

SOBREEXPRESIÓN DE UNA ACTIVIDAD ATPasa EN MUTANTES DE *Escherichia coli* INACTIVADAS EN EL SISTEMA DE TRANSPORTE FOSFOTRANSFERASA (PTS).

Sandra Soria, Noemí Flores, Patricia Castillo-España, Guillermo Gosset, Francisco Bolivar y José Luis Báez-Viveros. Av. Universidad 1001 Centro de Investigación en Biotecnología, Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Fax (777) 329 70 30. Correspondencia: jlbaz@uaem.mx

Palabras claves: PTS, ATPasa, ATP

Introducción. El ATP es ampliamente utilizado por los organismos como sustrato, producto, activador y/o inhibidor en muchos procesos celulares. La generación de ATP se produce a nivel del sustrato y por fosforilación oxidativa (por medio de la ATP sintasa). Se ha demostrado que el cociente intracelular ([ATP]/[ADP]) juega un papel muy importante en el control de la velocidad específica de crecimiento (μ) y el flujo glicolítico (q_s) en *E. coli* (1). El propósito del presente trabajo es estudiar el efecto de la sobreexpresión de una actividad ATPasa en mutantes de *E. coli* inactivadas en el Sistema de Transporte Fosfotransferasa (PTS) sobre el crecimiento celular y el consumo de glucosa.

Metodología. Se clonó el operón que codifica la actividad ATPasa (*atpAGD*) en el vector pTrc99A, generándose el plásmido pTrcAGD, el cual fue usado para transformar las cepas: silvestre JM101 y la mutante PB12 (PTS⁻Glc⁺). Las cepas construidas se designaron como: JMAGD⁺ (JM101/pTrcAGD) y PB12AGD⁺ (PB12/pTrcAGD). Las cepas fueron caracterizadas fisiológicamente a nivel de matraz durante 12 h, usando medio mínimo M9 suplementado con glucosa (2 g/l) y diferentes concentraciones de IPTG.

Resultados y discusión. La sobreexpresión de la actividad ATPasa tuvo un efecto negativo sobre la μ en la cepa JMAGD⁺ y en la mutante PB12AGD⁺. El incremento en las concentraciones de IPTG causó una mayor disminución en la μ en ambas cepas (Cuadro 1, Figura 1).

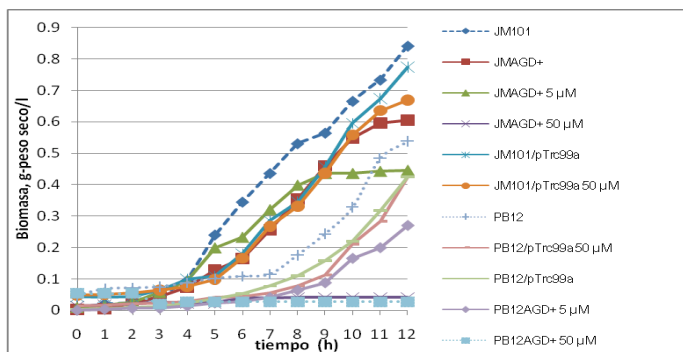


Figura 1. Cinética de crecimiento celular de JM101, PB12 y sus derivadas JMAGD⁺ y PB12AGD⁺.

Estos datos sugieren que el nivel energético de las células disminuye al aumentar la expresión de la actividad ATPasa. Este efecto se ve incrementado en un fondo genético PTS⁻Glc⁺, debido a que se asume que el nivel energético en la PB12 está disminuido comparado con la cepa parental. De hecho, cuando se indujo esta actividad con 50 μM de IPTG en la PB12AGD⁺, se detiene el crecimiento celular (Figura 1). Por otro lado, la q_s aumentó significativamente al sobreexpresar la actividad ATPasa en ambas cepas.

Cuadro 1. Velocidades específicas de crecimiento (μ) en las cepas JMAGD⁺ y PB12AGD⁺ a diferentes concentraciones de IPTG. La desviación estándar es mostrada entre paréntesis.

CEPAS	IPTG μ M	μ , h ⁻¹	CEPAS PTS ⁻	μ , h ⁻¹
JM101	0.0	0.71(0.01)	PB12	0.42(0.04)
JMAGD ⁺	0.0	0.38(0.07)	PB12AGD ⁺	0.23(0.05)
JMAGD ⁺	0.5	0.24(0.03)	PB12AGD ⁺	0.22(0.08)
JMAGD ⁺	50.0	0.06(0.05)	PB12AGD ⁺	0.0
JM101/pTrc99A	0.0	0.65(0.06)	PB12/pTrc99A	0.39(0.10)
JM101/pTrc99A	50.0	0.58(0.19)	PB12/pTrc99A	0.34(0.11)

Conclusiones. La disminución gradual de la μ con respecto al incremento de IPTG, sugiere que la expresión de la actividad ATPasa se logró modular. Asimismo, la sobreexpresión de una actividad ATPasa en cepas de *E. coli* JMAGD⁺ y PB12AGD⁺ mostró un fuerte impacto negativo sobre el crecimiento celular. Notablemente, el crecimiento celular fue inhibido al usar altas concentraciones de IPTG (50 μM en PB12AGD⁺ y mayores a 100 μM en JMAGD⁺).

Agradecimientos. Secretaría de Relaciones Exteriores, por el otorgamiento de la beca a la estudiante M. en C. Sandra Soria. CONACYT (Proyecto N° 84782).

Bibliografía.

1. Koebmann B.J., Westerhoff H.V., Snoep J.L., Nilsson D., Jensen P.R. (2002) The glycolytic flux in *Escherichia coli* is controlled by the demand for ATP. *J Bacteriol.* 184.14: 3909-3916.