



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Generación y caracterización de cepas de *Escherichia coli*
PTS⁻ y PTS⁻ Glc⁺ carentes del gen *ppsA*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A :

CÉSAR AUGUSTO AGUILAR MARTÍNEZ

TUTOR

DR. FRANCISCO GONZALO BOLÍVAR ZAPATA

CO-TUTOR

QUIM. DE ALIM. JUAN CARLOS SIGALA ALANIS



2007



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.

Esta tesis se realizó en el Instituto de Biotecnología, UNAM, en el Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, bajo la dirección del Dr. Francisco Gonzalo Bolívar Zapata y del Quim de Alim. Juan Carlos Sigala Alanis.

Para la realización del presente trabajo se contó con el apoyo económico del CONACyT a través del proyecto D43243Z.

Hoja de datos del jurado

1. Datos del alumno
Aguilar
Martínez
César Augusto
55 61 21 43
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
099014386
2. Datos del tutor
Dr.
Francisco Gonzalo
Bolivar
Zapata
3. Datos del Co-tutor
Quim. De Alim.
Juan Carlos
Sigala
Alanis
4. Datos del sinodal 1
Dr.
Víctor Manuel
Valdés
López
5. Datos del sinodal 2
M. en C.
Alfonso José
Vilchis
Pelayera
6. Datos del sinodal 3
M. en C.
Beatriz
Rodarte
Murguía
7. Datos del trabajo escrito
Generación y caracterización de cepas de *Escherichia coli* PTS⁻ y PTS⁻ Glc⁺ carentes del gen *ppsA*
74 p
2007

A mi papá, que un día me dijo que, distinto a lo que se piensa, la consumación del éxito para un hombre es tener un hijo; espero no defraudarte nunca. A mi madre, porque con sus lágrimas me hizo fuerte, y con su ímpetu me inspiró valor; gracias por ser especial y por hacer de mí una persona especial.

A mi familia que me hizo entender que lo imposible no existe, que me enseñó a decir “si llego” en lugar de “ya no puedo”, y que me hizo comprender que la enseñanza derivada de la derrota, se llama triunfo.

Agradecimientos:

- Al Doctor Francisco Gonzalo Bolívar Zapata, porque me permitió integrarme a su equipo de trabajo en el laboratorio; gracias por su tiempo y sus comentarios.
- A Juan Carlos Sigala Alanis, porque me llevó de la mano y por el camino correcto; no voy a olvidar tus consejos de amigo, ni tus enseñanzas como maestro.
- A Noemí Flores, que con paciencia y sencillez, logró introducirme al mundo de la biología molecular.
- A Georgina Hernández, porque hizo maravillas con el HPLC; sin su ayuda aún no habría terminado.
- A mis compañeros del laboratorio, porque siempre están dispuestos a ayudar, y porque con su entrega, dedicación y alegría a su trabajo, lograron despertar en mi el amor y la pasión a todo lo que hago.
- A Telmita, porque me dio ánimos y mucho, mucho apoyo.
- A Joyce, porque me ayudó a integrarme y le puso alegría a nuestro rincón de trabajo.
- A Mercedes Enzaldo, muchas gracias, porque su trabajo es el más importante en el laboratorio; sin su ayuda estaría a mitad del camino.
- A la familia Aguirre Crespo, que me permitió integrarme a su hogar como uno más de la familia; muchas gracias Doctora Virginia por brindarme afecto e interés. Gaby, te agradezco todos los pequeños favores. Azu, me hubiera gustado conocerte más, pero aún queda mucha vida por delante. Güero, muchas gracias por tratarme siempre con tanta cordialidad.
- A la doctora Patricia Joseph, porque me dio la oportunidad de llegar al Instituto de Biotecnología.

Indice:

| | |
|--|---------|
| 1. Resumen..... | pág. 1 |
| 2. Introducción..... | pág. 3 |
| 3. Antecedentes..... | pág. 7 |
| 3.1 Metabolismo del carbono..... | pág. 7 |
| 3.2 Asimilación de acetato..... | pág. 9 |
| 3.3 Ciclo del glioxalato..... | pág. 11 |
| 3.4 El sistema fosfoenolpiruvato: carbohidrato fosfotransferasa (PTS)..... | pág. 12 |
| 3.5 Operón <i>ptsHIcrr</i> | pág. 16 |
| 3.6 Cepas PTS ⁻ Glc ⁺ | pág. 17 |
| 3.7 El gen <i>ppsA</i> | pág. 19 |
| 3.8 El sistema PTS y la fosfoenol piruvato sintasa..... | pág. 20 |
| 4. Objetivos..... | pág. 21 |
| 5. Hipótesis..... | pág. 22 |
| 6. Materiales y metodología experimental..... | pág. 23 |
| 6.1 Cepas bacterianas..... | pág. 23 |
| 6.2 Plásmidos..... | pág. 24 |
| 6.3 Secuencias nucleotídicas utilizadas para interrumpir el gen <i>ppsA</i> por el método Datsenko – Wanner..... | pág. 25 |
| 6.4 Secuencias nucleotídicas utilizadas para comprobar la interrupción del gen <i>ppsA</i> en cada una de las cepas bacterianas..... | pág. 28 |
| 6.5 Medios de cultivo y condiciones de crecimiento..... | pág. 28 |
| 6.6 Método Datsenko – Wanner (2000)..... | pág. 29 |
| a) Obtención del producto de PCR a transformar..... | pág. 29 |

| | |
|---|---------|
| b) Obtención de las células transformantes..... | pág. 30 |
| c) Transformación..... | pág. 30 |
| 6.7 Caracterización de las cepas..... | pág. 31 |
| 6.8 Procesamiento de datos..... | pág. 32 |
| 6.9 Determinación del consumo de glucosa y acetato..... | pág. 33 |
| 7. Resultados y discusión..... | pág. 34 |
| 7.1 Obtención de cepas con el gen <i>ppsA</i> interrumpido..... | pág. 34 |
| 7.2 Comprobación de las inactivaciones..... | pág. 34 |
| 7.3 Manejo de inóculos..... | pág. 36 |
| 7.4 Cepas en medio mínimo con glucosa..... | pág. 38 |
| a) Cepas JM101 y PB12..... | pág. 38 |
| b) PB11:¿Un ciclo futil de interconversión de piruvato en PEP en la cepa PTS ⁻ ?.. | pág. 39 |
| 7.5 Cepas en medio mínimo con acetato..... | pág. 43 |
| a) Cepa silvestre JM101..... | pág. 43 |
| b) Cepa PB11 PTS ⁻ Glc ⁻ : | pág. 46 |
| c) Cepa PB12 PTS ⁻ Glc ⁺ | pág. 48 |
| 7.6 Cepas en medio mínimo con glucosa y acetato..... | pág. 50 |
| a) Consumo de las fuentes de carbono..... | pág. 52 |
| 8. Conclusiones..... | pág. 59 |
| 9. Perspectivas..... | pág. 61 |
| 10. Referencias..... | pág. 63 |

1. Resumen:

El fosfoenolpiruvato (PEP) es una molécula central en el metabolismo; su posición en la compleja red metabólica celular lo convierte en un metabolito precursor de muchas otras moléculas importantísimas no solo para el funcionamiento de la célula, sino también para la sociedad, pues algunos de los metabolitos generados a partir del PEP en el interior celular tienen un alto valor comercial. La disponibilidad intracelular de este precursor siempre ha estado muy controlada; actualmente la ingeniería de vías metabólicas ha logrado aumentar dicha disponibilidad deletando en una cepa silvestre de *Escherichia coli* (JM101) el operón *ptsHlcrr*, el cual codifica para el sistema de fosfotransferasa (PTS). Este sistema consume más del 50% del PEP originado por la glicólisis (Flores, N., *et. al* 2005).

A partir de esta cepa PTS⁻ denominada PB11, y por un proceso de presión selectiva, se generó la cepa PB12, la cual recuperó parcialmente la capacidad de asimilar la glucosa (PTS⁻ Glc⁺), además de redirigir parte del PEP no utilizado por PTS hacia la síntesis de compuestos aromáticos a partir de glucosa con alto rendimiento (Flores, S., *et. al.* 2002; Flores, N. *et. al* 2005). Análisis de RT-PCR indicaron que muchos genes del metabolismo gluconeogénico estaban sobreexpresados tanto en PB11 como en PB12. La sobreexpresión de estos genes en un sustrato como la glucosa llevó a indagar más al respecto y especialmente al análisis de un paso importante en la gluconeogénesis: la conversión del piruvato a PEP.

Con la finalidad de interpretar el papel que desempeña la enzima encargada de la reacción (PpsA) y determinar su importancia metabólica en cepas carentes del sistema PTS, así como la obtención de un conocimiento más profundo de estas cepas, en este trabajo se generaron cepas derivadas de JM101, PB11 y PB12 carentes del gen *ppsA* para su posterior caracterización bajo distintas condiciones. La

caracterización se llevó a cabo creciendo a las cepas en medio mínimo con glucosa, acetato, y glucosa con acetato.

La delección de este gen ocasionó fases lag más prolongadas y una disminución de más del 50% de la velocidad específica de crecimiento (μ) de las cepas JM101/*ppsA*- y PB11/*ppsA*- cuando el sustrato era el acetato. Por el contrario, cuando se utilizó la glucosa como sustrato, las fases lag no se vieron afectadas y la μ solo se afectó en la cepa PB11/*ppsA*-, la cual incrementó su μ alrededor de un 60%. Finalmente, las cepas crecidas en la mezcla de los dos sustratos, no modificaron su μ en ningún caso.

2. Introducción:

Los procesos de fermentación con cultivos microbianos son responsables de la producción de varias y diferentes moléculas de origen biológico de interés social y comercial. Actualmente, nos encontramos ante un magnífico escenario en cuanto a las posibilidades existentes para diseñar, manipular y orientar la maquinaria celular en procesos específicos de producción de moléculas de interés diverso, área que se conoce como ingeniería genética. A través de la ingeniería genética, podemos no solo construir organismos transgénicos que produzcan proteínas de interés comercial como la insulina humana, sino también, en ciertos organismos, y en particular microorganismos, podemos modificar los genes responsables de la incorporación de la glucosa y del metabolismo de los esqueletos de carbono y canalizar estos esqueletos de carbono hacia la producción de moléculas de interés en el interior de la célula. Esta capacidad a la que se le ha definido como “ingeniería de vías metabólicas”, permite pensar en la célula como un verdadero catalizador biológico especializado en la producción de moléculas específicas (Bolívar, F. y Gossett, G., 2004).

Los compuestos aromáticos tienen un papel importante en las industrias de alimentos, química y farmacéutica; los aminoácidos aromáticos: triptofano, tirosina y fenilalanina, son esenciales en la dieta del hombre y de la mayoría de los animales empleados para la alimentación humana. La fenilalanina es producida industrialmente y utilizada como suplemento nutricional para animales y recientemente, su producción ha cobrado un interés especial debido a que es uno de los constituyentes del edulcorante artificial llamado aspartame. En el presente, la mayoría de los compuestos aromáticos utilizados en la industria son obtenidos mediante procesos de síntesis química, empleando derivados del petróleo como materia prima. Este tipo de procesos genera subproductos que contaminan el medio ambiente (Bolívar, F. y Gossett, G., 2004)

Utilizando la ingeniería genética, es posible desarrollar cepas bacterianas capaces de sintetizar moléculas útiles, hasta ahora solo obtenidas mediante síntesis química. Estas cepas bacterianas utilizarían a la glucosa u otras fuentes renovables de carbono como materia prima en procesos biotecnológicos no contaminantes y deberían formar parte de tecnología biológica competitiva para poder desplazar los procesos actuales de producción por vía química de compuestos aromáticos.

En *Escherichia coli*, el fosfoenolpiruvato (PEP) es uno de los precursores más importantes en la biosíntesis de distintos metabolitos, entre ellos, de los compuestos aromáticos. Sin embargo, solo una mínima parte del PEP producido mediante la glicólisis (alrededor del 3 - 4%), es canalizado a producir dichos compuestos, pues el 80% del PEP se transforma en piruvato por dos vías, un 14 % por la acción de las piruvato cinasas (PykA y PykF), y el restante 66% debido al funcionamiento del sistema de transporte de azúcares dependiente de PEP (PTS), mientras que el 16% se transforma en oxaloacetato por la acción de la fosfoenolpiruvato carboxilasa (Flores, N., 1995). Esta limitante natural en la célula impide tener una mayor cantidad de PEP para incrementar la síntesis de metabolitos de interés industrial derivados de este precursor cuando *E. coli* utiliza la glucosa como fuente de carbono. Por esta razón, desde hace ya algunos años, se han realizado una serie de esfuerzos encaminados a la comprensión y manipulación de las vías metabólicas que tienen que ver (directa o indirectamente) con la síntesis, catabolismo y utilización del PEP en diferentes especies y variedades de bacterias. Una de las estrategias utilizadas en el laboratorio fue la eliminación del sistema PTS que en teoría duplicaría la disponibilidad de PEP para la biosíntesis de aminoácidos aromáticos (Flores, N., *et. al.* 1996; Liao, J., *et.al.*, 1996; Báez, J., *et.al.*, 2001). Sin embargo la primer cepa carente del sistema PTS (PB11), obtenida a partir de la cepa silvestre JM101, no es adecuada para los propósitos de producción ya que su crecimiento en glucosa se ve afectado de manera importante (Flores N., *et. al.* 1996). Posteriormente y mediante un método de adaptación basado en cultivo continuo, se lograron obtener dos cepas (PB12 y PB13) con la capacidad de asimilar más rápidamente la glucosa, denominadas PTS-

Glc⁺ (PB12 con un μ de 0.42 y PB13 con un μ de 0.49). Se demostró que el flujo de carbono que se dirige hacia la síntesis de compuestos aromáticos, es mayor en la cepa PB12 que en la silvestre JM101 (Báez *et.al.*, 2004), y estudios de expresión de genes por RT-PCR señalaron que muchos genes del metabolismo gluconeogénico estaban sobreexpresados no solo en PB12, sino también en PB11 (Flores N., *et. al.* 2005). Los estudios realizados en ambas cepas, gradualmente han mostrado los cambios sufridos; actualmente se sabe que en estas cepas se induce una condición de estrés permanente, lo que origina la sobreexpresión de genes RpoS dependientes (Flores, N., *et. al.* 2007). Particularmente en PB12, se demostró la sustitución del transportador de glucosa de PTS IIBC^{Glc} por la permeasa de galactosa GalP, y que la fosforilación de la glucosa es llevada a cabo por la glucocinasa (GlcK), la cual se encuentra sobreexpresada. Otro aspecto trascendental, es la mutación del gen *arcB* en esta cepa, lo que ocasiona una disminución de las funciones del sistema de dos componentes Arc A/B, que a su vez impide la represión de genes del ciclo de los ácidos tricarbixílicos (TCA, por sus siglas en inglés) y del ciclo del glioxalato (Flores, S., *et. al.* 2002; Flores, N., *et. al.* 2005). Existen otros cambios que propician un rearrreglo en la distribución de los flujos de los esqueletos de carbono en el metaboloma de *E. coli*, ocasionados por una regulación diferencial de las enzimas correspondientes en distintos niveles de las vías. La ausencia de PTS en PB11 y PB12 es también la responsable de la pérdida de la represión catabólica en estas cepas. Por lo anterior, las cepas PTS⁻ son capaces de cointilizar glucosa y otras fuentes de carbono y en ellas coexisten la vía glicolítica y gluconeogénica (Flores, N., *et. al.* 2005).

Para conocer más sobre estos rearrreglos y atraídos por los resultados de RT-PCR y las propiedades de estas cepas, se procedió a la construcción de cepas carentes del gen *ppsA*, el cual codifica para la enzima fosfoenolpiruvato sintasa (PpsA). Esta enzima participa en una de las reacciones centrales en el metabolismo gluconeogénico: la conversión de piruvato a PEP. En el caso de las cepas PB11 y PB12 cuando son crecidas en glucosa como única fuente de carbono, el gen *ppsA* se encuentra

sobreexpresado 3.7 y 2.4 veces respectivamente con relación a la cepa silvestre (Flores, N., *et. al.* 2005). La generación de estas mutantes y su ulterior caracterización utilizando varias fuentes de carbono, permitió en este trabajo, conocer más a fondo el papel que juega la PpsA en el metabolismo glicolítico y gluconeogénico en estas cepas, y contribuyó a la tarea de progresar todavía más en la búsqueda de pruebas que lleven a entender de manera detallada cómo fue alterado el metabolismo en estas cepas, sin descartar la ayuda futura que este trabajo brinda para deducir y proponer posibles mejoras para una optimización en la disponibilidad de PEP.

3. Antecedentes:

3.1 Metabolismo del carbono:

El ciclo Embden-Meyerhof es el más prevalente en la naturaleza y consiste en una serie de reacciones catalizadas por varias enzimas, las cuales catabolizan la glucosa hasta convertirla en dos moléculas de piruvato con la síntesis de ATP. Este ciclo, también conocido como glicólisis, es el inicio de un proceso que puede continuar con la respiración celular (si existe oxígeno) o con la fermentación (en ausencia de oxígeno). Sin embargo, en microorganismos de vida libre ó en parásitos, no siempre se dan las condiciones adecuadas para que el catabolismo de la glucosa se lleve a cabo y se obtenga la energía y la biosíntesis de todos los componentes celulares necesarios, esto debido principalmente a que no existe glucosa u algún otro sustrato rico en carbono en el medio. Por esta razón, la fisiología celular debe contender contra las características del medio en el que se encuentre y para ello ha perfeccionado mecanismos para la asimilación y metabolismo de sustratos pobres en esqueletos de carbono que se incorporan a la célula y son metabolizados en un proceso conocido como gluconeogénesis (Fig. 1) (Lengeler, J. W., *et. al.* 1999; Schmid, H. G., 1992).

