

UCH-FC
Doc-BMCN
M 434
C-1



“Establecimiento de la homeostasis redox del NADPH en el metabolismo de *Escherichia coli*: participación de la rama no oxidativa de la vía de las pentosas fosfato.”

Tesis entregada a la Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al grado de
Doctor en Ciencias con Mención en Biología Molecular, Celular y
Neurociencias

Facultad De Ciencias
Universidad de Chile

Por

Luis Darío Matsuda Ángel

Junio de 2016
Santiago, Chile

Director de Tesis:
Dr. Ricardo Mauricio Cabrera Paucar
Co-Director de Tesis:
Dr. Juan Carlos Letelier Parga

**FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE
INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE DOCTORADO**

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato

Luis Darío Matsuda Ángel

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología Molecular, Celular y Neurociencias, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 14 de Marzo 2016

Director de Tesis

Dr. Ricardo Cabrera



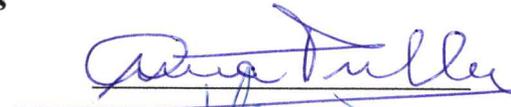
Co-Director de Tesis

Dr. Juan Carlos Letelier



Comisión de Evaluación de la Tesis

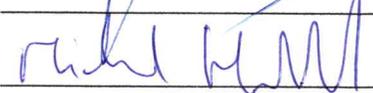
Dra. Ana Preller (Presidenta)



Dr. Jaime Eyzaguirre



Dr. Michael Handford



Dr. Nicolas Guiliani

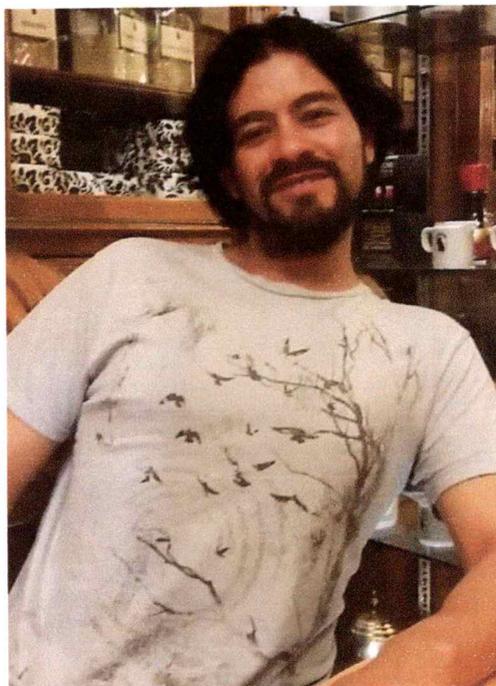


A mi mamá (Q.E.P.D.)

A mi papá

A l@s adoptad@s

A l@s optimist@s



Mi periplo por la vida comenzó en Santiago y tuvo diversas paradas durante mi niñez y adolescencia: Antofagasta, Chuquicamata, Iquique, Viña Marina, Valparaíso y de vuelta a Santiago. De todas esas vivencias rescato lo importante de la atención a cada momento y que cada experiencia de vida es única e irrepetible. En la Universidad de Chile encontré un lugar que me acogió y acompañó por más de una década. Durante mi pregrado me titulé de Ingeniero en Biotecnología Molecular, y continúe con un Doctorado en Ciencias mención Biología Molecular, Celular y Neurociencia. Debo a esta casa de estudio y los excelentes docentes que la componen, todo el apoyo para realizar numerosos viajes al extranjero (Argentina, Brasil y Estados Unidos), donde adquirí una sólida formación científica y profesional, impagable desde el punto de vista humano.

Agradecimientos

Agradezco el incansable apoyo de mi tutor Dr. Ricardo Cabrera a la realización de esta tesis. Su formación a través de los años, no solo académica, sino humana, ha posibilitado la realización de mi doctorado. Además, agradezco su perspicaz y aguda forma de ver los problemas científicos, la cual ha sido un ejemplo a seguir.

Agradezco a mi cotutor Dr. Juan Carlos Letelier, por acercarme al fascinante tema del metabolismo. Su dedicación, entusiasmo y perspicacia han sido una guía fundamental para desarrollar este trabajo.

Agradezco a mi familia por esperar siempre de mí lo mejor.

Agradezco a la familia que se forma en la vida: a mi amigo Pablo, el hermano que nunca tuve. A Macarena, mi compañera de vida, su aliento fue fundamental para concluir este trabajo. También agradezco a Leslie, Felipe, Fran, Matías, Manuel, Nené, Eli, Rod, Cinthya, Ceppi, David, Pancho, Tati, Marcelo, Carola, Manu, Mijo, Bruno, Kakin, Sergio y si me queda alguien en el tintero, pido disculpas. De todos ellos agradezco su apoyo y cariño, por estar en lo bueno y lo no tan bueno. Por todas las vivencias y conversaciones que me dejaron muchas enseñanzas. Lo que soy ahora se lo debo en gran parte a todos ellos.

Agradezco a todos mis compañeros de laboratorio por todos los momentos compartidos. Entre ellos, especialmente a Matías, Rodrigo, Diego, Karel, Erick, Pablo, JC y Eduardo.

Agradezco al Dr. Ka Yiu San, al Dr. Richard Garrat y al Dr. Álvaro Díaz por abrir las puertas de sus respectivos laboratorios, que significó una impagable formación profesional.

Finalmente, agradezco a los fondos de investigación de becas, estadías y proyectos que han sido decisivos en mi formación.

Financiamiento y actividades

Esta tesis fue desarrollada en el laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile (2010-2015) y en el laboratorio *Biochemistry and Cell Biology*, a cargo del Dr. Ka Yiu San, de la Universidad *Rice* en Houston, Texas (Abril-Agosto 2014). Además, se realizó una estadía corta en el laboratorio de Ingeniería Bioquímica de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso a cargo del Dr. Álvaro Díaz (Abril 2013). El trabajo y las estadías en el extranjero fueron financiados por los proyectos FONDECYT 11080290 y 1121170. Además, se contó con una beca para estudios de doctorado CONICYT 21090629.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. <i>Introducción</i>	1
1.1 Vías de producción de NADPH: importancia de la vía de las pentosas fosfato	3
1.2 Flujo a través de oxPPP y su efecto sobre la producción de NADPH en <i>E. coli</i>	8
1.3 Producción de NADPH dependiente de NADH: transhidrogenasa PntAB	15
1.4 Determinación de los flujos intracelulares	19
1.5 Hipótesis	24
1.6 Objetivos	25
1.6.1 Objetivo general	25
1.6.2 Objetivos específicos	25
2. <i>Materiales y Métodos</i>	27
2.1 Construcción de cepas	27
2.2 Condiciones de cultivo	28
2.2.1 Cultivos en modo <i>batch</i>	29
2.2.2 Cultivos en modo continuo	30
2.2.3 Concentración de metabolitos en el medio extracelular	31
2.3 Análisis por GCMS y obtención de los cocientes de flujos metabólicos	34
2.3.1 Preparación de muestra: hidrolisis y derivatización	34
2.3.2 Métodos de colección de datos del GCMS	35
2.3.3 Obtención de cocientes de flujo	37

2.3.4	Distribuciones de isotopómeros de aminoácidos proteogénicos y cálculos realizados por FiatFlux.....	39
2.4	Metodologías para el Análisis de Balance de Flujos	45
2.4.1	Cálculo del ATP de mantención	49
2.4.2	Incorporar los cocientes de flujo derivado de isotopómeros como restricción en el análisis de balance de flujos.....	50
2.4.3	Muestreo del espacio de soluciones usando Monte Carlo por cadenas de Markov	52
3.	<i>Resultados</i>	55
3.1	Construcción de cepas con alteraciones en la producción de NADPH.....	55
3.2	Determinación de los parámetros fisiológicos de cultivos en tasa de crecimiento máxima.	59
3.3	Condiciones para lograr el estado estacionario en el análisis de balance de flujos ocupando parámetros fisiológicos. Relevancia del ATP de mantención.	67
3.4	La disminución del consumo de glucosa como respuesta a la restricción en el flujo de carbono en noxPPP.....	73
3.5	Determinación de los parámetros fisiológicos de cultivos en tasa de crecimiento fija.	74
3.6	Obtención de los cocientes de flujo a partir del patrón de marcación isotópica de los aminoácidos proteogénicos	77
3.7	Distribuciones de flujos metabólicos mediante el uso de cocientes de flujo y muestreo con Monte Carlo por cadenas de Markov.	83
4.	<i>Discusión</i>	91

4.1	Determinación de la redistribución de flujos metabólicos en tasa de crecimiento fija y máxima.....	91
4.2	Sobre el estudio de los efectos en la partición de los flujos metabólicos asociados a cambios en la vías de producción de NADPH.....	93
4.3	Uso de los cocientes de flujo como restricciones y el ATP de mantención como función objetivo en <i>Flux Balance Analysis</i>	95
4.4	Impacto de la delección del gen <i>tktA</i> en la partición de los flujos metabólicos asociados a vías de producción de NADPH.....	98
4.5	Activación de la vía de Entner-Doudoroff en presencia de glucosa.....	102
4.6	Impacto en los parámetros fisiológicos en cultivos en <i>batch</i> frente a la restricción de flujo en noxPPP.....	104
5.	<i>Conclusiones</i>	111
6.	<i>Referencias</i>	113
7.	<i>Anexos</i>	120
7.1	Plásmidos y partidores ocupados en este estudio.....	120
7.2	Tasa de dilución y tasa de crecimiento en cultivos continuos.....	123
7.3	Curvas de calibración de glucosa y acetato para HPLC.....	125
7.4	Funciones y scripts de MatLab (R2013a) para uso en el toolbox Cobra.....	126
7.5	Origen metabólico del esqueleto carbonado de los aminoácidos.....	134

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Relación de los principales cofactores orgánicos con las vías catabólicas y anabólicas en el metabolismo heterotrófico	1
Figura 2	Partición de flujo en metabolitos de la vías centrales de <i>E. coli</i> donde una de las ramas está asociada a la producción de NADPH	4
Figura 3	Requerimientos de metabolitos para generar un gramo de biomasa en <i>E. coli</i>	5
Figura 4	Mapa metabólico de las vías centrales de <i>E. coli</i>	7
Figura 5	Cocientes de flujo determinados experimentalmente para las cepas de <i>E. coli</i> generadas.	38
Figura 6	Fragmentos de aminoácidos detectados en GC-MS.	40
Figura 7	El vector de distribución de masa para el fragmento M-57 de la alanina.	41
Figura 8	Representación del origen del esqueleto carbonado de la isoleucina con respecto a los metabolitos intermediarios piruvato y oxaloacetato	43
Figura 9	Determinación de los flujos metabólicos mediante distintos métodos de simulación	54
Figura 10	Verificación de la construcción de las cepas mediante secuenciación	57
Figura 11	Curva de crecimiento de la cepa silvestre en modo <i>batch</i>	60
Figura 12	Efecto en la tasa de crecimiento de la delección del gen <i>tktA</i> sobre distintos contextos genéticos.	61
Figura 13	Efecto en la tasa de consumo de glucosa de la delección del gen <i>tktA</i> sobre distintos contextos genéticos.	62
Figura 14	Tasa de producción de acetato en cultivo por <i>batch</i>	64
Figura 15	Simulación de la variación de la partición en el metabolito G6P y consumo mínimo de glucosa predicho por el modelo cuando se varía el flujo de las reacciones de transcetolación.	73

Figura 16	Curva de crecimiento de la cepa silvestre en modo continuo	76
Figura 17	Origen de los intermediarios metabólicos en las cepas de <i>E. coli</i> estudiadas.	79
Figura 18	Histogramas del flujo de la reacción ICDH en la cepa silvestre mediante el método Monte Carlo por cadenas de Markov.	84
Figura 19	Histogramas de los flujos metabólicos de las reacciones del metabolismo central de la cepa silvestre de <i>E. coli</i> generada mediante el método Monte Carlo por cadenas de Markov.	87
Figura 20	Distribución de flujos de carbono en el metabolismo central de <i>E. coli</i> durante crecimiento en cultivos continuos $0,2 \text{ h}^{-1}$	88
Figura 21	Valores del precio sombra para el metabolito E4P cuando se varía el flujo de las reacciones de transcetolación en noxPPP	105

LISTA DE ABREVIATURAS

PPP	Vía de las pentosas fosfato
oxPPP	Rama oxidativa de la vía de las pentosas fosfato
noxPPP	Rama no oxidativa de la vía de las pentosas fosfato
EDD	Vía de Entner-Doudoroff
NADHox	NADH oxidasa
NAD	Nicotinamida adenina dinucleótido oxidado
NADP	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidado
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido reducido
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
MCMC	Monte Carlo por cadenas de Markov
P5P	Pentosas Fosfato
6PG	6-fosfogluconato
6PGDH	6-fosfogluconato deshidrogenasa
COBRA	Toolbox de MatLab para el análisis de balance de flujos
E4P	Eritrosa 4-fosfato
F6P	Fructosa 6-fosfato
G6P	Glucosa 6-fosfato
G6PDH	Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa
GAP	Gliceraldehído 3-fosfato
GC	Cromatografía de gases
Gliox	Glioxilato
<i>gnd</i>	Gen que codifica la 6-fosfogluconato deshidrogenasa
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
<i>icd</i>	Gen que codifica la isocitrato deshidrogenasa
ICDH	Isocitrato deshidrogenasa
ICT	Isocitrato
KDPG	6-fosfo-2-deshidro-3-desoxi-D-gluconato
MaeB	Enzima málica NADP-dependiente
MAL	Malato
MS	Espectroscopia de masas
OAA	Oxalacetato

OGA	2-Oxoglutarato
P5P	Pentosas 5-fosfato
PEP	Fosfoenolpiruvato
PIR	Piruvato
<i>pntA</i>	Gen que codifica la subunidad α de la transhidrogenasa de membrana
PntAB	Transhidrogenasa de membrana
<i>pntB</i>	Gen que codifica la subunidad β de la transhidrogenasa de membrana
R5P	Ribosa 5-fosfato
S7P	Sedoheptulosa 7-fosfato
SUCC	Succinato
$Y_{x/s}$	Rendimiento de biomasa por sustrato
<i>zwf</i>	Gen que codifica la Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Cepas con alteraciones metabólicas y sus principales características genéticas	56
Tabla 2	Parámetros fisiológicos de la cepa silvestre y las cepas mutantes	66
Tabla 3	Comparación de las tasas de consumo mínimo predichas de glucosa según distintos modelos y datos experimentales	70
Tabla 4	Obtención del Cociente de flujo serina a través de glicolisis para la cepa silvestre	78
Tabla 5	Simulaciones en la cepa silvestre con el modelo iJO1366 optimizando tres funciones objetivo con los datos experimentales de los cultivos continuos	82
Tabla 6	Porcentaje de partición de bifurcaciones asociada a la producción de NADPH en <i>E. coli</i> .	89

Resumen

En todos los organismos el NADPH sirve como equivalente de reducción en numerosas reacciones, particularmente en la generación de biomasa. En organismos heterótrofos como *Escherichia coli*, el NADPH es producido por deshidrogenasas en las vías centrales, principalmente en la vía de las pentosas fosfato (PPP), así como por la transhidrogenasa de membrana PntAB. En este trabajo se generaron cepas de *E. coli* con alteraciones en la producción de NADPH a nivel de estas vías.

Con el objetivo de reducir el flujo a través de la rama oxidativa de PPP, generamos la cepa $\Delta tktA$, que carece de una de las isoenzimas transcetolasa de la rama no oxidativa de PPP. Además, se generaron las cepas $\Delta pntAB$, doble mutante $\Delta tktA \Delta pntAB$ y se expresó de manera episomal el gen de la NADH oxidasa en la cepa $\Delta tktA$. En el último caso, se espera disminuir la disponibilidad de NADH intracelular, sustrato de PntAB. Nuestro objetivo principal es cuantificar la redistribución de flujo metabólico en las particiones asociadas a la producción de NADPH, luego de disminuir el flujo de carbono por la rama no oxidativa de PPP.

En condiciones de crecimiento máximo (cultivo batch) la mayor alteración fisiológica, fueron las tasas de producción de acetato con respecto a la cepa silvestre. Los parámetros fisiológicos obtenidos se usaron en simulaciones de Análisis de Balance de Flujos (FBA, siglas en inglés), concluyéndose que con el uso del ATP de mantención como función objetivo, se logra una mejor aproximación de los datos experimentales. Además, se midieron los flujos metabólicos intracelulares en tasa de crecimiento fija (cultivo continuo a 0,2 h⁻¹) usando el análisis de isotopómeros de ¹³C en aminoácidos proteogénicos mediante GC-MS. Se calcularon 4 cocientes de flujo mediante el programa FiatFlux (Fischer y Sauer 2003), que fueron incorporados directamente como restricciones en la matriz estequiométrica, mediante el método FBrAtio (Choi y col. 2007; McAnulty y col. 2012). Se realizó un muestreo del espacio de soluciones mediante el algoritmo Monte Carlo por cadenas de Markov (Haverkorn, 2012). Se destaca como novedosa la combinación estas metodologías para obtener distribuciones de flujos metabólicos.

La respuesta principal en la cepa $\Delta tktA$ es una disminución en el flujo de carbono en la reacción 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH) de la rama oxidativa de PPP junto a una activación significativa del flujo a través de la vía

Entner-Doudoroff, de 7% a 25% del flujo de entrada de glucosa. Además, se observa que la principal respuesta compensatoria es la producción de NADPH por la transhidrogenasa PntAB. Sin embargo, en ausencia de PntAB o cuando se disminuye la disponibilidad de su sustrato NADH, la compensación de la producción de NADPH es a nivel de ICDH.

Abstract

In all living organisms NADPH serves as a reduction equivalent in numerous reactions, particularly in the generation of biomass. In heterotrophic organisms as *Escherichia coli*, NADPH is produced by dehydrogenases at the central pathways, primarily the pentose phosphate pathway (PPP) and the membrane-bound transhydrogenase PntAB. In this work we generated *E. coli* strains with impaired NADPH production at these sources.

With the aim to reduce the flux in the oxidative branch of PPP, we generated the strain $\Delta tktA$, which lacks one of the transketolase isoenzymes participating in reactions of the non-oxidative branch of PPP. Also, the strains $\Delta pntAB$, the double knockout $\Delta tktA \Delta pntAB$, and the $\Delta tktA$ expressing episomally the NADH oxidase gene ($\Delta tktA$ NADHox strain), were generated. In the last case, we expected to reduce the availability of intracellular NADH, substrate of PntAB. The main goal, is to quantified the effect in all the NADPH producing branch points upon diminishing the carbon flux through the non oxidative branch of the PPP.

Under batch conditions, the comparison between the $\Delta tktA$ with the wild type strain shows that the mayor physiological alteration was the acetate

production rate. The physiological parameters obtained were utilized for Flux Balance Analysis (FBA), concluding that the better approximation of the experimental data is achieved using the ATP maintenance as objective function. Furthermore, intracellular metabolic fluxes were measured at a fixed growth rate (0.2 h⁻¹), using GC-MS analysis of the ¹³C isotopomers from the proteogenic aminoacids. We calculated four flux ratios by using FiatFlux (Fischer and Sauer 2003), which were directly incorporated in the stoichiometric matrix using the FBrAtio method (Choi et al 2007; McAnulty et al 2012). Sampling of the solution space was performed using the Monte Carlo algorithm with Markov chains (Haverkorn, 2012). It is emphasized the novelty of the combination of both methodologies to obtain metabolic flux distributions.

The primary response we observed in the strain $\Delta tktA$ is a decrease in the carbon flux of the 6-phosphogluconate dehydrogenase reaction (6PGDH) of the oxidative branch of the PPP, along with a significant activation of the Entner-Doudoroff pathway (ED), from 7% to 25% of the glucose uptake. In addition, the main compensatory response is the production of NADPH by the transhydrogenase PntAB. However, when PntAB is absent or NADH substrate

availability is decreased, we observed that the compensation of the NADPH production occurs in the reaction ICDH.

1. Introducción

En *Escherichia coli*, la generación de NADPH y NADH ocurre en diferentes vías del metabolismo central, debido a las especificidades o preferencias que presentan las deshidrogenasas por estos NAD y NADP, respectivamente (figura 1).

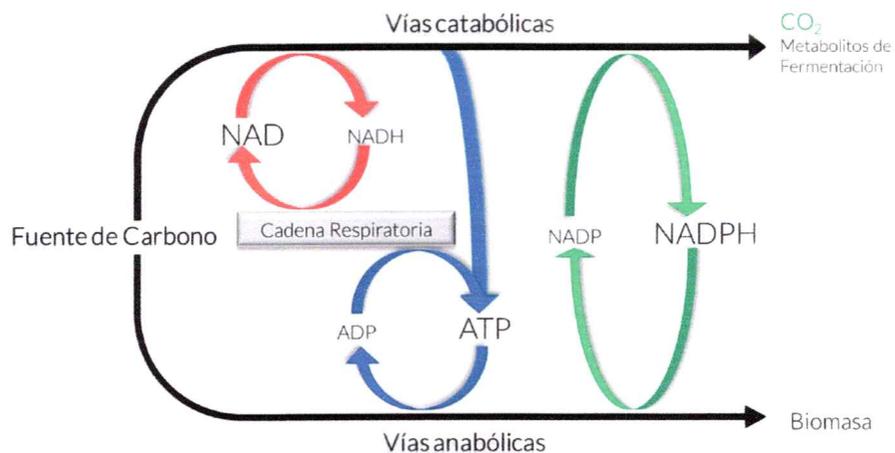


Figura 1. Relación de los principales cofactores orgánicos con las vías catabólicas y anabólicas en el metabolismo heterotrófico. Para cada cofactor el tamaño de letra se relaciona con su concentración intracelular.

Los átomos de carbono pueden fluir a través de vías catabólicas para la producción de energía y poder reductor, o a través del anabolismo para la generación de precursores de la biosíntesis. NAD(H) participa exclusivamente en las primeras, relacionándose con el anabolismo a través de la cadena respiratoria. Mientras que la energía liberada por la hidrólisis del ATP hace posible el

anabolismo, formándose desde la cadena respiratoria y/o el catabolismo (fosforilación a nivel de sustrato). Finalmente, NADP(H) es el cofactor redox que relaciona de manera directa la transferencia de electrones desde el catabolismo al anabolismo (figura 1).

A pesar de que NADH y NADPH son moléculas muy similares y poseen el mismo potencial estándar de oxidación-reducción, éstas cumplen funciones diferentes. NADH está relacionada con la generación de energía, al transferir equivalentes de reducción a la cadena transportadora de electrones, para la producción de ATP, y también con procesos de fermentación. Mientras que NADPH participa en las reacciones de biosíntesis, lo que lo hace un cofactor que vincula el catabolismo con el anabolismo (Fuhrer y Sauer 2009), y además, participa en la defensa antioxidante (Giró y col. 2006). Dichas funciones son posibles porque en la célula las concentraciones de estado estacionario de las especies oxidada y reducida de estos cofactores se encuentran desplazado del equilibrio químico, permitiendo que NAD acepte electrones desde las vías catabólicas y NADPH done electrones a las anabólicas.

Los electrones provenientes de NADH pueden salir del sistema (a través del aceptor final en la respiración, o de los metabolitos de fermentación), mientras que

en el caso de NADPH, los electrones permanecen en la célula, formando parte de la biomasa (aminoácidos, nucleótidos, etc.) (figura 1).

1.1 Vías de producción de NADPH: importancia de la vía de las pentosas fosfato

El sistema de producción de NADPH en *E. coli* en las vías metabólicas centrales, está dado por: las dos deshidrogenasas de la rama oxidativa de la vía de las pentosas fosfato (oxPPP), glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) y 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH); la isocitrato deshidrogenasa (ICDH) ubicada en el ciclo de Krebs y la enzima málica NADP-dependiente que es parte de las reacciones anapleróticas de este ciclo.

Una mirada cuidadosa en la arquitectura de las vías centrales de *E. coli*, nos muestra que todas las deshidrogenasas productoras de NADPH comparten la característica de estar ubicadas en una de las ramas de bifurcaciones de las vías metabólicas (figura 2). Por lo cual, en la célula el porcentaje de partición de flujo de carbono en esas bifurcaciones, determina la cantidad de NADPH con que una deshidrogenasa particular está contribuyendo al *pool* total. Cuando se usa glucosa como única fuente de carbono y la tasa de crecimiento es máxima (μ_{max}), las principales contribuyentes son la G6PDH y 6PGDH (oxPPP) que producen entre

un 35%-45% y la ICDH con un 20%-25% (Sauer y col. 2004). Por otro lado, *E. coli* posee la transhidrogenasa PntAB, que transfiere directamente los equivalentes de reducción desde NADH a NADPH contribuye con el porcentaje restante. Así, tomando en su conjunto las reacciones de producción de NADPH, podemos distinguir aquellas asociadas directamente al flujo de carbono (deshidrogenasas) y la no asociada (transhidrogenasa).

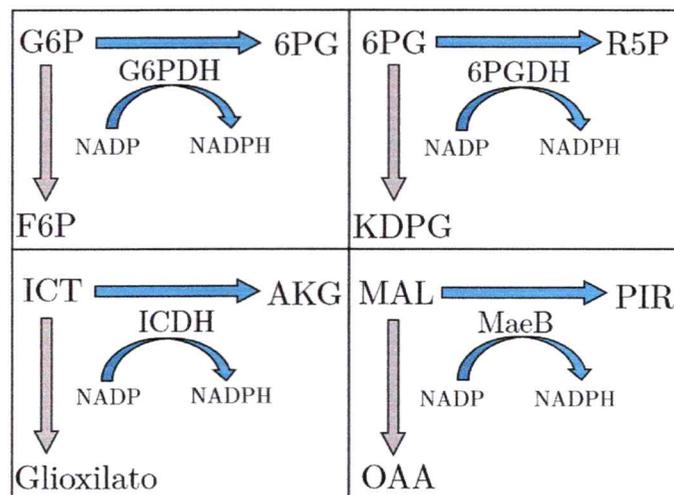


Figura 2. Partición de flujo en metabolitos de las vías centrales de *E. coli* donde una de las ramas está asociada a la producción de NADPH. Glucosa 6-fosfato (G6P); fructosa 6-fosfato (F6P); 6-fosfogluconato (6PG); 2-dehidro 3-deoxi 6-fosfato gluconato (KDPG); Ribosa 5-fosfato (R5P); Isocitrato (ICT); α -cetoglutarato (AKG); malato (MAL); oxaloacetato (OAA); Piruvato (PIR); Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH); 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH); Isocitrato deshidrogenasa (ICDH); Enzima málica NADP dependiente (MaeB).

La red metabólica, además de poder reductor, produce diversos intermediarios que son ocupados para la generación de biomasa. Estos son

producidos a nivel de las vías centrales en las tasas requeridas para la demanda anabólica. Se sabe específicamente cuanto de cada uno de estos intermediarios se necesita para producir un gramo de biomasa en *E. coli* (figura 3).

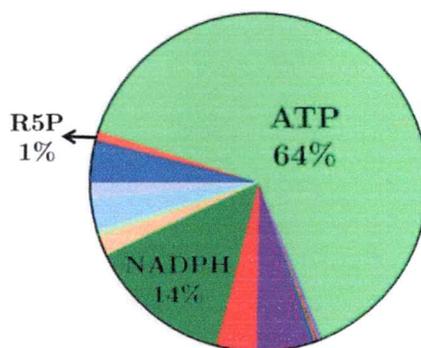


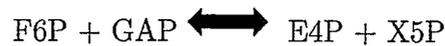
Figura 3. Requerimientos porcentuales de los 15 intermediarios metabólicos para generar un gramo de biomasa en *E. coli* (Ingraham y col. 1983) de acuerdo con el modelo iAF1260, indicados en distintos colores. Ver anexo figura S5.

La productividad de oxPPP, está dada por la generación de NADPH y de ribosa 5-fosfato¹ (R5P). Sin embargo, el requerimiento porcentual de NADPH para generar biomasa en *E. coli* es de un 14%, siendo el segundo metabolito más demandado, luego del ATP. En cambio, para R5P es alrededor de 1% (figura 3). Se ha reportado que la cantidad procesada de glucosa por oxPPP siempre es arriba de un 20% del total de glucosa consumida (Leighty y Antoniewicz 2013; Chen y col. 2011; Sauer y col. 2004), se deduce que la magnitud del flujo a través de oxPPP es muy superior a los requerimientos de R5P. En otras palabras, existe un

¹ precursor de nucleótidos de piridina y purinas

exceso relativo de R5P con respecto a la demanda anabólica. En un contexto de estado estacionario como no existe acumulación de metabolitos, la producción de biomasa consume la cantidad necesaria del intermediario R5P y el resto es transformado en metabolitos de la vía glicolítica a través de la rama no oxidativa de PPP (noxPPP).

Las reacciones que componen la vía noxPPP tienen la característica de ser reversibles² y producir intermediarios necesarios para la biosíntesis: eritrosa 4-fosfato (E4P) y sedoheptulosa-7-fosfato (S7P) (figura 4), el primero es precursor de los aminoácidos aromáticos y el segundo es usado como intermediario de la producción de lipopolisacáridos (Valvano y col. 2002). La reacción transcetolasa (EC 2.2.1.1) cataliza la transferencia de un fragmento de 2 carbonos desde un dador cetona hacia un aceptor aldosa y viceversa, la cual está presente en dos reacciones de noxPPP:



² Esta característica de las enzimas transcetolasas y transaldolasas, permite la viabilidad de cepas que carecen del gen *zwf* (codifica la primera enzima de oxPPP, G6PDH) o *gnd* (codifica la segunda enzima de oxPPP, 6PGDH). En otras palabras, permite que el flujo a través de oxPPP sea cero y la célula pueda producir R5P.

