

00591

3



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA**

**Caracterización genética, bioquímica y por resonancia  
magnética nuclear del metabolismo de carbono de  
*Escherichia coli* silvestre y de cepas derivadas modificadas  
en el transporte de glucosa**

**T E S I S**  
que para obtener el grado de:  
**Doctor en Ciencias Bioquímicas**  
presenta el Químico Farmacobiólogo  
**SALVADOR FLORES CHÁVEZ**

**Cuernavaca, Morelos**

**2002**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**CARACTERIZACIÓN GENÉTICA, BIOQUÍMICA Y POR RESONANCIA  
MAGNÉTICA NUCLEAR DEL METABOLISMO DE CARBONO DE *Escherichia  
coli* SILVESTRE Y DE CEPAS DERIVADAS MODIFICADAS EN EL  
TRANSPORTE DE GLUCOSA**

Salvador Flores Chávez

Este trabajo de tesis se realizó en el departamento de Microbiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría y dirección del Dr. Francisco G. Bolívar Zapata.

Para la realización de este trabajo se contó con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), a través de la beca de doctorado 96-120 y del proyecto CONACyT-PROBIOMED-UNAM NC-230, de los apoyos DGAPA-UNAM, y de la Fundación Telmex.

Cuernavaca, Morelos, 18 de enero del 2002.

**MIEMBROS DEL JURADO:**

**PRESIDENTE:**                    **Dra. Gloria Soberón Chávez**

**SECRETARIO:**                   **Dr. Francisco Gonzalo Bolívar Zapata**

**VOCAL:**                           **Dr. Agustín López Munguía**

**VOCAL:**                           **Dr. Federico Sánchez Rodríguez**

**VOCAL:**                           **Dr. Carlos Martín Cerda García-Rojas**

**SUPLENTE:**                      **Dr. Mario Soberón Chávez**

**SUPLENTE:**                      **Dra. Paulina Balbás Diez Barroso**

## INDICE GENERAL

	Página:
<b>I. RESUMEN.</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT.</b>	<b>3</b>
<b>II. INTRODUCCION.</b>	<b>5</b>
<b>III. JUSTIFICACION.</b>	<b>8</b>
<b>IV. OBJETIVOS.</b>	<b>10</b>
V.1    Objetivo general	<b>10</b>
V.2    Objetivos específicos	<b>10</b>
<b>V. ANTECEDENTES.</b>	<b>11</b>
V.1    Fisiología y genética de <i>Escherichia coli</i> .	<b>11</b>
V.2    Metabolismo general.	<b>12</b>
V.2.1    Consideraciones generales.	<b>12</b>
V.2.2    Transporte activo de glucosa: El sistema de la fosfotransferasa (PTS).	<b>13</b>
V.2.3    Vía glicolítica o Vía de Embden Meyernhoff-Parnas (EMP).	<b>16</b>
V.2.4    Vía de las pentosas-fosfato (PP).	<b>18</b>
V.2.5    Ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA).	<b>19</b>
V.2.6    Vía de Entner-Doudoroff (ED).	<b>21</b>
V.2.7    Productos de la fermentación de glucosa.	<b>21</b>
V.2.8    Estequiometría del metabolismo central.	<b>23</b>
V.3    Ingeniería de vías metabólicas.	<b>25</b>
V.3.1    Conceptos generales.	<b>25</b>
V.3.2    Herramientas y enfoques para el estudio del metabolismo de carbono.	<b>26</b>
V.3.2.1    Caracterización bioquímica.	<b>26</b>
V.3.2.2    Caracterización genética.	<b>27</b>
V.3.2.3    Análisis por Resonancia Magnética Nuclear (RMN).	<b>28</b>
V.3.2.3.1    Marcaje isotópico de <sup>13</sup> C. Consideraciones generales.	<b>28</b>
V.3.2.3.2    Análisis del metabolismo anabólico por técnicas de RMN.	<b>35</b>
V.3.3    Flujos metabólicos.	<b>36</b>
V.3.4    Ingeniería del metabolismo para la producción de compuestos de interés: moléculas aromáticas.	<b>39</b>

V.3.5	Nodo de fosfoenolpiruvato.	41
V.3.5.1	Consideraciones generales.	41
V.3.5.2	Mutantes en el sistema PTS.	43
V.3.5.3	Mutantes en las piruvato-cinasas A y F.	45
V.4	Modelamiento matemático; caso de estudio: la vía de las pentosas-fosfato.	47
<b>VI.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS.</b>	<b>52</b>
VI.1	Cepas bacterianas y vectores.	52
VI.2	Cultivos y preparación de muestras.	54
VI.3	Análisis de transporte de [ <sup>14</sup> C]-glucosa.	55
VI.4	Ensayos de actividad específica enzimática.	55
VI.5	Espectroscopía de RMN y modelamiento matemático.	56
<b>VII.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.</b>	<b>58</b>
VII.1	Aplicación del análisis de Resonancia Magnética Nuclear para la determinación de flujos de carbono en sistemas biológicos. Consideraciones relevantes.	58
VII.2	Resultados relevantes.	59
VII.2.1	Caracterización inicial de crecimiento en glucosa como fuente de carbono de la cepa JM101 y de sus derivadas PB11, PB12 y PB13.	59
VII.2.2	Transporte de [ <sup>14</sup> C]-glucosa en las diferentes cepas.	60
VII.2.3	Participación de la enzima glucocinasa en la utilización de glucosa como fuente de carbono en las cepas JM101, PB12 y PB13.	62
VII.2.4	Actividades específicas de las enzimas fosfoglucoisomerasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y 6-fosfogluconatodeshidrogenasa en diferentes cepas.	62
VII.2.5	Análisis de la utilización de gluconato en las cepas JM101, PB12 y PB13. Mutantes en la vía ED.	63
VII.3	Resultados de la caracterización del metabolismo de carbono mediante el análisis de resonancia magnética nuclear.	66
VII.3.1	Flujos de carbono determinados para la vía EMP.	67
VII.3.2	Flujos de carbono determinados para la vía de las pentosas y ED.	70
VII.3.3	Flujos de carbono determinados para TCA.	72

VII.4 Utilidad del análisis de flujos por RMN en la predicción de manipulaciones genéticas específicas en <i>Escherichia coli</i> .	75
VII.4.1 Mutantes en el gene <i>pgi</i> .	75
VII.4.2 Mutantes en el gene <i>gnd</i> .	77
<b>VIII. CONCLUSIONES.</b>	<b>79</b>
<b>IX. APENDICES.</b>	<b>83</b>
IX.1 Abreviaciones.	83
IX.2 Concentración de los diferentes isotopómeros extraídos de los espectros de 2D[ <sup>13</sup> C- <sup>1</sup> H]-COSY-NMR.	85
<b>X. BIBLIOGRAFÍA.</b>	<b>89</b>
<b>XI. AGRADECIMIENTOS</b>	<b>94</b>
<b>XII. ANEXO 1.</b> Artículo aceptado para su publicación en la revista Metabolic Engineering: "Analysis of carbon metabolism in <i>Escherichia coli</i> strains with an inactive phosphotransferase system by <sup>13</sup> C labelling and NMR spectroscopy". Flores S., Gosset G., Flores N., de Graaf A. A., and Bolívar F.	95

## I. RESUMEN.

Como parte de los intermediarios del metabolismo central de carbono, el fosfoenolpiruvato (PEP) juega un papel central en la fisiología de *Escherichia coli* debido a que es el metabolito donador del grupo fosfato en el sistema de transporte de glucosa (PTS), además, es precursor directo de varios aminoácidos y participa en la generación de ATP a nivel de las piruvato-cinasas. Por estas razones, diferentes estudios se han centrado en entender y manipular los flujos de carbono a nivel de PEP y piruvato. Algunas de las estrategias establecidas para dirigir el PEP hacia diferentes procesos biosintéticos han sido las siguientes: la sobreexpresión del gene que codifica para la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa (*ppc*), la inactivación de los genes que codifican para las piruvato-cinasas A y F y más recientemente, la utilización de cepas con un sistema PTS de transporte de glucosa inactivo, pero que regeneran la capacidad de usar glucosa a través un mecanismo alterno. A partir de una cepa con una delección en los genes del sistema PTS (PTS<sup>-</sup>), que crece muy lentamente en glucosa (Glc<sup>-</sup>), se desarrolló un método basado en cultivo continuo para seleccionar mutantes capaces de utilizar glucosa y crecer a velocidades similares a las de la cepa PTS<sup>+</sup>. Una caracterización posterior de estas cepas PTS<sup>-</sup>Glc<sup>+</sup>, en relación con la síntesis de aminoácidos aromáticos, demostró que se puede canalizar un mayor flujo de carbono hacia los intermediarios de la biosíntesis de aminoácidos aromáticos, cuando se la compara con una cepa PTS<sup>+</sup> isogénica. El rendimiento molar calculado a partir de glucosa del primer intermediario de la biosíntesis de aminoácidos aromáticos, el 3-deoxi-D-arabino-heptuloso-7-fosfato (DAHP), fue de 65 % mayor, en una cepa de *E. coli* PTS<sup>-</sup>Glc<sup>+</sup>*aroB*<sup>-</sup>, que sobreexpresa los genes que codifican para una DAHP-sintasa resistente a inhibición por producto final y para la transcetolasa, comparada con una cepa isogénica PTS<sup>+</sup>. Estos resultados indican que, evitando el consumo de PEP en el transporte y fosforilación de glucosa por el sistema PTS, en las cepas PTS<sup>-</sup>Glc<sup>+</sup>, una mayor cantidad de este precursor puede ser redirigido a rutas metabólicas específicas.

El propósito del presente trabajo fue obtener información metabólica detallada de dos cepas PTS<sup>-</sup>Glc<sup>+</sup>, PB12 y PB13, así como de las cepas de las que provienen JM101 (PTS<sup>+</sup>) y PB11 (PTS<sup>-</sup>Glc<sup>-</sup>), mediante una estrategia que combinó estudios bioquímicos, genéticos y de espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN). Este estudio se



centró en determinar la distribución de los flujos de carbono del metabolismo central, usando RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $^{13}\text{C}$ -RMN). Para demostrar la confiabilidad de los flujos de carbono obtenidos y la utilidad de los mismos se interrumpieron en las cepas JM101, PB12 y PB13, algunos genes que codifican para enzimas centrales en la vía de EMP o de las pentosas-fosfato, demostrando la utilidad de los análisis realizados en la predicción del efecto de dichas mutaciones. Se determinó que en las cepas  $\text{PTS}^-\text{Glc}^+$ , la enzima glucocinasa (Glk), codificada por el gene *glk*, es requerida para la fosforilación de glucosa y que la actividad específica de Glk es mayor en las cepas  $\text{PTS}^-\text{Glc}^+$ , que en la cepa silvestre. La espectroscopía de  $^{13}\text{C}$ -RMN permitió determinar las diferencias en flujos de carbono *in vivo*, que son, principalmente: un mayor flujo glicolítico en las cepas  $\text{PTS}^-\text{Glc}^+$ , de 93.1 y 89.2 comparado con el 76.6 % obtenido *E. coli* silvestre. Además, en las cepas PB12 y PB13, existe un flujo de carbono en la enzima málica de 4 y 10 %, respectivamente, comparado con un valor cercano a cero en la cepa silvestre, mientras que el flujo en la enzima Pck se encuentra ausente en las cepas PB12 y PB13, y en la cepa silvestre es de un 7.7 %. Finalmente, se encontró que en las cepas JM101 y PB12, la biosíntesis de ribosa-5-fosfato (R5P) y eritrosa-4-fosfato (E4P), se lleva a cabo a través de los brazos oxidativo y no-oxidativo de la vía de las pentosas, en tanto que en la cepa PB13 la R5P se sintetiza casi exclusivamente por el brazo oxidativo. Conjuntamente con estos datos, se demostró que la cepa derivada de la PB13, interrumpida en el gene *gnd*, que codifica para la enzima 6-fosfogluconato deshidrogenasa, no crece en glucosa como fuente de carbono debido a que la interrupción de *gnd*, limita su capacidad para producir R5P y E4P necesarias para la biosíntesis de aminoácidos, vitaminas y nucleótidos. En conclusión, los flujos de carbono determinados por RMN y modelamiento matemático, concuerdan con los resultados de la caracterización genética y bioquímica.

\*Nota: todos los flujos de carbono están expresados como el porcentaje molar del transporte de glucosa para cada cepa = 100 % [ $\text{mmol glc} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g biomasa}^{-1}$ ].

## ABSTRACT.

Among the metabolites of the central metabolism, phosphoenolpyruvate (PEP) plays a key role in cell physiology since it is a phosphate donor in the PEP:carbohydrate phosphotransferase system (PTS), additionally, PEP is direct precursor of several amino acids, and participates in the ATP-yielding reaction catalyzed by pyruvate kinases. Thus, a number of studies have focused on understanding and manipulating metabolic fluxes around the PEP and pyruvate nodes. Several approaches have been employed in order to increase the metabolic availability of PEP, like the over expression of the gene coding for PEP-synthase (*pps*), the inactivation of the genes coding for the two pyruvate kinase isoenzymes, and more recently, the utilization of strains with an inactive PTS, but with the capacity to consume glucose by an alternative mechanism. Starting from a strain with an inactive PTS (PTS<sup>-</sup>), which grows very slowly on glucose (Glc<sup>-</sup>), a method based on continuous culture was employed to select for mutants that can utilize glucose as carbon source and had similar growth rates as that of a PTS<sup>+</sup> strain. Further characterization of these PTS<sup>-</sup>Glc<sup>+</sup> strains, in the context of aromatic aminoacid biosynthesis, has revealed that they can be engineered to direct more carbon flux into intermediates of this pathway, when compared to isogenic PTS<sup>+</sup> strains. The measured molar yield from glucose for the synthesis of the first intermediate in the aromatic pathway, 3-deoxy-D-arabinoheptulosonate-7-phosphate (DAHP), was 65 % more, in a PTS<sup>-</sup>Glc<sup>+</sup> *aroB*<sup>-</sup> strain where genes coding for a feedback inhibition resistant DAHP synthase and transketolase were overexpressed compared with an isogenic PTS<sup>+</sup> strain. These results indicate that by avoiding PTS-dependent PEP consumption for glucose transport in the PTS<sup>-</sup>Glc<sup>+</sup> strains, a larger fraction of this precursor metabolite is now available to be redirected into specific biosynthetic pathways.

Therefore, the purpose of the present study was to obtain a detailed metabolic characterization of two PTS<sup>-</sup>Glc<sup>+</sup> strains, PB12 and PB13, and their isogenic progenitor strains JM101 (PTS<sup>+</sup>) and PB11 (PTS<sup>-</sup>Glc<sup>-</sup>), by combining genetic, biochemical and nuclear magnetic resonance (NMR) approaches. This study was based on determining the flux distributions of central metabolic pathways using <sup>13</sup>C labeling and NMR spectroscopy, and by generating and studying mutants in genes encoding for certain enzymes of the glycolytic

pathways. It was determined that in these strains a functional *glk* gene in the chromosome is required for rapid glucose consumption. Furthermore, glucokinase specific activities were higher than in the wild type strain. <sup>13</sup>C labelling and NMR analysis allowed the determination of carbon flux differences *in vivo* which include a higher glycolytic flux of 93.1 and 89.2 %, in the PTS<sup>-</sup>Glc<sup>+</sup> strains, when compared with the 76.6 % obtained for the wild type *E. coli*. In PB12 and PB13 we also determined a flux through the malic enzymes of 4 and 10 %, respectively, as compared to zero in the wild type strain. While flux through the Pck enzyme was absent in PB12 and PB13, in the wild type was 7.7 %. Finally, it was found that in strains JM101 and PB12, both the oxidative and the non-oxidative branches of the pentose-phosphate pathway contributed to ribose-5-phosphate synthesis whereas in PB13 this pentose was synthesized almost exclusively through the oxidative branch. Thus, a mutation in the *gnd* gene that codes for the 6-phosphogluconate dehydrogenase enzyme (strain PB13 *gnd*), was unable to grow in glucose as sole carbon source because it strongly reduces its capacity to produce R5P and E4P needed for amino acid, vitamin and nucleotide biosynthesis. In conclusion, the determined carbon fluxes correlate with the biochemical and genetic characterizations.

\*Note: All carbon flux values are expressed as molar percentage of the glucose uptake in  $\text{mmol glc} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g biomass}^{-1}$ , which for every individual strain was taken as 100 %.

## II. INTRODUCCION:

Las bacterias han demostrado su gran potencial de adaptabilidad a diversas condiciones imperantes en nuestro planeta. Algunas de las más importantes características de estos organismos son: a) las velocidades de reproducción y metabolismo más elevados entre los seres vivos, b) una adaptabilidad que les permite crecer en muy diversos ambientes y utilizar una gran cantidad de compuestos como fuentes de energía y de carbono, incluyendo algunas que podrían ser limitantes para la existencia de otras formas de vida. Así, el crecimiento y división de cada bacteria deben estar organizados de forma que se asegure la homogeneidad genética y fenotípica de la especie, en un proceso que puede durar en algunos casos de 20 a 30 minutos entre dos generaciones.

*Escherichia coli* puede sintetizar, a partir de una mezcla de compuestos relativamente sencillos, todos los componentes necesarios para su crecimiento y reproducción a través de una serie de reacciones conocidas como el metabolismo celular, el cual puede ser dividido para su estudio en diferentes secciones o tipos. En el presente trabajo, enfocamos el esfuerzo a estudiar el metabolismo de carbono, elemento del cual está compuesto el 50 % del peso seco de la bacteria, y que es, sin duda, pieza central en la existencia de todo ser vivo.

Los estudios del metabolismo de carbono se han centrado en un grupo de vías metabólicas que componen el metabolismo central de carbono. A partir de una molécula sencilla, generalmente glucosa, la célula obtiene metabolitos derivados, llamados precursores, a partir de los cuales y junto con algunos iones específicos y de algún aceptor de electrones para mantener el proceso de respiración, se sintetizan todos los componentes esenciales para cubrir las necesidades metabólicas de la célula.

Las herramientas clásicas de estudio, en lo referente al metabolismo central, se sustentan principalmente en la modulación de la actividad específica de algún(os) gene(s) relacionados con una vía metabólica en particular, a través de la regulación o modificación de las propiedades genéticas del gene en particular o de un conjunto de genes relacionados con el proceso de utilización/producción del metabolito de interés. En ciertos casos, la abolición total de la expresión de cierto gene o grupo de genes ha tenido éxito para el estudio de su papel en el metabolismo y la fisiología del sistema biológico, en particular en bacterias. Sin embargo, pocas son las estrategias que permiten conocer con exactitud cuales

son, o pueden ser, las consecuencias exactas, a nivel del metabolismo central de carbono, de la modificación de un gene, cualquiera que esta sea.

Otra técnica usada para el estudio del metabolismo central, ha sido la utilización de isótopos radioactivos de  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{32}\text{P}$ , principalmente, analizando los perfiles de utilización de las fuentes marcadas radioactivamente y también el análisis de los productos finales. Sin embargo, es poca o nula la información estructural, que a escala molecular se puede generar de estos análisis, principalmente por las dificultades propias de la utilización de materiales radioactivos en el laboratorio.

Una técnica de marcaje isotópico de reciente aplicación al análisis del metabolismo de carbono en sistemas biológicos es el uso de distintas moléculas como fuentes de carbono, marcadas con  $^{13}\text{C}$  y el ulterior análisis por Resonancia Magnética Nuclear (RMN). La mayor ventaja de este tipo de análisis es que es una técnica no destructiva, que utiliza la abundancia natural de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  para obtener información estructural de moléculas orgánicas. Usando  $^{13}\text{C}$ -glucosa como fuente de carbono en *Escherichia coli*, podemos analizar por RMN los esqueletos de carbono producto de la hidrólisis ácida de la biomasa obtenida, que tendrá una incorporación de  $^{13}\text{C}$  definido por los patrones catabólicos y anabólicos de la bacteria. Caracterizando y midiendo las concentraciones de los diferentes esqueletos de carbono marcados con  $^{13}\text{C}$ , podemos estudiar el metabolismo intermediario de la célula, así como el efecto de las diferentes manipulaciones genéticas dirigidas a la modificación del metabolismo (Szyperski, 1998).

A través de las técnicas de DNA recombinante, llamadas también técnicas de ingeniería genética, se han modificado diferentes sistemas biológicos, entre ellos los microorganismos, con la finalidad de aprovechar las propiedades de las bacterias para la transformación de sustratos en productos específicos. Esto se ha logrado, modulando y/o modificando algunos de los genes que codifican para enzimas que catalizan reacciones de interés específico o que de alguna forma tengan relación con las propiedades fisiológicas de la célula y que favorezcan la producción de un compuesto deseado y además mediante la incorporación de genes heterólogos.

La conversión de alguna fuente de carbono en un compuesto deseado por un sistema biológico ha sido la finalidad fundamental de muchos biotecnólogos. La comprensión del mecanismo por el cual el sistema biológico lleva a cabo esta conversión y el aumento en la productividad del proceso general juegan un papel central en los estudios y en los procesos

de la biotecnología moderna. La ingeniería del metabolismo o ingeniería metabólica conjunta estos dos grandes procesos: comprender el metabolismo y eficientar a su máximo la conversión de un sustrato en productos finales específicos.

### III. JUSTIFICACION.

En nuestro laboratorio hemos estado interesados en el estudio del metabolismo central en microorganismos, con el objetivo de orientar la maquinaria biosintética de la célula hacia la sobreproducción de moléculas específicas, en lo que se ha dado en llamar la ingeniería de vías metabólicas. En este sentido hemos estado particularmente interesados en canalizar esqueletos de carbono, como fosfoenolpiruvato (PEP) y eritrosa-4-fosfato (E4P), para incrementar la biosíntesis de compuestos derivados de intermediarios de la vía general de biosíntesis de aminoácidos aromáticos, así como para la biosíntesis de péptidos específicos. En este sentido, nuestro grupo ha demostrado que una mayor disponibilidad de PEP y E4P, ocasiona un aumento en la producción de 3-deoxiarabinoheptulose-7-fosfato (DAHP), intermediario en la síntesis de compuestos aromáticos en *E. coli* (Gosset *et al.*, 1996).

En el laboratorio se han seleccionado mutantes de *E. coli* que no cuentan con el sistema principal de transporte de glucosa (sistema PTS). A partir de estas cepas (cepas PTS<sup>-</sup>Glc<sup>-</sup>), se obtuvieron nuevas mutantes que recobran la capacidad de usar glucosa como fuente de carbono (mutantes PTS<sup>-</sup>Glc<sup>+</sup>), y que son capaces de transportar glucosa mediante la permeasa GalP (Flores, 1995). Se sabe que en estas mutantes, el fenotipo Glc<sup>+</sup> se debe a más de una mutación, aunque se desconoce la naturaleza de estas mutaciones. Se suponía que la ausencia del sistema PTS, que requiere de PEP como donador de fosfato, y el uso de GalP, que no requiere de PEP para fosforilar la glucosa, así como el proceso de mutación / adaptación por el que las cepas PTS<sup>-</sup>Glc<sup>-</sup> recobran la capacidad de usar glucosa como fuente de carbono tengan, en conjunto, como consecuencia variaciones en los flujos de carbono y en la fisiología general de las mutantes PTS<sup>-</sup>Glc<sup>+</sup> de *E. coli* obtenidas en el laboratorio.

Por todos los elementos anteriores se consideró que el estudio y caracterización del metabolismo de carbono de las cepas PTS<sup>-</sup>Glc<sup>-</sup> y PTS<sup>-</sup>Glc<sup>+</sup>, que no requieren el uso de PEP para internalizar glucosa, y que por ello pueden ser modificadas genéticamente para canalizar el PEP hacia la biosíntesis de compuestos aromáticos, resulta relevante, tanto desde el punto de vista básico por entender mejor el metabolismo celular, como desde el punto de vista de la microbiología industrial ya que estas son cepas de gran potencial en cuanto a la producción de moléculas orgánicas y proteínas recombinantes.

Es importante hacer notar que una de las aportaciones importantes a la investigación básica por las que se postuló este trabajo de tesis, fue la utilización de técnicas de  $^{13}\text{C}$ -RMN para el análisis y cuantificación de los flujos de carbono en una cepa de *E. coli* silvestre (y de sus mutantes PTS<sup>-</sup>Glc<sup>+</sup>), para así obtener la matriz metabólica del microorganismo de mayor utilización en biología molecular.



## IV. OBJETIVOS.

### IV.1. OBJETIVO GENERAL.

Estudiar el metabolismo central de carbono de las cepas de *Escherichia coli* JM101 y sus derivadas modificadas en el transporte de glucosa PB11, PB12 y PB13.

### IV.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Analizar el transporte de glucosa en las cepas de *Escherichia coli* JM101, PB11, PB12 y PB13.
- Estudiar el papel que juega la enzima glucocinasa en la fosforilación de glucosa en las cepas de *Escherichia coli* PB12 y PB13.
- Analizar el perfil de actividad específica de las enzimas glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, 6-fosfogluconato deshidrogenasa y fosfoglucosa-isomerasa en las cepas de *Escherichia coli* JM101, PB11, PB12 y PB13.
- Realizar análisis de Resonancia Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , del producto de la hidrólisis de biomasa de las cepas de *Escherichia coli* JM101, PB11, PB12 y PB13, cultivadas en  $^{13}\text{C}$ -glucosa como fuente de carbono.
- A partir de un modelo matemático alimentado con los datos provenientes del marcaje isotópico, proponer un modelo de flujos del metabolismo central de carbono en las cepas de *Escherichia coli* JM101, PB11, PB12 y PB13.
- Establecer las diferencias a nivel de flujos de carbono entre las cepas de *Escherichia coli* JM101 ( $\text{PTS}^+$ ) y PB11 ( $\text{PTS}^-\text{Glc}^-$ ), así como proponer algunos de los cambios que originaron a las cepas  $\text{PTS}^-\text{Glc}^+$ , PB12 y PB13 a partir de la cepa PB11 ( $\text{PTS}^-\text{Glc}^-$ ).

## V. ANTECEDENTES.

### V.1 Fisiología y genética de *Escherichia coli*.

El grupo de organismos a los que pertenece *Escherichia coli* son las Enterobacterias (familia: *Enterobacteriaceae*), que son bacilos gram-negativos, de crecimiento rápido -por respiración metabólica en presencia de oxígeno o por metabolismo fermentativo en su ausencia-. *Escherichia coli* vive en cercana asociación con el ser humano como parte de su flora intestinal habitual, así como de otros mamíferos y aves. Por otro lado, su tiempo de vida media en hábitats distintos, como agua o suelo es muy corto. Otras características propias de las bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*, que favorecen el estudio de *Escherichia coli*, son su rápido tiempo de duplicación (20 minutos), y la facilidad para obtener extractos enzimáticamente activos de este organismo.

Algunas de las características que han convertido a *Escherichia coli* en un sistema de estudio recurrente entre los microbiólogos han sido que es un organismo de fácil acceso, poco virulento (aunque en raros casos, algunas cepas de *E. coli* pueden colonizar el tracto urinario, así como causar diarreas, que incluso podrían llegar a ser fatales), y que crece con facilidad en medios químicamente definidos. Uno de los elementos decisivos en la utilización de *Escherichia coli* como sistema de estudio en microbiología y en los inicios de la biología molecular fue el descubrimiento, por Joshua Lederberg (Tatum y Lederberg 1947), del fenómeno del intercambio de material genético por conjugación. Así, el análisis genético de diferentes funciones celulares se hizo posible.

Este conjunto de características de *Escherichia coli* ha conducido a algunos de los mayores descubrimientos de la biología, como la elucidación de la mayoría de los patrones biosintéticos, el refinamiento del concepto de gene, el desarrollo de herramientas para elucidación del código genético y la secuenciación de los diferentes genomas, los descubrimientos en los mecanismos moleculares de la regulación genética, entre otros. Otro de los beneficios del estudio extensivo de este microorganismo es la gran cantidad de información estructural, bioquímica, fisiológica y genética disponible. Recientemente, un grupo de investigación dirigido por F. Blatner, reportó la secuencia del genoma de este organismo, que consta de 4.2 millones de pares de bases (Blatner *et al.*, 1997).

Sin embargo, aun con el extraordinario avance que significan la elucidación del genoma y proteoma de *E. coli*, estamos lejos de obtener la solución completa e infalible del

comportamiento celular en cualquier circunstancia; por esto, el estudio extensivo de la bacteria *Escherichia coli* es adecuado para lograr ese objetivo.

## **V.2 Metabolismo general.**

### **V.2.1 Consideraciones generales.**

*Escherichia coli* es capaz de sintetizar todas las macromoléculas que requiere para su crecimiento a partir de fuentes de carbono relativamente sencillas (por ejemplo acetato o glucosa), a través de su metabolismo. Además *Escherichia coli* puede utilizar varias docenas de compuestos orgánicos como fuente de carbono si se encuentran disponibles.

En la tabla 1, se muestra la composición general de las macromoléculas, de una célula bacteriana. La síntesis de todas las macromoléculas se realiza a partir de compuestos de bajo peso molecular de rápido recambio y que son constantemente sintetizados a partir de glucosa o cualquier otra fuente de carbono, llamados bloques primarios o monómeros. El metabolismo se puede dividir de varias formas; según el compuesto relacionado, el metabolismo puede ser: metabolismo de carbono, metabolismo de nitrógeno, metabolismo de fósforo, etcétera. Por otro lado, conforme al proceso de síntesis de macromoléculas, el metabolismo se puede dividir en: a) Reacciones de ensamblaje, que son las que modifican macromoléculas para formar las estructuras celulares, b) Reacciones de polimerización, que comprenden la unión secuencial, ramificada o no, de moléculas activadas para producir las macromoléculas, c) Reacciones biosintéticas, que producen los bloques primarios del proceso de polimerización, además de coenzimas y otros factores metabólicos, como cofactores. Las reacciones biosintéticas comienzan en todos casos con alguno(s) de los 12 "precursores metabólicos" (ver mas adelante), y se encuentran organizadas secuencialmente en bloques que se llaman vías biosintéticas, y están usualmente controladas (directa o indirectamente), por alguno de los productos de la vía, d) Reacciones del metabolismo central, también conocido como patrones catabólicos o catabolismo; estas son reacciones que degradan y oxidan sustratos, y que producen los 12 precursores metabólicos para las reacciones biosintéticas, así como energía, principalmente ATP. Las vías metabólicas, se encuentran unidas en varios puntos por cofactores como ATP, NADH y NADPH, que son indispensables para muchas reacciones. En la figura 1, se muestran las reacciones del metabolismo central de carbono y la ubicación de estos 12 precursores metabólicos de las reacciones biosintéticas.

**Tabla 1.** Composición de una célula de *Escherichia coli*.<sup>a</sup>

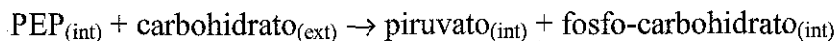
Tipo de macromolécula	Porcentaje del peso seco	Diferentes tipos de moléculas
Proteína	55.0	1050
RNA	20.5	463
DNA	3.1	1
Lípidos	9.1	4
Lipopolisacárido	3.4	1
Peptidoglicano	2.5	1
Glicógeno	2.5	1
Compuestos solubles (iones)	3.9	

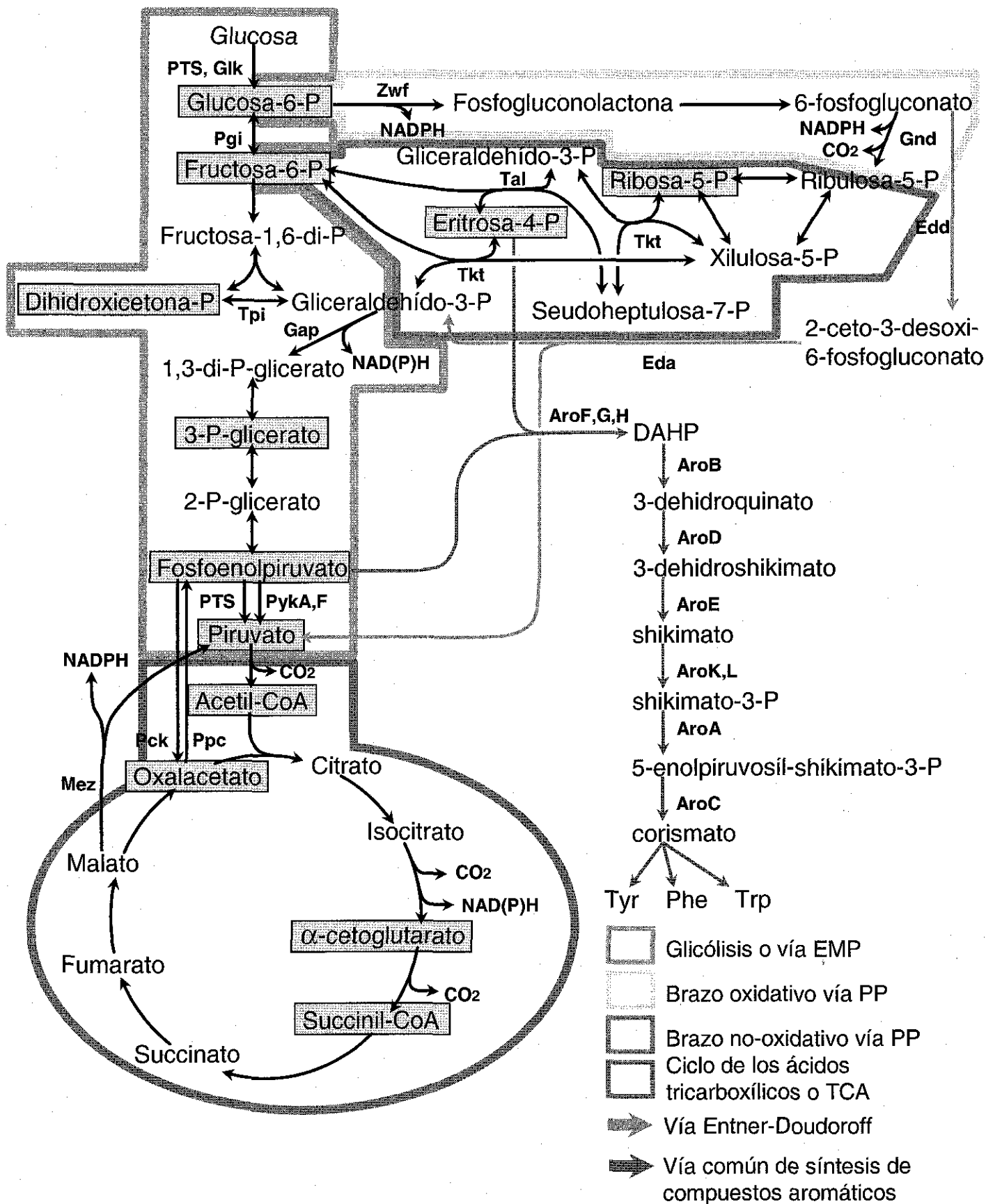
Datos obtenidos de Ingraham *et al.* (1983).

