Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada

PAPEL DE LA ENZIMA(S) PIRUVATO CINASA EN EL METABOLISMO DEL CARBONO EN LA CIANOBACTERIA *Synechocystis* sp. PCC 6803

TESIS
MAESTRIA EN CIENCIAS

YESSICA ARACELI MATAS RUIZ

ENSENADA, B. C., MAYO DEL 2001.

TESIS DEFENDIDA POR

Yessica Araceli Matas Ruíz

Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ

Dra. Elizabet Ponce Rivas

Director del Comité

Dra. Ma. del Pilar Sánchez Saavedra

Miembro del Comité

Dr. Helmut Maske Rubach

Miembro del Comité

M. en C. Ma. Enriqueta Muñoz Márquez

Miembro del Comité

(Nombre del Sinodal)

Miembro del Comité

Dr. Facundo J. Marquez Rocha

Jefe del Departamento de

(Nombre del Dpto.)

Director de Estudios de Posgrado

15 de Mayo del 2001

CENTRO DE INVESTIGACION CIENTIFICA Y DE EDUCACION

SUPERIOR DE ENSENADA

DIVISION DE OCEANOLOGIA

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGIA MARINA

PAPEL DE LA ENZIMA(S) PIRUVATO CINASA EN EL METABOLISMO DEL CARBONO EN LA CIANOBACTERIA *Synechocystis* sp. PCC 6803

TESIS

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

Q.F.B. YESSICA ARACELI MATAS RUIZ

Ensenada, Baja California, México Mayo de 2001

RESUMEN del proyecto de tesis de Maestría de **YESSICA ARACELI MATAS RUIZ**, para la obtención del grado de **MAESTRO EN CIENCIAS** con especialidad **BIOTECNOLOGÍA MARINA**. Ensenada, Baja California, México. Mayo de 2001.

"PAPEL DE LA ENZIMA(S) PIRUVATO CINASA EN EL METABOLISMO DEL CARBONO EN LA CIANOBACTERIA Synechocystis sp. PCC 6803"

Resumen aprobado por:

Dra. Elizabeth Ponce Rivas
Director de Tesis

Synechocystis sp. PCC6803 es el único microorganismo fotoautotrófico del que se ha secuenciado el genoma completo. El análisis de secuencias realizado con el genoma de la cianobacteria y las secuencias disponibles en los bancos de genes, Kaneko, *et al* (1997) reportaron dos secuencias que potencialmente podrían codificar para la enzima piruvato cinasa. Estas secuencias fueron denominadas *pyk*F (sll1275) y *pyk*F (sll0587) por la homología que existe con el gen de *Bacillus stearothermophilus* (47.4%) y *Agrobacterium vitis* (43.1%), respectivamente. En este trabajo se estudio el papel de la enzima(s) piruvato cinasa de *Synechocystis* sp. PCC6803.

Los alineamientos realizados con las piruvato cinasas de diferentes organismos, incluyendo las dos potenciales de la cianobacteria mostraron una alta conservación de todas ellas, principalmente en los sitios activos de la enzima y sitios de unión a iones. En particular la proteína codificada por el gen *pyk*F(sll1275), contiene una secuencia C-terminal larga de 52 aminoácidos, similar a la presente en *B. stearothermophilus* (Sakai y Ohta, 1993). Dado el parecido que presentan entre sí y a que en la cianobacteria se detectaron dos actividades diferentes de piruvato cinasa, una que requiere AMP como activador (PykA) y la otra fructosa-1,6-difosfato (PykF), como sucede en *E. coli*, es que se sugiere que la Pyk codificada por *pyk*F (sll1275) probablemente presente características similares a la piruvato cinasa de *B. stearothermophilus*. La actividad de PykA de la cianobacteria llegó a ser hasta 250 veces mayor a la PykA de *E. coli* crecida en MM con glucosa, mientras que la actividad de PykF de la cianobacteria fue 40 veces mayor a la de *E. coli*. La alta actividad observada en algunas condiciones de crecimiento implica una gran disponibilidad de piruvato que puede ser utilizado para la biosíntesis de compuestos de interés biotecnológico. De esta manera, tanto los resultados del análisis de secuencias como los de actividad enzimática sugieren la presencia de dos piruvato cinasas diferentes en *Synechocystis* sp. PCC6803, como se ha reportado también en la microalga *Chlorella*.

Con lo que respecta al crecimiento en presencia de luz blanca con glucosa, el crecimiento fue 7 veces mayor que en los cultivos en luz azul con glucosa, difiriendo estos resultados de lo reportado por Anderson y McIntosh (1991), que reportan un crecimiento semejante entre los cultivos en luz blanca y luz azul.

Palabras claves: *Synechocystis* sp. PCC6803, *pyk*F(sll1275), *pyk*F(sll0587) y piruvato cinasa.

ABSTRACT of the Masters of Science project of **YESSICA ARACELI MATAS RUIZ**, to obtain the **MASTER OF SCIENCES** degree in **MARINE BIOTECHNOLOGY**. Ensenada, Baja California, Mexico. May of 2000.

"ROLE OF THE PYRUVATE KINASE ENZYME(S) ON CARBON METABOLISM IN THE CYANOBACTERIA Synechocystis sp. PCC6803"

Abstract aproved by:

Ph D. Elizabeth Ponce Rivas
Thesis Director

Synechocystis sp. PCC6803 is a cyanobacteria the only photoautotrophic microorganism of which genome has been completely sequenced. The analysis done carried out with the cyanobacterial genome sequences and other Genbank sequences, Kaneko *et al* (1997) reported two presumtive genes for the pyruvate kinase enzymes (Pyk). These sequences were denominated *pyk*F (sll1275) and *pyk*F (sll0587) considered to the homologies with the *pyk*F genes of *Bacillus stearothermophilus* (47.4%) and *Agrobacterium vitis* (43.1%), respectively. In this work we studied study the paper of pyruvate kinase enzymes of *Synechocystis* sp. PCC6803.

The alignments were carried aout sequence of with the two pyruvate kinases from different organisms, including the two presuntive *pyk* genes from the cyanobacteria, showed a high conserved sequence conservation in all of them mainly in the active sites of the enzyme and union sites to ions. In particular the protein codified by the gene *pyk*F (sll1275), contains a long C-terminal sequence of 52 amino acids, similar to the C-terminal of *B. stearothermophilus* (Sakai and Ohta, 1993). Due to the similarity observed in these two *pyk*F genes and to the detection of two different Pyk activities, one of them requires AMP like activator (PykA) and the other fructose-1,6-diphosphate (PykF) as in *E. coli*, it is suggested that Pyk codified by *pyk*F (sll1275) may have similar characteristics to the Pyk of *B. stearothermophilus*. The activities detected for the cyanobacteria PykA and PykF enzymes were up to 250 and 40 times higher to the activity reported for the respective enzymes in *E. coli* cultivated in the minimun medium with glucose. The high activity observed in some of the growth conditions suggest a great availability of pyruvate which be used in the biosynthesis of compounds with biotechnological interest. The results analyses of the *pyk* sequences and the enzymatic activity suggest the presence of two different pyruvate kinase in *Synechocystis* sp. PCC6803, as it has been reported in the microalga *Chlorella*.

Growth obtained in the presence of white light with glucose was seven times higher to the growth observed in the blue light cultures with glucose, differing from the reported by Anderson and McIntosh (1991) that observed a similar growth between the white light and blue light cultures.

Key words: *Synechocystis* sp. PCC6803, *pyk*F (sll1275), *pyk*F (sll0587) and pyruvate kinase.

Dedicatoria.

A Dios, gracias por la vida y por ser mi fortaleza.

A mis padres Daniel y Alicia, por su amor y apoyo incondicional durante las diferentes etapas de mi vida.
Gracias por estar siempre a mi lado.
Los quiero.

A mis hermanos, Iván por aguantarnos y Fabiola (en tu memoria) siempre estás en mi corazón.

AGRADECIMIENTOS.

A **CONACyT (I31825-N)** por el apoyo económico durante la realización de la tesis.

Principalmente a la Dra. **Elizabeth Ponce** por su asesoría y la confianza que depósito en mi para la realización de la tesis.

A los miembros del comité:
Dra. **Ma. del Pilar Sánchez S.** por la gran disponibilidad y confianza que me ofreció,
M. en C. **Ma. Enriqueta Muñoz** por sus comentarios y aportaciones para la realización de la tesis y
Dr. **Helmut Maske** por sus revisiones y buena disposición.

Al Dr. **Jorge de la Rosa** por permitirme el uso de equipo del laboratorio.

A la técnica Q.F.B. **Rosalía Contreras** por las cosas aprendí en el laboratorio.

A **Raquel** por darme jalones de orejas y por su amistad desde..... aquellos años.

A **Efrén** por demostrarme que tan grande es su amistad y por estar a mi lado en los momentos más difíciles.

A **Darla** por su amistad .....

A **Chon** por la alivianada que me dio y su amistad.

A todos mis amigos por los días de camping: Alex Campa, Jorge Simental (Tata), Billy, Darla, Gissel, Carmen Copalcúa y Sergio. A Danny por haceme reír y porque aprendí algo de "tópicos selectos". A todos aquellos que hicieron las cosas más fáciles en los momentos de histeria: Gisela, Lore, Leonel, Raúl, Luis (Mochis), Yanet, Carmen, , Xochithllll, César (feo), Alexa, Alejandro, Galdy y por supuesto a mis primeros alumnos de maestría.

A todos mis compañeros del departamento de **Acuicultura** y **Biotecnológia Marina** y por supuesto a todas las secres: Alejandrina, Bibi, Cecy y Marielena.

CONTENIDO.

	Páginas.
I. Introducción.	1
II. Antecedentes.	9
III. Justificación.	14
IV. Objetivos.	
Objetivo General.	16
Objetivos Particulares	16
V. Materiales y Métodos.	
V.1. Análisis Molecular.	17
V.1.1 Análisis de comparación de las secuencias de *pyk*F (sll1275 y (sll0587).	
V.1.2 Análisis de restricción teórico de los genes *pyk.*	17
V.1.3 Extracción de ADN cromosomal de *Synechocystis* sp. PCC 6803	17
V.1.4 Análisis de restricción experimental.	17
4.a) Amplificación de los genes *pyk*F (sll1275 y sll0587) por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	18
4.b) Digestión de los productos de PCR.	20
V.1.5 Clonación de los genes *pyk*F de *Synechocystis* sp. PCC6803 en pUC19.	20
5.a) Digestión de los productos de PCR.	20
5.b) Ensayos de ligación.	21
V.1.6 Técnicas del ADN en *E. coli.*	22
V.2 Análisis Fisiológico.	24
V.2.1 Organismo y condiciones de cultivo.	24
V.2.2 Caracterización de la cepa *Synechocystis* sp. PCC6803.	24
2.a) Cinéticas de crecimiento.	25
2.b) Determinación de proteínas.	25
2.c) Medición de la actividad de la piruvato cinasa en *Synechocystis* sp. PCC 6803.	25
V.2.3 Fórmulas para determinar la actividad específica de piruvato cinasa.	27
V.2.4 Análisis estadístico de los resultados.	27
VI. RESULTADOS.	28
Análisis Molécular.	
VI.1 Análisis de comparación de secuencias de piruvato cinasa.	28
VI.2 Análisis de restricción teórico.	39
VI.3 Extracción ADN cromosomal.	43
VI.4 Análisis de restricción experimental.	44

Análisis Fisiológico.
VI.5 Cinéticas de crecimiento en diferentes condiciones de cultivo. 54
VI.6 Actividad de piruvato cinasa en *Synechocystis* sp. PCC6803. 58
A) Actividad de piruvato cinasa PykA y PykF en presencia de Luz Blanca. 63
B) Actividad de piruvato cinasa PykA y PykF en presencia de Luz Azul. 64
C) Actividad de piruvato cinasa PykA y PykF en completa oscuridad. 66
VII. Discusión. 68
VIII. Conclusiones. 81
Literatura citada. 83

