

00551



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

FACULTAD DE INGENIERÍA

Estudio sobre las diferencias de fenotipos  
entre cepas de *Escherichia coli* que carecen del  
sistema de fosfotransferasa (PTS)

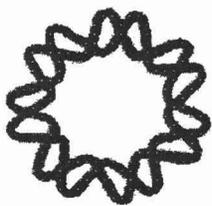
**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

P R E S E N T A

Q.F.B. LIDIA IRENE LEAL GUADARRAMA



CUERNAVACA, MOR.

NOVIEMBRE 2005

M:350380



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).

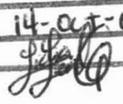
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición 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 Gonzalo Bolívar Zapata.

Para la realización del presente trabajo se contó con el apoyo económico del CONACyT a través del proyecto NC-230, DGAPA-PAPIIT IN220403-2, así como beca para realizar estudios de posgrado del CONACyT y de la DGEP.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recapcional.  
NOMBRE: Lidia Irene Leal Guadarrama

FECHA: 14-01-05

FIRMA: 

## MIEMBROS DEL JURADO

Presidente: Dra. Guadalupe Espín Ocampo

Secretario: Dr. Francisco Bolívar Zapata

Vocal: Dra. Alicia González Manjarrez

Suplente: Dr. Mario Soberón Chávez

Suplente: Dr. Guillermo Gosset Lagarda

*A quienes siempre han estado a mi lado: mi familia.*

*Gracias por hacerme sentir querida y valorada  
todos los días de mi vida.*

*Y a quienes han sido como una familia  
para mí durante estos dos años.*

## AGRADECIMIENTOS

- Al Dr. Francisco Bolívar por haberme dado la oportunidad de integrarme a su grupo de investigación y sobre todo por mostrarme lo importante que es sentir cada día entusiasmo y entrega por lo que uno hace.
- Al Dr. José Adelfo Escalante y la Dra. Noemí Flores por haberme enseñado con tanta paciencia el ABC del trabajo en el laboratorio.
- A los Drs. Alfredo Martínez, Dimitris Georgellis, Guadalupe Espín, Guillermo Gosset, José Luis Puente, Mario Soberón y Mario Rocha por sus aportaciones y comentarios durante la realización de este trabajo y la escritura de la tesis.
- A mis compañeros y amigos del grupo Bolívar-Gosset-Martínez; Álvaro, tú también formas parte del laboratorio. Ustedes me enseñaron mucho de lo que es la solidaridad, la perseverancia, la confianza, el análisis, la cultura, la alegría, la organización, el dinamismo, la seguridad, la honestidad, la fortaleza, la humildad, la dedicación, la unión y la amistad. Gracias.
- Muy especialmente a quienes me brindaron su apoyo y guía en la aplicación de técnicas, manejo de equipo y análisis de resultados: Gerard Huerta, Inés Chávez-Béjar, Juan Carlos Sigala, Monse Orencio, Naty Cabrera, Ramón de Anda, Salvador Flores, Susi Romero, Tere Brito y también Bernardo Franco.
- A Mercedes Enzaldo y Silvia Velázquez. Sin su ayuda creo que habría tardado el doble en terminar.
- A mis amigos de la maestría: Adriana, Álvaro, Andrea, Bernardo, Gerardo, Inés, Irma, Miriam, Naty, Paty y Susi. Gracias por compartir.
- A las chicas de Amarain. Gracias por darle un “giro” a mi vida.
- A Alicia Castrillón por ayudarme a reconstruir mi mundo y a mi misma.
- A la Sra. Juana Fuentes y el Sr. Armando Román por cuidarme durante estos dos años como si fuera parte de su familia.
- Al “aparecido” y compañía porque fue todo un acontecimiento en mi vida.

# ÍNDICE

RESUMEN . . . . .	1
INTRODUCCIÓN . . . . .	2
ANTECEDENTES . . . . .	4
El transporte de glucosa en <i>E.coli</i> . . . . .	4
a) El sistema PTS . . . . .	4
b) Vías alternativas para transportar glucosa . . . . .	6
c) Ingeniería genética para transportar glucosa en cepas PTS- . . . . .	7
Eliminación del sistema PTS . . . . .	8
a) Generación de cepas PTS- y PTS-Glc+ . . . . .	8
b) Determinación de flujos de carbono de las cepas PB11, PB12 y PB13 . . . . .	9
c) Análisis transcripcional por RT-PCR . . . . .	11
El regulón de galactosa . . . . .	14
Sistemas de regulación transcripcional . . . . .	17
JUSTIFICACIÓN . . . . .	19
OBJETIVOS	
General . . . . .	20
Específicos . . . . .	20
HIPÓTESIS . . . . .	21
MATERIALES Y MÉTODOS . . . . .	22
a) Cepas bacterianas y plásmidos . . . . .	22
b) Medios de cultivo y condiciones de crecimiento . . . . .	23

c) Extracción de RNA y síntesis de cDNA . . . . .	23
d) PCR de tiempo real (RT-PCR) . . . . .	24
e) Determinación de secuencias nucleotídicas de los genes . . . . .	26
f) Determinación de actividades enzimáticas . . . . .	28
RESULTADOS . . . . .	29
a) El regulón de galactosa está sobreexpresado en las cepas PB11 y PB12	29
b) Ausencia de mutaciones en el regulón de galactosa . . . . .	30
c) La sobreexpresión de <i>galP</i> en PB11 aumenta su velocidad de crecimiento . . . . .	31
d) Influencia de las enzimas Glk y Pgi sobre el crecimiento de las cepas PTS- . . . . .	32
e) El aumento de las capacidades de internalización y fosforilación de glucosa genera fenotipo Glc+ en la cepa PB11 . . . . .	36
f) Secuenciación de genes reguladores y detección de una mutación puntual en <i>arcB</i> . . . . .	39
DISCUSIÓN . . . . .	40
a) La ausencia del sistema PTS y sus consecuencias . . . . .	40
b) PB11, una cepa hambrienta . . . . .	41
c) Transportadores alternativos para la glucosa . . . . .	42
d) De la glucosa a la fructosa-6-fosfato . . . . .	43
e) Las posibles ventajas de inactivar el sistema de regulación Arc . . . . .	45
CONCLUSIONES . . . . .	50
PERSPECTIVAS . . . . .	51
ACTIVIDADES RELEVANTES DESARROLLADAS DURANTE LA MAESTRÍA . . . . .	52
APÉNDICE . . . . .	56
a) Clonación de los genes <i>pgi</i> y <i>glk</i> en plásmidos multicopia . . . . .	56
b) Abreviaturas más importantes utilizadas en este trabajo . . . . .	57
BIBLIOGRAFÍA . . . . .	58

## RESUMEN

El sistema de fosfotransferencia (PTS) consume un mol de fosfoenolpiruvato (PEP) para fosforilar cada mol de glucosa transportada. Para incrementar la disponibilidad de PEP hacia la producción de compuestos aromáticos de interés industrial se generó, a partir de la cepa silvestre JM101, la derivada PB11 (PTS<sup>-</sup>) la cual se sometió a presión selectiva hasta obtener mutantes que crecen más rápido en medio mínimo con glucosa. Se ha determinado que la cepa mutante PB12 (PTS<sup>-</sup> Glc<sup>+</sup>) utiliza a la permeasa de galactosa (GalP) para transportar glucosa y a la glucocinasa (Glk) para fosforilarla; además, el gen que codifica para la fosfoglucosa isomerasa (Pgi), la primera enzima glicolítica, está sobreexpresado 6.6 veces con respecto a la cepa silvestre JM101. Sin embargo aún no se conoce con detalle de qué manera estos factores influyen en la velocidad de crecimiento de PB12.

En el presente trabajo se estudiaron algunos factores genéticos, de regulación transcripcional y enzimáticos involucrados en el fenotipo Glc<sup>+</sup> de la cepa PB12. Los resultados más relevantes se mencionan a continuación:

- Por PCR en tiempo real (RT-PCR) se determinó que los genes del regulón de galactosa: *galP*, *galETKM*, *galU*, *mglB* y *galS* están sobreexpresados tanto en la cepa PB11 como en la PB12. No hay ninguna mutación en el regulón; aparentemente esta sobreexpresión se explica por la síntesis endógena de galactosa como autoinductor del sistema.
- En la cepa PB12 se seleccionó una mutación en el gen *arcB* que cambia un residuo de Tyr por uno de Cys en la segunda región transmembranal de la proteína. Además, en la cepa PB12 hay una ligera sobreexpresión de los genes de TCA, lo cual es característico de una cepa *arcA*<sup>-</sup>. La eliminación del gen *arcA* incrementó el crecimiento de la cepa PB11, pero su patrón de transcripción no es semejante al de PB12.
- La transformación de PB11 con el plásmido pCL*glk+galP* incrementa más de 5 veces la velocidad de crecimiento de la cepa PB11 lo cual sugiere fuertemente que la suma de una mayor internalización de glucosa por GalP más fosforilación por Glk generan un fenotipo Glc<sup>+</sup> en la cepa PB11.

## INTRODUCCIÓN

En *E. coli*, el transporte de azúcares y en particular la glucosa, depende del sistema de fosfotransferencia (PTS). Además de esta función, el sistema PTS regula los procesos de represión catabólica y participa como elemento transductor de señales en la quimiotaxis (Postma *et.al.*, 1996).

La mitad del fosfoenolpiruvato (PEP) producido durante la glucólisis es consumido por PTS durante la internalización de glucosa. El PEP es un metabolito celular clave en la síntesis de varios productos de interés industrial, como los compuestos aromáticos. Se han desarrollado varias estrategias para incrementar la disponibilidad de PEP hacia la producción de compuestos de interés; una de estas estrategias es la inactivación del sistema PTS. Sin embargo, la eliminación de PTS disminuye el transporte de glucosa y la tasa de crecimiento (fenotipo PTS<sup>-</sup> Glc<sup>-</sup>) por lo cual las cepas PTS<sup>-</sup> no son apropiadas para propósitos de producción (Flores *et.al.*, 2002). Por lo tanto, se requieren otras modificaciones genéticas para incrementar la capacidad de transporte de glucosa en una cepa mutante PTS<sup>-</sup>.

Con el objetivo de desarrollar mutantes de *E. coli* con alternativas al uso del sistema PTS, en nuestro laboratorio se obtuvo, a partir de la cepa silvestre JM101, la cepa PB11 que carece del sistema PTS ( $\Delta ptsHIcrr::kan$ ) (Lévy *et.al.*, 1990). La cepa PB11 (PTS-Glc<sup>-</sup>) se cultivó bajo presión de selección y se aislaron mutantes capaces de crecer en glucosa (PTS-Glc<sup>+</sup>) a velocidades mayores que la cepa progenitora PB11. Se ha iniciado la caracterización de dos cepas mutantes, la PB12 y la PB13. Se demostró que específicamente la cepa PB12 puede incrementar el flujo de PEP hacia la síntesis de compuestos aromáticos, así que tiene el potencial de convertirse en un buen sistema para la producción de metabolitos de importancia comercial (Flores *et.al.*, 1996). Por tal razón es que la caracterización de las cepas PTS-Glc<sup>+</sup> se ha enfocado más en la cepa PB12.

Se determinó que PB12 utiliza a la permeasa de galactosa (GalP) para transportar glucosa y a la glucocinasa (Glk) para fosforilarla (Flores *et.al.*, 2002 y Flores *et.al.*, 2005). Como objetivo de este trabajo, se pretende explicar el incremento en la expresión de los genes *galP* y *glk* utilizando diversas estrategias como es la determinación de niveles de

transcrito por RT-PCR y la secuenciación de genes del regulón de galactosa. En segundo lugar se analizará si el incremento de actividad de las enzimas glucocinasa y fosfoglucoquinasa, puede aumentar la velocidad de crecimiento de la cepa PTS- denominada PB11.

Finalmente se investigará la causa de la sobreexpresión de genes que codifican para enzimas de TCA detectada en PB12 por la técnica de RT-PCR. alguna mutación en los sistemas reguladores más importantes de esta vía podría explicar el incremento de la transcripción de genes de TCA.

A continuación se explicará el funcionamiento del sistema PTS, la estrategia para generar cepas PTS- capaces de consumir glucosa y las diferentes metodologías que se han utilizado para su caracterización.

## ANTECEDENTES

### El transporte de glucosa en *E. coli*

Una de las características morfológicas de *E. coli* y de otras bacterias gram-negativas es la presencia de dos membranas que rodean su citoplasma. El espacio entre las dos membranas se conoce como periplasma. Ambas membranas controlan el paso de compuestos polares a través de proteínas embebidas en las membranas que forman canales. En la membrana externa hay proteínas llamadas porinas siendo las más abundantes la OmpC y OmpF. Cuando la concentración de glucosa es mayor de 0.2 mM ésta pasa libremente (transporte pasivo) a través de OmpC y OmpF para llegar al periplasma. Una vez en el periplasma, la glucosa es internalizada al citoplasma mediante transporte activo, generalmente por el sistema de fosfotransferencia que es un translocador de grupo (Postma *et.al.*, 1996; Saier, 2002; Gosset, 2005).

#### a) El sistema PTS

El sistema de fosfotransferencia (PTS) transporta varios carbohidratos y ciertos alcoholes en bacterias. En este sistema, la translocación del carbohidrato a través de la membrana citoplasmática está acoplada a su fosforilación.

El sistema PTS está integrado por:

- La llamada "enzima I" (EI) y la proteína HPr que es estable al calor y rica en histidinas son proteínas citoplasmáticas que participan en el transporte de todos los carbohidratos PTS.
- El complejo enzimático II conformado por varios componentes diferentes que son específicos para cada carbohidrato. *E. coli* cuenta con 21 complejos enzimáticos II para el transporte de diferentes azúcares. Para el transporte de glucosa se requiere del componente soluble IIA y la proteína integral de membrana IICB que posee dos dominios.

Además de los componentes específicos para glucosa, este carbohidrato también puede transportarse por el sistema PTS de manosa (II<sup>Man</sup>).

El fosfoenolpiruvato (PEP), un intermediario de la glicólisis, inicia la cascada de fosforilación al donar su grupo fosfato a la enzima I la cual a su vez lo transfiere a la enzima HPr. Una vez fosforilada, HPr-P cede su grupo fosfato directamente al componente II el cual fosforila a la glucosa entrante (Postma *et.al.*, 1993; Nikaido y Saier, 1992). En la figura 1 se esquematiza esta cascada de fosforilación.

El PEP es dos veces más energético que el ATP ( $\Delta G^\circ$  de hidrólisis de aprox. 14 kcal/mol comparado con 7.5 kcal/mol para el ATP), lo cual hace que el sistema PTS pueda acumular sustrato en un exceso de  $10^6$  veces contra un gradiente de concentración. El azúcar queda atrapado en el interior en una forma fosforilada que le impide salir de la célula a menos que se hidrolice. Es por eso que el PTS es el sistema de transporte que permite la más efectiva acumulación de sustrato (Saier y Chin, 1990).

En *E. coli*, los genes que codifican para las enzimas I, HPr y  $\text{IIA}^{\text{Glc}}$  forman el operón *ptsHlcr*. El gen *ptsG* que codifica para la proteína  $\text{IICB}^{\text{Glc}}$  se encuentra en otro locus (De Reuse *et.al.*, 1984).

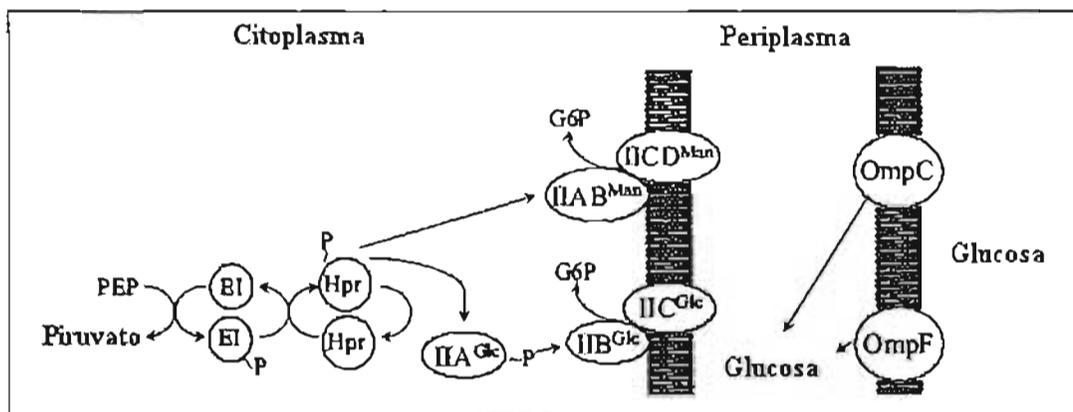


Figura 1. Transporte de glucosa por el sistema PTS. La glucosa es transportada principalmente por la enzima  $\text{IICB}^{\text{Glc}}$  y también puede internalizarse por la enzima  $\text{IICD}^{\text{Man}}$  (Gosset, 2005).

Además de participar en el transporte de carbohidratos, el sistema PTS ejerce funciones a nivel regulatorio. En presencia de glucosa, la enzima  $\text{IIA}^{\text{Glc}}$  transfiere el grupo fosfato a la enzima II y una vez desfosforilada ésta se une a varias permeasas inhibiendo la entrada de azúcares no PTS; a este fenómeno se le denomina "exclusión de inductor". En ausencia de un carbohidrato tipo PTS, la enzima  $\text{IIA}^{\text{Glc}}\text{-P}$  interactúa

con el dominio C-terminal de la enzima adenilato ciclasa y se activa el dominio catalítico N-terminal para producir AMPc a partir de ATP (Saier *et.al.*, 1996). La unión de AMPc al regulador transcripcional CRP activa muchos sistemas sujetos a represión catabólica. Además, la proteína  $\Pi^{Glc}$  ejerce un control negativo sobre la traducción del RNAm del gen *rpoS*, el cual codifica para la unidad  $\sigma^s$  que participa como parte del sistema de transcripción que usa la bacteria en condiciones de estrés (Ueguchi *et.al.*, 2001; Weber *et.al.*, 2005).

## b) Vías alternativas para transportar glucosa

Las cepas mutantes en el sistema PTS (componentes generales o específicos para glucosa) presentan deficiencia para crecer en glucosa. Se ha reportado que en ausencia del sistema PTS, este carbohidrato puede ser transportado por sistemas alternativos:

- Un componente  $\Pi^{Glc}$  desacoplado de la cascada de fosforilación convencional.  
Se ha propuesto que la enzima  $\Pi^{Glc}$ , funciona como un poro que está cerrado en ausencia de fosforilación pero que se abre al ser fosforilado. Algunas mutaciones en los genes *ptsG* y *ptsG* dan lugar a poros permanentemente abiertos que permiten transportar glucosa en ausencia de fosforilación (Ruijter *et.al.*, 1991).
- El transportador de gluconato.  
Muchas enterobacterias producen la enzima glucosa deshidrogenasa (GDH) que transforma a la glucosa en gluconato en el espacio periplásmico, el cual es transportado y metabolizado por la ruta de Entner-Doudoroff. Algunas bacterias pueden producir la holoenzima activa mientras que otras, como es el caso de *E. coli*, requieren de pirroloquinolina quinona (PQQ) como grupo prostético (Neijssel *et.al.*, 1983). Puesto que *E.coli* no produce PQQ (Matsushita *et.al.*, 1997), las cepas PTS- requieren de la adición de PQQ para poder generar gluconato a partir de glucosa.
- Un sistema de transporte de galactosa constitutivo.  
La permeasa de galactosa también tiene afinidad por la glucosa (ver Tabla1), pero en condiciones normales no transporta glucosa puesto que está sujeta a represión catabólica en presencia de este carbohidrato. Saier y cols. (1973) aislaron una cepa de *Salmonella typhimurium* PTS- que expresa *galP* de manera constitutiva debido a

una mutación que se encontró en el represor *galR*. Más adelante se explicará el funcionamiento del regulón de galactosa.

Tabla 1. Parámetros cinéticos de los transportadores de glucosa y costo energético de la internalización y fosforilación de la glucosa (Gosset, 2005).