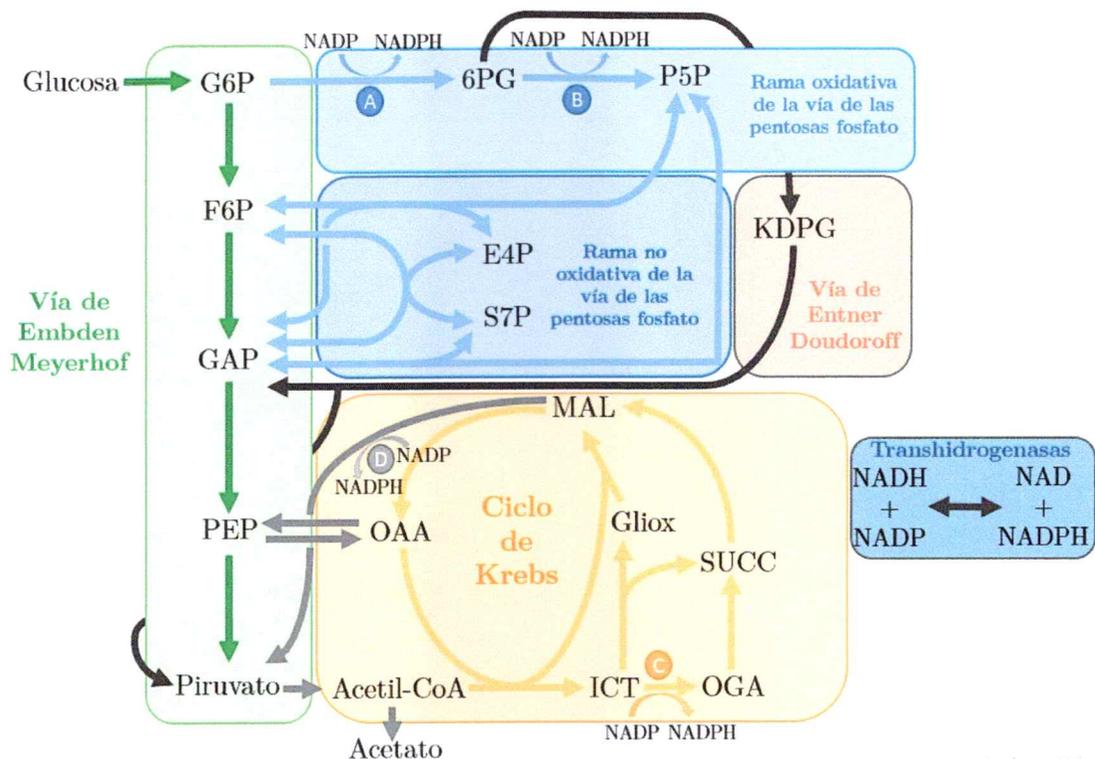


Figura 4. Mapa metabólico de las vías centrales de *E. coli*³. Los distintos colores representan las vías presentes, en verde la glicolisis, en azul la vía de las pentosas fosfato, en naranja la vía de Entner Doudoroff y en amarillo el ciclo de Krebs. En azul oscuro se representa las reacciones de las transhidrogenasas PntAB y UdhA. Con las letras A hasta D se muestran las enzimas que producen NADPH. A. glucosa 6-fosfato deshidrogenasa; B. 6-fosfogluconato deshidrogenasa; C. isocitrato deshidrogenasa; D. enzima málica NADP dependiente. G6P, glucosa 6-fosfato; F6P, fructosa 6-fosfato; GAP, gliceraldehído 3-fosfato; PEP, fosfoenolpiruvato; OAA, oxaloacetato; 6PG, 6-Fosfogluconato; P5P, pentosas 5-fosfato; E4P, eritrosa 4-fosfato; S7P, sedoheptulosa 7 fosfato; KDPG, 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato; MAL, Malato; Gliox, glioxilato; SUCC, succinato; OGA, alfa-cetoglutarato.

En *E. coli* estas reacciones están catalizadas por dos isoenzimas TktA y TktB, de las cuales la TktA contribuye entre un 70%-90% de la actividad total transcetolasa (Iida y col. 1993; Josephson y Fraenkel 1974). Es importante notar

³ Las abreviaturas fueron extraídas desde el sitio web <http://ecocyc.org/>

que la cepa doble mutante para los genes *tktA* y *tktB* es auxótrofa para compuestos aromáticos, por la incapacidad de la célula de producir el intermediario E4P (Zhao y Winkler, 1994). Sin embargo, en estudios del mutante del gen *tktA*, se observa la actividad transcetolasa dada por el gen *tktB*, es suficiente para evitar la auxotrofia (Josephson y Fraenkel 1969).

1.2 Flujo a través de oxPPP y su efecto sobre la producción de NADPH en *E. coli*.

Cuando la glucosa es la fuente de carbono la partición de flujo en el metabolito G6P es muy importante ya que afecta el balance entre producción y consumo de NADPH con consecuencias directas sobre el crecimiento. Un caso extremo ocurre cuando G6P es procesada en su totalidad a través de oxPPP catalizada por las enzimas G6PDH y 6PGDH debido a la eliminación del gen *pgi* (que codifica para la enzima fosfoglucosa isomerasa). Esto resulta en la producción de 2 moles de NADPH por mol de glucosa consumida. Esto conduce a un desbalance con respecto de lo que se necesita para generar biomasa. Se identificó que este desbalance de NADPH sería el responsable de disminuir en casi un 80% la tasa de crecimiento de esta cepa (Canonaco y col. 2001).

Si a la cepa Δpgi se le añade la mutación $\Delta udhA$ (transhidrogenasa soluble, que interconvierte NADPH a NADH), la cepa doble mutante es inviable cuando la glucosa es la única fuente de carbono. Por el contrario, si se añade a la cepa Δpgi la sobreexpresión de la enzima UdhA se mejora la tasa de crecimiento desde $0,22 \text{ h}^{-1}$ hasta $0,27 \text{ h}^{-1}$ (Canonaco y col. 2001). El alivio de la sobrecarga de NADPH también ha sido observado en una cepa de *E. coli* ($\Delta udhA$, Δpgi , Δqor^t , Δedd). Esta cepa exhibió originalmente una muy baja tasa de crecimiento ($0,04 \text{ h}^{-1}$) y de consumo de glucosa ($0,9 \text{ mmol} \cdot \text{peso seco g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) comparado con la cepa silvestre, pero fue sometida a evolución en el laboratorio, seleccionando aquellas mutantes que restablecen la tasa de crecimiento y el consumo de glucosa. Interesantemente, al secuenciar el genoma de la cepa evolucionada, se observó el reemplazo E183A en la enzima de NuoF⁵, que se vuelve capaz de ocupar tanto NADH y NADPH como donantes de electrones para la síntesis de ATP (Auriol y col. 2011). En otras palabras, esta cepa es capaz de respirar NADPH.

Finalmente, en nuestro laboratorio, hemos observado una recuperación de un 60% de la tasa de crecimiento en la cepa Δpgi al expresar una G6PDH

⁴ Quinona oxidoreductasa

⁵ NuoF es el fragmento soluble de la enzima NADH deshidrogenasa, que cumple la función de entrada de los electrones a la enzima. En la cepa silvestre de *E. coli* es NADH específica.

productora de NADH, en lugar de la enzima nativa productora de NADPH (Olavarria y col. 2014).

En conclusión, estas evidencias muestran que si la célula presenta un exceso de NADPH se verá reflejado en un detrimento en el crecimiento máximo de *E. coli*, ya que su único sumidero es la generación de biomasa.

Por otra parte, se ha estudiado el efecto de los niveles de expresión de la enzima G6PDH sobre el flujo de carbono a través de la oxPPP mostrando un bajo control de flujo. Se observa que el flujo de carbono aumenta solo un 40% en una cepa que sobre-expresa 10 veces G6PDH (Orthner y Pizer 1974). En otro estudio, se observó que sobre-expresando poco más de 15 veces G6PDH conlleva a sólo un 12% de aumento en el flujo por la PPP (Nicolas y col. 2007). Por lo tanto, en cultivos en *batch* y con glucosa como única fuente de carbono estas perturbaciones no afectan mayoritariamente la partición en el nodo G6P y tampoco la tasa de crecimiento máxima comparado con la cepa silvestre. Sin embargo, la enzima G6PDH si tiene un rol en situaciones relacionadas con una alta demanda por el cofactor NADPH. Por ejemplo, su expresión aumenta aproximadamente unas 10 veces cuando la célula está sometida a estrés oxidativo (Fawcett y Wolf 1995; Giró y col. 2006). Además se sabe que su expresión cambia a distintas tasas de

crecimiento y por la fuente de carbono ocupada (Rowley y col. 1991; Farrish y col. 1982).

La eliminación del gen *zwf*, que codifica para la enzima G6PDH, no es letal para la bacteria y aún más, no se observan cambios importantes en la tasa de crecimiento máxima con glucosa como única fuente de carbono (Fraenkel, 1968; Zhao y col. 2004; Nicolas y col. 2007). En la publicación de Sauer del año 2004, se estudió la cepa $\Delta zwf/\Delta(edd/eda)$ ⁶, la cual presenta un detrimento en su tasa de crecimiento respecto de la cepa silvestre, desde $0,67h^{-1}$ a $0,52h^{-1}$ (Sauer y col. 2004), disminuyendo en aproximadamente un 20%. Mediante experimentos de ¹³C (ver sección métodos 2.3) se observa una redistribución de flujos a nivel de las vías centrales como respuesta a la eliminación del flujo de carbono y la producción de NADPH a través de oxPPP. En esta cepa el flujo a través de noxPPP ocurre en la dirección de producción de los metabolitos E4P y R5P, supliendo la ausencia de abastecimiento por la rama oxidativa. Por otra parte, se observa un incremento en el flujo a través de la ICDH en el ciclo de Krebs, como respuesta del sistema para lograr abastecer de NADPH el consumo anabólico⁷ (Zhao y col. 2004).

⁶ *edd* y *eda* son los genes que codifican para las enzimas de la vía de Entner-Doudoroff.

⁷ En un apartado posterior se verá la participación de la transhidrogenasas en esta respuesta.

Se ha estudiado también, el efecto fisiológico de eliminar el gen de la segunda enzima de oxPPP, *gnd*, que codifica para la enzima 6PGDH, mediante experimentos de ^{13}C . Se hace notar que la cepa ocupada en este estudio es BW25113, presenta una partición del flujo por G6P de 80% hacia glicolisis y 20% hacia oxPPP. Lo primero que se observa en esta mutante, es que el porcentaje de flujo en G6PDH baja hasta un 10%. Lo que podría implicar una cierta dependencia entre ambas enzimas productoras de NADPH en oxPPP. De hecho, cuando se mide los flujos intracelulares en oxPPP en distintos contextos genéticos, ambas enzimas, G6PDH y 6PGDH, tienden a aumentar o disminuir en forma conjunta (Holm y col., 2010; Martínez y col., 2008; Zhao y col., 2004). Por otro lado, la principal respuesta que nos parece interesante destacar, fue que en esta mutante se abrió el flujo a través de la vía Entner-Doudoroff⁸ desde cero hasta un 10%, comparando con respecto a la cepa silvestre (Jiao y col. 2003). Esta activación es interesante de destacar, ya que parte de los resultados de este trabajo tienen que ver con el aumento de flujo a través de esta vía.

La vía de Entner-Doudoroff (ED) es considerada como la vía más antigua del catabolismo de azúcares, está distribuida ampliamente en el árbol filogenético,

⁸ A pesar de que el sustrato utilizado es glucosa como única fuente de carbono.

incluyendo arqueas (Conway 1992; Romano y Conway 1996). Sin embargo, los modelos actuales y más estudiados, asociados a microorganismos industriales (por ejemplo, *S. cerevisiae*, *B. subtilis*, *C. glutamicum*) carecen de esta vía metabólica. Aún más, en *E. coli* se considera principalmente que permite el crecimiento en gluconato (Eisenberg y Dobrogosz 1967) y generalmente es omitida en los modelos de las vías centrales, ya que se ha observado que permanece inactiva en crecimiento en glucosa como única fuente de carbono (San y col. 2002; Zhao y col. 2004).

En síntesis, como con Δpgi , la forma de estudio de las redes metabólicas generalmente ha sido eliminando los genes y observando las consecuencias fisiológicas que esto representa para la célula. Sin embargo, esta aproximación cuando se aplica en una bifurcación del flujo de carbono, lo que se genera en términos estrictos, es que el flujo sea un 100% a través de la vía metabólica que sigue activa (en otras palabras, linealiza el flujo). Por lo cual, se desprende que no es posible observar el efecto de distintas particiones del flujo de carbono aplicando esta aproximación experimental. Entonces, con el propósito de disminuir la contribución de oxPPP al *pool* de NADPH sería posible hacerlo a través de la disminución de la velocidad de noxPPP. Se usó como estrategia la eliminación de



una de las isoenzimas que son responsables de las reacciones de transcetolación en noxPPP, el gen *tktA*. Por lo mencionado en párrafos anteriores, se asume que una restricción al flujo en noxPPP, afectará directamente la magnitud del flujo en oxPPP. En estas condiciones se espera una redistribución de flujos metabólicos, particularmente en las bifurcaciones mostradas en la figura 2, Figura en función de mantener el balance de NADPH en *E. coli*.

En otras palabras, este trabajo propone disminuir el aporte de NADPH a través de oxPPP, restringiendo el flujo, sin llevarlo a cero, y observar que puntos de producción de NADPH se activan de manera compensatoria frente a este contexto fisiológico. En este punto es conveniente ahondar en el concepto de *compensación*. Se realizaron cultivos continuos, que tienen como objetivo principal mantener constante la demanda anabólica del NADPH y los metabolitos intermediarios, consecuencia de mantener una velocidad fija de crecimiento. En esta condición particular, es donde se puede afirmar que un punto de producción es *compensado* por otro y que los cambios que ocurren en cada uno de los contribuyentes al *pool* suceden por efecto de la restricción impuesta y no se debe a cambios en la demanda anabólica. Se hace hincapié que, en la mayoría de los casos, las cepas con modificaciones genéticas sufren un detrimento en su capacidad

de crecer, cambiando sus requerimientos por intermediarios, y aún más, este cambio va aparejado con una variación en el consumo de la fuente de carbono.

1.3 Producción de NADPH dependiente de NADH: transhidrogenasa PntAB

En *E. coli* existen dos transhidrogenasas: PntAB y UdhA. PntAB es una enzima que está codificada por dos genes: *pntA* y *pntB*, está asociada a membrana y transfiere el equivalente de reducción del NADH hacia el NADP de manera acoplada a la disipación del gradiente de protones. Al contrario, UdhA es una transhidrogenasa soluble que toma el hidruro del NADPH y lo transfiere al NAD lo que ocurre independiente del gradiente de protones. Las enterobacterias son la única excepción conocida que contiene ambas transhidrogenasas: PntAB (Clarke y col. 1986) y UdhA (Boonstra y col. 1999), los demás microorganismos tienen una u la otra.

Las transhidrogenasas en *E. coli* responden de forma diferencial, en términos de patrones de expresión, dependiendo del estado redox de la célula (Sauer y col. 2004). Concomitante con el aumento de NADPH en la cepa Δpgi se observó una reducción en la expresión de PntAB. Por otro lado, cuando se hace crecer en glicerol como única fuente de carbono, donde se ha visto que existe una

disminución en la producción de NADPH, se observa una transcripción más baja de UdhA. Adicionalmente, se ha visto que ambas transhidrogenasas son reguladas de manera opuesta. Por ejemplo, el factor de transcripción Lrp activa la transcripción de pntAB y reprime la de udhA. Bajo la misma lógica actúa el factor de transcripción Crp, activando a udhA, pero reprimiendo a pntAB (Haverkorn, 2012). Así, la acción de estas transhidrogenasas estaría segregada según el contexto metabólico, estando activa una y reprimida la otra, ante determinadas condiciones de crecimiento. Más aún, para la enzima homóloga a UdhA de *Pseudomonas aeruginosa* se vio una activación alostérica por NADPH y una inactivación mediante NADP (Widmer y Kaplan 1977). Esto podría sugerir un mecanismo de control para ambas transhidrogenasas dependiente del NADP(H) (Sauer y col. 2004).

En relación con la magnitud del aporte de las transhidrogenasas al *pool* de NADPH y NADH, existen reportes contradictorios⁹. Por un lado, se ha observado que existe un aporte de la transhidrogenasa PntAB es de un 35-45%, cuando se usa glucosa como única fuente de carbono en modo de crecimiento *batch* (Sauer y col. 2004). Por otro lado, el grupo de Vemuri, en estas mismas condiciones

⁹ Ambas publicaciones ocupan la misma cepa silvestre K-12 MG1655 y realizan los cultivos por lotes en condiciones similares.

fisiológicas, muestra que no existe aporte de PntAB, y más bien la transhidrogenasa UdhA consumiría NADPH en un 7% (con respecto al consumo de glucosa), cuando se usa glucosa como única fuente de carbono (Holm y col. 2010). Esta discrepancia no es fácil de aclarar. Sin embargo, es importante tener en cuenta que la única forma de cuantificar el aporte de la transhidrogenasa PntAB, es calcular la diferencia entre el flujo a través de las reacciones en vías centrales que producen NADPH y el consumo de NADPH para generar biomasa. Este valor, del requerimiento de NADPH por gramo de biomasa puede variar. De hecho, en la publicación del grupo de Sauer, se informa dos valores distintos para este requerimiento, comentando que el uso depende de la rapidez de crecimiento de la cepa, sin aclarar o discutir en que cepa se ocupa qué valor. Por otro lado, el trabajo del grupo de Vemuri no reporta el valor utilizado.

Esta es una razón para usar cultivos continuos fijando para todas las cepas el mismo requerimiento de NADPH, ya que todas están generando biomasa a la misma tasa de crecimiento. Así, nos independizamos de este parámetro a la hora de comparar entre las distintas cepas y sus modificaciones particulares.

Dado que NADH es el sustrato de la transhidrogenasa PntAB, es importante su disponibilidad intracelular. En el contexto de cultivos continuos, donde existe

1. INTRODUCCIÓN

una demanda fija por NADPH y ATP para generar biomasa, se evaluó modificar la disponibilidad de NADH expresando heterológamente la enzima NADH oxidasa (NADHox) de *Streptococcus pneumoniae*, la cual cataliza la reducción del oxígeno transformándolo en agua, ocupando para ello NADH. Esta enzima le permite a este organismo anaerobio facultativo, enfrentar ambientes donde el oxígeno está presente (Yu y col. 2001). Esta enzima ha sido usada para alterar el cociente redox NAD/NADH. En un estudio de *metabolic overflow*¹⁰ en *E. coli* se ocupó esta enzima para establecer un sumidero alternativo de NADH. La tasa de crecimiento fue controlada mediante cultivos continuos, encontrándose que la producción de acetato ocurría a tasas de asimilación de glucosa más elevadas que en la cepa silvestre. Además, se estableció que existía una alta correlación entre la aparición de acetato y el aumento de la fracción redox NAD/NADH. También, se encontró que el factor de transcripción ArcA es sensible a este cociente y controla la expresión de enzimas del ciclo de Krebs (Vemuri y col. 2006).

¹⁰ El efecto “overflow metabólico” ocurre cuando hay un alto consumo de glucosa alcanzándose la capacidad de flujo máxima para el ciclo de Krebs y la célula comienza a excretar acetato, incluso en la presencia de oxígeno (66). En *E. coli* la producción de acetato está asociada a la producción de ATP por fosforilación a nivel de sustrato.

Se utilizó la enzima NADH oxidasa para disminuir la disponibilidad de NADH, con el propósito de alterar la contribución potencial de NADPH mediante la transhidrogenasa PntAB. Así, cambios en la productividad de NADPH mediante PntAB se pueden relacionar directamente con la disponibilidad del NADH.

1.4 Determinación de los flujos intracelulares

Para estudiar la producción de NADPH y la partición del flujo de carbono en los distintos nodos de interés, es necesario estimar los flujos intracelulares. Esto es realizado actualmente de dos formas alternativas y complementarias: Análisis de Balance de Flujos (FBA, siglas en inglés) y Análisis de Flujos Metabólicos (MFA, siglas en inglés).

El Análisis de Balance de Flujos es una aproximación matemática que permite calcular las velocidades de reacción dentro de una red metabólica completa de un organismo. En otras palabras, es un análisis *in silico* para predecir los flujos metabólicos, la tasa de crecimiento, y la tasa de consumo y/o de producción de metabolitos (Orth y col. 2010) (ver métodos 2.4 para mayor detalles). Ya que este análisis corresponde a un problema lineal no determinado, el cual genera un espacio de soluciones, es necesario optimizar una función objetivo usando

programación lineal para obtener una solución única. En literatura existe actualmente una evaluación y discusión más detallada acerca de cuál es la función objetivo que el metabolismo está optimizando (Schuetz y col. 2012; Schuetz y col. 2007). Entre las cuales está la generación de biomasa, disminución de la entrada de glucosa, disminuir el flujo total del metabolismo, minimizar el ATP de mantención, entre otras. Se ocupó la minimización del ATP de mantención como la función objetivo, debido a razones expuestas en los resultados (sección 3.3).

Considerando que el FBA necesita de la optimización de una función objetivo, se ha criticado que el método implica la premisa sesgada de que los organismos evolucionaron hacia la optimización de las propiedades de su metabolismo (Bordbar y col. 2014). Sin embargo, a partir de la información experimental de 44 casos analizados por MFA, se concluyó que la mejor representación del comportamiento metabólico sería una superficie de Pareto definida por la combinación de tres objetivos: maximizar la generación de biomasa, maximizar el rendimiento de ATP y minimizar el flujo neto a través de la red metabólica. Los autores observan que los organismos presentan un crecimiento sub-óptimo respecto a dicha superficie, lo que les permitiría una rápida adaptación a las perturbaciones ambientales (Schuetz y col. 2012). Para evitar esta problemática,

además del FBA mencionado anteriormente, se ocupó el algoritmo Monte Carlo por cadenas de Markov (ver métodos 2.4.3) que no requiere uso de una función objetivo y que realiza un muestreo del espacio de soluciones obteniéndose histogramas para cada reacción en la red cuyo valor de la moda es el flujo más probable.

Por otra parte, MFA es una herramienta que combina la información experimental obtenida desde el marcado isotópico con el análisis matemático. En los últimos años ha mostrado ser bastante precisa en la determinación de flujos intracelulares (Crown y Antoniewicz 2013). Sin embargo, el número de reacciones que se pueden analizar es bajo (entre 20 y 30, las que generalmente corresponden a las vías centrales) en comparación con el total presente en la red metabólica.

En términos experimentales, se alimenta la célula en cultivo con una fuente de carbono marcada isotópicamente y debido a la dependencia que existe entre las vías de carbono ocupadas en el procesamiento catabólico y el marcaje producido en los aminoácidos, es posible dilucidar los flujos intracelulares. Esta técnica suele llamarse “determinación por ^{13}C ”, y se realiza mediante la medición de las poblaciones de moléculas marcadas isotópicamente en distintas posiciones de su esqueleto carbonado. Estas poblaciones se denominan isotopómeros y se

cuantifican por cromatografía de gases y espectroscopia de masas (GC-MS) o resonancia magnética nuclear (NMR). Existe una amplia literatura que trata sobre las distintas formas de hacer uso de esta técnica (Fischer y col. 2004; Fischer y Sauer 2003; Wittmann 2007; Wittmann y Heinzle 1999) y una amplia gama de softwares, entre los cuales los más importantes son: “13C-Flux¹¹”, “OpenFlux¹²” y FiatFlux (Zamboni y col. 2005), este último se ocupó para calcular los cocientes de flujo.

En este contexto, el grupo de Sauer ha presentado un procedimiento para estimar los flujos llamado: análisis de cociente de flujos (*metabolic flux ratio analysis*, en inglés) (Fischer y Sauer 2003). Esta aproximación matemática se basa en el estudio local de las proporciones de los flujos de producción de un metabolito, separado del resto de la red. Se generan una serie de ecuaciones que relacionan la distribución de masas en los aminoácidos, provenientes de la cuantificación de isotopómeros, con la actividad de las vías metabólicas que lo producen, y cuantifica la contribución relativa de vías convergentes o reacciones de los intermediarios metabólicos. Se cuantificaron los cocientes de flujo para las cepas silvestre y mutantes en cultivos continuos y se incorporaron al modelo (ver métodos 2.4.2)

¹¹ <http://www.13cflux.net/index.jsp>

¹² <http://openflux.sourceforge.net/>

mediante un método llamado “*flux balance analysis with flux ratios*” (FBrAtio) (Choi y col. 2007; McAnulty y col. 2012), que se basa en modificar a la matriz estequiométrica y luego, con el modelo modificado, se realizan los cálculos para obtener una distribución de flujos, los cuales pueden ser mediante programación lineal o el algoritmo Monte Carlo por cadenas de Markov.

Se destaca que este es el primer trabajo, del cual se conozca, que se haya ocupado FBrAtio y Monte Carlo por cadenas de Markov combinados para obtener una distribución de flujos metabólicos.

1.5 Hipótesis

La disminución del flujo en noxPPP, como consecuencia de la delección de *tktA*, afectará las particiones del flujo metabólico presentes en oxPPP, activando la vía de Entner-Doudoroff en presencia de glucosa y conllevará a una redistribución de flujos en las vías centrales como respuesta compensatoria a cambios en la producción de NADPH, siendo la reacción transhidrogenasa la respuesta primaria.

1.6 Objetivos

1.6.1 Objetivo general

Determinar el flujo de carbono a través de las deshidrogenasas del metabolismo central de *Escherichia coli*, como consecuencia de la disminución de la actividad transcetolasa y la producción de NADPH por PntAB.

1.6.2 Objetivos específicos

1. Generar una cepa de *E. coli* con actividad transcetolasa disminuida ($\Delta tktA$).
2. Disminuir la disponibilidad de NADH intracelular en la cepa de *E. coli* $\Delta tktA$, mediante la expresión de NADH oxidasa.
3. Eliminar la producción de NADPH desde *pntAB* en la cepa de *E. coli* $\Delta tktA$.
4. Observar parámetros fisiológicos (tasa de crecimiento, consumo de glucosa y producción de metabolitos de fermentación) en fase de crecimiento exponencial en *batch*, usando glucosa como única fuente de carbono en las cepas mencionadas.
5. Modelar el efecto metabólico de la delección de *tktA*, *pntAB* y la expresión de NADH oxidasa mediante Flux Balance Analysis usando los datos generados en el objetivo 4.

6. Implementar cultivos continuos a una tasa de crecimiento de $0,2 \text{ h}^{-1}$ usando como único sustrato glucosa marcado isotópicamente 1-C^{13} y U-C^{13} .
Obteniendo los isotopómeros de aminoácidos mediante hidrolisis, derivatización y medición por cromatografía de gases y espectroscopia de masas (GC-MS).
7. Análisis de las distribuciones de isotopómeros de los aminoácidos proteogénicos para la obtención de los cocientes de flujo usando el software FiatFlux.
8. Determinar los cambios en la distribución de flujos metabólicos en las cepas mencionadas mediante el uso de los cocientes de flujo como restricciones en FBA y en el muestreo del espacio de soluciones mediante Monte Carlo con cadenas de Markov.

2. Materiales y Métodos

2.1 Construcción de cepas

Para la construcción de las cepas con eliminación de genes, se utilizó la cepa silvestre de *Escherichia coli* MG1655 (ATCC 47076) a la cual se realizó el protocolo Datsenko-Wanner (Datsenko y Wanner 2000). Este método se basa en la transformación de la cepa con un fragmento de DNA que contiene el gen de la resistencia a kanamicina, secuencias que permiten la recombinación homóloga y sitios FRT, los cuales permiten una escisión posterior de la resistencia al antibiótico. La cepa a ser modificada está transformada con el plásmido pKD46 el cual expresa el sistema de recombinación del bacteriófago λ Red. El éxito del procedimiento fue verificado mediante secuenciaciones de los *locus* objetivos *tktA* y *pntAB*. En un paso posterior cada una de estas cepas se transformaron con el plásmido *pcp20* (contiene el gen de resistencia a ampicilina), el cual expresa la recombinasa de levadura Flp, que reconoce los sitios FRT y genera una “secuencia remanente” en el genoma, eliminándose la resistencia a kanamicina. Estas últimas cepas, sirven como parentales para una segunda ronda del mismo protocolo de Datsenko-Wanner.

Se verificó la sensibilidad de estas cepas al antibiótico ampicilina y kanamicina para observar que los plásmidos utilizados en el proceso hayan sido eliminados en las cepas resultantes.

Se construyeron las cepas MG1655 NADHox y $\Delta tktA$ NADHox que expresan de forma heteróloga episomal la enzima NADH oxidasa (NADHox) de *Streptococcus pneumoniae*. El plásmido que contiene el gen de la NADH oxidasa (pTrc99A-NADHox) fue donado gentilmente por el profesor Mark A. Eiteman de la Universidad de Georgia. Las transformantes fueron seleccionadas mediante uso de ampicilina, y su análisis mediante electroforesis en gel de agarosa, comprobando su presencia en las cepas.

Los plásmidos ocupados están listados en el anexo 7.1 junto a sus características genéticas más relevantes.

Los análisis de las secuenciaciones y las imágenes se realizaron con el programa Geneious 6.1.5.

2.2 Condiciones de cultivo

Las condiciones de cultivo fueron 37°C, aeróbico, con glucosa como única fuente de carbono y la mantención del pH en 7, agregando volúmenes necesarios de una solución 1M de NaOH.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

La composición del medio M9 por cada litro de cultivo es la siguiente:

- Solución M9 Base: 0,8 g NH_4Cl , 0,5 g NaCl , 5,98 g Na_2HPO_4 , 3 g KH_2PO_4 .
- Solución de elementos traza: 0,18 g ZnSO_4 , 0,12 g CuCl_2 , 0,14 g MnCl_2 , 0,21 g CoSO_4 y 1 g FeCl_3 .
- Además, fueron esterilizados por filtración, separadamente y agregados para completar el litro: 1 mL de MgSO_4 2M, 1 mL de CaCl_2 0,1M, 3 μL de Tiamina 30mM y dependiendo del cultivo, D-glucosa 150 g/L.

