

Revisión de los factores sigma en *Escherichia coli* y su potencial como dianas para el mejoramiento de producción de proteínas recombinantes

Diego Alonso Echánove-Cuevas y Guillermo Gosset-Lagarda*

Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Morelos, Cuernavaca, México CP: 62210

guillermo.gosset@ibt.unam.mx

Abstract

A potentially useful strategy for the development of recombinant protein production strains is the modification of global transcription factors of the host, which allows the alteration of the expression of several genes with the modification of only a few regulatory genes. However, the present scientific literature does not include an in-depth review that explores the potential of applying these strategies in *Escherichia coli*'s sigma factors. In the project described in this paper, a bibliographical review was performed on the different phenotypes that arise when sigma factors are altered in structure or expression in *E. coli*, and their potential for strain development for recombinant protein production. The method consisted of the use of the *Scopus* search tool to make individual searches of each of the sigma factors. Each search contained at least the variables of the name of *E. coli*, the sigma factor, the type of modification on the factor, and, optionally, the phenotype that was obtained or sought after. The results and discussion analyze the explored and yet-to-explore potential of each sigma factor and some areas of opportunity for future research. The use of the gathered information, in conjunction with metabolic engineering, gene editing, and synthetic biology could provide us with the ability to understand and influence the complex metabolic space, its relationship with the transcriptome, and the production of recombinant proteins in *E. coli* and other bacteria.

Keywords: *Sigma factors, E. coli, Recombinant protein production*

Resumen

Una estrategia potencialmente útil para la generación de cepas para producción de proteína recombinante consiste en modificar los factores de transcripción globales del hospedero, lo que permite alterar la expresión de muchos genes, modificando solo algunos reguladores. Sin embargo, en la bibliografía científica actual no existe una revisión que explore a profundidad el potencial de aplicar estas estrategias en los factores sigma de *Escherichia coli*. En el presente trabajo se elaboró una revisión bibliográfica de los fenotipos que surgen de los cambios de estructura o expresión de los factores sigma en *E. coli* y el potencial que representan para el mejoramiento de cepas para producción de proteína recombinante. El método de revisión consistió en el uso de la herramienta “+” realizando búsquedas individuales para cada uno de sus factores sigma. Cada búsqueda contenía como mínimo las variantes del nombre de *E. coli*, el factor sigma, el tipo de modificación al factor y, opcionalmente, el fenotipo que se busca. En los resultados y discusión se explora el potencial explorado y no explorado de cada factor sigma y algunas áreas de oportunidad para futuras investigaciones. La utilización de la información analizada, junto con herramientas de control metabólico, biología sintética y de ingeniería genética, podrían brindarnos la capacidad de entender e influenciar de nuevas formas el complejo espacio metabólico, su relación con el transcriptoma y la producción de proteínas recombinantes tanto en *E. coli* como en otras bacterias.

Palabras clave: *Factores sigma, E. coli, Producción de proteína recombinante*

Introducción

La producción de Proteína Recombinante (PR) es una tecnología ampliamente practicada para el desarrollo de las ciencias biológica y biomédica, así como en la industria química, biotecnológica y farmacéutica. En la gran mayoría de los casos, las PR son producidas cultivando organismos bien estudiados bajo condiciones controladas, lo que facilita la homogeneidad de los compuestos producidos y la optimización de los procesos. De todos los hospederos usados a través de la historia para la producción de PR, el más estudiado y frecuentemente seleccionado es la bacteria *Escherichia coli* (Rosano & Ceccarelli, 2014). Aunque es cierto que *E. coli* es muy útil para la producción de PR, la adecuada selección de hospedero es solo una de las estrategias disponibles para optimizar el proceso. Para esto existen diversas estrategias como lo son utilizar sistemas de expresión inducibles, manipulando las condiciones del cultivo, fusionar proteínas para mejorar su solubilidad realizando coexpresión con otras proteínas, el uso de diversos vectores de expresión, mejorar la regeneración de cofactores y muchas otras (Duzenli & Okay, 2020; Gopal & Kumar, 2013; Mahalik et al., 2014).

Un número importante de las estrategias disponibles para optimizar la producción de proteína recombinante requieren de la modificación, introducción o inactivación de genes específicos cuyos productos tienen un efecto directo o indirecto en el crecimiento del organismo, la síntesis de la proteína, su estabilidad o la facilidad con que pueda ser purificada. Utilizar este acercamiento para optimizar la producción de proteína puede ser muy útil, pero tiene la gran limitante de que las modificaciones normalmente se deben realizar de forma individual y secuencial, por lo que se vuelve un proceso tardado y complejo (Alper & Stephanopoulos, 2007; Mahalik et al., 2014). Por lo tanto, una metodología que permita realizar modificaciones en la expresión de múltiples genes de forma simultánea tiene el potencial de optimizar eficientemente, y en poco tiempo, el fenotipo de las cepas en cuestión. Esto se puede lograr a través de la modificación de los factores de transcripción.

Las técnicas de modificación de factores de transcripción buscan generar fenotipos complejos alterando la transcripción a nivel genómico. Es decir, se aprovecha la maquinaria intrínseca de las células para controlar un gran número de genes al mismo tiempo o en respuesta a un mismo estímulo (los factores globales de transcripción) y los modifica para permitir grandes cambios en la transcripción con la mínima inversión de tiempo. Esto puede implicar diversas modificaciones como mutaciones puntuales, delecciones completas o métodos más complejos que involucren una serie de procesos de selección como lo es la ingeniería de maquinaria global de transcripción, o gTME por sus siglas en inglés (Alper & Stephanopoulos, 2007). Los factores de transcripción que son de especial interés para este tipo de estrategias son los factores sigma.

Los factores sigma son subunidades disociables de la ARN polimerasa (ARNP) en bacterias. Esta subunidad multidominio permite reconocer los promotores en el ADN y que se dé la unión de alta afinidad entre la holoenzima ARNP y su sitio específico en el ADN. Así mismo, juega un papel esencial en la iniciación de la transcripción (Paget, 2015). Los factores sigma funcionan como factores de transcripción generales que establecen uno de los primeros niveles de regulación global de la transcripción en bacterias, teniendo en conjunto miles de regiones de unión en el ADN (Cho et al., 2014; Tripathi et al., 2014; Davis et al., 2017). Estructuralmente las subunidades sigma se pueden clasificar en dos familias, la familia σ^{70} y la familia σ^{54} , basándose en su homología con las correspondientes subunidades sigma de *E. coli*, las cuales son estructuralmente distintas entre ellas, pero su funcionamiento es esencialmente el mismo (Paget, 2015).

En *E. coli* se han descrito 7 factores sigma: σ^{70} (*rpoD*), σ^{54} (*rpoN*), σ^{38} (*rpoS*), σ^{32} (*rpoH*), σ^{28} (*fliA*), σ^{24} (*rpoE*), y σ^{19} (*fecI*), siendo *rpoD* el factor sigma principal o de "housekeeping" y el resto, factores sigma alternativos (Cho et al., 2014; Treviño-Quintanilla et al., 2013). Debido a la importancia de cada factor sigma en la regulación de distintos genes enfocados a una variedad de procesos celulares, éstos han sido estudiados de diversas formas para

entender su función celular, las interacciones entre los factores sigma y los cambios fenotípicos que pueden ocurrir cuando se realizan modificaciones en dichos factores. Sin embargo, la gran cantidad de estudios dificulta entender las implicaciones de modificar cada factor de transcripción, por lo que una revisión concisa de esta información sería útil si se planea utilizar estrategias que modifiquen dichos genes con el objetivo de generar cepas de producción de PR. En este trabajo, se busca explorar bibliográficamente las alteraciones fenotípicas que surgen al modificar la secuencia, los niveles de expresión o eliminar los factores sigma de *E. coli*, así como su utilidad para la producción de proteína recombinante.

Materiales y metodos

Revisión bibliográfica y análisis de información

Para la búsqueda de fuentes bibliográficas se utilizó la herramienta de búsqueda y base de datos de artículos científicos llamada Scopus (<https://www.scopus.com/>) en idioma inglés. El método de búsqueda consistió en usar combinaciones de filtros basados en la presencia de ciertas palabras en el título, resumen o palabras clave de los artículos. Dentro de los filtros, las palabras fueron unidas con el operador booleano OR y en búsquedas con más de un filtro, los filtros fueron unidos con el operador booleano AND u OR según fuera el caso. Las palabras dentro de un filtro se unieron con un operador booleano OR porque son palabras equivalentes para el objetivo que se busca, un ejemplo de esto es filtrar para obtener resultados referentes al factor sigma rpoD, cuyo filtro debe incluir todas las variaciones en que se puede nombrar a rpoD evitando que se pierdan documentos que lo nombren de una u otra forma.

Los filtros fueron diseñados de forma jerárquica para poder estructurar las búsquedas de forma sencilla. Esta jerarquía se manejó en 4 niveles: el filtro raíz, los troncales, los rama y, por último, los filtros terminales. El filtro raíz es utilizado en todas las búsquedas y delimita los resultados a aquellos asociados a *Escherichia coli*. Los filtros troncales delimitan a un determinado

factor sigma, es decir, que existe un filtro específico por cada factor sigma. Los filtros rama delimitan el tipo de modificación en el gen que se investigó en cada estudio, como delecciones del gen, mutaciones en la secuencia o cambios en expresión y por último la aplicación de ingeniería de factores globales de transcripción. Finalmente se tienen los filtros terminales, los cuales especifican el fenotipo que se ve afectado por los cambios en los factores sigma, siendo en total 6 filtros referentes a resistencia a estrés, tasa de crecimiento, asimilación de nitrógeno, uso de fuentes de carbono, respuesta a presión osmótica y producción de metabolitos y proteínas. La escritura detallada de cada filtro se puede observar a continuación:

- **Filtro raíz:** (TITLE-ABS-KEY ("E. coli" OR "Escherichia coli"))
- **Filtros troncales:**
 - o RpoD: (TITLE-ABS-KEY ("rpoD" OR "σ70" OR "sigma 70" OR "σD"))
 - o RpoN: (TITLE-ABS-KEY ("rpoN" OR "σ54" OR "sigma 54" OR "σN"))
 - o RpoS: (TITLE-ABS-KEY ("rpoS" OR "σ38" OR "sigma 38" OR "σS"))
 - o RpoH: (TITLE-ABS-KEY ("rpoH" OR "σ32" OR "sigma 32" OR "σH"))
 - o FliA: (TITLE-ABS-KEY ("fliA" OR "σ28" OR "sigma 28" OR "σF"))
 - o RpoE: (TITLE-ABS-KEY ("rpoE" OR "σ24" OR "sigma 24" OR "σE"))
 - o Fecl: (TITLE-ABS-KEY ("fecl" OR "σ19" OR "sigma 19" OR "σfecl"))
- **Filtros rama:**
 - o Rama A: TITLE-ABS-KEY ("deletion" OR "deficient" OR "absent" OR "defective")
 - o Rama B: TITLE-ABS-KEY ("mutant" OR "mutation" OR "overexpression" OR "underexpression")
 - o Rama C: TITLE-ABS-KEY ("gTME" OR "Global transcription machinery engineering")
- **Filtros terminales:**
 - o T1: TITLE-ABS-KEY ("Resistance" OR "Tolerance" OR "Resistant" OR "Tolerant")
 - o T2: TITLE-ABS-KEY ("growth" OR "growth rate")
 - o T3: TITLE-ABS-KEY ("nitrogen source" OR "n source" OR "Nitrogen")
 - o T4: TITLE-ABS-KEY ("Carbon source" OR

“C source” OR “acetate” OR “Carbon”)o T5:
TITLE-ABS-KEY (“high concentration” OR
“osmotic pressure” OR “high osmolarity” OR
“high NaCl” OR “high glucose”)
o T6: TITLE-ABS-KEY (“Protein production”
OR “metabolite production” OR “polymer
production” OR “antibody production”)

Por lo tanto, un ejemplo de una búsqueda con filtro terminal 2 de la rama A del factor sigma RpoD sería:

TITLE-ABS-KEY (“rpoD” OR “ σ^{70} ” OR “sigma 70” OR “ σ^D ”) AND TITLE-ABS-KEY (“E. coli” OR “Escherichia coli”) AND TITLE-ABS-KEY (“deletion” OR “deficient” OR “absent” OR “defective”) AND TITLE-ABS-KEY (“growth” OR “growth rate”).

En un sondeo inicial, se realizó una búsqueda uniendo todos los filtros troncales con el operador OR y uniendo el filtro raíz con el operador AND. Esta búsqueda mostró todos los documentos en la biblioteca que mencionan a *Escherichia coli* y a alguno de sus 7 factores sigma. Posterior a esto se realizaron las búsquedas jerárquicas por cada factor sigma. En estas búsquedas todos los filtros se unen entre ellos utilizando el operador AND. Primero se inicia con el filtro raíz y el filtro troncal del factor sigma de interés. Después, se agrega de forma separada cada uno de los filtros rama. Si los resultados de alguna de las búsquedas con el filtro rama supera los 100 documentos, se agrega de forma separada cada filtro terminal. En el caso de que la búsqueda con filtro rama y terminal supere los 100 documentos, se restringirá la búsqueda a los 100 documentos de publicación más recientes.

A partir de los documentos seleccionados, se realizó una lectura rápida del resumen para eliminar cualquier documento que no fuera pertinente al tema. Estos documentos no pertinentes surgen a raíz del uso de operadores OR en las búsquedas. Estos operadores permiten dar una cierta laxitud al algoritmo que evita que no se consideren artículos por no seguir estrictamente todos los parámetros, pero a su vez provoca que se agreguen artículos no pertinentes que sí mencionan alguna de las palabras seleccionadas para los filtros, pero no se adentran al tema que concierne a este trabajo.

Finalmente, cuando surgieron dudas específicas acerca de las funciones asociadas a cada factor sigma o cuestiones sobre la esencialidad de los genes, se realizaron búsquedas de forma directa al tema utilizando las herramientas de Google Scholar (<https://scholar.google.com/>) o *Scopus*.

Resultados

Al realizar una búsqueda general que incluye el filtro raíz y todos los filtros troncales de cada factor sigma en *E. coli* unidas con el operador OR, se encuentran 3,902 documentos. Esto representa el acervo completo de donde se obtendrá la bibliografía para este trabajo. En la **Tabla 1** se muestran el número de documentos para cada búsqueda troncal y rama. A continuación, se detallará la información más importante obtenida para cada factor sigma.

Factor σ^{70} (*rpoD*)

La proteína σ^{70} o RpoD es el principal factor sigma de *E. coli* y es responsable de la transcripción de la mayoría de los genes que son expresados cuando esta bacteria crece en fase exponencial (Shimada et al., 2014). En un estudio realizado por Cho *et al.* en 2014 se identificaron experimentalmente 1,643 sitios de unión por parte de RpoD en el ADN y se tienen registradas 1,130 unidades de transcripción dentro de su regulón en *E. coli*, convirtiéndolo en el factor sigma que controla la expresión del mayor número de genes en dicha bacteria (Keseler et al., 2021). El gen que codifica a este factor de transcripción ha sido identificado como esencial en medio complejo (LB) y medio mínimo, probablemente esto no se deba a que RpoD realice de forma directa alguna acción metabólica o estructural necesaria para la viabilidad celular, sino a que es un factor que permite la expresión de algunos genes esenciales que sí tiene estas actividades directas, por lo cual resulta imposible generar una cepa sin el gen *rpoD* (Cho et al., 2014; Goodall et al., 2018).

Aun siendo esencial, se han podido estudiar las características de cepas con diversos tipos de mutaciones en el gen *rpoD*, como es el caso de fenotipos de resistencia a diferentes tipos de estrés, afectaciones en el crecimiento de la

bacteria y mejoras en los parámetros de producción de algunos metabolitos y proteínas. En la literatura consultada, diferentes grupos han podido generar cepas de *E. coli* cuyos genotipos con sustituciones y deleciones de aminoácidos en RpoD dan lugar a fenotipos de resistencia a pH ácidos de 3.17 y 4.6 (Gao et al., 2016; Harden et al., 2015); aumento de tolerancia a kanamicina de hasta una concentración 4 veces mayor que el control (El Houry et al., 2019; Mogre et al., 2017); capacidad de sobrevivir a presiones hidrostáticas altas de hasta 800 MPa (Gayán et al., 2020), y resistencia a diferentes disolventes o compuestos orgánicos (etanol, butanol, ciclohexano y SDS) con cepas sobreviviendo y creciendo a concentraciones mayores al doble del máximo tolerable para las cepas control (Alper & Stephanopoulos, 2007; Si et al., 2016; Zhang et al., 2015).

No todos los cambios en RpoD conllevan fenotipos útiles. Una sustitución única de aminoácidos puede lograr reprimir genes asociados a la biosíntesis de nucleótidos y trehalosa, utilización de aminoácidos y metabolismo de carbono. La disminución de la expresión de *rpoD* puede provocar un fenotipo similar al de la respuesta estricta y, como ya fue mencionado, su deleción total inhibe su sobrevivencia por completo (Gao et al., 2016; Magnusson et al., 2003; Pletnev et al., 2020; Singh et al., 2011). Aún con estos ejemplos, algunos estudios han logrado mejorar la tasa de crecimiento de cepas con impedimentos en el crecimiento (específicamente cepas de genoma reducido y en ausencia del sistema de fosfotransferasa) al expresar factores RpoD con sustituciones de ciertos

aminoácidos (Aguilar et al., 2012; Choe et al., 2019).

En cuanto a fenotipos de producción, la mayoría de los casos relevantes en la literatura científica utilizaron métodos de gTME. Se han obtenido mejoras en la producción de licopeno, de ácido hialurónico y L-tirosina con aumentos del título de 7%, 34% y 14%, respectivamente. En el caso del licopeno, el estudio no describe la mutante, pero en los otros dos casos, ambos fueron productos de factores RpoD truncados, con solo los dominios estructurales 3 y 4 (Alper & Stephanopoulos, 2007; Santos et al., 2012; Yu et al., 2008).

En el caso específico de producción de PR, se han realizado dos estudios de gTME donde se han generado mutantes de *rpoD* con mejoras en la producción de proteína. Por un lado, se aumentó 400% el rendimiento de la producción del receptor de neurotensina 1 de ratas (NTR1) que en la cepa silvestre. Dicho factor sigma contenía únicamente la sustitución de un aminoácido (Tomatis et al., 2019). En el otro estudio, se aumentó la producción de anticuerpos IgG hasta un título de 130 mg/L (el más alto reportado para dichos anticuerpos en *E. coli*) en una mutante con sustituciones de aminoácidos y regiones truncadas de RpoD (McKenna et al., 2019). De la revisión realizada, fue evidente que se pueden obtener cepas con fenotipos útiles a través de modificaciones en secuencia o expresión del factor sigma. Pero en la bibliografía disponible, ninguna de las modificaciones mejoró el crecimiento o la utilización de nutrientes en condiciones sin estrés previo.

Tabla 1: Documentos encontrados en las búsquedas iniciales para cada factor sigma de *E. coli*.

Factor sigma	Filtro troncal	Rama A	Rama B	Rama C
FecI	58	10	28	0
RpoE	337	77	169	0
FliA	227	29	113	0
RpoH	585	125	308	0
RpoS	1,462	382	816	0
RpoN	534	108	222	0
RpoD	1,393	233	516	5

Para fenotipos de resistencia a estrés o de producción de metabolitos o proteína recombinante, en cambio, se encontraron diversos ejemplos de cepas con *rpoD* mutado. De manera interesante, no parece existir una región alterada en común y se han encontrado ejemplos con sustituciones de aminoácidos individuales y múltiples, así como delección de pocos residuos o de regiones enteras. Cabe resaltar que la alteración que se repitió en más de una ocasión fue tener a RpoD truncado con solo las regiones 3 y 4 conservadas, aunque en ninguna investigación se ha encontrado una explicación mecanística que explique por qué esta modificación estructural provoca el fenotipo resultante.

Factor σ^{54} (*rpoN*)

RpoN de *E. coli* es considerada la proteína arquetipo de la familia σ^{54} y es estructural y funcionalmente diferente al resto de los factores sigma de la familia σ^{70} . Entre las diferencias se puede encontrar que RpoN necesita la acción de proteínas activadoras para poder iniciar la transcripción (Merrick, 1993; Bonocora et al., 2015). Se han identificado a través de análisis ChIP-chip, 180 sitios de unión a ADN en *E. coli* por parte de RpoN, aunque hay estimaciones por medio de análisis ChIP-seq que sugieren que podrían existir más de 250 sitios de unión y los datos en Ecocyc detallan que contiene 55 unidades de transcripción en su regulón (Keseler et al., 2021).