Transportador	Km (Glucosa)	Vmax (mmol min <sup>-1</sup> g <sup>-1</sup> )	Gasto energético**
Complejo II <sup>Glc</sup>	3-10 μM	126	1 PEP
Complejo I <sup>Man</sup>	15 μM	72	1 PEP
GalP	10.2 μM	15.6	1 H <sup>+</sup> + 1 ATP
MglABC	0.2 μM	No determinado	2 ATP
Glf	4.1 mM*	75	1 ATP

\*Se ha reportado que el Glf<sup>Zm</sup> producido en *E.coli* tiene una Km de 1.1 a 2.9 mM (Parker *et.al.*, 1995). \*\* El costo energético de 1 mol de PEP corresponde a 1 mol de ATP.

Por otro lado se ha determinado que cuando *E. coli* crece en concentraciones micromolares de glucosa, sintetiza galactosa la cual puede inducir el regulón de galactosa. De esta manera puede expresarse la permeasa de galactosa para transportar glucosa (Ferenci *et.al.*, 2001).

### c) Ingeniería genética para transportar glucosa en cepas PTS<sup>-</sup>

Para la generación de cepas PTS-Glc<sup>+</sup> también se han utilizado estrategias de ingeniería genética como es la sobreexpresión de transportadores de glucosa independientes de PTS:

- *Zymomonas mobilis* tiene un facilitador de glucosa codificado por *glf* que no requiere de energía para el transporte. La expresión de este facilitador en una cepa de *E. coli* PTS<sup>-</sup> y de la glucocinasa para fosforilar a la glucosa logró recuperar la velocidad de crecimiento de 0.01 h<sup>-1</sup> a 0.53 h<sup>-1</sup> y sintetizar intermediarios aromáticos con un rendimiento del 41% (Snoep *et.al.*, 1994; Yi *et.al.*, 2003).
- La sobreexpresión de los genes nativos *galP* y *glk* bajo promotores de diferente fuerza también ha logrado incrementar la velocidad de crecimiento de una cepa *ptsHlcr<sup>-</sup> lacI<sup>-</sup> lacZ<sup>-</sup>* de 0.03 h<sup>-1</sup> a 0.64 h<sup>-1</sup> y sintetizar intermediarios aromáticos con un rendimiento del 43% (Hernández *et.al.*, 2003).

## Eliminación del sistema PTS

### a) Generación de cepas PTS<sup>-</sup> y PTS<sup>-</sup>Glc<sup>+</sup>

El PEP es uno de los compuestos precursores más importantes en las rutas biosintéticas, particularmente en la de los aminoácidos aromáticos. El PEP proviene principalmente de la glucólisis y el mayor porcentaje de éste se transforma en piruvato por dos rutas: por el sistema PTS durante el transporte de glucosa (66%) y por la acción de las piruvato cinasas PykA y PykF (14%). La otra enzima que tiene como sustrato al PEP es la PEP carboxilasa que lo convierte en oxaloacetato (16%), uno de los intermediarios más importantes del ciclo de Krebs. Así que sólo un 4% del PEP se dirige a la formación de aminoácidos aromáticos (Holms, 1986).

Hasta ahora, las estrategias utilizadas para aumentar la disponibilidad de PEP y con ello el rendimiento a partir de glucosa en la síntesis de compuestos aromáticos han sido las siguientes:

- Eliminación de las piruvato cinasas (Mori y Shio, 1987)
- Eliminación de la PEP carboxilasa (Miller *et.al.*, 1987)
- Sobreexpresión del gen *pps* que codifica para la enzima PEP sintasa que genera PEP a partir de piruvato (Yi *et.al.*, 2002)

Otra estrategia es la eliminación del sistema PTS lo cual en teoría duplicaría la disponibilidad de PEP para la biosíntesis de aminoácidos aromáticos (Liao *et.al.*, 1996; Báez *et.al.*, 2001). Para este fin se construyó en nuestro laboratorio una cepa de *E.coli* que carece del operón *ptsHlcr*. Para ello se transdujo a la cepa JM101 la delección  $\Delta(\text{ptsHlcr})::\text{kan}$  de la cepa TP2811, mediante el bacteriofago P1. De este modo se obtuvo la cepa mutante PB11  $\Delta \text{ptsHlcr}$  a la que se le determinó el fenotipo PTS (Flores *et.al.*, 1996).

Se ha señalado que las bacterias de *E. coli* carentes del sistema PTS crecen lentamente en medio mínimo con glucosa debido a la dificultad que tienen para transportar este azúcar, por ello no son apropiadas para propósitos de producción de compuestos aromáticos. Se requieren otras modificaciones genéticas para incrementar la capacidad de transporte de glucosa en una mutante PTS<sup>-</sup>.

Por tal razón se sometió a la cepa PB11 (JM101 PTS-) a un sistema de cultivo en lote durante 70 horas donde se generaron mutantes espontáneas y después se usó un sistema de cultivo continuo o quimiostato. Aumentando la dilución ( $D = 0.4 \text{ h}^{-1}$  hasta  $0.8 \text{ h}^{-1}$ ) del quimiostato se aislaron las mutantes a partir de sus velocidades de crecimiento. Se escogieron dos mutantes, una de menor y una de mayor velocidad, denominadas respectivamente PB12 ( $\mu=0.42 \text{ h}^{-1}$ ) y PB13 ( $\mu=0.49 \text{ h}^{-1}$ ) (Flores *et al.*, 1996).

Se ha demostrado que el flujo de carbono que se dirige hacia la síntesis de compuestos aromáticos es mayor en la cepa PB12 que en la silvestre JM101 (Báez *et al.*, 2004).

### b) Determinación de flujos de carbono de las cepas PB11, PB12 y PB13

Una vez aisladas las cepas mutantes PTS-Glc<sup>+</sup> denominadas PB12 y PB13 era importante iniciar su caracterización para determinar el o los factores involucrados en el aumento de crecimiento de estas cepas en ausencia del sistema PTS.

Como parte de la caracterización de las cepas PB12 y PB13, se midieron sus velocidades de crecimiento y sus capacidades de transporte de glucosa (Tabla 2). Se ha determinado también que utilizan a la permeasa de galactosa (GalP) y a la glucocinasa (Glc) para transportar y fosforilar glucosa en ausencia de PTS (Flores *et al.*, 1996; Flores *et al.*, 2002).

**Tabla 2.** Velocidades de crecimiento ( $\mu$ ), y transporte de (<sup>14</sup>C)-glucosa ( $\tau$ ) (Flores *et al.*, 1996).

Cepa	Fenotipo	$\mu$ (a)	$\tau$ (b)
JM101	Silvestre	0.71	20
PB11	PTS- Glc-	0.10	1.7
PB12	PTS- Glc <sup>+</sup>	0.42	10.3
PB13	PTS- Glc <sup>+</sup>	0.49	11.7

a) Velocidades obtenidas a partir de cultivos crecidos en fermentadores con medio M9 + 2g/L de glucosa. Unidades:  $\text{h}^{-1}$  b) Unidades:  $\text{nmol } ^{14}\text{C-Glc min}^{-1} \text{ mg proteína}^{-1}$

También se determinaron las actividades de las enzimas involucradas en el nodo de la glucosa-6-fosfato (G6P) (Tabla 3). Tanto Pgi como Zwf presentan mayor actividad en las cepas PB12 y PB13 con respecto a la silvestre JM101. Las relaciones de actividad Pgi/Zwf indican que en las cepas PB12 y PB13 debe haber mayor flujo hacia la glucólisis que en la cepa silvestre JM101.

Tabla 3. Actividades enzimáticas de Glk, Pgi y Zwf.

Cepa	Glk	Pgi	Zwf	Pgi / Zwf
JM101	57	1448	180	8.0
PB12	127	5699	267	21.3
PB13	136	4737	314	15.1

Unidades:  $\mu\text{mol } ^{14}\text{C-Glc min}^{-1} \text{ mg proteína}^{-1}$ . Glk - glucocinasa; Pgi - fosfoglucosa isomerasa; Zwf - glucosa 6 fosfato deshidrogenasa. Pgi / Zwf es la relación de las actividades enzimáticas.

Por otra parte se demostró por resonancia magnética nuclear (RMN) que los flujos de carbono se modificaron en varios nodos y porciones del metabolismo central de carbono en las cepas PB11, PB12 y PB13 comparados con la cepa silvestre JM101 (Figura 2). Algunos de los resultados de ese estudio se presentan a continuación (Flores *et. al.*, 2002):

- En una cepa silvestre el 76.6% de la glucosa es dirigida hacia glucólisis y 22.3% hacia la vía de las pentosas-fosfato. En la cepa PB11 se disminuye el flujo glicolítico hasta un 40.3% y en la cepa PB12 se incrementa a 93.1%. A su vez, el flujo hacia la vía de las pentosas-fosfato se incrementa en la cepa PB11, probablemente por un mayor requerimiento de poder reductor NADPH.
- En las cepas PTS-Glc<sup>+</sup> (PB12 y PB13) se aumenta la actividad tanto de Pgi como de Zwf, posiblemente como una manera de incrementar la velocidad de catabolismo de la glucosa-6-fosfato. Los resultados de RMN muestran que hay un mayor flujo hacia glicólisis.
- Puesto que en las cepas PTS-Glc<sup>+</sup> hay menor flujo hacia la vía de las pentosas, se obtiene menos poder reductor. Al incrementarse el flujo a través de las enzimas málicas se genera el NADPH que no se obtiene a través de la ruta de las pentosas fosfato.

- Por otra parte el flujo de carbono de malato a citrato está muy elevado en la cepa PB11 lo cual coincide con la sobreexpresión de la ruta del glioxilato determinada por RT-PCR (Flores *et.al.*, 2005).
- Finalmente el flujo a través de la enzima PEP carboxinasa (PckA) está incrementado en PB11 lo cual es un indicio de que esta cepa tiene un comportamiento gluconeogénico. Las cepas PB12 y PB13 también tienen características gluconeogénicas pues presentan flujo a través de las enzimas málicas.

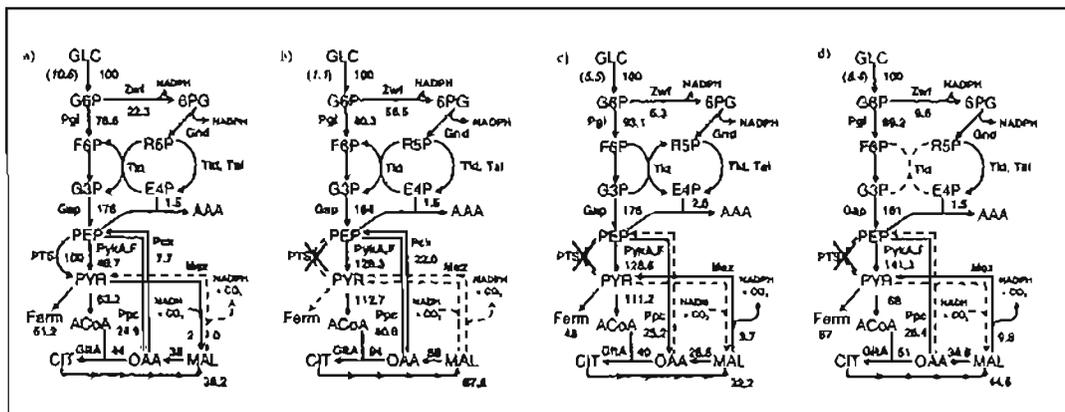


Figura 2. Flujos de carbono determinados por RMN para las cepas (a) JM101, (b) PB11, (c) PB12 y (d) PB13. Los números representan los porcentajes molares de glucosa consumida en los nodos específicos. Los valores en *itálicas* y entre paréntesis representan el consumo de glucosa en mmol Glc / h x g biomasa. 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 *et. al.*, 2002). Las abreviaturas y nombres de las enzimas se pueden consultar en el apéndice.

### c) Análisis transcripcional por RT-PCR

Con el objetivo de profundizar en la caracterización de las cepas PTS-Glc<sup>+</sup> y más específicamente de la cepa PB12, se analizó la expresión transcripcional de genes involucrados en el metabolismo central de carbono, el transporte y la regulación transcripcional. Para ello se utilizó la técnica de PCR en tiempo real (RT-PCR). Los resultados de la cepa PB11 y PB12 se compararon contra los de la silvestre JM101.

Enseguida se mencionarán sólo algunos de los hallazgos más importantes. En la figura 3 se muestra un esquema de las rutas metabólicas involucradas.

- El flujo de piruvato (Pyr) a acetil-CoenzimaA (AcCoA) se duplica tanto en PB11 como en PB12, pero los genes que codifican para el complejo enzimático de la piruvato deshidrogenasa (Pdh) no se encuentran totalmente sobreexpresados. El paso de Pyr a AcCoA no sólo se da a través de la Pdh. La piruvato oxidasa (PoxB) produce acetato a partir de Pyr y éste se convierte en AcCoA por la AcCoA sintetasa (Acs). Tanto *poxB* como *acs* están sobreexpresados en las cepas PB11 y PB12, así que la producción interna de acetato en estas cepas debe ser elevada.
- Los genes *poxB* y *acs* tienen promotores dependientes de RpoS y la transcripción de este factor sigma de respuesta a estrés está incrementado en PB11 y PB12, lo cual hace suponer que la sobreexpresión de *poxB* y *acs* podría estar relacionada con un aumento del factor  $\sigma^s$ .
- Además de producir acetato, PoxB es una enzima involucrada en el proceso de respiración ya que utiliza al piruvato como donador de electrones y reduce a las quinonas de membrana. En la cepa PB11 la transcripción de los genes que participan en procesos de respiración está disminuida, a excepción de *poxB*.
- Por otra parte, la ruta del glioxilato está sobreexpresada en la cepa PB11 y el acetato es un inductor transcripcional de esta ruta. La ruta o lanzadera de glioxilato acorta al ciclo de TCA y evita la liberación de dos moléculas de CO<sub>2</sub> por ciclo; por lo tanto se retiene más carbono. Otra manera de retener carbono es no sintetizando productos de fermentación, fenómeno que se observa en la cepa PB11.
- Las enzimas málicas (SfcA y MaeB) sintetizan piruvato a partir de malato y están sobreexpresadas en PB12. Por su parte, PB11 utiliza a la PEP carboxinasa (PckA) para sintetizar PEP a partir de oxaloacetato. Lo anterior implica que ambas cepas tienen capacidades glucolíticas y gluconeogénicas simultáneas, lo cual hace que puedan consumir glucosa y acetato casi al mismo tiempo sin que haya crecimiento diáuxico.
- En PB12, los genes que codifican para enzimas de TCA están sobreexpresados 1.3 a 2 veces lo cual le confiere una mayor capacidad energética y respiratoria en comparación a la cepa PB11. Los genes del ciclo de TCA en general se activan por CRP y se reprimen en anaerobiosis por el sistema ArcAB, aunque hay otros reguladores específicos para ciertos genes. Uno de los objetivos específicos de este trabajo involucra la secuenciación de genes reguladores para buscar alguna mutación que pueda explicar la sobreexpresión de genes de TCA en PB12.



## El regulón de galactosa

Como se mencionó anteriormente, se determinó que la cepa PB12 utiliza a la permeasa de galactosa (GalP) para transportar a la glucosa y a la glucocinasa para fosforilarla. Dado que la expresión de *galP* requiere de la presencia de galactosa, era necesario explicar cómo podía expresarse esta permeasa en ausencia del inductor. A continuación se explicará cómo funciona el regulón de galactosa.

Primeramente hay dos transportadores de galactosa:

- El de baja afinidad es GalP, una permeasa que depende de gradiente de protones y
- El de alta afinidad MglBAC que requiere de ATP para el transporte así como de una proteína periplásmica.

En la figura 4 se muestra un esquema de ambos transportadores.

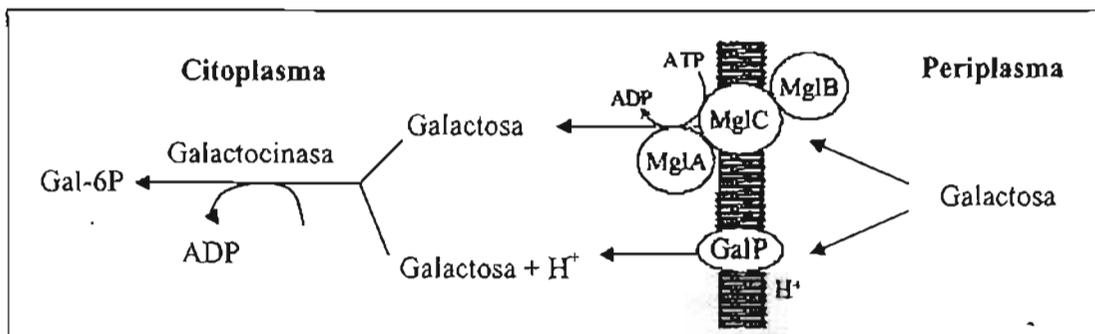


Figura 4. La galactosa es transportada al citoplasma por los transportadores de alta afinidad MglBAC y el de baja afinidad GalP (Gosset, 2005).

El principal regulador negativo de *galP* es GalR; GalS es el principal represor de *mglB* y CRP el activador de ambos. Los inductores del sistema son la D-galactosa y la D-fucosa, un análogo no metabolizable. GalS tiene mayor afinidad (14 veces mayor) por la galactosa que GalR, por lo que en bajas concentraciones de galactosa el primero en inactivarse es GalS y los primeros genes que dejan de ser reprimidos son los regulados más fuertemente por GalS (Geanacopoulos y Adhya, 1997). Sin embargo, GalS también reprime levemente a *galP* y GalR reprime ligeramente a *mglB*. Las afinidades de los represores por los operadores del sistema se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Constantes de afinidad de los represores GalR y GalS por los operadores de los operones *gal*, *mgl* y del gen *galP*. El operon *mgl* no tiene operador interno. Las afinidades están reportadas en nM (Geanacopoulos y Adhya, 1997).

Gen	GalR		GalS	
	O <sub>E</sub>	O <sub>I</sub>	O <sub>E</sub>	O <sub>I</sub>
<i>gal</i>	1.3 ± 0.2	2.9 ± 0.2	31.0 ± 12.8	72.4 ± 27.8
<i>galP</i>	0.3 ± 0.06	No determinado	> 100	No determinado
<i>mgl</i>	11.1 ± 2.2		18.1 ± 2.6	

El operón de galactosa también forma parte del regulón e incluye 3 genes estructurales que participan en la ruta de Leloir a través de la cual se metaboliza la galactosa. En la figura 5 se esquematiza esta ruta metabólica.