Las cepas fueron almacenadas en LB 50% glicerol a -80°C hasta su uso.

Luego para realizar los cultivos se comenzó siempre con un pre-inoculo de 30 mL en el mismo medio en que se realizaría el cultivo. Generalmente este pre-inoculo necesitaba de 12-17 horas para estar en fase exponencial. Para que cada crecimiento de la cepa silvestre y de las cepas mutantes en el biorreactor, tuviera el mínimo tiempo en fase lag, se realizaron cultivos en matraces para conocer el tiempo particular de entrada en fase exponencial del pre-inoculo (datos no mostrados).

2.2.1 Cultivos en modo *batch*.

Para los cultivos realizados en modo *batch* se usó un biorreactor con un volumen de trabajo de 1,5 L, con un rotor a una velocidad de 800 rpm. La

concentración de oxígeno disuelto se mantuvo en todo tiempo más arriba de 30% de saturación de aire. La cantidad de glucosa ocupada fue de 4 g/L.

Se tomaron muestras aproximadamente cada 15-30 minutos, para realizar las siguientes mediciones: i) la densidad óptica a 600 nm; ii) la concentración de glucosa y metabolitos de fermentación (se obtiene el medio extracelular mediante filtración con membranas de poro de 0,2 μm de diámetro, estas muestras se guardan hasta su medición por HPLC a -80°C), iii) el peso seco (se agrega un volumen a un recipiente de aluminio de peso conocido y se seca a $100-125^{\circ}\text{C}$ por 24-48 horas hasta que el peso del tacho sea constante).

El factor de conversión (f) de la absorbancia en peso seco, se calcula como la pendiente de la recta que relaciona estas dos variables. Para la cepa silvestre y la cepa $\Delta tktA$, el factor de conversión calculado fue de 0,44 gramos / litro de cultivo * unidad de absorbancia.

2.2.2 Cultivos en modo continuo

Los cultivos realizados en modo continuo fueron realizados en un biorreactor de 1 L, con un volumen de trabajo de 600 mL, con un rotor a una velocidad de 400 rpm. La cantidad de glucosa ocupada fue de 2 g/L. Para cada una de las cepas, se realizaron dos cultivos independientes, donde se ocupan dos formas

distintas de glucosa marcada isotópicamente, D-Glucosa-1-¹³C (Sigma, N° cat. 297046-10G, 99%) y D-Glucosa-U-¹³C (Sigma, N° cat. 660663-2G, 99%). La glucosa marcada isotópicamente solo se usa en el último tiempo de residencia, cuando ya se ha alcanzado estado estacionario. Para observar la llegada a estado estacionario, se monitoreó la estabilidad de la absorbancia a 600 nm y del oxígeno disuelto en el medio, en todos los casos, se requirió al menos 5 tiempos de residencia. Una vez llegado el cultivo a estado estacionario se realizó el reemplazo del medio que contiene glucosa sin marcar, con un medio idéntico, excepto, la mezcla de i) 20% D-Glucosa-U-¹³C y 80% D-Glucosa sin marcar o ii) 100 % D-Glucosa-1-¹³C. La decisión de qué marca isotópica usar y en qué proporciones se usaría la glucosa, se basó en un estudio donde se observan la resolución de los flujos metabólicos y su dependencia de la marca isotópica usada (Fischer y col. 2004). Alcanzando el estado estacionario, se obtuvieron muestras de células para medir los aminoácidos mediante GC-MS.

2.2.3 Concentración de metabolitos en el medio extracelular

Las muestras de medio extracelular fueron analizadas por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés). Las concentraciones de glucosa y de metabolitos de fermentación fueron cuantificadas por comparación

2. MATERIALES Y MÉTODOS

mediante una curva de calibración realizada en las mismas condiciones (Anexo 7.3)

Se usaron dos equipos y protocolos distintos. En el Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular, para las muestras de los cultivos modo *batch*, se usó un equipo HPLC Waters 1525, que estaba equipado con una columna de intercambio iónico para carbohidratos y ácidos orgánicos Aminex HPX-87H (BioRad) operando a 0,3 mL/ min, 40°C y con una fase móvil de 5mM H₂SO₄. El perfil de separación se observó a 210 nm con un detector UV (Waters, 2487) y un detector de índice de refracción (RI) (Waters 2414). La curva de calibración de glucosa fue realizada agregando cantidades en el orden de los microlitros desde una solución altamente concentrada de glucosa (1.6 M), hacia una solución con 40 mL de medio M9, preparada según especificaciones de los cultivos. Para la curva de acetato, se ocupó una solución de ácido acético a 17.49 M y se realizó un procedimiento idéntico al de la curva de glucosa. Además, se repitió esta curva mediante otro stock, preparado desde acetato de sodio, resultando ambas con una pendiente que no presentan diferencias significativas (Ancova P<0.05). En ambos casos, se realizaron correcciones en los cálculos según la dilución y los volúmenes tomados en cada inyección.

En el laboratorio “*Metabolic Engineering and Systems Biotechnology*”, a cargo del Dr. Ka Yiu San, en *Rice University*, para las muestras de los cultivos en modo continuo, se usó un equipo de HPLC Shimadzu-10A que estaba equipado con una columna de intercambio iónico para carbohidratos y ácidos orgánicos Aminex HPX-87H (BioRad) operando a 0,5 mL/ min, 55°C y con una fase móvil de 2.5mM H₂SO₄. El análisis de la separación se realizó a 210 nm con un detector UV (Shimadzu SPD-10A), y un detector de índice de refracción (RI) (Shimadzu RID-10A). En este caso, las curvas de calibración estaban incorporadas al software del HPLC y se realizaban pruebas de forma continua para observar cualquier variación en ellas.

La variación en la concentración se usó junto con el cambio en la biomasa para calcular las tasas de captación de glucosa y las tasas de excreción de acetato, utilizando el factor de conversión medido experimentalmente (anexo 7.3). En el caso de los cultivos en modo *batch* otros compuestos orgánicos (como lactato, formato, etanol, succinato y malato) no fueron detectados en cantidades apreciables, comparado contra un estándar (número de catálogo Aminex: 125-0234). En el caso de los cultivos en modo continuo, cuando se había establecido estado estacionario, no se detectó ningún metabolito de fermentación, ni tampoco

el sustrato glucosa, en el medio extracelular. Esto es concordante con la condición de que el carbono es limitante, consumiéndose inmediatamente una vez que se mezcla la gota del medio fresco con el medio en el biorreactor.

2.3 Análisis por GCMS y obtención de los cocientes de flujos metabólicos

2.3.1 Preparación de muestra: hidrolisis y derivatización

El experimento para obtener la distribución de la marca isotópica, comienza una vez que el cultivo continuo ha alcanzado el estado estacionario, luego de 5 tiempos de residencia. Una vez finalizado el último tiempo de residencia, se tomaron 50 mL de cultivo y se centrifugaron a 5000G, durante 15 min a 4°C. El sedimento celular se lavó tres veces con 25 mM Tris-HCl (pH 7,6) y se guardó a -20°C para futuros análisis. Luego, este sedimento celular se resuspende en 1,5 mL de HCl 6M. La mezcla se hidroliza en tubos de vidrio durante 12 horas a 105°C¹³. Luego de la hidrolisis se observa la formación de un sedimento de color oscuro, el cual será filtrado con una membrana de polietersulfona (PES) (resistente a pH bajos) de 0,2 µm filtro de tamaño de poro, obteniéndose un líquido de color

¹³ El ácido genera mucha presión, por lo que se recomienda el cierre hermético de los tubos para evitar evaporación.

amarillento. Esta mezcla se secó durante 12-24 horas bajo una corriente de nitrógeno (N₂)¹⁴. En ese momento, hay 16 aminoácidos en el hidrolizado, ya que la cisteína y el triptófano son destruidos en la hidrólisis, y la asparraguina y la glutamina son desaminados hasta ácido aspártico y ácido glutámico, respectivamente (Szyperki, 1995). El hidrolizado (sólido de color café) se disuelve¹⁵ en 300 µL tetrahidrofurano (THF) (Sigma, N° cat. 270385-2L, 99,9%, grado de pureza). Luego, se adiciona 300 µL N-ter-butildimetilsilil-N-metiltrifluoroacetamida (MTBSTFA) (Sigma, N° cat. 394882-5mL, 97%, grado de pureza) como agente derivatizador de la muestra. La derivatización ocurre a 85°C por 1 hora¹⁶.

2.3.2 Métodos de colección de datos del GCMS

Se corrieron las muestras en el GC-MS basados en dos protocolos (Dauner y Sauer, 2000; Zhao y Shimizu, 2003). Se aplicaron ambos métodos para discernir cual era más idóneo, dadas las condiciones del equipo disponible. El equipo de GCMS (GCMS-QP2010, Shimadzu) estaba equipado con una columna DB-5MS

¹⁴ Se realiza porque el paso de la derivatización es impedida por la presencia de agua. Por lo cual, el secado de la muestra es crucial.

¹⁵ No se puede disolver todo el sedimento, es suficiente obtener un color café-marrón en el líquido.

¹⁶ Si se observan desechos de células en la muestra derivatizada, centrifugar brevemente para evitar la transferencia de cualquier partícula en los viales GCMS. Las muestras se deben analizar pronto porque la degradación ocurre dentro de pocos días.

(Agilent) y con un inyector automático (AOC-20i, Shimadzu). Se realizaron pruebas para establecer una buena separación de los distintos aminoácidos¹⁷ y la mejor resolución de las distribuciones de isotómeros. Las condiciones definitivas fueron, un volumen de inyección de 1 μL con una fase móvil de helio 1 mL/min con un cociente de corte (“*split ratio*”) de 1:20. La temperatura inicial del horno GC fue de 150°C manteniéndose por dos minutos, para luego aumentar con una rampa de 3°C/min hasta llegar a los 280°C. Otras condiciones fueron: 250°C de temperatura de la interface, 200°C la temperatura de la fuente de iones y 70eV la energía de ionización por impacto de electrones. El análisis de los espectros generados fue analizado primero en el rango de 100-525 unidades de masa atómica, para conocer el tiempo de elución de cada aminoácido y luego ocupar el modo SIM. Este modo, se basa en que, en un determinado tiempo, el equipo escanea solamente el tamaño de masa atómica pedido¹⁸, esto logra aumentar la resolución de los picos de aminoácidos.



¹⁷ Para la leucina y la isoleucina, debido a que tienen la misma masa, se debe tener una rampa de temperatura en el GC que permita que ambos eluyan en forma diferencial. El tiempo de retención de leucina siempre es menor que la isoleucina.

¹⁸ Por ejemplo, la alanina tiene un tiempo de retención de alrededor de 17 minutos, por lo cual, el método se configura para escanear alrededor de 16,5 y 17,5 minutos las siguientes masas: 260, 261, 262, 263, 264, 232, 233, 234, 235. En este caso se miden los iones para los fragmentos de alanina M-57+ y M-85+.

2.3.3 Obtención de cocientes de flujo

Los datos obtenidos del GCMS fueron analizados mediante el software MestReNova (versión 9.0.1-13254, Mestrelab Research S.L.), que permitió la visualización e identificación de los picos de los fragmentos de los aminoácidos mediante librerías y el toolbox de MatLab “FiatFlux” (versión 1.67) (Zamboni y col. 2005), que permite obtener los cocientes de flujo metabólico.

Brevemente descrito, directamente de la data cruda del GCMS se obtienen los vectores de distribución de masa para cada fragmento α (MDV_α) de los aminoácidos:

$$MDV_\alpha = \begin{bmatrix} m_0 \\ m_1 \\ \vdots \\ m_n \end{bmatrix} \text{ con } \sum m_i = 1 \quad (1)$$

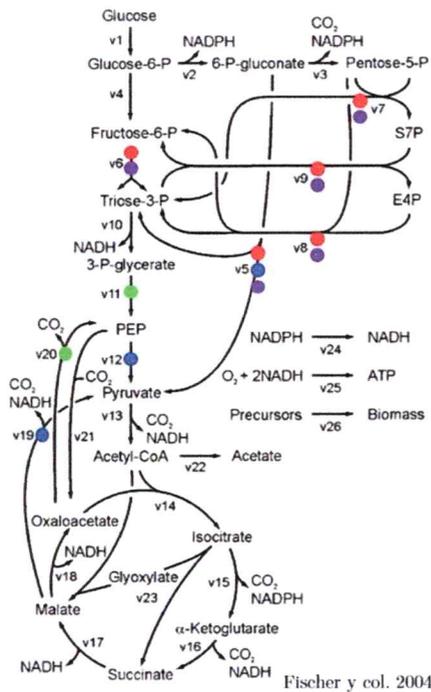
El protocolo que ejecuta el programa FiatFlux es:

- 1) Corrección por abundancia natural de isótopos, obteniéndose el vector MDV_α^*
- 2) Corrección por biomasa no marcada obteniéndose los vectores de distribución de masa de los aminoácidos (MDV_{AA})
- 3) A partir de combinaciones lineales de los MDV_{AA} se obtienen los vectores de distribución de masa de los metabolitos (MDV_M)

2. MATERIALES Y MÉTODOS

4) Los MDV_M y los MDV_{AA} se usan para obtener los cocientes de flujos metabólicos.

Los cocientes de flujo obtenidos en esta tesis se muestran en el siguiente diagrama. Los cocientes de flujo representan una fracción de un metabolito que proviene de distintas vías aferentes.



Fracción de la serina originada a través de glicolisis

$$A = \frac{2 * (v6 - v8 - v9)}{v5 + 2 * v6 + v7 + v9}$$

Fracción de piruvato originado a través de Entner-Doudoroff

$$B = \frac{v5}{v5 + v12 + v19}$$

Fracción del fosfoenolpiruvato desde oxaloacetato

$$C = \frac{v20}{v11 + v20}$$

Fracción del fosfoenolpiruvato originado a través de PPP (límite superior)

$$D \geq \frac{v7 + 3 * v8 + 2 * v9}{v5 + 2 * v6 + v7 + v9}$$

Figura 5. Cocientes de flujo determinados experimentalmente para las cepas de *E. coli* generadas. Los cocientes de flujo dependen de ciertos flujos metabólicos de las vías centrales. Los flujos metabólicos están representados como v1 hasta v26 de acuerdo con el mapa mostrado a la izquierda. Los cocientes de flujo están representados como letras (A-D) y los colores coinciden con los de los flujos metabólicos representados como círculos llenos.

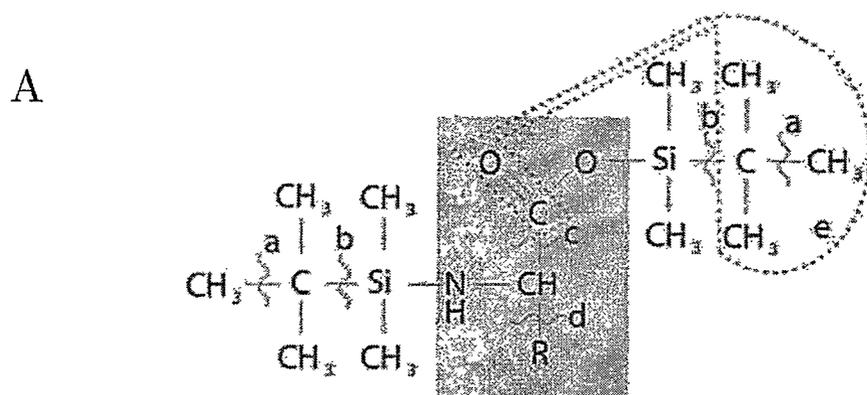
2.3.4 Distribuciones de isotómeros de aminoácidos proteogénicos y cálculos realizados por FiatFlux

En esta sección se exponen ejemplos de cada paso de los protocolos implementados. Los valores mostrados fueron obtenidos de forma experimental.

Primero, la muestra de aminoácidos provenientes de la fracción proteica (proteogénicos) derivatizada por MTBSTFA, es separada por GC, luego de la ionización en el MS se obtienen fragmentos (figura 6).

La derivatización bloquea por sililación los hidrógenos de los sitios de aminoácidos OH-, NH-, y grupos SH para reducir interacciones dipolo-dipolo y para aumentar la volatilidad en la separación por GC.

Un típico gráfico de corriente iónica total (TIC) se obtiene mediante GC, ampliado se observa el patrón de fragmentación en el espectro de masas del pico de la alanina (el primer aminoácido en aparecer en cualquier corrida de GC). Con el valor masa/carga 260-263 se construye el vector de distribución de masa para el fragmento M-57 de la alanina (figura 7).



B

Fragmento	Nombre del fragmento	Características
a	(M-15) ⁺	perdida de un grupo metil
b	(M-57) ⁺	perdida de un grupo terbutil
c	(M-159) ⁺	perdida de un ion C(O)O-TBDMS
d	(f302) ⁻	fragmento doble sililado sin cadena lateral (R)
e	(M-85) ⁺	reordenamiento molecular, grupo C=O y grupo terbutil

Figura 6. Fragmentos de aminoácidos detectados en GC-MS. A) Esquema de los fragmentos de aminoácidos detectados en la derivatización por MTBSTFA luego de ser ionizados. El rectángulo gris es la parte común a todos los aminoácidos. La fragmentación ocurre en las posiciones definidas por letras (a-d). La figura fue tomada de la publicación de Dauner y Sauer 2000. B) Características de cada uno de los fragmentos obtenidos. Las letras refieren donde ocurre la fragmentación indicada en la figura.

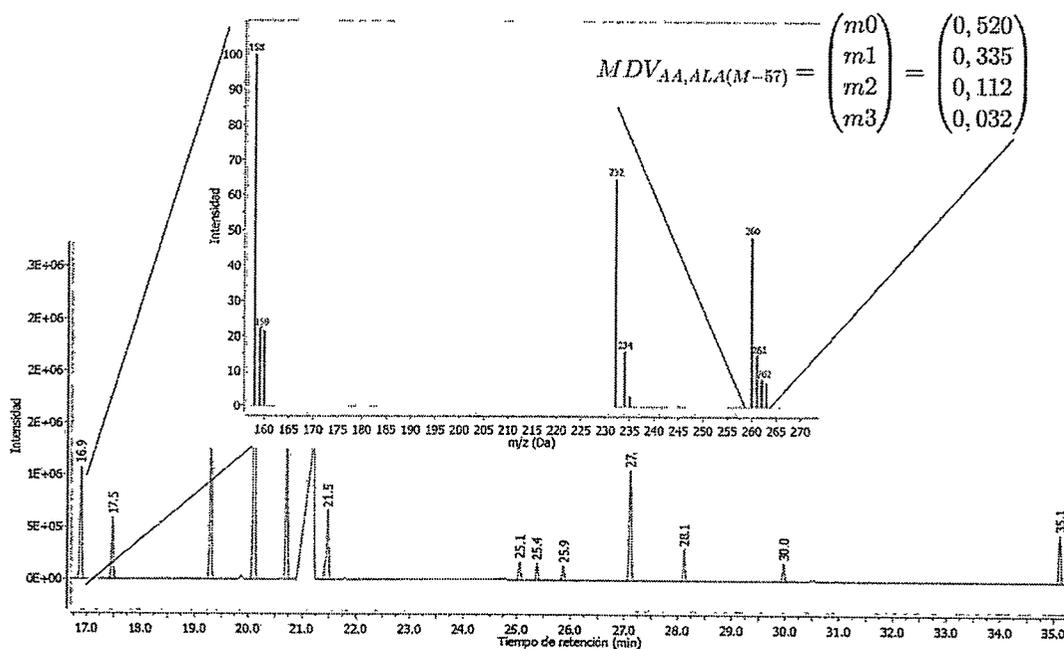


Figura 7. El vector de distribución de masa para el fragmento M-57 de la alanina. Imagen generada con el programa MestReNova.

Para corregir por ocurrencia natural de isotopos se requiere usar matrices de corrección para cada uno de los átomos del fragmento. La fórmula general ocupada para realizar los cálculos de corrección es:

$$Abundancia = \left(\sum_{k=1}^N \{V[I(k)]\} \right)! \cdot \prod_{k=1}^N \left(\frac{C[I(k)]^{V[I(k)]}}{V[I(k)]!} \right) \quad (2)$$

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Por ejemplo, para el carbono, la ocurrencia natural de C^{12} es de un 98,93% y de C^{13} de 1,07% (Bluck y Volmer 2009; Rosman y Taylor 1998), con esta información se construyen matrices¹⁹:

$$C_{corr} = \begin{pmatrix} {}^{12}C_8 & 0 & 0 & 0 \\ {}^{12}C_7 {}^{13}C_1 & {}^{12}C_8 & 0 & 0 \\ {}^{12}C_6 {}^{13}C_2 & {}^{12}C_7 {}^{13}C_1 & {}^{12}C_8 & 0 \\ {}^{12}C_5 {}^{13}C_3 & {}^{12}C_6 {}^{13}C_2 & {}^{12}C_7 {}^{13}C_1 & {}^{12}C_8 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 0,9175 & 0 & 0 & 0 \\ 0,0794 & 0,9175 & 0 & 0 \\ 0,0030 & 0,0794 & 0,9175 & 0 \\ 0,0000 & 0,0030 & 0,0794 & 0,9175 \end{pmatrix} \quad 20$$

El próximo ejemplo es sobre el cálculo del MDV_M . Si asumimos que el esqueleto carbonado de un aminoácido se genera directamente desde un metabolito único, el MDV_M de ese metabolito es igual al MDV_{AA} del aminoácido. En el caso de dos o más metabolitos, entonces el MDV_{AA} del aminoácido es la combinación lineal de los dos MDV_M de los metabolitos en cuestión. Esto sucede en el caso del oxaloacetato₁₋₄ y de piruvato₂₋₃ a partir del MDV_{AA} del fragmento M-15 de la isoleucina (figura 8).

¹⁹ Como ejemplo, el valor para ${}^{12}C_7 {}^{13}C_1$ se calcula, $8! \cdot \frac{0,9893^7}{7!} \cdot \frac{0,0107^1}{1!} = 0,0794$

²⁰ Estas correcciones son realizadas automáticamente por el software FiatFlux.

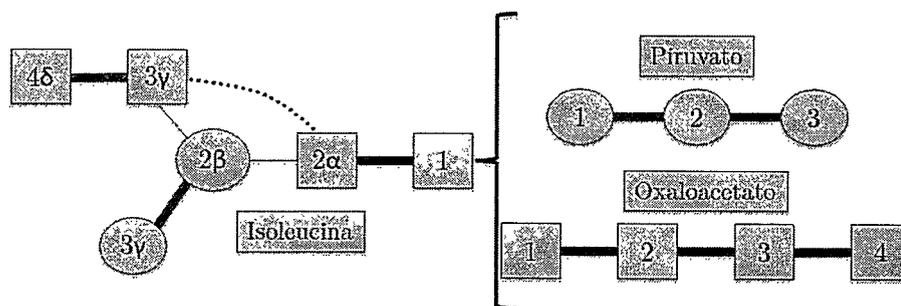


Figura 8. Representación del origen del esqueleto carbonado de la isoleucina con respecto a los metabolitos intermediarios piruvato y oxaloacetato. Las líneas gruesas denotan que esos enlaces entre carbonos no se rompen cuando se forma el aminoácido. Las líneas delgadas indican nuevos enlace C-C y la línea punteada indica que esos carbonos derivan del mismo metabolito aunque no estén juntas en el aminoácido. En el anexo 7.5 se muestra la figura S1 donde están representadas todas las dependencias de los aminoácidos y los intermediarios metabólicos de los cuales derivan.

A continuación se presentan las matrices y el resultado del cálculo²¹ para obtener los MDV_M del oxaloacetato₁₋₄ y de piruvato₂₋₃.

Dado los vectores:

$$MDV_{AA,ILE} = \begin{pmatrix} m0 \\ m1 \\ m2 \\ m3 \\ m4 \\ m5 \\ m6 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 0,407 \\ 0,194 \\ 0,210 \\ 0,104 \\ 0,060 \\ 0,018 \\ 0,007 \end{pmatrix}$$

$$MDV_{M,OAA,1-4} = \begin{pmatrix} O_0 \\ O_1 \\ O_2 \\ O_3 \\ O_4 \end{pmatrix} MDV_{M,PYR,2-3} \begin{pmatrix} P_0 \\ P_1 \\ P_2 \end{pmatrix}$$

²¹ Se resuelve un sistema de ecuaciones lineales con la condición de que la suma del vector sea 1.

Combinando:

$$MDV_{AA,ILE} = \begin{pmatrix} 0,407 \\ 0,194 \\ 0,210 \\ 0,104 \\ 0,060 \\ 0,018 \\ 0,007 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} O_0P_0 \\ O_0P_1 + O_1P_0 \\ O_0P_2 + O_1P_1 + O_2P_0 \\ O_1P_2 + O_2P_1 + O_3P_0 \\ O_2P_2 + O_3P_1 + O_4P_0 \\ O_3P_2 + O_4P_1 \\ O_4P_2 \end{pmatrix}$$

Se resuelve obteniéndose el MDV_M del oxaloacetato₀₋₄ y de piruvato₂₋₃.

$$MDV_{M,OAA,1-4} = \begin{pmatrix} 0,561 \\ 0,188 \\ 0,129 \\ 0,080 \\ 0,040 \end{pmatrix} MDV_{M,PYR,2-3} \begin{pmatrix} 0,725 \\ 0,102 \\ 0,172 \end{pmatrix}$$

Tanto los MDV_{AA} como los MDV_M son ocupados para calcular los cocientes de flujo. En el próximo ejemplo, se calcula la fracción de la serina originada a través de glicolisis. Como se deduce de la conectividad de las vías metabólicas de *E. coli* el MDV_{AA} de la serina, que proviene de 3-fosfoglicerato, depende de la contribución de tres vías: glicolisis, PPP y ED. Se representa esta dependencia en la siguiente formula:

$$MDV_{ser1-3} = f \cdot MDV_{GLI} + (1 - f) \cdot MDV_{ED,PPP}$$

Reordenando

$$f = \frac{MDV_{ser1-3} - MDV_{ED,PPP}}{MDV_{GLI} - MDV_{ED,PPP}} \quad (3)$$

Esta fórmula se interpreta de la siguiente forma, el MDV_{ser1-3} es igual a la contribución fraccional f de la vía metabólica (en este caso glicolisis) y la contribución fraccional $(1-f)$ de los otras vías metabólicas²² (ED y PPP).

Todos los cálculos mostrados los realiza FiatFlux²³ de forma interna, mostrando como resultado final los cocientes de flujo más un error obtenido desde los datos redundantes que contienen los MDV_{AA} .

Estos cocientes metabólicos fueron a su vez ocupados como restricciones adicionales en los cálculos realizados por el toolbox Cobra (Becker y col. 2007).

2.4 Metodologías para el Análisis de Balance de Flujos

La red metabólica de un organismo puede ser representada matemáticamente en su totalidad mediante la matriz estequiométrica (S). Esta posee m filas y n columnas, representando respectivamente el número de metabolitos y de reacciones en el sistema. Cada celda de esta matriz contiene el coeficiente estequiométrico con el que un determinado metabolito participa en cada reacción. Se asigna un valor negativo para aquellos metabolitos que son consumidos, cero

²² ED y PPP, en el caso de crecimiento en glucosa marcada en el carbono 1, pueden ser considerados juntos como un solo *pool* que contribuye al MDV_{ser} .

²³ Lamentablemente los códigos en este toolbox, vienen encriptados, lo que impide revisarlos detalladamente.

para los que no participan y positivo para los que son producidos en la respectiva reacción.

Por otro lado, todos los flujos metabólicos de la red pueden ser representados por un **vector** v , de dimensión igual al número de reacciones del sistema (o al número de columnas de la matriz S). Mientras que el cambio de las concentraciones en el tiempo, de todos los metabolitos, se encuentra contenido en un **vector** $\frac{d\vec{x}}{dt}$, de dimensión igual al número de metabolitos del sistema (o al número de filas de la matriz S). Este cambio puede ser representado mediante ecuaciones de balance de masa, utilizando la matriz S y el vector v :

$$\frac{d\vec{x}}{dt} = S \cdot \vec{v} \quad (4)$$

Sin embargo, este sistema de ecuaciones presenta un espacio de solución indeterminado. En otras palabras, contiene todas las combinaciones de flujos que hacen posible la igualdad de la Ecuación (3), por lo que para generar un espacio de soluciones acotado, FBA considera la condición en que la tasa de cambio de concentración de todo metabolito debe ser igual a cero (estado estacionario):

$$S \cdot \vec{v} = \vec{0} \quad (5)$$

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Esto significa que las concentraciones se mantienen constantes en el tiempo, es decir, que la velocidad de producción de los distintos intermediarios es igual a la velocidad de su consumo debido al crecimiento.

Con esto es posible encontrar distintos vectores \vec{v} que son solución del sistema de ecuaciones. Además se facilita el análisis, pues al no trabajar con las concentraciones de los metabolitos, no sería necesario conocer parámetros cinéticos. Para encontrar un único vector, FBA emplea métodos de programación lineal para optimizar una función objetivo. Esto frecuentemente corresponde a la maximización de la velocidad de producción de biomasa (tasa de crecimiento). Para hacer más preciso este cálculo, y el resultado consistente con las tasas de crecimiento registradas experimentalmente, se suelen utilizar datos experimentales de flujos metabólicos externos para restringir el modelo, poniéndole límites mínimos y máximos, como por ejemplo a la tasa de consumo de fuente de carbono, consumo de oxígeno, producción de metabolitos de fermentación, etc.