La gluconeogénesis se refiere a la formación de glucosa y abastecimiento de la vía alta del ciclo de Embden-Meyerhof a partir de precursores no azúcares (lactato, piruvato, propionato, acetato, glicerol y aminoácidos). Por tanto, el abastecimiento del ciclo de Embden-Meyerhof se puede dar a partir de sustratos que se incorporan a la célula en las vías bajas del metabolismo celular, donde son utilizadas diversas enzimas que conforman vías metabólicas consideradas esenciales durante la gluconeogénesis. En bacterias, estas vías gluconeogénicas tienen entonces la función de abastecer de PEP, para canalizar el flujo de carbono hacia la vía Embden Meyerhof, utilizando sustratos aminoacídicos tales como la prolina y la arginina que entran por el ciclo de Krebs después de su conversión a α -cetoglutarato, o ácidos orgánicos como el acetato, el cual se metaboliza hasta formar acetyl-CoA para la consecuente

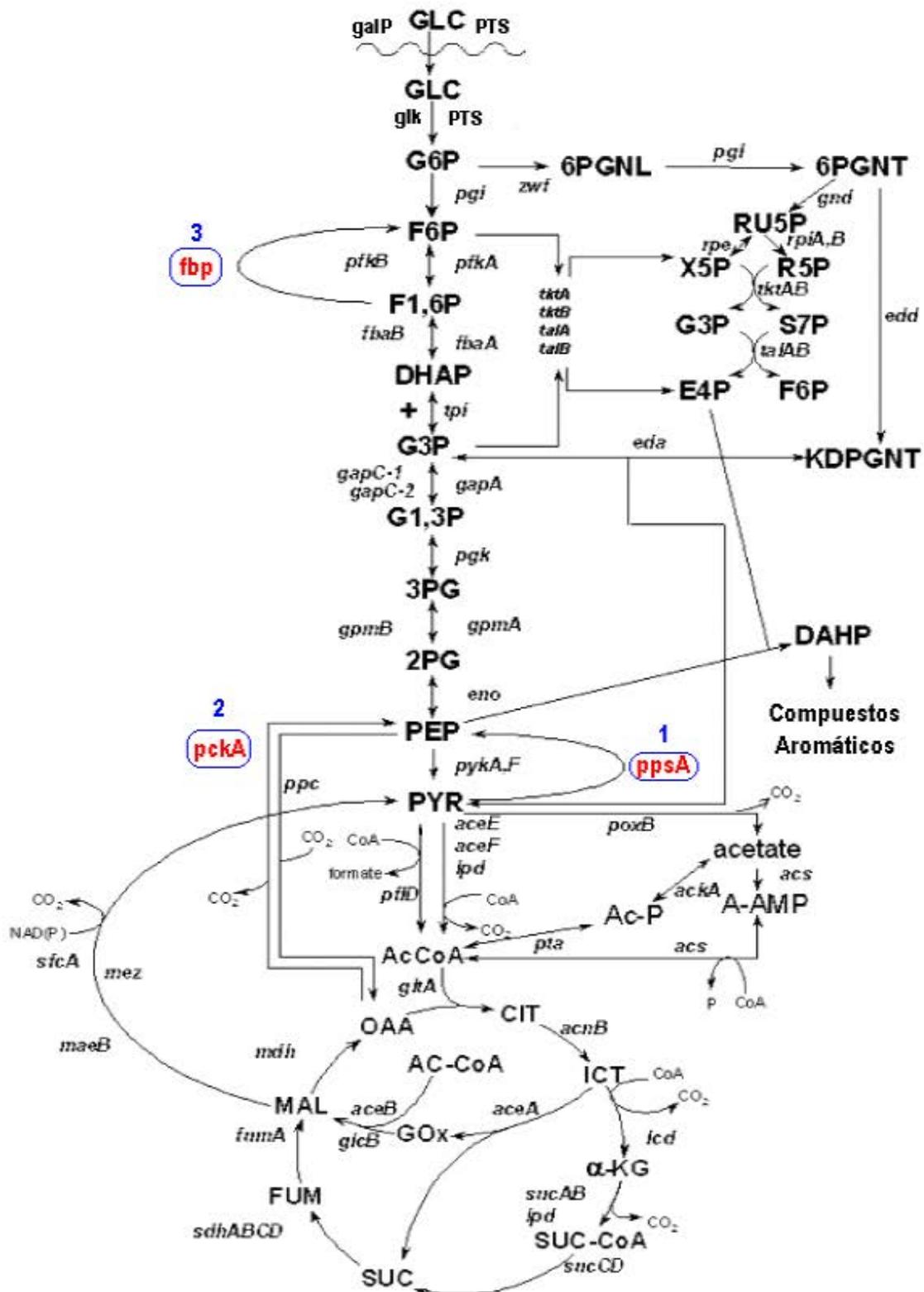


Fig. 1.- Esquema del metabolismo del carbono en *Escherichia coli* que muestra tres reacciones gluconeogénicas importantes. (Tomada y modificada de Flores N. *et. al.* 2005)

formación de piruvato utilizando la vía del glioxalato y alguna de las vías gluconeogénicas disponibles.

La formación de glucosa (gluconeogénesis) no es exactamente el proceso inverso a la glicólisis, a pesar de que muchas de las reacciones de la vía glicolítica son reversibles y que las mismas enzimas catalizan tanto la reacción glicolítica como la gluconeogénica.

Existen algunas reacciones durante la glicólisis que son altamente exergónicas, y como resultado son virtualmente irreversibles. La célula debe entonces contrarrestar estas barreras proporcionando vías alternas; sin embargo, estas vías requieren de energía que se obtiene del ATP celular. La primera de estas barreras, considerada como un punto central en la gluconeogénesis, es la formación de PEP a partir de piruvato (reacción 1 y 2, Fig. 1), realizada directamente por la enzima fosfoenol piruvato sintasa (PpsA), o indirectamente por la enzima piruvato carboxiquinasa (Pck), después de la conversión del piruvato a oxaloacetato.

Una tercera reacción considerada como un punto de control de esta vía, es la hidrólisis de la fructosa 1,6 bifosfato para la formación de fructosa 6 fosfato, catalizada por la enzima fructosa 1,6 bifosfatasa (reacción 3, Fig. 1) Estas reacciones catalizadas por enzimas distintas a las utilizadas en el proceso de glicólisis, constituyen puntos importantes en la regulación de la gluconeogénesis en *E. coli* (Schmid, H. G., 1992).

3.2 Asimilación de acetato:

El metabolismo de acetato es importante para la supervivencia de *Escherichia coli* en el intestino de los mamíferos ya que una gran cantidad del mismo (arriba de 70 mM) es producido por bacterias anaeróbicas a través de la fermentación de carbohidratos (Wei, B., *et. al.* 1999). El acetato en su forma disociada pasa por difusión simple a través de la membrana celular, sin embargo, bajo ciertas circunstancias la entrada del acetato es saturable, por lo que es necesario el uso de un transportador de

acetato. Según Giménez *et. al.* 2003., la permeasa de acetato ActP y un presunto segundo transportador hasta ahora no identificado, se encargan de introducir en *E. coli* la mayor parte del acetato disponible en el medio, pues los estudios demuestran que solo el 8% del acetato internalizado se difunde de forma pasiva en la célula. Una vez internalizado, el acetato necesita primero ser activado en forma de acetil-CoA y posteriormente es metabolizado por el ciclo del glioxalato y por el ciclo de Krebs.

Existen dos vías para la formación de acetil-CoA a partir de acetato (Fig. 2); una de las vías está mediada por la acetil coenzima A sintetasa codificada por el gen *acs*, que cataliza la formación de acetil-CoA a través de la formación de acetiladenilato (A-AMP) utilizando ATP y generando pirofosfato; posteriormente el acetiladenilato, reacciona con coenzima A (CoASH), formando acetil-CoA y AMP. Esta vía es irreversible debido a la presencia de fosfatasa intracelular, y al parecer, es también una vía de alta afinidad, la cual se utiliza cuando existen bajas concentraciones de acetato (alrededor de 200 μ M).

Tanto el gen *acs*, como el gen *yjcG*, que codifica para la permeasa de acetato ActP, y el gen *yjcH* que codifica para una proteína transmembranal, se encuentran en el cromosoma de *E. coli* formando un operón (Giménez. *et. al.*, 2003). La transcripción del gen *acs* podría estar regulada negativamente por IclR (regulador transcripcional) a través de un efecto indirecto. En contraparte, Fnr (regulador transcripcional) activa la transcripción de *acs* uniéndose a dos sitios localizados cerca del sitio de inicio de transcripción en el cromosoma (Kumari, S., *et. al.* 2000).

La segunda vía de activación del acetato (Fig. 2) utiliza las enzimas acetato cinasa (ACKA) y fosfotransacetilasa (PTA) codificadas por los genes *ackA* y *pta* respectivamente; ambos genes conforman un operon en *E. coli*. Durante este proceso, el acetato es convertido en acetil fosfato por acción de la acetato cinasa, el cual a su vez se convierte a acetil-CoA por conducto de la

logra utilizando la vía del glioxalato (Fig. 2), también conocida como el ciclo de Krebs-Kornberg; de esta forma algunas moléculas que entran a TCA no llevan a cabo el ciclo completo y se impiden las descarboxilaciones.

La isocitrato liasa y la malato sintasa, codificadas por los genes *aceA* y *aceB*, desvían cierto flujo y lo canalizan a la vía del glioxalato. La reacción determinante se da a partir de la formación de isocitrato, que puede continuar por TCA o ser dirigido al ciclo del glioxalato. El desvío del isocitrato hacia el ciclo del glioxalato es regulado por la fosforilación o desfosforilación de la isocitrato deshidrogenasa (*icd*), enzima del TCA que compite por el sustrato con la isocitrato liasa. Cuando la bacteria crece en acetato, la isocitrato deshidrogenasa es fosforilada y su actividad declina drásticamente. Por el contrario, cuando la bacteria crece en un medio con glucosa, esta misma enzima es desfosforilada y recupera toda su actividad. Dichas fosforilaciones y desfosforilaciones, son llevadas a cabo por una enzima bifuncional, la isocitrato deshidrogenasa cinasa/fosfatasa. Los genes que codifican para la malato sintasa (*aceB*), isocitrato liasa (*aceA*) y la isocitrato deshidrogenasa cinasa/fosfatasa (*aceK*), se encuentran en el mismo operón, y su expresión está controlada por un complejo mecanismo que involucra varios represores y activadores transcripcionales (Crp, ArcA, IclR, Ihf, FadR y posiblemente FruR).

3.4 El sistema fosfoenolpiruvato: carbohidrato fosfotransferasa (PTS):

El sistema de fosfotransferasa (PTS) es un sistema enzimático que interviene en el transporte y fosforilación concomitante de muchos carbohidratos en numerosos géneros bacterianos y está formado por un conjunto de proteínas que intervienen en una cascada de fosforilaciones. En *E. coli* el sistema PTS permite el transporte de glucosa, manosa, fructosa y los polioles sorbitol y manitol, entre otros (Postma, P. *et. al.*, 1996).

La cascada inicia con la enzima I (EI), la cual se autofosforila utilizando fosfoenolpiruvato (PEP) y transfiere el grupo fosfato a la proteína Hpr. Estas dos proteínas solubles son los componentes generales del sistema. Posteriormente se transfiere el fosfato de la proteína Hpr al componente II (IIA), que a su vez lo transfiere al complejo formado por la proteína IIBC. Este complejo (al igual que el componente IIA) es azúcar- específico y funciona como permeasa, fosforilando de manera concomitante al carbohidrato transportado (Fig. 3). Además del transporte y fosforilación de azúcares, el sistema PTS lleva a cabo varias funciones de regulación metabólica y transcripcional en diversas bacterias; por ejemplo, este sistema es responsable de la represión catabólica que ejerce la glucosa (Postma, P. *et. al.*, 1996).

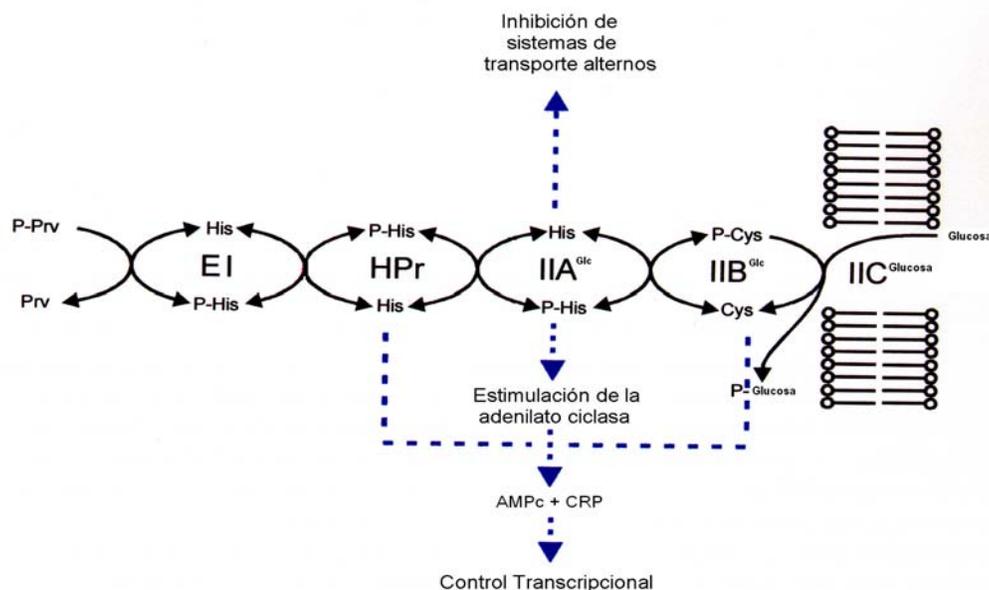


Fig 3.- Sistema de fosfotransferasa (PTS).

Cuando la glucosa está presente en el medio, la proteína IIA^{Glc} se encuentra principalmente desfosforilada, pues transfiere el grupo fosfato al complejo IIBC. La proteína IIA^{Glc} desfosforilada se une entonces a varias permeasas, inhibiendo la entrada de azúcares no PTS (lactosa, melobiosa, maltosa y glicerol) y en consecuencia impide su aprovechamiento; este fenómeno es conocido como

exclusión del inductor (Postma, *et. al.*, 1993). En ausencia de glucosa, la forma fosforilada de la proteína IIA^{Glc} activa a la enzima adenilato ciclasa, aumentando los niveles de AMPc. El AMPc junto con la proteína CRP (CAP) activan la transcripción de un gran número de genes catabólicos. Este sistema PTS para el transporte y fosforilación de azúcares parece estar presente sólo en bacterias que utilizan la vía Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), y esta ausente en bacterias aeróbicas estrictas (Romano, A. H. *et. al.*, 1992; Lengeler, J. W., *et. al.* 1999).

En bacterias es frecuente encontrar varios sistemas de transporte para un mismo nutriente p. ej., *Escherichia coli* posee cinco sistemas para transportar la galactosa y tres sistemas para algunos de los aminoácidos. Los diversos sistemas se diferencian en cuanto a su requerimiento energético, su afinidad, su regulación, etc. Lógicamente a lo largo de la evolución se han seleccionado sistemas redundantes de transporte, con objeto de permitir que el microorganismo sobreviva bajo diversas circunstancias ambientales.

La mitad del PEP producido durante la glicólisis es consumido por el sistema PTS (Frankel, D. G., 1996). Esta limitante natural de las células impide tener una mayor cantidad de fosfoenol piruvato para la síntesis de metabolitos de interés industrial, derivados de este precursor cuando *E. coli* utiliza la glucosa como fuente de carbono.

Por esta razón, desde hace ya algunos años, se han realizado una serie de esfuerzos encaminados a la comprensión y manipulación de las vías metabólicas que tienen que ver (directa o indirectamente) con la síntesis, catabolismo y utilización del PEP en diferentes especies y variedades de bacterias. Hasta ese entonces, las estrategias utilizadas concernían en la delección de las piruvato cinasas (cepas PykA⁻ y PykF⁻) y/o delección de la piruvato carboxilasa (mutantes en *ppc*), además de la sobreexpresión de *ppsA* (Fig. 4).

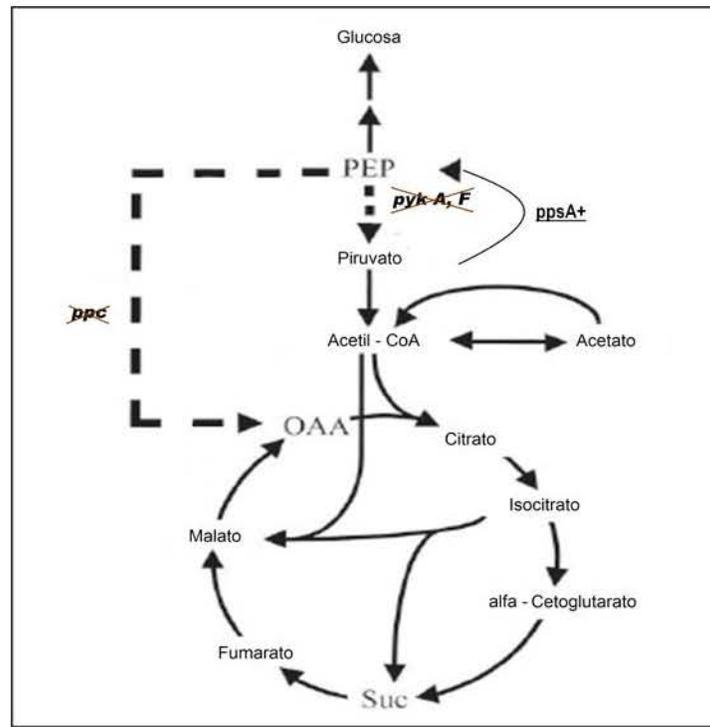


Fig. 4.- Esquema del metabolismo de *Escherichia coli*, que muestra las estrategias utilizadas para una mayor disponibilidad de PEP en la célula. (Tomado y modificado de Kao, K., *et. al.* 2005)

Otra estrategia es la eliminación del sistema PTS que en teoría duplicaría la disponibilidad de PEP para la biosíntesis de aminoácidos aromáticos (Flores, N., *et. al.* 1996; Liao, J., *et. al.*, 1996; Báez, J., *et. al.*, 2001). Recientemente, con el objeto de obtener una cepa con una mayor capacidad en cuanto a la disponibilidad del PEP, en nuestro laboratorio se lograron generar mutantes carentes del sistema PTS, pero con una capacidad de asimilación rápida de glucosa (Flores N., *et. al.* 1996). De esta forma se buscó explotar al máximo la cantidad de PEP disponible, tratando de canalizarlo a vías de síntesis de distintos metabolitos. Sin embargo, la inactivación de PTS no fue fácil, debido a que este sistema de transporte es esencial en la fisiología celular.

3.5 Operón *ptsHICrr*:

En *E. coli*, los genes *ptsI*, *ptsH* y *crr*, que codifican para las enzimas EI, HPr y IIA^{Glc} respectivamente, se encuentran ligados en el cromosoma formando un operón (Fig. 5), y el gen *ptsG* que codifica para la proteína IIBC se encuentra en otro locus (De Reuse, H. *et. al* 1984). Mutantes en los genes *ptsI* y *ptsH* son incapaces de crecer en carbohidratos PTS, mientras mutantes en las proteínas IIA^{Glc} y IIBC no crecen en el carbohidrato para el cual son específicos. En el caso de *E. coli*. y en general de todas las bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*, el gen *crr* se encuentra dentro del operón *pts*, cuyo producto (proteína IIA^{Glc}), pudiera ser considerado una proteína general del sistema PTS.

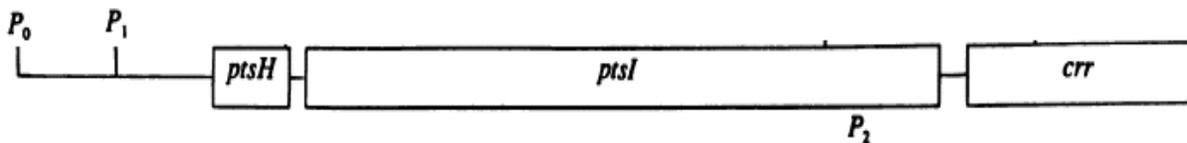


Fig. 5.- Operón *ptsHICrr* (Tomado y modificado de Fox, Donna K., *et. al*. 1992)

La delección del operón *ptsHICrr* en *E. coli* disminuye la capacidad de la bacteria para encontrar, seleccionar, transportar y metabolizar varios tipos de fuentes de carbono. Por este motivo, la primer cepa carente del sistema PTS (PB11 PTS⁻, obtenida a partir de la cepa silvestre JM101), no es adecuada para los propósitos de producción ya que su crecimiento en glucosa se ve afectado de manera importante ($\mu = 0.1$); (Flores N., *et. al*. 1996; 2005). Posteriormente y mediante un método de adaptación basado en cultivo continuo, se lograron obtener dos cepas (PB12 y PB13) con la capacidad de asimilar más rápidamente la glucosa (PTS⁻ Glc⁺). Lo anterior se llevó a cabo sometiendo a la cepa PB11 a un sistema de cultivo en lote durante 70 horas; lo que generó mutantes espontáneas. Dichas mutantes espontáneas se sometieron después a un sistema de cultivo continuo o quimiostato. Aumentando la tasa de dilución del quimiostato ($D = 0.4 \text{ h}^{-1}$ hasta 0.8 h^{-1}) se aislaron mutantes a partir

de sus velocidades de crecimiento. Se escogieron dos mutantes, una de menor y otra de mayor velocidad, denominadas respectivamente PB12 ($\mu=0.42 \text{ h}^{-1}$) y PB13 ($\mu=0.49 \text{ h}^{-1}$) (Flores N., *et al.*, 1996). Se ha demostrado que el flujo de carbono que se dirige hacia la síntesis de compuestos aromáticos, es mayor en la cepa PB12 que en la silvestre JM101 (Flores, S., *et. al.* 2002; Báez, J., *et.al.*, 2004).