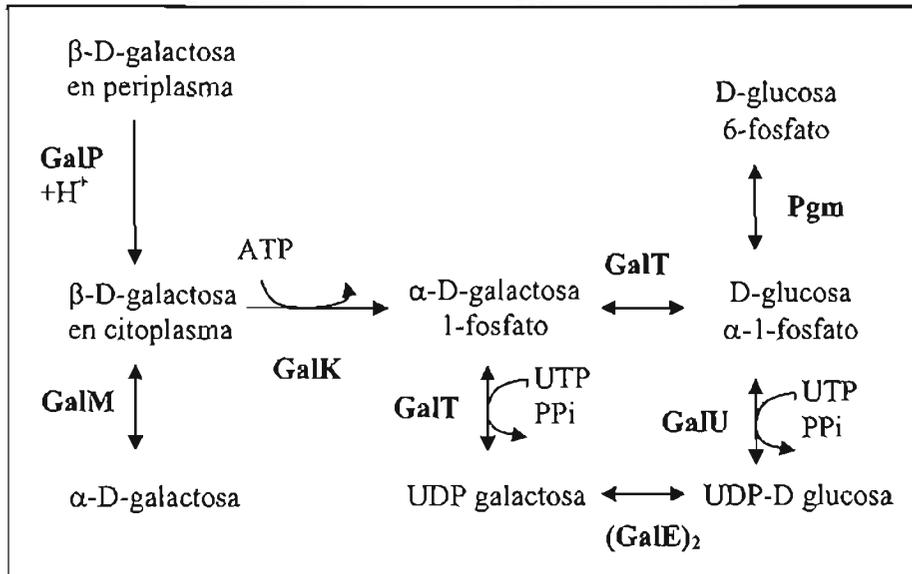
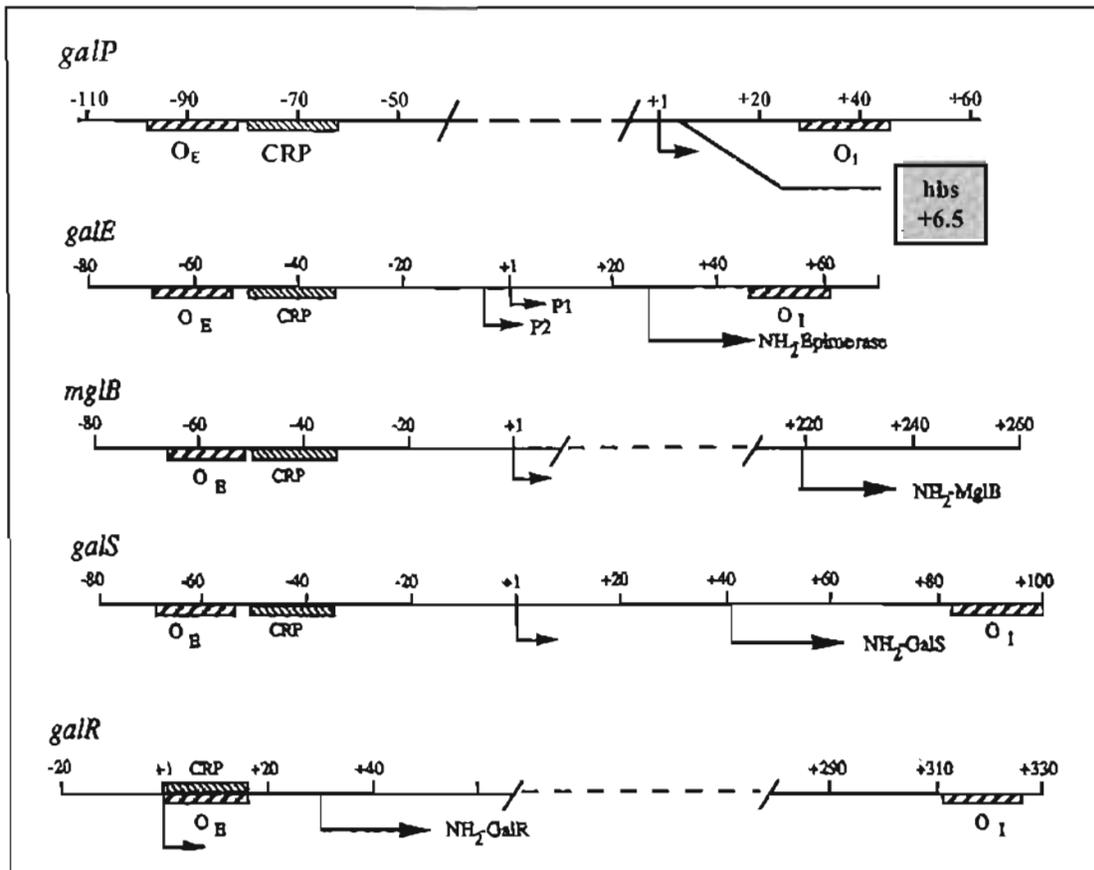


Figura 5. Ruta de Leloir a través de la cual se metaboliza la galactosa. El operón *gal* codifica para una epimerasa (*galE*), una transferasa (*galT*) y una cinasa (*galK*).

El operón *gal* está regulado negativamente por GalR y GalS, pero a diferencia de los genes *galP* y *mglBAC* que codifican para los transportadores, el operón *gal* cuenta con 2 operadores flanqueando dos promotores que se encuentran en caras opuestas del DNA. La unión de GalR al operador O<sub>E</sub> es suficiente para reprimir al promotor 1, pero el promotor 2 (P2) es activado en estas condiciones. La represión de P2 requiere la formación de un tetrámero de GalR que doble el DNA de manera que ambos promotores queden atrapados en la estructura. Se reprime la transcripción al impedirle

a la RNA polimerasa generar el complejo abierto. Para que se forme esta horquilla se requiere la unión de una proteína tipo histona llamada HU en el sitio hbs (histone binding site) y de superenrollamiento negativo (Geanakopoulos *et al.*, 1999). HU forma un heterodímero con las subunidades codificadas por los genes *hupA* y *hupB* regulados por la proteína reguladora FIS (Claret and Rouviere-Yaniv, 1996). En la figura 6 se comparan las regiones reguladoras de los principales genes del regulón de galactosa y en la figura 7 se esquematiza la tetramerización de GalR.



**Figura 6.** Comparación de las regiones reguladoras de los genes *galP*, *galE*, *mglB*, *galS*, *galR*. Las cajas muestran los sitios de unión para los represores ( $O_E$  y  $O_I$ ) y el activador CRP. La transcripción inicia en la posición +1 y se indica por una pequeña flecha. Solamente el gen *galE* tiene dos sitios de inicio de la transcripción señalados como P1 y P2. El inicio de la traducción se indica con una flecha más grande. En el esquema para *galP* se muestra un operador interno, sin embargo, aún no se ha comprobado que GalR se una en esa región. También se señala el sitio de unión para HU (hbs) (Weickert y Adhya, 1993; Geanakopoulos y Adhya, 1997; Geanakopoulos, 1999).

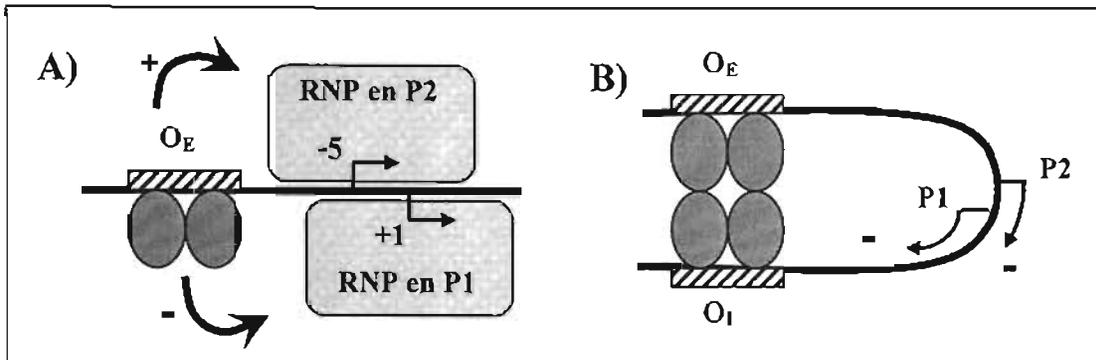


Figura 7. La unión de GalR al operador externo del operón *gal* reprime la transcripción de la RNA polimerasa (RNP) a partir del promotor 1, pero activa la del promotor 2. Y cuando se forma un tetrámero con GalR, se dobla el DNA y se reprime la transcripción de ambos promotores (Choy y Adhya, 1996).

Hay muchos factores que podrían generar la expresión constitutiva de *galP* en las cepas PB11 y PB12 como:

- La eliminación de los genes reguladores *galR* y/o *galS* o menor cantidad de transcrito de éstos.
- Una mutación en *galR* que le impida a la proteína represora unirse a sus operadores o que no permita generar la horquilla de represión (Saier *et.al.*, 1973 y Geanacopoulos *et.al.*, 1999).
- Mutaciones en alguno de los operadores de *galP* que genere una reducida afinidad del represor por su secuencia blanco (Irani *et.al.*, 1983).
- La ausencia de una o ambas subunidades de la proteína HU o una expresión disminuída de una o ambas (Lewis *et.al.*, 1999). Hasta el momento, la unión de HU sólo se ha reportado para el operón *gal*, pero no hay que descartar la posibilidad de que también intervenga en la regulación de la transcripción del gen *galP*.
- La síntesis endógena de galactosa para inducir el regulón (Ferenci *et.al.*, 2001).

### Sistemas de regulación transcripcional

Como se explicó en la sección anterior, los represores GalR y GalS serán los primeros reguladores transcripcionales que se estudiarán. Una mutación en alguno de éstos podría explicar una de las características más importantes de la cepa PB12, la expresión de GalP en ausencia de galactosa para el transporte de glucosa. Pero también hay otras características que podrían ser relevantes para el fenotipo  $\text{Glc}^+$  de una cepa  $\text{PTS}^-$  como la sobreexpresión de *glk*, *pgi*, genes del TCA y respiratorios. Es

probable que los cambios en los niveles de expresión de estos genes se deban a la selección de mutaciones en alguno de los sistemas de regulación transcripcional de *E. coli*. A continuación se presenta una tabla con los reguladores a estudiar y una breve explicación de su funcionamiento.

Tabla 5. Reguladores transcripcionales cuyos genes fueron secuenciados.

Regulador transcripcional	Función
ArcAB (Anoxic Redox Control)	Reprime los genes <i>gltA</i> , <i>acnA</i> , <i>icdA</i> , <i>lpd</i> , <i>suc</i> , <i>sdh</i> , <i>fumAC</i> , <i>mdh</i> , <i>aceBAK</i> , <i>aceEF lld</i> , <i>cyoABCDE</i> y <i>sodA</i> ; activa a <i>cydAB</i> , <i>pfl</i> , y <i>traY</i> para permitir crecimiento en anaerobiosis.
CRP (cAMP Receptor Protein)	Activa la transcripción de más de 200 genes cuando el cAMP se une a la proteína.
FNR (Fumarate Nitrate Reduction)	FNR activa la transcripción de muchos genes requeridos para respiración anaeróbica y de fermentación. Reprime algunos genes que funcionan durante crecimiento aeróbico. La actividad de FNR se regula por oxígeno; sólo está activo en anaerobiosis, el oxígeno oxida su centro de Fe y S inactivando a la proteína.
FruR (Cra, Catabolite Repressor/Activator)	Reprime varios operones del metabolismo central como <i>edd-eda</i> y activa otros como <i>aceBAK</i> , <i>icdA</i> , <i>pckA</i> y <i>ppsA</i> .
GalR (Represor del regulón de galactosa)	Reprime principalmente al gen <i>galP</i> y el operón <i>galETKM</i> . También ejerce una leve represión sobre el operón <i>mgIBAC</i> y el gen <i>galS</i> .
GalS (Isorepresor del regulón de galactosa)	Reprime principalmente a los genes <i>mgIBAC</i> y <i>galS</i> . También ejerce una leve represión sobre <i>galP</i> y el operón <i>galETKM</i> .
IclR (Represor del operón <i>aceBAK</i> )	Reprime al operón <i>aceBAK</i> .
PdhR (Regulador del complejo enzimático de la piruvato deshidrogenasa)	Activa al operón <i>lctPRD</i> y reprime la expresión del operón <i>pdhR-aceEF-lpdA</i> .

## JUSTIFICACIÓN

El principal objetivo de este estudio consiste en analizar los factores genéticos, enzimáticos o regulatorios más importantes que estén involucrados en la generación del fenotipo PTS-Glc<sup>+</sup>.

El conocer el fenotipo PTS-Glc<sup>+</sup> permitirá entender mejor el metabolismo, adaptación a estrés y regulación transcripcional de *E. coli*. Por otra parte, se facilitará la dirección de la ingeniería genética y metabólica de *E. coli* con fines biotecnológicos.

Con este proyecto pretendemos ampliar el conocimiento que se tiene de las cepas de *E. coli* PTS- y PTS-Glc<sup>+</sup>, tomando como modelos a las cepas PB11 y PB12.

Hasta el momento se cuenta con una caracterización bioquímica, determinación de flujos de carbono y análisis transcripcional que han generado información valiosa sobre el comportamiento de estas cepas. También se sabe que al menos dos mutaciones no cotransducibles son responsables del nuevo fenotipo PTS-Glc<sup>+</sup>. Pero aún hay preguntas por responder:

- ¿Cómo puede expresarse la permeasa de galactosa en ausencia de un inductor?
- ¿Cuál es el papel que juegan las enzimas Glk y Pgi en el crecimiento de las cepas PTS? ¿El incremento de actividad de Glk y/o Pgi es una selección adaptativa que le permite a PB12 metabolizar mejor a la glucosa?
- ¿Existe alguna mutación en algún o algunos genes reguladores que genere la modificación general del metabolismo de la cepa PB12?

Las principales herramientas experimentales utilizadas para responder a estos cuestionamientos son la secuenciación de genes, el análisis de expresión transcripcional por RT-PCR, la clonación y expresión de genes en plásmidos multicopia, la comparación de cinéticas de crecimiento y la determinación de actividades enzimáticas.

## OBJETIVO GENERAL

- Identificar factores genéticos, de regulación transcripcional o enzimáticos que estén involucrados en el fenotipo Glc<sup>+</sup> en la cepa PB12.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtener el patrón de expresión del regulón de galactosa por RT-PCR en las cepas PB11 y PB12.
- Determinar si el incremento en la expresión de *galP* en la cepa PB12 se debe a alguna mutación en los reguladores del regulón de galactosa.
- Analizar el efecto que tendría el aumento de las actividades enzimáticas de la glucocinasa y la fosfogluco isomerasa sobre la velocidad de crecimiento en glucosa de la cepa PB11.
- Secuenciar los genes reguladores *arcA*, *arcB*, *fnr*, *fruR*, *iclR*, *pdhR* y determinar si alguna mutación en estos genes es la responsable de los cambios en los niveles de expresión de genes involucrados en el metabolismo central de carbono observados en la cepa PB12.

## HIPÓTESIS

- Si la cepa PB12 presentara alguna mutación en los genes represores del regulón de galactosa que causara su inactivación, podría perderse la represión de *galP* aún en ausencia de inductor.
- La sobreexpresión de los genes *glk* y *pgi* podría favorecer de manera importante el crecimiento en glucosa de la cepa PB12 PTS-Glc<sup>+</sup>. Entonces, si se aumentara la actividad enzimática de Glk y/o Pgi en la cepa PB11, tal vez se aumentaría su velocidad de crecimiento.
- La selección de cualquier mutación en la cepa PB12 debe tener una justificación adaptativa. Así que si se intercambiara en PB11 el gen silvestre por el gen mutado encontrado en PB12 posiblemente se vería una ventaja adaptativa.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### a) Cepas bacterianas y plásmidos

Las cepas de *Escherichia coli* utilizadas en este trabajo se enlistan en la tabla 6. PB12 se obtuvo a partir de PB11, una cepa PTS<sup>-</sup> derivada de JM101 (Flores *et.al.*, 1996). La cepa PB121 se obtuvo por transformación de la PB12 con el plásmido pBB31 que porta el gene *arcB* silvestre. Los plásmidos se muestran en la tabla 7. Para mayor información sobre los plásmidos construídos en este trabajo, consultar el apéndice.

Tabla 6. Cepas bacterianas utilizadas en este estudio.

Cepas	Genotipo	Referencia
<i>E. coli</i> JM101	F <sup>-</sup> <i>traD36 proA<sup>+</sup> proB<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> lacZΔM15/supE thi</i> <i>Δ(lac-proAB)</i>	Bolívar <i>et.al.</i> , 1977
<i>E. coli</i> PB11	JM101 <i>Δ(ptsH, ptsI, crr)::kan</i>	Flores <i>et.al.</i> , 1996
<i>E. coli</i> PB12	PB11, PTS-Glc <sup>+</sup>	Flores <i>et.al.</i> , 1996
<i>E. coli</i> PB121	PB12, pBB31 ( <i>arcB</i> <sup>+</sup> )	Flores <i>et.al.</i> , 2005
<i>E. coli</i> PB11 <i>arcA</i> <sup>-</sup>	PB11 <i>arcA::tet</i>	Este trabajo

Tabla 7. Plásmidos utilizados en este estudio.

Construcción	Vector	Promotor	Referencia
(a) pCL <i>glk</i>	pCL1920 (Spt <sup>R</sup> )	pTrc	Hernández <i>et.al.</i> , 2003
(b) pCL <i>galP</i>	pCL1920 (Spt <sup>R</sup> )	pTrc	Hernández <i>et.al.</i> , 2003
(c) pCL <i>glk + galP</i>	pCL1920 (Spt <sup>R</sup> )	pTrc para ambos genes	Hernández <i>et.al.</i> , 2003
pCL <i>pgi</i>	pCL1920 (Spt <sup>R</sup> )	Silvestre	Este trabajo
pCL <i>glk + pgi</i>	pCL1920 (Spt <sup>R</sup> )	Glk - pTrc Pgi - silvestre	Este trabajo
pTrc <i>glk</i>	pTrc99A (Ap <sup>R</sup> )	Silvestre	Este trabajo
pTrc <i>pgi</i>	pTrc99A (Ap <sup>R</sup> )	Silvestre	Este trabajo
pBB31 ( <i>arcB</i> <sup>+</sup> )	pBR322	Silvestre	Iuchi y Lin, 1992

Por practicidad se modificaron en este estudio los nombres de los plásmidos construídos por Hernández *et.al.*: a) pCLv1glk, b) pCLv1galP y c) pv1Glk1GalP

## **b) Medios de cultivo y condiciones de crecimiento**

Los cultivos para aislamiento de RNA se crecieron en fermentadores de 1 L en medio M9 suplementado con 2 g/L de glucosa a 37°C, 600 rpm y una tasa de flujo de aire de 1vvm, iniciando con una OD600 de 0.05 y las muestras se colectaron en la fase logarítmica a una OD600 de 1. El pH se mantuvo en 7.0 con hidróxido de amonio 50 %.

Los cultivos para la determinación de velocidad de crecimiento y de ensayos enzimáticos se hicieron por duplicado. Los preinóculos se prepararon a partir de gliceroles creciendo una asada en 3 ml de medio LB con antibiótico. Los inóculos se crecieron también toda la noche a partir de 50 µL del preinóculo; se usaron matraces bafleados de 125 ml con 20 ml de M9 más 2 g/L de glucosa, 2 g/L de casaminoácidos y antibiótico dependiendo de la resistencia de la cepa (Km 30 µg/mL, Spt 50 µg/mL, Ap 200 µg/mL). Se lavaron las células con medio M9 y se inocularon 50 ml de medio M9 suplementado con 2 g/L de glucosa. Los cultivos se crecieron en matraces bafleados de 250 ml a 37°C y 300 rpm. Se iniciaron a una OD de 0.1 y las muestras para determinación de actividades enzimáticas se colectaron a una OD de 1. Las cinéticas de crecimiento se siguieron hasta alcanzar la fase estacionaria y las velocidades se calcularon con el programa Prism 3.0.

Para los ensayos de sensibilidad de crecimiento a azul de toluidina, se utilizaron placas de agar-peptona con 0.2 mg/ml de azul de toluidina. Para los análisis de complementación se utilizó el plásmido pBB31 que lleva el gen *arcB* silvestre (Iuchi y Lin, 1988; *idem* 1992).

## **c) 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. La integridad y la cuantificación se hizo por densitometría en geles de agarosa al 1.2% y por medición de la absorbancia a 260 y 280 nm. El RNA se trató con DNasa (DNA-free™, Ambion) y luego se sintetizó cDNA (RevertAid™ H First Strand cDNA synthesis kit, Fermentas Inc.) por el método de síntesis de primera cadena de DNA utilizando oligonucleóticos específicos (Tabla 8, los oligos "a" se unen

a la región 5' y los oligos "b" a la región 3' de cada gen). Este cDNA se usó como templado para los ensayos de RT-PCR. La reproducibilidad del método se determinó a través de dos experimentos separados de síntesis de cDNA a partir de dos fermentaciones diferentes de cada cepa.

#### **d) PCR de tiempo real (RT-PCR)**

La reacción de PCR de tiempo real se realizó en el ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Perkin-Elmer/Applied Biosystems) utilizando el kit SYBR Green PCR Master Mix (Perkin-Elmer/Applied Biosystems). Los oligonucleótidos para la amplificación específica (Tabla 8) se diseñaron con el programa Primer Express (Applied Biosystems). Para el análisis de datos se utilizó el método  $2^{-\Delta\Delta CT}$  descrito por Livak y Shmittgen (2001).