Generalmente, la reacción de biomasa corresponde a la función objetivo, puesto es la función que el proceso de optimización busca maximizar. Existen varias funciones objetivo que permiten obtener resultados biológicamente coherentes, y esto es de hecho una de las principales debilidades de éste método

puesto supone introducir arbitrariamente una función objetivo, lo que limita el análisis al sesgo que el investigador tenga a la hora de elegir. Otras funciones objetivo utilizadas son por ejemplo: maximizar el crecimiento al mismo tiempo que se minimiza la suma de todos los flujos activos del metabolismo o maximizar la producción de ATP al mismo tiempo que se minimiza la suma de todos los flujos activos. Esta última, fue la aproximación ocupada.

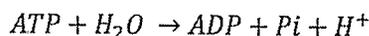
El grupo del Dr. Palsson lleva varios años desarrollando este método y actualmente tienen un *toolbox* gratuito desarrollado en el software MatLab (The MathWorks, Inc.), que permite realizar los cálculos de optimización (Schellenberger y col. 2011). La última versión de este toolbox es: COBRA 2.0.5, que es la que se ocupó en este estudio.

En términos de modelo de *E. coli*, se ocuparon tres. El modelo iJO1366 (Orth y col. 2011), iAF1260 (Feist y col. 2007) y el modelo CORE, que es un subconjunto de reacciones de vías centrales y otras relevantes del modelo iAF1260. Cada uno de estos modelos tiene diferencias sustanciales que generan espacios de soluciones distintos. Una de las diferencias más remarcables entre el modelo iJO1366 e iAF1260 es el valor del ATP de mantención fijado por cada modelo, en el primer

caso es de 3.15 mmol *peso seco g⁻¹ * h⁻¹, mientras que en el segundo es de 8.39 mmol*peso seco g⁻¹ * h⁻¹.

2.4.1 Cálculo del ATP de mantención

Aparte del ATP necesario para la generación de macromoléculas, existe una demanda energética basal que no está asociada al crecimiento (ATP de mantención). Ejemplos de esta demanda es el costo asociado a la polimerización de proteínas y al reciclaje de la membrana (Feist y col., 2007). En el modelo, el valor de ATP de mantención se expresa como el límite inferior del flujo de la reacción ATPM, la cual tiene la siguiente fórmula:



El valor del ATP de mantención se puede obtener experimentalmente desde cultivos continuos (Russell y Cook 1995) o también se puede estimar con FBA. En este caso corresponde a una maximización del flujo a través de la reacción ATPM presente en el modelo, lo que también corresponde a optimizar el rendimiento de ATP. Se utilizó esta aproximación, luego de fijar la tasa de crecimiento y el consumo de glucosa a los valores experimentales. Una vez obtenido mediante optimización el flujo máximo de ATPM, este valor se utiliza

como restricción. Esta aproximación ya ha sido utilizada exitosamente en nuestro grupo de investigación (Olavarria y col. 2014).

2.4.2 Incorporar los cocientes de flujo derivado de isotopómeros como restricción en el análisis de balance de flujos

Este método se basa incorporar directamente los cocientes de flujo a la matriz estequiométrica. Una ventaja de este enfoque es que permite incluir múltiples cocientes de flujo simultáneamente y el problema de optimización es resuelto con programación lineal. Esta incorporación a la matriz estequiométrica se realiza mediante la reformulación de las ecuaciones estequiometrias ocupando metabolitos artificiales. Se tomará como ejemplo, el cociente de flujo "A" para la serina producida a través de la glicolisis²⁴.

$$A = \frac{2 * (v6 - v8 - v9)}{v5 + 2 * v6 + v7 + v9}$$

Reemplazando los flujos con el nombre de las reacciones:

$$A = \frac{2 * (FBA - TKT2 - TALA)}{EDD + 2 * FBA + TKT1 + TALA}$$

²⁴ Se hace hincapié en que el cociente de flujo "A" es conocido, calculado a partir de los datos extraídos de GC-MS.

Para construir la restricción de flujo en la matriz estequiométrica, primero la ecuación anterior se reordena de la siguiente forma:

$$0 = (A - 1)FBA + \left(\frac{A}{2}\right) TKT1 + \left(\frac{A}{2} + 1\right) TALA + \left(\frac{A}{2}\right) EDD + (1)TKT2$$

A continuación, se añade una nueva fila a la matriz estequiometria (metabolito artificial "A"). En esta nueva fila, se añaden cinco valores (todos los demás valores en la fila son cero). En la columna que representa la reacción catalizada por FBA, el coeficiente añadido a la matriz es "(A-1)". En la columna que representa la reacción catalizada por el TKT1, se añade el coeficiente de "(A/2)", y así sucesivamente, se agrega todos los coeficientes de la ecuación asociados a las reacciones correspondientes. Con estas adiciones, cuando la ecuación de balance de flujos se resuelve, la relación de flujos para las reacciones será el valor del cociente A. Si el valor del cociente de flujo elegido no conduce a un estado estacionario, ninguna solución será encontrada. Tanto individualmente, como en conjunto, los cocientes de flujo ocupados llevaron a encontrar estado estacionario, es decir, solución óptima que satisface las restricciones añadidas.

2.4.3 Muestreo del espacio de soluciones usando Monte Carlo por cadenas de Markov

De acuerdo con Schuetz y colaboradores (2012), la mejor representación del comportamiento metabólico sería una superficie de Pareto donde los organismos presentan un crecimiento sub-óptimo respecto a dicha superficie. A la luz de esta información, se usó el muestreo del espacio de soluciones usando Monte Carlo por cadenas de Markov luego de actualizar el modelo usando los cocientes de flujo calculados anteriormente.

El muestreo del espacio de soluciones se usó para evaluar la aplicación de los cocientes de flujo en el modelo: 1) se observó cuan restringido resulta el espacio de soluciones y 2) se determinó el flujo particular de cada reacción en el modelo a partir de la distribución de flujos más probable.

El muestreo usando el algoritmo Monte Carlo por cadenas de Markov (también conocido como “hit and run sampler”) ha sido implementado en COBRA con la función llamada “gpSampler” (Schellenberger, 2010). Brevemente, se inicia el análisis tomando las coordenadas de algún punto al azar dentro del espacio de soluciones y luego este punto se desplaza en alguna dirección azarosa dentro de ese mismo espacio, registrándose las coordenadas de los destinos. Cada componente de las coordenadas de un punto corresponde al valor de flujo de una

2. MATERIALES Y MÉTODOS

reacción en ese punto, se construyen histogramas de la cantidad de veces que algún punto fue muestreado dentro de una subdivisión del rango de cada componente (reacción). Generalmente cada reacción tendrá una distribución normal, el valor medio de la gaussiana indicará el valor de flujo que fue muestreado más veces y por lo tanto el flujo más probable de ocurrir. En otras palabras, el valor de flujo estimado por este método corresponde al flujo más probable de acuerdo a la distribución normal del histograma de puntos muestreados respecto de la geometría del espacio de soluciones. O dicho de otro modo, el flujo estimado corresponde al flujo que el sistema, en este caso la célula, tiene más formas de propiciar (figura 9).

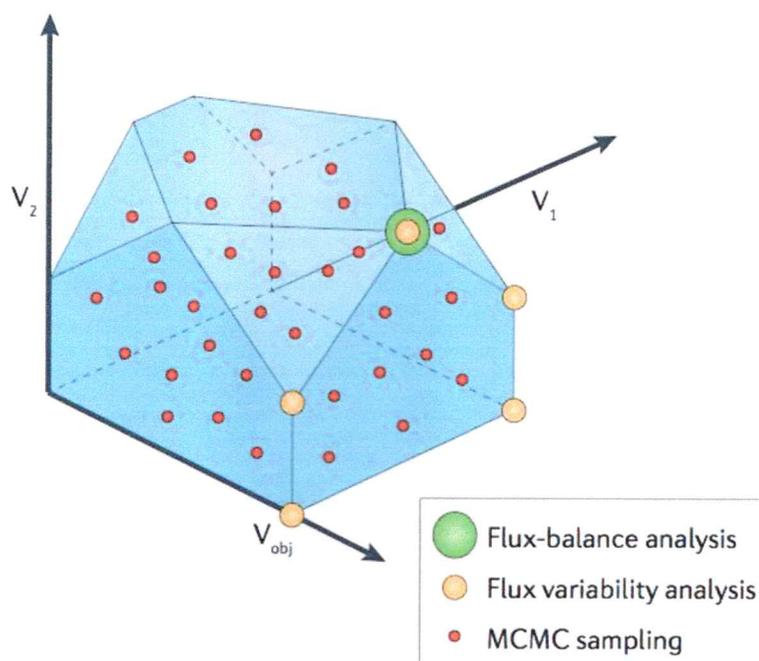


Figura 9. Determinación de los flujos metabólicos mediante distintos métodos de simulación. Se representa el espacio de soluciones simplificado a dos reacciones (V_1 y V_2) y la tercera reacción es la función objetivo. El círculo verde representa la aproximación generalmente usada en el análisis de balance de flujos que minimiza o maximiza una función objetivo dada por el investigador. Los círculos amarillos representan el enfoque del análisis de la variabilidad del flujo (FVA, siglas en inglés), en el que los flujos máximos y mínimos a través de cada reacción se calculan iterativamente cuando el flujo del objetivo función está limitado a su valor máximo. Por último, los círculos rojos representan un muestreo de distribuciones de flujo mediante Monte Carlo por cadenas de Markov que proporciona una distribución de probabilidad para los flujos. Este último enfoque no tiene sesgo, ya que no se requiere el presupuesto de una función objetivo. Esta figura fue tomada de Bordbar y col. 2014.

3. Resultados

3.1 Construcción de cepas con alteraciones en la producción de NADPH.

Este estudio tiene como objetivo medir la redistribución de flujos metabólicos frente a una disminución del flujo de carbono a través de oxPPP y observar cambios en el aporte al *pool* de NADPH desde otros puntos de producción. Para lograr esto, se construyó una cepa cuya característica principal es tener alterado los aportes de NADPH en oxPPP a través del *knock-out* del gen de la transcetolasa *tktA* ($\Delta tktA$). Además, se realizaron dos modificaciones adicionales paralelas, tomando como cepa parental $\Delta tktA$, se afectó la producción de NADPH dependiente de NADH, eliminando la transhidrogenasa PntAB (deleción de los genes *pntA* y *pntB*), y se expresó de forma heteróloga la enzima NADH oxidasa (NADHox). Las cepas generadas y sus propiedades genéticas distintivas se enumeran en la tabla 1.

Para construir las cepas *knock-out*, se reemplazaron los genes objetivo con el gen de resistencia al antibiótico kanamicina mediante recombinación homóloga por el método de Datsenko-Wanner (43) (ver sección materiales y métodos 2.1).

3. RESULTADOS

La secuenciación de los *locus* genómicos de interés confirmó el éxito del procedimiento (figura 10). Para generar la doble mutante, primero se eliminó el gen de resistencia, dejando una secuencia remanente en el genoma, para luego repetir el proceso en el segundo gen objetivo. A ambas mutantes se les logró remover el gen de resistencia a kanamicina. A esta *knock-out* doble se sometió a secuenciaciones para comprobar el reemplazo (figura 10 C).

Tabla 1. Cepas con alteraciones metabólicas y sus principales características genéticas

Nombre de la cepa	Características genéticas	Origen
MG1655	Parental	Donado por el laboratorio del Dr. Palsson
$\Delta tktA$	<i>Knock-out</i> del gen <i>tktA</i> de la isoenzima transcetolasa A. <i>tktA::FRT</i>	Este estudio
$\Delta pntAB$	<i>Knock-out</i> de los genes <i>pntA</i> y <i>pntB</i> , de la transhidrogenasa de membrana. <i>pntA</i> y <i>pntB::FRT</i> .	Este estudio
$\Delta tktA \Delta pntAB$	<i>Knock-out</i> de los genes <i>tktA</i> , <i>pntA</i> y <i>pntB</i> . <i>tktA::FRT</i> y <i>pntA</i> y <i>pntB::FRT</i> .	Este estudio
MG1655 NADHox	Expresión heteróloga de la enzima NADH oxidasa en el plásmido pTrc99A regulable mediante IPTG	Este estudio
$\Delta tktA$ NADHox	Expresión heteróloga de la enzima NADH oxidasa en el plásmido pTrc99A regulable por IPTG, en un contexto genético <i>knock-out</i> del gen <i>tktA</i> . <i>tktA::FRT</i>	Este estudio

Ver anexo tabla S1 para cepas intermediarias del proceso

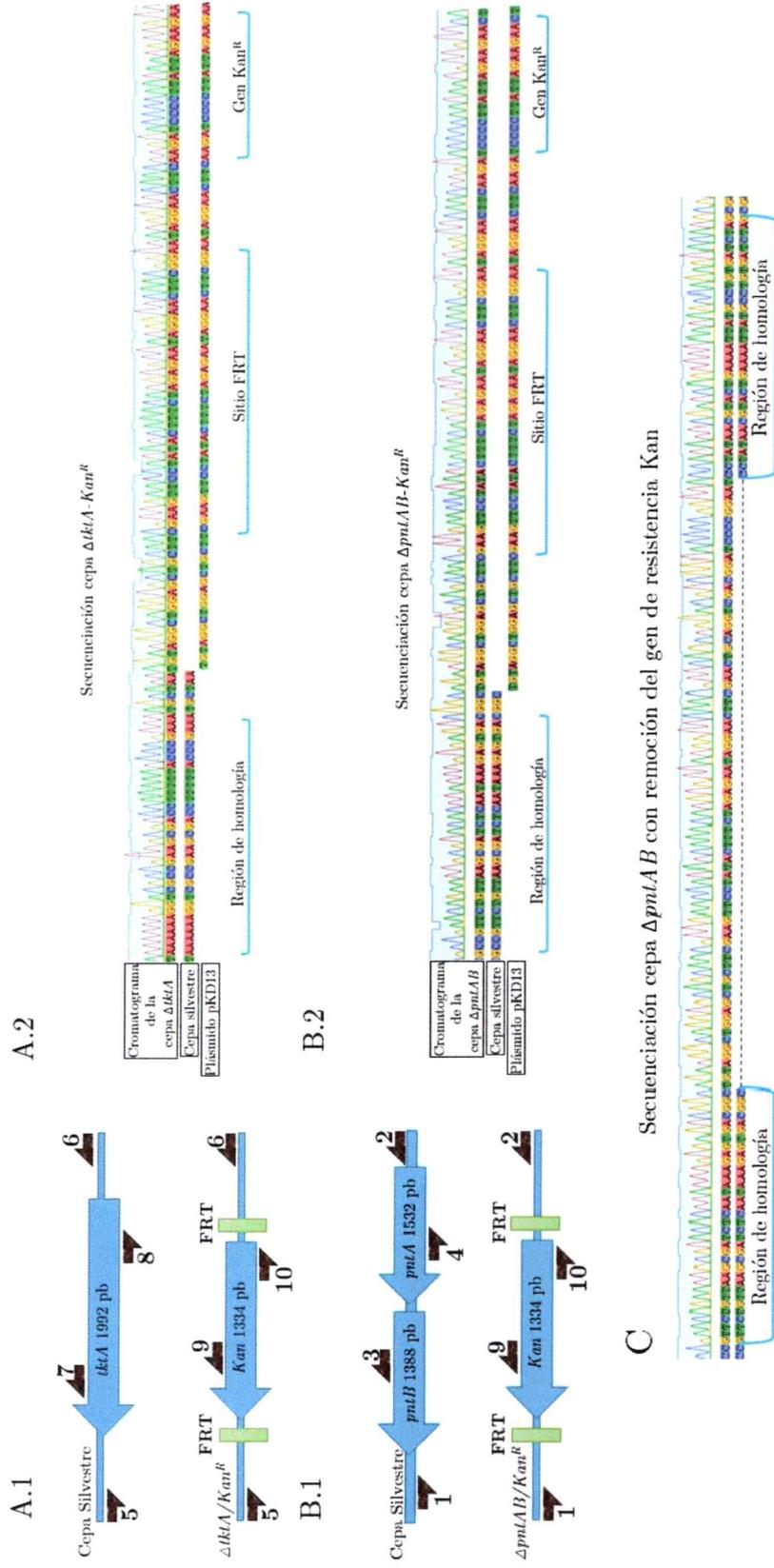


Figura 10. Verificación de la construcción de las cepas mediante secuenciación. A.1 y B.1, esquemas de los cambios genéticos realizados. Las flechas azules indican los genes de interés y la direccionalidad. Las flechas negras indican las posiciones y la direccionalidad de los *primers* utilizados para las secuenciaciones. A.2 y B.2, verificación que se realizó mediante secuenciación, se ejemplifica la secuenciación del partidor 5 y 1, para los *locus pntAB* y *tktA*, en la cepa $\Delta pntAB$ y $\Delta tktA$, respectivamente. En C se muestra la secuenciación del *locus pntA* y *pntB* luego de la remoción del gen de resistencia a kanamicina ocupando los sitios FRT.

3. RESULTADOS

Para la expresión heteróloga episomal de la enzima NADH oxidasa (NADHox), se usó el plásmido pTrc99A-NADHox que contiene el gen de la NADH oxidasa. El plásmido fue totalmente secuenciado, comprobándose la presencia de la NADH oxidasa y de la secuencia de resistencia a ampicilina. El plásmido fue ocupado para transformar la cepa silvestre MG1655 y la cepa *knock-out* $\Delta tktA$. Estas transformantes fueron seleccionadas mediante uso de ampicilina, y su análisis mediante electroforesis en gel de agarosa, comprobando su presencia en las cepas.

La expresión de NADH oxidasa apunta a disminuir la disponibilidad de NADH intracelular. En este sentido, se ha observado que la disponibilidad de NADH tiene una correlación proporcional a la excreción de acetato (Vemuri y col. 2006; Holm y col. 2010). Si se compara la producción de acetato de la cepa $\Delta tktA$ expresando NADH oxidasa, con respecto a la cepa parental $\Delta tktA$, se observa una disminución de aproximadamente un 75%, lo que sería coherente con la disminución de la disponibilidad de NADH en la cepa que expresa NADH oxidasa. Además, si se compara la tasa máxima de crecimiento de la cepa silvestre que expresa NADH oxidasa con respecto a lo informado en literatura, se encuentra solamente un 8% de diferencia entre ambas (Vemuri y col. 2006).

3.2 Determinación de los parámetros fisiológicos de cultivos en tasa de crecimiento máxima.

Los parámetros fisiológicos de los cultivos por *batch* se determinaron mediante crecimiento en biorreactor. Se realizó un seguimiento a la densidad óptica a 600 nm, el peso seco y la cantidad de glucosa y metabolitos de fermentación en muestras obtenidas a distintos tiempos. Con estos datos se calculó la tasa de crecimiento máxima en cultivos por *batch*, el factor de conversión “f” de absorbancia a peso seco, el consumo de glucosa y la producción de metabolitos de fermentación. Se calculó el factor “f” de conversión de absorbancia a peso seco de 0,44 gramos de peso seco por litro por unidad de absorbancia (figura 11). El experimento de factor de conversión se replicó para la cepa $\Delta tktA$, en cultivos por *batch*, obteniéndose el mismo valor.

El efecto en la tasa de crecimiento de la delección del gen *tktA* sobre distintos contextos genéticos muestra que todas las modificaciones genéticas que alteran la homeostasis redox disminuyen su crecimiento en medio mínimo M9 aeróbico con glucosa como única fuente de carbono (figura 12). En la cepa $\Delta tktA$, la tasa máxima de crecimiento baja en aproximadamente un 10% con respecto a la cepa silvestre. Las modificaciones genéticas que se generan sobre la cepa $\Delta tktA$, presentan un mayor efecto sobre la tasa de crecimiento, tal como se observa para las cepas $\Delta tktA \Delta pntAB$

3. RESULTADOS

y $\Delta tktA$ NADHox, que disminuyen su tasa de crecimiento en un 10% y un 30% comparado con la cepa $\Delta tktA^{25}$, respectivamente.

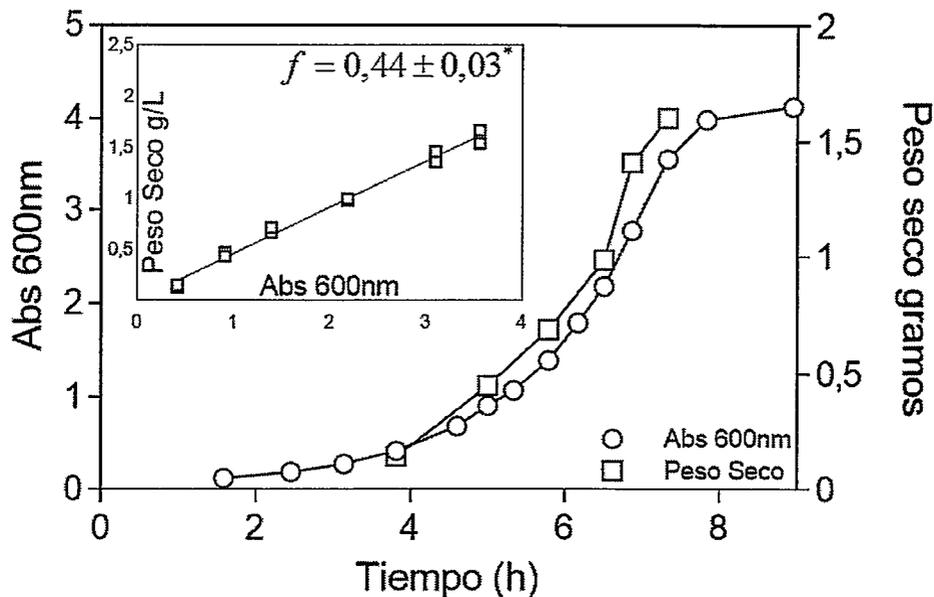


Figura 11. Curva de crecimiento de la cepa silvestre en modo *batch*. En el recuadro se observa el factor “f” de conversión absorbancia a peso seco calculada. *Representa el promedio y la desviación estándar de al menos 3 cultivos independientes.

A continuación se midieron la tasa de consumo de glucosa y producción de metabolitos de fermentación en cada una de las cepas. Para calcular la tasa de consumo de glucosa se construyen curvas que relacionan el peso seco de las bacterias con el consumo de glucosa remanente en el cultivo por *batch* (figura 13).

²⁵ A lo largo de este trabajo se comparará las cepas $\Delta tktA \Delta pntAB$ y $\Delta tktA$ NADHox contra la cepa $\Delta tktA$, es decir, su cepa parental desde la cual fueron generadas.

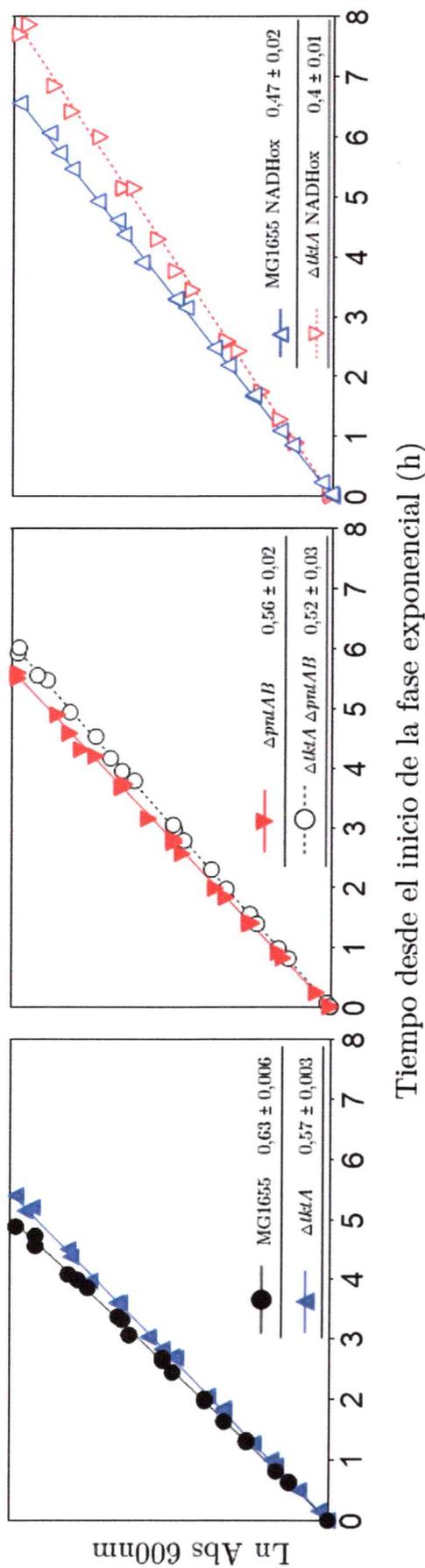


Figura 12. Efecto en la tasa de crecimiento de la delección del gen *tktA* sobre distintos contextos genéticos. Cada conjunto de puntos representan al menos tres cultivos independientes. Se muestra en el recuadro las tasas de crecimiento máximas y su desviación estándar calculadas a partir de cada una de estas curvas. El análisis ancova de estas regresiones lineales, con un $P < 0,05$, muestran ser todas significativamente distintas unas de otras. El tiempo de estas curvas se normalizó, tomando como tiempo cero, el fin de la fase de latencia.

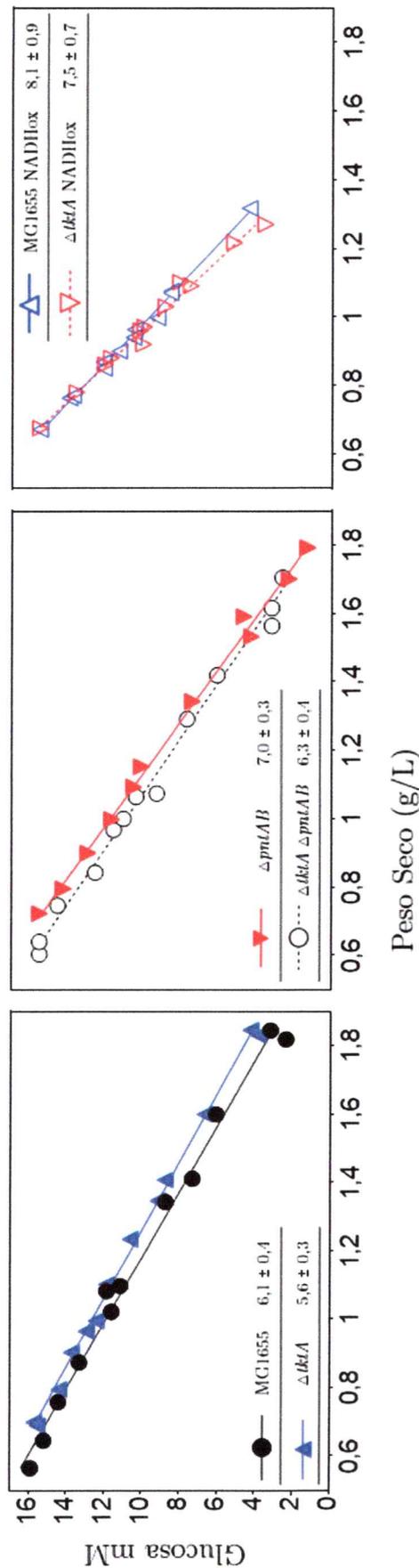


Figura 13. Efecto en la tasa de consumo de glucosa de la delección del gen *tktA* sobre distintos contextos genéticos. En el recuadro se muestra la tasa de consumo de glucosa²⁶ medida en $\text{mmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ y la desviación estándar. Estos puntos son obtenidos de al menos 3 cultivos independientes. No se muestran puntos de menor peso seco que 0,6 g/L, debido a que no tienen un comportamiento lineal con respecto a estas curvas. El análisis ancova de estas regresiones lineales, con un $P < 0,05$, muestran ser todas significativamente distintas unas de otras.

²⁶ Se hace notar que el cálculo de esta tasa de consumo incorpora la tasa de crecimiento. El valor recíproco de la pendiente de estas curvas son el rendimiento de biomasa en glucosa.

Al igual que lo ocurrido en la tasa de crecimiento, los cambios genómicos en las cepas conllevan una variación en el consumo de glucosa. El dato más relevante de esta medición es la disminución de la tasa de consumo de glucosa de la cepa $\Delta tktA$, lo cual podría indicar un mecanismo de respuesta en el control del consumo de glucosa a variaciones del flujo metabólico a través de oxPPP.

La cepa $\Delta tktA \Delta pntAB$ disminuye su incorporación de glucosa comparándola con su cepa "parental" $\Delta pntAB$ en un 10%. En cambio, con respecto a la otra cepa "parental" $\Delta tktA$, esta aumenta el consumo en un 12%.

La cepa $\Delta tktA NADHox$ disminuye su incorporación de glucosa un 8% comparándola con su cepa "parental", es decir, la cepa expresando la NADH oxidasa en un contexto genómico silvestre. En cambio, con respecto a la cepa $\Delta tktA$, esta aumenta el consumo en un 25%.

Con respecto a la producción de metabolitos de fermentación en cultivos por *batch* se detectó en todos los casos solo la presencia de acetato (figura 14).

Los cambios genómicos en las cepas conllevan una variación en la producción de acetato, como se mencionó en la introducción esta variación es un indicativo del *metabolic overflow*.

