

TESIS DEFENDIDA POR
Dante Alberto Magdaleno Moncayo
Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ

Dra. Elizabeth Ponce Rivas
Director del Comité

Dra. Enriqueta Muñoz Márquez
Miembro del Comité

Dr. Ernesto García Mendoza
Miembro del Comité

Dra. Carmen Guadalupe Paniagua Chávez
*Coordinador del programa de posgrado
en Ciencias con orientación en
Biotecnología Marina*

Dr. David Hilario Covarrubias Rosales
Director de Estudios de Posgrado

12 de Marzo de 2010.

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR
DE ENSENADA



PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS
CON ORIENTACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA MARINA

**Caracterización molecular y análisis de expresión de los genes
potenciales de piruvato cinasa (*pyk1 sll0587* y *pyk2 sll1275*) en la
cianobacteria *Synechocystis* sp. PCC 6803**

TESIS

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:

Dante Alberto Magdaleno Moncayo

Ensenada, Baja California, México, 12 de Marzo de 2010.

RESUMEN de la tesis de **DANTE ALBERTO MAGDALENO MONCAYO**, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de MAESTRO EN CIENCIAS con orientación en Biotecnología Marina. Ensenada, Baja California. Enero de 2010.

Caracterización molecular y análisis de expresión de los genes potenciales de piruvato cinasa (*pyk1 sll0587* y *pyk2 sll1275*) en la cianobacteria *Synechocystis* sp. PCC 6803

Resumen aprobado por:

Dra. Elizabeth Ponce Rivas
Director de Tesis

Synechocystis sp. PCC 6803 es una eubacteria Gram-negativa modelo para el estudio de rutas metabólicas ya que es competente natural y presenta un crecimiento fotoautotrófico y fotoheterotrófico en presencia de glucosa. El genoma de este microorganismo se encuentra secuenciado en su totalidad, lo cual ha propiciado el desarrollo de estudios *in silico* de transcriptomas, proteomas y metabolomas. En el genoma de esta cianobacteria se encuentran dos secuencias, en diferentes regiones del genoma, que son potenciales de codificar para dos piruvato cinasas diferentes Pyk1 *sll0587* y Pyk2 *sll1275*. La caracterización de estas dos secuencias es de gran importancia ya que la piruvato cinasa es la última enzima que interviene en una de las rutas del metabolismo del carbono de gran importancia como la glicólisis, formando piruvato y ATP a partir de fosfoenolpiruvato. En este sentido resulta de gran interés el estudiar si esta cianobacteria presenta uno o dos genes de piruvato cinasa, si estos están regulados en forma diferencial, si codifican para dos isoenzimas y de ser así, si estas están controladas por reguladores alostéricos diferentes como en otros organismos. Con base a lo anterior el objetivo del presente trabajo fue el llevar a cabo la caracterización molecular y análisis de expresión de los dos genes potenciales de piruvato cinasa (*pyk1 sll0587* y *pyk2 sll1275*) en la cianobacteria *Synechocystis* sp. PCC 6803.

El análisis de aminoácidos de las secuencias de Pyk1 *sll0587* y Pyk2 *sll1275* de *Synechocystis* sp. PCC 6803 con secuencias de piruvato cinasa de otras bacterias mostró la presencia de sitios conservados característicos de las enzimas Pyk. Entre los sitios conservados importantes están el sitio de unión a fosfoenolpiruvato y los sitios de unión a ATP/ADP y a cationes monovalentes y divalentes. Pyk2 presentó un extremo C-terminal largo de 99 aa como las piruvato cinasas del género *Bacillus*, el cual contiene un motivo de unión a fosfoenolpiruvato. Pyk2 también mostró un alto grado de homología de con otras piruvato cinasas que se activan con AMP como la de *G. stearothermophilus* y

Synechococcus sp. PCC 6301, lo que sugiere que Pyk2 también pudiera ser activada por AMP.

Para llevar a cabo la interrupción de los genes *pyk* se diseñaron dos metodologías diferentes: interrupción por digestión e interrupción por amplificación. Al utilizar la metodología de digestión con enzimas de restricción no se logró la interrupción de los genes *pyk* probablemente debido a que se utilizaron los genes completos, cuya secuencia podría resultar tóxica a la célula como se ha encontrado en otros organismos. La metodología de amplificación consistió en diseñar oligonucleótidos con bases homólogas a los genes *pyk1 sll0587* y *pyk2 sll1275* y bases que hibriden a casetes de resistencia a antibióticos que permitan amplificar los casetes y realizar la interrupción de los genes *pyk* en el cromosoma de la cianobacteria por recombinación homóloga. Las amplificaciones por PCR permitieron comprobar la interrupción de los genes *pyk1 sll0587* y *pyk2 sll1275* y en el genoma de *Synechocystis* sp. PCC 6803. Sin embargo, no se lograron obtener transformantes en las condiciones de selección utilizadas (BG11+glucosa y BG11+succinato). Por otro lado, se realizó el análisis de expresión de los dos genes potenciales de piruvato cinasa por medio de RT-PCR. Las muestras fueron obtenidas de cultivos de la cianobacteria en condiciones fotoautotróficas y exponiendo los cultivos a tres diferentes condiciones (fotoautotróficas, oscuridad por 48 horas y oscuridad por 48 horas con glucosa durante los últimos 60 minutos de incubación). La expresión del gen *pyk1 sll0587* fue inducida en oscuridad y en oscuridad con glucosa, mientras que el gen *pyk2 sll1275* se expresó cuando *Synechocystis* sp. PCC 6803 fue cultivada en condiciones fotoautotróficas y cuando estos cultivos fueron transferidos a oscuridad en presencia de glucosa. Los resultados mostraron que la expresión de los genes *pyk1 sll0587* y *pyk2 sll1275* se da forma diferencial.

Palabras Clave: piruvato cinasa; *Synechocystis* sp. PCC 6803; expresión de genes.

Molecular characterization and expression analysis of potential genes of pyruvate kinase (*pyk1 sll0587* and *pyk2 sll1275*) in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803

Synechocystis sp. PCC 6803 is a Gram-negative eubacteria model for the study of metabolic pathways as it is natural competent and has a photoautotrophic and photoheterotrophs growth in the presence of glucose. The complete genome sequence of this microorganism has been obtained, which has led to the development of *in silico* studies of transcriptomics, proteomics and metabolomics. In the genome of this cyanobacterium are two sequences, in different regions of the genome that potentially encode for two different pyruvate kinases: Pyk1 *sll0587* and Pyk2 *sll1275*. The characterization of these two sequences is of great importance since the pyruvate kinase is the last enzyme involved in the route of carbon metabolism of glycolysis, forming pyruvate and ATP from phosphoenolpyruvate. In this regard it is of great interest to study whether this cyanobacterium has one or two genes for pyruvate kinase, if they are differentially regulated, if they code for two different isoenzymes and if they are controlled by different allosteric regulators as in other organisms. Based on the above, the aim of this work was to perform the molecular characterization and expression analysis of the two potential genes of pyruvate kinase *pyk1 sll0587* and *pyk2 sll1275* in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803.

The amino acid analysis of the sequences of Pyk1 *sll0587* and Pyk2 *sll1275* from *Synechocystis* sp. PCC 6803 with pyruvate kinase sequences from other bacteria showed the presence of conserved sites characteristic of Pyk enzymes. Between the important conserved sites are the phosphoenolpyruvate binding site and the binding sites for ATP/ADP and monovalent and divalent cations. Pyk2 presents a long C-terminal of 99 aa as in the pyruvate kinases of genus *Bacillus*, which presents a phosphoenolpyruvate binding motif. Pyk2 also shows a high homology to other pyruvate kinases that are activated by AMP as in *G. stearothermophilus* and *Synechococcus* sp. PCC 6301, suggesting that Pyk2 could also be activated by AMP.

To perform the disruption of the *pyk* genes two different methodologies were designed: digestion disruption and interruption by amplification. The disruption of *pyk* genes was not achieved by using the method of digestion with restriction enzymes probably because the whole *pyk* genes were used, whose sequence could be toxic to the cell as has been found in other organisms. The amplification methodology consisted of designing oligonucleotides with bases homologous to *pyk1 sll0587* and *pyk2 sll1275* genes and bases that prime to antibiotic resistance cassettes that allow amplification of the cassettes and enhancement of the chromosomal disruption of the cyanobacterium *pyk* genes by homologous recombination.

The PCR amplifications made it possible to verify the disruption of genes *pyk1 sll0587* and *pyk2 sll1275* and in the genome of *Synechocystis* sp. PCC 6803. However, no transformants could be obtained with the selection conditions used (BG11 + glucose and BG11 + succinate). Subsequently, the gene expression analysis of the two potential pyruvate kinase genes was performed using RT-PCR. Samples were obtained from cyanobacteria cultures under photoautotrophic conditions, and later exposure at three different conditions (photoautotrophic, dark for 48 hours and darkness for 48 hours with glucose during the last 60 minutes of incubation). Expression of the gene *pyk1 sll0587* was induced in darkness and in darkness with glucose, while the gene *pyk2 sll1275* was expressed when *Synechocystis* sp. PCC 6803 was grown under photoautotrophic conditions and when these cultivations were transferred to darkness in the presence of glucose. The results showed the differential expression of genes *pyk1 sll0587* and *pyk2 sll1275*.

Keywords: pyruvate kinase; *Synechocystis* sp. PCC 6803; gene expression.

Dedicatorias

A mis padres.

Agradecimientos

Al CONACyT parcialmente a través de los proyectos FOMIX y Ciencia Básica, por otorgarme la beca para realizar la maestría en Ciencias con orientación en Biotecnología Marina en el CICESE.

A mi directora de tesis, la Dra. Elizabeth Ponce Rivas, por darme la oportunidad de realizar mi tesis, por sus consejos y paciencia.

A los miembros del comité, los doctores María Enriqueta Muñoz Márquez y Ernesto García Mendoza, por sus consejos, disponibilidad y paciencia.

A mis compañeros de laboratorios.

Al Dr. José Luis Stephano, por permitirme utilizar sus instalaciones y su equipo de laboratorio.

CONTENIDO

	Página
Resumen español.....	i
Resumen inglés.....	iii
Dedicatorias.....	v
Agradecimientos.....	vi
Contenido.....	vii
Lista de Figuras.....	x
Lista de Tablas.....	xiii
I. Introducción.....	1
II. Antecedentes.....	7
III. Justificación.....	10
IV. Objetivos.....	12
V. Materiales y Métodos.....	13
V.1 Análisis Molecular.....	13
V.1.1 Análisis comparativo de secuencias de piruvato cinasas.....	13
V.2 Interrupción de los genes <i>pyk</i>	13
V.2.1 Interrupción por medio de digestión y ligación de los genes <i>pyk</i>	13
V.2.2 Análisis de restricción teórico de las secuencias <i>pyk</i>	14
V.2.3 Digestiones enzimáticas de los plásmidos.....	16
V.2.4 Polimerización de extremos 5' de fragmentos de ADN.....	17
V.2.5 Reacción de ligado de los plásmidos con los casetes de resistencia a antibiótico.....	17
V.2.5.1 Ligación del plásmido Topo 1275 con el casete de resistencia a cloranfenicol.....	17
V.2.5.2 Ligación del plásmido Topo 0587 con el casete de resistencia a kanamicina.....	17
V.2.6 Interrupción por adición de sitios de restricción...	18
V.2.6.1 Diseño de oligonucleótidos para interrupción por adición	18
V.2.6.2 Digestión del plásmido Topo 1275 con <i>Age</i> I y amplificación del casete de resistencia a kanamicina con los oligonucleótidos Kan-age.....	19
V.2.6.3 Ligación del plásmido Topo 1275 y el casete de resistencia a kanamicina.....	20
V.2.6.4 Digestión del plásmido Topo 0587 con <i>Cla</i> I y amplificación de el casete de resistencia a cloranfenicol con los oligonucleótidos Clacat oligonucleótidos Clacat.....	20
V.2.6.5 Ligación del plásmido Topo 0587 y el casete de resistencia a cloranfenicol.....	21
V.3 Interrupción por amplificación.....	22

CONTENIDO (continuación)	Página
V.3.1 Diseño de oligonucleótidos para la interrupción por amplificación.....	22
V.3.2 Extracción plasmídica de los vectores pCAT19 y pNK862.....	23
V.3.3 PCR de gradiente para amplificar el casete de resistencia a kanamicina y cloranfenicol.....	24
V.4 Condiciones de cultivo y cinética de crecimiento.....	24
V.4.1 Condiciones de cultivo de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803.....	24
V.4.2 Curva de crecimiento de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803.....	26
V.5 Interrupción de los genes <i>pyk</i> en cromosoma.....	27
V.5.1 Transformación de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 con el producto de PCR diseñado para interrupción por amplificación.....	27
V.5.2 Comprobación por PCR de la interrupción de los genes <i>pyk</i> en el genoma de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803.....	28
V.6 Análisis de expresión de los genes <i>pyk</i>	28
V.6.1 Extracción de ARN total de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803.....	28
V.6.2 RT-PCR de los genes <i>sll0587</i> , <i>sll1275</i> y <i>rnpB</i>	29
V.7 Actividad enzimática.....	31
V.7.1 Medición de la actividad enzimática de piruvato cinasa en <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803.....	31
VI. Resultados y discusión.....	34
VI.1 Análisis molecular.....	34
VI.1.1 Análisis comparativo de secuencia de piruvato cinasas.....	34
VI.2 Interrupción de los genes <i>pyk</i> por digestión.....	41
VI.2.1 Digestión de los plásmidos pCAT19 y Topo 1275 con <i>Sma</i> I y ligación.....	41
VI.2.2 Digestión de los plásmidos pNK862 y Topo 0587 y ligación...	41
VI.2.3 Interrupción por adición de sitios de restricción.....	44
VI.2.3.1 Diseño de oligonucleótidos para interrupción por adición...	44
VI.2.3.2 Digestión del plásmido Topo 1275 y amplificación del casete de resistencia a kanamicina.....	44
VI.2.3.3 Digestión del plásmido Topo 0587 y amplificación del casete de resistencia a cloranfenicol.....	47
VI.3 Interrupción por amplificación.....	49
VI.4 Condiciones de cultivo y cinética de crecimiento.....	51
VI.4.1 Condiciones de cultivo de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 en medio líquido y sólido.....	51
VI.4.2 Cinética de crecimiento de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803.....	51

CONTENIDO (continuación)

	Página
VI.5 Interrupción de los genes <i>pyk</i> en cromosoma.....	53
VI.5.1 Transformación de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 con el producto de PCR diseñado para interrupción por amplificación.....	53
VI.6 Análisis de expresión de los genes <i>pyk</i>	58
VI.6.1 Extracción de ARN total de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803.....	58
VI.6.2 RT-PCR de los genes <i>sll0587</i> , <i>sll1275</i> y <i>rnpB</i>	59
VI.8 Actividad enzimática.....	63
VII. Conclusiones.....	67
VIII. Literatura citada.....	69

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura</i>		Página
1	Principales vías metabólicas del carbono en <i>Escherichia coli</i> .	3
2	Metabolismo de Pentosas fosfato en cianobacterias: a) vía reductiva, b) vía oxidativa.	4
3	Plásmidos y enzimas utilizadas para llevar a cabo la interrupción de los genes <i>pyk</i> .	15
4	Método de amplificación del casete de resistencia a kanamicina utilizando los oligonucleótidos Pk1275kan.	22
5	Alineamiento de secuencia de aminoácidos.	35
6	Digestión enzimática de los plásmidos Topo 1275 y pCAT19 con la enzima de restricción <i>Sma</i> I.	41
7	Digestión del plásmido Topo0587 con la enzima <i>Cla</i> I.	42
8	Digestión del plásmido pNK862 con la enzima <i>Ava</i> II para escindir el casete de resistencia a kanamicina.	43
9	Digestión del plásmido Topo 1275 con la enzima <i>Age</i> I y amplificación del casete de resistencia a kanamicina.	45
10	Producto de PCR utilizando los oligos Kan-Age.	46
11	PCR de los plásmidos extraídos de las clonas positivas de la ligación Topo1275 casete de resistencia a kanamicina.	46
12	Digestión del plásmido Topo0587 con la enzima <i>Cla</i> I.	47
13	Amplificación del casete de resistencia a cloranfenicol con los oligonucleótidos Cla-cat.	48

LISTA DE FIGURAS (continuación)

<i>Figura</i>		Página
14	Amplificaciones del PCR de gradiente con el plásmido pNK862 y los oligos Pk1275kan.	50
15	Amplificaciones del PCR de gradiente con el plásmido pCAT19 y los oligos Pk0587cat.	50
16	Gráfica de las absorbencias obtenidas a 730 nm y 750 nm durante un periodo de 30 días del cultivo de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803.	52
17	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 sembrada en medio BG-11 agar después de 6 días de incubación.	52
18	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 sembrada en medio BG-11 agar con TES NaOH y tiosulfato de sodio después de 10 días de incubación.	53
19	Comprobación de la interrupción del gen <i>sll0587</i> por medio de PCR.	56
20	Comprobación de la interrupción del gen <i>sll1275</i> por medio de PCR.	57
21	Electroforesis en gel de agarosa al 1% de extracción de ARN total.	59
22	RT-PCR de los genes <i>sll1275</i> , <i>sll0587</i> y el gen control <i>mnpB</i> de ARN total de cultivos en condiciones fotoautotróficas.	60
23	RT-PCR de los genes <i>sll1275</i> , <i>sll0587</i> y el gen control <i>mnpB</i> de ARN total de cultivos en condiciones de 2 días de oscuridad y 2 días de oscuridad con glucosa.	61
24	Gráfica de reacción control de la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa.	64

LISTA DE FIGURAS (continuación)

<i>Figura</i>		Página
25	Gráfica de reacción control de la actividad de la enzima piruvato cinasa.	65

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Oligonucleótidos utilizados para amplificar los genes <i>rnpB</i> , <i>pyk1 sll0587</i> y <i>pyk2 sll1275</i> .	30
II	Reactivos utilizados en las reacciones para la medición de actividad de piruvato cinasa en los controles (LDH y <i>pyk</i>) y muestras experimentales de las tres condiciones de cultivo utilizadas (foautotrófica, oscuridad y oscuridad con glucosa).	32
III	Oligonucleótidos utilizados para amplificar los casetes de resistencia a antibióticos para interrupción por adición.	44
IV	Oligonucleótidos utilizados para amplificar los casetes de resistencia a antibióticos para interrupción por amplificación.	49
V	Transcripción de los genes <i>pyk1 sll0587</i> , <i>pyk2 sll1275</i> y <i>rnpB</i>	61

I. INTRODUCCIÓN.

Las cianobacterias son un grupo de eubacterias Gram-negativas que presentan una amplia distribución en diferentes ambientes acuáticos. Estos organismos son importantes en el ciclo del carbono al fijar una proporción significativa de CO₂, en el ciclo del nitrógeno al fijar N₂, así como también en producción de O₂ y son de gran importancia biotecnológica (Knowles, *et al.*, 2001). Asimismo, producen una gran variedad de pigmentos, vitaminas, enzimas las cuales pueden obtenerse a escala comercial. Las cianobacterias también producen metabolitos con actividad antiviral, antifúngica e inmuno-moduladora. Un ejemplo de esto es el compuesto proveniente de *Oscillatoria laete-virians* llamado BDU 20801, el cual inhibe el crecimiento de *Candida* sp. (Deth, 1999).

Las cianobacterias también son una gran fuente de generación de bioenergía ya que bajo condiciones adecuadas producen una alta cantidad de lípidos para producción de biodiesel con un rendimiento 100 veces mayor que otros organismos, y su biomasa no lipídica puede ser convertida a metano, hidrógeno y electricidad (Rittmann, 2008).

Hasta el momento las cianobacterias son el único grupo de bacterias en el que se ha descrito un ciclo circadiano. En *Synechococcus* PCC 6301 se han encontrado tres genes relacionados con el ciclo circadiano (Ishiura, *et al.*, 1998). También se ha reportado que actividades que la división celular, la asimilación de aminoácidos, fijación de nitrógeno, respiración y síntesis de carbohidratos se encuentran bajo control circadiano (Golden, S. S., M. Ishiura. 1997).

Los organismos fotosintéticos como las cianobacterias generan compuestos orgánicos a través de la fotosíntesis. Estos organismos utilizan energía solar para generar energía química y poder reductor para fijar el carbono atmosférico y assimilar otros nutrientes (Singh, *et al.* 2008). Además de las cianobacterias fotoautótrofas existen otras bacterias que son fotoheterótrofas, las cuales son capaces de utilizar fuentes de carbono como la glucosa en presencia de luz (Patterson, 1996).

A diferencia de otras procariotas, las cianobacterias utilizan preferentemente la ruta oxidativa de pentosas fosfato para el catabolismo de la glucosa. En el caso de *E. coli* el 70% de la glucosa-6-fosfato se metaboliza mediante la vía Embden-Meyerhorf-Parnas y el 30% restante se metaboliza por la vía de pentosas fosfato (Miller, *et al.*, 1987) (Figura 1).

Con el uso de C¹⁴-glucosa se ha descubierto que la cianobacteria *Anabaena* sp. tiene preferencia por la ruta oxidativa de pentosas fosfato. Esta ruta metabólica funciona como vía oxidativa en el metabolismo de glucosa y como vía reductiva en la fijación de CO₂ (Carr y Whitton, 1982) (Figura 2a y b). Durante la oscuridad la vía de pentosas fosfato oxida el glucógeno y se genera energía por medio de respiración aeróbica, y cuando se utiliza como vía reductiva se fija CO₂ depositando parte del carbono como reserva de energía con la formación de glucógeno (Hein, *et al.*, 1988, Stal L., 1992).

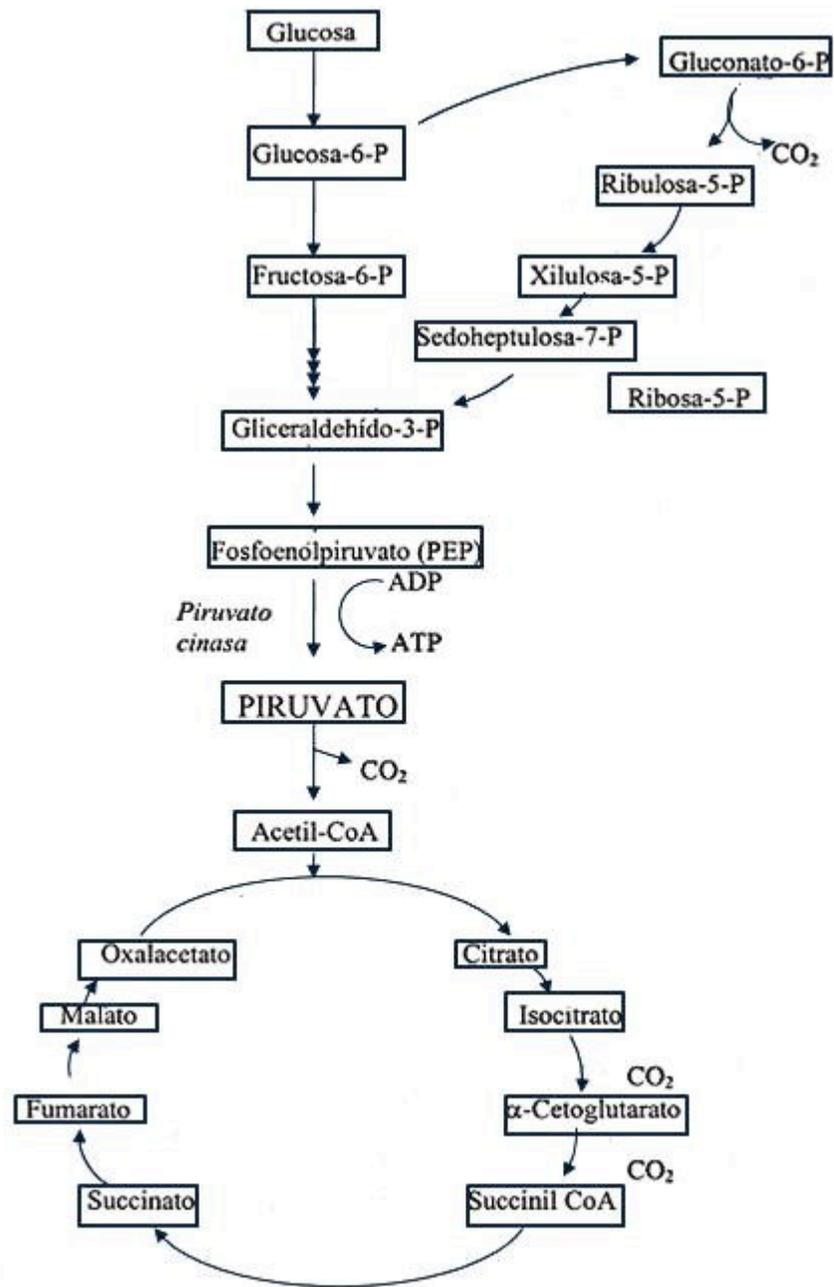


Figura 1. Principales vías metabólicas del carbono en *Escherichia coli* (Ponce et al., 1995).