La reacción de amplificación se hizo en un total de 15  $\mu$ L con 5 ng de cDNA como templado y una concentración final de 0.3  $\mu$ M de cada oligo. Se incluyó siempre un control sin templado para cada gen. Las condiciones de amplificación fueron 10 min a 95°C y luego 40 ciclos de 95°C por 15 s y 60°C por 60 s intercalados. El tamaño de todos los amplímeros fue de 101 pb.

Con el fin de ajustar la concentración de cDNA de las muestras, los datos se normalizaron utilizando el gen *ihfB* como control interno ("housekeeping gene") cuyo nivel de expresión es igual en todas las cepas en las condiciones de crecimiento descritas anteriormente. Se hizo una segunda normalización considerando como 1.0 el nivel de transcripción de todos los genes para la cepa silvestre JM101. Por lo tanto, los datos están reportados como valores de expresión relativa, comparados al nivel de expresión de la JM101.

Los resultados presentados son el promedio de cuatro mediciones por gen. Se analizaron cDNAs sintetizados por duplicado a partir de dos fermentaciones independientes. Se obtuvieron diferencias menores al 30% para cada gen.

**Tabla 8.** Oligonucleótidos utilizados para los estudios de RT-PCR. Los oligos "a" se unen a la región 5' y los oligos "b" a la región 3'. Todas las secuencias se indican de 5' a 3'.

Nombre del gen	Nombre de los oligos	Secuencia
<i>acnA</i>	acnA a acnA b	TGG CTT CTT CCC AAT CGA TG CCT GCG CTT TGG CAT ATT TT
<i>crp</i>	crp a crp b	ACC CGT CAG GAA ATT GGT CA TTA CCG TGT GCG GAG ATC AG
<i>cyaA</i>	cyaA a cyaA b	AGC GCC AAT TGC TAC AAC GT ACG GAA GCG GTT TTC ATC AA
<i>fruR</i>	fruR a fruR b	TCT TGT GAT CCC CGA TCT GG AGC AGG CAA TCA GCA GTT GA
<i>fumA</i>	fumA a fumA b	ATG TCG ATC AAC TGC AAG CG GAA GCC GCCG TGT TTT TTAC
<i>galE</i>	galE a galE b	AGC GCC AAT TGC TAC AAC GT ACG GAA GCG GTT TTC ATC AA
<i>galK</i>	galK a galK b	GGC TGT AAC TGC GGG ATC AT GAA ACT GCT TTG GTC CCC AG
<i>galM</i>	galM a galM b	CCA TTA CTT ATC GCG CCA CA GTG ATT GCG CAC GTC AGA CT
<i>galP</i>	galP a galP b	CAT GTA TTA CGC GCCG AAA A TGG CAA GTA CGT TGG TCA GG
<i>galR</i>	galR 3a galR 3b	TGT ACC GGG TGA GAT TTC GTT CCA TCG TCA CGA TTG GGT AAC
<i>galS</i>	galS a galS b	AGG TTA GCG ACA CCA TTG GC TTT CTG ATG CTG CTG AGC GA
<i>galT</i>	galT a galT b	TGC CGA ACA GAA ATC ACC AA GCA CGA CGG CTA ACC AGT GT
<i>galU</i>	galU a galU b	AAA GGG AAG AGC CAT GAC TGC CAG GCT TTA AAT TCC GTG CC
<i>glcD</i>	glcD a glcD b	AAT CAA TCA AAT GTG CGC CC TTT TCC CAG GGT TCA GCA AA
<i>glk</i>	glk a glk b	GAAGCGGTCATTCGCGTTTA GTCATCGCCACCCAGTCAC
<i>glpD</i>	glpD a glpD b	ATG GTG CTG GTA TCG CGG TTT TGA ACT GGC GGA AGA GG
<i>gltA</i>	gltA a gltA b	AGG CAC GCT GGG TCA AGA T TAG ATT CGC AGG ATG CGG TT
<i>hupA</i>	hupA a hupA b	CCT TCA AAG TGA ACC ACC GC GCC AGA AAC AAA TGC CGG TA
<i>hupB</i>	hupB a hupB b	CGT GCG TTA GAT GCT ATT ATT GCT GCA CGC TCT TTA ACG GCA AA
<i>icdA</i>	icdA a icdA b	GAC CGA AGC GGC TGA CTT AA GCA GTT TAG CGC CAT CCA TC
<i>lamB</i>	lamB a lamB b	AAC TTC CTC TGG CGG TTG C ACC TGT CCA ACC AAT ACC GG
<i>mglB</i>	mglB a mglB b	CCA GCA TGT TAT TCG GTG CC AGC CTT GCG CAC TAC AGA CA
<i>nuoF</i>	nuoF a nuoF b	TAT CCG TAC TCC CGA AAC GC CGC CTT CGT AAC CGT TTT TG
<i>pgi</i>	pgi a pgi b	ACT AAC GGT CAG CAC GCG TT TCA GAG AGC GGG TTA TGG GT

Nombre del gen	Nombre de los oligos	Secuencia
<i>pgm</i>	pgm a pgm b	GTA TCT CCC TCG ACG AAG CG CGC GGC CAT ATC AAC GAT AT
<i>sdhB</i>	sdhB a sdhB b	TGA ACG GCA AGA ATG GTC TG GAT CAC CGG TAA ACC TGG CA
<i>sodA</i>	sodA a sodA b	AAT CCA CCA CAC CAA ACA CCA TGA TCA GCT CTT CAA CCG GC
<i>sucA</i>	sucA a sucA b	GCG GCA AAG AAA CCA TGA AA TTC GGT GCT GGT AAT GTG CA

### e) Determinación de secuencias nucleotídicas de los genes.

**Tabla 9.** Oligonucleótidos usados para amplificación por PCR y secuenciación. Todas las secuencias se indican de 5' a 3'.

Gen	Nombre de oligos	Secuencia
<i>arcA</i>	arcARv arcAFw	GGA CTG CTC AAC TCT GCC GAT AG GTT AAA ATG GTT AGG ATG ACA GCC G
<i>arcB</i>	arcBERv arcBEFw arcBIRv arcBIFw arcBER2	CAT CCG CTC AGA ATT ACG CCA A CAT ACG CCA CCG GAA GTG ATC TA GCA AGG AAG CTG GTG AAA TCA AC GGT CCA GCT TGA TAA TCA ACC G CTT AAC TGC GTG CGG CCT GA
<i>crp</i>	crpFw crpRv	AAG CTA TGC TAA AAC AGT CAG GAT G AAA AAC GTT TAT GAG GCG TAT CAA G
<i>fruR</i>	fruR1Ex fruR1In fruR2In fruR2Ex	GCA TCG ATT CGC GAT GTG GCG CCC GAA CGC CGT GGC AGC TGG GCT CAG GAG GCA ACG ACG TCG GAT GTC CAG TCC CGT ACT CTA CG
<i>fnr</i>	fnrRv fnrFw	CAG GGT CTC CTT ACA ACA ACT GTCA GTG GTT ATT GCG CCA TGA AGG T
<i>galE</i>	galEFw galERv	AAA ACG TAA GTC CCG GTG TAA TC TTT TTC AGA TAA AAA GCG CAA TCA T
<i>galP</i>	galPFw galPRv	GCA GAT AAC AGC GTT TAA TCT ATG A GTA GTT ACG CCC TAG CTT CAG GT
<i>galR</i>	FIgalR FEgalR RI galR RE galR galR1Hae galR2Hae galRALu galRsecFE galRsecRE R3FE R4FE R5FI R5RI RFIHae RRIMlu FgalR500 RgalR500	GTT TTT CGG TGC AAT GGT G ACC TCT GGG ATC ACC ACT TT CAC CCG GTA CAT CAA TAC CA GCC AGA CCA TCG AAG AAT TA CCT GAC GCT CTT TTT GTT CGT TGT GGT AAC CG CCA ATG ACC GGC TGG TGA CAT TTG GCG CTC GGT CAT TGC CTG TTC GCC GCC GC CCG CGC AGG TTG GTG CAA GAG ACA GGG CCC GCG CCT TGC CGG AAG TGA AGG C CTT CGC CAG CGA GAA AAC GC CCT GCG CAT CTG CGC AGG CTG GTG CGC CCG TGC GCT GGC GCA GCA GAC C GGA AAC ATC ACC AAC GAC CAG ACC GAT CCG CCA TCG CTG TGC TGC GTT GGTC G GCC AGC CAG GCA CCG TAA CGA TCG TCC GCG TCG GGT CGA GAG GAA CAA AGT CG CTG GAA CAG GTG TGT GGT GCT ATG GTG C

Gen	Nombre de oligos	Secuencia
<i>galS</i>	galSinFw galSinRv galSexFw galSexRvR	AGA TGT AAC GGA ATC GCA ATG GTT AAT CAA CCG CGT TGT GC GCG GGG CAG TAG AGT TAA TG CGG ACC GGC AAT ATC TAA AA
<i>glk</i>	glkreg glkRv glkRegFw glkRegRv	GGC GGG GTC TGG TCC GGC ATG CAG ATG GCT AAA ACC GAG ATT CTT CCC CCT TAA GAA GTC CAG GTA GCG CAG AG CCC CGG ATC CCG CCC ACA TCA CCG ACT AAT G
<i>hupA</i>	hupAFw hupARv	TCG GTG CGT GTA TGC AGG AG GAG CGC CAG CCA GCA TCA AT
<i>hupB</i>	hupBFw hupBRv	AAC TGC TGC GCG TTC GTA CC TGT ACC TCA CGC AAC GTA TCG ATG
<i>pdhR</i>	pdhREFw pdhREFv	ATC GTT AAA AAA CTC CTT TCC GAA ACG TTC TGA CAT GGG TT
<i>pgi</i>	pgiF440 pgiRv pgiFw pgiRI pgiFI pgiregFw pgiregRv pgiF600 pgiR284	CAC CCA GAA GTG CTC CAC CAC TTG CG TTT TAG GAT TAA CCT CAC GGT ATG A GCG GTC AGT AGT TCA GCT AAT AAA T CGG TCT GGG CGA AGA AGT TAG ACA G GCA ATC ACT GAC GTA GTG AAC ATC GG CCC CGA ATT CTT TCA GCC TTG GCA CAA GGG CCC CGG ATC CCG TAA CGT CTT TCA TTT CAT CGA AG GCA TCA GAA AGC ACA ATA TCA GCG CGG TTT TCA GTG CGG TTG ATC T

Para determinar si en alguno de estos genes se había seleccionado alguna mutación, se amplificaron y secuenciaron los productos de PCR de cada uno de estos genes.

Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación por PCR se diseñaron con el programa Clone Manager y se enlistan en la tabla 9.

Se utilizaron 100 ng de DNA cromosomal de las cepas JM101, PB11 y PB12 como templados para la amplificación por PCR con Elongase enzyme mix de acuerdo a las recomendaciones del proveedor (Invitrogen, Inc.). Se analizó el tamaño de los productos de PCR por electroforesis en gel de agarosa 1.2% y se purificaron (PCR purification kit, Marligen BioScience Inc).

Las secuencias nucleotídicas se determinaron a partir de los productos de PCR por el método Taq FS Dye Terminator Cycle Fluorescence-Based Sequencing, con el equipo Perkin Elmer/ Applied Biosystems Model 377-18.

Se secuenciaron al menos 200 pares de bases de la región reguladora del extremo 5', el gen estructural y al menos 100 pb de la región 3'.

#### **f) Determinación de actividades enzimáticas**

Se colectaron 20 ml de cultivo a una OD de 1, se centrifugaron a 4000 rpm por 8 minutos y se lavó con solución amortiguadora de fosfatos 20 mM, pH de 6.8 más 10 mM de  $\beta$ -mercaptoetanol y 10 mM de azida de sodio. Se resuspendieron las células en 1 ml de la misma solución y se conservaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis. Las muestras descongeladas se sonicaron con 4 pulsos de 15 segundos con una amplitud de 14 a 16 micrones, separados por un minuto. Los extractos celulares se centrifugaron por 10 min a 13,500 rpm.

Para la determinación de actividad de glucocinasa (Glk) se requirió por reacción: 10 mM de D-glucosa, 10 mM de ATP, 0.3 mM NADP<sup>+</sup>, 2.5 unidades de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Zwf) y 25 a 100  $\mu\text{L}$  de extracto celular en 1 ml de reacción. Se usó una solución amortiguadora pH 8.5 (0.2 M de Tris-Cl, 10 mM de  $\beta$ -mercaptoetanol y 10 mM de  $\text{MgCl}_2$ ) (Lessie y Vander Wyk, 1972).

Para la determinación de actividad de fosfoglucoisomerasa (Pgi): 1 mM de fructosa-6-fosfato, 0.5 mM NADP<sup>+</sup>, 0.3 unidades de Zwf y 5 a 50  $\mu\text{L}$  de extracto celular en 1 ml de reacción. Se usó una solución amortiguadora pH 7.4 (50 mM de Tris-Cl y 10 mM de  $\text{MgCl}_2$ ) (Maitra y Lobo, 1971).

Los ensayos de actividad de Glk y Pgi acoplan la reacción catalizada por Zwf que convierte a la glucosa-6-fosfato en fosfogluconolactona, monitoreando la reducción de NADP<sup>+</sup> a 340 nm. La actividad enzimática específica es reportada como unidades internacionales por miligramo de proteína celular total ( $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína), la cual se define como la cantidad de enzima necesaria para convertir 1  $\mu\text{mol}$  de sustrato por minuto por mg de proteína. Se monitorearon las reacciones durante 6 minutos en el espectrofotómetro ThermoSpectronic Biomate 5 y la temperatura se mantuvo a  $25^{\circ}\text{C}$ . Se determinó la concentración de proteína en las muestras por el método de Bradford (1976).

## RESULTADOS

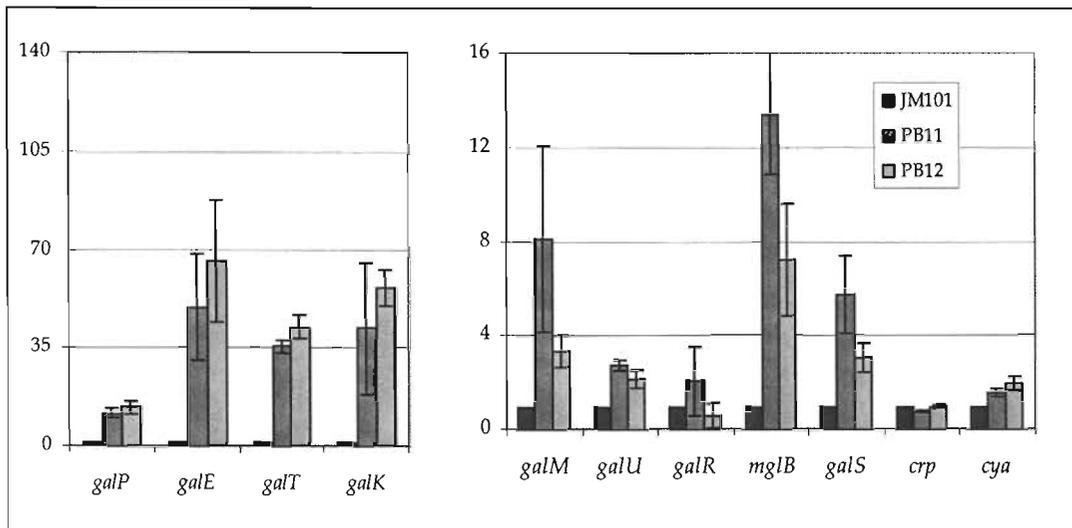
Una parte importante de los resultados obtenidos han sido publicados en el artículo: Flores N, Flores S, Escalante A, de Anda R, Leal L, Malpica R, Georgellis D, Gosset G, Bolívar F. Adaptation for fast growth on glucose by differential expression of central carbon metabolism and gal regulon genes in an *Escherichia coli* strain lacking the phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase system, *Metab Eng* 2005; 7(2): 70-87, del cual soy coautora.

### a) El regulón de galactosa está sobreexpresado en las cepas PB11 y PB12

Una vez determinado que la permeasa de galactosa está involucrada en la utilización de glucosa en la cepa mutante PB12, se intentó identificar la razón por la cual *galP* se expresa en estas condiciones. Algunas de las posibilidades son:

- Que se hubiera seleccionado una o varias mutaciones en la región estructural y/o la intergénica del gen *galP*.
- Que alguno de los represores del regulón de galactosa o ambos no fueran funcionales por alguna mutación.
- Que la expresión de los represores estuviera disminuída.
- Que alguna mutación le permitiera a CRP activarse aún en ausencia de AMPc.

Se inició por el análisis transcripcional del regulón de galactosa por RT-PCR. Los resultados (Gráfica 1) muestran que todo el regulón está sobreexpresado tanto en la cepa PB11 como en la PB12. El incremento de transcrito de *galP* en PB12 concuerda con el hecho de que esta cepa utilice a la permeasa de galactosa para transportar glucosa (Flores *et.al.*, 1996; Flores *et.al.*, 2002; Flores *et.al.*, 2005). La selección de mutaciones en los principales represores del sistema, GalR y GalS, o en las regiones reguladoras de los genes blanco podrían explicar dicha pérdida de represión, por tal razón se secuenciaron varios genes que conforman el regulón de galactosa.



**Gráfica 1.** Niveles de expresión del regulón de galactosa determinados por RT-PCR. Aunque *cyaA* no forma parte del regulón de galactosa, se incluyó en la gráfica porque un aumento en la expresión de la adenilato ciclasa, podría aumentar la actividad de CRP y esto a su vez favorecer la expresión del regulón de galactosa.

## b) Ausencia de mutaciones en el regulón de galactosa

Dado que tanto *galP* así como el operón *gal* están sujetos a represión catabólica, se propuso que la sobreexpresión observada en la cepa PB12 podría ser generada por alguna mutación. Por esta razón se decidió secuenciar las regiones reguladoras de los genes *galP* y *galE* así como las regiones codificantes y reguladoras de los represores *galR*, *galS* y *crp*. Puesto que GalP es el transportador de glucosa en la cepa PB12, el interés de secuenciar el regulón de galactosa estaba centrado principalmente en entender la sobreexpresión de este gen, sin embargo también se secuenció el gen *mglB* que codifica para el otro transportador de galactosa.

En los antecedentes de este trabajo se explicó que la ausencia de la proteína tipo histona HU, codificada por los genes *hupA* y *hupB*, podría anular la capacidad de represión de GalR al menos sobre el operón *gal*. Por tal motivo se secuenciaron también estos genes.

No se encontraron mutaciones en ninguno de los miembros del regulón de galactosa (incluyendo a *mglB*) ni en los genes *hupA* y *hupB*. Así que se ha descartado la

hipótesis de que la sobreexpresión del regulón de galactosa en la cepa PB12 se deba a alguna mutación en estos genes.

### *GalR*, un gen difícil de secuenciar

La secuenciación de *galR* de la cepa PB12 fue un proceso problemático por lo que se tuvieron que seguir varias estrategias:

1. Clonación del producto de PCR y secuenciación de la construcción.
2. Síntesis de oligonucleótidos en el interior de *galR* y amplificación del gen por partes para su posterior secuenciación.
3. Digestión de DNA cromosomal de corte único y utilización del templado digerido para las reacciones de PCR

### **c) La sobreexpresión de *galP* en PB11 aumenta su velocidad de crecimiento**

Las evidencias que se tenían es que PB12 utiliza a la permeasa de galactosa para transportar glucosa, que tanto la velocidad de crecimiento como el transporte de glucosa es mayor en la cepa PB12 que en la PB11 y que el gen *galP* está sobreexpresado en ambas cepas casi al mismo nivel. Así que de inicio no se pensaría que en la cepa PB11 haya una restricción de transporte por una baja expresión de *galP*. Sin embargo, al transformar a PB11 con el plásmido pCL*galP* (Hernández *et.al.*, 2003) se aumenta la velocidad de crecimiento de la cepa PB11. Con IPTG 0.1 mM, el crecimiento de PB11 pCL*galP* incluso logra incrementarse casi 3 veces respecto al control (Tabla 10).

Los resultados parecen señalar que GalP hasta cierto punto podría restituir el transporte de glucosa en la cepa PB11 y recuperar de manera importante su velocidad de crecimiento.

