

CONSTRUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NUEVOS VECTORES DE EXPRESIÓN PARA *Actinobacillus succinogenes*

Angélica Vallejo Giraldo^a, Luz María Martínez Mejía^a, Noemí Flores^a, Rosa Isela Corona González^b
Guillermo Gosset Lagarda^a

^aDepartamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología, UNAM, Avenida Universidad 2001, Cuernavaca, Morelos 62210, México. gosset@ibt.unam.mx. ^bDepartamento de Ingeniería Química, CUCEI, Universidad de Guadalajara, Boulevard Marcelino García Barragán 1421, Guadalajara, Jalisco 44430, México. rosa.corona@academicos.udg.mx.

Palabras clave: *Actinobacillus succinogenes*, vector de expresión, malato deshidrogenasa.

Introducción. *Actinobacillus succinogenes* 130Z es una bacteria gram negativa anaerobia facultativa, capnófila (1). Este organismo está categorizado como uno de los mejores productores naturales de ácido succínico (AS) reportados hasta el momento. Sin embargo, el desarrollo de herramientas genéticas eficientes es limitado (2). Así que para la generación de herramientas genéticas en microorganismos no modelo como *A. succinogenes*, se requiere de la selección de elementos reguladores esenciales como promotores, RBS y terminadores, esto con el fin de elaborar circuitos genéticos más versátiles (3). Dado a esto, se planteó la generación de vectores de expresión con elementos nativos y exógenos a fin de caracterizarlos y así puedan utilizarse para otras aplicaciones de ingeniería metabólica en el futuro en este microorganismo.

Generar vectores de expresión para *A. succinogenes*.

Metodología. La construcción de los vectores pMCLactrc, pMCpmdh, pMCLactrcmdh y pMCmdh se llevó a cabo mediante el uso de la técnica de clonación circular por extensión de la polimerasa (CPEC) y clonación libre de restricción (RFC) (4). La obtención del extracto crudo y la determinación de actividad enzimática de la malato deshidrogenasa se realizó siguiendo la metodología propuesta en (5). La extracción de RNA, la obtención de cDNA y el análisis mediante RT-qPCR se llevó a cabo según lo indicado en (6).

Resultados. Se ha diseñado y construido los plásmidos (pMCLactrc, pMCpmdh, pMCLactrcmdh y pMCmdh), basados en el vector de amplio rango de hospedero pMC-Express, que pueden usarse en miembros de la familia *Pasteurellaceae*. Estos vectores pueden ser utilizados para la expresión de genes nativos como heterólogos en forma constitutiva (pMCpmdh) o regulada (pMCLactrc).

La fuerza de los diferentes promotores aquí evaluados (P_{trc} y P_{mdh}) fue determinada por la medida de la actividad de la enzima malato deshidrogenasa que es codificada por el gene *mdh*. En el caso del plásmido

pMCLactrcmdh, hemos demostrado que el gen *mdh*, bajo el control del promotor *trc* de *E. coli*, es funcional en *A. succinogenes* 130Z y que sobreexpresa cerca de 2 veces más actividad enzimática y que el alelo del represor *lacI^q* que porta el sistema de expresión regulada pMCLactrc no presenta fugas de expresión del gen de estudio y que bajo las condiciones evaluadas acorde con los resultados obtenidos por [2]. Y que el rango óptimo de inducción de este sistema regulador se encuentra entre 1 – 2 mM de IPTG. Para el plásmido pMCmdh se observó que sobreexpresa cerca de 4 veces más la actividad enzimática de *mdh*. Los datos obtenidos por RT-qPCR muestran un aumento significativo en los niveles de transcripción de *mdh* entre 22.87 ± 6.84 y 19.44 ± 2.05 veces en pMCLactrcmdh y pMCmdh respectivamente (**Fig. 1**).

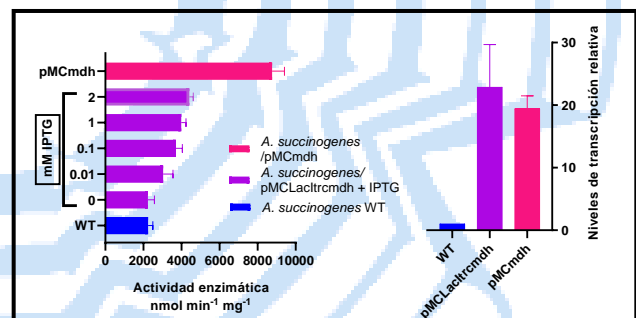


Fig. 1. Actividad enzimática y niveles de transcripción relativa de *mdh*.

Conclusiones. Los sistemas de expresión aquí construídos son funcionales en *A. succinogenes* y permiten la expresión tanto regulada como constitutiva de genes nativos.

Agradecimiento. Donativo PAPIIT-UNAM AG200322.

Bibliografía. (1) Dessie W., Xin F., Zhang W., Jiang Y., Wu H., Ma J., Jian M. (2018). *Appl Microbiol Biotechnol* 102, 9893–9910. (2) Long D, Immethun Ch, Vallecilla-Yepez L, Wilkins M, Saha R. (2021) *PLoS ONE* 16(5):1-17. (3) Zhao M., Yuan Z., Wu L., Zhou S., Deng Y. (2021). *ACS Synth. Biol.* 2022, 11, 92–102. (4) Quan, J., Tian, J. (2011). *Nat. Protoc.* 6, 242–251. (5) Van der Werf M., Guettler M. Jain M., Zeikus J. (1997). *Arch Microbiol* (1997) 167 : 332–342. (6) Rodríguez, A., Martínez, J.A., Báez-Viveros, J.L. Flores N., Hernández-Chávez G., Ramírez O., Gosset G., Bolívar F. (2013). *Microb Cell Fact* 12, 86: 1-17.