



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUIMICAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA CELULAR Y BIOCATÁLISIS**

**METABOLISMO DE ACETATO EN CEPAS
DE ESCHERICHIA COLI PTS⁻ Y PTS⁻GLC⁺:
EVIDENCIA DE CICLOS INÚTILES Y DE
DIFERENTES ESTRATEGIAS DE UTILIZACIÓN
DE CARBONO.**

T E S I S
**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
DOCTOR EN CIENCIAS**

P R E S E N T A :

Q.A. Juan Carlos Sigala Alanis

DIRECTOR DE TESIS: Dr. Francisco Bolívar Zapata



CUERNAVACA, MORELOS 2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Francisco G. Bolívar Zapata.

Para la realización del presente trabajo se contó con el apoyo económico del CONACyT a través de los proyectos D43243Z y 44126, y de PAPIIT/DGAPA/UNAM a través del proyecto 205005-2.

Juan Carlos Sigala Alanis fue financiado económicamente para realizar estudios de posgrado con becas del CONACyT y de la DGEP/UNAM.

MIEMBROS DEL JURADO:

PRESIDENTE: Dr. Agustín López Munguía-Canales

SECRETARIO: Dr. Daniel Segura González

VOCAL: Dr. Sergio Encarnación Guevara

SUPLENTE: Dr. Baltazar Becerril Luján

SUPLENTE: Dr. Francisco Bolívar Zapata

A quienes han sido siempre importantes a lo largo de mi vida:

a mi Ili, a mi Mamá, a mi tío Gilberto, a mi hermano Rodrigo, al Maestro Carlos, a mis Abuelitos, a todos mis tíos, tías, primos, primas y sobrinos, y a la familia González Hernández.

A todos mis amigos y a mis compañeros del laboratorio.

GRACIAS.

AGRADECIMIENTOS.

Al Dr. Francisco Bolívar por brindarme la oportunidad de colaborar en su grupo de investigación. Sus enseñanzas y su ejemplo han sido invaluable para mi.

A los miembros del jurado, integrado por los Dres. Agustín López M., Daniel Segura, Sergio Encarnación y Baltazar Becerril, por sus valiosos comentarios que permitieron mejorar la presentación de este trabajo.

A mi comité tutorial, integrado por los Dres. Mario Soberón, Esperanza Martínez y Guadalupe Espín, ya que con sus aportaciones se hizo posible este trabajo.

Al Dr. Salvador Flores por enseñarme los primeros pasos en el andar del posgrado, y a concretar las ideas y el trabajo del laboratorio.

A la Dra. Noemí Flores, todas sus enseñanzas sirvieron siempre para formarme de la manera adecuada.

A los Dres. Guillermo Gosset, Alfredo Martínez, Adelfo Escalante, sus críticas constructivas y sus recomendaciones fueron fundamentales para guiar esta investigación.

A los M. en C. Ramón de Anda y Georgina Hernández por su invaluable ayuda.

A César Aguilar por su valiosa cooperación en este trabajo, y por aprender juntos.

A mis amigos y compañeros del laboratorio Bolívar-Gosset. Gracias por la amistad, la solidaridad y el buen ambiente de trabajo.

A Mercedes Enzaldo y Silvia Velázquez, su trabajo es un pilar en la realización de todos los trabajos del laboratorio.

A todos mis amigos del posgrado, en especial a Sandra, Eugenio, Tere, Melchy y Maruri.

A Sonia Caro y a Delia Caro por su oportuna ayuda cuando la necesité.

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

INDICE

1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT	3
3. INTRODUCCIÓN	4
4. ANTECEDENTES	6
4.1. Sistema PTS	6
4.1.1. Componentes de PTS	6
4.1.2. Represión catabólica	8
4.2. Importancia de los nodos de PEP y piruvato en el metabolismo central	10
4.2.1. Construcción de cepas PTS ⁻ y PTS ⁻ Glc ⁺	11
4.3. Estudio de las cepas PTS⁻ y PTS⁻Glc⁺ al crecer en glucosa	13
4.3.1. Caracterización fisiológica y bioquímica, y análisis de flujo de carbono por RMN	13
4.3.2. Estudio transcripcional por RT-PCR	15
4.3.3. Identificación de mutaciones en la cepa PB12 PTS ⁻ Glc ⁺ .	17
4.4. Relevancia del metabolismo gluconeogénico en cepas PTS⁻ y PTS⁻Glc⁺	19
4.5. Metabolismo gluconeogénico de acetato en <i>E. coli</i>	20
4.5.1. Importancia del acetato en el habitat de <i>E. coli</i>	20
4.5.2. Switch de acetato.	20
4.5.3. Excreción de acetato	21
4.5.4. Asimilación de acetato y gluconeogénesis.	23

4.5.5. Regulación del metabolismo de acetato	26
5. HIPÓTESIS	31
6. OBJETIVOS	32
6.1. Objetivo general	32
6.2. Objetivos particulares	32
7. MATERIALES Y MÉTODOS	33
7.1. Cepas bacterianas, plásmidos, medios de cultivo y condiciones de crecimiento	33
7.2. Medición de la concentración intracelular de AMPc	34
7.3. Extracción de RNA y síntesis de cDNA	35
7.4. PCR de tiempo real (RT-PCR)	36
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
8.1. La capacidad de crecimiento y la concentración de AMPc intracelular es diferente en ambas derivadas PTS ⁻ respecto a JM101, cuando crecen en acetato	38
8.2. Perfiles de transcripción de genes del metabolismo central en las cepas JM101, PB11 y PB12 al crecer en acetato	40
8.2.1. Genes gluconeogénicos y del ciclo del glioxalato	40
8.2.2. Genes glicolíticos	43
8.2.3. Genes del ciclo de TCA.	47
8.2.4. Genes involucrados en la síntesis de acetato	49
8.2.5. Genes de la vía de las pentosas fosfato	49
8.2.6. Genes que codifican para proteínas reguladoras	50
8.3. Efecto diferencial de las enzimas gluconeogénicas involucradas	

en la síntesis de PEP o piruvato en las cepas PTS ⁻ al crecer en acetato.	50
8.3.1. Inactivación del gen <i>ppsA</i>	51
8.3.2. Inactivación de los genes <i>maeB</i> y <i>sfcA</i>	53
8.3.3. Inactivación del gen <i>pckA</i>	55
8.4. Papel del gen <i>poxB</i> en el metabolismo de acetato de las cepas PTS ⁻	55
8.5. Caracterización fisiológica preliminar de una cepa de <i>E. coli</i> que crece a una elevada μ en acetato (cepa PB122)	56
9. CONCLUSIONES	59
10. PERSPECTIVAS	62
11. BIBLIOGRAFÍA	63
12. ARTÍCULOS PUBLICADOS	72
12.1. Artículo en el que Juan Carlos Sigala es primer autor.	72
12.2. Artículos en los que Juan Carlos Sigala es coautor.	85

INDICE DE FIGURAS.

Figura 1.

Sistema PTS en *Escherichia coli*

Página 7.

Figura 2.

Algunas de las reacciones involucradas en el nodo de PEP.

Página 11.

Figura 3.

Flujos de carbono determinados por RMN para las cepas JM101, PB11 y PB12.

Página 14.

Figura 4.

Esquematación del “switch de acetato” durante el crecimiento aerobio en medio mínimo suplementado con glucosa como única fuente de carbono.

Página 21.

Figura 5.

Esquema general de los efectos regulatorios de Cra en enzimas clave de glicólisis, gluconeogénesis, el ciclo de TCA, el ciclo del glioxalato y la vía de Entner-Doudoroff en *E. coli*.

Página 29.

Figura 6.

Esquema del metabolismo central con metabolitos clave y los genes y las proteínas involucrados en su transformación.

Página 42.

Figura 7.

Crecimiento y cointilización de acetato y glucosa en la cepa PB122.

Página 58.

INDICE DE TABLAS.

Tabla 1.

Velocidades de crecimiento (μ), transporte de (^{14}C)-glucosa (τ) y actividades enzimáticas específicas de glucocinasa (Glk), fosfoglucoisomerasa (Pgi) y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Zwf) en diferentes cepas de *E. coli*.

Página 13.

Tabla 2.

Niveles de transcripción relativa determinados por RT-PCR de varios grupos de genes de las cepas JM101, PB11 y PB12, en glucosa.

Página 16.

Tabla 3.

Cepas bacterianas utilizadas y generadas en este estudio.

Página 35.

Tabla 4.

Velocidades específicas de crecimiento (μ) de la cepa silvestre de *E. coli* JM101 y sus derivadas PTS⁻ en medio mínimo con acetato o glucosa como únicas fuentes de carbono.

Página 38.

Tabla 5.

Niveles de transcripción relativa determinados por RT-PCR de varios grupos de genes de las cepas JM101, PB11 y PB12 crecidas en acetato como única fuente de carbono.

Página 44.

Tabla 6.

Velocidades específicas de crecimiento (μ) y fases lag de las derivadas de las cepas PB11 PTS⁻, PB12 PTS⁻ Glc⁺ y JM101 en medio mínimo con acetato como única fuente de carbono.

Página 52.

1. RESUMEN.

El operón *ptsHlcr*, que codifica para el sistema de fosfotransferasa de transporte de hidratos de carbono (PTS), fue deletado de la cepa silvestre de *Escherichia coli* JM101 para generar la cepa PB11 (PTS⁻); esta derivada crece a una velocidad específica de crecimiento (μ) muy baja en glucosa como única fuente de carbono. A partir de PB11, por medio de un proceso de evolución adaptativa, se generó una mutante que recuperó parcialmente su capacidad de crecimiento en glucosa y se denominó PB12 (PTS⁻ Glc⁺); parte del fosfoenolpiruvato que no es empleado para el transporte de glucosa en PB12 puede ser dirigido hacia la síntesis de aminoácidos aromáticos haciendo uso de diversas estrategias de ingeniería de vías metabólicas. Los análisis de flujo de carbono y de medición de transcripción de genes específicos en las derivadas PTS⁻ evidenciaron un metabolismo gluconeogénico activo, aún creciendo en glucosa como fuente de carbono. En el presente trabajo se caracterizó el metabolismo gluconeogénico de las derivadas PTS⁻ en comparación con la cepa silvestre; para ello, se empleó acetato como única fuente de carbono. Se determinó que en este sustrato la cepa PB11 presenta un μ mayor que PB12 (0.21 y 0.13 h⁻¹, respectivamente), mientras que JM101 tiene un μ de 0.28 h⁻¹. Con el objeto de entender las diferencias en el crecimiento en acetato entre estas cepas, se compararon los perfiles de expresión de los genes del metabolismo central por medio de análisis de “PCR de tiempo real” (RT-PCR). Los resultados obtenidos demuestran que las cepas PTS⁻ consumen y metabolizan acetato a una menor velocidad con relación a la cepa silvestre, probablemente como resultado de tener concentraciones bajas de AMPc, que no son suficientes para inducir de manera apropiada ciertos

genes gluconeogénicos. Más aún, la sobreexpresión de genes glicolíticos en las cepas PTS⁻ aún creciendo en acetato, en particular en PB12, al parecer genera ciclos inútiles que afectan el crecimiento debido a la coexistencia del metabolismo glicolítico y gluconeogénico. Ambas cepas PTS⁻, en particular PB11, parecen reciclar carbono a través de la enzima PoxB, lo que no ocurre en la cepa silvestre JM101 al crecer a mayor velocidad en glucosa o en acetato. Por otra parte, la inactivación de ciertos genes gluconeogénicos como *ppsA*, *sfcA* y *maeB*, así como de *poxB*, demostró tener distinta repercusión en la adaptación y el crecimiento en acetato de estas cepas. Finalmente, se aisló y se caracterizó fisiológicamente una mutante (PB122) que presenta una velocidad de crecimiento en acetato inusualmente alta ($\mu = 1.0 \text{ h}^{-1}$).

2. ABSTRACT.

The *ptsHlcr* operon was deleted from *Escherichia coli* wild type JM101 to generate strain PB11 (PTS⁻). In a mutant derived from PB11 that partially recovered its growth capacity on glucose by an adaptive evolution process (PB12, PTS⁻Glc⁺), part of the phosphoenolpyruvate not used in glucose transport has been utilized for the synthesis of aromatic compounds. In this report, it is shown that on acetate as a carbon source, PB11 displayed a specific growth rate (μ) higher than PB12 (0.21 and 0.13 hr⁻¹, respectively) while JM101 had a μ of 0.28 hr⁻¹. To understand these growth differences on acetate, we compared the expression profiles of central metabolic genes by RT-PCR analysis. Obtained data revealed that some gluconeogenic genes were downregulated in both PTS⁻ strains as compared to JM101, while most glycolytic genes were upregulated in PB12 in contrast to PB11 and JM101. Furthermore, inactivation of gluconeogenic genes, like *ppsA*, *sfcA*, and *maeB*, and *poxB* gene that codes for pyruvate oxidase, has differential impacts in the acetate metabolism of these strains. Results indicate that growth differences on acetate in the PTS⁻ derivatives are due to potential carbon recycling strategies, mainly in PB11, and futile carbon cycles, especially in PB12. Finally, an *E. coli* mutant (PB122) that grows with an unusual high μ on acetate, was spontaneously obtained from PB12 derivative strain; the primary physiological characterization of this strain is also reported here.

3. INTRODUCCIÓN.

En *Escherichia coli* (*E. coli*), el sistema PTS consume más del 50% del fosfoenolpiruvato (PEP) que se deriva del catabolismo de glucosa [Holms, 1986], y sólo se destina un 4% de este metabolito hacia la vía de síntesis de aminoácidos aromáticos. Con el fin de aumentar la capacidad de producción de compuestos aromáticos en *E. coli*, en nuestro laboratorio se han construido cepas que carecen del sistema PTS pero que continúan siendo capaces de utilizar glucosa. Para este propósito, en la cepa silvestre de *E. coli* JM101 se deletó el operón *ptsHIcrr*, obteniendo la cepa PB11 (PTS⁻). Posteriormente, una mutante que recobra parcialmente su capacidad de crecimiento en glucosa, denominada PB12 (PTS⁻ Glc⁺), se obtuvo a través de un proceso de evolución adaptativa a partir de PB11 [Flores N. et al., 1996, 2005]. La implementación de estrategias adicionales de ingeniería de vías metabólicas en la cepa PB12, ha permitido la producción de aminoácidos aromáticos a partir de glucosa [Gosset et al., 1996; Baez et al., 2004].

El sistema PTS, además de tener una participación importante en el transporte y fosforilación de hidratos de carbono, está involucrado en la regulación del catabolismo de varios compuestos de carbono. Es por esto que, en cepas de *E. coli*, la ausencia del sistema PTS causa efectos pleiotrópicos [Postma et al., 1996]. Por otro lado, la cepa PB12 adquirió varias mutaciones como respuesta al proceso de evolución adaptativa en glucosa. Por todo esto, nuestro laboratorio ha estado interesado en el estudio del metabolismo central de carbono de estas cepas de *E. coli* PTS⁻ y PTS⁻ Glc⁺, a través de la caracterización fisiológica, bioquímica, a nivel de transcripción y de flujos de carbono. Parte de los resultados obtenidos, demostraron que genes gluconeogénicos como *acs*, *yjcG* (*actP*), *aceBAK*, *glcB*, *sfcA*, *ppsA* y *fbp*,

se sobreexpresan en ambas derivadas PTS⁻ en relación a la silvestre, aún creciendo en glucosa como única fuente de carbono [Flores N. et al., 2005]. Más aún, se ha establecido que las derivadas PTS⁻ son capaces de utilizar de manera simultánea glucosa y otras fuentes de carbono, entre ellas acetato, lo cual corrobora la coexistencia de los metabolismos glicolítico y gluconeogénico en estas cepas [Flores S. et al., 2005; Flores N. et al., 2005].

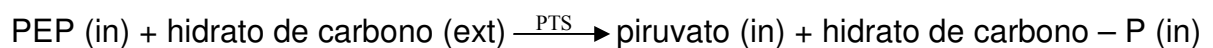
Por otro lado, en su ambiente natural, *E. coli* se encuentra expuesta a diferentes fuentes de carbono, incluyendo el acetato. Se ha determinado que, en presencia de este ácido orgánico como fuente de carbono, genes relacionados con el metabolismo de acetato y con funciones de gluconeogénesis, se sobreexpresan, mientras que otros se reprimen, como los genes glicolíticos [Oh et al., 2002; Polen et al., 2003]. Aunado a esto, se ha demostrado que el acetato puede interaccionar directamente con complejos de transcripción *in vitro* [Rosenthal et al., 2008].

Considerando el importante papel metabólico y de regulación que tiene el acetato, así como la evidencia de que las cepas PTS⁻ presentan un metabolismo gluconeogénico activo al crecer en glucosa, se estudió en este trabajo el metabolismo de acetato en las cepas PTS⁻ comparativamente con la cepa silvestre JM101. Para ello, se determinó la μ de estas cepas al crecer en acetato como única fuente de carbono y se llevaron a cabo análisis de transcripción de genes del metabolismo central. Además, se evaluó en las tres cepas de estudio, el efecto de inactivar ciertos genes sobre la capacidad de adaptación y crecimiento en acetato.

4. ANTECEDENTES.

4.1. Sistema PTS.

Las bacterias son capaces de utilizar una gran variedad de fuentes de carbono cuya traslocación a través de la membrana citoplásmica es catalizada por una variedad de sistemas de transporte específicos. Muchas bacterias necesitan adaptarse a los cambios continuos de su ambiente para poder competir con otros organismos por los limitados nutrientes disponibles. Las células poseen sensores moleculares que les permiten monitorear el ambiente y utilizar entre varias fuentes de carbono. Los sistemas PTS transportan y fosforilan un gran número de hidratos de carbono, y están involucrados en el movimiento de las células hacia esas fuentes de carbono (quimiotaxis), así como en la regulación de varias vías metabólicas. De esta forma, PTS funciona como transportador y como medio para sensor el medio ambiente bacteriano [Postma et al., 1996]. De manera general, PTS cataliza la siguiente reacción:



La fosforilación del hidrato de carbono está acoplada a su traslocación a través de la membrana citoplásmica; la energía para este proceso es obtenida de la hidrólisis del grupo fosfato de PEP.

4.1.1. Componentes de PTS.

La enzima I (EI) y la proteína de histidina (HPr) son proteínas citoplásmicas solubles que participan en la fosforilación de todos los hidratos de carbono PTS y han sido denominadas “proteínas generales de PTS” (fig. 1). Por otra parte, el conjunto de enzimas II (EII) son específicas para determinados hidratos de carbono; pueden ser proteínas unidas a membrana que contengan tres dominios (A, B y C),

como la de manitol (EII^{Mtl}), o estar constituidas de dos o más proteínas de las cuales al menos una está unida a membrana (p.ej. B y C) y una ser soluble (IIA o EIII), como en el par $IICB^{Glc}-IIA^{Glc}$ para glucosa (fig. 1).

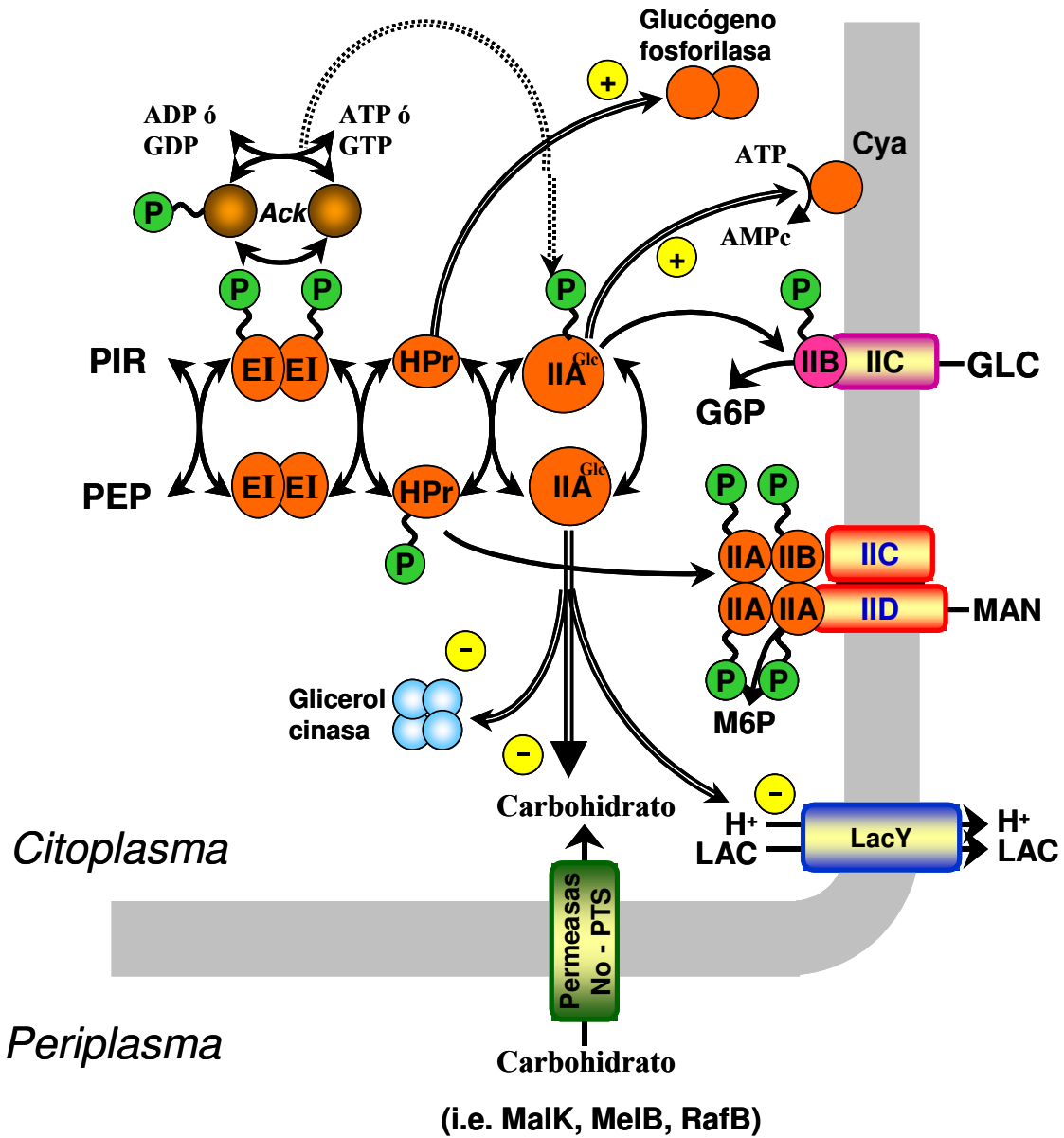


Figura 1. Sistema PTS en *Escherichia coli*. GLC, glucosa; LAC, lactosa; MAN, manosa.

En cualquier caso, el grupo fosfato es transferido de PEP hacia el hidrato de carbono, a través de los intermediarios fosforilados de EI, HPr, EIIA y EIIB. El dominio EIIC, que es la porción integral de membrana de EII, forma el canal de traslocación y presumiblemente el sitio de unión sustrato específico. Los componentes generales del sistema, EI (codificado por el gen *ptsI*), Hpr (codificado por *ptsH*), y el componente azúcar-específico EIIA^{Glc} (codificado por *crr*), el transportador de glucosa EIICB^{Glc} (codificado por *ptsG*), así como el complejo AMP cíclico (AMPC)–proteína receptora de AMPC (CRP), son miembros del modulón de represión catabólica que regula la actividad de muchos operones catabólicos y el transporte de hidratos de carbono. Los primeros tres genes están organizados en el operón *ptsHlcrr*, mientras *ptsG* se encuentra en otro locus. La expresión del operón *pts* se incrementa cerca de tres veces durante el crecimiento en sustratos PTS. Existen dos mecanismos de regulación involucrados, uno mediado por glucosa y una activación mediada por el complejo AMPC-CRP. Una mutación en cualquiera de los genes de este operón tiene efectos pleiotrópicos debidos a alteraciones en los niveles de cAMP, y una capacidad de crecimiento limitada en azúcares PTS y no-PTS [Postma et al., 1996].

4.1.2. Represión catabólica.

En *E. coli* y otras bacterias relacionadas, una fuente de carbono rápidamente metabolizable como la glucosa, inhibe la síntesis de enzimas involucradas en el metabolismo de otros compuestos carbonados. Este hecho involucra al menos cuatro fenómenos relacionados fisiológicamente pero diferentes en cuanto a su cinética y mecanismo, denominados: 1) represión permanente, 2) represión transitoria, 3) exclusión del inductor, y 4) expulsión del inductor. La represión permanente y la

transitoria se refieren a formas de represión de larga y corta duración que ocurren en respuesta a la adición de glucosa al medio de cultivo de un microorganismo; ambos fenómenos son independientes de la concentración citoplásmica de inductores. Por su parte, la exclusión y la expulsión del inductor, se refieren a la inhibición de la toma del inductor hacia la célula y la estimulación de la liberación del inductor del citoplasma, respectivamente. Desde el punto de vista fisiológico, estos cuatro fenómenos se engloban en el término “represión catabólica” debido a que causan la represión de la síntesis de ciertas enzimas en respuesta a la presencia de una fuente de carbono y de energía en el medio de cultivo [Saier, et al., 1996]. Muchas otras proteínas, además de las enzimas del catabolismo de carbono, como las involucradas en bioluminiscencia, fotosíntesis, esporulación, biosíntesis de antibióticos, biosíntesis de pigmentos, también están sujetas a represión catabólica [Postma, et al., 1996]. Diversos estudios han permitido reconocer en las bacterias entéricas, que el sistema PTS puede modular coordinadamente los niveles de AMPc y de inductores citoplásmicos de una forma fisiológica que describe los fenómenos de represión catabólica y de exclusión del inductor. Se ha propuesto un modelo de regulación de la adenilato ciclasa (Cya), enzima que transforma el ATP en AMPc, y de varias permeasas y enzimas catabólicas en bacterias entéricas (fig. 1). La proteína efectora, que se une a los sitios de control alostérico en las permeasas y enzimas blanco, es la enzima IIA^{Glc} del sistema PTS; esta proteína se fosforila a partir de PEP en reacciones consecutivas catalizadas por las enzimas I y HPr. El componente IIA^{Glc} fosforilado ($\text{IIA}^{\text{Glc}}\text{-P}$) activa alostéricamente a la enzima Cya, mientras que la forma desfosforilada IIA^{Glc} inhibe alostéricamente ciertas permeasas y enzimas catabólicas, como las permeasas de lactosa y maltosa, y la glicerol cinasa

(fig. 1). La desfosforilación de $\text{IIA}^{\text{Glc}}\text{-P}$ en respuesta a la presencia glucosa, da como resultado la inactivación coordinada de Cya (represión permanente) y la inhibición de las actividades de permeasas y enzimas catabólicas que generan los inductores intracelulares de varios operones catalíticos (exclusión del inductor). La reducción intracelular simultánea de AMPc y del inductor provoca un control dual sobre la transcripción de genes catabólicos; el AMPc actúa a través de CRP mientras que la respuesta a varios inductores es mediada al menos por tres tipos de factores de transcripción: represores, activadores y antiterminadores [Saier, et al., 1996].

4.2. Importancia de los nodos de PEP y piruvato en el metabolismo central.

Los nodos de PEP y de piruvato (Pyr) son clave en la fisiología de *E. coli* ya que estos metabolitos están involucrados directa o indirectamente en diversos procesos (fig. 2). El PEP se genera principalmente en la glicólisis y el mayor porcentaje de éste se transforma en piruvato por dos rutas: a) por el sistema PTS durante el transporte de glucosa (66%) y b) por las piruvato cinasas PykA y PykF (14%) [Holms, 1986]. La enzima PEP carboxilasa (Ppc) convierte aproximadamente un 16 % del PEP en oxaloacetato (OAA), uno de los intermediarios más importantes del ciclo de TCA. De esta forma, se estima que sólo una pequeña cantidad de PEP se dirige a la formación de aminoácidos aromáticos [Holms, 1986]. Puede generarse PEP a partir de OAA a través de la enzima PEP carboxicinasasa (Pck), en una reacción inversa a la catalizada por Ppc, y a partir de piruvato por la enzima PEP sintasa (PpsA). En condiciones aeróbicas, el Pyr se transforma principalmente en AcCoA por la piruvato deshidrogenasa, y sólo bajo condiciones especiales, la enzima PoxB transforma este

metabolito directamente en acetato con la concomitante reducción de quinonas en la membrana [Chang et al., 1999; Flores N. et al., 2004].

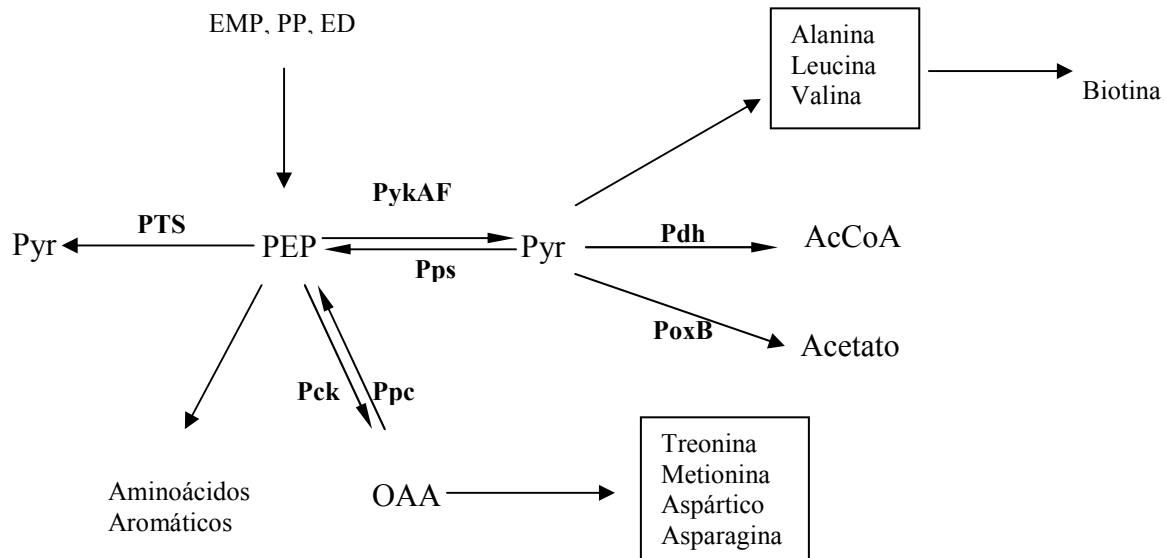


Figura 2. Algunas de las reacciones involucradas en el nodo de PEP. A partir de PEP se obtienen piruvato y OAA, que son a vez intermediarios en la biosíntesis de otros aminoácidos y vitaminas. Las abreviaturas y nombres de las enzimas y compuestos se pueden consultar en la tabla 2 y en la fig. 6.

4.2.1. Construcción de cepas PTS⁻ y PTS⁻ Glc⁺.

Si se tiene el interés de sobreproducir aminoácidos aromáticos, es claro que existe una restricción metabólica que limita la cantidad de PEP disponible para la síntesis de estos compuestos cuando *E. coli* utiliza glucosa como única fuente de carbono. Por esta razón, se han seguido diversas estrategias para aumentar la disponibilidad de PEP, entre ellas: a) la inactivación de las piruvato cinasas (PykA y PykF), b) la eliminación de la enzima Ppc, c) la sobreexpresión del gen *ppsA*, que codifica para la enzima PpsA que transforma el piruvato en PEP, y d) la eliminación del sistema PTS. Esta última estrategia es la que se ha seguido en nuestro laboratorio, ya que el no tener un sistema PTS activo duplicaría en teoría la disponibilidad de PEP para la biosíntesis de aminoácidos aromáticos. Para ello, se transdujo la delección

$\Delta(ptsHlcr):kan$ de la cepa TP2811 a la cepa silvestre de *E. coli* JM101 mediante el bacteriófago P1, obteniéndose la cepa denominada PB11 $\Delta(ptsHlcr):kan$ [Flores N. et al., 1996]. Como era de esperarse, la inactivación del operón *ptsHlcr* en *E. coli* disminuyó de manera importante el transporte de glucosa y la tasa de crecimiento (fenotipo PTS^-) [Flores N., 1995; Flores S. et al., 2002], por lo que las cepas PTS^- no son apropiadas para propósitos de producción. Se requieren seguir otras estrategias para incrementar la capacidad de transporte y utilización de glucosa en una mutante PTS^- ; una de ellas, fue la de aislar, a partir de una cepa PTS^- , una mutante que creciera a una mayor velocidad en medio mínimo con glucosa como fuente de carbono. Para ello, en nuestro laboratorio se desarrolló un proceso de evolución adaptativa en el que la cepa PB11 (PTS^-), alcanzó la fase estacionaria en un cultivo en lote, y posteriormente se implementó un sistema de cultivo continuo con diferentes tasas de dilución ($D = 0.4-0.8 \text{ h}^{-1}$) con tres tiempos de retención cada una. A partir de este experimento se aislaron cepas $PTS^- \text{Glc}^+$, entre ellas la cepa PB12 [Flores N., 1995, 1996]. Se ha demostrado que la cepa PB12 $PTS^- \text{Glc}^+$ es capaz de canalizar parte del PEP no utilizado en el transporte de glucosa hacia la síntesis de compuestos aromáticos cuando se incrementa la expresión de los genes *tktA* y *aroG^{fbr}* en multicopia [Flores N. et al, 1996; Báez et al, 2004, 2007; Gosset, 2005].