**Tabla 10.** Velocidades de crecimiento de PB11 transformada con *galP* en multicopia. Velocidades calculadas a partir de cinéticas en matraz. ( $R^2 > 0.99$ )

Cepas	$\mu$ ( $h^{-1}$ )
PB11	0.063
PB11 pCL	0.041
PB11 pCL <i>galP</i>	0.118
PB11 pCL <i>galP</i> + IPTG 0.1 mM	0.193
PB12	0.473

#### d) Influencia de las enzimas Glk y Pgi sobre el crecimiento de las cepas PTS-

Con el experimento anterior se demostró que una mayor expresión de *galP* aumenta la velocidad de crecimiento de PB11. Pero también hay que tomar en cuenta que el transporte es el resultado de la internalización del sustrato más su fosforilación. Así que las diferencias en la velocidad de transporte también podrían estar en un grado diferente de fosforilación entre PB11 y PB12.

Una de las hipótesis de este trabajo es que si el aumento de actividad de Glk y Pgi favorece el crecimiento de la cepa PB12 en glucosa, el sobreexpresar estas enzimas por medio de plásmidos en la cepa PB11 podría favorecer su crecimiento.

Para tal fin los genes *glk* y *pgi* fueron clonados en un plásmido de mediano número de copias (pTrc99A/30 copias por célula aprox.) y en uno de bajo número de copias (pCL1920/5 copias por célula aprox.) buscando generar diferentes niveles de expresión. En un inicio se pensó que las clonaciones en pTrc99A generarían una alta expresión que se vería reflejada en un aumento del flujo y de la velocidad de crecimiento. Pero, como se puede ver en la tabla 11, las construcciones pTrc*glk* y pTrc*pgi* no generaron un aumento notable de la velocidad de crecimiento de PB11. Esto se debe probablemente a que pTrc99A produce una carga metabólica por su replicación.

El plásmido pCL1920 genera menor carga metabólica que el pTrc99A y eso se ve reflejado en las velocidades de crecimiento de los controles. (Tabla 11) En el caso de pCL*glk*, se aumentó la velocidad de la cepa 3 veces con respecto al control (PB11 pCL1920) y 2 veces con respecto a PB11 ( $\mu=0.064 \text{ h}^{-1}$ ). Por su parte, PB11 transformada con pCL*pgi* no aumentó su velocidad de crecimiento.

Finalmente, el propósito de clonar ambos genes en el mismo vector (pCL*glk* + *pgi*) era aumentar la actividad de Pgi para drenar la G6P generada por Glk lo cual a su vez podría aumentar el flujo glicolítico y probablemente favorecer la velocidad de crecimiento. Pero esta construcción no aumentó la velocidad de crecimiento de manera significativa.

**Tabla 11.** Velocidades de crecimiento de la cepa PB11 transformada con pCL1920 / pTrc99A (controles) y con las clonaciones de *glk* y *pgi*.  $R^2>0.99$

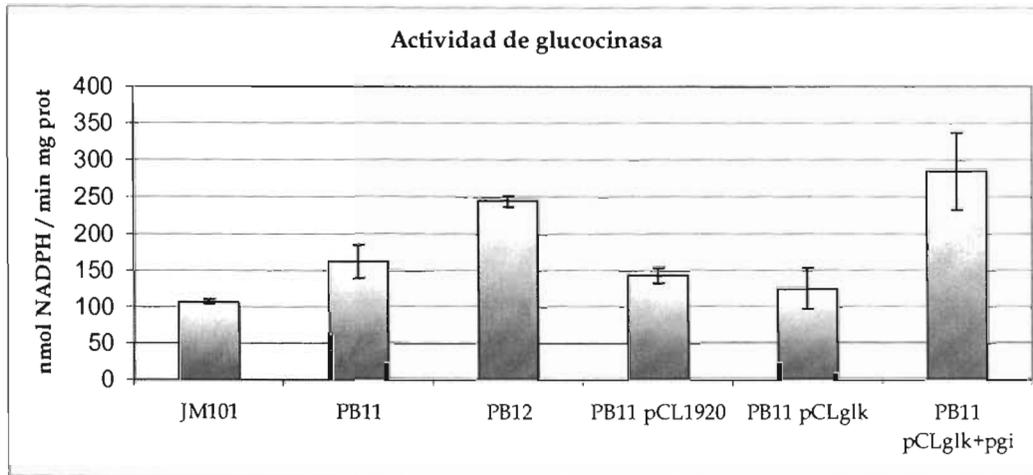
Controles	$\mu_1$ ( $\text{h}^{-1}$ )	Clonaciones	$\mu_2$ ( $\text{h}^{-1}$ )	Relación de $\mu_2/\mu_1$
PB11	0.064	-	-	-
pTrc99A	0.030	pTrc <i>glk</i>	0.035	1.2
pCL1920	0.041	pCL <i>glk</i>	0.126	3.1
pTrc99A	0.030	pTrc <i>pgi</i>	0.0404	1.3
pCL1920	0.041	pCL <i>pgi</i>	0.0432	1.0
pCL1920	0.041	pCL <i>glk</i> + <i>pgi</i>	0.0479	1.2

El siguiente paso fue determinar las actividades enzimáticas de Glk y Pgi. Sólo se analizaron las cepas transformadas con las clonaciones en pCL1920 por presentar menor carga metabólica.

A continuación se presentan las actividades enzimáticas de manera gráfica. Debajo de cada gráfico se muestra la velocidad de crecimiento de la cepa correspondiente y la recuperación en el crecimiento con respecto al control (PB11 pCL1920). Los resultados son el promedio de medir por triplicado la actividad de dos cultivos independientes.

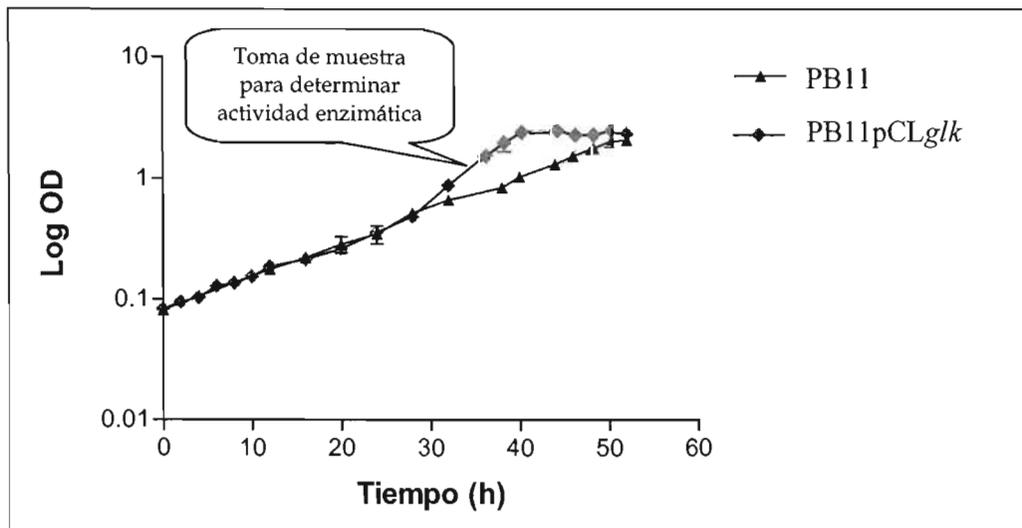
Primeramente se observa en la gráfica 2 que la actividad de PB11 aumenta un 50% con respecto a la cepa JM101. El nivel de transcrito de *glk* es el mismo para JM101 y PB11, así que ese aumento podría ser producto de una activación alostérica. Para PB12

se observa un incremento un poco más del doble en la actividad enzimática lo cual concuerda con el aumento de transcrito (Tabla 2) y con las determinaciones de actividad enzimática que se habían hecho anteriormente (Flores *et.al.*, 2002; Flores *et.al.*, 2005).



$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	0.85	0.064	0.473	0.041	0.126	0.048
Recuperación	-	-	-	-	3.1	1.2

Gráfica 2. Actividad de la glucocinasa y velocidades de crecimiento ( $\mu$ ). La recuperación se refiere al incremento de crecimiento respecto al control PB11 pCL1920.

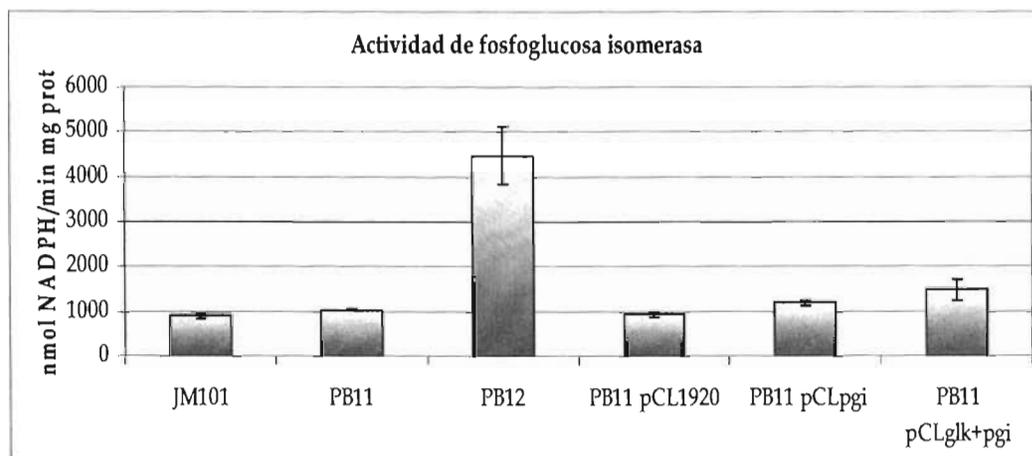


Gráfica 3. Cinética de crecimiento de las cepas PB11 y PB11 pCLglk. Se observa que la velocidad de crecimiento de PB11 pCLglk aumenta después de 24 horas de cultivo.

La cepa PB11 pCLglk triplica su velocidad de crecimiento respecto al control, pero no se incrementa la actividad de Glk. En cambio, la cepa PB11 pCLglk + pgi, al igual que PB12, duplica su actividad de Glk respecto a JM101, pero no aumenta su velocidad de crecimiento de manera importante. Una observación importante es que el incremento en la velocidad de crecimiento de PB11 pCLglk se genera después de 24 horas de iniciado el cultivo (Gráfica 3).

En cuanto a la actividad de Pgi, se observa que PB11 presenta los mismos niveles que JM101. Estas cepas también coinciden en el nivel de transcrito para ese gen. Por su parte PB12 incrementa la actividad de Pgi más de 4 veces y el nivel de transcrito también está incrementado (Gráfica 4, Tabla 2) (Flores *et.al.*, 2005).

Finalmente la cepa PB11 pCLglk + pgi presenta una ligera elevación de su nivel enzimático así como en su velocidad de crecimiento, pero no parecen ser incrementos significativos.



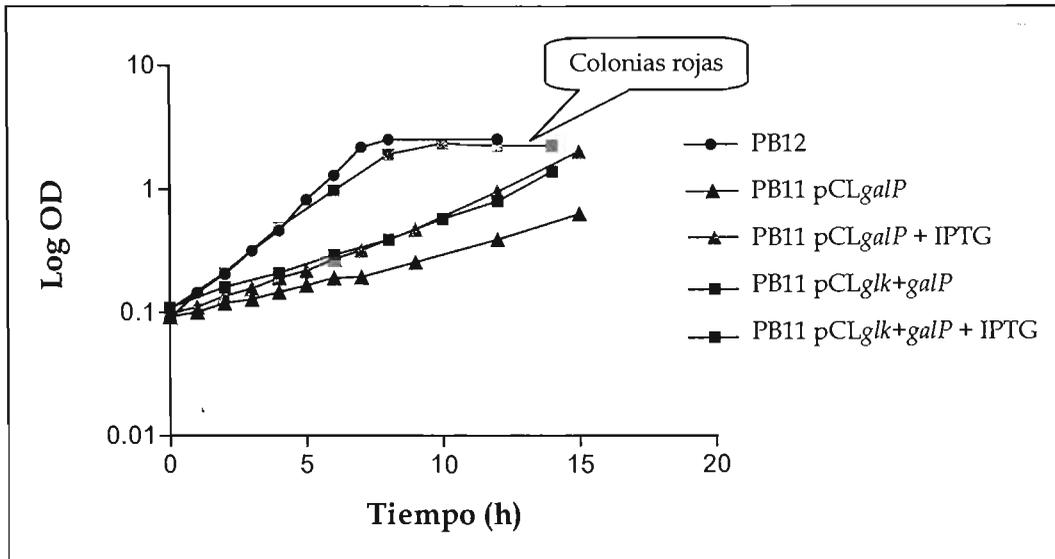
$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	0.85	0.064	0.473	0.041	0.0432	0.048
Recuperación	-	-	-	-	1.05	1.2

**Gráfica 4.** Actividad de fosfoglucoasa isomerasa y velocidades de crecimiento ( $\mu$ ). La recuperación se refiere al incremento de crecimiento respecto al control PB11 pCL1920.

e) El aumento de las capacidades de internalización y fosforilación de glucosa genera un fenotipo Glc<sup>+</sup> en la cepa PB11

Con los experimentos anteriores se determinó que la sólo sobreexpresión de glucocinasa o de permeasa de galactosa no es suficiente para regenerar el fenotipo Glc<sup>+</sup> a la cepa PB11. Pero no se sabía si la suma de internalización más fosforilación de glucosa tendría efectos aditivos sobre el crecimiento de PB11.

En la gráfica 5 se muestran las cinéticas de crecimiento en donde se observa que la sobreexpresión de glucocinasa junto con la permeasa de galactosa usando IPTG como inductor incrementa el crecimiento de PB11 y produce colonias rojas en medio McConkey + 2g/L de glucosa lo cual indica que el fenotipo pasa de Glc<sup>-</sup> a Glc<sup>+</sup>.



Gráfica 5. Cinéticas de crecimiento de la cepa PB11 transformada con varios plásmidos. La concentración de IPTG que se utiliza es 0.1 mM.

**Tabla 12.** Velocidades de crecimiento de la cepa PB11 transformada con pCLgalP y pCLglk+galP. Se usó una concentración de 0.1 mM de IPTG para inducir. La recuperación indica cuántas veces se incrementa la velocidad de crecimiento de la cepa con respecto al control PB11 pCL1920. B - Colonias blancas; R - Colonias rojas.  $R^2 > 0.98$

Transformaciones	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	Color de las colonias en McConkey	Recuperación
PB11	0.064	B	-
PB12	0.473	R	-
PB11 pCL1920	0.041	B	-
PB11 pCLgalP	0.118	B	2.9
PB11 pCLgalP + IPTG*	0.193	B	4.7
PB11 pCLglk+galP	0.204	B	5.0
PB11 pCLglk+galP + IPTG*	0.349	R	8.5

#### f) Secuenciación de genes reguladores y detección de una mutación puntual en *arcB*

Con el análisis transcripcional por RT-PCR se determinó que PB12 presenta sobreexpresión de genes involucrados en varias rutas metabólicas con respecto a la cepa silvestre JM101 (Flores *et.al.*, 2005) como:

- Glicólisis (específicamente *glk* y *pgi*)
- Ruta de las pentosas-fosfato
- Gluconeogénesis
- Ciclo de TCA
- Ruta de glioxilato
- Metabolismo de acetato

Dado que los cambios en los niveles de expresión abarcan muchos genes que corresponden a varias vías metabólicas, se pensó que el origen podría estar en alguna mutación de un regulador transcripcional.

Con el objetivo de detectar posibles mutaciones, se inició la secuenciación de algunos genes que codifican para reguladores transcripcionales como: *arcA*, *arcB*, *fnr*, *fruR*, *iclR* y *pdhR*.

No se encontraron cambios en ninguno de los reguladores anteriores, a excepción del gen *arcB* de la cepa PB12 en donde se detectó un cambio de Tyr a Cys en la posición 71 que corresponde a la segunda región transmembranal de la proteína ArcB. El siguiente paso fue analizar el impacto de esa mutación sobre la funcionalidad del sistema de regulación ArcAB.

El sistema de regulación Arc se ha relacionado, junto con FNR, a la respuesta de adaptación en anaerobiosis pues reprime genes de metabolismo aeróbico y activa genes de metabolismo anaerobio. El sistema Arc está compuesto 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 al regulador transcripcional ArcA. Se ha observado que aún en aerobiosis hay un nivel basal de ArcA-PO<sub>4</sub> y si se elimina el gen *arcA*, se genera una ligera sobreexpresión (1.3 a 2 veces) de los genes reprimidos por ArcA (Iuchi y Lin, 1988; Alexeeva *et.al.*, 2003; Perrenoud y Sauer, 2005).

En el caso de PB12, si la mutación en *arcB* generara una disfunción en la proteína ArcB, el regulador ArcA no podría activarse y dejaría de reprimir genes del ciclo de TCA, aumentando sus niveles de transcrito en condiciones aerobias. De hecho, el análisis transcripcional por RT-PCR indica que los genes del ciclo de TCA están ligeramente sobreexpresados (1.2 a 3.7) en la cepa PB12 (Flores *et. al.*, 2005) lo cual hace suponer que la mutación en *arcB* podría estar involucrada en dicha sobreexpresión.

Para estudiar el impacto de la mutación en *arcB* de la cepa PB12 se inició una colaboración con el grupo del Dr. Dimitris Georgellis (Instituto de Fisiología Celular, UNAM). Se ha observado que las cepas Arc<sup>-</sup> son sensibles al colorante azul de toluidina (Iuchi y Lin, 1988). Este fenotipo fue demostrado en la cepa PB12 y se logró restablecer el crecimiento en azul de toluidina al introducir el gen *arcB* silvestre (Flores *et.al.*, 2005).

Para estudiar el fenómeno Arc<sup>-</sup> y determinar si interviene en la adaptación de las cepas PTS<sup>-</sup>, se construyó la cepa PB11 *arcA*<sup>-</sup> mediante transducción con fago P1vir. La cepa donadora, proporcionada por el Dr. Georgellis, tiene inactivado el gen *arcA* por la inserción de un cassette de resistencia a tetraciclina. Se realizó una cinética de

crecimiento de la cepa PB11 *arcA*- y mostró tener mayor velocidad de crecimiento que PB11 (PB11  $\mu = 0.063 \text{ h}^{-1}$  y PB11 *arcA*-  $\mu = 0.116 \text{ h}^{-1}$ ) lo cual es un indicio de que la alteración del sistema Arc puede estar ayudando al crecimiento en glucosa de una cepa PTS-.

La siguiente pregunta que surgió es si el incremento en la expresión de los genes de TCA es lo que favorece el crecimiento de la cepa PB11 *arcA*- así que se determinaron por RT-PCR los transcritos de algunos genes del regulón de ArcA en las cepas PB11 y PB11*arcA*-. Los genes *pgi* y *glk* fueron incluidos en el análisis para determinar si forman parte del regulón de ArcA. Contrario a lo que se esperaba, la transcripción de genes de TCA disminuyó en la cepa PB11 *arcA*- con respecto a la cepa PB11 a excepción del gen *glcD*. Los resultados se muestran en la tabla 13. También se indica si los genes en estudio son reprimidos por ArcA y/o por FNR. Con esta información se analizarán los resultados en la siguiente sección.

**Tabla 13.** Análisis transcripcional por RT-PCR de varios genes del ciclo de TCA. La normalización se hizo en base a la cepa JM101. (R) - genes reprimidos en anaerobiosis por ArcA o FNR. Todas las desviaciones estándar son menores al 30% (Liu y De Wulf, 2004; Flores *et. al.*, 2005 y Perrenoud *et. al.*, 2005).