3.6 Cepas PTS⁻ Glc⁺:

Los estudios en cepas PTS⁻ Glc⁺ arrojan, entre otros, los siguientes cambios. El primero de ellos es la sustitución del transportador de glucosa PTS IIBC^{Glc} por la permeasa de galactosa GalP, la cual además de transportar galactosa, también es capaz de transportar otros azúcares como glucosa. El segundo de estos cambios se localiza en el paso posterior inmediato a la internalización de la glucosa. La fosforilación de la glucosa, es llevada a cabo por la glucocinasa (Glc), la cual se encuentra sobreexpresada en la cepa PB12 (Flores S., *et. al.* 2002). Existen por supuesto otros cambios que propician un rearrreglo en la distribución de los flujos de los esqueletos de carbono en el metaboloma de *E. coli*, ocasionados por la regulación diferencial de las enzimas correspondientes en distintos niveles de las vías.

Es importante mencionar, que la cepa PB12 que tiene la capacidad de utilizar glucosa más eficientemente, mantuvo como en PB11, la sobreexpresión de los genes de la vía del glioxalato (operón *aceBAK*). Sin embargo, el mecanismo en cuanto a la modulación de la expresión de la vía del glioxalato es diferente en PB12. Por estas razones se secuenciaron varios de los genes implicados en esta vía, y genes reguladores importantes, y solo se encontró una mutación, correspondiente al gen *arcB* en PB12, en el cual cambia un residuo de tirosina en la posición 71 por una cisteína. Esta mutación ocasiona una inactivación ó disminución en las funciones del sistema de dos componentes

Arc A/B, el cual cabe recordar, tiene la función de reprimir genes involucrados en el TCA y la vía del glioxalato (Flores N., *et. al.* 2005).

Para explicar las diferencias en los niveles de expresión entre el TCA y la vía del glioxalato es razonable proponer que la expresión del gen, que codifica para el más importante de los represores del operón *aceBAK* (*iclR*), está parcialmente reprimida en PB12, y totalmente reprimida en PB11 probablemente, por el efecto inhibitorio del acetato que es producido por la sobreexpresión (5.7 veces mayor en PB12 y 4.2 veces mayor en PB11 con respecto a JM101) del gen *poxB*. Es decir, en PB12 la mutación en *arcB* podría ser responsable de la sobreexpresión de genes del TCA, pero ser parcialmente responsable de la sobreexpresión del operón *aceBAK* (Flores N., *et. al.* 2005). Mutantes de PB12 en el gen *poxB* no afectan su crecimiento en un cultivo con glucosa como única fuente de carbono, sin embargo, el operón *aceBAK* se sigue sobreexpresando, aunque en menor grado; lo que indica que *poxB* no es el único factor que estaría inactivando a *iclR* (Flores N., *et. al.* 2004; 2005).

Se ha detectado que en ausencia del sistema PTS las células inducen una condición de estrés permanente debido a la ineficiencia en la utilización de las fuentes de carbono; esto provoca la sobreexpresión del gen *rpoS*, el cual codifica para el regulador transcripcional RpoS. Esta última es la subunidad S de la RNA polimerasa, la cual puede reemplazar parcialmente al factor sigma 70 durante condiciones de crecimiento limitado (Weber, H., *et. al.* 2005; Flores, N., *et. al.* 2007). En consecuencia, la transcripción de numerosos genes sigma S dependientes son activados; entre estos tenemos genes como *poxB*, *acs*, *acnA*, *fumC*, *tktB* y *ppsA* entre otros (Flores N., *et. al.* 2004; 2007). Además de la sobreexpresión de *rpoS* y numerosos genes transcritos por este factor sigma, análisis de transcripción de genes con microarreglos, revelaron que PB11 creciendo en un medio con glucosa, sobreexpresa una gran cantidad de genes relacionados con el transporte y metabolismo de carbono, así como genes que codifican para transportadores de ciertos nucleótidos, nitrógeno, fósforo y azufre.

Estas condiciones en PB11 son factores responsables de la utilización de fuentes de carbono secundarias en presencia de glucosa (Flores S., *et. al.* 2005).

PB12 por su parte, sufrió una segunda mutación (además de la ocurrida en el sistema de dos componentes ArcA/B) en el gen *rpoS*, al parecer característica de cepas de *E. coli*. cuando son crecidas en condiciones controladas limitadas de glucosa (Notley-McRobb, *et. al.* 2002). Esta mutación se generó en la posición 98 del gen, cambiando el codón TCG (serina) por un codón de término: TAG. Como consecuencia de esta mutación puntual, en PB12 se genera una proteína incompleta ó trunca de 32 aminoácidos, en lugar de la proteína normal, la cual cuenta con 228 residuos. La traducción del mensajero por tanto, estaría produciendo suficiente RpoS funcional para la transcripción de genes RpoS dependientes, pues es un hecho que esta transcripción se da (Flores N., *et. al.* 2007).

3.7 El gen *ppsA*:

La enzima fosfoenol piruvato sintasa (PpsA) codificada por el gen *ppsA*, cuyo tamaño es de 2379 nucleótidos, está implicada en una de las dos vías del metabolismo gluconeogénico. Esta enzima de 792 aminoácidos, cataliza la reacción inversa de las enzimas cinasas Pyk A y Pyk F; es decir, cataliza la reacción que va de piruvato a PEP. En esta reacción la PpsA utiliza como sustrato ATP, H₂O y piruvato, además de manganeso como cofactor, generando AMP como producto, PEP y fosfato inorgánico.

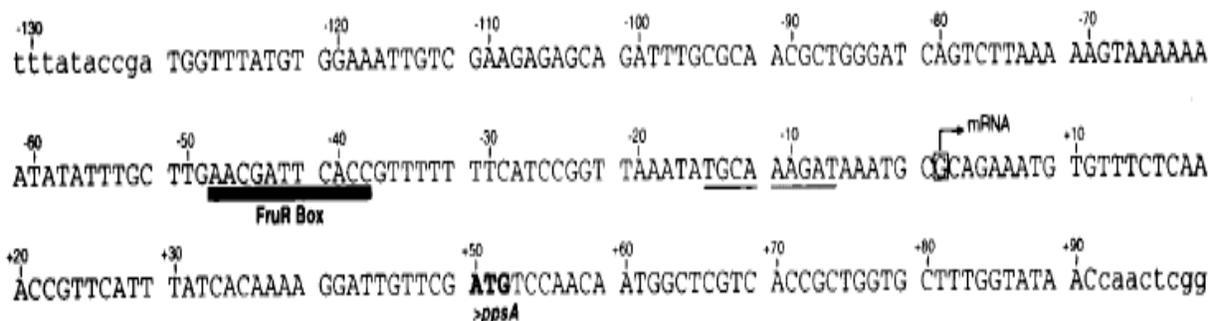


Fig. 6.- Secuencia del inicio de transcripción del gen *ppsA* que muestra la caja fruR, y la región promotora.

El gen *ppsA* es regulado a nivel transcripcional principalmente por la proteína FruR, la cual se encuentra implicada en el control de la expresión de numerosos operones del metabolismo de carbono en *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*. Entre los sitios controlados por este factor transcripcional se encuentran el operón de fructosa *fruB*, el operón *aceBAK*, el operón *ptsHIcrr* y diversos genes, como lo es el gen *ppsA*, cuyo promotor contiene una secuencia de 11 pares de bases en la posición -45.5 denominada caja FruR (Fig. 6); esta región es reconocida por la proteína FruR. Para el caso de *ppsA*, FruR induce una flexión de aproximadamente 120° en el DNA, lo cual se sugiere activa la región promotora y estimula la transcripción del gen (Negre, D. *et. al.* 1998). La actividad de esta enzima se reduce con PEP, oxaloacetato, malato y α -cetoglutarato.

3.8 El sistema PTS y la fosfoenol piruvato sintasa:

Cuando *E. coli* crece en un medio con exceso de glucosa (una fuente rica de carbono), se produce acetato y éste se excreta como un síntoma de exceso de carbono. El carbono excretado puede ser consumido después cuando los niveles de glucosa sean bajos. Durante el cambio de consumo de fuente de carbono (de glucosa a acetato), *E. coli* induce genes involucrados en la asimilación de acetato (*acs* y *ackA*), la vía del glioxalato (operon *aceBAK*), el ciclo de los ácidos tricarbóxicos (TCA), y genes gluconeogénicos tales como los que codifican para las enzimas málicas, *pckA* y *ppsA* entre otros. En una cepa silvestre, la delección de estos dos últimos genes (*pckA* y *ppsA*) aunque en mayor grado por la ausencia de *ppsA* (ya que la respuesta de la delección de *pckA* es dependiente del tipo de cepa), propicia una fase lag mucho más prolongada durante el periodo de adaptación al cambio de fuente de carbono (Katy C. *et. al.* 2005); lo que indica que el PEP es un metabolito importante en la cascada de señalizaciones dirigida por el sistema PTS, que se encarga de activar los genes necesarios para el

aprovechamiento de otra fuente de carbono en ausencia de glucosa. Se propone que la escasez de PEP impide la rápida y prolongada fosforilación del componente IIA en el sistema PTS, mismo efecto que causa la presencia de glucosa en el medio. De esta forma se evita que el sistema PTS cense la falta de glucosa en el medio, pues el componente IIA no puede activar a la adenilato ciclasa que es la encargada de incrementar los niveles de AMPc; por consiguiente no es posible inducir la activación de CRP y por ende, tampoco es posible activar de manera inmediata los genes catabólicos para otro tipo de azúcar.

Para el caso de las cepas PB11 y PB12, que carecen por completo del sistema PTS, no es posible observar el fenómeno llamado diauxia, lo cual indica que sus niveles de AMPc no se vieron del todo afectados y son capaces de cutilizar glucosa y acetato (Flores N. *et. al.* 2005). Sin embargo, la vía gluconeogénica a la cual pertenece la enzima PpsA, es de suma importancia para la supervivencia de ambas cepas; de hecho, la PpsA, considerada como una enzima no esencial en bacterias crecidas en medio mínimo (tanto en glucosa como acetato), en cepas como PB11 y PB12, se encuentra sobreexpresada 3.7 y 2.4 veces respectivamente en relación a su antecesora JM101, la cual mantiene intacto el sistema PTS (Flores N. *et. al.* 2005).

4. Objetivos:

General:

- Generar y caracterizar las cepas JM101, PB11 y PB12 con el gen *ppsA* inactivo.

Particulares:

- Inactivar el gen *ppsA* en las cepas JM101, PB11 y PB12, generando las derivadas correspondientes

- Determinar en las cepas *ppsA⁻* la velocidad específica de crecimiento en glucosa, acetato, y glucosa con acetato, además de la fase lag durante el cambio de fuente de carbono de glucosa a acetato.
- Interpretar el papel que desempeña la enzima PpsA y su importancia metabólica en cepas carentes del sistema PTS.

5. Hipótesis:

- En la cepa silvestre JM101: La ausencia de la enzima PpsA, probablemente provoque, debido a una falta de PEP, una disminución de la μ durante el crecimiento de esta cepa en acetato, no así durante su crecimiento en glucosa ni en glucosa y acetato juntos. La fase lag durante el cambio de fuente de carbono es muy probable que se vea afectada y por consiguiente se incremente debido a la insuficiencia de PEP, que impediría la rápida activación de genes para la asimilación del acetato.
- En la cepa PTS⁻ Glc⁻ PB11: Cuando se inactive el gen *ppsA* en esta cepa, probablemente no se vean cambios importantes durante la fase de adaptación (fase lag) en el cambio de fuente de carbono, pues esta cepa tiene sobreexpresados genes catabólicos para otras fuentes de carbono. Por el contrario, a lo largo de su crecimiento en acetato, es posible que PB11 se vea afectada significativamente, pues la vía gluconeogénica alterna sería insuficiente para abastecer de precursores en la vía alta de la red metabólica. Respecto a su crecimiento en glucosa y en glucosa con acetato, es factible esperar que la μ no se afecte debido a que la obtención de PEP

a partir de glucosa no involucra la vía gluconeogénica interrumpida en este trabajo, y la disponibilidad de este precursor no se afecte.

- En la cepa PTS⁻ Glc⁺ PB12: Para el caso de esta cepa, la ausencia de PpsA tal vez no arroje una baja significativa en su velocidad específica de crecimiento en ninguna de las tres condiciones, pues al parecer ambas vías gluconeogénicas son usadas indistintamente y es de esperar que la vía mediada por PckA, supla la ausencia de PpsA. Con respecto al periodo de adaptación en el cambio de fuente de carbono, probablemente la fase lag no se altere, ya que al igual que PB11, esta cepa sobreexpresa genes para el catabolismo de otras fuentes de carbono.

6. Materiales y Metodología experimental:

6.1 Cepas bacterianas:

- En la tabla 1, se enlistan las cepas bacterianas que se utilizaron en este estudio:

| Cepas | Genotipo | Referencia |
|-------------------------|--|------------------------------|
| JM101 | F' traD36 proA ⁺ proB ⁺ lacI ^q lacZΔM15/supE thi Δ(lac-proAB) | Bolívar <i>et.al.</i> , 1977 |
| PB11 | JM101 Δ(<i>ptsH, ptsI, crr</i>)::kan | Flores <i>et.al.</i> , 1996 |
| PB12 | PB11, PTS ⁻ Glc ⁺ | Flores <i>et.al.</i> , 1996 |
| JM101 ppsA ⁻ | JM101 ppsA::cm | Este trabajo |
| PB11 ppsA ⁻ | PB11 ppsA::cm | Este trabajo |
| PB12 ppsA ⁻ | PB12 ppsA::cm | Este trabajo |

Tabla 1: Cepas de *E. coli* utilizadas en este estudio

6.2 Plásmidos:

Para poder interrumpir el gen *ppsA* mediante la técnica de Datsenko-Wanner (2000), se utilizaron los siguientes plásmidos:

- El plásmido pKD3 (Fig. 7) tiene un tamaño aproximado de 2800 pares de bases y fue purificado de la cepa *E. coli* BW25141 (*lacI^d* *rrnB_{T14}* Δ *lacZ_{WJ16}* Δ *phoBR580* *hsdR514* Δ *araBAD_{AH33}* Δ *rhaBAD_{LD78}* *galU95* *endA_{BT333}* *uidA* (Δ *MluI*)::*pir⁺* *recA1*); este plásmido fue utilizado como templado para amplificar mediante la técnica de PCR, el gen de 1064 pb que confiere resistencia a cloramfenicol contenido en este vector.

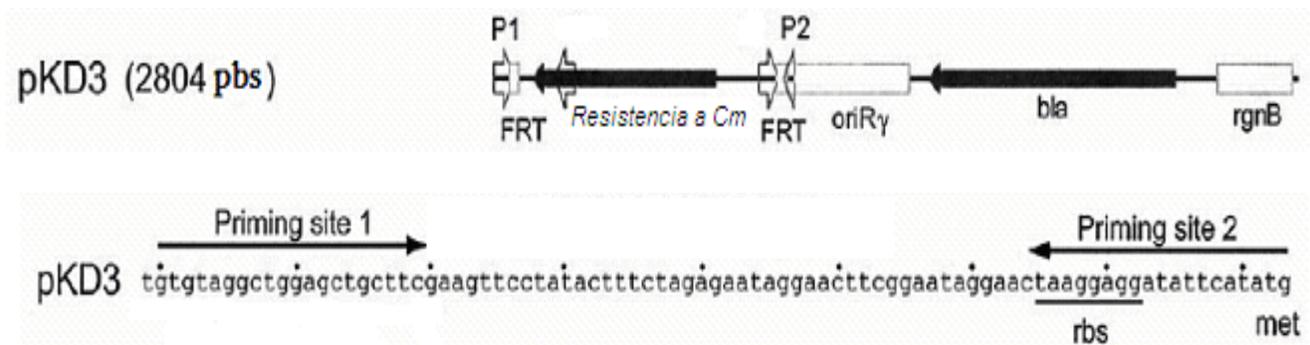


Fig. 7.- Plásmido pKD3; modificado Datsenko – Wanner, (2000).

- El plásmido pKD46 (Fig. 8) es un vector de bajo número de copias, el cual contiene los genes del sistema de recombinación del fago λ Red, lo que permite utilizar este vector para recombinar secuencias de oligonucleótidos a cromosoma bacteriano con una alta eficiencia.

El sistema λ red contiene 3 genes; γ , β y *exo*, cuyos productos son llamados Gama, Beta y Exo respectivamente. Gama inhibe la exonucleasa V RecBCD de la célula, por lo cual, Beta y Exo logran acceder a los extremos del DNA y promover entonces la recombinación. El pKD46 tiene un sitio optimizado de unión a ribosoma para la traducción eficiente de γ y expresar γ , β , y *exo* a partir de un promotor inducible por arabinosa (*P_{araB}*). Este promotor está bien regulado, lo que impide eventos de recombinación bajo condiciones no inducidas. La replicación del plásmido es sensible a la temperatura, para permitir su fácil eliminación.

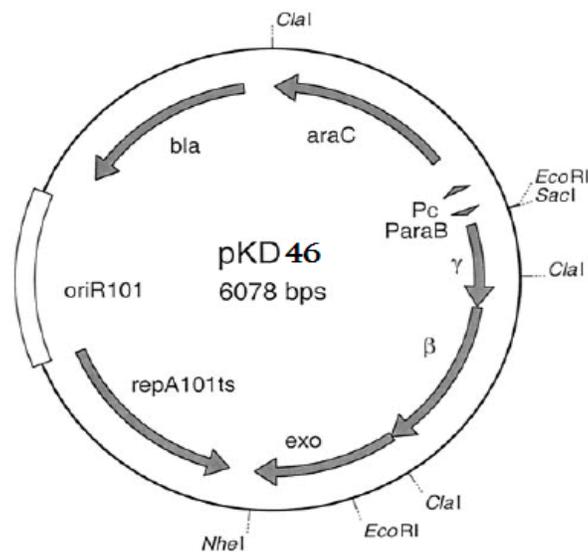


Fig. 8.- Plásmido pKD46; modificado Datsenko – Wanner (2000).

6.3 Secuencias nucleotídicas utilizadas para interrumpir el gen *ppsA* por el método Datsenko – Wanner:

- La estrategia básica de éste método es el reemplazamiento mediante recombinación, de una secuencia de DNA cromosomal por un gen de resistencia a antibiótico, la cual es generada

por PCR, usando iniciadores (primers) de entre 56 y 70 nucleótidos de extensión, formados por 36 a 50 nucleótidos de homología al DNA cromosomal (para recombinación) y 20 nucleótidos de homología al pKD3 (para la amplificación del gen de resistencia a antibiótico). Este procedimiento se da debido a la acción del sistema de recombinación incluido en el plásmido pKD46 introducido en la cepa receptora. Después de la selección, el gen de resistencia puede ser eliminado, usando un plásmido que expresa la recombinasa FLP, que actúa sobre las secuencias FRT que flanquean al gen de resistencia a antibiótico escindiendo dicho gen y por tanto eliminando la resistencia. Para este trabajo, no es necesario ese último paso.