4.3. Estudio de las cepas PTS^- y $PTS^- \text{Glc}^+$ durante su crecimiento en glucosa.

4.3.1. Caracterización fisiológica y bioquímica, y análisis de flujo de carbono por RMN.

En medio mínimo con glucosa (2 g/l), la cepa PB12 recupera parcialmente su capacidad de crecimiento y de transporte de glucosa en relación a PB11 pero aún

está por debajo de los valores de la cepa silvestre JM101 (tabla 1) [Flores S. et al., 2002].

Tabla 1. Velocidades específicas de crecimiento (μ), transporte de ^{14}C -glucosa (τ) y actividades enzimáticas de glucocinasa (Glk), fosfoglucosa isomerasa (Pgi) y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Zwf) en diferentes cepas de *E. coli*.

Cepa	Fenotipo	μ^a	τ^b	Glk ^c	Pgi ^c	Zwf ^c	Pgi/Zwf
JM101	silvestre	0.71	20.0	57	1448	180	8.0
PB11	PTS ⁻	0.10	1.7	ND	134	136	0.9
PB12	PTS ⁻ Glc ⁺	0.42	10.3	127	5699	267	21.3

^a en h^{-1} , en medio M9 con 2 g/l de glucosa.

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

^c en $\text{mmol de sustrato producido glc min}^{-1} \text{ mg prot}^{-1}$.

ND – no determinado.

Se determinó que la cepa PB12 utiliza la permeasa de galactosa (GalP) y la glucocinasa (Glk) para transportar y fosforilar glucosa, respectivamente [Flores N. et al., 1996, 2002]. Las determinaciones de las actividades específicas de las enzimas involucradas en el nodo de la glucosa-6-fosfato, indican una mayor actividad de Glk, Pgi y Zwf en PB12 respecto a JM101 y PB11. Los valores de las relaciones de actividad Pgi/Zwf (tabla 1), sugerían un flujo glicolítico mayor para PB12 y menor para PB11 en relación a JM101 [Flores S. et al., 2002]. Lo anterior fue confirmado posteriormente en estudios de flujo de carbono por resonancia magnética nuclear (fig. 3), determinándose que el flujo glicolítico en PB12 aumentó a 93.1 % y disminuyó en PB11 a 40.3 %, en comparación con JM101 (76.6 %). En concordancia con estos valores, el flujo de carbono hacia la vía de las pentosas disminuyó en PB12 (5.3 %) y aumentó en PB11 (58.5 %), en relación a JM101 (22.3 %). Es notable en las cepas PTS⁻ el aumento significativo en el flujo de PEP a piruvato debido a las piruvato cinasas, lo que permite compensar en parte la ausencia de PTS. Por otro

lado, a nivel de TCA y de las reacciones anapleróticas, también se hallaron diferencias importantes; el flujo de OAA hacia citrato, se incrementó en PB11 (94%), mientras que en las otras dos cepas fue similar (aproximadamente 40%).

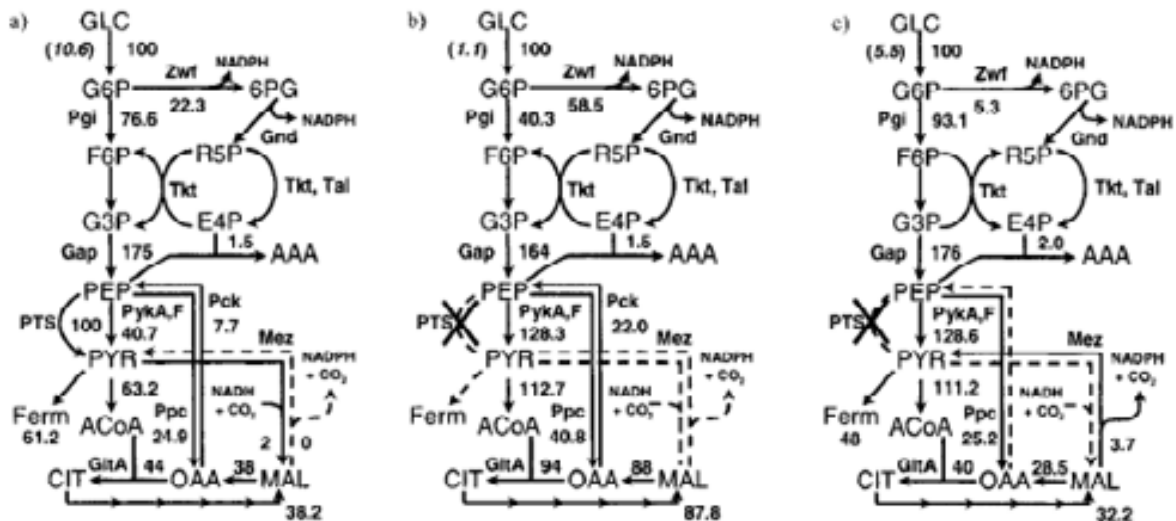


Figura 3. Flujos de carbono determinados por RMN para las cepas (a) JM101, (b) PB11 y (c) PB12. Los números representan los porcentajes molares de glucosa consumida en los nodos específicos. Los valores en *itálicas* y entre paréntesis representan el consumo de glucosa en mmol Glc / h x g biomasa. Las flechas indican la dirección principal del flujo de carbono y las líneas punteadas que el flujo es igual a cero o muy cercano a cero [Flores S. et al., 2002]. Las abreviaturas y nombres de las enzimas y compuestos se pueden consultar en la tabla 2 y en la fig. 6.

En la cepa silvestre, el principal intercambio entre metabolitos de glicólisis y TCA está mediado por Ppc y Pck, con un flujo de PEP a OAA de 24.9% y de OAA a PEP de 7.7%; en PB11 se siguen empleando ambas enzimas anapleróticas pero aumenta el flujo a 40.8% de PEP a OAA y a 22% para la reacción contraria. Al igual que JM101, PB12 mantiene el flujo mediado por Ppc (25.2 %) pero no así la conversión de OAA a PEP catalizado por Pck (flujo de 0%), el cual es suplido aparentemente por la aparición de flujo de malato a piruvato (4%); este último flujo no se detecta en las otras dos cepas. Finalmente, el flujo de piruvato a AcCoA, prácticamente duplicó su valor en PB11 y PB12, respecto a JM101; este resultado indicaba un probable

aumento en las capacidades gluconeogénicas y/o de reciclamiento de carbono en las cepas PTS⁻ a través de la actividad de las enzimas Pox-Acs (fig. 6, pag. 42), lo cual se corroboró posteriormente con estudios del nivel de expresión (ver abajo).

4.3.2. Estudio transcripcional por RT-PCR.

En el trabajo de Flores N. y colaboradores [2005], se analizó la expresión de genes del metabolismo central de carbono, de transporte e involucrados en procesos de regulación, cuando estas cepas crecen en glucosa. La tendencia observada es que varios genes glicolíticos, como *glk*, *pgi*, *gapA*, entre otros, se encuentran sobreexpresados en PB12 en relación a JM101 y PB11 (tabla 2). Además, prácticamente todos los genes de carácter gluconeogénico, como los genes *acs*, *sfcA*, *ppsA*, *fbp*, etc., se sobreexpresan, tanto en PB11 como en PB12, en comparación con JM101. Por otra parte, el alto flujo de piruvato a AcCoA encontrado anteriormente [Flores S. et al., 2002] pudo ser explicado al considerar la sobreexpresión tanto de *poxB* como de *acs* en las dos derivadas PTS⁻. Finalmente, en PB12 los genes que codifican para enzimas del ciclo de TCA se sobreexpresan respecto a JM101; esto implicaría una mayor capacidad energética y respiratoria en esta cepa en comparación con PB11.

4.3.3. Identificación de mutaciones en la cepa PB12 PTS⁻Glc⁺.

Una de las mutaciones identificadas inicialmente en la cepa PB12 fue la del gen *arcB*, en la que un residuo de Tyr cambió por uno de Cys en la posición 71, que corresponde a la segunda región transmembranal de la proteína codificada por este gen [Flores N. et al., 2004].

Tabla 2. Niveles de transcripción relativa determinados por RT-PCR de varios grupos de genes de las cepas JM101, PB11 y PB12, en glucosa.

Ruta, proceso o grupo de genes	Proteína para la que codifica	Niveles de expresión como $2^{\Delta\Delta Ct}$ con JM101 como valor de normalización 1.	
		PB11	PB12
a. Glicólisis			
<i>glk</i>	Glucocinasa	1.0 ± 0.032	2.2 ± 0.103
<i>pgi</i>	Fosfoglucosa isomerasa	1.0 ± 0.080	6.6 ± 0.282
<i>pfkA</i>	fosfofructocinasa	0.3 ± 0.040	0.5 ± 0.012
<i>fbpA</i>	Fructosa bifosfato aldolasa	0.9 ± 0.046	1.1 ± 0.052
<i>tpiA</i>	Triosa fosfato isomerasa	0.5 ± 0.034	1.8 ± 0.029
<i>gapA</i>	Gliceraldehído-3P deshidrogenasa	0.4 ± 0.151	1.7 ± 0.214
<i>pgk</i>	Fosfoglicerato cinasa	0.7 ± 0.001	1.2 ± 0.060
<i>gpmA</i>	Fosfoglicerato mutasa	0.9 ± 0.007	1.8 ± 0.039
<i>eno</i>	Enolasa	0.5 ± 0.169	0.5 ± 0.146
<i>pykA</i>	Piruvato cinasa A	0.4 ± 0.002	1.0 ± 0.045
<i>pykF</i>	Piruvato cinasa F	0.8 ± 0.010	0.9 ± 0.001
<i>aceE</i>	Piruvato deshidrogenasa (E1)	0.4 ± 0.025	1.4 ± 0.023
<i>aceF</i>	Piruvato deshidrogenasa (E2)	0.6 ± 0.022	1.2 ± 0.004
<i>lpd</i>	Piruvato deshidrogenasa (E3) (ver TCA)	1.1 ± 0.107	2.0 ± 0.128
b. Vía de las pentosas fosfato			
<i>zwf</i>	Glucose-6P-1-deshidrogenasa	0.7 ± 0.063	1.9 ± 0.175
<i>gnd</i>	6-fosfogluconato deshidrogenasa	0.8 ± 0.110	1.2 ± 0.069
c. Ciclo de los ácidos tricarboxílicos y el “shunt” de glioxalato			
<i>gltA</i>	Citrato sintasa	0.8 ± 0.083	1.3 ± 0.171
<i>acnB</i>	Aconitasa B	1.7 ± 0.364	1.7 ± 0.422
<i>aceB</i>	Malato sintasa A	15.6 ± 2.519	3.7 ± 0.308
<i>aceA</i>	Isocitrato liasa	11.9 ± 1.248	1.9 ± 0.225
<i>aceK</i>	Isocitrato deshidrogenasa fosfatasa/cinasa	5.5 ± 0.774	1.9 ± 0.255
<i>glcB</i>	Malato sintasa G	11.7 ± 1.417	3.7 ± 0.477
<i>icdA</i>	Isocitrato deshidrogenasa	1.0 ± 0.103	1.9 ± 0.003
<i>sucA</i>	2-oxoglutarato deshidrogenasa (E10)	1.4 ± 0.099	1.7 ± 0.068
<i>sucB</i>	Dihidrolipoamida succinato transferasa	0.8 ± 0.035	1.4 ± 0.086
<i>sucC</i>	SuccinilCoA sintetasa subunidad β	0.9 ± 0.072	1.6 ± 0.026
<i>sucD</i>	SuccinilCoA sintetasa subunidad α	1.0 ± 0.213	1.4 ± 0.302
<i>sdhA</i>	Succinato deshidrogenasa	0.9 ± 0.004	2.0 ± 0.278
<i>sdhB</i>	Succinato deshidrogenasa	0.8 ± 0.043	1.7 ± 0.027
<i>sdhC</i>	Succinato deshidrogenasa	1.3 ± 0.112	2.1 ± 0.593
<i>sdhD</i>	Succinato deshidrogenasa	0.9 ± 0.017	1.8 ± 0.052
<i>fumA</i>	Fumarasa A	3.3 ± 0.675	3.6 ± 0.673
<i>fumB</i>	Fumarasa B	0.8 ± 0.705	0.7 ± 0.365
<i>fumC</i>	Fumarasa C	4.3 ± 0.989	3.5 ± 1.482
<i>mdh</i>	Malato deshidrogenasa	1.2 ± 0.141	1.8 ± 0.520
d. Gluconeogénesis			
<i>actP</i>	Transportador de acetato	5.1 ± 0.455	7.2 ± 0.219
<i>acs</i>	AcCoA sintetasa	5.6 ± 0.745	8.0 ± 0.136
<i>sfcA</i>	Enzima málica	1.9 ± 0.332	1.7 ± 0.100
<i>maeB</i>	Enzima málica	1.2 ± 0.201	2.5 ± 0.032
<i>ppsA</i>	PEP sintasa	3.7 ± 0.216	2.4 ± 0.092
<i>pckA</i>	Piruvato carboxicinasa	0.8 ± 0.068	2.3 ± 0.026
<i>fbp</i>	Fructosa 1,6-bifosfatasa	2.4 ± 0.751	2.8 ± 0.138

Esta tabla muestra los niveles de transcripción relativos de diferentes grupos de genes involucrados en diferentes vías y procesos metabólicos. Los datos de esta tabla están reportados como valores de expresión relativa comparados al nivel de expresión de JM101 [Flores N, et al., 2005].

El sistema ArcAB se ha relacionado, junto con FNR, con la respuesta a adaptación en anaerobiosis, pues reprime genes del metabolismo aeróbico (del ciclo de TCA y del glioxalato, por ejemplo) y activa genes del metabolismo anaeróbico. Este sistema de dos componentes está formado por una proteína transmembranal que sensa el potencial redox del ambiente (codificada por *arcB*) y un regulador transcripcional (codificado por *arcA*). En anaerobiosis, ArcB se autofosforila y fosforila a ArcA, la cual forma un tetrámero para poder unirse a DNA [Jeon et al., 2001]; la unión de ArcA a sus secuencias blanco controla la expresión de numerosos operones involucrados en el metabolismo respiratorio y fermentativo. Se ha observado que aún en aerobiosis, existe un nivel basal de ArcA fosforilada, y si se elimina el gen *arcA*, se genera una ligera sobreexpresión de los genes reprimidos por este regulador [Luchi & Lin, 1992; Alexeeva et al., 2003; Perrenoud & Sauer, 2005]. En aerobiosis, las quinonas membranales estimulan la formación de puentes disulfuro intermoleculares en la región citosólica de ArcB, lo cual inhibe su actividad cinasa [Malpica et al., 2004]; incluso se ha detectado que en condiciones de oxidación, ArcB puede llegar a desfosforilar a ArcA-P *in vitro* [Georgellis et al., 1998]. Es posible que el nuevo residuo de Cys en la posición 71 de ArcB en PB12 genere un puente disulfuro entre dos moléculas ArcB y posiblemente “congele” la actividad cinasa; en un caso extremo, este puente disulfuro podría estimular la actividad desfosforilante de ArcB. De esta manera, el aumento en los niveles de transcripción en los genes de TCA en PB12 podría explicarse en parte por la desfosforilación de ArcA.

Por otra parte, también se ha detectado una mutación en el gen que codifica para el factor sigma RpoS, el cual está involucrado en la transcripción de varios genes que se expresan en fase estacionaria y/o en condiciones de estrés por limitación de

carbono. Esta mutación puntual genera un codón de paro lo cual produciría un péptido incompleto. Sin embargo, este cambio probablemente sea revertido en la cepa JM101 y sus derivadas, por la acción del producto del gen *supE*, el cual suprime codones de tipo ámbar [Flores N. et al., 2007]. De esta forma, se explicaría la expresión de genes dependientes de RpoS en PB12, no obstante no ser tan elevada esta expresión como ocurre en PB11. Por otro lado, se especula sobre la existencia de una mutación adicional en PB12 que sería responsable del elevado nivel de expresión de genes relacionados con el metabolismo de ppGpp [Flores N. et al., 2007].

Recientemente se empleó la técnica de secuenciación genómica comparativa de la empresa Nimblegen para encontrar alteraciones en la secuencia de PB12 en relación a JM101. Esto permitió identificar aproximadamente 31 mutaciones adicionales en esta cepa, ya sea de un aminoácido por otro, cambios en el marco de lectura o generación de codones de término. Dentro de esta serie de 31 genes mutados, seis están involucrados en regulación, cuatro son potenciales ORF's, cinco están relacionados con transporte, tres genes remanentes de profagos, uno con función en adaptación y 12 relacionados con el metabolismo del carbono. Existen al menos 7 genes que potencialmente son candidatos a colaborar en la regulación genética, *rssA*, *ypdA*, *barA*, *rpoD*, *arcB*, *rna* y *yjjU*. En cuanto a genes del metabolismo central, es de especial interés una mutación encontrada en el gen *actP*, que codifica para la permeasa de acetato; la importancia de estas mutaciones se encuentra actualmente en estudio.

4.4. Relevancia del metabolismo gluconeogénico en cepas PTS⁻ y PTS⁻Glc⁺.

El análisis de transcripción demostró que prácticamente todos los genes de carácter gluconeogénico se sobreexpresan en las derivadas PTS⁻ en relación a JM101 aún creciendo en glucosa como única fuente de carbono. Además, el notable incremento en el flujo de carbono entre piruvato y AcCoA, junto con la expresión elevada de los genes *poxB* y *acs* en las cepas PTS⁻, refleja un aumento en las capacidades gluconeogénicas y de reciclamiento de carbono en PB11 y PB12. Se determinó que en estas cepas PTS⁻ se consumen de manera simultánea glucosa y acetato sin presentar la característica diauxia observada en la cepa silvestre JM101 [Flores N. et al., 2005]. Más aún, esta co-utilización de sustratos incrementa la μ en ambas cepas, pasando PB11 de 0.1 a 0.3 h⁻¹ y PB12 de 0.4 a 0.48 h⁻¹. Por otra parte, un estudio reciente de transcripción, revela que en una cepa PB12 modificada para sobreproducir L-fenilalanina a partir de glucosa, los genes gluconeogénicos presentaron un aumento considerable en su nivel de expresión, respecto a los controles correspondientes [Báez et al., 2007].

Queda de manifiesto que las cepas PB11 y PB12 presentan capacidades glicolíticas y gluconeogénicas al crecer en glucosa. Sin embargo, no se ha estudiado el comportamiento de estas cepas en condiciones exclusivamente gluconeogénicas, como sería el crecerlas en acetato como única fuente de carbono.

4.5. Metabolismo gluconeogénico de acetato en *E. coli*.

4.5.1. Importancia del acetato en el habitat de *E. coli*.

La microbiota del colon humano es diversa y compleja, constituida por más de 50 géneros y 400 especies. Estos microorganismos normalmente forman biofilms para

adherirse a ciertos materiales intestinales y embeberse en la mucosa que recubre las células epiteliales del colon. La flora intestinal incluye un gran número de anaerobios pero también contiene algunos organismos facultativos, entre ellos *E. coli*, que mantienen el ambiente reducido necesario para los anaerobios estrictos. Algunos de estos anaerobios, esencialmente miembros de los géneros *Bifidobacterium* y *Bacteroides*, fermentan la fibra dietética a azúcares simples y ácidos grasos de cadena corta. Otro tipo de microorganismos anaerobios, principalmente *Peptostreptococcus* y *Fusobacterium*, así como ciertos organismos facultativos, como *Enterococcus* y *E. coli*, utilizan esos azúcares y ácidos grasos simples como fuente de carbono. Los ácidos grasos de cadena corta, como el acetato, el propionato o el butirato, constituyen aproximadamente dos tercios de la concentración aniónica del colon, siendo el acetato el más abundante de todos. Los azúcares acetogénicos en el colon provienen de la dieta, del metabolismo bacteriano o de la mucosa secretada por el huésped [Wolfe, 2005].

4.5.2. Switch de acetato.

A medida que las células bacterianas consumen del medio fuentes de carbono acetogénicas que les permiten un crecimiento rápido (por ejemplo D-glucosa o L-serina), dependen para su sobrevivencia de la capacidad de asimilar compuestos que originalmente fueron productos de desecho (como el acetato). Este cambio fisiológico, denominado “switch de acetato”, se presenta en el momento en que la asimilación de acetato iguala a su excreción (fig. 4), y evidentemente va acompañado de un “switch” a nivel molecular que exprese y active la maquinaria responsable de la asimilación de acetato [Wolfe, 2005].

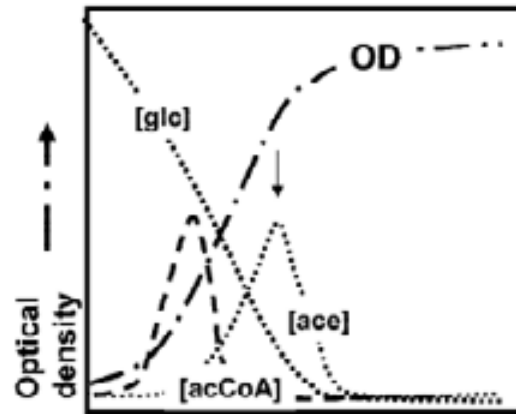


Figura 4. Esquematización del “switch de acetato” durante el crecimiento aerobio en medio mínimo suplementado con glucosa como única fuente de carbono. La flecha señala el instante fisiológico en que ocurre el switch de acetato. OD, densidad óptica. [glc] y [ace], concentraciones extracelulares de glucosa y acetato. [acCoA], concentración intracelular de acetil-CoA.

4.5.3. Excreción de acetato.

La excreción de acetato o acetogénesis puede ocurrir anaeróbicamente durante la fermentación ácido-mixta o en aerobiosis cuando el crecimiento en exceso de glucosa u otra fuente de carbono altamente asimilable, inhibe la respiración, comportamiento llamado “efecto Crabtree” [Mustea & Muresian, 2006]. A consecuencia del efecto Crabtree, aproximadamente 15% de la glucosa puede llegar a ser excretada como acetato. La producción aeróbica de acetato se ha considerado desde hace tiempo una cuestión de sobreflujo entre glicólisis y el ciclo de los ácidos tricarbónicos (TCA). Sin embargo, recientemente se ha propuesto que la excreción de este metabolito permite un rápido crecimiento en cultivos celulares de alta densidad al proveer de CoA a la enzima α -cetoglutarato deshidrogenasa del ciclo de TCA [El-Mansi, 2004]. La poza de CoA consiste primordialmente de la forma no esterificada (CoASH) y sus tioésteres AcCoA, succinil-CoA y malonil-CoA; la concentración intracelular de CoA es limitada y su composición responde rápidamente a la calidad y cantidad de la fuente de carbono. De esta forma, la

adición de glucosa incrementa los niveles de AcCoA y disminuye conforme las células asimilan el acetato previamente excretado (fig. 4). Este comportamiento correlaciona inversamente con el ciclo de TCA, el cual se reprime durante el crecimiento en glucosa y se induce fuertemente durante el crecimiento en acetato [Wolfe, 2005].

La descarboxilación oxidativa de piruvato en AcCoA es catalizada por el complejo de la piruvato deshidrogenasa (fig. 6 pag. 42) mientras que en anaerobiosis es la enzima piruvato formato liasa la que lleva a cabo esta transformación. Posteriormente, el Ac-CoA generado puede convertirse en acetato por efecto de las enzimas fosfotransacetilasa (Pta) y la acetato cinasa (AckA), generando dos moléculas de ATP por glucosa, teniendo al acetil fosfato como intermediario (fig. 6 pag. 42); estas reacciones son reversibles pero su afinidad por el acetato es muy baja (K_m en el orden de 7 a 10 mM) [Wolfe, 2005]. Por otro lado, el acetato también puede ser sintetizado a partir de la piruvato oxidasa (PoxB), enzima que cataliza la descarboxilación oxidativa del piruvato directamente a acetato; esta reacción produce CO_2 y reduce FAD en la membrana celular (fig. 6 pag. 42). Aparentemente, la enzima PoxB juega un papel importante en la fisiología bacteriana cuando las células crecen lento en glucosa, permitiendo la generación de ATP y el reciclamiento de carbono [Flores N. et al., 2004; 2005].

4.5.4. Asimilación de acetato y gluconeogénesis.

El acetato es un ácido débil de carácter lipofílico que permea libremente a través de la membrana celular en su forma acídica no dissociada (pK_a 4.6), pudiendo desacoplar el gradiente de pH transmembranal y ser tóxico. Una vez que cruza la

membrana, el acetato se disocia, libera un protón y acidifica el citoplasma, mientras que el anión aumenta la presión osmótica e interfiere en la biosíntesis de metionina [Roe et al., 2002]. Sin embargo, el acetato es parcialmente oxidado y por lo tanto puede ser utilizado como fuente de carbono y energía. De esta forma, a través del switch de acetato, *E. coli* tiene la capacidad de remover del medio este ácido potencialmente tóxico y consumirlo.

Dado que el acetato en su forma no disociada permea libremente a través de la membrana celular, su asimilación no requiere de un sistema de transporte específico. No obstante, bajo ciertas circunstancias, la asimilación de acetato parece ser saturable, sugiriendo la existencia de un sistema de transporte. Recientemente se ha reportado la existencia de una permeasa de acetato (ActP, antes YjcG) y se sugiere la existencia de al menos un segundo transportador [Gimenez et al., 2003]. De manera interesante, el gen *actP* junto con *acs*, forman parte de un mismo operón, lo que refuerza su importancia en el metabolismo de acetato. La utilización de acetato como fuente de carbono en *E. coli* es catalizada por la enzima Acs. Esta enzima convierte el acetato y una molécula de ATP en el intermediario acetiladenilato (acetil-AMP) liberando pirofosfato; este intermediario es muy estable y se encuentra unido a la enzima. Al parecer Acs es regulada por represión catabólica [Clark & Cronan, 1996]. Posteriormente, el acetil-AMP reacciona con CoASH para formar AcCoA, liberando AMP (fig. 6 pag. 42). La reacción es irreversible *in vivo* debido a la presencia intracelular de fosfatasas y por tanto funciona sólo anabólicamente; esta vía es considerada de alta afinidad (K_m por acetato de 200 μM), lo que le permitiría utilizar concentraciones muy bajas de acetato extracelular [Wolfe, 2005]. Como se

ha mencionado, la vía Pta-AckA es reversible y pudiera emplearse en la asimilación de acetato pero su afinidad por el acetato es baja (K_m 7-10 mM). Los niveles de estas enzimas en extractos de *E. coli* varían muy poco en diferentes fuentes de carbono, y la expresión de los genes *ackA* y *pta* no es inducida en acetato ni reprimida en glucosa [Clark & Cronan, 1996]. De hecho, análisis recientes de transcripción, muestran una sobreexpresión de los genes *acs* y *actP*, y una menor expresión de los genes *ackA* y *pta* cuando *E. coli* crece en acetato, en comparación a cuando crece en glucosa; lo anterior indicaría que Acs es la principal vía de asimilación de acetato [Oh et al., 2000]. Sin embargo, en condiciones aeróbicas, mutantes en cualquiera de los genes *ackA* y *pta* se ven seriamente impedidas a utilizar acetato como única fuente de carbono, y en glucosa, estas mutantes no incorporan acetato marcado [Brown et al., 1977]. Por su parte, la inactivación de *acs* provoca que las cepas resultantes crezcan pobremente en acetato aún teniendo la vía AckA-Pta funcional; las mutantes con los genes *ackA*, *pta* y *acs* inactivos, son totalmente incapaces de crecer en acetato [Kumari et al., 1995]. Estos resultados indican que las vías AckA-Pta y Acs son interdependientes, ya que la ausencia de una de ellas, teniendo la otra activa, limita el crecimiento de estas cepas en acetato. Es posible que la complementariedad de estas vías en el crecimiento de *E. coli* en acetato se deba a que Acs se emplea primordialmente para proveer de AcCoA a la célula en tanto que AckA puede generar el intermediario acetil-P. Varias funciones han sido propuestas para el acetil-P, entre ellas, la capacidad de donar su grupo fosfato de alta energía a proteínas de transporte del sistema PTS vía AckA, de manera alternativa al PEP. Otro papel propuesto para el acetil-P, es como señal

global del metabolismo energético, actuando quizá con los sistemas de transducción de señales de dos componentes dependiente de fosforilación [Clark & Cronan, 1996].

Para poder asimilar el acetato, ya sea por Acs o por la vía AckA-Pta, *E. coli* requiere posteriormente de: (1) el ciclo del glioxalato (CG), para abastecer intermediarios del ciclo de TCA, los cuales se emplean en la biosíntesis de aminoácidos y grupos hemo, y (2) la vía gluconeogénica para proveer de azúcares fosforilados. El efecto neto del CG es la formación de una molécula de ácido dicarboxílico a partir de dos moléculas de AcCoA. Empleando las enzimas isocitrato liasa y malato sintasa, el CG evita las dos etapas oxidativas del ciclo de TCA donde se pierde CO₂ (fig. 6 pag. 42); estas enzimas se inducen durante el crecimiento en acetato o en ácidos grasos [Clark & Cronan, 1996]. Al evitar la pérdida de dos átomos de carbono a expensas de la producción de energía, el CG permite la acumulación neta de precursores biosintéticos de cuatro carbonos (succinato) durante el crecimiento en sustratos de dos carbonos (acetato). Las células balancean la generación de energía y los requerimientos biosintéticos empleando mecanismos de control bioquímico y genético para dirigir el isocitrato a través del ciclo de TCA o del CG (ver adelante). Por otra parte, el crecimiento en acetato requiere también la formación de PEP para proveer a la célula de intermediarios de la vía glicolítica en un proceso denominado gluconeogénesis. La enzima PEP carboxinasa (PckA), descarboxila directamente el OAA para producir PEP a expensas de una molécula de ATP. Alternativamente, es posible producir PEP a partir de malato y piruvato por acción de las enzimas málicas y la PEP sintasa (PpsA) (fig. 6 pag. 42). La descarboxilación oxidativa del malato en piruvato, llevada a cabo por las enzimas

málicas, conlleva la reducción de los cofactores NAD o NADP, mientras que la generación de PEP por la enzima PpsA, depende del gasto de ATP.

La última etapa gluconeogénica, es la transformación de fructosa-1,6-difosfato en fructosa-6-fosfato por la enzima fructosa-1,6-difosfatasa (Fbp), reacción en la que se genera ATP.

4.5.5. Regulación del metabolismo de acetato.

En condiciones normales, la gluconeogénesis y la glicólisis se encuentran coordinadas de tal forma que en la célula una de estas vías está relativamente inactiva cuando la otra está activa. Si ambas vías se encontraran activas al mismo tiempo, el resultado neto sería la hidrólisis de 4 nucleótidos trifosfato por ciclo (2 ATP y 2 GTP). Tanto la gluconeogénesis como la glicólisis son altamente exergónicas bajo las condiciones celulares normales, de tal forma que no existe una barrera termodinámica para que actúen simultáneamente. Por ello, las cantidades y actividades de las enzimas exclusivas a cada vía están controladas para evitar que se encuentren activas simultáneamente. Por otro lado, existe un control a nivel genético sobre la utilización de las fuentes de carbono, además de que la velocidad con que proceden tanto la glicólisis como la gluconeogénesis, está también determinada por la concentración de glucosa y acetato, respectivamente [Berg et al., 2002].

La interconversión de fructosa-6-fosfato y fructosa-1,6-bifosfato está fuertemente controlada (fig. 5). La principal fosfofructocinasa de *E. coli*, PfkA, es una enzima alostérica activada por nucleótidos difosfato (ADP) e inhibida por PEP. *E. coli* cuenta con otra actividad menor de fosfofructocinasa, PfkB, la cual es inhibida por ATP. De manera contraria, la enzima fructosa-1,6-bifosfatasa (Fbp), se emplea para formar

fructosa-6-fosfato a partir de fructosa-1,6-bifosfato en condiciones gluconeogénicas, y es sensible a inhibición por AMP [Fraenkel, 1996]. De esta forma, un elevado nivel de AMP o ADP es indicativo de que el nivel energético de la célula es bajo y señala la necesidad de generar ATP. De manera contraria, altos niveles de ATP o PEP indican que el nivel energético es alto y que los intermediarios biosintéticos son abundantes, apagándose la glicólisis y promoviéndose la gluconeogénesis [Berg et al., 2002].

La interconversión de PEP y piruvato también está regulada de manera precisa. Las dos piruvato cinasas de *E. coli* difieren cinéticamente, estructuralmente y en su forma de regulación. PykF se activa alostéricamente por fructosa-1,6-bifosfato mientras que PykA se activa principalmente por AMP. De manera contraria, la enzima PEP sintasa (PpsA) se inhibe por PEP y OAA. Dado que la relación PEP–piruvato se ve afectada por las enzimas anapleróticas, es importante también considerar la regulación de estas enzimas. La enzima PEP carboxilasa (Ppc), que transforma el PEP en OAA, es activada por AcCoA y por la fructosa-1,6-bifosfato, e inhibida por aspartato. La reacción contraria, el paso de OAA a PEP, es catalizado por la enzima PEP carboxicinasa (PckA), la cual se inhibe normalmente por PEP [Fraenkel, 1996]. Por otra parte, las enzimas málicas, que catalizan la descarboxilación oxidativa de malato en piruvato, presentan una regulación diferencial; ambas se activan por malato pero la que es dependiente de NAD (SfcA) se activa por aspartato y se inhibe por CoA, mientras que la dependiente de NADP (MaeB) al parecer se inhibe por AcCoA [Sanwal et al., 1968].