TABLA DE FIGURAS

Figura.		Página.
1	Metabolismo de Pentosas Fosfato en cianobacterias: a) Vía oxidativa y b) Vía reductiva para la fijación del CO_2.	2
2	Principales vías metabólicas del carbono en *Escherichia coli.*	3
3	Ciclo de Acidos Tricarboxílicos en cianobacteria.	4
4	Metabolismo de compuestos derivados del ciclo reductivo de Pentosas fosfato en cianobacterias.	5
5	Biosíntesis de carotenoides a partir de piruvato.	6
6	Porcentajes de similitud de las secuencias de piruvato cinasa entre diferentes grupos de organismos.	31
7	Alineamiento de secuencias de aminoácidos del gen piruvato cinasa.	32
8	Árbol filogenético de 27 secuencias de piruvato cinasa de diferentes fuentes.	38
9	Esquema del análisis de restricción teórico realizado en el programa Dnastar para el gen *pyk*F(sll1275) de *Synechocystis* sp. PCC6803.	40
10	Esquema del análisis de restricción por medio del programa Dnastar del gen *pyk*F(sll0587) de *Synechocystis* sp. PCC6803.	41
11	Esquemas de los dos genes *pyk* de *Synechocystis* sp. PCC6803 con los tamaños de cortes con las enzimas seleccionadas *Eco*RV y *Cla*I.	42
12	ADN cromosomal de *Synechocystis* sp. PCC6803 en gel de agarosa al 1.2%.	43
13	Productos de PCR en gel de agarosa al 1.2%	45
14	Digestión de los productos de PCR.	46
15	ADN plasmídico a partir de las colonias transformadas con pUC19 y los genes *pyk*F de *Synechocystis* sp. PCC6803.	48

Figura.		Página.
16	Amplificación por PCR de los genes *pyk*F(sll0587) y *pyk*F(sll1275) con los oligonucleótidos del grupo II, amplificando un fragmento de 1200 pb.	49
17	Reacción de ligación.	50
18	Análisis de la secuencia proteíca en el programa Dnastar (1994) en la opción Protean del gen *pyk*F(sll1275) y *pyk*F(sll0587) de *Synechocystis* sp. PCC6803, *pyk*A de *B. subtilis* y *pyk*A de *E. coli*.	52
19	Amplificación por PCR con los oligonucleótidos del grupo III en agarosa al 1.2%.	53
20	Valores promedio de la densidad óptica (D.O.) evaluada para cultivos estáticos de *Synechocystis* sp. PCC6803, mantenidos bajo exposición de luz blanca, luz azul y oscuridad. En el medio de cultivo se consideró la adición de glucosa.	55
21	Valores promedio de proteínas evaluadas en diferentes puntos de la curva de crecimiento para cultivos estáticos de *Synechocystis* sp. PCC6803, mantenidos bajo exposición de luz blanca, luz azul y oscuridad. En el medio de cultivo se consideró la adición de glucosa.	56
22	Valores promedio de la actividad específica de PykA en diferentes condiciones evaluada a lo largo de la curva de crecimeinto para cultivos estáticos de *Synechocystis* sp. PCC6803, mantenidos bajo exposición de luz blanca, luz azul y oscuridad. En el medio de cultivo se consideró la adición de glucosa.	61
23	Valores promedio de la actividad específica de PykF en diferentes condiciones evaluada a lo largo de la curva de crecimeinto para cultivos estáticos de *Synechocystis* sp. PCC6803, mantenidos bajo exposición de luz blanca, luz azul y oscuridad. En el medio de cultivo se consideró la adición de glucosa.	61
24	Valores promedio de la actividad específica de PykA y PykF para cultivos estáticos de *Synechocystis* sp. PCC6803, mantenidos bajo exposición de luz blanca sin la adición de glucosa.	63

Figura.		Página.
25	Valores promedio de la actividad específica de PykA y PykF para cultivos estáticos de *Synechocystis* sp. PCC6803, mantenidos bajo exposición de luz blanca con la adición de glucosa.	64
26	Valores promedio de la actividad específica de PykA y PykF para cultivos estáticos de *Synechocystis* sp. PCC6803, mantenidos bajo exposición de luz azul sin la adición de glucosa.	65
27	Valores promedio de la actividad específica de PykA y PykF para cultivos estáticos de *Synechocystis* sp. PCC6803, mantenidos bajo exposición de luz azul con la adición de glucosa.	65
28	Valores promedio de la actividad específica de PykA y PykF para cultivos estáticos de *Synechocystis* sp. PCC6803, mantenidos en completa oscuridad sin la adición de glucosa.	66
30	Valores promedio de la actividad específica de PykA y PykF para cultivos estáticos de *Synechocystis* sp. PCC6803, mantenidos en completa oscuridad con glucosa.	67

LISTA DE TABLAS

Tabla.		Página.
I	Secuencias de los diferentes oligonucleótidos diseñados para la amplificación de cada uno de los genes *pyk*F(sll1275) y *pyk*F(sll0587) de *Synechcystis* sp. PCC6803.	19
II	Enzimas utilizadas para la digestión de los genes *pyk*F amplificados con cada uno de los grupos de oligonucleótidos diseñados.	21
III	Número de células promedio por mL de las diferentes condiciones de crecimiento a lo largo de la cinética de crecimiento de *Synechocystis* sp. PCC6803.	55
IV	Condiciones de las reacciones para determinar la actividad de PK a temperatura ambiente.	59

I. INTRODUCCION.

Las cianobacterias también llamadas "algas azul-verde"son un grupo muy diverso de procariotes Gram (-), capaces de realizar fotosíntesis oxigénica al igual que los cloroplastos de plantas y algas. A diferencia de las bacterias fotosintéticas púrpuras y verdes que utilizan H_2S, las cianobacterias utilizan el H_2O como donador de electrones (Kaneko y Tabita, 1997). En general las cianobacterias son microorganismos fotoautótroficos obligados, aunque algunas cepas pueden crecer heterotróficamente (Patterson, 1996). Sin embargo, estudios realizados en la cianobacteria *Anabaena* sp. utilizando ^{14}C-glucosa mostraron que la vía metabólica preferencial en cianobacterias es la vía de pentosas fosfato (Carr y Whitton, 1982), la cuál funciona como vía oxidativa para el metabolismo de glucosa y como vía reductiva para la fijación del CO_2 (Fig. 1 a y b). Diferenciandolas de otros microorganismos como *Escherichia coli* (*E. coli*) que utilizan principalmente la vía glicolítica, donde el 70% de la Glucosa-6-fosfato es metabolizada por la vía Embden-Meyerhorf-Parnas (EMP) y el otro 30% de glucosa, es metabolizado por la vía de pentosas fosfato (Miller *et al.*, 1987) (Fig. 2).

Los intermediarios C_3 provenientes de la vía pentosas fosfato, son esenciales en la síntesis de diferentes metabolitos. Entre éstos compuestos se encuentran los intermediarios fosfoenolpiruvato y piruvato, los cuáles intervienen en la última reacción de la vía EMP. Por lo tanto, independientemente de la vía metabólica utilizada por los microorganismos (glicólisis o pentosas fosfato) se tiene como último intermediario el piruvato, que es posteriormente catabolizado en la vía TCA (Fig. 3). En cianobacterias el TCA es un ciclo incompleto, ya que no contiene la enzima succinil-CoA sintetasa (Carr *et al.*, 1969). Por lo tanto, este es uno de los puntos de control importantes del metabolismo.

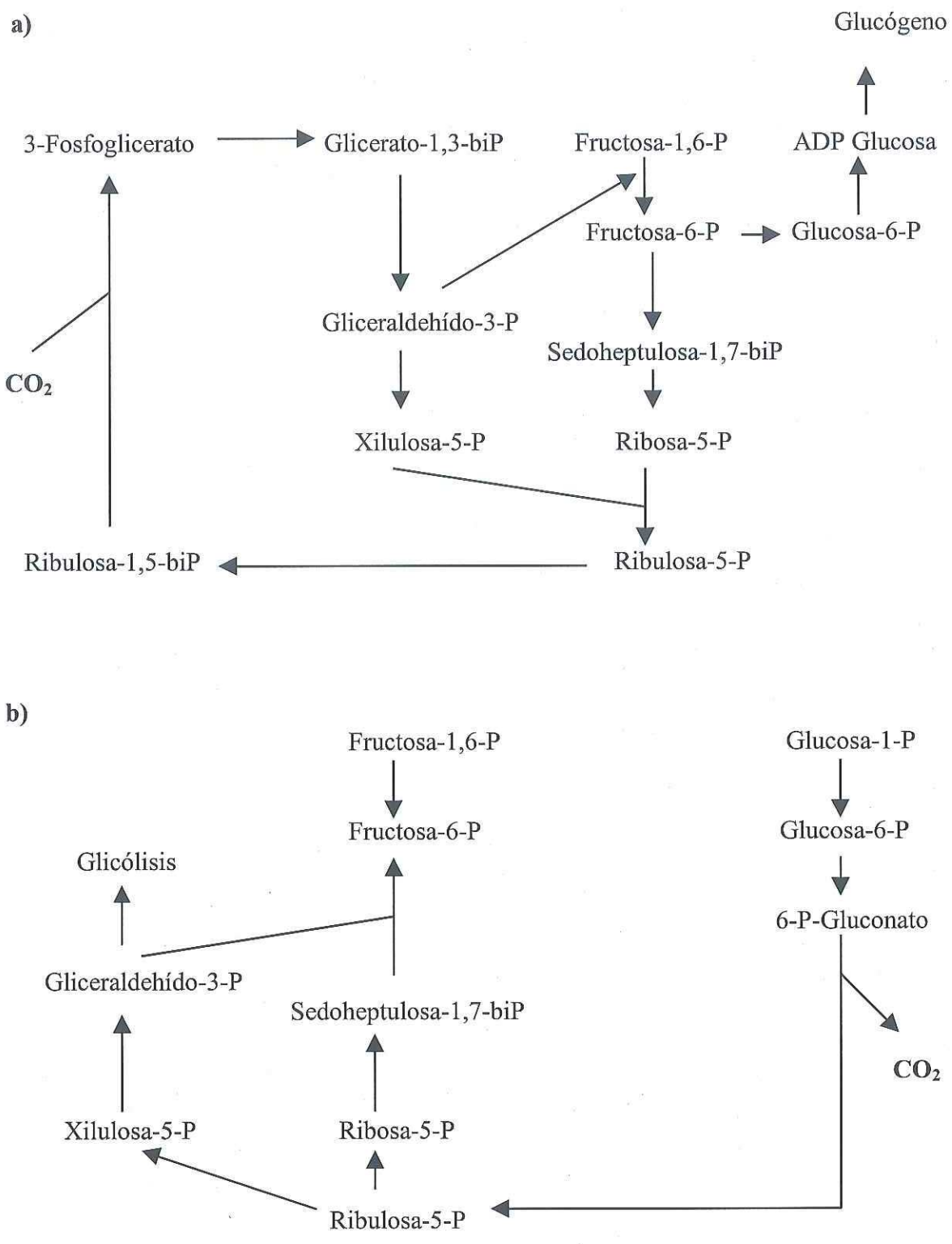


Figura 1. Metabolismo de Pentosas Fosfato en cianobacterias. a) vía Oxidativa y b) vía Reductiva (Carr *et al.,* 1969).