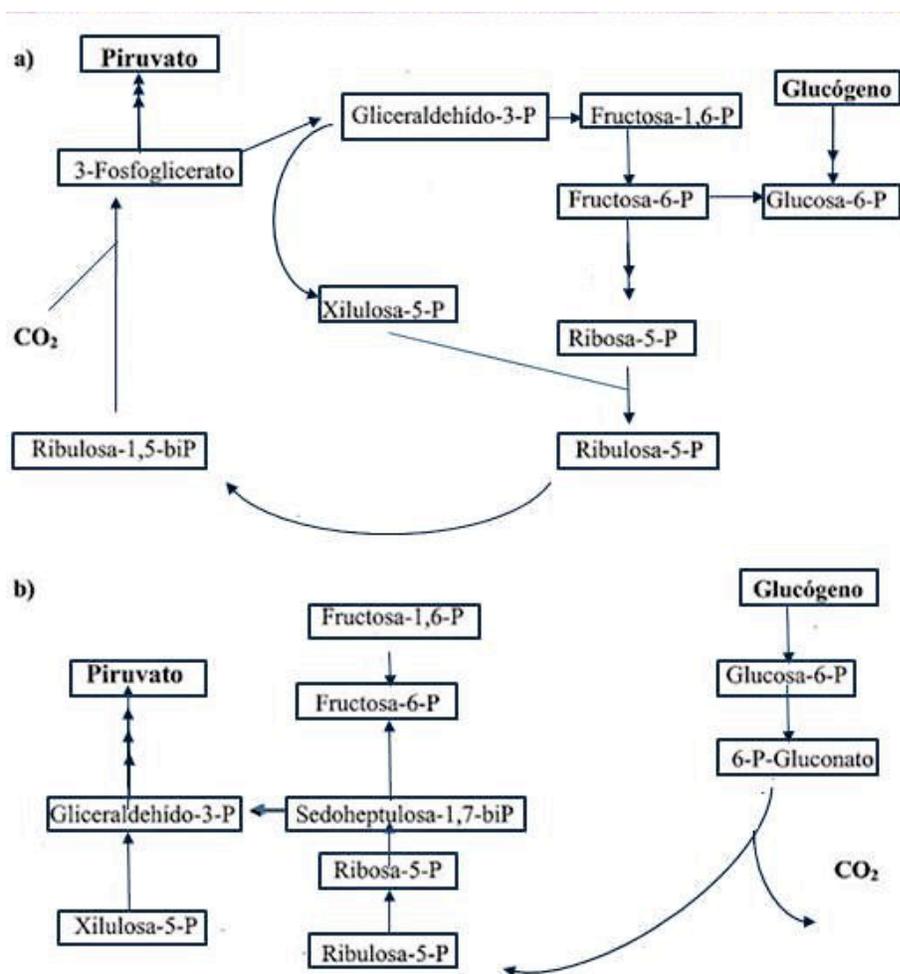


Figura 2. Metabolismo de Pentosas fosfato en cianobacterias: a) vía reductiva b) vía oxidativa (Carr, *et al.*, 1969).

En general los compuestos C_3 que se obtienen a partir de la ruta de pentosas fosfatos y la ruta glicolítica son importantes para la producción de diversos metabolitos en las cianobacterias. Dos intermediarios importantes que participan en la reacción final de la ruta de Embden Meyerhof-Parnas (EMP) son el fosfoenolpiruvato (PEP) y el piruvato, por lo que independientemente de la vía que se utilice (pentosas fosfato o glicólisis), el piruvato es el último intermediario. El piruvato es de gran importancia para el metabolismo celular ya que se puede utilizar tanto en la biosíntesis de aminoácidos como en la ruta de los ácidos

tricarboxílicos para la generación de energía (Miller, *et al.*, 1987; Valle, *et al.*, 1996).

Una de las enzimas clave en las vías de glicólisis y pentosas fosfato es la piruvato cinasa que realiza la catálisis de transfosforilación irreversible de PEP y adenosín difosfato (ADP) formando piruvato y adenosín trifosfato (ATP) (Kayne, 1973; Valentín, *et al.*, 2000). Esta enzima generalmente para su activación requiere de cationes como K^+ y cationes divalentes como Mg^{+2} o Mn^{+2} (Mattevi, *et al.*, 1995). Sin embargo, en algunos casos como en la bacteria hipertermofílica *Thermotoga maritima* y las archaeobacterias hipertermofílicas *Archaeoglobus fulgidus* y *Aeropyrum pernix*, la piruvato cinasa no utiliza el K^+ (Johnsen, *et al.*, 2003).

La piruvato cinasa ha sido purificada y caracterizada en animales, levaduras, plantas, y bacterias, en donde se presenta generalmente como un homotetrámero compuesto por subunidades de 55-60 kDa. Esta enzima presenta control alostérico y fosforilación reversible, coordinando la demanda de energía y de carbohidratos de la célula (Yamada K. y Noguchi T., 1999; Smith, *et al.*, 2000).

En general las bacterias presentan solo una enzima piruvato cinasa. Sin embargo, algunas enterobacterias como *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium* tienen dos isoenzimas llamadas piruvato cinasa tipo I, codificada por el gen *pykF* y piruvato cinasa tipo II, codificada por el gen *pykA* (Mattevi, *et al.*, 1995). En *E. coli* las isoenzimas de piruvato cinasa son activadas por fosfoenolpiruvato. Adicionalmente, la isoenzima tipo I es activada alostericamente por fructosa-1,6-difosfato (F1,6bF) e inhibida por ATP, mientras que la piruvato cinasa de tipo II es activada alostericamente por AMP y azúcares monofosfatos como la ribosa-5-fosfato (Malcovati, *et al.*, 1973; Mattevi, *et al.*, 1995).

En la mayoría de los organismos eucariotes la piruvato cinasa se encuentra en el citosol, pero en las plantas vasculares y algas verdes se presentan dos isoenzimas, una citosólica llamada PKc y otra del plástido PKp, las cuales difieren en sus características físicas e inmunológicas y presentan diferentes cinéticas enzimáticas (McCloud S. y Schuller K., 2001; Smith, *et al.*, 2000).

El metabolismo de las diferentes especies de cianobacterias generalmente se ha conservado a pesar de la gran divergencia morfológica y fisiológica que hay entre ellas (Osanai y Tanaka, 2006). Un organismo modelo para el estudio de rutas metabólicas es la cianobacteria *Synechocystis* sp. PCC 6803, la cual es unicelular, es naturalmente transformable (competente natural) y es capaz de presentar un crecimiento heterotrófico, en ausencia de luz (Kaneko, *et al.*, 1997). También puede crecer de forma fotoautotrófica y fotoheterotrófica (mixotrófica) (Anderson y McIntosh, 1991). *Synechocystis* sp. PCC 6803 puede integrar ADN exógeno en su genoma por medio de recombinación homóloga activa (Grigorieva, G., y S. Shestokov, 1982). Esta cianobacteria presenta un genoma de 3.6 mega pares de bases (Mbp) y tiene de 6 a 10 copias por célula (Grigorieva, G., y S. Shestokov, 1982). El genoma de *Synechocystis* sp. PCC 6803 ya ha sido secuenciado en su totalidad (Kaneko, *et al.*, 1996) y la información se encuentra en la base de datos CianoBase (Kaneko y Tabata, 1997). Esto ha propiciado un desarrollo *in silico* de las posibles interacciones desde genoma, transcriptoma, proteoma, metaboloma e interactoma, creándose bases de datos especializadas como SynechoNet (Woo-Yeo, *et al* 2008).

Synechocystis sp. PCC 6803 presenta múltiples factores sigma al igual que *E. coli*. Estos factores son uno de los mecanismos para regular la expresión de genes, ya que la ARN polimerasa puede unirse a diferentes factores sigma y así ser específica para ciertos promotores. Summerfield y Sherman 2007 han reportado que al interrumpir los genes de sigma B y sigma E, se presenta un mayor impacto en la expresión de genes de manera global en condiciones de crecimiento mixotróficas, y la cianobacteria se ve inhabilitada a crecer en presencia de glucosa con pulsos de luz.

Estudios utilizando microarreglos muestran que bajo condiciones limitantes de nitrógeno *Synechocystis* sp. PCC 6803 cambia su transcriptoma para poder sobrevivir a esta condición de estrés nutricional, incrementándose la transcripción de genes involucrados en las rutas metabólicas de la oxidación de pentosas fosfato y el catabolismo del glucógeno (Osanai, *et al.*, 2006).

II. ANTECEDENTES.

A la fecha solo se ha determinado actividad de la piruvato cinasa encontrada en *Anabaena variabilis*, la cual es activada en presencia de F1,6BF (Pearce y Carr, 1969), mientras que la piruvato cinasa encontrada en *Synechococcus* PCC 6301 es activada en presencia de AMP y ribosa-5-fosfato (Knowles, *et al.*, 2001).

Al realizar una análisis del genoma de *Synechocystis* sp. PCC 6803 se encontraron dos secuencias homólogas a los genes de la enzima piruvato cinasa en diferentes lugares del genoma. Una de ellas denominada *pykF* (*sll1275*) o *pyk2 sll1275* tiene homología con la piruvato cinasa de *Geobacillus stearothermophilus* antes *Bacillus stearothermophilus*, mientras que la otra secuencia encontrada denominada como *pykF* (*sll0587*) o *pyk1 sll0587* tiene homología con la piruvato cinasa de *Agrobacterium vitis* (Kaneko, *et al.*, 1996).

Investigaciones de Osani, *et al.* 2006, han mostrado que el gen *pyk1 sll0587* en *Synechocystis* sp. PCC 6803 que codifica para una piruvato cinasa es positivamente regulado por el factor sigma E (SigE) pero no el gen *pyk2 sll1275* (Osanai, *et al.*, 2005), y en condiciones de ausencia de nitrógeno se ha visto que *pyk1 sll0587* es inducida pero *pyk2 sll1275* es reprimida (Osanai, *et al.*, 2006).

Estudios realizados por nuestro grupo utilizando extractos crudos de *Synechocystis* sp. PCC 6803 han mostrado dos actividades diferentes de piruvato cinasa, en presencia de diferentes activadores. En presencia de PEP y AMP se observó actividad por lo que se le denominó PykA, y la otra en presencia de PEP y F1,6BF por lo que se le llamó PykF (Matas, 2001).

Asimismo se investigó la actividad de las isoenzimas de piruvato cinasa en *Synechocystis* sp. PCC 6803 en células cultivadas con luz blanca, luz azul, oscuridad en presencia de glucosa y en oscuridad sin glucosa. Se ha caracterizado, asimismo la expresión genética y los flujos metabólicos en *Synechocystis* sp. PCC 6803 en cultivos fotoautotróficos, mixotróficos y heterotróficos (Yang, *et al.*, 2002). Otros estudios incluyen la cuantificación de los ARN mensajeros (ARNm) de los genes glicolíticos en diferentes condiciones de

cultivo en *Synechocystis* sp. PCC 6803 por medio de un RT-PCR semi-cuantitativo, encontrándose que en condiciones fotoautotróficas los dos ARNm de las piruvato cinasa fueron transcritos, pero en incubación de dos días en oscuridad se dejaron de transcribir ambos genes. En la presencia de glucosa los niveles de ARNm de *pyk1 sll0587* se incrementaron con pulsos de luz por 5 minutos, pero no en oscuridad. Sin embargo, la expresión de *pyk2 sll1275* incrementó en presencia de glucosa inclusive en oscuridad (Tabei, *et al.*, 2007). Estos resultados y otros estudios sugieren que los genes son regulados en forma diferencial como sucede en *Escherichia coli* (Muñoz y Ponce, 2003).

Estudios utilizando microarreglos han mostrado un incremento en los niveles de ARNm del gen *sll1330* el cual es un gen que pudiera ser regulador de respuesta de un sistema de dos componentes con dominios de unión al ADN hélice-vuelta-hélice (H-T-H) en *Synechocystis* sp. PCC 6803. Los genes glicolíticos también mostraron un incremento en la transcripción en presencia de glucosa, y aun más en presencia de luz, mientras que al inactivar el gen *sll1330* se reprimió la transcripción de la piruvato cinasa *pyk1 sll0587* en oscuridad con periodos cortos de luz, y en presencia de glucosa, mientras que los niveles de ARNm de la piruvato cinasa *pyk2 sll1275* se incrementaron (Tabei, *et al.*, 2007).

En *E. coli* se ha realizado el knockout de las dos isoenzimas de piruvato cinasa presentes en la bacteria, esto para ver la respuesta del flujo metabólico en ausencia de las dos isoenzimas (Emmerling, *et al.*, 2001). Por otro lado, la inactivación de los genes *pykA* y *pykF* de *E. coli* en combinación con la delección del sistema de la fosfotransferasa ha permitido el incremento de DAH(P), primer intermediario de la vía de los compuestos aromáticos (Gosset, *et al.*, 1996; Ponce, *et al.*, 1996). De igual manera el gen que codifica para la enzima piruvato cinasa en *Corynebacterium lactofermentum* ha sido inactivado por medio de mutagénesis específica y complementación para redireccionar el flujo de carbono hacia la producción de glicina (Gubler, *et al.*, 1994).

La inactivación de genes de piruvato cinasa en organismos como *E. coli*, *C. lactofermentum* y *B. subtilis* (Gubler, *et al.*, 1994; Muñoz, *et al.*, 1997; Ponce, *et al.*,

1995) ha ayudado a entender el papel de estas enzimas en el metabolismo del carbono y caracterizar el efecto de la mutación en la fisiología celular, así como redirigir el flujo de carbono hacia la síntesis de compuestos de interés biotecnológico dado su papel central en el metabolismo. En el caso particular de las cianobacterias a la fecha no existen trabajos sobre la inactivación y estudio de genes del metabolismo del carbono que permitan generar conocimiento sobre el papel de estas enzimas en el metabolismo central y la fisiología de las cianobacterias. En este sentido, el presente proyecto tiene el interés de desarrollar metodologías que permitan inactivar los genes *pyk1 sll0587* y *pyk2 sll1275*, que potencialmente codifican para dos piruvato cinasas funcionales diferentes (Pyk1 y Pyk2) en *Synechocystis* sp. PCC 6803, así como el realizar un análisis de expresión de estos genes en diferentes condiciones de crecimiento.

III. JUSTIFICACIÓN

Las cianobacterias son microorganismos de gran interés para estudiar procesos metabólicos ya que comparten con las algas eucariotas y las plantas superiores la capacidad de llevar al cabo la fotosíntesis utilizando la luz como fuente de energía y dióxido de carbono (CO₂) como fuente de carbono. Asimismo algunas son capaces de utilizar fuentes de carbono adicionales como la glucosa. Esto les permite habitar una gran cantidad de ambientes incluyendo los extremos. Los trabajos realizados en las cianobacterias han estado en gran parte enfocados al estudio de la fotosíntesis y fijación de nitrógeno, pero con el avance que se ha dado en los últimos años en la secuenciación de genomas de diferentes organismos ha comenzado la identificación y caracterización de genes y enzimas relacionados con otros procesos presentes en las cianobacterias como lo es el metabolismo del carbono.

Synechocystis sp. PCC 6803 es una cianobacteria unicelular que presenta un crecimiento fotoautotrófico y fotoheterotrófico en presencia de glucosa, lo que la convierte en modelo para el estudio de procesos metabólicos. Además es competente natural y su genoma ha sido secuenciado completamente. En *Synechocystis* sp. PCC 6803 se han identificado dos secuencias, ubicadas en diferentes zonas del genoma, que son potenciales de codificar para dos enzimas piruvato cinasas diferentes. El estudio de las piruvato cinasas resulta de gran importancia ya que al ser nodo de regulación de la vía glicolítica participan en una reacción en la cual se produce energía para la célula y piruvato, un precursor clave que no solo es utilizado para la síntesis de aminoácidos sino también de otros intermediarios metabólicos importantes para la célula. En este sentido resulta de gran interés el estudiar si este organismo presenta uno o dos genes de piruvato cinasa, si estos están regulados en forma diferencial, si codifican para dos enzimas funcionales diferentes o solo una y de ser dos si estas están controladas por reguladores alostéricos diferentes como en *E. coli*.

Aún cuando existen algunos estudios aislados al respecto no son concluyentes. Esto nos permitirá avanzar en el conocimiento sobre el papel de la(s) piruvato

cinasa(s) en el metabolismo y la fisiología de las cianobacterias y en especial de *Synechocystis* sp. PCC 6803. Asimismo este tipo de trabajos permiten sentar las bases para definir genes clave con vista a redirigir el flujo de carbono hacia la producción de metabolitos de interés biotecnológico mediante ingeniería de vías a metabólicas. Por lo que el desarrollo y evaluación de métodos para interrupción de los genes *pyk* en genoma de *Synechocystis* sp. PCC 6803 son clave en el avance del conocimiento básico de este microorganismo. De encontrarse que las dos secuencias del genoma codifican para dos proteínas funcionales en *Synechocystis* sp. PCC 6803, este sería el primer ejemplo en un microorganismo fotótrofo.

IV. OBJETIVOS.

IV.1. Objetivo general:

Llevar a cabo la caracterización molecular y análisis de expresión de los genes potenciales de piruvato cinasa (*pyk1 sll0587* y *pyk2 sll1275*) en la cianobacteria *Synechocystis* sp. PCC 6803.

IV.2. Objetivos particulares:

- 1) Llevar a cabo análisis teórico de las secuencias *Pyk1 sll0587* y *Pyk2 sll1275* de *Synechocystis* sp. PCC 6803 para identificar sitios característicos de las piruvato cinasas.

- 2) Desarrollar y evaluar métodos de interrupción de los genes de piruvato cinasa en el genoma de *Synechocystis* sp. PCC 6803

- 3) Evaluar el efecto de factores nutricionales-ambientales sobre la expresión de los genes de piruvato cinasa y su relación con los niveles de actividad de las enzimas piruvato cinasa.

V. MATERIALES Y MÉTODOS.

V.I ANÁLISIS MOLECULAR.

1) Análisis comparativo de secuencias de piruvato cinasas.

Este análisis se llevó a cabo con el objetivo de comparar las secuencias de aminoácidos de las piruvato cinasas de *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Pyk1 sll0587 y Pyk2 sll1275), con las de otros organismos en los cuales se conocen los activadores o inhibidores alostéricos y los sitios conservados entre las piruvato cinasas. Entre las secuencias analizadas están las Pyks de *Escherichia coli*, *Synechococcus* sp. , *Geobacillus stearothermophilus* y *Bacillus subtilis*. Este análisis permitirá identificar si la secuencia de aminoácidos las Pyks sll1275 y sll0587 de *Synechocystis* sp. PCC 6803 presentan los dominios característicos de las enzimas piruvato cinasa reportadas. Las secuencias se obtuvieron del banco de genes y genomas de Kyoto (www.genome.jp/kegg). El alineamiento de secuencias de aminoácidos se hizo con el programa de cómputo Lasergene (DNASTAR), utilizando el método Clustal V con los parámetros de alineamiento múltiple gap penalty 10., gap length penalty 10 y en parámetros de alineamiento pares K-Tuple 1., gap penalty 3., window 5 y diagonals 5.

V.2 INTERRUPCIÓN DE LOS GENES *pyk*.

Para la realización del objetivo 2 se plantearon dos estrategias, a la primera se le llamo interrupción por medio de digestión y a la segunda interrupción por amplificación.

1) Interrupción por medio de digestión y ligación de los genes *pyk*.

Se partió de los plásmidos TOPO-TA PCR 2.1 en los cuales se encuentran clonados por separado los genes completos de piruvato cinasa de la cianobacteria *Synechocystis* sp. PCC 6803 (psll1275 y psll0587) (Matas 2001). Para realizar la interrupción del gen *pyk2* sll1275 con el casete de resistencia a cloranfenicol y el gen *pyk1* sll0587 con el casete de resistencia a kanamicina, se procedió a extraer ADN plasmídico de las colonias que contienen los plásmidos: pCAT19 que

contiene el casete de resistencia a cloranfenicol, pNK862 el cual contiene el casete de resistencia a kanamicina, Topo 1275 en donde se encuentra clonado el gen *pyk2 sll1275* y Topo 0587, en el cual esta clonado el gen *pyk1 sll0587*. Las colonias transformadas se pusieron a crecer en 3 ml de Luria Bertani (LB) con una concentración de cloranfenicol de 10 µg/ml para la que contiene el plásmido pCAT19 y 30 µg/ml de kanamicina para la clona con el plásmido pNK862. Las colonias con Topo1275 y Topo0587 se pusieron a crecer en 3 ml de LB con 50 µg/ml de carbencilina.

Los cultivos se incubaron por 12 horas a 37°C con una agitación de 250 rpm. La extracción plasmídica se realizó utilizando el kit de extracción de Invitrogen (HQ Mini Plasmid Purification Kit) siguiendo el protocolo del proveedor. Las extracciones plasmídicas fueron cuantificadas utilizando un espectrofotómetro (nanodrop) midiendo las absorbancias a 260 nm y 280 nm. Las fórmulas utilizadas para medir la concentración de ADN y la pureza fueron las siguientes:

$$\text{Concentración ADN } (\mu\text{g/ml}) = (\text{DO}_{260}) \times (\text{factor de dilución}) \times \frac{50 \mu\text{g ADN/ml}}{1 \text{ DO}_{260}}$$

$$\text{Pureza} = \text{DO}_{260} / \text{DO}_{280}$$

2) Análisis de restricción teórico de las secuencias *pyk*

Para seleccionar las enzimas de restricción que fueran compatibles para interrumpir los genes *pyk* con los sitios de corte al obtener los casetes de resistencia a kanamicina y cloranfenicol, se realizó un análisis teórico de las secuencias usando el programa Sequencher 4.8. Se analizaron las secuencias de los genes *pyk1 sll1275*, *pyk2 sll0587*, el vector Topo PCR 2.1, los plásmidos pCAT19 y pNK862. El criterio de selección de las enzimas fue buscando el sitio único de corte lo mas cerca de la parte media de cada gen (*pyk1 sll0587* y *pyk2 sll1275*).