- Las secuencias que se presentan a continuación sirvieron para amplificar por PCR el gen de resistencia a cloramfenicol contenido en el plásmido pKD3 Posteriormente, con esos productos de PCR se interrumpió mediante recombinación homóloga el gen *ppsA*, el cual codifica para la fosfoenol piruvato sintasa (Fig. 9). Por esta razón, los oligos de interrupción, poseen en su primera parte, 50 nucleótidos de homología que hibridan a 145 pares de bases antes del inicio de la transcripción del gen *ppsA* para el caso del oligo Pps - Cm 1 (H1) y a 54 pares de bases después del término de la transcripción del mismo gen para el caso del oligo Pps – Cm 2 (H2). El resto de los nucleótidos (20 nucleótidos), corresponden a la secuencia que empalma en los “priming sites” (P1 para el oligo Pps1 y P2 para el oligo Pps2) del gen que confiere resistencia a cloramfenicol, el cual se amplifica a partir del pKD3.

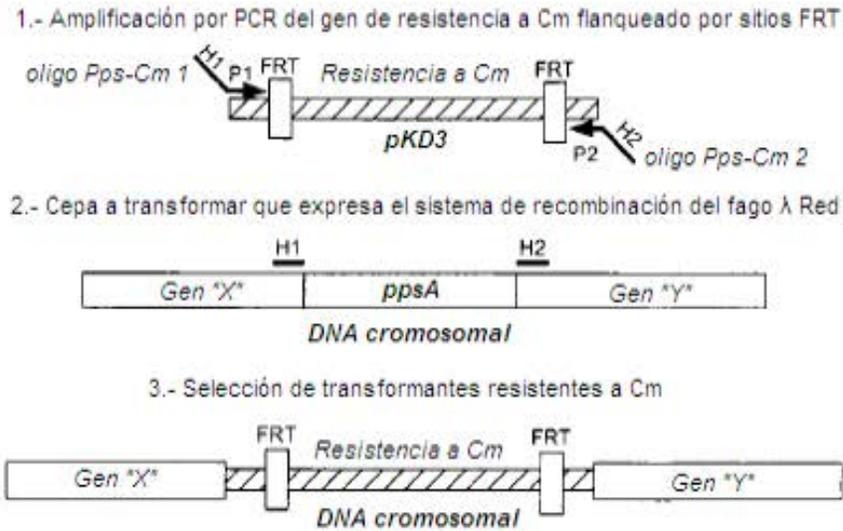


Fig. 9.- Método de interrupción Datsenko – Wanner.

Se utilizaron los siguientes oligonucleótidos para la amplificación:

1) Oligo “Forward”: Pps-Cm 1

5′

3′

GCG CAA CGC TGG GAT CAG TCT TAA AAA GTA AAA AAA TAT ATT TGC TTG AAG TGT
AGG CTG GAG CTG CTT C

Tamaño: 70 pb

2) Oligo “Reverse”: Pps-Cm 2

5′

3′

TTC ATC TTC GGG GAT CAC ATA ACC CCG GCG ACT AAA CGC CGC CGG GGA TTT CAT
ATG AAT ATC CTC CTT AG

Tamaño: 71 pb

Componentes del medio mínimo:

Cada 25 ml de medio mínimo M9 contiene:

2.5 ml de sales M9 10x; 22.2 ml de H₂O; 50µl de MgSO₄ 1M.; 2.5µl de Vitamina B1 20mg/µl; y 2.5µl de CaCl 1M.

Cada 100 ml de sales M9 10x contienen:

6gr. de NaHPO₄; 3gr. de KHPO₄; 0.5gr. de NaCl y 1gr. de NH₄Cl

Para el caso de M9 con glucosa 2g/L, se adiciona 0.25ml de glucosa (20%); para el caso de M9 con acetato 2g/L se adiciona 0.375ml de acetato de sodio (20%) y 2.5 µl más de vitamina B1; para el caso de M9 con glucosa 2g/L y acetato 1g/L, se adiciona 0.25ml de glucosa (20%) y 0.1875 ml de acetato de sodio (20%).

6.6 Método Datsenko-Wanner (2000) para la obtención de cepas interrumpidas en el gen *ppsA*:

a) Obtención del producto de PCR a transformar:

- Con los oligos de interrupción del gen, se amplifica por PCR, el casete de resistencia a cloramfenicol contenido en el pkD3.
- Se purifican y digieren los productos del PCR.
- Una vez purificado y digerido, se aísla el producto de PCR hasta tenerlo en una concentración suficiente para su transformación.
- Los productos aislados, se suspenden en un buffer (10mM Tris, pH 8.0).

b) Obtención de las células transformantes:

- Las células transformantes se crecen en medio LB agar con Cb²⁰⁰ a 30°C durante 24 horas.
- Se toma una asada de las colonias y se crecen en 25 ml de medio SOB con Cb²⁰⁰ y 2.5 ml de arabinosa 1M a una temperatura de 30°C hasta alcanzar una D.O. de 0.6.
- Se centrifugan las células.
- Se lavan con agua fría 3 veces y posteriormente se resuspenden en 200 µl de agua.

c) Transformación:

- Se toman 50 µl de células transformantes y de entre 5 y 10 µl de producto de PCR.
- Se transforman las células por electroporación.
- Las células electroporadas se incuban a 30°C durante 3 horas en 1 ml de medio SOC.
- Posteriormente se distribuyen 200µl del cultivo en medio LB agar con Cm²⁵ y se incuba a 37°C toda la noche (overnight) para seleccionar colonias transformadas. El cultivo restante se deja a temperatura ambiente toda la noche (overnight).
- Si no hay crecimiento de las colonias en el medio LB, se repite el procedimiento del paso anterior con el resto del cultivo, con la diferencia de que se crecen a 37°C toda la noche.
- Las células seleccionadas se crecen entonces en medio LB sin antibiótico a 42°C por una noche con la finalidad de que pierdan el plásmido pKD46. Para comprobar la pérdida del plásmido, las células se crecieron en medio LB agar con antibiótico (Cb²⁰⁰) y en medio sin antibiótico (si

las células perdieron el plásmido, crecerán solo en medio sin antibiótico). Las células resultantes, serán *ppsA⁻*. De estas células se hará un respaldo en glicerol a -70°C.

Nota: Todas las amplificaciones por la técnica de PCR, se realizaron en un termociclador para PCR de marca Hybaid.

6.7 Caracterización de las cepas:

- A partir del glicerol de respaldo, las células se crecieron en medio LB con sus respectivos antibióticos. La cepa silvestre no tiene ninguna resistencia, PB11 y PB12 tienen resistencia a kanamicina, mientras que las mutantes generadas, tienen resistencia a kanamicina y cloramfenicol, a excepción de la cepa JM101 *ppsA::cm*, la cual solo tiene la resistencia a cloramfenicol. Ya crecidas en medio LB, se inocularon en medio mínimo M9 con glucosa 2g/L y se incubaron a 37°C a 300 rpm.
- Durante su crecimiento en medio mínimo M9 con glucosa se esperó a que los cultivos llegaran a la fase exponencial tardía (entre 160 y 180 unidades Klett aproximadamente), donde por medio de un medidor de glucosa de marca Roche se determinó la concentración de glucosa, la cual siempre estuvo entre 0.4 y 0.1 g/L para poder inocular a:

1.- Un medio mínimo M9 con acetato para determinar el efecto de las inactivaciones sobre el cambio de fuente de carbono y el crecimiento en acetato.

2.- Un medio mínimo M9 con glucosa como experimento control donde no se da el cambio de fuente de carbono y para evaluar su crecimiento en glucosa

3.- Un medio mínimo M9 con las dos fuentes de carbono para evaluar su crecimiento con ambas fuentes de carbono simultáneamente.

Nota: Este procedimiento se realizó dos veces de forma independiente y en cada caso por duplicado para las seis cepas que se analizaron en este estudio y que se especifican en la tabla 1.

6.8 Procesamiento de Datos:

- Para determinar la fase lag y la velocidad específica de crecimiento (μ), primero se determinó en los cultivos la densidad óptica en unidades klett (U.K.) a través de un Klett-summerson photoelectric colorimeter modelo 800-3, a lo largo de todo su crecimiento en las tres condiciones mencionadas.
- Los valores determinados en (U.K.), fueron procesados (mediante el software de hoja de calculo excel, distribuido por Microsoft), para obtener a partir de cada valor en unidades klett el logaritmo natural y graficar estos valores con respecto al tiempo para generar una curva de crecimiento. Una vez generada la curva de crecimiento, se identificó la fase lag y la fase exponencial.
- La μ se determinó tomando todos los valores que conformaron la fase exponencial (los cuales deben ser por lo menos tres) y llevando a cabo un análisis de regresión lineal a partir de la cual

se calculó la pendiente de la recta. El valor de la pendiente representa la velocidad específica de crecimiento. Cabe señalar que la línea de regresión determinada por el valor de R (coeficiente de correlación lineal) siempre fue lo más cercano a 1.

- Con los valores obtenidos se determinó el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación. A partir de esos valores (promedio y desviación estándar) se calculó el coeficiente de variación; este último no debía ser mayor del 15% para tomar como confiables todos los valores experimentales.

6.9 Determinación del consumo de glucosa y acetato:

- El consumo de glucosa y acetato, solo fue determinado cuando las cepas fueron crecidas en medio mínimo M9 con glucosa y acetato juntos. La finalidad de determinar la concentración de las fuentes de carbono en puntos clave de la cinética de crecimiento fue tratar de encontrar diferencias en cuanto al consumo de ambas fuentes de carbono al compararlas con las cepas parentales, ya que estas diferencias no necesariamente se reflejarían en la μ de las cepas a la hora de ser comparadas.
- Las concentraciones de glucosa y de acetato se determinaron por medio de un equipo de HPLC.

7 Resultados y discusión:

7.1 *Obtención de cepas con el gen ppsA interrumpido:*

Para interrumpir el gen *ppsA*, los oligos se obtuvieron mediante su amplificación por la técnica de PCR (Fig. 10). Estos oligos fueron los utilizados para interrumpir el gen en cuestión por el método Datsenko-Wanner (2000) descrito en materiales y métodos. Mediante esta técnica, se lograron aislar colonias con el gen *ppsA* interrumpido de las cepas JM101, PB11 y PB12.



Fig. 10.- Gel de agarosa que muestra la gran cantidad de oligos de interrupción de 1064 pb obtenidos por PCR y necesarios para una transformación eficiente (carriles 1, 2, 3 y 4).

7.2 *Comprobación de las inactivaciones:*

Para comprobar las inactivaciones, se extrajo DNA cromosomal de las cepas transformadas y sin transformar con un kit para extracción de DNA cromosomal de la compañía Mo Bio Laboratorios, Inc. La comprobación de las inactivaciones se llevó a cabo a través de dos estrategias. En la primera de ellas, teniendo como templado el DNA cromosomal de las cepas interrumpidas y sus controles, se amplificó por PCR una parte de la secuencia interrumpida. Para ello se empleó un oligo que empalma dentro del gen de resistencia a cloramfenicol (oligo cm), y el oligo Pps2, el cual empalma 434 pb

después del término de la transcripción del gen *ppsA*. Para esta primera comprobación, se obtuvo producto de PCR solo cuando se tuvo como templado el DNA cromosomal de las cepas transformadas, lo cual indica una interrupción exitosa de *ppsA* por el gen de resistencia a cloramfenicol (Fig. 11).

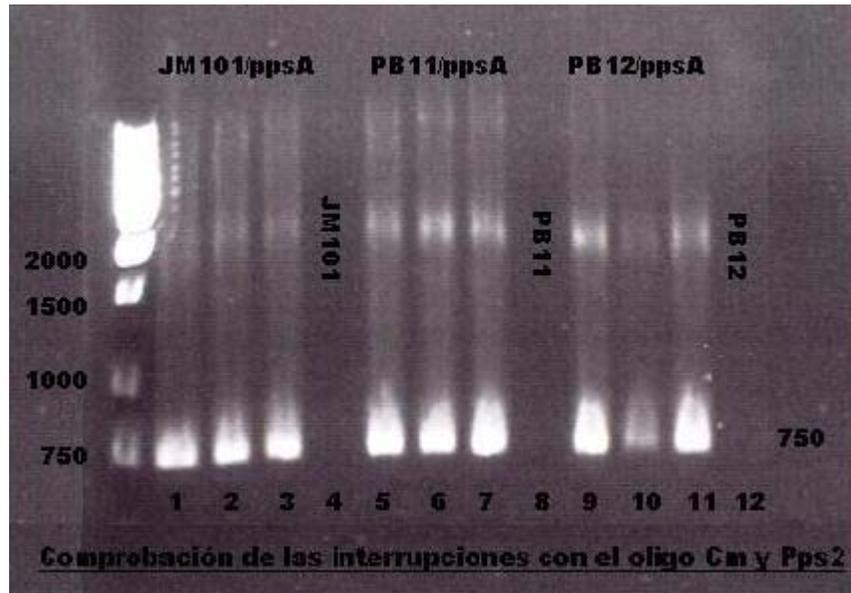


Fig. 11.- Gel de agarosa que muestra los tamaños de las secuencias amplificadas con los oligos Cm y Pps2, para comprobar las interrupciones del gen *ppsA* en tres colonias de JM101 (carriles 1, 2 y 3); PB11 (carriles 5, 6 y 7); y PB12 (9, 10 y 11). Los carriles 4 (cepa JM101), 8 (PB11) y 12 (PB12), muestran que en las tres cepas control donde no se encuentra la interrupción, como era de esperarse, no hubo amplificación.

La segunda comprobación, se hizo utilizando como templado el DNA cromosomal de las células (interrumpidas y su control) para amplificar por PCR el gen *ppsA* utilizando los oligos Pps1 y Pps2 (Fig. 12). Los productos de PCR, se corrieron en un gel de agarosa y se obtuvieron dos bandas por cepa en el gel, una de 3288 pb y otra de 1826 pb; es decir, el producto de PCR de las células con el gen *ppsA* interrumpido, tenían un tamaño más pequeño debido a la recombinación sufrida para interrumpir el gen en cuestión con el casete de resistencia a cloramfenicol. Por otro lado, el producto de PCR de las células sin transformar, tenían un tamaño mayor porque no sufrieron ninguna modificación en su

cromosoma. Lo anterior es prueba de que las interrupciones en el gen *ppsA*, fueron realizadas exitosamente.

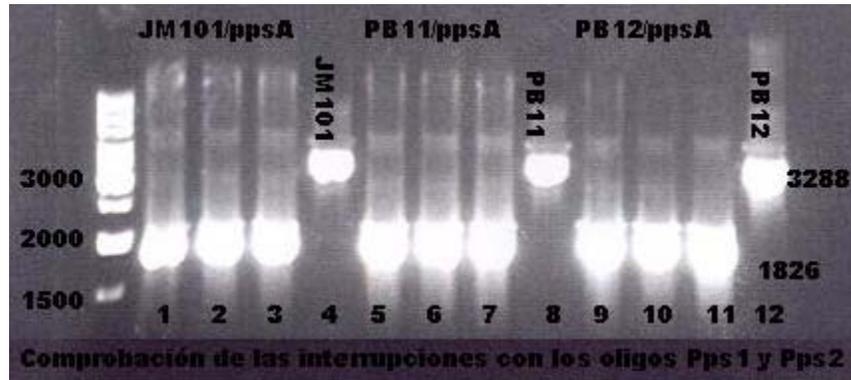


Fig. 12.- Gel de agarosa que muestra los tamaños de las secuencias amplificadas con los oligos Pps1 y Pps2, para comprobar las interrupciones en 3 colonias transformadas de JM101 (carriles 1, 2 y 3); PB11 (carriles 5, 6 y 7); y PB12 (9, 10 y 11). Los carriles 4 (cepa JM101), 8 (PB11) y 12 (PB12) muestran que en las 3 cepas control, el tamaño de la secuencia es mas grande(3288 pb). Para el caso de las colonias interrumpidas, el tamaño de la secuencia fue de 1826 pb.

7.3 Manejo de inóculos

Debido a que el principal aspecto que abordó este trabajo fue determinar la respuesta de crecimiento de las cepas JM101, PB11 y PB12 con el gen *ppsA* inactivo durante el cambio de fuente de carbono de glucosa a acetato; fue muy importante determinar de la forma más precisa posible, tanto la fase lag, como las μ 's de las cepas. Para conocer esos parámetros, las células se crecieron en un medio mínimo con glucosa y luego se utilizaron para inocular medio mínimo con acetato. Esto se hizo cuando las células llegaron a la fase exponencial tardía (D.O. de entre 1.3 y 1.6); pues dicha fase se caracteriza porque se activa el switch de acetato. El switch de acetato (Fig. 13) fisiológicamente se define como el momento en donde la tasa de excreción de acetato es igual a su tasa de asimilación (Wolfe, A., 2005). Este fenómeno es una adaptación a las necesidades celulares pues es común que las células se desenvuelvan en ambientes donde la disponibilidad de alimento varía constantemente. Siendo así, las células responden cambiando su programa fisiológico de estar creciendo rápidamente en presencia de

un determinado sustrato a uno de sobrevivencia, provocado por la ausencia ó reducción importante en la concentración del primer sustrato. Para este caso, las células se ven obligadas a pasar de un programa de rápido crecimiento, donde se asimila glucosa y se excreta acetato, a un programa de crecimiento lento donde la asimilación del acetato previamente excretado le ayuda a la célula a su sobrevivencia en ausencia ó limitación de glucosa.

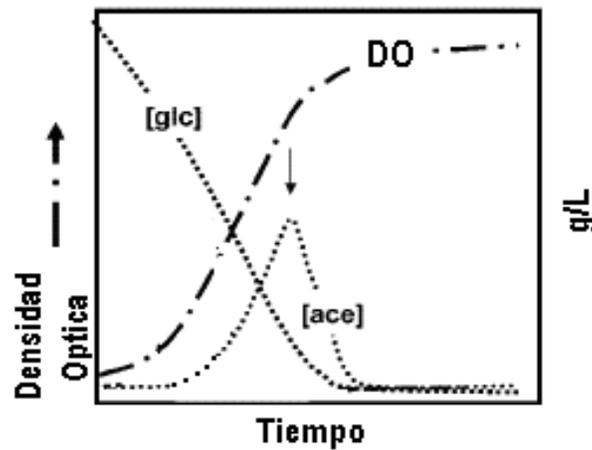


Fig. 13.- Switch de acetato. (Tomado y modificado de Wolfe, A., 2005)

De esta forma, cuando la célula llega a la fase exponencial tardía, el switch de acetato está activo, y por lo tanto, se han activado vías de asimilación de acetato (AMP-ACS). Metodológicamente hablando, esto fue de gran utilidad pues se encontró un punto donde la fisiología celular de todas las cepas es el mismo. Gracias a lo anterior fue posible someter a las cepas al cambio de fuente de carbono en el mismo punto fisiológico, lo que disminuyó el tiempo de adaptación y ayudó en gran medida a la reproducibilidad de los resultados. El establecimiento de dicho punto fisiológico se hizo mediante la determinación de la concentración de glucosa en el medio, la cual debía ser entre 0.4 y 0.1 g/L (cuando la glucosa inicial es de 2 g/L) y la densidad óptica está entre 1.3 y 1.6, que es el intervalo en donde el switch de acetato se activa (Wolfe, A., 2005).

Una vez estandarizado el manejo de los inóculos, se procedió a la determinación de las velocidades de crecimiento.