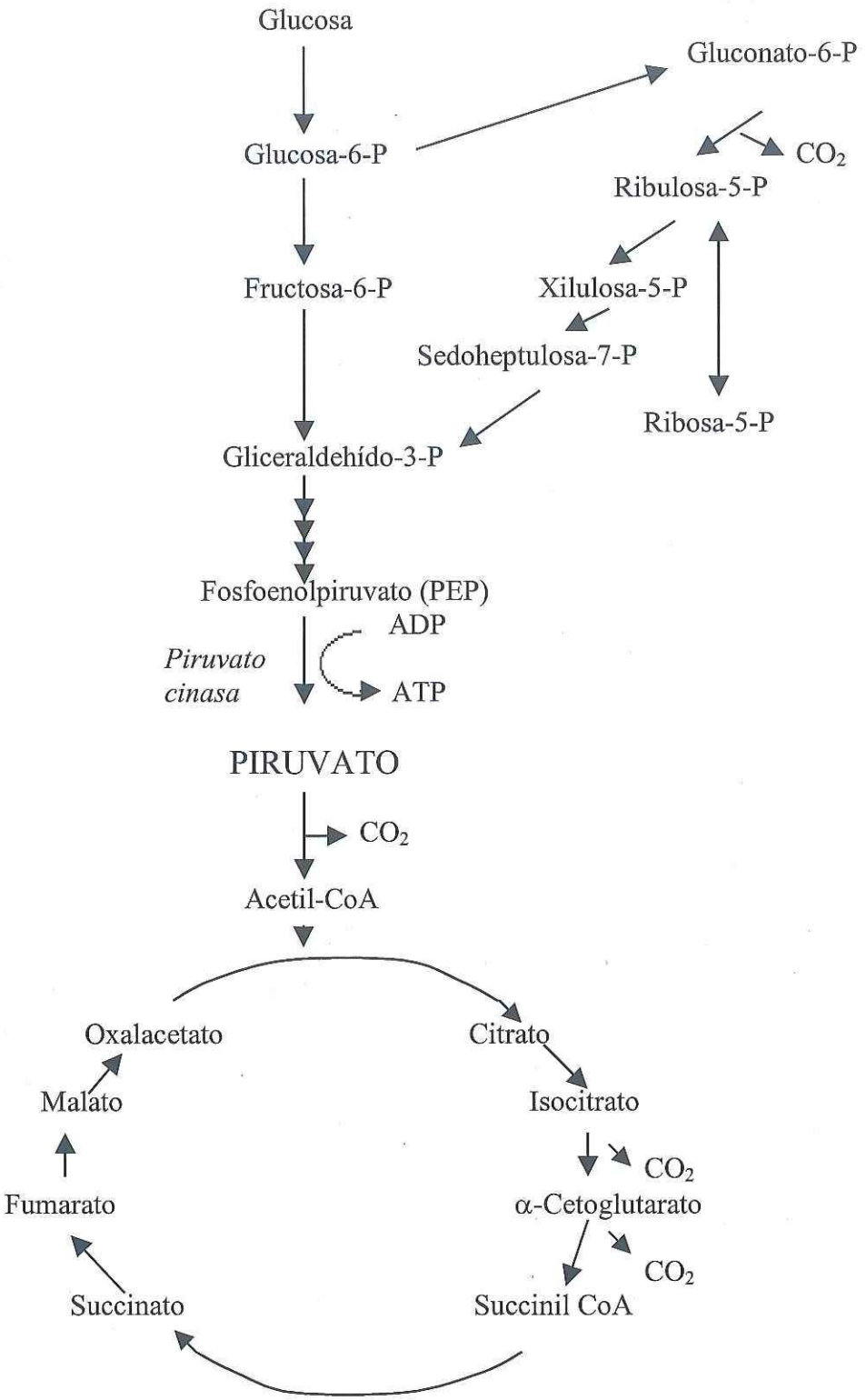


Fig. 2. Principales vías metabólicas del carbono en *Escherichia coli* (Ponce *et al.*, 1995).

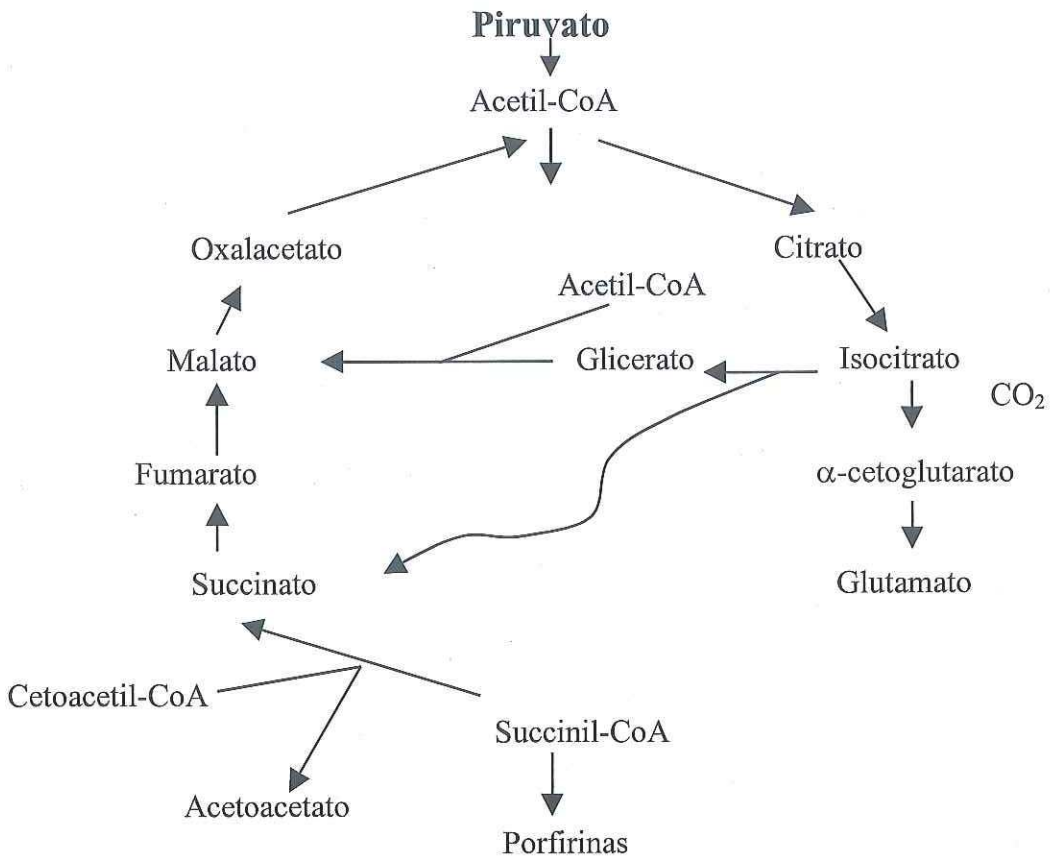


Figura 3. Ciclo de ácidos Tricarboxílicos (TCA) en cianobacterias (Carr *et al.,* 1969).

El piruvato es utilizado tanto en la biosíntesis de aminoácidos como en la generación de energía metabólica, vía TCA (Miller *et al.*, 1987; Valle *et al.*, 1996). Una fuente importante de piruvato es a través de la acción de las enzimas piruvato cinasa (Pyk), las cuáles catalizan la conversión de PEP y ADP a piruvato y ATP, en la etapa final de la vía glicolítica (Kayne, 1973).

La enzima requiere un catión monovalente normalmente K^+ y otro catión bivalente usualmente Mg^{+2} o Mn^{+2} (Mattevi *et al.,* 1995). Además, el piruvato esta involucrado en un gran número de reacciones metabólicas, teniendo gran importancia en la síntesis de

compuestos importantes para la célula como aminoácidos de la familia del ácido glutámico y ácido aspártico y la clorofila (Fig. 4) (Carr y Whitton, 1982), así como de compuestos de interés biotecnológico como los carotenoides (Fig. 5) y el polihidroxibutirato. Los carotenoides han acaparado la atención por sus efectos antioxidantes y su uso como aditivo en dietas para aves y en granjas acuícolas, también han sido utilizados en suplementos alimenticios (Bartley y Scolmik, 1989).

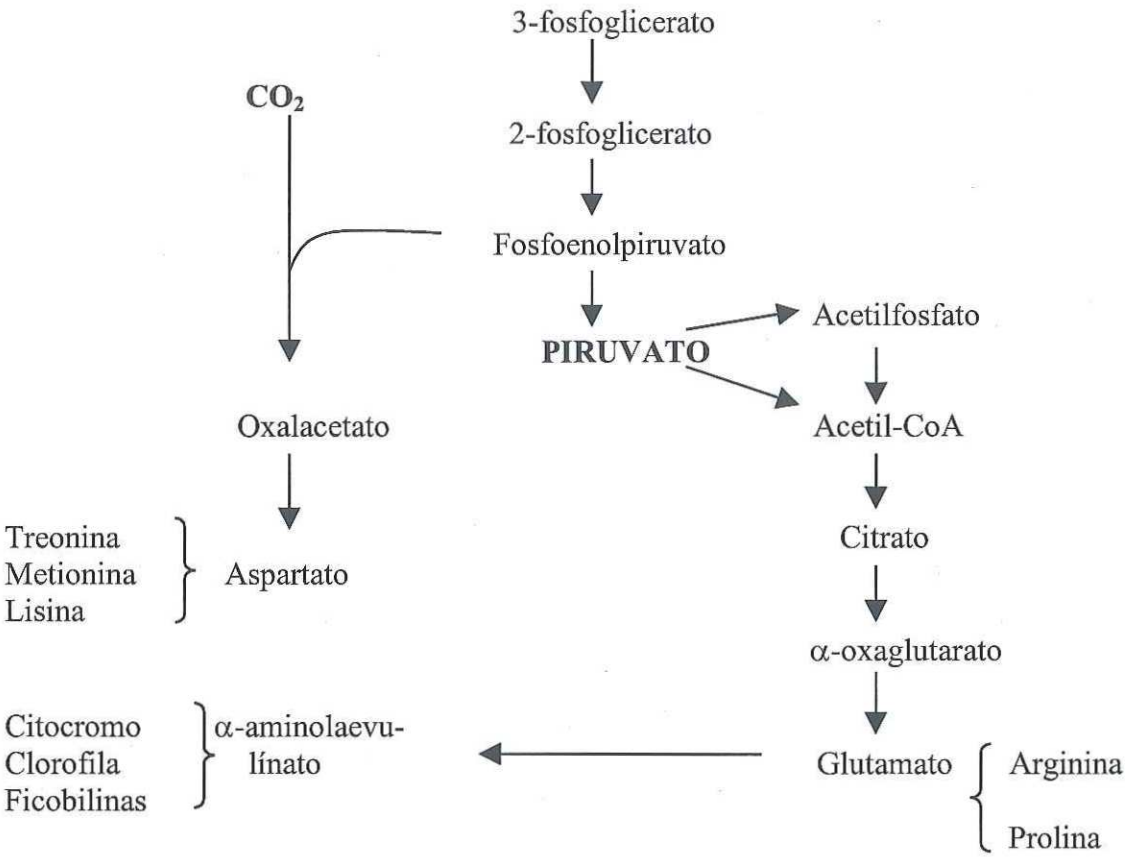


Figura 4. Metabolismo de compuestos derivados del ciclo reductivo de pentosas-fosfato en cianobacterias (Carr y Whitton, 1982).