Para realizar la interrupción del gen *pyk2 sll1275*, de 1776 pares de bases (pb) con el casete de resistencia a cloranfenicol de 1004 pb, se seleccionó la

enzima de restricción *Sma* I, la cual tiene tres sitios de corte en el gen *pyk2 sll1275* (en las bases 442, 507 y 751), pero no en el plásmido en donde se encuentra clonado el gen. Esta misma enzima se seleccionó para obtener el casete de resistencia a cloranfenicol del plásmido pCAT19, para poder ligar los fragmentos directamente ya que los dos son digeridos con la misma enzima de restricción (Figura 3).

Para la interrupción del gen *pyk1 sll0587* (1422 pb) con el casete de resistencia a kanamicina (1201 pb) se seleccionaron dos enzimas de restricción, la enzima *Cla* I para abrir el gen *pyk1 sll0587* en la base 689 y la enzima *Ava* II para escindir y obtener el casete de resistencia a kanamicina del plásmido pNK862 (Figura 3).

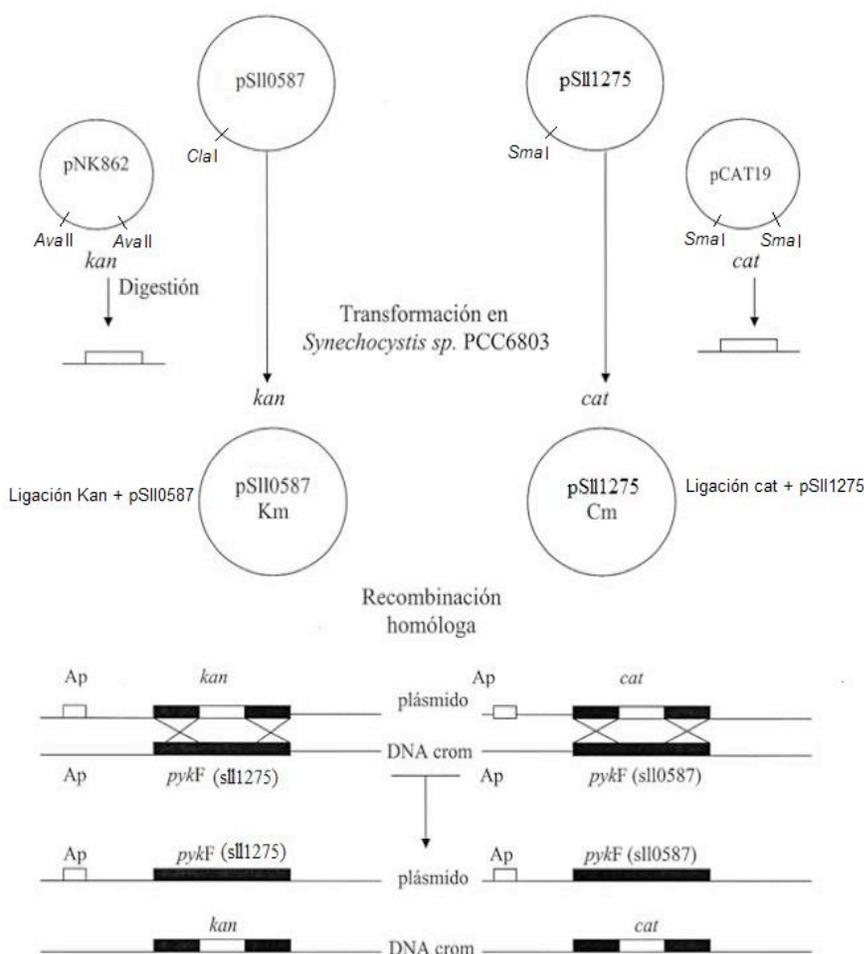


Figura 3. Plásmidos y enzimas utilizadas para llevar a cabo la interrupción de los genes *pyk*.

3) Digestiones enzimáticas de los plásmidos

Una vez seleccionadas las enzimas de restricción se procedió a obtener el casete de resistencia a cloranfenicol. Para ello se puso a digerir 1 µg de plásmido pCAT19, del amortiguador yellow con 1X de Fermentas: (Tris acetato 3 mM (pH 7.9 a 37°C), acetato de magnesio 10 mM, acetato de potasio 66 mM, BSA 0.1 mg/ml) y 10 unidades de la enzima *Sma* I (Fermentas). La reacción se aforó a 20 µl con H₂O estéril y se incubó 3 horas a 25°C. Para la obtención del casete de resistencia a kanamicina se puso a digerir 1 µg del plásmido pNK862, en amortiguador 2 de Invitrogen 1X (Tris-HCl 50 mM pH 8.0, MgCl₂ 10 mM, NaCl 50 mM) y 8 U de la enzima *Ava* II (Invitrogen).

La reacción fue aforada a 20 µl con H₂O estéril e incubada 3 horas a 37°C. Para obtener de forma lineal los plásmidos Topo 1275 y Topo 0587 se digirió 1 µg de cada plásmido con 10 U de la enzima *Sma* I (Fermentas) para el plásmido 1275 y 10 U de la enzima *Cla* I (Fermentas) para el plásmido 0587. Para ambas reacciones se utilizó amortiguador yellow 1X de Fermentas y se aforó a 20 µl con H₂O estéril. La reacción se incubó 3 horas a 25°C. Para desfosforilar los extremos terminales de ADN del plásmido y evitar su religación, treinta minutos antes de completar las tres horas de digestión se agregó 0.05 U de la enzima Calf fosfatasa alcalina de intestino (Fermentas) por cada pmol de extremos de ADN.

Completadas las reacciones enzimáticas se procedió a realizar electroforesis en geles de agarosa al 1% para separar los fragmentos de ADN que contienen los casetes de resistencia a cloranfenicol y kanamicina y extraerlos del gel de agarosa con el kit de Qiagen (Qiaquick Gel Extraction Kit) siguiendo el protocolo del proveedor. De la misma forma se extrajeron los plásmidos Topo 1275 y Topo 0857 ya lineales y desfosforilados del gel de agarosa con el kit (Qiaquick Gel Extraction Kit). Las eluciones purificadas de los fragmentos de ADN fueron cuantificadas como se mencionó anteriormente.

4) Polimerización de extremos 5' de fragmentos de ADN

El plásmido Topo 0587 linearizado y el casete de resistencia a kanamicina quedaron con extremos 5' salientes no compatibles al ser digeridos con las enzimas de restricción *Cla* I y *Ava* II, por lo que poder realizar la ligación los extremos salientes fueron rellenados utilizando el fragmento grande de la enzima DNA polimerasa I (Klenow) en presencia de dNTP's. Los reactivos usados fueron: 1 µg de ADN, dATP 0.5 mM, dCTP 0.5 mM, dGTP 0.5 mM, dTTP 0.5 mM, amortiguador 2 de Invitrogen 1X (Tris-HCl 50 mM, pH 8.0; MgCl₂ 10 mM, NaCl 50 mM) y 0.5 U del fragmento grande de la DNA Polimerasa. La reacción se aforó a 30 µl con H₂O estéril y se incubó por 20 minutos en hielo. El ADN se purificó con el kit de Qiagen (Qiaquick Gel Extraction Kit) siguiendo el protocolo del proveedor y se cuantificó como se mencionó anteriormente.

5) Reacciones de ligado de los plásmidos con los casetes de resistencia a antibiótico.

5.1) Ligación del plásmido Topo 1275 con el casete de resistencia a cloranfenicol.

Para la reacción de ligación de los extremos rasurados se utilizó un relación inserto: plásmido de 3:1, lo cual se calculó con la siguiente ecuación:

$$\text{Cantidad de inserto} = 3[(\text{pares de bases inserto} / \text{pares de bases vector})] (\text{masa del vector})$$

En la reacción de ligación se utilizó 100 ng de plásmido Topo1275, 52.7 ng de inserto del casete de resistencia a cloranfenicol, amortiguador de ligasa 1X (Tris-HCl 40 mM, MgCl₂ 10 mM, DTT 10 mM, ATP 0.5 mM (pH 7.8 a 25°C)) y 1 U de enzima T4 ligasa. También se pusieron reacciones de ligación control, las cuales incluyen lo mismo que la ya descrita, pero una sin inserto y otra sin inserto y sin ligasa. Todas las reacciones se aforaron a un volumen de 20 µl y se incubaron 12 horas a 25°C.

5.2) Ligación del plásmido Topo 0587 con el casete de resistencia a kanamicina.

Debido a que en esta reacción también se tienen que ligar extremos rasurados se utilizó la misma relación inserto: plásmido de 3:1, lo cual se calculó con la fórmula ya mencionada. En la reacción de ligación se utilizaron 100 ng de plásmido Topo 0587, 67.3 ng de inserto del casete de resistencia a kanamicina, amortiguador de ligasa 1X y 1 U de enzima T4 ligasa. También se pusieron reacciones de ligación control, como se mencionó anteriormente. Todas las reacciones se aforaron a un volumen de 20 μ l y se incubaron 12 horas a 25°C.

Las reacciones de ligación se utilizaron para la reacción de transformación con las células de *E. coli* Top10F químicamente competentes. La reacción se adicionó a 50 μ l de células, se incubó 30 minutos en hielo y después se le dio un choque térmico por 1 minuto a 42 °C, seguido por 1 minuto en hielo. Posteriormente se le agregó 250 μ l de medio SOC (extracto de levadura 0.5%, triptona 2%, NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM, MgSO₄ 10 mM, glucosa 20 mM) y se incubó 1 hora a 37°C con agitación a 250 rpm. Inmediatamente después de la hora de incubación las células se sembraron en cajas de petri con Luria-Bertani (LB)-agar. Las cajas fueron adicionadas con cloranfenicol (10 μ g/ml) o kanamicina (30 μ g/ml) según el plásmido y carbencilina (50 μ g/ml), además del control en LB-agar con carbencilina a 50 μ g/ml. Las cajas sembradas fueron incubadas a 37 °C por 18 horas.

6) INTERRUPCIÓN POR ADICCIÓN DE SITIO DE RESTRICCIÓN.

Como una forma alternativa de obtener los casetes de resistencia para clonarlos en Topo 1275 y Topo 0587 se diseñaron oligonucleótidos para amplificar los casetes de resistencia a cloranfenicol y kanamicina. Estos oligonucleótidos tienen como objetivo amplificar los casetes de resistencia y agregarles en los extremos 5' y 3' secuencias reconocidas por las enzimas de restricción específicas.

6.1) Diseño de oligonucleótidos para la interrupción por adición. Para el diseño de los oligonucleótidos se realizó un análisis de restricción teórico de las secuencias de los genes *pyk2 sll1275*, *pyk1 sll0587* del plásmido Topo 2.1 y de los casetes de resistencia a cloranfenicol y a kanamicina con el programa Sequencher 4.8. Se buscó una enzima de digestión que presentara un solo corte en aproximadamente la mitad de la secuencia del gen *pyk2 sll1275* y también del gen *pyk1 sll0587*. Otra característica para la selección de dicha enzima fue que no cortara en el vector Topo 2.1 en donde se encuentran clonados los genes y ni en los casetes de resistencia a antibiótico. Para el gen *pyk2 sll1275* (1776 pb) se seleccionó la enzima de restricción *Age* I, que corta el enlace fosfodiéster en la base número 824, mientras que para el gen *pyk1 sll0587* (1422 pb) se seleccionó la enzima de restricción *Cla* I, que corta en la base número 689. A los oligonucleótidos que se diseñaron para amplificar el casete de resistencia a kanamicina (Oligos KanAge) o cloranfenicol (Oligos Clacat) se les agregó la secuencia de reconocimiento para corte de la enzima *Age* I o *Cla* I, respectivamente. De esta forma los plásmidos y los casetes respectivos podrían ser digeridos con la misma enzima (*Age* I o *Cla* I) y posteriormente ligados, como se menciona a continuación.

6.2) Digestión del plásmido Topo 1275 con *Age* I y amplificación del casete de resistencia a kanamicina con los oligonucleótidos Kan-age

La digestión enzimática se realizó utilizando 1 µg del plásmido Topo1275, amortiguador NEB 1 1X de Biolabs (Bis-Tris-Propane HCl 10 mM, MgCl₂ 10 mM, ditiotretitol 1 mM (pH 7.0 a 25°C)), 5 U de *Age* I. La reacción se aforó a 20 µl y se incubó por 3 horas a 37°C.

El casete de resistencia a kanamicina fue amplificado por medio de un PCR utilizando 100 ng del plásmido pNK862 como templado, amortiguador de PCR 1X [Tris-HCl 20 mM (pH 8.4), KCl 50 mM], MgCl₂ 5 mM, 0.5 µl de dNTP's 10 mM, 1 µl (20 pmol) de oligo Kan-Age sentido, 1 µl (20 pmol) de oligo Kan-Age antisentido, 1.25 U de Taq polimerasa recombinante y fue aforado a 20 µl. Las condiciones del

PCR fueron 5 minutos a 94 °C, 25 ciclos de (30 s 94 °C, 30 s 60 °C, 1 min 72 °C) 10 min 72 °C de extensión. El producto de PCR se purificó utilizando el PCR Purification Kit de Invitrogen para luego digerir con la enzima *Age* I. Se utilizó 1 µg del producto de PCR, amortiguador 1 de Biolabs 1X (10 mM de Bis-Tris-Propane HCl, 10 mM de MgCl₂, 1 mM de ditiotretitol, pH 7.0 a 25°C). Se utilizaron 5 U de *Age* I y fue aforado a 20 µl. La reacción se incubó por 3 horas a 37°C y se purificó utilizando el PCR Purification Kit de Invitrogen.

6.3) Ligación del plásmido Topo 1275 y el casete de resistencia a kanamicina.

Se utilizó una relación inserto : plásmido de 2:1 ya que los extremos a ligar son cohesivos, lo cual se calculó con la formula ya mencionada. En la reacción de ligación se utilizó 200 ng de plásmido Topo 1275 abierto con *Age* I, 64.9 ng de inserto casete de resistencia a kanamicina digerido con *Age* I, amortiguador de ligasa 1X, 1 U de enzima T4 ligasa. La reacción se aforó a 20 µl, y se incubó 12 horas a 4°C. También se pusieron reacciones de ligación control, las cuales incluyen lo mismo que la ya descrita, pero una sin inserto y otra sin inserto y sin ligasa. Las reacciones se aforaron a un volumen de 20 µl y se incubaron 12 horas a 4°C.

Las reacciones de ligación se utilizaron para la reacción de transformación con las células de *E. coli* Top10F químicamente competentes con la metodología descrita anteriormente. Las células se sembraron en cajas de petri con LB-agar con 30 µg/ml de kanamicina y 50 µg/ml de carbencilina, los controles se sembraron en LB-agar con 50 µg/ml de carbencilina. Las cajas de Petri sembradas se incubaron a 37°C por 18 horas.

6.4) Digestión del plásmido Topo 0587 con *Cla* I y amplificación del casete de resistencia a cloranfenicol con los oligonucleótidos Clacat.

Se realizó una digestión enzimática utilizando 1 µg del plásmido Topo 0587 con amortiguador yellow 1X de Fermentas y 10 U de la enzima *Cla* I (Fermentas). La

reacción se aforó a 20 μ l con H₂O estéril y se incubó 3 horas a 37°C.

El casete de resistencia a cloranfenicol fue amplificado por medio de un PCR utilizando 100 ng del plásmido pCAT19 como templado, amortiguador PCR 1X, 5 mM de MgCl₂, 0.5 μ l (10mM) de dNTP's, 1 μ l (20 pmol) oligo Kan-Age sentido, 1 μ l (20 pmol) oligo Kan-Age antisentido, 1.25 U de Taq polimerasa recombinante y fue aforado a 20 μ l. Las condiciones del PCR fueron 5 minutos a 94 °C, 25 ciclos de (30 s 94 °C, 30 s 60 °C, 1 min 72 °C) 10 min 72 °C de extensión. El producto de PCR se purificó utilizando el PCR Purification Kit de Invitrogen. Enseguida se realizó la digestión con la enzimática *Cla* I, utilizando 1 μ g de producto de PCR, amortiguador yellow 1X de Fermentas y 10 U de la enzima *Cla* I (Fermentas). La reacción se aforó a 20 μ l con H₂O estéril, se incubó 3 horas a 37 °C y posteriormente se purificó utilizando el PCR Purification Kit de Invitrogen.

6.5) Ligación del plásmido Topo 0587 y el casete de resistencia a cloranfenicol.

Al igual que con el plásmido Topo 1275 se utilizó una relación inserto : plásmido de 2:1, lo cual se calculó con la formula ya mencionada. En la reacción de ligación se utilizó 200 ng de plásmido Topo 0587 linearizado con *Cla* I, 70.6 ng de inserto casete de resistencia a cloranfenicol digerido con *Cla* I, amortiguador ligasa 1X y 1 U de enzima T4 ligasa. La reacción se aforó a 20 μ l con H₂O estéril, y se incubó 12 horas a 4°C. También se pusieron reacciones de ligación control, las cuales incluyen lo mismo que la ya descrita, pero una sin inserto y otra sin inserto y sin ligasa. Las reacciones se aforaron a un volumen de 20 μ l y se incubaron 12 horas a 4 °C. Una vez completado el tiempo de incubación se transformaron células de la cepa Top10F de *E. coli* como se describió anteriormente. Las células se sembraron en cajas de petri con LB-agar con 5 μ g/ml de cloranfenicol y 50 μ g/ml de carbencilina, los controles se sembraron en LB-agar con 50 μ g/ml de carbencilina. Las cajas sembradas se incubaron a 37°C por 18 horas.

V.3 INTERRUPCIÓN POR AMPLIFICACIÓN.

La segunda estrategia para la realización del objetivo 2 se le denominó interrupción por amplificación.

Para llevar a cabo esta estrategia se diseñaron oligonucleótidos que contienen una parte del gen *pyk* y otra del gen de resistencia a cada uno de los dos antibióticos cloranfenicol o kanamicina para con ello amplificar por PCR y obtener los productos ya interrumpidos según la metodología propuesta por (Yu, et al., 2000) (Figura 4).

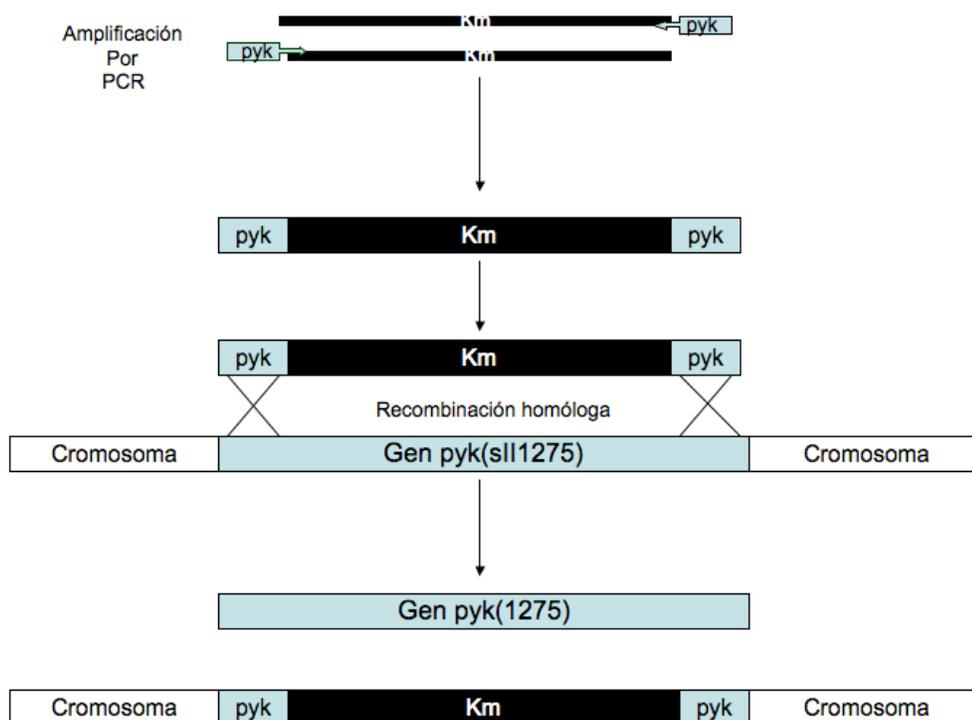


Figura 4. Diagrama de amplificación del casete de resistencia a kanamicina utilizando los oligonucleótidos Pk1275kan para realizar la interrupción del gen *pyk2 sll1275* en el genoma de *Synechocystis* sp. PCC 6803.

1) Diseño de oligonucleótidos para la interrupción por amplificación.

Para amplificar el casete de resistencia a kanamicina con secuencias homólogas al gen de piruvato cinasa *pyk2 sll1275* de *Synechocystis* sp. PCC 6803, se diseñaron los oligonucleótidos Pk1275kan-for y Pk1275kan-rev así como

los oligonucleótidos para amplificar el casete de resistencia a cloranfenicol con secuencias homólogas al gen de piruvato cinasa *pyk1 sll0587* de *Synechocystis* sp. PCC 6803, denominados Pk0587cat2-for y Pk0587cat-rev. Estos oligos contienen 19 bases que hibridan con los casetes de resistencia a kanamicina o a cloranfenicol más 60 bases homólogas a las secuencias de los genes *pyk2 sll1275* o *pyk1 sll0587*, respectivamente.

Para el diseño de los oligonucleótidos se realizó un análisis de secuencias con el programa Sequencher 4.8 para seleccionar bases que fueran específicos para los genes *pyk2 sll1275* y *pyk1 sll0587*. Asimismo se analizaron las secuencias de los transposones Tn9 para el casete de resistencia a cloranfenicol y Tn903 para el de resistencia a Kanamicina para asegurarnos que los oligonucleótidos que se diseñaran amplificaran el promotor, la secuencia de unión a ribosoma, el codón de inicio del gen y el de terminación. Estas secuencias también se revisaron que no hibridaran con las secuencias seleccionadas de los genes *sll1275* y *sll0587* para no tener problemas de dimerización de oligonucleótidos al momento de realizar el PCR.

2) Extracción plasmídica de los vectores pCAT19 y pNK862.

Se realizó la extracción de los plásmidos pCAT19 (que contiene el casete de resistencia a cloranfenicol) y pNK862 (el cual contiene el casete de resistencia a kanamicina). Para ello se inoculó una colonia aislada de una caja fresca de la transformante de cada plásmido en 3 ml de medio Luria Bertani (LB) con una concentración de cloranfenicol de 10 µg/ml y de kanamicina de 30 µg/ml, respectivamente. Los dos cultivos se incubaron por 12 horas a 37°C con una agitación de 250 rpm.

La extracción plasmídica se realizó utilizando el kit de extracción de Novagen (SpinPrep plasmid Kit Novagen) siguiendo el protocolo del proveedor.

Los plásmidos fueron cuantificados utilizando un espectrofotómetro como se mencionó anteriormente.

Los oligonucleótidos diseñados se mandaron sintetizar y se prepararon a una concentración de 20 µM, una vez teniendo los oligonucleótidos y los plásmidos

purificados y cuantificados se procedió a realizar un PCR de gradiente para cada uno de los casetes de resistencia a antibiótico.