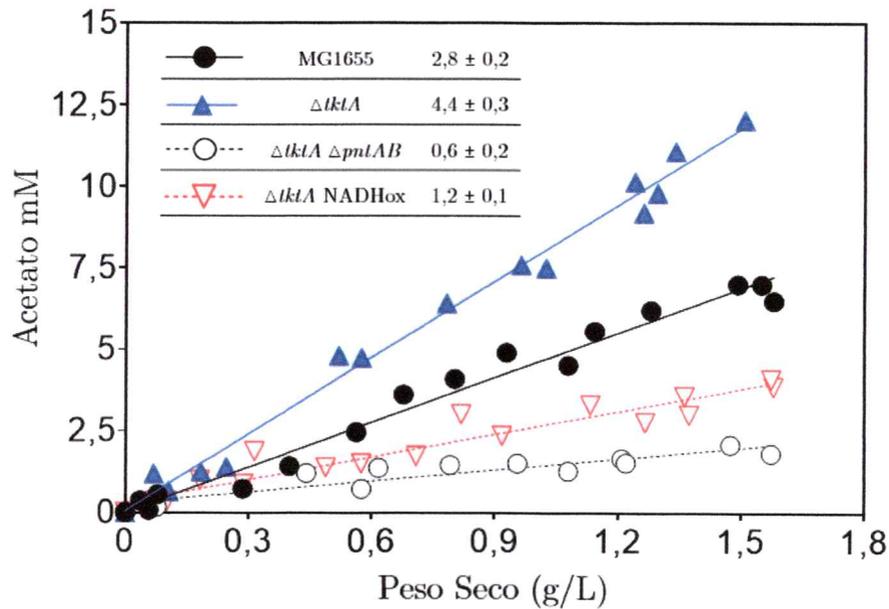


Figura 14. Tasa de producción de acetato en cultivo por *batch*. En el recuadro se muestra la tasa de producción de acetato²⁷ medida en mmol * peso seco g⁻¹ * h⁻¹. Estos puntos son obtenidos de al menos 3 cultivos independientes. No se muestran puntos de mayor peso seco que 1,6 g/L, debido a que no tienen un comportamiento lineal con respecto a estas curvas. El análisis ancova de estas regresiones lineales, con un P<0,05, muestran ser todas significativamente distintas unas de otras.

Al comparar la producción de acetato de la cepa silvestre con respecto a la cepa $\Delta tklA$ se observa un aumento de alrededor de un 60% en la mutante. Concordante con este aumento, el rendimiento de la producción acetato por el consumo de glucosa, aumenta desde 0,27 g/g hasta 0,45 g/g. Esto podría interpretarse como un indicativo, dado el fenómeno de *metabolic overflow*, que la actividad del ciclo de Krebs disminuye en esta mutante, ya que se estaría

²⁷ Se hace notar que el cálculo de esta tasa de producción incorpora la tasa de crecimiento. El valor recíproco de la pendiente de estas curvas son el rendimiento de acetato en glucosa.

desviando una mayor parte del piruvato hacia la producción de acetato en la cepa $\Delta tktA$.

En el caso de la producción de acetato la cepa $\Delta tktA \Delta pntAB$ presenta una disminución de casi un 80% con respecto a la cepa $\Delta tktA$. En términos de rendimiento, se calculó 0,45 g/g para $\Delta tktA$ y 0,7 g/g la cepa $\Delta tktA \Delta pntAB$. Esta gran diferencia entre ambas, es un indicativo de la activación del ciclo de Krebs, en respuesta a la falta de actividad transhidrogenasa en la cepa $\Delta tktA \Delta pntAB$.

En el caso de la cepa $\Delta tktA NADHox$ ésta disminuye su producción de acetato alrededor de un 75% con respecto a $\Delta tktA$. Como se mencionó en la introducción, la expresión de $NADHox$ aumenta el flujo glicolítico en *E. coli*. Por lo cual, una menor producción de acetato indicaría una actividad del ciclo de Krebs aumentada en la cepa $\Delta tktA NADHox$ comparada con $\Delta tktA$.

Comparada con la cepa silvestre, todas las cepas con alteraciones en la homeostasis redox disminuyen su rendimiento de biomasa generada por glucosa consumida. Esto podría indicar que la capacidad de producir NADPH en estas cepas está impedida, al no alcanzar la misma productividad que en la cepa silvestre. Esto conllevaría a decir, que la compensación en la producción de

3. RESULTADOS

NADPH (la redistribución de flujos) sucede en cierta medida, por lo cual, las reacciones de producción de NADPH no son totalmente intercambiables (tabla 2).

Tabla 2. Parámetros fisiológicos de la cepa silvestre y las cepas mutantes

Cepa	μ	Q_s	$\gamma_{x/s}$	Q_a	$\gamma_{ace/s}$
MG1655	$0,63 \pm 0,006$	$6,1 \pm 0,4$	0,57	$2,8 \pm 0,2$	0,27
$\Delta tktA$	$0,57 \pm 0,003$	$5,6 \pm 0,3$	0,56	$4,4 \pm 0,3$	0,45
$\Delta pntAB$	$0,56 \pm 0,02$	$7,0 \pm 0,3$	0,43	n.r.	n.r.
$\Delta tktA \Delta pntAB$	$0,52 \pm 0,03$	$6,3 \pm 0,4$	0,42	$0,6 \pm 0,2$	0,07
MG1655 NADHox	$0,47 \pm 0,02$	$8,1 \pm 0,9$	0,32	n.r.	n.r.
$\Delta tktA$ NADHox	$0,4 \pm 0,01$	$7,5 \pm 0,7$	0,29	$1,2 \pm 0,1$	0,14

Todas las mediciones son al menos en triplicado. μ , tasa de crecimiento (h^{-1}); Q_s , tasa de consumo de glucosa ($mmol \cdot peso\ seco\ g^{-1} \cdot h^{-1}$); Q_a , tasa de producción de acetato ($mmol \cdot peso\ seco\ g^{-1} \cdot h^{-1}$); $\gamma_{x/s}$ rendimiento de biomasa a partir del sustrato ($g \cdot g^{-1}$); $\gamma_{ace/s}$ ($g \cdot g\ peso\ seco^{-1}$). n.r. = no realizado

Se encuentran publicadas las tasas de crecimiento de las cepas $\Delta pntAB$ y MG1655 NADHox. Los resultados obtenidos presentaron diferencias con estos datos. Con respecto a la cepa $\Delta pntAB$ ($0,45 h^{-1}$, tabla 2) hay una diferencia de un 20% (Sauer y col. 2004) y con respecto a la cepa MG1655 NADHox ($0,51 h^{-1}$, tabla 2) se observa una diferencia de un 8% (Vemuri y col. 2006).

3.3 Condiciones para lograr el estado estacionario en el análisis de balance de flujos ocupando parámetros fisiológicos. Relevancia del ATP de mantención.

Los datos experimentales fueron usados para realizar análisis de balance de flujos, tanto los obtenidos mediante cultivos por *batch*, como los recolectados en cultivos continuos. Como se dijo en la sección de materiales y métodos, este análisis realiza una estimación de los flujos intracelulares, ocupando un conjunto de restricciones experimentales y una función objetivo, la cual generalmente es biomasa.

Por otra parte, en el análisis del balance de flujos metabólicos, el estado estacionario significa que la optimización del modelo encontró una solución posible dentro de las restricciones impuestas y la función objetivo usada. La primera aproximación que tomó este trabajo es averiguar si los datos obtenidos experimentalmente son concordantes con la obtención del estado estacionario.

La función objetivo que se ocupa mayoritariamente en las publicaciones es la maximización de biomasa. Por lo cual, la cantidad de glucosa consumida es un valor crítico para los cálculos de optimización por FBA. El límite superior del valor del consumo de glucosa que uno imponga como restricción al modelo, será siempre el que el modelo ocupe. En otras palabras, es lógico que, si uno está



optimizando la cantidad de biomasa producida, el consumo de la fuente de carbono será siempre la más alta posible.

Por otro lado, es posible fijar la tasa de crecimiento al valor obtenido experimentalmente y preguntarle al modelo cual es la mínima cantidad de glucosa requerida para cumplir ese valor. Si ese valor calculado es mayor, que el medido experimentalmente para la tasa de consumo de glucosa, se concluye que no existirá estado estacionario usando ambos valores experimentales como restricciones.

El caso contrario, es que la tasa de consumo de glucosa sea sobreestimada por el modelo, es decir, la tasa de consumo de glucosa medida experimentalmente es mayor que la tasa mínima predicha por el modelo, en cuyo caso, usando ambos valores experimentales como restricciones, se encontrará un estado estacionario. Sin embargo, este estado estacionario calcula que existe una parte de glucosa extra, que se consume en ciclos fútiles o generación de metabolitos de fermentación. Hay que recordar que no puede ser acetato, ya que es otra de las restricciones experimentales de estas simulaciones.

El último caso, el ideal, sería que la cantidad de glucosa mínima predicha sea exactamente el valor experimental, con lo cual, los tres valores obtenidos

experimentalmente (biomasa, glucosa y acetato) puedan ser ocupados en conjunto para dilucidar la distribución de flujos metabólicos.

Ocupando los datos experimentales obtenidos (tabla 2), además de datos extraídos de literatura, se realizaron cálculos de optimización ocupando como restricciones la tasa de producción de acetato y la tasa de crecimiento específica, donde la función objetivo es la minimización de la cantidad de glucosa consumida (tabla 3). Los modelos ocupados son: iJO1366 (Orth y col. 2011), iAF1260 (Feist y col. 2007) y el modelo CORE, que es un subconjunto de reacciones de vías centrales y otras relevantes del modelo iAF1260.

Si se compara las tasas de consumo mínimas de glucosa calculados con cada modelo, comparado con el valor experimental, este último es menor, es decir, no se alcanza estado estacionario. Como se observa, la mayor cantidad de casos representan mediciones del consumo de glucosa que son menores a las mínimas requeridas según los cálculos de los modelos. Al contrario, cuando se alcanza estado estacionario, el valor obtenido para la glucosa experimentalmente, sobrepasa lo calculado por el modelo, por lo tanto, el modelo predice una mayor biomasa generada.

3. RESULTADOS

Tabla 3. Comparación de las tasas de consumo mínimo predichas de glucosa según distintos modelos y datos experimentales

Modelo	Predicción de la tasa de consumo de glucosa mínima	Tasa de producción de acetato	Tasa de consumo de glucosa	Referencia
CORE	<u>7,33</u>			
iAF1260	<u>6,89</u>	2,5	6,1	Este estudio, cultivo por <i>batch</i>
iJO1366	<u>6,43</u>			
CORE	<u>2,65</u>			
iAF1260	<u>2,42</u>	0	2,52	Este estudio, cultivo continuo
iJO1366	<u>2,13</u>			
CORE	<u>8,24</u> / 8,7**			
iAF1260	<u>7,94</u> / 8,3*	5,8	8,7	Chen y col. 2011, cultivo por <i>batch</i>
iJO1366	<u>7,53</u> / 8,08*			
CORE	<u>8,56</u>			
iAF1260	<u>8,16</u>	3,15	7,5	Sauer y col. 2004, cultivo por <i>batch</i>
iJO1366	<u>7,68</u>			
CORE	<u>4,81</u>			
iAF1260	<u>4,49</u>	0,08	4,0	Kayser y col. 2005, cultivo continuo
iJO1366	<u>4,12</u>			

Los valores con subrayado simple, corresponde cuando no se alcanza estado estacionario. Los valores subrayado doble corresponde cuando se alcanza estado estacionario. Los valores con asteriscos se obtienen una vez que se usa el valor de ATP de mantención de 17,2 mmol*peso seco g⁻¹*h⁻¹ (Chen y col. 2011). El doble asterisco indica el único modelamiento donde se obtiene concordancia entre lo calculado y lo medido experimentalmente. Las unidades del consumo de glucosa y de producción de acetato son mmol*peso seco g⁻¹*h⁻¹.

Por otro lado, existen casos donde se obtiene lo contrario. Esto se ejemplifica para los datos de la cepa silvestre publicados (Chen y col. 2011), para alcanzar la tasa de crecimiento de 0,58 observada experimentalmente, se necesita

solamente 8,24-7,5 mmol*peso seco $g^{-1}h^{-1}$, por lo cual, si uno impone el valor experimental de 8,7 mmol*peso seco $g^{-1}h^{-1}$ en todos los casos, se calcularía una tasa de crecimiento mayor.

Ahora bien, se realizó un estudio sistemático de la capacidad predictiva de varias funciones objetivos, entre ellas, la optimización de la cantidad de ATP producida, concluyéndose que bajo la escasez de nutrientes en cultivos continuos, la maximización lineal de los ATP alcanza la más alta precisión predictiva (Schuetz y col. 2007). Aún más, en un caso presentado en la tabla 3, se observa que el ATP de mantención es un factor importante en la correlación entre las simulaciones y los datos experimentales. Se informó que la cantidad de ATP que participa en la mantención de los procesos celulares, es un tercio del ATP producido: 17,2 mmol*peso seco $g^{-1}h^{-1}$ (Chen y col. 2011). Este valor es crítico, ya que en los modelos CORE e iAF1260, el ATP de mantención que viene por defecto en el modelo es de 8,39 mmol*peso seco $g^{-1}h^{-1}$ y en el modelo iJO1366 es de 3,15 mmol*peso seco $g^{-1}h^{-1}$. Esta discrepancia es muy importante, ya que si uno modifica el valor del ATP de mantención hasta el valor informado, la cantidad de glucosa requerida por el modelo CORE, es igual a la cantidad informada en la

publicación. En el caso de los otros dos modelos, la cantidad de glucosa mínima se asemeja más a lo medido experimentalmente.

En conclusión, se muestra la relevancia del ATP de mantención como función objetivo, destacando además, que el uso de esta función, permite la optimización con 3 restricciones experimentales (tasa de crecimiento, consumo de glucosa y producción de acetato), comparado con las otras funciones objetivo, que requieren, o la tasa de crecimiento o el consumo de glucosa y que, además, sean susceptibles de variar. En el mismo sentido, se hace hincapié en que se han informado en literatura distintos valores para el ATP de mantención, lo que sugiere que no es un valor fijo, sino más bien depende de las condiciones genéticas de la cepa y/o ambientales del cultivo. Adicionalmente, en literatura se encuentra que el uso de esta función objetivo se ha probado en otros organismos como *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida utilis* (van Gulik y Heijnen 1995).

Por otro lado, se decidió ocupar el modelo iJO1366 para las simulaciones que se mostraran en los próximos acápite, por dos razones, 1) los resultados de la optimización muestran una cercanía mayor con los resultados experimentales y 2)

es el modelo estequiometrico más actual de *E. coli* y que abarca todas las reacciones conocidas de *E. coli* hasta la fecha²⁸.

3.4 La disminución del consumo de glucosa como respuesta a la restricción en el flujo de carbono en noxPPP

Uno de los rasgos fisiológicos que caracteriza a la cepa $\Delta tktA$ es mostrar una disminución en el consumo de glucosa comparado con la cepa silvestre. Para entender esta disminución se realizaron variadas simulaciones ocupando FBA (figura 15).

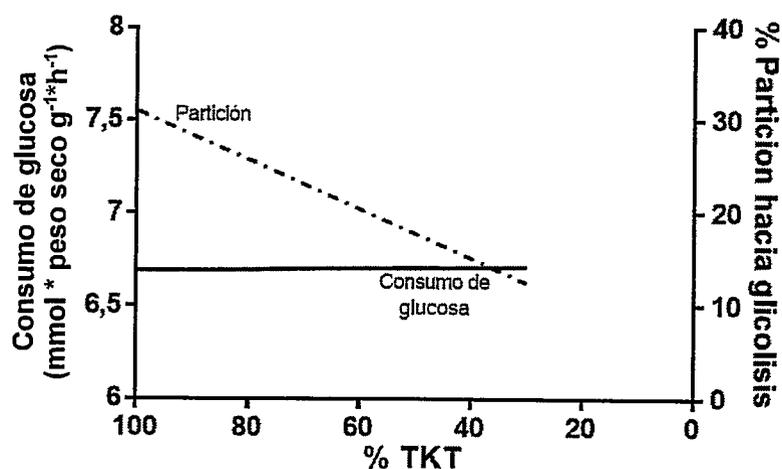


Figura 15. Simulación de la variación de la partición en el metabolito G6P y consumo mínimo de glucosa predicho por el modelo cuando se varía el flujo de las reacciones de transcetolación. Con los valores de 20%,10% y 0%, no se encuentra estado estacionario. Se usaron los datos experimentales de la $\Delta tktA$, buscando el mínimo consumo de glucosa predicho por el modelo. Las unidades del consumo de glucosa son $\text{mmol} \cdot \text{peso seco} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

²⁸ Los modelos usados en literatura, especialmente en experimentos de ^{13}C , carecen de ciertas vías, cuya presencia depende, en la mayoría de los casos, a razones de simplificación de cálculos. Ejemplos: 1) No se considera la vía Entner-Doudoroff (Holm y col. 2010); 2) No se considera la vía del glioxilato (Jiao y col. 2003); 3) No se considera las transhidrogenasas (Martínez y col. 2008)

El consumo mínimo de glucosa predicho por el modelo, no cambia sustancialmente a medida que se disminuye el flujo en las reacciones de transcetolación en noxPPP. La respuesta que se observa, es mas bien variar la partición del flujo en el nodo G6P disminuyendo desde un 30% hacia oxPPP, hasta un 10% aproximadamente (figura 15). Como las observaciones experimentales y de calculo de estado estacionario no se condicen entre sí, se dedujo que el consumo de glucosa, como respuesta a la disminución del flujo en oxPPP, podría deberse a que la partición en el nodo del metabolito G6P no sea libre de variar (figura 15).

3.5 Determinación de los parámetros fisiológicos de cultivos en tasa de crecimiento fija.

Los parámetros fisiológicos se determinaron a una tasa fija de crecimiento de $0,2 \text{ h}^{-1}$ mediante cultivo continuo en biorreactor. Se realizó un seguimiento a la densidad óptica a 600 nm, el peso seco y la cantidad de glucosa y metabolitos de fermentación en muestras obtenidas a distintos tiempos.

Los cultivos continuos se separan en dos fases, la primera es donde se obtiene suficiente biomasa por el modo *batch*, para luego comenzar el recambio de medio a la tasa de dilución deseada. Para asegurar el estado estacionario del

sistema, se monitorea la absorbancia del cultivo y la cantidad de oxígeno disuelto esperando que estos valores se estabilicen a medida que ocurran los tiempos de residencia (figura 16). Se realizaron los cultivos de las cepas: silvestre, $\Delta tktA$, $\Delta tktA \Delta pntAB$ y $\Delta tktA$ NADHox. En todos estos cultivos realizados se observó la cinética que se muestra en la figura 16, cuando se alcanza el estado exponencial tardío, se da inicio a la fase del cultivo continuo. Se observan oscilaciones de la absorbancia, hasta que se alcanza un valor estable alrededor de 2,2 OD_{600nm}. En el caso del oxígeno disuelto, la estabilización ocurre alrededor del 75-80%. Nótese que en esta curva, se observan dos picos, uno a las 22 horas y otro a las 38 horas. Estos corresponden a los tiempos cuando el cultivo dejaba de recibir glucosa por un par de minutos (al intercambiar las botellas de los medios). Para todas las cepas, las muestras sacadas a partir de cultivos desde la hora 10 en adelante, no se observó glucosa en el medio, indicando un consumo total del sustrato. Además, no se logró detectar metabolitos de fermentación pasadas las 15 horas de cultivo. Al igual que en cultivos por *batch*, se obtuvo un factor de conversión “f” de absorbancia a peso seco de 0,44, para las cuatro cepas evaluadas.

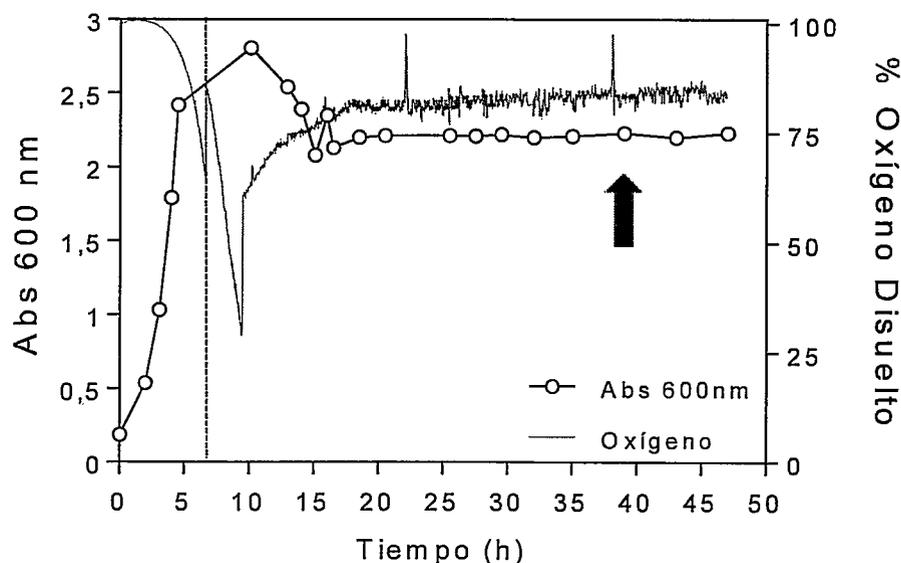


Figura 16. Curva de crecimiento de la cepa silvestre en modo continuo. En círculos se observa la absorbancia y en línea continua el porcentaje de oxígeno disuelto. La línea punteada marca el tiempo en el cual se cambia al modo de cultivo continuo, alrededor de las 6 horas. La flecha indica cuando ocurre el recambio al medio con la glucosa marcada isotópicamente, luego de aproximadamente 5 tiempos de residencia.

Luego de aproximadamente 5 tiempos de residencia, donde se observan valores estables de los parámetros de cultivo, se realiza un recambio de medio con la glucosa marcada isotópicamente, en una condición se suplementa con 100% ^{13}C -glucosa y en otro caso con $\text{U-}^{13}\text{C}$ -glucosa. Se espera un tiempo de residencia para extraer las muestras para la medición de distribución de proporciones de isotómeros en los aminoácidos proteogénicos.

3.6 Obtención de los cocientes de flujo a partir del patrón de marcación isotópica de los aminoácidos proteogénicos

Para dilucidar la redistribuciones de flujos que ocurren en las cepas con la homeostasis redox perturbada, se usó el análisis de los cocientes de flujos metabólicos (Fischer y Sauer 2003; Fischer y col. 2004). Como se explicó en la sección métodos 2.3, a partir de los vectores de distribución de masas de los distintos aminoácidos se puede calcular los vectores de distribución de masas de los metabolitos intermediarios y a partir de estos, calcular los cocientes de flujos (Emmerling y col. 2002; Yang y col. 2003). Se ejemplifica la obtención de uno de ellos, serina a través de glicolisis (tabla 4). Se muestran la resolución por la izquierda de la división matricial en el recuadro “command window” (MatLab) basándonos en la fórmula número 3 de la sección 2.3.4. Este resultado corresponde al obtenido para la cepa silvestre. Para las demás cepas, el valor de la matriz B y C son iguales, lo que cambia es el vector de distribución de masas de la serina 1-3. El resultado se puede expresar como la fracción de un intermediario originándose desde alguna vía específica para las cepas de *E. coli* estudiadas (figura 17). Estos valores y sus errores estándar son obtenidos por el software FiatFlux (Zamboni y col. 2005).

Tabla 4. Obtención del Cociente de flujo serina a través de glicolisis para la cepa silvestre.

Vector de distribución de masas de serina MDV _{AA,SERL3}	Contribución de la glicolisis al <i>pool</i> de serina MDV _{GLI}	Contribución de 3 átomos de carbono sin marcar MDV _{ED,PPP}	Resolución en MatLab Command Window
$\begin{pmatrix} 0,696 \\ 0,286 \\ 0,018 \\ 0,001 \end{pmatrix}$	$B = \begin{pmatrix} 0,489 \\ 0,500 \\ 0,011 \\ 0,000 \end{pmatrix}$	$C = \begin{pmatrix} 0,968 \\ 0,031 \\ 0,000 \\ 0,000 \end{pmatrix}$	<pre>>> SER13=[0.696 0.286 0.018 0.001]; >> B=[0.489 0.500 0.011 0.000]; >> C=[0.968 0.031 0.000 0.000]; >> RE=(SER13-C)/(B-C) RE = 0.5563</pre>

El vector MDV_{GLI} corresponde a la contribución de la glicolisis al *pool* de la serina, es la combinación entre un 50% de 3 átomos de carbono con la marca isotópica en el carbono 1 y un 50% de 3 átomos de carbono sin marcar. El vector MDV_{ED,PPP} es igual a 3 átomos de carbono sin marcar. Si se supone una pureza del sustrato del 99%, ambos MDV presentan idénticos valores en todos los casos. Como se observa, el valor obtenido es de 0.5563, que es representado en forma porcentual en la figura 17 como la primera columna del gráfico bajo el rótulo “serina a través de glicolisis” de la cepa silvestre.

Se logró determinar 4 cocientes de flujo, tres de los cuales provienen de experimentos con 100% de glucosa marcada en $1\text{-}^{13}\text{C}$ y uno (el límite superior de la cantidad de PEP a través de PPP) que proviene de experimentos con 20% glucosa marcada uniformemente y 80% de glucosa sin marcar (figura 17).

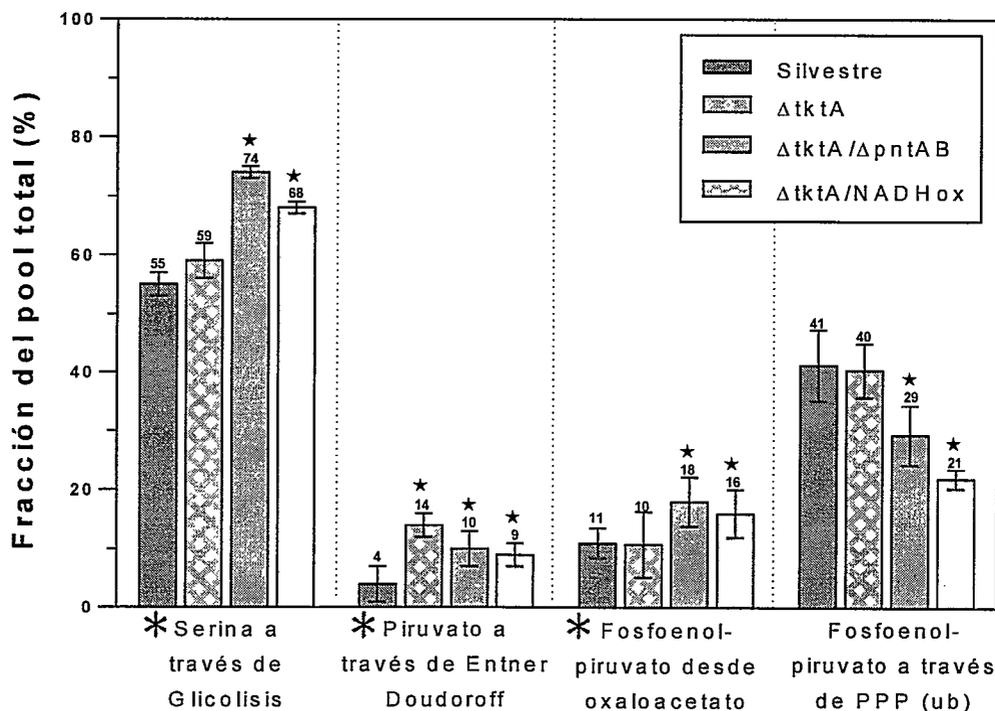


Figura 17. Origen de los intermediarios metabólicos en las cepas de *E. coli* estudiadas. Los cálculos se realizaron a partir del "toolbox" FiatFlux para Matlab. El error experimental se estimó a partir de distribuciones de masas redundantes, distintas formas de preparación de la muestra derivatizada y distintos métodos de obtención de datos a partir del GCMS. Los asteriscos indican los resultados obtenidos a partir de experimentos con 100% [$1-^{13}C$] de glucosa. PEP a través de PPP (ub o límite superior) se obtuvo a partir de experimentos con 20% [$U-^{13}C$] y 80% glucosa sin marcar. La estrella sobre las barras indica una diferencia estadísticamente significativa (prueba tukey, $P \leq 0,01$) entre la cepa silvestre y cada una de las modificaciones realizadas a las demás cepas.

Si se compara la fracción de serina producida a través de la glicolisis para la cepa silvestre con respecto a la cepa $\Delta tktA$ no se observa una diferencia significativa. En cambio, la cepa $\Delta tktA \Delta pntAB$ y $\Delta tktA NADHox$ aumenta un 19% y un 13% respectivamente con respecto a la cepa silvestre. Esto es una

evidencia experimental de que: 1) la restricción del flujo a través noxPPP no afectaría de forma significativa la partición en el metabolito G6P, 2) en la cepa $\Delta tktA \Delta pntAB$ la glicolisis presentaría un mayor flujo, y probablemente un ciclo de Krebs más activo 3) La cepa $\Delta tktA$ NADHox aumenta su flujo glicolítico, coherente con el hecho de que la actividad NADH oxidasa compite directamente con la disipación del gradiente de protones en la membrana, pudiendo evaluar como esa disminución afecta la disponibilidad de NADH para la actividad de PntAB.

Si se compara la fracción del piruvato producido a través de la vía Entner-Doudoroff para la cepa silvestre, con respecto a la cepa $\Delta tktA$, se observa una diferencia significativa de más de 3 veces de aumento en la cepa $\Delta tktA$. Si se observan las otras cepas estudiadas, $\Delta tktA \Delta pntAB$ y $\Delta tktA$ NADHox, también se observa un aumento, aunque en menor medida, con 2 veces de variación en ambos casos. Este aumento representa evidencia experimental de un mayor flujo a través de vía Entner-Doudoroff en las cepas que presentan una restricción al flujo a través de noxPPP.

En el caso de la cantidad de fosfoenolpiruvato que es producido desde oxaloacetato se observa que entre la cepa silvestre y la cepa $\Delta tktA$ no existen

variaciones significativas. Sin embargo, las otras dos cepas estudiadas, $\Delta tktA$ $\Delta pntAB$ y $\Delta tktA$ NADHox, presentan aumentos significativos de un 7% y un 5%, respectivamente. Este aumento podría indicar una evidencia de mayor actividad del ciclo de Krebs.