Por otro lado, la regulación de la utilización de carbono se da también a nivel genético. En este sentido, se han reportado dos mecanismos globales de regulación

que intervienen en la glicólisis y la gluconeogénesis, el sistema de control CRP-AMPc y el ejercido por la proteína Cra [Saier & Ramseier, 1996]. Además, ciertos genes de nodos metabólicos importantes en estas vías, presentan mecanismos particulares de regulación transcripcional. Como se ha mencionado anteriormente, el complejo CRP-AMPc es el principal mecanismo de represión catabólica en bacterias entéricas [Fraenkel, 1996]. La transcripción de genes importantes en el metabolismo gluconeogénico se controlan positivamente por acción de CRP-AMPc, como es el caso de los operones *acsactP* y *aceBAK*, así como el gen *maeB*. Por su parte, se ha establecido que la proteína Cra aparentemente controla la dirección del flujo de carbono en *E. coli* y por ende influye en el grado de utilización de docenas de fuentes de carbono [Saier et al., 1996]. En presencia de los sustratos apropiados, Cra reprime la expresión de genes que codifican para enzimas glicolíticas y de la vía de Entner-Doudoroff, incluyendo algunos genes que codifican para componentes del sistema PTS, mientras que activa la expresión de genes que codifican para enzimas gluconeogénicas, del ciclo del glioxalato y del ciclo de TCA (fig. 5). Cepas de *E. coli* con el gen *cra* (antes *fruR*) inactivo, son incapaces de crecer con sustratos gluconeogénicos como única fuente de carbono. La proteína Cra forma parte de la familia LacI-GalR y reconoce una secuencia de DNA palindrómica imperfecta a la cual se une asimétricamente. Si el operador Cra precede al sitio de unión de la RNA polimerasa, activa la transcripción de los operones río abajo, pero si sobrelapa o está por delante del sitio de unión de la enzima RNA polimerasa, reprime la transcripción.

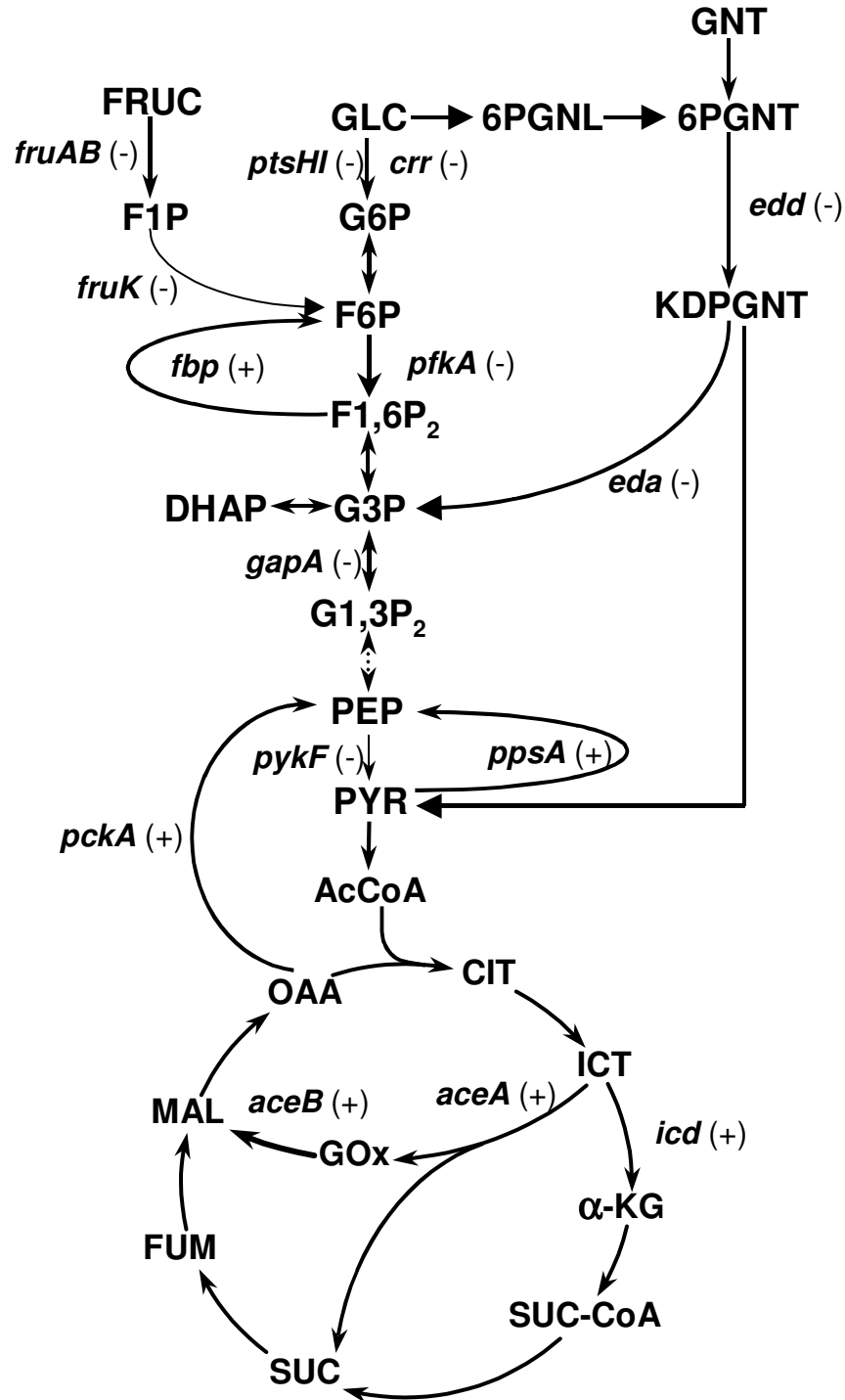


Figura 5. Esquema general de los efectos de regulación de Cra en enzimas clave de glicólisis, gluconeogénesis, el ciclo de TCA, el ciclo del glioxalato y la vía de Entner-Doudoroff en *E. coli*. Genes que son reprimidos por Cra se indican con (-), mientras que genes que son activados por Cra se indican con (+). Las abreviaturas y nombres de las enzimas y compuestos se pueden consultar en la tabla 2 y en la fig. 6.

Los efectos de Cra sobre la transcripción se contrarrestan por concentraciones micromolares de fructosa-1-fosfato y concentraciones milimolares de fructosa-1,6-bifosfato. De esta forma, los genes que son activados por Cra son sujetos a represión catabólica (por ejemplo *pckA*), mientras que genes que son reprimidos por Cra son sujetos a activación catabólica (como *pykF*). Este efecto metabólico se debe a que ciertos catabolitos, como fructosa-1-fosfato y fructosa-1,6-bifosfato, se unen a Cra y lo desplazan de los sitios operadores de operones que regula. Estos catabolitos están presentes en altas concentraciones durante el crecimiento en presencia de hidratos de carbono pero tienen una baja concentración durante el crecimiento en sustratos gluconeogénicos [Saier, 1996].

5. HIPÓTESIS.

La sobreexpresión de genes gluconeogénicos detectada en las cepas PTS⁻ y PTS⁻ Glc⁺ al crecer en glucosa, favorecerá la adaptación y el crecimiento de estas derivadas en medio mínimo con acetato como única fuente de carbono.

Se espera que bajo una condición de crecimiento gluconeogénica, como lo es crecer con acetato como única fuente de carbono, las cepas PTS⁻ y PTS⁻ Glc⁺ presenten diferencias entre sí y respecto a la cepa silvestre JM101, en sus perfiles de transcripción, y en su capacidad de adaptación y crecimiento al inactivar ciertos genes relacionados a este metabolismo.

6. OBJETIVOS.

6.1. Objetivo general.

Estudiar el metabolismo de acetato en cepas de *Escherichia coli* PTS⁻ y PTS⁻ Glc⁺.

6.2. Objetivos particulares.

- Determinar la velocidad específica de crecimiento (μ) en las cepas PTS⁻ al pasar de un medio mínimo con glucosa a uno con acetato.
- Cuantificar los niveles de AMPc intracelular en las cepas PTS⁻ y la cepa silvestre, al crecerlas en medio mínimo con acetato.
- Realizar perfiles de transcripción de genes del metabolismo central comparativamente entre las cepas PTS⁻ y la cepa silvestre, creciendo en medio mínimo con acetato.
- Determinar el efecto de las inactivaciones de los genes gluconeogénicos *maeB*, *sfcA*, *ppsA* y *pckA*, y del gen *poxB*, que codifica para la piruvato oxidasa, en la adaptación (fase lag) y la μ de las cepas PTS⁻ en acetato.
- Caracterización fisiológica preliminar de una cepa mutante PTS⁻ Glc⁺ que crece a una μ inusualmente alta en acetato.

7. MATERIALES Y MÉTODOS.

7.1. Cepas bacterianas, plásmidos, medios de cultivo y condiciones de crecimiento.

Las cepas de *Escherichia coli* utilizadas en este trabajo se enlistan en la tabla 3; las cepas JM101, PB11 y PB12 han sido descritas previamente [Flores N. et al., 1996, 2005]. Los genes *maeB* y *sfcA*, clonados en un vector pTOPO, se interrumpieron *in vitro* mediante la inserción de un gen que confiere resistencia al antibiótico cloramfenicol y que se encuentra flanqueado por dos sitios *loxP* paralelos (*cat-lox*) [Palmeros et al., 2000]; los productos de PCR de estos genes interrumpidos se utilizaron para generar las mutantes correspondientes en las tres cepas siguiendo el método descrito por Datsenko & Wanner [2000]. Para la doble inactivación *maeB sfcA*, *cat-lox* fue removido de las mutantes *maeB* y se usó el producto de PCR *sfcA cat-lox* para generar la doble mutante como se ha descrito. Las secuencias de DNA de los oligonucleótidos empleados para amplificar los genes *maeB* y *sfcA* nativos e interrumpidos fueron: *maeB*, 5' CGC-CAC-GTT-GTG-GGC-AGG-GGC and 5' GGA-GAG-ATA-TTC-GCT-GTG-GTG-C; *sfcA*, 5' CTT-GAG-GCC-GAC-GCC-CTG-GCG-G and 5' GAG-ATT-TAT-TCG-CCA-CTA-CCC. Los genes *pckA* y *ppsA* también fueron interrumpidos por el método de Datsenko & Wanner [2000] usando oligonucleótidos previamente reportados [Oh et al., 2002]; todas las interrupciones fueron confirmadas por PCR (datos no mostrados). Las cepas con el gen *poxB* inactivo fueron anteriormente reportadas [Flores N. et al., 2004]. La cepa PB122 es una mutante espontánea obtenida a partir de la cepa PB12 *maeB::lox* sembrada en placas de medio mínimo con acetato de sodio (3 g/l). Para preparar los inóculos, las cepas almacenadas a – 72°C en glicerol fueron inoculadas en medio LB y las células fueron

transferidas a medio mínimo M9 con glucosa (2 g/l). Cuando los cultivos alcanzaron una concentración residual de glucosa entre 0.3 y 0.1 g/l, fueron inoculados en medio mínimo fresco M9 con acetato de sodio (3 g/l) pre calentado a 37 °C, comenzando con una densidad óptica a 600 nm (DO_{600}) de aproximadamente 0.08. Las concentraciones de glucosa residual fueron medidas con el sistema de monitoreo de glucosa en sangre Accu-Chek (Roche). Las mediciones de densidad óptica se llevaron a cabo empleando un fotocolorímetro Klett/Summerson modelo 800-3. Cuando fue requerido, se adicionó al medio mínimo con acetato, alanina, AMPc o ribosa a una concentración final de 0.5 g/l, 10 mM y 0.01 g/l, respectivamente. Todas las μ presentadas en las tablas 4 y 6 son el promedio de los valores de al menos dos cultivos independientes, cada uno con su duplicado. Los cultivos para aislamiento de RNA se hicieron por triplicado y se crecieron en fermentadores de 1 l en medio M9 suplementado con 3 g/l de acetato de sodio, a 37°C, 600 rpm y una tasa de flujo de aire de 1 vvm, iniciando con una DO_{600} de 0.05; las muestras se colectaron en la fase logarítmica a una DO_{600} de 0.5.

7.2. Medición de la concentración intracelular de AMPc.

El contenido de AMPc en extractos celulares, fue determinado empleando el kit cAMP 3H Assay System, de la compañía Amersham-Pharmacia Biotech. Para ello, las células fueron crecidas en medio mínimo con acetato como se ha descrito y después de alcanzar una DO_{600} de 0.5, se centrifugaron 25 ml de cultivo y el pellet fue resuspendido en buffer de ensayo (50 mM Tris, 4 mM EDTA, pH 7.5).

Posteriormente las células fueron hervidas por 15 minutos y centrifugadas para remover los restos celulares. El sobrenadante se empleo en la determinación de AMPc de acuerdo con las instrucciones del kit.

Tabla 3. Cepas bacterianas utilizadas y generadas en este estudio.

Cepa	Genotipo	Referencias
<i>E. coli</i> JM101	F' <i>traD36 proA⁺ proB⁺ lacI^q</i> <i>lacZ</i> ΔM15/ <i>supE thi</i> Δ(<i>lac-proAB</i>)	Bolívar et al., 1977
PB11	JM101 Δ(<i>ptsH, ptsI, crr</i>):: <i>kan</i>	Flores N. et al., 1996
PB12	PB11, PTS ⁻ Glc ⁺	Flores N. et al., 1996
JM101 <i>maeB</i>	JM101 <i>maeB</i> :: <i>lox</i>	Este trabajo
JM101 <i>sfcA</i>	JM101 <i>sfcA</i> :: <i>lox</i>	Este trabajo
JM101 <i>maeB, sfcA</i>	JM101 <i>maeB</i> :: <i>lox, sfcA</i> :: <i>cat</i>	Este trabajo
JM101 <i>pckA</i>	JM101 <i>pckA</i> :: <i>cat</i>	Este trabajo
JM101 <i>ppsA</i>	JM101 <i>ppsA</i> :: <i>cat</i>	Este trabajo
PB11 <i>maeB</i>	PB11 <i>maeB</i> :: <i>lox</i>	Este trabajo
PB11 <i>sfcA</i>	PB11 <i>sfcA</i> :: <i>lox</i>	Este trabajo
PB11 <i>maeB, sfcA</i>	PB11 <i>maeB</i> :: <i>lox, sfcA</i> :: <i>cat</i>	Este trabajo
PB11 <i>pckA</i>	PB11 <i>pckA</i> :: <i>cat</i>	Este trabajo
PB11 <i>ppsA</i>	PB11 <i>ppsA</i> :: <i>cat</i>	Este trabajo
PB12 <i>maeB</i>	PB12 <i>maeB</i> :: <i>lox</i>	Este trabajo
PB12 <i>sfcA</i>	PB12 <i>sfcA</i> :: <i>lox</i>	Este trabajo
PB12 <i>maeB, sfcA</i>	PB12 <i>maeB</i> :: <i>lox, sfcA</i> :: <i>cat</i>	Este trabajo
PB12 <i>pckA</i>	PB12 <i>pckA</i> :: <i>cat</i>	Este trabajo
PB12 <i>ppsA</i>	PB12 <i>ppsA</i> :: <i>cat</i>	Este trabajo
PB122	Mutante espontánea derivada de PB12 <i>maeB</i> :: <i>lox</i>	Este trabajo

7.3. Extracción de RNA y síntesis de cDNA.

La extracción de RNA total se llevó a cabo mediante el método de fenol caliente equilibrado en agua. Después de las extracciones, el RNA se precipitó con una mezcla de acetato de sodio 3M y etanol, y se centrifugó a 20,000 x g a 4 °C. Se desechó el sobrenadante y el RNA se resuspendió en agua. El RNA total se trató con DNAsa, se cuantificó cuidadosamente por absorbancia a 260/280 nm y su integridad se verificó en geles de agarosa al 1.2%. El cDNA se sintetizó por el método de síntesis de primera cadena de DNA, utilizando primeros específicos descritos

anteriormente [Flores N. et al, 2005]. Este cDNA se usó como templado para los ensayos de RT-PCR.

7.4. PCR de tiempo real (RT-PCR).

El PCR de tiempo real se realizó con el ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Perkin-Elmer/Applied Biosystems), utilizando el kit SYBR Green PCR Master Mix (Perkin-Elmer/Applied Biosystems). Las condiciones de amplificación fueron 10 min a 95°C, un ciclo de dos pasos a 95°C por 15 s y 60°C por 60 s en un total de 40 ciclos. Los primeros para la amplificación específica se diseñaron con el programa Primer Express software (PE Applied Biosystems), y fueron reportados anteriormente [Flores N. et al., 2005]. El tamaño de todos los amplímeros fue de 101 pb. La concentración final de los primeros, en un total de 15 µl, fue 0.2 µM. Se agregaron 5 ng de cDNA a cada reacción. Todos los experimentos se realizaron por triplicado para cada gen de cada cepa. Se incluyó siempre un control sin templado y con la mezcla de reacción para cada gen. La técnica de cuantificación utilizada para analizar los datos fue el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ descrito por Livak & Shmittgen (2001).

Todos los datos se normalizaron utilizando el gen *ihfB* como control interno, con el fin de ajustar la concentración de cDNA de las muestras. Esto debido a que se detectó el mismo nivel de expresión de este gen en todas las cepas en las condiciones de crecimiento del estudio. El gen *ihfB* (“housekeeping gene”) codifica para la proteína reguladora IhfB. Para cada gen analizado en todas las cepas, el nivel de transcripción del gen de la cepa silvestre JM101 se consideró con un valor de 1.0, y fue usado como control para normalizar los datos. Por lo tanto, los datos están reportados como valores de expresión relativa, comparados al nivel de

expresión de JM101. Los resultados presentados en la tabla 5 y la figura 6, son los promedios de al menos tres mediciones independientes de RT-PCR de los valores de expresión obtenidos para cada gen. Estos valores se obtuvieron a partir de cDNAs generados de muestras de al menos dos bioreactores independientes. Los valores de expresión obtenidos por RT-PCR para cada gen difieren en menos del 30%.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

8.1. La capacidad de crecimiento y la concentración de AMPc intracelular es diferente en ambas derivadas PTS⁻ respecto a JM101, cuando crecen en acetato.

En la tabla 4 se presentan las μ 's de las cepas PTS⁻ y JM101, al crecer en medio mínimo con acetato, y se comparan con las obtenidas en glucosa. La cepa PB12, que es la derivada PTS⁻ que parcialmente había recuperado su velocidad de crecimiento en glucosa, reduce significativamente su μ en acetato en comparación con las otras dos cepas. En contraste, la cepa PB11, que crece lentamente en glucosa, tiene una μ en acetato sólo 25 % menor que la silvestre JM101.

Tabla 4. Velocidades específicas de crecimiento (μ) de la cepa silvestre de *E. coli* JM101 y sus derivadas PTS⁻ en medio mínimo con acetato o glucosa como únicas fuentes de carbono. Se muestran los valores promedio de al menos tres experimentos independientes, cada uno por duplicado. Las diferencias entre los valores de cada cepa son menores al 10%.

Cepa	μ en acetato (h ⁻¹)	% de μ en acetato vs. JM101	μ en glucosa (h ⁻¹)	% de μ en glucosa vs. JM101
JM101	0.28	100	0.71	100
PB11 (PTS ⁻)	0.21	75	0.10	14
PB12 (PTS ⁻ Glc ⁺)	0.13	46	0.42	59

Se ha reportado que la proteína IIA^{Glc}-P (fosforilada), activa a la enzima (Cya), la cual transforma el ATP en AMPc [Postma et al., 1996]. El complejo conformado por la proteína CRP y el AMPc, activa la transcripción de varios genes gluconeogénicos como *acs*, *actP*, *aceBAK* y *maeB* [Gosset et al., 2004]. Es posible que en PB11 y PB12, la producción de AMPc se reduzca como consecuencia de no tener al componente IIA^{Glc} de PTS. Para comprobar lo anterior, se determinaron las concentraciones intracelulares de AMPc en las tres cepas al crecer en acetato, y

como se esperaba, JM101 tiene cantidades mayores (30 pmol cAMP/mg proteína) que las cepas PB11 y PB12 (6 y 7.5 pmol cAMP/mg proteína, respectivamente). Estos resultados indican que ambas derivadas PTS⁻ probablemente crecen a una menor μ en acetato debido a que producen menos AMPc que la cepa silvestre, lo cual no permitiría la expresión adecuada de genes gluconeogénicos dependientes de CRP-AMPc en las derivadas PTS; lo anterior se corroboró con los análisis de expresión (ver adelante).

De manera interesante, la adición de AMPc (10 mM) al medio mínimo con acetato, ejerce un efecto positivo sólo en el crecimiento de PB12, mientras que en JM101 y PB11 se reduce la μ de un 20-30% al adicionar este compuesto (tabla 6, pag. 52). Es claro que en acetato, PB11 tiene una μ mayor que PB12 produciendo prácticamente la misma cantidad de AMPc (tabla 4). Es posible que la sobreexpresión de ciertos genes glicolíticos en la cepa PB12, pero no en JM101 y PB11 (ver más adelante), reduzca su μ en acetato. De esta forma, el adicionar AMPc al medio, probablemente permite a PB12 incrementar la expresión de ciertos genes gluconeogénicos y contrarrestar la sobreexpresión de genes glicolíticos, reflejándose en una μ mayor (tabla 6); esto no ocurriría ni en JM101 ni en PB11.

Por otro lado, las regiones reguladoras y codificantes de los genes *cya* y *crp* en PB12 se han secuenciado previamente y no se ha observado ningún cambio [Flores N. et al., 2005]. Finalmente, como se ha mencionado, las cepas PTS⁻ al crecer en glucosa sobreexpresan varios genes cuya transcripción depende de la acción del complejo AMPc-CRP [Flores N. et al., 2005]. Lo anterior podría ser indicio de una

actividad basal de Cya que produce cierta cantidad de AMPc en estas cepas al crecer en glucosa.

8.2. Perfiles de transcripción de genes del metabolismo central en las cepas JM101, PB11 y PB12 al crecer en acetato.

Se determinaron los niveles de expresión de varios genes del metabolismo central en estas cepas buscando correlacionarlos con su capacidad de crecimiento en acetato.

8.2.1. Genes gluconeogénicos y del ciclo del glioxalato.

El análisis de transcripción por RT-PCR muestra que algunos genes gluconeogénicos importantes como *actP*, *acs*, *maeB* y *pckA*, tienen un nivel de expresión menor en PB11 y PB12 respecto a JM101 (fig. 6, tabla 5). La acetato permeasa (ActP), codificada por el gen *actP*, se encuentra involucrada en el transporte de acetato [Giménez et al., 2003]. Una vez dentro de la célula, el acetato puede ser transformado en AcCoA por la AcCoA sintetasa (Acs) o por la vía de la fosfotransacetilasa (Pta) - acetato cinasa (AckA) (fig. 6). La enzima Acs convierte el acetato, el ATP y la coenzima A (CoA-SH) en AcCoA y AMP (fig. 6); esta reacción es irreversible *in vivo* y funciona sólo anabólicamente [Wolfe, 2005]. Los genes *acs* y *actP* forman parte del mismo operón, el cual es activado por el complejo AMPc-CRP [Beatty et al., 2003; Gosset et al., 2004]. Como se mencionó, las cepas PB11 y PB12 tienen menores concentraciones de AMPc en acetato en comparación con JM101 y este hecho pudiera ser responsable del bajo nivel de transcripción del operón *acsactP* en las derivadas PTS⁻. Lo anterior es relevante porque las enzimas ActP y Acs conforman una vía importante de asimilación de acetato en *E. coli* [Wolfe, 2005], mientras que la expresión de *ackA* y *pta* se mantienen constantes (tabla 5). En una

cepa silvestre que crece en acetato, existe una fuerte expresión del operón *acsactP* debido a que no hay glucosa que ejerza represión catabólica [Oh et al., 2000].

Por otra parte, en *E. coli* existen dos rutas gluconeogénicas que canalizan esqueletos de carbono provenientes del ciclo de (TCA) hacia PEP, 1) la transformación directa del OAA por la enzima PckA codificada por el gen *pckA* y, b) la transformación de malato en piruvato por las enzimas málicas, SfcA y MaeB, y la subsecuente conversión del piruvato en PEP por la enzima PpsA [Hansen & Juni, 1975; 1979]. En PB11, el gen *pckA* tiene un nivel de expresión muy bajo mientras que en PB12 no cambia respecto a la silvestre (fig. 6, tabla 5). El gen *ppc*, que codifica para la enzima PEP carboxilasa (Ppc) que cataliza la reacción inversa a la de PckA, presenta el mismo nivel de expresión en acetato en las tres cepas (fig. 6, tabla 5). En cuanto a la expresión de los genes que conforman la segunda vía gluconeogénica posible, el gen *maeB* presenta un nivel de expresión menor en ambas derivadas PTS⁻ en comparación con JM101, mientras que el gen *sfcA* no cambia su expresión significativamente. En *E. coli* los genes *maeB* y *sfcA* son reprimidos por glucosa en un fondo genético silvestre [Gosset et al., 2004; Murai et al., 1971]; la expresión de *maeB* es activada por CRP mientras *sfcA* parece expresarse constitutivamente [Gosset et al., 2004]. Nuevamente, la menor expresión del gen *maeB* en las cepas PTS⁻ en relación a JM101, puede asociarse a la baja concentración de AMPc en estas cepas. Con esta información, se propone que el decremento en la μ en las cepas PTS⁻ en contraste con la cepa silvestre JM101, es el resultado, al menos en parte, de una disminución en el nivel de expresión del operón *acsactP* y de los genes *maeB* y *pckA* (este último sólo en el caso de PB11).

Figura 6. Esquema del metabolismo central con metabolitos clave y los genes y las proteínas involucrados en su transformación. Los valores de RT-PCR de genes sobreexpresados 1.6 veces o más (números positivos) y de genes reprimidos 1.6 veces o menos (números negativos) se muestran junto a cada gen entre paréntesis para la cepa PB12 PTS⁻Glc⁺ y entre paréntesis y subrayados para la cepa PB11 PTS⁻, cuando crecen en acetato como fuente de carbono. Las abreviaturas son las siguientes: glucosa (GLC), glucosa-6-fosfato (G6P), fructosa-6-fosfato (F6P), fructosa-1,6-fosfato (F1,6P), dihidroxi-acetona fosfato (DHAP), gliceraldehído-3-fosfato (G3P), gliceraldehído-1,3-fosfato (G1,3P), 3-fosfoglicerato (3PG), 2-fosfoglicerato (2PG), fosfoenolpiruvato (PEP), piruvato (PYR), acetato (Ace), acetil-CoA (AcCoA), acetil-fosfato (Ac-P), acetil-AMP (A-AMP), citrato (CIT), isocitrato (ICT), glioxalato (GOx), α -cetoglutarato (α -KG), succinil-coenzima A (SUC-CoA), succinato (SUC), fumarato (FUM), malato (MAL), oxaloacetato (OAA), 6-fosfogluconolactona (6PGNL), 6-fosfogluconato (6PGNT), ribulosa-5-fosfato (RU5P), ribosa-5-fosfato (R5P), xilulosa-5-fosfato (X5P), pseudoheptulosa-7-fosfato (S7P), eritrosa-4-fosfato (E4P), 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato (KDPGNT), 3-desoxi-D-arabino-heptulosonato-7-fosfato (DAHP).

Otros genes importantes en el metabolismo gluconeogénico, como los genes del ciclo del glioxalato (CG) (*aceB* y *aceA*), *ppsA* y *fbp*, presentan el mismo nivel de expresión en ambas cepas PTS⁻ en comparación con JM101 (fig. 6, tabla 5).

8.2.2. Genes Glicolíticos.

En PB12 prácticamente todos los genes de la vía glicolítica se encuentran sobreexpresados, mientras que en PB11 sólo algunos presentan este comportamiento, en relación a JM101 (fig. 6, tabla 5). Dada la reversibilidad de la mayor parte de las reacciones de esta vía, la relevancia fisiológica de la sobreexpresión de estos genes dependerá de varios factores, entre ellos, la concentración intracelular de los metabolitos, la cual influiría en el sentido que tomen las reacciones. Sin embargo, las reacciones glicolíticas irreversibles catalizadas por PykF y PfkB pudieran ser importantes en la definición del fenotipo de PB12 en acetato, ya que contrarrestan las reacciones gluconeogénicas irreversibles catalizadas por PpsA y Fbp, respectivamente (fig. 6). La enzima PykF transforma el PEP en piruvato liberando ATP; en acetato, el gen *pykF* se sobreexpresa significativamente en PB12 y ligeramente en PB11 respecto a JM101 (tabla 5). De esta forma, la posible actividad de PykF transformaría parte del PEP en piruvato,

Tabla 5. Niveles de transcripción relativa determinados por RT-PCR de varios grupos de genes de las cepas JM101, PB11 y PB12 crecidas en acetato como única fuente de carbono

Genes	Niveles de expresión como $2^{-\Delta\Delta CT}$ (valores positivos) o $1/2^{-\Delta\Delta CT}$ (valores negativos) con JM101 como valor de normalización 1			
	PB11		PB12	
a) Gluconeogénesis y ciclo del glioxalato				
<i>aceA</i>	-1.07	(± 0.05)	-1.10	(± 0.31)
<i>aceB</i>	nd		-1.07	(± 0.23)
<i>acs</i>	-3.79	(± 0.88)	-2.58	(± 0.59)
<i>actP (yjcG)</i>	-5.23	(± 1.36)	-4.47	(± 0.60)
<i>fbp</i>	1.07	(± 0.27)	1.27	(± 0.38)
<i>glcB</i>	-1.64	(± 0.45)	-1.55	(± 0.29)
<i>maeB</i>	-2.35	(± 0.55)	-1.70	(± 0.36)
<i>pckA</i>	-3.97	(± 1.08)	-1.43	(± 0.27)
<i>ppsA</i>	-1.13	(± 0.01)	-1.12	(± 0.26)
<i>sfcA</i>	-1.23	(± 0.04)	-1.12	(± 0.04)
b) Glicólisis				
<i>aceE</i>	-1.57	(± 0.08)	-2.01	(± 0.20)
<i>aceF</i>	-1.23	(± 0.22)	-1.68	(± 0.07)
<i>eno</i>	1.11	(± 0.28)	-1.14	(± 0.00)
<i>fbaA</i>	-1.64	(± 0.19)	-1.78	(± 0.21)
<i>fbaB</i>	1.97	(± 0.02)	1.81	(± 0.25)
<i>gapA</i>	-1.27	(± 0.12)	1.72	(± 0.37)
<i>gapC-1</i>	1.97	(± 0.10)	2.82	(± 0.08)
<i>gapC-2</i>	2.05	(± 0.02)	3.23	(± 0.22)
<i>glk</i>	1.02	(± 0.18)	3.98	(± 1.17)
<i>gpmA</i>	-1.07	(± 0.18)	1.78	(± 0.16)
<i>gpmB</i>	1.16	(± 0.26)	2.07	(± 0.52)
<i>pfkA</i>	1.31	(± 0.32)	1.02	(± 0.07)
<i>pfkB</i>	1.43	(± 0.22)	2.45	(± 0.20)
<i>pgi</i>	1.26	(± 0.19)	12.12	(± 3.11)
<i>pgk</i>	-1.03	(± 0.11)	1.14	(± 0.07)
<i>pykA</i>	-1.31	(± 0.16)	-1.26	(± 0.05)
<i>pykF</i>	1.56	(± 0.08)	3.41	(± 0.57)
<i>tpi</i>	1.04	(± 0.14)	2.22	(± 0.08)

	PB11	PB12
c) Ciclo de los ácidos tricarboxílicos		
<i>acnB</i>	-2.25 (± 0.39)	-1.50 (± 0.32)
<i>fumA</i>	-3.21 (± 0.86)	-3.16 (± 0.44)
<i>fumC</i>	-1.52 (± 0.14)	-1.51 (± 0.34)
<i>gltA</i>	-1.70 (± 0.38)	-1.56 (± 0.29)
<i>icdA</i>	-1.28 (± 0.35)	1.17 (± 0.21)
<i>mdh</i>	-1.46 (± 0.27)	1.28 (± 0.27)
<i>sdhA</i>	-1.34 (± 0.26)	-1.37 (± 0.33)
<i>sdhB</i>	-1.32 (± 0.25)	-1.31 (± 0.26)
<i>sdhC</i>	-1.12 (± 0.20)	-1.39 (± 0.38)
<i>sdhD</i>	-1.14 (± 0.33)	-1.52 (± 0.23)
<i>sucA</i>	1.17 (± 0.19)	-1.31 (± 0.31)
<i>sucB</i>	1.00 (± 0.07)	1.21 (± 0.17)
<i>sucC</i>	-1.13 (± 0.11)	1.15 (± 0.21)
<i>sucD</i>	-1.27 (± 0.20)	1.04 (± 0.25)
d) Vía de las pentosas fosfato		
<i>gnd</i>	1.26 (± 0.27)	1.34 (± 0.35)
<i>rpe</i>	-1.25 (± 0.19)	-1.15 (± 0.24)
<i>rpiA</i>	1.02 (± 0.14)	1.59 (± 0.15)
<i>rpiB</i>	-1.95 (± 0.23)	-1.55 (± 0.23)
<i>talA</i>	2.97 (± 0.64)	4.78 (± 1.15)
<i>talB</i>	-1.15 (± 0.15)	1.17 (± 0.32)
<i>tktA</i>	-1.09 (± 0.20)	nd
<i>tktB</i>	2.59 (± 0.16)	8.39 (± 1.92)
<i>zwf</i>	1.67 (± 0.13)	2.28 (± 0.06)
e) Genes que codifican para proteínas regulatorias		
<i>arcA</i>	-1.04 (± 0.06)	1.05 (± 0.13)
<i>arcB</i>	1.02 (± 0.12)	1.43 (± 0.36)
<i>crp</i>	-1.33 (± 0.11)	-1.34 (± 0.34)
<i>csrA</i>	1.22 (± 0.28)	1.28 (± 0.28)
<i>cyaA</i>	-1.15 (± 0.09)	1.12 (± 0.02)
<i>fadR</i>	-1.07 (± 0.01)	-1.11 (± 0.11)
<i>fis</i>	1.64 (± 0.28)	1.53 (± 0.03)
<i>cra (fruR)</i>	1.31 (± 0.23)	-1.38 (± 0.39)
<i>iclR</i>	nd	-1.05 (± 0.27)
<i>mlc</i>	-1.20 (± 0.04)	1.01 (± 0.23)
<i>rpoS</i>	1.91 (± 0.51)	1.56 (± 0.28)

	PB11	PB12
f) Otros		
<i>ackA</i>	-1.14 (± 0.18)	-1.14 (± 0.12)
<i>galP</i>	10.71 (± 3.10)	25.54 (± 7.28)
<i>poxB</i>	1.92 (± 0.26)	3.45 (± 0.75)
<i>ppc</i>	-1.20 (± 0.30)	-1.08 (± 0.04)
<i>pta</i>	-1.08 (± 0.23)	1.02 (± 0.20)
<i>ptsG</i>	4.12 (± 1.03)	3.35 (± 0.55)

Para cada gen en todas las cepas, el nivel de transcripción del gen de la cepa silvestre JM101 se empleó como control para normalizar los datos, teniendo JM101 siempre un valor de RT-PCR de uno. De esta forma, los datos de este estudio se reportan como valores de expresión relativa, comparados al nivel de expresión de JM101. Los resultados presentados son el promedio de tres mediciones independientes de los valores de expresión para cada gen. Los valores negativos indican niveles de expresión menores que el detectado para ese gen en la cepa JM101 y se calcularon al dividir $1 / 2^{-\Delta\Delta CT}$. Valores se obtuvieron a partir de diferentes cDNAs generados al menos de dos muestras de bioreactores independientes. Los valores de expresión por RT-PCR obtenidos para cada gen difieren menos del 30%. La desviación estándar para cada gen se muestra entre paréntesis. nd = no determinado con la adecuada desviación estándar (menos de 30%).

reduciendo el carbono destinado hacia la parte superior de la vía y afectando la generación de precursores biosintéticos, principalmente en PB12.