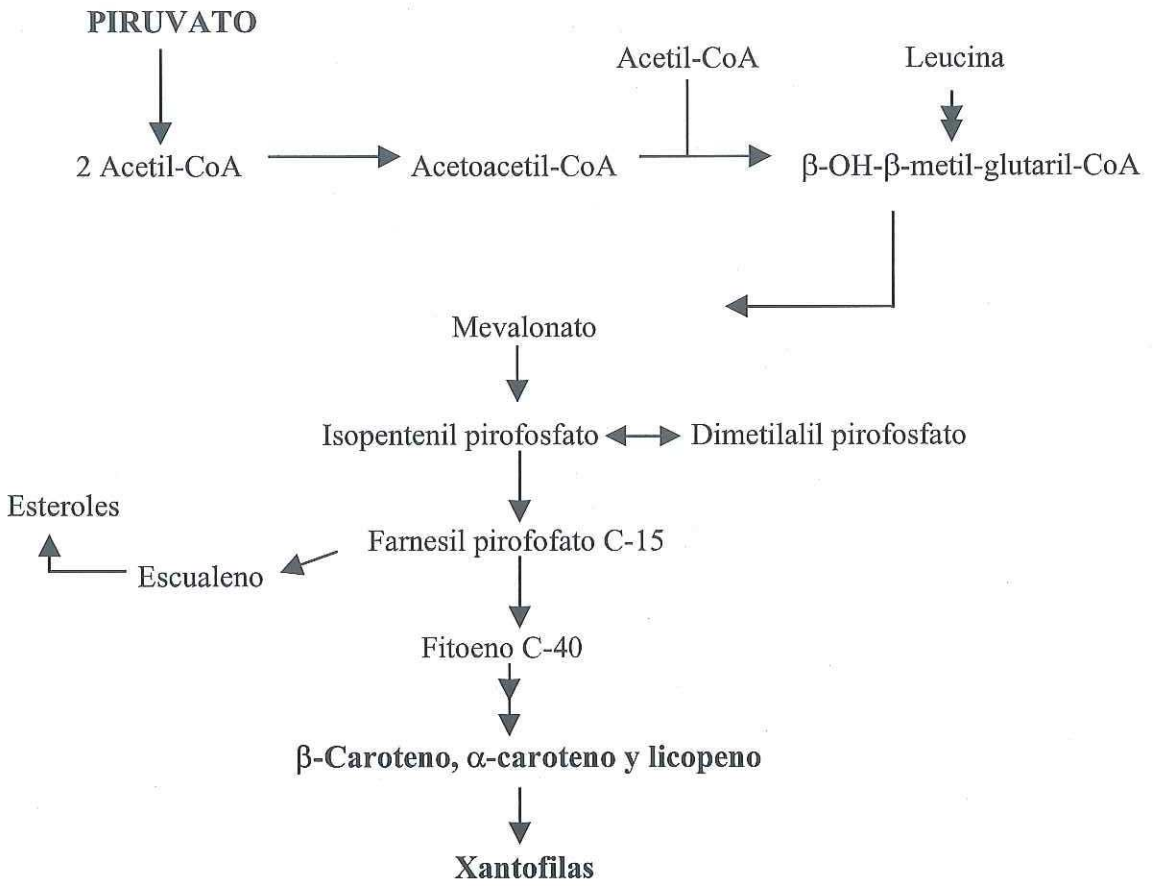


Figura 5. Biosíntesis de carotenoides a partir de Piruvato.

La mayoría de las especies bacterianas tienen una sola enzima de Pyk pero las enterobacterias (*E. coli* y *Salmonella typhimurium*) presentan 2 isoenzimas denominadas piruvato cinasa tipo I que es codificada por el gen *Pyk*F y piruvato cinasa tipo II que es codificada por el gen *Pyk*A (Mattevi *et al.,* 1995). Estas isoenzimas de *E. coli* son homotróficamente activadas por el fosfoenolpiruvato (PEP). En adición el tipo I es heterotróficamente activada por fructosa-1,6-bisfosfato e inhibida por ATP y la isoenzima tipo II es activada por AMP y azúcares monofosfatos como ribosa-5-fosfato (Malcovati *et al.,* 1973; Mattevi *et al.,* 1995).

En *Saccharomyces cerevisiae* existen dos genes de piruvato cinasa los cuáles se denominan *pyk*1 y *pyk*2. La isoenzima Pyk1 es activada por fructosa-1,6-bifosfato y Pyk2 es insensible a éste efector (Boles *et al.,* 1998), pero su expresión está sujeta a represión por glucosa (Boles *et al.,* 1997).

En el caso de mamíferos se han encontrado cuatro isoenzimas diferentes de Pyk, la isoenzima M_1, que esta presente en el músculo esquelético y que es diferente de las otras tres formas en sus propiedades enzimáticas, ya que no presenta regulación alostérica (Noguchi *et al.,* 1986). La isoenzima M_2 se encuentra en tejido adiposo, riñón y pulmones, la L en hígado y R en eritrocitos. Estas cuatro isoenzimas tienen propiedades cinéticas diferentes reflejando los distintos requerimientos metabólicos de los tejidos en los cuales se expresan preferencialmente, es decir, que son reguladas de manera tejido-específico (Muirhead *et al.,* 1986).

La expresión de las isoenzimas Pyk en mamíferos es de particular interés, ya que M_1 y M_2 son codificadas por un solo gen a partir del cual se generan dos diferentes RNAm por empalme diferencial (Consler *et al.,* 1989). Análogamente, las isoenzimas L y R, son codificadas por el gen L dando dos RNAm (Muirhead *et al.,* 1986; Noguchi *et al.,* 1986).

Hasta la fecha se ha determinado la estructura tridimensional de Pyk en la forma no alostérica del músculo de gato M1, en la Pyk del músculo de conejo y en la Pyk tipo I de *E. coli* (Mattevi *et al.,* 1995). Asimismo, se cuenta con las estructuras de *Saccharomyces cerevisiae* (Burke *et al.*, 1983), *Trypanoplasma borelli* (Ernest *et al.*, 1994), *Tripanosoma brucei* (Ernest *et al.,* 1998), *Nicotiana tabacum* y *Leishmania mexicana* (Blakeley *et al.*, 1995).

Un interés adicional para el estudio de las piruvato cinasas surge de su variabilidad en el eritrocito humano. Así, la deficiencia de la piruvato cinasa en el eritrocito es la causa

más común de la anemia hemolítica hereditaria no esferocítica (Kayne, 1973).

La piruvato cinasa es usualmente un homotetrámero con aproximadamente 500 aminoácidos por subunidad, que ha sido aislada en diferentes organismos tanto en procariotes como en organismos superiores (músculo de gato, músculo de pollo, hígado de rata). A diferencia de lo anterior en *Schizosaccharomyces pombe* y *Zymomonas mobilis* aparentemente son homodímeros y no son reguladas alostéricamente por la activación de azúcares fosfato (Steiner *et al.,* 1998).

La Pyk, además, suele tener otras funciones adicionales en *E. coli* como: la actividad de ATPasa dependiente de ATP, la de proveer nucleótidos trifosfato bajo ciertas condiciones anaeróbicas en adición a la formación de piruvato, tanto en *E. coli* como en *Pseudomonas aeruginosa* (Saeki *et al.*, 1974). Asimismo, es capaz de llevar a cabo la fosforilación de glicolato dependiente de ATP y la descarboxilación del oxalacetato en el músculo del bacalao (Kayne, 1973; Creighton y Rose, 1976).

II. ANTECEDENTES.

Aunque las cianobacterias constituyen una inmensa fuente de metabolitos únicos, solo algunas han sido estudiadas intensamente o explotadas comercialmente. La mayoría de los trabajos realizados en cianobacterias han estado dirigidos o enfocados principalmente a estudios sobre la fotosíntesis o la fijación de nitrógeno por lo que existen muy pocos trabajos sobre el metabolismo del carbono (Patterson, 1996).

Solo pocas especies han sido estudiadas biotecnológicamente, ya que solo en ciertas especies es posible llevar a cabo manipulaciones genéticas utilizando transformación integrativa o plásmidos de replicación autónoma (Ferino y Chauvat, 1989). Un ejemplo claro de las especies mas utilizadas con estos fines son las cianobacterias unicelulares *Synechococcus* sp. PCC7942 y *Synechocystis* sp. PCC6803 que son transformables naturalmente con ADN exógeno (competentes naturales). Además, la cianobacteria *Synechocystis* sp. PCC6803 es capaz de crecer fotoheterotróficamente en presencia de glucosa, también se ha visto que aparte de crecer en luz blanca también puede crecer en presencia de luz azul, activando su metabolismo heterotrófico y la división celular (Anderson y McIntosh, 1991).

Su mayor punto de regulación en el flujo del carbono se lleva a cabo a nivel de la glucosa-fosfato-deshidrogenasa mediante la inhibición por $NADP^+$, ribulosa-1,5-bifosfato dentro del ciclo oxidativo de pentosas fosfato (Anderson y McIntosh, 1991).

El genoma de *Synechocystis* sp. PCC6803, ya ha sido completamente secuenciado (Kaneko *et al.*, 1996), siendo el primer reporte del genoma de un organismo fotoautotrófico. Este se encuentra depositado en el banco CianoBase (Kaneko y Tabita, 1997).

Al realizar un análisis de las secuencias del genoma de *Synechocystis* sp., en busca del gen que pudiera ser el potencialmente codificará para la enzima piruvato cinasa, se observó que hay dos secuencias que tienen homología con el gene *pyk*F, uno con Pyk de *Bacillus stearothermophilus* y el otro con Pyk de *Agrobacterium vitis*, denominados en la cianobacteria como *pyk*F (sll1275) y *pyk*F (sll0587), respectivamente (Kaneko *et al.,* 1996).

Un análisis de la secuencia de su genoma contra las bases de datos disponibles realizado por el grupo de Kaneko y Tabita (1997) mostró que 3,168 genes potencialmente codifican para proteínas, siendo que solo el 4.6% de su genoma ha sido clonado y el 39.6% presenta similitud con genes reportados para otros microorganismos. El 45.0% no presenta similitud aparente con ninguno de los genes registrados en los bancos de secuencias.

En otras cianobacterias como *Synechococcus* sp. PCC 7942 (*Anacystis nidulans* R2) y *Anabaena* sp se han estudiado algunos genes involucrados en el metabolismo del carbono. Por ejemplos el gen *rbc* que codifican para la ribulosa-6-bifosfato carboxilasa, el gen *ccm* que es una proteína encargada del transporte del carbón inorgánico, el gen *ndh*B que codifica para la NADH deshidrogenasa y el gen *rca* que codifica para la ribulosa-1,5-bifosfato activasa (Gibson y Tabita, 1996). En *Synechocystis* sp. PCC 7942, se ha clonado y secuenciado el gen *gnd* que codifica para la gluconato-6-fosfato deshidrogenasa (Broedel y Richard, 1990). Asimismo, se ha realizado la caracterización del gen *zwf* que codifica para la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Scanlan *et al.,* 1995) así como del gen *ppc* que codifica para la fosfoenolpiruvato carboxilasa (Kodaki *et al.,* 1985) en *Nostoc* sp. ATCC 29133.

En *Anabaena* sp. PCC 7120 se ha sobreproducido el gen que codifica para la ribulosa-bifosfato carboxilasa/oxidasa en *E. coli* y se ha llevado a cabo la clonación, secuenciación y sobreexpresión de éste mismo gen en una cianobacteria termofílica

(Noguchi *et al.,* 1986). También se ha clonado el gen *nar*C (nitrato reductasa) por medio de ensayos de complementación en *E. coli* (Kuhlemeier *et al.,* 1984), así como la clonación del gen *cya* que codifica para la adenilato ciclasa en *Anabaena cylindrica* (Katayama *et al.,* 1995) y la clonación y expresión del gen que codifica para ADP-glucosa-pirofosforilasa en *Anabaena* sp. PCC 7120 (Charng, 1992).