En el caso del fosfoenolpiruvato producido a través de PPP, es importante notar que este cociente de flujo es un límite superior (ver métodos), es decir, que cualquier valor que tome por debajo de este límite, está permitido como solución de la optimización. En términos prácticos, este cociente no fue usado directamente como restricción, sino como un valor a comparar luego de la optimización. En todos los cálculos realizados, se obtuvieron valores menores a este cociente.

Con la información de los cocientes de flujo se realizaron nuevas simulaciones (tabla 5), usando la maximización del ATP de mantención²⁹ como una de las funciones objetivo, realizando una comparación entre los valores obtenidos sin y con el uso del cociente de flujo.

²⁹ Reacción del ATP de mantención. $ATP + H_2O \rightarrow ADP + H + Pi$

3. RESULTADOS

Tabla 5. Simulaciones en la cepa silvestre optimizando tres funciones objetivo con los datos experimentales de los cultivos continuos.

	Minimizar la tasa de consumo de glucosa ^A	Maximizar la tasa de crecimiento ^B	Maximizar el ATP de mantención ^C
Sin CF*	2,13	0,24	12,4
Con CF	2,38	0,21	6,2

*CF (cociente de flujo)

^A Varma y col. 1993

^{B y C} Schuetz y col. 2007

Al comparar la optimización realizada cuando se minimiza la tasa de consumo de glucosa, con y sin presencia del cociente de flujo, se observa que el consumo de glucosa aumenta en el caso de usar las restricciones adicionales. Se remarca que el valor de 2,38 mmol*peso seco g⁻¹*h⁻¹ se aproxima más al valor experimental obtenido de 2,52 mmol*peso seco g⁻¹*h⁻¹. En el caso de la tasa de crecimiento, sucede algo similar, donde el valor de 0,21 h⁻¹ se asemeja más a la tasa de crecimiento fijada en el cultivo continuo 0,2 h⁻¹. En el caso de la optimización usando como función objetivo el ATP de mantención, se observa que existe una menor cantidad de ATP producido en el caso del uso del cociente de flujo. El valor de 6,2 mmol*peso seco g⁻¹*h⁻¹ está mucho más cercano del valor que fija el modelo iJO1366 por defecto (3,15 mmol*peso seco g⁻¹*h⁻¹).

3.7 Distribuciones de flujos metabólicos mediante el uso de cocientes de flujo y muestreo con Monte Carlo por cadenas de Markov.

Para obtener distribuciones de flujos metabólicos en las cepas estudiadas se realizó un muestreo del espacio de soluciones mediante el método de Monte Carlo por cadenas de Markov usando los cocientes de flujo provenientes de experimentos ^{13}C como restricciones adicionales además de la tasa de crecimiento, consumo de glucosa y producción de acetato. De forma relevante cabe destacar que este método no tiene sesgo, ya que no necesita la elección de una función objetivo, además, es capaz de explorar el espacio de soluciones sub-óptimo. Se hace recordar que al comparar los valores experimentales con la superficie de Pareto (simulados), se obtiene que la bacteria está en un estado sub-óptimo (Schuetz y col. 2012).

En una simulación realizada se observa la reacción ICDH en la cepa silvestre con una tasa de crecimiento de $0,2 \text{ h}^{-1}$ en dos condiciones, donde se usa solamente las restricciones de intercambio con el medio y la tasa de crecimiento, y otra, donde además de lo anterior, se modifica la matriz estequiométrica con los valores de cociente de flujo extraídos desde los experimentos de ^{13}C (figura 18, figura 19).

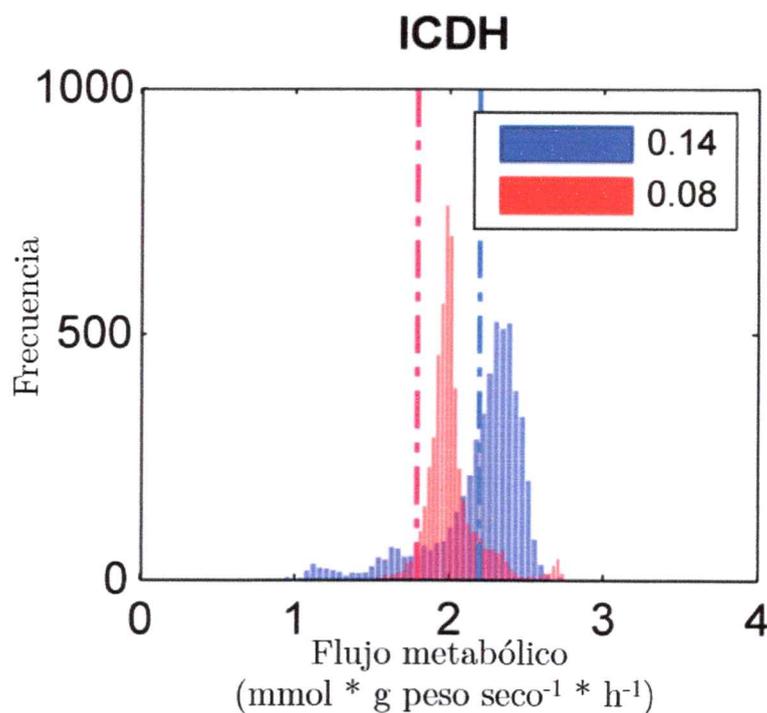


Figura 18. Histogramas del flujo de la reacción ICDH en la cepa silvestre mediante el método Monte Carlo por cadenas de Markov. Sin uso de cocientes de flujo (azul). Con uso de cociente de flujo (rojo). Las líneas punteadas son las soluciones óptimas calculadas usando la maximización del ATP como función objetivo. En el cuadro se muestra el coeficiente de variación (CV). Primero se realiza una prueba chi-cuadrado de bondad de ajuste para conocer si la distribución del histograma, corresponde a una normal. El coeficiente de variación muestra cuan dispersos están los valores en torno al promedio. Un valor alto indica mayor dispersión y, al revés, un valor más bajo indica una menor dispersión del histograma frente al promedio.

Este análisis tiene varias implicaciones, el uso de los cocientes de flujo: 1) restringe el espacio de soluciones, 2) cambia el valor del óptimo calculado, 3) cambia el valor medio de la gaussiana que indica el valor de flujo que fue muestreado más veces y 4) cambia la forma del histograma presentando una menor dispersión de los datos en torno al promedio, en otras palabras, su CV tiene un

valor menor 0,08, comparado con 0,14. El valor de flujo que fue muestreado más veces, en otras palabras, la media del histograma, fue ocupado como el valor en los mapas de flujo metabólico (figura 18).

Los flujos metabólicos medidos son afectados al usar los cocientes de flujo si se observan los resultados para un conjunto de las reacciones presentes en el modelo. En algunos casos, el espacio de soluciones resulta restringido al punto de que solo existe una solución. En otros, el histograma cambia de forma y/o sus límites inferior y superior, resultando otro flujo metabólico más probable (figura 19).

Los resultados muestran que lo primero a considerar es que la eliminación del gen *tktA* afecta el flujo a través de oxPPP. Aunque, no de la forma que esperábamos, ya que se ha visto en varias publicaciones, además de simulaciones, las enzimas G6PDH y 6PGDH tienden a aumentar o disminuir en forma conjunta (Holm y col., 2010; Martínez y col., 2008; Zhao y col., 2004). En este caso, el flujo a través de G6PDH no es mayormente afectado, e incluso contra lo esperado, aumenta ligeramente de un 47% a un 50%, si se compara con la cepa silvestre. Por otro lado, el flujo a través de 6PGDH se ve disminuido notoriamente, de un 40% hasta un 25%. Así, si se compara la cepa silvestre con la cepa Δ *tktA* se

observa inmediatamente, que el principal efecto de restringir el flujo a través de noxPPP es el aumento del flujo a través de la vía de ED, aumentando de un 7% hasta un 25%. Este efecto se observa en las otras dos cepas, $\Delta tktA \Delta pntAB$ y $\Delta tktA NADHox$, con 15% y 17% respectivamente. Los efectos sobre la producción de NADPH se analizarán a la luz de las bifurcaciones (figura 20).

Como se mencionó, las reacciones de producción de NADPH se encuentran en una de las ramas de bifurcaciones de las vías metabólicas. En estos términos, el efecto fisiológico de mutar la transcetolasa A (*tktA*), tiene un claro impacto en la partición del metabolito 6PG (la producción de NADPH baja de un 85% a un 50% con respecto a la cepa silvestre) e ICT (la producción de NADPH baja de un 64% a un 51% con respecto a la cepa silvestre), sin embargo, es casi nula sobre G6P que se mantiene alrededor de un 50% en ambos casos. Esta disminución en la producción de NADPH en 6PGDH e ICDH tiene una compensación directa en la producción de NADPH mediante la transhidrogenasa, que sube desde un 13% hasta un 38%, como se observa en la figura 19. Por otro lado, la bifurcación en el metabolito malato, en términos de porcentaje no presenta ninguna diferencia (tabla 6).

3. RESULTADOS

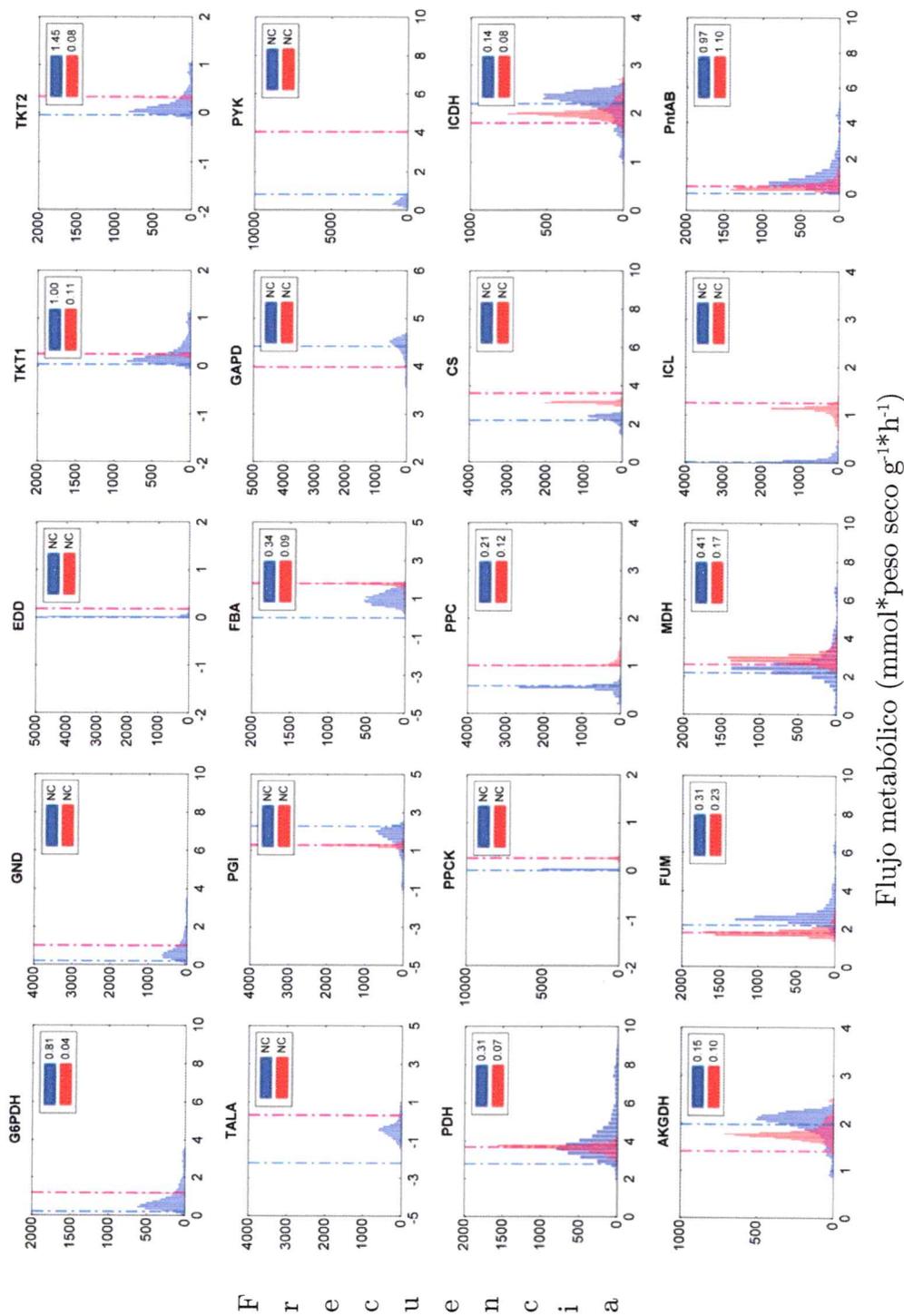


Figura 19. Histogramas de los flujos metabólicos de las reacciones del metabolismo central de la cepa silvestre de *E. coli* generada mediante el método Monte Carlo por cadenas de Markov. Sin uso de cocientes de flujo (azul). Con uso de cociente de flujo (rojo). Las líneas punteadas son las soluciones óptimas calculadas usando la maximización del ATP como función objetivo. En el cuadro se muestra el coeficiente de variación (CV). NC = no calculado, no presentan distribución normal mediante la prueba de bondad de ajuste.

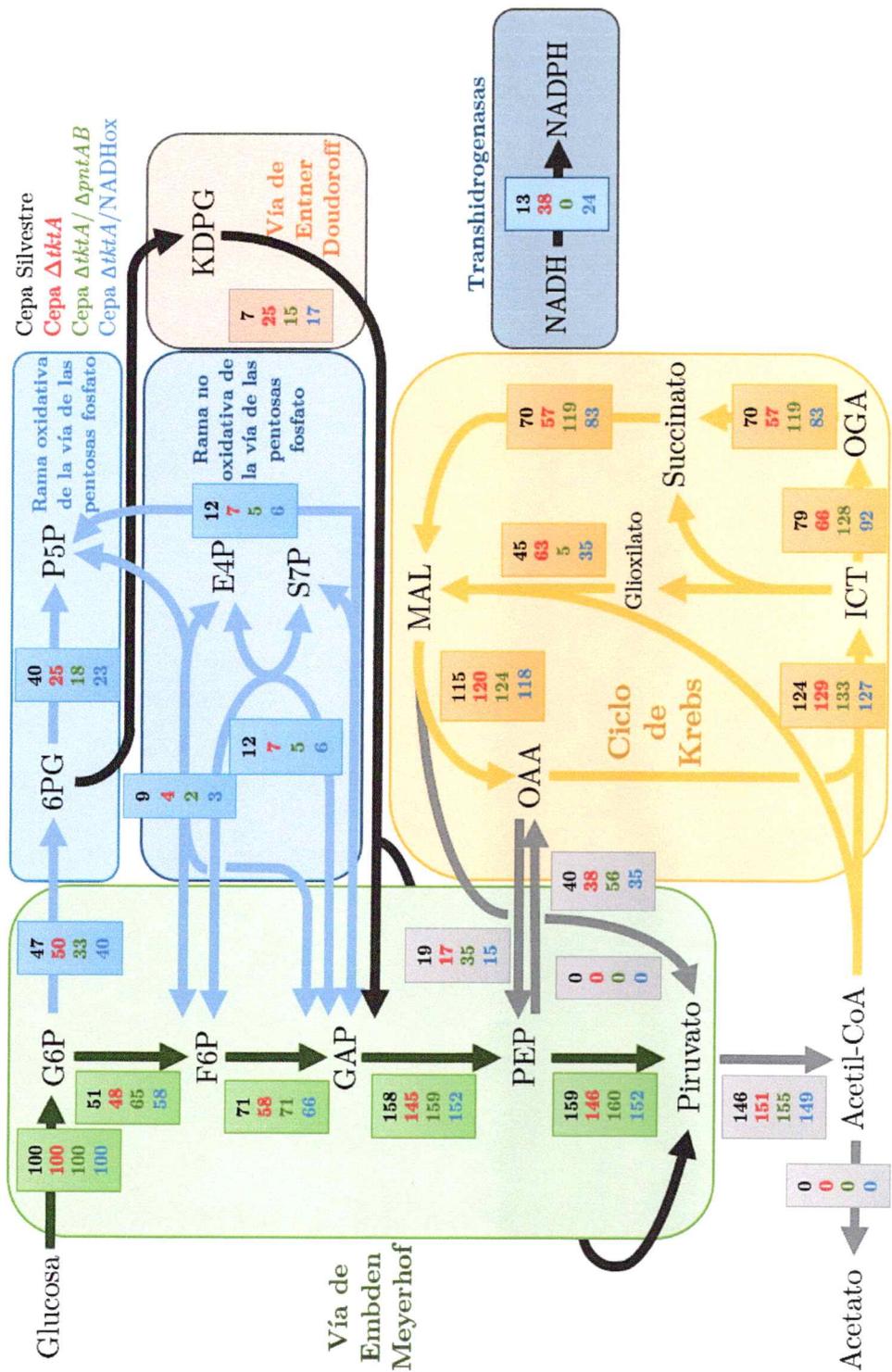


Figura 20. Distribución de flujos de carbono en el metabolismo central de *E. coli* durante crecimiento en cultivos continuos 0,2 h⁻¹. Los valores en negro, rojo, verde y azul están referidos a la cepa silvestre, $\Delta tkkA$, $\Delta tkkA \Delta pntAB$ y $\Delta tkkA NADHox$, respectivamente. Los valores están normalizados a la tasa de consumo de glucosa.

Tabla 6. Porcentaje de partición de bifurcaciones asociada a la producción de NADPH en *E. coli*.

Particiones de flujo	Silvestre	$\Delta tktA$	$\Delta tktA/\Delta pntAB$	$\Delta tktA/NADHox$
	52%/48%	49%/51%	66%/34%	59%/41%
	15%/85%	50%/50%	45%/55%	42%/58%
	100%/0%	100%/0%	100%/0%	100%/0%
	36%/64%	49%/51%	4%/96%	28%/72%

Los porcentajes de flujo están normalizados con respecto a la bifurcación en particular. El porcentaje asociado a la deshidrogenasa productora de NADPH se muestra en azul.

Cuando se estudia la partición con respecto a las modificaciones realizadas sobre la cepa $\Delta tktA$, es decir, las cepas $\Delta tktA \Delta pntAB$ y $\Delta tktA NADHox$, se observa que en ambas existe un impacto en la bifurcación del metabolito G6P, donde se observa un mayor flujo glicolítico. A pesar de esta disminución del flujo a través de oxPPP, el efecto observado en la bifurcación de 6PG, se mantiene cercano a un 50%. La principal diferencia entre estas dos cepas, es en el flujo a través de la

3. RESULTADOS

bifurcación en ICT. Como se observa en la cepa $\Delta tktA \Delta pntAB$ existe una caída del flujo desde un 49% hasta un 4%. Esta caída del flujo tiene que ver directamente en que la producción de NADPH a través de la trasnhidrogenasa no es posible y para cumplir los requerimientos se necesita producir el NADPH por la ICDH, que sube su aporte porcentual desde un 51% hasta un 96%.

4. Discusión

En todos los organismos vivos las vías metabólicas poseen bifurcaciones del flujo de carbono que permiten distribuirlo en distintos intermediarios necesarios para la biosíntesis. En organismos heterótrofos como *Escherichia coli*, la oxidación de glucosa a piruvato puede ocurrir mediante la vía de Embden-Meyerhoff (glicolisis), vía de las pentosas fosfato (PPP) o la vía de Entner-Doudoroff (ED). Los mecanismos que determinan los porcentajes de partición en estas bifurcaciones, aún no se encuentran totalmente explicados, y más aún, la predicción certera de cuál será la partición luego de alguna modificación genética, del nutriente, o ambiental, está lejos del estado del arte. Actualmente, el impacto en la fisiología de cada uno de los cambios debe ser aparejado con datos experimentales que muestren el efecto sobre la redistribución de los flujos metabólicos.

4.1 Determinación de la redistribución de flujos metabólicos en tasa de crecimiento fija y máxima

Este trabajo trata principalmente de la redistribución de flujos dado por cambios genéticos que afectan la producción de NADPH a nivel de las vías

centrales. En una primera aproximación al impacto de los cambios, se cuantificaron los parámetros fisiológicos de las cepas estudiadas en condiciones de cultivos por *batch*. Estos resultados mostraban diferencias significativas en la tasa de crecimiento máxima (μ_{\max}) entre las distintas cepas. Determinando la distribución de flujos metabólicos en esas condiciones, no solo se observa el efecto de la perturbación genética, sino además, la diferencia en la demanda para biosíntesis de los distintos intermediarios, que es dependiente de la velocidad de crecimiento.

Por otro lado, en cultivos continuos, se fijó la tasa de crecimiento a un mismo valor de 0.2 hr^{-1} , logrando así mantener el mismo requerimiento de intermediarios para biosíntesis. En este mismo sentido, se usó una concentración de 2 g/L de glucosa, la cual es consumida en su totalidad en todos los experimentos realizados. Esto fue verificado mediante la medición de la concentración de glucosa por HPLC en el medio de cultivo, que fue cero en todos los casos una vez alcanzado la fase estable del crecimiento continuo en el 5to recambio del medio de cultivo. Por lo cual, se puede decir, que dos parámetros muy relevantes a la hora de evaluar la redistribución de flujos metabólicos en las cepas mutantes, fueron fijados por el experimentador y en conclusión, se puede afirmar que los cambios observados en

la redistribución de flujo metabólico son solo consecuencia directa de las modificaciones genéticas realizadas. El beneficio adicional de no usar una alta concentración de glucosa, necesaria para obtener máxima velocidad de crecimiento, es la disminución del costo económico en la fase experimental en que se usa la glucosa marcada isotópicamente.

4.2 Sobre el estudio de los efectos en la partición de los flujos metabólicos asociados a cambios en la vías de producción de NADPH

En los casos reportados en literatura, las bifurcaciones o particiones del flujo de carbono se han estudiado mediante la eliminación de alguna de las enzimas presente en una de las ramas (Holm y col. 2010, Nicolas y col. 2007, Sauer y col. 2004, Zhao y col. 2004), en efecto, linealizando el flujo a través de la rama restante y, por ende, alterando la conectividad de la red metabólica. Es decir, el porcentaje de partición obtenido siempre es 100% para la enzima remanente y 0% para la vía cuya enzima fue eliminada. Para entender los factores que determinan la partición del flujo de carbono, las bifurcaciones estudiadas debieran modificadas de tal forma, que sea posible obtener valores de partición intermedios. Siendo consecuentes con este punto de vista, realizamos una perturbación indirecta de las bifurcaciones presentes en oxPPP, en el nodo de la glucosa 6-fosfato y en el nodo

del 6-fosfogluconato, mediante la disminución de la velocidad de una reacción río abajo de estas bifurcaciones. Dado que *E. coli* posee dos isoenzimas para las reacciones de transcetolación en noxPPP, la delección de una de ellas debiera permitir disminuir el flujo de la rama oxidativa sin llegar a cero. Con esta estrategia abordamos la pregunta central de la tesis, *¿Cuáles son los efectos en la partición de flujo metabólico asociados a vías de producción de NADPH, cuando se ha disminuido el flujo de carbono por noxPPP?*

La partición de flujo podría ser tomado como un efecto local, dado simplemente por las concentraciones de los sustratos y productos, y las constantes cinéticas de las enzimas presentes. Sin embargo, se ha observado que pequeños cambios puntuales, generalmente tienen un efecto sobre toda la red metabólica. Esto es particularmente cierto para metabolitos que están altamente conectados como los cofactores NAD(P)(H). Al modificar alguna vía de producción de NADPH, se espera que otros puntos de producción respondan de manera compensatoria si la demanda anabólica permanece constante.

4.3 Uso de los cocientes de flujo como restricciones y el ATP de mantención como función objetivo en *Flux Balance Analysis*

Las ecuaciones de los cocientes de flujo dependen directamente de las reacciones consideradas en el modelo y de la marcación isotópica de la fuente de carbono. Se calcularon 4 cocientes de flujo, 3 de los cuales son obtenidos con 100% $1\text{-}^{13}\text{C}$ -glucosa y el restante con 80% glucosa sin marcar y 20% $\text{U-}^{13}\text{C}$ -glucosa. Sin embargo, en estas condiciones hubiese sido posible obtener cocientes de flujo adicionales. Por ejemplo, en una publicación del grupo de Sauer, se observa que bajo el mismo protocolo de marcación isotópica lograron obtener 9 cocientes de flujo para el modelo de *E. coli* (Fischer y Sauer, 2003). Con esa cantidad de datos es posible usar FiatFlux y estimar directamente la distribución de flujos en las vías centrales. En nuestro caso, tuvimos que rechazar algunos de los cocientes de flujos cuya desviación estándar fue muy grande, lo que impidió seguir el mismo procedimiento. Sin embargo, los cambios en la distribución de flujos pudieron ser observados mediante una combinación de dos metodologías relativamente nuevas: el método FBrAtio (Choi y col. 2007; McAnulty y col. 2012), que se basa en incorporar directamente los cocientes de flujo a la matriz estequiométrica, y el

muestreo del espacio de soluciones mediante el algoritmo Monte Carlo por cadenas de Markov (Haverkorn, 2012).

Debido a que el uso de esta combinación de metodologías no ha sido descrito previamente en la literatura, exploramos cómo los cocientes de flujo restringen el espacio de soluciones. Así, en la figura 17, el histograma coloreado azul corresponde al muestreo de soluciones sin usar cocientes de flujo y, por el contrario, usándolos se obtiene el histograma coloreado en rojo. Este resultado muestra que la introducción de cocientes de flujo restringe notablemente el rango de valores posibles de los valores de flujo máximo y mínimo (eje x del histograma).

Por otra parte, se altera, para la gran mayoría de las reacciones, el valor del flujo más probable (pico del histograma). También en la mayor parte de casos, usando las restricciones de cocientes de flujo, el pico del histograma coincide estrechamente con el flujo óptimo que resulta de minimizar el ATP de mantención, de acuerdo con el protocolo convencional del *Flux Balance Analysis*. Se hace notar que en pocos casos ocurre que en los histogramas generados, al comparar el gráfico azul y rojo, el límite máximo y el límite mínimo de flujo no se alteren. Sin embargo, en todos los casos se observa que el estadígrafo, coeficiente de variación (CV)³⁰,

³⁰ El coeficiente de variación solo es posible calcularlo luego de una prueba de bondad de ajuste, que establece si los datos presentan una distribución normal.

que se define como un valor que indica la dispersión de datos en torno al promedio, disminuye su valor al hacer uso de los cocientes de flujo. Esto indica una menor dispersión de datos, por lo cual, picos mas aguzados. Se hace notar que si bien algunas reacciones pueden no variar en su mínimo y máximo de flujo, el espacio de soluciones si varía, ya que este último es resultado de todos los flujos que están presentes en el modelo.

Se mapearon los flujos más probables obtenidos usando cocientes de flujo, pues contienen el máximo nivel de información fisiológica sin el sesgo del uso de una función objetivo (figura 19).

Finalmente, tomamos la decisión de usar el ATP de mantención como función objetivo en la estimación de flujos intracelulares ocupando datos experimentales de cultivos continuos debido a tres razones. El valor del ATP de mantención varia dependiendo de las condiciones fisiológicas en que se encuentre la célula. Esto ha sido medido para el caso de *E. coli* en un contexto fisiológico aeróbico (17.2 mmol *peso seco g-1 * h-1) y anaeróbico (16.4 mmol *peso seco g-1 * h-1) (Chen y col. 2011). Los valores del ATP de mantención en los distintos modelos que existen son muy diferentes. En el caso del modelo de *E. coli* iAF1260 (Feist y col. 2007) es de 8.39 mmol *peso seco g-1 * h-1 y en el modelo iJO1366 (51) es de 3.15 mmol

*peso seco $g^{-1} \cdot h^{-1}$, es decir, menos de la mitad del valor del primer modelo. Y, por último, permite la optimización con 3 mediciones experimentales (tasa de crecimiento, consumo de glucosa y producción de acetato), comparado con las otras funciones objetivo, que requieren, o la tasa de crecimiento o el consumo de glucosa estén susceptibles de variar.

Tomando en cuenta todo lo anterior, se concluye que el ATP de mantención debería ser un parámetro a medir experimentalmente para cada una de las cepas generadas. Sin embargo, requiere en términos experimentales variar la tasa de crecimiento en cultivos continuos, lo que lo hace un parámetro

4.4 Impacto de la delección del gen *tktA* en la partición de los flujos metabólicos asociados a vías de producción de NADPH

Para medir los efectos en la partición de flujo metabólico asociados a vías de producción de NADPH cuando se ha disminuido el flujo de carbono por noxPPP, se midió experimentalmente la distribución de flujos metabólicos en las vías centrales de las cepas de *E. coli* silvestre, $\Delta tktA$, $\Delta tktA \Delta pntAB$ y $\Delta tktA$ NADHox en cultivos continuos. Recordando la hipótesis, “la disminución del flujo en noxPPP, como consecuencia de la delección de *tktA*, afectará las particiones del flujo metabólico presentes en oxPPP, activando la vía de Entner-Doudoroff en

presencia de glucosa y conllevará a una redistribución de flujos en las vías centrales como respuesta compensatoria a cambios en la producción de NADPH, siendo la reacción transhidrogenasa la respuesta primaria". A la luz de los resultados se puede decir que, en cultivos continuos, al restringir el flujo a través de noxPPP, hay un efecto en la partición de flujo en el nodo 6PG, disminuyendo la producción de NADPH en la enzima 6PGDH y activando ED.

Como se mencionó en la introducción, cuando se mide los flujos intracelulares en oxPPP en distintos contextos genéticos, ambas enzimas NADPH productoras, G6PDH y 6PGDH, tienden a aumentar o disminuir en forma conjunta. Solo cuando se elimina el gen *gnd* ocurre una activación de ED, es decir, en esa cepa, se observa que la producción de NADPH es independiente en ambas enzimas. Por lo cual, con la modificación genética en noxPPP, se observa un efecto similar. Es decir, efectivamente aunque se observe que estas enzimas trabajan regularmente de forma conjunta en la producción de NADPH, tienen la capacidad de tener flujos de carbono diferentes.