3) PCR de gradiente para amplificar el casete de resistencia a kanamicina y cloranfenicol.

Las condiciones del PCR para amplificar el casete de kanamicina fueron 8 minutos de desnaturalización a 94 °C seguida de 30 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 1 minuto (49.9°C, 53.4°C, 57.7°C, 61.3°C), 2 minutos a 72 °C por 30 ciclos y 10 minutos finales a 72 °C de extensión. La preparación de la reacción fue 120 ng de plásmido pNK862, 2 µl de amortiguador 10X, 1 µl de oligo Pk1275kan-for (20 pmol) o Pk0587cat2-for, 1 µl de oligo Pk1275kan-rev (20 pmol) o Pk0587-rev, 1.25 U de *Taq* Polimerasa Platimun; todo esto aforado a un volumen final con H₂O estéril a 20 µl.

Una vez terminadas las reacciones de PCR se procedió a analizarlas por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (Agarbol H/M Fragment mercury) a 70 Volts y posterior tinción con bromuro de etidio y observación en el transiluminador con una lámpara de UV.

V.4 CONDICIONES DE CULTIVO Y CINÉTICA DE CRECIMIENTO.

1) Condiciones de cultivo de *Synechocystis* sp. PCC 6803.

La cepa silvestre de *Synechocystis* sp. PCC 6803 fue donada por el Dr. Willem Vermaas de la Universidad de Arizona USA, la cual se recuperó a partir de una caja de medio BG-11 agar.

Se prepararon soluciones stocks para utilizarlos en la preparación del medio BG-11.

BG-11 100x sin Fe⁺, fosfato, carbonato.

Para un litro:

NaNO ₃	149.6 g
MgSO ₄ . 7H ₂ O	7.5 g
CaCl ₂ . 2H ₂ O	3.6 g

Ácido cítrico	0.60 g
NaEDTA 0.25 M pH 8.0	1.12 ml
Minerales traza	100 ml

Minerales traza:

Para 1 litro:

H ₃ BO ₃	2.86 g
MnCl ₂ . 4 H ₂ O	1.81 g
ZnSO ₄ . 7 H ₂ O	0.22 g
Na ₂ MoO ₄ . 2 H ₂ O	0.39 g
CuSO ₄ . 5 H ₂ O	0.079 g
Co(NO ₃) ₂ . 6 H ₂ O	0.049 g

Citrato de amonio férrico (1000x)

600 mg por 100 ml H₂O

Na₂CO₃ (1000x)

2 g Na₂CO₃ por 100 ml H₂O

K₂HPO₄ (1000x)

3.05 g K₂HPO₄ por 100 ml H₂O

Para preparar 1 litro de Medio BG-11 líquido se tiene que agregar las siguientes cantidades de los stocks descritos arriba:

Para 1 litro:

10 ml de 100x BG-11 sin Fe⁺, fosfato, carbonato.

1 ml de 1000x Citrato de amonio férrico

1 ml de 1000x Na₂CO₃

1 ml de 1000x K₂HPO₄

Para preparar cajas de medio BG-11 agar a lo mencionado arriba se le agrega lo siguiente:

Amortiguador 1 M TES/NaOH pH 8.2 10 ml

Na-tiosulfato (sólido) 3 g

Difco Bacto-agar 15 g

Autoclave por 30 minutos (Temperatura 120°C, presión 1.5 Kg/cm²).

Cuando se requirió adicionar algún antibiótico se enfrió el medio a 55°C después de esterilizar, se usó 50 ml de medio por caja de Petri.

Para llevar a cabo el resembrado de la cepa se tomó con una asada la cianobacteria de la caja y se inoculó en 5 ml de medio BG-11. Este se incubó en una temperatura de 25-30°C con iluminación continua de 40 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$. El cultivo se incubó por tres días y después se transfirió a un matraz de 125 ml y se agregó 10 ml de medio BG-11. Este se incubó en las mismas condiciones ya mencionadas y se le fue adicionando medio fresco cada tres días. También se observó al microscopio periódicamente para documentar si se encontraban en proceso de división. La cepa se sembró en medio sólido BG-11 con una asa bacteriológica y estriándola en las cajas de BG-11 agar, y se incubaron a una temperatura de 25-30 °C con una iluminación constante de 40 $\mu \mu\text{mol quanta m}^{-2}\text{s}^{-1}$ hasta observar crecimiento.

Los subsecuentes cultivos de la cepa en medio líquido fueron las mismas que la ya mencionadas, en el caso del cultivo en caja con medio BG-11 agar se incubaron a una iluminación de aproximadamente 25-30 $\mu \mu\text{mol quanta m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

2) Curva de crecimiento de *Synechocystis* sp. PCC 6803.

En un matraz Erlenmeyer de 500 ml se inoculó 200 ml de medio BG-11 líquido estéril con 10 ml de un preinoculo de *Synechocystis* sp. PCC 6803 que presentaba una densidad óptica (DO) de 0.8 (730 nm) La DO del cultivo al inicio fue de 0.164 a 730 nm y 0.155 a 750 nm.

Las mediciones de la DO del cultivo se realizaron a 730 nm y 750 nm cada 24 horas durante 30 días consecutivos. Estas son las longitudes de onda utilizadas en *Synechocystis* sp. PCC 6803 como indicador de variación de biomasa (Foster *et al.*, 2007, Zang, *et al* 2007).

V.5 INTERRUPCIÓN DE LOS GENES *pyk* EN CROMOSOMA.

1) Transformación de *Synechocystis* sp. PCC 6803 con el producto de PCR diseñado para interrupción por amplificación.

La transformación para llevar a cabo la interrupción de los genes *pyk* se hizo de acuerdo al método de Zhang *et al.* (2007), el cual consistió en tomar 5 ml de cultivo que se encontraba en fase de crecimiento exponencial a una DO de 0.8 a 730 nm y se concentró en 1 ml. Se centrifugó a 13,000 rpm por 1 minuto a temperatura ambiente, se retiró el sobrenadante y el paquete se resuspendió en 1 ml de medio BG-11 obteniendo una concentración teórica de $1-3 \times 10^9$ células por mililitro. Una vez resuspendido el paquete se le agregaron 30 μg de ADN que es el producto de PCR del casete de resistencia a kanamicina (915 pb) que contiene 60 pb del gen *pyk2 sll1275* en el extremo 5' y 60 pb en el extremo 3'. También se utilizó el producto de PCR del casete de resistencia a cloranfenicol (955 pb) con 60 pb del gen *pyk1 sll0587* en el extremo 5' y 60 pb en el extremo 3'. Una vez que se les agregó el ADN a las células se incubaron durante 5 horas a una temperatura de 25-30 °C con una iluminación de 40 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Después de las 5 horas se sembraron 100 μl sobre filtros millipore estériles de 47 mm y un poro de 0.45 μm puestos sobre cajas con medio BG-11 agar, BG-11 agar con glucosa a una concentración de 5 mM y BG-11 agar con succinato, las cajas se incubaron por 48 horas a una temperatura entre 25-30 °C con una iluminación continua de 40 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Después del tiempo de incubación los filtros se transfirieron a cajas con medio BG-11 con glucosa (5 mM) y antibiótico, y a cajas con BG-11 con succinato (5 mM) y antibiótico. Para el experimento con el gen *pyk2 sll1275* se adicionó 10 $\mu\text{g/ml}$ de kanamicina y para el gen *pyk1 sll0587* se adicionaron 5 $\mu\text{g/ml}$ de cloranfenicol. A la cepa silvestre que se utilizó como control se le dio el mismo tratamiento excepto la adición de ADN, se sembró en medio BG-11 agar con las dos fuentes de carbono pero sin antibióticos. Los filtros fueron transferidos cada semana a cajas nuevas con las mismas condiciones para mantener la selección con el antibiótico.

Se realizó un ensayo en el que se llevo a cabo una transformación en donde se adicionó glucosa desde la obtención del inóculo para el cultivo utilizado para la

transformación, el cual también fue tomado a DO de 0.8. Las células transformadas se dejaron crecer en las cajas con BG11 solamente 24 horas antes de que los filtros fueran transferidos a las cajas con los antibióticos respectivos.

2) Comprobación por PCR de la interrupción de los genes *pyk* en el genoma de *Synechocystis* sp. PCC 6803.

Con el objetivo de comprobar si se estaba llevando a cabo la interrupción de los genes *pyk* en el genoma de la cianobacteria se tomaron 5 μ l tanto de los cultivos transformados con el ADN y como de la cepa control. Para realizar un PCR se usaron los oligonucleótidos *pyk1275* que amplifican el gen *pyk2 sll1275* (1777 pb), y los oligonucleótidos *pyk0587* que amplifican el gen *pyk1 sll0587* (1422 pb), oligonucleótidos Kan-age que amplifican el casete de resistencia a kanamicina (915 pb) y los oligonucleótidos Cla-cat que amplifican el casete de resistencia a cloranfenicol (955 pb). Las reacciones consistieron de 5 μ l de la mezcla de transformación, amortiguador de PCR 1X, $MgCl_2$ 50 mM, dNTP's 10 mM, 2.5 U de *Taq* polimerasa y 36.4 μ l de H_2O y los diferentes oligonucleótidos a una concentración cada uno de 20 pmol.

V.6 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE LOS GENES *pyk*.

Con el propósito de evaluar la relación entre la expresión de los genes *pyk* y su actividad enzimática, se llevaron a cabo cultivos en diferentes condiciones de crecimiento. Todos los cultivos se mantuvieron a una temperatura de 25-30°C y con una iluminación constante de 40 μ mol quanta $m^{-2} s^{-1}$ hasta llegar a la DO_{730} de 0.8.

1) Extracción de ARN total de *Synechocystis* sp. PCC 6803

Se realizaron 3 extracciones de ARN total de cultivos en diferentes condiciones, el primero en condición fotoautotrófica, otro en condición fotoautotrófica pero se incubó 48 horas en oscuridad después de haber alcanzado una DO_{730} de 0.8. Por último un cultivo en condición fotoautotrófica que al haber alcanzado la DO_{730} de 0.8, se incubó 48 horas en oscuridad luego se le agregó glucosa a una

concentración de 5 mM en oscuridad por 60 minutos, para luego hacer la extracción de ARN total de acuerdo a Singh, *et al.* (2009). Se tomaron 50 ml de cada cultivo y se centrifugaron a 500xg por 20 minutos, se retiró el sobrenadante e inmediatamente se resuspendió el paquete celular en 1 ml de reactivo TRI (Sigma). Este se pasó a un tubo Eppendorf de 1.5 ml y se congeló en nitrógeno líquido, después los tubos se colocaron en un bloque térmico a 70°C para descongelar, se le dio vórtex a alta velocidad y se volvió a congelar en nitrógeno líquido, este ciclo se repitió por 5 veces para romper completamente las células. Después se agregaron 200 µl de cloroformo, se mezcló invirtiendo los tubos 10 veces y las muestras se centrifugaron a 10,000 xg por 15 minutos a 4°C. Se tomaron 310 µl del sobrenadante y se transfirieron a un tubo nuevo Eppendorf estéril de 1.5 ml. El ARN total se precipitó agregando 500 µl de isopropanol e incubándose 30 minutos en hielo, y se centrifugó por 15 minutos a 10,000xg a 4 °C. El paquete de ARN total se lavó con 500 µl de etanol al 75% frío, se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió en 50 µl de H₂O doble destilada estéril. Se corroboró la extracción usando 5 µl de cada muestra en corrimiento electroforético en un gel de agarosa al 1% para ver el ARN total. Las muestras se almacenaron a -20°C para su posterior utilización.

2) RT-PCR de los genes *pyk1 sll0587*, *pyk2 sll1275* y *rnpB*

Una vez que se extrajo el ARN total de las tres condiciones de cultivo a las que se expuso *Synechocystis* sp. PCC 6803, se realizó retrotranscripción de las dos secuencias potenciales de piruvato cinasa (*pyk1 sll0587* y *pyk2 sll1275*) para observar si se presentan cambios en la transcripción de los dos genes en las diferentes condiciones de cultivo. Como control se utilizó el gen *rnpB* que codifica para la subunidad de la ribonucleasa P, que no está sujeto a variabilidad de expresión en diferentes condiciones de cultivo. Antes de realizar la reacción de retrotranscripción se trató el ARN total con ADNasa I (grado amplificación) para eliminar el ADN que pudiera encontrarse en la muestra y evitar falsos positivos. La reacción usada fue: 5 µg de ARN total, amortiguador ADNasa I 1x (200 mM de

Tris-HCl (pH 8.4)), 20 mM de MgCl₂, 500 mM de KCl), 1 U de ADNasa I y se aforó a 10 µl con H₂O desionizada estéril. La reacción se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente y para detenerla se agregó 1 µl de EDTA (25 mM) y se incubó 10 minutos a 65°C. Los oligonucleótidos antisentido para cada uno de los genes se usaron a una concentración de 100 pmol/µl y se aforó a 11.5 µl con H₂O desionizada estéril, se incubó 5 minutos a 70°C y se pasó rápidamente a hielo. Posteriormente se le agregó 4 µl de RT-amortiguador 5X (Tris-HCl 250 mM pH 8.3 a temperatura ambiente, KCl 375 mM, MgCl₂ 15 mM), 2.5 µl de dNTP's 10 mM y 1 µl de RNasa out. La reacción se incubó por 5 minutos a 37 °C y después se le adicionó 200 U de la enzima transcriptasa reversa y se incubó a 42 °C por 60 minutos. La reacción se paró incubándose 10 minutos a 70 °C. Del cDNA del obtenido se tomaron 5 µl de la reacción para realizar PCRs por separado con los tres pares de oligonucleótidos mostrados en la Tabla I.

Tabla I. Oligonucleótidos utilizados para amplificar los genes *rnpB*, *sII0587* y *sII1275*.

Nombre Del Oligonucleótido	Secuencia
<i>rnpB</i> -sentido	5' AGTTAGGGGAGGGAGTTGC 3'
<i>rnpB</i> -antisentido	5' TAAGCCGGGTTCTGTTCC 3'
0587-sentido	5' CCTTCCATGACGACCAAAG 3'
0587-antisentido	5' ACGCTTCACTTAGGGCATG 3'
1275-sentido	5' ATGTTGGTGGAGGAAGTGG 3'
1275-antisentido	5' GCGGAACCTTTGACACATGG 3'

La reacción consistió en 5 µl de cDNA, amortiguador de PCR 1x, 1.5 µl MgCl₂ 50 mM, 1.25 µl de dNTP's 10 mM, 1 µl de oligonucleótido sentido 50 pmol, 1 µl de oligonucleótido antisentido (50 pmol), 2.5 U de *Taq* polimerasa (Invitrogen) y la reacción se aforó a 50 µl con H₂O desionizada. Las condiciones del amplificación fueron: 1 ciclo inicial de 5 min a 94 °C y 30 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 57 °C, 45

s a 72 °C y se le dio 1 ciclo de extensión final de 10 min a 72 °C. Los productos de PCR fueron analizados en una electroforesis en un gel de agarosa al 1%.

V.7 ACTIVIDAD ENZIMATICA

1) Medición de la actividad enzimática de piruvato cinasa en *Synechocystis* sp. PCC 6803.

Para determinar si las dos secuencias (*pyk2* *sll1275* y *pyk1* *sll0587*) potenciales codificadoras para dos diferentes piruvato cinasa en *Synechocystis* sp. PCC 6803 presentan diferente actividad de piruvato cinasa, se tomaron muestras de los mismos cultivos en donde se creció la cianobacteria en diferentes condiciones de crecimiento: fotoautotróficas, en oscuridad por dos días y en oscuridad por dos días en presencia de 5 mM de glucosa durante los 60 minutos. De cada cultivo se cosecharon 25 ml a una DO_{730} de 0.8 (fase logarítmica) y se centrifugaron por 15 minutos a 3000xg, se retiró el sobrenadante y se lavaron con 10 ml de amortiguador de fosfato de potasio 0.1 M y se centrifugaron por 10 minutos a 3000xg, el sobrenadante fue retirado y el paquete se resuspendió en 1 ml del amortiguador de fosfato de potasio 0.1 M, y las muestras se almacenaron a -20°C hasta realizar su análisis.

La obtención de los extractos se hizo utilizando esferas de zirconio de 0.1 mm de diámetro en un microvial para centrifuga y se le agregó el mililitro del paquete celular resuspendido en amortiguador de fosfato de potasio, y se colocó en el aparato Mini-Beadbeater-1 utilizando 5000 rpm de agitación por 3 minutos en periodos de 20 segundos de rompimiento y 2 minutos de incubación en hielo. Posteriormente las células fueron centrifugadas por 5 minutos a 13,000 rpm a una temperatura de 4°C, se colectó el sobrenadante y se centrifugó por 20 minutos a 4°C por 10,000xg y el sobrenadante de color verde oscuro fue recuperado, el cual corresponde al extracto crudo a utilizar en la reacción. La medición de la actividad de la piruvato cinasa se hizo por medio de una reacción acoplada en donde la piruvato cinasa presente en el extracto convierte el fosfoenolpiruvato y el ATP en piruvato y ADP. El piruvato es convertido en lactato por la enzima lactato

deshidrogenasa (LDH) con la consecuente oxidación del NADH_2 . Las reacciones controles y experimentales se muestran en la Tabla II.

Tabla II. Reactivos utilizados en las reacciones para la medición de actividad de piruvato cinasa en los controles (Enzimas LDH y Pyk estándar) y muestras experimentales de las tres condiciones de cultivo utilizadas (fotoautotrófica, oscuridad y oscuridad con glucosa).

Reactivos	Control LDH	Control pyk	Extracto Foto	Extracto oscuridad	Extracto osc/glucosa
H_2O	Aforado a 1 ml	Aforado a 1 ml	Aforado a 1 ml	Aforado a 1 ml	Aforado a 1 ml
Tris-AC	50 mM	50 mM	50 mM	50 mM	50 mM
MgCl_2	5 mM	5 mM	5 mM	5 mM	5 mM
KCl	50 mM	50 mM	50 mM	50 mM	50 mM
ADP	2 mM	2 mM	2 mM	2 mM	2 mM
NADH_2	0.2 mM	0.2 mM	0.2 mM	0.2 mM	0.2 mM
PEPsat	---	4 mM	4 mM	4 mM	4 mM
Piruvato	6.9 mM	---	---	---	---
Extracto	---	---	25 μl , 50 μl y 100 μl	25 μl , 50 μl y 100 μl	25 μl , 50 μl y 100 μl
Enzima Pyk Estándar	3 U	3 U	---	---	---
Enzima LDH Estándar	0.3 U	0.3 U	0.3 U	0.3 U	0.3 U

También se hicieron reacciones de extractos obtenidos en tres diferentes DO_{730} 0.7, 1.6 y 1.7 de un cultivo crecido con glucosa 5 mM en condición fotoautotrófica. Otras reacciones con los extractos fueron utilizando activadores de la piruvato cinasa, y en la reacción lo único que cambió es que se utilizó PEP insaturado (1 mM) y se le agregó AMP (1 mM) o F16bP (1 mM). Todas las reacciones se midieron a temperatura ambiente a 340 nm por un periodo de 3 minutos en un

espectrofotómetro (Elyptica) realizando registro y gráfica del cambio en la absorbancia.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

ANÁLISIS MOLECULAR.

1) Análisis comparativo de secuencias de las piruvato cinasas.

En el análisis realizado de las secuencias de aminoácidos de las dos piruvato cinasas (Pyk1 *sll0587* y Pyk2 *sll1275*) presentes en *Synechocystis* sp. PCC 6803 con piruvato cinasas de otras bacterias se observó que estas comparten todos los sitios conservados característicos de estas enzimas. Uno de estos es el sitio de unión a K^+ (Lauglin y Reed, 1997), que es un catión monovalente requerido para la actividad enzimática (Mattevi, *et al.*, 1995). Este sitio se encuentra entre los aminoácidos 36-42 y 69-77 en Pyk1, y entre los aminoácidos 38-44 y 71-79 en Pyk2 (Figura 5). También se observó el sitio de unión a fosfoenolpiruvato entre los aminoácidos 249-258 y 297-306 en la secuencia de Pyk2 y entre los aminoácidos 245-254 y 293-302 para el caso de Pyk1 (Figura 5). La secuencia de Pyk2 presenta una secuencia carboxilo terminal compuesta por 99 aminoácidos como la que presenta *Bacillus subtilis* (Muñoz, *et al.*, 1997) *Geobacillus stearothermophilus* (Sakai y Ohta, 1993) y *Lactobacillus delbrueckii*. Estas secuencias solo se habían encontrado en las Pyks de las bacterias del género *Bacillus*. En esta región C-terminal larga de las piruvato cinasas se encuentra un sitio de unión a fosfoenolpiruvato entre los aminoácidos 539-548. Se sugiere que la región C-terminal presente en las Pyks de las bacterias del género *Bacillus* no sea esencial para la actividad enzimática o regulación alostérica, esto debido a que otras Pyks no contienen esta región C-terminal. Sin embargo, se cree que pudiera tener una función de estabilidad estructural o también intervenir en la especificidad de los efectores alostéricos (Sakai y Ohta, 1993). El alineamiento de secuencias nos muestra que el gen *pyk2 sll1275* tiene un 38.7% de identidad con *pykF* de *E. coli* y 36.1% con *pykA* de *E. coli*, y *pyk1 sll0587* presenta una identidad de 39.2% con *pykF* de *E. coli* y 32.8% con *pykA*. La secuencia *pyk2 sll1275* presenta un mayor porcentaje de identidad (48.9%) con *pykF* de *G. stearothermophilus*. Este porcentaje es incluso mayor al porcentaje de homología que se presenta entre las dos secuencias de *pyk* de *Synechocystis* sp. PCC 6803 (41.1%). Es interesante

observar que Pyk2 *sll1275* tiene una homología del 67% con la enzima PykF de la cianobacteria *Synechococcus* PCC 6301 la cual se activa con AMP como sucede con la piruvato cinasa de tipo II (PykA) de *E. coli* y la piruvato cinasa de *G. stearothermophilus* (Knowles, *et al.*, 2001). Lo anterior sugiere la posibilidad de que la piruvato cinasa codificada por el gen *pyk2 sll1275* pudiera también estar activada por AMP. Por otro lado, el hecho de que en estudios previos realizados en nuestro laboratorio se haya observado actividad de piruvato cinasa de *Synechocystis* sp. 6803 con dos activadores diferentes (AMP y fructosa-1,6-bifosfato) sugiere que la enzima piruvato cinasa codificada por el gen *pyk1 sll0587* pudiera entonces estar activada por fructosa-1,6-bifosfato como la enzima PykF tipo I de *E. coli*. Los datos obtenidos del análisis de secuencias complementados con otros análisis ya mencionados sugiere que las secuencias de los genes *pyk2 sll1275* y *pyk1 sll0587* codifican para dos piruvato cinasa en *Synechocystis* sp. PCC 6803, las cuales pudieran presentar activadores alostéricos diferentes como en el caso de *E. coli*.