El gen *rpoN* no es esencial y se han observado distintos fenotipos interesantes en cepas de *E. coli* con delección, sobreexpresión o mutaciones en este factor sigma. Se han obtenido cepas capaces de resistir hasta 2 horas de exposición a pH = 2, obteniendo cultivos de 9.56×10^3 cfu/mL en cepas con delección total de *rpoN* comparado con 10 cfu/mL en el control. Cabe resaltar que esta resistencia fue observada en la fase exponencial del crecimiento, pero no en fase estacionaria (Mitra et al., 2012, 2014; Riordan et al., 2010). También hay ejemplos de resistencia a valores de pH alcalinos (10), pero no ha sido estudiado a fondo (Hamdallah et al., 2018). A su vez, se han obtenido cepas resistentes a novobiocina (por inactivación con transposones) y al bromuro de cetiltrimetilamonio por delección de 4 aminoácidos en RpoN (Milija et al., 1999; Nakata et al., 2010).

Se ha observado que la delección total de *rpoN* puede tener impacto sobre la tasa de crecimiento y la utilización de recursos como fuente de carbono y nitrógeno.

Entre estos efectos encontramos la relación del factor con el sistema de fosfotransferasa y las condiciones limitantes de carbono y nitrógeno (Kumar & Shimizu, 2010; Löffler et al., 2017; B. S. Powell et al., 1995); disminución de la velocidad de crecimiento en medio mínimo (García, 2020); auxotrofia para glutamina e incapacidad de procesar acetato (Milija et al., 1999; Nakata et al., 2010; Reitzer & Schneider, 2001); efectos negativos en la motilidad y un aumento en la capacidad de formación de biopelículas (Belik et al., 2008; Dong et al., 2011; Zhao et al., 2010). Es interesante señalar que los resultados de García en 2020 resultan contradictorios a los de otros autores, pues García reporta que la mutante con delección en *rpoN* mostró una disminución de la tasa de crecimiento, contrario a una ausencia total que se reporta debido a la auxotrofia para glutamina.

En cuanto a aspectos de producción de metabolitos, *rpoN* no ha sido explorado con la misma profundidad que *rpoD* para mejorar o generar cepas de producción. Sin embargo, existen 3 ejemplos de cepas con mejoras en producción a través de modificaciones en la actividad de *rpoN*. Un caso es el aumento de producción de un copolímero de lactato y 3-hidroxibutirato (P(LA-co-3HB)) a través de la delección total del factor (Kadoya et al., 2015); la expresión de sintasas de policétido a través de la sobreexpresión del factor (Stevens et al., 2013); y por último un aumento de 900% de la tasa de producción de hidrógeno por la sustitución de aminoácidos en un activador de RpoN (Sanchez-Torres et al., 2009).

En toda la bibliografía analizada para RpoN, la mayoría de los fenotipos útiles encontrados surgen a partir de delecciones totales del gen, lo cual no se observa en *rpoD* porque es esencial. Así mismo, no se han encontrado fenotipos asociados a la modificación de expresión o delección de *rpoN* con un aumento en la producción de proteína recombinante. Esto no significa que no sea viable, pues abre la posibilidad de utilizar otros mecanismos para obtener mutantes de *rpoN* y explorar su utilidad para la producción de PR.

Factor σ^{38} (*rpoS*)

RpoS es el principal factor sigma involucrado en la expresión genética durante la fase estacionaria y la respuesta general a condiciones de estrés en *E. coli* (Battesti et al., 2011, 2015). Este factor de transcripción tiene el mayor número de sitios de unión de todos los factores sigma de *E. coli*, sin contar a RpoD, con 903 sitios de unión y 228 unidades de transcripción registradas en Ecocyc. La función de RpoS es la expresión de genes para la respuesta a distintos tipos de estrés, entre ellos podemos encontrar hiperosmolaridad, estrés oxidativo, bajas o altas temperaturas, inanición, disminuciones de pH y parece tener un papel en aspectos de virulencia en cepas patógenas (Weber et al., 2005; Mata et al., 2017; Guo et al., 2019). Este gen no es considerado esencial por lo que se han generado cepas que carecen de él o este se encuentra mutado (Dong & Schellhorn, 2009; Goodall et al., 2018).

Como es de esperarse dado su papel en la expresión de genes asociados a estrés, se ha observado que se pueden obtener cepas resistentes a distintos tipos de estrés al alterar la secuencia y expresión de este factor sigma. La sobreexpresión de RpoS ha conferido resistencia a condiciones ácidas debajo de pH 4 causadas por una diversidad de ácidos, y se ha observado que también aumenta la sobrevivencia a desafíos de pH 2 (Bak et al., 2014; Gaida et al., 2013; Jin et al., 2009; Run & Tian, 2018). Aunado a esto, la sobreexpresión también puede generar resistencia a n-butanol (1% v/v), presión hidrostática alta (800 MPa), estrés oxidativo por H₂O₂, altas temperaturas (54 °C), alta concentración de NaCl (2.5 M) y estrés múltiple (Appukuttan et al., 2016; Gayán et al., 2020; Xu et al., 2021). De manera contraria, un estudio encontró que la expresión reducida del factor sigma aumenta la resistencia a un pH alcalino de 9 (Hamdallah et al., 2018). Inserciones a través de transposón también han generado cepas con alteraciones en la secuencia de *rpoS* de *E. coli* con una resistencia a la inanición de hasta 9 días de cultivo (Conter et al., 2001). Por otro lado, la delección total del gen tiene efectos negativos en la resistencia a antibióticos y a la presión osmótica alta (Cebrián et al., 2015; Padgen et al., 2020; Stasic et al., 2012; Tkachenko et al., 2017).

Con respecto cepas con eliminación del gen *rpoS* o su funcionalidad, han mostrado diferentes fenotipos, entre ellos: tasa de crecimiento específico máximo y afinidad a la glucosa igual o mayor en condiciones limitantes de carbono con respecto a la silvestre tanto en medios complejos (LB) como mínimos minerales (Franchini et al., 2015); en condiciones sin limitaciones de carbono, una caída en la densidad óptica de los cultivos en medio LB y medio mineral (M9) (García, 2020); una disminución significativa de unidades formadoras de colonia en medios carentes de nitrógeno para mutantes con *rpoS* inactivado (Kabir et al., 2004); en la cepa JWK2711 se redujo el tiempo para llegar a la fase estacionaria, disminuyó el crecimiento máximo e inhabilitó la utilización de acetato. Contradictoriamente, se ha reportado que la delección de *rpoS* en la cepa JW5437 alivia el efecto de sobre flujo metabólico y suprime la acumulación de acetato en condiciones de alta concentración de glucosa (Rahman et al., 2006; Suryadarma et al., 2012). Otros efectos encontrados han sido la mejora de biosíntesis de aminoácidos proteínogénicos a través de carbono derivado de metanol en cepas con sobreexpresión de *rpoS* (Bennett et al., 2020).

La delección total de *rpoS* tiene efectos positivos en la producción de ciertos metabolitos como el 1-propanol, del polímero P(LA-co-3HB) y triptófano (Ding et al., 2021; Jun Choi et al., 2012; Kadoya & Kodama, 2015). En cuanto a la producción de proteínas, se han encontrado cambios (tanto en el aumento como disminución) en la expresión de *rpoS* en cepas con mejoras en la PPR S (Landberg et al., 2020; Weikert et al., 2000). Por otro lado, la utilización de segmentos 5' del promotor de *rpoS* o induciendo la expresión de RpoS en fase exponencial puede aumentar la expresión de proteína recombinante (Kang et al., 2008; Mulyanti et al., 2021) pero, únicamente se reporta un caso donde se explora específicamente la modificación de *rpoS* a través de su inactivación por inserción del transposón 10 para la producción de proteína recombinante (específicamente beta galactosidasa) y se logró un aumento del cuádruple de la actividad volumétrica de la enzima recombinante con respecto a la silvestre (Chou et al., 1996).

Algo que resalta de este factor sigma es la gran cantidad de fenotipos que se han encontrado para los 3 parámetros buscados (resistencias, crecimiento y producción) y que gran parte de ellos surgen por cambios en la expresión, ya sea un aumento, disminución o completa carencia. Aunque es claro debido a su papel en la respuesta a estrés, estos resultados muestran que alterar la expresión de *rpoS* tiene un buen potencial de generar cepas con fenotipos interesantes, y que la alteración de su estructura no ha sido estudiada a fondo, lo cual posibilita interesantes.

Factor σ^{32} (*rpoH*)

RpoH es el factor sigma encargado de regular los genes de respuesta a choque térmico por señales citoplasmáticas (a diferencia de RpoE). Entre los genes que se encuentran en su regulón con 99 unidades de transcripción (el cual incluye 312 sitios de unión a ADN en *E. coli*) se han identificado distintas proteínas chaperonas y proteasas (Solís, 2001; Narberhaus & Balsiger, 2003; Nonaka et al., 2006; Cho et al., 2014; Keseler et al., 2021).

Los niveles intracelulares de este factor de transcripción se mantienen muy bajos durante el crecimiento a 30° C y aumentan al incrementarse la temperatura a 42 °C, este factor sigma se acumula en grandes cantidades para dirigir la ARN polimerasa a los promotores de genes de choque térmico.

En su mayoría, las mutaciones de *rpoH* parecen tener efectos deletéreos en el crecimiento o aumentan la sensibilidad a distintos tipos de estrés. Solo en 2 estudios se sugiere que su sobreexpresión puede generar resistencia a presión hidrostática y choque térmico (Gayán et al., 2016, 2020). Distintos estudios sobre genes esenciales (como los realizados para la biblioteca Keio, PEC o TraDIS) muestran que *rpoH* es un gen esencial (Goodall et al., 2018). Sin embargo, en la determinación de la esencialidad de los genes en cada biblioteca se utilizan ciertas condiciones de crecimiento de las cepas mutantes como una temperatura de 37 °C. En el caso de *rpoH*, se ha observado que una célula de *E. coli* sí puede ser viable con una delección en este gen si ésta crece en temperaturas iguales o menores a 20 °C o con mutaciones de supresión de la letalidad (Zhou et al., 1988).