Por otro lado, el metabolismo central de carbono se puede dividir para su estudio en diferentes vías metabólicas: la vía glicolítica o vía de Embden-Meyerhoff-Parnas (EMP), sección V.2.3; la vía del 6-fosfogluconato o vía de las pentosas-fosfato (PP), sección V.2.4; el ciclo de los ácidos tricarbóxicos (TCA o ciclo de Krebs), sección V.2.5; la vía de Entner-Doudoroff (ED), sección V.2.6 y el ciclo de Calvin o ciclo del glioxal (Fraenkel, 1996, Cronan J.E., y LaPorte D., 1996). Para fines prácticos, la mayor parte de las explicaciones sobre el metabolismo en la presente tesis, tomarán en cuenta el metabolismo de *Escherichia coli*, creciendo en glucosa como fuente de carbono y en condiciones aerobias, salvo las excepciones que se manejen para cada caso.

### V.2.2 Transporte activo de glucosa: El sistema de la fosfotransferasa (PTS).

El sistema fosfoenolpiruvato-carbohidrato de transferencia de fosfatos (PTS, por sus siglas en inglés), tiene dos funciones principales, es un sistema de transporte de carbohidratos, así como un sistema "sensor". El sistema PTS participa en el transporte y la fosforilación de una amplia gama de carbohidratos (carbohidratos-PTS), en quimiotaxis, así como en la regulación de varias vías metabólicas. La reacción general que cataliza el sistema PTS es:

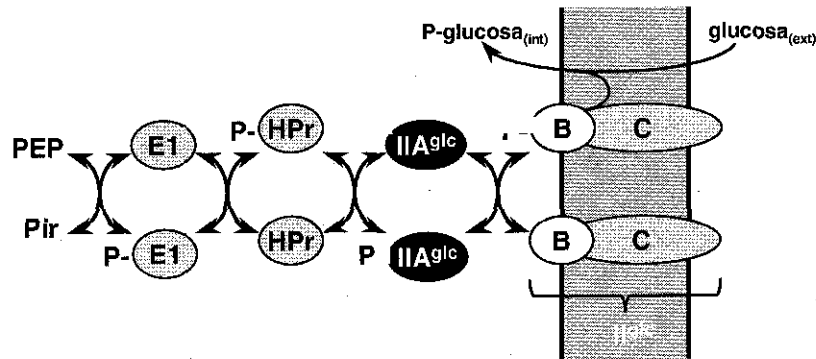




**Figura 1.** Algunas de las principales vías del metabolismo de *Escherichia coli*. Los 12 precursores metabólicos se encuentran resaltados en fondo gris.

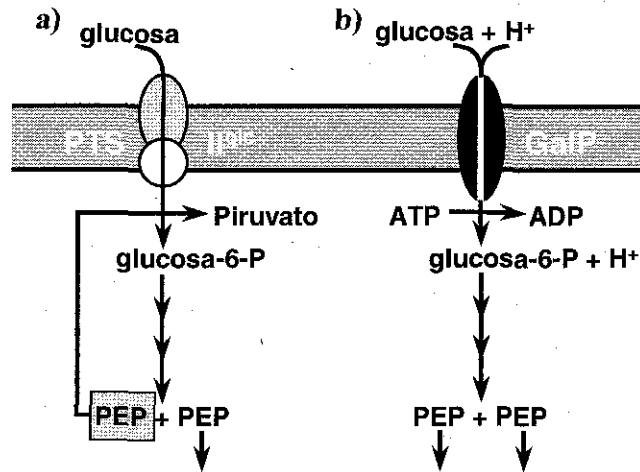
**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

La fosforilación del carbohidrato está acoplada a la translocación del mismo a través de la membrana citoplasmática. La fuerza motriz de este proceso es aportada por la hidrólisis del enlace fosfato de alta energía del PEP. La transferencia del fosfato desde el PEP hasta el carbohidrato se encuentra esquematizada en la figura 2.



**Figura 2.** Transferencia secuencial de fosfato del PEP a la glucosa. Los componentes B y C se encuentran fusionados en la membrana celular y juntos conforman el componente II<sup>glc</sup> del sistema PTS específico para glucosa, denotado por el superíndice-glc. Los componentes E1, HPr y IIA<sup>glc</sup>, son solubles. Dependiendo del estado de fosforilación de los componentes HPr y IIA<sup>glc</sup>, pueden ejercer funciones regulatorias a nivel enzimático y/o transcripcional. E1 y HPr son comunes al transporte de todos los carbohidratos-PTS. Como denota la bidireccionalidad de la mayoría de las reacciones, los componentes del sistema PTS, pueden ser fosforilados o defosforilados, dependiendo de la abundancia de los compuestos inicial y/o final, sólo la transferencia de fosfato a la glucosa por parte del componente II<sup>glc</sup>, es irreversible.

Como se observa en la reacción que cataliza el sistema PTS, una molécula de PEP es defosforilada para proveer de la fuerza motriz para el transporte y fosforilación de una molécula de azúcar, dejando la otra molécula de PEP producida a través de la glicólisis (figura 3-a), para que se utilice en diferentes rutas metabólicas (figura 8). El PEP juega un papel central en la fisiología de *Escherichia coli* debido a que es un precursor directo de varios aminoácidos y porque participa en la generación de ATP al nivel de las piruvatoquinasas. Además del comentado papel como donador del grupo fosfato en el sistema de transporte de glucosa (PTS), de alguna manera, el PEP es el “sensor” de la disponibilidad de azúcares-PTS en la célula. Por estas razones, diferentes estudios se han centrado en entender y manipular los flujos de carbono al nivel de PEP y piruvato.



**Figura 3.** En las cepas mutantes PTS<sup>-</sup>Glc<sup>+</sup> una molécula de PEP puede canalizarse hacia la síntesis de otras moléculas, motivada por el cambio de sistema de transporte-PTS, dependiente de PEP (a), por GalP, independiente de PEP (b).

### V.2.3 Vía glicolítica o Vía de Embden Meyerhoff-Parnas (EMP).

Esta vía forma parte del metabolismo central e incluye las reacciones enzimáticas que permiten la incorporación y la transformación de la glucosa, una molécula de seis átomos de carbono, en dos moléculas de piruvato, de tres átomos de carbono, ver figura 1. En *E. coli*, esta vía metabólica comprende la activación por fosforilación de la glucosa. El transporte y la fosforilación de glucosa en *E. coli*, la lleva a cabo mayoritariamente el sistema de la fosfotransferasa o sistema PTS de transporte de carbohidratos (ver sección V.2.2). Otra alternativa para el transporte y fosforilación de glucosa es el sistema GalP-Glk. Una diferencia importante entre los dos sistemas de fosforilación, además del donador de fosfato, es que el sistema de la fosfotransferasa, puede transportar y fosforilar una amplia gama de carbohidratos variando uno de sus componentes. El sistema PTS regula la utilización preferencial de carbohidratos por un proceso llamado represión catabólica. No se han reportado funciones regulatorias a nivel genético para la glucocinasa. Glk sólo puede fosforilar glucosa por lo que es específica para su metabolismo. Las reacciones que permiten la transformación de glucosa-6-fosfato a piruvato, son llevadas a cabo por las enzimas listadas en la tabla 2 (Fraenkel D.G., 1996).

Otra de las principales características de la vía EMP es la producción de ATP, a nivel de las enzimas fosfoglicerato-cinasa y piruvato-cinasas, y la producción de poder reductor a nivel de la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidratasa.

La vía de EMP puede funcionar en el sentido de glucosa a piruvato, -catálisis-, o en el sentido de la síntesis de glucosa, -síntesis-, cuando la fuente de carbono sea de 2, 3 ó 4 carbonos. Ya que no todas las enzimas de la vía catalítica actúan en ambos sentidos, la vía anabólica o sintética, incluye la fructosa-bisfosfatasa, distinta de la fosfofructocinasa, que hidroliza al enlace fosfodiéster de la posición 1 de la fructosa-1,6-bis-fosfato para producir fructosa-6-fosfato (Fraenkel, 1996).

**Tabla 2.** Enzimas que participan en la vía EMP.

Enzima (número EC <sup>a</sup> )	Gene
Glucocinasa (EC 2.7.1.2)	<i>glk</i>
Fosfoglucosa-isomerasa (EC 5.3.1.9)	<i>pgi</i>
Fosfofructocinasas (EC 2.7.1.11)	<i>pfkA, pfkB</i>
Fructosa-1,6- <i>bis</i> -fosfatasa (EC 3.1.3.11)	<i>fbp</i>
Fructosa-1,6- <i>bis</i> -fosfatoaldolasa (EC 4.1.2.13)	<i>fbaA</i>
Triosa-fosfatoisomerasa (EC 5.3.1.1)	<i>tpiA</i>
Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (EC 1.2.1.12)	<i>gapA</i>
Fosfoglicerato-cinasa (EC 2.7.2.3)	<i>pgk</i>
Fosfoglicerato-mutasa (EC 2.7.5.3)	<i>gpm</i>
Enolasa (EC 4.2.1.11)	<i>eno</i>
Piruvato-cinasas (EC 2.7.1.40)	<i>pykA, pykF</i>

<sup>a</sup> = Los números EC están tomados según en *Enzyme nomenclature*, 1978. Academic Press.

La vía de EMP interacciona con otras vías del metabolismo central compartiendo alguno de sus intermediarios, como la glucosa-6-fosfato, la fructosa-6-fosfato y el gliceraldehído-3-fosfato, que se pueden dirigir hacia la vía PP. Algunos de los productos del catabolismo de pentosas son F6P y G3P, y pueden integrarse a la vía EMP. Del mismo modo, el G3P y el piruvato producto del metabolismo de ácidos urónicos y se pueden incorporar en la vía de EMP. Los carbohidratos distintos a la glucosa se incorporan en la vía EMP al diferentes niveles cuando son transformadas por enzimas específicas. En el caso de la fructosa, esta se fosforila durante su transporte y se incorpora a la vía EMP a nivel de la F6P. Galactosa o maltosa se convierten en glucosa-1-fosfato y ésta, a su vez, en G6P por acción de la enzima fosfoglucomutasa (Fraenkel, 1996).



#### V.2.4 Vía de las pentosas-fosfato (PP).

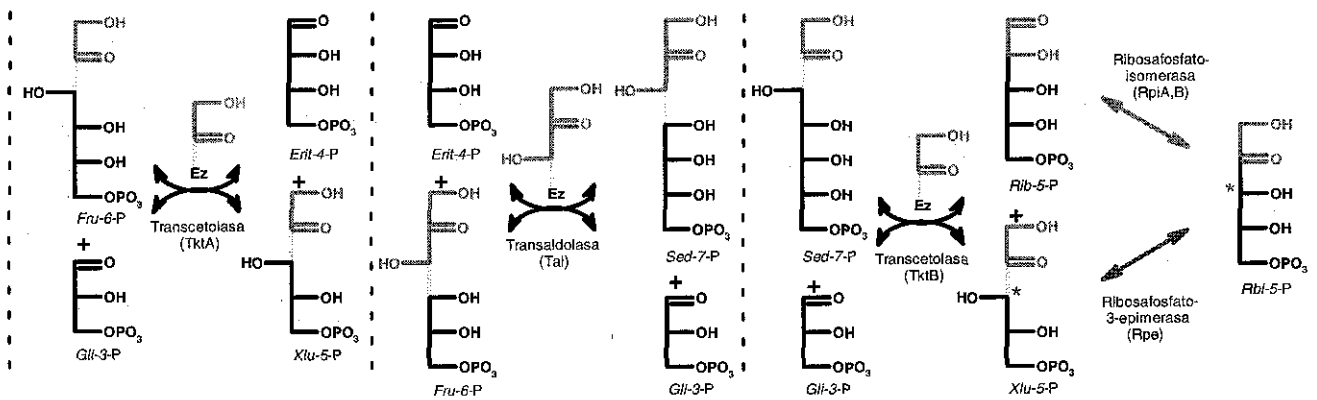
La vía de las pentosas-fosfato se puede dividir para su estudio en dos partes: a) el brazo oxidativo de la vía de las pentosas y b) el brazo no-oxidativo de la vía de las pentosas. El brazo oxidativo comprende las reacciones a partir de glucosa-6-fosfato hasta ribulosa-5-fosfato. Las características principales de esta conversión es la pérdida de una unidad de carbono (inicia con una hexosa-fosfato y termina con una pentosa-fosfato), en forma de  $\text{CO}_2$ , a nivel de la enzima 6-fosfogluconato-deshidrogenasa (Gnd), y la producción de dos moléculas de NADPH a nivel de las enzimas glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Zwf) y Gnd (figura 1). En condiciones de crecimiento exponencial, en glucosa como fuente de carbono, las enzimas Zwf y Gnd son las responsables de la mayor parte de la producción de NADPH (Szyperski, 1995), sin embargo existen otros puntos del metabolismo que pueden cubrir de manera satisfactoria la producción de NADPH, como son la enzima malato deshidrogenasa dependiente de NADPH, la isocitrato deshidrogenasa, o la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, que puede producir ambos cofactores, NADH o NADPH (Czonka y Frankel, 1977).

El brazo no oxidativo de la vía de las pentosas está compuesto por reacciones que no involucran la modificación energética de los intermediarios que participan en ella, medido como el  $\Delta G^{\circ} \approx 0$ , de las reacciones correspondientes. Las reacciones del brazo no-oxidativo son una serie de transformaciones entre moléculas de 3 a 7 carbonos mediados, algunos por la transferencia reversible de unidades -cetol, de 2 carbonos, mediados por las transcetolasas A y B, y otras, de unidades -aldol, de 3 carbonos entre dos moléculas, mediadas por la enzima transaldolasa, (figura 5). Otra parte de las reacciones de este brazo no oxidativo son las que involucran a las enzimas ribosa-fosfato epimerasa ó Rpe (ribulosa-5-fosfato  $\rightarrow$  xilulosa-5-fosfato) y ribosafosfato isomerasa ó Rpi.

Alguna de las características más importantes de la vía PP, es su flexibilidad, ya que, dependiendo del estado metabólico de la bacteria, puede cubrir diferentes necesidades de precursores o de energía y/o poder reductor. En el caso de *Escherichia coli*, esta modulación de la vía de las pentosas se debe a dos factores: la velocidad de crecimiento y la fuente de carbono. Mientras mayor es la velocidad de crecimiento en presencia de hexosas, los genes que codifican para las enzimas Zwf y Gnd, aumentan su expresión. Es probable que el aumento en la expresión de estos genes aumente el flujo de carbono en el brazo oxidativo de la vía de las pentosas. En tanto que en bajas velocidades de crecimiento

o cuando la bacteria utiliza fuentes de carbono de 2 a 5 carbonos (metabolismo gluconeogénico), los genes de las enzimas Zwf y Gnd se expresan a valores menores (Wolf, 1979).

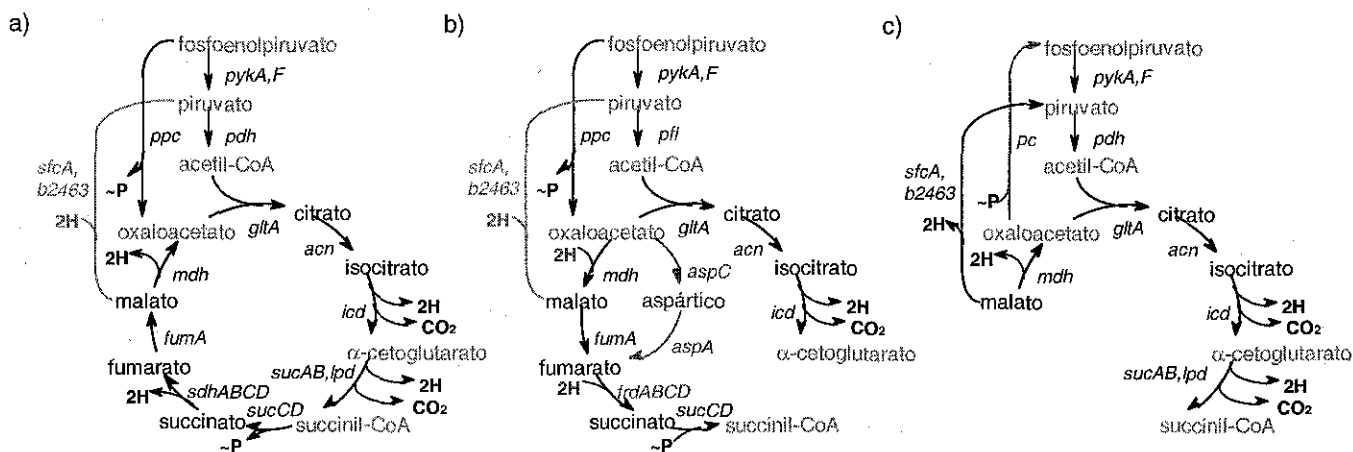
En la vía PP, a nivel de las enzimas Rpi o Rpe, es donde se incorporan al metabolismo central diversas fuentes de carbono, como pentosas, hexosas y ácidos urónicos. Se piensa que éstas fuentes de carbono son importantes para *Escherichia coli* en vida silvestre, ya que algunos son componentes comunes del lumen intestinal (Fraenkel, 1996, Lyngstadaas *et al.*, 1998)



**Figura 4.** Reacciones enzimáticas que participan en el brazo no-oxidativo de la vía de las pentosas. Los grupos transferidos en las reacciones de las enzimas Tkt o Tal están sobresaltados en color rojo, los enlaces que se rompen o se forman durante estas transferencias se denotan en anaranjado. El carbono que se epimeriza de la conformación D ↔ L, durante la reacción de la enzima Rpe se denota por un asterisco azul. Los carbonos que participan en la tautomerización ceto-enólica que cataliza la enzima Rpi se denotan en verde. Nótese que durante las reacciones catalizadas por las enzimas Rpi y Rpe no existe ninguna ruptura de enlaces carbono-carbono, por lo que para fines del presente estudio, las tres pentosas: ribosa-5-fosfato, ribulosa-5-fosfato y xilulosa-5-fosfato se pueden considerar como una sola especie de pentosa-5-fosfato (P5P).

### V.2.5 Ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA).

El ciclo de los ácidos tricarboxílicos juega dos papeles primordiales en el metabolismo de *Escherichia coli*. Primero, TCA es el responsable de la oxidación total de unidades de dos carbonos en forma de acetil-CoA, la cual se deriva principalmente del piruvato proveniente de glicólisis. Segundo, algunos de los intermediarios de TCA son precursores directos de la síntesis de aminoácidos, así como para la biosíntesis de grupos hemo. El ciclo de los ácidos tricarboxílicos, al igual que PP, es inducible en *Escherichia coli*, dependiendo, principalmente de la fuente de carbono y de la presencia o ausencia de un aceptor final de electrones en la cadena respiratoria, principalmente en forma de oxígeno (Kessler y Knappe, 1996, Nakano, 1998).



**Figura 5.** Diferentes condiciones de funcionamiento del ciclo de los ácidos tricarbóxicos en *E. coli*. En cursivas se indican los genes que codifican para las enzimas o complejos enzimáticos que catalizan las diferentes reacciones del ciclo. Las reacciones que involucran fosfoenolpiruvato y piruvato como sustratos o productos se incluyeron en esta figura debido a su estrecha relación con los compuestos de TCA, aunque no son consideradas clásicamente como reacciones de TCA. a) Reacciones generales de TCA, probablemente las presentes durante la utilización aerobia de glucosa. b) Funcionamiento de TCA en condiciones de fermentación anaeróbica de glucosa. c) Funcionamiento de TCA en utilización aerobia de compuestos dicarbóxicos, malato en este ejemplo. En rojo se consideran las reacciones cuyo funcionamiento no está plenamente caracterizado en las condiciones citadas. En azul se ejemplifican los cambios comparativamente con la situación considerada en a). Los equivalentes reductivos usados durante las diferentes reacciones están esquematizados como 2H, la energía utilizada en forma de ATP está esquematizada como ~P. (Nakano, 1998, Neidhardt, 1990, Van der Rest, 2000).

Bajo condiciones anaeróbicas, el ciclo de TCA deja de funcionar como tal, dividiéndose en dos “brazos”, uno reductivo que produce succinil-CoA y un brazo oxidativo, que produce  $\alpha$ -cetoglutarato (ver figura 5a y 5b). Bajo estas condiciones, los niveles de las enzimas que catalizan las reacciones en TCA, se encuentran de 10 a 20 veces más bajas que durante crecimiento aeróbico; en el caso de la  $\alpha$ -cetoglutarato-deshidrogenasa, ésta se encuentra prácticamente ausente.

TCA, además de producir precursores, produce poder reductor y energía, en forma de NADH, NADPH y FADH. La reoxidación de NADH y FADH se lleva a cabo por dos procesos, que dependen del receptor final de electrones: a) En metabolismo fermentativo o anaeróbico, la reoxidación se lleva a cabo por la reducción de compuestos orgánicos y b) En metabolismo de tipo respiratorio o aerobio, la reoxidación se lleva a cabo mediante la transferencia de electrones en la cadena respiratoria, donde el receptor final de electrones es el oxígeno. Como parte de la transferencia de electrones en la cadena respiratoria, se genera gran cantidad de ATP a partir de NADH y FADH, así que para *Escherichia coli*, como para

otros aerobios, los nucleótidos reducidos, en forma de NADH y FADH son la fuente principal de energía a nivel de metabolismo.

Diferentes fuentes de carbono, principalmente de 2, 3 y 4 átomos de carbono se incorporan al metabolismo central en TCA cuando son utilizados como fuente de carbono y/o nitrógeno, como fumarato, succinato, malato (ver figura 5c), y aminoácidos, (Cronan y LaPorte, 1996).

### **V.2.6 Vía de Entner-Doudoroff (ED).**

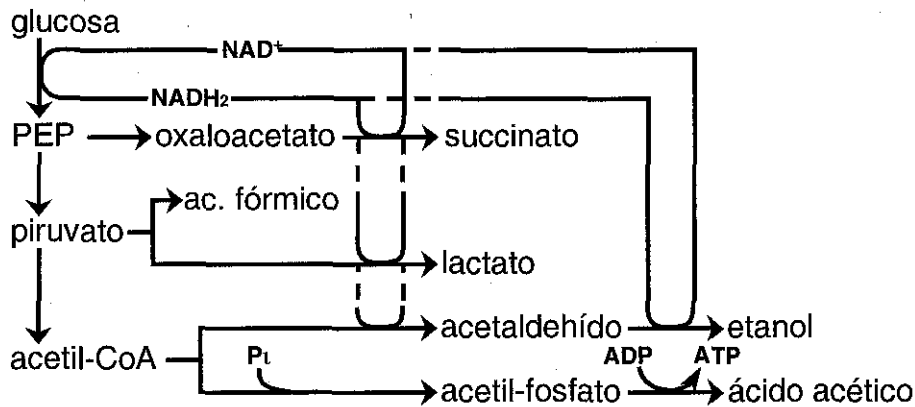
*Escherichia coli*, utiliza las enzimas que participan en la vía ED como el principal mecanismo para metabolizar gluconato, o algunos otros ácidos urónicos (figura 1). A partir de estas moléculas, se produce gliceraldehído-3-fosfato y piruvato, que continúan su catabolismo por la vía EMP y TCA. La vía de ED es inducible y la expresión de los genes *edd* y *eda*, de la vía ED están coordinados concertadamente con los genes que codifican para las enzimas que transportan y fosforilan las fuentes de carbono utilizables por esta vía, como el gluconato y los ácidos urónicos (Tong, *et al.*, 1996, Porco, *et al.*, 1997). Se ha demostrado que en presencia de la enzima Edd, el 6-fosfogluconato se metaboliza preferencialmente por esta vía (Porco, *et al.*, 1997). La 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato aldolasa (Eda), segunda enzima de la vía, es una enzima esencial para la detoxificación de diferentes compuestos productos del metabolismo en *E. coli*, ya que se ha demostrado su afinidad por diferentes ceto-desoxi-ácidos y ceto-ácidos; mutantes en el gene *eda*, son incapaces de crecer en casi cualquier fuente de carbono (Egan *et al.*, 1992).

### **V.2.7 Productos de la fermentación de glucosa.**

La conversión de glucosa hasta piruvato a través de la vía EMP, genera dos moléculas de NADH. Para mantener el flujo en esta vía, se deben regenerar la forma oxidada de este cofactor (NAD<sup>+</sup>), y esto se logra mediante la respiración aeróbica (el oxígeno es el aceptor final de electrones en este caso), o mediante la oxidación de compuestos orgánicos que posteriormete serán excretados por la célula en un proceso conocido como fermentación. El metabolismo fermentativo se presenta principalmente en condiciones de anaerobiosis (ver sección V.2.5); en ausencia de oxígeno, otros aceptores de electrones, como moléculas de carbono, pueden ser reducidas para regenerar los cofactores oxidados, requeridos en el metabolismo central. Otros aceptores finales de electrones,

utilizables por *E. coli*, como nitrato, sulfato, fumarato, etcétera, que producen patrones distintos de fermentación, no serán considerados en el presente resumen.

Los compuestos de carbono principalmente utilizados en el proceso de reoxidación de compuestos reducidos son piruvato, fosfoenolpiruvato y acetil-CoA para producir, principalmente lactato, etanol, acetato, succinato y 2,3-butanodiol. Es importante precisar que los productos de fermentación varían largamente dependiendo de la cepa, las condiciones de cultivo y la fuente de carbono. En la figura 6, se observan algunas de estas reacciones.



**Figura 6.** Productos de la fermentación de hexosas en *E. coli*. A partir de ácido fórmico se producen, además CO<sub>2</sub> y gas hidrógeno; sin embargo, estos compuestos no son detectables por procesos bioquímicos. Nótese que la producción de ácido acético no involucra la reoxidación de NADH a NAD<sup>+</sup>; sin embargo, la producción de este compuesto se ve favorecida en la bacteria debido a la producción de una molécula de ATP por molécula de ácido acético producida.

En *E. coli*, Se pueden apreciar productos del metabolismo fermentativo, aún en condiciones aeróbicas. Lo anterior se puede explicar como una incapacidad -o saturación- de la cadena respiratoria en el microorganismo, que limita la capacidad para reoxidar el NADH y FADH obtenido del metabolismo central, propiciando así el metabolismo fermentativo de la bacteria. Debido al bajo rendimiento de síntesis de ATP durante la fermentación (2 moléculas de ATP, contra aproximadamente 28 en el caso de la respiración aeróbica), una gran cantidad de carbono se tiene que derivar hacia productos de fermentación, para obtener la energía suficiente para el crecimiento (Neidhardt *et al.*, 1990).

### V.2.8 Estequiometría del metabolismo central.

Una de las ventajas principales, que facilita el estudio del metabolismo es que es "estequiométrico", es decir la misma cantidad de carbono que entra en la bacteria será recuperado como biomasa, productos excretados por la bacteria y CO<sub>2</sub>. Basados en el conocimiento actual del metabolismo microbiano, podemos conocer, con gran aproximación, la cantidad de precursores son requeridos para la síntesis de cada uno de los componentes de la célula.

En la tabla 3, se muestra la composición de 1 g de biomasa de *E. coli*, así como la cantidad de moléculas que intervienen en la síntesis de cada uno de los componentes. A partir de estos cálculos se puede determinar como se divide la glucosa entre las diferentes vías del metabolismo para justificar la producción de los diferentes esqueletos de carbono y cofactores para producir la relación de componentes presentada en la tabla 3.

**Tabla 3.** Precursores necesarios para sintetizar 1 g de biomasa de *E. coli*<sup>a</sup>.

Monómero	Cant. <sup>b</sup>	Moléculas necesarias para sintetizar 1 μmol de cada uno de estos monómeros (en μmol / μmol) <sup>c</sup> .						
		Metabolitos	ATP	NADH	NADPH	1-C	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	S
<b>Aminoácido</b>								
Alanina	488	1 PIR	0	0	1	0	1	0
Arginina	281	1 αCG	7	-1	4	0	4	0
Asparagina	229	1 OAA	3	0	1	0	2	0
Aspártico	229	1 OAA	0	0	1	0	1	0
Cisteína	87	1 G3P	4	-1	5	0	1	1
Glutamina	250	1 αCG	0	0	1	0	1	0
Glutámico	250	1 αCG	1	0	1	0	2	0
Glicina	582	1 G3P	0	-1	1	-1	1	0
Histidina	90	1 P5P	6	-3	1	0	3	0
Isoleucina	276	1 αCG, 1 PIR	2	0	5	0	1	0
Leucina	428	1 PIR, 1 ACoA	0	-1	2	0	1	0
Lisina	326	1 OAA, 1 PIR	2	0	4	0	2	0
Metionina	146	1 OAA	7	0	8	1	1	1
Fenilalanina	176	1 E4P	1	0	2	0	1	0
Prolina	210	1 αCG	1	0	3	0	1	0
Serina	205	1 G3P	0	-1	1	0	1	0
Treonina	241	1 OAA	2	0	3	0	1	0
Triptófano	54	1 P5P, 1 E4P 1 PEP	5	-2	3	0	2	0
Tirosina	131	1 E4P, 2 PEP	1	-1	2	0	1	0
Valina	402	2 PIR	0	0	2	0	1	0

**Tabla 3.** Precursores necesarios para sintetizar 1 g de biomasa de *E. coli*<sup>a</sup>. (continuación).

Monómero	Cant. <sup>a</sup>	Moléculas necesarias para sintetizar 1 $\mu\text{mol}$ de cada uno de estos monómeros (en $\mu\text{mol} / \mu\text{mol}$ ) <sup>c</sup> .						
		Metabolitos	ATP	NADH	NADPH	1-C	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	S
<b>Nucleótidos de RNA</b>								
ATP	165	1 P5P, 1 G3P	11	-3	1	1	5	0
GTP	203	1 P5P, 1 G3P	13	-3	0	1	5	0
CTP	126	1 P5P, 1 OAA	9	0	1	0	3	0
UTP	136	1 P5P, 1 OAA	7	0	1	0	2	0
<b>Nucleótidos de DNA</b>								
dATP	24.7	1 P5P, 1 G3P	11	-3	2	1	5	0
dGTP	25.4	1 P5P, 1 G3P	13	-3	1	1	5	0
dCTP	25.4	1 P5P, 1 OAA	9	0	2	0	3	0
dTTP	24.7	1 P5P, 1 OAA	10.5	0	3	1	2	0
<b>Componentes lipídicos</b>								
Glicerol-P	129	1 TP	0	0	1	0	0	0
Serina	129	1 G3P	0	-1	1	0	1	0
ác. grasos <sup>d</sup>	258	8.2 ACoA	7.2	0	14	0	0	0
<b>Componentes del lipopolisacárido</b>								
UDP-glucosa	15.7	1 G6P	1	0	0	0	0	0
CDP-etanolamina	23.5	1 G3P	3	-1	1	0	1	0
ác. mirístico	23.5	7 ACoA	6	0	11	0	0	0
KDO	23.5	1 P5P, 1 PEP	2	0	0	0	0	0
heptosa	23.5	1.5 G6P	1	0	-4	0	0	0
glucosamina	15.7	1 F6P	2	0	0	0	1	0
<b>Monómeros de péptidoglicano</b>								
Nac-GLN	27.6	1 F6P, 1 ACoA	3	0	0	0	1	0
Nac-MUR	27.6	1 F6P, 1 ACoA, 1 PEP	4	0	1	0	1	0
Alanina	55.2	1 PIR	0	0	1	0	1	0
DAP	27.6	1 OAA, 1 PIR	2	0	3	0	2	0
Glutámico	27.6	1 $\alpha$ CG	0	0	1	0	1	0
<b>Monómeros de glicógeno</b>								
Glucosa	154	1 G6P	1	0	0	0	0	0
<b>Esqueletos para metabolismo C-1</b>								
Serina	48.5	1 G3P	0	-1	1	0	0	0
<b>Poliaminas</b>								
Ornitina	59.3	1 $\alpha$ CG	2	0	0	0	2	0

<sup>a</sup>. Algunos componentes celulares no tomados en cuenta para el presente cálculo (menos del 3 % del peso seco): NAD<sup>+</sup>, NADP<sup>+</sup>, CoA, CoQ, bactoprenoides, tetrahidrofolato, cianocobalamina, piridoxal-fosfato, FMN, FAD, biotina, citocromos, ácido lipóico, tiamina-pirofosfato. Las abreviaciones están reportadas según el apéndice 1 de la presente tesis.