El análisis de flujo de carbono en una cepa silvestre crecida en acetato, indica que no hay flujo de PEP hacia piruvato [Zhao et al., 2004], lo cual es indicio de una nula o mínima actividad de las enzimas PykA y PykF en condiciones gluconeogénicas. Un caso adicional en el que un ciclo inútil surgiría en PB12 al crecer en acetato, se presenta con la enzima PfkB, la cual cataliza la formación de fructosa-1,6-fosfato a partir de fructosa-6-fosfato (fig. 6). Esta reacción pudiera contrarrestar la actividad gluconeogénica de la enzima Fbp en PB12, resultando en una producción deficiente de fructosa-6-fosfato y ATP. El impacto negativo de este ciclo en la poza de ATP y/o en el flujo de carbono hacia la vía de las pentosas fosfato, podría contribuir a la disminución de la μ en PB12 al crecer en acetato, como ha sido reportado para

cepas de *E. coli* que sobreexpresan *pfkB* por efecto de una mutación en este gen [Torres et al., 1997]. Una disminución en la concentración intracelular de glucosa-6-fosfato en PB12, limitaría el flujo de carbono hacia la vía de las pentosas fosfato y en consecuencia se reduciría la producción de precursores biosintéticos y NADPH en esta cepa. En concordancia con este hecho, la adición de concentraciones catalíticas de ribosa (0.01 g/l) al medio con acetato, ejerce un efecto positivo únicamente en PB12 al incrementar la μ un 46% y reducir la fase lag tres horas. Finalmente, es notable que los genes *glk* y *pgi* presenten en acetato un nivel de expresión muy elevado en PB12 respecto a las otras dos cepas, y que *galP* lo haga en ambas cepas PTS⁻ respecto a JM101 (fig. 6, tabla 5). Las actividades de GalP y Glk son esenciales en la definición del fenotipo PTS⁻ Glc⁺ en PB12 dado que están involucrados en el transporte y fosforilación de glucosa, respectivamente [Flores S. et al., 2002]. Pgi cataliza una reacción reversible y funciona tanto en condiciones glicolíticas como gluconeogénicas. El gen *galP* se sobreexpresa fuertemente en ambas derivadas PTS⁻ respecto a JM101, probablemente porque están respondiendo a una situación de escasez de carbono [Ferenci, 1999; Flores N. et al., 2005, 2007; Flores S. et al., 2005; Weber et al., 2005]. La sobreexpresión de *pgi* y *glk* también se presenta en PB12 cuando crece en glucosa [Flores N. et al., 1996, 2005]. De esta forma, es importante señalar que varios genes glicolíticos se sobreexpresan en PB12 independientemente de que se utilice glucosa o acetato como fuentes de carbono.

8.2.3. Genes del ciclo de TCA.

La mayor parte de los genes del ciclo de TCA presentan el mismo nivel de expresión en acetato en las tres cepas (fig. 6, tabla 5). En condiciones

gluconeogénicas, *E. coli* hace uso del CG para evitar la pérdida de carbono que ocurre por descarboxilación en la parte baja del ciclo de TCA [Cronan y LaPorte, 1996; Flores N. et al., 2005]. Sin embargo, el poder reductor liberado en las reacciones de la parte baja de TCA puede acoplarse a la síntesis de ATP en la cadena respiratoria. Zhao et al. (2004) han determinado que en una cepa silvestre de *E. coli* que crece en acetato como única fuente de carbono, aproximadamente 20% del carbono se distribuye a través del CG mientras que 55% va hacia la parte baja del ciclo de TCA. Es claro que el nodo de isocitrato es controlado estrictamente dependiendo de las necesidades de la célula [Cronan y LaPorte, 1996]. Los genes *icdA* y *aceBAK* tienen el mismo nivel de expresión en las derivadas PTS⁻ respecto a JM101 al crecer en acetato (fig. 6, tabla 5). Recientemente se encontró una mutación puntual en el gen *arcB* de la cepa PB12, misma que sería responsable de la sobreexpresión de los genes del ciclo de TCA cuando esta cepa crece en glucosa [Flores N. et al., 2005]. Sin embargo, el efecto de esta mutación en PB12 no es evidente cuando se emplea acetato como fuente de carbono. Tanto *arcA* como *arcB* mantienen el mismo nivel de expresión en ambas derivadas PTS⁻ en comparación con JM101 (datos no mostrados). Por último, únicamente los genes *gltA* y *fumAC* en ambas cepas PTS⁻, y *acnB* sólo en PB11, muestran un nivel de expresión menor respecto a la silvestre. Estos resultados podrían ser indicio de un menor flujo a través de TCA en PB11 y PB12, en comparación con JM101, asociado a una menor producción de AcCoA debido a la baja expresión de los genes *acs* y *actP*. Más aún, la disminución en la expresión del operón *fumAC* en las cepas PTS⁻ en acetato podría reflejar una menor producción de malato a partir de fumarato, siendo el malato

producido de forma importante por el CG en estas cepas [Cronan & LaPorte, 1996; Flores N. et al., 2005].

8.2.4. Genes involucrados en la síntesis de acetato.

Los niveles de transcripción de los genes *pta* y *ackA*, cuyos productos transforman el AcCoA en acetato, no cambian significativamente entre las tres cepas. Por otro lado, el gen *poxB* se sobreexpresa en ambas derivadas PTS⁻ en relación a JM101 (fig. 6, tabla 5); la enzima PoxB transforma el piruvato en acetato generando ATP en la membrana. Los mismos resultados se obtienen con este grupo de genes cuando las cepas crecen en glucosa [Flores N. et al., 2005]. Como se verá más adelante, la inactivación del gen *poxB* tiene un efecto negativo en el crecimiento de ambas derivadas PTS⁻ en acetato.

8.2.5. Genes de la vía de las pentosas fosfato.

En acetato, el gen *zwf* se sobreexpresa en ambas derivadas PTS⁻ en relación a JM101 (fig. 6, tabla 5). El intercambio de esqueletos de carbono a nivel de la fructosa-6-fosfato y gliceraldehído-3-fosfato entre glicólisis y la vía de las pentosas fosfato, parece ser significativo en las cepas PB11 y PB12, ya que los genes *tktB* y *talA* se sobreexpresan en estas cepas respecto a JM101 (fig. 6, tabla 5). Además, el gen *rpiA* presenta un nivel de expresión mayor en PB12 respecto a las otras dos cepas. Este comportamiento en las cepas PTS⁻ quizá es consecuencia de una mayor demanda de ribosa-5-fosfato y NADPH para biosíntesis, en especial en PB12. Lo anterior es consistente con el hecho de que la adición de ribosa al medio con acetato, como ha sido mencionado, incrementa la μ sólo en PB12. Se ha determinado en una cepa silvestre que crece en acetato, que el flujo a través de la

vía de las pentosas es sólo del 1% del carbono total [Zhao et al., 2004], lo cual es indicio de que esta vía funciona a un nivel bajo en condiciones gluconeogénicas en una cepa silvestre. Por último, es interesante hacer notar que la sobreexpresión de estos genes también se presenta en las cepas PTS⁻ al crecer en glucosa [Flores N. et al., 2005].

8.2.6. Genes que codifican para proteínas reguladoras.

Se analizó la transcripción de varios genes que codifican para proteínas con funciones reguladoras, y sólo el gen *rpoS* se sobreexpresó ligeramente en acetato en las cepas PB11 y PB12 (1.9 +/- 0.51 y 1.6 +/- 0.28, respectivamente), en relación a JM101. Sin embargo, este resultado debe considerarse con cautela dada la desviación observada en ambos casos. Cuando se tiene glucosa como fuente de carbono, el gen *rpoS* también presenta un nivel de expresión mayor en las cepas PB11 y PB12 (2.9 +/- 0.09 y 2.2 +/- 0.16, respectivamente), en comparación con la silvestre [Flores N. et al., 2008]. La sobreexpresión de este gen en las derivadas PTS⁻, podría ser resultado de las condiciones de crecimiento lento que enfrentan estas cepas en glucosa y en acetato [Flores N. et al., 2008; Weber et al., 2005], siendo más claro el efecto en glucosa que en acetato para ambas cepas.

8.3. Efecto diferencial de las enzimas gluconeogénicas involucradas en la síntesis de PEP o piruvato en las cepas PTS⁻ al crecer en acetato.

Un aspecto clave del metabolismo gluconeogénico, es la transformación de esqueletos de carbono de TCA hacia piruvato o PEP. Con el objeto de tener un mayor entendimiento de esta parte del metabolismo gluconeogénico, y considerando las diferencias en el nivel de expresión de los genes involucrados, en las cepas PTS⁻

en glucosa y en acetato, se decidió inactivar los genes *pckA*, *sfcA*, *maeB* y *ppsA*. Se analizan en las mutantes generadas el tiempo que les toma adaptarse al medio (fase lag) y su μ en acetato, en comparación con las cepas parentales.

8.3.1. Inactivación del gen *ppsA*.

La inactivación del gen *ppsA* provoca diferencias significativas en el crecimiento de las cepas PB11 *ppsA* y JM101 *ppsA*, y en la capacidad de adaptación de las mutantes PB11 *ppsA* y PB12 *ppsA* (tabla 6). Estos resultados indican que la enzima PckA por sí sola, no puede suplir el PEP necesario para el crecimiento y la adaptación característicos de las tres cepas de estudio. Las cepas PB11 *ppsA* y JM101 *ppsA* reducen drásticamente su μ en acetato en relación a sus cepas parentales (tabla 6), lo cual es indicio de que el PEP que ya no es producido por PpsA a partir de piruvato, no es compensado por una mayor actividad de PckA en estas mutantes. Es probable que la cepa PB12, al crecer lento en acetato, tenga menores requerimientos biosintéticos que JM101 y PB11, de tal forma que en la mutante PB12 *ppsA*, la necesidad de PEP pueda ser complementada por la actividad de PckA. Sin embargo, las fases lag de las derivadas PB12 *ppsA* y PB11 *ppsA* se incrementan mucho en comparación a la de sus parentales (tabla 6), no obstante que estas cepas cuentan con la actividad de PckA como alternativa para la generación de PEP. Recientemente, se ha reportado que la cepa silvestre de *E. coli* BW25113 *ppsA*, también presenta una ligera fase lag en acetato [Kao et al., 2005]; estos autores proponen que en esta mutante la disminución en la producción de PEP disminuiría la transferencia del grupo fosfato hacia el componente IIA^{Glc} del sistema

Tabla 6. Velocidades específicas de crecimiento (μ) y fases lag de las derivadas de las cepas PB11 PTS⁻, PB12 PTS⁻ Glc⁺ y JM101, en medio mínimo con acetato como única fuente de carbono. Se muestran los valores promedio de al menos dos experimentos independientes, cada uno por duplicado. Las diferencias entre los valores de cada cepa son menores al 10%.

Cepa	μ en acetato (h ⁻¹)	fase lag (hs)	% de μ vs. PB11
PB11	0.21	5	100
PB11 + AMPc	0.15	9	71
PB11 <i>ppsA</i>	0.09	37	43
PB11 <i>ppsA</i> + AMPc	0.10	13	48
PB11 <i>maeB</i>	0.12	8	57
PB11 <i>sfcA</i>	0.07	12	33
PB11 <i>maeB sfcA</i>	0.02	37	10
PB11 + alanina	0.26	4	124
PB11 <i>maeB sfcA</i> + alanina	0.26	5	124
PB11 <i>pckA</i>	0.22	4	105
PB11 <i>poxB</i>	0.12	7	57
			% de μ vs. PB12
PB12	0.13	8	100
PB12 + AMPc	0.17	14	133
PB12 <i>ppsA</i>	0.11	43	85
PB12 <i>ppsA</i> + AMPc	0.15	13	115
PB12 <i>maeB</i>	0.15	9	115
PB12 <i>sfcA</i>	0.13	11	100
PB12 <i>maeB sfcA</i>	0.05	33	38
PB12 + alanina	0.21	6	162
PB12 <i>maeB sfcA</i> + alanina	0.18	5	138
PB12 <i>pckA</i>	0.12	12	92
PB12 <i>poxB</i>	0.09	16	69
			% de μ vs. JM101
JM101	0.28	5	100
JM101 + AMPc	0.23	7	82
JM101 <i>ppsA</i>	0.13	9	46
JM101 <i>ppsA</i> + AMPc	0.18	8	64
JM101 <i>maeB</i>	0.24	6	86
JM101 <i>sfcA</i>	0.27	5	96
JM101 <i>maeB sfcA</i>	0.14	40	50
JM101 + alanina	0.27	5	96
JM101 <i>maeB sfcA</i> + alanina	0.29	5	104
JM101 <i>pckA</i>	0.24	7	86
JM101 <i>poxB</i>	0.29	5	104

PTS, reduciendo la activación de Cya, y en consecuencia la producción de AMPc. Sin embargo, nuestros resultados indican que el efecto sobre la μ y las fases lag en acetato debido a la inactivación del gen *ppsA*, se debe a una disminución en el PEP producido por PckA, independientemente de los niveles de AMPc y de la presencia o ausencia del sistema PTS. En el caso de las derivadas PTS⁻, la inactivación de *ppsA* repercute en mayor medida en su capacidad de adaptación en acetato debido a que no cuentan con el componente IIA^{Glc}, y *per se* tienen niveles bajos de AMPc. En este sentido, la adición de AMPc al medio con acetato reduce sustancialmente las fases lag de las mutantes PB11 *ppsA* y PB12 *ppsA* (Tabla 6).

8.3.2. Inactivación de los genes *maeB* y *sfcA*.

Las inactivaciones de los genes que codifican para las enzimas málicas afectan principalmente el crecimiento en acetato de la cepa PB11; la mutante PB11 *sfcA* reduce su μ casi 70% en tanto que PB11 *maeB* disminuye su μ un 43%, en comparación con la parental. Estos resultados son interesantes debido a que la ausencia de alguna de las enzimas málicas en JM101 o PB12, no altera considerablemente el crecimiento de estas cepas en acetato, indicando que la ausencia de una de las enzimas málicas es suplida por la otra (tabla 6). Es probable que las enzimas málicas sean importantes en PB11 no sólo para generar piruvato sino también para balancear los niveles de los cofactores reducidos en función de las necesidades celulares; el cofactor NAD es específico para la enzima SfcA mientras que NADP lo es para MaeB [Hansen y Juni, 1975; 1979]. En este sentido, una mayor afectación en la capacidad de adaptación y de crecimiento en acetato se da en PB11 *sfcA*, cepa en la que el desbalance en la relación de cofactores se da a favor del

NADPH (tabla 6). Por otra parte, es notable que la derivada PB12 *maeB* incrementa ligeramente su μ en acetato; probablemente en esta cepa se genera preferencialmente NADH, el cual puede ser utilizado en la cadena respiratoria para generar energía; como se verá más adelante, a partir de PB12 *maeB* se obtuvo un mutante espontáneo que crece en acetato a una μ de 1.0 h^{-1} . Por otra parte, cuando los genes *maeB* y *sfcA* se inactivan simultáneamente en las tres cepas de estudio, los μ 's y los periodos de adaptación en acetato se afectan drásticamente (tabla 6). En una cepa silvestre diferente (*E. coli* BW25113), se ha reportado un resultado similar al inactivar estos dos genes y crecer en acetato [Kao et al., 2005]. Sin embargo, el efecto de la doble inactivación de estos genes es aún más pronunciado en las derivadas PTS⁻ (tabla 6), siendo la cepa PB11 *maeB sfcA* la más afectada. Al no tener a las enzimas málicas activas, las mutantes *sfcA maeB* limitan su producción de piruvato; este metabolito se emplea como precursor en la biosíntesis de alanina, valina y leucina, y también es transformado en PEP por PpsA en condiciones gluconeogénicas. Ya se ha discutido en la sección anterior la repercusión que tiene una posible disminución en la disponibilidad de PEP. La hipótesis de la escasez de piruvato en estas mutantes se refuerza al considerar que en una cepa silvestre de *E. coli* creciendo en acetato no se detecta flujo de PEP hacia piruvato [Zhao et al., 2004]. De esta forma, las mutantes *maeB sfcA* aparentemente son incapaces de generar suficiente piruvato a partir de PEP, no obstante estar el gen *pykF* sobreexpresado en PB12 (fig. 6, tabla 5). Esta deficiencia de piruvato es más drástica en PB11 quizá porque el nivel de expresión de *pckA* se reduce de manera importante respecto a JM101 y PB12, y además no hay cambio en

la expresión de *pykAF* en esta cepa (fig. 6, tabla 5). Adicionalmente, es posible que parte del escaso piruvato generado en las derivadas PTS⁻, sea transformado en acetato por acción de la enzima PoxB con el fin de reciclar carbono (ver adelante). De manera notable, la posible deficiencia en piruvato se elimina por completo cuando al medio con acetato se le añade alanina (0.5 g/l); este aminoácido puede ser empleado en biosíntesis o puede ser transformado directamente en piruvato [McFall y Newman, 1996]. La complementación con alanina restablece el crecimiento y elimina las prolongadas fases lag de las tres cepas con la doble inactivación *maeB sfcA* (tabla 6). Más aún, la adición de alanina incrementa la μ de manera significativa en las cepas PB11 *maeB sfcA*, PB12 *maeB sfcA*, PB11 y PB12 (tabla 6). Estos resultados indican que las cepas PB11 y PB12 padecen una deficiencia intrínseca de piruvato al crecer en acetato.

8.3.3. Inactivación del gen *pckA*.

La enzima PckA cataliza la descarboxilación de OAA en PEP, de tal forma que puede generarse este metabolito directamente a partir de intermediarios del ciclo de TCA. La inactivación del gen *pckA* tanto en JM101 como en las derivadas PTS⁻, no presentó efecto alguno en cuanto a la adaptación y el crecimiento en acetato, respecto a sus cepas parentales (tabla 6). Este resultado indica que en estas cepas la principal ruta gluconeogénica es a través de las enzimas málicas y PpsA, y no vía PckA.

8.4. Papel del gen *poxB* en el metabolismo de acetato de las cepas PTS⁻.

La enzima PoxB cataliza la descarboxilación de piruvato en acetato y CO₂, asociada a la reducción de quinonas (UQH₂) membranales que pueden contribuir a la

generación de ATP. Se sabe que el gen *poxB* suele expresarse en condiciones de estrés, incluyendo la que se da por limitación de carbono, y que ésta expresión depende principalmente del regulador RpoS [Chang et al., 1999; Henge-Aronis, 2002; Flores N. et al., 2004, 2005]. En acetato, el gen *poxB* se sobreexpresa en ambas cepas PTS⁻ en relación a JM101 (fig. 6, tabla 5), y al inactivarlo, la μ de las derivadas PB11 *poxB* y PB12 *poxB* se reduce aproximadamente 40% y 30% respectivamente, en comparación con las cepas parentales; la mutante JM101 *poxB* no presenta efecto alguno en su μ respecto al control JM101 (tabla 6). Además, la fase lag de la cepa PB12 *poxB* se duplica en relación a la de PB12. De esta forma, en las cepas PTS⁻ que crecen lento en acetato, la enzima PoxB aparentemente es importante como estrategia de reciclamiento de carbono y producción de ATP vía UQH₂. Un resultado similar se obtiene cuando PB11 *poxB* crece en glucosa, condición en la cual la μ se reduce un 50% en comparación con PB11. Sin embargo, la derivada PB12 *poxB* no afecta su crecimiento en glucosa debido a que crece a una velocidad mayor en este sustrato [Flores N. et al., 2004; Hua et al., 2004].

8.5. Caracterización fisiológica preliminar de una cepa de *E. coli* que crece a una elevada μ en acetato (cepa PB122).

A partir de la cepa PB12 *maeB::lx*, se obtuvo espontáneamente una cepa (PB122) que presenta una μ inusualmente alta en acetato ($\mu = 1.0 \text{ h}^{-1}$), en comparación con la cepa silvestre JM101 ($\mu = 0.28 \text{ h}^{-1}$). Es notable el hecho de que las progenitoras de esta cepa, tanto PB12 como PB12 *maeB::lx*, crezcan a una μ muy baja en este sustrato (0.13 y 0.15 h^{-1} , respectivamente). Por otra parte, en glucosa la μ de la cepa PB122 es esencialmente la misma que la de PB12 y PB12 *maeB::lx* (aprox. 0.4 h^{-1}),

lo cual indica que la mutación o mutaciones adquiridas por esta cepa afectaron sólo el metabolismo de acetato y no el de glucosa. Sin embargo, PB122 no crece en sustratos gluconeogénicos diferentes al acetato, como el malato, citrato o succinato. De acuerdo con la información obtenida en este trabajo, se puede especular acerca de los cambios que justificarían el peculiar fenotipo en acetato de PB122 en comparación con su parental PB12. En primer lugar, se pudo haber aumentado la expresión de los genes *acs* y *actP*, lo cual favorecería la capacidad de transporte y asimilación de acetato. A su vez, es posible que los genes *pykF* y *pfkB* tengan una menor expresión, lo cual eliminaría los potenciales ciclos inútiles presentes en PB12. Finalmente, se esperaría que la alta expresión de genes cuyos productos catalizan reacciones reversibles en glicólisis y gluconeogénesis se mantuviera en PB122.

Por otro lado, se ha reportado que cepas que carecen del sistema PTS pueden utilizar simultáneamente glucosa y acetato debido a la ausencia de represión catabólica ejercida por la glucosa. Las cepas PB11 y PB12 coutilizan estos sustratos pero difieren en que PB11 agota primero el acetato, mientras que PB12 lo hace con la glucosa [Flores N., et al., 2004]. Como se esperaba, la cepa PB122 también consume simultáneamente glucosa y acetato pero a diferencia de PB12, PB122 agota primero el acetato y posteriormente la glucosa (fig. 7A). De forma interesante, la coutilización de estos sustratos deja de presentarse en PB122 si el inóculo se adapta en acetato; en esta condición, la glucosa comienza a utilizarse hasta que el acetato se consume por completo (fig. 7B), simulando un fenómeno de “represión catabólica” del acetato sobre la glucosa.

Una propiedad adicional de la cepa PB122, es su capacidad de crecer a elevadas μ 's aún en concentraciones altas de acetato, en comparación con los controles. Al

resembrar sucesivamente esta cepa en medios con concentraciones de acetato cada vez más elevadas (2, 5, 10 y 15 g/l), adquiere la capacidad de adaptarse y crecer a mayores μ s que la cepa silvestre. Se espera que el análisis de transcripción comparativo de PB122 con sus cepas parentales, proporcione información relevante para explicar el peculiar fenotipo de esta cepa.

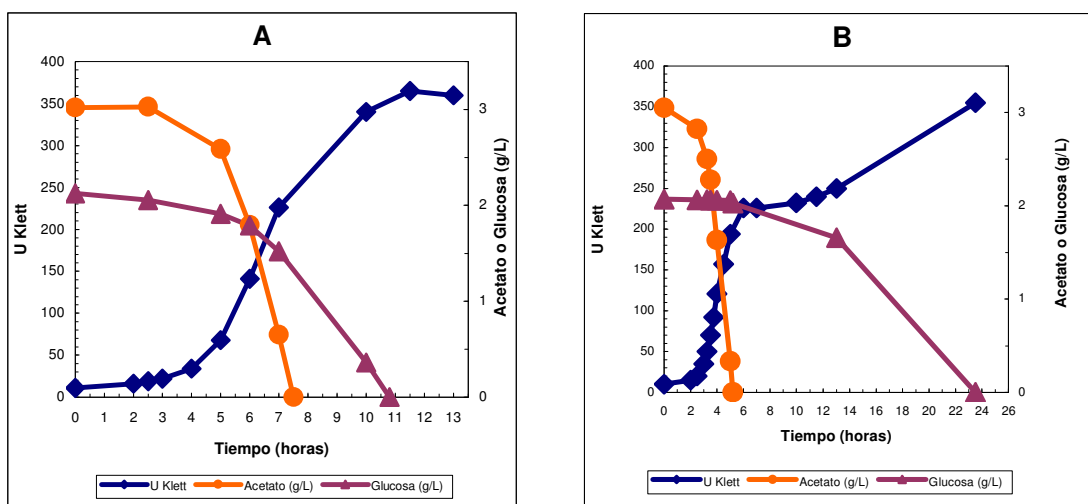


Figura 7. Crecimiento y coutilización de acetato y glucosa en la cepa PB122. El inóculo se adapta en medio mínimo con glucosa (A) o acetato (B).

9. CONCLUSIONES.

- Se propone que la cepa PB12 (PTS⁻Glc⁺) crece lentamente en acetato debido a que presenta un nivel de expresión bajo en algunos genes gluconeogénicos (*acs*, *actP* y *maeB*), y simultáneamente mantiene una elevada expresión de la mayor parte de los genes de la vía glicolítica, en particular *pykF* y *pfkB*, en comparación con la cepa silvestre.
- De manera similar a lo que ocurre en PB12, la cepa PB11 expresa a un nivel menor ciertos genes gluconeogénicos (*acs*, *actP*, *maeB* y *pckA*), respecto a la cepa silvestre, lo cual puede explicar en parte las diferencias de crecimiento en acetato entre esta cepa y su progenitora JM101. Sin embargo, PB11 probablemente tiene un μ mayor que PB12 porque no sobreexpresa los genes *pykF* y *pfkB* que se piensa pudieran estar involucrados en posibles ciclos inútiles de carbono que afectan el crecimiento de PB12 en condiciones gluconeogénicas.
- Ambas derivadas PTS⁻ tienen una menor concentración de AMPc intracelular al crecer en acetato, en comparación con la cepa silvestre; este resultado en parte pudiera explicar en estas cepas, los bajos niveles de expresión determinados en genes gluconeogénicos, cuya activación depende del complejo CRP-AMPc (*actP*, *acs* y *maeB*).
- Las inactivaciones genéticas evidenciaron que la principal ruta gluconeogénica en las tres cepas es la formada por las enzimas málicas y PpsA, y no a través de PckA.
- Al inactivar el gen *ppsA*, se evidenció que PckA por sí sola no puede suplir del PEP necesario para el crecimiento y adaptación en acetato. La mayor afectación se

presenta en PB11 *ppsA*, cuya cepa parental (PB11) tiene un nivel de expresión menor en el gen *pckA*.

- La doble inactivación de los genes *sfcA* y *maeB*, afecta drásticamente la adaptación y el crecimiento en acetato de las derivadas PTS⁻ y de la silvestre JM101, probablemente porque se afecta la producción de piruvato.
- La ausencia de alguna de las enzimas málicas, por efecto de la inactivación de los genes respectivos (*maeB* o *sfcA*) en las cepas JM101 y PB12, es suplida por la actividad de la enzima málica restante.
- En contraste, PB11 requiere la actividad de ambas enzimas málicas para suplir de piruvato a la célula, ya que la inactivación de *maeB* o *sfcA* afecta el crecimiento en acetato en esta cepa. Es probable que PB11 requiera también la presencia de ambas enzimas málicas para balancear los requerimientos de NADH/NADPH al crecer en acetato.
- Las cepas PB11 y PB12 incrementan significativamente su μ cuando al medio con acetato se le añade alanina, lo cual podría reflejar niveles bajos de piruvato. Este resultado también concuerda con la probable disminución en la concentración de este metabolito al ser utilizado por la enzima PoxB.
- El reciclaje de carbono a través de PoxB y Acs se presenta en ambas cepas PTS⁻ que crecen lento en acetato quizá para mantener constante la poza de AcCoA. La inactivación del gen *poxB* reduce la μ en acetato en las cepas PTS⁻, en especial en PB11, lo cual es indicio de un papel importante de PoxB en estas derivadas que crecen lento en acetato.

- Se obtuvo la mutante PB122 que crece a una μ muy alta en acetato en relación a JM101 y a su cepa parental directa, la cepa PB12 *maeB::lx*.
- La caracterización fisiológica inicial de la cepa PB122, ha permitido determinar que las capacidades de coutilización de glucosa y acetato dependen de la fuente de carbono con la que se adapte a las células.
- La resiembra sucesiva de PB122 en medios mínimos con mayores concentraciones de acetato, ha permitido obtener una segunda generación de mutantes que toleran altas concentraciones de acetato, y que además lo consumen a una velocidad mayor a lo que ocurre con las cepas control.
- Finalmente, el conocimiento acerca de la plasticidad metabólica de *E. coli*, ejemplificado en este trabajo con el metabolismo de acetato, comparado con el de glucosa, podría ser útil en la definición de nuevas estrategias de ingeniería metabólica que involucren cepas PTS⁻ en la producción de compuestos aromáticos y/o en la producción de compuestos que deriven de AcCoA.

10. PERSPECTIVAS.

Analizar los valores expresión por RT-PCR de las cepas PTS⁻ carentes de RpoS. Se han determinado promotores sobrelapados para las dos subunidades RpoS y RpoD en todos los genes glicolíticos analizados, además de *acs* y *poxB*. Es probable que esta situación también se presente en los genes gluconeogénicos, ya que reducen su expresión en las derivadas RpoS⁻ al crecer en glucosa.

Realizar el análisis de transcripción de la cepa PB122 en relación a sus cepas parentales creciendo en acetato. Caracterizar el fenómeno de adaptación de la cepa PB122 por cultivo sucesivo, partiendo de 2 g/l hasta 15 g/l de acetato o concentraciones mayores.

Aprovechando la elevada velocidad de consumo simultáneo de glucosa y acetato de la cepa PB122 cuando se adapta su inóculo en glucosa, inactivar en esta cepa los genes *pykAF* y *ppsA*, con la intención de separar el metabolismo glicolítico y el gluconeogénico. Evaluar si la coutilización de glucosa y acetato mantiene viable esta nueva mutante. Determinar si la posible acumulación de PEP o de AcCoA en la cepa PB122 *pykAF ppsA*, favorece la producción de aminoácidos aromáticos o PHB, respectivamente, al coutilizar glucosa y acetato. En caso necesario, incluir las inactivaciones de los genes *pckA* y *ppc* en la cepa PB122 *pykAF ppsA*, y reevaluar los elementos anteriormente mencionados.

Explorar la posibilidad de utilizar la cepa PB122, o el conocimiento generado de ella, como una herramienta biológica de destoxificación de acetato en cultivos de interés industrial que acumulen este ácido orgánico a altas concentraciones, como en el caso de fermentaciones en donde se emplean hidrolizados agroindustriales, los cuales se sabe contienen al menos 4 g/l de acetato.

11. BIBLIOGRAFÍA.

1. Abdel-Hamid AM, Attwood MM, Guest JR: Pyruvate oxidase contributes to the aerobic growth efficiency of *Escherichia coli*. *Microbiology* 2001; 147: 1483–1498.
2. Alexeeva S, Hellingwerf KJ, Teixeira de Mattos MJ. Requirement of ArcA for redox regulation in *Escherichia coli* under microaerobic but not anaerobic or aerobic conditions. *J Bacteriol* 2003; 185(1):204-209.
3. Báez J.L., Osuna, J., Hernández-Chávez, G., Soberón, X., Bolívar, F. y Gosset, G. Metabolic engineering and protein directed evolution increase the yield of L-phenylalanine synthesized from glucose in *E. coli*. *Biotechnol. Bioeng.* 2004; 87:516-524.
4. Báez JL, Flores N, Juárez K, Bolívar F, Gosset G: Metabolic transcription analysis of engineered *Escherichia coli* strains that overproduce L-phenylalanine. *Microbial Cell Factories* 2007; 6:30.
5. Beatty CM, Browning DF, Busby SJ, Wolfe AJ: Cyclic AMP receptor protein-dependent activation of the *Escherichia coli* *acsP2* promoter by a synergistic class III mechanism. *J Bacteriol* 2003; 185: 5148-5157.
6. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L: *Biochemistry*, ed 5, Freeman, 2002, pp. 456-460.
7. Brown T, Jones-Mortimer M, Kornberg HL: The enzymatic interconversion of acetate and acetyl-coenzyme A in *Escherichia coli*. *J Gen Microbiol*; 102:327-336.