En algunos estudios se sugiere que mutantes con delección total en *rpoH* sí pueden crecer a temperaturas mayores a 20 °C (Díaz-Acosta et al., 2006; Rowbury & Goodson, 1993), pero sería importante evaluar si las cepas utilizadas no tuvieran alguna de estas mutaciones supresoras de esencialidad.

La delección de *rpoH* genera cepas con crecimiento más lento y con una temperatura mínima de crecimiento de 10 °C, son sensibles a choque térmico y a estrés oxidativo, pero solo durante fase exponencial (Díaz-Acosta et al., 2006). Además de lo mencionado, se ha descrito que cepas donde se altera la secuencia de *rpoH* son hipersensibles a la presencia de antibióticos, luz UV, etanol, metales pesados, pH ácido, y estrés oxidativo (Zhou et al., 1988; Solís, 2001; Rowbury & Goodson, 1993; Kogoma & Yura, 1992; J. K. Powell & Young, 1991; LaRossa et al., 1995).

Existen pocos estudios donde se encontraron mejoras en la producción a través de cambios en la actividad o estructura de este factor sigma. En uno, se aumentó el título del policétido 6-deoxi-eritronolida B a través de la sobreexpresión de *rpoH* (Yang et al., 2015). Así mismo, se logró suprimir la proteólisis de una proteína de fusión heteróloga con la mutación sin sentido *rpoH165* (Goldberg et al., 1989). Finalmente, la producción de 5 proteínas heterólogas distintas fue mejorada hasta 8 veces la concentración de la silvestre a través de la mutación de sustitución del aminoácido Arg-268-Cys denominada *rpoH358* (Obukowicz et al., 1992). Cabe mencionar que estos estudios sobre producción de PR tienen más de 25 años de ser publicados y no parecen existir nuevas publicaciones en el tema. En contraste con los factores ya revisados, los fenotipos útiles encontrados para cambios en estructura y expresión de *rpoH* son pocos (5) y dos de ellos fueron hallazgos al estudiar cepas mutantes, y no estudios donde se exploraba la modificación de *rpoH*. Aunque es poca la evidencia, existen indicios de que se pueden obtener efectos positivos si se altera la expresión o secuencia del factor y éstas se centran en aspectos de resistencia a estrés y producción de metabolitos o proteínas, pero su delección total parece provocar un fenotipo muy frágil.

Factor σ^{28} (*fliA*)

FliA es conocido como el factor sigma de quimiotaxis y síntesis de flagelo (Kundu et al., 1997; Shimada et al., 2017). Se han identificado 51 sitios de unión al ADN en el genoma de *E. coli* con 34 unidades de transcripción registradas en Ecocyc, además que el factor controla la transcripción de 6 operones de clase 3 para la síntesis de flagelo (entre ellos está el gen de las subunidades de flagelina), componentes del motor, y factores reguladores de la quimiotaxis (Cho et al., 2014; Fitzgerald et al., 2014; Keseler et al., 2021). Este gen no es esencial y se han observado distintas características en cepas con ausencia del gen *fliA* como lo es la carencia de flagelo, la falta de síntesis de pili tipo 1, la incapacidad de formación de biopelículas y una falta de motilidad (Wood et al., 2006; Claret et al., 2007; Zhao et al., 2007). Los cambios de fenotipo en las cepas con cambios en expresión y secuencia en *fliA* han sido menos explorados que en los otros factores sigma ya mencionados, y en su mayoría estos estudios son específicamente sobre aspectos de motilidad. Sin embargo, estos cambios de motilidad pueden ser positivos, pues una sustitución de aminoácido en FliA (R220W) puede provocar una plasticidad notoria para aumentar la velocidad de nado y la tasa de crecimiento del cultivo (Yi & Dean, 2016). Además de esto, se ha observado que la delección de *fliA* confiere ventajas en el crecimiento de *E. coli* y disminuye la muerte celular basal sin presencia de estrés exógeno. Esto parece solo ocurrir en medios líquidos con agitación, y esta ventaja se elimina o revierte en medios sólidos, semisólidos o donde la movilidad representa una ventaja (Fontaine et al., 2007). En temas de producción, se ha reportado únicamente que la cepa CWML2 derivada de MG1655 (la cual presenta características favorables para la producción de proteína recombinante, como lo es una tasa de crecimiento específica mayor, incrementos en los rendimientos de biomasa y mayor resistencia a distintos tipos de estrés) muestra un aumento en la expresión de *fliA* comparada con la cepa silvestre, lo que le confiere cambios favorables en la motilidad (Weikert et al., 2000). Para el caso de este factor sigma, no se encontró ningún fenotipo asociado a la resistencia a algún tipo de estrés y los fenotipos útiles para producción de PR encontrados a partir de la modificación en la expresión o secuencia de este gen han sido limitados.

En todo caso, parece ser que su potencial es mayor si se buscan características que modifiquen motilidad, crecimiento y formación de biopelículas.

Factor σ^{24} (*rpoE*)

RpoE es uno de los factores sigma de función extracitoplasmática, es decir, que se encuentra en el citoplasma unido a la membrana interna acoplado a un sistema transmembranal que responde a estímulos del ambiente. Los productos de los genes controlados por RpoE se requieren para el correcto plegamiento de proteínas de membrana externa, biosíntesis de fosfolípidos y lipopolisacáridos, transducción de señales, y la expresión de proteínas de membrana interna y externa (Solís, 2001; Egler et al., 2005; Hayden & Ades, 2008). Se han identificado 65 regiones promotoras para RpoE y 82 unidades de transcripción en su regulón (Cho et al., 2014; Keseler et al., 2021). RpoE es considerado como esencial en colecciones de mutantes como Keio o en el programa TraDIS debido a que al eliminar este gen cesa la transcripción de genes esenciales para el crecimiento celular y estabilidad de la membrana. Sin embargo, se han observado mutaciones que suprimen la esencialidad del gen *rpoE* como lo es la sobreexpresión de *ptsN* y *yhbW*, los cuales codifican para una proteína reguladora de la actividad y/o expresión de transportadores de potasio en el sistema PTS y una monooxigenasa sin función definida, respectivamente (Hayden & Ades, 2008; Goodall et al., 2018).

Existe poca evidencia de cepas con cambios en la secuencia en *rpoE* con mejoras en resistencia a estrés, pues al contrario la mayoría de las mutantes en este factor sigma son más sensibles. Cuando esto se ha reportado resulta por una sobreexpresión de RpoE que elimina algún fenotipo sensible a temperatura o estrés en la membrana causada por mutaciones en otros genes (Egler et al., 2005; Hart et al., 2019; Ono et al., 2009; Vidovic et al., 2018; Warr et al., 2021). Solamente en un caso se menciona una mutación de sustitución de aminoácido llamada *rpoE_S2R* la cual parece permitir una respuesta más rápida al estrés periplásmico, pero en el estudio se sugiere que esta mutación en *E. coli* la vuelve hiperreactiva a estrés de baja intensidad, disminuyendo su capacidad de sobrevivencia (Konovalova et al., 2016).

También se estableció una participación de RpoE en la regulación de condiciones limitantes de nitrógeno y carbono al mismo tiempo, midiendo la transcripción de genes en su regulón (Löffler et al., 2017). Éstos son los principales puntos relevantes que fueron encontrados en la bibliografía disponible y no existen estudios que evalúen la producción de proteína u otros metabolitos. A falta de estudios donde se explore la mutación azarosa del factor RpoE y la utilización de mutaciones supresoras de su esencialidad, el potencial que se observa en este factor como diana de modificaciones para producción de PR es reducido.

Factor σ^{19} (*fecI*)

El factor sigma FecI es el segundo factor sigma extracitoplasmático de *E. coli*. FecI tiene la función de dirigir la transcripción de los operones *fecABCDE* y *fecIR* que son necesarios para el transporte de citrato férrico. El factor de transcripción es activado por la presencia de citrato férrico en el medio y su actividad es permitida en condiciones de inanición por hierro (Braun et al., 2003; Moraleda-Muñoz et al., 2019). Solo se han identificado 7 sitios de unión de este factor sigma en el genoma de *E. coli* y una sola unidad de transcripción, y su expresión solo es regulada por RpoD y RpoS mientras que no regula a ningún factor sigma (Cho et al., 2014; Keseler et al., 2021).

En algunos estudios donde se han generado cepas con delección en *fecI*, se muestra una ausencia de FecA (la proteína transmembranal receptora de citrato férrico que induce la actividad de FecR y FecI) y no se lograba inducir la expresión de genes *fec* de transporte, aún en condiciones de ausencia de hierro (Ochs, Angerer, et al., 1995; Ochs, Veitinger, et al., 1995).

Mutantes sin este factor sigma parecen crecer de la misma forma que una cepa silvestre (García, 2020). Además de esta alteración fenotípica esperada, se ha encontrado que cepas con delección en *fecI* muestran una mayor producción del polímero P(LA-co-3HB) que la cepa silvestre (5.7 g/L y 5.3 g/L respectivamente) aunque muestran una disminución en la proporción de unidades de lactato (medido como el porcentaje del peso total) en el polímero con peso molecular variable (Kadoya & Kodama, 2015). Así mismo, sobreexpresar FecI ha mostrado un aumento en

la transcripción de genes heterólogos como *oxyB* lo que sugiere que puede regular positivamente la transcripción de otros clústeres de genes biosintéticos (Stevens et al., 2013). Aun siendo el factor sigma con el regulón más pequeño, se lograron encontrar algunas características interesantes al eliminar y sobreexpresar este factor sigma. Esto señala que, aunque el tamaño de su regulón limita el impacto que tienen las alteraciones en su secuencia y expresión del gen, aún se pueden obtener fenotipos útiles.

Discusión

Potencial de los factores sigma como dianas para el mejoramiento de cepas de producción

En primer lugar, RpoD muestra tener un alto potencial como diana de modificaciones para la formación de cepas de producción. Esto se demuestra ya que existen ejemplos donde su modificación, mediante cambios a la secuencia del gen, mejora las concentraciones de proteína producida. Además de esto, también se pueden obtener cepas con cambios en la resistencia a distintas formas de estrés que pueden llegar a darse durante un proceso de producción.