Particularmente, en *Synechocystis* sp. PCC 6803 se han estudiado algunos genes que intervienen en el metabolismo. Entre los genes que han sido clonados se encuentran el gen *gdh*A que codifica para NADP-glutamato deshidrogenasa (Chávez *et al.,* 1995) y el gen *tal* que codifica para la transaldolasa, la cuál es una enzima de la vía oxidativa de las pentosas fosfato y que tiene una identidad del 78% con las transaldolasas de *E. coli* (Kohler *et al.,* 1996). En el gen *btp*A que codifica para la sacarosa fosfato sintasa ya ha sido clonado, secuenciado y expresado, teniendo como relevancia que es el primer gen que se ha identificado y caracterizado en procariotes (Curatti *et al.,* 1998).

La glucosa exógena que es metabolizada en la cianobacteria *A. variabilis* contribuye en un 46 % del peso seco total. Esta cianobacteria es la única en la que se tiene reportado un procedimiento para determinar la actividad de la enzima piruvato cinasa. La Pyk detectada es activada por fructosa-1,6-fosfato (F1,6F) y no tiene comportamiento sigmoidal como la Pyk de *E. coli*. La enzima es similarmente activada por fructosa-6-fosfato, glucosa-6-fosfato y citrato. Esto confirma la presencia de ésta enzima en cianobacterias (Pearce y Carr, 1969).

Se han llevado a cabo otros estudios en los genes de piruvato cinasa en otros microorganismos. Entre ellos destacan los estudios de clonación del gen *pyk*A y *pyk*F de *E. coli,* donde además se han construido y analizado las cepas mutantes en el ADN cromosomal con uno o ambos genes de Pyk interrumpidos por medio de marcadores de

resistencia a antibióticos (Ponce *et al.,* 1995). En cuanto a su papel en la formación de piruvato, crecimiento celular y consumo de glucosa, se ha demostrado que bajo ciertas condiciones (medio mínimo con glucosa), la mutante en uno de los genes *pyk* no tiene efectos en el crecimiento celular y en el consumo de glucosa. Sin embargo, la doble mutación *pyk*A*pyk*F provoca una disminución en el consumo de glucosa y producción de ácido acético. Esto es importante debido a que los cultivos de *E. coli* pueden ser mejorados por la reducción de la acumulación de acetato (Ponce, 1996), ya que este es un potente inhibidor del crecimiento celular de *E. coli.* Además, se sugiere que en la presencia de glucosa la Pyk tipo I parecería tener un papel más importante en la síntesis de piruvato que la Pyk tipo II (Ponce *et al.,* 1995).

Los análisis enzimáticos, tanto para PykA y PykF mostraron valores muy similares de actividad específica a lo largo de toda la curva de crecimiento. Sin embargo, la actividad específica para la enzima PykF de la cepa silvestre fue 15 veces mayor que lo obtenida para la isoenzima PykA al utilizar medio mínimo con glucosa como única fuente de carbono.

Las cepas con mutaciones en los genes *pyk* muestran velocidades de crecimiento menores a las cepas silvestres, sin embargo todas llegan a una densidad óptica final muy similar, lo que mostró que la cepa silvestre de *E. coli* requiere de ambas piruvato cinasas para alcanzar las máximas velocidades de crecimiento, por lo que ambas enzimas parecen jugar un papel importante en el metabolismo del carbono. Por otro lado, los estudios realizados por Ponce, *et al.* (1995) mostraron que las mutantes en PykA, PykF en combinación con *pts* no presentan producción de acetato.

En otros microorganismos como *Corynebacterium lactofermentum* también se ha clonado e inactivado el gen *pyk* por mutagénesis específica y complementación (Gubler *et*

al., 1994). Es importante notar que los mutantes en piruvato cinasa aisladas en éste organismo al igual que en *E. coli,* presentan la característica de ser incapaces de crecer en medio mínimo que contiene ribosa como única fuente de carbono.

En *Bacillus subtilis,* se realizó la interrupción del gen de la enzima piruvato cinasa (*pyk*A) por la inserción de un marcador de antibióticos a nivel cromosomal. La clonación de éste gen, se llevó a cabo por la complementación en la cepa de *E. coli* mutante en piruvato cinasa, con una biblioteca genómica de *B. subtilis* (Muñoz *et al.*, 1997).

Además se han identificado dos formas diferentes de la Pyk en los plastidos de R*icinus communis* (ricino) y *Nicotiana tabacum* (tabaco) denominadas como PK_pA y PK_pG. En *R. communis* los genes son codificadas por un solo gen y se expresan en endosperma de la semilla en germinación y en desarrollo, así como en la raíz pero no se encuentra presente en la hoja. En *N. tabacum* ambas formas son expresadas en semillas en desarrollo pero no en tejidos maduros y son codificadas por genes diferentes (Blakeley *et al.*, 1995).

III. JUSTIFICACIÓN.

La mayoría de los estudios que se han realizado a la fecha en cianobacterias han estado dirigidos hacia la fotosíntesis y la asimilación de nitrógeno. Por lo tanto, existen pocos reportes sobre el estudio de genes del metabolismo del carbono en cianobacterias, y los pocos que hay se han realizado principalmente en las cianobacterias *Synechococcus* sp. PCC 7942 y *Anabaena* sp. El estudio de genes que codifican para las enzimas claves, como el gen que codifica para la piruvato cinasa son importantes ya que esta enzima controla el flujo del carbono hacia otras vías metabólicas, dado que el piruvato es el último intermediario de las vías básicas del metabolismo, y es utilizado para la síntesis de aminoácidos y otros intermediarios metabólicos. También este es un punto importante de formación de energía.

La cianobacteria *Synechocystis* sp. PCC 6803 cuenta con la facilidad de transformación y crecimiento heterotrófico en presencia de glucosa, dando la posibilidad de llevar a cabo estudios en oscuridad, aparte de la presencia de luz y utilizar una fuente de carbono adicional. Además ya se han desarrollado metodologías moleculares para facilitar el estudio de genes y se cuenta con plásmidos para llevar a cabo la manipulación del ADN en ésta cianobacteria. Además es la única cianobacteria de la que se ha secuenciado todo su ADN genómico.

La mayoría de los genes de esta cianobacteria que son potenciales para codificar proteínas funcionales, han sido determinadas únicamente por homologías con secuencias de genes conocidos de otros microorganismos.

En este sentido este proyecto pretende determinar si las dos secuencias potenciales de codificar para la enzima de piruvato cinasa, realmente codifican para estas enzimas como lo sugieren el análisis de secuencias del genoma de esta cianobacteria.

De encontrarse que los dos genes codificaran para la piruvato cinasa en éste microorganismo, sería el primer ejemplo de un microorganismo fotótrofo que presenta más de un gen de piruvato cinasa.

IV. OBJETIVOS.

IV.1. OBJETIVO GENERAL:

Estudiar el papel de la enzima(s) piruvato cinasa de *Synechocystis* sp. PCC 6803 en el metabolismo celular.

IV.2. OBJETIVOS PARTICULARES:

1) Llevar a cabo el análisis de las secuencias de genes de piruvato cinasa (Pyk) depositados en bancos de datos.
2) Clonar los genes potenciales de Pyk de *Synechocystis* sp. PCC 6803.
3) Implementar la metodología de medición de la actividad de la enzima Pyk para *Synechocystis* sp. PCC 6803.
4) Determinar la actividad de Pyk en cultivos de la cianobacteria realizados en diferentes condiciones de crecimiento.

V. MATERIALES Y MÉTODOS.

V.1 ANÁLISIS MOLECULAR.

1) Análisis de comparación de las secuencias de *pyk*F (sll1275 y sll0587). Este análisis se realizó con el propósito de determinar el grado de similitud existente entre las piruvato cinasas de *Synechocystis* sp. PCC 6803 con la de otros organismos. Diversas secuencias de Pyk como las de *E. coli, H. sapiens* y *N. tabacum* se obtuvieron de bancos de datos como el GenBank. A partir del banco CyanoBase (www.kazusa.or.jp), se obtuvieron las secuencias de los dos genes que potencialmente codifican para *pyk* de *Synechocystis* sp. PCC 6803. Las secuencias de aminoácidos obtenidas se alinearon entre sí utilizando el programa Megaling del Dnastar. El filtro utilizado para los alineamientos fue PAM250. A partir de éstas misma secuencias se realizó un análisis filogenético utilizando el mismo paquete de computo.

2) Análisis de restricción teórico de los genes de *pyk*. Las secuencias de los genes que potencialmente podrían codificar para *pyk*F(sll1275) y *pyk*F(sll10587), se obtuvieron del banco de genes CyanoBase. Estas se importaron al programa Dnastar, para realizar el análisis de restricción teórico. A partir de la lista de las enzimas de restricción y los sitios de corte para cada uno de los genes, se seleccionaron las enzimas a utilizar para el análisis experimental.

3) Extracción de ADN cromosomal de *Synechocystis sp.* PCC 6803. Se siguió la metodología descrita por el laboratorio la Dra. Golden para esta especie (comunicación personal). Se tomaron 10 ml de cultivo en medio BG11 con una densidad óptica de 0.25 (Abs 730nm). Sé resuspendieron en 500 µl del buffer SE (0.125 M de NaCl, 0.05 M de

EDTA pH 8). Después se centrifugó por 5 min a 14,000 rpm y se resuspendió en 340 µl del Buffer de Lisis (25% de sacarosa, 50 mM de Tris, 100 mM de EDTA pH 8) y 5 µl de lisozima (2 mg/ml). Se dejó incubar a 37°C por 1 hr. Después se adicionaron 8 µl de Sarcosil al 25% y 2 µl de proteínasa K (10mg/mL), se incubó a 55°C por 30 min. Se adicionaron 55 µl de NaCl 5 M y 45 µl de CTAB al 10%, y se dejó incubar a 65°C por 10 min. Después se lavó con 500 µl de cloroformo/alcohol isoamílico 24:1 y se centrifugó por 5 min a 14,000 rpm. La fase acuosa se transfirió a otro tubo con 500 µl de fenol y se realizó una segunda extracción con el cloroformo/alcohol isoamílico. Posteriormente se adicionó 5 µl de RNAsa y se dejó incubar a 37°C por 30 min, precipitando con 2 volúmenes de etanol absoluto. Por último se lavó con etanol al 70%, se secó en el VACUFAGUE durante 15 min a 30°C y se resuspendió en 50 µl de buffer TE (10 mM de Tris.Cl, pH 7.4 y 1 mM de EDTA, pH 8.0).

4) Análisis de restricción experimental. Este análisis se llevó a cabo a partir de los productos de PCR. Los pasos a seguir para este proceso se describen a continuación:

4.a) Amplificación de los genes *pyk*F (sll1275 y sll0587) por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Diseño de los oligonucleótidos (primers) para PCR. Los oligonucleótidos que se utilizaron para amplificar cada uno de los genes *pyk*F fueron diseñados a partir de las secuencias depositadas en CyanoBase. Los oligos del grupo I (tabla I), se diseñaron de tal manera que al amplificar las secuencias de los genes *pyk* quedaran en fase de lectura con el gen de *Lac*Z del plásmido pUC19 (Biolabs 96-97).

Tabla I. Secuencias de los diferentes oligonucleótidos diseñados para la amplificación de cada uno de los genes *pyk*Fsll1275 y *pyk*F(sll0587) de *Synechocystis* sp. PCC6803.