8. Clark D, Cronan J: Two-carbon compounds and fatty acids as carbon sources; in Neidhardt F (ed): *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology, ed 2. Washington, ASM press, 1996, pp. 343-360.
9. Cronan J, LaPorte D: Tricarboxylic acid cycle and glyoxylate bypass; in Neidhardt F (ed): *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology, ed 2. Washington, ASM press, 1996, pp. 206-214.
10. Curtis JS and Epstein W: Phosphorylation of D-Glucose in *Escherichia coli* mutants defective in glucosephosphotransferase, mannosephosphotransferase and glucokinase. *J Bacteriol* 1975; 122: 1189–1199.
11. Chang D, Shin S, Rhee J, Pan J: Acetate metabolism in a *pta* mutant of *Escherichia coli* W3110: Importance of maintaining acetyl coenzyme A flux for growth and survival. *J Bacteriol* 1999; 181: 6656–6663.
12. Chang YY, Cronan JE: Genetic and biochemical analysis of *Escherichia coli* strains having a mutation in the structural gene (*poxB*) for pyruvate oxidase. *J Bacteriol* 1983; 154: 757-762.
13. Datsenko K, Wanner L: One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *PNAS* 2000; 97:6640-6645.
14. El-Mansi M: Flux to acetate and lactate excretions in industrial fermentations: physiological and biochemical implications. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2004; 31:295-300.
15. Ferenci T: Regulation by nutrient limitation. *Curr Opin Microbiol* 1999; 2(2):208-213.

16. Flores, N., 1995. Construcción y caracterización de cepas de *Escherichia coli* mutantes en el sistema de transporte de carbohidratos PTS. Tesis de maestría, Instituto de Biotecnología, UNAM, México.
17. Flores N, Xiao J, Berry A, Bolívar F, Valle F: Pathway engineering for the production of aromatic compounds in *Escherichia coli*. Nature Biotech 1996; 14:620-623.
18. Flores N, de Anda R, Flores S, Escalante A, Hernandez G, Martinez A, Ramirez OT, Gosset G, Bolivar F: Role of pyruvate oxidase in *Escherichia coli* strains lacking the phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase system. J Mol Microbiol Biotechnol 2004; 8(4):209-221.
19. Flores N, Flores S, Escalante A, de Anda R, Leal L, Malpica R, Georgellis D, Gosset G, Bolivar F: 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. Metab Eng 2005; 7(2):70-87.
20. Flores N, Leal L, Sigala JC, de Anda R, Escalante A, Martínez A, Ramírez T, Gosset G. Bolivar F: Growth recovery on glucose under aerobic conditions of an *Escherichia coli* strain carrying a phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase system deletion by inactivating *arcA* and overexpressing the genes coding for glucokinase and galactose permease. J Mol Microbiol Biotechnol 2007; 13:105-116.
21. Flores N, Escalante A, de Anda R, Báez JL, Merino E, Franco B, Georgellis D, Gosset G. Bolivar F: New insights on the role of sigma factor RpoS as revealed

- in *Escherichia coli* strain lacking the phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase system. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2008; (in Press).
22. Flores S, Gosset G, Flores N, de Graaf AA, Bolívar F: Analysis of carbon metabolism in *Escherichia coli* strains with an inactive phosphotransferase system by ^{13}C labeling and NMR spectroscopy. *Metab Eng* 2002; 4:124-137.
 23. Flores S, Flores N, de Anda R, Gonzalez A, Escalante A, Sigala JC, Gosset G, Bolivar F: 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* 2005; 10: 51-63.
 24. Fraenkel D: Glycolysis; in Neidhardt F (ed): *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology, ed 2. Washington, ASM press, 1996, pp. 189-194.
 25. Gennis RB, Stewart V: Respiration; in Neidhart FC (ed): *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology, ed 2. Washington, ASM, 1996, pp 217–260.
 26. Georgellis D, Kwon O, De Wulf P, Lin EC. Signal decay through a reverse phosphorelay in the Arc two-component signal transduction system. *J Biol Chem* 1998; 273(49):32864-32869.
 27. Gimenez R, Nuñez M, Badia J, Aguilar J, Baldoma L: The gene *yjcG*, cotranscribed with the gene *acs*, encodes an acetate permease in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 2003; 185: 6448-6455.

28. Gosset G: Improvement of *Escherichia coli* production strains by modification of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system. *Microbial Cell Factories* 2005; 4:14.
29. Gosset G, Yong-Xiao J, Berry A: A direct comparison of approaches for increasing carbon flow to aromatic bio synthesis in *Escherichia coli*. *J Ind Microbiol* 1996; 17: 47-52.
30. Gosset G, Zhang Z, Nayyar S, Cuevas W, Saier MH: Transcriptome analysis of CRP-dependent catabolite control of gene expression in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 2004; 186: 3516-3524.
31. Hansen EJ, Juni E: Isolation of mutants of *Escherichia coli* lacking NAD- and NADP-linked malic enzymes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1975; 65(2):559-566.
32. Hansen EJ, Juni E: Properties of mutants of *Escherichia coli* lacking malic dehydrogenase and their revertants. *J Biol Chem* 1979; 254(9):3570-3575.
33. Hengge-Aronis R: Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the sigma S (RpoS) subunit of RNA polymerase. *Microbiol. Mol. Biol. Revs.* 2002; 66: 373-395.
34. Holms, W. H. 1986. The central metabolic pathways of *Escherichia coli*: relationship between flux and control at a branch point, efficiency of conversion to biomass, and excretion of acetate. *Current topics in cellular regulation.* (B. L. Horecker, E. R. Stadtman eds.).
35. Hua Q, Yang C, Oshima T, Mori H, Shimizu K: Analysis of gene expression in *Escherichia coli* in response to changes of growth-limiting nutrient in chemostat cultures. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70:2354-66.

36. Iuchi S, Lin EC: Mutational analysis of signal transduction by ArcB, a membrane sensor protein responsible for anaerobic repression of operons involved in the central aerobic pathways in *Escherichia coli*. J Bacteriol 1992; 174:3972-3980.
37. Jeon Y, Lee YS, Han JS, Kim JB, Hwang DS: Multimerization of phosphorylated and non-phosphorylated ArcA is necessary for the response regulator function of the Arc two-component signal transduction system. J Biol Chem 2001; 276(44):40873-40879.
38. Kao KC, Tran LM, Liao JC: A global regulatory role of gluconeogenic genes in *Escherichia coli* revealed by transcriptome network analysis. J Biol Chem 2005; 280(43):36079-36087.
39. Kumari S, Tishel R, Eisenbach M, Wolfe AJ: Cloning, characterization, and functional expression of *acs*, the gene which encodes acetyl coenzyme A synthetase in *Escherichia coli*. J Bacteriol. 1995; 177(10):2878-86.
40. Livak K, Shmittgen TD: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. Methods 2001; 25: 402-408.
41. Malpica R, Franco B, Rodriguez C, Kwon O, Georgellis D. Identification of a quinone-sensitive redox switch in the ArcB sensor kinase. Proc Natl Acad Sci USA 2004; 101(36):13318-13323.
42. Martínez K, de Anda R, Hernández G, Escalante A, Gosset G, Ramírez OT, Bolívar F: Co-utilization of glucose and glycerol enhanced the production of aromatic compounds in an *Escherichia coli* strain lacking the phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase system. Microbial Cell Factories 2008; 7:1.

43. McFall E, Newman E: Amino acids as carbon sources; in Neidhardt F (ed): *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology, ed 2. Washington, ASM press, 1996, pp 358-379.
44. Moreau PL: Diversion of the metabolic flux from pyruvate dehydrogenase to pyruvate oxidase decreases oxidative stress during glucose metabolism in nongrowing *Escherichia coli* cells incubated under aerobic, phosphate starvation conditions. *J Bact* 2004; 186: 7364-7368.
45. Murai T, Tokushige M, Nagai J, Katsuki H: Physiological functions of NAD- and NADP-linked malic enzymes in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* 1971; 43(4):875-881.
46. Mustea I, Muresian T: Crabtree effect in some bacterial cultures. *Cancer* 2006; 20(9): 1499–1501.
47. Oh M, Rohlin L, Kao K, Liao J: Global expression profiling of acetate-grown *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 2002; 277: 13175-13183.
48. Palmeros B, Wild J, Szybalski W, Le Borgne S, Hernandez-Chavez G, Gosset G, Valle F, Bolivar F: A family of removable cassettes designed to obtain antibiotic-resistance-free genomic modifications of *Escherichia coli* and other bacteria. *Gene* 2000; 247(1-2):255-264.
49. Park Y, Lee B, Seok Y, Peterkofsky P: *In vitro* reconstitution of catabolite repression in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 2006; 281: 6448-6454.
50. Perrenoud A, Sauer U. Impact of global transcriptional regulation by ArcA, ArcB, Cra, Crp, Cya, Fnr, and Mlc on glucose catabolism in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 2005; 187:3171-3179.

51. Phue JN, Shiloach J: Transcription levels of key metabolic genes are the cause for different glucose utilization pathways in *Escherichia coli* B (BL21) and *Escherichia coli* K (JM109). *J Biotechnol* 2004; 109: 21–30.
52. Polen T, Rittmann D, Wendisch VF, Sahm H: DNA microarray analysis of the long-term adaptive response of *Escherichia coli* to acetate and propionate. *Appl Environ Microbiol* 2003; 69: 1759–1774.
53. Postma PW, Lengeler JW, Jacobson GR: Phosphoenolpyruvate carbohydrate phosphotransferase systems; in Neidhart FC (ed): *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology, ed 2. Washington, ASM, 1996, pp 1149–1174.
54. Quail MA, Haydon DJ, Guest JR: The *pdhR**aceEF*-*lpd* operon of *Escherichia coli* expresses the pyruvate dehydrogenase complex. *Mol Microbiol* 1994; 12: 95–104.
55. Roe A, O'Byrne C, McLaggan D, Booth I: Inhibition of *Escherichia coli* growth by acetic acid: a problem with methionine biosynthesis and homocysteine toxicity. *Microbiology* 2002; 148: 2215-2222.
56. Rosenthal AZ, Youngbae K, Gralla JD: Regulation of transcription by acetate in *Escherichia coli*: *in vivo* and *in vitro* comparisons. *Mol Microbiol* 2008; 68: 907-917.
57. Saier MH, Ramseier TM: The catabolite repressor/activator (Cra) protein of enteric bacteria. *J Bacteriol* 1996; 178:3411-3417.

-
58. Saier MH, Ramseier TM, Reizer J: Regulation of carbon utilization; in Neidhart FC (ed): *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology, ed 2. Washington, ASM, 1996, pp 1325–1343.
 59. Sanwal BD, Wright JA, Smando R. Allosteric control of the activity of malic enzyme in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* 1968; 31(4):623-627.
 60. Torres JC, Guixé V, Babul J: A mutant phosphofructokinase produces a futile cycle during gluconeogenesis in *Escherichia coli*. *Biochem J* 1997; 327: 675-684.
 61. Weber H, Polen T, Heuveling J, Wendisch VF, Hengge R: Genome-wide analysis of the general stress response network in *Escherichia coli*: sigmaS-dependent genes, promoters, and sigma factor selectivity. *J Bacteriol* 2005; 187(5):1591-1603.
 62. Wolfe A: The acetate switch. *Microbiol. Mol Biol Rev* 2005; 69: 12-50.
 63. Zhao J, Baba T, Mori H, Shimizu K: Effect of *zwf* gene knockout on the metabolism of *Escherichia coli* grown on glucose or acetate. *Metab Eng* 2004; 6(2):164-174.

Acetate Metabolism in *Escherichia coli* Strains Lacking Phosphoenolpyruvate: Carbohydrate Phosphotransferase System; Evidence of Carbon Recycling Strategies and Futile Cycles

Juan Carlos Sigala^a Salvador Flores^b Noemí Flores^a César Aguilar^a
Ramón de Anda^a Guillermo Gosset^a Francisco Bolívar^a

^aDepartamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Cuernavaca/Morelos, and ^bCentro de Instrumentos, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, Col. Doctores, México

Key Words

Catabolite repression · Gluconeogenic and glycolytic metabolisms · Phosphotransferase system · Pyruvate · Phosphoenolpyruvate · Carbon recycling and futile cycles

Abstract

The *ptsHlcr* operon was deleted from *Escherichia coli* wild-type JM101 to generate strain PB11 (PTS⁻). In a mutant derived from PB11 that partially recovered its growth capacity on glucose by an adaptive evolution process (PB12, PTS⁻Glc⁺), part of the phosphoenolpyruvate not used in glucose transport has been utilized for the synthesis of aromatic compounds. In this report, it is shown that on acetate as a carbon source, PB11 displayed a specific growth rate (μ) higher than PB12 (0.21 and 0.13 h⁻¹, respectively) while JM101 had a μ of 0.28 h⁻¹. To understand these growth differences on acetate, we compared the expression profiles of central metabolic genes by RT-PCR analysis. Obtained data revealed that some gluconeogenic genes were downregulated in both PTS⁻ strains as compared to JM101, while most glycolytic genes were upregulated in PB12 in contrast to PB11 and JM101. Furthermore, inactivation of gluconeogenic genes, like *ppsA*, *sfcA*, and *maeB*, and *poxB* gene that codes for pyruvate oxidase, has differential impacts in the acetate metabolism of these strains. Results indicate that growth differences on acetate in the PTS⁻ derivatives are due to potential carbon recycling strategies, mainly in PB11, and futile carbon cycles, especially in PB12.

Copyright © 2008 S. Karger AG, Basel

Introduction

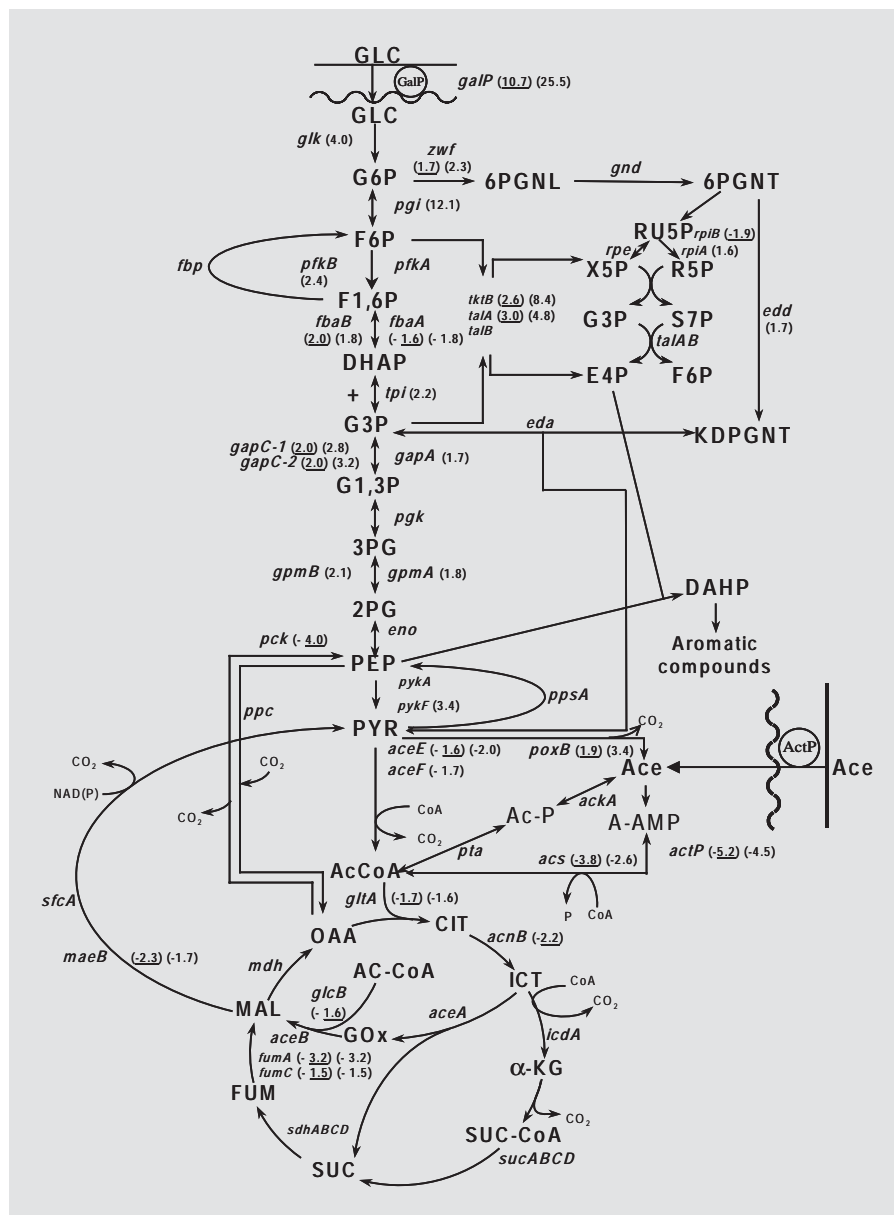
In *Escherichia coli*, the phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase system (PTS) consumes more than 50% of the glucose-derived phosphoenolpyruvate (PEP) and competes with the first step of the aromatic pathway, which condensates this metabolite with erythrose-4-phosphate to produce 3-deoxy-D-arabinoheptulosonate-7-phosphate [Postma et al., 1996]. For enhancing the capacity of aromatic compounds production in this bacteria, our group has constructed strains lacking PTS but still capable of glucose utilization. For this purpose, the *ptsHlcr* operon was deleted from *E. coli* wild-type strain JM101 generating strain PB11 (PTS⁻). Subsequently, a mutant that partially recovered its growth capacity on glucose, named PB12 (PTS⁻Glc⁺), was ob-

tained by an adaptive evolution process, in which PB11 was grown in a chemostat for more than 100 h with glucose fed at progressively higher rates [Flores N. et al., 1996, 2005]. On minimal medium with glucose (2 g/l), JM101 showed a specific growth rate (μ) of 0.71 h⁻¹ while PB11 grew slowly with a μ of 0.10 h⁻¹ and PB12 with a μ of 0.42 h⁻¹ [Flores S. et al., 2002]. *E. coli* strains lacking PTS, like PB11, cannot transport and metabolize efficiently external glucose even if it is present at a high concentration (2 g/l) in the medium, therefore the cell apparently senses a low internal glucose or glucose-6-phosphate condition that induces a carbon-scavenging response. Thus, PTS⁻ strains that grow very slowly on glucose, increase the transcription of many genes like *galP* involved in growth under stressed carbon limited conditions and *rpoS* whose product RpoS is implicated in the transcription of many genes that are expressed under these growth conditions [Ferenci, 1999; Flores N. et al., 2005, 2008; Flores S. et al., 2005; Hengge-Aronis, 2002; Hua et al., 2004; Weber et al., 2005]. In strain PB12 some of the PEP which is not consumed in glucose transport due to the lack of PTS can be redirected into the aromatic pathway, increasing the yield of aromatic compounds [Báez et al., 2007; Flores N. et al., 1996]. Detailed characterization of PB12 growing on glucose as the only carbon source was previously achieved by metabolic flux analysis [Flores S. et al., 2002] and transcriptome profiling by RT-PCR [Flores N. et al., 2005]. An important result derived from these studies was that glycolytic and gluconeogenic pathways function simultaneously in these PTS⁻ strains, allowing the co-utilization of glucose and acetate [Flores N. et al., 2005]. Carbon flux analysis also demonstrated that PB12 increases its glycolytic capacities while PB11 reduces them, as compared to JM101 when growing on glucose. It was also shown that in both PTS⁻ derivative strains, carbon flux between pyruvate and acetyl-CoA (AcCoA) doubled its value, thus indicating higher carbon recycling and gluconeogenic capacities [Flores S. et al., 2002]. In agreement with these results, transcriptome analysis showed that gluconeogenic genes such as *acs*, *yjcG* (*actP*), *aceBAK*, *glcB*, *sfcA*, *ppsA* and *fbp* are upregulated in both PTS⁻ derivative strains while most glycolytic genes, such as *glk*, *pgi* and *gapA* among others, are upregulated only in PB12 as compared to JM101 when grown on glucose [Flores N. et al., 2005]. Additionally, it is known that strain PB12 carries several mutations and some of them could be partially responsible for its faster μ on glucose than PB11. Two of these mutations map in the *arcB* and the *rpoS* genes respectively, and another is responsible for the upregulation of genes involved in

ppGpp metabolism of PB12. The analysis of some other interesting changes that occurred in this strain is on its way [Flores N. et al., 2005, 2008; Flores N. unpubl. results]. Finally, when *glk* and *galP* genes were overexpressed in a plasmid in a PB11 *arcA*⁻ mutant, the resulting strain grew faster on glucose ($\mu = 0.49$ h⁻¹) [Flores N. et al., 2007]. In fact, inactivation of the *glk* gene in strain PB12 reduced substantially the glucokinase activity and its ability to grow [Curtis and Epstein, 1975; Flores S. et al., 2002], and it has also been shown that glucose transport depends on a functional GalP protein in PB12 [Flores N. et al., 1996]. Interestingly, *glk*, *pgi* and *galP* are upregulated in PB12 but no mutation has been identified either in the structural or in the regulatory sequences of these genes [Flores N. et al., 2005].

In its natural environment, *E. coli* is frequently exposed to different carbon sources including acetate. The important role of this compound on *E. coli* physiology has been recently studied [Oh et al., 2002; Polen et al., 2003]. These authors determined that genes related to acetate metabolism and other gluconeogenic functions were upregulated while others were repressed, like the glycolytic genes, by the presence of this organic acid as carbon source. In *E. coli*, there are several reactions that produce and consume acetate. One of these is a bypass of the pyruvate dehydrogenase (Pdh) conversion of pyruvate into AcCoA mediated through pyruvate oxidase (encoded by *poxB*), and the AcCoA synthase (encoded by *acs*) (fig. 1). In *E. coli*, pyruvate oxidase (PoxB) catalyses the decarboxylation of pyruvate into acetate with the concomitant reduction of quinones at the membrane [Chang and Cronan, 1983; Gennis and Stewart, 1996]. While the Pdh is accepted as the main complex catalyzing pyruvate oxidation into AcCoA under aerobic conditions when glucose is present in high concentrations, PoxB was originally regarded as a non-essential enzyme (fig. 1) [Chang and Cronan, 1983; Phue and Shiloach, 2004; Quail et al., 1994]. However, it has been demonstrated that PoxB makes a significant contribution to the aerobic growth efficiency when *E. coli* is growing slowly on minimal medium [Abdel-Hamid et al., 2001; Flores N. et al., 2004; Moreau, 2004]. Considering the important role of acetate and its derived metabolites on central metabolism, we decided to analyze the gluconeogenic metabolism of these PTS⁻ strains by performing comparative gene expression analyses of central carbon metabolic genes by RT-PCR and the effect on μ of key genes inactivation when these strains were grown on acetate as the only carbon source. The results presented in this report demonstrate that PTS⁻ strains consume acetate at lower

Fig. 1. Central metabolic routes showing key metabolites and the genes and proteins involved in their transformation in an *E. coli* strain that lacks the PTS system. In these types of strains, glucose is transported into the cell by the GalP permease and Glk phosphorylates glucose into glucose-6-phosphate. RT-PCR values of upregulated genes (1.6-fold or higher) and downregulated genes (-1.6-fold or lower) are shown close to the gene in parentheses for strain PB12 PTS⁻Glc⁺ and underlined in parentheses for strain PB11 PTS⁻. The RT-PCR values of all the genes are presented in table 2. The abbreviations are as follows: glucose (GLC), glucose-6-phosphate (G6P), fructose-6-phosphate (F6P), fructose-1,6-phosphate (F1,6P), dihydroxy-acetone phosphate (DHAP), glyceraldehyde-3-phosphate (G3P), glyceraldehyde-1,3-phosphate (G1,3P), 3-phosphoglycerate (3PG), 2-phosphoglycerate (2PG), phosphoenolpyruvate (PEP), pyruvate (PYR), acetate (Ace), acetyl-CoA (AcCoA), acetyl phosphate (Ac-P), acetyl-AMP (A-AMP), citrate (CIT), isocitrate (ICT), glyoxylate (GOx), α-ketoglutarate (α-KG), succinyl-coenzyme A (SUC-CoA), succinate (SUC), fumarate (FUM), malate (MAL), oxaloacetate (OAA), 6-phosphogluconolactone (6PGNL), 6-phosphogluconate (6PGNT), ribulose-5-phosphate (RU5P), ribose-5-phosphate (R5P), xylulose-5-phosphate (X5P), pseudoheptulose-7-phosphate (S7P), erythrose-4-phosphate (E4P), 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate (KDPGNT), 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate (DAHP).



rates as compared to the wild-type strain, probably as the result of lower levels of cAMP that are not enough to properly induce certain gluconeogenic genes. Moreover, the upregulation of glycolytic genes in these PTS⁻ strains, specially in PB12, are apparently responsible for futile carbon cycles due to coexistence of glycolytic and gluconeogenic metabolisms in this strain when growing on acetate. Carbon recycling is also apparently present in both PTS⁻ strains. Finally, the inactivation of *ppsA*, *sfcA*, *maeB* and *poxB* have different consequences among these strains when grown on acetate.

Results and Discussion

Growth Capacity on Acetate Is Different for Both PTS⁻ Derivatives

To investigate the gluconeogenic metabolism of the PTS⁻ derivatives, their growth capacity on minimal medium with acetate as the only carbon source was determined and compared to the wild-type JM101 strain (table 1). PB12, the PTS⁻ strain that partially recovered its growth capacity on glucose, was the most affected strain when growing on acetate; this derivative also showed a

Table 1. Specific growth rates (μ) of wild-type strain and PTS⁻ derivative strains in minimal medium with acetate or glucose as the only carbon source (mean values for at least two independent cultures, each one with a duplicate, are shown; the differences between values in these experiments were <10%)

Strain	μ on acetate h ⁻¹	Growth % on acetate vs. JM101	μ on glucose h ⁻¹	Growth % on glucose vs. JM101
JM101	0.28	100	0.71	100
PB11 (PTS ⁻)	0.21	75	0.10	14
PB12 (PTS ⁻ Glc ⁺)	0.13	46	0.42	59

slight increase (3 h) in its lag phase adaptation period on acetate as compared to JM101 and PB11 strains. In contrast, PB11 that grows very slowly on glucose, exhibited a μ only 25% lower on acetate than JM101 and the same lag phase period (tables 1, 3).

In both PTS⁻ strains the lack of PTS could affect gluconeogenic metabolism in response to a low cAMP production capacity. It has been reported that the PTS component IIA^{Glc} activates adenylate cyclase (Cya), the enzyme that transforms ATP into cAMP [Postma et al., 1996]. The cAMP receptor protein (CRP)-AMPc complex activates transcription of many gluconeogenic genes such as *acs*, *actP*, *aceBAK* and *maeB* [Gosset et al., 2004]. In strains PB11 and PB12 the gene coding for IIA^{Glc} protein was deleted, however when grown on glucose, these strains upregulate the expression of many CRP-cAMP activated genes [Flores N. et al., 2005]. Therefore, it is possible that in these PTS⁻ strains a basal activity level of Cya may be responsible for low cAMP production capacity or Cya could be partially activated by other factor(s) [Park et al., 2006]. To ascertain the role of cAMP on the gluconeogenic metabolism in these mutant strains, the intracellular concentration of this metabolite was measured. As expected, it was found that on acetate strain JM101 exhibited higher levels of cAMP (30 pmol cAMP/mg protein) than strains PB11 and PB12 (6 and 7.5 pmol cAMP/mg protein, respectively). Interestingly, the addition of 10 mM cAMP to the acetate medium exerted a positive effect on growth only in strain PB12 while reducing (20–30%) the μ of JM101 and PB11 strains (table 3). These results suggest that in PB11, basal levels of active Cya supply enough cAMP required for CRP activation to allow growth on acetate almost as fast as the wild-type strain ($\mu = 0.21 \text{ h}^{-1}$), while in PB12 apparently there is not enough cAMP necessary for fast growth on this carbon

source even when the cAMP concentration is slightly higher in this strain as compared to PB11 (table 1). Apparently, a higher level of cAMP is necessary in PB12 strain to activate gluconeogenic genes at the level required to counteract the upregulation of the genes coding for the glycolytic pathway that is detected in this strain when growing on acetate (see below). Regulatory and coding regions of *cya* and *crp* genes in PB12 were previously sequenced and no changes were observed [Flores N. et al., 2005].

Transcription Profiles of Central Metabolism Genes of JM101, PB11 and PB12 Strains Grown on Acetate

The transcription profiles of several important carbon central metabolism and certain regulatory genes were determined in these strains to correlate their expression with growing capacities on acetate.