Cabe resaltar que la mayoría de estas cepas han sido obtenidas a través de gTME (genera mutaciones aleatorias por medio de PCR propensa a errores), lo cual tiene la gran ventaja de poder ser aplicado a las cepas de producción ya existentes, mejorando el rendimiento en la producción de muchos productos biotecnológicos. Sin embargo, esta no es una técnica racional, por lo que sería importante la exploración de las mutaciones específicas de los genes que provocan los fenotipos deseados.

Potencialmente, se podría explorar a mayor profundidad alteraciones en estructura y expresión que no sigan los métodos de gTME. Así mismo, se podrían llevar las aplicaciones de gTME y otros fenotipos aún más lejos, por ejemplo: se sabe que se puede generar un fenotipo de resistencia múltiple utilizando dos factores sigma distintos en la misma bacteria, pero agregar la utilización de circuitos genéticos sintéticos para activar la expresión de un alelo de *rpoD* bajo ciertas condiciones y la de un *rpoD* distinto con un estímulo específico, entonces se podría controlar el cambio fenotípico global. Una limitante de la exploración de mutantes de *rpoD* es que su delección resulta complicada ya que

controla funciones esenciales, por lo que no se han reportado casos de fenotipos en ausencia de este factor. Entre todos los factores sigma, éste es el más estudiado en la aplicación de su modificación y con un mayor potencial, pero no es el único que debería ser explorado.

En segundo lugar, la generación de mutaciones y deleciones de los factores RpoS y RpoN ya han sido exploradas. Su delección, sobreexpresión, o mutación genera fenotipos que tienen mayor resistencia a ciertas condiciones o una mayor producción de ciertos metabolitos. En el caso específico de la producción de PR, no existe información específica sobre los efectos que podrían provocar modificaciones en RpoN o en su expresión, aunque las mejoras en producción de otros metabolitos y su influencia en la utilización de fuentes de nitrógeno puede indicar una potencial utilidad en PPR y abre la puerta a nuevas investigaciones.

Para RpoS, en cambio, sí existen ejemplos donde modificando el gen se obtienen cepas con fenotipo favorable para la producción de PR, sin embargo, la mayoría de estas modificaciones en el factor sigma no han sido el objetivo del estudio sino más bien, un hallazgo fortuito, a excepción del estudio de Chou y colaboradores en 1996 con su estudio de la producción de galactosidasa. Un caso especialmente llamativo es el de Mulyanti *et al.* en 2021, donde el cambio favorable para producción de PR se obtuvo al unir el gen de *rpoS*, bajo un promotor de *rpoD*, con esto se indujo su expresión en fase exponencial (Mulyanti *et al.*, 2021). Esto amplía las posibles aplicaciones de estos factores sigma.

Dadas las interacciones que se han encontrado entre estos dos factores sería importante que los estudios en producción de PR que modifiquen la expresión de uno de ellos tengan en cuenta la actividad de ambos. Además de eso, no se ha explorado el potencial de aplicar gTME y otras herramientas de evolución dirigida a estos factores sigma. Dada la evidencia ya existente de los fenotipos que se pueden generar en cada factor sigma, y en especial la predominancia en expresión que muestra el regulón de RpoS en fase estacionaria, existe un alto potencial en ser explorados como posibles dianas para la formación de cepas de producción.

A diferencia de los otros factores sigma ya mencionados, RpoE y RpoH han sido muy poco explorados en lo concerniente a cepas de producción debido a los efectos deletéreos de su alteración y a que estos genes son esenciales en condiciones de crecimiento a 37 °C. Específicamente en el caso de *rpoH*, en la búsqueda bibliográfica se logró encontrar ejemplos de experimentos, aunque realizados hace ya varias décadas, donde *rpoH* podía ser eliminado y *E. coli* era viable a temperaturas menores a 20 °C. Aunado a dicho hallazgo, se localizaron dos ejemplos donde mutantes de *rpoH* tenían fenotipos que aumentaban la producción de metabolitos y PR, pero estos estudios se realizaron hace más de 25 años y no se encontró algún seguimiento experimental más actualizado (Goldberg *et al.*, 1989; Obukowicz *et al.*, 1992). A su vez, para *rpoE* se encontró que en ciertas cepas de *E. coli* el gen no es esencial, y puede ser eliminado.

Ambos casos abren la posibilidad de investigar a mayor profundidad las mutantes de estos genes. Además de esto, la fuerte relación que se ha observado entre los regulones de estos factores sigma y la expresión de proteínas chaperonas, la regulación de otros procesos metabólicos como la glucosilación de lípidos, el desarrollo de mutaciones puntuales, y la temperatura de crecimiento, continúan resaltando a estos dos genes como buenas opciones para la investigación de cepas de producción. Sin embargo, las dificultades presentes debido a los efectos deletéreos de sus mutantes son un obstáculo que aún deben de ser abordados a mayor profundidad.

Por último, los factores con regulón más pequeño, FecI y FliA, mostraron repercusiones menores en sus mutantes comparadas con los demás factores sigma. Aunque los cambios generados por la eliminación de estos genes pueden ser menores en comparación, sí podrían llegar a ser importantes, especialmente en el caso de *fliA* debido a su papel en la motilidad y su relación con el regulón de RpoS. Por lo tanto, su potencial como diana de mutaciones para la generación de cepas de producción es menor a cualquier otro factor sigma, pero el efecto reducido que tiene sobre la viabilidad celular y el crecimiento, lo vuelve un objeto de estudio interesante pues tienen el potencial de liberar espacio metabólico, reduciendo los recursos celulares invertido en la producción de flagelo en condiciones donde no son necesarias (como un

cultivo por agitación), lo que podría beneficiar la producción de PR.

Perspectivas y futuros experimentos

La bibliografía revisada muestra que existen muchos otros temas y experimentos por explorar. Dentro de éstos sugerimos tres perspectivas interesantes que podrían ser investigadas en el futuro. En primer lugar, dirigir la aplicación de gTME a otros factores sigma diferentes a RpoD. Esto surge de observar la utilidad que ha mostrado esta técnica en la generación de fenotipos útiles; sin embargo, para *E. coli* solo ha sido aplicada a RpoD como se muestra en la **tabla 1**. A futuro, incluso se podría buscar aplicar gTME en más de un factor sigma a la vez, permitiendo alteraciones que potencialmente afecten todo el transcriptoma de *E. coli*. Además de esto, se pueden aprovechar los hallazgos en algunos factores sigma y observar si éstos se pueden aplicar a los demás. Como ejemplo, explorar si la generación de factores sigma truncados que conserven solo las regiones 3 y 4, como se ha observado repetidamente para RpoD, puede ser útil para otros factores sigma de la misma familia estructural.

Otro tema interesante es la profundización en las cepas con deleciones en estos factores sigma. Por un lado, realizar múltiples deleciones para encontrar cuál es el mínimo de factores sigma necesarios para la sobrevivencia de *E. coli*, puede ser una estrategia rápida para generar un sistema de célula mínima no basado en un genoma mínimo, sino en un transcriptoma mínimo, puesto que las alteraciones de gran magnitud serán sobre la transcripción de los genes. Por otro lado, la dinámica de interacción a través de competición por la ARNP que caracteriza a los factores sigma podría ser explotada a través de la deleción de estos factores o el control de su expresión y actividad. Esto se podría utilizar para potenciar los efectos de factores sigma mutantes, ya que el traslape de los regulones llega a tener un cierto efecto amortiguante. Por ejemplo, si se reduce fuertemente la expresión de RpoS, la fuerte competencia que este factor puede generar con los más de 800 genes que comparte con RpoD se vería reducida, por lo tanto, podríamos esperar que las mutaciones en el gen *rpoD* tengan efectos más drásticos.

Por último, en combinación con herramientas de biología sintética, la alta pleiotropía que generan las mutantes de factores sigma, produciendo fuertes alteraciones fenotípicas a través de la mutación de un solo gen, abre la posibilidad de controlar el fenotipo de una sola cepa a través de la expresión de distintas mutantes en distintos tiempos de crecimiento. De ser posible, esta herramienta nos daría la capacidad no solo de controlar la inducción de genes para la producción de ciertos metabolitos o proteínas en una cepa de producción, y también de inducir junto con ellos el fenotipo que genere las condiciones celulares óptimas para dicha producción.

Conjuntando la ingeniería de factores sigma con herramientas de control dinámico de metabolismo, se podría potenciar el control que se ejerce sobre el estado metabólico de la célula. Ejemplos de esto podrían ser la utilización de ARN de interferencia, o proteínas conocidas como antisigmas para suprimir transitoriamente la actividad de ciertos factores sigma, o acoplar la activación de sigmas mutados con circuitos de biología sintética que reaccionen a señales ambientales o metabólicas.

Conclusiones

La producción de PR es y seguramente continuará siendo uno de los procesos biotecnológicos de mayor importancia a nivel mundial. Esto provoca que exista un gran número de artículos científicos del tema, lo cual es especialmente el caso en cepas tan utilizadas como *E. coli* y en genes con impacto tan amplio en el fenotipo como los factores sigma. En el presente trabajo se realizó una revisión sistemática de la bibliografía disponible sobre los fenotipos útiles para la producción de PR que se han observado en *E. coli* por la modificación en estructura o expresión de sus siete factores sigma. Además, se propuso una estrategia experimental para evaluar el potencial de cada factor sigma en la producción de PR. Se encontró que RpoD presenta un alto potencial que ha sido explorado y demostrado en diversos experimentos, y puede continuar siendo utilizado para generar cepas de producción. RpoS y RpoN muestran un alto potencial explorado en menor medida, lo cual abre una interesante línea de investigación. Por otro lado, aunque es menor el potencial de RpoE y RpoH es que los casos anteriores, ha sido apenas abordado debido a las restricciones en el crecimiento.

Sin embargo, existen indicios de que estos obstáculos podrían ser superados. Finalmente, los factores Fecl y FliA mostraron el menor potencial, probablemente debido al tamaño de su regulón en comparación con el resto, pero su facilidad de ser eliminado sin causar problemas en el crecimiento también tiene interesantes aplicaciones.

La utilización de herramientas biosintéticas y de ingeniería genética acopladas a estos conocimientos podrían brindarnos la capacidad de entender e influenciar de nuevas formas el complejo espacio metabólico y su relación con el transcriptoma, tanto en *E. coli* como en otras bacterias. Esto tiene el potencial de ser sumamente útil para la producción de PR y de otros metabolitos y, sobre todo, muy interesante.

