En cambio, los rangos intercuartílicos presentaron diferente longitud atendiendo a la abundancia de los valores atípicos encontrados en cada condición de cultivo. Así, en las comparativas de la fuente de carbono, se encontraron más valores con un Fch negativo, lo que indica mayor abundancia en glicerol. Del mismo modo se corroboró que las mayores diferencias se daban en el caso de las comparativas de la fuente de nitrógeno, con los valores de Fch más ampliamente distribuidos (Figura 1).

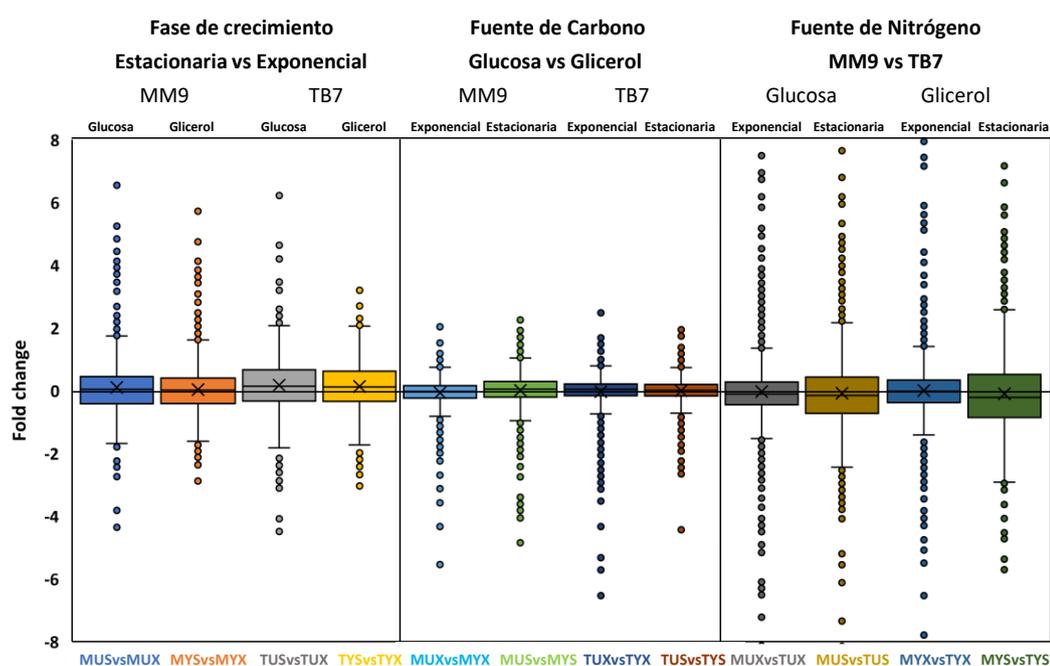


Figura 1: Diagrama de cajas de los valores de Fch de las comparativas del proteoma. Se muestran las 12 comparativas relativas a cada una de las tres variables, es decir, fase de crecimiento, fuente de carbono y fuente de nitrógeno. La línea de dentro de la caja representa la mediana de los datos, mientras que la x representa la media, y la parte inferior y superior de cada caja representan el primer y tercer cuartil.

Asimismo, se llevó a cabo un enriquecimiento funcional en términos GO de los procesos biológicos (PB) empleando la base de datos DAVID, para conocer en que rutas o

procesos biológicos estaban implicadas las proteínas que presentaron distintas abundancias entre las condiciones de cada variable de cultivo [42]. Así, para este análisis se agruparon los datos de las 12 comparativas en función de las 3 variables, es decir fuente de carbono, de nitrógeno y fase de crecimiento. Por ejemplo, un primer grupo, en la que la variable era la fase de crecimiento, incluía las proteínas con diferencias significativas de las comparativas donde sólo cambiaba la variable de la etapa de crecimiento (MUS vs MUX, MYS vs MYX, TUS vs TUX y TYS vs TYX) (Tabla S2 del Anexo). También se tuvieron en cuenta las proteínas que habían sido encontradas en una única condición y no en el resto (Tabla S1 del Anexo). Para controlar la tasa de falsos positivos se aplicó la corrección de Benjamini-Hochberg para el ajuste de los p-valor, y se estableció como umbral de significancia estadística un p-valor $< 0,05$. Los Términos GO más frecuentes que cumplieron esta corrección y el porcentaje de proteínas con diferencias significativas en abundancia que pertenecen a cada término (enriquecimiento) se exponen en la Figura 2.

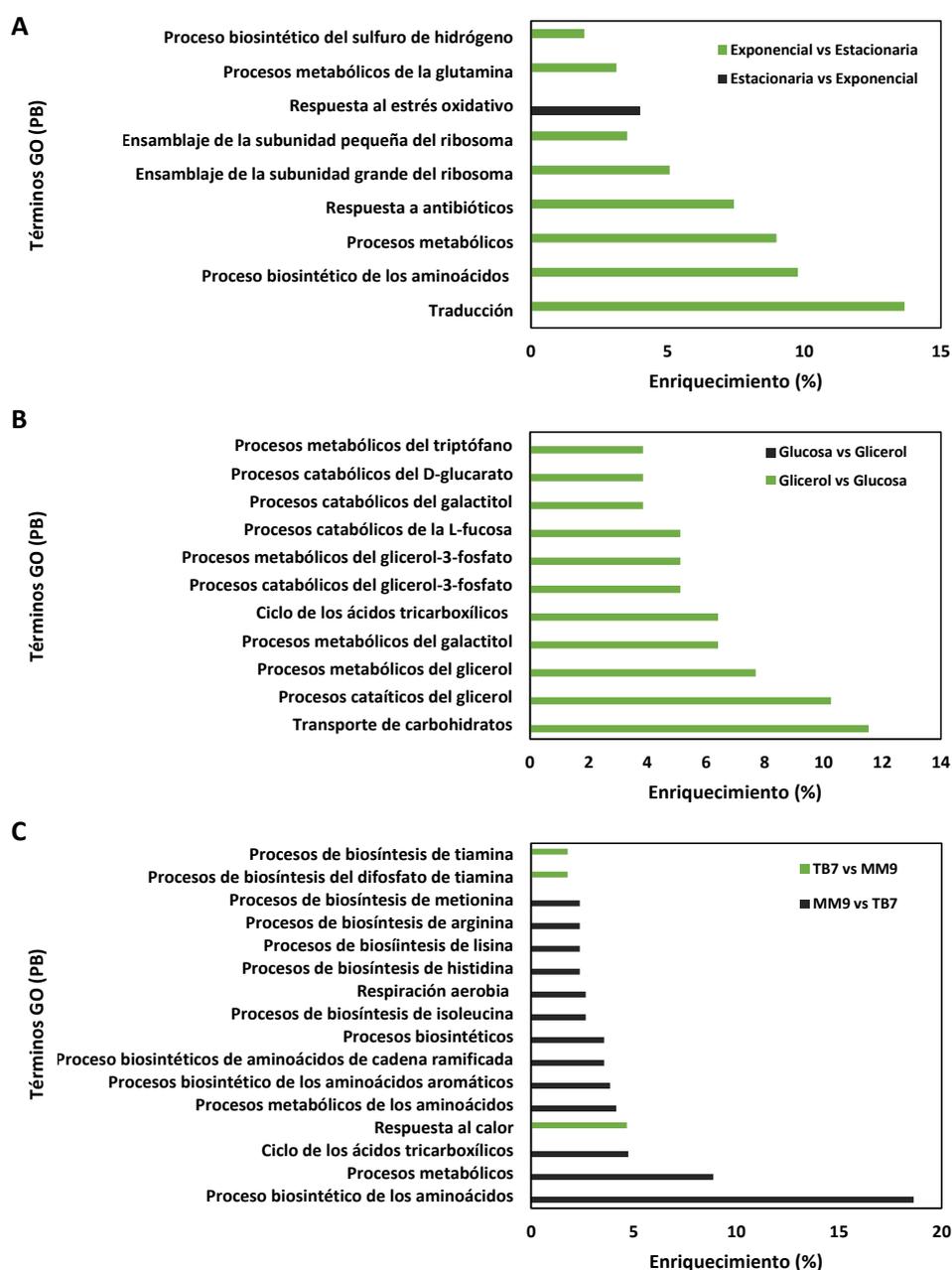


Figura 2: Enriquecimiento en términos GO (procesos biológicos, PB) de las proteínas significativamente más abundantes en las distintas condiciones de estudio. (A) Términos GO más frecuentes entre las proteínas significativamente más abundantes en fase estacionaria que en fase exponencial, y viceversa. (B) Términos GO con mayor porcentaje entre las proteínas significativamente más abundantes en glucosa que en glicerol, y viceversa. (C) Términos GO con mayor porcentaje entre las proteínas significativamente más abundantes en MM9 que en TB7, y viceversa.

Respecto al efecto de la fase de crecimiento se observó un enriquecimiento en las funciones de traducción, procesos metabólicos, biosíntesis de aminoácidos y ensamblaje del ribosoma en las proteínas más abundantes en la fase exponencial, y de respuesta al

estrés oxidativo en el caso de la fase estacionaria. En cuanto a la fuente de carbono, las proteínas más abundantes en glucosa que en glicerol no se encontraron enriquecidas en ningún proceso biológico. Sin embargo, las proteínas diferencialmente más abundantes en glicerol que en glucosa, o solamente presentes en glicerol, estuvieron relacionadas con el transporte de carbohidratos, el metabolismo del glicerol y del glicerol-3-fosfato, el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (ciclo TCA), el metabolismo de otros compuestos derivados de carbohidratos y el metabolismo del glucarato y del triptófano. Por su parte, atendiendo a la fuente de nitrógeno, se observó un enriquecimiento en los procesos de respuesta al calor y biosíntesis de tiamina en las proteínas más abundantes en TB7. Mientras que las proteínas más abundantes, o presentes solo en MM9, estaban implicadas en los procesos de biosíntesis y metabolismo de los aminoácidos, el ciclo TCA y procesos biosintéticos y de respiración aerobia (Figura 2).

Análisis del acetiloma de *E. coli* en distintas condiciones de cultivo

Con el fin de conocer el impacto de las distintas variables de cultivo sobre la dinámica de la acetilación en *E. coli*, se llevó a cabo un enriquecimiento de las muestras en péptidos acetilados mediante un ensayo de inmunofluorescencia previo a su análisis por espectrometría de masas. Los péptidos acetilados totales, los de cada una de las 8 muestras, y los que aparecen solo en una condición (fase estacionaria, fase exponencial, glucosa, glicerol, MM9 y TB7) se indican en la Tabla S3 del Anexo. En la Tabla 2 se exponen el número de sitios de acetilación y el número de proteínas acetiladas identificadas en cada muestra y en total.

Tabla 2: Sitios de acetilación y proteínas acetiladas encontrados en total y en cada una de las condiciones.

	Sitios de acetilación	Proteínas acetiladas
Total	7482	1817
MM9 glucosa exponencial	4342	1277
MM9 glucosa estacionaria	4662	1334
MM9 glicerol exponencial	4207	1276
MM9 glicerol estacionaria	3406	1097
TB7 glucosa exponencial	3487	1130
TB7 glucosa estacionaria	3581	1212
TB7 glicerol exponencial	2872	1016
TB7 glicerol estacionaria	3694	1267

Tal y como se observa, se hallaron un total de 7482 sitios de acetilación que pertenecen a 1817 proteínas modificadas. En cuanto a los sitios de acetilación de cada una de las condiciones, se tomaron aquellos que se encontraban en al menos 3 de los 4 replicados biológicos. El número de sitios de acetilación fue más elevado, en general, en MM9 que en TB7, al igual que el número de proteínas acetiladas, aunque en este caso, las diferencias fueron menores. Respecto la fase de crecimiento, observamos como, en todos los casos, las muestras de la fase estacionaria presentaron un mayor número de sitios acetilados y de proteínas modificadas, con la excepción de las muestras de MM9 suplementadas con glicerol. Atendiendo a las fuentes de carbono, no se produjeron grandes diferencias, aunque en general se observó un mayor número de lisinas acetiladas en glucosa que en glicerol (Tabla 2).

Para determinar si existía algún motivo común alrededor de la lisina acetilada se llevó a cabo un análisis de la secuencia de los péptido acetilados con el software IceLogo [41] (Figura 3A). El análisis indicó que los residuos cargados negativamente (D y E) estaban sobrerrepresentados en las regiones que rodean los 7482 sitios de acetilación, lo que está en concordancia con estudios anteriores, tanto en *E. coli* [14], [20], [28], como en otros microorganismos [44]–[46].

Además, para conocer las posibles implicaciones de la acetilación, se llevó a cabo un enriquecimiento en términos GO de los procesos biológicos en los que estaban implicadas las proteínas acetiladas totales (Figura 3B). De nuevo, se aplicó la corrección de Benjamini-Hochberg para el ajuste de los p-valor, estableciéndose como umbral de significancia estadística un p-valor < 0,05, y se tomaron los 15 términos GO más abundantes. El análisis de las funciones de las proteínas acetiladas indicó que muchas de estas forman parte de multitud de procesos metabólicos, en concreto la mayoría se encuentran relacionadas con la traducción (procesamiento de los ARNt y ARNr, ensamblaje del ribosoma, biogénesis del ribosoma), el metabolismo de los nucleótidos (biosíntesis de los nucleótidos de purina) y los aminoácidos (procesos biosintéticos y metabólicos de los aminoácidos), los procesos metabólicos y biosintéticos, los procesos glicolíticos y la respuesta al calor.

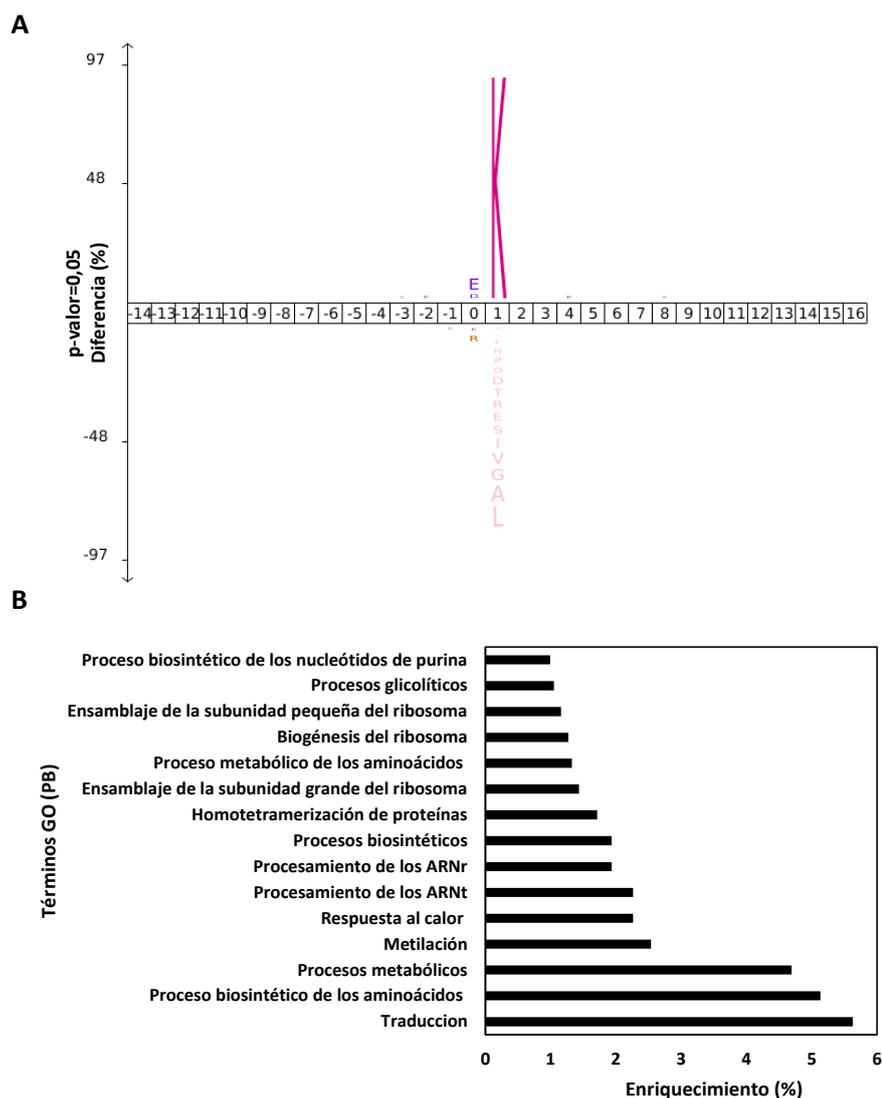


Figura 3: Análisis de la secuencia motivo de los sitios de acetilación (A) y enriquecimiento en términos GO (procesos biológicos, PB) de las proteínas acetiladas totales (B).

Debido a los cambios observados en el proteoma entre las distintas condiciones de cultivo (Tabla 1 y Figura 1), se llevó a cabo la normalización de los datos del acetiloma para evitar un sesgo en los resultados debido al diferente perfil de abundancia de proteínas en cada condición de cultivo. Además, se realizó un análisis exploratorio de los datos normalizados de los péptidos acetilados mediante un PCA, con el fin de buscar tendencias, agrupaciones y valores atípicos, y reducir en la medida de lo posible la dimensionalidad de los datos. Este análisis inicial mostrado en la Figura 4, evaluó el efecto de las tres variables (fuente de nitrógeno (TB7 y MM9), fuente de carbono (glucosa y glicerol) y fase de crecimiento (exponencial y estacionaria)) sobre los cambios relativos del acetiloma de *E. coli*.