<sup>b</sup>. En  $\mu\text{mol} / \text{g}$  peso seco.

<sup>c</sup>. Los valores positivos significan utilización del cofactor correspondiente; los valores negativos significan producción del cofactor correspondiente.

<sup>d</sup>. Los valores muestran el promedio de ácidos grasos encontrados en *E. coli*.

### V.3 Ingeniería de vías metabólicas.

#### V.3.1 Conceptos generales.

La ingeniería del metabolismo, o ingeniería de vías metabólicas tiene como finalidad principal el análisis y modificación dirigida de las vías metabólicas con fines específicos. Esta área del conocimiento emerge durante la década pasada, y, auxiliada por técnicas de biología molecular, se ha convertido en punto focal de los estudios de biología, ingeniería bioquímica, fisiología celular y microbiología aplicada. En los últimos años, existen muy variados reportes de manipulación exitosa del metabolismo central en diferentes sistemas biológicos para la producción de aminoácidos, solventes, antibióticos y vitaminas.

Como todas las áreas de la ingeniería, la ingeniería del metabolismo también incluye dos niveles definidos de estudio, el *análisis* y la *síntesis*. Debido a que la ingeniería del metabolismo se desarrolló de forma importante auxiliada por el avance en las técnicas de DNA recombinante, los estudios publicados hasta la fecha, se han centrado esencialmente en la parte “sintética”, de la ingeniería del metabolismo. Así, la Ingeniería del metabolismo se expresó inicialmente como la manifestación tecnológica de la biología molecular aplicada; con pocos estudios de ciencia básica o de “*análisis*”.

Aunque la definición exacta de la Ingeniería metabólica varía dependiendo del autor, todos coinciden en las metas generales y conceptos de esta disciplina. Podemos definir a la ingeniería metabólica como “*el mejoramiento dirigido de la producción de algún compuesto o propiedad celular mediante la modificación específica de alguna(s) reacción(es) bioquímica(s), o la introducción de otra mas, distinta y nueva en el organismo de estudio*”. Las estrategias de biología molecular de las que la ingeniería del metabolismo se aprovecha para lograr sus objetivos pueden ser: la amplificación, la inhibición, delección, transferencia, desregulación o modificación por cambio de pares de bases, en la secuencia nucleotídica de uno o varios genes específicos (y por lo tanto, de las enzimas para las que dichos genes codifican).

Otro concepto importante, en el aspecto “sintético”, de la ingeniería del metabolismo, es el de un metabolismo “*integrado*”, en lugar de pensar en el metabolismo como una serie de reacciones individuales. Así, los estudios del metabolismo deben examinar la “*red metabólica*”, de forma integral (Stephanopoulos *et al.*, 1998).



Para realizar estudios de ingeniería del metabolismo, se requiere del mayor conocimiento posible de las características metabólicas del sistema biológico en estudio. Para lograr este objetivo, se debe estudiar el metabolismo celular apoyándose en distintas herramientas y enfoques, principalmente de estudios bioquímicos, genéticos y, recientemente, del análisis del metabolismo por técnicas de marcaje isotópico de carbono-13. A continuación se detallan los alcances e importancia de la caracterización del metabolismo celular mediante cada una de las tres estrategias.

### **V.3.2 Herramientas y enfoques para el estudio del metabolismo de carbono**

#### **V.3.2.1 Caracterización bioquímica.**

La caracterización clásica de las propiedades de los microorganismos o de componentes de ellos, se ha llevado a cabo principalmente en base a sus características bioquímicas, observables según ensayos *in vitro*, o a partir de los productos que excretan estos sistemas. Sin embargo, las condiciones osmóticas, de pH, de viscosidad, y de concentración de las diferentes especies químicas en el interior celular son, o pueden ser muy distintas de las observadas en los ensayos *in vitro*. Por lo anterior es probable que los parámetros obtenidos, por ejemplo, en el caso de ensayos enzimáticos, sean o no paralelos a lo que sucede en el sistema *in vivo*. Otras técnicas desarrolladas de análisis de las propiedades celulares son las que involucran la microscopía. Estas técnicas han sido auxiliadas de forma importante por el descubrimiento de marcadores biológicos, como la proteína verde fluorescente (GFP), o variaciones de la misma con distintos espectros de absorción, que ayudan a comprender mejor la organización y/o compartimentalización de los distintos componentes de la células; sin embargo, para el estudio del metabolismo microbiano, la organización, por ejemplo de una vía metabólica, si es que existe alguna compartimentalización de la misma, ofrece pocos o ningún dato acerca de su funcionamiento *in vivo*, dado que la presencia de algún componente celular no asegura que éste se encuentre activo. Sin embargo, el conjunto de todos estos estudios han generado una visión más completa del metabolismo celular. Con base en el análisis de RNAm, de actividades específicas enzimáticas, así como en la cuantificación de diferentes productos de fermentación, se conoce con detalle, el funcionamiento del ciclo de los ácidos tricarbóxicos en distintas situaciones metabólicas (ver figura 5). De igual forma, se ha establecido prácticamente toda la red metabólica de *E. coli* y otros sistemas biológicos, así

como su funcionamiento bajo distintas condiciones metabólicas. Sin embargo, el mismo tipo de estudios no han podido certificar el funcionamiento o no de la vía de ED, en particular de la enzima Edd, cuando *E. coli* utiliza glucosa como fuente de carbono. Casos similares se pueden demostrar para la participación del ciclo del glioxal, la presencia/ausencia de ciclos fútiles o la participación de las enzimas málicas (Mez) en las mismas condiciones ni tampoco la dirección en que actúan (ver figura 5); así como muchos otros aspectos del funcionamiento celular.

#### **V.3.2.2 Caracterización genética.**

Otra técnica de gran utilidad para la caracterización del metabolismo ha sido la modificación (dirigida o al azar) de diversos genes. Sin embargo este tipo de modificaciones tiene en la mayoría de los casos, efectos difíciles de predecir dentro del sistema biológico. La mayoría de las modificaciones dirigidas hacia un gene en particular son del tipo “knockout”; el efecto de esa modificación es, generalmente de -todo o nada-, y el resultado observable se encuentra entre los mismos límites (un máximo o un mínimo), por lo que la interpretación del efecto de dicha modificación será válido sólo cuando sea explicado en los mismos términos. Por ejemplo, la mutación de un gene X, relacionado con más de una función, tendrá efecto en su función principal e insustituible, como la utilización o no de un carbohidrato; sin embargo, las consecuencias de sus funciones secundarias podrían verse “enmascaradas” por la presencia de otros genes que cubran funciones similares y la capacidad de adaptación de la red metabólica o de la respuesta fisiológica celular (un término conocido como “*robustness*”). El efecto de la manipulación del gene X, que tenga una función única e insustituible dentro de una red metabólica (por ejemplo, la conversión de un metabolito C en el metabolito D), va más allá de la modificación del gene de estudio y se relacionan con las consecuentes variaciones en la disponibilidad de los metabolitos C o D. Quizá la mayor y más acertada información a partir de la modificación de un gene en particular, se obtiene en los casos donde este funcione sólo en un punto específico del metabolismo y esencialmente no forme parte central de la red metabólica.

### V.3.2.3 Análisis por Resonancia Magnética Nuclear (RMN).

La espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) se basa en el análisis del espín nuclear que presentan diferentes átomos con carga nuclear o masa nuclear impar, como  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  o  $^{31}\text{P}$ . El campo magnético resultante puede ser analizado, así como los efectos que campos magnéticos de núcleos  $N = \text{impar}$ , cercanos en el espacio ( $\text{Å}$ ) o vecinos y que interaccionen entre ellos. La RMN es una técnica no destructiva, usada intensivamente para el estudio fino a nivel estructural de muy diversas moléculas en química orgánica. Típicamente en estudios de RMN se utiliza la abundancia natural de cada uno de los diferentes isótopos para hacer estudios de moléculas particulares. Debido a que el  $^{13}\text{C}$  conforma aproximadamente el 1 % de la abundancia natural de este elemento, la  $^{13}\text{C}$ -RMN se vió limitada en sus inicios a la sensibilidad de los aparatos para analizar esta cantidad tan pequeña del isótopo  $^{13}\text{C}$ . Posteriormente se desarrollaron equipos con mayor capacidad para analizar  $^{13}\text{C}$ -RMN, aumentando la sensibilidad de los mismos así como mayor especificidad en los métodos de análisis (secuencias de pulsos electromagnéticos). El procesamiento de datos en los espectros de resonancia de mediante la ecuación transformada de Fourier ó FT, aumentó de manera importante la aplicabilidad de la RMN al estudio de diferentes moléculas, aumentando el rango de experimentos que era posible realizar, así como la sensibilidad de los mismos.

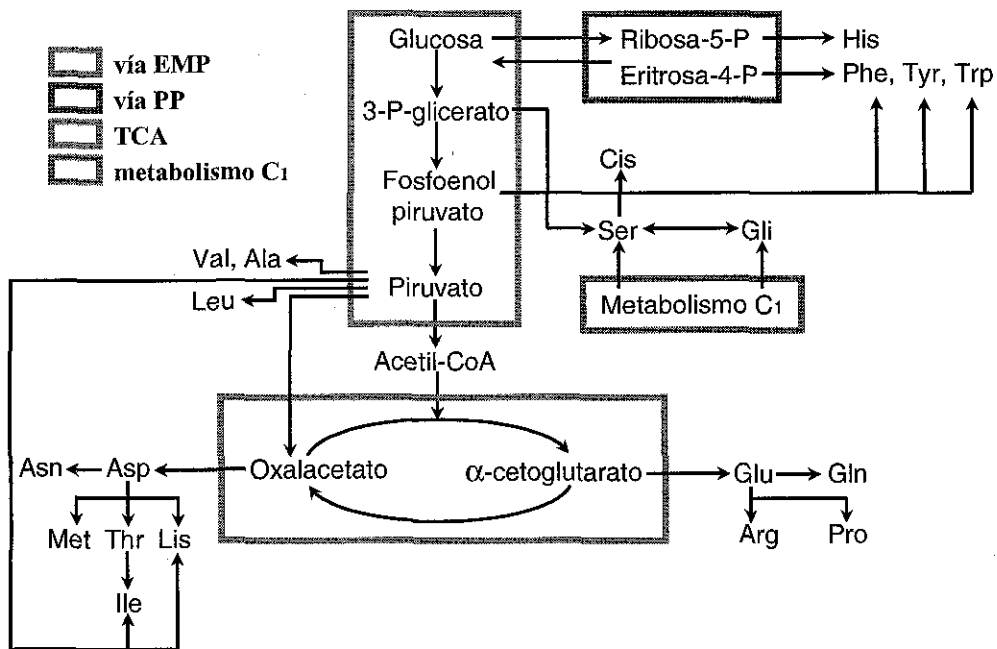
Mediante el uso de moléculas enriquecidas (sintéticas), en alguna de sus posiciones con algún isótopo observable por RMN, principalmente  $^{13}\text{C}$ , se han diversificado los estudios de RMN. El mismo razonamiento ha sido válido para la sustitución de un átomo de  $^1\text{H}$ , que presenta señal de RMN, por otro de  $^2\text{H}$  (o D), que presenta señal en una frecuencia diferente.

#### V.3.2.3.1 Marcaje isotópico de $^{13}\text{C}$ . Consideraciones generales.

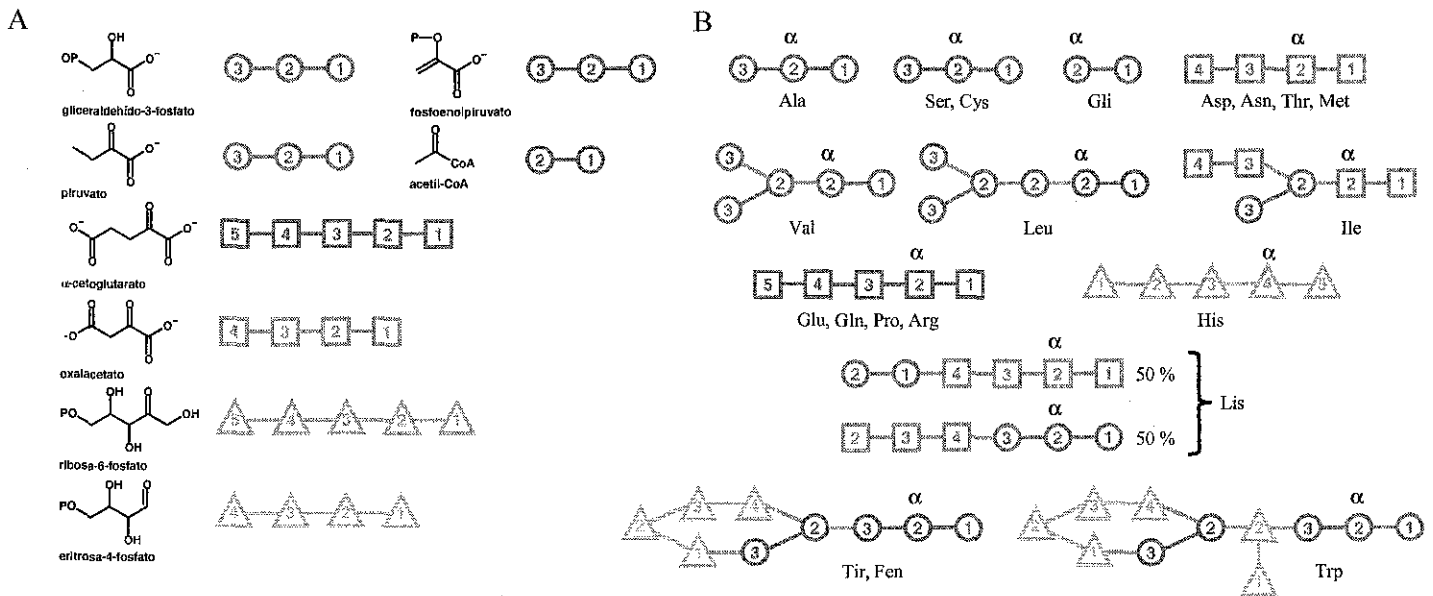
La células vivas poseen una intrincada red metabólica, y uno de los mayores problemas para la ingeniería del metabolismo es que la respuesta a una modificación dentro de esta red es difícilmente predecible, haciendo compleja su manipulación. De hecho, las dificultades para predecir el efecto de una modificación genética, en particular las relacionadas con el metabolismo central y su regulación, constituye uno de los principales retos de la ingeniería de vías metabólicas. La eficiencia final de los experimentos realizados como parte de los estudios de la ingeniería del metabolismo, depende, de forma importante

de las herramientas analíticas de que se disponga para monitorear la respuesta celular a la modificación que se esté estudiando. Es importante el estudio de algunos de los intermediarios de las vías EMP, PP y TCA (ver los precursores metabólicos en las figuras 1, 7 y 8), ya que ellos constituyen la columna vertebral del metabolismo.

Una de las características principales del metabolismo, es que es “concertado y coordinado”, es decir está estrechamente relacionado de forma secuencial y es poco variable entre los sustratos de sus reacciones y los productos obtenidos, por lo tanto una enzima tendrá un papel específico y diferenciado de otras. La especificidad de sustratos y productos de cada reacción metabólica, que a su vez serán utilizados por reacciones posteriores en el metabolismo, puede ser aprovechada para conocer o predecir cual será la estructura y el destino final de cada uno de los átomos de carbono iniciales de la reacción, o grupos de reacciones. El mismo razonamiento es válido para la síntesis de aminoácidos, (figuras 1 y 8). Sin embargo, para el caso de los precursores del metabólicos, el metabolismo central ofrece distintas posibilidades para resolver la conversión del metabolito inicial o “fuente de carbono”, por ejemplo, glucosa, en los mismos (figura 1).



**Figura 7.** Precursores metabólicos de la síntesis de aminoácidos.



**Figura 8.** Esqueletos carbonados de los 20 aminoácidos proteínogénicos en *E. coli*, así como de sus precursores. En la sección A, se esquematizan los esqueletos de carbono de los precursores metabólicos y se diferencian por colores, los aminoácidos proteínogénicos a los que dan origen y las posiciones que ocupa cada carbono del precursor en el aminoácido final se ejemplifica en la sección B. Las predicciones de conectividad de los esqueletos de carbono de los aminoácidos proteínogénicos consideran su biosíntesis en condiciones de metabolismo anabólico en glucosa como fuente de carbono. Los enlaces representados en gris denotan que ambos carbonos no provienen de la misma molécula precursora. El carbono  $\alpha$ - de cada aminoácido está marcado por el símbolo  $\alpha$  arriba del mismo.

Debido a que la abundancia natural de aminoácidos y otros productos del metabolismo microbiano, es considerablemente pequeña en relación a los procesos para los que inicialmente fue diseñada la RMN, se hizo necesario el enriquecimiento de las moléculas iniciales (fuentes de carbono) a través del marcaje de éstas con  $^{13}\text{C}$ . Este hecho es de particular importancia para los estudios de flujos de carbono, ya que la utilización de mezclas de moléculas marcadas con moléculas no marcadas isotópicamente es clave para diferenciar la participación de diferentes vías metabólicas (ver más adelante).

La RMN ha sido aplicada de forma exitosa en el análisis de diferentes productos del metabolismo, de extractos celulares y medio de crecimiento, así como para elucidar patrones biosintéticos. Los primeros trabajos que utilizaron el marcaje de  $^{13}\text{C}$  en biosíntesis, fueron los realizados por Seto *et al.*, (1973), McInnes *et al.*, (1974) y London *et al.*, (1975). Sin embargo, esos estudios se dedicaron principalmente a elucidar la estructura covalente de productos del metabolismo secundario. Otras aplicaciones reportadas de marcaje de  $^{13}\text{C}$  en el marcaje de péptidos y proteínas fueron las realizadas posteriormente por Senn *et al.* (1989), Neri *et al.*, (1989), Szyperski *et al.*, (1992) y Wüthrich *et al.*, (1992).

Recientemente, el grupo del Dr. Uwe Sauer (Maaheimo *et al.* 2001), ha descifrado por primera vez la matriz metabólica de un microorganismo, *Saccharomyces cerevisiae*, utilizando marcaje isotópico de  $^{13}\text{C}$  y el análisis matemático de las moléculas resultantes marcadas según los patrones biosintéticos de la levadura. Sin embargo, un estudio similar en *E. coli* o algún otro sistema biológico aún no ha sido publicado. Los estudios de RMN para definir flujos de carbono en diferentes sistemas biológicos han sido extensivamente usados; sin embargo, dichos estudios sólo se han dedicado a establecer flujos parciales del metabolismo, conversiones de sustrato a producto en sistemas específicos o a definir la posible participación de alguna enzima en el metabolismo de carbono en condiciones particulares.

El marcaje de los aminoácidos se obtiene creciendo la bacteria en medio mínimo conteniendo una mezcla de una cantidad específica de glucosa marcada uniformemente en todos sus átomos de carbono, por ejemplo  $^{13}\text{C}_6$ -glucosa (UL- $^{13}\text{C}$ -glucosa, por sus siglas en inglés), o glucosa marcada en alguno de sus átomos de carbono, como [1- $^{13}\text{C}$ ]glucosa; con moléculas de glucosa no marcadas (con abundancia natural de  $^{13}\text{C}$  igual al 1 %), debido a que la mayor información se obtiene de la combinación de moléculas marcadas con moléculas no marcadas, tanto la utilización del 100 % de UL- $^{13}\text{C}$ -glucosa como de glucosa natural, no provee información útil para el cálculo de flujos de carbono.

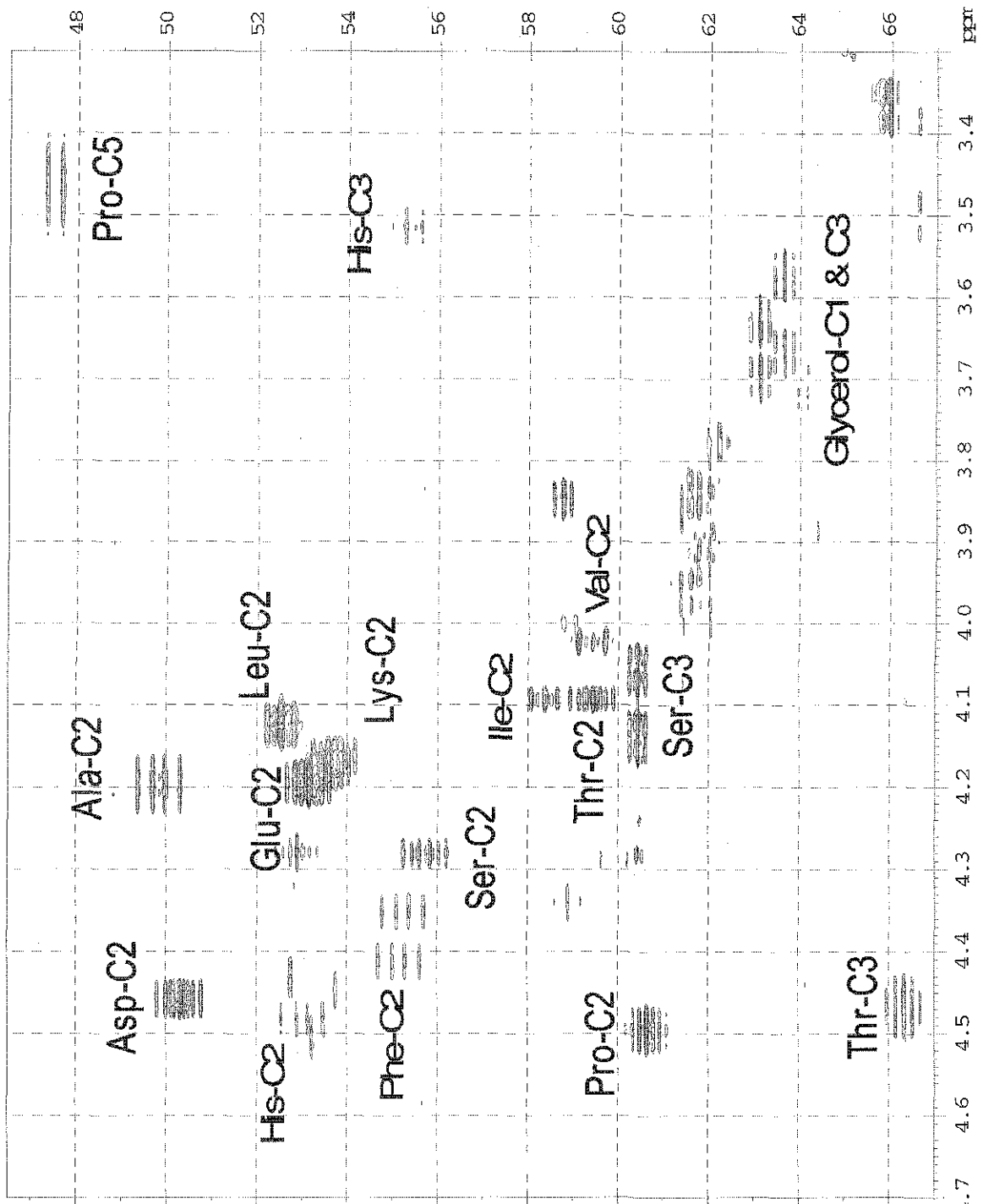
La probabilidad de que un átomo de  $^{13}\text{C}$  tenga como vecino a otro átomo igual de forma natural es de sólo del 1 %. Por el contrario, la aparición de dos  $^{13}\text{C}$  vecinos entre si que provengan de una misma molécula inicial, aumenta de forma directa de acuerdo con la concentración inicial de UL- $^{13}\text{C}$ -glucosa, siempre y cuando la concentración inicial de UL- $^{13}\text{C}$ -glucosa no rebase valores que aumenten la posibilidad de recombinación entre moléculas de UL- $^{13}\text{C}$ -glucosa provenientes de distintas vías metabólicas. La concentración de UL- $^{13}\text{C}$ -glucosa aceptada como la más adecuada para el estudio de flujos de carbono es del 10 %. En el presente estudio se eligió usar una combinación del 10 % de UL- $^{13}\text{C}$ -glucosa y el 90 % restante de [1- $^{13}\text{C}$ ]glucosa, ya que bajo estas condiciones sólo el C-1 de la glucosa estará marcado al 100 %, lo que no contraviene lo explicado en el párrafo anterior ya que a nivel de la triosa-fosfato-isomerasa (Tpi), sólo 50 % del G3P estará marcado en C-3. Otro motivo por el cual fue importante usar un 100 %  $^{13}\text{C}$  en C-1 de la glucosa fue porque era interesante analizar el flujo sobre la vía de las pentosas, donde por

cada molécula de glucosa que se procese por el brazo oxidativo de la vía de las pentosas, se producirá una molécula de  $^{13}\text{CO}_2$ , (ver figura 1).

Como se verá más adelante, los estudios de RMN de aminoácidos marcados se basa en los enriquecimientos de  $^{13}\text{C}$  de los mismos en ciertas posiciones del esqueleto de carbono, es decir, de la concentración de distintos isómeros isotópicos o "isotopómeros", de los aminoácidos. El seguimiento de la conectividad de los enlaces covalentes  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  a través de las diferentes conversiones producto del metabolismo, es la característica que provee mayor cantidad de información.

A partir de  $^{13}\text{C}$ -glucosa y debido a que los esqueletos carbonados de los aminoácidos se encuentran marcados según los distintos flujos y el estado regulatorio de las vías metabólicas, la señal correspondiente a cada aminoácido, será la de una mezcla de isotopómeros, que servirá como prueba para examinar los flujos de carbono del metabolismo central que la originó.

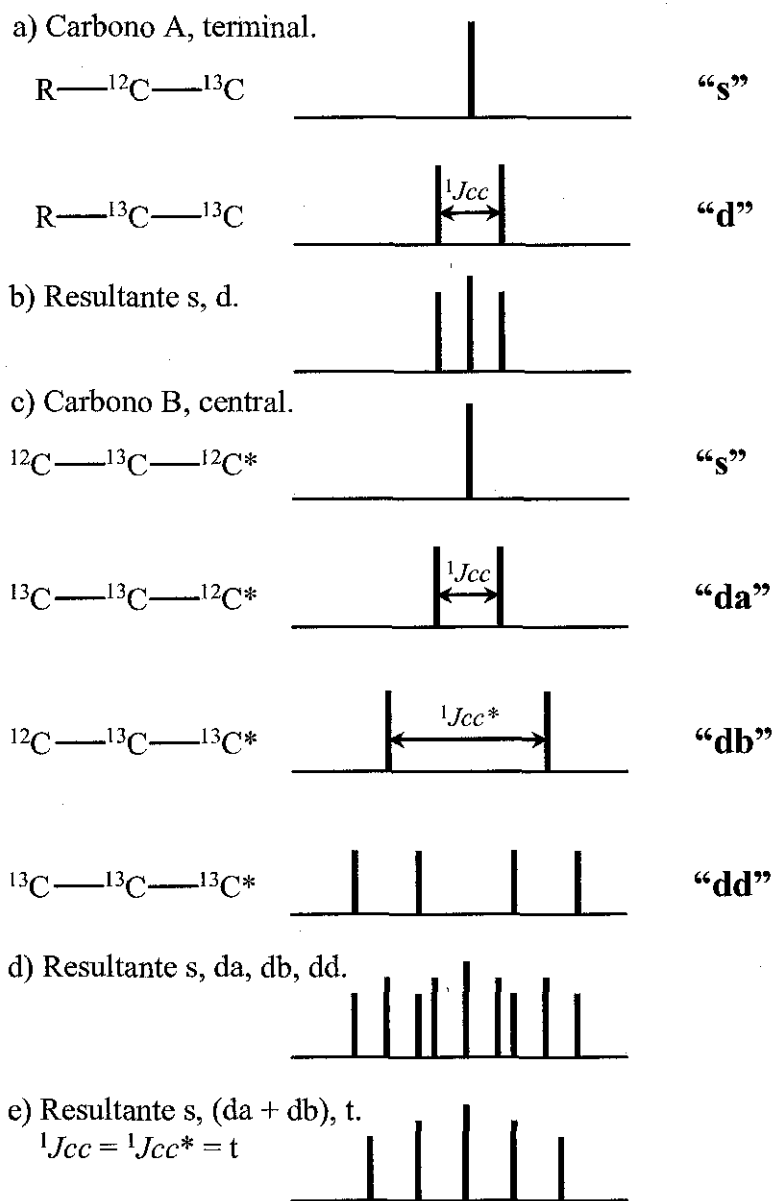
Para el estudio de las mezclas de isotopómeros provenientes de la hidrólisis ácida de los aminoácidos proteinogénicos se utiliza la técnica de análisis de correlación de espín nuclear  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  de RMN conocida como  $2\text{D}[^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ ]-COSY, que presenta la ventaja de que se pueden analizar todos los componentes producto de la hidrólisis en un solo experimento (ver figura 9). La técnica  $2\text{D}[^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ ]-COSY, se basa en la observación de las interacciones dipolares  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  y la interacción de este dipolo con el elemento de carbono al que está directamente asociado; por lo tanto, sólo los átomos de  $^{13}\text{C}$  unidos directamente a algún átomo de  $^1\text{H}$  son observables en un experimento rutinario de  $2\text{D}[^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ ]-COSY. Las constantes de acoplamiento a un enlace ( $^1J_{\text{CC}}$ , ver figuras 10 y 11) son lo suficientemente fuertes para ser resueltas en el eje  $^{13}\text{C}$ ; debido a esto, la estructura fina de  $^{13}\text{C}$  se determina únicamente para los carbonos directamente unidos al carbono base (el del acoplamiento  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ ). La multiplicidad de señales, observada para los acoplamientos de  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  en un espectro de  $2\text{D}[^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ ]-COSY, de la hidrólisis de biomasa marcada con  $^{13}\text{C}$ , es una superposición de las señales características de cada uno de los isotopómeros de la molécula en particular. En la figura 10, se esquematizan los patrones más relevantes de marcaje isotópico provenientes de un esqueleto de carbono alifático. La figura 11, muestra el producto de la extracción del multiplete correspondiente al ácido aspártico del espectro  $2\text{D}[^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ ]-COSY en el eje de  $^{13}\text{C}$ , en la misma figura se detallan las señales correspondientes para cada isotopómero del ácido aspártico.



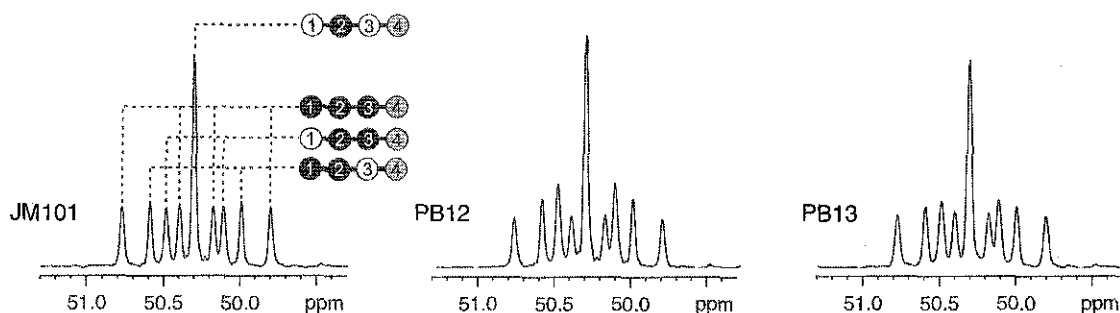
**Figura 9.** Espectro COSY del hidrolizado de *E. coli* JM101. El espectro fué obtenido a 100 MHz  $^{13}\text{C}$  y 400 MHz  $^1\text{H}$ . Ala: alanina, Asp: ácido aspártico, Gli: glicerol, Glu: ácido glutámico, His: histidina, Leu: leucina, Lys: lisina, Phe: fenilalanina, Pro: prolina, Ser: serina, Thr: treonina, Val: valina.

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN





**Figura 10.** Distintos patrones de señales de conectividad C-C esperados en el espectro de <sup>13</sup>C-NMR. Para un carbono ubicado en el extremo de la molécula (carbono A, en la sección a), existen sólo dos posibilidades: que el carbono A se encuentre unido a un átomo de <sup>12</sup>C, en cuyo caso presentará una señal única conocida como singulete “s”, o que se encuentre unido a un átomo de <sup>13</sup>C, en cuyo caso la señal se dividirá en dos. A este último tipo de señal, se le conoce como doblete o “d” y aparece centrado donde originalmente estaría la señal -s-. La distancia entre las dos señales se conoce como constante de acoplamiento y se denota por <sup>1</sup>J<sub>cc</sub> y se anota en Hertz. La señal resultante para este compuesto (sección b), es el resultado de la superimposición de s y d, y es una relación directa de la concentración de cada isotópomo. En la sección c, que muestra el caso de un <sup>13</sup>C central en alguna molécula, dependiendo del marcaje obtenido, se pueden esperar hasta nueve líneas para el conjunto de señales correspondientes a la mezcla de isotópomos de la molécula en estudio. Dependiendo de la distribución de átomos de carbono alrededor del <sup>13</sup>C central en la molécula, éste presentará señales del tipo -s-, -da-, -db- y -dd-. Si las constantes de acoplamiento <sup>1</sup>J<sub>cc</sub> (para -da-) y <sup>1</sup>J<sub>cc\*</sub> (para -db-), son distintas, se presentará la multiplicidad de señales denotada en la sección d. Para el caso contrario, las señales obtenidas serán del tipo de la que se muestra en la sección e; en este caso la señal para el acoplamiento entre el carbono base y sus vecinos, en el caso que ambos sean <sup>13</sup>C, será un triplete o “t”.