Figura 5. Alineamiento de secuencias de aminoácidos de diferentes enzimas piruvato cinasa. Los números del margen izquierdo indican el número del aminoácido. Los residuos que intervienen en la unión de PEP y ADT/ATP son indicados con P y A, respectivamente. D y M indican los ligandos para los cationes divalentes y monovalentes, respectivamente. El motivo de unión a PEP de 31 residuos se encuentra subrayado en el C-terminal. Las secuencias de los organismos fueron tomadas de la base de datos NCBI: *Agrobacterium vitis* (ACM37653), *Bacillus cereus* (ZP_04324168), *Bacillus subtilis* (AAC00343), *Escherichia coli* (ACA77601), *Escherichia coli* (ACA77428), *Geobacillus stearothermophilus* (BAA02406), *Lactobacillus delbrueckii* (CAA50527), *Synechococcus* sp. (CAE07813), *Synechocystis* sp. PCC 6803(BAA17574), *Synechocystis* sp. PCC 6803(BAA10621).

	10	20	30	
1	M K R - - - - -	- - - - - N R K V K I L A T L G P A S Q D		A. vitis
1	M - - - V I K M T I D R - - - - -	- - - - - I C T I G P A S N N		B. cereus
1	M - - - - - - - - - - - - - - -	- - - - - R K T K I V C T I G P A S E S		B. subtilis
1	M K - - - - - - - - - - - - - - -	- - - - - K T K I V C T I G P K T E S		E. coli tipo I
1	M S R R L - - - - - - - - - - - - - - -	- - - - - R R T K I V T T L G P A T D R		E. coli tipo II
1	M K - - - - - - - - - - - - - - -	- - - - - R K T K I V C T I G P A S E S		G. stearothermophilus
1	M K - - - - - - - - - - - - - - -	- - - - - K T K I V S T L G P A S D D		L. delbrueckii
1	M G Q F - - - - - - - - - - - - - - -	- - - - - D Q N R R T K I V A T I G P A T E S		Synechococcus sp.
1	M P A L I N P V K F M R P L S H R T K I V A T I G P A S S S			Pyk1(0587)
1	M Q T S - - - - - - - - - - - - - - -	- - - - - P L P R R T K I V A T I G P A T Q S		Pyk2(1275)

	40	50	60	
20	E A M I R K L H E A G A D L F R I N M S H A S H D V M R T L			A. vitis
20	K E T L A Q L I S N G M K I V R L N L S H G T H E S H K D I			B. cereus
17	I E M L T K L M E S G M N V A R L N F S H G D F E E H G A R			B. subtilis
17	E E M L A K M L D A G M N V M R L N F S H G D Y A E H G Q R			E. coli tipo I
21	D N N L E K V I A A G A N V V R M N F S H G S P E D H K M R			E. coli tipo II
18	V D K L V Q L M E A G M N V A R L N F S H G D H E E H G R R			G. stearothermophilus
17	I E T I T K L A E A G A N V F R F N F S H G N H E E H L A R			L. delbrueckii
23	S E R I K E L V Q A G A T T F R L N F S H G D H S E H A A R			Synechococcus sp.
31	V E V I R Q M V D A G M N V A R L N F S H G S Y E D H A T M			Pyk1(0587)
23	K E V L R Q L I Q A G A T T F R L N F S H G D H A Y H Q Q S			Pyk2(1275)

P M M

	70	80	90	
50	I Q R I R N V E A A C G R P I G I L A D L Q G P K L R V G K			A. vitis
50	I R L V K S - - - L D D S I K I L G D V Q G P K I R L G E			B. cereus
47	I K N I R E A S K K L G K N V G I L L D T K G P E I R T H T			B. subtilis
47	I Q N L R N V M S K T G K T A A I L L D T K G P E I R T M K			E. coli tipo I
51	A D K V R E I A A K L G R H V A I L G D L Q G P K I R V S T			E. coli tipo II
48	I A N I R E A A K R T G R T V A I L L D T K G P E I R T H N			G. stearothermophilus
47	M N M V R E V E K K T G K L L G I A L D T K G A E I R T T D			L. delbrueckii
53	I S T I R Q V S E E L G I N I G I L Q D L Q G P K I R L G R			Synechococcus sp.
61	V R L L R S V E Q E M D T P I T L L Q D L Q G P K I R I G Q			Pyk1(0587)
53	I R L I R Q I A F E L N Q P V G I L Q D L Q G P K I R V G K			Pyk2(1275)

P M M
A
M

	100	110	120	
80	F - - A N T S V E L K P G Q T F T L D S N - E A P - G D E T			A. vitis
76	M - - K G E Q I T L Q A G D S F I L H T Q - P V T G S S T E			B. cereus
77	- M E N G G - I E L E T G K E L I I S M D - E V - V G T T D			B. subtilis
77	- L E G G N D V S L K A G Q T F T F T T D - K S V I G N S E			E. coli tipo I
81	F K E - - G K V F L N I G D K F L L D A N L G K G E G D K E			E. coli tipo II
78	- M E N G A - I E L K E G S K L V I S M S - E V - L G T P E			G. stearothermophilus
77	- Q E G G K - F T I N T G D E I R V S M D - A T K A G N K D			L. delbrueckii
83	F - - A E G P I T L A N G D S F S L T S R - P V S C - N Q S			Synechococcus sp.
91	L - - P G G E K Q L R E G E K V S L V P V - E I G D R H P G			Pyk1(0587)
83	F L N D A G S V Q L K N G D P Y T L T S R - P V E C - T E T			Pyk2(1275)

	130	140	150	
106	R V Y L P H P E I L E A V K V G H R L L I D D G K L H L R A			A. vitis
103	A - S V D Y E G I A N D V K V G S R I L V N D G E V E L I V			B. cereus
103	K I S V T Y E G L V H D V E Q G S T I L L D D G L I G L E V			B. subtilis
105	M V A V T Y E G F T T D L S V G N T V L V D D G L I G M E V			E. coli tipo I
109	K V G I D Y K G L P A D V V P G D I L L L D D G R V Q L K V			E. coli tipo II
104	K I S V T Y P S L I D D V S V G A K I L L D D G L I S L E V			G. stearothermophilus
104	M I H V T Y P G L F D D T H V G G T V L I D D G A V G L T I			L. delbrueckii
109	I A T V T Y D K L A D E V T A G S R I L L D D G R V E M K V			Synechococcus sp.
118	A V G I D Y P H L A T E A K V G E R I L L D D G L L E M K V			Pyk1(0587)
111	I S S I S Y E Y L A D E V P S G A R I L L D D G K L E M L V			Pyk2(1275)

	160	170	180	
136	E K C D G - - K T I V C S V V S G T K I S D R K G V S L P D			A. vitis
132	E K V S T D K - - I E T K V K T G G N I S S H K G V N L P G			B. cereus
133	L D V D A A K R E I K T K V L N N G T L K N K K G V N V P G			B. subtilis
135	T A I E G N K - - V I C K V L N N G D L G E N K G V N L P G			E. coli tipo I
139	L E V Q G M K - - V F T E V T V G G P L S N N K G I N K L G			E. coli tipo II
134	N A V D K Q A G E I V T T V L N G G V L K N K K G V N V P G			G. stearothermophilus
134	K A K D E E K R E L V C E A Q N T G V I G S K K G V N A P G			L. delbrueckii
139	E Q V D Q A E Q T L H C T V T V G G V L S N N K G V N F P D			Synechococcus sp.
148	V S I Q D P E - - V I C E V V T G G I L K S R K G V N L P G			Pyk1(0587)
141	E E V D T V A R D L H C R V I V G G T L S S N K G V N F P G			Pyk2(1275)

	190	200	210	
164	T I L A T G V L T D K D R A D L D A V L A T N D V D W V A L			A. vitis
160	A I V R L P A I T E K D K K D I Q F L L - E E G V D F I A C			B. cereus
163	V S V N L P G I T E K D A R D I V F G I - E Q G V D F I A P			B. subtilis
163	V S I A L P A L A E K D K Q D L I F G C - E Q G V D F V A A			E. coli tipo I
167	G G L S A E A L T E K D K A D I K - T A A L I G V D Y L A V			E. coli tipo II
164	V K V N L P G I T E K D R A D I L F G I - R Q G I D F I A A			G. stearothermophilus
164	V E I R L P G I T E K D T D D I R F G L - K H G I N F I F A			L. delbrueckii
169	V Q L S V R A L T D K D K V D L E F G L - S Q G V D W V A L			Synechococcus sp.
176	L V L T L P S M T T K D K Q D L E F G L - S Q G I D W V S L			Pyk1(0587)
171	V C L S V K A M T D K D K E D L M F G L - D Q G V D W V A L			Pyk2(1275)

	220	230	240	
194	S F I Q R P E D L A E V R K I A R G R - - - V G L M S K I			A. vitis
189	S F V R K P S H I K E I R D F I Q Q Y K E T S P N L I A K I			B. cereus
192	S F I R R S T D V L E I R E L L E E H N A Q D I Q I I P K I			B. subtilis
192	S F I R K R S D V I E I R E H L K A H G G E N I H I I S K I			E. coli tipo I
196	S F P R C G E D L N Y A R R L A R D A G C - D A K I V A K V			E. coli tipo II
193	S F V R R A S D V L E I R E L L E A H D A L H I Q I I A K I			G. stearothermophilus
193	S F V R K A Q D V L D I R A L C E E A N A S Y V K I F P K I			L. delbrueckii
198	S F V R N P S D M E E I R G L I R E H G - H E T P V V A K I			Synechococcus sp.
205	S F V R K G E D I H T L K Q F L A E R G H P D L P V I A K I			Pyk1(0587)
200	S F V R N P Q D I D E I K G L I A A A G - K S V P V I A K I			Pyk2(1275)

P
AP
D

	250	260	270	
220	E K P Q A L - - E R I D E I I E L S D A L M V A R G D L G			A. vitis
219	E T M E A I - - E N F Q D I C K E A D G I M I A R G D L G			B. cereus
222	E N Q E G V - - D N I D A I L E V S D G L M V A R G D L G			B. subtilis
222	E N Q E G L - - N N F D E I L E A S D G I M V A R G D L G			E. coli tipo I
225	E R A E A V C S Q D A M D D I I L A S D V V M V A R G D L G			E. coli tipo II
223	E N E E G V - - A N I D E I L E A A D G L M V A R G D L G			G. stearothermophilus
223	E S Q E G I - - D N I D E I L Q V S D G L M V A R G D M G			L. delbrueckii
227	E K F E A I - - D Q I D A I L P L C D G V M V A R G D L G			Synechococcus sp.
235	E K P Q A I - - D N L E E I V A V S N G I M V A R G D L G			Pyk1(0587)
229	E K H E A I - - K D M Q A V L E K C D G V M V A R G D L G			Pyk2(1275)

P
A
D

D

P P
A A
D

	280	290	300	
247	V E M P L E A V P G I Q K Q L I R A C R R E G K P V V V A T			A. vitis
246	V E L P F Q F I P L L Q K M M I Q E C N R R T N T Y V I T A T			B. cereus
249	V E I P A E E V P L V Q K E L I K K C N A L G K P V I T A T			B. subtilis
249	V E I P V E E V I F A Q K M M I E K C I R A R K V V I T A T			E. coli tipo I
255	V E I G D P E L V G I Q K A L I R R A R Q L N R A V I T A T			E. coli tipo II
250	V E I P A E E V P L I Q K L L I K K C N M L G K P V I T A T			G. stearothermophilus
250	V E I P F I N V P F V Q K T L I K K C N A L G K P V I T A T			L. delbrueckii
254	V E M P A E E V P L L Q K E L I R K A N S L G I P I I T A T			Synechococcus sp.
262	V E V N P E K V P R L Q K E I I R R C N V R A I P V I T A T			Pyk1(0587)
256	V E L P A E D V P I L Q K K L I A T A N R L G I P V I T A T			Pyk2(1275)

	310	320	330	
277	Q M L E S M I S A P V P T R A E V S D V A T A V F E G A D A			A. vitis
276	Q M L Q S M V D H S I P T R A E V T D V F Q A V L D G T N A			B. cereus
279	Q M L D S M Q R N P R P T R A E A S D V A N A I F D G T D A			B. subtilis
279	Q M L D S M I K N P R P T R A E A G D V A N A I L D G T D A			E. coli tipo I
285	Q M M E S M I T N P M P T R A E V M D V A N A V L D G T D A			E. coli tipo II
280	Q M L D S M Q R N P R P T R A E A S D V A N A I F D G T D A			G. stearothermophilus
280	Q M L D S M Q E N P R P T R A E V T D V A N A V L D G T D A			L. delbrueckii
284	Q M L D S M A S S P R P T R A E V S D V A N A I L D G T D A			Synechococcus sp.
292	Q M L D S M I Q N S R P T R A E A S D V A N A I L D G T D A			Pyk1(0587)
286	Q M L D S M V N S P R P T R A E V S D V A N A I L D G T D A			Pyk2(1275)

P
M

	340	350	360	
307	I M L S A E S A S G Q Y P V E A V S T M A S I A R T I E R E			A. vitis
306	V M L S A E S A S G E H P V E S V S T L R L V S E F A E - -			B. cereus
309	I M L S G E T A A G S Y P V E A V Q T M H N I A S R S E E A			B. subtilis
309	V M L S G E S A K G K Y P L E A V S I M A T I C E R T D R V			E. coli tipo I
315	V M L S A E T A A G Q Y P S E T V A A M A R V C L G A E K -			E. coli tipo II
310	V M L S G E T A A G Q Y P V E A V K T M H Q I A L R T E Q A			G. stearothermophilus
310	T M L S G E S A N G L Y P V Q S V Q A M H D I D V R T E K E			L. delbrueckii
314	V M L S N E T A V G D F P V E A V Q T M A T I A C R I E K D			Synechococcus sp.
322	V M L S G E S A V G Q Y P V K S V Q M L R K I A E E T E V G			Pyk1(0587)
316	V M L S N E T A I G K F P V E A V A I M A K I A E R I E Q E			Pyk2(1275)

P P
M

	370	380	390	
337	P H Y P G I I Y A Q R P Q P - - E A T G A D A I S L A A R Q			A. vitis
334	- H V K K D G P F - - - - - - - - - - - - - - - - V			B. cereus
339	L N Y K E I L S - K R R D Q - V G M T I T D A I G Q S V A H			B. subtilis
339	M N S R - - - - L E F N N D N R K L R I T E A V C R G A V E			E. coli tipo I
344	- - I P S I N V S K H R L D V Q F D N V E E A I A M S A M Y			E. coli tipo II
340	L E H R D I L S - Q R T K E - S Q T T I T D A I G Q S V A H			G. stearothermophilus
340	L D T R N T L A L Q R F E E Y K G S N V T E A I G E S V V R			L. delbrueckii
344	Y P Q R S V - - - - - D S H L A S T V P N A L S G A V S T			Synechococcus sp.
352	L H L V N N P P I E N T E - - - - - - - T H A L S E A L V V			Pyk1(0587)
346	D I N P S Q - - - - - A E A S R T S I P N A I S S A V S Q			Pyk2(1275)

	400	410	420	
365	I A E T L K - L T A I V C Y T S S G N T G L R A S R E R P E			A. vitis
343	M K G V L E - L -			B. cereus
367	T A I N L N - A A A I V T P T E S G H T A R M I A K Y R P Q			B. subtilis
365	T A E K L D - A P L I V V A T Q G G K S A R A V R K Y F P D			E. coli tipo I
372	A A N H L K G V T A I I T M T E S G R T A L M T S R I S S G			E. coli tipo II
368	T A L N L D - V A A I V T P T V S G K T P Q M V A K Y R P K			G. stearothermophilus
370	T A Q E L G - V K T I I A A T S S G Y T A R M I S K Y R P D			L. delbrueckii
368	I A S Q L N - A S A I L P L T K S G A T A K N V S K F R P A			Synechococcus sp.
375	I D G I L D - L K Y I V T F T T S G F T S L L A S N Q R P S			Pyk1(0587)
370	I A E T L N - A A A I M S L T K T G S T A R H V S K F R P K			Pyk2(1275)

	430	440	450	
394	V P I L A L S P V V Q T A R R L S L V W G L H C - V V S E E			A. vitis
350	- - - - - - - - - - L H K S L D - - - - - - - - - - - -			B. cereus
396	A P I V A V T V N D S I S R K L A L V S G V F A E S G Q N A			B. subtilis
394	A T I L A L T T N E K T A H Q L V L S K G V V P Q L V K E I			E. coli tipo I
402	L P I F A M S R H E R T L N L T A L Y R G V T P V H F D S A			E. coli tipo II
397	A P I I A V T S N E A V S R R L A L V W G V Y T K E A P H V			G. stearothermophilus
399	A T I V A L T F D E K I Q H S L G I V W G V E P V L A K K P			L. delbrueckii
397	S P I L A I T P D P T V A C R L Q L V W G V K P L V I P Q H			Synechococcus sp.
404	V P V I A F T P S E K V Y H S L N L V W G I I P F L I N E E			Pyk1(0587)
399	T P I L A V T P H V D V S R Q L Q L V W G V K P L L V L D L			Pyk2(1275)

	460	470	480	
423	P T D L D D M V N R A C R I V V S E E F G K P G D R V I I S			A. vitis
356	- -			B. cereus
426	S S T - D E M L E D A V Q K S L N S G I V K H G D L I V I T			B. subtilis
424	T S T - D D F Y R L G K E L A L Q S G L A H K G D V V M V			E. coli tipo I
432	N D G V A A A - S E A V N L L R D K G Y L M S G D L V I V T			E. coli tipo II
427	N T T - D E M L D V A V D A A V R S G L V K H G D L V V I T			G. stearothermophilus
429	S N T - D E M F E E A A R V A K E H G F V K D G D L V I I V			L. delbrueckii
427	E L T - T H T F L A A M T Q A K T M G L L K E G D L V V Q T			Synechococcus sp.
434	F D T F E D L I Q Q A E V L L R D R K M V E K G D Q L L I M			Pyk1(0587)
429	P S T - S Q T F Q A A I N V A Q E N H F L R D G D L V V M T			Pyk2(1275)

	490	500	510	
453	A G V P L G T P G A T N M L R I A Y I G P - - - - - - - - -			A. vitis
356	- -			B. cereus
455	A G T - V G E S G T T N L M K V H T V G D I I A K G Q G I G			B. subtilis
453	S G A - L V P S G T T N T A S V H V - - - - - - - - - - - -			E. coli tipo I
461	Q G D V M S T V G S T N T R I L T V E			E. coli tipo II
456	A G V P V G E T G S T N L M K V H V I S D L L A K G Q G I G			G. stearothermophilus
458	A G V P F G Q S G T T N L M K L Q I I G N Q L A Q G L G V G			L. delbrueckii
456	A G T H T G V S G S T D L V K V - - - - - - - - - - - -			Synechococcus sp.
464	A G I P T K I P R G T N F L K I H R I S			Pyk1(0587)
458	A G T L Q G V A G S T D L I K V E V V K A I L G R G V G I G			Pyk2(1275)

	520	530	540	
474	- - - - -	- - - - -	- - - - -	A. vitis
356	- - - - -	- - - - -	- - - - -	B. cereus
484	R K S A Y G P V V V A Q N A K E A E Q K M T D G A V L V T K			B. subtilis
470	- - - - -	- - - - -	- - - - -	E. coli tipo I
480	- - - - -	- - - - -	- - - - -	E. coli tipo II
486	R K S A F G K A V V A K T A E E A R Q K M V D G G I L V T V			G. stearothermophilus
488	T G S V I G K A V V A N S A E E A N A K V H E G D I L V A K			L. delbrueckii
472	- - - - -	- - - - -	- - - - -	Synechococcus sp.
483	- - - - -	- - - - -	- - - - -	Pyk1(0587)
488	Q G A V S	G R A R V A S R P Q - A I A Q F T Q G E I L V V P		Pyk2(1275)

▶ Inicio del C Terminal

	550	560	570	
474	- - - - -	- - - - -	D G L S G - - - - -	A. vitis
356	- - - - -	- - - - -	- - - - -	B. cereus
514	S T D R D M I A S L E	<u>K A S A L I T E E G G L T S H A</u>	A V V	B. subtilis
470	- - - - -	- - - - -	- - - - -	E. coli tipo I
480	- - - - -	- - - - -	- - - - -	E. coli tipo II
516	S T D A D M M P A I E	<u>K A A A I I T E E G G L T S H A</u>	A V V	G. stearothermophilus
518	T T D K D Y M P A I K	<u>K A S G M I V E A S G L T S H A</u>	A V V	L. delbrueckii
472	- - - - -	- - - G I V S S E E A - - - - -	- - - - -	Synechococcus sp.
483	- - - - -	- - - - -	- - - - -	Pyk1(0587)
517	S T N A D C V D M M R	<u>R A A G I I T E E E S L T S H A</u>	A I I	Pyk2(1275)

	580	590	600	
479	- - - - -	- - - - -	- - - - -	A. vitis
356	- - - - -	- - - - -	- - - - -	B. cereus
544	<u>G L S L G I P V I V G L E N A</u>	T S I L T D G Q D I T V D A S		B. subtilis
470	- - - - -	- - - - -	- - - - -	E. coli tipo I
480	- - - - -	- - - - -	- - - - -	E. coli tipo II
546	<u>G L S L G I P V I V G V E N A</u>	T T L F K D G Q E I T V D G G		G. stearothermophilus
548	<u>G V S L G I P V V V G V A D A</u>	T S K I A D G S T L T V D A R		L. delbrueckii
480	- - - - -	- - - - -	- - - - -	Synechococcus sp.
483	- - - - -	- - - - -	- - - - -	Pyk1(0587)
547	G L R L G V P V I V G F K G A T Q K I R D G A I V T I D A Q			Pyk2(1275)

	610		
479	- - - - -	V	A. vitis
356	- - - - -	- - - - -	B. cereus
574	R G A V Y Q G - - - R A S V L		B. subtilis
470	- - - - -	- - - - -	E. coli tipo I
480	- - - - -	- - - - -	E. coli tipo II
576	F G A V Y R G - - - H A S V L		G. stearothermophilus
578	R G A I Y Q G - - - E V S N L		L. delbrueckii
480	- - - - -	- - - P V N M I	Synechococcus sp.
483	- - - - -	- - - - -	Pyk1(0587)
577	K G L I Y S G A L P P V S K G		Pyk2(1275)

VI.2 INTERRUPCIÓN DE LOS GENES *pyk* por digestión.

1) Digestión de los plásmidos pCAT19 y Topo 1275 con *Sma* I y ligación.

Para llevar a cabo la interrupción de los genes por el método de digestión (Figura 3) primero se llevaron a cabo las digestiones de los plásmidos Topo 1275 y pCat19. Los resultados de las digestiones de los plásmidos fueron como se esperaban de acuerdo al análisis de restricción teórico que se realizó. En la Figura 6 (carriles 2 al 4) podemos observar como la digestión del plásmido pCAT19 con la enzima *Sma* I escindió el casete de resistencia a cloranfenicol obteniendo un tamaño de 1004 pares de bases (pb). En el carril número 6 se encuentra el plásmido Topo 1275 sin digerir y se ve la diferencia de tamaño con el plásmido Topo 1275 digerido con *Sma* I en los carriles 7 al 10.