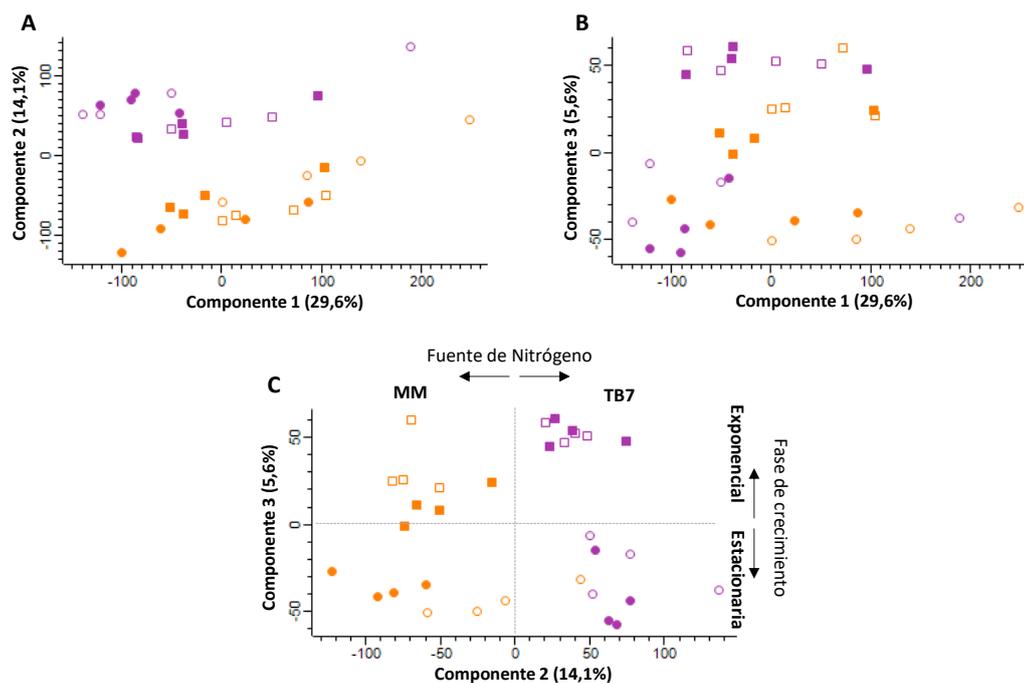


Figura 4: Análisis PCA de los datos normalizados del acetiloma y la influencia de las variables objeto de estudio. Las variables: fuente de nitrógeno (TB7 y MM9 en morado y naranja, respectivamente), fuente de carbono (glucosa y glicerol, mostrado en símbolos rellenos y vacíos, respectivamente) y fase de crecimiento (exponencial y estacionaria, mostrado en círculos y cuadrados, respectivamente). (A) Componente 1 vs Componente 2. (B) Componente 1 vs Componente 3. (C) Componente 2 vs Componente 3.

Tal y como se observa en la Figura 4, gracias a los tres primeros componentes principales fue posible explicar el 49,3% de la varianza de los datos analizados. El primer componente recogió la mayor parte de la varianza de los datos (29,6%) que pareció deberse a una contribución tanto de la fuente de nitrógeno como de carbono, sin embargo, no se observó un peso claro de la variable fase de crecimiento. Por su parte, el componente 2 recogió el 14,1% de la varianza y permitió agrupar claramente los datos en función de la fuente de nitrógeno, mientras que el componente 3 (5,6%) posibilitó la agrupación en función de la fase de crecimiento. Así, cuando se representaron el componente 2 y 3, se distinguieron visiblemente 4 grupos en función de las categorías analizadas, dos por la fuente de nitrógeno (MM9 y TB7), y dos por la fase de crecimiento (exponencial y estacionaria). En resumen, la proyección de los datos en las componentes 2 y 3 mostró que el PCA fue capaz de encontrar un claro patrón para diferenciar las categorías mencionadas (Figura 4).

Debido a que las mayores diferencias se observaron al comparar la fuente de nitrógeno, se llevó a cabo otro análisis PCA separando los datos por esta variable (Figura 5, Figura 5A MM9 y Figura 5B TB7). Para ambos análisis, se consideraron las dos primeras componentes de cada modelo. Respecto al PCA de los datos de las muestras de los cultivos en medio mínimo, el componente 1 (36,6%) tendió a agrupar los datos por la fuente de carbono, en cambio el componente 2 (9,7%) permitió una separación clara en función de la fase de crecimiento. Por su parte, el análisis de PCA de los datos de las muestras crecidas en TB7, no mostró una contribución manifiesta para la varianza contenida en el componente 1 (34,2%), mientras que el componente 2 (13,8%), distinguió visiblemente los datos por fase de crecimiento.

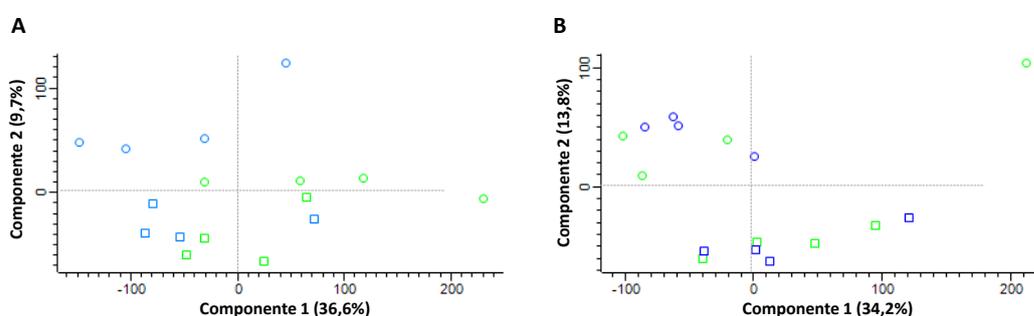


Figura 5: Análisis exploratorio mediante PCA de los datos normalizados del acetiloma de las muestras clasificadas por fuente de nitrógeno, MM9 (A) y TB7 (B). La fuente de carbono, glucosa y glicerol, es mostrada en color azul y verde, respectivamente, y la fase de crecimiento, exponencial y estacionaria, es mostrada en círculos y cuadrados, respectivamente.

Además, para mostrar visualmente las diferencias entre las muestras, se llevaron a cabo diagramas de Venn de las 12 comparativas (muestras 2 a 2), incluyendo los péptidos acetilados totales de cada muestra (Figura 6).

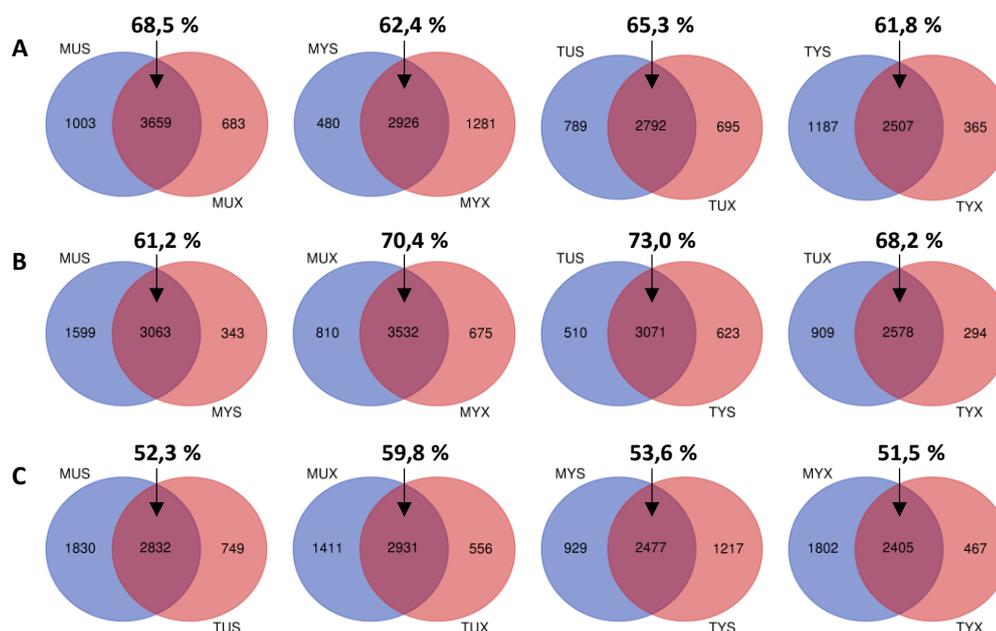


Figura 6: Diagramas de Venn de las lisinas acetiladas totales de las distintas condiciones analizadas. Comparaciones de las lisinas acetiladas de las muestras variando la fase de crecimiento (A), la fuente de carbono (B) y la fuente de nitrógeno (C). Porcentajes correspondientes al número de lisinas acetiladas iguales entre las dos condiciones comparadas.

En todos los casos, más de la mitad de los péptidos se encontraban en las dos muestras a cotejar. Al igual que en caso del análisis PCA, observamos las menores diferencias debidas a la fuente de carbono, ya que entre un 61-73% de los péptidos acetilados fueron idénticos entre las muestras que se diferenciaban únicamente en esta variable. Sin embargo, las mayores diferencias se encontraron en la identidad de los péptidos acetilados entre el medio mínimo y el medio complejo, donde entorno al 45% de los péptidos acetilados fueron diferentes (Figura 6).

Impacto de las condiciones de cultivo sobre el nivel de acetilación relativo

Para poder analizar los cambios relativos en la acetilación en función de las tres variables (fuente de carbono, fuente de nitrógeno y fase de crecimiento), se llevó a cabo un análisis estadístico de las 12 comparativas (MUS vs MUX, MYS vs MYX, TUS vs TUX, TYS vs TYX, MUX vs MYX, MUS vs MYS, TUX vs TYX, TUS vs TYS, MUX vs TUX, MUS vs TUS, MYX vs TYX y MYS vs TYS) empleando la prueba t de Student. Al igual que en el caso del análisis del proteoma se tomaron las lisinas acetiladas presentes en al menos 3 de los 4 replicados biológicos de las muestras que se están analizando. Las lisinas acetiladas con diferencias significativas entre las distintas condiciones fueron aquellas que pasaron la corrección

estadística ($s_0 = 0,1$; FDR basado en permutaciones $\leq 0,05$), y presentaron un $Fch \geq +1$ o ≤ -1 . Los sitios de acetilación con diferencias significativas se muestran en la Tabla S4 del Anexo. El número de lisinas acetiladas con diferencias significativas encontrados en cada una de las 12 comparativas y las proteínas a las que pertenecen se indican en la Tabla 3A. Además, la media de los valores de Fch de estos sitios de acetilación con diferencias significativas y el porcentaje que representan estos en cada comparativa con respecto a los péptidos acetilados totales en esa comparación, se muestran en la Tabla 3B. Las lisinas acetiladas únicas de cada condición (fase estacionaria, fase exponencial, glucosa, glicerol, MM9 y TB7), se muestra en la Tabla 3C.

Tabla 3A: Número de lisinas acetiladas (AcK) con cambios significativos en su abundancia entre las distintas condiciones y proteínas con las que se corresponden. ($Fch \geq +1$: incremento de la abundancia; $Fch \leq -1$: reducción de la abundancia).

Fase de crecimiento	MUS vs MUX	MYS vs MYX	TUS vs TUX	TYS vs TYX
AcK $Fch \geq +1$	0	22	396	0
Proteínas ($Fch \geq +1$)	0	22	264	0
AcK $Fch \leq -1$	0	177	19	0
Proteínas ($Fch \leq +1$)	0	133	19	0
Fuente de carbono	MUX vs MYX	MUS vs MYS	TUX vs TYX	TUS vs TYS
AcK $Fch \geq +1$	30	677	0	0
Proteínas ($Fch \geq +1$)	28	368	0	0
AcK $Fch \leq -1$	0	1	0	0
Proteínas ($Fch \leq -1$)	0	1	0	0
Fuente de nitrógeno	MUX vs TUX	MUS vs TUS	MYX vs TYX	MYS vs TYS
AcK $Fch \geq +1$	0	183	34	1
Proteínas ($Fch \geq +1$)	0	139	31	1
AcK $Fch \leq -1$	0	881	533	69
Proteínas ($Fch \leq -1$)	0	481	343	65

Tabla 3B: Promedio de los valores de Fch de los sitios de acetilación con cambios significativos en su abundancia entre las distintas condiciones (Media), y porcentaje que representan las lisinas acetiladas significativamente diferentes entre condiciones con respecto a los péptidos acetilados totales de esas condiciones (% significativos). (Fch \geq +1: incremento de la abundancia; Fch \leq -1: reducción de la abundancia).

Fase de crecimiento	MUS vs MUX	MYS vs MYX	TUS vs TUX	TYS vs TYX
Media Fch \geq +1	-	1,66	2,11	-
% significativos (Fch \geq +1)	-	0,78 %	14,83 %	-
Media Fch \leq -1	-	-2,25	-2,03	-
% significativos (Fch \leq -1)	-	6,25 %	0,71 %	-
Fuente de carbono	MUX vs MYX	MUS vs MYS	TUX vs TYX	TUS vs TYS
Media Fch \geq +1	1,71	2,57	-	-
% significativos (Fch \geq +1)	0,88 %	22,83 %	-	-
Media Fch \leq -1	-	-1,66	-	-
% significativos (Fch \leq -1)	-	0,03 %	-	-
Fuente de nitrógeno	MUX vs TUX	MUS vs TUS	MYX vs TYX	MYS vs TYS
Media Fch \geq +1	-	2,30	1,66	1,57
% significativos (Fch \geq +1)	-	6,75 %	1,47 %	0,04 %
Media Fch \leq -1	-	-2,19	-2,10	-3,65
% significativos (Fch \leq -1)	-	32,49 %	23,07 %	2,89 %

Tabla 3C: Número de sitios de acetilación únicos encontrados en cada condición del cultivo.

	Fase de crecimiento		Fuente de Carbono		Fuente de nitrógeno	
	Estacionaria	Exponencial	Glucosa	Glicerol	MM9	TB7
Nº Sitios acetilación	13	16	9	9	257	76

Atendiendo a la fase de crecimiento, solo observamos diferencias significativas entre las muestras crecidas en MM9-glicerol y TB7-glucosa, siendo el nivel de acetilación de los sitios mayor en fase estacionaria que en exponencial en las muestras de TB7-glucosa (396 lisinas más acetiladas en estacionaria y 19 en exponencial), y mostrando el perfil opuesto en las muestras de MM9-glicerol (22 lisinas más acetiladas en fase estacionaria y 177 en exponencial). En cuanto a la fuente de carbono, no se observaron diferencias significativas en el nivel de acetilación en las muestras procedentes de TB7, pero si en las de medio mínimo, como parecía indicar el análisis de PCA. En las muestras de MM9, el suplemento con glucosa supuso un aumento de la acetilación, siendo mayor en la fase estacionaria, y solo encontramos un sitio más acetilado en glicerol que en glucosa, concretamente, se identificó la acetilación de la lisina 124 que pertenece a la proteína gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GapA). Por su parte, la comparación entre las distintas fuentes de nitrógeno, MM9 y TB7, fue la que reportó mayores diferencias en la acetilación. Así, se observó un mayor nivel de acetilación en TB7 que en

MM9, siendo favorecido por la presencia de glucosa en fase estacionaria. En cuanto a los sitios de acetilación encontrados en una única condición, los números fueron similares en las variables de fuente de carbono y fase de crecimiento, sin embargo, en la fuente de nitrógeno se observó un mayor número de sitios de acetilación únicos en MM9 (257) que en TB7 (76) (Tabla 3C). Por su parte, los valores de la media de los Fch fueron similares en todos los casos. Además, para evitar un sesgo debido a las diferencias en el número de péptidos acetilados totales en cada muestra, se analizó el porcentaje los sitios de acetilación significativos con respecto al número de péptidos acetilados totales de cada comparativa (Tabla 3B), comprobando que los resultados estuvieron en concordancia con los mostrados en la Tabla 3A.

En esta misma línea, llevamos a cabo un diagrama de cajas para mostrar visualmente los cambios relativos en la distribución de la acetilación, expresados como Fch, para las 12 comparativas de las muestras analizadas y así, identificar valores atípicos y caracterizar las distribuciones. En la mayoría de los casos, se observó una simetría de la distribución de los datos, ya que la mediana está en el centro de las cajas (Figura 7).

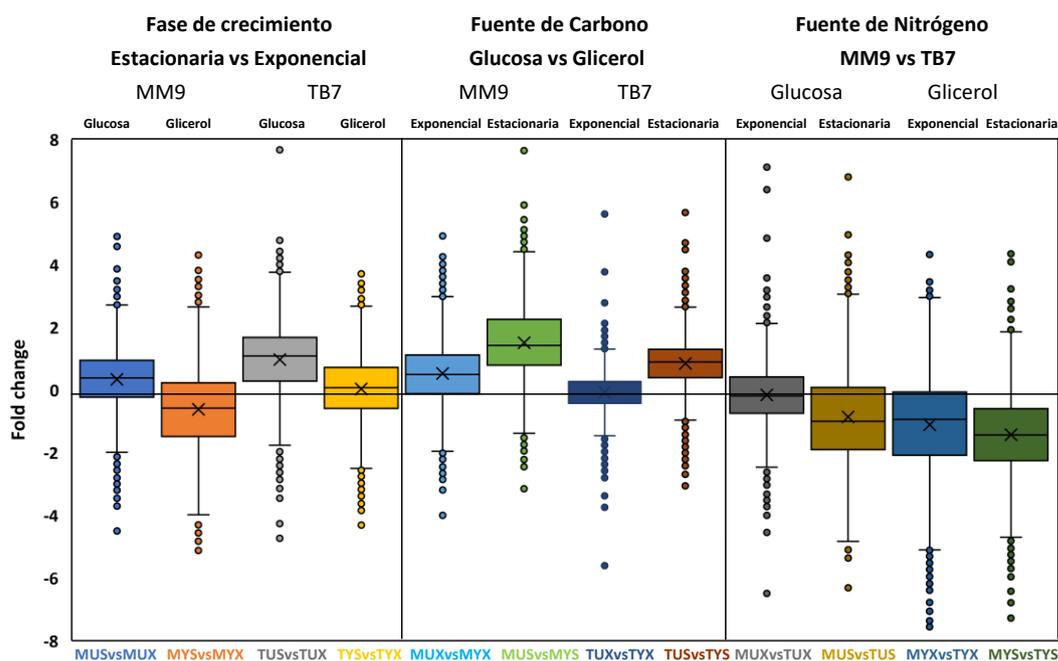


Figura 7: Diagrama de cajas que muestra las diferencias relativas en la acetilación. Se muestra el cambio en la acetilación para las 12 comparativas relativas a cada una de las tres categorías, es decir, fase de crecimiento, fuente de carbono y fuente de nitrógeno. La línea de dentro de la caja representa la mediana de los datos mientras que la x representa la media, y la parte inferior y superior representan el primer y tercer cuartil.

Así, respecto al efecto de las fases de crecimiento confrontadas, estacionaria vs exponencial, la mayor distancia entre la mediana de Fch con respecto al cero se observó en las cajas de medio mínimo suplementado con glicerol en fase de crecimiento exponencial y TB7 suplementado con glucosa en fase tardía. Por su parte, en la comparación entre las fuentes de carbono, glucosa vs glicerol, pareció favorecerse la acetilación en medio mínimo suplementado con glucosa. Finalmente, la comparación entre ambas fuentes de nitrógeno, MM9 vs TB7, mostró que los cultivos crecidos en TB7 afectaron positivamente el nivel de acetilación en cultivos suplementados con glucosa en fase tardía y, en menor medida, cuando se emplea glicerol en cualquier fase de crecimiento.