**Figura 11.** Multipletes del C-2 de ácido aspártico de distintas cepas de *E. coli*. Las diferencias en los perfiles de cada multiplete significan diferencias en la concentración de cada isotópomo de esta molécula. Los átomos de  $^{13}\text{C}$  se denotan por los círculos negros. Los átomos de  $^{12}\text{C}$  se denotan por los círculos blancos. Los círculos grises demuestran el caso en que no se conoce el estado isotópico del carbono correspondiente.

### V.3.2.3.2 Análisis del metabolismo anabólico por técnicas de RMN.

Las principales vías biosintéticas que están relacionadas a la síntesis de aminoácidos cuando *E. coli* crece en medio mínimo usando glucosa como fuente de carbono se muestran en la figura 12. De acuerdo a este esquema, los esqueletos de carbono de los aminoácidos proteinogénicos se derivan de ocho intermediarios del metabolismo: fosfoenolpiruvato (PEP), y piruvato, intermediarios de la vía EMP; oxalacetato y  $\alpha$ -cetoglutarato, intermediarios de TCA, ribosa-5-fosfato y eritrosa-4-fosfato, de la vía PP y acetil-CoA que proviene principalmente de piruvato. Adicionalmente, glicina y serina están directamente relacionadas con el metabolismo de C1. Considerando un metabolismo esencialmente anabólico para la síntesis de aminoácidos, cada átomo de carbono presente en la aminoácidos proteinogénicos se puede rastrear desde los precursores mencionados anteriormente como se muestra en la figura 13.

Los esqueletos carbonados de los aminoácidos proteinogénicos se pueden obtener mediante hidrólisis ácida de la proteína celular. Durante este proceso, los aminoácidos triptófano y cisteína se pierden por oxidación; la glutamina y la asparagina, se convierten en ácido glutámico y aspártico, respectivamente, por pérdida del grupo amino. Como resultado del análisis de cada una de las señales extraídas del espectro de  $2\text{D}[^{13}\text{C}\text{-}^1\text{H}]\text{-COSY}$ , se puede calcular la concentración de cada uno de los isotopómeros y, a partir de ellos, por modelamiento matemático, obtener los flujos que dan origen al marcaje obtenido. Mediante análisis de este tipo se podrá enriquecer el conocimiento del metabolismo central no sólo de *E. coli*, sino de prácticamente cualquier ser vivo y de la respuesta a modificaciones genéticas, de fuente de carbono o ambientales.

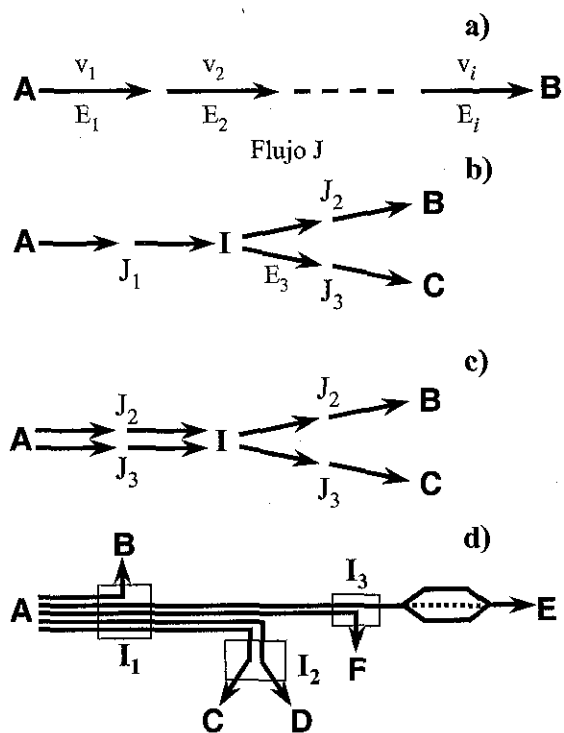
### V.3.3 Flujos metabólicos.

Quizá alguna de las mayores aportaciones de la ingeniería del metabolismo es el énfasis para lograr la comprensión de los flujos metabólicos y su control *in vivo*. El concepto de flujo metabólico ha sido parte del estudio de los bioquímicos desde hace más de 30 años y el resultado de este trabajo ha dado lugar a importantes aportaciones para la comprensión del metabolismo en general. La combinación de métodos analíticos para cuantificar los flujos de carbono y el uso de técnicas de biología molecular para incorporar cambios genéticos específicos, con la finalidad de modificar el flujo de carbono para “*eficientar*” la conversión de un sustrato en producto final, es la esencia de la ingeniería del metabolismo.

El *flujo*, es un determinante fundamental para la fisiología celular, y el parámetro más crítico de una vía metabólica, en una vía metabólica lineal, el “*flujo*”  $-J-$ , es igual a la velocidad de las reacciones individuales en estado estacionario (figura 12-a). Para una vía metabólica divergente (figura 12-b), separándose a nivel del intermediario I, habrá flujos para cada uno de las siguientes vías, relacionadas de forma:  $J_1 = J_2 + J_3$ . Obviamente el flujo  $J_1$ , será la suma de sus dos componentes finales  $J_2 + J_3$ , (figura 12-c). Sin embargo, la red metabólica usualmente se comporta de la forma esquematizada en la figura 12-d, donde el flujo se puede descomponer en varias vías lineales, cada una con sus respectivos flujos (12-b, 12-d).

Debido a que las vías metabólicas y sus flujos conforman el centro de los estudios de la ingeniería metabólica, debemos marcar la definición más exacta de los mismos: una vía metabólica es cualquier secuencia de reacciones bioquímicas posibles y existentes que relacionan un conjunto específico de metabolitos iniciales y finales o sustratos y productos. El flujo metabólico es definido como la velocidad a la que los metabolitos iniciales son convertidos en los metabolitos finales. Aunque comúnmente existe más de una posibilidad para que un metabolito se convierta en otro, si los flujos de estas conversiones no pueden ser demostrados experimentalmente, su inclusión no proveerá información adicional. Por lo que es conveniente, en el caso de estos flujos no determinados (líneas continuas  $I_3 \rightarrow E$ , en la figura 12-d), agruparlos en un flujo común y observable de conversión de compuestos (línea punteada  $I_3 \rightarrow E$ , figura 12-d). Por supuesto, el análisis exhaustivo de la red metabólica, y la generación de técnicas cada vez más informativas sobre el estado de la misma, los flujos metabólicos y la concentración de los intermediarios en el estado

estacionario, proveerá a los siguientes estudios con mayores y mejores herramientas de estudio de la red metabólica integral y particular para cada microorganismo. La determinación de los flujos metabólicos *in vivo*, conocida como análisis de flujos metabólicos o MFA, según sus siglas en inglés, es de importancia central para la ingeniería metabólica. Es importante enfatizar que el flujo de una vía metabólica no se modifica conforme varía la actividad específica de alguna enzima en particular que participe como parte de un cierto grupo de reacciones. La única información de la que podemos estar seguros a partir de un ensayo de actividad específica *in vitro*, es si la enzima correspondiente está presente y activa en las condiciones del ensayo. La inclusión de este tipo de estudios continuamente ha llevado a interpretaciones erróneas asignándose a esta actividad, un flujo en particular, lo que es ciertamente incorrecto para llegar a conclusiones precisas (Stephanopoulos et al., 1998).



**Figura 12.** Ejemplos simplificados de vías metabólicas. Las letras **A-F**, significan los sustratos o productos participantes en esta vía metabólica hipotética.  $v_1-v_i$ , significan las velocidades de conversión de sustrato a producto de las conversiones específicas.  $J_1-J_3$ , significan los flujos de carbono del grupo de conversiones particulares. I, o  $I_1-I_3$ , simbolizan nodos.

Otra etapa del análisis del metabolismo es la introducción de perturbaciones claramente definidas al mismo, para fines de su estudio preciso. Debido a que la mayoría de las modificaciones al metabolismo se enfocan en nodos, como el de la figura 12-b, se pueden tener como blanco de forma selectiva cada uno de los tres flujos participando en el nodo del compuesto I. Sin embargo, debemos hacer notar que, cualquier perturbación a la red metabólica, podrá tener efecto sobre más de un nodo de la red; esto puede ser aprovechado para el estudio de la misma, minimizando así el número de experimentos que se requieren para su estudio y establecimiento de una red metabólica real (Stephanopoulos *et al.*, 1998).

La etapa final en la determinación del análisis de control de flujos en la ingeniería del metabolismo, es el análisis de la perturbación de un flujo en particular. La perturbación de cualquiera de los tres flujos en la figura 12-b, nos permite determinar la flexibilidad del nodo en particular, por ejemplo, si una modificación importante del flujo  $J_1$  no tiene efecto sobre la magnitud individual o distribución de los flujos  $J_2$  y  $J_3$  (*relación de flujos* o *flux split ratio*), entonces el nodo se comportará como “rígido” a la modificación en el flujo  $J_1$ . La perturbación del flujo en  $J_1$ , puede o no tener efecto sobre la concentración fisiológica de I. Incluso, si la concentración de I cambia, es posible que sólo exista una pequeña variación en los flujos subsecuentes.

Después del estudio y el establecimiento de los parámetros principales de una red o vía metabólica, el investigador debe implementar aquellos cambios que parecieran ser los más efectivos para lograr un objetivo específico, como podría ser la conversión máxima de un metabolito B, a partir del precursor A. Si, por ejemplo en la figura 12-b, el metabolito B es el producto de interés, y si el nodo I es “flexible”, con respecto a las modificaciones en el flujo que lleva al metabolito C, la mejor producción de B se logra eliminando la enzima  $E_3$ . Esto producirá una auxotrofia del metabolito C, el cual se deberá proveer de forma controlada según las necesidades de crecimiento celular y/o producción. Otra alternativa sería la de retener cierta actividad residual de la enzima  $E_3$ , para que el metabolito C sea producido de forma endógena, eliminando así la necesidad de proveerlo a la bacteria o sistema de producción (Stephanopoulos *et al.*, 1998).

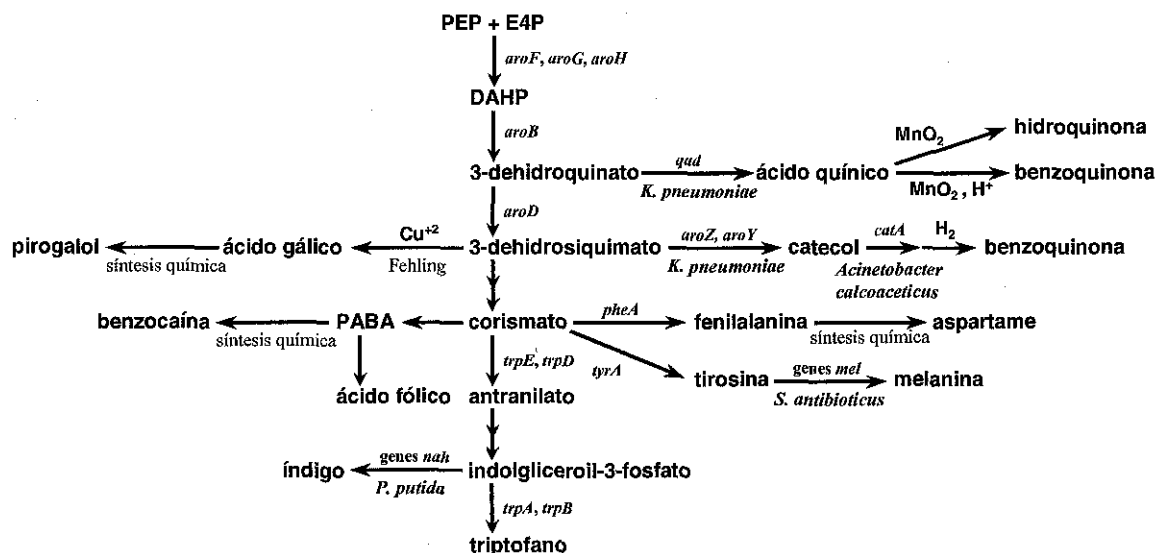
El conocimiento del control biológico del metabolismo celular facilitará el diseño del perfil óptimo enzimático y bioquímico de un sistema biológico en particular. Este conocimiento será así, un complemento de la biología molecular para la modificación

genética de microorganismos con fines de producción o de mejoramiento de alguna característica celular en particular. De hecho, la biología molecular ha avanzado tan rápidamente que el análisis racional de la red metabólica para la identificación de los genes y enzimas “blanco”, se ha convertido en el paso limitante de la optimización dirigida de la función celular. Además, actualmente no todos los procesos biotecnológicos son completamente competitivos con los procesos establecidos comunes de síntesis química, sin embargo, existe un sentido general en la comunidad industrial, económica y científica, que ambas áreas están avanzando a diferentes velocidades y el cruce de caminos ocurrirá pronto. Los procesos biotecnológicos en general, tienen la gran ventaja de la selectividad del producto final, lo que posiblemente esa será la fuerza vital que acelerará este cambio; a este respecto, la ingeniería metabólica funciona como el catalizador de la industria biotecnológica (Stephanopoulos *et al.*, 1998).

#### **V.3.4 Ingeniería del metabolismo para la producción de compuestos de interés: moléculas aromáticas.**

La mayoría de los microorganismos poseen la maquinaria suficiente para la biosíntesis de todos los aminoácidos esenciales. Tradicionalmente, la principal fuente para la obtención de aminoácidos puros eran las proteínas y en menor grado, la síntesis química. Un evento importante fue el descubrimiento de una bacteria que excretaba grandes cantidades de glutamato, la bacteria fue nombrada *Corynebacterium glutanicum*, y es capaz de excretar, bajo ciertas condiciones hasta 100 g/L de glutamato (Kinoshita, 1957). El éxito en la producción de glutámico, motivó a muchos otros biotecnólogos a buscar nuevas cepas de microorganismos sobreproductores de otros aminoácidos. A partir de la década de los 50's, hubo un cambio radical en la producción a gran escala de aminoácidos, adoptándose la biotecnología y los procesos de fermentación como la “nueva era”, de la producción de los mismos. Actualmente los aminoácidos y algunos de sus derivados tienen un gran espectro de aplicaciones en la industria como complementos alimenticios, precursores para la síntesis de péptidos o fármacos.

Para lograr la acumulación extracelular de aminoácidos, se requieren cambios en el metabolismo celular y el control del mismo. Uno de los mecanismos más comúnmente utilizados para lograr la sobreproducción de aminoácidos ha sido la utilización de mutantes resistentes a la acumulación intracelular del mismo.



**Figura 13.** Algunos pasos de la vía general de síntesis de aminoácidos aromáticos. En esta figura se incluyen derivados de interés industrial y el mecanismo por el cual se obtienen, a partir de intermediarios de esta vía. En *E. coli*, algunos de estos pasos se han logrado por integración de genes provenientes de otras especies, las que se denotan en la parte inferior de las flechas correspondientes.

En nuestro laboratorio hemos estado interesados en orientar la maquinaria biosintética de la célula hacia la sobreproducción de aminoácidos aromáticos y péptidos. En este sentido nuestro grupo está particularmente interesado en canalizar PEP y E4P, que son los precursores de la vía biosintética de aminoácidos aromáticos, para incrementar la biosíntesis de los mismos o de alguno de sus intermediarios (ver figuras 1 y 13). En este sentido, hemos ya demostrado, que cepas  $PTS^-Glc^+$ , manipuladas para la producción de aminoácidos aromáticos, son capaces de canalizar una mayor cantidad de PEP y E4P, hacia la producción de un intermediario de la biosíntesis de aromáticos (DAHP), si se les compara con una cepa  $PTS^+$  isogénica. El rendimiento molar calculado de DAHP a partir de glucosa, fue de 0.71 mol DAHP / mol glucosa, en una cepa de *E. coli*  $PTS^-Glc^+aroB^-$ , que sobre expresa los genes que codifican para una DAHP-sintasa resistente a inhibición por producto final y para la transcetolasa. En contraste, en una cepa isogénica  $PTS^+$ , el rendimiento alcanzó sólo el 0.43 mol DAHP / mol glucosa (Baéz *et al.*, 2001). Otras modificaciones que se han realizado para analizar la sobreproducción de DAHP, han sido la interrupción de los genes que codifican para las piruvato cinasas PykA, PykF (Ponce *et al.*, 1997), y la sobreexpresión de los genes que codifican para las enzimas TktI y Pps. En todos los casos anteriores, se observó un aumento en la acumulación de DAHP. El mayor

aumento en la acumulación de DAHP se observó en la cepa  $PTS^-Glc^+PykAF^-Tkt^+AroG^{fbr}$ . El aumento en la concentración de DAHP en la cepa  $PTS^-Glc^+PykAF^-Tkt^+AroG^{fbr}$ , fue 20 veces mayor que la cepa silvestre sin ninguna modificación (Gosset *et al*, 1996).

Otros ejemplos de modificaciones del metabolismo central para la sobreproducción de aminoácidos aromáticos, en particular triptófano han sido la delección de los genes para las enzimas isofuncionales AroG y AroH (inhibidas por triptófano y fenilalanina, respectivamente), que catalizan la condensación de una molécula de PEP y otra de E4P, el primer paso de la biosíntesis de aminoácidos aromáticos (figura 13). Por mutación al azar, se obtuvo una mutante de AroF (*aroF394*), insensible a inhibición por tirosina, otra enzima que participa en la condensación de PEP y E4P. La sobreexpresión de *aroF394*, se logró por delección el gene represor *tyrR*. Otras modificaciones han sido la eliminación de la biosíntesis de tirosina y fenilalanina, por delección de los genes *tyrA* y *pheA* (figura 13); la inactivación del gene *tna*, que codifica para una triptofanasa, la expresión de la enzima TrpE, insensible a inhibición por triptófano (mutación *trpE382*); la inactivación del gene represor de la biosíntesis de triptófano (*trpR*); y la interrupción del sistema de atenuación por mutaciones en el gene que codifica para la triptofanil-tRNA sintasa (*trpS*). La cepa de producción industrial de *E. coli* (NST100), rinde 6.2 g/L triptófano, la adición de antranilato al medio, mejora los rendimientos de triptófano. Por otro lado, una cepa de *Corynebacterium glutanicum* que puede produce 18 g/L de triptófano se ha modificado para llegar a producir grandes cantidades de tirosina (26 g/L), por sobreexpresión de una DAHP-sintasa resistente a inhibición y la corismato mutasa, sobreexpresando en esta cepa la preferato deshidratasa, se logran producir 28 g/L tirosina (Ikeda y Katsumata, 1992).

### **V.3.5 Nodo de fosfoenolpiruvato.**

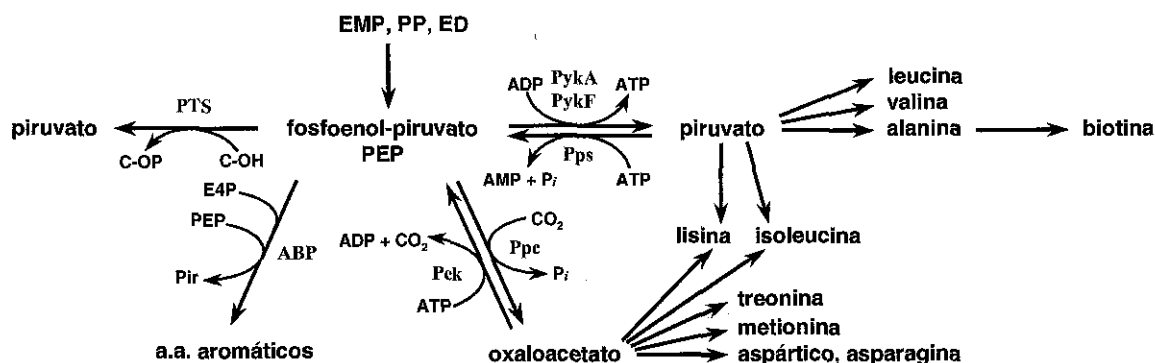
#### **V.3.5.1 Consideraciones generales.**

El nodo de PEP es de vital importancia para la fisiología general de *E. coli* y prácticamente todos los sistemas biológicos. PEP es uno de los precursores metabólicos, además de que varios otros precursores se derivan directamente de PEP (figura 1 y 8). PEP es importante para la fisiología celular, debido a que es precursor de la biosíntesis de diferentes compuestos esenciales, como aminoácidos aromáticos, vitaminas y neurotransmisores. En plantas, la carboxilación de PEP por la enzima Ppc para producir oxaloacetato, es el primer paso en la reacción de fijación biológica de CO<sub>2</sub>. Las plantas que



fijan  $\text{CO}_2$ , a partir de PEP, se denominan plantas  $\text{C}_4$ . Existe otro tipo de fijación biológica de  $\text{CO}_2$ , donde la molécula final de este proceso es G3P, una molécula de tres carbonos, las plantas que fijan  $\text{CO}_2$  por este proceso se denominan plantas  $\text{C}_3$ . En plantas  $\text{C}_3$ , la carboxilación de PEP por Ppc sólo cumple funciones como una vía anaplerótica, reemplazando el carbono tomado de TCA para funciones energéticas y de biosíntesis, como funciona en bacterias (ver sección VI.3.3; Flujos de carbono obtenidos para TCA).

PEP es sustrato de muy diversas reacciones, algunas de ellas revisten particular importancia para la biotecnología, debido a que forman parte de las vías metabólicas que se dirigen a la producción de metabolitos de interés (figura 14). Por lo anterior, la manipulación del metabolismo a nivel del nodo de PEP ha sido sujeto de diversos estudios para lograr la redistribución de los mismos con fines de aumentar la conversión de PEP en aminoácidos, solventes orgánicos como etanol y otros productos de fermentación, entre otros. Las vías relacionadas con la biosíntesis de aminoácidos se consideran “rígidas”, con respecto a la disponibilidad de PEP (el concepto de “rigidez” se revisa en la parte de ingeniería de vías metabólicas, sección V.3.3, conceptos generales), debido principalmente a la inhibición alostérica por producto final de las primeras enzimas de la vía en particular. Por el contrario, otras enzimas participantes en el nodo de PEP, principalmente las piruvato-cinasas, presentan una regulación distinta y se comportan como “flexibles” a la modificación en la concentración de PEP o a las modificaciones en otros flujos del nodo de PEP.



**Figura 14.** Algunas de las vías del metabolismo que involucran PEP como sustrato. A partir de éste, se obtienen piruvato y oxaloacetato que son también intermediarios de la biosíntesis de otros aminoácidos y vitaminas. La utilización de PEP para cualquiera de las reacciones representadas en esta figura es esencialmente irreversible por la misma enzima. ABP = vía común de síntesis de aminoácidos aromáticos.

El flujo de carbono a través de la enzima Ppc, se puede catalogar como rígido. Se ha demostrado que Ppc se encuentra finamente regulado de forma negativa por aspártico (abundante en fermentación anaeróbica de glucosa, fig. 5-b) y positiva por ppGpp y Acetil-CoA, (abundantes en fermentación aerobia de glucosa), el flujo sobre Ppc responde principalmente a las condiciones de crecimiento, más que a modificaciones en los flujos de carbono del nodo de PEP o a su biodisponibilidad (Stephanopoulos et al., 1998, Neidhardt et al., 1990). Afortunadamente, según los resultados obtenidos durante la presente investigación, presentados en la sección VII.3.3 (Flujos de carbono obtenidos para TCA), se pudo demostrar experimentalmente, la rigidez del flujo en Ppc con respecto a la disponibilidad de PEP. La “rigidez”, combinada con la “flexibilidad” de las diferentes vías que utilizan PEP ofrece retos importantes para el estudio de ciencia básica a nivel del nodo de PEP. En cuanto a la ingeniería del metabolismo para la biosíntesis de aminoácidos o derivados de los mismos, el estudio se centra no sólo a nivel de la modulación de la expresión de los genes que codifiquen para la vía biosintética específica, sino en la incorporación de variantes enzimáticas modificadas (homólogas o heterólogas), con propiedades alostéricas distintas que eviten la rigidez en la utilización de PEP para la producción de intermediarios de la vía biosintética.

#### **V.3.5.2 Mutantes en el sistema PTS.**

Una de las estrategias aplicadas en nuestro laboratorio para aumentar la disponibilidad de PEP para poderlo canalizar hacia vía general de biosíntesis de aminoácidos aromáticos, fue la inactivación del sistema PTS de transporte de glucosa (cepas PTS<sup>-</sup>). A partir de las cepas PTS<sup>-</sup>, se obtuvieron por mutación adaptante (al azar), mediante cultivos en quimiostato con glucosa como única fuente de carbono, revertantes que recuperaron capacidad de usar glucosa como fuente de carbono (cepas PTS<sup>-</sup>Glc<sup>+</sup>). Estudios posteriores de las cepas PTS<sup>-</sup>Glc<sup>+</sup>, demostraron que el transportador principal de glucosa es la permeasa GalP. Es conocido que GalP presenta afinidad tanto por glucosa como por galactosa para su transporte (McDonald *et al.*, 1997). Como se esquematiza en la figura 9, la disponibilidad de PEP en las cepas PTS<sup>-</sup>Glc<sup>+</sup> desarrolladas en nuestro laboratorio, es distinta a la disponibilidad de PEP en la cepa silvestre de la que provienen.

Como puede observarse en la figura 3-b, las cepas PTS<sup>-</sup>Glc<sup>+</sup>, transportan glucosa a través de la permeasa GalP; sin embargo, se debía identificar el donador de grupo fosfato. El candidato principal para llevar a cabo la función de fosforilación de la glucosa internalizada por GalP, es la enzima glucocinasa. Estudios posteriores, demostraron que efectivamente las cepas PTS<sup>-</sup>Glc<sup>+</sup>, tienen una mayor capacidad de dirigir el flujo de carbono hacia la vía general de biosíntesis de aromáticos (ver sección V.3.4, Gosset *et al.*, 1996). Por otro lado, la delección del sistema PTS y su cambio por un sistema independiente, puede tener diferentes efectos sobre el metabolismo y la fisiología general en *E. coli*, ya que como se menciona en la figura 2, algunos de sus componentes se comportan como reguladores generales tanto a nivel transcripcional como alostérico. De igual forma, una mayor disponibilidad de PEP en la célula, podría acarrear consecuencias, principalmente en el metabolismo, ya que el PEP se comporta como inhibidor / activador alostérico de varias enzimas del metabolismo central. Esta hipótesis es difícil de verificar, debido principalmente a que los diversos estudios donde se demuestra el efecto alostérico de PEP sobre distintas enzimas, se realizaron bajo condiciones de ensayo *in vitro*, donde es posible que las condiciones particulares de cada componente del ensayo sean muy distintas a las que se encuentren *in vivo*. Igualmente, se ha demostrado que el recambio de moléculas energéticas *in vivo* (como PEP), es muy alto, de forma que inclusive en condiciones de no-utilización de PEP por el sistema PTS, es probable que no se logre una condición de aumento de la concentración intracelular real de PEP suficiente para concretar un efecto alostérico (Neidhardt *et al.*, 1990, Mendes *et al.*, 1996). Otra consecuencia para el metabolismo y la fisiología general podría ser la característica particular del nuevo sistema de transporte generado. El cambio de expresión de un grupo genes que codifican para proteínas membranales (genes del sistema PTS y otras proteínas reguladas por él), por otro diferente (*galP*), puede traer efectos variados sobre la composición de la membrana. La permeasa GalP es un "simporter", que transporta glucosa simultáneamente con un protón al interior de la célula (figura 3-b). Como consecuencia de las diferencias fisicoquímicas del proceso de transporte de glucosa entre el sistema PTS y la permeasa GalP (figura 3), puede haber variaciones en el potencial de membrana, que está cercanamente relacionado a la concentración de iones. De esta forma, el análisis a fondo de las variaciones en la fisiología y el metabolismo entre las cepas de *E. coli* silvestre, PTS<sup>-</sup>Glc<sup>-</sup> y PTS<sup>-</sup>Glc<sup>+</sup>, ofrece retos interesantes tanto para la biología celular como para la ingeniería de vías metabólicas.

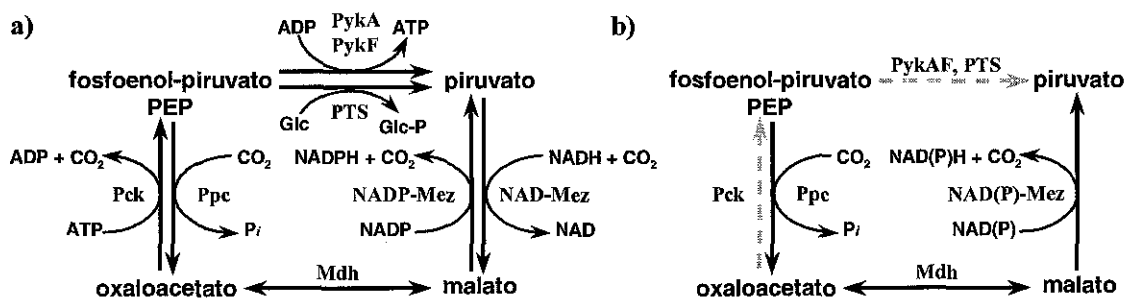
### V.3.5.3 Mutantes en las Piruvato-cinasas A y F.

El piruvato juega un papel central en el metabolismo bacteriano. El nodo de piruvato es un “cruce de caminos” desde donde los esqueletos de carbono son dirigidos hacia diferentes vías del metabolismo central. Una de las vías principales que dependen de piruvato (PIR) es la síntesis de acetil-CoA (ACoA), que es fuente principal de carbono hacia TCA. Como se menciona en la sección V.2.5, TCA tiene estrecha relación con la producción de energía y esqueletos de carbono para la biosíntesis de macromoléculas, por lo tanto, el aporte de ACoA hacia TCA, es vital para la fisiología general en *E. coli*. Otro motivo de interés para el estudio del PIR, es que a partir de PIR o ACoA se derivan los principales productos de fermentación en *E. coli*.

La acumulación de ácido acético constituye pérdidas en procesos de producción a nivel industrial ya que reduce el rendimiento de proteína recombinante e inhibe el crecimiento celular. Es debido a la relación de piruvato con la producción de ácido acético, y a que diversos compuestos de interés industrial, como solventes y aminoácidos se derivan del mismo, que el nodo de piruvato ha sido motivo de diversos estudios de ingeniería genética. Como resultado de dichos estudios, se ha determinado de una forma mas clara, el rol que juega el piruvato en el metabolismo celular, mediante la modificación a nivel de expresión o regulación de las enzimas en las que participa. En nuestro laboratorio se han obtenido mutantes en los genes que codifican para las piruvato cinasas A y F (*pykA* y *pykF*), mutantes PB22 (*E. coli pykA*), PB24 (*E. coli pykF*), y PB25 (*E. coli pykA-pykF*) (Ponce *et al.*, 1995). Estas mutantes han sido estudiadas por diversos grupos, logrando reconocer el efecto de estas modificaciones sobre otros puntos del metabolismo, algunos de ellos, aparentemente lejanos entre sí.

Ponce *et al.*, (1998), demostraron, que la cepa PB25, presenta un patrón de producción de CO<sub>2</sub> (M9-glc 2 g/l en condiciones aerobias), distinto a la cepa silvestre. Cambios en el perfil de producción de CO<sub>2</sub>, puede significar cambios en los flujos de carbono entre las principales vías que lo producen, como PP y TCA (ver figura 1). Un reporte posterior del mismo autor (Ponce, 1999), demostró una disminución en la producción de acético en cepas *pykA-pykF*<sup>-</sup> y PTS<sup>-</sup>Glc<sup>+</sup>, así como un aumento en la conversión de glucosa a proteína total ( $Y_{\text{PROT/GLC}}$ ) de aproximadamente el 31% en la mutantes PTS<sup>-</sup>Glc<sup>+</sup> y PTS<sup>-</sup>Glc<sup>+</sup> *pykA*<sup>-</sup> comparativamente con la cepa silvestre, ambos estudios reportados por Ponce, fueron realizados en condiciones similares.

En un estudio mas extenso, Zhu et al, (2001), demostraron cambios en los patrones de producción de CO<sub>2</sub>, acetato, piruvato, así como en el consumo de la fuente de carbono (M9-glc 10 g/l). Es particularmente interesante que éste grupo haya encontrado un comportamiento “dual” en el crecimiento de la mutante PB25. El crecimiento es logarítmico en los primeros 200 minutos de la fermentación (conc. aprox. glucosa residual = 6 g/l), y es lineal a partir de este punto hasta que finaliza el consumo de glucosa. Este cambio va acompañado por probables cambios en el metabolismo, ya que la producción de CO<sub>2</sub> se estabiliza a valores elevados y constantes, comienza la acumulación de piruvato y baja la velocidad de producción de ácido acético.