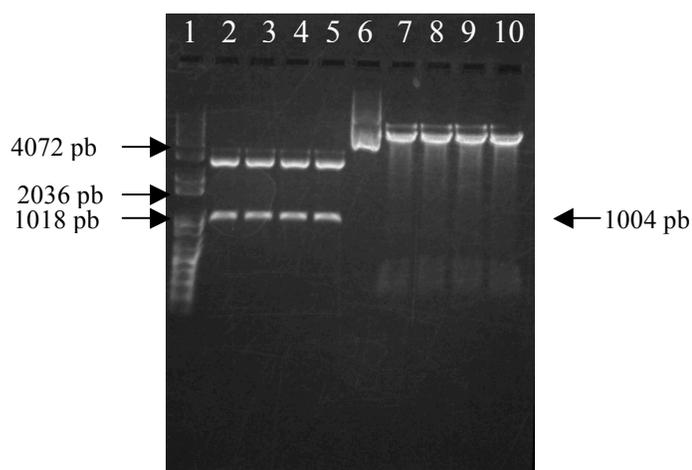


Figura 6. Digestión enzimática de los plásmidos Topo 1275 y pCAT19 con la enzima de restricción *Sma* I. Carril 1: Escalera 1Kb; carril 2-5, pCAT19 cortado con *Sma* I; Carril 6, Topo 1275 sin cortar; carril 7-10, Topo1275 cortado con *Sma* I.

Al realizar la ligación del plásmido Topo 1275 digerido con *Sma* I tratado con fosfatasa alcalina y del casete de resistencia a cloranfenicol digerido con *Sma* I y transformar la reacción en células de *E. coli* químicamente competentes, se obtuvieron transformantes que son resistentes a los antibióticos carbencilina (que es la resistencia que tiene el plásmido Topo-TA PCR 2.1), y cloranfenicol (que es

el antibiótico con la cual se selecciona la interrupción del gen *pyk2 sll1275* en el plásmido Topo 1275). Al realizar las primeras extracciones de plásmido de las clonas transformantes resistentes a cloranfenicol no se obtuvo plásmido de estas. Se realizaron diversas extracciones de plásmido con diferentes kits de extracción y utilizando controles, pero en ninguno de los casos de las transformantes se obtuvo plásmido para realizar las pruebas correspondientes de comprobación del gen interrumpido. Las reacciones de ligación se repitieron por varias ocasiones más y se siguieron teniendo los mismos resultados. Es importante mencionar que sí se obtienen transformantes resistentes a cloranfenicol pero al poner a crecer a estas en medio LB con cloranfenicol directamente de la colonia no se logra extraer plásmido. Al realizar varios pases de las clonas positivas en medio LB con cloranfenicol (5 µg/ml) se observó que comenzaban a perder la resistencia al antibiótico.

2) Digestión de los plásmidos pNK862 y Topo 0587 y ligación.

Las digestiones del plásmido Topo 0587 y de pNK862 que contiene el casete de resistencia a kanamicina, se analizaron mediante una electroforesis en geles de agarosa al 1%. Como se observa en las Figuras 7 y 8 se obtuvo el plásmido en forma lineal y se logró escindir el casete de resistencia a kanamicina (1206 pb).

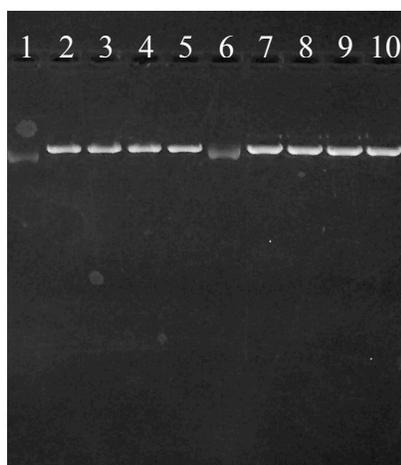


Figura 7. Digestión del plásmido Topo 0587 con la enzima *Cla* I. Carril 1, plásmido sin digerir; carril 2-5, plásmido digerido con *Cla* I; carril 6, plásmido sin digerir; carril 7-10, plásmido digerido con *Cla* I.

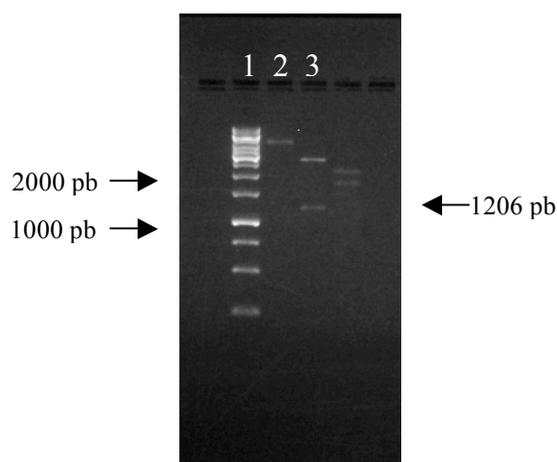


Figura 8. Digestión del plásmido pNK862 con la enzima *Ava II* para escindir el casete de resistencia a kanamicina. Carril 1, escalera 1 Kb; carril 2, plásmido sin digerir; carril 3, digerido con *Ava II*.

Después de terminada la electroforesis se extrajo del gel de agarosa la forma lineal del plásmido Topo 0587 y se realizó el relleno de los extremos 5' salientes utilizando la enzima polimerasa Klenow, se purificó y se desfosforiló para evitar su religación en el momento de insertar el casete de resistencia a kanamicina.

La reacción de ligación del plásmido Topo 0587 con el inserto casete de resistencia a kanamicina no dio transformantes resistentes a kanamicina. Los controles de plásmido sin inserto tampoco dieron transformantes como era de esperarse ya que el plásmido se encuentra desfosforilado y no se puede religar. Estas ligaciones se siguieron intentando varias veces más, pero siempre con los mismos resultados. Adicionalmente se hicieron pruebas de ligación con plásmidos linearizados para comprobar que la enzima Klenow estuviera relleno los extremos 5' y permitiera que se religaran y se obtuvieran transformantes. Sin embargo, no se presentó religación del plásmido por lo que se sugirió que la enzima no estaba funcionando adecuadamente.

3) INTERRUPCIÓN POR ADICIÓN DE SITIO DE RESTRICCIÓN.

3.1) Diseño de oligonucleótidos para la interrupción por adición.

En la tabla III se muestran los oligonucleótidos diseñados para amplificar los casetes de resistencia a kanamicina y cloranfenicol. Como se observa en la tabla el sitio de restricción *Age* I fue incorporado al oligonucleótido de kanamicina y el sitio de restricción *Cla* I para el de cloranfenicol.

Tabla III. Oligonucleótidos utilizados para amplificar los casetes de resistencia a antibióticos para interrupción por adición.

Nombre del Oligonucleótido	Secuencia
KanAge-For	5' GATC <u>ACCGGT</u> TGTTACATTGCACAAG 3'
KanAge-Rev	5' GTCA <u>ACCGGT</u> CCAATTAACCAATTCTG 3'
Clacat-For	5'CC <u>ATCGAT</u> AAGCTTGCATGCCTG 3'
Clacat-Rev	5'GG <u>TAGCTA</u> GGCGTTTAAGGGCAC 3'

Subrayado. Secuencia específica de reconocimiento para corte enzimático

3.2) Digestión del plásmido Topo 1275 y amplificación del casete de resistencia a kanamicina.

En la Figura 9 se observa que se presentó una digestión completa del plásmido Topo 1275 con la enzima de restricción *Age* I. También podemos ver que se logró llevar a cabo la amplificación del casete de resistencia a kanamicina (927 pb) con los oligonucleótidos Kan-Age. Debido a que la digestión del plásmido fue completa y a que el producto de PCR no mostró bandas accesorias, se purificaron directamente de las reacciones de digestión y de PCR y se procedió a realizar la ligación de los mismos.

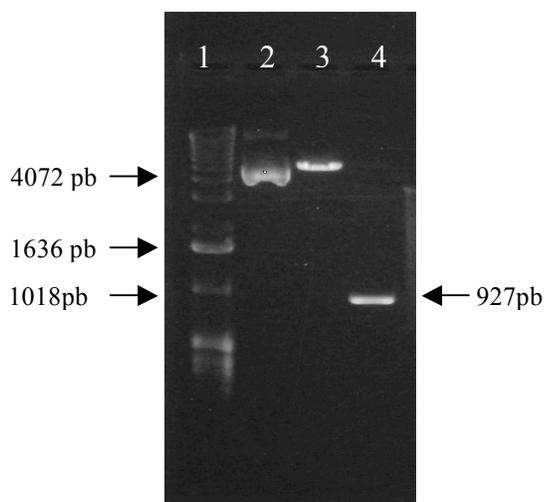


Figura 9. Digestión del plásmido Topo 1275 con la enzima *Age* I y amplificación del casete de resistencia a kanamicina. Carril 1, escalera 1 Kb; carril 2, Topo 1275 sin digerir; carril 3, Topo 1275 digerido con *Age* I; carril 4, amplificación por PCR del casete de resistencia a kanamicina con los oligos Kan-*Age*.

Los resultados obtenidos de las transformaciones con las reacciones de ligación del plásmido Topo 1275 linearizado con *Age* I y el casete de resistencia a kanamicina digerido con *Age* I, fueron los esperados. Las clonas mostraron resistencia a kanamicina y carbencilina. En los controles sin inserto si hubo religación del plásmido y las clonas crecieron en carbencilina. En el control sin ligasa y sin inserto solo hubo 2 transformantes, lo que indica que quedaron algunos plásmidos sin digerir. A las clonas que crecieron en los dos antibióticos se le extrajo plásmido para verificar que fueran positivas.

En la Figura 10 se observa una banda tenue correspondiente a la amplificación del casete de resistencia a kanamicina (927 pb), en 6 clonas diferentes a las que se les extrajo plásmido, pero también se observa una amplificación de más de 5000 pb.

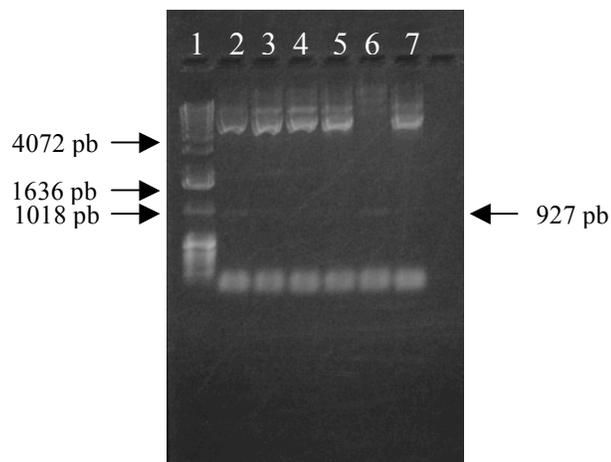


Figura 10. Producto de PCR utilizando los oligos Kan-Age. Carril 1 escalera 1 Kb, carril 2 clona 1, carril 3 clona 2, carril 4 clona 3, carril 5 clona 8, carril 6 clona 9, carril 7 clona 10.

Para asegurar que el casete de resistencia a kanamicina se encontraba interrumpiendo el gen *pyk2 sll1275* que esta clonado en el vector Topo se hizo un PCR con los oligos *pyk1275* que amplifican el gen *pyk2 sll1275* (Figura 11).

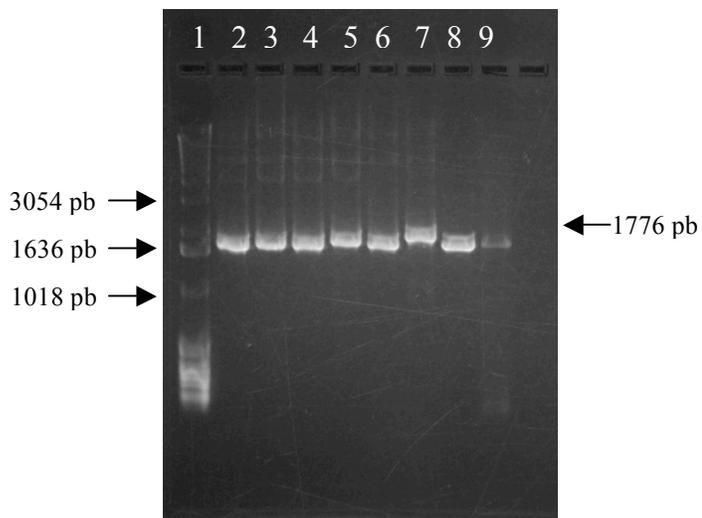


Figura 11. PCR de los plásmidos extraídos de las clonas positivas de la ligación Topo1275 casete de resistencia a kanamicina. Carril 1, escalera 1Kb; carril 2, clona 1; carril 3, clona 2; carril 4, clona 3; carril 5, clona 8; carril 6, clona 9; carril 7, clona 10; carril 8 y 9, plásmido Topo1275.

El tamaño esperado de la amplificación era un fragmento de 2703 pb que corresponden al gen *pyk2 sll1275* más el casete de resistencia a kanamicina de 927 pb. Sin embargo, lo que se obtuvo fue un fragmento de 1776 pb que

corresponde al gen *pyk2 sll1275*. Por esta razón se decidió hacer un gradiente con diferentes concentraciones de kanamicina para ver si aumentando la concentración del antibiótico se podría hacer una mejor selección de las clonas correctas. Se obtuvo que todas las clonas crecieron en las diferentes concentraciones de kanamicina (30 µg/ml, 50 µg/ml, 70 µg/ml y 100 µg/ml). Por lo cual se revisó el plásmido Topo 2.1 en donde se encuentra clonado el gen *pyk2 sll1275*, y al ver el mapa del vector se observó que el plásmido Topo 2.1 tiene resistencia a ampicilina pero también a kanamicina. Esto impedía la selección de las transformantes. Por ello, se cambió de estrategia para poder interrumpir el gen *pyk2 sll1275* que se encuentra clonado en Topo 2.1.

3.3) Digestión del plásmido Topo 0587 y amplificación del casete de resistencia a cloranfenicol.

En la Figura 12 se observa la digestión parcial del plásmido Topo 0587 con la enzima de restricción *Cla* I, mientras que en la Figura 13 se observa el producto de la amplificación por PCR del casete de resistencia a cloranfenicol (971 pb) con los oligonucleótidos *Cla*-cat. Dado que el plásmido presentó una digestión parcial se extrajo del gel de agarosa el fragmento correspondiente al vector linearizado. Como el producto de PCR no presentó fragmentos adicionales se purificó el producto directo de la reacción de PCR, se puso a digerir y se procedió a realizar la ligación de estos.

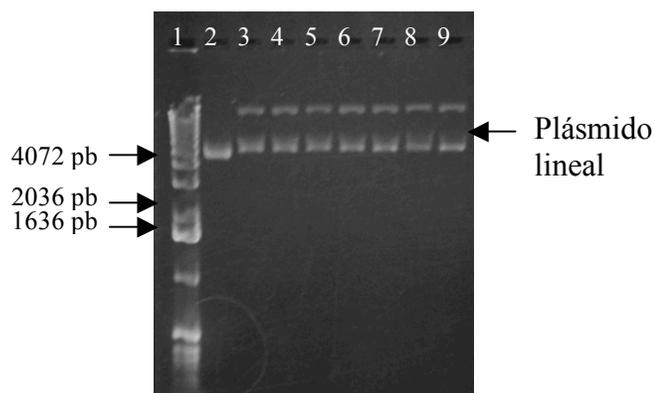


Figura 12. Digestión del plásmido Topo0587 con la enzima *Cla* I. Carril 1, escalera 1 Kb; carril 2, Topo0587 sin digerir; carril 3-9, Topo0587 digerido con *Cla* I.

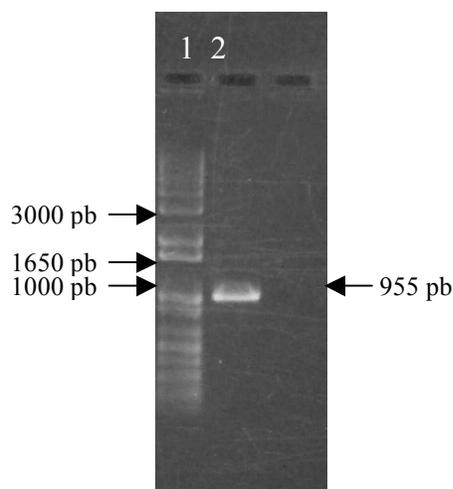


Figura 13. Amplificación del casete de resistencia a cloranfenicol con los oligonucleótidos Cla-cat. Carril 1, escalera 1 Kb; carril 2, producto de PCR.

Los resultados de las transformaciones con las reacciones de ligación del plásmido Topo 0587 linearizado con *Cla* I y el casete de resistencia a cloranfenicol digerido con *Cla* I, fueron los esperados. Las clonas mostraron resistencia a cloranfenicol y carbencilina. En los controles sin inserto se presentó religación del plásmido y las clonas crecieron en carbencilina. En el control sin ligasa y sin inserto no hubo transformantes. A las clonas que crecieron en los dos antibióticos se le extrajo plásmido para verificar que fueron positivas usando una reacción de PCR con los oligonucleótidos Cla-cat los cuales amplifican el casete de resistencia a cloranfenicol, pero en ninguna fue positiva. Esto mismo sucedió al obtener las transformantes de la ligación del plásmido topo 1275 linearizado con *Sma* I y del casete de resistencia a cloranfenicol escindido con *Sma* I en donde se obtuvieron transformantes, pero en ninguno de los casos se pudo extraer plásmido de estas clonas. Estos resultados podrían sugerir que la interrupción del gen *pyk* completo con el casete de cloranfenicol provoca que se den eventos de recombinación que hagan que se pierda el casete y con ello la resistencia inicial, lo que pudiera provocar que el plásmido sea inestable dentro de la célula. Debido a que en esta estrategia se utilizó el gen completo del gen *pyk* es posible que esto provocara ya en sí inestabilidad de plásmido ya que se sabe de otros genes de piruvato cinasa

que no han podido ser clonados completos. Este es el caso de la *pyk* de *B. subtilis* (Muñoz, M.E., 1997).

VI.3 INTERRUPCIÓN POR AMPLIFICACIÓN.

En la tabla IV se muestra los oligonucleótidos diseñados para realizar la amplificación de los genes *pyk1 sll0587* y *pyk2 sll1275* y de los genes de resistencia a cloranfenicol (*cat*) o kanamicina (*kan*) respectivamente con base al esquema mencionado en la figura 4.

Tabla IV. Oligonucleótidos utilizados para la interrupción por amplificación.

Nombre Del Oligonucleótido	Secuencia
Pk1275kan-for	5' CGACCCAAAGCAAGGAAGTGCTGAGACAACGATCCAAGCCGGTGCTACCACTTT CCGCCGTTACATTGCACAAGATA 3'
Pk1275kan-rev	5' CAGTCCTTTTTGGGCATCGATGGTGACAATGGCTCCATCTCGAATCTTTTGGGTA GCGCCCAATTAACCAATTCTGA 3'
Pk0587cat2-for	5' GTAGAGGTGATACGTCAGATGGTGGATGCGGGCATGAATGTGGCCCGCTGAATT TTCCGCCAAGCTTGCATGCCTG 3'
Pk0587cat-rev	5' AGGGAATAATACCCCAAATAAGTTGAGGCTATGGTAAACCTTTTCTGAGGGAGT GAAAGCCAGGCGTTAAGGGCAC 3'

Subrayado. Secuencia específica de los casetes de resistencia

El PCR de gradiente utilizando los oligonucleótidos Pk1275kan utilizando como templado el plásmido pNK862 dio como resultado una amplificación de 1035 pb en todas las temperaturas de alineamiento analizadas, lo cual se esperaba ya que el casete de resistencia a kanamicina es de 915 pb y esto sumado a las secuencias homólogas de 60 bases de *pyk2 sll1275* para cada oligonucleótido utilizado nos da un producto de 1035 pb, como se muestra en la Figura 14. Estos resultados coinciden con el análisis teórico de la secuencia del gen *pyk2 sll1275*, donde se seleccionaron las 120 bases específicas para cada uno de los genes *pyk*, además de amplificar el casete de resistencia a kanamicina.

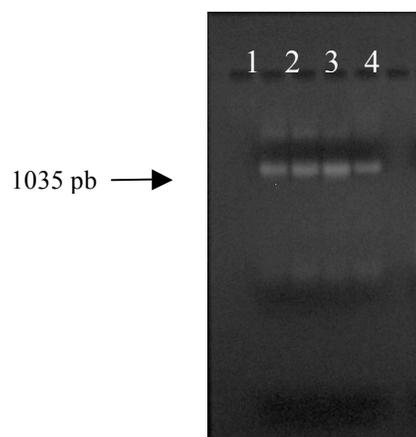


Figura 14. Amplificaciones del PCR de gradiente con el plásmido pNK862 y los oligos Pk1275kan. Carril 1, amplificación con la temperatura de alineamiento de los oligos de 49.9°C; carril 2, 53.4°C; carril 3, 55.7°C y carril 4, 61.4°C.

Con este producto de PCR se realizaron los ensayos para interrumpir el gen *pyk2* *sll1275* en el genoma de *Synechocystis* sp PCC 6803.

El PCR de gradiente utilizando los oligonucleótidos Pk0587cat y como templado el plásmido pCAT19 dio como resultado un producto de 1075 pb que corresponde al casete de resistencia a kanamicina de 955 pb y a las secuencias homólogas de 60 bases de *pyk1* *sll0587* para cada oligonucleótido (Figura 15).

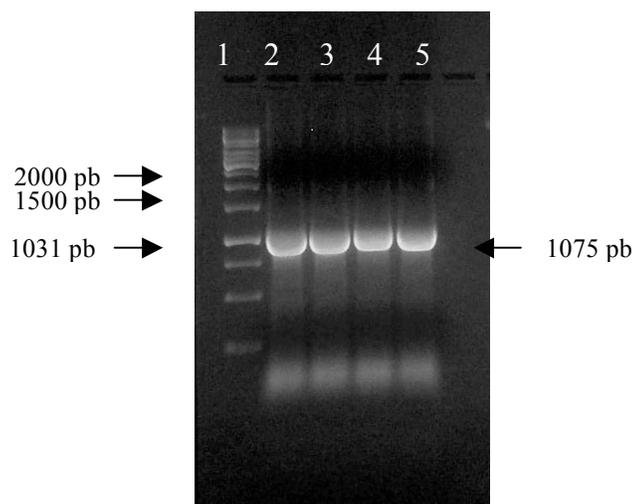


Figura 15. Amplificaciones del PCR de gradiente con el plásmido pCAT19 y los oligos Pk0587cat. Carril 1, escalera de 1Kb; carril 2, amplificación con la temperatura de alineamiento de los oligonucleótidos de 58.3°C; carril 3, 60.4°C; carril 4, 63.5°C y carril 5, de 65.6°C.

Como se puede observar en la Figura 15 en todas las temperaturas de alineamiento de oligonucleótidos se obtuvo la amplificación del casete de resistencia a cloranfenicol (1075 pb) con 60 pb homólogas a el gen *pyk1 sll0587* en el los extremos 5' y 3'. Con este producto de PCR se prosiguió a interrumpir el *pyk1* gen *sll0587* en el genoma de *Synechocystis* sp PCC 6803.

VI.4 CONDICIONES DE CULTIVO Y CINÉTICA DE CRECIMIENTO.

1) Condiciones de cultivo de *Synechocystis* sp. PCC 6803 en medio líquido y sólido.

Los cultivos de *Synechocystis* sp. PCC 6803 realizados con el medio de cultivo BG-11 líquido, presentaron muy poco crecimiento, ya que solo alcanzaron una DO_{730} máxima de 0.2. Al realizar el cultivo de la cianobacteria en medio sólido BG-11 agar no se presentó crecimiento, por lo que se procedió a revisar de nuevo las condiciones de temperatura e iluminación. Se prepararon asimismo nuevas soluciones de la manera recomendada por el Dr. Vermaas (ver metodología). Se preparó medio BG-11 líquido y se ajustó el pH a 7.4 con NaOH 0.5 M. Con este nuevo medio la cepa comenzó a crecer más rápido y también se observó en el microscopio una mayor cantidad de células en proceso de división. Ya teniendo las condiciones adecuadas para el cultivo de la cepa se evaluó las características de crecimiento poblacional.