Por su parte, el número total de lisinas acetiladas con cambios significativos se agruparon según las seis condiciones (fase exponencial, fase estacionaria, glucosa, glicerol, MM9 y TB7) de las tres variables analizadas, y se muestran en la Figura 8.

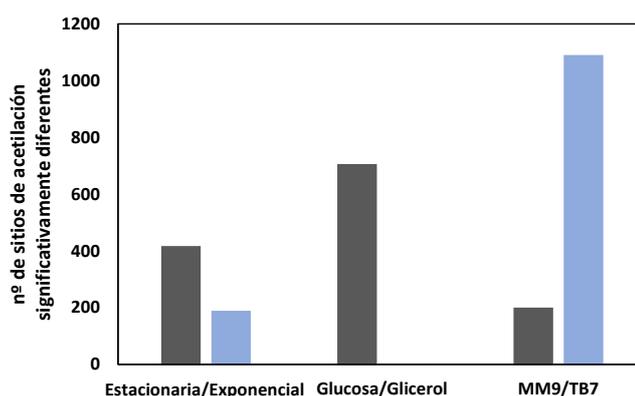


Figura 8: Número de sitios de acetilación que muestran cambios estadísticamente significativos entre las distintas condiciones de cultivo. Sumatorio del número de lisinas acetiladas que son significativamente más abundantes en cada una de las condiciones de las variables (estacionaria, glucosa y MM9 en gris; exponencial, glicerol y TB7 en negro).

En resumen, y como se confirma en la Figura 8, todos los datos obtenidos sugieren que la acetilación se ve favorecida en cultivos con medio complejo en todas las condiciones, y por su parte, la presencia de glucosa condujo a un mayor nivel de acetilación con el empleo de medio mínimo. En cuanto a la fase de crecimiento, se observó una mayor acetilación en fase estacionaria respecto a la exponencial.

Para determinar los sitios de acetilación diferentes y comunes de las comparativas agrupadas por variable, se realizaron los diagramas de Venn que se muestran en la Figura 9. A partir de estas representaciones se observó que aparecían unos 1500 péptidos

comunes para todas las variables (Figura 9A, B y C). Además, se realizaron otros 3 diagramas incluyendo sólo las lisinas acetiladas con diferencias significativas (Figura 9D, E y F). En cuanto a estos resultados, se encontraron muy pocos sitios de acetilación comunes entre las comparativas de la fase de crecimiento y la fuente de carbono (Figura 9D y E). Mientras que, en el caso de la fuente de nitrógeno, si encontramos un mayor número de péptidos acetilados compartidos entre las distintas comparaciones (Figura 9F). Por lo tanto, estos datos sugieren que la identidad de los sitios de acetilación podría depender de la fuente de nitrógeno, que es la variable que también presentó mayores diferencias en el nivel de acetilación relativo, y en la identidad de los péptidos acetilados totales.

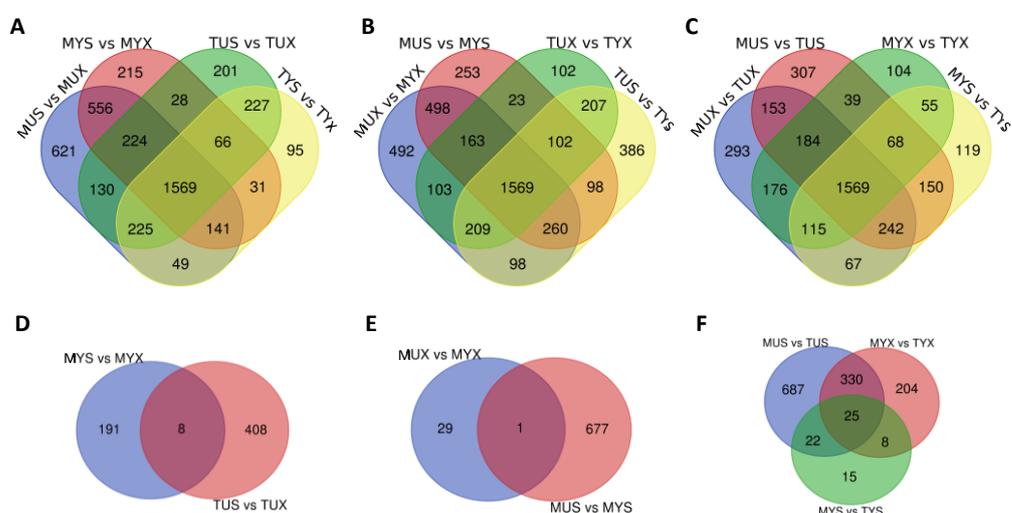


Figura 9: Diagramas de Venn de las lisinas acetiladas de las distintas condiciones analizadas. Sitios de acetilación de las comparativas que relacionan la variable fase de crecimiento (estacionaria vs fase exponencial) (A), fuente de carbono (glucosa vs glicerol) (B) y fuente de nitrógeno (MM9 vs TB7) (C). Lisinas acetiladas con cambios significativos entre las condiciones en las comparativas de las variables fase estacionaria vs fase exponencial (D), glucosa vs glicerol (E) y MM9 vs TB7 (F).

Análisis de la concentración extracelular de acetato y de la velocidad específica de crecimiento de *E. coli* en las distintas condiciones de cultivo

La evidencia acumulada de los estudios de acetiloma de *E. coli*, vincula la acetilación no enzimática con el metabolismo del acetato, a través de un mecanismo dependiente de acetil-P [14], [22]. Para comprobar si los cambios en los niveles de acetilación estaban relacionados con el desbordamiento del acetato, se midió la concentración extracelular de este metabolito y, además, se calculó la velocidad específica de crecimiento (μ_{max}). Para ello, se llevaron a cabo cultivos de *E. coli* K12 en MM9 y en TB7 suplementados con glucosa o glicerol como fuente de carbono, y se siguió el crecimiento celular, mediante la DO_{600} .

Los datos de velocidad específica de crecimiento μ_{\max} , se muestran en la Tabla 4, y los valores máximos de acetato extracelular en cada una de las condiciones se muestran en la Figura 10.

Tabla 4: Velocidades específicas de crecimiento (μ_{\max}) para las cepas de *E. coli* K12 creciendo en las diferentes condiciones de cultivo.

	TB7-glucosa	TB7-glicerol	MM9-glucosa	MM9-glicerol
μ_{\max} (h^{-1})	$1,15 \pm 0,08$	$0,92 \pm 0,06$	$0,71 \pm 0,04$	$0,59 \pm 0,02$

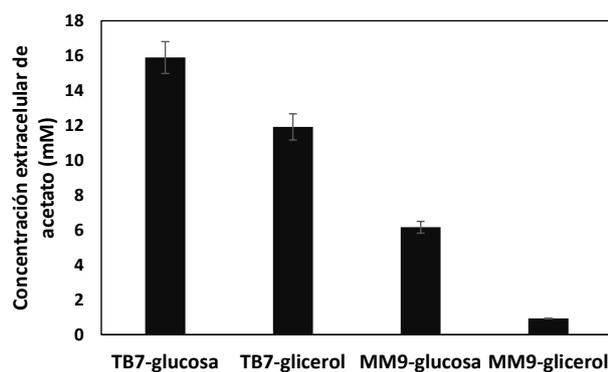


Figura 10: Concentración extracelular de acetato máxima de *E. coli* K12 creciendo en las distintas condiciones de cultivo.

La velocidad específica de crecimiento fue superior en medio complejo que en medio mínimo, y mayor en glucosa que en glicerol (Tabla 4). En cuanto a la concentración extracelular de acetato, la concentración máxima se correspondió con la muestra creciendo en TB7-glucosa (15,89 mM), seguida de la muestra en TB7-glicerol (11,91 mM). Sin embargo, el crecimiento en medio mínimo con glucosa supuso una reducción de 2,6 veces con respecto a la muestra de mayor concentración, y casi la desaparición de la excreción de acetato para las muestras en MM9-glicerol (0,93 mM) (Figura 10).

En consecuencia, la mayor concentración de acetato en TB7 y glucosa concuerda con los resultados anteriores relacionados con un incremento del nivel de acetilación (Tabla 3 y Figura 8).

Estudio funcional de las proteínas acetiladas en las distintas condiciones de cultivo

Para conocer las rutas o procesos biológicos en los que participan las proteínas que tienen sitios de acetilación con cambios significativos en las distintas condiciones agrupadas por variable (fase de crecimiento, fuente de carbono y fuente de nitrógeno), se llevó a cabo un enriquecimiento en términos GO de los procesos biológicos (PB) empleando la base de datos DAVID [42]. También se tuvieron en cuenta las proteínas que contenían lisinas acetiladas en una única condición (fase exponencial, fase estacionaria, glucosa, glicerol, MM9 y TB7) y no en el resto (Tabla S3 del Anexo). Se aplicó la corrección de Benjamini-Hochberg para el ajuste de los p-valor, y se estableció como umbral de significancia estadística un p-valor $< 0,05$. Como máximo, los 15 términos GO más abundantes que cumplieron esta corrección se exponen en la Figura 11.

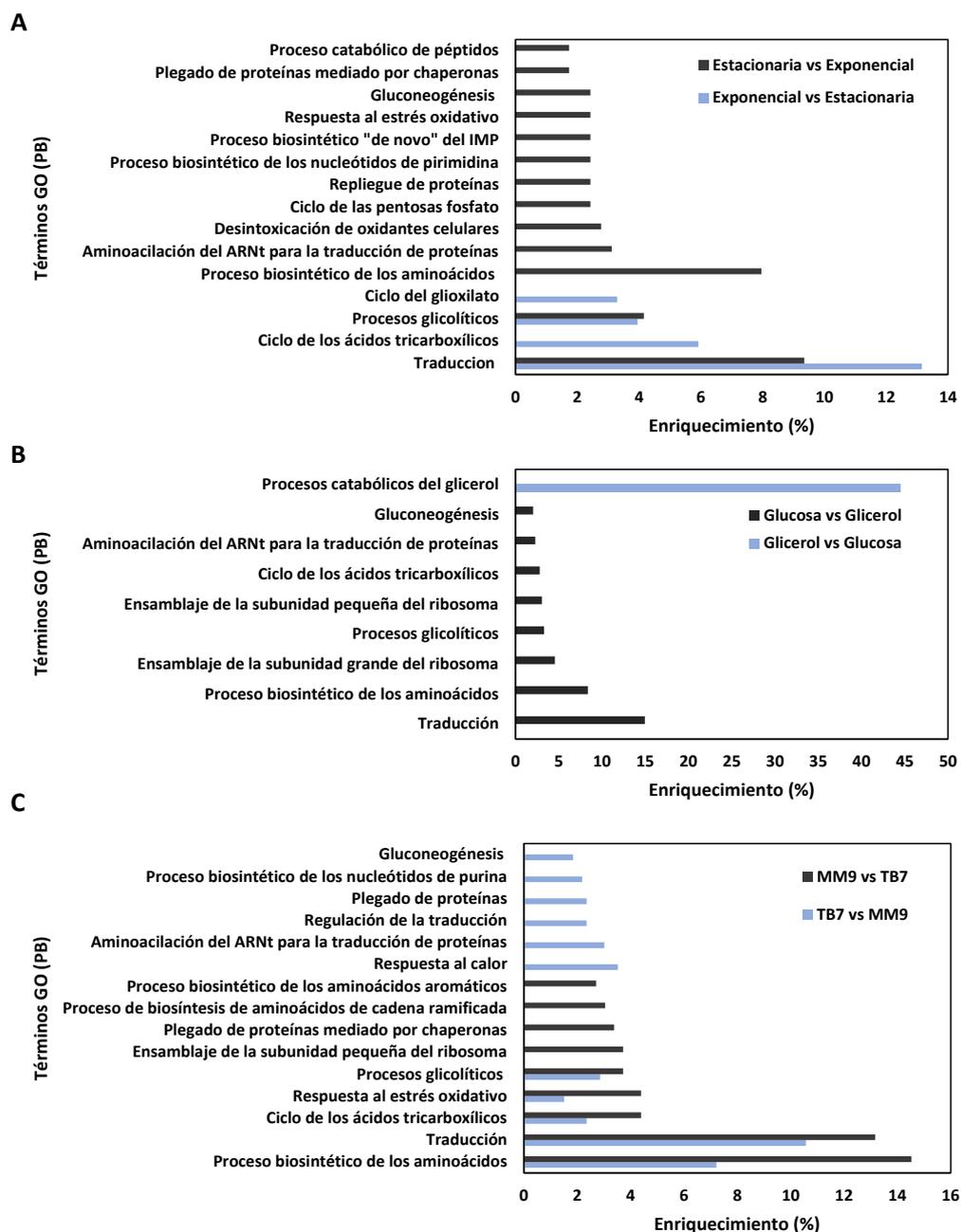


Figura 11: Enriquecimiento en términos GO (procesos biológicos, PB) de las proteínas con sitios de acetilación significativamente más abundantes en las distintas condiciones de estudio. (A) Términos GO con mayor porcentaje de las proteínas con lisinas más acetiladas significativamente en fase estacionaria que en fase exponencial, y viceversa. **(B)** Términos GO con mayor porcentaje de las proteínas con lisinas más acetiladas significativamente en glucosa que en glicerol, y viceversa. **(C)** Términos GO con mayor porcentaje de las proteínas con lisinas más acetiladas significativamente en MM9 que en TB7, y viceversa.

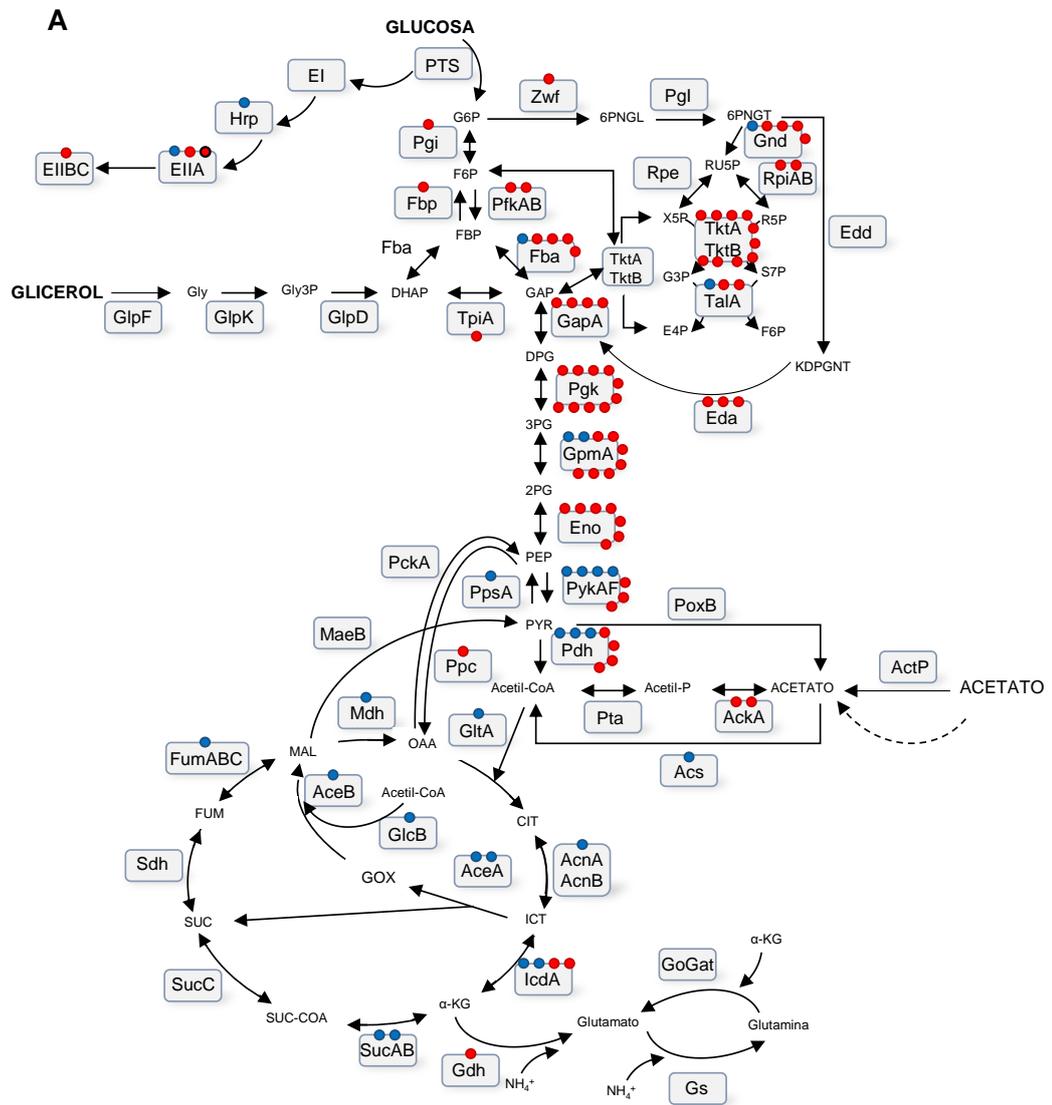
Las proteínas con lisinas más acetiladas en la fase exponencial de crecimiento se relacionaron con los procesos de traducción y el metabolismo central del carbono, en concreto, el ciclo TCA, los procesos glicolíticos y el ciclo del glioxilato. En cuanto a las