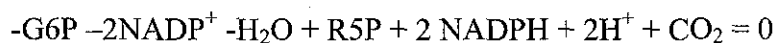
**Figura 15.** Rutas metabólicas presentes en *E. coli* para producir piruvato a partir de PEP. En el panel a), se presentan las vías posibles para producir piruvato a partir de PEP, las reacciones catalizadas por las enzimas NAD-Mez, funciona como reversibles *in vitro*, sin embargo, su desempeño *in vivo*, no ha sido determinado con certeza. En el panel b) se presentan las reacciones postuladas por Sauer, Zhu y nuestro grupo en casos que la utilización de PEP ha sido modificada, ya sea por mutaciones en los genes del sistema PTS o en las piruvato-cinasas. La participación de la enzima Pck en las condiciones de b), no han sido esclarecidas por los grupos de Sauer y Zhu. En el presente estudio, se demuestra que en condiciones de aumento de PEP, el flujo sobre Pck se ve disminuido a niveles cercanos a cero. La reacción que cataliza la enzima Pps, para producir PEP a partir de piruvato (reacción opuesta a PTS o PykA-F), no es considerada en el presente esquema.

Sauer *et al*, (1999), demostraron que la mutante PB25 establece una nueva vía metabólica para producir piruvato a partir de PEP. Esta vía involucra probablemente la carboxilación de PEP por la enzima Ppc para producir oxaloacetato, la concentración de oxaloacetato y malato se equilibra por la enzima malato-deshidrogenasa (Mdh), y finalmente alguna de las enzimas málicas (NAD-Mez, NADP-Mez), convierte malato en piruvato (ver figura 15). El grupo de Zhu, reporta que probablemente se establezca este mismo ciclo para justificar la producción de ácido acético en la mutante PB25. Una de las conclusiones del presente estudio considera que la enzima málica funciona de la misma forma para producir piruvato a partir de malato en las mutantes PTS<sup>-</sup>Glc<sup>+</sup>. Una

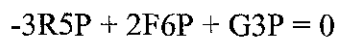
característica particular que distingue a las mutantes PB25 y PTS<sup>-</sup>Glc<sup>+</sup>, es que en ambos casos se modifica la utilización de PEP (ver figura 15). La reacción termodinámicamente más favorecida de la enzima málica, es en el sentido de la producción de malato ( $\Delta G^{\circ} = -2$  kcal/mol). Sin embargo, los reportes de los grupos de Sauer, Zhu y el nuestro, han demostrado que la enzima málica, en condiciones que modifican la utilización de PEP, funciona en el sentido contrario (Sauer *et al.*, 1999, Zhu *et al.*, 2001, Flores *et al.*, 2001).

#### V.4 Modelamiento matemático; caso de estudio: la vía de las pentosas-fosfato.

Las figuras 1 y 4 muestran las reacciones que intervienen en la vía de las pentosas-fosfato. Como se explica en la sección V.2.4 (Vía de las pentosas-fosfato), la vía PP consta de un brazo oxidativo que comienza con la reducción de G6P para formar 6PG y, después de dos reacciones se sintetiza R5P, que es utilizada a su vez para la síntesis de RNA y DNA: la estequiometría general de la reacción es la siguiente:



Debido a que la célula requiere más NADPH que R5P, el exceso de ésta última se puede convertir de nuevo en intermediarios de la vía EMP, a través de la transferencia de unidades -ceto y -aldol por el brazo no oxidativo de la vía de las pentosas (figura 4). La estequiometría del brazo no oxidativo de la vía PP es la siguiente:



El análisis de flujos en el metabolismo central de carbono requiere del monitoreo exacto del carbono que es oxidado por la vía PP y del poder reductor generado para biosíntesis. Los balances generales de energía pueden dar alguna información al respecto del flujo neto sobre esta vía y de la distribución del flujo entre PP y EMP al nivel de la G6P. Sin embargo, es deseable obtener información sobre otras distribuciones de los flujos, así como de la reversibilidad *in vivo*, de las reacciones del brazo no oxidativo de PP. Estos objetivos han sido logrados con el uso de glucosa marcada isotópicamente.

Comenzaremos con el balance de los metabolitos de la vía PP, según se esquematiza en la figura 14. En este caso, se considera que la isomerización entre G6P y F6P, catalizada por la fosfoglucosa-isomerasa así como la velocidad en que se alcanza el equilibrio entre las diferentes especies de pentosas, son tan rápidas que se asume, que esas especies se encuentran en equilibrio. Por lo tanto se consideran como un elemento individual de hexosas (H6P) y pentosas (P5P).

$$dc_{H6P} / dt = v_0 - v_1 - v_2 + v_5 + v_6 \quad (\text{Eqn. 1.1a})$$

$$dc_{R5P} / dt = v_1 - 2v_4 - v_6 - v_7 \quad (\text{Eqn. 1.1a})$$

$$dc_{G3P} / dt = 2v_2 - v_3 + v_4 - v_5 + v_6 \quad (\text{Eqn. 1.1c})$$

$$dc_{E4P} / dt = v_5 - v_6 \quad (\text{Eqn. 1.1d})$$

$$dc_{S7P} / dt = v_4 - v_5 \quad (\text{Eqn. 1.1e})$$

En el estado estacionario, las ecuaciones anteriores se reducen a la siguiente relación, asumiendo un consumo nulo de P5P para la síntesis de nucleótidos:

$$v_1 = 3xv_0 \quad (\text{Eqn. 1.2a})$$

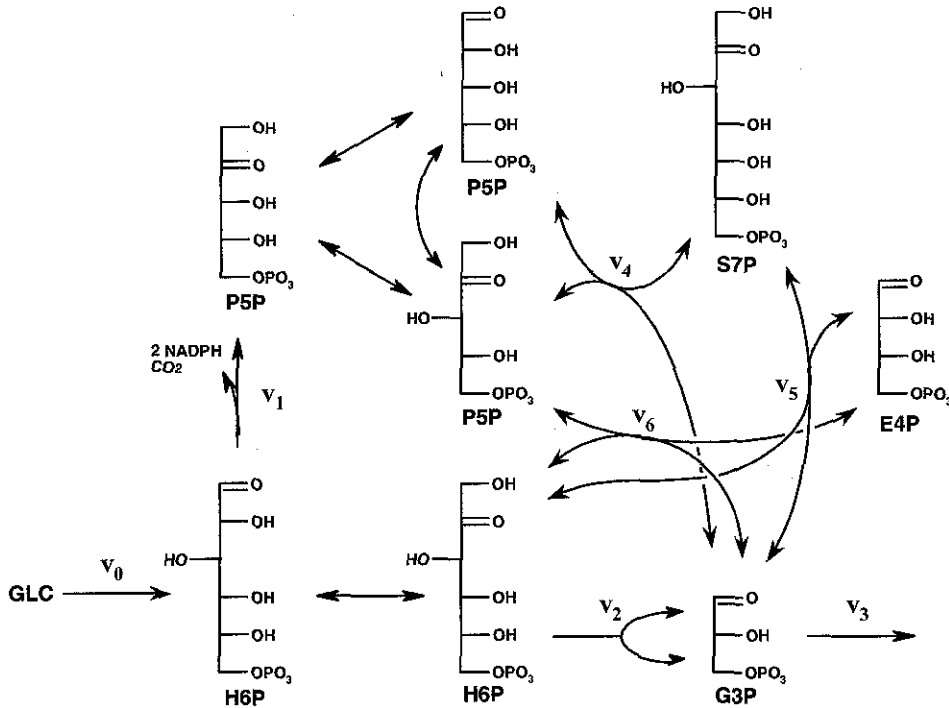
$$v_2 = (1 - x) v_0 \quad (\text{Eqn. 1.2b})$$

$$v_3 = (2 - x) v_0 \quad (\text{Eqn. 1.2c})$$

$$v_4 = v_5 = v_6 = xv_0 \quad (\text{Eqn. 1.2d})$$

El valor  $x$  en las ecuaciones 1.2a-d, representa la fracción de H6P que se dirige hacia PP. Los balances para los diferentes metabolitos se refieren sólo hacia el flujo general en la vía, sin considerar la reversibilidad. Como se puede analizar, el flujo neto sobre las diferentes reacciones del brazo no oxidativo están en equilibrio. Las ecuaciones anteriores, pueden ser examinadas a partir de  $^{13}\text{C}$ -glucosa y analizando la distribución del marcaje en uno o más de los intermediarios de la vía de las pentosas. Para interpretar el marcaje obtenido, se debe determinar el balance de carbono en cada una de las reacciones consideradas en la red metabólica, como se esquematiza en la figuras 16 y 17.

En la figura 16, puede notarse que las reacciones del brazo no oxidativo de la vía de las pentosas se asumen como reversibles, así que cada reacción está compuesta de una reacción a favor ( $v_i^+$ ), y otra en el sentido contrario ( $v_i^-$ ). La reversibilidad de estas reacciones puede conducir a una redistribución del marcaje debido al intercambio de carbono con los intermediarios de la vía EMP (figura 18).

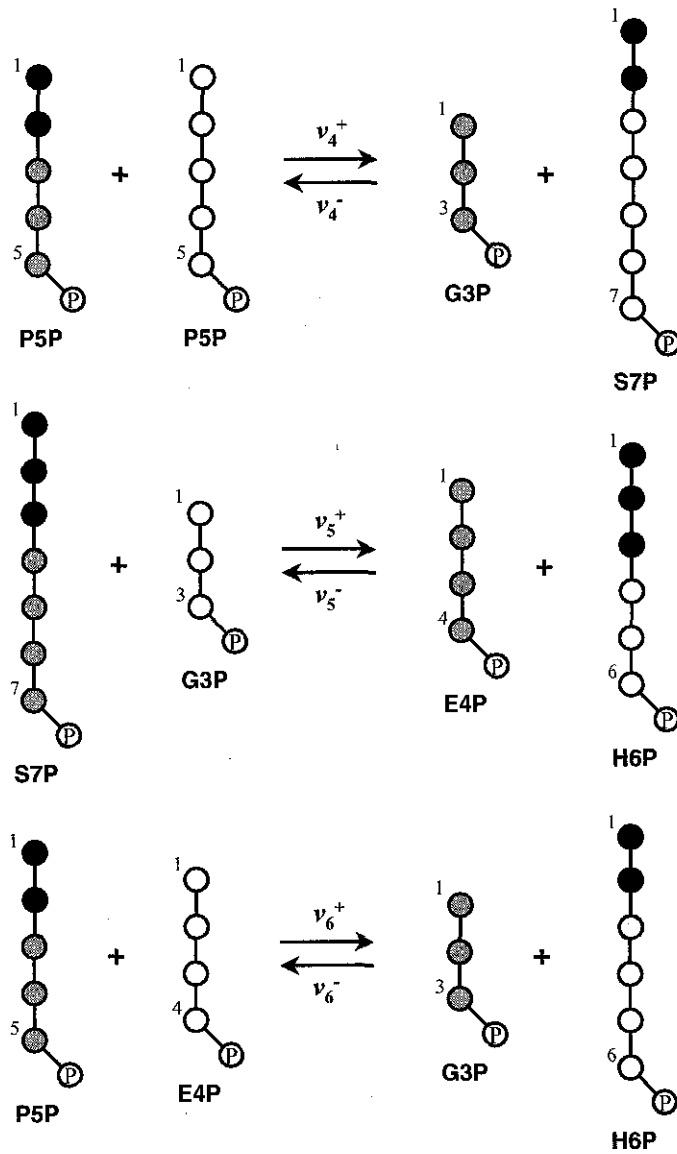


**Figura 16.** Vía de las pentosas-fosfato. Los vectores (flujos) para cada reacción se esquematizan por la letra v.

$$\begin{aligned}
 \frac{d[H6P]}{dt} &= v_0 \begin{bmatrix} \text{Hexosa(1)} \\ \text{Hexosa(2)} \\ \text{Hexosa(3)} \\ \text{Hexosa(4)} \\ \text{Hexosa(5)} \\ \text{Hexosa(6)} \end{bmatrix} - (v_1 + v_2) \begin{bmatrix} H6P(1) \\ H6P(2) \\ H6P(3) \\ H6P(4) \\ H6P(5) \\ H6P(6) \end{bmatrix} + v_5^+ \begin{bmatrix} S7P(1) \\ S7P(2) \\ S7P(3) \\ G3P(4) \\ G3P(5) \\ G3P(6) \end{bmatrix} - (v_5^- + v_6^-) \begin{bmatrix} H6P(1) \\ H6P(2) \\ H6P(3) \\ H6P(4) \\ H6P(5) \\ H6P(6) \end{bmatrix} + v_6^- \begin{bmatrix} R5P(1) \\ R5P(2) \\ E4P(3) \\ E4P(4) \\ E4P(5) \\ E4P(6) \end{bmatrix} \\
 \frac{d[R5P]}{dt} &= v_1 \begin{bmatrix} H6P(2) \\ H6P(3) \\ H6P(4) \\ H6P(5) \\ H6P(6) \end{bmatrix} - 2v_4^+ \begin{bmatrix} R5P(1) \\ R5P(2) \\ R5P(3) \\ R5P(4) \\ R5P(5) \end{bmatrix} + v_4^- \begin{bmatrix} S7P(1) \\ S7P(2) \\ G3P(1) \\ G3P(2) \\ G3P(3) \end{bmatrix} + v_4^- \begin{bmatrix} S7P(3) \\ S7P(4) \\ S7P(5) \\ S7P(6) \\ S7P(7) \end{bmatrix} - v_6^+ \begin{bmatrix} R5P(1) \\ R5P(2) \\ R5P(3) \\ R5P(4) \\ R5P(5) \end{bmatrix} + v_6^- \begin{bmatrix} H6P(1) \\ H6P(2) \\ G3P(1) \\ G3P(2) \\ G3P(3) \end{bmatrix} \\
 \frac{d[G3P]}{dt} &= v_2 \begin{bmatrix} H6P(3) \\ H6P(2) \\ H6P(1) \end{bmatrix} + v_2 \begin{bmatrix} H6P(4) \\ H6P(5) \\ H6P(6) \end{bmatrix} + v_4^+ \begin{bmatrix} R5P(3) \\ R5P(4) \\ R5P(5) \end{bmatrix} - (v_4^- + v_5^+ + v_6^- + v_3) \begin{bmatrix} G3P(1) \\ G3P(2) \\ G3P(3) \end{bmatrix} + v_5^- \begin{bmatrix} H6P(4) \\ H6P(5) \\ H6P(6) \end{bmatrix} + v_6^+ \begin{bmatrix} R5P(3) \\ R5P(4) \\ R5P(5) \end{bmatrix} \\
 \frac{d[E4P]}{dt} &= v_5^+ \begin{bmatrix} S7P(4) \\ S7P(5) \\ S7P(6) \\ S7P(7) \end{bmatrix} - (v_5^- + v_6^+) \begin{bmatrix} E4P(1) \\ E4P(2) \\ E4P(3) \\ E4P(4) \end{bmatrix} + v_6^- \begin{bmatrix} E4P(1) \\ E4P(2) \\ E4P(3) \\ E4P(4) \end{bmatrix} \\
 \frac{d[S7P]}{dt} &= v_4^+ \begin{bmatrix} R5P(1) \\ R5P(2) \\ R5P(1) \\ R5P(2) \\ R5P(3) \\ R5P(4) \\ R5P(5) \end{bmatrix} - (v_4^- + v_5^+) \begin{bmatrix} S7P(1) \\ S7P(2) \\ S7P(3) \\ S7P(4) \\ S7P(5) \\ S7P(6) \\ S7P(7) \end{bmatrix} + v_5^+ \begin{bmatrix} H6P(1) \\ H6P(2) \\ H6P(3) \\ E4P(1) \\ E4P(2) \\ E4P(3) \\ E4P(4) \end{bmatrix}
 \end{aligned}$$

**Figura 17.** Ejemplo de cálculo mediante el modelo de matriz algebraica del balance de carbono para los metabolitos de la vía de las pentosas.





**Figura 18.** Esquema de transferencia de carbóns en el brazo no oxidativo de la vía de las pentosas

La reversibilidad de las reacciones del brazo no oxidativo de la vía de las pentosas se denota como  $\xi_i$ . La introducción de los valores de intercambio permite expresar todas las ecuaciones de la figura 18 como una función del flujo neto en la vía PP, que es igual a  $xv_0$ :

$$v_4^+ = (xv_0 + \xi_4) \quad (\text{Eqn. 1.3a})$$

$$v_4^- = \xi_4 \quad (\text{Eqn. 1.3b})$$

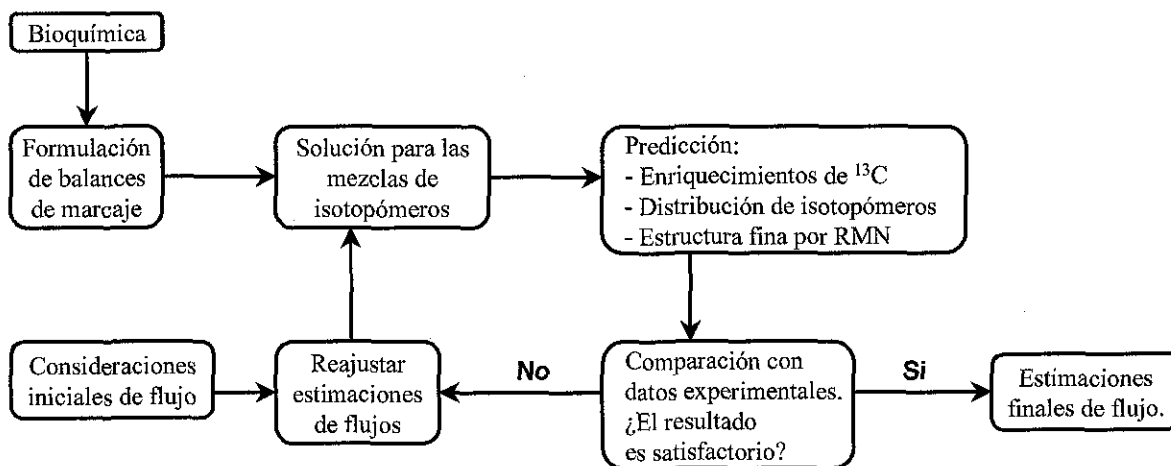
$$v_5^+ = (xv_0 + \xi_5) \quad (\text{Eqn. 1.3c})$$

$$v_5^- = \xi_5 \quad (\text{Eqn. 1.3b})$$

$$v_6^+ = (xv_0 + \xi_6) \quad (\text{Eqn. 1.3d})$$

$$v_6^- = \xi_6 \quad (\text{Eqn. 1.3e})$$

Claramente, la determinación del flujo de carbono, así como de los valores de reversibilidad de las reacciones de la vía de las pentosas (como en otras vías), requiere de la aplicación de técnicas de marcaje isotópico, así como del análisis de la distribución del marcaje. En el método de “ensayo y error” (figura 19), se inicia con algunos conceptos básicos extraídos del conocimiento general sobre flujos de carbono en el sistema biológico de estudio, en este caso, la vía de las pentosas en *E. coli*, donde es generalmente aceptado un flujo de carbono que varía entre 20 % y 30 % del carbono a nivel del nodo de G6P que se dirige hacia PP cuando la bacteria crece logarítmicamente en glucosa como fuente de carbono en condiciones aerobias (Fiaux, *et al.*, 1999). A partir de este valor, se supone la distribución del marcaje isotópico a nivel de alguno de los sustratos (por ejemplo, H6P) y se comienza a resolver el sistema de ecuaciones de la figura 15. Posteriormente, se compara con los datos experimentales extraídos del espectro NMR-2D[ $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ ]-COSY, las suposiciones iniciales son reajustadas y el procedimiento se repite hasta que se logra una buena convergencia de resultados. En este caso es importante considerar que: a) El problema es en esencia la solución de un sistema no lineal de ecuaciones algebraicas y, por lo tanto es sensible a las consideraciones iniciales y, b) La solución final del sistema de ecuaciones (si se obtiene), depende de forma crítica de las intensidades obtenidas para cada uno de los isotopómeros provenientes de 2D[ $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ ]-COSY.



**Figura 19.** Representación esquemática del proceso iterativo que lleva a la determinación de flujos de carbono intracelulares a partir de mediciones de enriquecimiento isotópico (Stephanopoulos *et al.*, 2000).

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS.

### VI.1 Cepas bacterianas y vectores.

La tabla 4 muestra de forma detallada las características generales de las cepas y vectores usados durante el presente estudio.

La cepa PB11 es una derivada de la cepa JM101 de *Escherichia coli*, interrumpida en los genes del sistema PTS de transporte de carbohidratos ( $\Delta$  (*ptsH*, *ptsI*, *corr*)::Kan<sup>R</sup>). Las cepas mutantes PB12 y PB13 fueron obtenidas a partir de la cepa PB11 (fenotipo PTS<sup>-</sup>Glc<sup>-</sup>) por un proceso de adaptación a la utilización de glucosa como fuente de carbono, según se reporta por Flores, (1995).

Los genes *glk*, *pgi* y *edd*, fueron obtenidos mediante PCR usando como templado DNA cromosomal de *E. coli*; los oligonucleótidos utilizados para la clonación de los genes se señalan en la tabla 4. Los productos de PCR fueron analizados en geles de agarosa y por patrones de restricción, coincidiendo con el tamaño esperado para cada caso y cada análisis de restricción según la secuencia obtenida del Genebank. El producto de PCR fue utilizado para su clonación en los vectores señalados en la tabla 4. El gene *glk* se clonó en el plásmido pBR322 (Bolívar *et al.* 1977), los genes *pgi* y *edd*, se clonaron en el plásmido pCR<sup>®</sup>-Blunt.

Las cepas interrumpidas en el gene *glk*: SM1, NF29 y NF30, fueron obtenidas por trasducción con el fago P1 de una cepa de *E. coli* ATCC47002 que tiene integrado en su cromosoma la construcción *glk*::Cm proveniente del plásmido pGlk5. Las interrupciones en cromosoma de los genes *pgi*, *gnd* y *edd*, fueron obtenidas clonando los correspondientes genes en plásmidos derivados de pBR322; e interrumpiendo los genes correspondientes con un casete de resistencia a cloramfenicol (Cat2), proveniente del plásmido pLoxCat4 (Palmeros, 2000). El plásmido correspondiente con el gene interrumpido fue modificado cambiando el origen de replicación por el origen de replicación permisivo R6K (*ori*<sub>R6K</sub>), o termo-sensible proveniente del plásmido pSC101 (*par*, *ori* y *rep101*<sup>ts</sup>), según sea el caso. Los plásmidos derivados (permisivos) con los genes interrumpidos *pgi*::Cat2 *gnd*::Cat2 y *edd*::Cat2 fueron usados para generar la inactivación cromosomal del gene correspondiente por doble recombinación plásmido-cromosoma. Las dobles recombinantes fueron elegidas por el fenotipo Ap<sup>S</sup> / Cm<sup>R</sup> y verificadas por análisis del DNA cromosomal mediante PCR, y en su caso, por análisis de actividad específica de la enzima correspondiente.

**Tabla 4.** Cepas de *Escherichia coli*, vectores y oligonucleótidos usados en el presente estudio.

<b>Cepa</b>	<b>Genotipo y fenotipo relevante</b>	<b>Fuente o Referencia</b>
JM101	<i>SupE, thi, Δ (lac-proAB), F<sup>+</sup></i>	Rodríguez, 1977
SM1	JM101 <i>glk::Cm</i>	Este estudio
SM6	JM101 <i>gnd::Cm</i>	Este estudio
SM14	JM101 <i>pgi::Cm</i>	Este estudio
SM22	JM101 <i>edd::Cm</i>	Este estudio
PB11	JM101 $\Delta$ ( <i>ptsH, ptsI, crr</i> )::Kan <sup>R</sup>	Flores, 1995
PB12	PTS <sup>-</sup> Glc <sup>+</sup>	Flores, 1995
NF29	PB12 <i>glk::Cm</i>	Este estudio
SM8	PB12 <i>gnd::Cm</i>	Este estudio
SM31	PB12 <i>pgi::Cm</i>	Este estudio
PB13	PTS <sup>-</sup> Glc <sup>+</sup>	Flores, 1995
NF30	PB13 <i>glk::Cm</i>	Este estudio
SM9	PB13 <i>gnd::Cm</i>	Este estudio
SM25	PB13 <i>edd::Cm</i>	Este estudio
SM32	PB13 <i>pgi::Cm</i>	Este estudio
<b>Plásmido</b>	<b>Características</b>	<b>Fuente o Referencia</b>
pKNG101	Plásmido mobilizable ( <i>mob</i> ), con el origen de replicación condicionada R6K ( <i>ori<sub>v</sub></i> ) del plásmido pKNG101, suicida en cepas <i>pir<sup>-</sup></i> .	Kaniga, 1991
pInt3 <sub>ts</sub>	Derivado de pMC1403 ( $\Delta$ <i>lacZ-Y</i> ), con el origen de replicación termosensible del plásmido pSC101 ( <i>par, ori</i> y <i>rep101<sup>ts</sup></i> ).	Palmeros, 2001
pGlk1	pBR322 que porta el gene <i>glk</i> de <i>E. coli</i>	Noemí Flores
pGlk5	pGlk1 <i>glk::Cm<sup>R</sup></i>	Este estudio
pMN6	pBR322 que porta el gene <i>gnd</i> de <i>E. coli</i>	Nasoff, 1980
pGnd1	pMN6 <i>gnd::Cm<sup>R</sup></i>	Este estudio
PGnd5	pGnd1 con el origen de replicación condicionada R6K	Este estudio

**Tabla 4.** Cepas de *Escherichia coli*, vectores y oligonucleótidos usados en el presente estudio (continuación).

<b>Plásmido</b>	<b>Características</b>		<b>Fuente o Referencia</b>
pPgi1	pCR <sup>®</sup> -Blunt que porta el gene <i>pgi</i> de <i>E. coli</i>		Noemí Flores
pPgi5	pPgi1 <i>pgi</i> ::Cm <sup>R</sup>		Este estudio
pPgi8	pPgi5 con el origen de replicación condicionada de R6K		Este estudio
pBri01	pCR <sup>®</sup> -Blunt que porta el gene <i>edd</i> de <i>E. coli</i>		Este estudio
pBri02	pBri01 <i>glk</i> ::Cm <sup>R</sup>		Este estudio
pBri03	pBri02 con el origen de replicación termosensible del plásmido pInt3 <sub>ts</sub>		Este estudio
<b>Gene</b>	<b>Oligos:</b>		<b>Fuente:</b> <b>Investigador / Compañía</b>
	<b>Nombre</b>	<b>Secuencia</b>	
<i>glk</i>	GLK1	5'-CAGGGAGGCCTGCCTTCCGGCGTTG-3'	Dr. Enrique Merino / Ana-Gen Technologies, Palo Alto, CA
	GLK2	5'-CTGACGCAGGTCGACCTTCTGAGGGG-3'	
<i>edd</i>	EDD01	5'-GCGGGATCCGGTTACAGGCGTTTC-3'	Salvador Flores / Unidad de síntesis, IBT-UNAM
	EDD05	5'-CGAATGATGTCCCCGTCGCGCAC-3'	
<i>pgi</i>	FGI-1	5'-CGCTGCCTGGCAGGCACTAC-3'	Noemí Flores / Unidad de síntesis, IBT-UNAM
	FGI-2	5'-CCATTGGTCGAGCTATCGTG-3'	
<i>cat</i>	Cm <sub>1</sub>	5'-GGTGGTATATCCAGTGATTTTTT-TCTCCAT-3'	Beatriz Palmeros / Unidad de síntesis, IBT-UNAM

## VI.2 Cultivos y preparación de muestras.

Los cultivos para la determinación de la velocidad de crecimiento ( $\mu$ ), la determinación de transporte de [<sup>14</sup>C]-glucosa, preparación de muestras para análisis de resonancia magnética nuclear y ensayos enzimáticos de actividad específica, se realizaron a 37°C en medio mínimo de sales M9, suplementado con glucosa a una concentración de 2 g/l comenzando los cultivos a una OD<sub>600</sub> entre 0.04 y 0.05. Las células fueron colectadas en fase logarítmica cuando el crecimiento rebasó OD<sub>600</sub> = 1.

Las muestras para RMN fueron tomadas de cultivo-lote en fermentador de 2 litros con un volumen de trabajo de 1 l de medio M9 suplementado con 80 % [1-<sup>13</sup>C]-glucosa y 20 % [U-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]-glucosa (ambas de Cambridge Isotope Laboratories, Andover, MA) para una concentración final de 3 g / l; las células fueron colectadas cuando el cultivo alcanzó una densidad óptica = 1 a OD<sub>600</sub>. El volumen total de la fermentación fue colectado,

centrifugado a 6000 g 10 min. y las células fueron secadas en horno a 105°C por al menos 10 horas. Por éste método, se obtienen 850-900 mg de células (peso seco).

250 mg de biomasa (peso seco), fueron sometidas a un proceso de hidrólisis en HCL 6N a 90°C por 18 horas. Una vez transcurrido ese tiempo, el hidrolizado fue microfiltrado (papel 45 µm), y el filtrado se liofilizó y se redisolvió en 700 µl D<sub>2</sub>O con 2 mM de 2,2,3,3-d<sub>4</sub>-trimetilsililpropionato de sodio (Aldrich) como referencia interna para RMN. En las mezclas resultantes de hidrólisis los aminoácidos originalmente presentes en la biomasa cisteína y triptófano se degradan por oxidación y la asparagina y glutamina son deaminadas, para producir ácido aspártico y glutamina, repectivamente.

### **VI.3 Análisis de transporte de [<sup>14</sup>C]-glucosa:**

Las velocidades iniciales de transporte de [<sup>14</sup>C]-glucosa se determinaron colectando 1 OD<sub>600</sub> de un cultivo creciendo en fase exponencial a 37°C en medio mínimo de sales M9-glucosa 2 g/l, las células fueron centrifugadas por 20 s, a 3000 g, y después lavadas con 1 ml de buffer tris 1 M, pH = 6.8, centrifugadas nuevamente y resuspendidas en 540 µl de medio M9, manteniéndolas en un baño de hielo. Las células se incubaron a 37°C 10 minutos en agitación, la reacción fue iniciada mediante la adición de 30 µl de [<sup>14</sup>C]-glucosa (1 mM, 5mCi/mmol) manteniendo la agitación. Una alícuota de las células que incorporaban la [<sup>14</sup>C]-glucosa se adicionó a una membrana (poro = 45 µm), colocada sobre una corriente de aire. La membrana se lavó tres veces con medio M9 a 4°C, se dejó secar con la corriente de aire y la glucosa incorporada se monitoreó en un contador de centelleo.

### **VI.4 Ensayos de actividad enzimática específica:**

Las muestras para ensayos enzimáticos fueron realizadas creciendo las bacterias en matraz klett con 30 ml de medio M9-glucosa 2 g/l. Cuando los cultivos celulares alcanzaron OD<sub>600</sub> = 1, se colectaron 25 ml, y se centrifugaron 8 min. a 4500 g. Las células fueron resuspendidas en buffer de fosfatos (2 x 10<sup>-2</sup> M pH = 6.8, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10<sup>-2</sup> M, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10<sup>-2</sup> M, 2-mercaptoetanol 10<sup>-2</sup> M, azida de sodio 10<sup>-2</sup> M) y vueltos a centrifugar. El pellet de células se resuspende en un volumen final de 1 ml del mismo buffer (conc. final de células = 25X). Las células fueron rotas por sonicación en un baño frío a -10°C, aplicando cuatro pulsos de 15 segundos separados por 1 min., mientras se mantenían las células por

ese lapso en un baño de hielo. El extracto libre de células se obtuvo por centrifugación de la suspensión producto de la sonicación de células a 13000 g por 10 minutos.

Una cantidad variable (5-50  $\mu$ l, dependiendo del caso), de este extracto proteico, fue utilizado para determinar las siguientes actividades específicas: a) fosfoglucosa-isomerasa (Pgi), (según Maitra y Lobo, 1979), b) glucocinasa (Glk), c) glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Zwf) y d) 6-fosfogluconato deshidrogenasa (Gnd), las cuales fueron determinadas según Lessie y Vander Wyk (1972). Todas las actividades se reportan como nmoles de sustrato producido por minuto por miligramo de proteína, usando un coeficiente de extinción molar de 6.22 para el NADPH. Para la determinación de la proteína celular, se tomaron 40  $\mu$ l del extracto 25X y se diluyeron con el mismo buffer de fosfatos  $2 \times 10^{-2}$  M pH = 6.8, hasta 1 ml de volumen final (conc. de células = 1X), y determinada según el método de Lowry, utilizando albúmina sérica de bovino como proteína de referencia.

#### **VI.5 Espectroscopía de RMN y modelamiento matemático.**

Los patrones de marcaje de  $^{13}\text{C}$  de aminoácidos, glicerol y nucleótidos presentes en los hidrolizados de la biomasa celular, obtenida a partir de  $^{13}\text{C}$ -glucosa, fué determinado por espectroscopía de resonancia magnética nuclear en un espectro de amplio rango de 400 MHz (Bruker Karlsruhe). Las estructuras finas de los multipletes de  $^{13}\text{C}$  que reflejaban la composición de isotopómeros de los metabolitos se analizó mediante un espectro bidimensional de RMN de [ $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ] HSQC, Szyperski (1995). Los parámetros de adquisición fueron:  $t_{1\text{max}}=520$  ms,  $t_{2\text{max}}=231$  ms. El tamaño de datos después de cero son 3072 puntos en  $t_1$  y 2048 puntos en  $t_2$ . El ancho de banda fue 4.42 kHz para  $^1\text{H}$  y 2.95 kHz para  $^{13}\text{C}$ ; el tiempo total de adquisición fué de 53.5 h. Es de central importancia resaltar que el análisis de la composición isotopomérica de alanina en este estudio, en la que usamos UL- $^{13}\text{C}$ -glucosa y [1- $^{13}\text{C}$ ]glucosa, para la determinación de los flujos de carbono de la vía PP y ED. El isotopómero [1- $^{13}\text{C}$ ]alanina proviene de la ruptura de [1- $^{13}\text{C}$ ]glucosa en la vía ED. El isotopómero [3- $^{13}\text{C}$ ]alanina resulta de la glucosa metabolizada por la vía EMP. Además, la abundancia de este isotopómero refleja directamente la actividad del brazo oxidativo de la vía de las pentosas ya que la operación de esta vía metabólica causa la pérdida del  $^{13}\text{C}$  originada del carbono-1 de la glucosa. La composición de isotopómeros de alanina en el hidrolizado fue investigada por separado, usando espectroscopía de "spin echo difference" de  $^1\text{H}$  como se describe por deGraaf *et al.* (2000).