Agradecimientos

Se agradece el apoyo del donativo CONACyT A1-S-8646.

Referencias

- Aguilar, C., Escalante, A., Flores, N., de Anda, R., Riveros-McKay, F., Gosset, G., Morett, E., & Bolívar, F. (2012). Genetic changes during a laboratory adaptive evolution process that allowed fast growth in glucose to an *Escherichia coli* strain lacking the major glucose transport system. *BMC Genomics*, *13*(1), 385. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-385>
- Alper, H., & Stephanopoulos, G. (2007). Global transcription machinery engineering: A new approach for improving cellular phenotype. *Metabolic Engineering*, *9*(3), 258-267. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2006.12.002>
- Appukkuttan, D., Singh, H., Park, S.-H., Jung, J.-H., Jeong, S., Seo, H. S., Choi, Y. J., & Lim, S. (2016). Engineering synthetic multistress tolerance in *Escherichia coli* by using adeinococcal response regulator, DR1558. *Applied and Environmental Microbiology*, *82*(4), 1154–1166. <https://doi.org/10.1128/AEM.03371-15>
- Bak, G., Han, K., Kim, D., & Lee, Y. (2014). Roles of *rpoS*-activating small RNAs in pathways leading to acid resistance of *Escherichia coli*. *MicrobiologyOpen*, *3*(1), 15–28. <https://doi.org/10.1002/mbo3.143>
- Battesti, A., Majdalani, N., & Gottesman, S. (2011). The RpoS-mediated general stress response in *Escherichia coli*. *Annual Review of Microbiology*, *65*(1), 189–213. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090110-102946>
- Battesti, A., Majdalani, N., & Gottesman, S. (2015). Stress sigma factor RpoS degradation and translation are sensitive to the state of central metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *112*(16), 5159–5164. <https://doi.org/10.1073/pnas.1504639112>
- Belik, A. S., Tarasova, N. N., & Khmel', I. A. (2008). Regulation of biofilm formation in *Escherichia coli* K12: Effect of mutations in the genes HNS, STRA, LON, and RPON. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*, *23*(4), 159–162. <https://doi.org/10.3103/S0891416808040010>
- Bennett, R. K., Agee, A., Gerald Har, J. R., von Hagel, B., Siu, K.-H., Antoniewicz, M. R., & Papoutsakis, E. T. (2020). Triggering the stringent response enhances synthetic methanol utilization in *Escherichia coli*. *Metabolic Engineering*, *61*, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2020.04.007>
- Bonocora, R. P., Smith, C., Lapierre, P., & Wade, J. T. (2015). Genome-scale mapping of *Escherichia coli* σ_{54} reveals widespread, conserved intragenic binding. *PLOS Genetics*, *11*(10), e1005552. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005552>
- Braun, V., Mahren, S., & Ogierman, M. (2003). Regulation of the Fecl-type ECF sigma factor by transmembrane signalling. *Current Opinion in Microbiology*, *6*(2), 173–180. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(03\)00022-5](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(03)00022-5)
- Cebrián, G., Arroyo, C., Condón, S., & Mañas, P. (2015). Osmotolerance provided by the alternative sigma factors σ_B and *rpoS* to *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* is solute dependent and does not result in an increased growth fitness in NaCl containing media. *International Journal of Food*

Microbiology, 214, 83–90.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.07.011>

Cho, B.-K., Kim, D., Knight, E. M., Zengler, K., & Palsson, B. O. (2014). Genome-scale reconstruction of the sigma factor network in *Escherichia coli*: Topology and functional states. *BMC Biology*, 12(1), 4.
<https://doi.org/10.1186/1741-7007-12-4>

Choe, D., Lee, J. H., Yoo, M., Hwang, S., Sung, B. H., Cho, S., Palsson, B., Kim, S. C., & Cho, B.-K. (2019). Adaptive laboratory evolution of a genome-reduced *Escherichia coli*. *Nature Communications*, 10(1), 935.
<https://doi.org/10.1038/s41467-019-08888-6>

Chou, C.-H., Bennett, G. N., & San, K.-Y. (1996). Genetic manipulation of stationary-phase genes to enhance recombinant protein production in *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*, 50(6), 636–642.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19960620\)50:6<636::AID-BIT4>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19960620)50:6<636::AID-BIT4>3.0.CO;2-L)

Claret, L., Miquel, S., Vieille, N., Ryjenkov, D. A., Gomelsky, M., & Darfeuille-Michaud, A. (2007). The flagellar sigma factor FliA regulates adhesion and invasion of Crohn disease-associated *Escherichia coli* via a cyclic dimeric GMP-dependent pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 282(46), 33275–33283.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M702800200>

Conter, A., Gangneux, C., Suzanne, M., & Gutierrez, C. (2001). Survival of *Escherichia coli* during long-term starvation: Effects of aeration, NaCl, and the rpoS and osmC gene products. *Research in Microbiology*, 152(1), 17–26.
[https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(00\)01164-5](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(00)01164-5)

Davis, M. C., Kesthely, C. A., Franklin, E. A., & MacLellan, S. R. (2017). The essential activities of the bacterial sigma factor. *Canadian Journal of Microbiology*, 63(2), 89–99.
<https://doi.org/10.1139/cjm-2016-0576>

Díaz-Acosta, A., Sandoval, M. L., Delgado-Olivares, L., & Membrillo-Hernández, J. (2006). Effect of anaerobic and stationary phase growth conditions on the heat shock and oxidative stress responses in *Escherichia coli* K-12. *Archives of Microbiology*, 185(6), 429–438.
<https://doi.org/10.1007/s00203-006-0113-9>

Ding, D., Bai, D., Li, J., Mao, Z., Zhu, Y., Liu, P., Lin, J., Ma, H., & Zhang, D. (2021). Analyzing the genetic characteristics of a tryptophan-overproducing *Escherichia coli*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 44(8), 1685–1697.
<https://doi.org/10.1007/s00449-021-02552-4>

Dong, T., & Schellhorn, H. E. (2009). Global effect of RpoS on gene expression in pathogenic *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL933. *BMC Genomics*, 10(1), 349.
<https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-349>

Dong, T., Yu, R., & Schellhorn, H. (2011). Antagonistic regulation of motility and transcriptome expression by RpoN and RpoS in *Escherichia coli*: Antagonistic control by RpoS and RpoN. *Molecular Microbiology*, 79(2), 375–386.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07449.x>

Duzenli, O., & Okay, S. (2020). Promoter engineering for the recombinant protein production in prokaryotic systems. *AIMS Bioengineering*, 7(2), 62–81.
<https://doi.org/10.3934/bioeng.2020007>

Egler, M., Grosse, C., Grass, G., & Nies, D. H. (2005). Role of the extracytoplasmic function protein family sigma factor RpoE in metal resistance of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 187(7), 2297–2307.
<https://doi.org/10.1128/JB.187.7.2297-2307.2005>

El Khoury, J. Y., Maure, A., Gingras, H., Leprohon, P., & Ouellette, M. (2019). Chemogenomic screen for imipenem resistance in Gram-negative bacteria. *MSystems*, 4(6).
<https://doi.org/10.1128/mSystems.00465-19>

Fitzgerald, D. M., Bonocora, R. P., & Wade, J. T. (2014). Comprehensive mapping of the *Escherichia coli* flagellar regulatory network. *PLoS Genetics*, 10(10), e1004649.
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004649>

Fontaine, F., Stewart, E. J., Lindner, A. B., & Taddei, F. (2007). Mutations in two global regulators lower individual mortality in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 071202153222001
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05988.x>

- Franchini, A. G., Ihssen, J., & Egli, T. (2015). Effect of global regulators RpoS and cyclic-AMP/CRP on the catabolome and transcriptome of *Escherichia coli* K12 during Carbon- and energy-limited growth. *PLoS ONE*, *10*(7), e0133793. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133793>
- Gaida, S. M., Al-Hinai, M. A., Indurthi, D. C., Nicolaou, S. A., & Papoutsakis, E. T. (2013). Synthetic tolerance: Three noncoding small RNAs, DsrA, ArcZ and RprA, acting supra-additively against acid stress. *Nucleic Acids Research*, *41*(18), 8726–8737. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt651>
- Gao, X., Jiang, L., Zhu, L., Xu, Q., Xu, X., & Huang, H. (2016). Tailoring of global transcription sigma D factor by random mutagenesis to improve *Escherichia coli* tolerance towards low-pHs. *Journal of Biotechnology*, *224*, 55–63. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.03.012>
- García, E. (2020). *Caracterización de mutantes en factores sigma de Escherichia coli*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Gayán, E., Cambré, A., Michiels, C. W., & Aertsen, A. (2016). Stress-induced evolution of heat resistance and resuscitation speed in *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 43888. *Applied and Environmental Microbiology*, *82*(22), 6656–6663. <https://doi.org/10.1128/AEM.02027-16>
- Gayán, E., Van den Bergh, B., Michiels, J., Michiels, C. W., & Aertsen, A. (2020). Synthetic reconstruction of extreme high hydrostatic pressure resistance in *Escherichia coli*. *Metabolic Engineering*, *62*, 287–297. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2020.09.008>
- Goldberg, I., Salerno, A. J., Patterson, T., & Williams, J. I. (1989). Cloning and expression of a collagen-analog-encoding synthetic gene in *Escherichia coli*. *Gene*, *80*(2), 305–314. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(89\)90294-1](https://doi.org/10.1016/0378-1119(89)90294-1)
- Goodall, E. C. A., Robinson, A., Johnston, I. G., Jabbari, S., Turner, K. A., Cunningham, A. F., Lund, P. A., Cole, J. A., & Henderson, I. R. (2018). *The essential genome of Escherichia coli K-12*. *9*(1), 18.
- Gopal, G. J., & Kumar, A. (2013). Strategies for the production of recombinant protein in *Escherichia coli*. *The Protein Journal*, *32*(6), 419–425. <https://doi.org/10.1007/s10930-013-9502-5>
- Guo, Y., Li, Y., Zhan, W., Wood, T. K., & Wang, X. (2019). Resistance to oxidative stress by inner membrane protein ElaB is regulated by OxyR and RpoS. *Microbial Biotechnology*, *12*(2), 392–404. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13369>
- Hamdallah, I., Torok, N., Bischof, K. M., Majdalani, N., Chadalavada, S., Mdluli, N., Creamer, K. E., Clark, M., Holdener, C., Basting, P. J., Gottesman, S., & Slonczewski, J. L. (2018). Experimental evolution of *Escherichia coli* K-12 at High pH and with RpoS induction. *Applied and Environmental Microbiology*, *84*(15). <https://doi.org/10.1128/AEM.00520-18>
- Harden, M. M., He, A., Creamer, K., Clark, M. W., Hamdallah, I., Martinez, K. A., Kresslein, R. L., Bush, S. P., & Slonczewski, J. L. (2015). Acid-Adapted Strains of *Escherichia coli* K-12 obtained by experimental evolution. *Applied and Environmental Microbiology*, *81*(6), 1932–1941. <https://doi.org/10.1128/AEM.03494-14>
- Hart, E., O'Connell, A., Tang, K., Wzorek, J., Grabowicz, M., Kahne, D., & Silhavy, T. (2019). Fine-tuning of sigma E activation suppresses multiple assembly-defective mutations in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, *201*(11), e000745-18.
- Hayden, J. D., & Ades, S. E. (2008). The extracytoplasmic stress factor, σE , is required to maintain cell envelope integrity in *Escherichia coli*. *PLoS ONE*, *3*(2), e1573. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001573>
- Jin, Y., Watt, R. M., Danchin, A., & Huang, J. (2009). Small noncoding RNA GcvB is a novel regulator of acid resistance in *Escherichia coli*. *BMC Genomics*, *10*(1), 165. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-165>
- Jun Choi, Y., Hwan Park, J., Yong Kim, T., & Yup Lee, S. (2012). Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of 1-propanol. *Metabolic Engineering*, *14*(5), 477–486. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2012.07.006>
- Kabir, Md. S., Sagara, T., Oshima, T., Kawagoe, Y., Mori, H., Tsunedomi, R., & Yamada, M. (2004). Effects of mutations in the rpoS gene on cell viability and global gene expression under