Genes	PB11	PB11 <i>arcA</i> -	PB12*	Efecto de ArcA	Efecto de FNR
<i>glk</i>	1.5	0.9	2.2		
<i>pgi</i>	1.1	0.5	6.6		
<i>gltA</i>	1.6	0.2	1.3	R	
<i>acnA</i>	4.2	3.9	5.7	R	R
<i>icdA</i>	1.1	0.7	1.9	R	R
<i>sucA</i>	0.9	0.9	1.7	R	R
<i>sdhB</i>	1.3	1	1.7	R	R
<i>fumA</i>	3.6	1.9	3.6	R	R
<i>glcD</i>	16	41.2	ND	R	
<i>nuoF</i>	0.9	0.8	1.4	R	R
<i>glpD</i>	1.2	0.7	ND	R	
<i>sodA</i>	0.9	1	2.1	R	R

\* Datos reportados en Flores *et.al.*, 2005. (ND) No determinado

## DISCUSIÓN

### a) La ausencia del sistema PTS y sus consecuencias

La ausencia del sistema PTS afecta la fisiología celular de diversas maneras como:

- La ausencia de la enzima IIA<sup>Glc</sup>, codificada por el gen *crr*, genera una disminución en los niveles de cAMP pues ésta activa a la adenilato ciclasa (Lévy *et.al.*, 1990). También se pierde la represión catabólica por glucosa.
- Se ha reportado que las mutantes PTS<sup>-</sup> tienen un tiempo de duplicación de 10 a 20 horas lo cual desencadena una respuesta de estrés dirigida por RpoS (Notley y Ferenci, 1996). Además, la ausencia de IIA<sup>Glc</sup> incrementa el nivel de traducción del RNAm del gen *rpoS* (Ueguchi *et.al.*, 2001). De hecho, el transcrito de este gen está incrementado tanto en la cepa PB11 como en la PB12 (Flores *et.al.*, 2005). Se ha observado que las células en donde se acumula RpoS presentan mayor resistencia a condiciones oxidativas debido a que el factor  $\sigma^s$  también transcribe genes del regulón de estrés oxidativo (Moreau *et.al.*, 2001). Este efecto se presenta en la cepa PB11, es más resistente al peróxido de hidrógeno y al paraquat en comparación a las cepas JM101 y PB12 (Comunicación personal, Flores N.).
- Recientemente se ha identificado que la proteína FrsA codificada por el gen *yafA* se une a la forma no fosforilada de la enzima IIA<sup>Glc</sup> y que este complejo participa en la regulación del flujo entre respiración y fermentación. La inactivación del gen que codifica para FrsA genera un incremento en la respiración en presencia de glucosa y la sobreexpresión de FrsA incrementa la fermentación (Koo *et.al.*, 2004). No se han hecho experimentos con cepas PTS<sup>-</sup>, pero probablemente la ausencia de la enzima IIA<sup>Glc</sup> genere un fenotipo parecido al de la ausencia de FrsA.

### b) PB11, una cepa hambrienta

Cuando la concentración de la fuente de carbono llega a niveles micromolares, *E.coli* genera una respuesta de "hambre" que consiste en la expresión de transportadores de alta afinidad que permiten tomar del medio la mayor cantidad de nutrientes posible.

El modelo de represión catabólica por glucosa indica que los transportadores para carbohidratos no PTS se pueden expresar sólo en caso de que se agote la glucosa y que además haya un inductor en el medio que permita eliminar la represión transcripcional del sistema. Pero este modelo no puede explicar la expresión de transportadores de alta afinidad durante la respuesta de "hambre". Se determinó que durante este fenómeno, la poca glucosa que es transportada al interior de la célula es transformada en algún carbohidrato que puede activar los sistemas de transporte de alta afinidad, es decir, en limitación de glucosa se sintetizan inductores endógenos (Ferenci, 1999).

Así, se produce maltotriosa que activa el sistema de transporte de maltosa, y galactosa que induce la expresión de los transportadores de galactosa. Para el caso de la autoinducción por galactosa se requiere de las enzimas codificadas por los genes *galE*, *galU* y *pgm* para poder sintetizar galactosa a partir de glucosa (Figura 5, p 15.). Una concentración interna de galactosa cerca de  $2 \times 10^{-4}$  M es suficiente para inducir los operones *mgl* y *gal* (Death y Ferenci, 1994).

Hay varias evidencias que indican que la cepa PB11 se está comportando como una cepa "hambrienta":

- La ausencia de PTS disminuye el transporte de glucosa de manera importante, así que muy probablemente PB11 esté sensando concentraciones micromolares de glucosa o glucosa-6-fosfato en su interior.
- En la cepa PB11 se sobreexpresan los genes *pgm*, *galETKM* y ligeramente *galU* que codifican para las enzimas requeridas para sintetizar galactosa a partir de glucosa.
- Los genes que codifican para sistemas de transporte de alta afinidad, *lamB* y *mglB* están sobreexpresados en la cepa PB11.

Por otra parte, se sabe que la expresión de los sistemas Mgl y Gal requieren de cAMP para su expresión. Sin embargo, se ha comprobado que la presencia del inductor es más importante que el incremento de cAMP. Esto es, que las cepas PB11 y PB12 no requieren presentar niveles muy altos de cAMP para poder transcribir los operones *mgl* y *gal*; tienen suficiente cAMP. Además hay que contemplar la posibilidad de que el cAMP se pueda sintetizar sin la activación de la adenilato ciclasa dependiente de la enzima  $\Pi A^{Glc-P}$ .

### c) Transportadores alternativos para la glucosa

Se ha demostrado que la cepa PB12 transporta glucosa a través de GalP (Flores *et.al*, 1996), pero en la cepa PB11 aún no es posible definir si la glucosa es internalizada por MglBAC, GalP o ambos. Dado que el transportador MglBAC tiene mayor afinidad por la glucosa que GalP, sería posible que la glucosa fuera transportada principalmente por el sistema MglBAC, pero también hay que considerar que tiene el inconveniente de requerir más energía que GalP (Tabla 1, p. 7).

Por otra parte, hay que tomar en cuenta que los niveles de transcrito de *galP* son muy parecidos en PB11 y PB12 lo cual indicaría que PB11 también podría estar usando a la permeasa de galactosa para transportar glucosa. Si éste fuera el caso, la cepa PB11 pCL*galP* no habría aumentado su velocidad de crecimiento. Entonces, ¿qué pasa con el transcrito de *galP* en PB11? Hay varias propuestas:

- Que haya algún factor en PB11 que disminuya el nivel de traducción de ciertos mRNA como el de *galP*. O que la traducción de MglB compita con la traducción de GalP.
- Que el sistema de proteínas que dirige la localización de proteínas de membrana esté disminuída en PB11.
- Que haya mayor actividad proteolítica en la cepa PB11 que genere el corte del péptido señal de GalP antes de ser localizado en membrana.

PB12 también fue transformada con el plásmido pCL*galP* para evaluar si su velocidad de crecimiento podía incrementarse, pero no ocurrió así (resultados no mostrados), por lo tanto, el sistema de transporte a través de GalP debe haber alcanzado su máxima capacidad en la cepa PB12.

Por otra parte no debe olvidarse que el transporte es el resultado de la internalización del sustrato más su fosforilación. Así que las diferencias en la velocidad de transporte podrían estar en un grado diferente de fosforilación entre PB11 y PB12, éste es un aspecto que se abordará más adelante.

Finalmente, la expresión de *galP* en la cepa PB12 no se debe a ninguna mutación de la región reguladora ni en los genes reguladores *galR*, *galS* y *crp*. Todo parece indicar que en la cepa PB12 se ha mantenido el fenómeno de autoinducción por galactosa descrito para la cepa PB11 y que incluso la concentración de este inductor podría ser mayor en PB12 que en PB11 lo cual explicaría por qué los niveles de expresión del operón *galETKM* son mayores en PB12.

#### **d) De la glucosa a la fructosa-6-fosfato**

Las enzimas Glk y Pgi presentan una actividad mayor en la cepa PB12 con respecto a JM101. Estos datos concuerdan con el análisis transcripcional y con el incremento de flujo de carbono en la primera reacción glicolítica (Flores *et.al.*, 2002; Flores *et.al.*, 2005). La hipótesis es que si se logra aumentar la actividad de Glk y/o Pgi en la cepa PB11, se podría mejorar su capacidad para crecer en glucosa como fuente de carbono.

Para estudiar la influencia que tiene la sobreexpresión de Glk y Pgi en el crecimiento de la cepa PB11 (PTS-Glc<sup>+</sup>), se transformó ésta con los genes *glk* y *pgi* clonados en diferentes plásmidos multicopia.

Se observó que el plásmido pCL*glk* logró aumentar la velocidad de crecimiento de PB11. Pero también cabe señalar que el incremento en la velocidad se observó después de 24 horas de cultivo lo cual haría suponer que probablemente se pudiera requerir la acumulación de algún metabolito. Sin embargo, es de llamar la atención que no se observe un incremento de la actividad enzimática. Así es que el aumento en la velocidad de crecimiento de esta cepa no está relacionado con un incremento de la actividad de la glucocinasa y tampoco se trata de una mutante porque la cinética de crecimiento fue reproducible.

En cambio en la cepa PB11 pCL*glk* + *pgi* sí se duplicó la actividad de Glk sin haber un incremento en la velocidad de crecimiento. Esto implicaría que el incremento de la actividad de Glk de manera aislada en PB11 probablemente no favorece su velocidad de crecimiento. Además se sabe que la cepa VH32 (W3110 *ptsHIcrr* - *lacI*- *lacZ*-) no incrementa su velocidad de crecimiento al ser transformada con un plásmido que

duplica la expresión de *glk* (Hernández *et.al.*, 2003). El incremento de actividad enzimática cuando se transforma con el plásmido pCL*glk* + *pgi* y no con el pCL*glk* podría explicarse por el hecho de que el plásmido donde están clonados ambos genes tiene dos promotores: el silvestre para *pgi* y pTrc para *glk*; ésto podría estar favoreciendo la unión de RNA polimerasas y por lo tanto aumentando los niveles de transcripción que se refleja en una mayor actividad enzimática.

Si bien la glucocinasa es indispensable para el consumo de glucosa en la cepa PB12, es posible que el consumo de glucosa en PB12 no se favorezca por un incremento de actividad de Glk sino por una mayor disponibilidad de ATP. Cabe recordar que aparentemente PB12 tiene una mayor capacidad respiratoria y energética que PB11 (Flores *et.al.*, 2005) lo cual implica producir ATP en menos tiempo. Entonces de nada serviría aumentar la actividad de glucocinasa si no hubiera suficiente ATP. El determinar la concentración de ATP en las cepas PB11 y PB12 sería un buen indicativo de la capacidad energética de cada cepa.

También es posible que el incremento de actividad de glucocinasa sólo sea útil si se aumenta además la entrada de glucosa a la célula. Éste parece ser un argumento válido puesto que sólo se obtuvieron colonias rojas en agar McConkey (fenotipo Glc<sup>+</sup>) cuando se indujeron al mismo tiempo *galP* y *glk* en PB11 (ver tabla 12, p. 37). Es decir, una mayor internalización más fosforilación pueden regenerar el fenotipo Glc<sup>+</sup> en la cepa PB11. Sin embargo, no se ha alcanzado la velocidad de crecimiento de la cepa PB12 lo cual sugiere que hay otros factores involucrados en el crecimiento en glucosa de una cepa PTS-; uno de éstos podría ser el incremento de actividad de Pgi y/o la mutación del gen *arcB*.

Hasta el momento no es posible saber si el sólo incremento de actividad de Pgi podría mejorar el crecimiento de la cepa PB11 puesto que no se logró incrementar la actividad de Pgi en PB11 al nivel de la cepa PB12. Para responder este cuestionamiento tendría que clonarse *pgi* bajo un promotor fuerte e inducible, en un vector de bajo número de copias para disminuir la carga metabólica y transformar a la cepa PB11 con este plásmido.

Finalmente se ha determinado que el metabolito ppGpp disminuye la actividad de Pgi, no observándose el mismo efecto para otras enzimas glicolíticas. El ppGpp se acumula durante la limitación de nutrientes y los genes *relA* y *spoT* están involucrados en su síntesis. En una cepa *relA*<sup>-</sup> se incrementan levemente los niveles de fructosa-6-fosfato, fructosa-1,6-bifosfato y dihidroxiacetonafosfato (Taguchi *et.al.*, 1978). La inactivación del gen *relA* podría representar una ventaja adaptativa para una cepa PTS<sup>-</sup> pues se incrementarían las concentraciones de varios intermediarios glicolíticos y además disminuiría la concentración de ppGpp lo cual activaría a Pgi.

### e) Las posibles ventajas de inactivar el sistema de regulación Arc

Las evidencias más importantes con las que contamos hasta el momento son:

- La mutación en *arcB* de la cepa PB12 genera sensibilidad al azul de toluidina que es característica de una cepa *arcA*<sup>-</sup> (Iuchi y Lin, 1988).
- En la cepa PB12 están ligeramente sobreexpresados los genes del ciclo de TCA (Flores *et.al.*, 2005) al igual que ocurre en una cepa mutante en *arcA* crecida en aerobiosis (Nystrom *et.al.*, 1996).
- La interrupción del gen *arcA* en la cepa PB11 genera una duplicación en la velocidad de crecimiento de la cepa.
- Las cepas PB11 *arcA*<sup>-</sup> y PB12 no presentan los mismos niveles transcripcionales de los genes estudiados del ciclo de Krebs.

Para entender el impacto de la mutación en *arcB* (Tyr 71 → Cys 71) detectada en PB12 es importante conocer el mecanismo de acción de esta proteína. En anaerobiosis, ArcB se autofosforila y fosforila a ArcA, la cual forma un tetrámero de dímeros para poder unirse al DNA (Jeon *et.al.*, 2001). La secuencia consenso de unión de ArcA a sus blancos es: GTTAATTAAATGTTA. En la figura 8 se muestran cuáles son las bases más conservadas (Liu y De Wulf, 2004). La unión de este regulador transcripcional a sus secuencias blanco controla la expresión de numerosos operones involucrados en el metabolismo respiratorio y fermentativo.

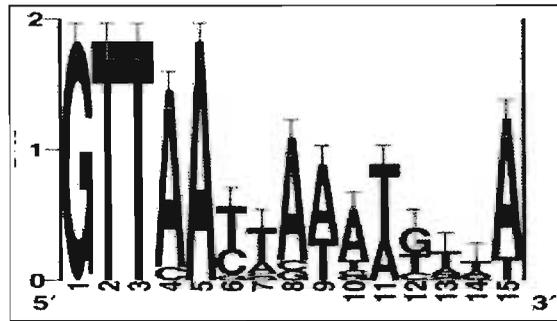


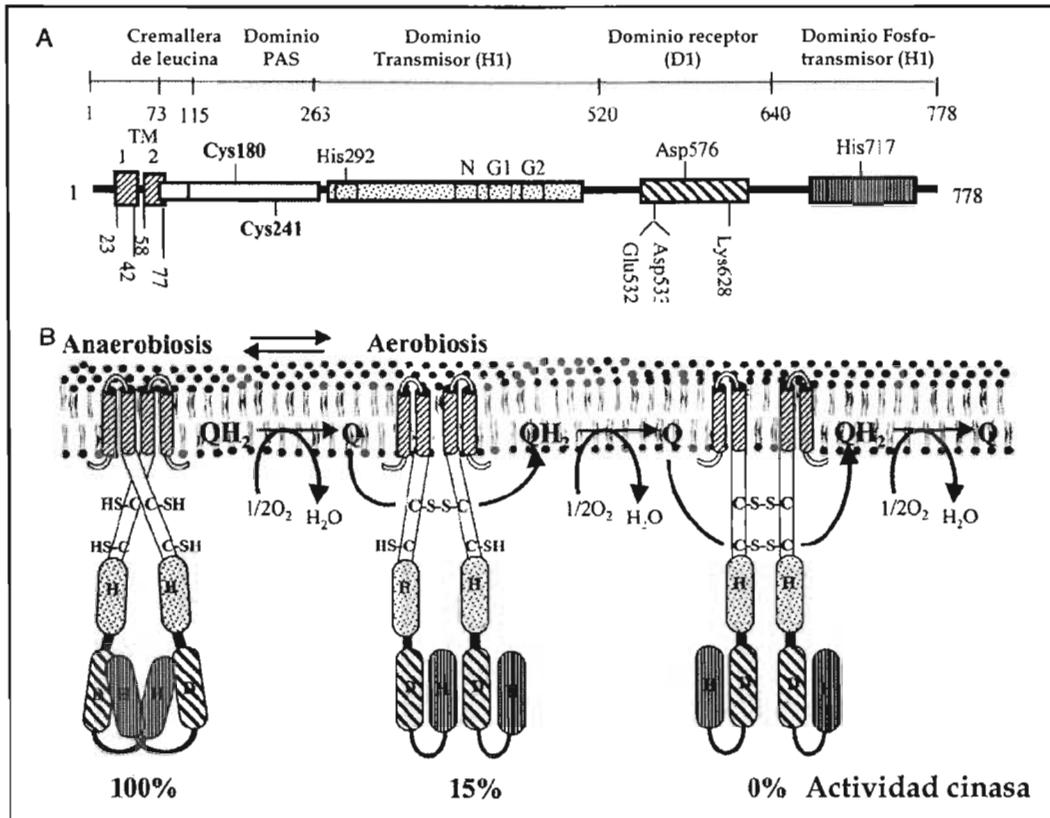
Figura 8. Secuencia de reconocimiento de ArcA-P.  
Las letras más grandes indican que hay mayor conservación.

En aerobiosis las quinonas de membrana estimulan la formación de puentes de disulfuro intermoleculares en la región citosólica de ArcB lo cual inhibe su actividad cinasa (Malpica *et.al.*, 2004). En la figura 9 se esquematiza este proceso. Durante condiciones de oxidación se ha detectado que ArcB puede incluso desfosforilar a ArcA-P *in vitro* (Georgellis *et.al.*, 1998). Existe la propuesta de que el nuevo residuo de Cys en la posición 71 de ArcB podría generar un puente de disulfuro entre dos moléculas de ArcB y posiblemente podría incrementarse su actividad desfosforilante. De esta manera el aumento en los niveles de transcripción para los genes de TCA de la cepa PB12 podría explicarse por la desfosforilación de ArcA.

Puesto que los genes de TCA se sobreexpresan tanto en la cepa PB12 como en una cepa *arcA-*, se generó la cepa PB11 *arcA-* buscando encontrar una elevación del nivel de transcripción de los genes de TCA. Se esperaba que los transcritos de los genes *gltA*, *acnA*, *icdA*, *sucA*, *sdhB*, *fumA*, *glpD* y *sodA* se incrementarían en PB11 *arcA-* de manera similar a como ocurre en la cepa PB12. Sin embargo, los niveles de transcrito de esos genes disminuyeron o no variaron en PB11 *arcA-* comparados con PB11.

Existe un reporte que podría ayudar a entender estos resultados. Se ha determinado que una cepa *arcA-* durante la transición de aerobiosis a microaerobiosis se comporta como si hubiera mayor actividad de FNR. Este regulador aumenta la transcripción de genes de anaerobiosis y disminuye la de genes de aerobiosis debido a un aumento en la relación de NADH/NAD<sup>+</sup> (Levanon *et al.*, 2005). También se sabe que la eliminación de *arcA* aumenta la relación de NADH/NAD<sup>+</sup> al incrementarse la oxigenación del sistema (Alexeeva *et.al.*, 2003). En la tabla 13 se muestra que los valores

de transcripción de los genes regulados por FNR efectivamente están ligeramente reprimidos en PB11 *arcA*- respecto a PB11. Estas observaciones sugieren que PB11 *arcA*- podría estar respondiendo como si hubiera mayor actividad de FNR por un incremento en la relación de NADH/NAD<sup>+</sup>. Además, el que haya una mayor concentración de NADH en PB11 apoya la observación de que esta cepa resiste mejor el estrés oxidativo que PB12 y JM101. (Comunicación personal, Flores N.) Sin embargo, no hay que olvidar que FNR es sensible al oxígeno.



**Figura 9.** A) Representación de los dominios que conforman a ArcB. B) Formación de puentes de disulfuro intermoleculares en ArcB en aerobiosis (Malpica *et.al.*, 2004). La mutación detectada en PB12 se encuentra en la segunda región transmembranal.