Las mediciones se facilitaron por el hecho de que la señal de resonancia del protón metílico de la alanina se resuelve claramente en el hidrolizado. Usando un tiempo total de espín-eco de 7.6 ms y la alternativa de inversión de  $^{13}\text{C}$ , el enriquecimiento del carbono-3 de la alanina se determinó de la diferencia de señales. Usando un eco total de 192 ms y una inversión selectiva de 173-180 ppm la banda espectral en la dimensión del  $^{13}\text{C}$  en la posición 1 fue cuantificada por análisis de deconvulsión de las señales mediante la diferencia de espectros.

El modelamiento del metabolismo de *E. coli* y la distribución de isotopómeros en todos los metabolitos, así como la determinación de la distribución de los diferentes flujos de carbono por adecuación no-lineal de mínimos cuadrados, fué realizada usando el programa de computación para flujos de  $^{13}\text{C}$  desarrollados por Wiechert *et al.* (1999); Möllney *et al.* (1999); y Petersen *et al.* (2000). Se usó un modelo estándar del metabolismo de *E. coli* que incluye las reacciones de la glicólisis, la vía de las pentosas-fosfato, la vía ED, el ciclo de los ácidos tricarbóxicos y el ciclo del glioxal. Como vías anapleróticas, se incluyeron las reacciones de la fosfoenolpiruvato carboxilasa y las enzimas málicas (Fraenkel, 1996, Cronan y LaPorte, 1996).

La PEP-carboxicinasa se incluyó como reacción gluconeogénica. Las siguientes reacciones se consideraron como reversibles: transcetolasa, transaldolasa, fosfoglucosa isomerasa y triosafosfato isomerasa, así como la secuencia de reacciones de la vía EMP participantes en la conversión de gliceraldehído-3-fosfato hasta fosfoenolpiruvato y la reacción de la fumarasa.



## VII. RESULTADOS Y DISCUSION.

### VII.1 Aplicación del análisis de Resonancia Magnética Nuclear para la determinación de flujos de carbono en sistemas biológicos.

#### Consideraciones relevantes:

Uno de los objetivos iniciales del presente estudio fue el de definir algunos de los cambios que llevaron a la cepa PB11 (*Escherichia coli* JM101  $\Delta$  (*ptsH*, *ptsI*, *crr*)::Kan<sup>R</sup>), incapaz de usar glucosa como fuente de carbono, a utilizarla por una vía alterna al sistema PTS, la permeasa GalP. Conocíamos, según los resultados presentados por Noemí Flores (Flores, 1995), que el nuevo fenotipo se debía a más de una mutación. Por otro lado, también es conocido que el sistema PTS es un regulador global en *E. coli* (Postma, 1996), por lo tanto su ausencia puede tener efectos variados sobre la fisiología y el metabolismo central de carbono en las cepas mutantes PTS<sup>-</sup>Glc<sup>-</sup> PB11 y sus derivadas PTS<sup>-</sup>Glc<sup>+</sup>, PB12 y PB13.

Debido a las limitaciones propias de la caracterización genética y bioquímica (por ensayos de actividad enzimática), son pocas las conclusiones a las que se puede llegar a nivel de establecer los cambios finos del metabolismo central de carbono entre las cepas JM101, PB11, PB12 y PB13.

La capacidad de estudiar el metabolismo central de carbono de cualquier sistema biológico a través del marcaje isotópico de carbono-13, y el conocimiento fino del metabolismo central de *E. coli*, permitió establecer la matriz estequiométrica de la bacteria y, a partir de los patrones de marcaje de carbono-13 presentes en los esqueletos de carbono de los aminoácidos proteinogénicos, y establecer los flujos de carbono de cada una de las vías del metabolismo central que les dieron origen.

Establecidos los flujos de carbono para cada una de las cepas de este estudio, pudimos conocer a detalle los cambios a nivel del metabolismo central que forman parte de la adaptación a usar glucosa como fuente de carbono de las cepas PTS<sup>-</sup>Glc<sup>+</sup> PB12 y PB13, así como los flujos de carbono en la cepa PB11. Afortunadamente, los resultados de la caracterización genética y bioquímica de las cepas JM101, PB11, PB12 y PB13, coinciden sorprendentemente con los flujos de carbono obtenidos por marcaje de carbono-13 y el modelamiento matemático.

Fue particularmente importante establecer, por vez primera, la matriz metabólica de *E. coli*, así como de las mutantes. Los resultados de este estudio fueron publicados en el artículo: Analysis of carbon metabolism in *Escherichia coli* strains with an inactive phosphotransferase system by  $^{13}\text{C}$  labelling and NMR spectroscopy (por S. Flores, G. Gosset, N. Flores, A. A. de Graaf, y F. Bolívar), *Metabolic Engineering* (2001), aceptado para su publicación (14/09/2001); ver Anexo 1.

## VII.2 Resultados relevantes.

### VII.2.1 Caracterización inicial de crecimiento en glucosa como fuente de carbono de la cepa JM101, y de sus derivadas PB11, PB12 y PB13.

Con la finalidad de lograr una caracterización inicial de las cepas utilizadas en este estudio, se determinó su velocidad de crecimiento, así como la capacidad aparente de transporte de glucosa de la cepa silvestre de *E. coli* JM101, su derivada PTS<sup>-</sup>Glc<sup>-</sup> PB11, y las mutantes capaces de usar glucosa mediante la permeasa GalP (fenotipo PTS<sup>-</sup>Glc<sup>+</sup>) PB12 y PB13 y estos resultados se muestran en la tabla 5. La cepa JM101, tiene una velocidad de crecimiento ( $\mu$ , en horas<sup>-1</sup>) de 0.71; el impacto la delección del sistema PTS en la velocidad de crecimiento, se puede ver claramente en la cepa PTS<sup>-</sup>Glc<sup>-</sup> PB11, donde la  $\mu$ , es de tan sólo 0.10 h<sup>-1</sup> en las mismas condiciones. Por otro lado, las cepas derivadas de PB11, por adaptación a usar glucosa como fuente de carbono: PB12 y PB13 tienen una  $\mu$  de 0.42 y 0.49 h<sup>-1</sup>, respectivamente.

**Tabla 5.** Velocidad de crecimiento ( $\mu$ ), y transporte de [ $^{14}\text{C}$ ]-glucosa ( $\tau$ ) en diferentes cepas de *Escherichia coli*.

Cepa	Fenotipo	$\mu^a$	$\tau^b$
JM101	silvestre	0.71	20.0
PB11	PTS <sup>-</sup> Glc <sup>-</sup>	0.10	1.7
PB12	PTS <sup>-</sup> Glc <sup>+</sup>	0.42	10.3
PB13	PTS <sup>-</sup> Glc <sup>+</sup>	0.49	11.7

<sup>a</sup> en h<sup>-1</sup>, obtenido en medio M9 suplementado con 2 g/l de glucosa.

<sup>b</sup> en nmol  $^{14}\text{C}$ -glc min<sup>-1</sup>.mg prot.<sup>-1</sup>.

### VII.2.2 Transporte de [<sup>14</sup>C]-glucosa en las diferentes cepas.

Las velocidades aparentes de utilización de [<sup>14</sup>C]-glucosa para estas cepas se presentan en la tabla 5; estos resultados muestran que la delección del principal transportador de glucosa en *E. coli*, el sistema PTS, provoca una reducción importante de la capacidad de transporte de glucosa en las condiciones estudiadas por nosotros. La cepa PTS<sup>-</sup> PB11 presenta solo un 8.5 % del transporte de [<sup>14</sup>C]-glucosa, con relación al de la cepa silvestre (PTS<sup>+</sup>), JM101 (20 nmol [<sup>14</sup>C]-glucosa · min<sup>-1</sup> · mgprot<sup>-1</sup>). Las cepas PTS<sup>-</sup>Glc<sup>+</sup> PB12 y PB13 recuperan parcialmente su capacidad de transporte de glucosa, que corresponde a un 42 y 47 % respectivamente de la determinada para la cepa silvestre JM101.

### VII.2.3 Participación de la enzima glucocinasa en la utilización de glucosa como fuente de carbono en las cepas JM101, PB12 y PB13.

Con el propósito de establecer la enzima responsable de la fosforilación de glucosa en las cepas PB12 y PB13, se realizaron estudios de actividad específica enzimática de la enzima glucocinasa (Glc), así como la interrupción del gene *glk* en cromosoma de las cepas JM101, PB12 y PB13.

Los resultados de la medición de la actividad específica de la enzima Glc en las cepas JM101, PB12 y PB13 y sus derivadas interrumpidas en el gene *glk*, se muestran en la tabla 6. Se obtuvo un incremento de 122 y 138 % en la actividad enzimática de Glc en las cepas PB12 y PB13, comparativamente con la actividad obtenida para la cepa silvestre JM101. La interrupción del gene *glk* en las cepas PB12 y PB13 redujo considerablemente la capacidad de estas cepas para utilizar glucosa como fuente de carbono, según se observó en cajas de MacConkey-glucosa 2 %. Las cepas que utilizan preferencialmente glucosa como fuente de carbono producen colonias rojas en este medio, en tanto que las cepas que producen colonias blancas en cajas de medio MacConkey-glucosa 2 %, significa que utilizan preferencialmente las otras fuentes de carbono presentes en el medio. Según se observa en la tabla 6, las cepas SM1 (JM101 *glk*<sup>-</sup>), NF29 (PB12 *glk*<sup>-</sup>) y NF30 (PB13 *glk*<sup>-</sup>), presentan una actividad residual de fosforilación de glucosa de entre 22 y 32 nmol sustrato · min<sup>-1</sup> · mgprot<sup>-1</sup>. Este resultado se puede explicar por la presencia de otras enzimas con capacidad de fosforilar glucosa, como el componente IIA<sup>man</sup>, del sistema de transporte de manosa-fosfotransferasa (Curtis y Epstein, 1975). Se realizaron análisis de PCR de DNA cromosomal de las cepas *glk*<sup>-</sup> SM1, NF29 y NF30, que demostraron sólo la presencia del

producto correspondiente a la construcción *glk::Cat* integrada en el cromosoma de las cepas correspondientes. De estos datos, podemos concluir que la glucocinasa es la enzima que lleva a cabo la mayor parte de la fosforilación de glucosa en las cepas PB12 y PB13 y que la interrupción de este gene provoca que estas cepas reduzcan severamente su capacidad de utilizar glucosa como fuente de carbono.

Según datos publicados en Flores (1995), se postuló la posible participación de la vía de Entner-Doudoroff como alternativa para la utilización de glucosa como fuente de carbono en las cepas PTS<sup>-</sup>Glc<sup>+</sup>. Debido a que para la utilización de glucosa como fuente de carbono en las cepas PTS<sup>-</sup>Glc<sup>+</sup>, por la vía del gluconato se necesita que la glucosa se convierta en gluconato en el espacio periplásmico y que éste sea transportado hacia el interior por alguna permeasa y, una vez en el interior de la célula, que el gluconato sea fosforilado, para iniciar su metabolismo por la vía de ED. Se ensayó la capacidad de fosforilación de gluconato de los extractos libres de proteína de las cepas PB12 y PB13, obteniéndose valores cercanos a cero, la enzima Glk fosforila principalmente glucosa, y no gluconato. Los datos obtenidos a nivel de la enzima glucocinasa y de su participación en la utilización de glucosa permiten suponer que la vía de ED no tiene una participación mayoritaria en el metabolismo de glucosa en las cepas PTS<sup>-</sup>Glc<sup>+</sup> PB12 y PB13.

**Tabla 6.** Actividades específicas de la enzima Glk y fenotipo de cepas mutantes en el gene *glk*.

Cepa	Genotipo	Glk <sup>a</sup>	Fenotipo <sup>b</sup>
JM101	silvestre	57	R
SM1	JM101 <i>glk</i> <sup>-</sup>	27	R
PB12	PTS <sup>-</sup>	127	R
NF29	PB12 <i>glk</i> <sup>-</sup>	32	W
PB13	PTS <sup>-</sup>	136	R
NF30	PB13 <i>glk</i> <sup>-</sup>	22	W

Los resultados representan el promedio de al menos tres diferentes experimentos.

<sup>a</sup> Las actividades específicas se reportan como nmol sustrato producido min<sup>-1</sup>mg prot.<sup>-1</sup>.

<sup>b</sup> Observado en cajas de MacConkey-glucosa 2 %. La coloración roja de las colonias se interpretó como la capacidad de la cepa para usar glucosa como fuente de carbono. La coloración blanca de las colonias se interpretó como una severa reducción en la capacidad de utilización de glucosa como fuente de carbono. R = colonias rojas, W = colonias blancas.

#### VII.2.4 Actividades específicas de las enzimas fosfoglucoosa-isomerasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y 6-fosfogluconato deshidrogenasa, en diferentes cepas.

Como parte de la caracterización de las cepas PB11, PB12 y PB13, se realizaron análisis de las actividades específicas de algunas de las enzimas del metabolismo central. Como se puede observar en la tabla 7, existen diferencias importantes entre las actividades específicas de las enzimas Pgi, Zwf y Gnd, cuando se les compara con los valores correspondientes a los de la cepa silvestre.

En la cepa PB11 se observó un importante decremento de la actividad específica de la enzima Pgi. Donde la actividad específica de ésta enzima se reduce a un 9 % de la actividad que presenta la cepa silvestre, esto puede ser consecuencia de la ausencia del sistema PTS, que se reconoce como un regulador global del metabolismo de carbono en *E. coli* (Postma, 1996), o bien puede ser a causa de la reducción en el transporte de glucosa que presenta la cepa PB11. En *E. coli*, la ausencia de un sistema PTS funcional en presencia de glucosa como fuente de carbono, podría tener consecuencias en la disponibilidad de glucosa-6-fosfato o algunos otros metabolitos, y la variación en la disponibilidad de los mismos puede tener alguna relación con la expresión del gene *pgi*, o causar alguna modificación post-transcripcional de la proteína que la hace inactiva para el ensayo de actividad específica. Sin embargo, no se ha reportado aún si existe alguna relación directa entre el sistema PTS (o alguno de sus componentes) y los mecanismos de regulación de la actividad de la enzima Pgi o de la expresión del gene *pgi*.

Los valores de actividades específicas de la enzima Pgi para las cepas PB12 y PB13 fueron 3.9 y 3.3 veces mayores del valor obtenido para la misma enzima en la cepa silvestre JM101. Del mismo modo, se obtuvieron actividades específicas mayores para la enzima Zwf, aunque, en este caso los valores fueron sólo de 1.5 y 1.9 veces para las cepas PB12 y PB13, respectivamente con relación a la cepa silvestre. Por otro lado, la actividad específica de Gnd de estas mutantes es 50 % menor, en ambos casos que la correspondiente en la cepa silvestre. Estos datos sugieren que las cepas PTS<sup>-</sup>Glc<sup>+</sup> PB12 y PB13 tienen una distribución de flujos de carbono a nivel del nodo de glucosa-6-fosfato entre la vía glicolítica y el brazo oxidativo de la vía de las pentosas, diferente al de la cepa silvestre JM101 de la que provienen. Por otro lado, la relación Pgi/Zwf de actividades específicas es de 8 para la cepa silvestre, y de 21.3 y 15.1 para las cepas PB12 y PB13; esta relación de actividades específicas puede ser interpretado como un indicador de un mayor flujo de carbono en la

vía EMP sobre el brazo oxidativo de la vía de las pentosas en las cepas PB12 y PB13, comparativamente con la relación de flujos en estas vías del metabolismo para diferentes cepas silvestres de *E. coli*, que varía entre valores de 70-80% del carbono a nivel de glucosa-6-fosfato para la vía EMP, y el restante 20-30 % que se dirige al brazo oxidativo de la vía de las pentosas a través de la enzima Zwf (Sziperski, 1995, Fiaux, 1999).

**Tabla 7.** Actividades específicas<sup>a</sup> de las enzimas Pgi, Zwf y Gnd de varias cepas de *E. coli*.

Cepa	Fenotipo	Pgi	%	Zwf	%	Gnd	%	Pgi / Zwf
JM101	silvestre	1448	100	180	100	255	100	8.0
PB11	PTS <sup>-</sup> Glc <sup>-</sup>	134	9	136	76	114	45	1.0
PB12	PTS <sup>-</sup> Glc <sup>+</sup>	5699	394	267	148	130	51	21.3
PB13	PTS <sup>-</sup> Glc <sup>+</sup>	4737	327	314	174	123	48	15.1

<sup>a</sup> reportado como nmol sustrato producido·min<sup>-1</sup>·mg prot.<sup>-1</sup>

#### VII.2.5 Análisis de la utilización de gluconato en las cepas JM101, PB12 y PB13. Mutantes en la vía ED.

Según los datos reportados por Noemí Flores (Flores, 1995), no era claro si una de las estrategias para la utilización de glucosa que desarrollaba la cepa PB11 durante el proceso de mutación-adaptación, era la conversión de glucosa a gluconato en el espacio periplásmico y la posterior utilización del mismo por la vía de ED. De acuerdo con los datos de actividad específica obtenidos durante la caracterización bioquímica de las cepas PB12 y PB13, existe un incremento de la actividad específica de la enzima Zwf, lo cual podría significar la canalización de un mayor flujo de carbono por el brazo oxidativo de la vía de las pentosas (LaPorte *et al.*, 1984). Una de las siguientes reacciones enzimáticas del brazo oxidativo de la vía de las pentosas es catalizada por la enzima Gnd. En condiciones de utilización aeróbica de glucosa, la glucosa que se metaboliza por la enzima Zwf continúa por Gnd; sin embargo, está reportado que en presencia de la enzima Edd, el 6-fosfogluconato es metabolizado preferencialmente por esta última (Tong *et al.*, 1996).

Anteriormente, se reconocía la posibilidad de que en el espacio periplásmico, algunas cepas de *E. coli*, puedan convertir glucosa en gluconato mediante la expresión del gene de la enzima glucosa-deshidrogenasa, (Gcd), que requiere del cofactor pirroloquinoleínquinona (PQQ), para llevar a cabo la oxidación (Biville *et al.*, 1991).

Recientemente, se demostró que *E. coli*, es incapaz de producir PQQ, y sólo cuando se le adiciona este al cultivo, es capaz de realizar la oxidación de glucosa a gluconato (Matsushita *et al.*, 1997). En presencia de gluconato se expresan los genes específicos para el transporte, fosforilación y metabolismo de éste (Tong *et al.*, 1996). Estos genes incluyen los que codifican para las enzimas Edd y Eda, de la vía ED.

Como se señaló anteriormente, la glucocinasa es la principal responsable de la fosforilación de glucosa en las cepas PB12 y PB13. Esto podría descartar la utilización de gluconato en las cepas PB12 y PB13. Sin embargo, de los datos de actividad específica, no queda claro si a nivel del 6-fosfogluconato, el metabolismo del mismo continúa a través de Gnd o por Edd. El valor de actividad específica de la enzima Gnd es 42 % mayor al de Zwf en la cepa JM101. En las cepas PB12 y PB13, el valor de actividad específica es 49 % y 39 % menor al de Zwf, respectivamente. Analizando estos datos, existen al menos dos posibilidades: I) Que el aumento de la actividad específica de Zwf no tenga efectos en la cantidad de carbono que se metaboliza en los subsiguientes pasos del metabolismo de glucosa a través de las vías PP o ED. Bajo estas condiciones, se entendería que la cantidad de la enzima Gnd es suficiente para metabolizar el carbono proveniente de Zwf y, II) Que si existe un aumento del flujo de carbono motivado por el aumento de la actividad específica de Zwf en las cepas PB12 y PB13, éste sea metabolizado preferentemente por Edd y no por Gnd. Para diferenciar entre estas dos posibilidades, decidimos interrumpir el gene *edd*, en las cepas JM101, PB12 y PB13. En el caso de que alguna fracción importante del 6-fosfogluconato sea metabolizado por esta vía, la mutación en el gene *edd*, tendría un efecto visible en el crecimiento, que se podría interpretar como la participación de la vía ED en el metabolismo de glucosa en las cepas PB12 y/o PB13. El caso contrario, donde no haya efecto apreciable de la interrupción del gene *edd* en estas cepas, demostraría la poca o nula participación de la vía ED en el metabolismo de glucosa en las cepas PB12 y PB13.

Las cepas mutantes en el gene *edd*, se obtuvieron por doble recombinación en cromosoma de la construcción *edd::Cm* presente en el plásmido termosensible pBri03. Las dobles recombinantes fueron seleccionadas por su fenotipo  $Cm^rAp^s$ . Las cepas *edd* fueron analizadas por técnicas de PCR usando combinaciones de los oligonucleótidos EDD01 y EDD05 con el oligonucleótido  $Cm_1$ , que es complementario para una región interior del gene *cat*, presente en el plásmido pBri03. Los productos de PCR fueron corroborados por análisis de restricción y en todos casos se obtuvieron fragmentos del tamaño esperado. En

la tabla 8, se muestran las velocidades de crecimiento obtenidas para las cepas *edd* derivadas de JM101 y PB13.

En el caso de la cepa silvestre, ésta muestra un decremento de solo un 10 % de la velocidad de crecimiento comparativamente entre el medio M9-Glc 0.2 % y su crecimiento en el medio M9-Gnt 0.2 %. En el caso de la cepa SM22 (JM101 *edd*), el decremento en la velocidad de crecimiento es de 50 %, lo cual corrobora que la principal vía de utilización de gluconato en *E. coli* silvestre es la vía ED. En el caso de la cepa PB13, el decremento de la velocidad de crecimiento en el medio M9-Glc 0.2 % al medio M9-Gnt 0.2 %, es de 12 %. Contrario a lo observado para la derivada *edd* de la cepa silvestre JM101, la derivada *edd* de la cepa PB13 (cepa SM25), no reduce su velocidad de crecimiento cuando crece en gluconato como única fuente de carbono, sino que la aumenta. En la cepa silvestre JM101 el gluconato es principalmente metabolizado por la vía ED, y la interrupción del gene *edd*, tiene consecuencias importantes en esta cepa para la utilización de esta fuente de carbono. En el caso de la cepa PB13 es probable que la enzima Gnd pueda dirigir flujo de carbono hacia el brazo no-oxidativo de la vía PP, por lo que la delección del gene *edd* no tiene consecuencias importantes para el crecimiento en gluconato en esta mutante. Este resultado es relevante ya contribuye a esclarecer el importante papel que juega la enzima Gnd en el metabolismo de carbono en la cepa PB13.

**Tabla 8.** Velocidades de crecimiento de las cepas *edd*.

Cepa	Genotipo	$\mu^a$	$\mu^b$	% $\mu_{Gnt} / \mu_{Glc}$
JM101	silvestre	0.70	0.63	90
SM22	JM101 <i>edd</i>	0.62	0.31	50
PB13	PTS <sup>-</sup> Glc <sup>+</sup>	0.44	0.36	82
SM25	PB13 <i>edd</i>	0.35	0.42	120

<sup>a</sup> en h<sup>-1</sup>, obtenidos en medio M9-glucosa 2 g/l.

<sup>b</sup> en h<sup>-1</sup>, obtenidos en medio M9-gluconato 2 g/l.

Contrariamente a lo esperado, no fue posible obtener la derivada *edd* de la cepa PB12. Es probable que la delección de este gene sea letal para esta cepa. Es conocido que los genes *edd-eda*, están organizados secuencialmente en un operón (Conway *et al.*, 1991). El gene *eda*, es monocistrónico con *edd*, por lo que la expresión de *eda*, depende en su mayor



parte de *edd*. Se ha demostrado la expresión independiente de *eda*, creciendo en glucosa como fuente de carbono, pero aún esta expresión depende de un promotor situado en el extremo 3', del gene *edd* (Egan, *et al.*, 1992). Se ha reportado además, que la interrupción del gene *eda*, es letal para *E. coli*, ya que la enzima Eda cumple funciones de detoxificación o metabolismo de  $\alpha$ -cetoácidos, en la respuesta de tipo SOS y en respuesta a agentes químicos que desnaturalizan el DNA (Peekhaus y Conway, 1998). Así mismo, se ha demostrado que la enzima Edd de *E. coli* es sensible a agentes oxidantes del tipo  $O_2^-$ , conocidos como superóxidos y que juega un papel importante en la detoxificación de  $\alpha,\beta$ -dihidroxiácidos (Gardner y Fridovich, 1991). Dada la extrema relación entre los genes *edd-eda*, es posible que en la cepa PB12 la mutación en el gene *edd* por sí misma tenga consecuencias para la fisiología particular de la cepa PB12, o por el efecto indirecto que esta interrupción tenga sobre la expresión del gene *eda*.

### **VII.3 Resultados de la caracterización del metabolismo de carbono mediante el análisis de resonancia magnética nuclear.**

Se utilizó una mezcla de  $[1-^{13}C]$ glucosa y  $[U-^{13}C_6]$ glucosa para determinar las diferencias en los flujos de carbono entre las cepas silvestre,  $PTS^-Glc^-$  y  $PTS^-Glc^+$ . Para ello, se realizaron experimentos de análisis bidimensional de correlación  $^1H-^{13}C$  de RMN (2D  $[^{13}C, ^1H]$ -HSQC) o COSY del producto de la hidrólisis ácida de biomasa proveniente de cultivo-lote de las cepas de *E. coli*, silvestre y sus derivadas modificadas en el transporte de glucosa y se integraron los multipletes de  $^{13}C$  que reflejan las mezclas de isotopómeros para cada especie química observable en el espectro COSY. Los valores para todas las señales se presentan en el apéndice 2. Los datos del apéndice 2 se usaron a su vez para alimentar el programa de análisis de flujos, obteniéndose así, los valores de flujos de carbono del metabolismo central en  $mmol \cdot h^{-1} \cdot g \text{ biomasa}^{-1}$ , para las cepas JM101, PB11, PB12 y PB13.

Como resultado de estos análisis, se obtuvieron diferencias significativas en los valores de flujos de carbono para estas cepas a nivel de la vía EMP, PP y el ciclo de los ácidos tricarbóxicos; (ver tabla 9), las diferencias entre los valores de los flujos de carbono para estas vías se discutirá mas adelante.

**Tabla 9.** Flujos de carbono<sup>a</sup> obtenidos del análisis de <sup>13</sup>C-NMR (porcentaje molar).

Cepa	Reacción <sup>b</sup>							
	1	2	3	4	5	6	7	8
JM101	76.6	22.3	40.7	44.1	7.7	0.0	38.1	55.4
PB11	40.3	58.5	128.3	94.0	22.0	0.0	88.0	0.0
PB12	93.1	5.3	128.3	40.3	0.0	3.7	28.5	36.0
PB13	89.2	9.6	141.3	50.7	0.0	9.8	34.8	53.1

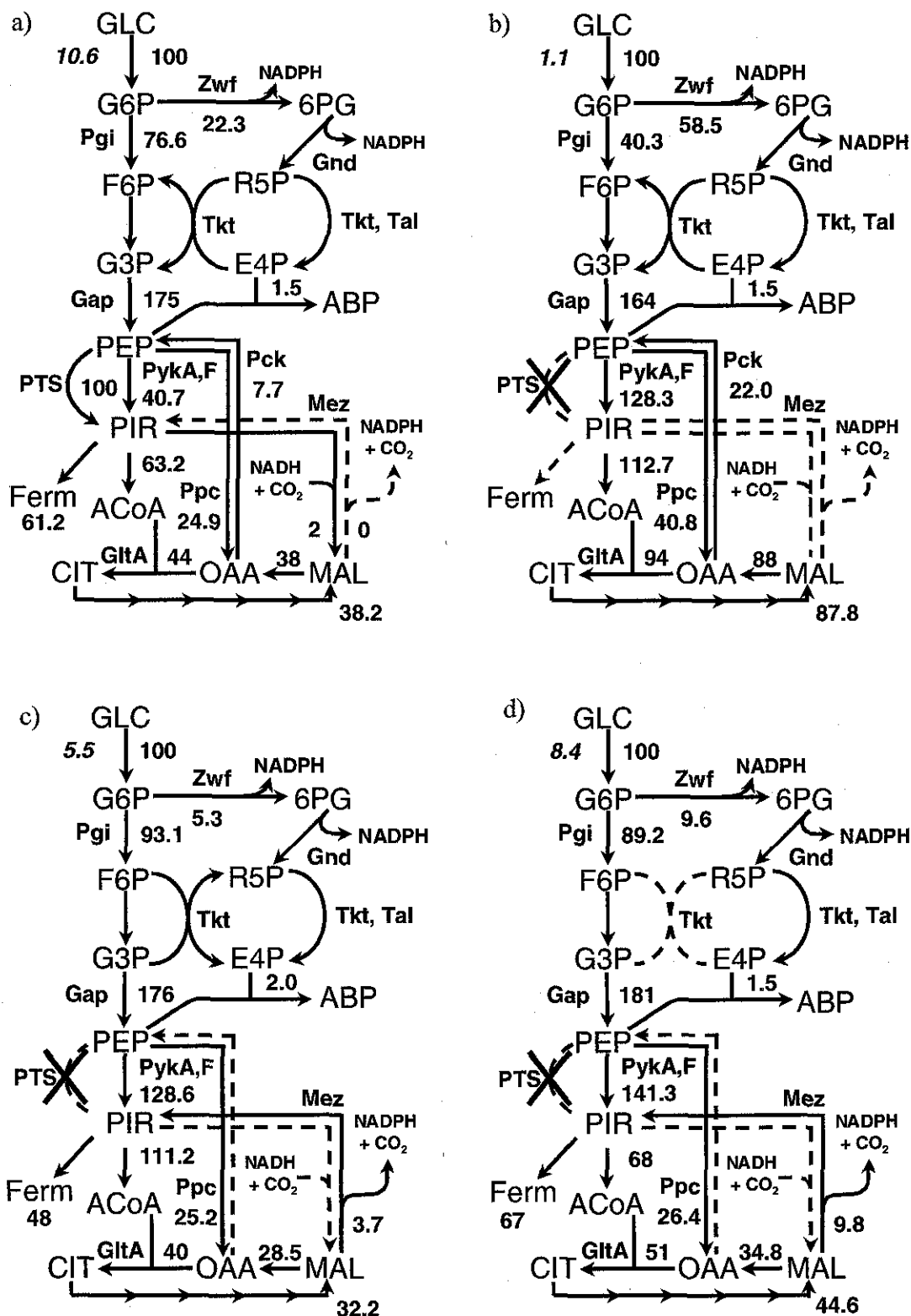
<sup>a</sup> Todos los flujos de carbono se expresan como porcentaje de la utilización de glucosa en cada cepa, y están expresados en mmol Glc·h<sup>-1</sup>·g biomasa<sup>-1</sup>.

<sup>b</sup> Reacciones: 1) G6P → F6P, flujo de carbono en la vía EMP. 2) G6P → 6PG, flujo de carbono en la vía PP. 3) PEP → PIR, flujo de carbono en las enzimas PykA, PikF. 4) ACoA + OAA → CIT, flujo de carbono en la enzima GltA. 5) OAA → PEP + CO<sub>2</sub>, flujo de carbono en la enzima Pck. 6) OAA → PIR + CO<sub>2</sub>, flujo de carbono en la enzima NADP-Mez. 7) MAL → OAA, flujo de carbono en la enzima Mdh. 8) producción de ácido acético.

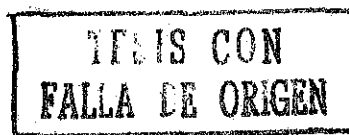
### VII.3.1 Flujos de carbono determinados para la vía EMP.

Como se observó a partir de la caracterización bioquímica de las cepas JM101, PB11, PB12 y PB13, la relación de las actividades específicas de las enzimas Pgi y Zwf sugería un mayor flujo de carbono a través de la vía de EMP en las cepas mutantes, PB12 y PB13, comparativamente con la cepa silvestre. Esta hipótesis fue confirmada por RMN. La cepa silvestre de *E. coli* dirige un 76.6 % del flujo de carbono molar hacia la vía glicolítica a partir de glucosa-6-fosfato (ver figura 20-a), mientras que la cepa PTS<sup>-</sup>Glc<sup>-</sup> PB11, presentó una reducción muy importante del flujo de carbono en la vía EMP (40.3 % flujo molar, figura 20-b).

Es probable que las diferencias de flujo de carbono en la vía EMP entre las cepas JM101 y PB11 sea el resultado de la ausencia del sistema PTS en la cepa PB11, con la consecuente disminución en la capacidad de transporte de glucosa y por ende, una reducida velocidad de crecimiento. Estos factores pudieran dejar a la cepa PB11 con una disponibilidad limitada de G6P además de que la primera reacción de la vía EMP, catalizada por la enzima Pgi es una reacción reversible, en tanto que la primera reacción del brazo oxidativo de la vía PP, (que compite con la vía EMP por el sustrato común G6P), catalizada por la enzima Zwf, es irreversible, por lo que, tomando en cuenta estas consideraciones, es posible explicar el bajo flujo de carbono sobre la vía EMP en la cepa PB11.



