



“Evolución adaptativa en cepas de *Escherichia coli* carentes del sistema PTS”

César Aguilar<sup>1</sup>, Adelfo Escalante<sup>1</sup>, Noemí Flores<sup>1</sup>, Ramón de Anda<sup>1</sup>, Fernando Riveros-McKay<sup>2</sup>, Guillermo Gosset<sup>1</sup>, Francisco Bolívar<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Cuernavaca, Morelos, 62210, México and <sup>2</sup>Winter Genomics, México D.F. 07300.

Palabras clave: Evolución, Sistema PTS, *Escherichia coli*.

**Introducción.** Los compuestos aromáticos poseen un alto valor comercial para varios tipos de industrias. Estos compuestos son sintetizados por *E. coli* en bajas concentraciones a partir de eritrosa 4 fosfato (E4F) y fosfoenolpiruvato (PEP), el cual, en *E. coli*, es consumido en un 50% por el principal sistema de transporte de glucosa (PTS). Una estrategia para incrementar la poza de PEP en *E. coli*, para redirigir el flujo de carbono hacia la síntesis de compuestos aromáticos fue la eliminación del sistema PTS, y se realizó en la cepa JM101, la cual presenta una velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) de 0.7 hr<sup>-1</sup> [1,2]. La cepa obtenida, denominada PB11, no fue adecuada para los propósitos de producción ya que su crecimiento en glucosa se vio seriamente afectado ( $\mu=0.1$  hr<sup>-1</sup>). A partir de la cepa PB11, y por un proceso de evolución adaptativa por crecimiento rápido en glucosa, se generó la cepa PB12 ( $\mu=0.42$  hr<sup>-1</sup>) y PB13 ( $\mu=0.5$  hr<sup>-1</sup>), aisladas a las 120 hrs y 200 hrs respectivamente [1,2]. Varias mutaciones generadas, fueron responsables del incremento en el crecimiento. En este trabajo se presenta la caracterización genética y fisiológica de todos los cambios generados en las cepas evolucionadas que les permitió utilizar y metabolizar la glucosa en ausencia del sistema PTS [3].

**Metodología.** Se secuenció el genoma de las cepas JM101, PB11, PB12 y PB13 utilizando 3 metodologías distintas: Secuenciación comparativa y Secuenciación masiva empleando la tecnología de Illumina y Ion torrent PGM. Para la caracterización de los efectos de las mutaciones sobre el crecimiento y fisiología se realizaron varias inactivaciones de genes clave, así como análisis transcriptómicos, lipidómicos y proteómicos.

**Resultados.** Como resultado del proceso de evolución adaptativa, ambas cepas evolucionadas carecen de un fragmento cromosomal de 10,328 pb. donde residían 12 genes, cinco de los cuales (*galR*, *rppH*, *mutH*, *aas* y *lplT*) incidieron en consecuencias fisiológicas (Fig. 1).

La ausencia del gen *galR* permitió la ausencia de represión del gen *galP*, el cual codifica para la permeasa de galactosa, que en estas cepas es capaz de transportar la glucosa, lo que permitió la internalización del sustrato por esta vía. La ausencia del gen *rppH* permitió un incremento en los niveles de transcrito de la vía glicolítica, incluido el gen *glk*, lo que permitió una correcta fosforilación de la glucosa, así como un mejor metabolismo de ésta.

La ausencia del operón *aas-lplT*, ocasionó la pérdida del sistema de recambio de la fosfatidiletanolamina (PtdEtn), lo que propició la optimización del metabolismo mediante el empleo de la vía de degradación de fosfolípidos. La ausencia del gen *mutH*, ocasionó un incremento en la tasa de mutación de ambas cepas evolucionadas.

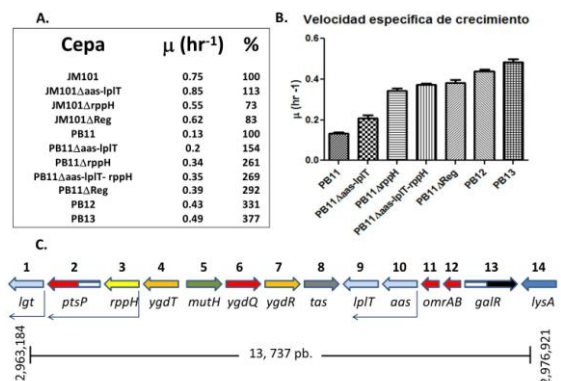


Fig. 1. A. Velocidades específicas de crecimiento en cepas derivadas de la JM101 y PB11 generadas en éste estudio. B. Gráfica comparativa de la recuperación del crecimiento en las diferentes cepas derivadas de la PB11. C. Esquema de los genes eliminados en las cepas evolucionadas después del proceso de evolución adaptativa.

**Conclusiones.** La ausencia del fragmento cromosomal en las cepas evolucionadas fue el principal evento adaptativo durante el proceso de evolución. Esto ocasionó una recuperación en la capacidad de transporte, fosforilación y el metabolismo de la glucosa en ausencia del sistema PTS, optimizando sistemas de transporte alternos, así como mecanismos de optimización del carbono. La afectación de uno de los principales sistemas de reparación de DNA en estas cepas ocasionó un incremento en su tasa de mutación, lo cual representa una ventaja en cuestiones evolutivas, pero una desventaja si se quieren emplear para propósitos de producción.

**Agradecimientos.**

CONAcYt, apoyo 105782; PAPIIT, apoyo IN205811.

**Bibliografía.**

- 1.- Flores, N et al. 2005. *Met Eng* 7:70-87.
- 2.- Flores, N et al. 2008. *J Mol Microbiol Biotechnol* 14: 176-92.
- 3.- Aguilar, C. et al. 2012 *BMC. Genomics* 13 (1):385.