Gluconeogenic and Glyoxylate Shunt Genes

One possible explanation of why PTS⁻ derivatives have lower μ on acetate as compared to the parental strain JM101, could be a lower transcription levels of important gluconeogenic genes such as *actP*, *acs*, *maeB* and *pckA* (fig. 1; table 2). *actP* and *acs* genes are important because their protein products are responsible for the first two steps on acetate assimilation; these two genes are part of the same operon. Acetate permease (ActP) is involved in acetate transport and is encoded by *actP* [Gimenez et al., 2003]. Once inside the cell, acetate can be transformed into AcCoA by *Acs* or via the phosphotransacetylase (Pta) and acetate kinase (AckA). *Acs* converts acetate, ATP and coenzyme A (CoA-SH) into AcCoA and AMP (fig. 1). This reaction is irreversible in vivo and functions only anabolically [Wolfe, 2005]. The *acsyjcHactP* operon is activated by the CRP-cAMP complex [Beatty et al., 2003; Gosset et al., 2004]. As mentioned, PB11 and PB12 strains had lower cAMP concentration as compared to JM101; this situation could be in part responsible for the relatively low transcription levels of this operon in these PTS⁻ derivatives when grown on acetate as compared to JM101 (fig. 1; table 2). In a wild-type strain there was a strong upregulation of the *acsyjcHactP* operon when growing on acetate because there is no glucose to exert catabolic repression. Although there was a relative low expression level of this operon in PB11 as compared to JM101 strain, its expression should be sufficient to sustain the faster growth of PB11 on acetate than on glucose (fig. 1; table 2). In *E. coli* there are two gluconeogenic routes to redirect carbon skeletons from the tricarboxylic acid (TCA) cycle intermediates into PEP: (a) direct

Table 2. Relative transcription levels determined by RT-PCR of several group of genes from strains JM101, PB11 and PB12 grown on acetate as the only carbon source

Genes	Expression levels as $2^{-\Delta\Delta CT}$ (positive values) or $1/2^{-\Delta\Delta CT}$ (negative values) with JM101 as normalizing value		Genes	Expression levels as $2^{-\Delta\Delta CT}$ (positive values) or $1/2^{-\Delta\Delta CT}$ (negative values) with JM101 as normalizing value	
	PB11	PB12		PB11	PB12
Gluconeogenesis and glyoxylate shunt			Pentose phosphate pathway		
<i>aceA</i>	-1.07 ± 0.05	-1.10 ± 0.31	<i>gnd</i>	1.26 ± 0.27	1.34 ± 0.35
<i>aceB</i>	ND	-1.07 ± 0.23	<i>rpe</i>	-1.25 ± 0.19	-1.15 ± 0.24
<i>acs</i>	-3.79 ± 0.88	-2.58 ± 0.59	<i>rpiA</i>	1.02 ± 0.14	1.59 ± 0.15
<i>actP (yjcG)</i>	-5.23 ± 1.36	-4.47 ± 0.60	<i>rpiB</i>	-1.95 ± 0.23	-1.55 ± 0.23
<i>fbp</i>	1.07 ± 0.27	1.27 ± 0.38	<i>talA</i>	2.97 ± 0.64	4.78 ± 1.15
<i>glcB</i>	-1.64 ± 0.45	-1.55 ± 0.29	<i>talB</i>	-1.15 ± 0.15	1.17 ± 0.32
<i>maeB</i>	-2.35 ± 0.55	-1.70 ± 0.36	<i>tktA</i>	-1.09 ± 0.20	ND
<i>pckA</i>	-3.97 ± 1.08	-1.43 ± 0.27	<i>tktB</i>	2.59 ± 0.16	8.39 ± 1.92
<i>ppsA</i>	-1.13 ± 0.01	-1.12 ± 0.26	<i>zwf</i>	1.67 ± 0.13	2.28 ± 0.06
<i>sfcA</i>	-1.23 ± 0.04	-1.12 ± 0.04	Genes coding for regulatory proteins		
Glycolysis			<i>arcA</i>	-1.04 ± 0.06	1.05 ± 0.13
<i>aceE</i>	-1.57 ± 0.08	-2.01 ± 0.20	<i>arcB</i>	1.02 ± 0.12	1.43 ± 0.36
<i>aceF</i>	-1.23 ± 0.22	-1.68 ± 0.07	<i>crp</i>	-1.33 ± 0.11	-1.34 ± 0.34
<i>eno</i>	1.11 ± 0.28	-1.14 ± 0.00	<i>csrA</i>	1.22 ± 0.28	1.28 ± 0.28
<i>fbaA</i>	-1.64 ± 0.19	-1.78 ± 0.21	<i>cyaA</i>	-1.15 ± 0.09	1.12 ± 0.02
<i>fbaB</i>	1.97 ± 0.02	1.81 ± 0.25	<i>fadR</i>	-1.07 ± 0.01	-1.11 ± 0.11
<i>gapA</i>	-1.27 ± 0.12	1.72 ± 0.37	<i>fis</i>	1.64 ± 0.28	1.53 ± 0.03
<i>gapC-1</i>	1.97 ± 0.10	2.82 ± 0.08	<i>cra (fruR)</i>	1.31 ± 0.23	-1.38 ± 0.39
<i>gapC-2</i>	2.05 ± 0.02	3.23 ± 0.22	<i>iclR</i>	ND	-1.05 ± 0.27
<i>glk</i>	1.02 ± 0.18	3.98 ± 1.17	<i>mlc</i>	-1.20 ± 0.04	1.01 ± 0.23
<i>gpmA</i>	-1.07 ± 0.18	1.78 ± 0.16	<i>rpoS</i>	1.91 ± 0.51	1.56 ± 0.28
<i>gpmB</i>	1.16 ± 0.26	2.07 ± 0.52	Other		
<i>pfkA</i>	1.31 ± 0.32	1.02 ± 0.07	<i>galP</i>	10.71 ± 3.10	25.54 ± 7.28
<i>pfkB</i>	1.43 ± 0.22	2.45 ± 0.20	<i>poxB</i>	1.92 ± 0.26	3.45 ± 0.75
<i>pgi</i>	1.26 ± 0.19	12.12 ± 3.11	<i>ppc</i>	-1.20 ± 0.30	-1.08 ± 0.04
<i>pgk</i>	-1.03 ± 0.11	1.14 ± 0.07	<i>pta</i>	-1.08 ± 0.23	1.02 ± 0.20
<i>pykA</i>	-1.31 ± 0.16	-1.26 ± 0.05	<i>ptsG</i>	4.12 ± 1.03	3.35 ± 0.55
<i>pykF</i>	1.56 ± 0.08	3.41 ± 0.57			
<i>tpi</i>	1.04 ± 0.14	2.22 ± 0.08			
TCA cycle					
<i>acnB</i>	-2.25 ± 0.39	-1.50 ± 0.32			
<i>fumA</i>	-3.21 ± 0.86	-3.16 ± 0.44			
<i>fumC</i>	-1.52 ± 0.14	-1.51 ± 0.34			
<i>gltA</i>	-1.70 ± 0.38	-1.56 ± 0.29			
<i>icdA</i>	-1.28 ± 0.35	1.17 ± 0.21			
<i>mdh</i>	-1.46 ± 0.27	1.28 ± 0.27			
<i>sdhA</i>	-1.34 ± 0.26	-1.37 ± 0.33			
<i>sdhB</i>	-1.32 ± 0.25	-1.31 ± 0.26			
<i>sdhC</i>	-1.12 ± 0.20	-1.39 ± 0.38			
<i>sdhD</i>	-1.14 ± 0.33	-1.52 ± 0.23			
<i>sucA</i>	1.17 ± 0.19	-1.31 ± 0.31			
<i>sucB</i>	1.00 ± 0.07	1.21 ± 0.17			
<i>sucC</i>	-1.13 ± 0.11	1.15 ± 0.21			
<i>sucD</i>	-1.27 ± 0.20	1.04 ± 0.25			

For each gene in all strains, the transcription level of the gene for the wild-type strain JM101 was used as the control to normalize the data using the wild-type RT-PCR value for that gene as one. Results presented are the averages of three independent measurements of the RT-PCR expression values for each gene. Negative values indicate lower expression levels than the one detected for that gene in the parental JM101 strain and were calculated by dividing $1/2^{-\Delta\Delta CT}$. Values were obtained from different cDNAs generated from at least two independent bioreactor samples. The RT-PCR expression values obtained for each gene differ <30%. SD values for each gene are shown in parentheses. ND = Not determined with adequate standard deviation (<30%).

generation of PEP from oxaloacetate (OAA) by the PEP carboxykinase (PckA) enzyme coded by the *pckA* gene, and (b) transformation of malate into pyruvate by two malate dehydrogenase enzymes (SfcA and MaeB) [Hansen and Juni, 1975, 1979] with the subsequent transformation of pyruvate into PEP by the PEP synthase (PpsA) enzyme coded by *ppsA*. Two of these gluconeogenic genes, *pckA* and *maeB*, had different expression levels in both PTS⁻ derivatives as compared to JM101. *pckA* showed relatively low transcription level in PB11 (-4), whereas in PB12 it did not significantly change as compared to JM101 (table 2). PEP carboxylase (Ppc) carries out the reverse reaction accomplished by PckA and its coding gene (*ppc*) had the same transcription level on acetate in the three strains (fig. 1; table 2). Regarding the alternative gluconeogenic pathway in *E. coli*, the *maeB* gene showed lower transcription levels in both PTS⁻ derivatives as compared to JM101 while *sfcA* did not change significantly its expression. It is known that both *maeB* and *sfcA* genes are repressed on glucose in the wild-type strain [Gosset et al., 2004; Murai et al., 1971]. Recently, it has been reported that *maeB* is activated by CRP while *sfcA* has apparently a constitutive expression [Gosset et al., 2004]. It is interesting to notice that the transcription level of the *acsyjcHactP* operon and *maeB* gene, both activated by CRP, was downregulated in strains PB11 and PB12 as compared to JM101 strain; again, this effect could be associated with the reduced cAMP concentrations in the PTS⁻ strains. Other important genes in gluconeogenic metabolism, like *aceB* and *aceA* (glyoxylate shunt), *ppsA* and *fbp*, exhibited significantly the same expression levels in both PTS⁻ derivatives and in the wild-type strain (fig. 1; table 2). With this information, it can be proposed that decreased μ of PTS⁻ derivatives on acetate in contrast to wild-type strain is the result, at least in part, of low relative expression levels of the *acsyjcHactP* operon, *maeB* and *pckA* (only in PB11) genes. It is important to point out that on glucose practically all these gluconeogenic genes have very high expression values in the PTS⁻ derivative strains, as compared to JM101 [Flores N. et al., 2005].

Glycolytic Genes

In PB12 the majority of the genes of the glycolytic pathway were upregulated, while only few in PB11, as compared to JM101 (fig. 1; table 2). Given the reversible nature of most of the reactions catalyzed by the products of these genes, the physiological relevance of high expression values of these glycolytic genes will depend on several factors, including the intracellular concentrations of metabolites that could influence the direction of the reac-

tions. However, the irreversible glycolytic reactions catalyzed by PykF and PfkB could have relevant roles in the PB12 phenotype on acetate because they may counteract non-reversible gluconeogenic reactions accomplished by PpsA and Fbp, respectively. Enzyme PykF transforms PEP into pyruvate with the generation of ATP and the *pykF* gene was significantly upregulated on acetate in PB12 and slightly on PB11 as compared to the wild-type strain (fig. 1; table 2). Therefore, high PykF activity could be a factor defining growth characteristics of PB12, which is the strain with lowest μ on acetate. In this situation, some of the PEP produced from OAA by PckA or produced from malate and pyruvate by MaeB SfcA-PpsA could be retransformed into pyruvate by PykF and not derived to the upper section of gluconeogenic metabolism to generate biosynthetic precursors, thus leading to a possible futile cycle in this strain in this metabolic node. Metabolic flux analysis in a wild-type strain grown on acetate indicates that carbon flux from PEP into pyruvate is not favored in this condition [Zhao et al., 2004]. An additional case of potential carbon futile cycle in strain PB12 is related to the PfkB enzyme; this protein catalyzes the formation of fructose-1,6-P from fructose-6-P. This reaction could counteract the activity of the gluconeogenic Fbp enzyme, thus resulting in low concentration of fructose-6-P and consequently low levels of glucose-6-phosphate in strain PB12. The negative impact of this cycle on either the intracellular ATP pool or the flux of carbon skeletons to anabolic pathways, or both, would eventually result in a slower μ on acetate as has been reported for a *pfkB* mutant grown on glycerol [Torres et al., 1997]. As a consequence of lower glucose-6-phosphate synthesis capacity, the carbon flux through the pentose pathway in PB12 could be affected, thus reducing the production of important biosynthetic precursors and NADPH. In agreement with this proposition, low concentrations of ribose (0.01 g/l) in the acetate medium had a positive effect solely on the PB12 strain by increasing its μ 46% and reducing the lag phase period 3 h (data not shown). Thus, the potentially contradictory simultaneous glycolytic and gluconeogenic fluxes in PB12 strain on acetate could be in part responsible for its slower μ when compared to JM101 and PB11. Finally, it is noteworthy that *galP*, *glk* and *pgi* genes were highly expressed in PB12 in contrast to JM101 and PB11 on acetate (fig. 1; table 2). It is known that GalP and Glk activities are essential for the PTS⁻Glc⁺ phenotype in PB12 since they are involved in glucose transport and phosphorylation, respectively [Flores S. et al., 2002]. High expression of *pgi* on acetate in PB12 as compared to JM101 and PB11 was also remarkable al-

though Pgi catalyzes a reversible reaction and it is expected to function both in glycolytic and gluconeogenic conditions depending on substrate concentrations. Moreover, *galP* was upregulated in both PTS⁻ derivatives probably because these strains are responding, due to their slow growth, to a carbon-scavenging situation [Ferenci, 1999; Flores N. et al., 2005, 2007; Flores S. et al., 2005; Weber et al., 2005]. Interestingly, upregulation of *pgi* and *glk* also occurred in PB12 but not in PB11 when grown on glucose [Flores N. et al., 1996, 2005]. However, it is remarkable that the upregulation of most glycolytic genes remains in strain PB12 independently of the carbon source present in the growth medium. Simultaneous upregulation of most glycolytic genes and low expression of gluconeogenic genes, when strain PB12 is grown on acetate, suggests that in this strain both pathways are functional under these growing conditions. Thus, the existence of futile metabolic cycles may explain in part the low μ on acetate in this strain.

TCA Cycle Genes

Most of the TCA cycle genes exhibited the same expression levels on acetate in the three strains (fig. 1; table 2). In gluconeogenic metabolism, *E. coli* canalizes some carbon flux through the glyoxylate shunt to avoid decarboxylations and loss of carbon through the lower part of the TCA cycle [Cronan and LaPorte, 1996; Flores N. et al., 2005; Zhao et al., 2004]. However, when *E. coli* is growing fast, energy is mainly generated in the lower TCA cycle reactions due to the reduction of cofactors that can be used to produce ATP by the respiratory chain. Zhao et al. [2004] determined that approximately 20% of incoming acetate is distributed through the glyoxylate shunt while 55% goes to the lower part of the TCA cycle in wild-type *E. coli*. The isocitrate node is a key metabolic valve strictly controlled [Cronan and LaPorte, 1996], however PTS⁻ derivative strains have the same expression levels on the *icdA* and *aceBAK* genes on acetate as compared to the wild-type strain. Recently, a point mutation in the *arcB* gene in the PB12 strain has been reported as apparently responsible for the slight upregulation of the TCA cycle genes when glucose is used as carbon source [Flores N. et al., 2005], however the effect of this mutation was not detected when acetate is used as the sole carbon source. Both *arcA* and *arcB* genes displayed similar expression values in the PTS⁻ derivative strains on acetate as compared to the wild-type JM101 strain (table 2). Finally, *gltA* and *fumAC* in both PTS⁻ derivatives, and *acnB* only in PB11 showed lower expression levels as compared to wild-type strain. These results could reflect

a lower flux through the TCA cycle in both PTS⁻ derivatives, in contrast to JM101, associated with a possible low AcCoA production capacity due to a relative lower expression of the *acs* and *actP* genes in the PB11 and PB12 strains. Moreover, low expression levels of *fumAC* in these PTS⁻ strains on acetate, could also reflect lower production of malate from fumarate, being malate preferentially produced in these strains via the glyoxylate shunt [Cronan and LaPorte, 1996; Flores N. et al., 2005].

Genes Involved in the Synthesis of Acetate

Transcription levels of the *pta* and *ackA* genes involved in transformation of AcCoA into acetate were the same in the three strains growing on acetate. However, the *poxB* gene was upregulated in both PTS⁻ derivatives as compared to the parental strain (fig. 1; table 2). Similar results are obtained for all these genes when these strains are grown on glucose [Flores N. et al., 2005].

Pentose Pathway Genes

The expression of the *zwf* gene on acetate was upregulated in both PTS⁻ strains as compared to the JM101 strain (fig. 1; table 2). According to carbon flux analysis data in wild-type *E. coli* grown on acetate, flux through pentose pathway is only 1% of total carbon [Zhao et al., 2004]. These reported results indicate that the pentose pathway in *E. coli* wild-type strains on gluconeogenic conditions apparently functions at a low level just to provide the necessary amount of precursor metabolites to sustain growth. Furthermore, the *tktB* and *talA* genes were also upregulated in PB11 and PB12 strains, and *rpiA* only in PB12 as compared to JM101 (fig. 1; table 2). Upregulation of these genes also occur on glucose and could suggest higher carbon skeletons exchange in the PTS⁻ between glycolysis and pentose pathways, probably as a response to compensate a higher need of ribose-5-P and NADPH for biosynthesis, in particular for the PB12 strain [Flores et al., 2005]. The upregulation of all these genes was higher in PB12 than in PB11 (fig. 1; table 2). In agreement with these results and as previously mentioned, the addition of ribose to the acetate medium increased μ from 0.13 to 0.19 h⁻¹ only in strain PB12.

Genes Coding for Regulatory Proteins

The transcription of genes coding for regulatory proteins was also analyzed and no significant differences among these strains were observed (table 2). Only *rpoS* was slightly upregulated in PB11 and PB12 strains in contrast to JM101. This result could indicate that in both PTS⁻ derivatives there is a stress response on acetate as it

Table 3. Specific growth rates (μ) and lag phase periods (h) of the PB11 PTS⁻, PB12 PTS⁻Glc⁺ and JM101 strain and their derivatives grown on minimal medium with acetate as the only carbon source (mean values for at least two independent cultures, each one with a duplicate, are shown; the differences between values in these experiments were <10%)

Strain	μ on acetate, h ⁻¹	Lag phase, h	Growth % vs. PB11
PB11	0.21	5	100
PB11 + cAMP	0.15	9	71
PB11 <i>ppsA</i>	0.09	37	43
PB11 <i>maeB</i>	0.12	8	57
PB11 <i>sfcA</i>	0.07	12	33
PB11 <i>maeB sfcA</i>	0.02	37	10
PB11 + alanine	0.26	4	124
PB11 <i>maeB sfcA</i> + alanine	0.26	5	124
PB11 <i>pckA</i>	0.22	4	105
PB11 <i>poxB</i>	0.12	7	57

			Growth % vs. PB12
PB12	0.13	8	100
PB12 + cAMP	0.17	14	133
PB12 <i>ppsA</i>	0.11	43	85
PB12 <i>maeB</i>	0.15	9	115
PB12 <i>sfcA</i>	0.13	11	100
PB12 <i>maeB sfcA</i>	0.05	33	38
PB12 + alanine	0.21	6	162
PB12 <i>maeB sfcA</i> + alanine	0.18	5	138
PB12 <i>pckA</i>	0.12	12	92
PB12 <i>poxB</i>	0.09	16	69

			Growth % vs. JM101
JM101	0.28	5	100
JM101 + cAMP	0.23	7	82
JM101 <i>ppsA</i>	0.13	9	46
JM101 <i>maeB</i>	0.24	6	86
JM101 <i>sfcA</i>	0.27	5	96
JM101 <i>maeB sfcA</i>	0.14	40	50
JM101 + alanine	0.27	5	96
JM101 <i>maeB sfcA</i> + alanine	0.29	5	104
JM101 <i>pckA</i>	0.24	7	86
JM101 <i>poxB</i>	0.29	5	104

occurs on glucose, where *rpoS* was also upregulated in PB11 and PB12 strains as compared to JM101. In the PTS⁻ strains, *rpoS* upregulation is apparently the result of slow growing conditions [Flores N. et al., 2008; Weber et al., 2005].

Differential Contributions on Acetate Metabolism of Gluconeogenic Enzymes Involved in the Synthesis of PEP or Pyruvate in the PTS⁻ Strains

Considering the importance of the two gluconeogenic routes involved in the transformation of carbon skeletons from the TCA cycle into pyruvate and PEP, and the differences observed in gene expression profiles on acetate, we decided to inactivate *ppsA*, *pckA* and the genes that code for the two malate dehydrogenases (*sfcA* and *maeB*) in strains PB11, PB12 and JM101, and compare their growth capacity on acetate to gain a better understanding of the gluconeogenic metabolism in these strains.

Inactivation of the *ppsA* Gene

Inactivation of *ppsA* gene drastically reduced μ on acetate of PB11 *ppsA* and JM101 *ppsA* strains and slightly in the PB12 *ppsA* derivative as compared to their parental strains (table 3). These results suggest that in the absence of PpsA, PckA supplies enough PEP to sustain slow growth of strain PB12 *ppsA* but this does not occur in strains PB11 *ppsA* and JM101 *ppsA*. Also the lack of *ppsA* gene drastically affected the adaptation capabilities for growth on acetate of PB11 *ppsA* and PB12 *ppsA* derivatives since their lag phases lasted more than 30 h in contrast to the slight increase in the lag phase period of strain JM101 *ppsA* (table 3); the pronounced lag phases in these strains are presumably the result of lower amounts of AMPc. Recently, it has been reported that *E. coli* BW25113 strain with an inactive *ppsA* gene shows also a delay of several hours to begin growing on acetate but apparently without a significant μ reduction [Kao et al., 2005]. These authors proposed that *ppsA* inactivation could affect cAMP concentration because of insufficient PEP that can transfer its phosphate group through the PTS system to the IIA^{Glc} component to activate Cya. Our results indicate that the JM101 *ppsA* mutant increased slightly its lag phase but most importantly, also reduced its μ significantly (>50%); it is possible that insufficient PEP production due to the absence of the *ppsA* gene reduces cAMP production and also limits biosynthetic capacities in this wild-type strain. In the case of the PTS⁻ *ppsA* derivatives, lack of enough PEP due to *ppsA* inactivation has more implications on acetate adaptation because these strains also have lower cAMP levels.

Inactivation of the *maeB* and *sfcA* Genes

Inactivation of *sfcA* in strain PB11 *sfcA* reduced its μ on acetate almost 70% and increased the lag phase by 7 h as compared to PB11. Also when *maeB* was inactivated in strain PB11 *maeB*, the μ on acetate diminished 43%, as

compared to its parental strain but with no important effect on the adaptation phase. This result is interesting since the absence of a single malic enzyme in strains JM101 and PB12 had no significant growth or adaptation effects on acetate, indicating that in these two strains one of the two malic enzymes can substitute adequately for the other (table 3). It is possible that strain PB11 needs both malic enzymes not only to supply enough pyruvate for biosynthesis, but also to balance reduced cofactors depending on the metabolic needs for either NADH or NADPH. These results suggest that a decreased production capacity for NADH could have an important negative impact on growth and adaptation on acetate since strain PB11 *sfcA*, where NADPH is preferentially produced, is more affected (table 3). It is noteworthy that inactivation of *maeB* in PB12 increased its μ slightly while inactivation of *sfcA* does not affect either growth or lag phase adaptation considerably. When both *sfcA* and *maeB* genes were simultaneously inactivated, μ and lag phases adaptation periods on acetate were drastically affected in all strains (table 3); similar results have been reported for *E. coli* strain BW25113 *maeB sfcA* PTS⁺ [Kao et al., 2005]. However, growth reduction due to simultaneous *sfcA* and *maeB* inactivation was more pronounced in the PTS⁻ strains (table 3), PB11 *sfcA maeB* being the most affected. These results indicate that PckA activity alone cannot sustain growth and adaptation on acetate for PTS⁻ derivatives and JM101 when *maeB* and *sfcA* are inactive, probably not only for PEP but also for pyruvate biosynthetic requirements. This metabolite is utilized for biosynthesis of alanine, valine, and leucine amino acids, and it has been also reported that when wild-type *E. coli* is grown on acetate, flux from PEP to pyruvate is not detected [Zhao et al., 2004]. Therefore, double *maeB* and *sfcA* mutants are probably unable to synthesize sufficient pyruvate from PEP on acetate even if there is upregulation of *pykF* in both PTS⁻ strains, specially in PB12; apparently, this pyruvate deficiency could be more drastic in the case of PB11 because in this strain *pckA* is highly downregulated as compared to JM101 (fig. 1, table 2). In addition, it is also possible that part of the pyruvate produced in the PTS⁻ strains is transformed by PoxB into acetate for recycling purposes (see below). Interestingly, the proposed pyruvate deficiency is abolished when alanine (0.5 g/l) is added to the acetate medium. Alanine can be used for biosynthesis purposes and can be transformed directly into pyruvate [McFall and Newman, 1996]. Complementation with alanine restored growth and eliminated the prolonged lag phases in all three strains with *maeB* and *sfcA* mutations (table 3). Moreover, alanine addition

significantly increased μ of strains PB11 *maeB sfcA*, PB12 *maeB sfcA*, PB12 and PB11 (table 3). These results suggest that strains PB11 and PB12 have intrinsic pyruvate deficiencies when growing on acetate.

Inactivation of the *pckA* Gene

PckA catalyzes decarboxylation of OAA into PEP. This reaction is a direct gluconeogenic route to provide this metabolite from TCA cycle compounds. However, for JM101 *pckA* and its PTS⁻ *pckA* derivatives, inactivation of PckA did not exert relevant effects on acetate growth and adaptation (table 3). These results indicate that in these strains when growing on acetate, the main gluconeogenic route is the PpsA-malic enzymes and not PckA.

Inactivation of the *poxB* Gene

PoxB catalyzes the transformation of pyruvate into acetate with associated FAD reduction. The expression of *poxB* depends on RpoS and it is known that this gene is expressed in stress conditions including growing slowly on glucose [Chang et al., 1999; Henge-Aronis, 2002; Flores N. et al., 2004, 2005]. As mentioned, the *poxB* gene is upregulated both in PB11 and PB12 on acetate. Inactivation of *poxB* gene reduced μ on acetate of strains PB11 *poxB* and PB12 *poxB* approximately 45 and 30% respectively, as compared to that of the parental strains, while strain JM101 *poxB* had no effect on its μ (table 3). In addition, *poxB* inactivation in both PTS⁻ derivatives increased the lag phase periods, in particular in PB12 *poxB* (table 3). Therefore, in both PTS⁻ strains that grow slowly on acetate, PoxB could be an important enzyme that utilizes pyruvate to transform it into acetate for ATP production and carbon recycling purposes reducing CO₂ production. A similar result was obtained when strain PB11 *poxB* was grown on glucose where its μ was reduced 50% as compared to strain PB11; however, the inactivation of *poxB* in strain PB12 did not reduce its μ when grown on glucose probably because this strain grows relatively fast on this substrate [Flores N. et al., 2004; Hua et al., 2004].

Concluding Remarks

Results presented in this report suggest that strain PB12 (PTS⁻ Glc⁺), which was selected for faster growth on glucose than PB11 (PTS⁻), displayed a lower μ on acetate as compared to JM101 due to low relative expression levels of some gluconeogenic genes (*acs*, *actP*, and *maeB*) and simultaneous upregulation of most glycolytic genes, es-

pecially *pykF* and *pfkB*, as compared to the wild-type strain. Also, the results obtained provide evidence that PB12 growing on acetate has a limited capacity of cAMP and pyruvate production, as compared to PB11 and JM101. Apparently, during the selection process of PB12 as a faster grower on glucose in which several mutations appeared, the expression of many genes coding for the glycolytic enzymes were upregulated. It is noteworthy that this situation prevails also when this strain is grown on acetate. A possible explanation for this result is that a general regulatory mechanism has been modified in PB12, that allows the upregulation of these genes in both glycolytic or gluconeogenic growth conditions. In agreement with this proposition, it is known that in the PTS⁻ strains growing on glucose, the expression of many glycolytic genes is partially RpoS dependant [Flores N. et al., 2008]. In contrast, strain PB11 (PTS⁻) grows faster on acetate than PB12 but not as well as JM101. This could be explained because, although it has also a low expression level of gluconeogenic genes (*acs*, *actP*, *maeB* and *pckA*), it has only few glycolytic genes (*gapC-1*, *gapC-2*, *fbaB* and *pykF*) upregulated as compared to JM101. As in the case of PB12, strain PB11 has lower cAMP level as compared to JM101, but seems to be sufficient to allow the expression of gluconeogenic genes required for growth on acetate. Since both PTS⁻ derivatives have low transcription levels of gluconeogenic genes, being more pronounced in PB11 and PB12 have higher transcription levels of practically all the glycolytic pathway, it seems that growth differences on acetate between strains PB11 and PB12 are due to possible futile carbon cycles, mainly in PB12, where both gluconeogenic and glycolytic metabolisms are simultaneously present. Carbon recycling mainly through PoxB and Acs in both PTS⁻ strains could be part of the cell carbon recycling strategy to reduce carbon oxidation to CO₂ in these strains that grow relatively slow on acetate. The same metabolic pattern also happens in PB11 when it grows slowly on glucose [Flores N. et al., 2004]. On the other hand, gene inactivation experiments allowed the determination that the malic enzymes (MaeB-sfcA)-PpsA route is the main gluconeogenic pathway in the PTS⁻ derivative strains and in JM101 and not the PckA route. PpsA inactivation in these three strains apparently alters significantly PEP production for biosynthesis and indirectly for cAMP formation, being this deficiency more drastic in the PTS⁻ derivative strains due to the absence of the PTS IIA^{Glc} component. Interestingly, single malic enzyme inactivation affected only strain PB11 probably because these two enzymes are both needed to balance NADH/NADPH co-factor requirements in

this strain on acetate. The double malic enzyme inactivation drastically affects growth and adaptation on acetate of the PTS⁻ derivative strains and the parental strain JM101 apparently because pyruvate production is substantially altered and PckA cannot provide enough PEP in these growing conditions. Alanine complementation of acetate medium completely restores growth and adaptation capabilities on acetate of all strains carrying double *maeB* and *sfcA* inactivations. Furthermore, PB11 and PB12 strains also increase substantially their μ on acetate when alanine is added to the medium, probably reflecting, as mentioned, low level pools of pyruvate. These results are in agreement with a pyruvate deficiency in these strains probably as a result of different carbon utilization strategies that can transform this compound into other metabolites, in particular via PoxB to produce acetate and reduced quinones at the membrane for ATP production. Finally, *poxB* inactivation causes a substantial μ reduction of the PTS⁻ strains, especially in PB11, indicating the important role of PoxB in these strains that are growing slowly on acetate. These results suggest that the lack of catabolic repression by glucose allows different carbon utilization strategies and the coexistence of gluconeogenic and glycolytic metabolisms in the PTS⁻ derivatives when they grow on glucose [Flores N. et al., 2004, 2005; Flores S. et al., 2005], or on acetate as has been shown in this report. These results allow a better understanding of the physiology of these PTS⁻ strains that can utilize simultaneously several carbon sources and due to this capacity, enhance the production of aromatic compounds [Báez et al., 2007; Flores S. et al., 2005; Martínez et al., 2008]. This report also extends the knowledge concerning the metabolic plasticity of *E. coli* that could be used for the defining novel metabolic engineering strategies which utilize PTS⁻ derivative strains in the production of aromatic compounds.

Experimental Procedures

Bacterial Strains, Growth Conditions and Recombinant DNA Techniques

E. coli strains JM101 (F' *traD36 proA*⁺ *proB*⁺ *lacI*^q*lacZ* Δ M15/*supE thi* Δ (*lac-proAB*)), PB11 (JM101 Δ (*ptsH, ptsI, crr*):*kan*) and PB12 (PB11, PTS⁻ Glc⁺) have been described [Flores N. et al., 1996, 2005]. Cloned *maeB* and *sfcA* genes were disrupted in vitro by the insertion of a chloramphenicol gene flanked by two parallel loxP sites (Cm-lox) [Palmeros et al., 2000]; PCR products of the disrupted genes were used to generate the corresponding mutants in the three strains following the method published by Datsenko and Wanner [2000]. For the double *maeB sfcA* inactivation, Cm-lox was removed from *maeB* mutant strains and *sfcA* Cm-lox PCR product was used as described. The DNA sequence of the oligo-

nucleotides used to amplify native and disrupted *maeB* and *sfcA* genes were: *maeB*, 5' CGC-CAC-GTT-GTG-GGC-AGG-GGC and 5' GGA-GAG-ATA-TTC-GCT-GTG-GTG-C; *sfcA*, 5' CTT-GAC-GCC-GAC-GCC-CTG-GCG-G and 5' GAG-ATT-TAT-TCG-CCA-CTA-CCC. The *pckA* and *ppsA* genes were also disrupted by this method by using oligonucleotides previously reported [Oh et al., 2002]; all gene disruptions were confirmed by PCR (data not shown). Strains with inactive *poxB* genes were previously reported [Flores N. et al., 2004]. For inocula preparations, strains stored at -72°C in glycerol were inoculated on LB medium and then cells were transferred into M9 minimal medium with 2 g/l of glucose. When cultures reached residual glucose concentration, between 0.3 and 0.1 g/l, these were inoculated into prewarmed M9 minimal medium with acetate (2 g/l) as the only carbon source (OD_{600} of 0.08). Residual glucose concentrations were measured with the Accu-Chek blood glucose monitoring system (Roche). Optical density measurements were performed using a Klett/Summerson photocolormeter, model 800-3. When required, alanine, cAMP or ribose were added to the acetate medium to a final concentration of 0.5 g/l, 10 mM and 0.01 g/l, respectively. All μ presented in tables 1 and 3 are the averages of values of at least two independent cultures, each one in duplicate. Triplicate cultures for RNA isolation were grown in 1-liter reactors on M9 medium with 2 g/l of acetate, at 37°C , 600 rpm and air flow rate of 1 v.v.m., starting at an OD_{600} of 0.08 and collected when growing in the log phase at an OD_{600} of 0.5.

Measurement of cAMP Concentrations

The cAMP content in cell extracts was determined by using the cyclic AMP ^3H Assay System kit from Amersham-Pharmacia Biotech. Cells were grown in M9 minimal medium with acetate (2 g/l) and after reaching an OD_{600} of 0.5, 25 ml of cultures were centrifuged, pelleted and resuspended in assay buffer (50 mM Tris, 4 mM EDTA, pH 7.5). Cells were then boiled for 15 min and centrifuged to remove cell debris. The supernatant was used for cAMP determination according with the kit instructions.

RNA Extraction and cDNA Synthesis

Total RNA extraction was performed using hot-phenol equilibrated with water. After extractions, RNA was precipitated with 3 M sodium acetate/ethanol and centrifuged 20,000 g at 4°C . Supernatant was discarded and the RNA resuspended in water. RNA was treated with DNase kit (DNA-freeTM, Ambion) and its concentration measured by absorbance at 260 nm; its integrity and purity was assessed by densitometry in agarose gels and by 260/280 nm ratio absorbance. cDNA was synthesized using RevertAidTM

H minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Inc.) and a mixture of specific DNA primers for the utilized genes whose nucleotide sequences have been previously published [Flores N. et al., 2005]. cDNA was used as template for RT-PCR assays.

Real-Time PCR

Real-time PCR (RT-PCR) was performed with the ABI Prism 7000 Sequence Detection System (PerkinElmer/Applied Biosystems) using the SYBR Green PCR Master Mix kit (PerkinElmer/Applied Biosystems). Amplification conditions were 10 min at 95°C , and a two-step cycle at 95°C for 15 s and 60°C for 60 s for a total of 40 cycles. The DNA sequences of the primers for specific amplifications were previously designed [Flores N. et al., 2005] using the Primer Express software (PE Applied Biosystems). The size of all amplimers was 101 bp. The final primer concentration, in a total volume of 15 μl , was 0.2 μM . 5 ng of target cDNA for each gene was added to the reaction mixture. All experiments were performed in triplicate for each gene of each strain, obtaining very similar values (differences of <0.3 SD). A non-template control reaction mixture was included for each gene. The quantification technique used to analyze data was the $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ method described by Livak and Schmittgen [2001]. Down-regulation negative values were obtained by dividing $1/2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ for each case. The data were normalized using the *ihfB* gene as an internal control (housekeeping gene). The same expression level of this gene in all the strains in the conditions in which bacteria were grown was detected [Flores N. et al., 2005]. For each analyzed gene in all strains the transcription level of the wild-type gene, considered as one, was used as the control to normalize the data. Therefore, data are reported as relative expression levels, compared to the expression level of the same gene in strain JM101. The results presented in table 2 and figure 1 are the averages of at least three independent measurements of the RT-PCR expression values for each gene. Values were obtained from different cDNAs generated from at least two independent bioreactor samples.

Acknowledgments

We thank Katy Juarez for technical support in the cAMP determinations. We also thank Mercedes Enzaldo for technical assistance (Instituto de Biotecnología-UNAM, México). Support for J.C. Sigala was provided by fellowships from CONACyT Mexico and UNAM. This work was financially supported by CONACyT D43243Z and 44126, and PAPIIT/DGAPA/UNAM 205005-2 grants.