2) Cinética de crecimiento de *Synechocystis* sp. PCC 6803.

La curva de crecimiento de *Synechocystis* sp. PCC 6803 en las condiciones descritas en la metodología se muestra en la Figura 16. Se realizaron diluciones para guardar una linealidad en la lectura por el espectrofotómetro, dado el incremento de la DO del cultivo con el tiempo.

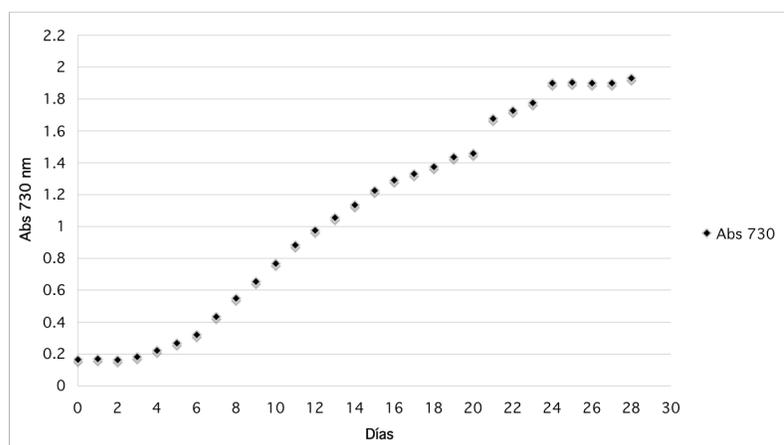


Figura 16. Densidad óptica a 730 nm durante un periodo de 30 días del cultivo de *Synechocystis* sp. PCC 6803. Los rombos negros representan las mediciones con una dilución de 1:1 (cultivo: medio BG-11), y a partir del día 20 son diluciones de 1:4.

En contraste con el cultivo de la cianobacteria en medio líquido, en medio sólido BG-11 con agar solo se observó un crecimiento por 3 días y después se tornó de color amarillo hasta que se perdió (Figura 17).

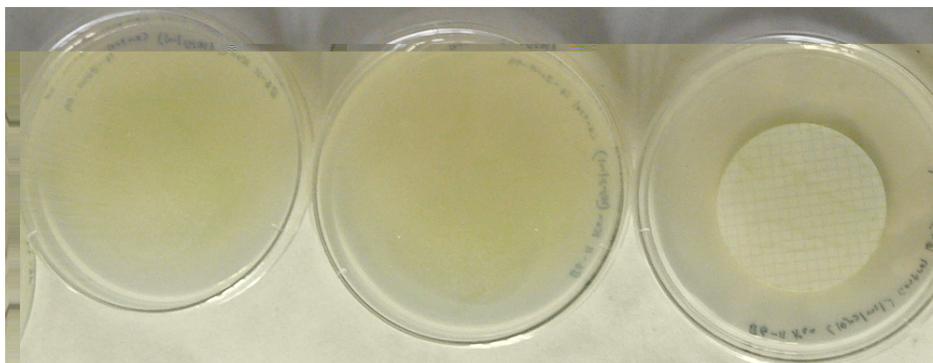


Figura 17. *Synechocystis* sp. PCC 6803 sembrada en medio BG-11 agar después de 6 días de incubación no presentó crecimiento y perdió el color verde.

La cepa no presentó crecimiento en medio sólido, el cual era necesario para seleccionar las colonias transformantes al interrumpir los genes *pyk2 sll1275* y *pyk1 sll0587*. Con el fin de reactivar su crecimiento se adicionó amortiguador TES/NaOH y el tiosulfato de sodio como se menciona en la metodología. Como se observa en la Figura 18 al sembrar la cepa en estas condiciones se logró crecimiento de la cepa.



Figura 18. *Synechocystis* sp. PCC 6803 sembrada en medio BG-11 agar con TES NaOH y tiosulfato de sodio después de 10 días de incubación.

Estos resultados sugieren que un adecuado pH es un factor determinante para el crecimiento de *Synechocystis* sp. PCC 6803 tanto en medio sólido como líquido.

VI.5 INTERRUPCIÓN DE LOS GENES *pyk* EN CROMOSOMA.

1) Transformación de *Synechocystis* sp. PCC 6803 con el producto de PCR diseñado para interrupción por amplificación.

Se realizó el ensayo de transformación de la cepa para interrumpir los genes *pyk2* *sll1275* y *pyk1* *sll0587*. De acuerdo a la bibliografía (Zang, *et al.*, 2007) se esperaban transformantes después de 15 días de incubación, pero no se presentó ningún crecimiento de colonias transformantes en las cajas BG-11 con los antibióticos de selección, sino solo en las cajas control sin antibiótico.

El análisis de secuencias del genoma completo de *Synechocystis* sp. PCC 6803 y al mapa de las rutas del metabolismo del carbono obtenido para esta especie a partir de la base de datos Enciclopedia de genes y genomas de Kyoto (KEGG), sugiere que la única forma en que *Synechocystis* sp. PCC 6803 puede obtener

piruvato es por medio de la enzima piruvato cinasa, ya que no presenta el sistema de fosfotransferasa dependiente de PEP.

En el análisis de secuencias tampoco se observa la presencia de la ruta Enter-Doudoroff ni la de la enzima piruvato fosfato dicinasa, que son algunas formas alternativas para obtener piruvato utilizadas por algunos organismos (Ponce, *et al.*, 1995; García and Ponce, 2003). Debido a esto se siguieron haciendo más transformaciones pero ahora sembrando en cajas de medio BG-11 agar con glucosa y cajas con succinato para poder obtener colonias transformantes. Esto se hizo ya que al interrumpir alguno de los dos genes potenciales codificadores para dos piruvatos cinasas en esta cianobacteria, se estaría disminuyendo la cantidad de piruvato disponible para la célula y así se limitaría el crecimiento de las mismas. Sin embargo, no se obtuvieron colonias transformantes en las cajas con glucosa, ni con succinato.

Con respecto a la cantidad de bases requeridas para que se lleve a cabo recombinación homóloga cabe mencionar que en *E. coli* se ha probado experimentalmente que se requiere un mínimo de 40 pares de bases (Lovingshimer, *et al.*, 2005). Sin embargo, el mínimo de bases para la doble recombinación homóloga probada experimentalmente en *Synechocystis* sp. PCC 6803 es de 200 pares de bases (Zang, *et al.*, 2007) y en este experimento se utilizó 60 pares de bases en el extremo 5' y 60 pares de bases en el extremo 3'. Con el propósito de comprobar que se estaba llevando a cabo la recombinación homóloga de los productos amplificados con los genes *pyk2 sll1275* y *pyk1 sll0587* del genoma de *Synechocystis* sp. PCC 6803, se realizaron amplificaciones por PCR de las reacciones de transformación como se menciona en la metodología. Al utilizar los oligos *pyk0587* en la reacción donde se transformó la cianobacteria con el fragmento 0587-cat-0587 se asumieron dos posibles resultados. Uno, que si no se llevaba a cabo la recombinación se obtuviera una amplificación de 1422 pb correspondientes al gen completo *pyk1 sll0587*, la cual no se presentó. Dos, en el caso de estarse llevando a cabo la recombinación homóloga con el gen de interés el producto de la amplificación del PCR con los oligonucleótidos *pyk0587* daría un

tamaño aproximado de 1219 pb; que lo conforman las 1075 pb de 0587-cat-0587 más las 144 pb del gen *pyk1 s//0587* en donde hibridan los oligonucleótidos *pyk0587*. Como se observa en la Figura 19 se obtuvo un fragmento de aproximadamente 1219 pb lo que confirma que se está llevando a cabo la recombinación homóloga del fragmento 0587-cat-0587 con el gen *pyk1 s//0587* en el genoma de *Synechocystis* sp. PCC 6803. El producto 0587-cat-0587 no contiene la región en donde hibridan los oligos *pyk0587* ya que estas se encuentran al principio del lado 5' y final del lado 3' del gen *pyk1 s//0587*. Con esto se descarta el estar amplificando el producto de PCR que se adicionó a la reacción para la transformación.

También se utilizaron los oligonucleótidos Cla-cat en la reacción de transformación donde se adicionó el producto de PCR 0587-cat-0587, para amplificar el casete de resistencia a cloranfenicol y el resultado fue positivo ya que se presentó un producto de PCR de 955 pb correspondiente al casete de cloranfenicol (Figura 19, carril 6). En la Figura 19 se observa que en la reacción de la cepa control en la que no se adicionó ADN al utilizar los oligonucleótidos *pyk0587* los cuales amplifican el gen completo, no hubo amplificación del gen *pyk1 s//0587*. Cuando se utilizaron los oligonucleótidos Cla-cat que amplifican el casete de resistencia a cloranfenicol se amplificó un producto muy tenue de aproximadamente 971 pb que correspondería con el tamaño del casete de resistencia a cloranfenicol (Figura 19, carril 3). Sin embargo, dado que no es posible que la cepa control contenga el casete de resistencia a cloranfenicol, pues no fue transformada con ADN y al ser sembrada en medio sólido con cloranfenicol no presentara crecimiento. Sugirió que la amplificación obtenida es un falso positivo que podría deberse a que los oligonucleótidos cla-cat hibriden en alguna otra parte del genoma y de dar lugar a una amplificación de un tamaño muy aproximado. Esto explicaría la baja intensidad del fragmento amplificado y el que no se haya obtenido amplificación con los oligos *pyk0587*.

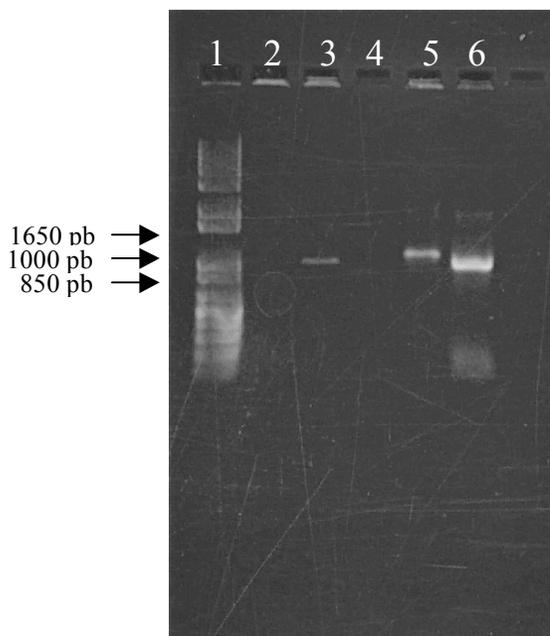


Figura 19. Comprobación de la interrupción del gen *pyk1 sll0587* por medio de PCR del cultivo utilizado para transformación con el producto de PCR del casete de resistencia a cloranfenicol con secuencias del gen *pyk2 sll0587*. Carril 1, escalera de 1Kb; carril 2, PCR *Synechocystis* control con oligos *pyk0587*; carril 3, PCR *Synechocystis* control con oligos Cla-cat; carril 4, vacío; carril 5, PCR *Synechocystis* experimento con oligos *pyk0587*; carril 6, PCR *Synechocystis* experimento con oligos Cla-cat.

Para la comprobación de la recombinación del producto de PCR que contiene el casete de resistencia a kanamicina y 60 bases en los extremos 5' y 3' del gen *pyk2 sll1275* (Fragmento 1275-kan-1275), se utilizaron los oligonucleótidos *pyk1275* y *kan-age*. Los primeros amplifican el gen *pyk2 sll1275* completo (1776 pb) tanto en el control y como en la reacción de transformación con el fragmento 1275-kan-1275. El producto de amplificación es de 1126 pb que correspondería a 935 pb del fragmento 1275-kan1275 mas 94 pb del gen *pyk2 sll1275*, que es en donde se encuentran las regiones en donde hibridan los oligonucleótidos *pyk1275* al llevarse a cabo la recombinación. Como se muestra en el carril 5 de la Figura 21 la presencia del producto de 1126 pb comprueba la recombinación en el genoma. Asimismo se observó otro fragmento más tenue de 1776 pb que correspondería al gen *pyk2 sll1275* completo. Estos resultados sugieren que quedan células en las que no se llevó a cabo la recombinación homóloga con el cromosoma. Al utilizar

los oligonucleótidos kan-age no se obtuvo amplificación en la reacción control (Figura 20, carril 3), pero en la amplificación de la reacción que se transformó con el fragmento 1275-kan-1275 sí se obtuvo el fragmento esperado de 915 pb que corresponde al casete de resistencia a kanamicina (Figura 20, carril 6).

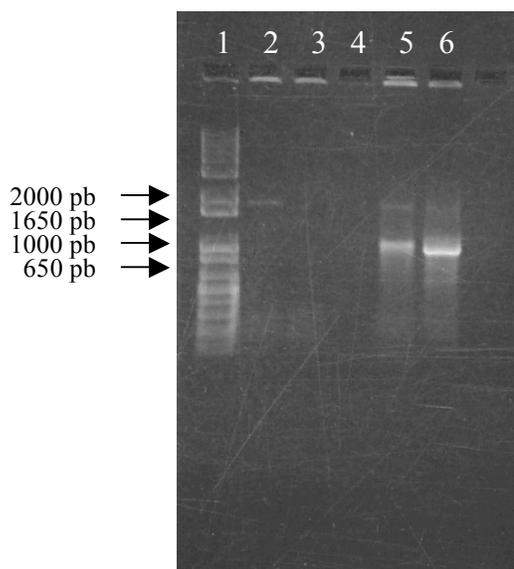


Figura 20. Comprobación de la interrupción del gen *pyk2 sll1275* por medio de PCR del cultivo utilizado para transformación con el producto de PCR del casete de resistencia a kanamicina con secuencias del gen *pyk2 sll1275*. Carril 1, escalera de 1Kb; carril 2, PCR *Synechocystis* control con oligos *pyk1275*; carril 3, PCR *Synechocystis* control con oligos Kanage; carril 4, vacío; carril 5, PCR *Synechocystis* experimento con oligos *pyk1275*; carril 6, PCR *Synechocystis* experimento con oligos Kanage.

Aun cuando se comprobó que se estaba llevando a cabo la recombinación de los casetes de resistencia a antibióticos en el genoma de *Synechocystis* sp. PCC 6803, no se obtuvieron transformantes resistentes a kanamicina o cloranfenicol. Estos resultados sugieren que la interrupción del gen *pyk* es inestable y se pierde al crecerla en el medio de selección, o que la interrupción de cualquiera de los dos genes por separado le afecte a la cianobacteria al grado de no tener el suficiente piruvato. Afectando por lo tanto la producción de acetil coenzima A y por consecuencia un ineficiente ciclo de los ácidos tricarbóxicos y la fosforilación oxidativa para la producción de adenosín trifosfato. Además del impacto en la síntesis de aminoácidos como la isoleucina, valina, alanina y leucina los cuales se

derivan directamente del piruvato (Valle, *et al*, 1996). Una manera para intentar obtener las mutantes de piruvato cinasa de la cianobacteria seria utilizando un medio ya sea rico en los aminoácidos de la familia de piruvato o al medio agregarle piruvato para compensar la falta de producción al mutar alguna de los dos genes *pyk2 sll1275* o *pyk1 sll0587*.

V.6 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE LOS GENES *pyk*.

1) Extracción de ARN total de *Synechocystis* sp. PCC 6803

El ARN total se extrajo de manera exitosa en todas las condiciones y en un buen estado ya que se observan las bandas del ARN ribosomal 23s, 16s y 5s (Figura 21). En la Figura 21 se observa el ARN total de la condición oscuridad/glucosa y la condición fotoautotrófica en una electroforesis de gel de agarosa. Para el caso de condición fotoautotrófica se obtuvieron en promedio 900 ng/μl de ARN total. Para la condición de oscuridad por 2 días el resultado de la cuantificación fue 1.3 μg/μl de ARN total, el rendimiento total fue de 65 μg de ARN, la condición de dos días de oscuridad con 5 mM de glucosa durante 60 minutos, se obtuvo 2 μg/μl de ARN total, el rendimiento total fue de 100 μg de ARN. El ARN total fue utilizado para analizar la expresión de los genes *pyk2 sll1275* y *pyk1 sll0587* por medio de un análisis de RT-PCR semicuantitativo.

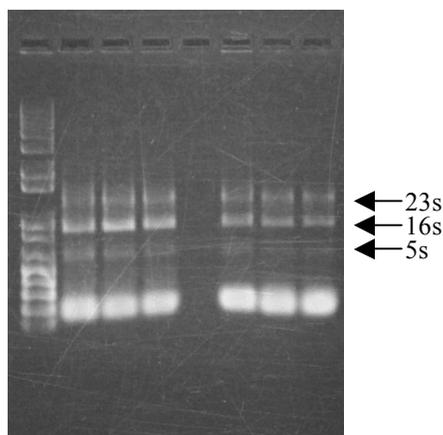


Figura 21. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de extracción de ARN total. Carril 1, escalera 1 kb; carril 2-4, ARN total de condición oscuridad con glucosa; carril 6-8, ARN total condición fotoautotrófica.

2) RT-PCR de los genes *pyk1 sll0587*, *pyk2 sll1275* y *rnpB*.

En la Figura 22 (carril 4) se observa como en condiciones fotoautotróficas la expresión del gen *pyk2 sll1275* fue inducida ya que se observa el producto esperado de 777 pb. Sin embargo, aparentemente no se obtuvo transcrito del gen *pyk1 sll0587*. El gen control *rnpB*, produjo el transcrito esperado de 416 pb (carril 2). Este gen codifica para una subunidad de ribonucleasa P su expresión es independiente de la condición de cultivo en que se encuentre la cianobacteria. Cabe destacar que los ensayos de retrotranscripción para todas las condiciones se realizaron con 5 μ g de ARN total, ya que cuando se utilizó 2.5 μ g de ARN total solamente el gen control es el que presentó transcripción. Esto sugiere que aunque se observó la expresión de los dos genes de *pyk*, estos no se están transcribiendo en gran cantidad. Si tomamos en cuenta que se utilizó cinco veces más de lo recomendado para llevar a cabo un ensayo de retrotranscripción (1 μ g de ARN total).

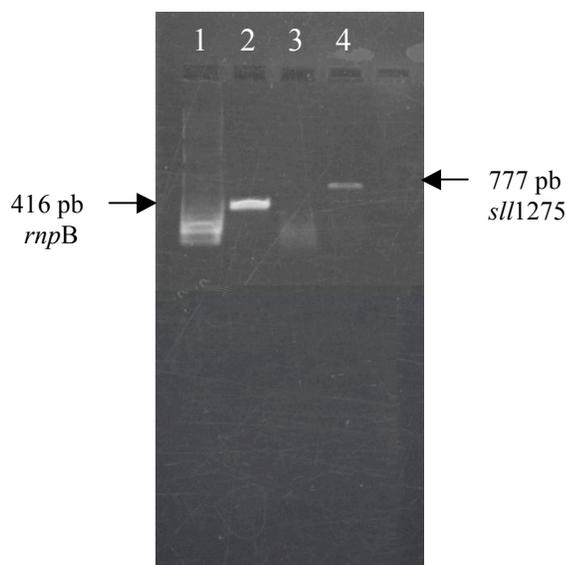


Figura 22. RT-PCR de los genes *pyk2 sll1275*, *pyk1 sll0587* y el gen control *rnpB* de ARN total de cultivos en condiciones fotoautotróficas. Carril 1, escalera 1 kb; carril 2, PCR de cDNA control (gen *rnpB*); carril 3, PCR de cDNA gen *pyk1 sll0587*; carril 4, PCR de cDNA gen *pyk2 sll1275*.

Para el caso de las condiciones de oscuridad y oscuridad con glucosa por 60 minutos el gen control se transcribió independientemente de las dos condiciones (Figura 23, carriles 2 y 6). El gen *pyk1 sll0587* que no mostró prácticamente expresión en condiciones fotoautotróficas mostró un incremento de los niveles de ARNm al ponerlo en oscuridad por dos días, dado un producto de 574 pb (Figura 23, carril 3). En cambio el gen *pyk2 sll1275* cuya expresión fue inducida en condiciones fotoautotróficas al exponer al cultivo a oscuridad los niveles de ARNm bajaron y apenas fue posible observar el fragmento de 777 pb (carril 4). En la condición de oscuridad donde se mantuvieron con glucosa durante 60 minutos, la expresión del gen *pyk2 sll1275* fue claramente inducida por glucosa (carril 8), mientras que la expresión del gen *pyk1 sll0587* se mantuvo como la observada en oscuridad sin glucosa (carril 7).

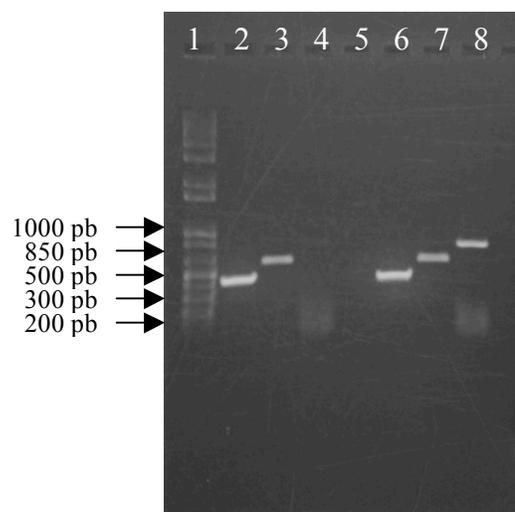


Figura 23. RT-PCR de los genes *pyk2 sll1275*, *pyk1 sll0587* y el gen control *rnpB* de ARN total de cultivos en condiciones de 2 días de oscuridad y 2 días de oscuridad con 5 mM de glucosa por 60 minutos. Carril 1, escalera 1 kb; carril 2, PCR de cDNA control (gen *rnpB*) condición oscuridad; carril 3, PCR de cDNA gen *pyk1 sll0587* condición oscuridad; carril 4, PCR de cDNA gen *pyk2 sll1275* condición oscuridad; carril 5, vacío; carril 6, PCR de cDNA control (gen *rnpB*) condición oscuridad/glucosa; carril 7, PCR de cDNA gen *pyk1 sll0587* condición oscuridad/glucosa; carril 8, PCR de cDNA gen *pyk2 sll1275* condición oscuridad/glucosa.

Tabla V. Transcripción de los genes *pyk1 sll0587*, *pyk2 sll1275* y *rnpB* (control) en las diferentes condiciones de cultivo. Transcripción positiva (+), transcripción negativa (-).