7.4 Crecimiento de las cepas en medio mínimo con glucosa:

a) Para las cepas JM101 y PB12:

Los experimentos control (donde no se sometió a las cepas a un cambio de fuente de carbono), no arrojaron cambios significativos en lo que respecta a JM101 y PB12 con la mutación en el gen *ppsA*; es decir, las velocidades específicas de crecimiento y las fases lag, se mantuvieron prácticamente iguales tanto en las cepas mutantes, como en las cepas parentales (Tabla 2, Fig 14).

Estos resultados concuerdan con lo que se esperaba, pues el gen *ppsA* actúa en condiciones gluconeogénicas para poder abastecer a la célula de precursores en la vía alta de la red metabólica. Debido a las características del gen y del sustrato a utilizar (en este caso glucosa), era de esperarse que la μ de la cepa no cambiara, pues en general, es un hecho que la glucosa, en mayor o menor magnitud, se asimila deficientemente en cepas PTS^- , y por esta razón y bajo estas condiciones (glucosa como única fuente de carbono), la fosfoenolpiruvato sintasa no confiere desventajas, pues a pesar de que en PB12 se sobreexpresa *ppsA* (y otros genes gluconeogénicos), debido a la necesidad de la célula de catabolizar otro tipo de fuentes de carbono para un mejor crecimiento, el producto de este gen tiene muy poco sustrato para funcionar, pues no hay otras entradas de carbono, y la célula solo cataboliza el poco acetato que ella misma produce debido a la entrada de glucosa.

b) Para la cepa PTS: ¿Un ciclo fútil de interconversión de piruvato en PEP en la cepa PB11?

Por otra parte, la velocidad específica de crecimiento de la cepa PB11 con la interrupción en el gen *ppsA*, resultó ser mayor alrededor de un 60% que la de su progenitora PB11; es decir, la cepa PB11 tiene una μ de 0.12, y la cepa PB11/*ppsA*- resultó tener una μ de 0.2 (Tabla 2).

La cepa PB11 crece muy lentamente en medio mínimo con glucosa debido principalmente a la ineficiente internalización de la glucosa, lo que conlleva a tener menos cantidad de piruvato disponible si se compara a esta cepa con las cepas JM101 y PB12. Analizando el nodo de piruvato, en el laboratorio se detectó la sobreexpresión del gen que codifica para la piruvato oxidasa (*poxB*) en la cepa PB11 (Flores N. *et. al.* 2005). En otro trabajo, se concluyó que la cepa PB11 utiliza la enzima piruvato oxidasa (PoxB) cuando se encuentra en medio mínimo con glucosa para convertir un porcentaje significativo de piruvato en acetato, logrando contribuir a la generación de ATP al incrementar la cantidad de ubiquinol (UQH₂) en la membrana celular (Flores N. *et. al.* 2004). Lo anterior podría explicar en parte, el incremento en la μ de PB11 cuando se interrumpió *ppsA*, pues la enzima producto de éste gen utiliza piruvato como sustrato para generar PEP, reacción que en estas condiciones resulta ser una desventaja debido al tipo de sustrato que se está metabolizando. Además, convertir piruvato en PEP utilizando PpsA implica el gasto de una molécula de ATP en cada evento de conversión, lo cual es un gasto energético.

En este caso, la glucosa le da a la célula ciertos beneficios y le restringe otros que aunado a las características de la cepa, le obliga a explotar otras vías para su supervivencia; es decir, la glucosa abastece perfectamente la vía alta de la red metabólica, hasta llegar al nodo de PEP; sin embargo, el que no se hayan detectado productos de fermentación en esta cepa PB11 (Flores S., *et. al.* 2002), hace pensar que el poco o mucho acetato generado por la vía PoxB, es indispensable para la célula, pues lo consume inmediatamente. Tomando en cuenta lo anterior, se refuerza la idea de que la cepa PB11 esté

utilizando el extra de piruvato por la ausencia de *ppsA* recurriendo a la vía PoxB, pues así gana ATPs que incrementan el ubiquinol en la corriente de electrones, y genera también acetato, para la formación de acetil coenzima A que alimentará el ciclo de Krebs; esto sin olvidar que el acetato podría estar aumentando la actividad de los genes del ciclo del glioxalato que presupondría un ahorro de esqueletos de carbono, al actuar de manera indirecta sobre el operón *aceBAK*, pues se ha manejado la posibilidad de que el acetato (o algún metabolito relacionado) esté inactivando al modulador *IclR*, el cual reprime dicho operón. El dato anterior sugiere que la poza del piruvato está limitada en PB11 cuando crece en glucosa y que la cancelación de la actividad de PpsA aumenta la poza de este metabolito. En este sentido resulta sorprendente y en cierta medida contradictorio, como se ha señalado, que la cepa PB11 sobreexpresa 3.7 veces el gen *ppsA* en estas condiciones de crecimiento (Flores, N., *et. al.* 2005). Vale la pena señalar que en la cepa PB11 cuando crece en glucosa como única fuente de carbono, se sobreexpresan muchos genes gluconeogénicos y entre ellos *ppsA* (Flores, N., *et. al.* 2005). Sin embargo solo algunos de ellos son dependientes de RpoS y este no es el caso de *ppsA* (Flores, N., *et. al.* 2007). Lo anterior señala que hay varios reguladores involucrados en la respuesta gluconeogénica.

| <i>Medio Mínimo M9 con glucosa</i> | | |
|------------------------------------|-------|-------------------|
| <i>Cepa</i> | μ | <i>Porcentaje</i> |
| <i>JM101</i> | 0.69 | 100 |
| <i>JM101/ppsA-</i> | 0.7 | 101.4 |
| | | |
| <i>PB11</i> | 0.12 | 100 |
| <i>PB11/ppsA-</i> | 0.2 | 166.6 |
| | | |
| <i>PB12</i> | 0.40 | 100 |
| <i>PB12/ppsA-</i> | 0.42 | 105 |

Tabla 2: Cuadro comparativo de las velocidades específicas de crecimiento (μ) entre las cepas mutantes y las cepas parentales crecidas en medio mínimo con glucosa (M9-Glc).

Considerando lo anterior, es factible pensar que la interrupción de *ppsA* le confiera una ventaja a la cepa PB11, pues en este caso es más importante abastecer de piruvato, que la utilización de éste para formar PEP, el cual, basándose en estos resultados, probablemente estaría reprimiendo parcialmente la vía glicolítica, pues se sabe que este metabolito es un inhibidor de la glicólisis. En PB11 quizá el PEP intracelular se encuentre en una cantidad suficiente como para inhibir enzimas de la vía glicolítica tales como la glucocinasa y la fosfoglicerato isomerasa; que son claves en el inicio de esta vía (Ogawa, T., *et. al.* 2007).

La nula actividad de PpsA, podría estar propiciando entonces dos cosas: 1) un aumento en la cantidad de piruvato disponible, que la célula pudiera aprovechar vía PoxB, y 2) la desrepresión de la vía glicolítica; lo cual se ve reflejado en un incremento en la velocidad específica de crecimiento y probablemente en la reducción de la fase lag en PB11.

Un punto importante a mencionar, es la regulación de *ppsA*. Como ya se mencionó, en el trabajo de Flores N. *et. al.* 2005, el gen *ppsA* se encuentra sobreexpresado 3.7 veces más que en la cepa silvestre cuando se crece en glucosa; por esta razón se podría pensar que la actividad de la enzima producto de ese gen, es esencial en el funcionamiento celular. FruR es un regulador transcripcional global que controla la expresión de numerosos operones involucrados en el metabolismo de carbono, incidiendo de manera importante en el flujo de carbono en *Escherichia coli* (Ramseier, T., M., *et. al.* 1995), y en cepas como PB11 y PB12, se encuentra ligeramente sobreexpresado 1.3 y 1.5 veces respectivamente en relación con JM101 en medio mínimo con glucosa. Como se ha mencionado, la región promotora del gen *ppsA* tiene una secuencia denominada caja FruR, situada en la región -45.5; dicha región corresponde a una secuencia de reconocimiento de 11 pares de bases, donde se une este factor de transcripción, regulando positivamente la expresión de este gen (Negre, D. *et. al.* 1998).

Si tomamos en cuenta la condición de FruR y su sobreexpresión en glucosa, así como el tipo de cepa, entenderíamos que PB11 al carecer de un sistema que le permite la óptima internalización de glucosa,

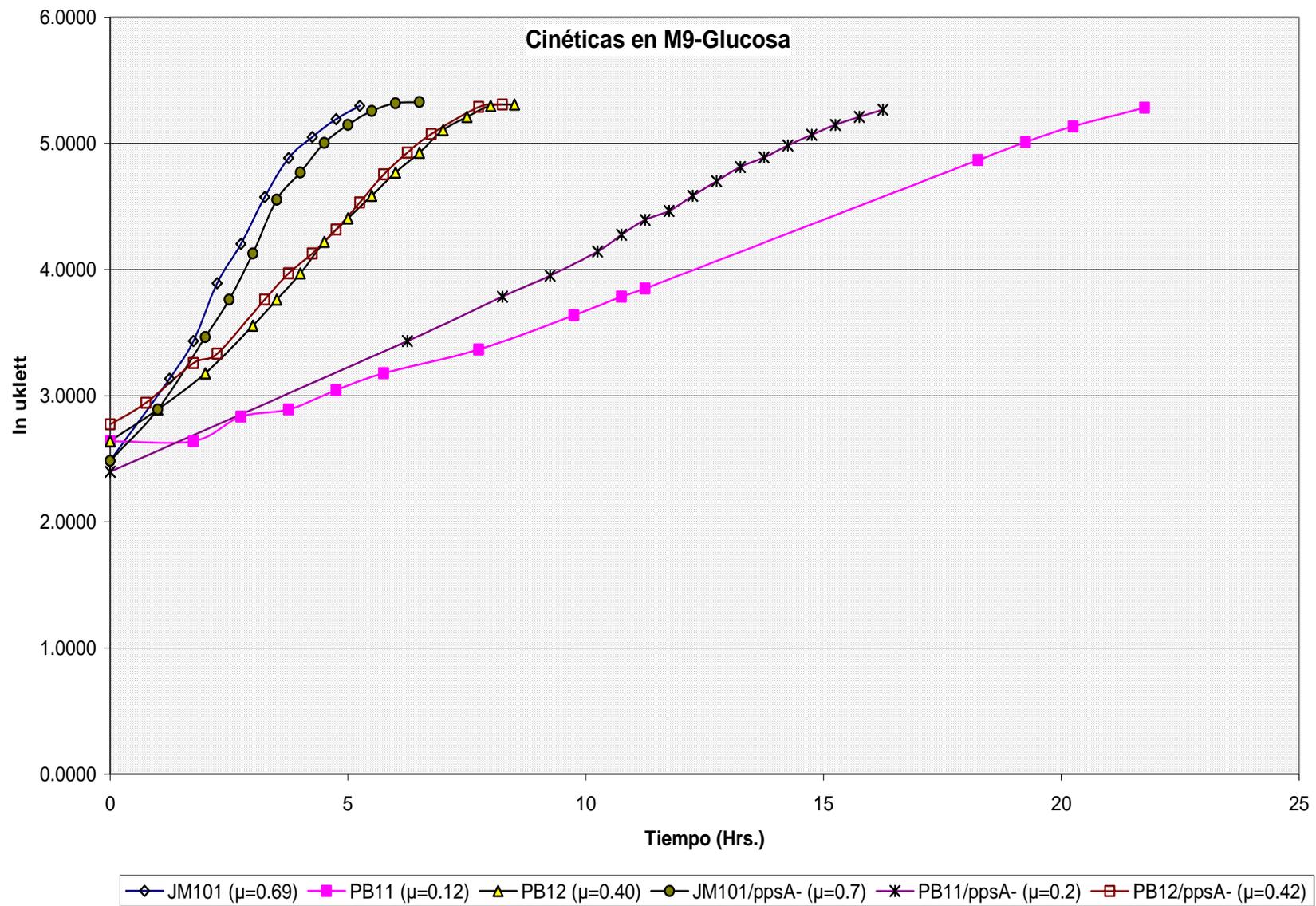


Fig. 14.- Comportamiento de todas las cepas del estudio en medio mínimo con glucosa

necesitó de una regulación que le permitiera controlar de la forma más adecuada posible el flujo de carbono, hasta llegar a un equilibrio que le permita sobrevivir bajo las circunstancias genéticas en las que se desenvuelve. Para encontrar este equilibrio, probablemente pudieron participar, distintos reguladores transcripcionales como RpoS, ppGpp y FruR entre otros (Flores, N. *et. al.* 2006); que pudieran ejercer efectos pleiotrópicos en la célula, posiblemente ocasionando un rearrreglo metabólico. La sobreexpresión, en principio aparentemente no necesaria, del gen que codifica para la fosfoenolpiruvato sintasa en la cepa PB11, pudo entonces ocasionar un intercambio fútil, entre el piruvato y el PEP, es decir, la célula necesita tener piruvato para generar acetato por medio de PoxB, y así optimizar la utilización de los esqueletos de carbono. Las enzimas Pyk A y Pyk F sintetizarían entonces el piruvato a partir de PEP. Sin embargo, la sobreexpresión de *ppsA*, inducida por FruR, limitaría la cantidad de piruvato, al ser utilizado para la síntesis de PEP por conducto de la fosfoenolpiruvato sintasa, induciendo en la célula la necesidad de generar piruvato por medio de las piruvato cinasas, lo cual resultaría en la formación de un ciclo fútil entre el piruvato y el PEP, debido a la interconversión entre ambos metabolitos. Esta limitación de piruvato ocasionada por la constante interconversión de metabolitos, podría estar mermando la capacidad de utilización de la glucosa en el medio. Sustenta la hipótesis anterior, el hecho de que se da un incremento en la velocidad específica de crecimiento en PB11 cuando se inactiva *ppsA*.

7.5 Crecimiento de cepas en medio mínimo con acetato:

a) *Cepa silvestre JM101:*

Para el caso de la mutante *ppsA* en la cepa JM101, era de esperar que la fase de adaptación (fase lag) al cambio de fuente de carbono fuera más prolongada (tabla 3, Fig 15), ya que la enzima PpsA, junto

con las enzimas málicas, forman parte de una de las dos vías gluconeogénicas que utilizan metabolitos intermediarios del ciclo de Krebs para la formación de PEP. Este metabolito abastece del fosfato necesario para la activación de la glucosa internalizada, ó en su defecto, la presencia o ausencia del fosfato cedido por el PEP, es la señal implicada en el mecanismo por el cual se activan o no, genes que están involucrados en la asimilación de otras fuentes de carbono, incluido el acetato cuando hay ausencia de glucosa. La interrupción del gen *ppsA* en una cepa que cuenta con el sistema PTS y que se encuentra en un ambiente pobre en esqueletos de carbono, impide un abastecimiento completo de PEP para activar la cascada de señalizaciones que como ya se mencionó, ayuda a la célula a contender con ambientes adversos. Sin embargo, eso no significa que la expresión de los genes gluconeogénicos no se lleve a cabo, pues la ruta paralela para la obtención de PEP, a partir de la vía baja de la red metabólica mediada por PckA, resulta de gran ayuda para el funcionamiento celular bajo estas condiciones. De esta forma, PckA logra sintetizar suficiente PEP para la activación de los genes gluconeogénicos necesarios, aunque el tiempo de respuesta no es el mismo, debido a que es la única vía activa.

| <i>Medio Mínimo M9 con acetato</i> | | |
|--|-------|-------------------|
| <i>Cepa</i> | μ | <i>Porcentaje</i> |
| <i>JM101</i> | 0.29 | 100 |
| <i>JM101/ppsA-</i> (Fase lag 5 horas mayor que JM101) | 0.14 | 48.2 |
| | | |
| <i>PB11</i> | 0.23 | 100 |
| <i>PB11/ppsA-</i> (Fase lag 38 hrs. Mayor que PB11) | 0.1 | 43.4 |
| | | |
| <i>PB12</i> | 0.13 | 100 |
| <i>PB12/ppsA-</i> (Fase lag 28 hrs. Mayor que PB12) | 0.11 | 84.6 |

Tabla 3: Cuadro comparativo de las velocidades específicas de crecimiento (μ) entre las cepas mutantes y las cepas parentales crecidas en medio mínimo con acetato (M9-Ace).

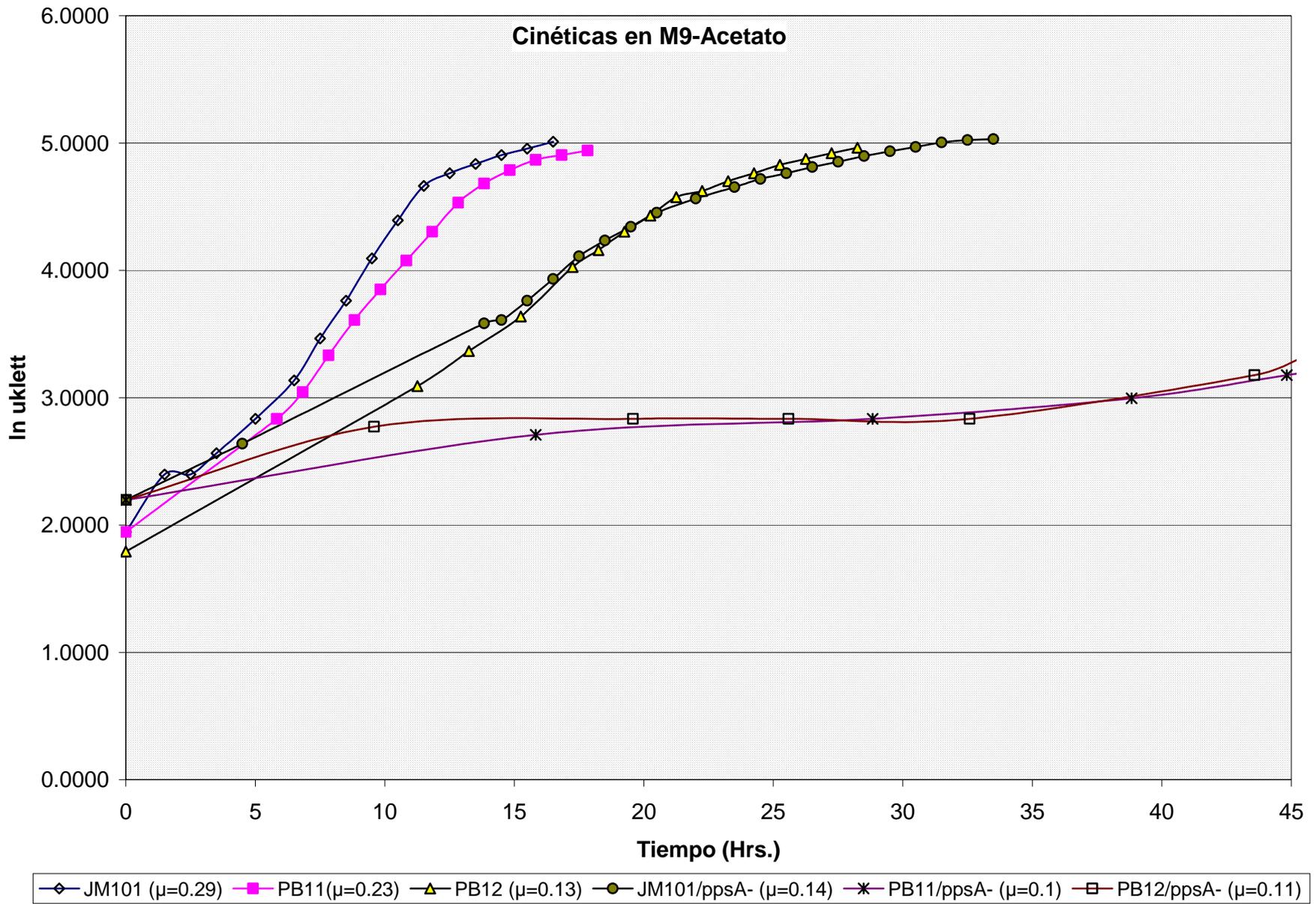


Fig. 15.- Comportamiento de todas las cepas del estudio en medio mínimo con acetato

Experimentos previos con la cepa de *E. coli* BW25113 interrumpida en este mismo gen (Katy C. *et. al.* 2005), no arrojan variaciones en la velocidad específica de crecimiento (μ) cuando se crece a *E. coli* en medio mínimo con glucosa ó en medio mínimo con acetato comparándolas con sus controles. Sin embargo, en nuestra cepa, si se observa una baja de más del 50% en la μ de la cepa JM101 *ppsA*- durante su crecimiento en medio mínimo con acetato.