La disminución de la producción de NADPH en 6PGDH en la cepa $\Delta tktA$, conlleva a una compensación dada primariamente por la producción de NADPH por PntAB. La magnitud de esta producción es mayor que en la cepa silvestre: un

13% frente a un 38% de la cepa $\Delta tktA$ (figura 20). Esto genera que la ICDH en el ciclo de Krebs baje su producción de un 79% a un 66% (figura 20). Al existir una baja de producción de NADPH en 6PGDH, la célula activaría la transcripción de PntAB (Haverkorn, 2012). Sin embargo, esto no solo restaura los niveles de aporte de NADPH, sino que interesantemente, el aporte es mucho mayor que en silvestre, concomitantemente, la célula responde aumentando la partición en el metabolito ICT hacia un mayor flujo a través de la vía del Glioxilato, de un 45% a un 63%. Ahora bien, cuando se expresa heterológicamente una enzima que disipa el NADH, sustrato de PntAB, vemos como esa contribución de un 38%, baja a 24%, concomitantemente la partición en el metabolito ICT, por la vía del Glioxilato, baja de un 63% a un 35%. En otras palabras, la producción de NADPH por la transhidrogenasa PntAB depende de la disponibilidad del NADH. En el último caso, cuando desaparece completamente el aporte de NADPH por PntAB (cepa $\Delta tktA \Delta pntAB$), vemos como la ICDH aumenta hasta 128%, disminuyendo hasta un 5% el flujo a través la vía del Glioxilato. Por lo cual, se concluye que la respuesta primaria está dada por la transhidrogenasa PntAB, y si ese punto de producción no está disponible, la respuesta compensatoria es ICDH en el ciclo de Krebs.

Este resultado puede ser comparado con lo obtenido para la cepa Δzwf , que presenta flujo cero a través de oxPPP (Sauer y col. 2004), en esta publicación se observa que la mayor parte del NADPH es producido por ICDH y no por PntAB. Es decir, lo contrario a lo que sucede en los resultados recién expuestos. Hay que recordar, que en estos resultados de Sauer las cepas tienen distintas tasas de crecimiento. Por lo cual, un factor es que esto responda a las condiciones de cultivo *batch* en el caso del grupo de Sauer. Esto reafirma lo dicho anteriormente que fijar la tasa de crecimiento es la única condición donde se puede afirmar que un punto de producción es compensado por otro.

Es necesario declarar una discrepancia encontrada en literatura sobre el porcentaje de partición de G6P. En condiciones de cultivos continuos ($0,2 \text{ h}^{-1}$) de la cepa silvestre, se ha observado consistentemente un 80% glicolisis y un 20% oxPPP en las publicaciones del grupo de investigación del Dr. Shimizu, (Jiao y col. 2003; Zhao y col. 2004). En cambio, en una publicación del laboratorio del Dr. Sauer se informó 50% y 50% (Nanchen y col. 2006). Esta discrepancia puede deberse a que las cepas silvestres en ambos casos son distintas, BW25113 (Colección Keio³¹) y MG1655, si bien ambas son K-12. Por otro lado, esta

³¹ <http://cgsc.biology.yale.edu/KeioList.php>

discrepancia se observa también en condiciones de cultivos en *batch*, donde se ha observado un 80% glicolisis y un 20% oxPPP (Sauer y col. 2004) y 50%-50% (Holm y col. 2010). Esta última, no puede deberse a la cepa, ya que en ambos estudios, es MG1655, pero si a que usaron distintos medios de cultivo (M9 y MOPS, respectivamente).

4.5 Activación de la vía de Entner-Doudoroff en presencia de glucosa

De los resultados obtenidos fue muy interesante la activación de la vía EDD en presencia de glucosa. Como se menciona en la introducción, generalmente en los estudios de flujos metabólicos de *E. coli* es omitida, ya que la vía glicolítica es mayoritariamente la que realiza la oxidación de la glucosa.

Se estudió la magnitud de los flujos de cada una de las 3 vías metabólicas (EMP, ED y PPP) para procesar la glucosa en 7 especies de bacterias con distintos modos de vida y filogenéticamente distintas, incluida *E. coli* (Fuhrer y col., 2005). Se observó, sorprendentemente, que en 5 casos, ED fue la vía catabólica exclusiva de la glucosa, y EMP casi estuvo ausente. En el caso de *E. coli*, se observa un flujo muy pequeño por ED, como se ha documentado en variadas publicaciones (Holm y col., 2010; Martínez y col., 2008; Zhao y col., 2004).

Lo dicho anteriormente implica que *E. coli* tiene la capacidad de procesar una mayor cantidad de glucosa por ED que lo visto hasta este momento, sin embargo, deben existir restricciones para que esto no suceda así. Por ejemplo, que la demanda de NADPH imponga al flujo de carbono a ser direccionado por 6PGDH. Se ha visto que la expresión de los genes *edd* y *eda* depende de la presencia de gluconato, el cual interactúa con el represor transcripcional GntR, co-transcribiéndose ambos genes, y no así en presencia de glucosa (Egan y col. 1992).

Se midieron los flujos metabólicos de una librería de 24 cepas de *E. coli*, cada una con disrupción de un solo gen, las cuales son parte de la colección Keio. Interesantemente, en esta medición *high-throughput* se calcularon los flujos intracelulares para la cepa $\Delta tktA$, encontrándose que existe una activación de ED comparada con la cepa silvestre, reafirmando lo encontrado en el presente trabajo (Ishii y col. 2007). Sin embargo, no coinciden los resultados para otros flujos, especialmente en términos de partición, por ejemplo, se reportó un 78% hacia glicolisis y solo un 21% hacia oxPPP en esta cepa. Además, estos resultados en específico no son discutidos en la publicación. Estas diferencias se pueden explicar debido a que la cepa parental en este estudio es la BW25113, en contraste con la ocupada en este trabajo (MG1655). Es importante recordar que se hace mención

en un apartado anterior, a que estos valores de partición para esta cepa, se han visto en trabajos anteriores (Jiao y col. 2003; J Zhao y col. 2004). Y además, otra diferencia relevante es que los cultivos realizados son al doble de la concentración de glucosa con respecto al presente trabajo.

4.6 Impacto en los parámetros fisiológicos en cultivos en *batch* frente a la restricción de flujo en noxPPP

El efecto fisiológico de la restricción de flujo en noxPPP ($\Delta tktA$) impacta negativamente sobre la tasa de crecimiento en alrededor de un 10% comparado con la cepa silvestre en cultivos por *batch*. Esta disminución puede ser explicada por varias razones o una combinación de ellas.

La eliminación del gen *tktA* afecta primariamente la magnitud del flujo a través de noxPPP, como se revisa en introducción, se ha observado que la eliminación de ambas isoenzimas (TktA y TkaB) de las reacciones de transcetolación producen auxotrofia, por la incapacidad de la célula de producir el intermediario E4P (Zhao y Winkler 1994). Para explorar esta posibilidad se estudió mediante FBA la variación del precio sombra³² de este metabolito.

³² Como parte del procedimiento de optimización es posible calcular, además del valor de la función objetivo, los flujos intracelulares y las reacciones de intercambio, los precios sombra de los metabolitos. El precio

Conceptualmente, el precio sombra mide el aumento en la función objetivo debido a la adición de un metabolito particular (Varma y Sauer, 1993).

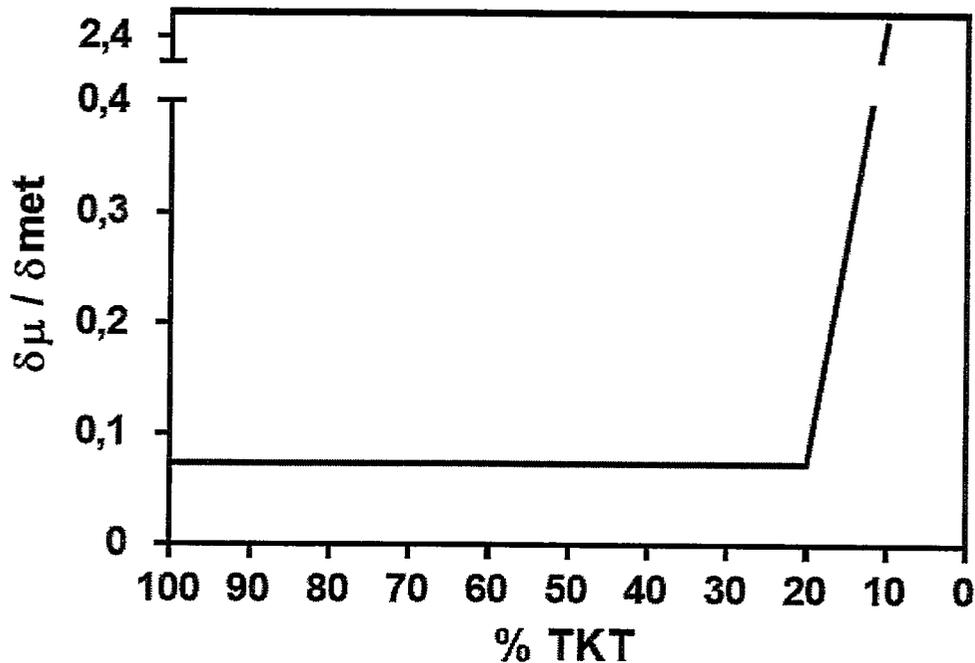


Figura 21. Valores del precio sombra para el metabolito E4P cuando se varía el flujo de las reacciones de transcetolación en noxPPP. El valor del 100% del flujo se obtiene en una primera simulación sin ningún tipo de restricción sobre las reacciones de transcetolación. Luego ese valor se varía, repitiendo la simulación hasta llegar a 0% donde no se encuentra estado estacionario. Las restricciones de la simulación son el consumo de glucosa y la producción de acetato medidas en cultivos por *batch* en la cepa $\Delta tktA$. La función objetivo es biomasa.

sombra se define matemáticamente como el incremento marginal en la función objetivo debido a una variación marginal de un metabolito particular.

$$\text{Precio sombra} = \delta Z / \delta b_i$$

Se observa que el precio sombra de E4P tiene un valor alrededor de 0,08, que se conserva en casi todo el rango de porcentajes del flujo a través de las reacciones de transcetolación. Sin embargo, cuando se restringe el flujo a un 10% del original, el precio sombra presenta un valor cercano a 2,4. Como la función objetivo es el crecimiento, los precios sombra con un valor positivo indican que frente a un aumento infinitesimal del intermediario E4P la tasa de crecimiento se vería favorecida. La diferencia entre ambos valores es de 30 veces, lo que indica que si la cepa tiene una muy baja actividad transcetolasa verá impedido su crecimiento. Volviendo a los resultados experimentales, en el caso de $\Delta tktA$ no es posible descartar algún efecto auxotrófico en crecimiento en *batch* debido a la disminución de un 10% de la tasa de crecimiento con respecto a la cepa silvestre. Se hace hincapié que, sin embargo, en el caso de cultivos continuos, al fijar la tasa de crecimiento a un valor mucho menor que la tasa máxima de crecimiento, no es posible que exista auxotrofia (figura 21).

Otro efecto fisiológico interesante de la cepa $\Delta tktA$, es la disminución del consumo de glucosa, en aproximadamente un 10% comparado con la cepa silvestre. Como se observa en las simulaciones vistas en la figura 14, la cantidad mínima de glucosa que requiere el sistema para alcanzar la biomasa observada

experimentalmente, a través de un barrido de porcentaje de actividades transcetolasa no varía, y más bien, se afecta la partición del flujo en el nodo G6P. Sin embargo, lo que se observa experimentalmente es que *disminuye el ingreso de glucosa*. Nos llamó la atención este fenómeno, ya que en experimentos de otro alumno de doctorado del laboratorio, donde se reemplazó la versión G6PDH NADP preferente, por otra con la especificidad alterada, es decir, NAD preferente, se observó que el consumo de glucosa baja a un 40% comparado con la cepa silvestre (Olavarria y col. 2014). Sin embargo, de esta cepa no se han realizado determinación de flujos intracelulares por experimentos de C¹³. Adicionalmente, para la cepa $\Delta tktA \Delta pntAB$, es interesante ver que disminuye la tasa de consumo de glucosa en un 11% con respecto a lo observado en la cepa $\Delta pntAB$, indicando que no es un comportamiento exclusivo de la cepa $\Delta tktA$ con respecto a la cepa silvestre. En conjunto, esto podría estar implicando un mecanismo de respuesta en el control del consumo de glucosa a cambios en el flujo de carbono por oxPPP, hasta ahora no descrito en literatura.

Otro efecto fisiológico interesante de la cepa $\Delta tktA$ es el aumento de la excreción de acetato alrededor de un 25% con respecto a la cepa silvestre. Según Hoek y Merks (2012) la excreción de acetato es un indicativo de la relación entre

el flujo glicolítico y el flujo en ciclo de Krebs. Se ha demostrado que a un alto flujo glicolítico, el ciclo de Krebs se reprime. La excreción de acetato evitaría la entrada de carbono al ciclo de Krebs. Por lo cual, en nuestro caso particular, donde se disminuye el consumo de glucosa en la cepa $\Delta tktA$ y se favorece la excreción de acetato, podríamos sugerir que el ciclo de Krebs está siendo reprimido. Esto implicaría, que la respuesta de la red a una disminución del flujo a través de oxPPP cuando la tasa de crecimiento es máxima, está dada por la producción de NADPH por PntAB.

Adicionalmente a esta observación, la doble mutante $\Delta tktA \Delta pntAB$ presenta una marcada disminución de la excreción de acetato en un 85% comparada con la mutante $\Delta tktA$. Esto significaría que al no estar disponible la producción de NADPH por PntAB, la cepa activa su ciclo de Krebs y consecuentemente la enzima ICDH, la enzima málica NADP dependiente o ambas.

Por otro lado, en literatura se ha informado las consecuencias fisiológicas de sobre expresar la enzima NADH oxidasa en el contexto de la cepa silvestre, observando que la tasa de crecimiento disminuye en un 8%, la cantidad de glucosa consumida aumenta aproximadamente un 25% y la cantidad de acetato producido disminuye un 40% (Holms y col., 2010). En esta cepa se realizaron experimentos

de C^{13} que indicaron que el ciclo de Krebs aumentaba su flujo casi el doble, permaneciendo inalterado el flujo en oxPPP. Además, hubo una activación de la transhidrogenasa UdhA (soluble) que transfiere directamente equivalentes de reducción desde NADPH a NADH.

Comparando con nuestros resultados, la cepa MG1655 NADHox presenta una disminución de la tasa de crecimiento de un 26% y un aumento de la tasa de consumo de glucosa de un 32%, con respecto a la cepa silvestre, siendo comparables con los resultados de literatura.

En contraste, la expresión de NADH oxidasa en el contexto genético de la cepa $\Delta tktA$, es decir, la comparación entre la cepa $\Delta tktA$ y $\Delta tktA$ NADHox, se observa que el efecto fisiológico es que la tasa de crecimiento disminuye un 30%, la tasa de consumo de glucosa aumenta en un 33% y la tasa de producción de acetato disminuye en un 75%. Estos resultados indican que frente a la expresión de NADH oxidasa, se enmascara el efecto que produce la eliminación del gen $\Delta tktA$ discutido en párrafos anteriores, ya que el consumo de glucosa aumenta. Adicionalmente, al disminuir la tasa de producción de acetato indica una activación del ciclo de Krebs, si esto ocurre así, ICDH estaría aumentando su flujo. Además, como se está disminuyendo la disponibilidad del sustrato NADH de la

transhidrogenasa PntAB, se podría concluir que su actividad disminuye en esta cepa comparada con la cepa $\Delta tktA$.

5. Conclusiones

- En cultivos continuos a $0,2 \text{ h}^{-1}$, una disminución del flujo metabólico a través de la noxPPP afecta principalmente la partición de flujo en el nodo 6PG, disminuyendo la producción de NADPH en la enzima 6PGDH y activando ED.
- Si se disminuye la contribución de 6PGDH en oxPPP, en cultivos continuos a $0,2 \text{ h}^{-1}$, la principal respuesta compensatoria es la producción de NADPH por la transhidrogenasa PntAB.
- El efecto de la expresión de NADH oxidasa en la cepa $\Delta tktA \text{ NADHox}$, es activar la glicolisis y disminuir el aporte de PntAB comparado con la cepa $\Delta tktA$.
- En cultivos continuos a $0,2 \text{ h}^{-1}$, si PntAB no es capaz de suplir la demanda, en el caso de la cepa $\Delta tktA \Delta pntAB$, ICDH es capaz de compensar la producción de NADPH.
- La capacidad de ICDH de responder a los cambios en la producción de NADPH se debe a la posibilidad activar o reprimir el flujo a través de la vía del glioxilato.

- En cultivos por *batch*, el aumento de la tasa de producción de acetato en la cepa $\Delta tktA$ podría indicar que la respuesta compensatoria a una disminución del flujo a través de oxPPP, está dada por la producción de NADPH por *pntAB*.
- En cultivos por *batch*, la cepa doble mutante $\Delta tktA \Delta pntAB$ presenta una marcada disminución de la excreción de acetato en un 85% comparada con la mutante $\Delta tktA$, lo que indicaría que la respuesta compensatoria en este caso a la demanda de NADPH sería la producción mediante la enzima ICDH.

6. Referencias

- Auriol C, Bestel-Corre G, Claude J-B, Soucaille P, Meynial-Salles I. 2011. Stress-induced evolution of *Escherichia coli* points to original concepts in respiratory cofactor selectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108:1278–1283.
- Becker S a, Feist AM, Mo ML, Hannum G, Palsson BØ, Herrgard MJ. 2007. Quantitative prediction of cellular metabolism with constraint-based models: the COBRA Toolbox. *Nat. Protoc.* 2:727–738.
- Bluck L, Volmer DA. 2009. The Role of Naturally Occurring Stable Isotopes in Mass Spectrometry, Part I: The Theory. *Spectroscopy (Springf).* 23:36.
- Boonstra B, French CE, Wainwright I, Bruce NC. 1999. The *udhA* Gene of *Escherichia coli* Encodes a Soluble Pyridine Nucleotide Transhydrogenase. *J. Bacteriol.* 181:1030–1034.
- Bordbar A, Monk JM, King ZA, Palsson BO. 2014. Constraint-based models predict metabolic and associated cellular functions. *Nat. Rev. Genet.* 15:107–120.
- Canonaco F, Hess TA, Heri S, Wang T, Szyperski T, Y US. 2001. Metabolic flux response to phosphoglucose isomerase knock-out in *Escherichia coli* and impact of overexpression of the soluble transhydrogenase (UdhA). 204:247–252.
- Chen X, Alonso AP, Allen DK, Reed JL, Shachar-Hill Y. 2011. Synergy between (13)C-metabolic flux analysis and flux balance analysis for understanding metabolic adaptation to anaerobiosis in *E. coli*. *Metab. Eng.* 13:38–48.
- Choi HS, Kim TY, Lee DY, Lee SY. 2007. Incorporating metabolic flux ratios into constraint-based flux analysis by using artificial metabolites and converging ratio determinants. *J. Biotechnol.* 129:696–705.
- Clarke DM, Loo TW, Gillam S, BRAGG PD. 1986. Nucleotide sequence of the *pntA* and *pntB* genes encoding the pyridine nucleotide transhydrogenase of *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* 158:647–653.

6. REFERENCIAS

- Conway T. 1992. The Entner-Doudoroff pathway: history, physiology and molecular biology. *FEMS Microbiol. Rev.* 103:1–28.
- Crown SB, Antoniewicz MR. 2013. Publishing ¹³C metabolic flux analysis studies: a review and future perspectives. *Metab. Eng.* 20:42–48.
- Datsenko K a, Wanner BL. 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 97:6640–6645.
- Dauner M, Sauer U. 2000. GC-MS Analysis of Amino Acids Rapidly Provides Rich Information for Isotopomer Balancing. *Biotechnology Progress.* 16:642–649.
- Egan SE, Fliege R, Tong S, Shibata A, Wolf RE, Conway T. 1992. Molecular characterization of the Entner-Doudoroff pathway in *Escherichia coli*: sequence analysis and localization of promoters for the *edd-eda* operon. *J. Bacteriol.* 174: 4638–4646.
- Eisenberg RC, Dobrogosz WJ. 1967. Gluconate metabolism in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 93:941–949.
- Emmerling M, Dauner M, Ponti A, Fiaux J, Hochuli M, Szyperski T, Wu K, Bailey JE, Sauer U. 2002. Metabolic Flux Responses to Pyruvate Kinase Knockout in *Escherichia coli* 184:152–164.
- Farrish EE, Baker H V, Wolf RE. 1982. Different control circuits for growth rate-dependent regulation of 6-phosphogluconate dehydrogenase and protein components of the translational machinery in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 152:584–594.
- Fawcett WP, Wolf RE. 1995. Genetic Definition of the *Escherichia coli* *zwf* “Soxbox”, the DNA Binding Site for SoxS-Mediated Induction of Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase in Response to Superoxide 177:1742–1750.
- Feist AM, Henry CS, Reed JL, Krummenacker M, Joyce AR, Karp PD, Broadbelt LJ, Hatzimanikatis V, Palsson BØ. 2007. A genome-scale metabolic reconstruction for *Escherichia coli* K-12 MG1655 that accounts for 1260 ORFs and thermodynamic information. *Mol. Syst. Biol.* 3:121.
- Fischer E, Sauer U. 2003. Metabolic flux profiling of *Escherichia coli* mutants in central carbon metabolism using GC-MS. *Eur. J. Biochem.* 270:880–891.

6. REFERENCIAS

- Fischer E, Zamboni N, Sauer U. 2004. High-throughput metabolic flux analysis based on gas chromatography-mass spectrometry derived ^{13}C constraints. *Anal. Biochem.* 325:308–316.
- Fraenkel DG. 1968. Selection of *Escherichia coli* mutants lacking glucose-6-phosphate dehydrogenase or gluconate-6-phosphate dehydrogenase. *J. Bacteriol.* 95:1267–1271.
- Fuhrer T, Fischer E, Sauer U. 2005. Experimental Identification and Quantification of Glucose Metabolism in Seven Bacterial Species. *J. Bacteriol.* 187:1581–1590.
- Fuhrer T, Sauer U. 2009. Different biochemical mechanisms ensure network-wide balancing of reducing equivalents in microbial metabolism. *J. Bacteriol.* 191:2112–2121.
- Giró M, Carrillo N, Krapp AR. 2006. Glucose-6-phosphate dehydrogenase and ferredoxin-NADP(H) reductase contribute to damage repair during the soxRS response of *Escherichia coli*. *Microbiology* 152:1119–1128.
- Haverkorn, B.R.B. 2012. Transcriptional regulation of central metabolism in *Escherichia coli*. Tesis PhD. ETH Zürich, Suiza: 103-104.
- Holm AK, Blank LM, Oldiges M, Schmid A, Solem C, Peter R, Jensen PR, Vemuri GN. 2010. Metabolic and transcriptional response to cofactor perturbations in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 285:17498–17506.
- Ingraham JL, Maaløe O, Neidhardt FC. 1983. Growth of the bacterial cell. pp 78-88. Sinauer Associates.
- Iida A, Teshiba S, Mizobuchi K, Mizobuchi K. 1993. Identification and Characterization of the *tktB* Gene Encoding a Second Transketolase in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol.* 175: 5375-5383.
- Ishii N, Nakahigashi K, Baba T, Robert M, Soga T, Kanai A, Hirasawa T, Naba M, Hirai K, Hoque A, Ho PY, Kakazu Y, Sugawara K, Igarashi S, Harada S, Masuda T, Sugiyama N, Togashi T, Hasegawa M, Takai Y, Yugi K, Arakawa K, Iwata N, Toya Y, Nakayama Y, Nishioka T, Shimizu K, Mori H, Tomita M. 2007. Multiple high-throughput analyses monitor the response of *E. coli* to perturbations. *Science.* 316:593-597



6. REFERENCIAS

- Jiao Z, Baba T, Mori H, Shimizu K. 2003. Analysis of metabolic and physiological responses to *gnd* knockout in *Escherichia coli* by using C-13 tracer experiment and enzyme activity measurement. *FEMS Microbiol. Lett.* 220:295–301.
- Josephson BL, Fraenkel DG. 1969. Transketolase mutants of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 100: 1289-1295
- Josephson BL, Fraenkel DG. 1974. Sugar metabolism in transketolase mutants of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 118: 1082-1089
- Kayser A, Weber J, Hecht V, Rinas U. 2005. Metabolic flux analysis of *Escherichia coli* in glucose-limited continuous culture. I. Growth-rate-dependent metabolic efficiency at steady state. *Microbiology* 151:693–706.
- Leighty RW, Antoniewicz MR. 2013. COMPLETE-MFA: complementary parallel labeling experiments technique for metabolic flux analysis. *Metab. Eng.* 20:49–55.
- Majewski RA, Domach MM. 1990. Simple constrained-optimization view of acetate overflow in *E. coli*. *Biotechnol. Bioeng.* 35:732–738.
- Martínez I, Zhu J, Lin H, Bennett GN, San K-YY. 2008. Replacing *Escherichia coli* NAD-dependent glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) with a NADP-dependent enzyme from *Clostridium acetobutylicum* facilitates NADPH dependent pathways. *Metab Eng.* 10: 352-359
- McAnulty M, Yen J, Freedman B, Senger R. 2012. Genome-scale modeling using flux ratio constraints to enable metabolic engineering of clostridial metabolism in silico. *BMC Syst. Biol.* 6:42.
- Nanchen A, Schicker A, Sauer U. 2006. Nonlinear dependency of intracellular fluxes on growth rate in miniaturized continuous cultures of *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:1164–1172.
- Nicolas C, Kiefer P, Letisse F, Krömer J, Massou S, Soucaille P, Wittmann C, Lindley ND, Portais J-C. 2007. Response of the central metabolism of *Escherichia coli* to modified expression of the gene encoding the glucose-6-phosphate dehydrogenase. *FEBS Lett.* 581:3771–3776.

6. REFERENCIAS

- Olavarria K, De Ingeniis J, Zielinski DC, Fuentealba M, Muñoz R, McCloskey D, Feist AM, Cabrera R. 2014. Metabolic impact of an NADH-producing glucose-6-phosphate dehydrogenase in *Escherichia coli*. *Microbiology* 160:2780–2793.
- Orth JD, Conrad TM, Na J, Lerman JA, Nam H, Feist AM, Palsson BØ. 2011. A comprehensive genome-scale reconstruction of *Escherichia coli* metabolism--2011. *Mol. Syst. Biol.* 7:535.
- Orth JD, Palsson B. 2012. Gap-filling analysis of the iJO1366 *Escherichia coli* metabolic network reconstruction for discovery of metabolic functions. 6:30.
- Orth JD, Thiele I, Palsson BØ. 2010. What is flux balance analysis? *Nat. Biotechnol.* 28:245–248.
- Orthner CL, Pizer LI. 1974. An evaluation of regulation of the hexose monophosphate shunt in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 249:3750–3755.
- Romano a. H, Conway T. 1996. Evolution of carbohydrate metabolic pathways. *Res. Microbiol.* 147:448–455.
- Rosman K, Taylor P. 1998. Isotopic compositions of the elements. *Pure Appl. Chem.* 70:217–235.
- Rowley DL, Pease AJ, Wolf RE. 1991. Genetic and Physical Analyses of the Growth Rate-Dependent Regulation of *Escherichia coli* *zwf* Expression 173:4660–4667.
- Russell JB, Cook GM. 1995. Energetics of bacterial growth: balance of anabolic and catabolic reactions. *Microbiol. Rev.* 59:48–62.
- San K-Y, Bennett GN, Berríos-Rivera SJ, Vadali R V, Yang Y-T, Horton E, Rudolph FB, Sariyar B, Blackwood K. 2002. Metabolic engineering through cofactor manipulation and its effects on metabolic flux redistribution in *Escherichia coli*. *Metab. Eng.* 4:182–192.
- Sauer U, Canonaco F, Heri S, Perrenoud A, Fischer E. 2004. The soluble and membrane-bound transhydrogenases UdhA and PntAB have divergent functions in NADPH metabolism of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 279:6613–6619.

- Schellenberger J, Que R, Fleming RMT, Thiele I, Orth JD, Feist AM, Zielinski DC, Bordbar A, Lewis NE, Rahmanian S, Kang J, Hyduke DR, Palsson BØ. 2011. Quantitative prediction of cellular metabolism with constraint-based models: the COBRA Toolbox v2.0. *Nat. Protoc.* 6:1290–1307.
- Schellenberger J. Monte Carlo Simulation in Systems Biology. Ph.d., University of California, San Diego, 2000.
- Schuetz R, Kuepfer L, Sauer U. 2007. Systematic evaluation of objective functions for predicting intracellular fluxes in *Escherichia coli*. *Mol. Syst. Biol.* 3:119.
- Schuetz R, Zamboni N, Zampieri M, Heinemann M, Sauer U. 2012. Multidimensional optimality of microbial metabolism. *Science* 336:601–604.
- Szyperski T. 1995. Biosynthetically directed fractional ¹³C-labeling of proteinogenic amino acids. An efficient analytical tool to investigate intermediary metabolism. *Eur. J. Biochem.* 232:433–448.
- Valvano MA, Messner P, Kosma P. 2002. Novel pathways for biosynthesis of nucleotide-activated glycerol-manno-heptose precursors of bacterial glycoproteins and cell surface polysaccharides. *Microbiology* 148:1979–1989.
- Van Gulik WM, Heijnen JJ. 1995. A metabolic network stoichiometry analysis of microbial growth and product formation. *Biotechnol. Bioeng.* 48:681–698.
- Varma A, Boesch BW, Palsson B. 1993. Stoichiometric interpretation of *Escherichia coli* glucose catabolism under various Oxygenation Rates. *Applied and Environmental Microbiology.* 59:2465–2473.
- Vemuri GN, Altman E, Sangurdekar DP, Khodursky a B, Eiteman M a. 2006. Overflow metabolism in *Escherichia coli* during steady-state growth: transcriptional regulation and effect of the redox ratio. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:3653–3661.
- Widmer F, Kaplan NO. 1977. *Pseudomonas aeruginosa* transhydrogenase: affinity of substrates for the regulatory site and possible hysteretic behavior. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 76:1287–1292.