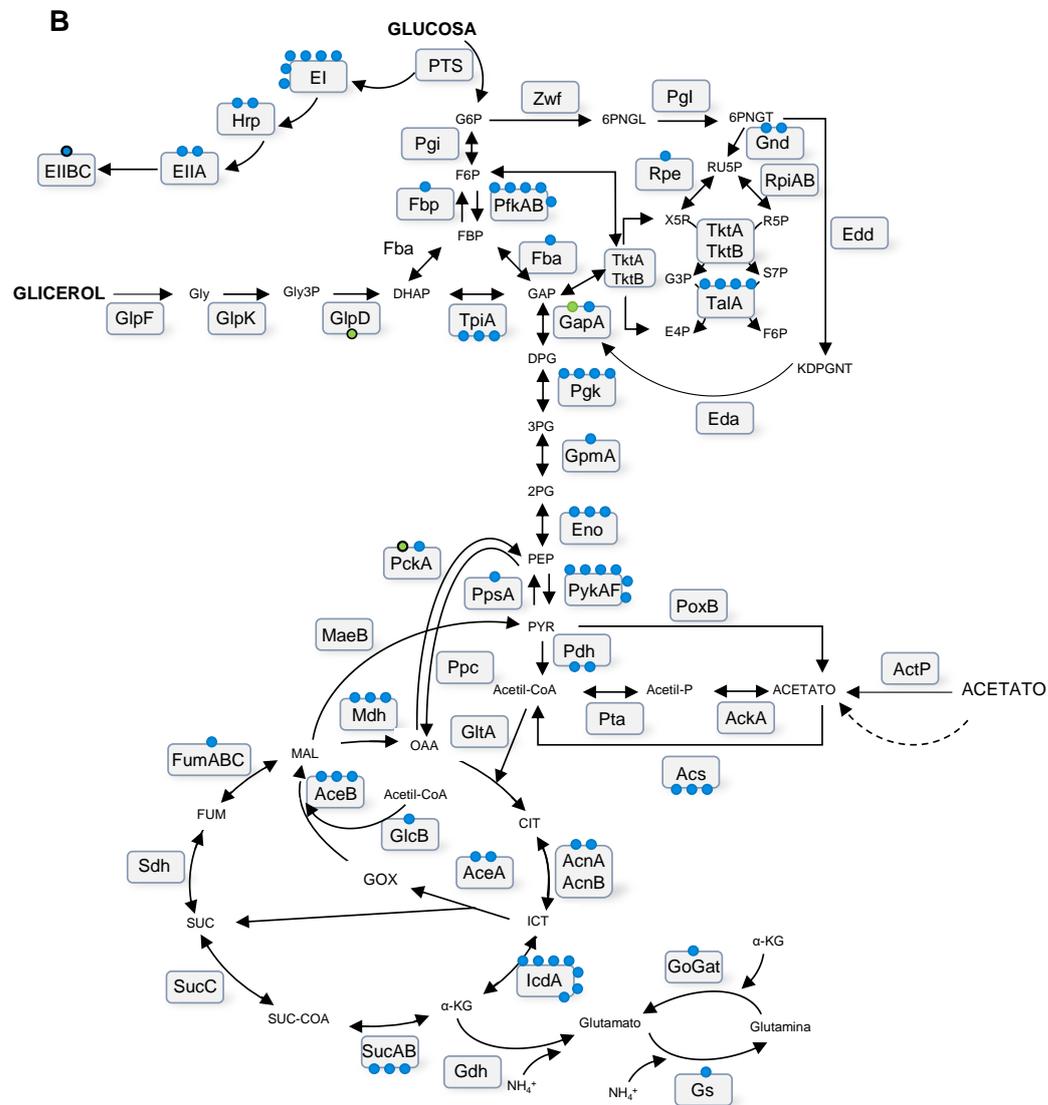
proteínas con péptidos más acetilados en la fase estacionaria, destacaron aquellas implicadas en la traducción, la biosíntesis de aminoácidos y la aminoacilación del ARNt para la traducción. También fueron abundantes las pertenecientes a procesos glicolíticos, y otras rutas del metabolismo central del carbono, como el ciclo de las pentosas fosfato y la gluconeogénesis, así como rutas adaptativas de respuesta al estrés oxidativo y desintoxicación de oxidantes. En cuanto a las diferencias en el enriquecimiento de las proteínas acetiladas derivadas del uso de glucosa o glicerol, observamos muy pocos sitios de acetilación más abundantes en glicerol, en contraste, en presencia de glucosa las lisinas más acetiladas pertenecen a proteínas implicadas en los procesos de traducción, biosíntesis de aminoácidos, ensamble del ribosoma y aminoacilación del ARNt para la traducción, y también determinados procesos del metabolismo central del carbono, como los procesos glicolíticos, el ciclo TCA y la gluconeogénesis. Respecto a las diferencias en las funciones de las proteínas acetiladas entre MM9 y TB7, observamos como en ambas condiciones están relacionadas con los procesos de biosíntesis de aminoácidos, traducción, respuesta al estrés oxidativo, el ciclo TCA y procesos glicolíticos, presentando todos estos un mayor porcentaje en MM9 que en TB7, sobre todo en el caso de la biosíntesis de aminoácidos. Además, las proteínas con lisinas más acetiladas en MM9 se vincularon a procesos de síntesis y procesamiento proteico como la biosíntesis de aminoácidos aromáticos y de cadena ramificada y el ensamblaje del ribosoma. Por su parte, las proteínas con lisinas relativamente más acetiladas en TB7 que en MM9 se relacionaron con la gluconeogénesis, la biosíntesis de nucleótidos de purina y la respuesta al calor, y también estaban implicadas en la regulación de la traducción y el plegado de proteínas (Figura 11).

Análisis de la acetilación sobre el metabolismo central de *E. coli* en las distintas condiciones de cultivo

Los resultados del análisis funcional mediante enriquecimiento en términos GO revelaron una prevalencia de enzimas acetiladas relacionadas con los procesos de traducción y con el metabolismo central de la bacteria (Figura 11). Por lo tanto, nos centramos en las enzimas con lisinas acetiladas con diferencias entre las distintas condiciones pertenecientes al metabolismo del carbono (glicólisis, gluconeogénesis, ciclo TCA, ciclo del glioxilato, metabolismo del acetato, reacciones anapleróticas, ruta de las

pentosas fosfato y sistema PTS) y las rutas de la asimilación del amonio (Tabla S5 del Anexo) (Figura 12).





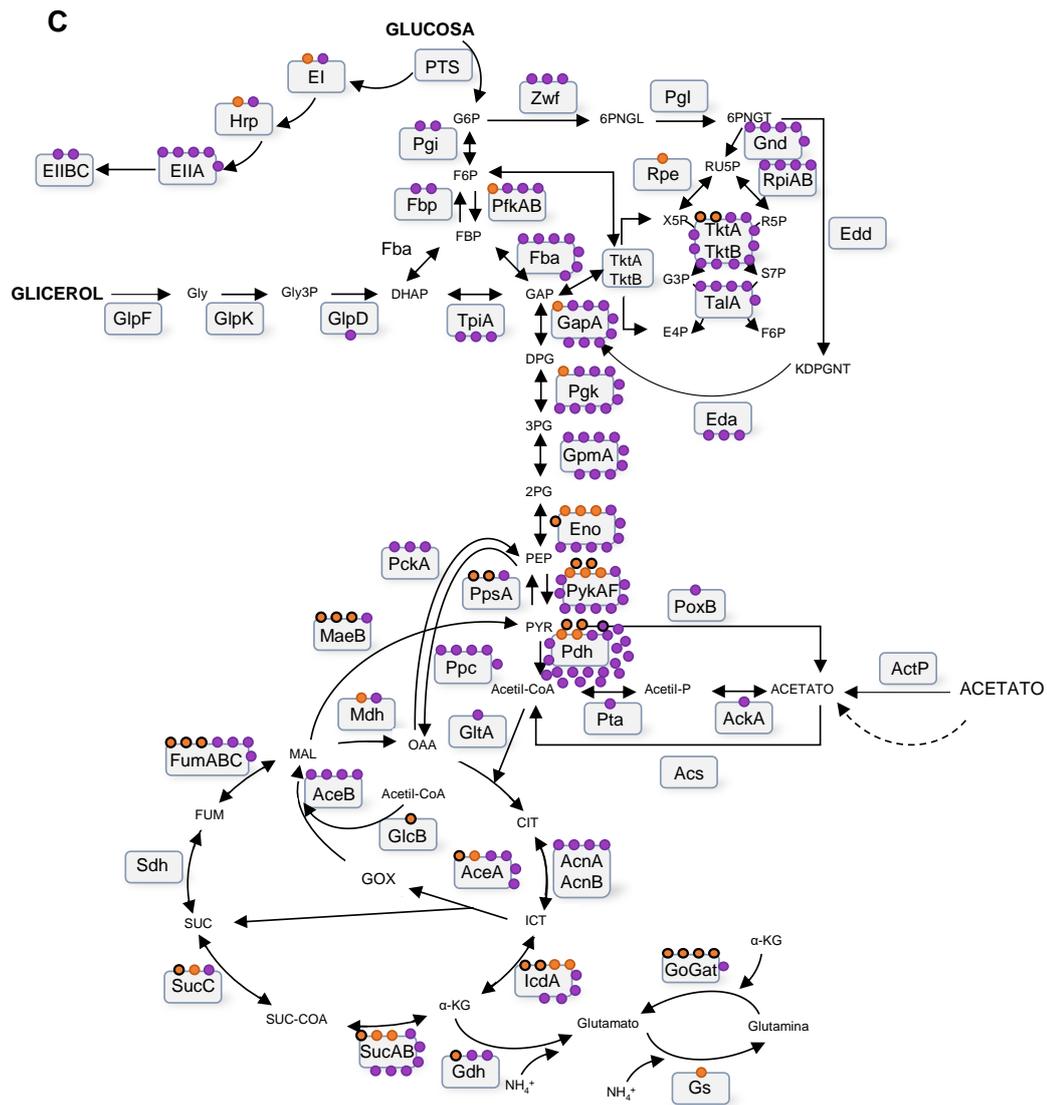


Figura 12: Enzimas del metabolismo central acetiladas diferencialmente entre las distintas condiciones de cultivo. Los círculos indican las lisinas de cada enzima acetiladas de forma diferencial entre las condiciones comparadas. (A) Lisinas acetiladas con diferencias significativas en las comparativas de la fase de crecimiento, más acetiladas en fase estacionaria en rojo y más acetiladas en fase exponencial en azul. (B) Lisinas acetiladas con diferencias significativas en las comparativas de la fuente de carbono, más acetiladas en glucosa en azul y más acetiladas en glicerol en verde. (C) Lisinas acetiladas con diferencias significativas en las comparativas de la fuente de nitrógeno, más acetiladas en MM9 en naranja y más acetiladas en TB7 en morado. En todos los casos las lisinas únicas de una determinada condición se muestran con el borde en negro. Abreviaturas de los metabolitos: Gly, glicerol; Gly3P, glicerol-3-fosfato; G6P, glucosa-6-fosfato; F6P, fructosa-6-fosfato; FBP, fructosa-1,6-bifosfato; DHAP, dihidroxiacetona-fosfato; GAP, gliceraldehído 3-fosfato; DPG, 1,3-bifosfoglicerato; 3PG, 3-fosfoglicerato; 2PG, 2-fosfoglicerato; PEP, fosfoenolpiruvato; PYR, piruvato; 6PGLN, 6-fosfoglucono- δ -lactona; 6PGNT, 6-fogluconato; RU5P, ribulosa-5-fosfato; R5P, ribosa-5-fosfato; X5P, xilulosa-5-fosfato; S7P, pseudoheptulosa-7-fosfato; E4P, eritrosa-4-fosfato; KDPGNT, 2-ceto-3-deoxi-D-gluconato-6-fosfato; PRPP, 5-fosfo-D-ribosil- α -1-pirofosfato; Acetil-CoA, acetil coenzima A; Acetil-P, acetil fosfato; CIT, citrato; ICT, isocitrato; GOX, glioxilato; α -KG, α -cetoglutarato; SUC-CoA, succinil-coenzima A; SUC, succinato; FUM, fumarato; MAL, malato; OAA, oxalacetato

La mayoría de las proteínas pertenecientes a estas rutas del metabolismo central se han encontrado acetiladas en al menos una condición de cultivo (Tabla S3 del Anexo), además, se detectaron 59 enzimas con cambios significativos entre las distintas condiciones (Figura 12). Las proteínas con lisinas más acetiladas en fase estacionaria que en fase exponencial se encontraron en mayor abundancia en la glicólisis y en la ruta de las pentosas fosfato, presentando las enzimas fosfoglicerato quinasa (P_{gk}) y transketolasa (T_{ktA} y T_{ktB}) 10 lisinas con mayor nivel de acetilación en fase estacionaria. Por su parte, las enzimas con lisinas más acetiladas en la fase exponencial se encontraron principalmente implicadas en el ciclo TCA y el ciclo del glioxilato, de hecho, solo la enzima isocitrato deshidrogenasa (I_{cdA}), que conecta ambos ciclos, presentó también lisinas con mayor nivel de acetilación en fase estacionaria (Figura 12A).

En cuanto a la fuente de carbono, la mayoría de las enzimas se encontraron más acetiladas en glucosa que en glicerol, sin embargo, encontramos 3 lisinas más acetiladas en glicerol, que corresponden a las enzimas glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (G_{lpD}), GapA y fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (P_{ckA}), por lo que estos sitios de acetilación podrían ser específicos de glicerol. Por su parte, las enzimas con lisinas más acetiladas en glucosa se encontraron distribuidas por todas las rutas del metabolismo central, aunque en mayor número en el sistema PTS (6 sitios de acetilación en la enzima I, E_I), en el ciclo TCA (6 sitios de acetilación en la I_{cdA}) y en la glicólisis (6 lisinas en la piruvato quinasa, P_{ykAF}) (Figura 12B). En todos los casos las lisinas más acetiladas en glucosa se han encontrado en la comparación MUS vs MYS, por lo que parece que la acetilación mediada por glucosa de estas enzimas depende también de la fase de crecimiento (Tabla S5 del Anexo).

En cuanto a la comparación entre las fuentes de nitrógeno, observamos el mayor número de lisinas diferencialmente acetiladas de todas las variables analizadas (Figura 12C). Se observaron más lisinas acetiladas en TB7 que en MM9 pertenecientes a las rutas de la glicólisis y la ruta de las pentosas fosfato. En concreto, las enzimas P_{ykAF}, el complejo piruvato deshidrogenasa (P_{dh}) y T_{ktAB} presentaron 9, 19 y 10 lisinas más acetiladas en TB7, respectivamente (Figura 12C). Sin embargo, en MM9, los cambios se observaron en el ciclo TCA, en algunas enzimas del metabolismo del nitrógeno, en el ciclo del glioxilato, en las reacciones anapleróticas, y en las enzimas de la parte final de la glicólisis.

Para identificar las lisinas acetiladas que mostraron mayores cambios, nos basamos en aquellas que presentaron un F_{ch} > 3 o < -3. Entre estas destacaron la enzima II (E_{II})

perteneciente al sistema PTS, que poseía 4 lisinas con mayor nivel de acetilación en TB7 que en MM9. Otra enzima con un alto número de lisinas acetiladas con este Fch fue la Pgc, con 4 lisinas con mayor acetilación en TB7 con respecto a MM9, en concreto una de estas lisinas, la K120, también presentó este gran aumento relativo al comparar la acetilación en fase estacionaria con respecto a la exponencial en TB7-glucosa. La α -cetoglutarato deshidrogenasa (SucAB), también mostró 4 lisinas con estos grandes cambios en el nivel de acetilación, dos de estas presentaron un mayor nivel de acetilación en glucosa que en glicerol, y otras dos en TB7 que en MM9 (Tabla S5 del Anexo). Además, observamos un gran número de enzimas en las comparaciones de las 3 variables que tenían lisinas más acetiladas en una condición y otras lisinas en la condición opuesta, por lo que algunas de estas acetilaciones pueden ser específicas de la condición estudiada.

Discusión

La Nε-acetilación de lisinas es una MPT muy conservada en todos los organismos que está implicada en múltiples procesos, como la transcripción, la regulación del metabolismo central y la interacción con otras moléculas, entre otros [6], [47]. Esta modificación está relacionada con el estado metabólico y energético de la bacteria a través de los intermediarios acetyl-CoA y acetyl-P, por lo que las condiciones nutricionales y de cultivo son un factor determinante en la abundancia de esta MPT [6], [14], [17]. En este estudio nos hemos centrado en el análisis de la dinámica del acetiloma, determinando también el nivel de acetilación de *E. coli* bajo diferentes condiciones de cultivo. Así, se empleó una fuente de carbono de tipo PTS, la glucosa, la cual es empleada de forma preferente por la bacteria por su mayor valor metabólico [29], [48], y una fuente de carbono de tipo no PTS, el glicerol, el cual es interesante desde un punto de vista biotecnológico para el aprovechamiento de recursos [31], [49]. Al mismo tiempo, se emplearon dos fuentes de nitrógeno distintas, una basada en amonio inorgánico, el MM9, y otra en péptidos, aminoácidos y nucleótidos, el TB7. Para este estudio llevamos a cabo el análisis del proteoma y del acetiloma, mediante espectrometría de masas cuantitativa sin etiquetas. El estudio del proteoma se llevó a cabo para identificar el perfil de expresión de proteínas en las diferentes condiciones de cultivo y normalizar el acetiloma frente a la abundancia de proteínas, evitando un posible sesgo en el nivel de acetilación. Es importante señalar que la implicación de la fuente de nitrógeno en la acetilación no había

sido estudiada hasta ahora, aunque sí la relación de esta MPT con la fuente de carbono y la fase de crecimiento [14], [17], [20], [22], [27], [50].

En primer lugar, analizamos el proteoma y detectamos grandes diferencias en la abundancia de las proteínas entre las distintas condiciones de cultivo. En términos generales, la variable que menos cambios conllevó en el perfil del nivel de proteínas fue la fuente de carbono, aunque se encontró una mayor abundancia de las proteínas en glicerol que en glucosa (Tabla 1 y Figura 1). Esta mayor abundancia de proteínas en glicerol puede deberse a la RCC, pues el consumo de la glucosa a través del sistema PTS inhibe la utilización de otras fuentes de carbono, reprimiendo la expresión de muchos genes [30], [51]. Esto se confirmó mediante el análisis funcional de los términos GO de las proteínas más abundantes en glicerol, en el que observamos un enriquecimiento en los procesos del metabolismo del glicerol y otros carbohidratos, del transporte de carbohidratos y del ciclo TCA (Figura 2). Otros estudios han remarcado el aumento de la expresión de genes de utilización de las fuentes de carbono no PTS y del ciclo TCA cuando se emplea glicerol u otra fuente de carbono que desencadene una respuesta al estrés [43], [52].