GRUPO	NOMBRE	SECUENCIAS (5'-3')*	CARACTERISTICAS
I	E275F-REV	GGA-ATT-CCA-CCA-ACC-AGG-CTA-GAA-TGG	Amplifican el gen ***pyk*F(sll1275)** completo. Fragmento de 2047 pb
	HIND275F-FOR	CCC-AAG-CTT-TAT-GCA-AAC-GTC-TCC-CCT-TC	
	BAM587-REV	CGG-GAT-CCC-GCA-TAA-TCC-CTA-ACA-AAG-CGG	Amplifican el gen ***pyk*F(sll0587)** completo. Fragmento de 1500 pb
	HIND587-FOR	CCC-AAG-CTT-AGT-GCC-AGC-CCT-GAT-TAA-CC	
II	HB275FOR	CCC-AAG-CTT-GGT-GGA-GGA-AGT-GGA-CAC-TG	Oligonucleótidos internos para ambos genes Pyk. Fragmento de 1200 pb
	EB275REV	GGA-ATT-CAA-CCC-ACA-ATG-ACC-GGC-ACC	
	HB587FOR	CCC-AAG-CTT-GCA-TGA-ATG-TGG-CCC-GGC-TG	
	EB587REV	GGA-ATT-CTC-CCG-CAG-TAG-TAC-CTC-CGC	
III	E275F-FOR	GGA-ATT-CTC-CCA-AGC-GGA-AGC-CAG-TC	Amplifican a PykF(sll1275) a partir de 1038 pb a 2058 pb. Fragmento de1010 pb
	E275F-REV	GGA-ATT-CGC-CAT-GCG-CCC-CAC-CAA-C	
	E587F-FOR	GGA-ATT-CCT-GAT-CTG-CCG-GTC-ATT-GC	Amplifican a Pyk(sll0587) a partir de 676 pb a 1500 pb. Fragmento 824 pb
	E587F-REV	GGA-AAT-CGC-ATA-CCT-AAC-AAA-GCG-G	

* La Tm de los oligonucleótidos fue calculada con la fórmula: 2X(A+T) + 4X(C+G)

En el extremo 5' y 3'contienen secuencias que son reconocidas por las enzimas de restricción *Eco*R I, *Hind* III o *Bam* HI. Estos sitios de restricción permiten clonar más fácilmente los productos de PCR en vectores de clonación. Además se realizaron diferentes diseños de oligonucleótidos para llevar a cabo varios ensayos de clonación, grupo II y III de oligos (Tabla I).

Amplificación por PCR. Ambos genes fueron amplificados a partir del ADN cromosomal de *Synechocystis* sp. PCC 6803, el cual se utilizó como templado. Después

del paso de desnaturalización inicial a 94°C por 5 min, se llevaron a cabo 30 ciclos de amplificación. Las temperaturas y períodos de tiempo usados en cada ciclo fueron los siguientes: 94°C por 30 seg, 60°C por 30 seg y 72°C por 2.30 min y un solo ciclo a 72°C por 10 min. El contenido de la reacción fue: 37.75 µl de agua, 5 µl del buffer 10X, 1 µl de dNTP's, 0.5 µl de los oligonucleótidos en una reacción final de 50 µl. Los productos de PCR se corrieron en un gel de electroforesis al 1.2% tomando 5 µl de ADN de un volumen total de 50 µl y posteriormente se purificaron por el método fenol:cloroformo reportado en Sambrook, *et al.* (1989).

4.b) Digestión de los productos de PCR. Para la digestión de los productos de PCR amplificados con los oligos del grupo I, se utilizaron 5 µl para cada uno de los productos de PCR, 2 U de la enzima *Eco*R V para el caso de la *pyk*F sll1275 y 5 U de la enzima *Cla* I para la *pyk*F sll0587. La reacción final fue de 20 µl. La incubación se llevó a cabo a 37°C por 1.30 hrs. Posteriormente los 20 µl fueron corridos electroforéticamente en un gel de agarosa al 1.2%.

5) Clonación de los genes *pyk*F de *Synechocystis* sp. PCC6803 en pUC19. Para llevar a cabo la clonación de los genes *pyk* que potencialmente podrían codificar para la enzima piruvato cinasa dentro del sitio de clonación múltiple del plásmido pUC19 (BioLabs, 96-97), se utilizaron los productos de PCR amplificados con los oligos presentes en la tabla I que fueron purificados por el método fenol:cloroformo reportado en Sambrook *et al.* (1989). La clonación se realizó por separado para cada uno de los genes *pyk* y para ello se llevaron a cabo los siguientes procedimientos:

5.a) Digestión de los productos de PCR. Se realizó la digestión preparativa para cada uno de los productos de PCR bajo la siguiente reacción: 100 µl de agua, 16 µl del

Buffer, 40 µl del plásmido pUC19 y 2 µl de las enzimas correspondientes en un volumen total de 160 µl. La digestión se llevo a cabo por 3 hrs a 37°C. Las enzimas utilizadas se muestran en la tabla II.

Tabla II. Enzimas utilizadas para la digestión de los genes *pyk*F amplificados con cada uno de los grupos de oligonucleótidos diseñados.

Oligos	Gen	Enzimas
I	sll1275	*Eco* RI *Hind* III
	sll0587	*Bam* HI *Hind* III
II	sll1275	*Eco* RI *Hind* III
	sll0587	
III	sll1275	*Eco* RI
	sll0587	

La digestión se realizó en un gel preparativo de agarosa al 1.2%, después se cortaron los fragmentos con los tamaños correspondientes a las amplificaciones por PCR bajo luz UV (tabla I) y se purificaron por el método de fenol congelado (Sambrook *et al.*, 1989).

5.b) Ensayos de ligación. Una vez purificados los fragmentos digeridos, se llevaron a cabo los ensayos de ligación con el plásmido pUC19, el cuál fue previamente linealizado, es decir, fue digerido con las mismas enzimas que se utilizaron para los productos de PCR que corresponden a los genes *pyk*. Para llevar a cabo las ligaciones se realizaron las siguientes reacciones:

a) Para el gen *pyk*F(sll1275):

	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4
pUC19	3 µl	3 µl	2 µl	2 µl
pykF 1275	4 µl	-	-	-
Buf. Ligasa	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
H_2O	10 µl	14 µl	16 µl	15 µl
Ligasa	1 µl	1 µl	-	1 µl
	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl

b) Para el gen *pyk*F(sll0587):

	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4
pUC19	3 µl	3 µl	2 µl	2 µl
pykF 0587	8 µl	-	-	-
Buf. Ligasa	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
H_2O	6 µl	14 µl	16 µl	15 µl
Ligasa	1 µl	1 µl	-	1 µl
	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl

Las reacciones se incubaron durante toda la noche a 16°C. Cada una de las reacciones anteriores se purificaron, precipitaron y resuspendieron en 20 µl de agua destilada (Sambrook *et al.*, 1989).

6) Técnicas del ADN en *E. coli*. Según lo reportado por Sambrook *et al.* (1989), se llevó a cabo la tranformación con los 20 µl de la reacción de ligación en 50 µl de células competentes de *E. coli* JM101 preparados según la metodología de Ausbel *et al.*, 1992. Después se platearon en medio de cultivo LB (1 gr de Triptona, 0.5 gr de extracto de levadura, 1 gr de NaCl), agar al 1.5%. Debido a que el plásmido pUC19 (Biolabs, 96-97) contiene al gen *lac*Z y el gen de resistencia a ampicilina se le adicionó al medio de cultivo sólido 20 mg/mL de Ampicilina, 20 mg/mL de X-Galactosidasa y 10 mg/mL de IPTG

(isopropil β-D-tiogalactopiranosidasa) para poder seleccionar colonias por color (blanco o azul) y por resistencia al antibiótico. Algunas de estas colonias se seleccionaron para continuar con la purificación plasmídica. El ADN plásmidico fue digerido bajo las mismas condiciones mostradas en la sección 5.a.

V.2 ANÁLISIS FISIOLÓGICO.

1) Organismo y condiciones de cultivo. Se utilizó la cianobacteria unicelular *Synechocystis* sp. PCC 6803. El crecimiento se realizó en matraces de 1 Lt con 900 mL de medio de cultivo BG11 por triplicado en cada una de las diferentes condiciones de crecimiento que fueron con y sin glucosa al 5 mM en presencia de luz blanca fría, luz azul o en oscuridad. Los cultivos se mantuvieron a una T° de 25°C. El medio BG11 contiene por litro: 1 mg de EDTA, 6 mg de ácido cítrico, 1500 mg de $NaNO_3$, 40 mg de K_2HPO_4, 75 mg de $MgSO_4.3H_2O$, 36 mg de $CaCl_2.2H_2O$, 20 mg de $Na_2CO_3.H_2O$, 6 mg de citrato de amonio férrico. Micronutrientes por litro: 2.86 g de H_3BO_3, $MnCl_2$. 0.39 g de $4H_2O$, 0.049 g de $Co(NO_3)_2.6H_2O$ y pH 7.4 (Allen, 1968). La iluminación fue con luz blanca por medio de lámparas de luz fluorescente (50 $\mu E \cdot s^{-1} \cdot m^{-2}$); con fotoperíodo (ciclos de 12 hrs de oscuridad y 12 hrs de luz), y también se utilizaron lámparas fluorescentes de irradiación azul, General Electric Blue-green F40B (pico de emisión de 440 nm). En el caso de la luz azul, se utilizó un matraz expuesto una semana antes bajo éste tipo de luz, el cuál fue utilizado para inocular a los matraces experimentales a una densidad óptica de 0.05 (Abs 730 nm). La D.O. de 0.05 fue a la que iniciaron todos los cultivos. Los cultivos con luz azul recibieron la misma intensidad de luz que los cultivos con luz blanca. Las distancias de los matraces fueron ajustados de manera que se tuviera la misma irradiación total (50 $\mu E \cdot s^{-1} \cdot m^{-2}$), la cuál fue medida al centro de la base de los matraces con un Biospherical Instrument QSL-100 cuantos.metro (Sánchez y Voltolina, 1996). La agitación de los cultivos fue por burbujeo continúo de aire filtrado.

2) Caracterización de las cepa *Synechocystis* sp. PCC 6803. Se llevaron a cabo cinéticas de crecimiento por duplicado en diferentes condiciones de crecimiento,

que fueron en luz blanca, oscuridad y luz azul, cada una de ellas en presencia o no de glucosa 5 mM (Anderson y McIntosh, 1991). **2.a) Cinéticas de crecimiento.** Para evaluar el crecimiento de los cultivos se tomó 1 mL de cultivo para cada una de las diferentes condiciones antes mencionadas, cada 48 hrs durante 30 días realizando cada medición por triplicado y se midió la densidad óptica a 730 nm en el espectrofotómetro utilizando medio BG11 como blanco (Anderson y McIntosh, 1991). Otra medida del crecimiento fue por conteo de células que se realizó en un microscopio con el objetivo 10x y un hematocitómetro (Neubauer de dos cámaras) de 0.1 mm de profundidad recomendado para contar microorganismos de (2 a 30 μ de diámetro), cada una con un retículo de 9 cuadros de 1 mm por lado. Contando las células de los cuadros de los extremos de ambas cámaras (8 cuadros en total). Para esto, se tomó una muestra de 1 mL y se fijo con una gota de solución lugol, después se homogenizo las dos cámaras que contienen un portaobjetos. A partir de una D.O. de 0.6 se realizaron diluciones de 1:100. Las células contadas fueron divididas entre los 8 cuadros y multiplicada por la dilución obteniendo el número de células por mL (Paniagua *et* al., 1989). **2.b) Determinación de proteínas**. Como otra forma de cuantificar la biomasa así como para poder determinar la actividad específica de PK se obtuvo el nivel de proteína de las muestras de 1 mL de cultivo que se tomaron cada 96 hrs por triplicado, para cada una de las diferentes condiciones de crecimiento. La determinación se realizó utilizando el método reportado por Lowry *et al.,* 1951, utilizando albúmina de suero de bovino como estándar. **2.c) Medición de la actividad de la piruvato cinasa en** *Synechocystis* sp. **PCC 6803.** Para realizar las mediciones, primero se obtuvo el extracto en base a lo reportado por Carr *et al.* (1969) para *Anabaena* sp. que es el único reporte de medición de actividad de Pyk en cianobacterias. Para ello se tomaron muestras de 25 mL de cultivo por triplicado, para cada una de las diferentes condiciones de