Artículos

nitrogen starvation in *Escherichia coli*. *Microbiology*, 150(8), 2543–2553. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27012-0>

Kadoya, R., & Kodama, Y. (2015). Enhanced cellular content and lactate fraction of the poly(lactate-co-3-hydroxybutyrate) polyester produced in recombinant *Escherichia coli* by the deletion of s factor RpoN. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 119(4), 427–429.

Kadoya, R., Kodama, Y., Matsumoto, K., & Taguchi, S. (2015). Indirect positive effects of a sigma factor RpoN deletion on the lactate-based polymer production in *Escherichia coli*. *Bioengineered*, 6(5), 307–311.

Kang, Z., Wang, Q., Zhang, H., & Qi, Q. (2008). Construction of a stress-induced system in *Escherichia coli* for efficient polyhydroxyalkanoates production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 79(2), 203–208. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1428-z>.

Keseler, I. M., Gama-Castro, S., Mackie, A., Billington, R., Bonavides-Martínez, C., Caspi, R., Kothari, A., Krummenacker, M., Midford, P. E., Muñoz-Rascado, L., Ong, W. K., Paley, S., Santos-Zavaleta, A., Subhraveti, P., Tierrafría, V. H., Wolfe, A. J., Collado-Vides, J., Paulsen, I. T., & Karp, P. D. (2021). The EcoCyc Database in 2021. *Frontiers in Microbiology*, 12, 711077. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.711077>.

Kogoma, T., & Yura, T. (1992). Sensitization of *Escherichia coli* cells to oxidative stress by deletion of the rpoH gene, which encodes the heat shock sigma factor. *Journal of Bacteriology*, 174(2), 630–632. <https://doi.org/10.1128/jb.174.2.630-632.1992>.

Konovalova, A., Schwalm, J. A., & Silhavy, T. J. (2016). A suppressor mutation that creates a faster and more robust σ E envelope stress response. *Journal of Bacteriology*, 198(17), 2345–2351. <https://doi.org/10.1128/JB.00340-16>

Kumar, R., & Shimizu, K. (2010). Metabolic regulation of *Escherichia coli* and its gdhA, glnL, gltB, D mutants under different carbon and nitrogen limitations in the continuous culture. *Microbial Cell Factories*, 9(1), 8. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-9-8>

Kundu, T. K., Kusano, S., & Ishihama, A. (1997). Promoter selectivity of *Escherichia coli* RNA polymerase σ F holoenzyme involved in transcription of flagellar and chemotaxis genes. *Journal of Bacteriology*, 179(13), 4264–4269.

Landberg, J., Wright, N., Wulff, T., Herrgard, M., & Nielsen, A. (2020). CRISPR interference of nucleotide biosynthesis improves production of a single-domain antibody in *Escherichia coli*. 117(12), 3835–3848.

LaRossa, R., Smulski, D., & Van Dyk, T. (1995). Interaction of lead nitrate and cadmium chloride with *Escherichia coli* K-12 and *Salmonella typhimurium* global regulatory mutants. *Journal of Industrial Microbiology*, 14, 252–258.

Löffler, M., Simen, J. D., Müller, J., Jäger, G., Laghrami, S., Schäferhoff, K., Freund, A., & Takors, R. (2017). Switching between nitrogen and glucose limitation: Unraveling transcriptional dynamics in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, 258, 2–12. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.04.011>

Magnusson, L. U., Nyström, T., & Farewell, A. (2003). Underproduction of ζ 70 Mimics a Stringent Response. *Journal of Biological Chemistry*, 278(2), 968–973. <https://doi.org/10.1074/jbc.M209881200>

Mahalik, S., Sharma, A. K., & Mukherjee, K. J. (2014). Genome engineering for improved recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories*, 13(1), 177. <https://doi.org/10.1186/s12934-014-0177-1>

Mata, G. M. S. C., Ferreira, G. M., & Spira, B. (2017). RpoS role in virulence and fitness in enteropathogenic *Escherichia coli*. *PLoS ONE*, 12(6), e0180381. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180381>

McKenna, R., Lombana, T. N., Yamada, M., Mukhyala, K., & Veeravalli, K. (2019). Engineered sigma factors increase full-length antibody expression in *Escherichia coli*. *Metabolic Engineering*, 52, 315–323. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.12.009>

Merrick, M. J. (1993). In a class of its own σ the RNA polymerase sigma factor σ^{54} (σ^N). *Molecular Microbiology*, 10(5), 903–909. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1993.tb00961.x>

Milija, J., Lilic, M., Janjusevic, R., Jovanovic, G., & Savic, D. J. (1999). TRNA synthetase mutants of *Escherichia coli* K-12 are resistant to the gyrase inhibitor novobiocin. *Journal of Bacteriology*, *181*, 5.

Mitra, A., Fay, P. A., Morgan, J. K., Vendura, K. W., Versaggi, S. L., & Riordan, J. T. (2012). Sigma factor N, liaison to an ntrC and rpoS dependent regulatory pathway controlling acid resistance and the LEE in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *PLoS ONE*, *7*(9), e46288. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046288>

Mitra, A., Fay, P. A., Vendura, K. W., Alla, Z., Carroll, R. K., Shaw, L. N., & Riordan, J. T. (2014). σ^N -dependent control of acid resistance and the locus of enterocyte effacement in enterohemorrhagic *Escherichia coli* is activated by acetyl phosphate in a manner requiring flagellar regulator FlhDC and the σ^S antagonist FliZ. *MicrobiologyOpen*, *3*(4), 497–512. <https://doi.org/10.1002/mbo3.183>

Mogre, A., Veetil, R. T., & Seshasayee, A. S. N. (2017). Modulation of global transcriptional regulatory networks as a strategy for increasing kanamycin resistance of the translational elongation factor-G mutants in *Escherichia coli*. *G3 Genes/Genomes/Genetics*, *7*(12), 3955–3966. <https://doi.org/10.1534/g3.117.300284>

Moraleda-Muñoz, A., Marcos-Torres, F. J., Pérez, J., & Muñoz-Dorado, J. (2019). Metal-responsive RNA polymerase extracytoplasmic function (ECF) sigma factors. *Molecular Microbiology*, *112*(2), 385–398. <https://doi.org/10.1111/mmi.14328>

Mulyanti, D., Soewandhi, S. N., & Riani, C. (2021). Insertion of prpoD_rpoS fragment enhances expression of recombinant protein by dps auto-inducible promoter in *Escherichia coli*. *Molecular Biology Reports*, *48*(8), 5833–5845. <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06562-z>

Nakata, K., Koh, M. M., Tsuchido, T., & Matsumura, Y. (2010). All genomic mutations in the antimicrobial surfactant-resistant mutant, *Escherichia coli* OW66, are involved in cell resistance to surfactant. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *87*(5), 1895–1905. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2638-8>

Narberhaus, F., & Balsiger, S. (2003). Structure-function studies of *Escherichia coli* RpoH (σ_{32}) by In Vitro linker insertion mutagenesis. *Journal of Bacteriology*, *185*, 8.

Nonaka, G., Blankschien, M., Herman, C., Gross, C. A., & Rhodius, V. A. (2006). Regulon and promoter analysis of the *E. coli* heat-shock factor, σ_{32} , reveals a multifaceted cellular response to heat stress. *2006*, *20*, 1176–1789.

Obukowicz, M. G., Staten, N. R., & Krivi, G. G. (1992). Enhanced heterologous gene expression in novel rpoH mutants of *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, *58*(5), 1511–1523. <https://doi.org/10.1128/aem.58.5.1511-1523.1992>.

Ochs, M., Angerer, A., Enz, S., & Braun, V. (1995). Surface signaling in transcriptional regulation of the ferric citrate transport system of *Escherichia coli*: Mutational analysis of the alternative sigma factor Fecl supports its essential role in fec transport gene transcription. *Molecular Genetics and Genomics*, *250*, 455–465.