Las mayores diferencias en cuanto a la abundancia de proteínas se observaron entre el medio mínimo y el medio complejo, siendo la abundancia de proteínas mayor en MM9 en fase exponencial, y en TB7 en fase estacionaria (Tabla 1 y Figura 1). Esto puede ser debido a que en un medio complejo, como el TB7, muchos de los precursores, como los aminoácidos y algunos nucleótidos, ya están disponibles, y no es necesaria la expresión de una gran cantidad de proteínas para sintetizarlos [34]. En este sentido, la mayor abundancia de proteínas en TB7 en fase estacionaria puede ser explicada porque en medio complejo la transición a esta fase supone el aumento de la expresión de muchas enzimas presentes en menor abundancia, y que son necesarias para procesar y formar los precursores necesarios, mientras que en MM9 el perfil del proteoma no sufre tanta variación [34]. Así, en el análisis funcional observamos que las proteínas más abundantes en MM9 que en TB7 estaban implicadas principalmente en procesos de biosíntesis de precursores (Figura 2), algo que ya había sido observado en otros trabajos [34]. En cuanto al análisis funcional de las proteínas con diferencias en la fase de crecimiento, las proteínas más abundantes en fase exponencial pertenecían a procesos de traducción y procesos metabólicos, mientras que las más abundantes en fase estacionaria se relacionan con la respuesta a estrés oxidativo, lo que apunta a una adaptación funcional de las células al medio (Figura 2). Es conocido que varios reguladores globales en *E. coli*

controlan la respuesta al estrés y la transición de la fase de crecimiento, principalmente ArcA, Crp, Cra y el factor sigma alternativo RpoS [34], [51]–[53].

Una vez estudiadas las diferencias en el proteoma, se realizó un análisis del perfil del acetiloma en las distintas condiciones empleadas. Así, el número total de lisinas acetiladas encontradas en todas las condiciones fue de 7482, pertenecientes a 1817 proteínas (Tabla 2). Estas proteínas estaban involucradas, principalmente, en procesos del metabolismo primario como traducción y transcripción, metabolismo de los nucleótidos y procesos del metabolismo central (Figura 3B), tal y como se ha observado previamente en otros estudios de esta y otras bacterias [14], [28], [44], [54]. El número de sitios de acetilación encontrados en este estudio es muy elevado, a pesar de no haber empleado en el análisis cepas deficientes en la sirtuína CobB, la sobreexpresión de alguna lisín-acetiltransferasa o cepas deficientes en el gen *ackA*, condiciones que provocan un aumento del nivel normal de acetilación [14], [17], [27], [28], [54], [55]. El gran número de sitios de acetilación detectados en este estudio pudo deberse al empleo de tres variables distintas, fuente de carbono, fase de crecimiento y fuente de nitrógeno, de manera simultánea, lo cual aumenta el número de diferencias en la abundancia de proteínas (Tabla 1 y Figura 1), y con ello las posibilidades de que se den acetilaciones en distintos sitios. Otro factor determinante para alcanzar esta sensibilidad y selectividad analítica ha sido el empleo de un espectrómetro de masas Orbitrap Exploris 480 de alta resolución con alta precisión de masa.

En cuanto al número de sitios de acetilación en cada condición, este fue superior en las muestras de MM9 con respecto a las de TB7, en las de fase estacionaria con respecto a las de fase exponencial, y en las de glucosa con respecto a las de glicerol (Tabla 2). Para analizar estas diferencias se llevó a cabo un análisis inicial de PCA y diagramas de Venn, con los que concluimos que las mayores diferencias en la identidad de los péptidos acetilados se daban entre las fuentes de nitrógeno, y en menor medida en la fase de crecimiento (Figuras 4, 5 y 6). La mayor abundancia en lisinas acetiladas en MM9, puede ser explicada por una gran abundancia de proteínas diferentes necesarias para la síntesis de componentes esenciales en este medio [34]. Estos resultados indican la importancia de la fuente de nitrógeno en la identidad de las lisinas acetiladas, algo que no había sido descrito hasta la fecha.

Una vez estudiadas las diferencias generales, se analizaron de forma cuantitativa las diferencias en el nivel de acetilación entre las distintas condiciones de cultivo y su

posible causa, para lo que se estudió la concentración extracelular de acetato, y se llevaron a cabo pruebas t de Student de las muestras del acetiloma. La acetilación no enzimática se debe en gran medida a la concentración del dador de acetilo, acetil-P, que, a su vez, depende del metabolismo de desbordamiento del acetato [11]. Así, cuando la velocidad de flujo a través de la glicólisis excede la del ciclo TCA se acumula acetil-CoA, que es convertido en acetato a través del intermedio acetil-P, por lo que una mayor excreción de acetato conlleva un aumento del nivel de acetilación a través de un mecanismo químico [23], [56]. De este modo, observamos una mayor concentración de acetato en TB7 que en MM9, y en glucosa que en glicerol (perfil que coincide con la μ_{max} , (Tabla 4)), encontrándose una excreción de acetato casi inapreciable en MM9-glicerol (0,93 mM) (Figura 10).

Respecto a las diferencias relativas en el nivel de acetilación, esta fue superior en medio complejo que en medio mínimo, tal y como se observa en la Tabla 3 y la Figura 8. El alto nivel de acetilación en medio complejo parece estar relacionado con el desbordamiento de acetato concomitante con un rápido crecimiento, debido principalmente al tipo de fuente de nitrógeno (Tabla 4 y Figura 10). Por su parte, en medio MM9 el nivel de acetilación se relacionó con la fuente de carbono, siendo mayor en presencia de glucosa que con glicerol (Tabla 3), ya que en este último medio el desbordamiento de acetato es despreciable (Figura 10). En conclusión, en todas las condiciones el nivel de acetilación fue un reflejo del desbordamiento de acetato asociado a una elevada velocidad de crecimiento. Así, en un estudio en el que se compararon los niveles de acetilación derivados del empleo de glucosa y xilosa, no se obtuvieron diferencias entre estas fuentes de carbono, debido probablemente a que el desbordamiento de acetato y el crecimiento celular fue muy similar en ambas condiciones [22]. En cuanto a la fase de crecimiento, se observó un mayor nivel de acetilación en fase estacionaria (Tabla 3 y Figura 8), que pudo ser causa de la acumulación de los dadores de acetilo durante el crecimiento y el bajo recambio proteico [6], [17], [20]. Sin embargo la muestra de MM9-glicerol mostró un menor nivel de acetilación en fase estacionaria, esto podría deberse a que en este medio (MYS) es donde se produce un menor desbordamiento de acetato, y por tanto una menor formación de acetil-P tras la reincorporación de acetato [14]. Además, el análisis de las secuencias mostró el motivo de acetilación con presencia de residuos cargados negativamente, D y E, en la posición -1, el cual ha sido descrito anteriormente como un motivo esencial para la acetilación no enzimática [6], [14].

Debido a que habíamos encontrado diferencias en la identidad de los péptidos acetilados en función de las condiciones de cultivo (Figura 6), comprobamos si los péptidos acetilados con diferencias significativas eran los mismos entre las distintas comparativas de una misma variable, para lo que se llevaron a cabo diagramas de Venn (Figura 9). Al igual que en el caso de los péptidos acetilados totales, las diferencias en la identidad de los péptidos con diferencias significativas dependen principalmente de la fuente de nitrógeno. Además, las proteínas que contienen péptidos diferencialmente acetilados entre alguna condición, en general, están vinculadas a las rutas más abundantes en esa condición (Figuras 2 y 11), por lo que parece que la acetilación general depende de la abundancia y accesibilidad de las lisinas en las proteínas, tal y como se ha descrito anteriormente [14]. Sin embargo, destaca la prevalencia de proteínas del ciclo del glioxilato y el ciclo TCA más acetiladas en fase exponencial que en fase estacionaria, a pesar de que estas proteínas suelen estar más expresadas en fase estacionaria, lo que sugiere una funcionalidad específica de la acetilación para el control de los flujos metabólicos [34].

Centrándonos en las distintas rutas que pueden determinar la concentración de los dadores de acetilo responsables de la acetilación, observamos como el metabolismo del acetato no presenta un gran número de lisinas diferencialmente acetiladas en ninguna de las 3 variables (Figura 12). En otros estudios se ha observado un gran nivel de acetilación en las enzimas que emplean acetil-CoA [14], pero en este caso no observamos este comportamiento. Además, una de las enzimas del metabolismo del acetato, la acetil-CoA sintetasa (Acs) se inhibe por acetilación de su lisina 609 en *E. coli* y en otros organismos [28], [57], [58]. En este caso no encontramos la lisina 609 con diferencias significativas en el nivel de acetilación entre las condiciones de cultivo, pero si se encontró acetilada (Tabla S3 del Anexo). Sin embargo, la ruta de reincorporación de acetato en la que participa Acs no es la principal cuando la concentración extracelular de acetato es elevada, pues en estos casos actúa la ruta Pta-AckA [25], por lo que el impacto de la acetilación de Acs en estas condiciones puede no ser relevante.

Otra ruta importante que puede determinar el nivel de acetilación y la concentración de los metabolitos intermediarios esenciales es la glicólisis, pues un rápido flujo a través de ella puede conllevar la acumulación de acetil-CoA y su conversión en acetato [23], [59]. En esta ruta, el nivel de acetilación de las lisinas fue más elevado en la fase estacionaria con respecto a la fase exponencial, y en TB7 con respecto a MM9, sobre todo en la parte baja de la ruta (Figura 12). Entre las enzimas con mayor nivel de

acetilación de esta ruta se encuentra la P_{gk}, con 4 lisinas con valores de F_{ch} superiores o inferiores a 3 o -3, respectivamente. En la mayoría de los sitios de acetilación de esta enzima se observa una diferencia significativa en el nivel de acetilación en más de una comparativa, viéndose beneficiada por las condiciones que favorecen la acetilación no enzimática (Tabla S5 del Anexo). Una de estas lisinas, la K197, es homóloga a la lisina 220 de humanos, la cual está implicada en la unión al sustrato ATP (adenosina 5-trifosfato) [60], [61], por lo que la acetilación de este residuo podría conllevar una reducción de la actividad. Por su parte, la enzima GapA posee una lisina, la 184, que presentó un mayor nivel de acetilación en MUS que en TUS. Esta lisina se encuentra cerca del sitio activo y su acetilación en otros organismos conllevó una disminución de la actividad [62], [63]. Además, cabe destacar que esta enzima posee la única lisina diferencialmente más acetilada en glicerol que en glucosa, la K124, por lo que puede ser específica de esta fuente de carbono, y su estudio en profundidad resulta interesante. En cuanto a la triosa-fosfato isomerasa (TpiA), esta presenta una lisina, la K11, cuyo nivel de acetilación fue superior en medio complejo que medio mínimo en la comparativa de fase exponencial y con glicerol como fuente de carbono. Esta lisina se encuentra cerca del sitio activo de unión al sustrato DHAP (dihidroxiacetona-fosfato), y en otros organismos se ha observado que la cadena lateral de este residuo es crítica para la catálisis, pues estabiliza el estado de transición [64], por lo tanto su modificación podría provocar una pérdida de la actividad. Por último, otra enzima con una lisina acetilada con importantes implicaciones es la fosfoglicerato mutasa dependiente de 2,3-bifosfoglicerato (GpmA), la cual presentó la K11 más acetilada en medio complejo que en medio mínimo, cuando la bacteria creció en fase estacionaria y con glucosa. Esta lisina se encuentra implicada en la unión a sustrato [65], por lo que su acetilación podría alterar su actividad. En conclusión, parece que la acetilación de las lisinas de estas enzimas podría ser importante para la regulación de la glicólisis en función de las fuentes de carbono y nitrógeno y de la etapa de crecimiento bacteriana, y se necesitarían más estudios para dilucidar sus implicaciones.

Otras rutas relevantes son el ciclo TCA y el ciclo del glioxilato, las cuales presentaron lisinas con un mayor nivel de acetilación en fase exponencial que en fase estacionaria (Figura 12). Algunas de las enzimas de estas rutas se regulan por acetilación en *E. coli* y otros microorganismos, por lo que nos centraremos en su análisis. Así, la citrato sintetasa (GltA) posee dos lisinas cuya acetilación provoca una disminución y un aumento de su actividad, la K295 y la K283, respectivamente [66]. Estas lisinas no se encuentran entre las diferencialmente acetiladas en nuestro estudio, pero si se han encontrado acetiladas

(Tabla S3 del Anexo) [66]. Por su parte, la enzima malato deshidrogenasa (Mdh) sufre un aumento de su actividad cuando se acetila en los residuos K99 o K140 [67]. En el presente estudio, la lisina 140 mostró un mayor nivel de acetilación en TB7 que en MM9 cuando la bacteria creció en glicerol durante la fase exponencial, sin embargo, el residuo K99, aunque se encontró acetilado, no presentó diferencias significativas en su nivel de acetilación entre las distintas condiciones de cultivo (Tablas S3 y S5). Por último, las enzimas isocitrato liasa (AceA) del ciclo del glioxilato, e IcdA del ciclo TCA compiten por el isocitrato, y la mayor actividad de una u otra determina un mayor flujo hacia uno u otro ciclo [68]. Ambas enzimas son reguladas por la acetilación de alguna de sus lisinas, así, la AceA disminuye su actividad cuando aumenta su nivel de acetilación. En un estudio en el que se demuestra esta pérdida de actividad, aparecen acetiladas las lisinas 13, 34, 308, 326 y 331 [28], de ellas, todas excepto la K308, aparecen diferencialmente acetiladas en nuestro trabajo, con un mayor nivel de acetilación en medio complejo que en medio mínimo (Tabla S5 del Anexo). Además, en otro estudio realizado en *S. enterica* se obtuvo esta misma reducción de la actividad en AceA cuando se acetiló con la lisín-acetiltransferasa Pat, y se asumió que esta reducción de la actividad podría deberse a la acetilación de la K308 [69], la cual también se encontró acetilada en nuestro estudio, aunque no de manera diferencial (Tabla S3 del Anexo). Por su parte, la enzima IcdA se encuentra regulada por fosforilación, mediante la acción de la isocitrato deshidrogenasa quinasa/isocitrato deshidrogenasa fosfatasa (AceK), y a su vez por acetilación, pues la acetilación de los residuos K50 y K350 aumentan su actividad, mientras que la de los residuos K235, K100 y K230 la disminuyen [70]. Los residuos implicados en el aumento de la actividad por acetilación se encuentran diferencialmente acetilados en nuestro estudio, así, la lisina 350 solo aparece acetilada en las muestras de MM9, y la K55 aparece más acetilada en glucosa que en glicerol en medio mínimo (Tabla S5 del Anexo). Por lo tanto, parece que el cultivo en MM9 induce la acetilación de estas lisinas, y, por tanto, un aumento de la actividad. Sin embargo, encontramos también más acetilada la lisina 100 en MUS que en TUS y MYS, lo que provocaría una pérdida de actividad. Al encontrarse más acetilada en MM9 también esta lisina, la regulación de esta enzima dependerá del nivel de la acetilación de las tres lisinas 50, 350 y 100. Así, parece que el empleo de medio complejo podría reducir el flujo hacia el ciclo del glioxilato, debido a la posible inhibición de AceA. Por su parte, en medio MM9 el flujo hacia una u otra vía dependerá del mayor o menor nivel de acetilación de las lisinas 50, 100 y 350 de IcdA. En conclusión, el empleo de distintas fuentes de nitrógeno puede provocar la acetilación diferencial de estas

enzimas, que, acoplada con la fosforilación, podrían determinar una fina regulación de los flujos de estas rutas interconectadas.

En cuanto al metabolismo del nitrógeno, la acción de dos rutas, la de la glutamato deshidrogenasa (Gdh) y la de la glutamina sintetasa (Gs) y la glutamato sintetasa (GoGat), permiten la asimilación del nitrógeno en forma de amonio. Por lo tanto, el empleo de otros compuestos (péptidos, aminoácidos o nucleótidos) como fuente de nitrógeno implica su degradación previa a amonio para ser consumidos [32]. Así, la Gdh posee una lisina, la 92, importante para su actividad, pues su mutación implica una pérdida total de esta [71]. Esta lisina se encontró acetilada en este estudio, pero sin diferencias significativas en su nivel, y solo presente en algunas condiciones de MM9 (Tabla S3 del Anexo). Al igual que la Gdh, la Gs posee una lisina, la 353 que es la encargada de la unión a ATP [72], esta se encontró acetilada, pero sin diferencias significativas, lo que podría afectar a la unión a ATP, y por tanto a su actividad. En cuanto a la GoGat, esta presenta 4 lisinas en su subunidad pequeña que solo se encuentran acetiladas en MM9, por lo que en este medio podría verse afectada su función por esta acetilación. Además, estas enzimas presentan cambios en su nivel de abundancia si atendemos a la variable fuente de nitrógeno, pues la Gdh y la GoGat están más expresadas en MM9 que en TB7 y la Gs, presenta el perfil contrario (Tabla S2 del Anexo). Se debe destacar que la Gdh y la Gs son las encargadas de asimilar el amonio [33]. La mayor expresión de la Gdh en MM9 era esperable, pues esta enzima es la encargada de la asimilación en medios ricos en amonio como el medio mínimo [33]. De este modo, las modificaciones observadas podrían ir encaminadas a una mayor actividad de estas enzimas en medio mínimo, aunque sería interesante analizar, en trabajos futuros, el papel de la acetilación de estas lisinas, y como afecta a la asimilación de nitrógeno en los distintos medios empleados.

En conclusión, la abundancia de proteínas fue dependiente de la fuente de nitrógeno y de la fase de crecimiento, mientras que el número de lisinas acetiladas y la identidad de las mismas dependió de la abundancia de proteínas, siendo, de forma general, superior en medio mínimo. Por su parte, el nivel de acetilación de las lisinas con diferencias significativas mostró una dependencia con la velocidad de crecimiento vinculada al desbordamiento del acetato, siendo superior en TB7 que MM9.

Finalmente, los resultados de este estudio revelan la acetilación diferencial de las enzimas implicadas en el ciclo del glioxilato, el ciclo TCA y la asimilación del nitrógeno, y la posibilidad de una regulación por acetilación de estas vías que se encuentran

interconectadas. Asimismo, se han identificado lisinas específicas relacionadas con las condiciones de cultivo, que constituyen interesantes dianas para futuros estudios.

