

ANÁLISIS DE FLUJOS DE CARBONO MEDIANTE RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR DEL NODO DE FOSFOENOLPIRUVATO EN *Escherichia coli* SILVESTRE Y SUS DERIVADAS MODIFICADAS EN EL TRANSPORTE DE GLUCOSA

Salvador Flores, Albert de Graaf, Guillermo Gosset, Francisco Bolívar, Instituto de Biotecnología-UNAM, Av. Universidad 2001, col. Chamilpa, Cuernavaca, México. C.P. 62210, fax: (7) 317-2388, sflores@ibt.unam.mx

Palabras clave: RMN, metabolismo, fosfoenolpiruvato

Introducción: En nuestro laboratorio se han obtenido cepas de *Escherichia coli* mutadas en el principal sistema de transporte de glucosa (sistema PTS), capaces de usar glucosa como fuente de carbono (cepas PTS⁻Glc⁺) [1]. En estudios anteriores se demostró que las mutantes PTS⁻Glc⁺, utilizan el transportador de galactosa, GalP para internalizar la glucosa. Es probable que la ausencia del sistema PTS y el uso de GalP, que no requiere de fosfoenolpiruvato para fosforilar la glucosa, tengan como consecuencia variaciones en los flujos de carbono en las mutantes PTS⁻Glc⁺.

El marcaje isotópico de esqueletos de carbono y su análisis mediante resonancia magnética nuclear (RMN), permiten conocer el metabolismo central de carbono en diferentes sistemas biológicos [2]. La observación del acoplamiento de espín nuclear de ¹³C-¹³C en espectros de RMN de correlación ¹³C-¹H, (2D[¹³C,¹H]-COSY), permite identificar los patrones biosintéticos de marcaje de ¹³C.

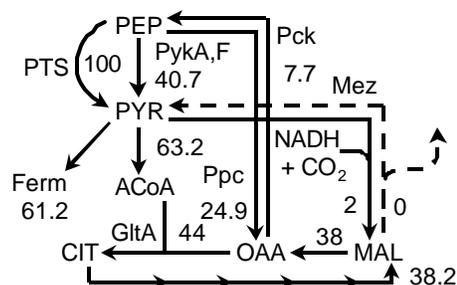
El objetivo del presente trabajo es aplicar la técnica de RMN para establecer la distribución del carbono en el metabolismo central de *Escherichia coli*, así como conocer el efecto de algunas modificaciones genéticas sobre la bacteria.

Metodología: Se realizaron fermentaciones en cultivo lote aerobio con un volumen de trabajo de 1 l en medio M9 suplementado con 1.8 g/l ¹³C-1-glucosa y 0.2 g/l ¹³C-6-glucosa iniciales, se cultivaron las células creciendo en fase logarítmica cuando alcanzaron DO_{600nm} = 1. La fracción soluble de la hidrólisis ácida de las células fue analizada por 2D[¹³C,¹H]-COSY-NMR en un aparato de RMN Bruker 400 MHz para ¹H. La concentración de cada especie isotópica fue extraída del espectro COSY-NMR.

Resultados y Discusión: Se observaron diferencias importantes de los flujos de carbono entre las cepas de estudio, la delección del sistema PTS provoca un aumento de aproximadamente el 100 % de flujo molar de PEP a través de las enzimas piruvato cinasas, el aumento de flujo corresponde aproximadamente al PEP que es utilizado por el sistema PTS en la cepa silvestre.

Otras reacciones metabólicas relacionadas con el PEP también fueron afectadas; en la cepa silvestre la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa (Pck), utiliza como sustrato PEP y produce oxaloacetato, de esta forma, una de sus funciones es la de compensar los esqueletos de carbono extraídos del ciclo de los ácidos tricarbóxicos (TCA), utilizados por el metabolismo celular, existe también un flujo en la dirección contraria por parte de la enzima PEP-carboxicinas (Pck), en la figura 1, se pueden observar los valores de flujo de carbono para estas enzimas en la cepa

silvestre. En las cepas PB12 y PB13, el flujo de carbono sobre la enzima Ppc se mantiene constante, en tanto que el flujo de carbono sobre la enzima Pck es prácticamente cero, demostrando así un aumento neto del carbono que se



alimenta a TCA a partir de PEP.

Fig. 1. Flujos de carbono determinados para las reacciones del metabolismo central que están relacionadas a PEP, los valores están dados en % de flujo molar tomando el transporte molar de glucosa = 100 %. Ferm = productos de fermentación.

En la cepa silvestre se observa que el flujo de carbono sobre la enzima málica (Mez) se dirige a la producción de malato a partir de piruvato, en las mutantes PTS⁻Glc⁺, este flujo se encuentra invertido, mostrando otra vía para producir piruvato a partir de intermediarios de TCA sin producir PEP, manteniendo así, el balance de los esqueletos de carbono relacionados a esta parte del metabolismo central.

Conclusiones: El análisis del marcaje isotópico permitió valorar los flujos de carbono en *Escherichia coli*, así como los resultados de las modificaciones en genes relacionados con el metabolismo central de carbono y transporte de glucosa. La mayor disponibilidad de PEP debida a la ausencia del sistema PTS tiene efectos específicos sobre el metabolismo central de carbono en *Escherichia coli*. En las cepas PTS⁻Glc⁺, reacciones que involucran PEP se modifican de forma que no es necesaria mayor síntesis de PEP por parte de la enzima Pck, como en el caso de la cepa silvestre, sin embargo, el balance de esqueletos de carbono en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos se mantiene modificando otras reacciones del metabolismo central, como la enzima málica.

Agradecimientos: El presente trabajo fue apoyado por el CONACyT, DGEP-UNAM y Fundación Telmex.

Bibliografía:

- Flores, N. Xiao, J. Berry, A. Bolivar, F. y Valle, F. (1996). Pathway engineering for the production of aromatic compounds in *Escherichia coli*. *Nat. Biotech.* 14:620-623.
- de Graaf, A. (2000). Use of ¹³C labelling and NMR spectroscopy in metabolic flux analysis. En: *NMR in Microbiology: Theory and Applications*. Barbotin, J. Horizon Scientific Press, UK. pp 97-126