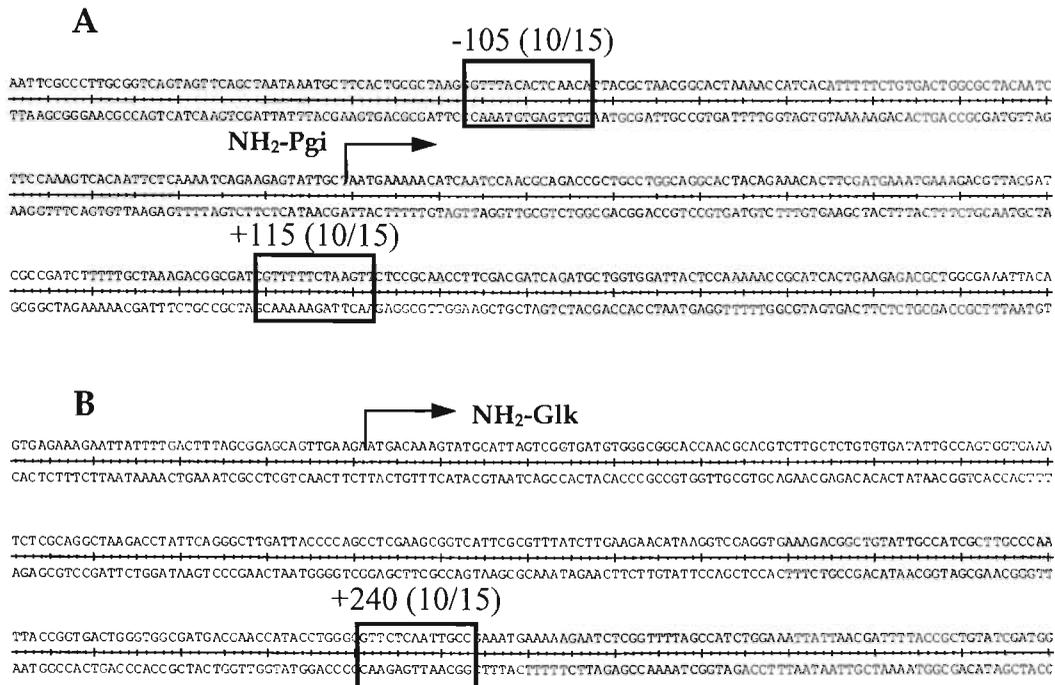
Hay que considerar que el fenotipo *arcA*- tal vez no sea igual en la cepa PB11 (PTS-) que en la PB12 (PTS-Glc<sup>+</sup>); posiblemente interfiera el elevado estrés que presenta PB11 en comparación a PB12. Además, dado que las redes de regulación son muy complejas, esto es, que la transcripción no sólo está sujeta a un sólo sistema de regulación, no se debe ignorar la ausencia del sistema PTS al analizar las consecuencias de la eliminación del regulador transcripcional ArcA. El sistema PTS tiene un papel regulatorio

importante por lo que su inactivación podría estar interviniendo también en el fenotipo *arcA*<sup>-</sup>. Además, no se sabe si la cepa PB12 presenta algún otro cambio en un regulador que esté involucrado en la modificación de los patrones de transcripción.

En general la transcripción de los genes de TCA en la cepa PB11 *arcA*<sup>-</sup> está por debajo de los niveles reportados para PB11 a excepción de *glcD*. Este gen codifica para la glicolato oxidasa y es fuertemente reprimido por ArcA-P y activado por la proteína GlcC (Liu y De Wulf, 2004). A su vez el gen *glcC* es reprimido por ArcA-P y FNR no participa en su regulación. Un aumento del activador GlcC podría explicar que los niveles de *glcD* estén tan elevados en PB11 *arcA*<sup>-</sup>.

Por otro lado, el nivel de transcrito de *glk* en la cepa PB11*arcA*<sup>-</sup> casi no se encuentra modificado respecto a PB11 y el transcrito de *pgi* disminuyó. Se sabe que en anaerobiosis se incrementa la actividad de Pgi (Schreyer y Böck, 1980), lo cual podría ser un indicio de que este gen está regulado positivamente por ArcA-P y que al ser eliminado *arcA*, la transcripción de *pgi* disminuye. Sin embargo no existe ningún reporte que incluya a *pgi* en el regulón de Arc; además habría que cuestionarse si el aumento de actividad de Pgi reportada en anaerobiosis se debe al incremento de su transcrito o a la presencia de algún activador enzimático. Sería importante estudiar la posibilidad de que *pgi* forme parte del regulón de Arc.

A pesar de que se han identificado más de 50 nuevos operones involucrados en el regulón de ArcA-P (Liu y De Wulf, 2004), aún debe haber blancos que no se conocen. Por ejemplo, no se tenía reporte de que *ptsG* fuera regulado por ArcA y ahora se sabe que la eliminación de *arcA* incrementa 2 veces la expresión de *ptsG* y la sobreexpresión de *arcA* disminuye el consumo de glucosa (Jeong *et.al.*, 2004). De la misma manera los genes *glk* y/o *pgi* podrían ser regulados por ArcA aunque hasta el momento no se tengan reportes al respecto. Se hizo una búsqueda de la secuencia consenso de unión para ArcA-P en los genes *glk* y *pgi* y se encontraron posibles sitios de unión que se muestran en la figura 10. Pero incluso si se llegara a demostrar que ArcA-P activa la transcripción de *pgi*, esto no explicaría por qué se incrementan los niveles de transcrito en la cepa PB12; éste es un aspecto que se seguirá estudiando.



**Figura 10.** Posibles sitios de unión de ArcA-P en las regiones reguladoras de *pgi* y *glik*. Estos sitios están encerrados en recuadros; arriba de cada cuadro se indica la posición del nucleótido central respecto al ATG de inicio y los números entre paréntesis indican el número de bases que coinciden con las 15 que conforman la secuencia consenso para ArcA-P.

Por último, para poder analizar con mayor exactitud la influencia de la mutación en *arcB* sobre los niveles transcripcionales de genes de TCA, se requeriría intercambiar en la cepa PB12 el gen *arcB* mutado por el gen *arcB* silvestre o cambiar el *arcB* silvestre por *arcB* mutado en la cepa PB11.

Hasta el momento se han logrado importantes avances sobre la caracterización de las cepas PB11 y PB12 y se han detectado algunos factores que favorecen el crecimiento de estas cepas. Sin embargo aún falta identificar cuáles fueron las mutaciones que se seleccionaron en PB12.

## CONCLUSIONES

- No se detectó ninguna mutación en los genes del regulón de galactosa. La sobreexpresión del regulón de galactosa en las cepas PB11 y PB12 se explica por la síntesis interna de galactosa como autoinductor del sistema.
- La sobreexpresión de *pgi* y *glk* no pueden ser explicados por cambios en la secuencia nucleotídica de éstos ya que no se detectó mutación en las regiones estructurales ni reguladoras de los genes.
- En la cepa PB12 se seleccionó una mutación en el gen *arcB* que cambia un residuo de Tyr por uno de Cys en la segunda región transmembranal de la proteína. En la cepa PB12 se sobreexpresan los genes de TCA que es un fenotipo *arcA*<sup>-</sup>.
- La eliminación del gen *arcA* incrementa el crecimiento de la cepa PB11. Sin embargo, este efecto no está relacionado con un incremento en la expresión de genes de TCA. Aún no se conocen los elementos responsables del aumento de velocidad.
- La presencia del plásmido pCL*galP* casi duplica la velocidad de crecimiento de la cepa PB11, lo cual implica que la sobreexpresión de *galP* puede al menos parcialmente restituir el transporte de glucosa en PB11.
- La duplicación de la actividad de glucocinasa en la cepa PB11 utilizando el plásmido pCL*glk* + *pgi* no incrementa la velocidad de crecimiento de la cepa. Aparentemente, el incremento de actividad de la glucocinasa no es de manera aislada un factor que favorezca el consumo de glucosa por parte de la cepa PB11.
- La transformación de la cepa PB11 con el plásmido pCL*pgi* no incrementa de manera importante la actividad enzimática. Por tanto aún no es posible saber si sólo el incremento de actividad de Pgi en la cepa PB11 podría incrementar su velocidad de crecimiento.
- La presencia del plásmido pCL*glk+galP* más IPTG incrementa más de 5 veces la velocidad de crecimiento de la cepa PB11 lo cual sugiere fuertemente que la suma de una mayor internalización de glucosa por GalP más fosforilación por Glk generan un fenotipo Glc<sup>+</sup> en la cepa PB11.

## PERSPECTIVAS

- Aún falta identificar la o las mutaciones involucradas en el fenotipo PTS-Glc<sup>+</sup> de la cepa PB12 además de la mutación detectada en *arcB*. Si en PB12 se hubiesen seleccionado dos mutaciones, entonces es probable que la complementación de una cepa PB11 ArcB<sup>Tyr 71 → Cys</sup> con un banco del genoma de PB12 podría permitir la detección de la otra mutación. Esta opción sería viable en caso de que se trate de una sola mutación puntual. Pero también es posible que en PB12 haya más de una mutación o que incluso haya ocurrido un fenómeno de transposición o de duplicación genética.
- Para profundizar en la caracterización de la mutación en *arcB* se podría analizar el crecimiento de la cepa PB12 en anaerobiosis y diferentes niveles de oxigenación. Si la mutación en *arcB* genera un aumento de la actividad desfosforilante de la proteína, se dificultaría el crecimiento de PB12 en microaerobiosis.
- No se ha determinado la causa de la sobreexpresión de *glk* y *pgi*. La fusión de las regiones reguladoras de *glk* y *pgi* con el gen que codifica para la β-glucuronidasa y el monitoreo de actividad al hacer complementaciones con un banco, podría permitir la detección del gen responsable de dicha sobreexpresión. También podría investigarse la posible regulación de ArcA-P sobre *glk* y *pgi*.
- La cuantificación de ATP, NAD<sup>+</sup>/NADH y NADP<sup>+</sup>/NADPH de las cepas PB11 y PB12 sería útil para conocer el estado energético y capacidad biosintética de las mismas.
- Actualmente continúa el trabajo de secuenciación y estudio de sistemas reguladores involucrados en respuesta a estrés como RpoS, SoxR y SodA.

## Actividades relevantes desarrolladas durante la maestría

- ❖ Publicación de artículos como coautora.

En ambos proyectos participé principalmente en la manipulación de RNA (extracción, cuantificación, y purificación) y en el desarrollo del análisis transcripcional por RT-PCR.

- 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* 2005; 7(2): 70-87.

La bacteria *E.coli* utiliza la mitad del PEP producido durante la glicólisis para transportar a la glucosa por el sistema PTS. Para incrementar la disponibilidad de PEP hacia la producción de compuestos aromáticos, se eliminó el sistema PTS para dar origen a la cepa PB11 (PTS-). Posteriormente se aisló y caracterizó a PB12 (PTS-Glc<sup>+</sup>), una cepa mutante derivada de PB11 que puede consumir glucosa y crecer más rápido que PB11. En este artículo se reporta un análisis transcripcional comparativo entre estas cepas de genes involucrados en el metabolismo central de carbono de glucosa, el transporte y la regulación transcripcional. Se determinó que PB11 se comporta como una cepa hambrienta y que tiene capacidades glicolíticas y gluconeogénicas simultáneas. Por otra parte los genes *glk*, *pgi*, del TCA y de respiración están sobreexpresados en PB12 lo cual podría proporcionarle una ventaja adaptativa. La mutación detectada en *arcB* es probablemente responsable de la sobreexpresión de genes de TCA en la cepa PB12.

Varios resultados del presente proyecto fueron incluidos en este artículo.

- Lara A, **Leal L**, Flores N, Gosset G, Bolívar F and Ramírez O. Transcriptional and metabolic response of recombinant *Escherichia coli* to spatial dissolved oxygen tension gradients simulated in a scale-down system. *Biotechnol Bioeng.* (In press)

Una cepa de *E.coli* productora de proteína verde fluorescente (GFP) fue sometida a oscilaciones de oxígeno disuelto (DOT) simulando los gradientes que se presentan en biorreactores de gran escala. Se determinaron los niveles de transcripción de genes de fermentación ácida por RT-PCR. Los resultados sugieren que bajo estas condiciones de crecimiento el TCA funciona en su modalidad de 2 ramas abiertas y que el citocromo de mayor afinidad al oxígeno se usa preferencialmente. Por otra parte, la producción de GFP fue 19% menor con respecto al control. La respuesta transcripcional de *E.coli* reportada en

este artículo permitirá establecer criterios que permitan diseñar estrategias para mejorar el desempeño de cultivos a gran escala.



Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

SCIENCE @ DIRECT®

Metabolic Engineering 7 (2005) 70–87

METABOLIC  
ENGINEERING

[www.elsevier.com/locate/jymben](http://www.elsevier.com/locate/jymben)

## 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

Noemí Flores<sup>a</sup>, Salvador Flores<sup>a</sup>, Adelfo Escalante<sup>a</sup>, Ramón de Anda<sup>a</sup>, Lidia Leal<sup>a</sup>, Roxana Malpica<sup>b</sup>, Dimitris Georgellis<sup>b</sup>, Guillermo Gosset<sup>a</sup>, Francisco Bolívar<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Ingeniería Celular y Biotecnología, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos 62271, México

<sup>b</sup>Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 3000 D.F., México

Received 9 July 2004; accepted 5 October 2004  
Available online 11 November 2004

### Abstract

Phosphoenolpyruvate (PEP) is a key intermediate of cellular metabolism and a precursor of commercially relevant products. In *Escherichia coli* 50% of the glucose-derived PEP is consumed by the PEP:carbohydrate phosphotransferase system (PTS) for glucose transport. PTS, encoded by the *ptsHIerr* operon, was deleted from JM101 to generate strain PB11 (PTS<sup>-</sup>Glc<sup>-</sup>). PB12, a mutant derived from PB11, grows faster than the parental strain on glucose (PTS<sup>-</sup>Glc<sup>+</sup> phenotype). This strain can redirect some of the PEP not utilized by PTS into the high yield synthesis of aromatic compounds from glucose. Here, we report a comparative transcription analysis among these strains of more than 100 genes involved in central carbon metabolism during growth on glucose. It was found that in the PTS<sup>-</sup> strains that have reduced glucose transport capacities, several genes encoding proteins with functions related to carbon transport and metabolism were upregulated. Therefore, it could be inferred that these strains synthesize autoinducers of these genes when sensing very low internal glucose concentrations, probably for scavenging purposes. This condition that is permanently present in the PTS<sup>-</sup> strains even when growing in high glucose concentrations allowed the simultaneous utilization of glucose and acetate as carbon sources. It was found that the *gal* operon is upregulated in these strains, as well as the *aceBAK*, *poxB* and *acs* genes among others. In PB12, *glk*, *pgi*, the TCA cycle and certain respiratory genes are also upregulated. A mutation in *arcB* in PB12 is apparently responsible for the upregulation of the TCA cycle and certain respiratory genes.

© 2004 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** *Escherichia coli*; PTS<sup>-</sup>; *arcA*; *arcB*; *galP*; *glk*; *pgi*; *rpoS*; RT-PCR; Starvation-stress response; TCA; Glyoxylate shunt; Autoinducers; Acetate; Phosphoenolpyruvate; Pyruvate

### 1. Introduction

Metabolic engineering can be defined as the modification of cellular enzymatic, transport and regulatory activities with the aim of strain improvement (Bailey,

1991). This discipline has been applied in *Escherichia coli* to improve productivity and yield in the synthesis of specific metabolites. Some of the strategies followed to achieve these goals include modification or elimination of the phosphoenolpyruvate (PEP):carbohydrate phosphotransferase system (PTS). This protein system belongs to the group translocator class of transporters, which are widespread in bacteria (Saier, 2002). One of

\*Corresponding author. Fax: +52 777 3172388.  
E-mail address: [noemi@ibt.unam.mx](mailto:noemi@ibt.unam.mx) (N. Flores).

# Transcriptional and Metabolic Response of Recombinant *Escherichia coli* to Spatial Dissolved Oxygen Tension Gradients Simulated in a Scale-Down System

Alvaro R. Lara,<sup>1</sup> Lidia Leal,<sup>2</sup> Noemi Flores,<sup>2</sup> Guillermo Gosset,<sup>2</sup> Francisco Bolivar,<sup>2</sup> Octavio T. Ramirez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Molecular Medicine and Bioprocesses, Institute of Biotechnology, National Autonomous University of Mexico (UNAM), Mexico City, Mexico; telephone: (52) 777 329-1646; fax (52) 777 3138811; e-mail: tonatiuh@ibt.unam.mx

<sup>2</sup>Department of Cellular Engineering and Biocatalysis, Institute of Biotechnology, National Autonomous University of Mexico (UNAM), Mexico City, Mexico

Received 29 June 2005; accepted 17 August 2005

DOI: 10.1002/bit.20704

**Abstract:** *Escherichia coli*, expressing recombinant green fluorescent protein (GFP), was subjected to dissolved oxygen tension (DOT) oscillations in a two-compartment system for simulating gradients that can occur in large-scale bioreactors. Cells were continuously circulated between the anaerobic (0% DOT) and aerobic (10% DOT) vessels of the scale-down system to mimic an overall circulation time of 50 s, and a mean residence time in the anaerobic and aerobic compartments of 33 and 17 s, respectively. Transcription levels of mixed acid fermentation genes (*ldhA*, *pxxB*, *frdD*, *ackA*, *adhE*, *pfhD*, and *fdhF*), measured by quantitative RT-PCR, increased between 1.5- to over 6-fold under oscillatory DOT compared to aerobic cultures (constant 10% DOT). In addition, the transcription level of *fumB* increased whereas it decreased for *sucA* and *sucB*, suggesting that the tricarboxylic acid cycle was functioning as two open branches. Gene transcription levels revealed that cytochrome bd, which has higher affinity to oxygen but lower energy efficiency, was preferred over cytochrome b<sub>558</sub> in oscillatory DOT cultures. Post-transcriptional processing limited heterologous protein production in the scale-down system, as inferred from similar *gfp* transcription but 19% lower GFP concentration compared to aerobic cultures. Simulated DOT gradients also affected the transcription of genes of the glyoxylate shunt (*aceA*), of global regulators of aerobic and anaerobic metabolism (*fnr*, *arcA*, and *arcB*), and other relevant genes (*luxS*, *sodA*, *fumA*, and *sdhB*). Transcriptional changes explained the observed alterations in overall stoichiometric and kinetic parameters, and production of ethanol and organic acids. Differences in transcription levels between aerobic and anaerobic compartments were also observed, indicating that *E. coli* can respond very fast to intermittent DOT conditions. The

transcriptional responses of *E. coli* to DOT gradients reported here are useful for establishing rational scale-up criteria and strain design strategies for improved culture performance at large scales. © 2005 Wiley Periodicals, Inc. **Keywords:** recombinant *E. coli*; scale-down; aerobic and anaerobic metabolism; transcriptomics; circulation time; dissolved oxygen gradients; scale-up; scale-down

## INTRODUCTION

The design and operation of large-scale fermenters is constrained by practical issues that frequently lead to mixing problems and the concomitant appearance of spatial gradients in culture parameters (Amanullah et al., 2004; Davidson et al., 2003; Palomares and Ramirez, 2000; Schmalzriedt et al., 2003). Under such conditions, cells are continuously exposed to an oscillating environment that can affect their metabolic and physiologic behavior. This explains the different performance generally observed between large-scale cultures and laboratory studies conducted under well-controlled conditions (Bylund et al., 1998, 1999, 2000; Hewitt et al., 2000; Namdev et al., 1993; Onyeaka et al., 2003). The effects of environmental fluctuations on cells can be investigated in scale-down systems as originally proposed by Oosterhuis (1984). Using such approach, the effects of pH, dissolved oxygen tension (DOT), and substrate gradients have been studied on a variety of organisms ranging from bacteria (Amanullah et al., 2001; Bylund et al., 1999; De León et al., 1995; Hewitt et al., 2000; Namdev et al., 1993; Oosterhuis et al., 1985; Sandoval-Basanto et al., 2005; Tujillo-Roldán et al., 2001) and yeast (Cortés et al., 2005; George et al., 1993), to mammalian cells (Osman et al., 2002; Serrato et al., 2004). The study of cell physiology under such fluctuating conditions has been

Correspondence to: Octavio T. Ramirez

Contract grant sponsors: CONACYT, DGAPA

Contract grant numbers: NC-230, 43243, 46408-2; IN220403, IN218902, IX254404

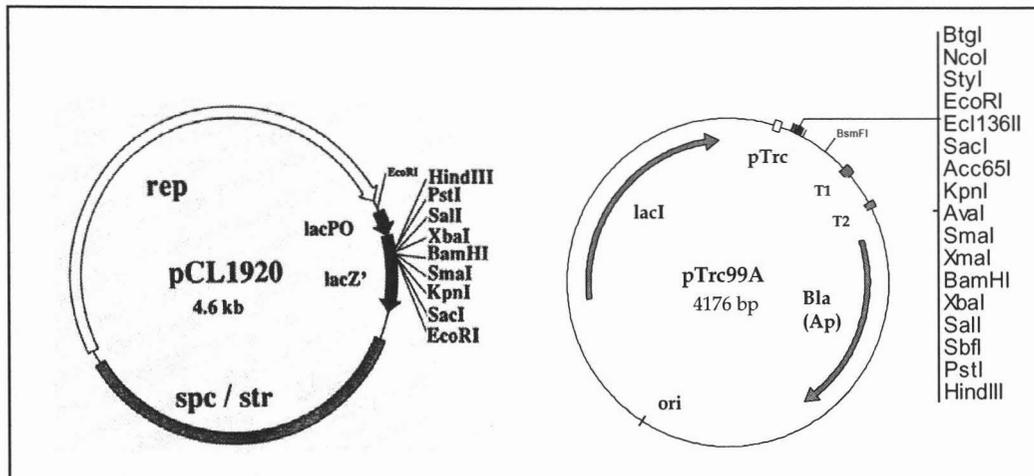
©2005 Wiley Periodicals, Inc.