Referencias

- [1] Z. D. Blount, "The unexhausted potential of *E. coli*," *Elife*, vol. 4, pp. 1–12, 2015, doi: 10.7554/eLife.05826.
- [2] F. R. Blattner *et al.*, "The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12," *Science (80-.)*, vol. 277, no. 5331, pp. 1453–1462, 1997, doi: 10.1126/science.277.5331.1453.
- [3] N. S. Mccarty and R. Ledesma-amaro, "Synthetic Biology Tools to Engineer Microbial Communities for Biotechnology," *Trends Biochem. Sci.*, vol. 37, no. 2, pp. 181–197, 2019, doi: 10.1016/j.tibtech.2018.11.002 181.
- [4] R. Aebersold and M. Mann, "Mass-spectrometric exploration of proteome structure and function," *Nature*, vol. 537, no. 7620, pp. 347–355, 2016, doi: 10.1038/nature19949.
- [5] B. Macek, K. Forchhammer, J. Hardouin, E. Weber-Ban, C. Grangeasse, and I. Mijakovic, "Protein post-translational modifications in bacteria," *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 17, no. 11, pp. 651–664, 2019, doi: 10.1038/s41579-019-0243-0.
- [6] D. G. Christensen *et al.*, "Mechanisms, detection, and relevance of protein acetylation in prokaryotes," *MBio*, vol. 10, no. 2, pp. 1–20, Mar. 2019, doi: 10.1128/mBio.02708-18.
- [7] J. Lassak, A. Sieber, and M. Hellwig, "Exceptionally versatile take II: post-translational modifications of lysine and their impact on bacterial physiology," *Biol. Chem.*, 2022, doi: 10.1515/HSZ-2021-0382.
- [8] C. Choudhary, B. T. Weinert, Y. Nishida, E. Verdin, and M. Mann, "The growing landscape of lysine acetylation links metabolism and cell signalling," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 15, no. 8. Nature Publishing Group, pp. 536–550, 2014, doi: 10.1038/nrm3841.
- [9] K. L. Hentchel and J. C. Escalante-Semerena, "Acylation of Biomolecules in Prokaryotes: a Widespread Strategy for the Control of Biological Function and Metabolic Stress," *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 79, no. 3, pp. 321–346, 2015, doi: 10.1128/mmbr.00020-15.
- [10] X. J. Yang and E. Seto, "Lysine Acetylation: Codified Crosstalk with Other Posttranslational Modifications," *Mol. Cell*, vol. 31, no. 4, pp. 449–461, 2008, doi: 10.1016/j.molcel.2008.07.002.
- [11] A. J. Wolfe, "Bacterial protein acetylation: new discoveries unanswered questions," *Curr. Genet.*, vol. 62, no. 2, pp. 335–341, 2016, doi: 10.1007/s00294-015-0552-4.
- [12] S. Zhao *et al.*, "Regulation of Cellular Metabolism by Protein Lysine Acetylation," *Science (80-.)*, vol. 327, no. 5968, pp. 1000–1004, 2010, doi: 10.1126/science.1179689.
- [13] T. De Diego Puente *et al.*, "The protein acetyltransferase PatZ from *Escherichia coli* is regulated by autoacetylation-induced oligomerization," *J. Biol. Chem.*, vol. 290, no. 38, pp. 23077–23093, 2015, doi: 10.1074/jbc.M115.649806.
- [14] M. L. Kuhn *et al.*, "Structural, kinetic and proteomic characterization of acetyl phosphate-dependent bacterial protein acetylation," *PLoS One*, vol. 9, no. 4, pp.

- 1–26, 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0094816.
- [15] M. Lammers, “Post-translational Lysine Ac(et)ylation in Bacteria: A Biochemical, Structural, and Synthetic Biological Perspective,” *Front. Microbiol.*, vol. 12, no. 757179, pp. 1–45, 2021, doi: 10.3389/fmicb.2021.757179.
- [16] M. M. Wang, D. You, and B. C. Ye, “Site-specific and kinetic characterization of enzymatic and nonenzymatic protein acetylation in bacteria,” *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 14790, pp. 1–12, 2017, doi: 10.1038/s41598-017-13897-w.
- [17] B. Weinert *et al.*, “Acetyl-Phosphate is a critical determinant of Lysine Acetylation in *E.coli*,” *Mol. Cell*, vol. 51, no. 2, pp. 265–272, 2013, doi: 10.1016/j.molcel.2013.06.003.
- [18] J. Gallego-Jara, Á. Ortega, G. Lozano Terol, R. A. Sola Martínez, M. Cánovas Díaz, and T. de Diego Puente, “Bacterial Sirtuins Overview: An Open Niche to Explore,” *Front. Microbiol.*, vol. 12, pp. 1–15, 2021, doi: 10.3389/fmicb.2021.744416.
- [19] J. Gallego-Jara, A. Écija Conesa, T. de Diego Puente, G. Lozano Terol, and M. Cánovas Díaz, “Characterization of CobB kinetics and inhibition by nicotinamide,” *PLoS One*, vol. 12, no. 12, pp. 1–19, 2017, doi: 10.1371/journal.pone.0189689.
- [20] B. Schilling *et al.*, “Protein acetylation dynamics in response to carbon overflow in *Escherichia coli*,” *Mol. Microbiol.*, vol. 98, no. 5, pp. 847–863, 2015, doi: 10.1111/mmi.13161.
- [21] D. G. Christensen, J. S. Orr, C. V. Rao, and J. Wolfe, “Increasing Growth Yield and Decreasing Acetylation in *Escherichia coli* by Optimizing the Carbon-to-Magnesium Ratio in Peptide-Based Media,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 83, no. 6, pp. 1–13, 2017.
- [22] B. Schilling *et al.*, “Global lysine acetylation in *Escherichia coli* results from growth conditions that favor acetate fermentation,” *J. Bacteriol.*, vol. 201, no. 9, pp. 1–9, 2019, doi: 10.1101/457929.
- [23] V. Bernal, S. Castaño-Cerezo, and M. Cánovas, “Acetate metabolism regulation in *Escherichia coli*: carbon overflow, pathogenicity, and beyond,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 100, no. 21, pp. 8985–9001, 2016, doi: 10.1007/s00253-016-7832-x.
- [24] S. Castaño-Cerezo, S. Renilla, V. Bernal, and M. Cánovas, “An insight into the role of phosphotransacetylase (*pta*) and the acetate/acetyl-CoA node in *Escherichia coli*,” *Microb. Cell Fact.*, vol. 8, no. 54, pp. 1–19, 2009, doi: 10.1186/1475-2859-8-54.
- [25] B. Enjalbert, P. Millard, M. Dinclaux, J.-C. Portais, and F. Létisse, “Acetate fluxes in *Escherichia coli* are determined by the thermodynamic control of the Pta-AckA pathway,” *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 42135, pp. 1–11, 2017, doi: 10.1038/srep42135.
- [26] H. Kakuda, K. Hosono, K. Shiroishi, and S. Ichihara, “Identification and Characterization of the *ackA* (Acetate Kinase A)-*pta* (Phosphotransacetylase) Operon and Complementation Analysis of Acetate Utilization by an *ackA-pta* Deletion Mutant of *Escherichia coli*,” *J. Biochem.*, vol. 116, no. 4, pp. 916–922, 1994, doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a124616.
- [27] B. T. Weinert, S. Satpathy, B. K. Hansen, D. Lyon, L. J. Jensen, and C. Choudhary, “Accurate quantification of site-specific acetylation stoichiometry reveals the

- impact of Sirtuin deacetylase CobB on the *E. coli* acetylome,” *Mol. Cell. Proteomics*, vol. 16, no. 5, pp. 759–769, 2017, doi: 10.1074/mcp.M117.067587.
- [28] S. Castaño-Cerezo *et al.*, “Protein acetylation affects acetate metabolism, motility and acid stress response in *Escherichia coli*,” *Mol. Syst. Biol.*, vol. 10, no. 762, pp. 1–15, 2014, doi: 10.15252/msb.20145227.
- [29] B. Görke and J. Stülke, “Carbon catabolite repression in bacteria: Many ways to make the most out of nutrients,” *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 6, no. 8, pp. 613–624, 2008, doi: 10.1038/nrmicro1932.
- [30] K. Bettenbrock, S. Fischer, A. Kremling, K. Jahreis, T. Sauter, and E. D. Gilles, “A quantitative approach to catabolite repression in *Escherichia coli*,” *J. Biol. Chem.*, vol. 281, no. 5, pp. 2578–2584, 2006, doi: 10.1074/jbc.M508090200.
- [31] J. M. Clomburg and R. Gonzalez, “Anaerobic fermentation of glycerol: A platform for renewable fuels and chemicals,” *Trends Biotechnol.*, vol. 31, no. 1, pp. 20–28, 2013, doi: 10.1016/j.tibtech.2012.10.006.
- [32] L. Reitzer, “Nitrogen Assimilation and Global Regulation in *Escherichia coli*,” *Annu. Rev. Microbiol.*, vol. 57, pp. 155–176, 2003, doi: 10.1146/annurev.micro.57.030502.090820.
- [33] W. C. van Heeswijk, H. V. Westerhoff, and F. C. Boogerd, “Nitrogen Assimilation in *Escherichia coli*: Putting Molecular Data into a Systems Perspective,” *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 77, no. 4, pp. 628–695, 2013, doi: 10.1128/mmb.00025-13.
- [34] Z. Li, M. Nimtz, and U. Rinas, “The metabolic potential of *Escherichia coli* BL21 in defined and rich medium,” *Microb. Cell Fact.*, vol. 13, no. 45, pp. 1–17, 2014.
- [35] M. Tong, S. French, S. S. El Zahed, W. K. Ong, P. D. Karp, and E. D. Brown, “Gene dispensability in *Escherichia coli* grown in thirty different carbon environments,” *MBio*, vol. 11, no. 5, pp. 1–20, 2020, doi: 10.1128/mBio.02259-20.
- [36] A. Martinez-Val *et al.*, “Urea Artifacts Interfere with Immuno-Purification of Lysine Acetylation,” *J. Proteome Res.*, vol. 16, no. 2, pp. 1061–1068, 2017, doi: 10.1021/acs.jproteome.6b00463.
- [37] J. Krstic *et al.*, “Fasting improves therapeutic response in hepatocellular carcinoma through p53-dependent metabolic synergism,” *Sci. Adv.*, vol. 8, no. 3, pp. 1–19, 2022, doi: 10.1126/sciadv.abh2635.
- [38] J. Cox, N. Neuhauser, A. Michalski, R. A. Scheltema, J. V. Olsen, and M. Mann, “Andromeda: A Peptide Search Engine Integrated into the MaxQuant Environment,” *J. Proteome Res.*, vol. 10, pp. 1794–1805, 2011, doi: 10.1021/pr101065j.
- [39] J. Cox, M. Y. Hein, C. A. Lubner, I. Paron, N. Nagaraj, and M. Mann, “Accurate Proteome-wide Label-free Quantification by Delayed Normalization and Maximal Peptide Ratio Extraction, Termed MaxLFQ,” *Technol. Innov. Resour.*, vol. 13, no. 9, pp. 2513–2526, 2014, doi: 10.1074/mcp.M113.031591.
- [40] B. Schilling, J. G. Meyer, L. Wei, M. Ott, and E. Verdin, “High-Resolution Mass Spectrometry to Identify and Quantify Acetylation Protein Targets,” in *An Automated Irrigation System Using Arduino Microcontroller*, vol. 1983, 2019, pp. 3–16.

- [41] N. Colaert, K. Helsens, L. Martens, J. Vandekerckhove, and K. Gevaert, "Improved visualization of protein consensus sequences by iceLogo," *Nat. Methods*, vol. 6, no. 11, pp. 786–787, 2009, doi: 10.1038/nmeth1109-786.
- [42] D. W. Huang *et al.*, "DAVID Bioinformatics Resources: Expanded annotation database and novel algorithms to better extract biology from large gene lists," *Nucleic Acids Res.*, vol. 35, pp. 169–175, 2007, doi: 10.1093/nar/gkm415.
- [43] K. Martínez-Gómez *et al.*, "New insights into *Escherichia coli* metabolism: carbon scavenging, acetate metabolism and carbon recycling responses during growth on glycerol," *Microb. Cell Fact.*, vol. 11, no. 46, pp. 1–21, 2012, doi: 10.1186/1475-2859-11-46.
- [44] S. Kosono *et al.*, "Changes in the acetylome and succinylome of *Bacillus subtilis* in response to carbon source," *PLoS One*, vol. 10, no. 6, pp. 1–24, 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0131169.
- [45] H. Okanishi, K. Kim, R. Masui, and S. Kuramitsu, "Acetylome with Structural Mapping Reveals the Significance of Lysine Acetylation in *Thermus thermophilus*," *J. Proteome Res.*, vol. 12, no. 9, pp. 3952–3968, 2013, doi: 10.1021/pr400245k.
- [46] J. Novak, I. Fabrik, D. Jurnecka, J. Holubova, O. Stanek, and P. Sebo, "*Bordetella pertussis* Acetylome is Shaped by Lysine Deacetylase Bkd1," *J. Proteome Res.*, vol. 19, no. 9, pp. 3680–3696, 2020, doi: 10.1021/acs.jproteome.0c00178.
- [47] I. Ali, R. J. Conrad, E. Verdin, and M. Ott, "Lysine Acetylation Goes Global: From Epigenetics to Metabolism and Therapeutics," *Chem. Rev.*, vol. 118, no. 3, pp. 1216–1252, 2018, doi: 10.1021/acs.chemrev.7b00181.
- [48] A. Kremling, J. Geiselmann, D. Ropers, and H. de Jong, "Understanding carbon catabolite repression in *Escherichia coli* using quantitative models," *Trends Microbiol.*, vol. 23, no. 2, pp. 99–109, 2015, doi: 10.1016/j.tim.2014.11.002.
- [49] Y. Dharmadi, A. Murarka, and R. Gonzalez, "Anaerobic Fermentation of Glycerol by *Escherichia coli*: A New Platform for Metabolic Engineering," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 94, no. 5, pp. 821–829, 2006, doi: 10.1002/bit.21025.
- [50] B. J. Yu, J. A. Kim, J. H. Moon, S. E. Ryu, and J. G. Pan, "The diversity of lysine-acetylated proteins in *Escherichia coli*," *J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 18, no. 9, pp. 1529–1536, 2008, doi: 7509 [pii].
- [51] A. Perrenoud and U. Sauer, "Impact of global transcriptional regulation by ArcA, ArcB, Cra, Crp, Cya, Fnr, and Mlc on glucose catabolism in *Escherichia coli*," *J. Bacteriol.*, vol. 187, no. 9, pp. 3171–3179, 2005, doi: 10.1128/JB.187.9.3171-3179.2005.
- [52] M. Mori *et al.*, "From coarse to fine: the absolute *Escherichia coli* proteome under diverse growth conditions," *Mol. Syst. Biol.*, vol. 17, no. e9536, pp. 1–23, 2021, doi: 10.15252/msb.20209536.
- [53] M. Rahman, M. R. Hasan, T. Oba, and K. Shimizu, "Effect of *rpoS* Gene Knockout on the Metabolism of *Escherichia coli* During Exponential Growth Phase and Early Stationary Phase Based on Gene Expressions, Enzyme Activities and Intracellular Metabolite Concentrations," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 94, no. 3, pp. 585–595, 2006, doi: 10.1002/bit.20858.
- [54] J. Baeza *et al.*, "Stoichiometry of site-specific lysine acetylation in an entire

- proteome," *J. Biol. Chem.*, vol. 289, no. 31, pp. 21326–21338, 2014, doi: 10.1074/jbc.M114.581843.
- [55] D. G. Christensen *et al.*, "Identification of Novel Protein Lysine Acetyltransferases in *Escherichia coli*," *MBio*, vol. 9, no. 5, pp. 1–23, 2018, doi: 10.1128/mBio.
- [56] A. J. Wolfe, "The Acetate Switch," *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 69, no. 1, pp. 12–50, 2005, doi: 10.1128/MMBR.69.1.12.
- [57] S. Castaño-Cerezo, V. Bernal, T. Röhrig, S. Termeer, and M. Cánovas, "Regulation of acetate metabolism in *Escherichia coli* BL21 by protein Ne-lysine acetylation," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 99, no. 8, pp. 3533–3545, 2015, doi: 10.1007/s00253-014-6280-8.
- [58] V. J. Starai, J. G. Gardner, and J. C. Escalante-Semerena, "Residue Leu-641 of Acetyl-CoA Synthetase is Critical for the Acetylation of Residue Lys-609 by the Protein Acetyltransferase Enzyme of *Salmonella enterica*," *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 28, pp. 26200–26205, 2005, doi: 10.1074/jbc.M504863200.
- [59] C. S. Westfall and P. A. Levin, "Comprehensive analysis of central carbon metabolism reveals multiple connections between nutrients, biosynthetic capacity, and cell morphology in *Escherichia coli*," *Plos Genet.*, vol. 14, no. 2, pp. 1–25, 2017, doi: 10.1101/191585.
- [60] C. Gondeau *et al.*, "Molecular basis for the lack of enantioselectivity of human 3-phosphoglycerate kinase," *Nucleic Acids Res.*, vol. 36, no. 11, pp. 3620–3629, 2008, doi: 10.1093/nar/gkn212.
- [61] L. Zerrad *et al.*, "A Spring-Loaded Release Mechanism Regulates Domain Movement and Catalysis in Phosphoglycerate Kinase," *J. Biol. Chem.*, vol. 286, no. 16, pp. 14040–14048, 2011, doi: 10.1074/jbc.M110.206813.
- [62] G. Foucault, M. Nakano, and J. Pudles, "Role of Lysine-183 in D-Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenases," *Eur. J. Biochem.*, vol. 83, no. 1, pp. 113–123, 1978, doi: 10.1111/j.1432-1033.1978.tb12074.x.
- [63] J. H. Park, D. C. Shaw, E. Mathew, and B. P. Meriwether, "Enzymatic Characterization of the N-acetylation of 3-Phosphoglyceraldehyde Dehydrogenase by Acetyl Phosphate," *J. Biol. Chem.*, vol. 245, no. 11, pp. 2946–2953, 1970, doi: 10.1016/s0021-9258(18)63079-0.
- [64] M. K. Go, A. Koudelka, T. L. Amyes, and J. P. Richard, "Role of Lys-12 in Catalysis by Triosephosphate Isomerase: A Two-Part Substrate Approach," *Biochemistry*, vol. 49, no. 25, pp. 5377–5389, 2010, doi: 10.1021/bi100538b.
- [65] C. S. Bond, M. F. White, and W. N. Hunter, "Mechanistic Implications for *Escherichia coli* Cofactor-dependent Phosphoglycerate Mutase Based on the High-resolution Crystal Structure of a Vanadate Complex," *J. Mol. Biol.*, vol. 316, no. 5, pp. 1071–1081, 2002, doi: 10.1006/jmbi.2002.5418.
- [66] S. Venkat, H. Chen, P. McGuire, A. Stahman, and Q. Gan, "Characterizing lysine acetylation of *Escherichia coli* type II citrate synthase," *FEBS J.*, vol. 286, pp. 2799–2808, 2019, doi: 10.1111/febs.14845.
- [67] S. Venkat, C. Gregory, J. Sturges, Q. Gan, and C. Fan, "Studying the Lysine Acetylation of Malate Dehydrogenase," *J. Mol. Biol.*, vol. 429, no. 9, pp. 1396–1405, 2017, doi: 10.1016/j.jmb.2017.03.027.