Esto no resulta extraño si recordamos que solo la vía que concierne a PckA está trabajando en esta cepa para generar PEP, el cual no solo es esencial para la activación de genes gluconeogénicos, sino que también es indispensable para la generación de precursores utilizados en el ciclo de las pentosas, y para la síntesis de a.a. aromáticos, lo que se refleja en una μ más baja debido a un déficit de PEP cuando la fuente de carbono es acetato.

b) En la cepa PB11 PTS⁻ Glc⁻:

La cepa PB11 *ppsA*- disminuyó su μ hasta casi un 60%, indicando un papel importante para PpsA en esta cepa y en estas condiciones de crecimiento (Tabla 3). Se había pensado originalmente que al encontrarse en un estado de estrés permanente debido a la falta del sistema PTS, la célula experimentaría menos inconvenientes al encontrarse en condiciones de escasez de carbono a pesar de haber interrumpido *ppsA*. Análisis recientes de valores de expresión de genes obtenidos mediante RT-PCR pero cuando PB11 y PB12 son crecidas en medio mínimo con acetato, muestran que genes importantes para contender con el déficit de carbono tales como *actP*, *acs*, *maeB*, y *pckA*, en la cepa PB11 se encuentran subexpresados 5, 3.1, 1.7 y 1.6 veces respectivamente comparadas con la cepa silvestre (Sigala, J. C. 2006). Esto resulta extraño, si se tiene en cuenta que esos genes conforman las vías que se supone deben estar más activas; *actP* y *acs* para la internalización y transformación del acetato, y *maeB* y *pckA* para la generación de PEP. Lo anterior puede indicar que la capacidad de

expresión puede ser diferente en las diferentes cepas. También puede indicar que las necesidades en ambas situaciones cambian, por esta razón se esperaba por ejemplo, una fase lag más corta al saber que varios genes importantes, como los ya mencionados, estaban sobreexpresados o al menos no cambiaban su nivel de expresión con respecto a la cepa silvestre (cuando la célula se encuentra en presencia de glucosa).

Al analizar ambas situaciones vemos que tal vez la célula, al no poder transportar glucosa eficientemente aún estando en medio mínimo con glucosa, activa genes para la asimilación de otras fuentes de carbono; incluyendo los de la asimilación de acetato. La célula en esta situación, aparentemente se ve obligada a tratar de buscar y captar todo el carbono, incluyendo el acetato disponible y se sobreexpresan genes como *poxB*, *acs*, *sfcA*, *maeB* y los que están implicados en el ciclo del glioxalato. Esto concuerda con que en PB11 no se encuentren productos de fermentación tal como el acetato porque probablemente es consumido inmediatamente (Flores, S. *et. al.* 2002). Por otro lado, al encontrarse en un medio con acetato, probablemente no es necesario sobreexpresar tanto estos genes, al menos comparativamente con la silvestre; de hecho como ya se menciona, algunos bajan su expresión debido a que a ese nivel funcionan bien, ya que hay acetato que metabolizar, lo cual se corrobora con que en medio mínimo con acetato, se tenga una μ de 0.23, superior a la obtenida en medio mínimo con glucosa (μ 0.11).

El aumento en la fase lag (Tabla 3, Fig. 15) entonces se explica de la mismo forma; el gen *ppsA* ahora se sabe no cambia su nivel de expresión en PB11, caso contrario, el gen *pckA* disminuye 4.0 veces su nivel de expresión en esta misma cepa con relación a la silvestre (Sigala J. C. 2006). Esto habla de la importancia de la función de la enzima codificada por *ppsA*, pues la célula tiene una ruta preferencial para la obtención de PEP en condiciones gluconeogénicas, pues en medio mínimo con acetato, la célula utiliza la vía *mez-ppsA* para la generación de PEP, idea que se refuerza al saber que deletando las enzimas málicas, se disminuye la μ a 0.11 si se trata de *maeB* y a .090 si se deleta la función de

sfcA (Sigala J. C. 2005), concluyendo a su vez que *sfcA* es usada preferencialmente sobre *maeB* que tiene un nivel de expresión menor. Por esta razón, al interrumpir un gen gluconeogénico tan importante como *ppsA*, aunado a que *pckA* no es la ruta preferencial ni se expresa a un nivel óptimo para la generación de PEP, el tiempo de respuesta aumenta notablemente, reflejándose en una lag de 45 horas (Fig. 15), y posteriormente en una baja en la μ de hasta casi el 60% (Tabla 3).

La falta del sistema PTS en PB11, podría cuestionar lo referente a la activación de los genes catabólicos para otros tipos de fuentes de carbono en la supuesta ausencia de glucosa en el medio, pues podría argumentarse que además del poco PEP generado en la cepa PB11 *ppsA*⁻, el cual proporcionaría el fosfato necesario para la cadena de fosforilaciones que darían paso a las activaciones de las que hablamos, no existe ningún componente del sistema PTS; incluyendo la proteína IIA^{Glc}, la cual activa la adenilato ciclasa para aumentar los niveles de AMPc y así se produzca la desrepresión de varios genes importantes. A pesar de ello, es un hecho que dicha desrepresión se da, y se ha propuesto que la adenilato ciclasa debe ser activada por otra proteína, pues los niveles de transcripción de genes como *crp*, el cual codifica para la proteína CRP, y *cya* que codifica para la adenilato ciclasa, se sobreexpresan en las cepas PTS⁻ (Flores, N. *et. al.* 2005), además de saber que la cepa PB11 no se beneficia al agregar AMPc al medio (Sigala, J.C., 2005). Otra probable explicación sería que exista alguna otra proteína que supla la función de IIA ó que tal vez el gen *cya* en cepas PB11 no requiere estar activado.

c) La cepa PB12 PTS⁻ Glc⁺:

Como se ha señalado, la cepa PB12 en medio mínimo con glucosa, muestra una sobreexpresión de los genes que conforman ambas vías gluconeogénicas: *pckA* se sobreexpresa 2.3 veces más que en la cepa silvestre; y los genes *maeB*, *sfcA* y *ppsA*, se sobreexpresan 2.5, 1.7 y 2.4 veces respectivamente. Esto indica que ambas vías son utilizadas al parecer indistintamente cuando hay glucosa en el medio. Con

base en estos resultados, se pensó que durante el crecimiento de esta cepa en medio mínimo con acetato, la vía *pckA* alcanzaría por abastecer la demanda de PEP y así no afectar de manera importante la μ .

Por otra parte, resultados recientes de análisis de transcriptoma en medio mínimo con acetato para esta cepa, muestran que *pckA* y *maeB* se expresan 1.5 veces menos con respecto a la JM101 (Sigala J. C. 2006). Estos resultados y las inactivaciones en estos genes indican que ambas vías se complementan, pues las mutantes de estos genes por separado, no afectan demasiado la μ de la cepa (la mutante en *sfcA* afectó el 1% y para el caso de *maeB* la μ extrañamente incremento un 21%; para el caso de *pckA* la μ disminuyó un 8%). Por su parte la mutante en *ppsA* confirma esta complementación, pues a pesar de haber afectado más que las otras mutaciones, la μ solo disminuyó alrededor del 15% (Tabla 3).

Por su parte la fase lag (Fig. 15), la cual se incrementó 28 horas más, habla en esencia del mismo problema que se presentó en la cepa PB11. Al conocer que en PB12, el gen *ppsA* se sobreexpresa en medio mínimo con glucosa, y que la expresión de este mismo gen no cambia en medio mínimo con acetato pero que su delección tiene cierto impacto negativo, es de esperar sea importante no para iniciar la respuesta de adaptación, sino para superarla lo más pronto posible; pues a pesar de que ambas vías gluconeogénicas se complementen, hay que recordar que el acetato no es el mejor sustrato para el crecimiento de PB12. Si a esto, se añade el hecho de que la inactivación del gen *ppsA* (después de la doble inactivación de las enzimas málicas), es la mutación que causa más estragos en la fisiología de esta cepa, lo anterior podría significar que la vía *mez-ppsA* es más usada, y para ello resulta lógico pensar que la fase lag se incrementa, independientemente del estado de estrés permanente causado por la delección del sistema PTS y que provoca desrepresión de varios genes concernientes al aprovechamiento de carbono.

7.6 Crecimiento de las cepas en medio mínimo con glucosa y acetato:

En las cepas PTS⁻ generadas en nuestro laboratorio, se notó por medio de un análisis de expresión de genes (RT-PCR), que muchos de los genes implicados en el metabolismo gluconeogénico estaban sobreexpresados, aún creciendo en un sustrato como la glucosa. Al parecer, basándose en los datos de expresión de estos genes (Flores N., *et. al.* 2005), y distinto a lo que se pensaba en un inicio con un estudio de análisis de flujos por resonancia magnética nuclear (Flores S., *et. al.* 2002), mientras la cepa PB11 utilizaba la vía *mez-ppsA* como vía gluconeogénica, la cepa PB12 podía utilizar tanto la vía *mez-ppsA*, como la mediada por *pckA* en glucosa. Estos resultados, indicaban que ambas cepas PTS⁻ podrían hacer uso de sus capacidades glicolíticas y gluconeogénicas al mismo tiempo.

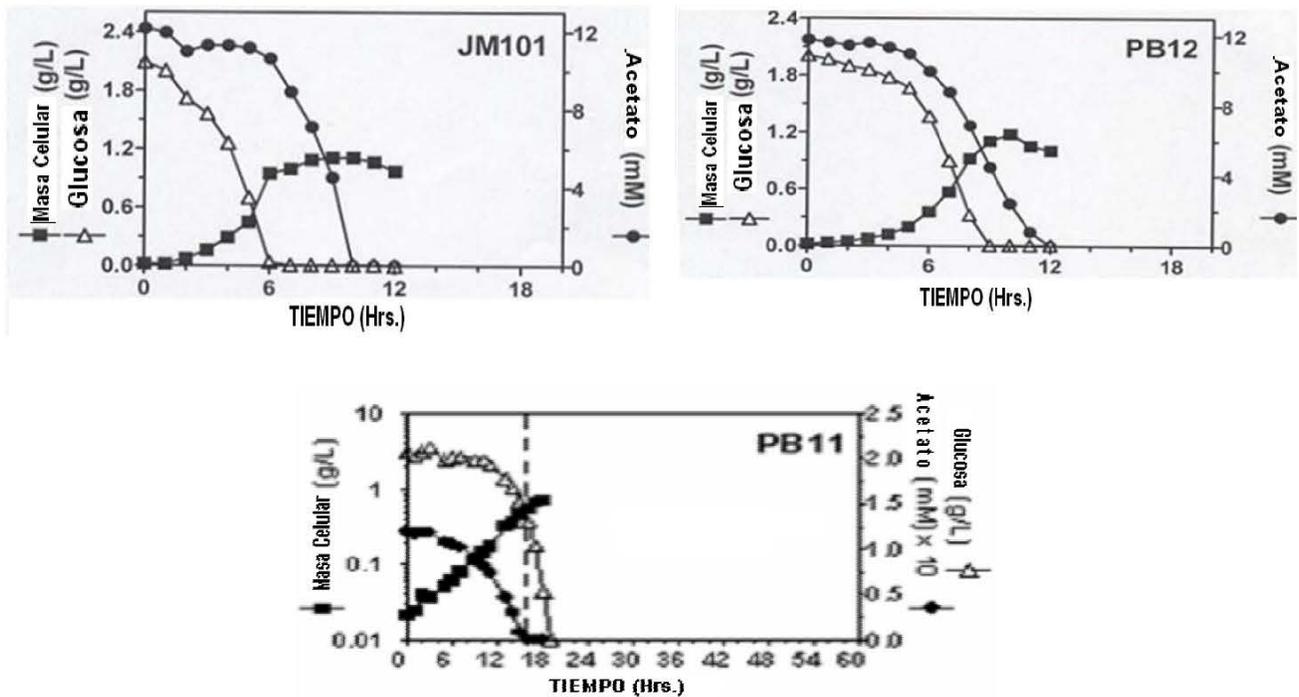


Fig. 16.- Gráficas obtenidas en el trabajo de Flores N., *et. al.* 2005 cuando se cuantificó la concentración de glucosa y acetato, a lo largo de las cinéticas con ambas fuentes de carbono en el medio; los resultados demuestran la capacidad de PB11 y PB12 para cointilizar ambas fuentes de carbono.

Para corroborar lo anterior, estas cepas se crecieron en medio M9 con glucosa 2 g/L, para después ser crecidas en un medio M9 con las dos fuentes de carbono conjuntamente (glucosa 2g/L y acetato 1g/L), y de esta forma evaluar las capacidades glicolíticas y gluconeogénicas de las cepas en presencia de una alta concentración de glucosa en el medio con respecto al acetato.

Los resultados demostraron que en la cepa parental se presentaba la misma μ que cuando fue crecida únicamente con glucosa en el medio, pero después de 2 horas en fase estacionaria, se detectaba una segunda fase exponencial con una μ mucho más baja. Por otro lado, la cuantificación de las fuentes de carbono en el medio demostraron que la silvestre utilizaba solo glucosa en su primera etapa de crecimiento, y acetato en la segunda como era de esperarse (Fig. 16).

Por su parte, las cepas PB11 y PB12, no mostraron diauxia en su crecimiento y su μ se incrementó (PB11 paso de una μ de 0.1, a una de 0.3, y PB12 paso de una μ de 0.4, a una de 0.48). La cuantificación de carbono en el medio a lo largo de la cinética de crecimiento en estas cepas, indicó un consumo simultáneo de ambas fuentes de carbono, aunque con una diferencia en cuanto a la preferencia; es decir, mientras PB11 comenzaba a utilizar primero el acetato y luego la glucosa, la PB12 hacía lo contrario, primero utilizaba la glucosa y luego el acetato (Fig. 16); sin embargo, ambas cepas co-utilizan las dos fuentes de carbono y terminan su crecimiento en menos de 15 horas, lo que apoya la hipótesis de que las cepas PTS⁻, conjuntan ambas capacidades metabólicas de manera simultánea.

| <i>Medio Mínimo M9 con glucosa y acetato</i> | | |
|--|-------|-------------------|
| <i>Cepa</i> | μ | <i>Porcentaje</i> |
| <i>JM101</i> | | |
| *Comportamiento diauxico | 0.67 | 100 |
| <i>JM101/ppsA-</i> | | |
| *Comportamiento diauxico | 0.68 | 101.4 |
| | | |
| <i>PB11</i> | 0.3 | 100 |
| <i>PB11/ppsA-</i> | 0.32 | 106.6 |
| | | |
| <i>PB12</i> | 0.46 | 100 |
| <i>PB12/ppsA-</i> | 0.46 | 100 |

Tabla 4: Cuadro comparativo de las velocidades específicas de crecimiento (μ) entre las cepas mutantes y las cepas parentales crecidas en medio mínimo con glucosa y acetato (M9- Glc y Ace). Nota: la μ en el caso de los comportamientos diauxicos, corresponden al crecimiento con la utilización de glucosa.

Las mutantes generadas en este trabajo también fueron sometidas a las mismas condiciones en las que se evaluaron por primera vez las capacidades glicolíticas y gluconeogénicas de las cepas PTS⁻. Los resultados arrojados en estos experimentos, no mostraron ningún cambio significativo en cuanto a las velocidades específicas de crecimiento de ninguna de las cepas (Tabla 4); tanto la JM101, como la PB11 y la PB12 carentes del gen *ppsA* incrementaron su μ de la misma forma que sus parentales cuando éstas son crecidas en un medio con glucosa y acetato.

a) Consumo de las fuentes de carbono:

La cepa JM101/*ppsA-* presentó, como se esperaba, su característica diauxia (Fig. 17), en donde consume glucosa en una primera fase de crecimiento, y posteriormente a su etapa de adaptación, consume acetato en una segunda fase de crecimiento (Fig 18). Es importante mencionar, que una diferencia significativa, es la que concierne a la etapa de adaptación de esta cepa una vez consumida la glucosa pues mientras la cepa silvestre (JM101) tarda solo 2 horas en comenzar con la segunda fase de

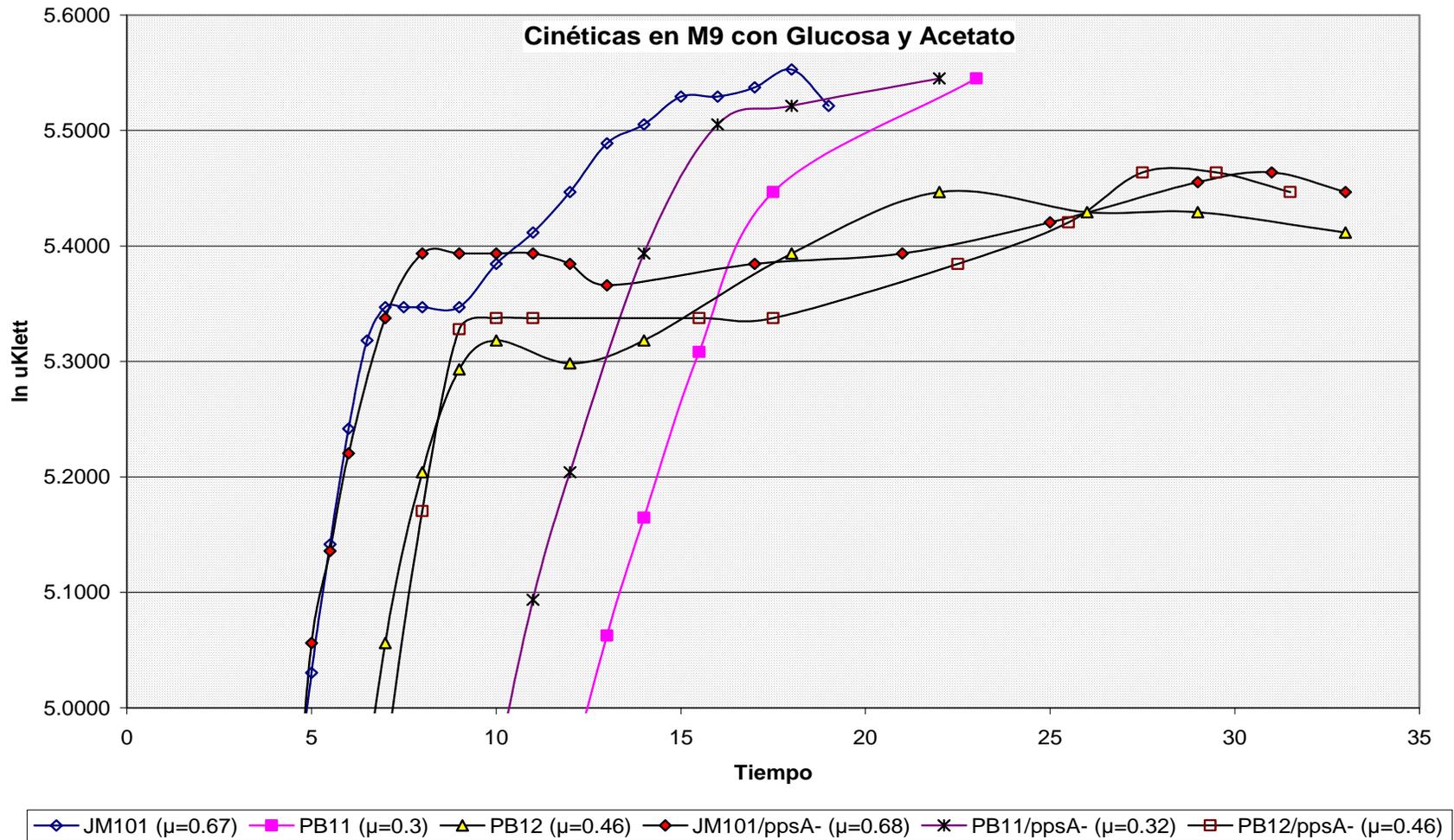


Fig. 17.- Comportamiento de todas las cepas del estudio en medio mínimo con Glucosa y Acetato (parte final de las cinéticas a una escala mayor).