crecimiento cada 4 días. Los 25 mL fueron centrifugados por 15 min a 3,500 rpm y lavados con 10 mL de buffer de fosfatos 0.1 M pH 7.0. Estos fueron centrifugados por 10 min a 3,500 rpm y resuspendidos en 1 mL de volumen total del buffer anterior. Estas muestras fueron congeladas a -20°C hasta su análisis. Para llevar a cabo la obtención del extracto las muestras fueron sonicadas a 60 W por 3 períodos de 45 seg (manteniendose en hielo), se centrifugaron a 10,000 g por 15 min a 4°C y se obtuvo el sobrenadante de color verde oscuro que corresponde al extracto crudo a utilizar en la reacción. La medición de la actividad de la piruvato cinasa se llevo a cabo por medio de una reacción acoplada, midiendo el grado de oxidación del $NADH_2$ en la presencia de lactato deshidrogenasa a temperatura ambiente. La reacción contienía: 100 µM de Tris pH 7.6, 10 µM de $MgCl_2$, 50 µM KCl, 0.25 mM ADP y 5 µl del extracto crudo en un volumen total de 2.7 mL. Esta reacción fue mezclada para después adicionar 0.1 µM de fosfoenolpiruvato no saturado y 0.1 µl de lactato deshidrogenasa (30 unidades de actividad). Con la finalidad de determinar en que concentración de PEP obteníamos mayor actividad y determinar si el AMP y F1,6bF activaban la reacción. Además se realizaron varios controles para determinar si la(s) enzimas Pyk de la cianobacteria eran activadas por efectores como el AMP o la Fructosa 1,6-bisfosfato como sucede en *E. coli* (Kayne, 1973). Para ello se adicionaron los reactivos anteriores excepto PEP saturado (1 M), AMP y F1,6bF, 2) solo PEPsat, 3) PEPsat y AMP, 4) PEPsat y F1,6bF, 5) PEP sin saturar, 6) PEP y F1,6bF y 7) PEP y F1,6bF. La medición se realizó en el espectrofotómetro a 340 nm por 3 minutos (Pearce y Carr, 1969). Las absorbancias obtenidas fueron graficadas contra el tiempo de reacción cada una por separado y se calcularon las pendientes de las rectas. A partir de la pendiente se calcularon las actividades aplicando las fórmulas que se describen a continuación.

3) Fórmulas para determinar la actividad específica de piruvato cinasa. Para calcular la actividad específica de piruvato cinasa, se basó en las fórmulas aplicadas para calcular la actividad de PykA y PykF en *E. coli*, ya que presenta dos actividades diferentes de Pyk y aparentemente *Synechocystis* sp. PCC6803 presenta también dos actividades. Por tanto, se utilizó la fórmula PykA= Vc–Va y PykF=1.2(Vd–Vb) donde, a= a la reacción sin PEP y ningún activador (AMP o F1,6bP), b=PEP, c=PEP+AMP y d=PEP+F1,6bP. Para calcular la actividad volumétrica de cada piruvato cinasas se utilizó la fórmula AV=(m.min^{-1})(μmoles.cm/6.22)(l^{-1})(Vf.Ve)(1/F), donde, m representa la pendiente (Abs 730 nm), l el diámetro de la celda, Vf el volumen final de la reacción, Ve el volumen de extracto y F el factor de concentración. El factor $6.22x10^3$ $M^{-1}.cm^{-}1$ es el coeficiente de extinción molar para el NADH, utilizado para convertir las absorvancia a moles de piruvato por minuto (Malcovati y Valentini, 1982). La actividad volumétrica es reportado en μmoles·min^{-1}·ml. Estos resultados fueron divididos entre la concentración de proteínas para obtener actividad específica, reportándose en μmoles de piruvato formado/min.mg de proteína que equivale a una Unidad Internacional de enzima por miligramo de proteína (UI/mg de proteína).

4) Análisis estadístico de los resultados. Los resultados obtenidos de crecimiento tanto de densidad óptica como número de células al igual que la actividad específica de las enzimas PykA y PykF, se estimaron por medio de un análisis de varianza de una vía ANOVA. En los casos que se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos, se realizó una prueba "a posteriori" de Turkey por medio del programa "Statistica 5.0" utilizando para todos los casos un α=0.05. Además las desviaciones estándares se obtuvieron promediando los valores obtenidos que fueron por triplicado para todos los datos presentados en resultados utilizando el programa Excel 2000.

VI. RESULTADOS.

ANÁLISIS MOLECULAR.

1) Análisis de comparación de secuencias de piruvato cinasa.

Este análisis se realizó con el fin de determinar el grado de similitud existente entre las secuencias de aminoácidos de las enzimas piruvato cinasa de *Synechocystis* sp. PCC 6803 con la de otros organismos.

Las secuencias seleccionadas que codifican para la enzima Pyk, fueron importadas al programa Dnastar. Las secuencias proteicas utilizadas incluyen a los dos genes potenciales que codifican para la enzima Pyk de la cianobacteria *Synechocystis* sp. PCC 6803 y una variedad de organismos que va desde animales, plantas, protozoarios, hongos, levaduras, bacterias Gram positivas y Gram negativas.

Del alineamiento realizado obtuvimos una similitud de 41.1% al comparar la secuencia de *pyk*F (sll1275) y *pyk*F (sll0587) de *Synechocystis* sp. PCC 6803. Al comparar la similitud con las de *E. coli,* se encontró que el gen *pyk*F (sll1275) de la cianobacteria tiene un 38.7% de similitud con *pyk*F de *E. coli* y 36.1% con *pykA*. Por otro lado, el gen *pyk*F (sll0587) de la cianobacteria tiene una similitud del 39.2% con *pyk*F de *E. coli* y 32.8 % con *pyk*A. El porcentaje de homología entre los dos genes de *pyk* de la cianobacteria *Synechocystis* sp. PCC 6803 es mayor entre sí (41.1%) que al compararlos con el gen *pyk*F y *pyk*A de *E. coli* (Fig. 6).

Con base al alineamiento de las secuencias de aminoácidos se observó que las secuencias de *pyk*F comparten sitios altamente conservados entre los diferentes organismos alineados. Entre estas secuencias de alta conservación se encuentra el sitio de unión para el catión monovalente K^+ (Lauglin y Reed, 1997) entre los aminoácidos 53-59 y 200-208 del gen *pyk*F(sll1275) y entre los aminoácidos 76-84 y 224-232 del gen *pyk*F(sll0587) (Fig.

7), los cuales se mantienen altamente conservados entre las dos secuencias de *Synechocystis* sp. PCC 6803 con respecto a *E. coli, B. stearothermophilus* y con el resto de las secuencias alineadas.

La secuencia de unión para la fructosa-1,6-bifosfato también mostró una alta conservación entre todas las secuencias alineadas. Esta región se encuentra entre los aminoácidos 843-876 del gen *pyk*F(sll1275) y 861-894 del gen *pyk*F(sll0587) de *Synechocystis* sp. PCC6803 (Fig. 7).

Otro sitio que también se encuentra altamente conservado es entre los aminoácidos 558-568 del gen *pyk*F(sll1275) de *Synechocystis* sp. PCC6803 que es el sitio de unión al sustrato fosfoenolpiruvato.

Además se observó claramente que pykF sll1275 contiene una secuencia carboxilo terminal larga de aproximadamente 86 pb en comparación con la *pyk*F sll0587 o las de *E. coli*. Esta secuencia es similar al C-terminal que caracteriza el gen *pyk*A de *B. stearothermofilus,* el cuál tiene una similitud mayor con *pyk*F de *E. col,i* pero su actividad es comparable con la enzima PykA de *E. coli* ya que es activada por AMP (Fig. 7).

Además dentro de la región C-terminal de la proteína se encuentra una región conservada entre diferentes especies de *B. stearothermophilus* y que también se encontró en la secuencia *pyk*F sll1275 de *Synechocystis* sp. PCC6803 entre los aminoácidos 1507 y 1538.

A partir del alineamiento anterior de proteínas, se realizó un análisis filogenético donde se muestra alta homología entre las piruvato cinasas considerando la variedad de organismos que son comparados en éste análisis. Estos grupos de organismos tienen altos niveles de conservación entre las secuencias conocidas de las enzimas glicolíticas.