- [68] M. El-Mansi, A. J. Cozzone, J. Shiloach, and B. J. Eikmanns, "Control of carbon flux through enzymes of central and intermediary metabolism during growth of *Escherichia coli* on acetate," *Curr. Opin. Microbiol.*, vol. 9, no. 2, pp. 173–179, 2006, doi: 10.1016/j.mib.2006.02.002.
- [69] Q. Wang *et al.*, "Acetylation of metabolic enzymes coordinates carbon source utilization and metabolic flux," *Science (80-.)*, vol. 327, no. 5968, pp. 1004–1007, Feb. 2010, doi: 10.1126/science.1179687.
- [70] S. Venkat *et al.*, "Characterizing Lysine Acetylation of Isocitrate Dehydrogenase in *Escherichia coli*," *J. Mol. Biol.*, vol. 430, no. 13, pp. 1901–1911, 2019, doi: 10.1016/j.jmb.2018.04.031.Characterizing.
- [71] K. M. Jones, M. J. McPherson, A. J. Baron, I. W. Mattaj, C. L. Riordan, and J. C. Wootton, "The *gdhA1* point mutation in *Escherichia coli* K12 CLR207 alters a key lysine residue of glutamate dehydrogenase," *MGG Mol. Gen. Genet.*, vol. 240, no. 2, pp. 286–289, 1993, doi: 10.1007/BF00277068.
- [72] L. Saelices, R. Robles-Rengel, F. J. Florencio, and M. I. Muro-Pastor, "A core of three amino acids at the carboxyl-terminal region of glutamine synthetase defines its regulation in cyanobacteria," *Mol. Microbiol.*, vol. 96, no. 3, pp. 483–496, 2015, doi: 10.1111/mmi.12950.

Anexo

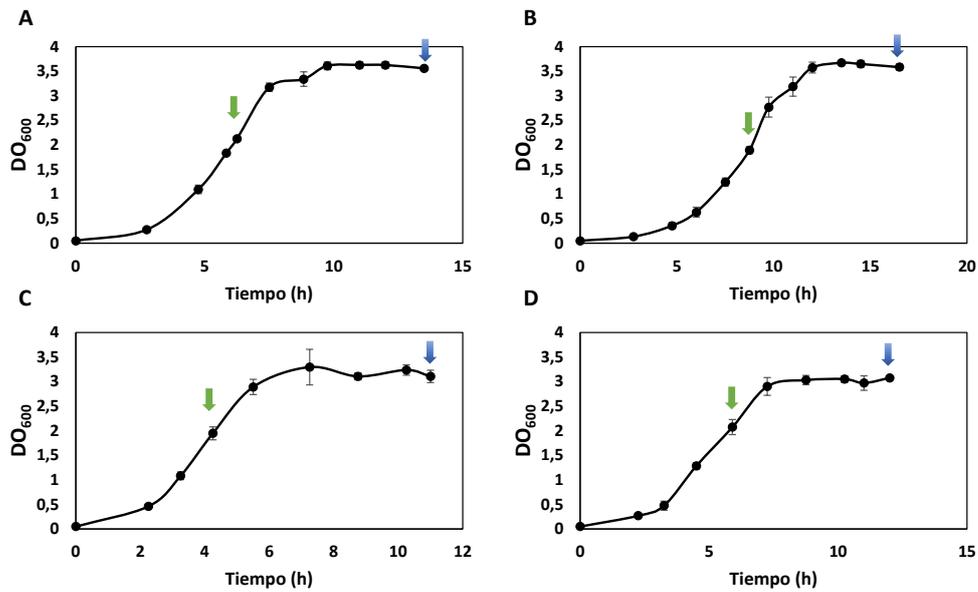


Figura S1: Crecimiento celular a DO₆₀₀ de *E. coli* K12 creciendo en los distintos medios de cultivo. *E. coli* K12 creciendo en MM9-glucosa (A), MM9-glicerol (B), TB7-glucosa (C) y TB7-glicerol (D) para el análisis por espectrometría de masas sin marcaje. Las flechas indican la toma de muestra, la flecha verde indica la toma de muestra en fase exponencial y la flecha azul la toma de muestra en fase estacionaria.

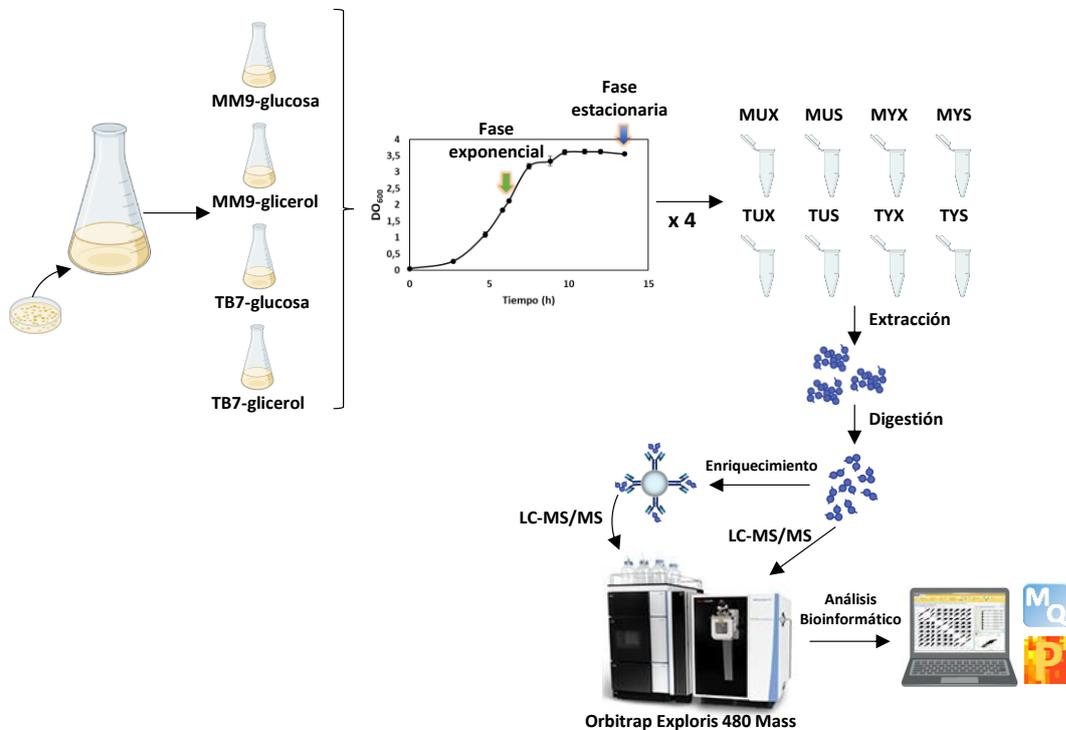


Figura S2: Esquema del flujo de trabajo para el análisis del proteoma y el acetiloma de *E. coli* mediante LC-MS/MS sin marcaje. Se indican las distintas condiciones de cultivo y la toma de muestra.

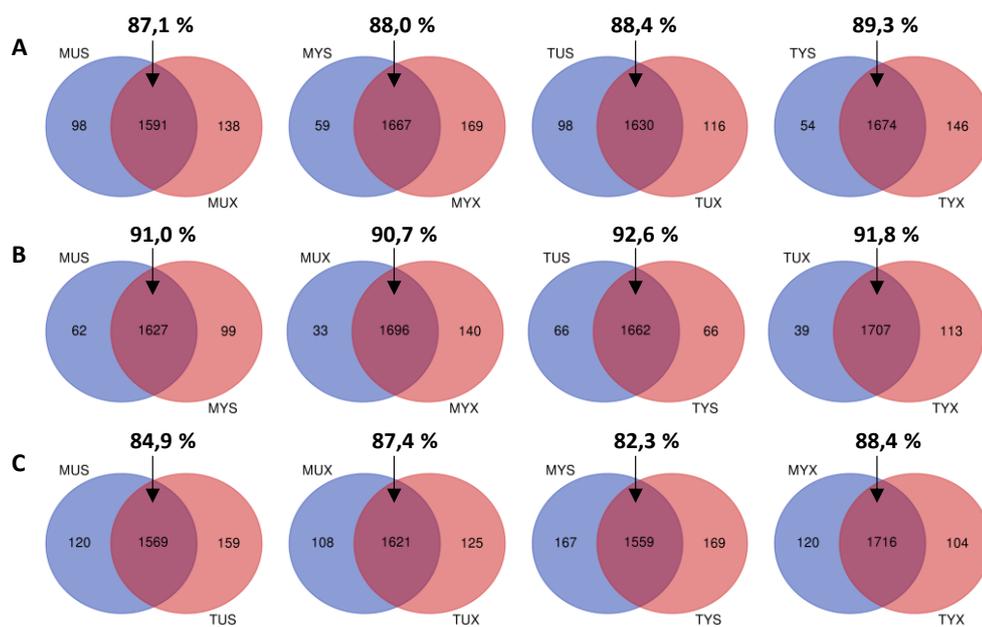


Figura S3: Diagramas de Venn de las proteínas totales de las distintas condiciones analizadas. Comparaciones de las proteínas de las muestras variando la fase de crecimiento (A), la fuente de carbono (B) y la fuente de nitrógeno (C). Porcentajes correspondientes al número de proteínas iguales entre las dos condiciones comparadas.

Tablas Suplementarias (Tabla S1, S2, S3, S4 y S5):

<https://umubox.um.es/index.php/s/0w6MgtVz4MrpqUn>

Capítulo 7

Conclusiones/Conclusions

Discusión final

El objetivo general de esta Tesis Doctoral ha sido identificar y comprender los factores que gobiernan la dinámica de la acetilación de lisinas en *Escherichia coli* (*E. coli*), y sus efectos sobre la regulación del metabolismo, con el fin de mejorar las capacidades biotecnológicas de la bacteria.

E. coli es uno de los hospedadores microbianos más utilizados para la generación de productos biológicos, y un excelente organismo modelo para el diseño de nuevos fármacos contra las infecciones [1]. En este sentido, con los avances en el área de Sistemas y Biología Sintética, la caracterización completa de las vías bacterianas debería permitir un diseño predictivo del microorganismo e implementar nuevas funcionalidades para la síntesis de biomoléculas. Además, gracias a la mejora en las técnicas de proteómica basadas en espectrometría de masas, en los últimos años se ha demostrado la importancia de la regulación por acetilación de proteínas en todos los dominios de la vida [2]. En consecuencia, para garantizar el éxito de la optimización celular de la bacteria es ineludible esclarecer los principales factores que controlan este mecanismo, para así completar el cuadro de las funciones reguladoras en la bacteria y ampliar nuestra comprensión sobre la divergencia entre el genotipo y la diversidad de fenotipos que presenta. Los avances en este campo tienen un gran impacto en múltiples ámbitos científicos, desde la bioingeniería hasta la ciencia biomédica, pues permiten incrementar la eficacia de la explotación de *E. coli* en biotecnología blanca, y aumentan su conocimiento como modelo de patologías mitocondriales que suceden por la desregulación de la acetilación de proteínas [1].

Un factor determinante cuando se emplea *E. coli* como hospedador es el control del desbordamiento del acetato, el cual limita la producción de bioproductos y conlleva un incremento global de la acetilación a través de los dadores de acetilo [3], [4]. Por lo tanto, este fenómeno está relacionado de forma directa con la producción de proteínas recombinantes y con el estado celular que determina la dinámica de la acetilación. Así, en este trabajo estudiamos las implicaciones del uso de distintos medios de cultivo en la producción de proteínas recombinantes (Capítulo 3), en el perfil proteico y en el nivel de acetilación en *E. coli* (Capítulo 6). Además, combinamos la estrategia anterior con mutantes deficientes en genes involucrados en el metabolismo del acetato y en la regulación de la acetilación de lisinas, para optimizar la producción de proteínas recombinantes y conocer su nivel de acetilación (Capítulos 3). Continuando con la

optimización biotecnológica, se analizaron distintos sistemas de expresión para alcanzar un equilibrio entre el desajuste metabólico y el rendimiento del bioproceso (Capítulo 4). Por último, se estudiaron las implicaciones de la acetilación en una importante ruta metabólica, la ruta de biosíntesis de pirimidinas *de novo* (Capítulo 5). Los resultados de estos trabajos nos han permitido avanzar en el diseño de estrategias, mediante la selección de medios de cultivo, de sistemas de expresión y la ingeniería de cepas, para la regulación de los flujos metabólicos y el aumento de las aptitudes de la bacteria como hospedador biotecnológico.

En cuanto a la producción de proteínas recombinantes, se han desarrollado multitud de estrategias basadas en las modificaciones del medio de cultivo y centradas en eliminar o reducir el desbordamiento de acetato [5]–[9]. En el Capítulo 3 llevamos a cabo dos estrategias de forma simultánea, la reducción del desbordamiento del acetato mediante ingeniería de cepas, y el empleo de distintos medios de cultivo. A partir del comportamiento metabólico de cada mutante en los diferentes medios de cultivo y el análisis de la expresión diferencial de enzimas clave, demostramos la redirección de los flujos de carbono entre las diferentes vías, que generan un impacto desigual en el rendimiento final del bioproceso. Los resultados de este trabajo mostraron un aumento de hasta 5 veces en la producción de proteínas recombinantes en la cepa $\Delta ackA$ con respecto a la cepa silvestre (wt), cuando se empleó TB7-glicerol como medio de cultivo. Por su parte en el Capítulo 4 se analizaron diferentes sistemas de expresión para reducir el impacto del desajuste metabólico celular y aumentar el rendimiento de bioproceso. Además de *E. coli* wt, también se empleó la cepa mutante deficiente en *ackA*, sin embargo, con un vector de alto número de copias (500-700 copias) se produjo una gran reducción en la producción de proteínas recombinantes en esta cepa, muy distinta al excelente resultado mostrado en el capítulo anterior en el que se empleó un vector pRSET-A de 200 a 250 copias [10]. Este comportamiento, probablemente, fue consecuencia del excesivo desajuste metabólico sumado al estrés fisiológico del mutante, que le impidieron alcanzar la homeostasis celular. Esta situación, se tradujo en una reducción de los valores de μ_{max} y de la producción de proteínas recombinantes en este mutante que supero los beneficios obtenidos, en el Capítulo 3, sobre el control del desbordamiento de acetato.

En cuanto a la relación de las distintas condiciones de cultivo con la expresión de proteínas recombinantes, en el Capítulo 3 observamos como el empleo de medio complejo suplementado con glicerol supuso un incremento en el rendimiento del

bioproceso. La mayor expresión de proteínas en medio complejo pudo deberse a que muchos de los precursores necesarios para el bioproceso eran aportados en el medio, por lo que la bacteria no requería invertir recursos para su síntesis, los cuales pudieron ser destinados a la producción de proteínas recombinantes. Sin embargo, en medio mínimo es necesaria la mayor expresión de ciertas rutas destinadas a la obtención de estos recursos no suministrados en el medio. Este hecho se puso de manifiesto en el Capítulo 6, con una mayor abundancia en medio mínimo de proteínas relacionadas con procesos de síntesis, como la biosíntesis de aminoácidos. Estos resultados concuerdan con otros estudios en lo que se comparan la expresión de proteínas en estos dos tipos de medios [11]. Además, el uso de glicerol supone una reducción del desbordamiento del acetato, tal y como se observa en los Capítulos 3 y 6, porque se genera un balance entre los flujos de las vías metabólicas implicadas que reduce la excreción de acetato. Este hecho, combinado con la presencia de multitud de precursores en el medio, puede suponer un gran beneficio a la hora de llevar a cabo la producción de proteínas recombinantes u otros bioprocesos.

El uso de las estrategias empleadas en los Capítulos 3 y 4 para optimizar la producción de proteínas recombinantes tiene importantes implicaciones en el nivel de acetilación global, el cual afecta directamente a la proteína obtenida. Así, el uso de las cepas $\Delta cobB$, Δpta y $\Delta ackA$, que favorece la producción de proteínas recombinantes, tal y como se observa en el Capítulo 3 y en otros estudios [12]–[14], también tiene consecuencias sobre el nivel de acetilación. Las cepas deficientes en la desacetilasa CobB y en AckA conllevan un aumento del grado de acetilación, mientras que la cepa deficiente en el gen *pta* está relacionada con una disminución del nivel de acetilación [15]–[18]. En este estudio también observamos estos perfiles de acetilación en las proteínas purificadas de las cepas $\Delta cobB$, Δpta y $\Delta ackA$ en el Capítulo 3, lo que puede tener implicaciones en la funcionalidad de las proteínas producidas en estas condiciones. Estas implicaciones se pusieron de manifiesto en el Capítulo 5, pues las OPRTasas purificadas de las cepas $\Delta cobB$ y $\Delta ackA$ presentaban menor actividad que la purificada de Δpta . En este mismo estudio se observó una menor formación de curli en la cepa $\Delta cobB$, debido probablemente a la acetilación de la OPRTasa en los residuos 26 o 103, lo que tiene implicaciones sobre el crecimiento y la capacidad de adhesión de la bacteria.

Del mismo modo, el nivel de acetilación depende de las condiciones de cultivo empleadas, pues como se observa en el Capítulo 6, la acetilación es más elevada con el empleo de medio complejo y de glucosa que la que se produce en medio mínimo y con

glicerol. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en el Capítulo 3 para la proteína GFP, ya que en medio mínimo solo se detectó acetilación en las proteínas procedentes de *ΔcobB* y *ΔackA*, mientras que, en medio complejo, todas las proteínas producidas en el resto de las cepas mostraron un elevado nivel de acetilación. Otros estudios han relacionado el uso de distintas fuentes de carbono con el nivel de acetilación [19], [20], pero hasta donde sabemos, este es el primer trabajo en el que se analizan las implicaciones del uso de distintas fuentes de nitrógeno y carbono de forma conjunta sobre las proteínas expresadas y el nivel de acetilación general en *E. coli*. Además, en ambos capítulos se observa la relación entre el desbordamiento del acetato y el nivel de acetilación de lisinas, pues aunque se emplean cepas distintas, *E. coli* BL21 (Capítulo 3) y *E. coli* K12 (Capítulo 6), que difieren en el nivel de acetilación y en el desbordamiento de acetato [17], [21], [22], en ambos casos, se observa un incremento de la acetilación cuando la excreción de acetato es más elevada.