6. REFERENCIAS

- Wittmann C, Heinzle E. 1999. Mass spectrometry for metabolic flux analysis. *Biotechnol. Bioeng.* 62:739-750.
- Wittmann C. 2007. Fluxome analysis using GC-MS. *Microb. Cell Fact.* 6:6.
- Yang C, Hua Q, Baba T, Mori H, Shimizu K. 2003. Analysis of *Escherichia coli* anaerobic metabolism and its regulation mechanisms from the metabolic responses to altered dilution rates and phosphoenolpyruvate carboxykinase knockout. *Biotechnol. Bioeng.* 84:129-144.
- Yu J, Bryant AP, Marra A, Lonetto MA, Ingraham KA, Chalker AF, Holmes DJ, Holden D, Rosenberg M, Mcdevitt D. 2001. Characterization of the *Streptococcus pneumoniae* NADH oxidase that is required for infection. *Microbiology.* 147: 431-438.
- Zamboni N, Fischer E, Sauer U. 2005. FiatFlux--a software for metabolic flux analysis from ¹³C-glucose experiments. *BMC Bioinformatics* 6:209.
- Zhao J, Baba T, Mori H, Shimizu K. 2004. Effect of *zwf* gene knockout on the metabolism of *Escherichia coli* grown on glucose or acetate. *Metab. Eng.* 6:164-174.
- Zhao J, Baba T, Mori H, Shimizu K. 2004. Global metabolic response of *Escherichia coli* to *gnd* or *zwf* gene-knockout, based on ¹³C-labeling experiments and the measurement of enzyme activities. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64:91-98.
- Zhao J, Shimizu K. 2003. Metabolic flux analysis of *Escherichia coli* K12 grown on ¹³C-labeled acetate and glucose using GC-MS and powerful flux calculation method 101:101-117.
- Zhu J, Shimizu K. 2005. Effect of a single-gene knockout on the metabolic regulation in *Escherichia coli* for D-lactate production under microaerobic condition. *Metab. Eng.* 7:104-115.
- Zhao G, Winkler ME. 1994. An *Escherichia coli* K-12 *tktA tktB* mutant deficient in transketolase activity requires pyridoxine (vitamin B6) as well as the aromatic amino acids and vitamins for growth. *J Bacteriol.* 176: 6134-6138

7. Anexos

7.1 Cepas, plásmidos y partidores

Tabla S1. Cepas y características genotípicas

	Cepas	Fragmentos	
		Región <i>tktA</i>	Región <i>pntA</i> y <i>pntB</i>
Intermedias	$\Delta tktA::kan^R$	Cassette FRT-kan ^R -FRT	Operón <i>pntAB</i> silvestre
	$\Delta pntAB::kan^R$	Gen <i>tktA</i> silvestre	Cassette FRT-kan ^R -FRT
	$\Delta pntAB \Delta tktA::kan^R$	Cassette <i>icd</i> ^{NAD} -FRT-kan ^R -FRT	Secuencia remanente FRT
Finales	MG1655 NADHox†	Gen <i>tktA</i> silvestre	Operón <i>pntAB</i> silvestre
	$\Delta tktA$	Secuencia remanente FRT	Operón <i>pntAB</i> silvestre
	$\Delta pntAB$	Gen <i>tktA</i> silvestre	Secuencia remanente FRT
	$\Delta tktA \Delta pntAB$	Secuencia remanente FRT	Secuencia remanente FRT
	$\Delta tktA$ NADHox†	Secuencia remanente FRT	Operón <i>pntAB</i> silvestre

†Expresión heteróloga de la enzima NADH oxidasa en el plásmido pTrc99A regulable por IPTG

Tabla S2. Lista de plásmidos

Nombre Plásmido	Característica genómica relevantes	Referencia
pKD13	<ul style="list-style-type: none"> • Sitios FRT • Kanamicina^R 	Datsenko y Wanner, 2000
pKD46	<ul style="list-style-type: none"> • Termosensible (mantención 30°C, curar a 37°C). • Inducible por L-Arabinosa • Sistema de recombinación del bacteriófago λ <i>Red.</i> • Ampicilina^R 	Datsenko y Wanner, 2000
pCP20	<ul style="list-style-type: none"> • Termosensible (Inducción a 30°C, curar a 43°C) • Recombinasa de levadura Flp, reconoce los sitios FRT. 	Datsenko y Wanner, 2000
pTrc99A-nox	<ul style="list-style-type: none"> • Inducible por IPTG. • Ampicilina^R 	Vemuri y col., 2006

Tabla S3. Lista de partidores

identificador de partidor	Secuencia	TM °C	Sitio inicio hibridación en genoma o plásmido
1	TCTCATTATCTGGTGCTGAAAACAG	62	1.672.516
2	TATCACATTCCTTAAGCCAATTTTAATC	61	1.676.317
3	GTGGTATTAATGTGCGTTTCGGTAT	62	1.673.354
4	CAGGATTCAGTAACGCAATTCATC	63	1.675.672
5	TGAATGTAATTCTCGCTGATATAGTTTTTAT	61	3.077.222
6	CATATACACTTTGTAATTTACCGGCTGAC	63	3.080.191
7	ACTGATTTTTCATCGCTACCGGTTTCAGAAGT	69	3.077.976
8	AGTTTTAGAGTGCAGCTGACGGAAGTTTTT	68	3.079.367
9	GTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAG	69	213 (pKD13)
10	GTCCATAAAACCGCCCAGTCTAGCTATC	69	1.054 (pKD13)

7.2 Tasa de dilución y tasa de crecimiento en cultivos continuos.

Los cultivos continuos tienen como finalidad controlar la tasa de crecimiento. En este anexo se presenta la deducción matemática y los supuestos que permite establecer que la tasa de crecimiento (μ) es igual a la tasa de dilución (D). Para un metabolito cualquiera en un cultivo (incluida la biomasa) se definen cuatro procesos. La velocidad de acumulación es igual a la velocidad de ingreso más la velocidad de formación, menos la velocidad de salida y de consumo del metabolito.

$$\frac{d(X)V}{dt} = X'(t) = F_1 C_i - F_2 C_s + V r_f^i - V r_c^i$$

donde: X=Biomasa; V=volumen del cultivo; F1=caudal de alimentación; F2=caudal de salida; Ci=concentración del componente i en la alimentación; Cs=concentración del componente i en el lavado, r_f^i =velocidad de formación del componente i; r_c^i = velocidad de consumo del componente i.

En los cultivos continuos, además de la tasa de crecimiento hay que considerar la tasa de remoción de células. La ecuación queda de esta forma:

$$\frac{dX}{dT} V = \mu X V - F X$$

Se reordena:

$$\frac{dX}{dT} = \mu X - \frac{F}{V} X$$

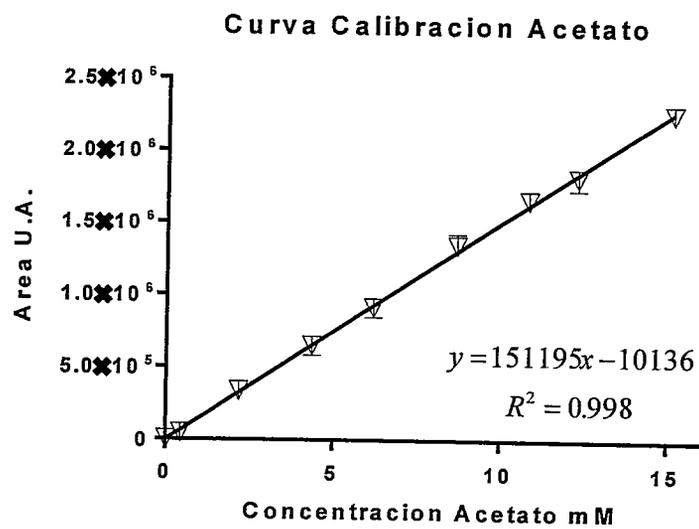
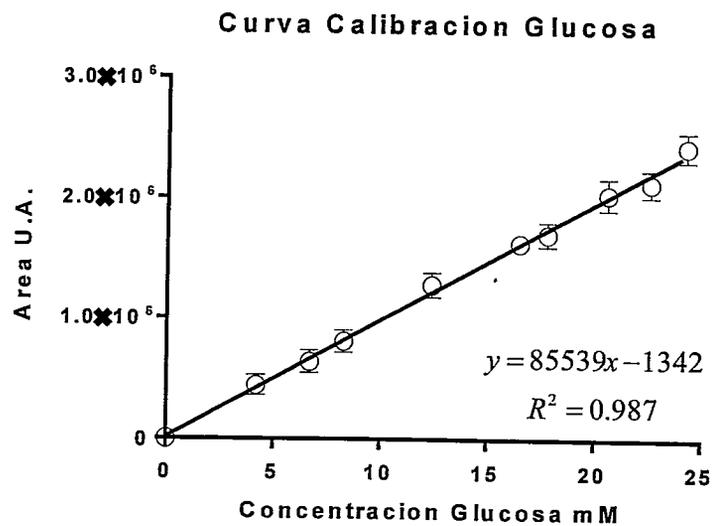
$F/V =$ Tasa de dilución D (h^{-1})

$$\frac{dX}{dT} = \mu X - DX$$

Si la concentración de células es constante $dx/dt = 0$

$$0 = \mu X - DX \quad \therefore \quad \mu = D$$

7.3 Curvas de calibración de glucosa y acetato para HPLC



7.4 Funciones y scripts de MatLab (R2013a) para uso en el toolbox Cobra.

Notas colores.

Naranja = Comentarios.

Calipso = Entradas o cadenas de texto.

Azul = Palabras claves reservadas por MatLab. Ejemplo: uso de bucles.

1. La función optimizar, puede ser ocupada para calcular el óptimo usando programación lineal (LP) o programación lineal entera mixta (MILP), esta última para obtener soluciones con bucles minimizados.

```

classdef optimizar
methods (Static)
%Entradas
% model : Modelo Cobra
%Salida .LP
% Sol : Vector solución
% PuntoF : Valor solución
%Salida .MILP
% Sol : Vector solución con minimización de bucles
function [Sol,PuntoF]=GluMinLP(model)
Bio=0.2;
Ace=0;
model= changeRxnBounds(model,'Ec_biomass_iJ01366_WT_53p95M',Bio,'b');
model=changeRxnBounds(model,'Ec_biomass_iJ01366_core_53p95M',0,'b');
model= changeRxnBounds(model,'EX_glc(e)',-20,'l');
model= changeRxnBounds(model,'EX_ac(e)',Ace,'b');
model=changeObjective(model,'EX_glc(e)');
Sol=optimizeCbModel(model,'max');
PuntoF=Sol.f;
disp(sprintf('El consumo de glucosa mínimo para 0.2 de biomasa es:
%.2f.',PuntoF));
end
function [Sol,PuntoF]=BioMaxLP(model)
Glu=2.52;
Ace=0;
model= changeRxnBounds(model,'EX_glc(e)',-Glu,'b');
model= changeRxnBounds(model,'EX_ac(e)',Ace,'b');
model=changeObjective(model,'Ec_biomass_iJ01366_WT_53p95M');
model=changeRxnBounds(model,'Ec_biomass_iJ01366_core_53p95M',0,'b');
Sol=optimizeCbModel(model,'max');
PuntoF=Sol.f;
disp(sprintf('La producción de biomasa máxima para 2.52 mmoles de glucosa es:
%.2f.',PuntoF));
end
function [Sol,PuntoF]=ATPMinLP(model)
Bio=0.2;

```

```

Glu=2.52;
Ace=0;
model=changeRxnBounds(model, 'EX_glc(e)', -Glu, 'b');
model=changeRxnBounds(model, 'EX_ac(e)', Ace, 'b');
model=changeRxnBounds(model, 'Ec_biomass_iJ01366_WT_53p95M', Bio, 'b');
model=changeRxnBounds(model, 'Ec_biomass_iJ01366_core_53p95M', 0, 'b');
model=changeObjective(model, 'ATPM');
model=changeRxnBounds(model, 'ATPM', 0, 'l');
Sol=optimizeCbModel(model, 'max');
PuntoF=Sol.f;
disp(sprintf('El ATP de mantenimiento minimo es: %.2f.', PuntoF));
end
function [fluxEcoliGluMILP]=GluMinMILP(model)
Bio=0.2;
Ace=0;
model= changeRxnBounds(model, 'Ec_biomass_iJ01366_WT_53p95M', Bio, 'b');
model=changeRxnBounds(model, 'Ec_biomass_iJ01366_core_53p95M', 0, 'b');
model= changeRxnBounds(model, 'EX_glc(e)', -20, 'l');
model= changeRxnBounds(model, 'EX_ac(e)', Ace, 'b');
model=changeObjective(model, 'EX_glc(e)');
fluxEcoliGluMILP = IterativeOpt(model, 'EX_glc(e)');
end
function [fluxEcoliBioMILP]=BioMaxMILP(model)
Glu=2.52;
Ace=0;
model= changeRxnBounds(model, 'EX_glc(e)', -Glu, 'b');
model= changeRxnBounds(model, 'EX_ac(e)', Ace, 'b');
model=changeObjective(model, 'Ec_biomass_iJ01366_WT_53p95M');
model=changeRxnBounds(model, 'Ec_biomass_iJ01366_core_53p95M', 0, 'b');
fluxEcoliBioMILP = IterativeOpt(model, 'Ec_biomass_iJ01366_WT_53p95M');
end
function [fluxEcoliATPMILP]=ATPMinMILP(model)
Bio=0.2;
Glu=2.52;
Ace=0;
model=changeRxnBounds(model, 'EX_glc(e)', -Glu, 'b');
model=changeRxnBounds(model, 'EX_ac(e)', Ace, 'b');
model=changeRxnBounds(model, 'Ec_biomass_iJ01366_WT_53p95M', Bio, 'b');
model=changeRxnBounds(model, 'Ec_biomass_iJ01366_core_53p95M', 0, 'b');
model=changeObjective(model, 'ATPM');
model=changeRxnBounds(model, 'ATPM', 0, 'l');
fluxEcoliATPMILP = IterativeOpt(model, 'ATPM');
end
end
end

```

2. La función `calculoFR`, se utilizó para realizar los cálculos de los cocientes de flujo y ocuparlos como restricciones en la optimización.

```

classdef calculoFR
methods (Static)
% Entradas
% model      : Modelo Cobra
% FBAsol     : Solución Cobra
% Salida
% Resultado  : Valor calculo cociente de flujo
function [Resultado] = A(model,FBAsol)
    RxnsA = {'FBA','TKT2','TALA','EDD','TKT1'};
    rxnIDiJO = findRxnIDs(model,RxnsA);
    FBA=FBAsol.x(rxnIDiJO(1));
    TKT2=FBAsol.x(rxnIDiJO(2));
    TALA=FBAsol.x(rxnIDiJO(3));
    EDD=FBAsol.x(rxnIDiJO(4));
    TKT1=FBAsol.x(rxnIDiJO(5));
    Resultado=((2*(FBA-TKT2-TALA))/((EDD)+(2*FBA)+(TKT1)+(TALA)));
end
function [Resultado] = B(model,FBAsol)
    RxnsB = {'EDD','PDH','ME1'};
    rxnIDiJO = findRxnIDs(model,RxnsB);
    EDD=FBAsol.x(rxnIDiJO(1));
    PDH=FBAsol.x(rxnIDiJO(2));
    ME1=FBAsol.x(rxnIDiJO(3));
    Resultado=(EDD)/((EDD)+(PDH)+(ME1));
end
function [Resultado] = C(model,FBAsol)
    RxnsC = {'PPCK','GAPD'};
    rxnIDiJO = findRxnIDs(model,RxnsC);
    PPCK=FBAsol.x(rxnIDiJO(1));
    GAPD=FBAsol.x(rxnIDiJO(2));
    Resultado=(PPCK)/((PPCK)+(GAPD));
end
function [Resultado,Limite] = D(model,FBAsol,limite)
    RxnsD = {'EDD','FBA','TKT1','TKT2','TALA'};
    rxnIDiJO = findRxnIDs(model,RxnsD);
    EDD=FBAsol.x(rxnIDiJO(1));
    FBA=FBAsol.x(rxnIDiJO(2));
    TKT1=FBAsol.x(rxnIDiJO(3));
    TKT2=FBAsol.x(rxnIDiJO(4));
    TALA=FBAsol.x(rxnIDiJO(5));
    Resultado=((TKT1)+(2*TKT2)+(3*TALA))/((EDD)+(2*FBA)+(TKT1)+(TALA));
    if Resultado >= limite
        disp('El Flux Ratio supera el limite medido experimentalmente')
        Limite=0;
    end
    if Resultado < limite
        Limite=1;
    end
end
end
end
end

```

3. Script del muestreo del espacio de soluciones mediante Monte Carlo por cadenas de Markov.

```

modelCaso = readCbModel();% Carga Modelo
% Establecer restricciones y calcular óptimo
Bio=0.2;
Glu=2.52;
Ace=0;
modelCaso=changeRxnBounds(modelCaso,'EX_ac(e)',Ace,'b'); %Acetato
modelCaso=changeRxnBounds(modelCaso,'EX_glc(e)',-Glu-Glu*0.05,'l'); %Glucosa
modelCaso=changeRxnBounds(modelCaso,'EX_glc(e)',-Glu+Glu*0.05,'u');
modelCaso=changeRxnBounds(modelCaso,'Ec_biomass_iJ01366_core_53p95M',0,'b');
%Biomasa
modelCaso=changeRxnBounds(modelCaso,'Ec_biomass_iJ01366_WT_53p95M',Bio-
Bio*0.05,'l');
modelCaso=changeRxnBounds(modelCaso,'Ec_biomass_iJ01366_WT_53p95M',Bio+Bio*0.
05,'u');
%Optimizar llamando a la función optimizar.ATPMinMILP
[SolCaso,PuntoF(1,1)]=optimizar.ATPMinLP(modelCaso);
%Se usa la solución óptima como restricción adicional
modelCaso=changeRxnBounds(modelCaso,'ATPM',PuntoF(1)-PuntoF(1)*0.05,'l');
modelCaso=changeRxnBounds(modelCaso,'ATPM',PuntoF(1)+PuntoF(1)*0.05,'u');
%Muestreo del espacio de soluciones mediante Monte Carlo por cadenas de
Markov (MCMC)
[Caso_model_gp,Caso_mixfraction] = gpSampler(modelCaso);
%Calcular picos de la distribución de cada reacción
for i = 1:length(modelCaso.rxns)
    gaussCaso = fitdist(Caso_model_gp.points(i,:)','normal');
    FlujosProbables_Caso(i,1) = {modelCaso.rxns(i)};
    FlujosProbables_Caso(i,2) = {SolCaso.x(i)};
    FlujosProbables_Caso(i,3) = {gaussCaso.mu};
end

```

4. Script que construye gráficos de los histogramas de las reacciones de interés, de dos muestreos del espacio de soluciones mediante Monte Carlo por cadenas de Markov.

```

% Iniciar Variables
cvCaso1=zeros();
cvCaso2=zeros();
CHICaso1=zeros();
CHICaso2=zeros();
NumeroColumnas = 5;
NumeroFilas = ceil(length(ListRxn)/NumeroColumnas);
graphNum = 1;
for i = 1:length(ListRxn(:,1))
    %Reacción Graficada
    subplot(NumeroFilas, NumeroColumnas, graphNum);
    Reaccion = ListRxn(i,1);
    %Buscar posibilidades de flujos de dicha reacción en ambas condiciones

```

```

Caso1 = Caso1_model_gp.points(findRxnIDs(modelCASO1,Reaccion),:);
Caso2 = Caso2_model_gp.points(findRxnIDs(modelCASO2,Reaccion),:);
%Normalizar número de barras del histograma
DivHist1 = 50;
DivHist2 = 50;
%Histograma caso 1, color azul
[y_caso1,x_caso1] = hist(Caso1,DivHist1);
bar_caso1=bar(x_caso1,y_caso1);
set(bar_caso1,'facecolor',[0 0 1],'Edgecolor','none');
hold on;
%Histograma caso 2, color rojo
[y_caso2,x_caso2] = hist(Caso2,DivHist2);
bar_caso2=bar(x_caso2,y_caso2);
set(bar_caso2,'facecolor',[1 0 0],'Edgecolor','none');
%Transparencia de histogramas
alpha(get(bar_caso1,'children'),.5);
alpha(get(bar_caso2,'children'),.5);
%Ajustar limites del eje X
limite = 1.2;
if abs(FluxProbables_CASO1(findRxnIDs(modelCASO1, Reaccion),1)) ...
< limite && abs(FluxProbables_CASO2(findRxnIDs(modelCASO1, Reaccion),1)) <
limite
    maximo(1,1) = FluxProbables_CASO1(findRxnIDs(modelCASO1,
Reaccion),1);
    maximo(2,1) = FluxProbables_CASO2(findRxnIDs(modelCASO1,
Reaccion),1);
    valorMax = max(maximo);
    xlim([(valorMax - abs(valorMax*3)) (valorMax + abs(valorMax*3))]);
end;
if xlim <= 0.5 & xlim >=-0.5;
    xlim([(valorMax - abs(valorMax*50)) (valorMax + abs(valorMax*75))]);
end

%Agregar línea recta con valor optimo
altura=get(gca,'YLim');
set(gca,'YLim',altura);
if OptimoFluxCaso1(i)==OptimoFluxCaso2(i)
line([OptimoFluxCaso1(i)
OptimoFluxCaso1(i)],get(gca,'YLim'),'LineStyle','.', 'LineWidth',1, 'Color',rgb
('Black'))
else
line([OptimoFluxCaso1(i)
OptimoFluxCaso1(i)],get(gca,'YLim'),'LineStyle','.', 'LineWidth',1, 'Color',rgb
('RoyalBlue'))
line([OptimoFluxCaso2(i)
OptimoFluxCaso2(i)],get(gca,'YLim'),'LineStyle','.', 'LineWidth',1, 'Color',rgb
('DeepPink'))
end
%Cambios en los titulos
if strcmp(Reaccion,'G6PDH2r')
Reaccion = strrep(Reaccion,'G6PDH2r','G6PDH');
end
if strcmp(Reaccion,'ICDHyr')
Reaccion = strrep(Reaccion, 'ICDHyr','ICDH');

```

```

end
if strcmp(Reaccion, 'THD2pp')
    Reaccion = strrep(Reaccion, 'THD2pp', 'PntAB');
end
if strcmp(Reaccion, 'NADTRHD')
    Reaccion = strrep(Reaccion, 'NADTRHD', 'UdhA');
end
Reaccion = strrep(Reaccion, '_', '\_');
title(Reaccion, 'fontweight', 'bold');
graphNum = graphNum + 1;
%Se muestra en la legenda el coeficiente de variación (CV) calculado, solo si
%tiene una distribución normal, dado por la prueba prueba chi-cuadrado de
%bondad de ajuste.
CHICaso1(i) = chi2gof(Caso1);
CHICaso2(i) = chi2gof(Caso2);
cvCaso1(i) = std(Caso1)/mean(Caso1);
cvCaso2(i) = std(Caso2)/mean(Caso2);
if CHICaso1(i) == 1 && CHICaso2(i) == 1;
    if cvCaso1(i) <= 0;
        NewMean=mean(Caso1).*-1;
        cvCaso1(i) = std(Caso1)/NewMean;
        legend(sprintf('%.2f',cvCaso1(i)),sprintf('%.2f',cvCaso2(i)));
        if cvCaso2(i) <= 0;
            NewMean=mean(Caso2).*-1;
            cvCaso2(i) = std(Caso2)/NewMean;
            legend(sprintf('%.2f',cvCaso1(i)),sprintf('%.2f',cvCaso2(i)));
        end
    end
elseif cvCaso2(i) <= 0;
    NewMean=mean(Caso2).*-1;
    cvCaso2(i) = std(Caso2)/NewMean;
    legend(sprintf('%.2f',cvCaso1(i)),sprintf('%.2f',cvCaso2(i)));
else
    legend(sprintf('%.2f',cvCaso1(i)),sprintf('%.2f',cvCaso2(i)));
end
end
if CHICaso1(i) == 0 || CHICaso2(i) == 0;
    legend('NC','NC');
end
%Propiedades de la leyenda
set(legend,'FontSize',8);
set(legend,'Location','NorthEast');
end
%Exporta Grafico a imagen .tif
box on
set(gcf, 'Color', 'w');
set(gcf, 'Position', [223 43 1462 929]);
export_fig Figura.tif -q101 -nocrop -opengl -r300
%Nota: Solo el "rendering" opengl es capaz de realizar transparencias MatLab
R2013a.

```

Tabla S4. Equivalencia entre las reacciones metabólicas en el modelo iJO1366 y el modelo usado por FiatFlux.

Numero reacción COBRA	Nombre reacción COBRA	Numero reacción FiatFlux	Nombre reacción FiatFlux
164	EX_glc(e)	1	glucose
1283	G6PDH2r	2	zwf
1423	GND	3	gnd
2077	PGI	4	pgi
1095	EDD	5	edd
1151	FBA	6	pfk-fba
2064	PFK		
2442	TKT1	7	tktA
2443	TKT2	8	tktB
2398	TALA	9	tal
1315	GAPD	10	gap-pgk
1102	ENO	11	PGA>PEP
2266	PYK	12	Pyk
2047	PDH	13	Pyr-AcCoa
878	CS	14	TCA1
1548	ICDHyr	15	TCA2
608	AKGDH	16	TCA3
1245	FUM	17	TCA4
1758	MDH	18	mdh
1761	ME1 (NAD)	19	mae
1762	ME2 (NADP)		
2183	PPCK	20	pck
2181	PPC	21	pcc
36	EX_ac(e)	22	acetate
1552	ICL	23	gox
2418	THD2pp	24	TH
1871	NADTRHD		
252	EX_o2(e)	25	respiration

Tabla S5. Lista de requerimientos de intermediarios metabolitos para generar un gramo de biomasa en *Escherichia coli* (Ingraham y col. 1983).

Cantidad*	Metabolito
59.81	ATP
13.03	NADPH
4.94	GLU-L
3.74	ACCOA
3.54	NAD
2.83	PYR
1.78	OAA
1.49	3PG
0.89	R5P
0.51	PEP
0.36	E4P
0.25	GLN-L
0.20	G6P
0.12	G3P
0.07	F6P

*mmoles por gramo de peso seco.

7.5 Origen metabólico del esqueleto carbonado de los aminoácidos.

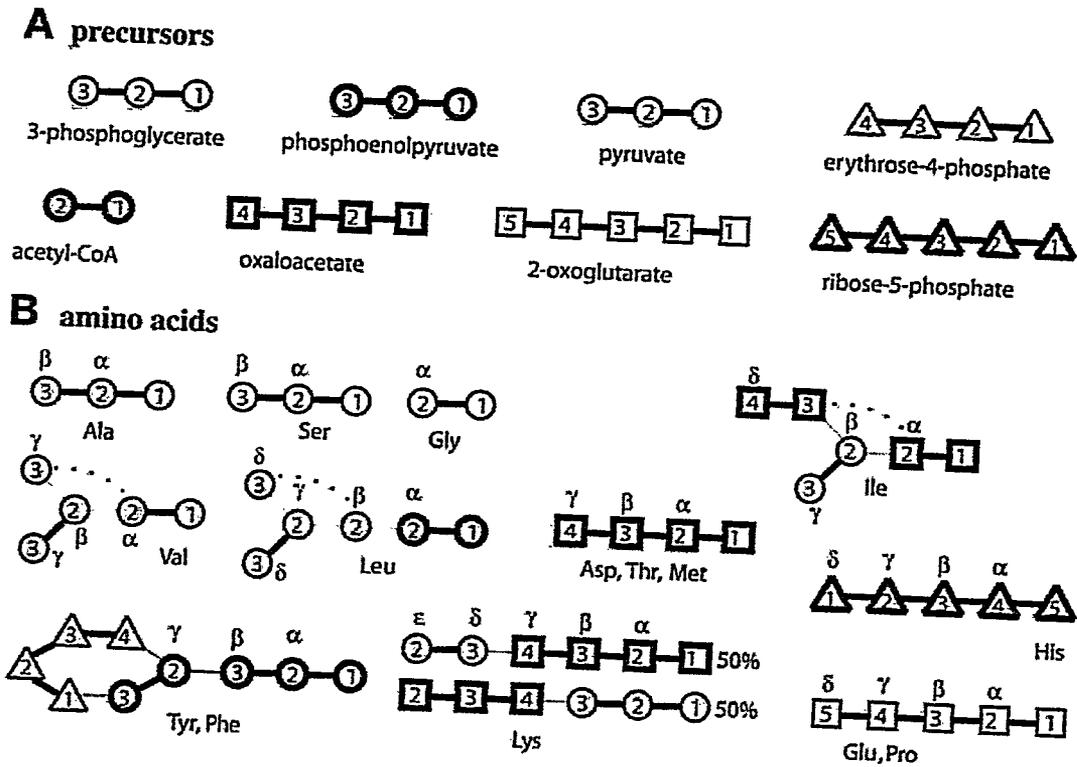


Figura S1. Las líneas gruesas denotan que esos enlaces entre carbonos no se rompen cuando se forma el aminoácido. Las líneas delgadas indican nuevos enlace C-C y la línea punteada indica que esos carbonos derivan del mismo metabolito aunque no estén adyacentes en el aminoácido (Szyperski, 1995).