**Figura 20.** Valores de flujo de carbono obtenidos para algunas vías metabólicas en *Escherichia coli* JM101 (a), su derivada PTS<sup>-</sup>Glc<sup>-</sup> PB11 (b) y las cepas PTS<sup>-</sup>Glc<sup>+</sup> PB12 (c) y PB13 (d). Los valores en *itálicas* representan el transporte de glucosa en mmol Glc<sup>-1</sup>·g biomasa<sup>-1</sup>. Otros valores se expresan como el porcentaje molar del transporte de glucosa para cada cepa. La dirección de la flecha representa la resultante del flujo de carbono para esa reacción. Las líneas punteadas significan valores de flujo de carbono cercanos a cero para la reacción señalada.



En las cepas  $PTS^-Glc^+$  PB12 y PB13, una de las diferencias importantes comparativamente con la cepa silvestre se encuentra a nivel del nodo de G6P, en el primer paso de la vía EMP, catalizado por la enzima Pgi. Los valores de flujos de carbono obtenidos para las cepas PB12 Y PB13, fueron 93.1 y 89.2 de flujo molar, respectivamente (figura 20-c y 20-d). Es relevante señalar que no existen diferencias importantes en los flujos de carbono para los siguientes pasos de la vía glicolítica entre las cepas JM101, PB11, PB12 y PB13 desde F6P hasta PEP.

La hipótesis para iniciar el estudio del metabolismo de carbono en *E. coli*, confirmada por Báez *et al.*, (2001), fue que la ausencia del sistema PTS, el principal sistema de utilización de PEP, así como la utilización de un sistema diferente para el transporte y fosforilación de glucosa, provoca un aumento de la disponibilidad de PEP que podría ser canalizado hacia la biosíntesis de aminoácidos aromáticos (ABP). Sin embargo, los resultados del análisis de RMN y el modelamiento matemático no indicaron diferencias importantes entre los valores de flujo de carbono hacia ABP entre la cepa silvestre y sus mutantes modificadas en el transporte de glucosa (figura 20).

La pequeña variación de flujo de carbono hacia la vía común de síntesis de aminoácidos aromáticos entre las cepas JM101, PB12 y PB13 es esperado, si se toma en cuenta que esta vía presenta una fuerte regulación del tipo de inhibición por producto final. Esta inhibición se presenta principalmente a nivel de las tres isoenzimas DAHP sintasas (AroF, AroG y AroH); estas enzimas catalizan la condensación de PEP y E4P, que es el primer paso de la vía (Gosset *et al.*, 1996, Stephanopoulos, 1999). Sin embargo, otras reacciones participantes en el nodo de PEP, y que se comportan como flexibles a modificaciones en la biodisponibilidad de PEP, como la conversión de PEP en piruvato, catalizada por las enzimas piruvato cinasas A y F, aumentan considerablemente su flujo de carbono en las cepas  $PTS^-$ , (ver figura 20).

Dos de las más importantes diferencias entre las cepas JM101 y sus derivadas  $PTS^-$ , es que en las cepas mutantes PB11, PB12 y PB13, el flujo de carbono en las enzimas PykA-F, se incrementa en aproximadamente en la misma fracción que la que es utilizada por el sistema PTS en la cepa silvestre (figura 20). El flujo de carbono por las enzimas PykA-F aumenta de 40.7 % molar en la cepa silvestre, a 128.3, 128.6 y 141.3 respectivamente, en las tres mutantes. El piruvato producido es usado diferencialmente para la síntesis de acetil-CoA y malato (ver más adelante).

El análisis de la producción de ácido acético (tabla 9 y figura 20), muestra que las cepas JM101 y PB13, producen aproximadamente la misma cantidad de ácido acético por mol de glucosa, 55 y 56 % molar; en tanto que en la cepa PB12 este porcentaje es de sólo el 36 %. Este resultado concuerda con observaciones previas reportadas por nuestro grupo (Sigüenza *et al*, 1999).

Otros productos observados de la fermentación de glucosa en *E. coli* JM101 por <sup>1</sup>H-RMN son principalmente etanol y ácido fórmico. La fracción total de la glucosa que se dirige a los productos de fermentación es del 61.2 % en la cepa silvestre, 48 % en la cepa PB12 y 67 % en la cepa PB13 (figura 20-a, c y d). El modelamiento matemático de la cepa PB11 sugirió que la cepa PB11 no produce ningún producto de fermentación de glucosa; de igual forma, en los análisis de <sup>1</sup>H-RMN, tampoco se pudo observar la presencia de ninguna especie en el sobrenadante del medio de cultivo, además de la glucosa.

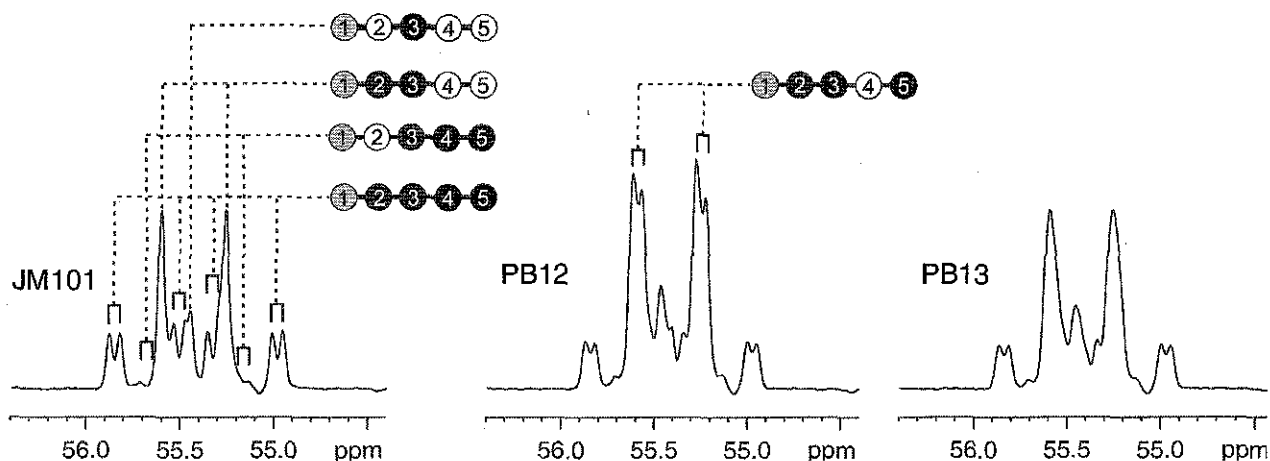
### VII.3.2 Flujos de carbono determinados para la vía de las pentosas y ED.

A nivel de la vía PP, se obtuvieron tres diferencias principales entre las cepas estudiadas:

I) La cepa JM101 dirige un 22 % de la G6P, a través de la enzima Zwf, hacia el brazo oxidativo de la vía de las pentosas, en las condiciones estudiadas por nosotros. Los datos obtenidos coinciden con los valores previamente reportados por Neidhardt (1990) y Szyperski (1998), que proponen que *E. coli*, cuando crece aeróbicamente en glucosa como fuente de carbono, la fracción de la glucosa que se metaboliza por la vía de las pentosas oscila entre el 20 al 30 %. La cepa PTS<sup>-</sup>Glc<sup>-</sup> PB11, presentó un flujo de carbono por esta misma vía de alrededor del 58 %.

II) Las cepas PTS<sup>-</sup>Glc<sup>+</sup>, disminuyen drásticamente el valor de flujo de carbono por el brazo oxidativo de la vía PP de 5.3 y 9.6 %, respectivamente. La reducción del flujo de carbono en esta vía en las cepas PB12 y PB13, coincide con la tendencia observada en el análisis de actividad específica de las enzimas Pgi y Zwf (tabla 7). La reducción del flujo de carbono en el brazo oxidativo de la vía de las pentosas podría tener consecuencias para la fisiología y el metabolismo de las mutantes PTS<sup>-</sup>Glc<sup>+</sup> PB12 y PB13, debido a que en la cepa silvestre, algunos metabolitos y cofactores como R5P, NADPH y E4P, se producen a partir de la glucosa metabolizada por esta vía, bajo las condiciones estudiadas, Fraenkel *et al.*, 1996; Szypersky, 1995 (figura 20-a).

III) El análisis de RMN y el modelamiento matemático revelaron que la principal vía para producir R5P es diferente entre las cepas PB12 y PB13. Como se observa en la figura 21, la histidina, que se deriva directamente de R5P, mostró diferentes patrones de marcaje isotópico en el espectro COSY, lo que significa una composición de isotopómeros de  $^{13}\text{C}$ -histidina distinta. En la cepa PB12, la R5P, se produce principalmente por del brazo no-oxidativo de la vía de las pentosas, a través de las reacciones catalizadas por las enzimas Tkt, Rpi y Rpe. En la cepa PB13, el flujo de carbono a través del brazo no oxidativo de la vía de las pentosas es cercano a cero (tabla 10 y figura 20-d). En la cepa PB13, la E4P y R5P se producen a través del brazo oxidativo de la vía de las pentosas, como producto de las reacciones catalizadas por las enzimas Zwf, Gnd, Rpi, Rpe, Tkt y Tal, (tabla 10 y figura 20-d).



**Figura 21.** Multipletes del C-3 de la molécula de histidina de distintas cepas de *E. coli*. Las diferencias en los perfiles de cada multiplete significan diferencias en la concentración de cada isotopómero de esta molécula. Los átomos de  $^{13}\text{C}$  se denotan por los círculos negros. Los átomos de  $^{12}\text{C}$  se denotan por los círculos blancos. Los círculos grises demuestran el caso en que no se conoce el estado isotópico del carbono correspondiente. Es importante notar que en el caso de la histidina se presenta un acoplamiento a “larga distancia”, debido a la estructura cíclica de la molécula. Los acoplamientos a larga distancia generalmente presentan constantes de acoplamiento pequeñas y dependen de la conectividad  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$ . La presencia del isotopómero  $^{13}\text{C}_2$ - $^{13}\text{C}_3$ - $^{12}\text{C}_4$ - $^{13}\text{C}_5$ , en la molécula de histidina proveniente del hidrolizado de biomasa de la cepa PB12 es sugestiva de un importante flujo de carbono a través del brazo no oxidativo de la vía PP. La presencia de moléculas intactas (uniformemente marcadas), de histidina en sus carbonos 1-5, está directamente relacionada con el flujo de carbono a través de las enzimas Zwf y Gnd del brazo oxidativo de la vía PP, esto debido a que durante estas reacciones no se lleva a cabo ningún rearrreglo del esqueleto carbonado proveniente de UL- $^{13}\text{C}$ -glucosa.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

El análisis de marcaje isotópico y modelamiento matemático de estas cepas demostró que la vía de ED tiene una participación minoritaria en el flujo de carbono en la cepa silvestre de *E. coli* JM101 (figura 20-a), de alrededor de 1.3 % molar; en las cepas PTS<sup>-</sup>Glc<sup>+</sup>, PB12 y PB13, este valor es cercano a cero. La vía de ED es la principal vía para el catabolismo de ácidos urónicos, principalmente gluconato, el cual debe ser fosforilado en el interior de las células para ser metabolizado por esta vía. El resultado de la caracterización bioquímica de las cepas PB12 y PB13, que demuestra que la glucocinasa es la enzima lleva a cabo la mayor parte de la fosforilación de glucosa en estas cepas, demostró también que la glucocinasa presente en las cepas PB12 y PB13 no tiene capacidad para fosforilar gluconato. La ausencia de algún marcaje de <sup>13</sup>C que sugiera la participación de la vía de ED en las cepas PB12 y PB13, junto con la caracterización bioquímica, permitieron determinar que en las mutantes PB12 y PB13, es mínima la participación de la vía de ED en el metabolismo de carbono a partir de glucosa o en el proceso de adaptación a la utilización de glucosa como fuente de carbono de estas cepas.

**Tabla 10.** Flujos de carbono en la vía de las pentosas-fosfato<sup>a</sup>.

Reacción <sup>b</sup>	Cepa		
	JM101	PB12	PB13
ppp1	22	5	10
ppp1a	21	5	9
ppp2	6	1	2
ppp3	6	1	2
ppp4	3	-3	0

<sup>a</sup> Todos los flujos de carbono se expresan como porcentaje de la utilización de glucosa en cada cepa, y están expresados en mmol Glc·h<sup>-1</sup>·g biomasa<sup>-1</sup>. Los flujos negativos significan reacciones reversas.

<sup>b</sup> Reacciones: ppp1 = G6P → 6PG, ppp1a = 6PG → P5P + CO<sub>2</sub>, ppp2 = P5P + P5P → S7P + G3P, ppp3 = S7P + G3P → F6P + E4P, ppp4 = P5P + E4P → F6P + G3P.

### VII.3.3 Flujos de carbono determinados para TCA.

El flujo de carbono a través de las enzimas GltA y Ppc representan la principal vía de aporte de esqueletos de carbono para el ciclo TCA (Cronan y LaPorte, 1996, figura 3). La pérdida de carbono del ciclo TCA, está principalmente motivada por las necesidades biosintéticas de la célula (figura 7), la producción de CO<sub>2</sub> a nivel de la enzima Icd y el complejo de la αCG-deshidrogenasa (figura 1), y la actividad de las enzimas Pck y Mez

(figuras 5-a y 15-a). El análisis de flujos demostró sólo pequeñas diferencias en el flujo de carbono a través de la enzima GltA entre las cepas JM101 (44 %), PB12 (40 %) y PB13 (51 %), (figura 20, tabla 9). En contraste, los flujos de carbono de las reacciones que producen oxaloacetato, especialmente a partir de PEP y malato (figura 15-a), varían.

En la cepa PB11, se observa un recambio importante entre PEP y OAA; el flujo de carbono por la enzima Ppc es 40.8 % molar, mientras que el flujo de carbono en sentido contrario, catalizado por la enzima Pck es 22 %. El flujo de carbono por la enzima GltA es del 94% molar del total de la glucosa internalizada por la bacteria (figura 20-b). Estos datos sugieren que existe una gran actividad de TCA en la cepa PB11 (ver flujo de carbono por la enzima GltA, ver figura 20-b y tabla 9), con la consecuente ganancia de energía (en forma de ATP), por mol de glucosa. Una de las reacciones de que provee de esqueletos de carbono hacia el ciclo TCA, es la reacción catalizada por la enzima Ppc (figuras 1 y 5), presentó valores similares de flujos de carbono en las cepas JM101, PB12 y PB13. En la cepa JM101 el recambio PEP-OAA, está mediado entre las enzimas Ppc y Pck (figuras 15-a y 20-a); el flujo de carbono en la enzima Ppc obtenido fue de 24.9 %, mientras que se observó un flujo de carbono en el sentido contrario de la reacción de 7.7 %, catalizado por la enzima Pck. Según en marcaje de  $^{13}\text{C}$ , el análisis matemático de las mezclas de isotopómeros, el flujo de carbono por la enzima Pck, tiene valores cercanos a cero en las mutantes  $\text{PTS}^-\text{Glc}^+$  PB12 y PB13, demostrándose un incremento neto del aporte de carbono a partir de la carboxilación de PEP hacia TCA en estas cepas. Por otro lado, el oxalacetato sintetizado por la malato deshidrogenasa decrece de un 38 % molar en la cepa JM101 a 28.5 % y 34.8 % en las cepas PB12 y PB13, respectivamente (figura 20-a, -c y -d). En la cepa silvestre, Ppc equilibra los esqueletos de carbono tomados de TCA para la biosíntesis de aminoácidos por la enzima Pck, mientras que en las cepas mutantes PB12 y PB13, Ppc, además, repone el malato utilizado por la enzima málica para producir NADPH y piruvato. La figura 11 muestra la mezcla de isotopómeros del ácido aspártico, para cada una de las cepas JM101, PB12 y PB13, que se produce por transaminación directa del oxaloacetato (figura 7). En la figura 11, se observa claramente que existen diferencias de flujos de carbono de las vías que producen oxalacetato entre estas cepas.

Por otro lado, la enzima málica dependiente de NADP (NADP-Mez), oxida malato para producir piruvato NADPH y  $\text{CO}_2$ . NADP-Mez es un importante productor de NADPH en *E. coli*; sin embargo, la vía PP es el mayor aporte de NADPH cuando la bacteria crece



usando glucosa como fuente de carbono en condiciones aeróbicas (Csonka y Fraenkel, 1977, Szyperski, 1995, Fiaux *et al*, 1999). Recientemente, se han aislado cepas mutantes en cada uno de los genes que codifican para las enzimas málicas (NAD-Mez, gen *sfcA* y NADP-Mez, gene *b2463*). A partir de estas cepas se ha demostrado que la ausencia de descarboxilación oxidativa no tiene efectos observables en *E. coli*, cuando crece en glucosa como fuente de carbono en condiciones aerobias (Van der Rest *et. al*, 2000). En el presente trabajo, mediante marcaje de  $^{13}\text{C}$  y el modelamiento matemático, se determinó que el flujo de carbono a través de la enzima málica es despreciable en la cepa silvestre. En contraste, en las cepas PB12 y PB13, el flujo de carbono por la enzima NADP-Mez, fue de 3.7 % y 9.8 % molar, respectivamente (figura 20-c y 20-d). Otros grupos de investigación usando técnicas similares, han reportado un marcaje de menos del 5 % de las moléculas de piruvato, que sugiere flujo de carbono a través de la enzima málica NADP-Mez, lo que a su vez sugiere un flujo de carbono mínimo a través de esta enzima. En el mismo reporte, se señala un aumento del mismo tipo de marcaje al 20 % de las moléculas de piruvato cuando analizaron mutantes de *E. coli*, en los genes que codifican para las enzimas piruvato-cinasas A y F (cepa PB25, Ponce *et al.*, 1997, Sauer *et al.*, 1999). Como se puede observar de los trabajos del Dr. Sauer y de nuestro grupo, dos cepas con distintas modificaciones en la utilización de PEP, incrementan el flujo de carbono en las enzimas málicas (ver figura 15-a y 15-b). Stols y Donnely, (1997), y van der Rest *et al.*, (2000), reportan que la función principal de las enzimas málicas es la de sintetizar piruvato y poder reductor (NADH o NADPH) a partir de malato. Sin embargo, la enzima NAD-Mez puede actuar en dirección contraria, carboxilando piruvato, para sintetizar malato, usando NADH como cofactor (figura 15-a). En el presente estudio, obtuvimos un flujo de carbono en esta en la enzima NAD-Mez del 2 % del flujo molar en la dirección de la carboxilación de piruvato. Este flujo se encuentra ausente en las cepas PB12 y PB13 (figuras 20-c y 20-d). Es posible que las enzimas Ppc, Pck y Mez reflejen un mecanismo “concertado”, que utiliza la bacteria para regular el flujo de carbono en TCA bajo ciertas condiciones metabólicas. En el caso de la cepa JM101, el poder reductor, NADPH, es producido principalmente por el brazo oxidativo de la vía de las pentosas, y el balance PEP-PIR es mediado por las enzimas Ppc y Pck. En las cepas  $\text{PTS}^-\text{Glc}^+$  PB12 y PB13, debido a la reducción de flujo de carbono en el brazo oxidativo de la vía de las pentosas, la enzima NADP-Mez, sintetiza NADPH usando malato, un intermediario del ciclo TCA, como sustrato. En las cepas PB12 y PB13, el

balance PEP-PIR se encuentra en la dirección de la producción de PEP; debido a la ausencia del sistema PTS, el PEP se encuentra disponible para ser metabolizado por otras vías; aparentemente no hay necesidad de sintetizar PEP por la enzima Pck. Otra posible explicación para la ausencia de flujo de carbono por la enzima Pck, en las mutantes PB12 y PB13, es la depleción de esqueletos de carbono de TCA motivado por la actividad de la enzima málica. De esta forma, la célula puede responder a la disponibilidad de PEP y/o depleción de esqueletos de carbono en TCA, ajustando el flujo de carbono sobre Pck.

#### **VII.4 Utilidad del análisis de flujos por RMN en la predicción de manipulaciones genéticas en *Escherichia coli*.**

##### **VII.4.1 Mutantes en el gene *pgi*.**

Los resultados de los análisis de RMN y el modelamiento matemático permitieron predecir algunos efectos de manipulaciones genéticas específicas realizadas a las cepas PB12 y PB13.

Los cálculos basados en el marcaje de  $^{13}\text{C}$  demostraron que las cepas PB12 y PB13 tienen disminuido el flujo de carbono por el brazo oxidativo de la vía PP. Estas cepas tienen incrementada la actividad específica de la enzima Pgi con respecto a la cepa silvestre (tabla 7). Igualmente, estas cepas presentan, como se mencionó anteriormente, un incremento en la actividad específica de la enzima Zwf, que compromete la G6P que metaboliza a seguir su catabolismo por el brazo oxidativo de la vía PP (figura 1). La tendencia observada al analizar el coeficiente Pgi/Zwf de las cepas PB12 y PB13 (tabla 7), coincide con el flujo de carbono obtenido según los experimentos de marcaje isotópico y modelamiento matemático, que demostraron un elevado flujo glicolítico en estas cepas y un decremento en el flujo de carbono sobre el brazo oxidativo de la vía de las pentosas. En estas condiciones las enzimas Pgi y Zwf compiten por el sustrato común de ambas, la G6P, el incremento de la actividad específica de ambas puede formar parte del proceso de adaptación para usar glucosa eficientemente como fuente de carbono en las cepas PB12 y PB13 y como un medio para mantener la capacidad de dirigir flujo de carbono suficiente en el brazo oxidativo de la vía de las pentosas para cumplir con las necesidades fisiológicas de estas cepas, por ejemplo la producción de NADPH, R5P y E4P.

Para determinar si el incremento de la actividad específica de la enzima Zwf pudiera tener algún papel fisiológico, se decidió interrumpir el gene *pgi* en la cepa silvestre y en las mutantes PTS<sup>-</sup>Glc<sup>+</sup> PB12 y PB13. Se ha reportado que cepas de *E. coli* mutantes en el gene *pgi*, crecen dependiendo del flujo de carbono que pueden dirigir a través de la enzima Zwf. En la cepa silvestre, la interrupción de este gene causó una reducción de la velocidad de crecimiento en medio M9-glucosa 0.2 % de 0.7 h<sup>-1</sup> a 0.1 h<sup>-1</sup> en la cepa SM14 (JM101 *pgi*<sup>-</sup>), 86 % menos que la cepa parental. Cuando se realizó la misma interrupción en cepas PTS<sup>-</sup>Glc<sup>+</sup>, la velocidad de crecimiento bajó de 0.42 h<sup>-1</sup> a 0.29 h<sup>-1</sup> en la cepa SM31, sólo 31 % menos que la cepa PB12, de la que proviene y de 0.49 h<sup>-1</sup> a 0.35 h<sup>-1</sup> en la cepa SM32, 29 % menos que la cepa PB13, de la cual proviene (tabla 11). La actividad de la enzima Zwf en las cepas SM14, SM31 y SM32 en ningún caso fue mayor que en las cepas parentales, demostrando que el menor efecto deletéreo de la mutación en el gene *pgi* en las cepas PTS<sup>-</sup>Glc<sup>+</sup>, no se debe a una adaptación posterior, mediante el aumento del flujo de carbono en el brazo oxidativo de la vía PP, al crecimiento en glucosa de sus derivadas *pgi*<sup>-</sup>. Usando estos datos, es posible concluir que una mayor actividad específica de la enzima Zwf, quizá auxiliada por otros eventos de mutación adaptante a la utilización de glucosa como fuente de carbono de la cepa PTS<sup>-</sup>Glc<sup>-</sup>, permita a las cepas de *E. coli* PTS<sup>-</sup>Glc<sup>+</sup> dirigir un mayor flujo de carbono hacia la vía de las pentosas y mantener una mayor velocidad de crecimiento, comparativamente con la cepa silvestre, en ausencia de la enzima Pgi.

**Tabla 11.** Velocidades de crecimiento ( $\mu$ ) de mutantes en los genes *pgi* y *gnd* de *E. coli*.

Cepa	Genotipo	$\mu$ <sup>a</sup>	%
JM101	silvestre	0.71	100
SM14	JM101 <i>pgi</i> <sup>-</sup>	0.10	14
PB12	PTS <sup>-</sup> Glc <sup>+</sup>	0.42	100
SM31	PB12 <i>pgi</i> <sup>-</sup>	0.29	69
PB13	PTS <sup>-</sup> Glc <sup>+</sup>	0.49	100
SM32	PB13 <i>pgi</i> <sup>-</sup>	0.35	71

<sup>a</sup> en h<sup>-1</sup>, obtenidos en medio M9-glucosa 2 g/l.

#### VII.4.2 Mutantes en el gene *gnd*.

El metabolismo de pentosas es diferente entre las cepas PB12 y PB13. Según lo observado a partir de los datos de RMN y modelamiento matemático, en la cepa PB12 el brazo no oxidativo de la vía PP, es el principal productor de R5P y E4P (tabla 9, figura 20-c, figura 21). Por otro lado, en la cepa PB13, la R5P se sintetiza a partir de la enzima Gnd del brazo oxidativo de la vía PP, mientras que la E4P se produce por la transaldolasa a partir de las P5P sintetizadas por Gnd (figura 20-d, figura 21). Debido a estas diferencias, la interrupción del gene *gnd* tendría diferentes efectos en estas cepas. Una derivada *gnd* de la cepa PB13 estaría severamente limitada en la síntesis de R5P y E4P necesaria para la biosíntesis de aminoácidos aromáticos y vitaminas. Esta situación podría ser distinta en la cepa PB12, donde la interrupción del mismo gene podría no tener el mismo efecto deletéreo cuando las cepas fueran analizadas para su crecimiento en glucosa como fuente de carbono. Con base en lo anterior se decidió interrumpir este gene en el cromosoma de las cepas JM101, PB12 y PB13, y se analizó el crecimiento en glucosa como única fuente de carbono de las derivadas *gnd* de estas cepas. Como se puede observar en la tabla 12, la cepa SM8 (PB12 *gnd*) y PB12 tienen casi la misma velocidad de crecimiento ( $0.39 \text{ h}^{-1}$  y  $0.42 \text{ h}^{-1}$ ). En contraste, la cepa SM9 (PB13 *gnd*) crece muy lentamente en glucosa a una  $\mu$  de  $0.02 \text{ h}^{-1}$ , mientras que la cepa PB13 tiene una  $\mu$  de  $0.49 \text{ h}^{-1}$ . Las velocidades de crecimiento obtenidas para las cepas interrumpidas en el gene *gnd*, concuerdan ampliamente con lo predicho por los resultados de marcaje isotópico y el modelamiento matemático. El efecto de la interrupción del gene *gnd* en la cepa silvestres de una reducción de la  $\mu$  de  $0.71 \text{ h}^{-1}$  a  $0.56 \text{ h}^{-1}$ ; este efecto se debe principalmente a la acumulación a niveles tóxicos de 6-fosfogluconato. Es posible que el flujo de carbono en el brazo oxidativo de la vía de las PP no sea suficiente para producir la cantidad de 6PG a niveles tóxicos de 6PG en la cepa PB12.

**Tabla 12.** Velocidades de crecimiento ( $\mu$ ) de mutantes en el gene *gnd* de *E. coli*.

Cepa	Genotipo	$\mu^a$	%
JM101	silvestre	0.71	100
SM6	JM101 <i>gnd</i> <sup>-</sup>	0.57	80
PB12	PTS <sup>-</sup> Glc <sup>+</sup>	0.42	100
SM8	PB12 <i>gnd</i> <sup>-</sup>	0.39	93
PB13	PTS <sup>-</sup> Glc <sup>+</sup>	0.49	100
SM9	PB13 <i>gnd</i> <sup>-</sup>	0.02	4

<sup>a</sup> en h<sup>-1</sup>, obtenidos en medio M9-glucosa 2 g/l.

## VIII. CONCLUSIONES:

Como parte del presente estudio, utilizando técnicas bioquímicas y de resonancia magnética nuclear, se logró conocer los flujos de carbono del metabolismo central de carbono en cepas de *E. coli* y de derivadas modificadas en el transporte de glucosa: la cepa PTS<sup>-</sup>Glc<sup>-</sup> PB11, y mutantes adaptadas a usar glucosa como fuente de carbono (cepas PTS<sup>-</sup>Glc<sup>+</sup>), PB12 y PB13.

En las cepas PTS<sup>-</sup>Glc<sup>+</sup> PB12 y PB13, la glucosa se internaliza por la permeasa GalP; una vez internalizada ésta, la enzima glucocinasa es la encargada principal de su fosforilación. La participación de la enzima glucocinasa como la principal enzima fosforilante de glucosa en las cepas PTS<sup>-</sup>Glc<sup>+</sup>, PB12 y PB13 y su especificidad por glucosa como sustrato, permitió suponer que la vía del gluconato (ED) no maneja una fracción mayoritaria del carbono, cuando estas cepas crecen en glucosa como fuente de carbono y en presencia de oxígeno (aeróbicamente). La caracterización por RMN del metabolismo de carbono de las cepas en este estudio, permitió corroborar esta hipótesis, demostrando que, en la cepa silvestre, aproximadamente un 1.3 % del carbono es dirigido hacia la vía de ED, mientras que este valor es cercano a 0 en las cepas mutantes en el sistema PTS: PB11, PB12 y PB13, independientemente de su capacidad de usar glucosa como fuente de carbono.

La capacidad de transporte de glucosa de las mutantes PTS<sup>-</sup>Glc<sup>+</sup>, PB12 y PB13 resultó de aproximadamente la mitad de la capacidad de transporte en la cepa silvestre. Esta capacidad menor de transportar glucosa puede explicar, parcialmente, los resultados observados para las diferencias en actividades específicas de las enzimas Pgi y Zwf en las cepas PTS<sup>-</sup>Glc<sup>+</sup>, PB12 y PB13. El aumento de las actividades específicas de estas enzimas puede ser el resultado del desacoplamiento del transporte y la fosforilación de la glucosa, con su catabolismo. En *Escherichia coli*, como en otros sistemas biológicos, es posible que exista un mecanismo de canalización de sustratos en el metabolismo de carbono. Como se ha reportado por varios autores, la canalización de sustratos existe en distintos sistemas biológicos y tiene ciertas ventajas para algunas vías metabólicas (Mendes *et al.*, 1996; Vértessy *et al.*, 1997; Edwards *et al.*, 1998; Spivey y Ovádi, 1999). Es posible que el sistema GalP-Glk, que reemplaza al sistema PTS silvestre en las cepas PTS<sup>-</sup>Glc<sup>+</sup>, PB12 y PB13, no tenga las mismas características de canalización de sustratos entre el transporte y las primeras enzimas de la vía glicolítica. Además, quizás como parte del proceso de

adaptación a usar glucosa como fuente de carbono de las cepas PTS<sup>-</sup>Glc<sup>+</sup>, PB12 y PB13, se elevan los niveles de expresión de las enzimas Pgi y Zwf (ambas), para lograr un mayor flujo de glucosa-6-fosfato hacia las vías catabólicas en las que funcionan.

El transporte de glucosa en la cepa PTS<sup>-</sup>Glc<sup>-</sup>, PB11 es 10 veces menor que el presente en la cepa silvestre de *E. coli*. El marcaje de <sup>13</sup>C y análisis resonancia magnética nuclear de la biomasa celular permitió determinar los flujos de carbono de la cepa PTS<sup>-</sup>Glc<sup>-</sup>, PB11, demostrándose que esta cepa dirige un flujo de carbono importante (58 %) de la glucosa, cuando se le compara con el flujo de carbono para la cepa silvestre, que es del 22 %. Una forma más sencilla para explicar la distribución de carbono a nivel del nodo de la G6P, es de que la reacción catalizada por la enzima Zwf es irreversible, lo cual implica comprometer el carbono que metaboliza hacia por la vía de las pentosas. La irreversibilidad de la reacción catalizada por Zwf, junto con una menor Km de la enzima por la G6P, se puede reflejar como un mayor flujo de carbono sobre la vía de las PP, en tanto que la reacción catalizada por la enzima Pgi es reversible y es conocido que el flujo de carbono en la glicólisis se determina por la enzima Pfk, y no por Pgi (Emmerling *et al.*, 2000).

La caracterización bioquímica permitió proponer que el metabolismo de carbono es distinto entre las cepas silvestre, PTS<sup>-</sup>Glc<sup>-</sup>, y PTS<sup>-</sup>Glc<sup>+</sup>. El cociente Pgi/Zwf de actividad específica es 8 para la cepa silvestre; esta relación probablemente señala las actividades específicas que definen la distribución del carbono entre las vías de las pentosas y la vía glicolítica en la cepa silvestre. La relación de actividades específicas Pgi/Zwf es de 21 y 15 para las cepas PB12 y PB13, respectivamente. El cociente de los valores de actividad específica de las enzimas Pgi y Zwf supone que en las cepas PTS<sup>-</sup>Glc<sup>+</sup>, existe un mayor flujo glicolítico a la vez que una probable disminución del flujo de carbono en el brazo oxidativo de la vía de las pentosas. El análisis de RMN y el modelamiento matemático del metabolismo de estas cepas, permitió corroborar lo observado según la caracterización bioquímica, que demostró que las cepas PB12 y PB13, con un alto cociente de AE Pgi/Zwf, dirigen un mayor flujo de carbono hacia la glicólisis de 95 % y 90 %, respectivamente, con una baja consecuente del flujo de carbono en el brazo oxidativo de la vía de las pentosas a valores de alrededor del 5 % y 10 % del flujo de carbono, respectivamente.