❖ Participación en congresos

- Presentación oral del trabajo “Impacto de la sobreexpresión de *galP*, *glk* y *pgi* sobre una cepa de *Escherichia coli* PTS-” en el XI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería que tuvo lugar en Mérida, Yucatán del 18 al 23 de sep. del 2005.
- Presentación del cartel titulado “Análisis transcripcional del regulón de galactosa en cepas de *Escherichia coli* PTS-Glc<sup>+</sup>” en el XXV Congreso Nacional de Bioquímica que tuvo lugar en Ixtapa, Zihuatanejo del 28 de nov. al 3 de dic. del 2004.

## APÉNDICE

### a) Clonación de los genes *pgi* y *glk* en plásmidos multicopia



**Figura 11.** Representación de los vectores utilizados para clonar los genes *pgi* y *glk*. Es importante mencionar que el sitio múltiple de clonación del vector pCL1920 aparece invertido en la referencia original (Lerner e Inouye, 1990; Amann *et.al.*, 1988).

**Tabla 14.** Clonaciones de este trabajo

Construcción	Región clonada**	Vector	No. copias	Sitio de clonación
pTrc <i>glk</i>	470 / 115	pTrc99A	≈ 30	EcoRI
pTrc <i>pgi</i>	160 / 260	pTrc99A	≈ 30	EcoRI
pCL <i>pgi</i>	160 / 260	pCL1920	≈ 5	EcoRI
*pCLv <i>glk pgi</i>	160 / 260	pCL1920	≈ 5	Xba I - BamHI

\* El gen *pgi* fue clonado en tándem con respecto a *glk* en el plásmido pCLv*glk* construido anteriormente (Hernández *et.al.*, 2003).

\*\* El primer número indica la cantidad de pb clonadas en el extremo 5' con respecto al ATG de inicio; el segundo número indica la cantidad de pb clonadas después del codón de término del gen.

## b) Abreviaturas más importantes utilizadas en este trabajo

**Tabla 15.** Abreviaturas usadas para compuestos químicos.

Abreviatura	Nombre completo
Glc	Glucosa
G6P	Glucosa-6-fosfato
6PGNL	6-Fosfogluconolactona
F6P	Fructosa-6-fosfato
PEP	Fosfoenol piruvato
Ac-CoA	Acetil coenzima A
CoA	Coenzima A
A-AMP	Acetil AMP
Ac-P	Acetil fosfato

**Tabla 16.** Nombre de las proteínas codificadas por los genes enlistados a la izquierda.

Nombre del gen	Codifica para
<i>ackA</i>	Acetato cinasa
<i>acnAB</i>	Aconitasa
<i>aceA</i>	Isocitrato liasa
<i>aceB</i>	Malato sintasa A
<i>acs</i>	Acetil coenzima A sintetasa
<i>cyaA</i>	Adenilato ciclasa
<i>fumA</i>	Fumarasa
<i>galE</i>	UDP-glucosa 4-epimerasa
<i>galK</i>	Galactocinasa
<i>galM</i>	Galactosa-1-epimerasa
<i>galP</i>	Permeasa de galactosa
<i>galT</i>	Galactosa-1-fosfato uridiltransferasa
<i>galU</i>	UTP-glucosa-1-fosfato-uridiltransferasa
<i>glcB</i>	Malato sintasa G
<i>glcD</i>	Subunidad D de la glicolato oxidasa
<i>glk</i>	Glucocinasa
<i>glpD</i>	Glicerol-3-fosfato-deshidrogenasa
<i>gltA</i>	Citrato sintasa
<i>hupA</i>	Subunidad $\alpha$ de la proteína de unión a DNA (HU)
<i>hupB</i>	Subunidad $\beta$ de la proteína de unión a DNA (HU)
<i>icdA</i>	Isocitrato sintasa
<i>lamB</i>	Receptor de alta afinidad para maltosa

Nombre del gen	Codifica para
<i>maeB</i>	Enzima málica dependiente de NADP <sup>+</sup>
<i>mdh</i>	Malato deshidrogenasa
<i>mglB</i>	Transportador ABC para galactosa
<i>nuoF</i>	Subunidad de la NADH deshidrogenasa
<i>Pdh</i>	Piruvato deshidrogenasa
<i>pckA</i>	PEP carboxicinas
<i>pfl</i>	Piruvato formato liasa
<i>pgi</i>	Fosfoglucosa isomerasa
<i>pgm</i>	Fosfoglucomutasa
<i>poxB</i>	Piruvato oxidasa
<i>ppc</i>	PEP carboxilasa
<i>pps</i>	PEP sintasa
<i>pta</i>	Fosfato acetil-transferasa
<i>pykAK</i>	Piruvato cinasas isoenzimas A y F
<i>sdhABCD</i>	Complejo de la succinato deshidrogenasa
<i>sfcA</i>	Enzima málica dependiente de NAD <sup>+</sup>
<i>sodA</i>	Superóxido dismutasa
<i>sucAB</i>	Subunidades del complejo de la $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa
<i>sucCD</i>	Subunidades del complejo de la succinil-CoA sintetasa

## BIBLIOGRAFÍA

- Alexeeva S, Hellingwerf K and Teixeira de Mattos M. Requirement of ArcA for redox regulation in *Escherichia coli* under microaerobic but not anaerobic or aerobic conditions. *J Bacteriol* 2003;185(1): 204-209.
- Amann E, Ochs B and Abel K. Tightly regulated tac promoter vectors useful for the expression of unfused and fused proteins in *Escherichia coli*. *Gene* 1988; 69(2): 301-15.
- Báez J, Bolivar F and Gosset G. Determination of 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate productivity and yield from glucose in *Escherichia coli* devoid of the glucose phosphotransferase system. *Biotechnol Bioeng* 2001; 6: 530-535.
- Báez J, Osuna J, Hernández-Chávez G, Soberón X, Bolivar F and Gosset G. Metabolic engineering and protein directed evolution increase the yield of L-phenylalanine synthesized from glucose in *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng* 2004; 87(4): 516-524.
- Bolívar F, Rodríguez R, Greene P, Betlach M, Heyneker H and Boyer H. Construction and characterization of new cloning vehicles II. A multipurpose cloning system. *Gene* 1977; 2(2): 95-113.
- Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Chem* 1976; 72: 248.
- Choy H and Adhya S. Control of gal transcription through DNA looping: Inhibition of the initial transcribing complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 11264-11268.
- Choy H, Park S, Aki T, Parrack P, Fujita N, Ishihama A and Adhya S. Repression and activation of transcription by Gal and Lac repressors: involvement of alpha subunit of RNA polymerase. *EMBO J* 1995; 14(18): 4523-9.
- Choy H and Adhya S, Negative Control, In: *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology, Vol. 1, Neidhardt F. (ed), 2<sup>nd</sup> ed., ASM Press, Washington, 1996, pp. 1291-1292.
- Claret L and Rouviere-Yaniv J, Regulation of HU alpha and HU beta by CRP and FIS in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 1996; 263(2):126-139. Curtis S and Epstein W. Phosphorylation of D-glucose in *Escherichia coli* mutants effective in glucosephosphotransferase, mannosephosphotransferase, and glucokinase. *J Bacteriol* 1975, 122:1189-99.

- Death A and Ferenci T. Between feast and famine: endogenous inducer synthesis in the adaptation of *Escherichia coli* to growth with limiting carbohydrates. *J Bacteriol* 1994;176(16): 5101-5107.
- De Reuse H, Huttner E and Danchín A. Analysis of the *ptsH-ptsI-crr* region in *Escherichia coli* K-12: evidence for the existence of a single transcriptional unit. *Gene* 1984; 32: 31-40.
- Ferenci T. Regulation by nutrient limitation. *Curr Opin Microbiol* 1999; 2: 208-213.
- Ferenci T. Hungry bacteria, definition and properties of a nutritional state. *Environ Microbiol* 2001; 3(19): 605-611.
- Flores N, Xiao J, Berry A, Bolívar F and Valle F. Pathway engineering for the production of aromatic compounds in *Escherichia coli*. *Nature Biotechnology* 1996; 14:620-623.
- 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* 2005; 7(2): 70-87.
- Flores S, Gosset G, Flores N, de Graaf A and Bolívar F. Analysis of carbon metabolism in *Escherichia coli* strains with an inactive phosphotransferase system by <sup>13</sup>C labeling and NMR spectroscopy. *Metabolic Engineering* 2002; 4:124-137.
- Geanacopoulos M and Adhya S. Functional characterization of roles of GalR and GalS as regulators of the *gal* regulon. *J Bacteriol* 1997; 179(1):228-234.
- Geanacopoulos M, Vasmatzis G, Lewis D, Roy S and Lee B. GalR mutants defective in repressosome formation. *Gene and Development* 1999; 13: 1251-1262.
- Georgellis D, Kwon O, De Wulf P and Lin E. Signal decay through a reverse phosphorelay in the Arc two-component signal transduction system. *J Biol Chem* 1998; 273: 32864-32869.
- Gosset G. Improvement of *Escherichia coli* production strains by modification of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system. *Microbial Cell Factories* 2005; 4:14.
- Holms W. 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, In: *Current topics in cellular regulation*, Horecker B. and Stadtman E. (eds.), Academic Press, 1986, pp. 69-104.

- Hernández-Montalvo V, Martínez A, Hernández-Chávez G, Bolívar F and 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(6): 687-694.
- Irani M, Orosz L, Busby S, Taniguchi T and Adhya S. Cyclic AMP-dependent constitutive expression of *gal* operon: use of repressor titration to isolate operator mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1983; 80(15): 4775-4779.
- Iuchi S and 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.
- Iuchi S and Lin E. 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.
- Jeon Y, Lee Y, Han J, Kim J and Hwang D. 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.
- Jeong J, Kim Y, Cho N, Shin D, Nam T, Ryu S and Seok Y. Expression of ptsG encoding the major glucose transporter is regulated by ArcA in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 2004; 279(37): 38513-38518.
- Koo B, Yoon M, Lee C, Nam T, Choe Y, Jaffe H, Peterkofsky A and Seok Y. A novel fermentation/respiration switch protein regulated by enzyme IIAGlc in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 2004; 279(30): 31613-31621.
- Kwon O, Georgellis D, Lynch A, Boyd D and Lin E. The ArcB sensor kinase of *Escherichia coli*: genetic exploration of the transmembrane region. *J Bacteriol* 2000; 182(10): 2960-2966.
- Lerner C and Inouye M. Low copy number plasmids for regulated low-level expression of cloned genes in *Escherichia coli* with blue/white insert screening capability. *Nucleic Acids Res* 1990; 18(15): 4631.
- Lessie T and Vander Wyk J. Multiple forms of *Pseudomonas multivorans* glucose-6-phosphate and 6-phosphogluconate dehydrogenases: differences in size, pyridine nucleotide specificity, and susceptibility to inhibition by adenosine 5'-triphosphate. *J Bacteriol* 1972; 110(3): 1107-1117.

- Levanon S, San K and Bennett G. Effect of oxygen on the *Escherichia coli* ArcA and FNR regulation systems and metabolic responses. *Biotechnol Bioeng* 2005; 89(5): 556-564.
- Lévy S, Zeng G and Danchin A. Cyclic AMP synthesis in *Escherichia coli* strains bearing known deletions in the *pts* phosphotransferase operon. *Gene* 1990; 86: 27-33.
- Lewis D, Geanacopoulos M and Adhya S. Roles of HU and DNA supercoiling in transcription repression. Specialized nucleoprotein repression complex at gal promoters in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 1999; 31: 451-461.
- Liao J, Hou S y Chao Y. Pathway analysis, engineering, and physiological considerations for redirecting central metabolism. *Biotechnol Bioeng* 1996, 52:129-140.
- Liu X and De Wulf P. Probing the ArcA-P modulon of *Escherichia coli* by whole genome transcriptional analysis and sequence recognition profiling. *J Biol Chem* 2004; 279(13): 12588-12597.
- Livak K and Schmittgen T. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  Method. *Methods* 2001; 25(4): 402-8.
- Lux R, Jahreis K, Bettenbrock K, Parkinson J and Lengeler J. Coupling the phosphotransferase system and the methyl-accepting chemotaxis protein-dependent chemotaxis signaling pathways of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci* 1995; 92:11583-11587.
- Maitra P and Lobo Z. A kinetic study of glycolytic enzyme synthesis in yeast. *J Biol Chem* 1971; 246(2): 475-488.
- Malpica R, Franco B, Rodriguez C, Kwon O and Georgellis D. Identification of a quinone-sensitive redox switch in the ArcB sensor kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(36): 13318-23.
- Matsushita K, Arents J, Bader R, Yamada M, Adachi O and Postma P. *Escherichia coli* is unable to produce pyrroloquinoline quinone (PQQ). *Microbiology* 1997; 143 (Pt 10): 3149-3156.
- McDonald T, Walmsley A and Henderson P. Asparagine 394 in putative helix 11 of the galactose-H<sup>+</sup> symport protein (GalP) from *Escherichia coli* is associated with the internal binding site for cytochalasin B and sugar. *J Biol Chem* 1997; 272:15189-15199.

- Miller J, Backman K, O'Connor M and Hatch R. Production of phenylalanine and organic acids by phosphoenolpyruvate carboxylase-deficient mutants of *Escherichia coli*. J Ind Microbiol 1987; 2: 143-149.
- Moreau P, Gerard F, Lutz N and Cozzone P. Non-growing *Escherichia coli* cells starved for glucose or phosphate use different mechanisms to survive oxidative stress. Mol Microbiol 2001; 39(4): 1048-1060.
- Mori M and Shio I. Pyruvate formation and metabolic in an amino acid-producing bacterium, *Brevibacterium flavum*. Agric Biol Chem 1987; 51: 129-138.
- Nikaido H and Saier M, Jr. Transport proteins in bacteria: common themes in their design. Science 1992; 258: 936-942
- Neijseel O, Tempest D, Postma P, Duine J and Frank J, Jr. Glucose metabolism by K<sup>+</sup>-limited *Klebsiella aerogenes*: evidence for the involvement of a quinoprotein glucose dehydrogenase. FEMS Microbiol Lett 1983; 20: 35-39.
- Notley L and Ferenci T. Induction of RpoS-dependent functions in glucose-limited continuous culture: what level of nutrient limitation induces the stationary phase of *Escherichia coli*? J Bacteriol 1996; 178(5): 1465-1468.
- Nystrom T. The glucose-starvation stimulon of *Escherichia coli*: induced and repressed synthesis of enzymes of central metabolic pathways and role of acetyl phosphate in gene expression and starvation survival. Mol Microbiol 1994; 12(5): 833-843.
- Nystrom T, Larsson C and Gustafsson L. Bacterial defense against aging: role of the *Escherichia coli* ArcA regulator in gene expression, readjusted energy flux and survival during stasis. EMBO J 1996; 15(13): 3219-3228.
- Parker C, Barnell W, Snoep J, Ingram L and Conway T. Characterization of the *Zymomonas mobilis* glucose facilitator gene product (glf) in recombinant *Escherichia coli*: examination of transport mechanism, kinetics and the role of glucokinase in glucose transport. Mol Microbiol 1995; 15(5): 795-802.
- Perrenoud A and 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(9): 3171-3179.
- Podolny V, Lin E and Hochschild A. A cyclic AMP receptor protein mutant that constitutively activates an *Escherichia coli* promoter disrupted by an IS5 insertion. J Bacteriol 1999; 181(4): 7457-7463.

- Postma P, Lengeler J and Jacobson G. Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microb Rev* 1993; 57: 543-594.
- Postma P, Lengeler J and Jacobson G. Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase system, In: *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology, Vol 1, Neidhardt F. (ed), 2<sup>nd</sup> ed., ASM Press, Washington, 1996, pp. 1149-1174.
- Ruijter G, Postma P and van Dam K. Energetics of glucose uptake in a *Salmonella typhimurium* mutant containing uncoupled enzyme II<sub>Glc</sub>. *Arch Microbiol* 1991; 155(3): 234-7.
- Saier M, Jr., Young W and Roseman S. Utilization and transport of hexoses by mutant strains of *Salmonella typhimurium* lacking enzyme I of the phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system. *J Biol Chem* 1971; 246, 5838-5840
- Saier M, Jr., Bromberg F and Roseman S. Characterization of constitutive galactose permease mutants in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* 1973;113(1):512-514
- Saier M, Jr., Werner P and Müller M. Insertion of proteins into bacterial membranes: mechanism, characteristics, and comparisons with the eucaryotic process. *Microbiol Rev* 1989; 53(3): 333-366.
- Saier M, Jr. and Chin A. Energetics of bacterial phosphotransferase system in sugar transport and the regulation of carbon metabolism, In: *The Bacteria: a treatise on structure and function*, Vol XII-Bacterial energetics, Krulwich T. (ed.), Academic Press, New York, 1990, pp. 273-299.
- Saier M, Jr. and Ramseier T. The catabolite repressor/activator (Cra) protein of enteric bacteria. *J Bacteriol* 1996; 178: 3411-3417.
- Saier M, Jr., Ramseier T and Reizer J. Regulation of carbon utilization. In: *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology, Vol. 1, Neidhardt F. (ed), 2<sup>nd</sup> ed., ASM Press, Washington, 1996.
- Saier M. Vectorial metabolism and the evolution of the transport systems. *J Bacteriol* 2002; 182: 5029-5035.
- Schreyer R and Böck A. Phosphoglucose isomerase from *Escherichia coli* K 10: purification, properties and formation under aerobic and anaerobic condition. *Arch Microbiol* 1980; 127(3): 289-98.

- Snoep J, Arfman N, Yomano L, Fliege R, Conway T and Ingram L. Reconstitution of glucose uptake and phosphorylation in a glucose-negative mutant of *Escherichia coli* by using *Zymomonas mobilis* genes encoding the glucose facilitator protein and glucokinase. *J Bacteriol* 1994; 176: 2133-2135.
- Taguchi M, Izui K and Katsuki H. Stringent control of glycolysis in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* 1978; 84(1):195-201. Ueguchi C, Misonou N and Mizuno T. Negative control of *rpoS* expression by phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase system in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 2001; 183(2): 520-527.
- Yi J, Li K, Draths K and Frost J. Modulation of phosphoenolpyruvate synthase expression increases shikimate pathway product yields in *E. coli*. *Biotechnol Prog* 2002; 18(6): 1141-1148.
- Yi J, Draths K, Li K and Frost J. Altered glucose transport and shikimate pathway product yields in *E. coli*. *Biotechnol Prog* 2003; 19(5): 1450-9.
- Weber H, Polen T, Heuveling J, Wendisch V and 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.
- Weickert M and Adhya S. Control of transcription of Gal Repressor and Isorepressor genes in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1993; 175(1): 251-258.