



METABOLISMO GLUCONEOGENICO EN CEPAS DE *Escherichia coli* PTS⁻ Y PTS⁻GLC⁺.

Juan Carlos Sigala, Salvador Flores, Guillermo Gosset y Francisco Bolivar.

Instituto de Biotecnología, UNAM. Av. Universidad 2001, Col. Chamilpa, C.P. 62250, Cuernavaca, Mor.

Fax 56 22 76 01. E-mail: jcsigala@ibt.unam.mx

Palabras clave: Gluconeogénesis, PTS, RT-PCR.

Introducción. En nuestro laboratorio, a la cepa silvestre de *Escherichia coli* (*E. coli*) JM101 se le eliminó el operón *ptsHlcr* (1), que codifica para los componentes del sistema fosfotransferasa de transporte de carbohidratos (PTS) para generar la derivada PB11 (PTS⁻Glc⁻). JM101 crece en glucosa a una μ de 0.7 h⁻¹ mientras que PB11 lo hace a 0.1 h⁻¹. A partir de PB11 se generó la cepa PB12 (PTS⁻Glc⁺) que es una mutante espontánea que recupera parcialmente su crecimiento en glucosa (0.4 h⁻¹). En PB12 parte del PEP que no es consumido por PTS para transportar glucosa ha sido direccionado exitosamente hacia la vía de aminoácidos aromáticos, incrementando significativamente el rendimiento de fenilalanina (2). Como parte de la caracterización de estas tres cepas, se ha reportado que el nivel de expresión de los genes gluconeogénicos en las cepas PB11 y PB12 se encuentra elevado respecto al nivel que presentan en JM101, aún creciendo en glucosa como única fuente de carbono y que las derivadas PTS⁻ pueden metabolizar simultáneamente glucosa y acetato sin presentar la característica diauxia de la cepa silvestre (3). El objetivo de este trabajo es comparar el metabolismo gluconeogénico entre la cepa silvestre de *E. coli* JM101 y sus derivadas PTS⁻ Glc⁻ y PTS⁻Glc⁺ a través de un análisis de transcripción de los genes del metabolismo central y del efecto de la inactivación de los genes gluconeogénicos (*maeB*, *sfcA*, *pckA* y *ppsA*) en la capacidad de adaptación y crecimiento en acetato.

Metodología. Las cepas con las deleciones fueron crecidas en matraces klett bañados de 125 ml en medio mínimo M9 con acetato 2 g/l a 37°C y 300 rpm. Los cultivos para la extracción de RNA se realizaron en bioreactores de 1 l con un volumen de trabajo de 750 ml en medio mínimo M9 con acetato 2 g/l a 37°C, 600 rpm y un flujo de aire de 1 v.v.m; la muestra se colectó a una D.O. de 0.5. La extracción total de RNA se llevó a cabo con fenol caliente equilibrado en agua. El cDNA fue sintetizado empleando el kit RevertAidTM de Fermentas Inc. Las reacciones de RT-PCR se llevaron a cabo con el equipo ABI Prism 7000 de Applied Biosystems empleando SYBR Green. Para analizar los datos se usó el método de 2- $\Delta\Delta C_T$.

Resultados y discusión. En medio mínimo con acetato 2 g/L, JM101 tiene una μ de 0.28, PB11 de 0.22 y PB12 de 0.13. Es interesante que PB12, que fue adaptada a crecer en glucosa, crece a una velocidad baja en acetato. Se realizó un análisis comparativo de transcripción por RT-PCR de aproximadamente 50 genes del metabolismo central entre las tres cepas de estudio creciendo en medio mínimo con acetato. Entre los resultados más significativos se encontró

que en ambas derivadas PTS⁻ genes gluconeogénicos importantes como *yjcG*, *acs*, *glcB*, *maeB*, y *pckA* presentan un nivel de transcripción menor que la cepa silvestre. Por otra parte, prácticamente toda la vía glicolítica en PB12 se encuentra sobreexpresada en comparación con PB11 y JM101, cuyo perfil glicolítico entre estas dos últimas cepas es similar. La inactivación de *ppsA* perjudica seriamente a las derivadas PTS⁻ en cuanto a su adaptación al pasar de glucosa a acetato pues presentan una fase lag muy larga respecto a las cepas parentales. Las cepas JM101 *ppsA* y PB11 *ppsA* disminuyen significativamente su crecimiento en acetato. Por otro lado, en las tres cepas de estudio la inactivación simultánea de ambas enzimas málicas repercute de manera importante tanto en la adaptación al medio en acetato como en el crecimiento en medio mínimo con acetato. Sólo en el caso de la cepa PB11, las inactivaciones individuales de las enzimas málicas afectan el crecimiento en acetato pero sin afectar su fase de adaptación. La inactivación de *pckA* no repercute ni en el crecimiento ni en las fases lag en las tres cepas de estudio.

Conclusiones. Las cepas PTS⁻ presentan un crecimiento menor en acetato en parte porque genes gluconeogénicos como *yjcG*, *acs*, *glcB*, *maeB*, y *pckA* tienen una menor expresión respecto a JM101. Probablemente el bajo crecimiento en acetato es más drástico para PB12 porque los cambios que le permitieron crecer mejor en glucosa cuando fue evolucionada, le provocan tener un nivel de expresión elevado de la vía glicolítica respecto a JM101 aún creciendo en condiciones gluconeogénicas, lo cual implica un claro conflicto metabólico. Por otra parte, la principal ruta gluconeogénica para las tres cepas de estudio es vía enzimas málicas-PpsA y no a través de PckA.

Agradecimiento. A César Aguilar y a Mercedes Enzaldo (IBT, UNAM) por el apoyo técnico. JCSA recibe beca del CONACYT y de DGEP-UNAM.

Bibliografía.

1. Flores, S. *et al.* (2002) Analysis of carbon metabolism in *E. coli* strains with an inactive PTS by ¹³C labeling and NMR spectroscopy. *Metab. Eng.* **4**:124-137.
2. Baez, J.L. *et al.* (2004) Metabolic engineering and protein directed evolution increase the yield of L phenylalanine synthesized from glucose in *E. coli*. *Biotechnol. Bioeng.* **87**: 516-524.
3. Flores, N. *et al.* (2004) Adaptation for fast growth on glucose by differential expression of central carbon metabolism and gal regulon genes in an *E. coli* strain lacking PTS. *Metab Eng.* **7**(2):70-87.