References

- Abdel-Hamid AM, Attwood MM, Guest JR: Pyruvate oxidase contributes to the aerobic growth efficiency of *Escherichia coli*. Microbiology 2001;147:1483–1498.
- Báez JL, Flores N, Juárez K, Bolívar F, Gosset G: Metabolic transcription analysis of engineered *Escherichia coli* strains that overproduce L-phenylalanine. Microbial Cell Fact 2007;6:30.
- Beatty CM, Browning DF, Busby SJ, Wolfe AJ: Cyclic AMP receptor protein-dependent activation of the *Escherichia coli* *acsP2* promoter by a synergistic class III mechanism. J Bacteriol 2003;185:5148–5157.
- Chang D, Shin S, Rhee J, Pan J: Acetate metabolism in a *pta* mutant of *Escherichia coli* W3110: importance of maintaining acetyl coenzyme A flux for growth and survival. J Bacteriol 1999;181:6656–6663.
- Chang YY, Cronan JE: Genetic and biochemical analysis of *Escherichia coli* strains having a mutation in the structural gene (*poxB*) for pyruvate oxidase. J Bacteriol 1983;154:757–762.
- Cronan J, LaPorte D: Tricarboxylic acid cycle and glyoxylate bypass; in Neidhardt F (ed): *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology, ed 2. Washington, ASM Press, 1996, pp 206–214.

- Curtis JS, Epstein W: Phosphorylation of D-glucose in *Escherichia coli* mutants defective in glucose phosphotransferase, mannose phosphotransferase and glucokinase. *J Bacteriol* 1975;122:1189–1199.
- Datsenko K, Wanner L: One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:6640–6645.
- Ferenci T: Regulation by nutrient limitation. *Curr Opin Microbiol* 1999;2:208–213.
- Flores N, de Anda R, Flores S, Escalante A, Hernandez G, Martinez A, Ramirez OT, Gosset G, Bolivar F: Role of pyruvate oxidase in *Escherichia coli* strains lacking the phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase system. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2004;8:209–221.
- Flores N, Escalante A, de Anda R, Báez-Viveros JL, Merino E, Franco B, Georgellis D, Gosset G, Bolivar F: New insights on the role of sigma factor RpoS as revealed in *Escherichia coli* strains lacking the phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase system. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2008;14:176–192.
- Flores N, Flores S, Escalante A, de Anda R, Leal L, Malpica R, Georgellis D, Gosset G, Bolivar F: 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. *Metab Eng* 2005;7:70–87.
- Flores N, Leal L, Sigala JC, de Anda R, Escalante A, Martinez A, Ramirez T, Gosset G, Bolivar F: Growth recovery on glucose under aerobic conditions of an *Escherichia coli* strain carrying a phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase system deletion by inactivating *arcA* and overexpressing the genes coding for glucokinase and galactose permease. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2007;13:105–116.
- Flores N, Xiao J, Berry A, Bolivar F, Valle F: Pathway engineering for the production of aromatic compounds in *Escherichia coli*. *Nat Biotech* 1996;14:620–623.
- Flores S, Flores N, de Anda R, Gonzalez A, Escalante A, Sigala JC, Gosset G, Bolivar F: 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* 2005;10:51–63.
- Flores S, Gosset G, Flores N, de Graaf AA, Bolivar F: Analysis of carbon metabolism in *Escherichia coli* strains with an inactive phosphotransferase system by ¹³C labeling and NMR spectroscopy. *Metab Eng* 2002;4:124–137.
- Gennis RB, Stewart V: Respiration; in Neidhart FC (ed): *Escherichia coli* and *Salmonella: Cellular and Molecular Biology*, ed 2. Washington, ASM Press, 1996, pp 217–260.
- Gimenez R, Nuñez M, Badia J, Aguilar J, Baldoma L: The gene *yjcG*, cotranscribed with the gene *acs*, encodes an acetate permease in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 2003;185:6448–6455.
- Gosset G, Zhang Z, Nayyar S, Cuevas W, Saier MH: Transcriptome analysis of CRP-dependent catabolite control of gene expression in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 2004;186:3516–3524.
- Hansen EJ, Juni E: Isolation of mutants of *Escherichia coli* lacking NAD- and NADP-linked malic enzymes. *Biochem Biophys Res Commun* 1975;65:559–566.
- Hansen EJ, Juni E: Properties of mutants of *Escherichia coli* lacking malic dehydrogenase and their revertants. *J Biol Chem* 1979;254:3570–3575.
- Hengge-Aronis R: Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the sigma S (RpoS) subunit of RNA polymerase. *Microbiol Mol Biol Revs* 2002;66:373–395.
- Hua Q, Yang C, Oshima T, Mori H, Shimizu K: Analysis of gene expression in *Escherichia coli* in response to changes of growth-limiting nutrient in chemostat cultures. *Appl Environ Microbiol* 2004;70:2354–2366.
- Kao KC, Tran LM, Liao JC: A global regulatory role of gluconeogenic genes in *Escherichia coli* revealed by transcriptome network analysis. *J Biol Chem* 2005;280:36079–36087.
- Livak K, Schmittgen TD: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} method. *Methods* 2001;25:402–408.
- Martínez K, de Anda R, Hernández G, Escalante A, Gosset G, Ramirez OT, Bolivar F: Co-utilization of glucose and glycerol enhanced the production of aromatic compounds in an *Escherichia coli* strain lacking the phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase system. *Microbial Cell Factories* 2008;7:1.
- McFall E, Newman E: Amino acids as carbon sources; in Neidhardt F (ed): *Escherichia coli* and *Salmonella: Cellular and Molecular Biology*, ed 2. Washington, ASM Press, 1996, pp 358–379.
- Moreau PL: Diversion of the metabolic flux from pyruvate dehydrogenase to pyruvate oxidase decreases oxidative stress during glucose metabolism in non-growing *Escherichia coli* cells incubated under aerobic, phosphate starvation conditions. *J Bact* 2004;186:7364–7368.
- Murai T, Tokushige M, Nagai J, Katsuki H: Physiological functions of NAD- and NADP-linked malic enzymes in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* 1971;43:875–881.
- Oh M, Rohlin L, Kao K, Liao J: Global expression profiling of acetate-grown *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 2002;277:13175–13183.
- Palmeros B, Wild J, Szybalski W, Le Borgne S, Hernandez-Chavez G, Gosset G, Valle F, Bolivar F: A family of removable cassettes designed to obtain antibiotic resistance-free genomic modifications of *Escherichia coli* and other bacteria. *Gene* 2000;247:255–264.
- Park Y, Lee B, Seok Y, Peterkofsky P: In vitro reconstitution of catabolite repression in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 2006;281:6448–6454.
- Phue JN, Shiloach J: Transcription levels of key metabolic genes are the cause for different glucose utilization pathways in *Escherichia coli* B (BL21) and *Escherichia coli* K (JM109). *J Biotechnol* 2004;109:21–30.
- Polen T, Rittmann D, Wendisch VF, Sahn H: DNA microarray analysis of the long-term adaptive response of *Escherichia coli* to acetate and propionate. *Appl Environ Microbiol* 2003;69:1759–1774.
- Postma PW, Lengeler JW, Jacobson GR: Phosphoenolpyruvate carbohydrate phosphotransferase systems; in Neidhart FC (ed): *Escherichia coli* and *Salmonella: Cellular and Molecular Biology*, ed 2. Washington, ASM Press, 1996, pp 1149–1174.
- Quail MA, Haydon DJ, Guest JR: The *pdhRac EF-lpd* operon of *Escherichia coli* expresses the pyruvate dehydrogenase complex. *Mol Microbiol* 1994;12:95–104.
- Torres JC, Guixé V, Babul J: A mutant phosphofructokinase produces a futile cycle during gluconeogenesis in *Escherichia coli*. *Biochem J* 1997;327:675–684.
- Weber H, Polen T, Heuveling J, Wendisch VF, Hengge R: Genome-wide analysis of the general stress response network in *Escherichia coli*: sigmaS-dependent genes, promoters, and sigma factor selectivity. *J Bacteriol* 2005;187:1591–1603.
- Wolfe A: The acetate switch. *Microbiol Mol Biol Rev* 2005;69:12–50.
- Zhao J, Baba T, Mori H, Shimizu K: Effect of *wfj* gene knockout on the metabolism of *Escherichia coli* grown on glucose or acetate. *Metab Eng* 2004;6:164–174.

Growth Recovery on Glucose under Aerobic Conditions of an *Escherichia coli* Strain Carrying a Phosphoenolpyruvate:Carbohydrate Phosphotransferase System Deletion by Inactivating *arcA* and Overexpressing the Genes Coding for Glucokinase and Galactose Permease

Noemí Flores^a Lidia Leal^a Juan Carlos Sigala^a Ramón de Anda^a
Adelfo Escalante^a Alfredo Martínez^a Octavio T. Ramírez^b Guillermo Gosset^a
Francisco Bolívar^a

^aDepartamento de Ingeniería Celular y Biotecnología, and ^bDepartamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, México

Key Words

Glucose growth recovery · Phosphotransferase system · Glucokinase · Galactose permease · Phosphoglucose isomerase · ArcAB

Abstract

In *Escherichia coli* the phosphotransferase system (PTS) consumes one molecule of phosphoenolpyruvate (PEP) to phosphorylate each molecule of internalized glucose. PEP bioavailability into the aromatic pathway can be increased by inactivating the PTS. However, the lack of the PTS results in decreased glucose transport and growth rates. To overcome such drawbacks in a PTS⁻ strain and reconstitute rapid growth on glucose phenotype (Glc⁺), the *glk* and *galP* genes were cloned into a plasmid and the *arcA* gene was inactivated. Simultaneous overexpression of *glk* and *galP* increased the growth rate and regenerated a Glc⁺ phenotype. However, the highest growth rate was obtained when *glk*

and *galP* were overexpressed in the *arcA*⁻ background. These results indicated that the *arcA* mutation enhanced glycolytic and respiratory capacities of the engineered strain.

Copyright © 2007 S. Karger AG, Basel

Introduction

Phosphoenolpyruvate (PEP) is one of the key metabolic precursors in the synthesis of aromatic compounds as well as the phosphate donor utilized by the phosphotransferase system (PTS) for glucose internalization [Postma et al., 1996]. Several groups have modified the PEP node to increase the availability of this molecule for the synthesis of aromatic compounds [Frost and Lievens, 1984; Miller et al., 1987; Mori and Shio, 1987; Flores et al., 1996; Gosset et al., 1996; Yi et al., 2002]. One of these strategies includes the elimination of PTS which consumes half of the PEP produced during glycolysis for glucose internalization [Flores et al., 1996; Postma et al., 1996; Saier, 2002; Gosset, 2005]. The inconvenience of PTS inactivation is that growth rate (μ) on glucose and

N.F. and L.L. contributed equally to this work.

KARGER

Fax +41 61 306 12 34
E-Mail karger@karger.ch
www.karger.com

© 2007 S. Karger AG, Basel
1464–1801/07/0133–0105\$23.50/0

Accessible online at:
www.karger.com/mmb

Francisco Bolívar
Departamento de Ingeniería Celular y Biotecnología
Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México
Apdo. Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos 62271 (Mexico)
Tel./Fax +52 777 329 1601, E-Mail noemi@ibt.unam.mx

glucose uptake rate (τ) decreased substantially as compared to the wild-type strain (0.1 vs. 0.7 h⁻¹ and 1.7 vs. 20 nmol [¹⁴C]Glc · min⁻¹ · mg protein⁻¹, respectively) [Flores et al., 2002]. In these growing conditions the relative glycolytic carbon flux was decreased from 76% present in the parental wild-type strain JM101 to 40% in a PTS⁻ derivative (PB11) lacking the *pstH,I,crp* operon. Also, the relative carbon fluxes between pyruvate and acetyl-CoA and between citrate and malate were increased between 2- and 3-fold in PB11 as compared to JM101 [Flores et al., 2002]. These results indicated that PB11 was probably sensing a carbon nutrient stress condition and therefore induced the synthesis of gluconeogenic and nutrient scavenging enzymes to preserve and scavenge carbon. This assumption is supported by the upregulation of gluconeogenic and nutrient scavenging genes in PB11 as compared to JM101 [Flores et al., 2005a, b]. The properties of PTS⁻ strains represent drawbacks for industrial purposes and thus limit their application.

In order to overcome some of these limitations, we have reported the selection of spontaneous Glc⁺ revertants that arose from PB11. These mutants can grow faster on glucose (with a μ of at least 0.4 h⁻¹) than the PTS⁻ parental strain and form red colonies on MacConkey-glucose agar plates (Glc⁺ phenotype). It is known that at least two non-cotransducible mutations were selected in one of these mutants, named PB12, to allow this strain to consume glucose and grow in the absence of the PTS at a much higher rate than PB11 (0.42 vs. 0.1 h⁻¹) [Flores et al., 1996, 2002]. Initial characterization of PB12 revealed that rapid glucose consumption and relatively high growth rates depend on a functional galactose permease (GalP) and an increased activity level of glucokinase (Glc). In addition, carbon flux distribution in the wild-type JM101 and PTS⁻Glc⁺ (PB12) strains was studied by biochemical analysis and nuclear magnetic resonance spectroscopy indicating important differences among the strains [Flores et al., 2002]. Transcriptome analysis in these strains using RT-PCR measurements of more than 100 genes coding for enzymes that participate mainly in the central metabolism has also been reported. In PB12 the transcript levels of *galP*, *glk* and *pgi* (the gene coding for phosphoglucose isomerase) were 13-, 2.2- and 6.6-fold higher respectively, as compared to the wild-type strain JM101. These studies demonstrated that the PB12 PTS⁻Glc⁺ strain adjusted its metabolic capacities due to the absence of the PTS and as a consequence of at least two mutations, one of them located in the *arcB*⁻ gene [Flores et al., 2005a]. These strains, PB11 and PB12, are also ca-

pable of cointilizing certain carbon sources like acetate in the presence of glucose [Flores et al., 2005a, b].

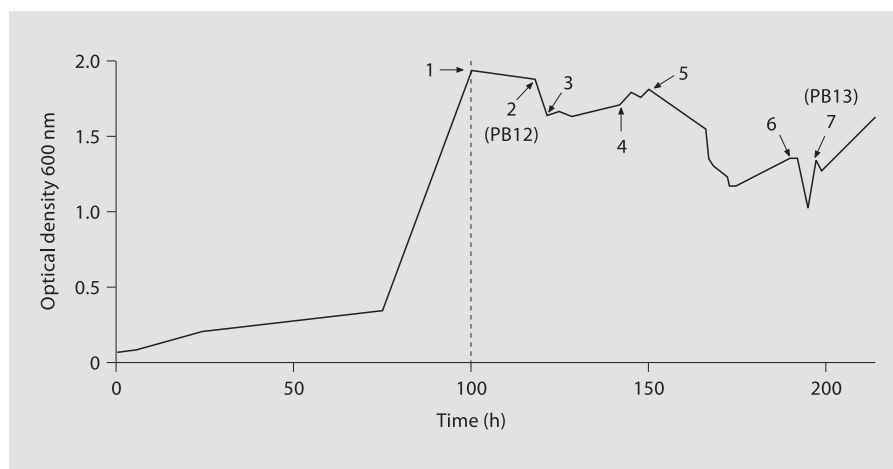
We have been interested in identifying the mutations that were selected in PB12 and the enzymes involved in the differential utilization of glucose, carbon catabolism, and other metabolic capacities present in this modified strain. Therefore, the nucleotide sequences of several regulatory genes including *arcA*, *crp*, *fnr*, *fruR*, *iclR*, *pdhR* had been determined, and thus far only a single mutation has been found in the *arcB* gene of PB12. The protein coded by this gene is part of the ArcAB system for anaerobiosis adaptation [Iuchi and Lin, 1988; Liu and De Wulf, 2004]. This mutation is responsible, in this strain when growing under aerobic conditions, for the slight upregulation (1.2- to 3.7-fold) of the genes whose protein products are involved in the TCA cycle [Flores et al., 2005a]. We have previously shown that simultaneous overexpression of *glk* and *galP* in a PTS⁻Glc⁻ strain derivative of *Escherichia coli* W3110, restored glucose transport and increased glycolytic flux into fermentation products [Hernández-Montalvo et al., 2003]. Based on the detected phenotype in the PB12 strain (increased transcriptional levels of *galP*, *glk*, *pgi*, and genes coding for TCA cycle enzymes), as well as the Δ *arcA* phenotype, we present experiments that allowed the determination of the specific contributions of these characteristics to the reconstitution of the Glc⁺ phenotype in the PTS⁻Glc⁻ PB11 strain.

Results and Discussion

Isolation of PTS⁻Glc⁺ Strains

As previously reported, the PB11 PTS⁻ strain was generated by transduction of the interrupted *pstHICrr* operon from TP2811 to the JM101 strain [Flores et al., 1996]. The decreased growth rate on glucose (0.1 vs. 0.7 h⁻¹ as compared to the wild type) is a clear phenotype of the PTS⁻ strains. From PB11 we have isolated strains capable of growing faster on glucose than the PB11 strain. Some of these strains (PB12 and PB13) have been characterized [Flores et al., 2002]. However, we have not yet reported the conditions utilized for the initial isolation of the PTS⁻Glc⁺ strains (PB12 and PB13). In this experiment, PB11 was grown in a batch culture fermentor containing M9 minimal medium supplemented with 2 g/l of glucose. Under these conditions, a selection pressure is generated, favoring mutants that acquired the capacity to grow faster than the original PB11 strain. The culture was maintained until it reached the stationary phase and then a continuous culture was started by feeding a glucose solu-

Fig. 1. Isolation of Glc⁺ mutants from a continuous culture of the PB11 PTS⁻ strain. The arrows indicate the isolation time for several Glc⁺ strains including PB12. Dotted line indicates the end of the batch culture and the start of the continuous cultures. Numbers indicate dilution rates ($D = h^{-1}$) as follows: 1 for $D = 0.08$, 2 for $D = 0.4$, 3 for $D = 0.5$, 4 for $D = 0.6$, 5 for $D = 0.7$, 6 for $D = 0.75$, 7 and for $D = 0.8$.



tion at progressively higher dilution rates (fig. 1). This procedure allowed the isolation of mutants according to their growth rates. Samples from the continuous culture were monitored on glucose-MacConkey agar plates to identify red colonies as indicative of a Glc⁺ phenotype. Eight of these colonies were isolated and grown in M9 plus glucose to determine their growth rates. Two of these strains were selected for further characterization and they were named PB12 and PB13. PB12 had the lowest ($0.42 h^{-1}$) and PB13 ($0.5 h^{-1}$) the highest growth rates among the analyzed colonies (fig. 1) [Flores, 1995; Flores et al., 1996, 2002].

*Recovery of Glc⁺ Phenotype in PB11 by Simultaneous Overexpression of *glk* and *galP**

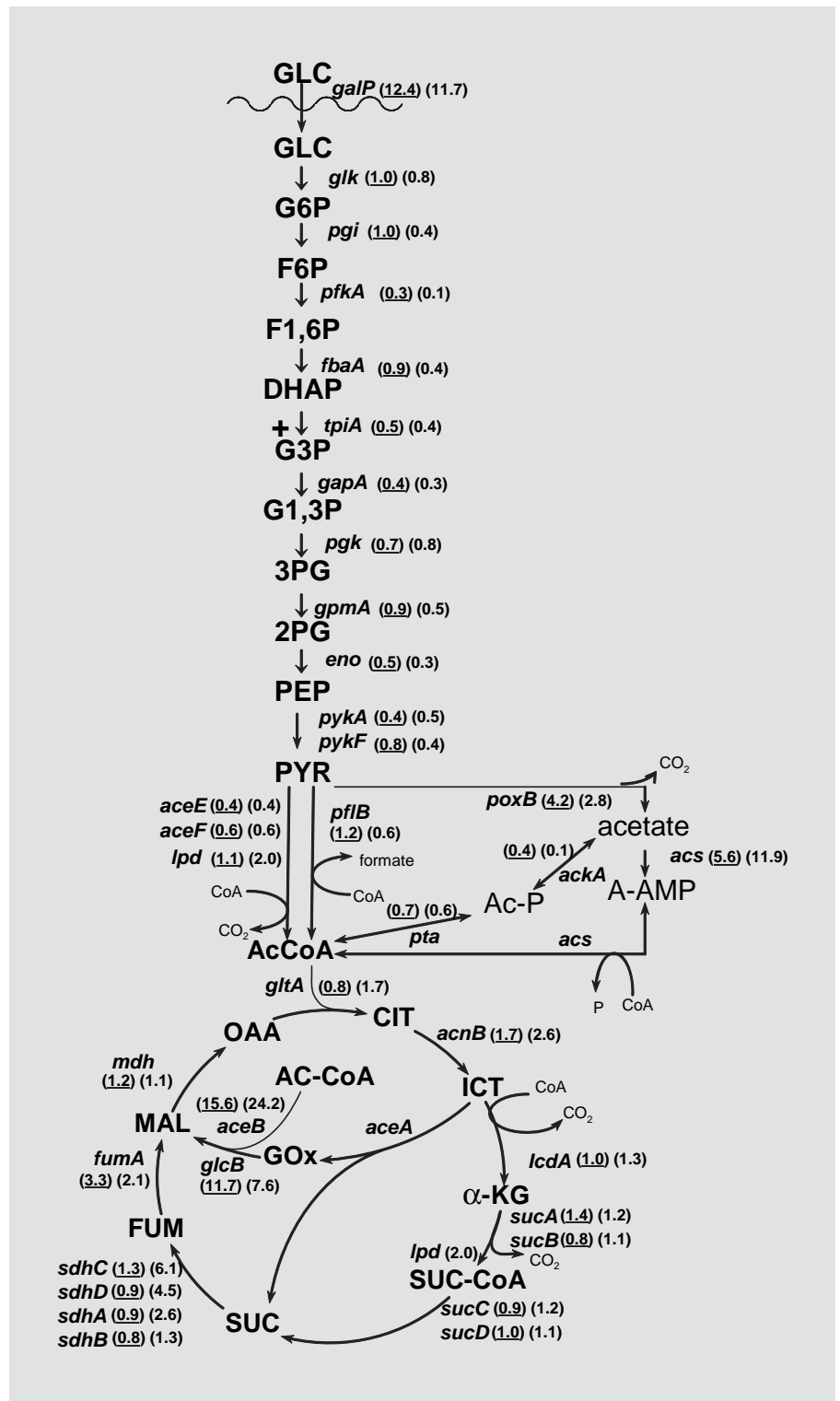
It has been demonstrated that PB12 transports glucose through GalP. This observation is supported by *galP* up-regulation in PB12 and by the loss of glucose transport capacity in this strain if *galP* is inactivated [Flores et al, 2002, 2005a]. In PB11, *galP* is also highly upregulated (fig. 2), but glucose utilization is limited in this strain. These observations originally suggested that the poor glucose utilization capacity was not due to low *galP* expression. The glucose utilization rate is the net result of the added rates of its internalization, phosphorylation and degradation. In the absence of the PTS at least the first two steps are not coupled; therefore, internalized glucose should be phosphorylated by glucokinase [Curtis and Epstein, 1975]. The transcript level for *glk* in PB11 is the same as that of JM101; however, the *glk* gene is up-regulated in PB12 (fig. 2) and the specific glucokinase activity is also increased in this strain (2.2-fold compared to JM101 and PB11) [Flores et al., 2002, 2005a]. This ob-

servation suggested that the main difference in glucose transport and growth rate capacities between PB11 (PTS⁻ Glc⁻) and PB12 (PTS⁻ Glc⁺) could be the higher level of glucose phosphorylation activity in PB12 as compared to PB11. Therefore, it was expected that overexpression of the gene coding for glucokinase in this strain would increase its growth rate.

As can be seen in table 1, strain PB11/pCLv1*glk*, that carries the *glk* gene transcribed from the *trc* promoter in a low copy number plasmid, duplicated its growth rate as compared to PB11. This result shows that increased expression of the *glk* gene has a positive effect on the growth rate of this strain. However, a Glc⁺ phenotype as determined in MacConkey-glucose plates was not recovered.

Strain PB12 upregulates *glk* and also *pgi* which codes for phosphoglucose isomerase (Pgi), the first enzyme of the glycolytic pathway. It has been previously proposed that a higher Pgi activity in PB12 could be responsible for draining the glucose-6-phosphate (G6P) generated by glucokinase, thus increasing the glycolytic flux and consequently the growth rate on glucose [Flores et al., 2002, 2005a]. In order to determine the effect of overexpressing simultaneously *glk* and *pgi* in PB11, these genes were cloned in the same plasmid, *pgi* under its own promoter and *glk* under the *trc* promoter. PB11 was transformed with this plasmid and Glk and Pgi activities were measured. There was a 50% increase in Pgi-specific activity, and Glk-specific activity increased 2.5-fold in this strain as compared to the parental strains PB11 and JM101 [data not shown; Leal, 2005]. Despite increased activities of both Pgi and Glk, the growth rate in this strain was unmodified as compared to PB11 (data not shown). It is important to emphasize that this result is surprising, and it

Fig. 2. Central metabolic routes and key metabolites and the genes involved in their transformation. RT-PCR values of these genes are shown underlined in parentheses for PB11, and in parentheses for PB11 *arcA*⁻. The transcription level for the wild-type strain (JM101) was always considered as 1 [from Flores et al., 2005]. The abbreviations are: glucose (GLC), glucose-6-phosphate (G6P), fructose-6-phosphate (F6P), fructose-1,6-phosphate (F1,6P), dihydroxy-acetone-phosphate (DHAP), glyceraldehyde-3-phosphate (G3P), glyceraldehyde-1,3-phosphate (G1,3P), 3-phosphoglycerate (3PG), 2-phosphoglycerate (2PG), phosphoenolpyruvate (PEP), pyruvate (PYR), acetyl-CoA (AcCoA), acetyl phosphate (Ac-P), acetyl-AMP (A-AMP), citrate (CIT), isocitrate (ICT), glyoxylate (GOx), α -ketoglutarate (α -KG), succinyl-coenzyme A (SUC-CoA), succinate (SUC), fumarate (FUM), malate (MAL), oxaloacetate (OAA).



is difficult to understand why increased Pgi activity in the presence of *glk* overexpression does not allow the cells to grow faster, as it is observed when *glk* is overexpressed alone. A possible explanation for this result is that the synthesized G6P is utilized for growth and also accumulated at a certain level in the PB11/pCLv1*glk* strain. When the concentration of this molecule reaches a certain level it could also, directly or indirectly, be responsible for modulating the expression of other genes that could also participate in the growth response. It has been demonstrated that G6P modulates the degradation of *ptsG* mRNA level in *E. coli* and that the absence of Pgi increases the degradation of this mRNA [El-Kazzaz et al., 2004; Kawamoto et al., 2005]. Therefore, it is possible that G6P could also modulate the transcription and/or the translation of other important catabolic genes in *E. coli*, especially in a PTS⁻ strain where glucose transport is not coupled to its phosphorylation. The cell carrying both *glk* and *pgi* genes in the same vector does not grow because G6P is not accumulated, but rather transformed more efficiently into fructose-6P (F6P) due to the presence of a higher Pgi activity in this strain, and F6P does not have the same effect as G6P. Finally, the presence of *pgi* alone in a plasmid did not have any effect on the growth rate of PB11 (data not shown).

PB11 was also transformed with plasmid pCLv1*galP* that carries the *galP* gene under control of the *trc* promoter. It was not expected that the presence of pCL*galP* should modify the growth rate of PB11, as *galP* is already upregulated in this strain [Flores et al., 2005a]. As can be seen in table 1, strain PB11/pCLv1*galP* displayed a μ of 0.13 h⁻¹, growing slower with this plasmid than the control strain PB11/pCL1920. When IPTG was added, the μ increased slightly to 0.18 h⁻¹. These results corroborate the assumption that in these growing conditions the presence of *galP* in a plasmid does not increase the growth rate of PB11 because in this strain this gene is already upregulated at the same level (13-fold) as it is in PB12 [Flores et al., 2005a]. However, these results are not in agreement with previous data in a different PTS⁻ strain where the growth rate was increased upon expression of *galP* from plasmid pCLv1*galP* [Hernández-Montalvo et al., 2003].

The effect of simultaneous *glk* and *galP* overexpression was also studied in strain PB11/pCLv1*glkgalP*. Interestingly, it was observed that GalP had an additive effect with Glk on growth rate, increasing it from 0.34 to 0.44 h⁻¹ without IPTG and from 0.37 to 0.46 h⁻¹ when the inducer was added. As expected, this strain had a Glc⁺ phenotype (table 1).

Table 1. Growth rates (h⁻¹) of PB11 and PB11 *arcA*⁻ strains transformed with plasmid pCL1920 carrying *galP* and/or *glk*

Strains	μ , h ⁻¹	Growth increase vs. PB11	Phenotype*
PB11	0.16	-	Glc ⁻
PB11/pCLv1 <i>glk</i>	0.34	2.1	Glc ⁻
PB11/pCLv1 <i>glk</i> + IPTG	0.37	2.3	Glc ⁻
PB11/pCLv1 <i>galP</i>	0.13	0.8	Glc ⁻
PB11/pCLv1 <i>galP</i> + IPTG	0.18	1.1	Glc ⁻
PB11/pCLv1 <i>glkgalP</i>	0.44	2.7	Glc ⁺
PB11/pCLv1 <i>glkgalP</i> + IPTG	0.46	2.9	Glc ⁺
PB11 <i>arcA</i> ⁻	0.32	2.0	Glc ⁻
PB11 <i>arcA</i> ⁻ /pCLv1 <i>glk</i>	0.38	2.4	Glc ⁺
PB11 <i>arcA</i> ⁻ /pCLv1 <i>glk</i> + IPTG	0.39	2.5	Glc ⁺
PB11 <i>arcA</i> ⁻ /pCLv1 <i>galP</i>	0.16	1.0	Glc ⁻
PB11 <i>arcA</i> ⁻ /pCLv1 <i>galP</i> + IPTG	0.27	1.7	Glc ⁻
PB11 <i>arcA</i> ⁻ /pCLv1 <i>glkgalP</i>	0.38	2.4	Glc ⁺
PB11 <i>arcA</i> ⁻ /pCLv1 <i>glkgalP</i> + IPTG	0.49	3.1	Glc ⁺
PB12	0.42	2.6	Glc ⁺

Growth rate (μ) increase without induction is the result of escape expression of the genes. 0.1 Mm IPTG was used for gene induction.

* All Glc⁻ phenotypes are white colonies and the Glc⁺ are red colonies on MacConkey-glucose agar plates.

Elimination of ArcA Function Increased the Growth Rate in PB11

The ArcAB regulatory system is involved in the adaptive response to anaerobiosis. The transmembrane protein ArcB autophosphorylates in anaerobiosis and phosphorylates the transcriptional regulator ArcA which can repress aerobic metabolism and activate anaerobic metabolism. There is a residual or basal concentration of ArcA-P in aerobiosis that can slightly repress genes involved in aerobic metabolism. It has been reported that under aerobic growing conditions, inactivation of ArcA causes upregulation of 1.3- to 2-fold of genes coding for TCA cycle enzymes [Iuchi and Lin, 1988; Park and Gunsalus, 1995; Chao et al., 1997; Cunningham et al., 1997; Park et al., 1997; Shen and Gunsalus, 1997; Cunningham and Guest, 1998; Liu and De Wulf, 1994; Malpica et al., 2004; Perrenoud and Sauer, 2005].