En este punto, es importante resaltar que las cepas PTS<sup>-</sup>Glc<sup>+</sup>, PB12 y PB13, presentan una reducción del flujo de carbono hacia el brazo oxidativo de la vía de las pentosas, a la vez que presentan una elevación de los niveles de la actividad específica de la

enzima Zwf, que define el flujo de carbono sobre esta sección de la vía PP. El análisis aislado de este dato, puede ser confuso; sin embargo, si se toma en cuenta que la otra enzima que compite por el sustrato común G6P, también eleva, y de forma mayoritaria su actividad específica en estas mismas cepas, se puede entender que a pesar del aumento de actividad específica de Zwf, el flujo de carbono a través de esta enzima, sea menor. Es posible que sea la relación de actividades específicas entre las enzimas Pgi y Zwf, y no la variación de una de las mismas, lo que defina el valor de flujo de carbono entre las vías EMP y PP.

En el caso de la cepa PTS<sup>-</sup>Glc<sup>-</sup> PB11, el cociente de actividades específicas Pgi/Zwf es de 1; este valor puede demostrar la posible relación de regulación ejercida por alguno de los componentes del sistema PTS sobre la actividad de la enzima Pgi, y muy probablemente sobre el flujo de carbono en la vía EMP. Estos valores de actividades, así como la baja Km de la enzima Zwf por G6P, coincide con lo obtenido según el análisis de RMN y el modelamiento matemático del metabolismo de carbono de la cepa PB11, que demostró que a nivel del nodo de G6P, un 58 % de la glucosa es dirigida hacia el brazo oxidativo de la vía de las pentosas mientras que solo un 41 % se dirige hacia la vía EMP. Esta relación de flujos de carbono en la cepa PB11 coincide con la tendencia observada según los análisis de actividad específica que muestran que se requiere una mayor actividad específica de Pgi con fines de asegurar un elevado flujo glicolítico en *E. coli*. La baja en la actividad específica de Pgi está relacionada con la baja de flujo de carbono en la vía EMP, tal y como es el caso de la cepa PB11.

El análisis de RMN y el modelamiento matemático del metabolismo central demostró que la biosíntesis de ribosa-5-fosfato y de eritrosa-4-fosfato, es distinta entre las cepas PB12 y PB13; en la cepa PB12, la biosíntesis de R5P y E4P, se comparte entre los brazos oxidativo y no-oxidativo de la vía de las pentosas; en tanto que en el caso de la cepa PB13, la R5P, es sintetizada a partir de los productos del metabolismo de las enzimas Gnd y Rpi. Según los datos de los flujos de carbono obtenidos para las cepas PB12 y PB13, la interrupción del gene *gnd* en estas cepas, tendría efectos distintos. La cepa SM32 (PB13 *gnd*), crece muy lentamente en glucosa como fuente de carbono, reduce su  $\mu$  a sólo un 4 % de la de su cepa parental PB13, en tanto que la cepa SM31 (PB12 *gnd*), crece prácticamente igual que su cepa parental PB12.



Otro resultado obtenido de los análisis de RMN y el modelamiento matemático del metabolismo central de carbono, fue el definir el papel que juegan las enzimas málicas en *E. coli* JM101. Se demostró que el flujo de carbono por la enzima NADP-Mez es de cero en la cepa JM101, en tanto que el flujo de carbono sobre esta misma enzima en las mutantes PB12 y PB13 es de 4 y 10 %. La aparición de flujo de carbono sobre la enzima NADP-Mez puede ser un mecanismo compensatorio para la reducción de la biosíntesis de NADPH en el brazo oxidativo de la vía de las pentosas por las enzimas Zwf y Gnd.

En la cepa JM101, la principal reacción anaplerótica que reemplaza los esqueletos de carbono tomados de TCA para la biosíntesis de aminoácidos y cofactores es la carboxilación de PEP para producir oxaloacetato mediada por la enzima Ppc; sin embargo, también se ha reportado la presencia en *E. coli* de la enzima que cataliza la reacción contraria. En *E. coli* JM101, el recambio PEP-oxalacetato mediado por las enzimas Ppc-Pck, está en la dirección de la producción de oxalacetato, mientras que en las cepas PB12 y PB13, el flujo detectado por la enzima Pck es prácticamente de cero, con lo que se obtiene un aumento neto de la alimentación de TCA por parte de la enzima Ppc.

Debido al aumento de flujo de carbono en la enzima NADP-Mez, existe una depleción del oxalacetato a nivel de TCA en las cepas PB12 y PB13; la forma en que la célula reacciona a esta condición es aparentemente, reduciendo el flujo de carbono a través de la enzima Pck, que también retira oxalacetato de TCA, incrementando de esta forma la síntesis neta de oxalacetato en estas cepas.

Estas diferencias en el metabolismo de las cepas PB12 y PB13 con la cepa silvestre reflejan capacidades existentes en la bacteria *E. coli*, para compensar ciertos cambios impuestos por diferentes condiciones fisiológicas. Finalmente, la caracterización de estas cepas como se llevó a cabo en el presente trabajo de tesis, permitirá una mejor planeación del diseño y construcción de cepas con mejores capacidades metabólicas y fisiológicas con la finalidad de la sobreproducción de distintos metabolitos.

## IX. APENDICES.

### IX.1 Abreviaciones

---

#### *Vías metabólicas:*

---

ED	Vía Entner-Doudoroff
EMP	Vía Embden-Meyernhof-Parnas
PP	Vía de las pentosas-fosfato
TCA	Ciclo de los ácidos tricarboxílicos
ABP	Vía común de síntesis de aminoácidos aromáticos

---

#### *Enzimas:*

---

Eda	2-ceto,3-desoxi,6-fosfogluconato deshidratasa
Edd	6-fosfogluconato deshidratasa
GalP	Permeasa de galactosa
GltA	Isocitrato sintasa
Glk	Glucocinasa
Gnd	6-fosfogluconato deshidrogenasa
Icd	Isocitrato deshidrogenasa
Mdh	Malato deshidrogenasa
Mez	Enzimas málicas
Pfk	Fosfofructocinasa
Pgi	Fosfoglucosa isomerasa
Pps	Fosfoenolpiruvato sintasa
PTS	Sistema de transferencia de fosfato fosfoenolpiruvato:carbohidrato.
Rpe	Ribosafosfato epimerasa
Rpi	Ribosafosfato isomerasa
Tal	Transaldolasa
Tkt	Transcetolasa
Tpi	Triosafosfato isomerasa
Zwf	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa

---

#### *Moléculas:*

---

$\alpha$ CG	Alfacetoglutarato
6PG	6-fosfogluconato
ACoA	Acetilcoenzima-A
ATP	Adenosíntrifosfato
CDP	Citidinadifosfato
CIT	Citrato
CTP	Citidinatrifosfato
CoQ	Coenzima-Q
DAHP	Deoxiarabinoheptolosonato-7-fosfato
DAP	Dihidroxiacetonafofosfato
D <sub>2</sub> O	Agua deuterada
dATP	Deoxiadeninatrifosfato
dCTP	Deoxicitidinatrifosfato

---

## IX.1 Abreviaciones (*continuación*)

### *Moléculas: (continuación)*

---

DGTP	Deoxiguanosinatrifosfato
DNA	Acido desoxiribonucleico
dTTP	Deoxitirosinatrifosfato
E4P	Eritrosa-4-fosfato
F6P	Fructosa-6-fosfato
FADH	Flavinadenindinucleótido (forma reducida)
Ferm	Productos de fermentación
FMN	Flaminmononucleótido
G3P	Gliceraldehído-3-fosfoato
G6P	Glucosa-6-fosfato
Glc, GLC	Glucosa
GTP	Guanosinatrifosfato
H6P	Hexosa-6-fosfato
KDO	Ceto-D-octanoato
MAL	Malato
NAc-GLN	<i>n</i> -acetilglucosamina
NAc-MUR	Acido- <i>n</i> -acetilmurámico
NADH	Nicotinadenindinucleótido (forma reducida)
NADPH	Nicotinadenindinucleótidofosfato (forma reducida)
OAA	Oxaloacetato
P5P	Pentosa-5-fosfato
PEP	Fosfoenolpiruvato
PIR	Piruvato
PQQ	Pirroloquinileínquinona
R5P	Ribosa-5-fosfato
RNA	Acido ribonucleico
S	Azufre
S7P	Seudoheptulosa-7-fosfato
TP	Triosafofosfato
UDP	Uridinadifosfato
UTP	Uridinatrifosfato

---

## IX.2 Concentración de los diferentes isotopómeros extraídos de los espectros de 2D[<sup>13</sup>C-<sup>1</sup>H]-COSY-NMR.

s=singulete, da=señal doble con la constante de acoplamiento mayor, db= señal doble con la constante de acoplamiento mayor, dd=señal doble de dobles o triplete, ddd=doble de doble de dobles.

### a) Cepa JM101:

Atomo de <sup>13</sup> C	s	da	db	dd	ddd
Citidina-1'	0.408	0.592			
Histidina-5	0.455	0.545			
Histidina-3	0.075	0.032	0.427	0.467	
Histidina-2	0.055	0.068	0.026	0.851	
Uridina-4'	0.102	0.898			
P5P-5'	0.536	0.464			
Glicerol-1,3	0.552	0.448			
Glicerol-2	0.048	0.123		0.829	
Glicina-2	0.123	0.877			
Serina-2	0.056	0.183	0.072	0.689	
Serina-3	0.688	0.312			
Fenilalanina-2	0.051	0.031	0.057	0.861	
Fenilalanina-3	0.520	0.410		0.069	
Alanina-2	0.037	0.024	0.086	0.853	
Alanina-3	0.651	0.349			
Leucina-2	0.517	0.291	0.123	0.069	
Leucina-3	0.393	0.507		0.100	
Isoleucina-2	0.383	0.415	0.101	0.101	
Valina-2	0.097	0.682	0.040	0.181	
Valina-3	0.035	0.508		0.329	0.128
Aspartato-2	0.293	0.175	0.185	0.347	
Aspartato-3	0.403	0.201	0.227	0.169	
Treonina-4	0.436	0.564			
Glutamato-2	0.370	0.212	0.204	0.213	
Glutamato-3	0.222	0.499		0.278	
Glutamato-4	0.453	0.250	0.194	0.103	
Prolina-2	0.379	0.211	0.230	0.180	
Prolina-5	0.052	0.948			
Tirosina-delta	0.486	0.432		0.082	
Tirosina-epsilon	0.123	0.291		0.586	

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**b) Cepa PB11:**

<b>Atomo de <sup>13</sup>C</b>	<b>s</b>	<b>da</b>	<b>db</b>	<b>dd</b>	<b>ddd</b>
Citidina-1'	0.448	0.552			
Histidina-5	0.521	0.479			
Histidina-3	0.250	0.056	0.328	0.367	
Histidina-2	0.104	0.174	0.002	0.721	
Uridina-4'	0.342	0.658			
P5P-5'	0.393	0.607			
Glicerol-1,3	0.457	0.543			
Glicerol-2	0.065	0.238		0.696	
Glicina-2	0.340	0.660			
Serina-2	0.175	0.280	0.157	0.388	
Serina-3	0.651	0.349			
Fenilalanina-2	0.122	0.046	0.152	0.681	
Fenilalanina-3	0.418	0.477		0.105	
Alanina-2	0.089	0.063	0.200	0.649	
Alanina-3	0.515	0.485			
Leucina-2	0.428	0.376	0.099	0.097	
Leucina-3	0.544	0.392		0.064	
Isoleucina-2	0.413	0.360	0.111	0.117	
Valina-2	0.226	0.535	0.082	0.156	
Valina-3	0.084	0.574		0.217	0.125
Aspartato-2	0.328	0.263	0.200	0.209	
Aspartato-3	0.333	0.263	0.213	0.191	
Treonina-4	0.458	0.542			
Glutamato-2	0.331	0.258	0.219	0.192	
Glutamato-3	0.383	0.467		0.150	
Glutamato-4	0.356	0.359	0.147	0.138	
Prolina-2	0.336	0.264	0.212	0.188	
Prolina-5	0.137	0.863			
Tirosina-delta	0.363	0.494		0.143	
Tirosina-epsilon	0.234	0.336		0.430	

**e) Ceba PB12:**

<b>Atomo de <sup>13</sup>C</b>	<b>s</b>	<b>da</b>	<b>db</b>	<b>dd</b>	<b>ddd</b>
Citidina-1'	0.753	0.247			
Histidina-5	0.824	0.176			
Histidina-3	0.102	0.034	0.595	0.269	
Histidina-2	0.045	0.074	0.010	0.870	
Uridina-4'	0.115	0.885			
P5P-5'	0.631	0.369			
Glicerol-1,3	0.535	0.465			
Glicerol-2	0.017	0.095		0.888	
Glicine-2	0.135	0.865			
Serina-2	0.048	0.176	0.072	0.704	
Serina-3	0.685	0.315			
Fenilalanina-2	0.050	0.026	0.062	0.862	
Fenilalanina-3	0.510	0.413		0.077	
Alanina-2	0.043	0.029	0.088	0.840	
Alanina-3	0.656	0.344			
Leucina-2	0.524	0.276	0.133	0.068	
Leucina-3	0.330	0.535		0.135	
Isoleucina-2	0.432	0.349	0.121	0.099	
Valina-2	0.097	0.681	0.035	0.187	
Valina-3	0.045	0.430		0.350	0.174
Aspartato-2	0.298	0.181	0.242	0.279	
Aspartato-3	0.341	0.188	0.253	0.219	
Treonina-4	0.368	0.632			
Glutamato-2	0.348	0.188	0.238	0.227	
Glutamato-3	0.209	0.497		0.294	
Glutamato-4	0.380	0.207	0.262	0.151	
Prolina-2	0.341	0.192	0.242	0.225	
Prolina-5	0.068	0.932			
Tirosina-delta	0.462	0.435		0.103	
Tirosina-epsilon	0.113	0.284		0.603	

**d) Ceba PB13:**

<b>Atomo de <sup>13</sup>C</b>	<b>s</b>	<b>da</b>	<b>db</b>	<b>dd</b>	<b>ddd</b>
Citidina-1'	0.672	0.328			
Histidina-5	0.754	0.246			
Histidina-3	0.095	0.036	0.538	0.321	
Histidina-2	0.041	0.077	0.005	0.877	
Uridina-4'	0.124	0.876			
P5P-5'	0.575	0.425			
Glicerol-1,3	0.540	0.460			
Glicerol-2	0.030	0.098		0.872	
Glicine-2	0.130	0.870			
Serina-2	0.044	0.108	0.066	0.782	
Serina-3	0.659	0.341			
Fenilalanina-2	0.049	0.021	0.061	0.870	
Fenilalanina-3	0.511	0.416		0.073	
Alanina-2	0.051	0.030	0.093	0.826	
Alanina-3	0.645	0.355			
Leucina-2	0.512	0.278	0.141	0.069	
Leucina-3	0.368	0.523		0.109	
Isoleucina-2	0.405	0.382	0.107	0.106	
Valina-2	0.108	0.672	0.038	0.182	
Valina-3	0.041	0.446		0.355	0.158
Aspartato-2	0.298	0.173	0.211	0.318	
Aspartato-3	0.379	0.193	0.233	0.194	
Treonina-4	0.390	0.610			
Glutamato-2	0.366	0.192	0.226	0.216	
Glutamato-3	0.213	0.496		0.291	
Glutamato-4	0.425	0.232	0.225	0.118	
Prolina-2	0.377	0.197	0.223	0.203	
Prolina-5	0.077	0.923			
Tirosina-delta	0.452	0.444		0.104	
Tirosina-epsilon	0.109	0.285		0.606	

## X. BIBLIOGRAFÍA.

1. Báez, J.L., Bolívar, F., Gosset, G. (2001). Determination of 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate productivity and yield from glucose in *Escherichia coli* devoid of the glucose phosphotransferase transport system. *Biotechnology and Bioengineering* **73**, 530-535.
2. Biville, F., Turlin, E., Gasser, F. (1991). Mutants of *Escherichia coli* producing pyrroloquinoline quinone. *Journal of General Microbiology* **137**, 1775-1782.
3. Blattner, F.R., Plunkett III, G., Bloch, C.A., Perna, N.T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J.D., Rode, C.K., Mayhew, G.F., Gregor, J., Davis, N.W., Kirkpatrick, H.A., Goeden, M.A., Rose, D.J., Mau, B., Shao, Y. (1997). The Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**, 1453-1462.
4. Conway, T., Cheol, Y.K., Egan, S.E., Wolf, R.E.Jr., Rowley, D.L. (1991). Locations of the *zwf*, *edd*, and *eda* genes on the *Escherichia coli* physical map. *Journal of Bacteriology* **173**, 5247-5248.
5. Cronan, J.E., LaPorte, D. (1996). Tricarboxylic acid cycle and glyoxylate bypass. In "Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology" (F.C. Neidhardt, Ed.), 2nd. ed., Vol. 1. pp. 206-216. ASM press, Washington DC.
6. Csonka, L.N., Fraenkel, D.G. (1977). Pathways of NADPH formation in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* **252**, 3382-3391.
7. Curtis, J.S., Epstein, W. (1975). Phosphorylation of D-Glucose in *Escherichia coli* mutants defective in glucosephosphotransferase, mannosephosphotransferase, and glucokinase. *Journal of Bacteriology* **122**, 1189-1199.
8. de Graaf, A.A., Mahle, M., Möllney, M., Wiechert, W., Stahmann, P., Sahm, H. (2000). Determination of full <sup>13</sup>C isotopomer distributions for metabolic flux analysis using heteronuclear spin echo difference NMR spectroscopy. *Journal of Biotechnology* **77**, 25-35.
9. Edwards, M.R. (1998). From a soup or a seed? Pyritic metabolic complexes in the origin of life. *Trends in Ecology and Evolution* **13**, 178-181.
10. Egan, S.E., Fliege, R., Tong, S., Shibata, A., Wolf, R.E.Jr., Conwzy, T. (1992). Molecular characterization of the Entner-Doudoroff pathway in *Escherichia coli*: sequence analysis and localization of promoters for the *edd-eda* operon. *Journal of Bacteriology* **174**, 4638-4646.
11. Emmerling, M., Bailey, J.E., Sauer, U. (2000). Altered regulation of pyruvate kinase or co-overexpression of phosphofructokinase increases glycolytic fluxes in resting *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering* **67**, 624-627.
12. Fiaux, J., Andersson, C.I.J., Holmberg, N., Bülow, L., Kallio, P.T., Szyperski, T., Bailey J.E., Würtrich, K. (1999). <sup>13</sup>C NMR flux ratio analysis of *Escherichia coli* central carbon metabolism in microaerobic bioprocesses. *Journal of the American Chemical Society* **121**, 1407-1408.
13. Flores, Noemí. (1995). Construcción y caracterización de cepas de *Escherichia coli* mutantes en el sistema de transporte de carbohidratos PTS. Tesis de Maestría. Instituto de Biotecnología-UNAM. México.
14. Flores, N., Xiao, J., Berry, A., Bolivar, F., Valle, F. (1996). Pathway engineering for the production of aromatic compounds in *Escherichia coli*. *Nature Biotechnology* **14**, 620-623.



15. Fraenkel, D.G. (1996). Central Metabolism. In "*Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology" (F.C. Neidhardt, Ed.), 2nd. ed., Vol. 1. pp. 189-198. ASM press, Washington DC.
16. Gardner, P.R. and Fridovich, I. (1991). Superoxide sensitivity of the *Escherichia coli* 6-phosphogluconate dehydratase. *Journal of Biological Chemistry* **266**,1478-1483.
17. Gosset, G., Yong-Xiao, J., Berry, A. (1996). A direct comparison of approaches for increasing carbon flow to aromatic biosynthesis in *Escherichia coli*. *Journal of Industrial Microbiology* **17**, 47-52.
18. Ikeda, M., Katsumata, R. (1992). Metabolic engineering to produce tyrosine or phenylalanine in a tryptophan-producing *Corynebacterium glutanicum* strain. *Applied and Environmental Microbiology* **58**, 781-785.
19. Ingraham, J.L., Maaløe, O., Niedhardt, F.C. (1983). Growth of the bacterial cell. Sinauer Associates, Inc, Sunderland, Massachusetts, USA.
20. Kaniga, K., Delor, I., Cornelis, G.R. (1991). A wide-host-range suicide vector for improving reverse genetics in gram-negative bacteria: inactivation of the *blaA* gene of *Yersinia enterocolitica*. *Gene* **109**, 137-141.
21. Kessler, D., Knappe, J. (1996). Anaerobic dissimilation of pyruvate. In "*Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology" (F.C. Neidhardt, Ed.), 2nd. ed., Vol. 1. pp. 199-205. ASM press, Washington DC.
22. Kinoshita, S., Nakayama, K., Udaka, S. (1957). Studies on the amino acid fermentations. Part I. Production of L-glutamic acid by various microorganisms. *Journal of General and Applied Microbiology* **3**, 193-205.
23. LaPorte, D.C., Walsh, K., Koshland, Jr. D.E. (1984). The branch point effect. *The Journal of Biological Chemistry* **259**, 10468-10475.
24. Lessie, T.G., Vander Wyk, J.C. (1972). Multiple forms of *Pseudomonas multivorans* glucose-6-phosphate and 6-phosphogluconate dehydrogenases: Differences in size, pyridine nucleotide specificity, and susceptibility to inhibition by adenosine 5'-triphosphate. *Journal of Bacteriology* **110**, 1107-1117.
25. London, R.E., Kollman, V.H., Matwiyoff, N.A. (1975). The quantitative analysis of carbon-carbon coupling in the <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance spectra of molecules biosynthesized from <sup>13</sup>C enriched precursors. *Journal of the American Chemical Society* **97**, 3565-3573.
26. Lyngstadaas, A., Sprenger, G.A., Boye, E., (1998). Impaired growth of an *Escherichia coli* rpe mutant lacking ribulose-5-phosphate epimerase activity. *Biochimica et Biophysica Acta* **1381**, 319-330.
27. Maaheimo, H., Fiaux, J., Çakar, Z.P., Bailey, J.E., Sauer, U., Szyperski, T. Central carbon metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* explored by biosynthetic fractional <sup>13</sup>C labeling of common amino acids. *European Journal of Biochemistry* **268**, 2464-2479.
28. Matsushita, K., Arents, J.C., Bader, R., Yamada, M., Adachi, O. Postma, P.W. (1997). *Escherichia coli* is unable to produce pyrroloquinoline quinone (PQQ). *Microbiology* **143**, 3149-3156.
29. Maitra, P.K., Lobo, Z. (1971). A kinetic study of glycolytic enzyme synthesis in yeast. *Journal of Biological Chemistry* **246**, 475-488.
30. McDonald, T.P., Walmsley, A.R., Henderson, P.J.F. (1997). Asparagine 394 in putative helix 11 of the galactose-H<sup>+</sup> symport protein (GalP) from *Escherichia coli* is associated with the internal binding site for cytochalasin B and sugar. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 15189-15199.

31. McInnes, A.G., Smith, D.G., Walter, J.A., Vining, L.C., Wright, J.L.C. (1974). New techniques in biosynthetic studies using  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance spectroscopy. The biosynthesis of tenellin enriched from singly and doubly labelled precursors. *Journal of the Chemical Society for Chemical Communication* 282-284.
32. Mendes, P., Kell, D.B., Westerhoff, H.V. (1996). Why and when channelling can decrease pool size at constant net flux in a simple dynamic channel. *Biochimica et Biophysica Acta* **1289**, 175-186.
33. Möllney, M., Wiechert, W., Kownatzki, D., de Graaf, A.A. (1999). Bidirectional reaction steps in metabolic networks. Part IV: Optimal Design of Isotopomer Labeling Experiments. *Biotechnology and Bioengineering* **66**, 86-103.
34. Nakano, M.M., Zuber, P., Sonenshein, A.L. (1998). Anaerobic regulation of *Bacillus subtilis* Krebs cycle genes. *Journal of Bacteriology*. **180**, 3304-3311.
35. Nasoff, M.S., Wolf, R.E.Jr. (1980). Molecular cloning, correlation of genetic and restriction maps, and determination of the direction of transcription of *gnd* of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **143**; 731-741.
36. Neidhardt, F.C., Ingraham, J.L., Scheachter, M. (1990). Biosynthesis and fueling. In: "Physiology of the bacterial cell. A molecular approach". pp. 133-173, Sinauer Associates, Inc, Sunderland, Massachusetts, USA.
37. Neri, D., Szyperski, T., Otting, G., Senn, H., Würthrich, K. (1989). Stereospecific nuclear magnetic resonance assignments of the methyl groups of valine and leucine in the DNA-binding domain of the 434 repressor by biosynthetically directed fractional  $^{13}\text{C}$  labelling. *Biochemistry* **28**, 7510-7616.
38. Palmeros, Beatriz. (2001). Diseño y construcción de sistemas genéticos para la regulación concertada de genes cromosomales en *Escherichia coli*. Tesis de Doctorado. Instituto de Biotecnología-UNAM, México.
39. Peekhaus, N., Conway, T. (1998). What's for dinner?: Entner-Doudoroff metabolism in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **180**, 3495-3502.
40. Petersen, S., de Graaf, A.A., Eggeling, L., Möllney, M., Wiechert, W., Sahm, H. (2000). *In vivo* quantification of parallel and bidirectional fluxes in the anaplerosis of *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 35932-35949.
41. Ponce, E., Flores, N., Martínez, A., Valle, F., Bolívar, F. (1995). Cloning of two pyruvate kinase isoenzymes structural genes from *Escherichia coli*: The relative role of these enzymes in pyruvate biosynthesis. *Journal of Bacteriology* **177**, 5719-5722.
42. Ponce, E., Martínez, A., Bolívar, F., Valle, F. (1998). Stimulation of glucose catabolism through the pentose phosphate pathway by the absence of the two pyruvate kinase isoenzymes in *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering* **58**, 292-295.
43. Ponce, E. (1999). Effect of growth rate reduction and genetic modifications on acetate accumulation and biomass yields in *Escherichia coli*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **87**, 775-780.
44. Porco A., Peekhaus N., Bausch C., Tong S., Isturiz T., Conway T. (1997). Molecular genetic characterization of the *Escherichia coli gntI* gene of GntI, the main system for gluconate metabolism. *Journal of Bacteriology* **179**, 1584-1590.
45. Postma, P.W., Lengeler, J.W., Jacobson, G.R. (1996). Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase system. In "*Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology" (F.C. Neidhardt, Ed.), 2nd. ed., Vol. 1. pp. 1149-1174. ASM press, Washington DC.

46. Rodríguez, R.L., Tait, R., Shine, J., Bolívar, F., Heineker, H., Betlach, M., Boyer, H.W. (1977). Characterization of tetracycline and ampicillin resistant plasmid cloning vehicles. *In: Molecular cloning in recombinant DNA. Miami Winter Symposia* **13**, 73-78.
47. Sauer, U., Lasko, R.W., Fiaux, J., Hochuli, M., Glaser, R., Szyperski, T., Wüthrich, K., Bailey, J.E. (1999). Metabolic flux ratio analysis of genetic and environmental modulations of *Escherichia coli* central carbon metabolism. *Journal of Bacteriology* **181**, 6679-6688.
48. Senn, H., Werner, W., Messerle, B.A., Weber, C., Traber, R., Wüthrich, K. Stereospecific assignment of the methyl <sup>1</sup>H-NMR lines of valine and leucine in polypeptides by non-random <sup>13</sup>C labelling. *FEBS Letter* **249**, 113-118.
49. Seto, H., Sato, T., Yonchara, H. (1973). Utilization of carbon-13 carbon-13 coupling in structural and biosynthetic studies. An alternative double labelling method. *Journal of the American Chemical Society* **95**, 8461-8462.
50. Sigüenza, R., Flores, N., Hernández, G., Martínez, A., Bolívar, F., Valle, F. (1999). Kinetic characterization in batch continuous culture of *Escherichia coli* mutants affected in phosphoenolpyruvate metabolism: differences in acetic acid production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **15**, 587-592.
51. Spivey, H.O., Ovádi, J. (1999). Substrate channeling. *Methods* **19**, 306-321.
52. Stephanopoulos, G.N., Aristidou, A.A., Nielsen, J. (1998). *Metabolic Engineering, Principles and Methodologies*. Academic Press, San Diego, CA. USA.
53. Stols, L., Donnelly, M.I. (1997). Production of succinic acid through overexpression of NAD<sup>+</sup>-dependent malic enzyme in an *Escherichia coli* mutant. *Applied and Environmental Microbiology* **63**, 2695-2701.
54. Szyperski, T., Neri, D., Leiting, B., Otting, G., Wüthrich, K. (1992). Support of <sup>1</sup>H-NMR assignments in proteins by biosynthetically directed fractional <sup>13</sup>C labelling. *Journal of Biomolecular NMR* **2**, 323-334.
55. Szyperski, T. (1995). Biosynthetically directed fractional <sup>13</sup>C-labeling of proteinogenic amino acids - An efficient analytical tool to investigate intermediary metabolism. *European Journal of Biochemistry* **232**, 433-448.
56. Szyperski, T. (1998). <sup>13</sup>C-NMR, MS and metabolic flux balancing in biotechnology research. *Quarterly Reviews of Biophysics* **1**, 41-106.
57. Tatum, E.L., Lederberg J. (1947). Gene recombination in the bacterium *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **53**, 673-684.
58. Tong S., Porco A., Istruz T., Conway T. (1996). Cloning and molecular characterization of the *Escherichia coli* *gntR*, *gntK*, and *gntU* genes of GntI, the main system for gluconate metabolism. *Journal of Bacteriology* **178**; 3260-3269.
59. Van der Rest, M.E., Frank, C., Molenaar, D. (2000). Functions of the membrane-associated and cytoplasmic malate dehydrogenases in the citric acid cycle of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **182**, 6892-6899.
60. Vértessy, G.B., Orosz, F., Kovács, J., Ovádi, J. (1997). Alternative binding of two sequential glycolytic enzymes to microtubules: Molecular studies in phosphofructokinase / aldolase / microtubule system. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 25542-25546.
61. Wiechert, W., Möllney, M., Isermann, N., Wurzel, M., de Graaf, A.A. (1999). Bidirectional reaction steps in metabolic networks. Part III: Explicit solution and analysis of isotopomer labelling systems. *Biotechnology and Bioengineering* **66**, 69-85.
62. Wolf, R.E.Jr., Prather, D.M., Shea, F.M. (1979). Growth rate-dependent alteration of 6-phosphogluconate dehydrogenase and glucose-6-phosphate dehydrogenase levels in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*. **139**, 1093-1096.

63. Würthrich, K., Szyperski, T., Leiting, B., Otting, G. (1992). Biosynthetic pathways of the common proteinogenic aminoacids investigated by fractional  $^{13}\text{C}$  labelling and NMR spectroscopy. In *Frontiers and new horizons in amino acid research*. (Takai, K., Ed.). Elsevier, Amsterdam.
64. Zhu, T., Phalakornkule, C., Koepsei, R.R., Domach, M.M., Ataii M.M. (2001). Cell growth and by-product formation in a pyruvate kinase mutant of *E. coli*. *Biotechnology Progress* **17**, 624-628.

## **XI. AGRADECIMIENTOS.**

Quiero agradecer el apoyo de los miembros de mi Comité Tutorial, Dr. José Luis Puente, Dra. Esperanza Martínez, Dra. Guadalupe Espín y Francisco Bolívar, por su apoyo y recomendaciones en la elaboración de mi trabajo doctoral. Así mismo, quiero agradecer a los Dres. Guillermo Gosset, Fernando Valle y la M.C. Noemí Flores por sus aportaciones y su apoyo, no sólo en este trabajo en particular, sino a lo largo de todo mi trabajo como estudiante en el Departamento de Microbiología Molecular del Instituto de Biotecnología. Quiero agradecer al Dr. Albert de Graaf por brindarnos la oportunidad de realizar los estudios de Resonancia Magnética Nuclear en su laboratorio, así como a los coautores del artículo publicado, en particular al Dr. Guillermo Gosset, por sus relevantes aportaciones en la elaboración y discusión del mismo.

La clonación del gene *edd*, así como la obtención de los plásmidos pBri01, pBri02 y pBri03 se realizó con la colaboración de la estudiante de Licenciatura en Química de la Facultad de Ciencias Químicas de la UNAM, Brianda Barrios López.

Quiero también agradecer a la Técnico Mercedes Enzaldo por su apoyo en la elaboración de medios de cultivo y materiales en general, así como a las Sras. Emma Trejo, y Mayela Dingler por su apoyo administrativo.

En particular quiero agradecer el apoyo computacional brindado por la Sra. Sonia Caro para la corrección, elaboración y organización de la presente Tesis.

Este proyecto fue desarrollado con un apoyo económico del CONACyT NC-230 (2001) y el apoyo económico como becario del CONACyT, DGAPA-UNAM y la Fundación Telmex.

## **XII. ANEXO 1.**

Artículo aceptado para su publicación en la revista *Metabolic Engineering* (14/09/2001):  
“Analysis of carbon metabolism in *Escherichia coli* strains with an inactive phosphotransferase system by  $^{13}\text{C}$  labelling and NMR spectroscopy”. S. Flores, G. Gosset, N. Flores, A. A. de Graaf, and F. Bolívar.