Además, el análisis del acetiloma abordado en el Capítulo 6, mostró que la acetilación diferencial debida al empleo de distintos medios de cultivo podría tener implicaciones en la regulación de rutas metabólicas y en la producción de proteínas recombinantes. Así, en MM9 hay una mayor prevalencia de la acetilación en las enzimas responsables de la biosíntesis de aminoácidos y la traducción, mientras que en TB7 se encontraron más acetiladas las enzimas que pertenecen al plegado de las proteínas y a la regulación de la traducción. Esta acetilación puede ser responsable de cambios en la funcionalidad de estas enzimas y, por tanto, en diferencias en cuanto a la producción y el procesamiento de las proteínas recombinantes en distintas condiciones de cultivo. En cuanto al metabolismo central, a través del análisis del proteoma del este mismo capítulo, se observó un aumento de la abundancia de proteínas del ciclo TCA, y del metabolismo de fuentes de carbono secundarias cuando se consume glicerol como fuente de carbono. Este perfil proteico parece balancear los flujos entre las vías metabólicas del metabolismo central y con ello disminuir la excreción de acetato, lo que está relacionado con un bajo grado de acetilación proteica. Todo ello concuerda con el comportamiento metabólico observado en los mutantes estudiados en el Capítulo 3, así como, con los valores relativos de transcripción génica de enzimas clave del metabolismo analizados en este trabajo. Estas diferencias en expresión han sido encontradas en otros estudios [23]. En general se observaron diferencias en la abundancia de las proteínas del metabolismo central, en su nivel de acetilación (Capítulo 6) y en los flujos a través de este (Capítulo 3), derivados del uso de distintos medios de cultivo. Por lo tanto, el empleo de distintas condiciones de

cultivo condiciona la regulación de los flujos del metabolismo central y, por consiguiente, del metabolismo del acetato.

A partir del trabajo abordado en el Capítulo 3, detectamos un aumento de 35 veces en la excreción de orotato en la cepa deficiente en el gen de la desacetilasa *cobB* con respecto a la cepa wt [24]. Esta gran diferencia, probablemente no pueda ser únicamente explicada por el control del nodo del α -cetoglutarato por acetilación de la isocitrato liasa, sino que podría suceder, simultáneamente, una regulación por acetilación de la vía de biosíntesis de pirimidinas que contribuyera al elevado aumento de la excreción de orotato. Por este motivo, en el Capítulo 5 analizamos la posible regulación por acetilación de la ruta de biosíntesis de pirimidinas *de novo*, y demostramos que la acetilación en las lisinas 26 y 103 de la OPRTasa provocó una reducción de su actividad enzimática, la cual pudo ser revertida por la desacetilación con CobB. En el Capítulo 6 encontramos la K26 de la OPRTasa acetilada, sin diferencias significativas entre las distintas condiciones de cultivo, pero solo presente en algunas muestras de TB7-glucosa. La presencia de esta lisina acetilada en condiciones que provocan un elevado nivel de acetilación (TB7-glucosa), ya había sido observada en otros estudios [15], [16], [19], [23], lo que apoya nuestra hipótesis de que la acetilación de estos residuos en la OPRTasa ocurre por un mecanismo no enzimático. La regulación de la OPRTasa justificada en este capítulo puede tener implicaciones importantes debido al papel de *E. coli* en la microbiota humana y como diana para tratamientos antimicrobianos, antivirales y contra el cáncer.

En conclusión, el empleo de distintas condiciones de cultivo determina los flujos del metabolismo central en general, y en concreto del desbordamiento del acetato, lo que tiene repercusiones en la abundancia relativa de las proteínas, el nivel de acetilación de lisinas y, en consecuencia, en la producción de proteínas recombinantes. Además, el nivel de acetilación asociado a las distintas condiciones de cultivo repercute en la acetilación de las proteínas producidas, lo cual es un factor a tener en cuenta cuando se lleva a cabo un bioproceso, pues puede afectar a su actividad o a su conformación. Del mismo modo, la acetilación derivada de las distintas condiciones de cultivo actúa ejerciendo una regulación diferencial de las rutas del metabolismo central, como ocurre, por ejemplo, en la ruta de biosíntesis de las pirimidinas *de novo*. Además, se han llevado a cabo otras estrategias, como la ingeniería de cepas, con el fin de mejorar las capacidades de *E. coli* como organismo hospedador. Por lo tanto, los resultados de esta Tesis Doctoral ponen de manifiesto la interconexión de la regulación por acetilación de las rutas del metabolismo central con las condiciones de cultivo de *E. coli*.

Conclusiones

El principal objetivo de esta Tesis Doctoral fue comprender los factores que gobiernan la dinámica de la acetilación de proteínas y su efecto sobre el control del metabolismo central de *E. coli*, con el fin de diseñar estrategias que garanticen la optimización celular para la producción de proteínas recombinantes. Con este fin, las principales conclusiones alcanzadas en cada uno de los capítulos de esta tesis son:

1. Se ha demostrado que la selección de la fuente de nitrógeno y carbono es determinante en la optimización de la producción de proteínas recombinantes. El empleo de medio complejo suplementado con glicerol mejora el rendimiento de los flujos de las vías implicadas en el metabolismo central de carbono, y supone un beneficio desde el punto de vista del aprovechamiento de recursos, pues el glicerol es el principal subproducto de la síntesis de biodiesel.
2. Las estrategias combinadas de ingeniería de cepas, vinculadas al metabolismo del acetato, junto con la selección optimizada del medio de cultivo son decisivos para la bioproducción de proteínas heterólogas. Así, la cepa *E. coli* BL21 $\Delta ackA$, creciendo en medio TB7-glicerol, ha supuesto un aumento de hasta 5 veces en la producción de proteínas recombinantes con respecto a la cepa silvestre, empleando el sistema de expresión adecuado. Además, la excreción de acetato en esta cepa es casi imperceptible, lo que supone una redirección optimizada de los flujos de carbono hacia la producción del producto biológico.
3. El desajuste metabólico producido por la replicación del plásmido es traducido en una reducción en el nivel de expresión de proteína recombinante en *E. coli* BL21. Este desajuste metabólico es mayor cuando se emplean vectores de alto número de copias y promotores fuertes, por lo que el equilibrio entre la fuerza del promotor y el número de copias del plásmido es esencial para la optimización de la producción de proteína soluble en *E. coli*.
4. Se ha evidenciado que la ruta de biosíntesis de pirimidinas *de novo* es regulada por acetilación de lisinas de la enzima OPRTasa en *E. coli*. La acetilación permanente de las lisinas en las posiciones 26 y 103 de la OPRTasa provoca una reducción en los valores de la k_{cat} para la reacción directa y reversa de 300 y 150 veces para la OPRTasa-103AcK y de 19 y 6,3 veces para la OPRTasa-26AcK,

respectivamente. Además, la desacetilación con CobB implica que las OPRTasas acetiladas recuperen el nivel de actividad de la OPRTasa control. Este hallazgo es de gran relevancia debido al papel esencial de esta ruta y de la enzima OPRTasa como diana para tratamientos antimicrobianos, antivirales y contra el cáncer.

5. A partir del análisis del proteoma por espectrometría de masas sin marcaje se ha demostrado que la abundancia de proteínas es dependiente de la fuente de nitrógeno y de la fase de crecimiento. Mientras que el número de lisinas acetiladas y la identidad de estas depende de la abundancia relativa de proteínas.
6. A partir del análisis cuantitativo del acetiloma por espectrometría de masas libre de marcaje se ha detectado que el nivel de acetilación de las lisinas con diferencias significativas muestra una dependencia con la velocidad de crecimiento vinculada al desbordamiento del acetato, siendo superior en medio complejo que en medio mínimo.
7. Se ha identificado una acetilación diferencial de las enzimas implicadas en el ciclo del glioxilato, el ciclo TCA y la asimilación del nitrógeno relacionadas con las condiciones de cultivo, lo que sugiere una regulación por acetilación de estas vías que se encuentran interconectadas. Asimismo, se han identificado lisinas específicas de enzimas clave que constituyen interesantes dianas para futuros estudios sobre su mecanismo de acción.

Conclusions

The main objective of this PhD Thesis was to understand the factors that govern the dynamics of protein acetylation and its effect on the control of the central metabolism of *E. coli*, in order to design strategies that guarantee cell optimization to produce recombinant proteins. To this end, the main conclusions reached in each of the chapters of this Thesis are:

1. It has been shown that the selection of the nitrogen and carbon source is decisive in the optimization of recombinant protein production. The use of complex medium supplemented with glycerol improves the yield of the fluxes of the pathways involved in central carbon metabolism, and is beneficial from the point of view of resource utilization, since glycerol is the main by-product of biodiesel synthesis.
2. The combined strategies of strain engineering, linked to acetate metabolism, together with the optimized selection of culture medium are decisive for the bioproduction of heterologous proteins. Thus, the *E. coli* BL21 $\Delta ackA$ strain, growing in TB7-glycerol medium, has involved up to a 5-fold increase in recombinant protein production over the wild-type strain, employing the appropriate expression system. Moreover, acetate excretion in this strain is almost imperceptible, which entails an optimized redirection of carbon fluxes towards the production of the biological product.
3. The metabolic burden produced by plasmid replication is translated into a reduction in recombinant protein expression level in *E. coli* BL21. This metabolic burden is greater when high copy number vectors and strong promoters are used, so the balance between promoter strength and plasmid copy number is essential for optimising soluble protein production in *E. coli*.
4. It has been evidenced that the *de novo* pyrimidine biosynthesis pathway is regulated by lysine acetylation of the OPRTase enzyme in *E. coli*. Permanent acetylation of lysines at positions 26 and 103 of OPRTase causes a reduction in k_{cat} values for the forward and reverse reaction by 300- and 150-fold for OPRTase-103AcK and 19- and 6.3-fold for OPRTase-26AcK, respectively. Moreover, deacetylation with CobB implies that these OPRTases recover the activity level of

the control OPRTase. This finding is of great relevance due to the essential role of this pathway and the OPRTase enzyme as a target for antimicrobial, antiviral and cancer treatments.

5. The proteome analysis by label-free mass spectrometry shown that protein abundance is dependent on nitrogen source and growth phase. While the number of acetylated lysines and the identity of these depends on the relative abundance of proteins.
6. From the quantitative analysis of the acetylome by label-free mass spectrometry it has been detected that the level of acetylation of lysines with significant differences shows a dependence with the growth rate linked to acetate overflow, being higher in complex medium than in minimal medium.
7. Differential acetylation related to culture conditions of enzymes involved in the glyoxylate cycle, TCA cycle and nitrogen assimilation has been identified, suggesting acetylation regulation of these interconnected pathways. In addition, key enzyme-specific lysines have been identified as interesting targets for future studies on their mechanism of action.

Referencias

- [1] Z. D. Blount, "The unexhausted potential of *E. coli*," *Elife*, vol. 4, pp. 1–12, 2015, doi: 10.7554/eLife.05826.
- [2] L. K. Pino, J. Rose, A. O. Broin, S. Shah, and B. Schilling, "Emerging mass spectrometry-based proteomics methodologies for novel biomedical applications," *Biochem. Soc. Trans.*, vol. 48, pp. 1953–1966, 2020, doi: doi.org/10.1042/BST20191091.
- [3] A. J. Wolfe, "Bacterial protein acetylation: new discoveries unanswered questions," *Curr. Genet.*, vol. 62, no. 2, pp. 335–341, 2016, doi: 10.1007/s00294-015-0552-4.
- [4] V. Bernal, S. Castaño-Cerezo, and M. Cánovas, "Acetate metabolism regulation in *Escherichia coli*: carbon overflow, pathogenicity, and beyond," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 100, no. 21, pp. 8985–9001, 2016, doi: 10.1007/s00253-016-7832-x.
- [5] A. A. Aristidou, K. Y. San, and G. N. Bennett, "Improvement of Biomass Yield and Recombinant Gene Expression in *Escherichia coli* by Using Fructose as the Primary Carbon Source," *Biotechnol. Prog.*, vol. 15, no. 1, pp. 140–145, Feb. 1999, doi: 10.1021/bp980115v.
- [6] C. H. Chou, G. N. Bennett, and K. Y. San, "Effect of Modulated Glucose Uptake on High-Level Recombinant Protein Production in a Dense *Escherichia coli* Culture," *Biotechnol. Prog.*, vol. 10, no. 6, pp. 644–647, Nov. 1994, doi: 10.1021/bp00030a009.
- [7] M. A. Eiteman and E. Altman, "Overcoming acetate in *Escherichia coli* recombinant protein fermentations," *Trends Biotechnol.*, vol. 24, no. 11, pp. 530–536, 2006, doi: 10.1016/j.tibtech.2006.09.001.
- [8] H. Waegeman, S. De Lausnay, J. Beauprez, J. Maertens, M. De Mey, and W. Soetaert, "Increasing recombinant protein production in *Escherichia coli* K12 through metabolic engineering," *N. Biotechnol.*, vol. 30, no. 2, pp. 255–261, 2013, doi: 10.1016/j.nbt.2011.11.008.
- [9] A. Negrete and J. Shiloach, "Constitutive expression of the sRNA GadY decreases acetate production and improves *E. coli* growth," *Microb. Cell Fact.*, vol. 14, no. 148, pp. 1–10, 2015, doi: 10.1186/s12934-015-0334-1.
- [10] C. R. R. Ramos, P. A. E. Abreu, A. L. T. O. Nascimento, and P. L. Ho, "A high-copy T7 *Escherichia coli* expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide," *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, vol. 37, no. 8, pp. 1103–1109, 2004, doi: 10.1590/S0100-879X2004000800001.
- [11] Z. Li, M. Nimtz, and U. Rinas, "The metabolic potential of *Escherichia coli* BL21 in defined and rich medium," *Microb. Cell Fact.*, vol. 13, no. 45, pp. 1–17, 2014.
- [12] J. Y. H. Kim and H. J. Cha, "Down-regulation of acetate pathway through antisense strategy in *Escherichia coli*: Improved foreign protein production," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 83, no. 7, pp. 841–853, 2003, doi: 10.1002/bit.10735.
- [13] T. S. Kim *et al.*, "Reduction of acetate and lactate contributed to enhancement of a recombinant protein production in *E. coli* BL21," *J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 25, no. 7, pp. 1093–1100, 2015, doi: 10.4014/jmb.1503.03023.

- [14] D. Kuczyńska-Wiśnik, M. Moruno-Algara, K. Stojowska-Swędryńska, and E. Laskowska, "The effect of protein acetylation on the formation and processing of inclusion bodies and endogenous protein aggregates in *Escherichia coli* cells," *Microb. Cell Fact.*, vol. 15, no. 189, pp. 1–10, 2016, doi: 10.1186/s12934-016-0590-8.
- [15] B. T. Weinert, S. Satpathy, B. K. Hansen, D. Lyon, L. J. Jensen, and C. Choudhary, "Accurate quantification of site-specific acetylation stoichiometry reveals the impact of Sirtuin deacetylase CobB on the *E. coli* acetylome," *Mol. Cell. Proteomics*, vol. 16, no. 5, pp. 759–769, 2017, doi: 10.1074/mcp.M117.067587.
- [16] M. L. Kuhn *et al.*, "Structural, kinetic and proteomic characterization of acetyl phosphate-dependent bacterial protein acetylation," *PLoS One*, vol. 9, no. 4, pp. 1–26, 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0094816.
- [17] B. Weinert *et al.*, "Acetyl-Phosphate is a critical determinant of Lysine Acetylation in *E. coli*," *Mol. Cell*, vol. 51, no. 2, pp. 265–272, 2013, doi: 10.1016/j.molcel.2013.06.003.
- [18] S. Castaño-Cerezo *et al.*, "Protein acetylation affects acetate metabolism, motility and acid stress response in *Escherichia coli*," *Mol. Syst. Biol.*, vol. 10, no. 762, pp. 1–15, 2014, doi: 10.15252/msb.20145227.
- [19] B. Schilling *et al.*, "Global lysine acetylation in *Escherichia coli* results from growth conditions that favor acetate fermentation," *J. Bacteriol.*, vol. 201, no. 9, pp. 1–9, 2019, doi: 10.1101/457929.
- [20] B. Schilling *et al.*, "Protein acetylation dynamics in response to carbon overflow in *Escherichia coli*," *Mol. Microbiol.*, vol. 98, no. 5, pp. 847–863, 2015, doi: 10.1111/mmi.13161.
- [21] S. Castaño-Cerezo, V. Bernal, T. Röhrig, S. Termeer, and M. Cánovas, "Regulation of acetate metabolism in *Escherichia coli* BL21 by protein Nε-lysine acetylation," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 99, no. 8, pp. 3533–3545, 2015, doi: 10.1007/s00253-014-6280-8.
- [22] F. W. Studier, P. Daegelen, R. E. Lenski, S. Maslov, and J. F. Kim, "Understanding the Differences between Genome Sequences of *Escherichia coli* B Strains REL606 and BL21(DE3) and Comparison of the *E. coli* B and K-12 Genomes," *J. Mol. Biol.*, vol. 394, no. 4, pp. 653–680, 2009, doi: 10.1016/j.jmb.2009.09.021.
- [23] K. Martínez-Gómez *et al.*, "New insights into *Escherichia coli* metabolism: carbon scavenging, acetate metabolism and carbon recycling responses during growth on glycerol," *Microb. Cell Fact.*, vol. 11, no. 46, pp. 1–21, 2012, doi: 10.1186/1475-2859-11-46.
- [24] G. Lozano Terol, J. Gallego-Jara, R. A. Sola Martínez, M. Cánovas Díaz, and T. De Diego Puente, "Engineering protein production by rationally choosing a carbon and nitrogen source using *E. coli* BL21 acetate metabolism knockout strains," *Microb. Cell Fact.*, vol. 18, no. 151, pp. 1–19, 2019, doi: 10.1186/s12934-019-1202-1.