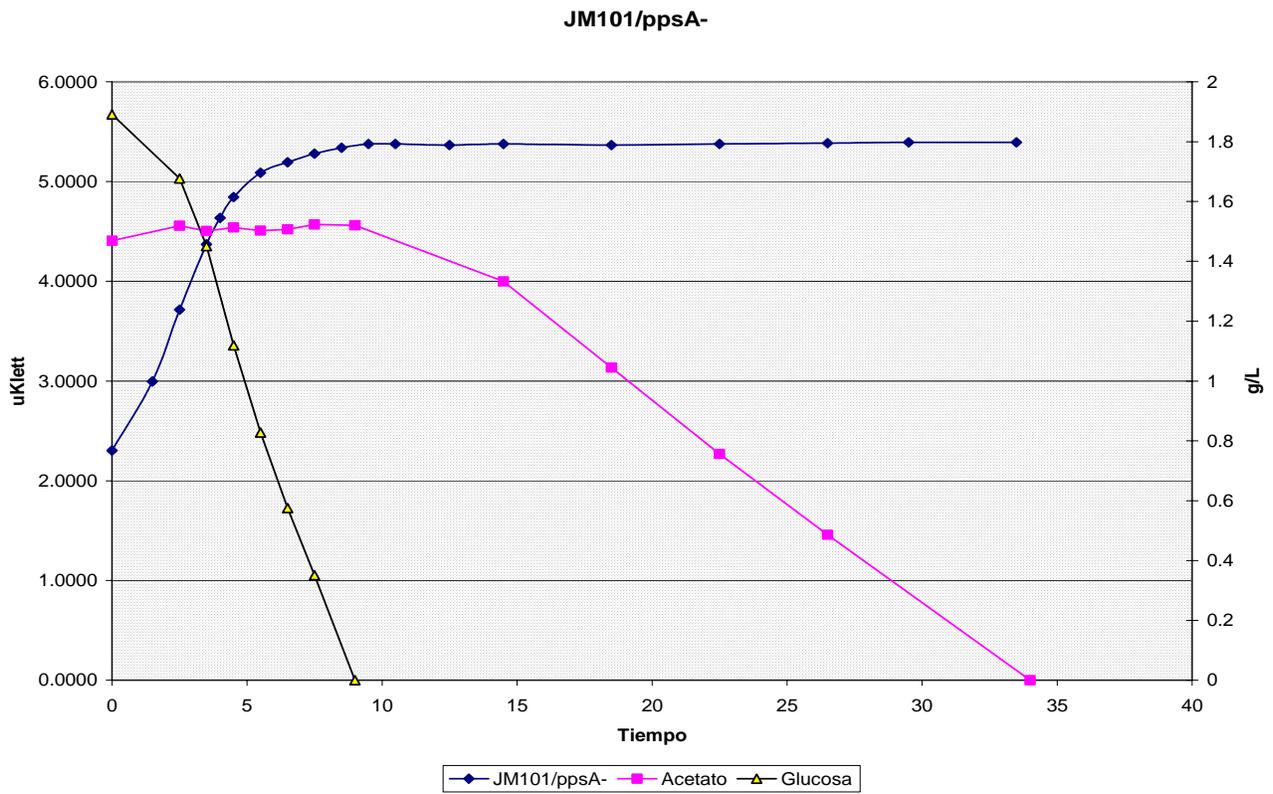
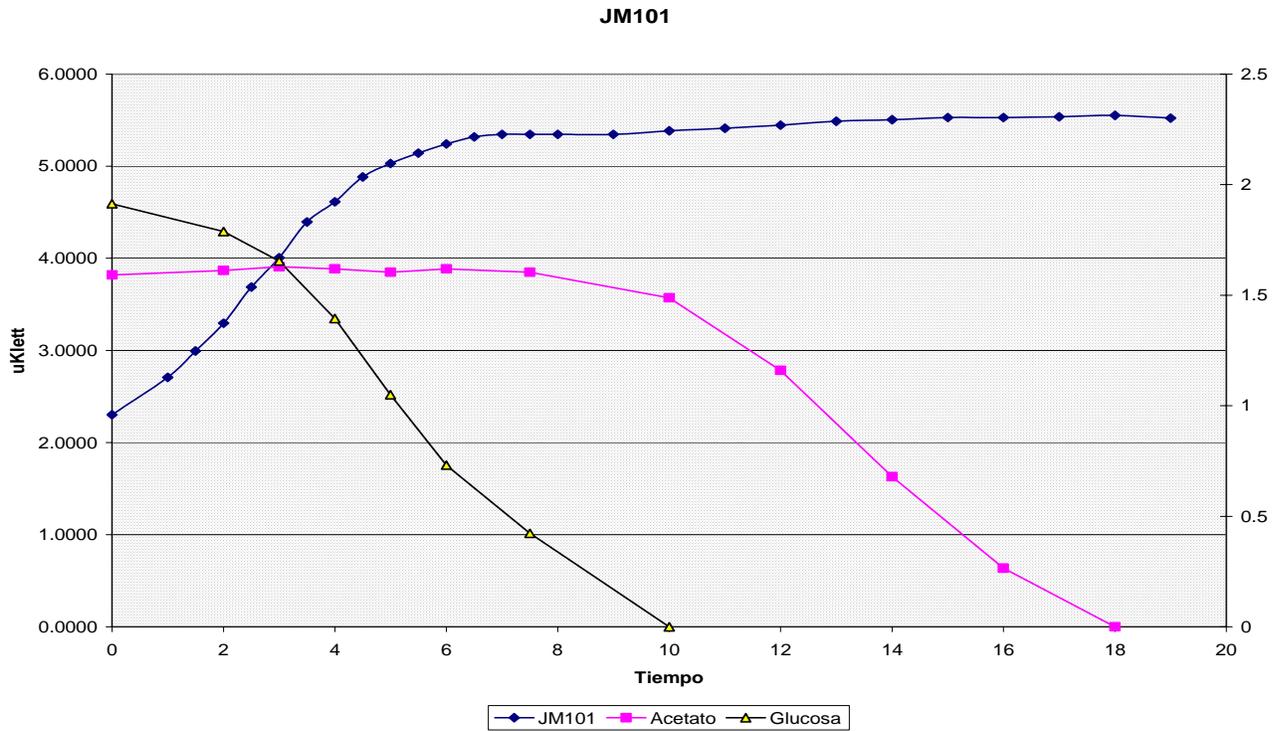


Fig 18.- Gráficas de JM101 y JM101/*ppsA*- que muestran el consumo de glucosa y acetato a lo largo de la cinética; ambas cepas consumen las dos fuentes de carbono de manera diferencial.

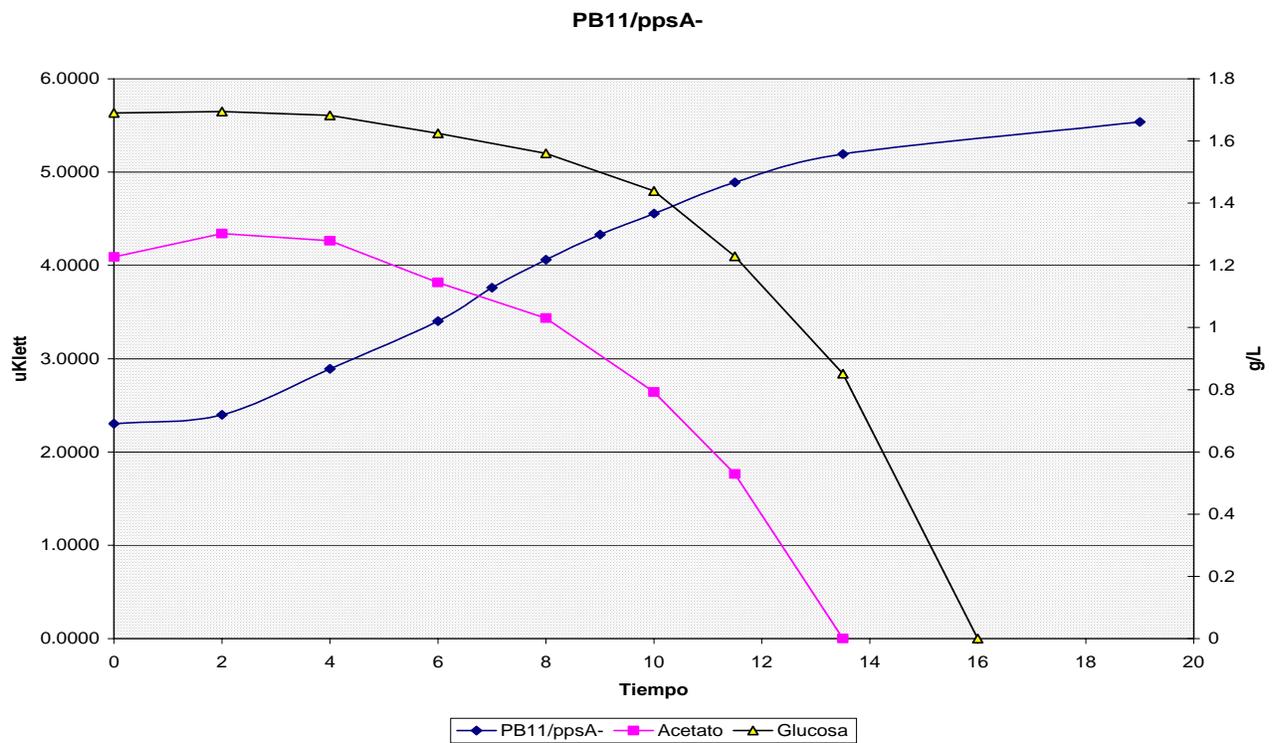
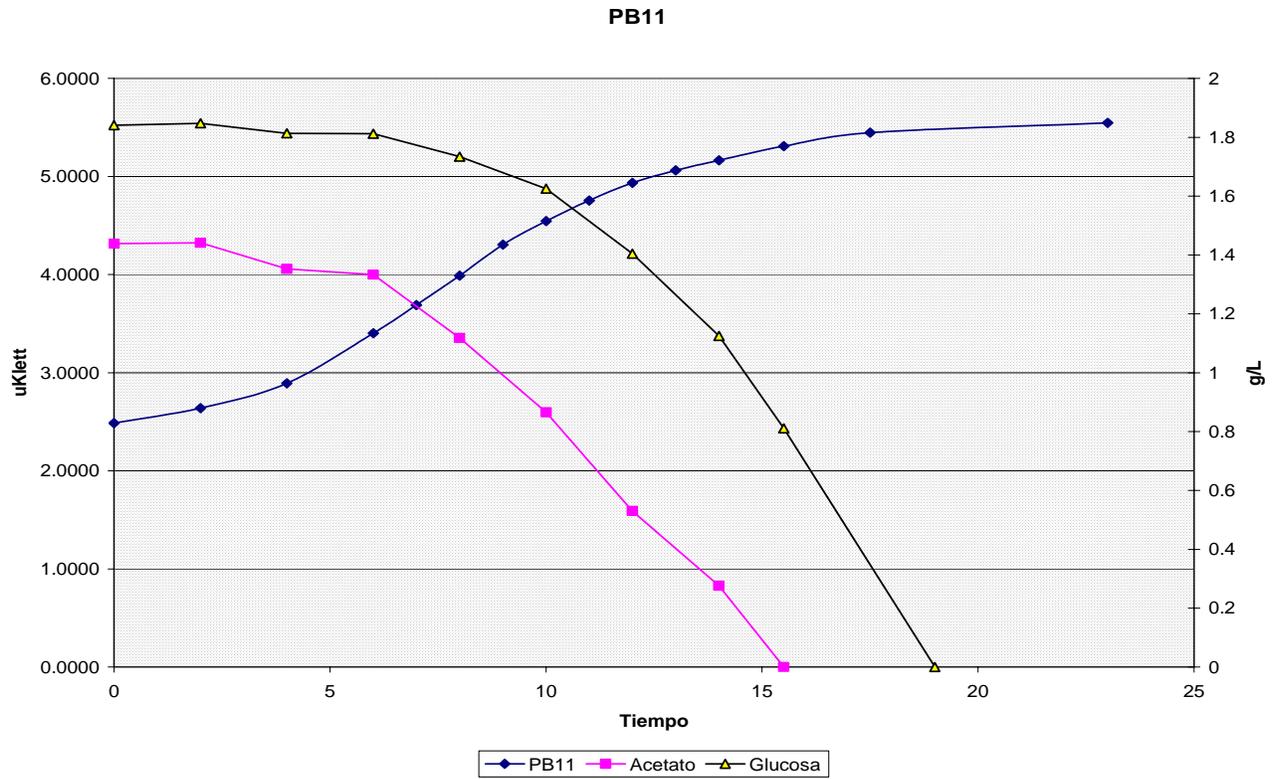


Fig 19.- Gráficas de PB11 y PB11/ppsA- que muestran el consumo de glucosa y acetato a lo largo de la cinética; ambas cepas cutilizan las dos fuentes de carbono.

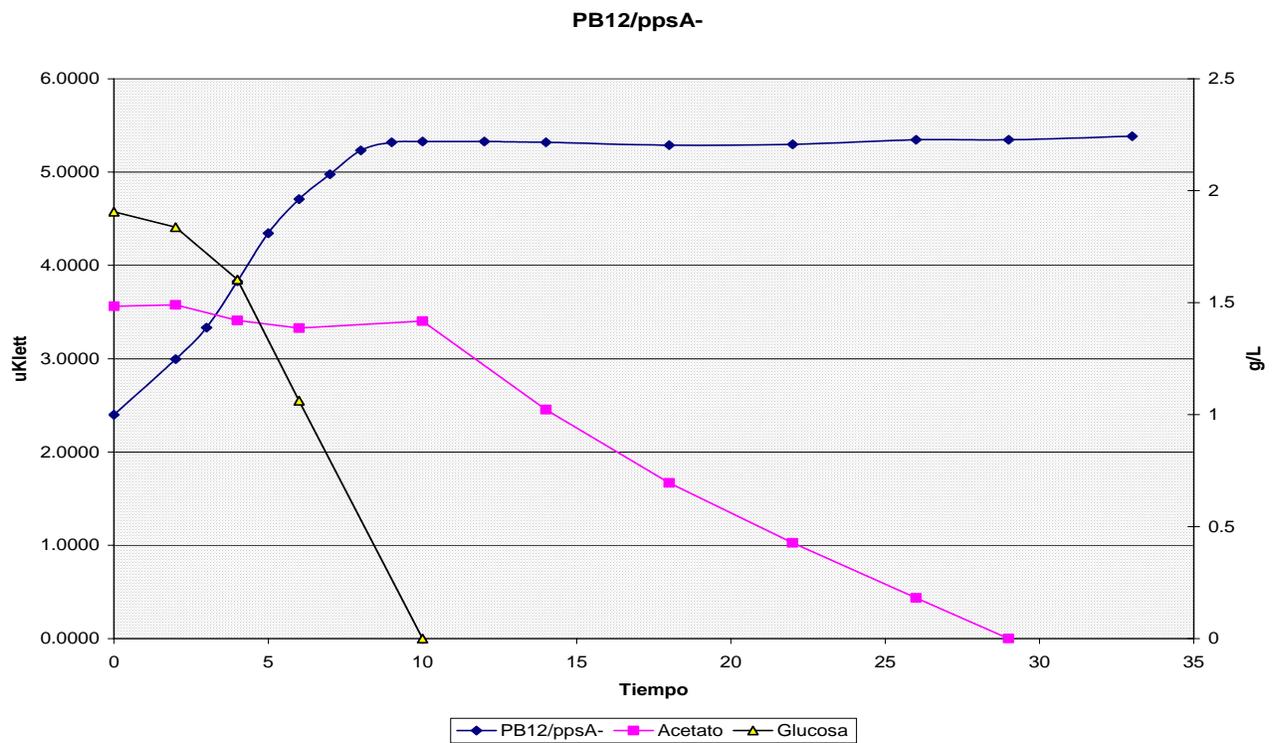
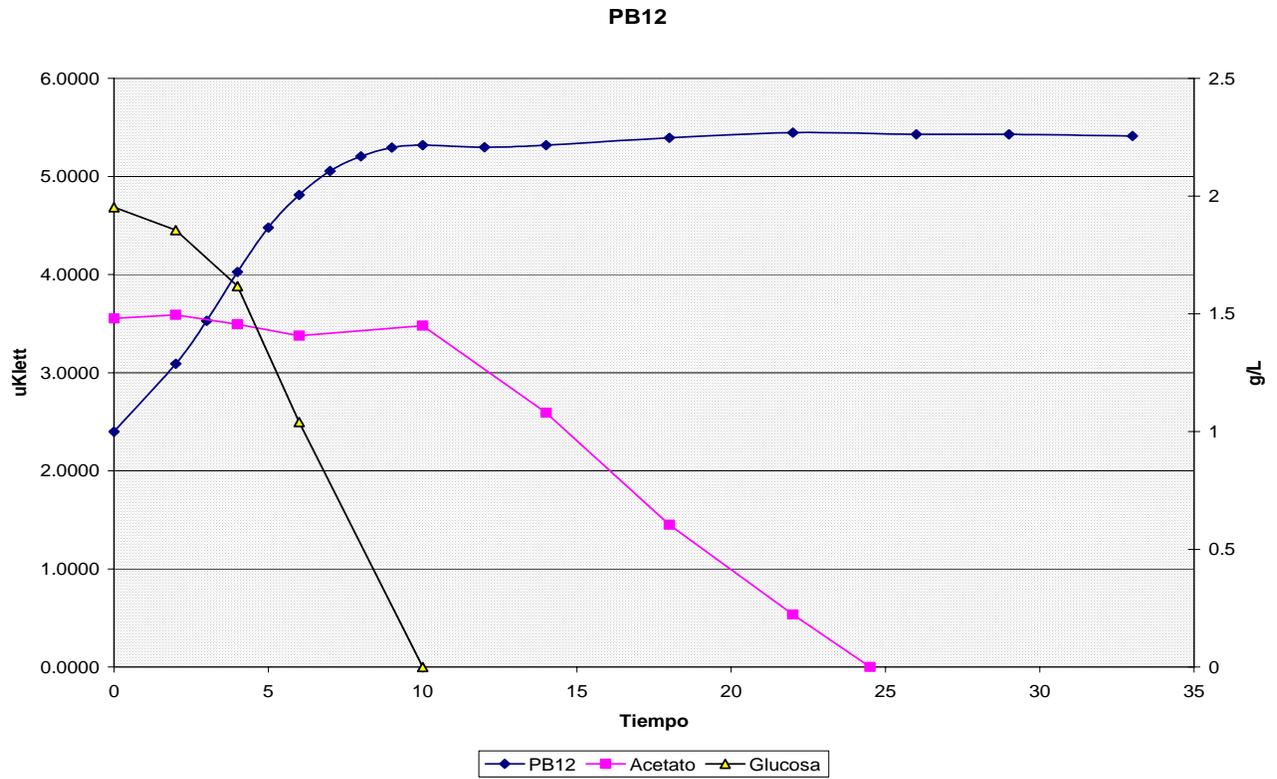


Fig 20.- Gráficas de PB12 y PB12/*ppsA*- que muestran el consumo de glucosa y acetato a lo largo de la cinética; ambas cepas consumen las dos fuentes de carbono simultáneamente pero con una muy notable preferencia por la glucosa.

crecimiento; la cepa mutante (JM101/*ppsA*-) tarda alrededor de 12 horas en iniciar esa segunda fase; la cual, como puede apreciarse en la gráfica de la figura 17, tiene una pendiente muy tenue. Esto es congruente con lo observado al pasar de un cultivo con glucosa a uno con acetato.