	<i>pyk1 sll0587</i>	<i>pyk2 sll1275</i>	<i>rnpB</i>
Luz	-	+	+
Oscuridad	+	-	+
Oscuridad/Glucosa	+	+	+

De acuerdo a los datos obtenidos en el ensayo de RT-PCR en el cual se estudiaron las transcripciones de los genes *pyk2 sll1275* y *pyk1 sll0587* se puede decir que estos genes se expresan de manera diferencial dependiendo de las condiciones en la que se cultive la cianobacteria. Estos resultados sugieren que en esta etapa exponencial del cultivo (DO_{730} 0.8), la piruvato cinasa codificada por el gen *pyk2 sll1275* es la que principalmente estaría llevando a cabo la síntesis de piruvato cuando *Synechocystis* sp. PCC 6803 se encuentre en condiciones fotoautotróficas. En cambio la piruvato cinasa codificada por el gen *pyk1 sll0587* pareciera ser la encargada principal de la producción de piruvato cuando la

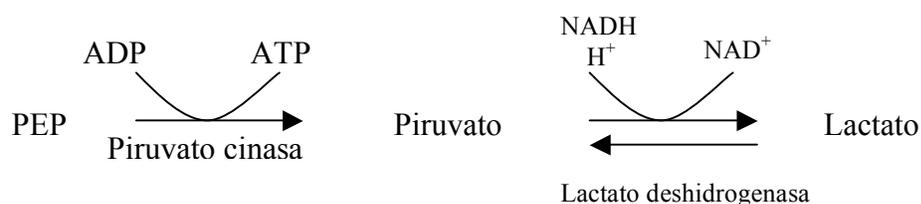
cianobacteria se encuentra en oscuridad. Los resultados sugieren que cuando *Synechocystis* sp. PCC 6803 se encuentra en oscuridad con glucosa, el piruvato producido proviene de las enzimas Pyk codificadas por los dos genes: *pyk1 sll0587* y *pyk2 sll1275*. Shimizu, *et al*, (2002) al realizar un análisis de flujo metabólico en *Synechocystis* utilizando la distribución de isótopos de ^{13}C -glucosa marcada observó que en condiciones fotoautotróficas la síntesis de piruvato se lleva a cabo por medio de la vía glicolítica ya que en esta condición la ruta de pentosas fosfato es remplazada por el ciclo de Calvin para la fijación de CO_2 . Por otro lado, el 90.2% la glucosa es catabolizada por medio de la ruta de pentosas fosfato. Estos resultados sugieren que en la condición heterotrófica probada en este trabajo la producción de piruvato estaría dada principalmente a través de la vía de las pentosas en donde posiblemente se utilizarían ambas piruvato cinasas, mientras que en presencia de luz la producción de piruvato estaría dada principalmente a través de la vía glicolítica utilizando la piruvato cinasa codificada el gen *pyk2 sll1275*.

Interesantemente, los resultados de expresión de los genes *pyk* en *Synechocystis* sp. PCC 6803 obtenidos en este trabajo, no concuerdan con los obtenidos por el trabajo de Tabei (2007), en donde se midió la expresión de los genes que intervienen en la glicólisis de *Synechocystis* en diferentes condiciones fisiológicas. Estos autores encontraron que en condiciones fotoautotróficas los dos genes *pyk* se expresan, mientras que en condiciones de oscuridad no observaron la expresión de ninguno de los dos genes y en la condición de oscuridad con glucosa solo observaron la expresión del gen *pyk2 sll1275*. En este trabajo sin embargo no especifican en qué fase de crecimiento tomó el cultivo, ni la cantidad y tipo de inóculo utilizado. Esto sugiere que los niveles de expresión de los genes *pyk* no solo pueden variar dependiendo de las condiciones de cultivo, suplementos nutritivos y las fases de crecimiento en las que sea analizada la expresión de los genes *pyk*.

V.7 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.

Se realizó un ensayo de actividad enzimática para corroborar que las secuencias de los genes *pyk2 sll1275* y *pyk1 sll0587* codificaran para dos piruvato cinasas funcionales diferentes en *Synechocystis* sp. PCC6803. El ensayo se hizo con extractos de cultivos expuestos a las diferentes condiciones de crecimiento en las cuales se detectó la transcripción diferencial de estos genes.

La medición de piruvato cinasa se llevó a cabo a través de una reacción indirecta acoplada a la oxidación de NADH. La reacción consta de dos partes, en la primera reacción la piruvato cinasa forma piruvato y ATP a partir de PEP y ADP y en la segunda parte el piruvato se convierte a lactato y NAD^+ por acción de la lactato deshidrogenasa.



Primero se verificó que la enzima lactato deshidrogenasa estándar (LDH) se encontrara funcionando. Como se observa en la Figura 24 al adicionarle piruvato a la reacción este fue convertido en lactato por medio de la enzima LDH oxidándose el NADH_2 a NAD . El registro en el espectrofotómetro a 340 nm mostró el grado de oxidación del NADH a NAD^+ . Los resultados indicaron que la segunda parte de la reacción se estaba llevando a cabo adecuadamente, ya que se registro un cambio de absorbancia de 0.6975 a 0.0913 durante la medición, y la curva obtenida en la gráfica (Figura 24, curva negra) se ajusto con la curva teórica de una reacción cinética dada por el programa elyptica (curva roja).

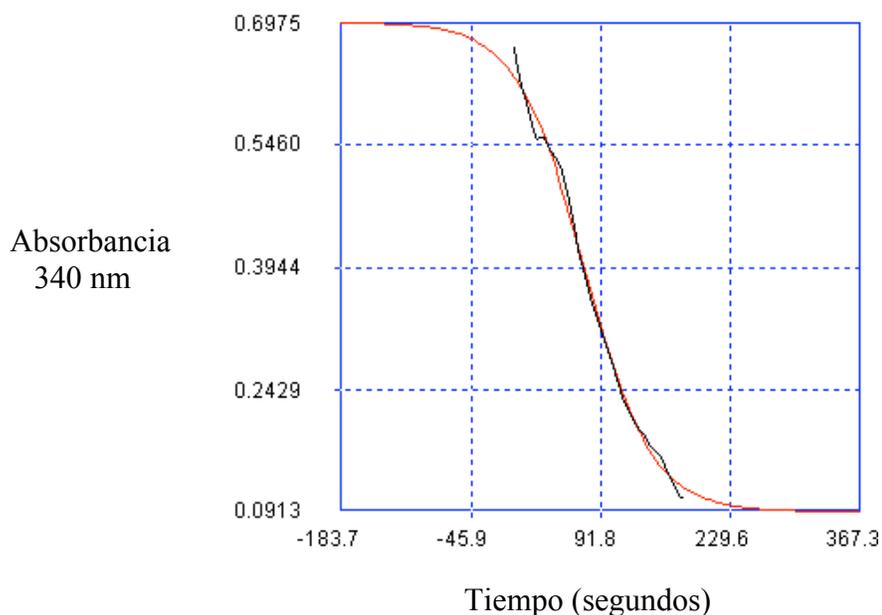


Figura 24. Reacción control de la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa estándar. Los valores negativos indican el tiempo de ajuste del instrumento. La curva en color rojo es la curva teórica para reacciones enzimáticas y la curva en negro es la reacción experimental.

El segundo control tuvo como objetivo el verificar que el fosfoenolpiruvato se estaba convirtiendo en piruvato a través del uso de la enzima piruvato cinasa estándar. En la Figura 25 se observa indirectamente la actividad de la piruvato cinasa comercial (Roche) al convertir el fosfoenolpiruvato (4 mM) que contenía la reacción a piruvato, el cual luego fue convertido a lactato registrándose el cambio de oxidación del NADH_2 en el espectrofotómetro.

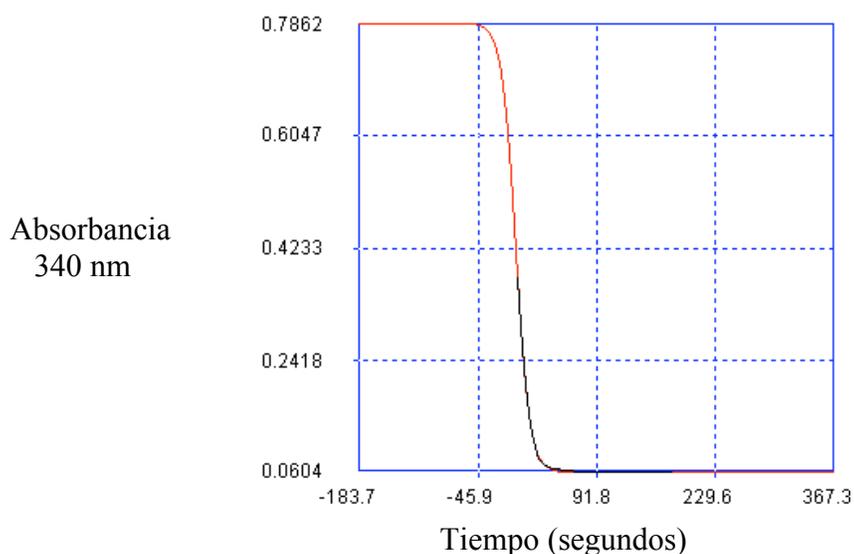


Figura 25. Reacción control de la actividad de la enzima piruvato cinasa estándar. Los valores negativos indican el tiempo de ajuste del instrumento. La curva en color rojo es la curva teórica para reacciones enzimáticas y la curva en negro es la reacción experimental.

Una vez comprobado las reacciones para cada uno de los reactivos y que la enzima lactato deshidrogenasa funcionaba correctamente se prosiguió a utilizar los extractos obtenidos en diferentes condiciones de cultivo para medir las actividades.

Se utilizaron cantidades de extracto crudo de 25 μ l, 50 μ l y 100 μ l de las diferentes condiciones de cultivo y no se logró medir actividad. Las razones por las cuales no se observó actividad pudiera ser la manera en la que se obtuvieron los extractos. Otra posibilidad es que al momento de estar rompiendo las células a pesar de los cuidados, el calor producido por la fricción de las esferas de zirconio pudiera haber provocado la desnaturalización de las enzimas presentes en los extractos, incluyendo la piruvato cinasa. También podría ser que en la DO_{730} en que se tomaron las muestras, la cianobacteria tiene muy poca actividad de piruvato cinasa. Para descartar esto se tomaron tres muestras con DO_{730} diferentes 0.7, 1.6 y 1.7 de un cultivo con glucosa 5 mM y el resultado fue negativo en todas las fases. Otra posibilidad podría ser que la cantidad de cultivo utilizado no haya sido

suficiente para obtener la enzima necesaria para que se pudiera registrar actividad en el espectrofotómetro o bien que la enzima pierda rápidamente su actividad al obtener el extracto. Por lo tanto se requiere estandarizar la metodología para medir la actividad de piruvato cinasa proveniente de extractos de cultivos de *Synechocystis* sp. PCC 6803 tomando en cuenta los controles y las diferentes causas por las cuales no se logró obtener actividad enzimática en este trabajo.

VII. Conclusiones

- Las secuencias Pyk1 *sll0587* y Pyk2 *sll1275* de *Synechocystis* sp. PCC 6803 presentan sitios de unión y dominios característicos de las enzimas piruvato cinasa como el sitio de unión a ADP/ATP y el sitio de unión a fosfoenolpiruvato.
- La secuencia de aminoácidos de Pyk2 *sll1275* de *Synechocystis* sp. PCC 6803 presenta un extremo C-terminal largo de 99 aa como las piruvato cinasas del género *Bacillus*, el cual presenta un motivo de unión a fosfoenolpiruvato.
- Los análisis de secuencias mostraron que existe un alto grado de homología entre la secuencia de Pyk2 *sll1275* de *Synechocystis* sp. PCC 6803 con otras piruvato cinasas que se activan con AMP como la de *G. stearothermophilus* y *Synechococcus* sp. PCC 6301.
- Las amplificaciones por PCR permitieron comprobar la interrupción de los genes *pyk1 sll0587* y *pyk2 sll1275* en el genoma de *Synechocystis* sp. PCC 6803 por recombinación homóloga utilizando el método interrupción por amplificación. Sin embargo, no se lograron obtener colonias transformantes con los genes *pyk* interrumpidos en las condiciones de selección utilizadas.

- La expresión de los genes *pyk1 sll0587* y *pyk2 sll1275* se da de forma diferencial y su expresión depende de las condiciones de cultivo a las que se exponga *Synechocystis* sp. PCC 6803:
 - La expresión del gen *pyk1 sll0587* fue inducida en oscuridad y en oscuridad con glucosa en cultivos de *Synechocystis* sp. PCC 6803 en fase logarítmica de crecimiento (DO_{730} 0.8).
 - El gen *pyk2 sll1275* se expresa cuando *Synechocystis* sp. PCC 6803 es cultivada en condiciones fotoautotróficas (DO 0.8) y cuando estos cultivos son transferidos a oscuridad en presencia de glucosa.

VIII. LITERATURA CITADA.

Anderson, S. L. y McIntosh, L. 1991. Light-activated heterotrophic growth of the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803: a blue-light- Requiring process. *Journal of Bacteriology*. 173 (9):2761-2767 p.

Carr, N. G. y B. A. Whitton. 1982. *The Biology of Cyanobacteria*. University of California Press. Berkeley. USA. 688 pp.

Carr, N. G., W. Hood y J. Pearce. 1969. Control and intermediary metabolism in blue-green algae. *Progress in Photosynthesis Research*, 3:1565-1569 p.

Deth, S. K. 1999. Antimicrobial compounds from marine cyanobacteria with special Reference to the bioactivity of a purified compound from *Oscillatoria laete-virens* BDU 20801. PhD thesis, Bharathi Dasan University, Thiruchirappalli, India. 47-57 p.

Emmerling, M., M. Dauner, A. Ponti, J. Fiaux, M. Hochuli, T. Szyperski, K. Wüthrich, J. E. Bailey y U. Sauer. 2001. Metabolic Flux Responses to Pyruvate Kinase Knockout in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 84(1):152-164 p.

Foster, J., A. Singh, L. Rothschild y L. Sherman. 2007. Growth-phase dependent differential gene expression in *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803 and regulation by a group 2 sigma factor. *Archives of Microbiology*. 187(4):265-279 p.

García, M. y E. Ponce. 2003. Metabolismo del carbono en microorganismos de interés biomédico y biotecnológico: Vía de Entner-Doudoroff. *Biotechnología Aplicada* 20:85-94 p.

Golden, S. S., M. Ishiura, C. H. Johnson y T. Kondo. 1997. Cyanobacterial circadian rhythms. *Annu. Rev. Plant Physiology. Plant Molecular Biology*. 48:327–354 p.

Gosset, G., J. Yong-Xiao y A. Berry. 1996. A direct comparison of approaches for increasing carbon flow to aromatic biosynthesis in *Escherichia coli*. *Journal of Industrial Microbiology*. 17(1):47-52 p.

Grigorieva, G. y S. Shestokov. 1982. Transformation in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Federation of European Microbiological Societies Letters*. 13:367-370 p.

Gubler, M., M. Jetten, S. Ho Lee y A.J. Sinskey. 1994. Cloning of the pyruvate kinase gene (*pyk*) of *Corinebacterium glutamicum* Strain. Applied and Environmental Microbiology. 60 (7): 2494-2500 p.

Hein, S., H. Tran y A. Steinbuchel. 1998. *Synechocystis* sp. PCC6803 possesses a two component polyhydroxyalkanoic acid synthase similar to that of Sulfur bacteria. Archives of Microbiology. 170(3):162-170 p.

Ishiura, M., S. Kutsuna, S. Aoki, H. Iwasaki, C. Andersson, A. Tanabe, S. Golden, C. Johnson y T. Kondo. 1998. Expression of a gene cluster *kaiABC* as a circadian feedback process in cyanobacteria. Science. 281(5382):1519–1523 p.

Johnsen, U., T. Hansen y P. Schonheit. 2003. Comparative Analysis of Pyruvate Kinases from the Hyperthermophilic Archaea *Archaeoglobus fulgidus*, *Aeropyrum pernix*, and *Pyrobaculum aerophilum* and the Hyperthermophilic Bacterium *Thermotoga maritime*. The journal of biological chemistry. 278 :(28) 25417–25427 p.

Kaneko, T., S. Sato, H. Kotani, A. Tanaka, E. Asamizu, Y. Nakamura, N. Miyajima, M. Hirose, M. Sugita y S. Tabita. 1996. Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. DNA Research. 3(3):109-136 p.

Kaneko, T. y S. Tabita. 1997. Complete genome structure of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. Plant Cell Physiology. 38(11):1171-1176 p.

Kayne, F. 1973. Pyruvate kinase. En: (Boyer, P.D., ed), 3ra The Enzymes. Ed. Academic Press Inc. New York, USA. 353-382 pp.

Knowles, V., C. Smith, C. Smith y W. Plaxton. 2001. Structural and regulatory properties of pyruvate kinase from cyanobacterium *Synechococcus* PCC6301. J. Biol. Chem. 276(24):2996-72 p.

Laughlin L. T. y G.H. Reed. 1997. The monovalent cation requirement of rabbit muscle pyruvate kinase is eliminated by substitution of lysine for glutamate 117*. Archives of biochemistry and biophysics. 348(2): 262-277 p.

Lovingshimer, M., D. Siegele y G. Reinhart. 2005. Construction of an inducible, *pfkB* deficient strain of *Escherichia coli* for the expression and purification of phosphofructokinase from bacterial sources. *Protein expression and purification* 46(2):475-482 p.

Malcovati, M., G. Valentini y H.L. Kornberg 1973. Two forms of pyruvate kinase in *E. coli*: Their properties and regulation. *Acta Vitaminol Enzymology*. 27(1):96-111 p.

Matas Ruiz Y. 2001. Papel de la enzima(s) piruvato cinasa en el metabolismo del carbono en la cianobacteria *Synechocystis* sp. PCC 6803. Departamento de Biotecnología Marina. CICESE. Ensenada, B.C. Tesis de Maestría. 85 pp.

Mattevi, A.G., M. Valentini, M. Rizzi, L. Speranza, M. Bolognesi y A. Coda. 1995. Cristal structure of *Escherichia coli* pyruvate kinase type I: molecular basis of the allosteric transition. *Structure*. 3(7):729-741 p.

McCloud, S., R. Smith y K. Schuller. 2001. Partial purification and characterization of pyruvate kinase from the plant fraction of soybean root nodules. *Physiologia plantarum*. 111(3):283-290 p.

Miller, J., C. B. Keith, J. O. Mary y T. Randolph. 1987. Production of phenylalanine and organic acids by phosphoenolpyruvate carboxylase-deficient mutants of *Escherichia coli*. *Journal of Industrial Microbiology*. 2(3):143-149 p.

Muñoz Márquez M. E., S. LeBorgne, F. Valle y F. Bolívar. 1997. Molecular cloning of gene that code for the pyruvate kinase of *Bacillus subtilis* and primary characterization of to strain carrying this gene insertionally inactivated. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 39(3-4): 129-40 p.

Muñoz Márquez M. E. y E. Ponce Rivas. 2003. Pyruvate kinase: current status of regulatory and functional properties. *Comparative Biochemistry and Physiology parte B*. 135(2):197-218 p.

Osanai, T., Y. Kanesaki, T. Nakano, H. Takahash, M. Asayama, M. Shirai, M. Kanehisa, I. Suzuki, N. Murata y K. Tanaka. 2005. Positive regulation of sugar catabolic pathways in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 by the group 2 sigma factor SigE. *The Journal of Biological Chemistry*. 280(35):30653–30659 p.

Osanai, T., S. Imamura, M. Asayama, M. Shirai, I. Suzuki, N. Murata y K. Tanaka. 2006. Nitrogen induction of sugar catabolic gene expression in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *DNA Research*. 13(5):185–195 p.

Patterson, G. M. L. 1996. Biotechnological Applications of Cyanobacteria. *Journal of Scientific and Industrial Research*. 55:669-684 p.

Pearce. J. y Carr, N. G. 1969. The incorporation metabolism of glucose by *Anabaena variabilis*. *Journal of Genetic Microbiology*. 54:451-462 p.

Ponce, E. 1996. Papel fisiológico de las isoenzimas de piruvato cinasa de *Escherichia coli* en el metabolismo celular. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma de México (UNAM). 54 pp.

Ponce, E., N. Flores, A. Martínez, F. Y. Valle y F. Bolívar. 1995. Cloning of the two pyruvate kinase isoenzyme structural genes from *Escherichia coli*: the relative roles of these enzymes in pyruvate biosynthesis. *Journal of Bacteriology*. 177(19): 5719-5722 p.

Rittmann, B. 2008. Opportunities for Renewable Bioenergy Using Microorganisms. *Biotechnology and Bioengineering*. 100 (2):203-212 p.

Sakai, H. y T. Otha. 1993. Molecular cloning and nucleotide sequence of the gene for pyruvate kinase of *Bacillus stearothermophilus* and the production of the enzyme in *Escherichia coli*. Evidence that the genes for phosphofructokinase constitute an operon. *European Journal of Biochemistry*. 211(3):851-859 p.

Shimizu, K., C. Yang y Q. Hua. 2002. Metabolic Flux Analysis in *Synechocystis* Using Isotope Distribution from ¹³C-Labeled Glucose. *Metabolic Engineering*. 4(3): 202–216 p.

Singh, P., P. Sinha, V. Daiker y D. Häder. 2009. Quantitative and qualitative extraction of RNA from a filamentous cyanobacterium *Anabaena variabilis* PCC 7937. *Journal of Applied Phycology*. 22(1):113-116 p.

Singh, K., T. Elvitigala, M. Bhattacharyya-Pakrasi, R. Aurora, B. Ghosh y H. Pakrasi. 2008. Integration of C and N metabolism Integration of C and N metabolism in *Synechocystis* under high Light. *Plant Physiology*. 148:467-478 p.

Smith, C. y V. Knowels. 2000. Purification and characterization of cytosolic piruvate Kinase from *Brassica napus* suspension cell cultures. Implications for the Integration of glycolysis with nitrogen assimilation. *European Journal of Biochemistry*. 267(14):447-4485 p.

Stal, L. 1992. Poly (hydroxyalkanoate) in cyanobacteria: an overview. *Federation of European Microbiological Societies*. 103(2-4):169-180 p.

Summerfield, T. y L. Sherman. 2007. Role of Sigma Factors in Controlling Global Gene Expression in Light/Dark Transitions in the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803. *Journal of Bacteriology*. 189(21):7829–7840 p.

Tabei, Y., O. Katsuhiko y M. Tsuzuki. 2007. Sll1330 controls the expression of glycolytic genes in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 355(4):1045–105 p.

Valentini, G., L. Chiarellis, R. Fortín, M. Speranza, A. Galizzi y A. Mattevi 2000. The allosteric regulation of piruvate kinase. *The Journal of Biological Chemistry*. 275(24):18145-18152 p.

Valle, F., E. Muñoz., E. Ponce., N. Flores y F. Bolivar. 1996. Basic and applied aspects of metabolic diversity: the phosphoenolpyruvate node. *Journal of Microbiology*. 17(5-6):458-462 p.

Woo-Yeo, K., K. Sungsoo, K. Byoung, O. Jeehyun, C. Seongwoong y C. Jong. 2008. SynechoNet: integrated protein-protein interaction database of a model cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *BMC Bioinformatics*. 10.1186/1471-2105-9-SI-S20 p.

Yamada, K. y T. Noguchi. 1999. Nutrient and hormonal regulation of pyruvate Kinase gene expression. *Biochemical Journal*. 337:1-11 p.

Yang, C., Q. Hua y K. Shimizu. 2002. Integration of the information from gene expression and metabolic fluxes for the analysis of the regulatory mechanisms in *Synechocystis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 58(6):813-822 p.

Yu, D., H. Ellis, E. Lee, N. Jenkins, G. Copeland, y L. Donald. 2000. An efficient recombination system for chromosome engineering in *Escherichia coli*. *Proceedings of Academic Scientific*. USA 97(11):5978-5983 p.

Zang, X., B. Liu, S. Liu, K.K.I.U. Arunakumara, y X. Zhang.2007. Optimum Conditions for Transformation of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Journal of Microbiology*. 45(3):241-245 p.