In PB12 the genes that code for TCA enzymes are up-regulated 1.2- to 3.7-fold and this strain is sensitive to blue toluidine dye. Both features are characteristics of an Δ *arcA* phenotype [Iuchi and Lin, 1988; Alexeeva et al., 2003; Perrenoud and Sauer, 2005]. These results indicat-

Table 2. Relative transcription levels determined by RT-PCR of several groups of genes from strains JM101, PB11, PB11 *arcA*⁻ and PB12

Gene	Coded protein	ArcA regulation	Expression levels as 2 ^{-ΔΔCt} with JM101 as normalization value		
			PB11	PB11 <i>arcA</i> ⁻	PB12
<i>aceB</i>	Malate synthase A	-	15.6 ± 2.5	24.2 ± 2.6	3.7 ± 0.3
<i>aceE</i>	Pyruvate dehydrogenase (E1)	-	0.4 ± 0.0	0.4 ± 0.0	1.4 ± 0.0
<i>aceF</i>	Pyruvate dehydrogenase (E2)	-	0.6 ± 0.0	0.6 ± 0.0	1.2 ± 0.0
<i>ackA</i>	Acetate kinase A	-	0.4 ± 0.1	0.1 ± 0.0	0.8 ± 0.0
<i>acnB</i>	Aconitase B	-	1.7 ± 0.4	2.6 ± 0.3	1.7 ± 0.4
<i>acs</i>	Acetyl-CoA synthetase	-	5.6 ± 0.7	11.9 ± 0.1	8.0 ± 0.1
<i>cyoA</i>	Cytochrome bo terminal oxidase II	-	0.6 ± 0.0	1.1 ± 0.1	1.4 ± 0.1
<i>eno</i>	Enolase	-	0.5 ± 0.1	0.3 ± 0.0	0.5 ± 0.1
<i>fbaA</i>	Fructose-1,6-bis-phosphate	-	0.9 ± 0.0	0.4 ± 0.0	1.1 ± 0.0
<i>fumA</i>	Fumarate A	-	3.3 ± 0.7	2.1 ± 0.1	3.6 ± 0.7
<i>galP</i>	Galactose permease	-	12.4 ± 1.1	11.7 ± 0.4	13.1 ± 1.9
<i>gapA</i>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	-	0.4 ± 0.1	0.3 ± 0.0	1.7 ± 0.2
<i>glcB</i>	Malate synthase A	-	11.7 ± 1.4	7.6 ± 0.3	3.7 ± 0.5
<i>glk</i>	Glucokinase	-	1.0 ± 0.0	0.8 ± 0.1	2.2 ± 0.1
<i>gltA</i>	Citrate synthase	-	0.8 ± 0.1	1.7 ± 0.1	1.3 ± 0.2
<i>gpmA</i>	Phosphoglycerate mutase A	-	0.9 ± 0.0	0.5 ± 0.0	1.8 ± 0.0
<i>icdA</i>	Isocitrate dehydrogenase	-	1.0 ± 0.1	1.3 ± 0.0	1.9 ± 0.0
<i>ldh</i>	Lactate dehydrogenase	-	0.6 ± 0.0	0.5 ± 0.2	1.2 ± 0.2
<i>lpdA</i>	Pyruvate dehydrogenase (E3), oxoglutarate dehydrogenase (E3)	-	1.1 ± 0.1	2.0 ± 0.5	2.0 ± 0.1
<i>mdh</i>	Malate dehydrogenase	-	1.2 ± 0.1	1.1 ± 0.1	1.8 ± 0.5
<i>ndh</i>	NADH dehydrogenase II	+	0.6 ± 0.0	0.3 ± 0.1	1.1 ± 0.1
<i>nuoA</i>	NADH dehydrogenase I	-	0.4 ± 0.0	1.0 ± 0.0	2.4 ± 0.1
<i>pflB</i>	Pyruvate formate-lyase	-	1.2 ± 0.0	0.6 ± 0.0	1.1 ± 0.0
<i>pfkA</i>	Phosphofructokinase A	-	0.3 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.5 ± 0.0
<i>pgi</i>	Phosphoglucose isomerase	-	1.0 ± 0.1	0.4 ± 0.0	6.6 ± 0.3
<i>pgk</i>	Phosphoglycerate kinase	-	0.7 ± 0.0	0.8 ± 0.0	1.2 ± 0.0
<i>poxB</i>	Pyruvate oxidase	-	4.2 ± 0.3	2.8 ± 0.9	5.7 ± 0.5
<i>pta</i>	Phosphate acetyltransferase	-	0.7 ± 0.1	0.6 ± 0.1	1.5 ± 0.3
<i>ptsG</i>	EIIGlc	-	1.3 ± 0.1	1.2 ± 0.3	1.3 ± 0.1
<i>pykA</i>	Pyruvate kinase A	-	0.4 ± 0.0	0.5 ± 0.1	1.0 ± 0.0
<i>pykF</i>	Pyruvate kinase F	-	0.8 ± 0.0	0.4 ± 0.0	1.4 ± 0.0
<i>rpoS</i>	Sigma S factor	-	2.9 ± 0.1	2.6 ± 0.1	2.2 ± 0.2
<i>sdhA</i>	Succinate dehydrogenase flavoprotein	+/-	0.9 ± 0.0	2.6 ± 0.1	2.0 ± 0.3
<i>sdhB</i>	Succinate dehydrogenase iron-sulfur protein	+/-	0.8 ± 0.0	1.3 ± 0.0	1.7 ± 0.0
<i>sdhC</i>	Succinate dehydrogenase membrane protein	+/-	1.3 ± 0.1	6.1 ± 1.5	2.1 ± 0.6
<i>sdhD</i>	Succinate dehydrogenase membrane protein	+/-	0.9 ± 0.0	4.5 ± 0.1	1.8 ± 0.0
<i>sucA</i>	2-Oxoglutarate dehydrogenase E1	-	1.4 ± 0.1	1.2 ± 0.0	1.7 ± 0.1
<i>sucB</i>	Dihydrolipoamide succinate transferase	-	0.8 ± 0.0	1.1 ± 0.2	1.4 ± 0.1
<i>sucC</i>	Succinyl-CoA synthetase β-subunit	-	0.9 ± 0.1	1.2 ± 0.2	1.6 ± 0.0
<i>sucD</i>	Succinyl-CoA synthetase α-subunit	-	1.0 ± 0.2	1.1 ± 0.1	1.4 ± 0.3
<i>tpiA</i>	Triosephosphate isomerase	-	0.5 ± 0.0	0.4 ± 0.0	1.8 ± 0.0

This table shows the relative transcription levels of genes involved in different pathways and processes. The third column shows which genes are regulated by ArcA. For each gene in all strains, the transcription level of the gene for the wild-type strain was used as the control to normalize the data using the wild-type RT-PCR value for that gene as one. Therefore, data in this table and in figure 2 are reported as relative expression levels, compared to the expression level of JM101. The results are the averages of four independent measurements of the RT-PCR expression values for each gene. The RT-PCR expression values obtained as reported by Flores et al. [2005a] for each gene differ between them in most of the genes by less than 30%. The RT-PCR values from PB11 and PB12 strains have been already reported and are included for comparative purposes [Flores et al., 2005a].

ed that the specific mutation detected in *arcB* that changed tyrosine residue 71 into a cysteine, is responsible for the Δ *arcA* phenotype in PB12 [Flores et al., 2005a].

If the Δ *arcA* phenotype is at least partially responsible for the Glc⁺ phenotype in PB12, then the inactivation of *arcA* would probably increase the growth rate of PB11. Therefore, a PB11 *arcA*⁻ strain was generated by P1vir phage transduction using P1 XECL5020 (*arcA::tet*) as donor strain [Georgellis et al., 2001; Leal, 2005]. As can be seen in table 1, the inactivation of *arcA* increased 2-fold the growth rate of the PB11 *arcA*⁻ strain as compared to PB11. This result prompted us to analyze the expression in the PB11 *arcA*⁻ strain of genes regulated by ArcA, as well as other genes involved in carbon metabolism, using the RT-PCR technique.

As expected, the presence of the *arcA*⁻ mutation in strain PB11 *arcA*⁻ caused the upregulation of several genes negatively controlled by this general regulator (table 2). Among them, *lpdA* is upregulated 2-fold as compared to PB11. The product of this gene (LpdA) is the E3 component of the pyruvate dehydrogenase (Pdh), coded also by *aceE* and *aceF*. These two genes are also negatively regulated by ArcA at least in microaerobic growing conditions [Levanon et al., 2005]. However, in aerobic growing conditions their transcription levels were not upregulated in PB11 *arcA*⁻ (table 2). LpdA is also a subunit of the 2-oxoglutarate dehydrogenase complex (Odh) coded by the *lpdA* and the *sucAB* genes. Another set of genes that is also 2- to 4-fold upregulated are *sdhCDAB* that code for the succinate dehydrogenase complex (Sdh). Interestingly, the transcription levels of the *sucABCD* genes that are part of the same *sdh* operon are only 15–30% upregulated with the exception of *sucA*. This result is discussed below. Finally, the transcription of other TCA genes and also some respiratory genes that are also negatively regulated by ArcA in PB11 *arcA*⁻ as compared to PB11, is upregulated with the exception of *ndh* that is activated by ArcA, and its transcription is downregulated 2-fold (fig. 2, table 2).

The upregulation of *lpdA* could be at least partially responsible for the growth increase in PB11 *arcA*⁻ as compared to PB11. Such upregulation could allow a higher Pdh activity in the *arcA*⁻ strain, especially if LpdA is a limiting component of this protein complex that in turn could channel more pyruvate into the TCA cycle. This would increase, at least at this metabolic step, the glycolytic flux of the strain because the transcription of other glycolytic genes is not increased in PB11 *arcA*⁻ (fig. 2, table 2). It has been reported that in the PB11 PTS⁻ strain, where the carbon flux between pyruvate and AcCoA is

increased 2-fold and the *poxB* gene is upregulated 6-fold [Flores et al., 2002, 2005], around half of the pyruvate is channeled and recycled through PoxB into the glyoxalate shunt and into gluconeogenesis. If *poxB* is inactivated, the PB11 *poxB*⁻ strain decreases its growth rate 50% as compared to PB11 [Flores et al., 2004, 2005a]. Therefore, when *arcA* is inactivated, the transcription of *lpdA* is increased and the Pdh-specific activity could also be increased, resulting in a higher glycolytic capacity in PB11 *arcA*⁻.

We observed, in agreement with this situation, upregulation in PB11 *arcA*⁻ as compared to PB11 of *gltA* and *acnB* (coding for citrate synthase (CitA) and aconitase B (AcoB) that synthesize citrate and isocitrate, respectively) and the slight upregulation (30%) of the *icdA* gene that codes for the isocitrate dehydrogenase (Icd) that transforms isocitrate into α -ketoglutarate and CO₂. Furthermore, as previously mentioned, the *sucABCD* genes that code for the Odh complex (*sucAB*) in conjunction with LpdA and the succinyl-CoA synthetase (Scs) (*sucCD*) that transform α -ketoglutarate into succinate and CO₂, are also slightly upregulated (15–30%) with the exception of *sucA*. These RT-PCR values of the *icdA* and *sucABCD* genes are within the limits of experimental error and should be taken with caution. However, this result indicates that strain PB11 *arcA*⁻ is maybe capable of channeling more carbon than PB11 through the TCA cycle, allowing greater substrate oxidation with more CO₂ production (fig. 2, table 2).

Also, in agreement with this situation could be the upregulation (2- to 4-fold) in PB11 *arcA*⁻ of the *sdhCDAB* genes that are regulated by oxygen (ArcA) and carbon (Crp) [Park et al., 1997; Shen and Gunsalus, 1997; Cunningham and Guest, 1998]. This enzyme is responsible for transferring electrons from succinate to the quinone pool located at the cellular membrane [Gennis and Stewart, 1996]. Interestingly, as we have proposed, the PB11 PTS⁻ strain mainly uses the glyoxalate shunt to synthesize malate and succinate instead of the complete TCA cycle, because this strategy allows this strain, under carbon nutritional stress conditions, to retain and recycle more carbon [Flores et al., 2002, 2004, 2005a, b]. The *arcA* mutation in this background could permit a higher glycolytic flux through Pdh, maybe a higher oxidative capacity through IcdA and Odh, and also a higher respiratory capacity through an increased Sdh activity. In agreement with this last proposal is the upregulation in PB11 *arcA*⁻ of *cyoA* and *nuoA* that are negatively regulated by ArcA and code for components of the cytochrome *bo* ubiquinol oxidase (CyoABCD) and the NADH dehydroge-

Table 3. Growth rates (h^{-1}) of PB11 and PB11 *arcA*⁻ strains on glucose, acetate and glucose plus acetate

Strain	Glucose	Acetate	Glucose + acetate
PB11	0.16	0.22	0.31
PB11 <i>arcA</i> ⁻	0.32	0.27	0.44

nase I (NuoA-F), respectively (table 2) [Gennis and Stewart, 1996].

It is known that the *sdhCDAB* and *sucABDC* genes are part of the same operon transcribed from a promoter located at the 5' end of *sdhD*. It is regulated by ArcA [Cunningham and Guest, 1998]. As mentioned before, while the transcription of the first four genes (*sdhCDAB*) is up-regulated 2- to 4-fold in PB11 *arcA*⁻, the transcript level of *sucABCD* is only 15–30% upregulated (with the exception of *sucA*). It is known that this very large polycistronic mRNA, carrying the information of these eight genes, has a very structured region with three RNaseIII recognition sites located at the end of the fourth *sdh* gene. This large mRNA has only been detected in an RNase-deficient mutant, suggesting that it is unstable [Cunningham and Guest, 1998]. This property could play a role in explaining the lower transcription levels of the *sucABCD* genes as compared to the *sdhCDAB* genes at least in the PB11 PTS⁻ *arcA*⁻ strain, and also in PB12 *arcB*⁻, where a relative higher transcription level for the *sucABCD* genes is present [Flores et al., 2005a] (table 2). In these strains and in these growing conditions, maybe the transcription of the mRNA that includes all these eight genes is terminated at the end of the *sdhB* gene in the very structured region that includes three REP sequences and a hairpin (where the RNaseIII cleavage sites are located), not including in most of the cases the *sucABCD* region in the transcribed mRNA [Cunningham and Guest, 1998]. Therefore, the cell coordinates expression of the genes that code for these three dehydrogenases (Pdh, Icd, and Odh) involved in pyruvate and acetate utilization (recycling and oxidation) mainly through ArcA and Crp. LpdA, a component of two of these dehydrogenase complexes, could also play an important sensor role in pyruvate utilization, linking Pdh with the TCA cycle [Cunningham and Guest, 1998].

If the PB11 *arcA*⁻ strain has in fact increased its glycolytic capacity, at least for the conversion of pyruvate into AcCoA by Pdh, maybe its gluconeogenic capacity is also modified. Therefore, we decided to analyze this capacity.

It has previously been reported that PB11 grows faster in a medium containing glucose plus acetate as carbon sources than when only glucose is available, and that this strain is also capable of utilizing both substrates simultaneously [Flores et al., 2005a, b]. As can be seen in table 3, PB11 grows faster in minimal medium with acetate as carbon source ($\mu = 0.22 \text{ h}^{-1}$) than when growing on glucose as carbon source ($\mu = 0.16 \text{ h}^{-1}$). As has been reported, this strain grows faster ($\mu = 0.3 \text{ h}^{-1}$) when glucose and acetate are both present in the medium (table 3), and both carbon sources are utilized simultaneously [Flores et al., 2005a, b]. These results are in agreement with the high gluconeogenic capacity of PB11. Interestingly, as shown in table 3, strain PB11 *arcA*⁻ has a μ of 0.32 h^{-1} in minimal medium with glucose as carbon source, a μ of 0.27 h^{-1} when acetate is the carbon source, and a μ of 0.4 h^{-1} when both carbon sources are present. These results clearly indicate that this strain has increased its glycolytic capacity because it grows faster on glucose than on acetate but has also maintained, and even slightly increased, its gluconeogenic capacity when growing in these media.

In agreement with this last consideration, the expression of *aceB*, a gene regulated by ArcA, is 30% (15- to 24-fold) upregulated as compared to the result in PB11 growing on glucose as the only carbon source. Also, the transcription of *glcB*, *poxB* and *acs* is still upregulated in PB11 *arcA*⁻ in this condition. Additional evidence is the result that demonstrates that the inactivation of *poxB* in strain PB11 *arcA*⁻ only reduces its growth rate 8–10%, when growing on glucose as the carbon source (data not shown). This indicates that most of the pyruvate is utilized through Pdh in PB11 *arcA*⁻ instead of being utilized both by Pdh and PoxB in PB11, where inactivation of *poxB* decreases its growth rate 50% [Flores et al., 2004, 2005a].

It is interesting to point out that the inactivation of ArcA in the PB11 PTS⁻ strain does not have the same effect as inactivating ArcA in wild-type strains where apparently the upregulation of all TCA genes occurs (1.3- to 2-fold). In the PB11 PTS⁻ strain, the upregulation of some of the TCA genes and other ArcA-regulated genes like *acnB*, *aceB*, *glcB* and *fumA* is already present while the transcription levels of *gltA* and *mdh* are not substantially modified as compared to the wild-type strain JM101. However, the transcription levels of some of these genes (*aceB*, *acnB* and *gltA*) are even higher in the PB11 *arcA*⁻ strain while the relative expression of *fumA* and *mdh* is not modified (table 2). These results could indicate the relative role of ArcA in the regulation of these and other genes. Interestingly, the expression of *galP* and *poxB* (that are not regulated by ArcA) is also already upregulated in

PB11 and is essentially unmodified in the PB11 *arcA*⁻ strain and the transcription levels of *glk*, and other glycolytic genes is similar in both strains while *pgi*, and other glycolytic genes are downregulated (table 2).

Finally, overexpression of *galP* in a plasmid in the PB11 *arcA*⁻ strain did not increase its growth rate, while overexpression of *glk* increased growth rate by 20%. Interestingly, the simultaneous induction by IPTG of *glk* and *galP* present in the plasmid pCLv1*glkgalP* increased the growth rate to 0.49 h⁻¹, the highest μ obtained for a PB11 derivative which is also higher than the μ of PB12 (table 1).

Concluding Remarks

The results presented here suggest that glucose phosphorylation by glucokinase is the most important factor in the recovery of the Glc⁺ phenotype of the PB11 PTS⁻ strain. Interestingly, *galP* overexpression by itself does not allow a higher growth rate, but its simultaneous overexpression with *glk* allows the PB11/pCLv1*glkgalP* strain to recover a growth rate similar to PB12, in these growing conditions. This result suggests that once glucokinase activity is not limiting, then transport by GalP becomes the factor limiting growth capacity.

Other changes that have been selected in PB12 might contribute to the Glc⁺ phenotype in this strain, not only *glk* overexpression. For instance, the specific mutation (tyr→cys71) in *arcB* apparently plays a role in improving the energetic and metabolic capacities of PB12 for adaptation to grow on glucose. As expected, inactivation of *arcA* helps PB11 grow faster on glucose, and this mutation is responsible for increasing the expression of genes coding for LpdA and TCA proteins. This in turn apparently increases the respiratory capabilities of this strain since *sdhCDAB*, *cyoA* and *nuoA* are upregulated. Also, the glycolytic capacity is increased at least at the level of pyruvate conversion into AcCoA, since the transcription level of the genes coding for some glycolytic enzymes are not substantially modified and others are downregulated in PB11 *arcA*⁻ as compared to PB11 strain. Nevertheless, the *arcA*⁻ derivative grows twice as fast as PB11 on glucose as the carbon source suggesting that the amount of glycolytic enzymes that transform G6P into pyruvate present in this strain under these growing conditions is enough to perform this conversion [Flores et al., 2005a]. Finally, there are few ArcA-regulated genes (*fumA* and *mdh*) whose expression is not changed as compared to the transcription level present in the parental PB11 strain and in-

terestingly, the transcription of *aceB* is increased from 15- to 24-fold. This last result could explain why PB11 *arcA*⁻ is capable of growing faster on acetate than PB11.

It has been reported that in PB11 growing on glucose as the only carbon source PoxB plays an important role. When *poxB* is inactivated, growth rate is reduced 50%. Accordingly, we believe that in PB11, an important amount of pyruvate is oxidized by PoxB (the Pox shunt), producing acetate and electrons that are transferred to the membrane during this transformation. This assumption is supported by the facts that carbon flux is increased 2-fold between pyruvate and AcCoA and by the upregulation of *poxB* and *acs* whose protein products are involved in pyruvate transformation into AcCoA in PB11 as compared to the parental wild-type strain JM101 [Flores et al., 2002, 2004, 2005a]. Therefore, we have proposed that PoxB (whose coding gene is transcribed by RpoS) is an enzyme that plays an important role when growing under carbon-limiting stress conditions like those present permanently in PB11 when growing on glucose as the only carbon source. This is because the cell is unable to produce enough G6P to grow fast due to the absence of the PTS. As a result of this limitation, the cell probably senses low internal glucose (or G6P) concentrations and utilizes PoxB, AcS, and the glyoxalate shunt enzymes to produce malate and succinate, avoiding the complete oxidation of AcCoA into CO₂ through the TCA cycle to preserve carbon skeletons. Malate is then utilized gluconeogenically in this strain [Flores et al., 2002, 2004, 2005a]. Therefore, in PB11 the strategy appears to be to preserve and recycle carbon skeletons using these enzymes and it appears that PoxB also plays an important role in respiration in this strain since *poxB* is upregulated 5-fold, while all the other respiratory genes are downregulated in PB11 as compared to JM101 [Flores et al., 2005a]. As expected, the inactivation of *poxB* in wild-type JM101 and also in PB12 when growing on glucose (2 g/l) as the only carbon source, does not affect their growth rates because these strains utilize mainly Pdh to produce AcCoA in these growing conditions [Flores et al., 2004]. Interestingly, the growth rate of the *poxB*⁻ derivative of PB11 *arcA*⁻ strain is only slightly decreased (8–10%) when growing on glucose as the only carbon source. This result is in agreement with data that indicate that due to the presence of the *arcA* mutation in PB11, this strain now utilizes mainly Pdh instead of using both Pdh and PoxB enzymes roughly in similar proportions as it happens in PB11.

Interestingly, the PB11 *arcA*⁻ strain carrying plasmid pCLv1*glkgalP* when induced with IPTG reached a μ of

Table 4. *E. coli* strains and plasmids used in this study

Strains	Genotype	Reference
JM101	F' <i>traD36 proA⁺ proB⁺ lacI^q lacZΔM15/ supE thi Δ(lac-proAB)</i>	Bolívar et al., 1977
PB11	JM101 Δ(<i>ptsH, ptsI, crr</i>): <i>kan</i>	Flores et al., 1996
PB12	PB11, <i>pts⁻ arcB⁻</i>	Flores et al., 1996, 2005a
PB121	PB12, pBB31 (<i>arcB⁺</i>)	Flores et al., 2005a
PB11 <i>arcA⁻</i>	PB11 <i>arcA::tet</i>	Georgellis et al., 2001
PB11 <i>poxB⁻</i>	PB11 <i>poxB::cat</i>	Flores et al., 2004
PB11 <i>arcA⁻poxB⁻</i>	PB11 <i>arcA::tet poxB::cat</i>	This work

Plasmids	Vectors	Promoters	Reference
pCLv1 <i>glk</i>	pCL1920 (Spt ^R)	<i>ptrc</i>	Hernández et al., 2003
pCLv1 <i>galP</i>	pCL1920 (Spt ^R)	<i>ptrc</i>	Hernández et al., 2003
pCLv1 <i>glkgalP</i>	pCL1920 (Spt ^R)	<i>ptrc</i>	Hernández et al., 2003
pCL <i>pgi</i>	pCL1920 (Spt ^R)	Wild type	Leal, 2005
pCL <i>glkpgi</i>	pCL1920 (Spt ^R)	<i>glk</i> – <i>ptrc</i> <i>pgi</i> – wild type	Leal, 2005

0.49 h⁻¹ that is 20% higher than PB12 growth rate (0.42 h⁻¹) and this strain has also recovered the Glc⁺ phenotype.

There are more modifications in PB12 that are still unexplained. Namely *pgi* upregulation, especially because this gene is downregulated in PB11 *arcA⁻*, and why plasmids pCL*pgi* or pCL*glkpgi* have no effect on the growth rate in the PTS⁻ PB11 strain. It is interesting that PB11/pCLv1*glk* partially recovered its growth rate. This result might indicate that this strain synthesizes and maybe accumulates G6P to a certain level that triggers growth increase, whereas there is no growth increase in PB11/pCL*glkpgi*. This suggests that the G6P is being transformed more efficiently in this last strain into F6P and that this metabolite does not have the same effect on the growth rate as G6P.

In addition to helping understand genetic and metabolic plasticity in *E. coli* using strains lacking global regulator systems like PTS and ArcA, and possible relations between these master regulators, the results obtained in this work could be applied to the improvement of industrial production strains. It has been reported that overexpression of *galP* and *glk* in a PTS⁻Glc⁻ *E. coli* mutant allows the generation of strains with a higher capacity to synthesize ethanol when compared to a PTS⁺ strain [Hernandez-Moltalvo et al., 2003]. The finding that *arcA* inactivation further increases growth capacity over *galP* and *glk* overexpression offers a new alternative for the design of better *E. coli* production strains by metabolic engineering.

Experimental Procedures

Bacterial Strains and Plasmids

E. coli strains and plasmids used in this work are listed in table 4. PB12 was obtained from PB11, a PTS⁻ mutant derivative of *E. coli* JM101 [Flores et al., 1995, 1996]. PB11 *arcA⁻* was the result of transducing the *arcA::tet* mutation from ECL5020 into PB11 [Georgellis et al., 2001; Leal, 2005]. Strain PB11 *arcA⁻poxB⁻* was constructed by transducing the *poxB::cat* mutation into PB11 *arcA⁻* strain [Flores et al., 2004]. The *glk* and *pgi* genes were cloned in the low-copy plasmid pCL1920 (ca. 5 copies per cell) [Hernández-Montalvo et al., 2003]. *pgi* was cloned in the *EcoRI* site of pCL1920 and also as an *XbaI*-*BamHI* fragment in the plasmid pCLv1*glk* located in tandem with *glk* [Leal, 2005].

Media and Growth Conditions

To isolate PTS⁻Glc⁺ strains, a Multigen fermentor (New Brunswick Scientific Co.) was used for batch and continuous culture. The culture medium was 1.3 l of M9 minimal medium [Ausubel et al., 1999] with glucose (2 g/l) and kanamycin (30 μg/ml); growth conditions were: 1 vvm, 37°C, 600 rpm and pH = 7. Dilution rates (D) for continuous culture were: 0.08, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.75 and 0.8 h⁻¹ (fig. 1) [Flores, 1995].

For RNA isolation, duplicate cultures were grown in 1-liter fermentors in aerobic conditions on M9 medium with 2 g/l of glucose, at 37°C, 600 rpm, pH = 7 and an air flow rate of 1 vvm, starting at an OD_{600nm} of 0.05 and collected when growing in the log phase at an OD_{600nm} of 1 [Flores et al., 2005a].

Triplicate cultures for growth rates and enzymatic activities determinations were grown in 125-ml baffled flasks with 25 ml M9 medium and 2 g/l of glucose, at 37°C and 300 rpm, starting at an OD_{600nm} of 0.1 and collected when growing in the log phase at an OD_{600nm} of 1.0. Growth kinetics were followed until the culture reached the stationary phase [Leal, 2005]. Inocula preparation is very important because the PB11 strain is very sensitive. If PB11 growing cells are centrifuged and washed, or even if growth mea-

surements are performed to often (15 min), growth rate is highly perturbed and reduced. Therefore, these steps were avoided for inocula preparation and inocula for growth rate determinations were prepared as follows: strains stored on glycerol at -70°C were initially inoculated on Luria broth medium for overnight growth. It is important to emphasize that when PB11/pCLv1glk and PB11/pCLv1galP strains are transferred from Luria Broth to M9 medium, a long lag phase occurs. Cells were then inoculated into M9 medium with 2 g/l of glucose and when these cultures were growing exponentially ($\text{OD}_{600\text{nm}} = 1.4$), they were inoculated into the same prewarmed medium at 37°C with a starting $\text{OD}_{600\text{nm}} = 0.08$. IPTG was used at a final concentration of 0.1 mM when required.

Glucose phenotype was analyzed with MacConkey agar base plates and glucose 2 g/l as the carbon source. Red colonies indicated Glc^{+} phenotype and white colonies Glc^{-} phenotype. Colonies were analyzed after a 12-hour incubation at 37°C .

References

- Alexeeva S, Hellingwerf K, Teixeira MM: Requirement of ArcA for redox regulation in *Escherichia coli* under microaerobic but not anaerobic or aerobic conditions. *J Bacteriol* 2003;185:204–209.
- Ausubel F, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K: Short Protocols in Molecular Biology, ed 4. New York, Wiley, 1999.
- Bolívar F, Rodríguez RL, Greene PJ, Betlach MC, Hyenecker HL, Boyer HW, Crosa JH, Falkow S: Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene* 1977;2:95–113.
- Chao G, Shen J, Tseng CP, Park SJ, Gunsalus RP: Aerobic regulation of isocitrate dehydrogenase gene (*icd*) expression in *Escherichia coli* by the *arcA* and *fnr* gene products. *J Bacteriol* 1997;179:4299–4304.
- Cunningham L, Gruer MJ, Guest JR: Transcriptional regulation of aconitase genes (*acnA* and *acnB*) of *Escherichia coli*. *Microbiology* 1997;143:3795–3805.
- Cunningham L, Guest JR: Transcription and transcript processing in the *sdhCDAB* and *sucABCD* operon of *Escherichia coli*. *Microbiology* 1998;144:2113–2123.
- Curtis SJ, Epstein W: Phosphorylation of D-glucose in mutants defective in glucose phosphotransferase, mannose phosphotransferase and glucokinase. *J Bacteriol* 1975;122:1189–1199.
- El-Kazzaz W, Morita T, Tagami H, Inada T, Aiba H: Metabolic block at early stages of the glycolytic pathway activates the Rcs phosphorylay system via increased synthesis of dTDP-glucose in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 2004;51:1117–1128.
- Flores N: Master Degree Thesis, Institute of Biotechnology, UNAM, México, 1995.
- Flores N, Xiao J, Berry A, Bolívar F, Valle F: Pathway engineering for the production of aromatic compounds in *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol* 1996;14:620–623.
- Flores S, Gosset G, Flores N, de Graaf A, Bolívar F: Analysis of carbon metabolism in *Escherichia coli* strains with an inactive phosphotransferase system by ^{13}C labeling and NMR spectroscopy. *Metab Eng* 2002;4:124–137.
- Flores N, de Anda R, Flores S, Escalante A, Hernández G, Martínez A, Ramírez O, Gosset G, Bolívar F: Role of pyruvate oxidase in *Escherichia coli* strains lacking the phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase system. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2004;8:209–211.
- Flores N, Flores S, Escalante A, de Anda R, Leal L, Malpica R, Georgellis D, Gosset G, Bolívar F: 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. *Metab Eng* 2005a;7:70–87.
- Flores S, Flores N, de Anda R, González A, Escalante A, Sigala JC, Gosset G, Bolívar F: 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* 2005b;10:51–63.
- Frost J, Lievense J: Prospects for biocatalytic synthesis of aromatics in the 21st century. *New J Chem* 1984;18:341–348.
- Gennis RB, Stewart V: Respiration; in Neidhart FC (ed): *Escherichia coli* and *Salmonella*, ed 2. Washington, ASM, 1996, pp 217–252.
- Georgellis D, Kwon O, Lin ECC, Wong SM, Akeryley BJ: Redox signal transduction by the ArcB sensor kinase of *Haemophilus influenzae* lacking the PAS domain. *J Bacteriol* 2001;183:7206–7212.
- Gosset G, Yong-Xiao J, Berry A: A direct comparison of approaches for increasing carbon flow to aromatic biosynthesis in *Escherichia coli*. *J Ind Microbiol* 1996;17:47–52.
- Gosset G: Improvement of *Escherichia coli* production strains by modification of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system. *Microb Cell Fact* 2005;4:14–25.
- Hernández-Montalvo V, Martínez A, Hernández-Chávez G, Bolívar F, Valle F: Expression of *galP* and *glk* in an *Escherichia coli* PTS mutant restores glucose transport and increases glycolytic flux to fermentation products. *Biotechnol Bioeng* 2003;83:687–694.
- Iuchi S, Lin E: *arcA* (*dye*), a global regulatory gene in *Escherichia coli* mediating repression of enzymes in aerobic pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:1988–1992.
- Kawamoto H, Morita T, Shimizu A, Inada T, Aiba H: Implication of membrane localization of target mRNA in the action of a small RNA: mechanism of post-transcriptional regulation of glucose transport in *Escherichia coli*. *Genes Dev* 2005;19:328–338.
- Leal L: Master Degree Thesis, Institute of Biotechnology, UNAM, México, 2005.
- Levanon SS, San K, Bennett G: Effect of oxygen on the *Escherichia coli* ArcA and FNR regulation systems and metabolic responses. *Biotechnol Bioeng* 2005;89:556–564.
- Liu X, DeWulf P: Probing the ArcA-P modulon of *Escherichia coli* by whole genome transcriptional analysis and sequence recognition profiling. *J Biol Chem* 2004;279:12588–12597.
- Malpica R, Franco B, Rodríguez C, Kwon O, Georgellis D: Identification of a quinone sensitive redox switch in the ArcB sensor kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:13318–13323.

RNA Extraction, cDNA Synthesis and RT-PCR

RNA extraction, cDNA synthesis and real-time PCR were performed as described by Flores et al. [2005a].

Acknowledgments

We thank Dimitris Georgellis for providing the *arcA*⁻ strain *arcA::tet* (ECL5020). We also thank Mercedes Enzaldo and Cesar Aguilar Martínez for technical support, as well as Paul Gaytán and Eugenio López for the synthesis of oligonucleotides. This work was partially supported by CONACyT/México grants NC230, 43243 and DGAPA-PAPIIT/UNAM grants IN2204032, IN218902, IN205005.

- Miller J, Backman K, O'Connor M, Hatch R: Production of phenylalanine and organic acids by phosphoenolpyruvate carboxylase-deficient mutants of *Escherichia coli*. *J Ind Microbiol* 1987;2:143–149.
- Mori M, Shio I: Pyruvate formation and metabolism in an amino acid-producing bacterium, *Brevibacterium flavum*. *Agric Biol Chem* 1987;51:129–138.
- Park SJ, Chao G, Gunsalus RP: Aerobic regulation of the *sucABCD* genes of *Escherichia coli*, which encode α -ketoglutarate dehydrogenase and succinyl coenzyme A synthase: role of ArcA, Fnr and the upstream *sdhCDAB* promoter. *J Bacteriol* 1997;179:4138–4142.
- Park, SJ, Gunsalus RP: Oxygen, iron, carbon and superoxide control of the fumarase *fumA* and *fumC* genes of *Escherichia coli*: role of the *arcA*, *fnr* and *soxR* gene products. *J Bacteriol* 1995;177:6255–6262.
- Perrenoud A, Sauer U: Impact of global transcriptional regulation by ArcA, ArcB, Cra, Crp, Cya, Fnr, and Mlc on glucose catabolism in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 2005;187:3171–3179.
- Postma P, Lengeler J, Jacobson G: Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase system; in Neidhardt FC (ed). *Escherichia coli* and *Salmonella*. Cellular and Molecular Biology. Washington, American Society for Microbiology, 1996, vol 1, pp 1149–1174.
- Saier M: Vectorial metabolism and the evolution of the transport systems. *J Bacteriol* 2002; 182:5029–5035.
- Shen J, Gunsalus RP: Role of multiple ArcA recognition sites in anaerobic regulation of succinate dehydrogenase (*sdhCDAB*) gene expression in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 1997;26:223–236.
- Yi J, Li K, Draths K, Frost J: Modulation of phosphoenolpyruvate synthase expression increases shikimate pathway product yields in *Escherichia coli*. *Biotechnol Prog* 2002;18: 1141–1148.