La cepa PB11/*ppsA*- siguió utilizando ambas fuentes de carbono simultáneamente, presentándose también su preferencia al acetato, el cual consumía primero (fig.19). Como era de esperarse en este caso, la ausencia del gen *ppsA* no generó fuertes cambios, y ambas cepas se comportaron prácticamente igual. No obstante, los valores calculados de las velocidades específicas de consumo de sustrato (q_s) entre ambas cepas, no arrojan una diferencia significativa para ningún sustrato (La q_s de ambas cepas para acetato es de 0.24 y para glucosa son de 0.10 y de 0.11 para PB11 y PB11/*ppsA*- respectivamente). El aumento del 6% en la μ de la cepa PB11/*ppsA*- no parece ser significativo.

Como ya se mencionó con anterioridad; los experimentos correspondientes a la cepa PB12/*ppsA*- y su control (PB12), no arrojaron cambios en las velocidades específicas de crecimiento y estas se mantuvieron prácticamente iguales (Tabla 4); sin embargo, el análisis de resultados del consumo de sustratos para ambos casos, mostró en forma clara que los sustratos del medio eran aprovechados en forma distinta a como se había especulado. La glucosa es consumida inmediatamente, sin embargo el acetato se consume en cantidades muy pequeñas al principio; y una vez que la glucosa termina de ser consumida; se comienza con la utilización del acetato en forma clara.

Los resultados fueron claros, y se confirmaron con tres réplicas posteriores; después de 10 horas, cuando la glucosa se había agotado, y hasta las 25 horas en el caso de PB12 y hasta las 30 horas en el caso de PB12/*ppsA*-, ambas cepas empezaban con un consumo sustancial del acetato en el medio (Fig. 20), pues el consumo de este sustrato en un inicio fue mínimo.

Los resultados obtenidos para el caso de la cepa PB12 difieren un poco con lo que se había demostrado previamente en nuestro laboratorio (Flores N., *et. al* 2005), cuando se determinó cómo es que las cepas

PTS⁻ habían logrado adaptar su metabolismo a la ausencia de éste sistema de transporte. Por el momento es viable atribuir las diferencias de comportamiento a que los experimentos realizados hace algunos años, se efectuaron en fermentadores de 1L, y los que se presentan en este trabajo, fueron realizados en matraces klett de 125 (con 25 ml de medio), ésta única diferencia podría estar implicando aspectos no solo de volúmen, sino también otros factores intrínsecos del volumen, principalmente pH del medio ligado a la densidad celular ó algún aspecto derivado de los anteriores que no se ha contemplado, que no fueron monitoreados en este trabajo y que sí fueron controlados en los fermentadores, lo que causaría un comportamiento variable únicamente para esta cepa y bajo esta condición (mezcla de sustratos), pues hay que mencionar que para los otros casos (medio con glucosa y acetato por separado), la PB12 se comportó exactamente igual que como se comportó en fermentador.

Por ahora solo se puede mencionar que al parecer, la cepa PB12 tiene comportamientos distintos cuando se crece en fermentador y cuando se crece en matraz, debido probablemente a factores no controlados en matraz tales como pH y oxigenación, que al parecer ese cambio es significativo, pues en matraz la cepa PB12 y su mutante no asimilan acetato de una forma tan marcada, como en el fermentador. Lo que llama la atención es que la μ de la primera fase de crecimiento, se incrementó en el medio con mezcla de fuentes de carbono, en la misma proporción, que cuando se cutilizan ampliamente ambos sustratos; a pesar de saber que el acetato no era consumido en forma sustancial . Sería lógico pensar que si solo consume glucosa y muy poco acetato en esa primera fase, su μ debería ser la misma o ligeramente mayor que en la cinética realizada con medio mínimo con glucosa solamente.

Las diferencias entre la cepa PB12 y la cepa PB12/*ppsA*- cuando son crecidas en la mezcla de sustratos en este trabajo, radica en el tiempo que éstas tardan en consumir el acetato, pues mientras la cepa parental lo consume en aproximadamente 15 horas, la cepa mutante lo hace en 20 horas. (Fig. 20). Tal

parece que la delección de *ppsA* le impide a la cepa una asimilación más rápida del acetato en el medio, debido seguramente a que la otra vía activa (PckA) que sube el flujo de carbono a las partes altas del metabolismo es insuficiente. Cabe mencionar que para ambas cepas, al terminar de consumir la glucosa en el medio, se nota un ligero incremento en la concentración de acetato, el cual se le atribuye a la excreción de éste al consumir la glucosa.

8. Conclusiones:

a) Crecimiento en glucosa como única fuente de carbono:

- La ausencia de PpsA, no ocasiona ventajas ni desventajas evidentes para las cepas JM101 y PB12, ya que este sustrato glicolítico no afectó la disponibilidad del PEP pues la célula probablemente utilizó la vía glicolítica para abastecerse de este metabolito.
- Por el contrario, en PB11 la interrupción del gen *ppsA* generó un incremento en la μ , debido probablemente a un aumento en la disponibilidad de piruvato. Es posible que PB11 esté utilizando el extra de piruvato por la ausencia de *ppsA* mediante un incremento de la vía PoxB, pues así reduce más quinonas en la membrana y genera más acetato, para la formación de acetil coenzima A que alimentará el ciclo de Krebs. Lo anterior sin olvidar que el acetato (o algún metabolito relacionado) pudiera estar aumentando la actividad de los genes del ciclo del glioxalato lo que a su vez presupondría un ahorro de esqueletos de carbono al no oxidar completamente las moléculas de acetil-CoA. Además, al no utilizar la PpsA para transformar piruvato en PEP se ahorra ATP. Pareciera que *ppsA* fuera un ciclo fútil de interconversión de PEP en piruvato en la cepa PB11 PTS⁻ que reduce la μ .

b) Crecimiento en acetato como única fuente de carbono. La ausencia de PpsA propicia una disminución del PEP, lo que a su vez ocasiona:

- No se activen de forma inmediata genes para asimilación de acetato en cepas PTS+, ya que sin el suficiente PEP se impide, posiblemente, la rápida y prolongada fosforilación del componente IIA en el sistema PTS, mismo efecto que causa la presencia de glucosa en el medio. De esta forma se evita que el sistema PTS cense la falta de glucosa en el medio, pues el componente IIA no puede activar a la adenilato ciclasa que es la encargada de incrementar los niveles de AMPc. Por consiguiente no es posible inducir la activación de CRP y tampoco es posible activar de manera inmediata los genes catabólicos para otro tipo de azúcar.
- No haya suficiente biosíntesis de compuestos orgánicos que ayuden al crecimiento de las células; esto se reflejó en fases lag más prolongadas, pues se debe esperar a tener suficiente PEP para comenzar la fase de crecimiento, la cual también se ve afectada sin la disponibilidad necesaria de éste metabolito. Esta aseveración recae en los valores de los niveles de expresión génica de *ppsA* en las tres cepas y de genes alrededor de ella, que proponen y de igual forma reafirman, que la vía gluconeogénica principal para el abastecimiento de PEP, es la vía *mez-ppsA*.
- La interrupción de genes de la vía gluconeogénica *mez-ppsA*, afecta en mayor grado a JM101 y PB11 en su μ ; tal vez debido a una baja en la disponibilidad de PEP que no alcanza a ser reabastecida por otras vías.

- Al parecer PB12 suple adecuadamente la interrupción de la vía *mez-ppsA* utilizando PckA para la formación de PEP, ya que su μ no se vio afectada significativamente. Sin embargo la μ de PB12/*ppsA*- en acetato es muy baja ($\mu = 0.11$), similar a la de la cepa PB11/*ppsA*-.

c) Crecimiento en medio con mezcla de fuentes de carbono (Glucosa y Acetato):

- Las cepas JM101, PB11 y PB12, mutantes en PpsA prácticamente no modifican su μ .
- La cepa JM101, al igual que su mutante, presenta represión catabólica y por ende un comportamiento diauxico.
- La cepa PB12 al parecer tiene un comportamiento distinto cuando es crecida en matraz; ya que en fermentador cutiliza en forma clara ambos sustratos y en matraz se presenta un consumo discreto de éstos, pues el acetato se consume muy poco al inicio; y su utilización se ve favorecida cuando la glucosa está ausente en el medio.
- Es posible que los comportamientos de PB12 se deban principalmente a un aumento o disminución del pH ó algún aspecto variable relacionado con el volúmen, los cuales no era posible controlar en los experimentos de este trabajo.

9. Perspectivas:

- Tratar de recuperar el crecimiento exhibido en las cepas parentales, el cual se perdió al generar las interrupciones en *ppsA*-, agregando al medio algún intermediario de la vía del shiquimato. Esto permitiría corroborar que es la falta de PEP la causa de los problemas de crecimiento en

acetato de estas cepas. El agregar un metabolito que por alguna vía genere PEP, ya sea directa o indirectamente, probablemente ayude a recuperar el crecimiento, y a disminuir la fase lag, logrando así una mejora en las velocidades específicas de crecimiento de las cepas.

- Sobreexpresar las piruvato cinasas A y F en PB11. De esta manera se mejoraría el crecimiento tratando de explotar al máximo la estrategia celular de esta cepa creciendo en un medio con glucosa, en la que se utiliza el piruvato para la activación de una vía gluconeogénica que gana ATPs y por consiguiente, ayuda a la célula para aprovechar de mejor forma la glucosa en el medio.
- Continuar indagando acerca de la fisiología de las cepas PTS⁻, nos permitirá entender aún mejor los procesos metabólicos en su interior. El conocimiento derivado de este trabajo, así como el conocimiento futuro de estas cepas bacterianas, podría conducirnos eventualmente, a aumentar la poza de PEP en el interior celular a un bajo costo, y así, canalizar este metabolito no solo a la vía de aminoácidos aromáticos, sino a distintas vías importantes para la producción de varias moléculas importantes para la industria.
- La sobreexpresión de *rpoS* no afecta la transcripción de PB11, pero en PB12 la afecta de 2.4 a 1.1. Esto podría indicar la aparición de una mutación en la región del promotor de *ppsA* en PB12 que ahora lo hace dependiente de RpoS (Flores, N., *et. al.* 2007). Valdría la pena secuenciar la región de PB11 y PB12 que contiene el promotor de *ppsA*.

10. Referencias:

Báez, J., Bolívar, F., Gosset, G., 2001. Determination of 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate productivity and yield from glucosa in *Escherichia coli* devoid of the glucose phosphotransferase system. Biotechnol. Bioeng. 6: 530-535.

Báez-Viveros, J. L., Osuna, J., Hernández-Chávez, G., Soberon, X., Bolívar, F., Gosset, G., 2004. Metabolic engineering and protein directed evolution increase the yield of L-phenylalanine synthesized from glucose in *Escherichia coli*. Biotechnol. Bioeng. 87: 516-524.

Bolívar, F., Rodriguez, R., Greene, P., Betlach, M., Heyneker, H., Boyer, H., 1977. Construction and characterization of new cloning vehicles II. A multipurpose cloning system. Gene. 2(2): 95-113.

Bolivar, F. y Gossett G., 2004, En: Fundamentos y casos exitosos de la biotecnología moderna, Capítulo VIII: Ingeniería celular microbiana. Primera edición. El Colegio Nacional.

Cozzzone, A. J., 1998. Regulation of acetate metabolism by protein phosphorylation in enteric bacteria. Annu. Rev. Microbiol. 52: 127-164.

Datsenko, K., Wanner, B., 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. PNAS. 97(12): 6640-6645.

De Reuse, H., Huttner, E., Danchin, A., 1984. Analysis of the *ptsH-ptsI-crr* region in *Escherichia coli* K-12: evidence of a single transcriptional unit. Gene. 32: 31-40.

Flores, N., 1995. Construcción y caracterización de cepas de *Escherichia coli* mutantes en el sistema de transporte de carbohidratos PTS. Instituto de Biotecnología, UNAM. Tesis de Maestría

Flores, N., Xiao, J., Berry, A., Bolivar, F., Valle, F., 1996. Pathway engineering for the production of aromatic compounds in *Escherichia coli*. Nat. Biotechnol. 14: 620 – 623.

Flores, N., de Anda, R., Flores, S., Escalante, A., Hernandez, G., Martinez, A., Ramirez, O. T., Gosset, G., Bolivar, F., 2004. Role of Pyruvate Oxidase in *Escherichia coli* Strains Lacking the Phosphoenolpyruvate: Carbohydrate Phosphotransferase System. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 8: 209-221.

Flores, N., Flores, S., Escalante, A., de Anda, R., Leal, L., Malpica, R., Georgellis, D., Gosset, G., Bolivar, F., 2005. Adaptation for fast growth on glucose by differential expression of central carbon metabolism and gal regulon genes in an *Escherichia coli* strain lacking the phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system. Metabol. Eng. 7: 70-87.

Flores, N., Escalante, A., de Anda, R., Báez-Viveros, J. L., Merino, E., Georgellis, D., Gosset, G., Bolívar, F., 2007. The role of sigma factor RpoS in *Escherichia coli* strains lacking phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system. The transcription of *spot* and *gpp* whose protein products are involved in the syntesis and degradation of ppGpp is RpoS dependent.

(Manuscrito en trámites para publicación).

Flores, S., Gosset, G., Flores, N., de Graaf, A., Bolivar, F., 2002. Analysis of carbon metabolism in *Escherichia coli* strains with an inactive phosphotransferase system by ¹³C labelling and NMR spectroscopy. Metabol. Eng. 4: 124-137.

Flores S., Flores N., de Anda R., González A., Escalante A., Sigala J.C., Gosset G., Bolivar F., 2005. Nutrient-scavenging stress response in an *Escherichia coli* strain lacking the phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system, as explored by gene expression profile analysis. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 10(1):51-63.

Fox, Donna K., Presper, Kathleen A., Adhya, Sankar., Roseman, Saul., Garges, Susan., 1992. Evidence for two promoters upstream of the *pts* operon: Regulation by the cAMP receptor protein regulatory complex. Biochemistry, 89: 7056-7059.

Frankel, D.G., 1996. Glycolysis. In: Neidhart, F. C. (Ed.), *Escherichia coli*, and *Salmonella: Cellular and Molecular Biology*, 2nd ed. ASM, Washington, DC, USA. pp. 189 – 196.

Gimenez, R., Nunez, M. F., Badia, J., Aguilar, J., Baldoma, L., 2003. The gene *yjcG*, cotranscribed with the gene *acs*, encodes an acetate permease in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 185: 6448–6455.

Gosset, G., Zhang, Z., Nayyar, S., Cuevas, W., Saier, M. H. Jr., 2004. Transcriptome analysis of *crp*-dependent catabolite control of gene expression in *Escherichia coli*. J Bacteriol. 186: 3516-3524.

Kao, K., Tran, L., Liao, J., 2005. A Global Regulatory Role of Gluconeogenic Genes in *Escherichia coli* Revealed by Transcriptome Network Analysis. Biol. Chem. 280(43): 36079-36087.

Kumari, S., Beatty, C. M., Browning, D., F., Busby S., Simel, E., Hovel-Miner, G., Wolfe, A., J., 2000. Regulation of Acetyl Coenzyme A Synthetase in *Escherichia coli*. J.of Bacteriol. 182(15): 4173-4179.

Lengeler, J.,W., Drews, G., Schlegel, H.,G., 1999. Biology of Prokaryotes. Blackwell Science. N.Y.

Liao, J., Hou, S., Chao, Y., 1996. Pathway analysis, engineering, and physiological considerations for redirecting central metabolism. Biotechnol. Bioeng. 52: 129-140.

Negre, D., Oudot, C., Prost, J. F., Murakami, K., Ishihama, A., Cozzone, A. J., Cortay, J.C., 1998. FruR-mediated transcriptional activation at the ppsA promoter of *Escherichia coli*. J. Mol. Biol. 276(2):355-365.

Notley-McRobb, L., King, T., and Ferenci, T., 2002. rpoS mutations and loss of general stress resistance in *Escherichia coli* populations as a consequence of conflict between competing stress responses. J. Bacteriol. 184: 806-811.

Ogawa, T., Mori, H., Tomita, M., Yoshino, M., 2007. Inhibitory effect of phosphoenolpyruvate on glycolytic enzymes in *Escherichia coli*. Res. Microbiol., 158(2):159-63

Oh, M. K., Rohlin, L., Kao, K., Liao, J., 2002. Global expression profiling of acetate-grown *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 277:13175-13183.

Postma, P., Lengeler, W., Jacobson, G. R., 1993. Phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. Microbiol. Rev. 57: 543-594.

Postma, P., Lengeler, W., Jacobson, G. R., 1996 : Phosphoenol-pyruvate: carbohydrate phosphotransferase systems. In: "*Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Cellular and molecular biology", 2ª edición (F.C. Neidhart, ed.). American Society for Microbiology Press. Washington, D.C., pp. 1149-1173.

Ramseier, T., M., Negre, D., Cortay, J. C., Scarabel, M., Cozzone, A. J., Saier M. H. Jr., 1993. In vitro binding of the pleiotropic transcriptional regulatory protein, FruR, to the fru, pps, ace, pts and icd operons of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. J. Mol. Biol. 234(1): 28-44.

Ramseier T., M., Bledig S., Michotey V., Feghali R., Saier M., H., Jr., 1995. The global regulatory protein FruR modulates the direction of carbon flow in *Escherichia coli*. J. Mol. Microbiol. 16(6): 1157-69.

Romano, A. H., Saier, M. H. Jr., 1992. Evolution of the bacterial phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system. Section I. Physiological and organismic considerations, In R. P. Mortlock (ed.), Evolution of metabolic function. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla. pp. 143-170.

Sigala J. C. 2006 Estudio del metabolismo gluconeogénico en cepas de *E. coli* PTS- y PTS- Glc+. Instituto de Biotecnología, UNAM. (Tesis de Doctorado en preparación).

Schmid, H. G., 1992. The chemical basis of life, primera edición. Little, brown and company, Boston, USA, pp. 759-782.

Weber, H., Polen, T., Heuveling, J., Wendisch, V. F., Hengge, R., 2005. Genome-wide analysis of the general stress response network in *Escherichia coli*: sigmaS-dependent genes, promoters, and sigma factor selectivity. J Bacteriol. 187(5):1591-603.

Wei, B., Shin, S., LaPorte, D., Wolfe, Alan. J., Romeo, T., 1999. Global Regulatory Mutations in *csrA* and *rpoS* Cause Severe Central Carbon Stress in *Escherichia coli* in the Presence of Acetate. J. of Bacteriol., 6 (182): 1632-1640.

Wolfe, A. J., 2005. The acetate switch. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 69(1): 12–50.