Ochs, M., Veitinger, S., Kim, I., Weiz, D., Angerer, A., & Braun, V. (1995). Regulation of citrate-dependent iron transport of *Escherichia coli*: FecR is required for transcription activation by Fecl. *Molecular Microbiology*, *15*(1), 119–132. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.tb02226.x>

Ono, K., Kutsukake, K., & Abo, T. (2009). Suppression by enhanced RpoE activity of the temperature-sensitive phenotype of a degP ssaA double mutant in *Escherichia coli*. *Genes & Genetic Systems*, *84*(1), 15–24. <https://doi.org/10.1266/ggs.84.15>

Padgen, M. R., Lera, M. P., Parra, M. P., Ricco, A. J., Chin, M., Chinn, T. N., Cohen, A., Friedericks, C. R., Henschke, M. B., Snyder, T. V., Spremo, S. M., Wang, J.-H., & Matin, A. C. (2020). EcAMSat spaceflight measurements of the role of σ s in antibiotic resistance of stationary phase *Escherichia coli* in microgravity. *Life Sciences in Space Research*, *24*, 18–24. <https://doi.org/10.1016/j.lssr.2019.10.007>

- Paget, M. (2015). Bacterial Sigma Factors and Anti-Sigma Factors: Structure, Function and Distribution. *Biomolecules*, 5(3), 1245–1265. <https://doi.org/10.3390/biom5031245>.
- Pletnev, P., Pupov, D., Pshanichnaya, L., Esyunina, D., Petushkov, I., Nesterchuk, M., Osterman, I., Rubtsova, M., Mardanov, A., Ravin, N., Sergiev, P., Kulbachinskiy, A., & Dontsova, O. (2020). Rewiring of growth-dependent transcription regulation by a point mutation in region 1.1 of the housekeeping σ factor. *Nucleic Acids Research*, 48(19), 10802–10819. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa798>
- Powell, B. S., Court, D. L., Inada, T., Nakamura, Y., Michotey, V., Cui, X., Reizer, A., Saier, M. H., & Reizer, J. (1995). Novel proteins of the phosphotransferase system encoded within the *rpoN* operon of *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 270(9), 4822–4839. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.9.4822>
- Powell, J. K., & Young, K. D. (1991). Lysis of *Escherichia coli* by r-Lactams which bind penicillin-binding proteins Ia and Ib: Inhibition by heat shock proteins. *Journal of Bacteriology*, 173, 6.
- Rahman, M., Hasan, M. R., Oba, T., & Shimizu, K. (2006). 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. *Biotechnology and Bioengineering*, 94(3), 585–595. <https://doi.org/10.1002/bit.20858>
- Reitzer, L., & Schneider, B. L. (2001). Metabolic context and possible physiological themes of σ_{54} -dependent genes in *Escherichia coli*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65, 23.
- Riordan, J. T., Tietjen, J. A., Walsh, C. W., Gustafson, J. E., & Whittam, T. S. (2010). Inactivation of alternative sigma factor 54 (*RpoN*) leads to increased acid resistance, and alters locus of enterocyte effacement (LEE) expression in *Escherichia coli* O157: H7. *Microbiology*, 156, 719–730.
- Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. (2014). Recombinant protein expression in microbial systems. *Frontiers in Microbiology*, 5. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00341>.
- Rowbury, R. J., & Goodson, M. (1993). PhoE porin of *Escherichia coli* and phosphate reversal of acid damage and killing and of acid induction of the *CadA* gene product. *Journal of Applied Bacteriology*, 74(6), 652–661. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1993.tb05199.x>
- Run, S., & Tian, P. (2018). Improved tolerance of *Escherichia coli* to propionic acid by overexpression of sigma factor *RpoS*. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 54(3), 288–293. <https://doi.org/10.1134/S0003683818030122>.
- Sanchez-Torres, V., Maeda, T., & Wood, T. K. (2009). Protein engineering of the transcriptional activator FhIA to enhance hydrogen production in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(17), 5639–5646. <https://doi.org/10.1128/AEM.00638-09>
- Santos, C. N. S., Xiao, W., & Stephanopoulos, G. (2012). Rational, combinatorial, and genomic approaches for engineering L-tyrosine production in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(34), 13538–13543. <https://doi.org/10.1073/pnas.1206346109>
- Shimada, T., Tanaka, K., & Ishihama, A. (2017). The whole set of the constitutive promoters recognized by four minor sigma subunits of *Escherichia coli* RNA polymerase. *PLoS ONE*, 12(6), e0179181. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179181>
- Shimada, T., Yamazaki, Y., Tanaka, K., & Ishihama, A. (2014). The whole set of constitutive promoters recognized by RNA Polymerase *RpoD* holoenzyme of *Escherichia coli*. *PLoS ONE*, 9(3), e90447. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090447>
- Si, H.-M., Zhang, F., Wu, A.-N., Han, R.-Z., Xu, G.-C., & Ni, Y. (2016). DNA microarray of global transcription factor mutant reveals membrane-related proteins involved in n-butanol tolerance in *Escherichia coli*. *Biotechnology for Biofuels*, 9(1), 114. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0527-9>

- Singh, S. S., Typas, A., Hengge, R., & Grainger, D. C. (2011). *Escherichia coli* σ 70 senses sequence and conformation of the promoter spacer region. *Nucleic Acids Research*, *39*(12), 5109–5118. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr080>.
- Solís, M. (2001). *Análisis del gen regulador de la respuesta da estrés por calor, rpoH, en cepas de Escherichia coli aisladas de diferentes hospederos* [Maestra en Ciencias (Biología Celular)]. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Stasic, A. J., Wong, A. C. L., & Kaspar, C. W. (2012). Osmotic and desiccation tolerance in *Escherichia coli* O157:H7 requires rpoS (σ 38). *Current Microbiology*, *65*(6), 660–665. <https://doi.org/10.1007/s00284-012-0210-8> *Chemical Science and Engineering*, *6*(2), 152–157. <https://doi.org/10.1007/s11705-012-1287-0>.
- Tkachenko, A. G., Kashevarova, N. M., Tyuleneva, E. A., & Shumkov, M. S. (2017). Stationary-phase genes upregulated by polyamines are responsible for the formation of *Escherichia coli* persister cells tolerant to netilmicin. *FEMS Microbiology Letters*, *364*(9). <https://doi.org/10.1093/femsle/fnx084>
- Tomatis, P. E., Schütz, M., Umudumov, E., & Plückthun, A. (2019). Mutations in sigma 70 transcription factor improves expression of functional eukaryotic membrane proteins in *Escherichia coli*. *Scientific Reports*, *9*(1), 2483. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39492-9>
- Treviño-Quintanilla, L., Freyre-González, J., & Martínez-Flores, I. (2013). Anti-Sigma Factors in *E. coli*: Common Regulatory Mechanisms Controlling Sigma Factors Availability. *Current Genomics*, *14*(6), 378–387. <https://doi.org/10.2174/1389202911314060007>
- Tripathi, L., Zhang, Y., & Lin, Z. (2014). Bacterial Sigma Factors as Targets for Engineered or Synthetic Transcriptional Control. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *2*. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2014.00033>
- Vidovic, S., Medihala, P., Dynes, J. J., Daida, P., Vujanovic, V., Hitchcock, A. P., Shetty, D., Zhang, H., Brown, D. R., Lawrence, J. R., & Korber, D. R. (2018). Importance of the RpoE Regulon in Maintaining the Lipid Bilayer during Antimicrobial Treatment with the Polycationic Agent, Chlorhexidine. *PROTEOMICS*, *18*(3–4), 1700285. <https://doi.org/10.1002/pmic.201700285>
- Warr, A. R., Giorgio, R. T., & Waldor, M. K. (2021). Genetic analysis of the role of the conserved inner membrane protein CvpA in enterohemorrhagic *Escherichia coli* resistance to deoxycholate. *Journal of Bacteriology*, *203*(6). <https://doi.org/10.1128/JB.00661-20>.
- Weber, H., Polen, T., Heuveling, J., Wendisch, V. F., & Hengge, R. (2005). Genome-wide analysis of the general stress response network in *Escherichia coli*: Σ S-dependent genes, promoters, and sigma factor selectivity. *Journal of Bacteriology*, *187*, 1591–1603.
- Weikert, C., Canonaco, F., Sauer, U., & Bailey, J. E. (2000). Co-overexpression of RspAB improves recombinant protein production in *Escherichia coli*. *Metabolic Engineering*, *2*(4), 293–299. <https://doi.org/10.1006/mben.2000.0163>
- Wood, T. K., González Barrios, A. F., Herzberg, M., & Lee, J. (2006). Motility influences biofilm architecture in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *72*(2), 361–367. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0263-8>
- Xu, G., Xiao, L., Wu, A., Han, R., & Ni, Y. (2021). Enhancing n-butanol tolerance of *Escherichia coli* by overexpressing of stress-responsive molecular chaperones. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *193*(1), 257–270. <https://doi.org/10.1007/s12010-020-03417-4>
- Yang, J., Xiong, Z.-Q., Song, S.-J., Wang, J.-F., Lv, H.-J., & Wang, Y. (2015). Improving heterologous polyketide production in *Escherichia coli* by transporter engineering. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *99*(20), 8691–8700. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6718-7>
- Yi, X., & Dean, A. M. (2016). Phenotypic plasticity as an adaptation to a functional trade-off. *ELife*, *5*, e19307. <https://doi.org/10.7554/eLife.19307>

Yu, H., Tyo, K., Alper, H., Klein-Marcuschamer, D., & Stephanopoulos, G. (2008). A high-throughput screen for hyaluronic acid accumulation in recombinant *Escherichia coli* transformed by libraries of engineered sigma factors. *Biotechnology and Bioengineering*, 101(4), 788–796. <https://doi.org/10.1002/bit.21947>

Zhang, F., Qian, X., Si, H., Xu, G., Han, R., & Ni, Y. (2015). Significantly improved solvent tolerance of *Escherichia coli* by global transcription machinery engineering. *Microbial Cell Factories*, 14(1), 175. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0368-4>

Zhao, K., Liu, M., & Burgess, R. R. (2007). Adaptation in bacterial flagellar and motility systems: From regulon members to 'foraging'-like behavior in *E. coli*. *Nucleic Acids Research*, 35(13), 4441–4452. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm456>.

Zhao, K., Liu, M., & Burgess, R. R. (2010). Promoter and regulon analysis of nitrogen assimilation factor, σ_{54} , reveal alternative strategy for *E. coli* MG1655 flagellar biosynthesis. *Nucleic Acids Research*, 38(4), 1273–1283. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp1123>

Zhou, Y.-N., Kusukawa, N., Erickson, J. W., Gross, C. A., & Yura, T. (1988). Isolation and characterization of *Escherichia coli* mutants that lack the heat shock sigma factor cr32. *Journal of Bacteriology*, 170, 10.