En este árbol filogenético se observan dos grandes grupos de enzimas. Las dos secuencias de Pyk de la cianobacteria quedan en uno de los grupos junto con la de *E. coli* tipo 2. El otro grupo incluye a las Pyk de *Bacillus, Sacharomyces*, las humanas y algunas de plantas. Sin embargo, la Pyk de *B. stearothermophilus* presentó un mayor porcentaje de homología con la PykF(sll1275) (48.9%) que la que presentan los dos genes Pyk de la cianobacteria (41.1%).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
1 *S. 6803(sll1275)*		41.1	38.7	36.1	42.3	45.1	42.5	42.7	30	31.9	30	40.6	33.1	34.9	31.7	33.7	32.1	34.5	31	32.7	38.2	30	25.7	31.3	31.8	30.5	27.4
2 *S. 6803(sll0587)*	54.5		39.2	32.8	35.7	40.3	38.2	37.8	34.1	33.9	33.1	39.6	31.6	31.6	30	30.8	31.4	33.3	30	32.4	37.6	30.4	28.9	30.4	30.4	30	32.6
3 *E. coli* type 1	56.8	58.1		33.1	48.5	48.9	46.1	49.6	44.4	44.2	42.4	37	40.5	35.1	40.5	38.7	40.7	40.9	40.7	41.3	44.8	28.6	31	43.7	43.3	41.8	34.4
4 *E. coli* type 2	59.7	62.9	62		36.1	36.5	37.6	35.5	32.8	32.8	31.1	37.1	32.8	76.6	31.9	31.9	30.7	31.7	30.9	33	34	26.8	24.4	30.1	29.6	30.5	30.9
5 *B. subtilis*	54.7	60.6	48.3	58.9		71.7	64.4	85.4	36.2	36.2	32.2	38.7	36.7	36.2	32.8	36.3	35	35.1	31.8	36.5	53.3	28.4	29.8	36.2	35.7	36.8	30.1
6 *B. stearothermophilus*	52.7	57.4	48	58.9	27.2		65.5	73.7	37.9	37.9	35.7	41.7	36.3	37.2	33.9	36.3	35.2	37.1	32.9	37.6	53.5	30.4	30.6	38.6	37.8	37.2	31.7
7 *B. psychrophilus*	55.2	58.6	51.2	58.6	34.6	34.3		65.3	36	35.8	33.4	38.5	36.9	35.1	34.1	36.1	36.6	36.1	32.5	35	52.9	28.9	28.8	37	36.7	38.4	29.7
8 *B. licheniformis*	54.4	57.8	47.7	59.6	14	25.6	34.2		37	37	34.1	38.3	38.7	35.6	33.8	37.3	36.4	38.2	33.3	36.9	53.8	29.8	29.6	37.2	37.1	36.8	31
9 *H. sapiens* M2	62.9	61.2	52.4	64.2	56.7	54.1	56.9	55.5		99.6	70.8	33.5	48.3	31	45.8	47.7	49.8	46.6	47.4	50	32.8	29.8	27.3	39.1	38.6	41.5	30.4
10 *H. sapiens* M1	63.1	61.5	52.6	64.2	56.7	54.1	57.1	55.5	0.4		70.8	33.3	48.1	31	45.8	47.5	49.6	46.4	47.4	49.8	32.8	28.2	27.3	38.9	38.4	41.3	30.6
11 *H. sapiens* R/L	63.2	59.4	54.2	64.8	58.3	53.9	57	55.8	28.9	28.9		32	46.5	28.2	45.6	46.5	48	44.6	45	46.8	32.1	26.8	26.7	37.8	39.8	37	28.3
12 *C. glutamicum*	57	57.4	59.5	59.8	58	56.9	59.4	58.7	60.9	61.2	63.2		33.3	36.2	31.4	29.5	29.3	33.9	31.4	33.3	35.2	27.1	27.6	31.8	31.4	32.2	31.2
13 *T. brucei*	63.6	62.7	56.3	63.9	57.1	57.9	58.1	55.7	49.3	49.5	49.6	64.1		33.1	46.5	44.3	47.1	59.6	45.7	45.7	34.3	27.3	27.3	38.1	37.7	39.3	32.3
14 *H. influenzae*	60.6	65.2	60.5	22.9	59.2	58.8	60.3	60	65.5	65.5	65.4	61.2	63.6		31.6	32	29.7	31.4	31.6	32.2	32.6	25.1	25.3	31.6	31.2	31.8	30.3
15 *Y. lipolytica*	64.6	63.7	56	63.8	61.3	60.4	61.7	61.4	49.6	49.6	48.9	65	50.8	65.9		64.9	60.8	42.4	58.9	64.6	33.2	28	25.3	38.4	38	37	28.8
16 *S. cerevisiae*	63.3	64.9	57.1	65.1	61.1	59.8	60.2	59.9	49.4	49.6	50.4	65.1	53.3	65.2	33.9		65.1	40.8	60.9	63.7	35.1	27.7	26.5	36.1	34.9	35.1	29.1
17 *S. pombe*	64.8	63.6	54.8	65.1	59.4	60.3	59.2	58.9	47.6	47.8	49	63.9	49.6	65.2	37.9	33.7		43.6	61	63.4	34.1	27.3	25	36.4	36.2	36.2	29.5
18 *T. borelli*	63.4	63.1	55.9	65.2	59.7	58.4	59.2	57.6	50.7	50.9	52.3	63.1	38.8	64.8	53.5	55.4	52.3		44	44.8	34.7	24.6	28.5	35.7	35.3	33.9	29.7
19 *T. reesei*	65.5	64.1	55.6	65.1	62.9	61.3	61.9	61.8	49.1	49.1	51	64.6	52.2	65.5	38.7	37.5	37.3	52.7		68.4	30.5	26.8	25.5	38.7	38	37	29
20 *A. niger*	63.8	63.4	54.1	63.9	58.8	55.7	59.1	57.2	45.5	45.7	48.1	62.7	51.7	64.5	33.3	34.5	34.3	51.5	30.8		32.1	28.9	25.3	40.5	38.2	40	30.2
21 *L. delbrueckii*	59.4	60.2	52.7	62.1	44.6	45.1	46	44.5	63.8	63.8	61	62	62.1	64.2	62.7	61.7	63	63	66	63.7		27.5	30.4	35.4	35.5	35.4	27.4
22 *M. jannaschii*	65.6	63.3	64.1	66.8	65.4	63.9	65.1	65.3	62.9	63.1	65.5	66.3	66.1	68.5	64.8	66.1	66.5	67.3	67	65.4	67.4		23.5	28	28	25.1	27.7
23 M. genitalium	68.4	69.4	64.9	70.3	64	63.4	64	65	66.9	66.9	69	68.6	65.5	69.5	66.9	67.5	67.2	65.4	67.9	67.7	65.9	71.1		25.3	26.1	25.4	24.5
24 *G. max*	65.4	62.3	53	65.4	59	56.7	58.2	58.3	52.6	52.8	55.9	63.7	56.8	64.7	55.9	59.8	57.1	58.3	56	54.1	61.9	64.5	68.8		89.2	76.8	28.8
25 *S. tuberosum*	66.9	62.3	53	65.4	59.5	56.9	58.2	58.1	54.3	54.5	55.6	64.2	57.6	64.4	56.3	60.5	57.9	58.2	56.9	55.4	61.7	65.2	68.4	10.2		74.8	29.6
26 *N. tabacum*	64.3	63.5	54.7	65	58.6	56.5	56.3	57.9	52.2	52.4	56.6	62.5	56.6	64.7	56	59.8	57.8	59.4	57.6	54.3	61.9	66.6	68.4	22.8	24.5		28.7
27 *N. tabacum* (plastid)	65.3	63.2	59.9	65	60.6	58.3	61.9	59	65.3	65	67.8	66.5	63.4	64.2	65.4	67.8	67.9	67	65.9	66.3	63.8	66.1	69.6	64.2	63.9	64.2	

Figura 6. Porcentaje de similitud de las secuencias de piruvato cinasa entre diferentes grupos de organismos. Los nombres marcados con el número 1 y 2 al inicio de la lista representan a *Synechocystis* sp. PCC6803.

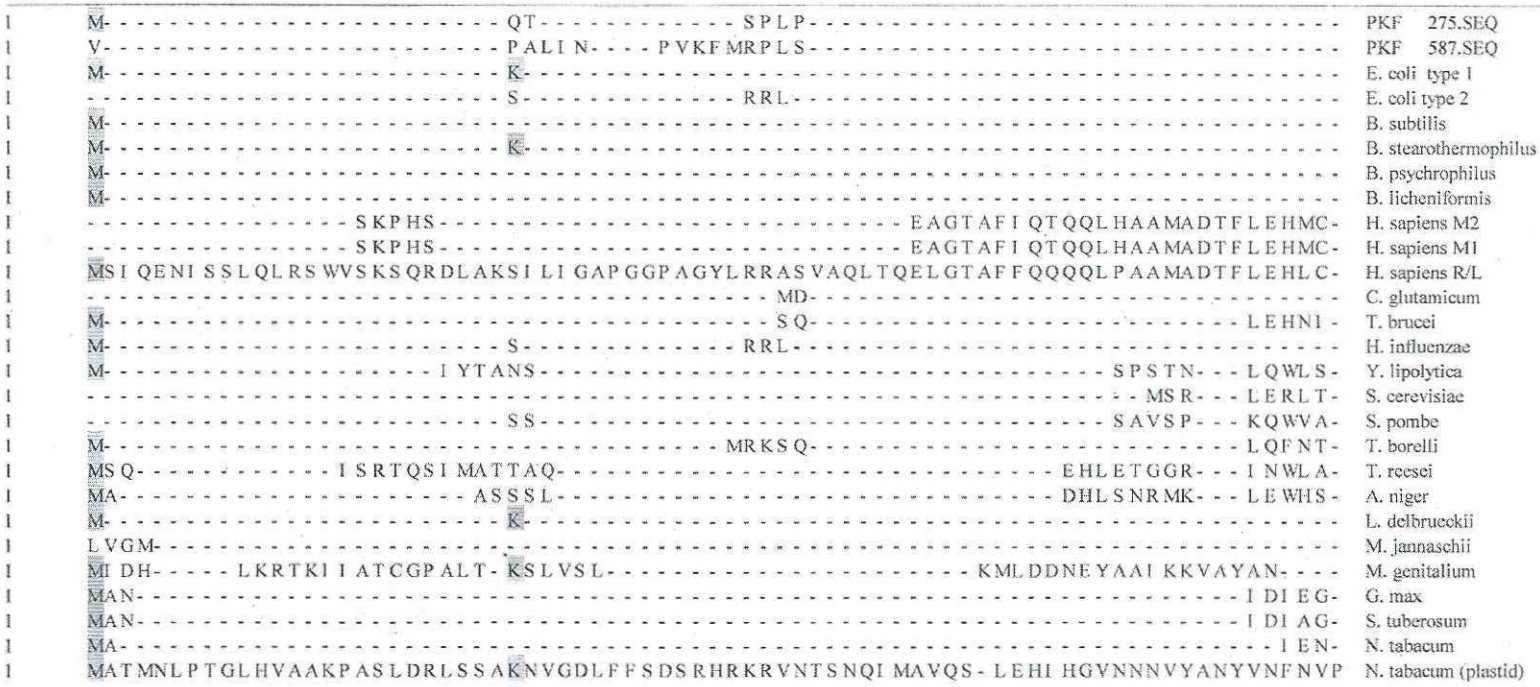
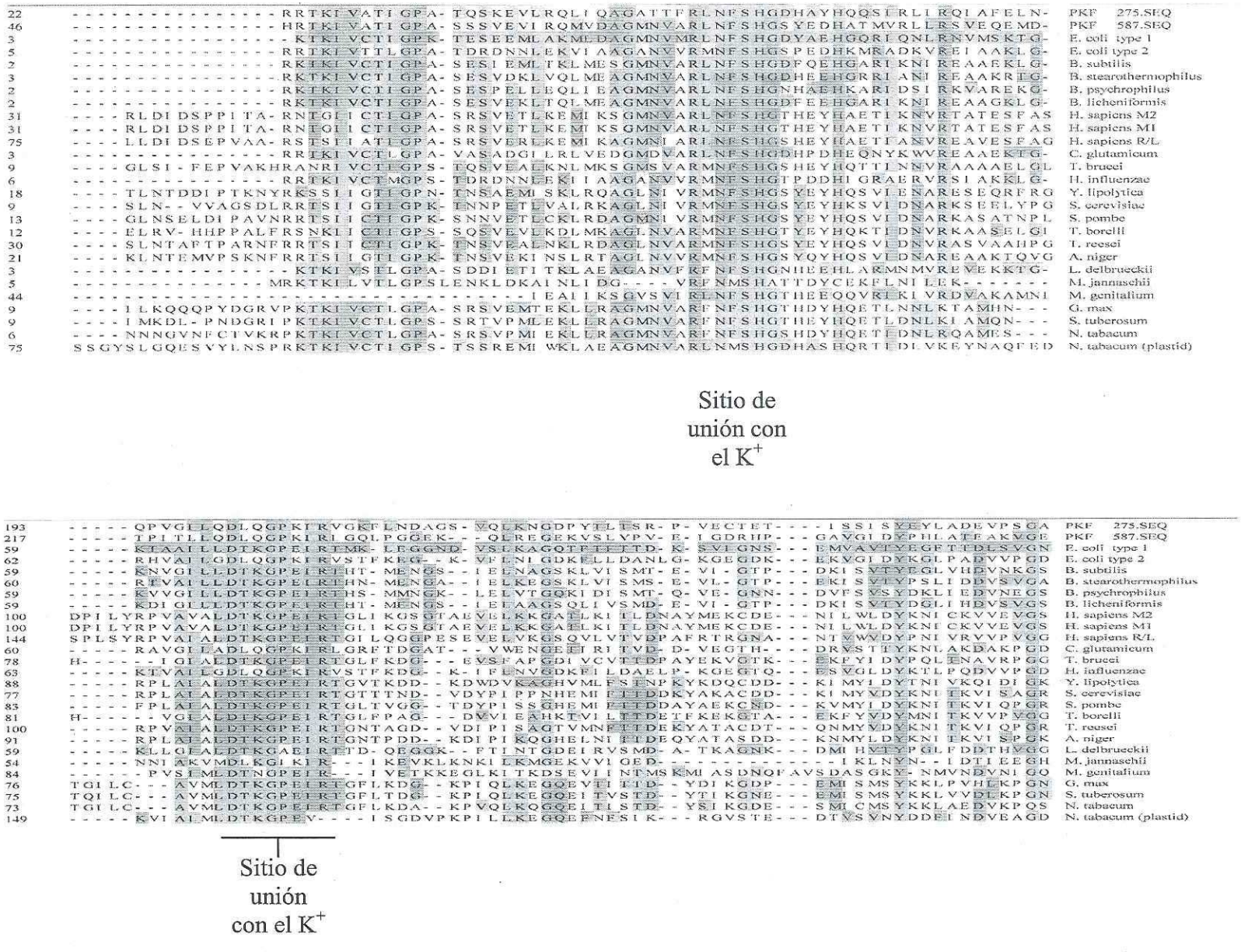
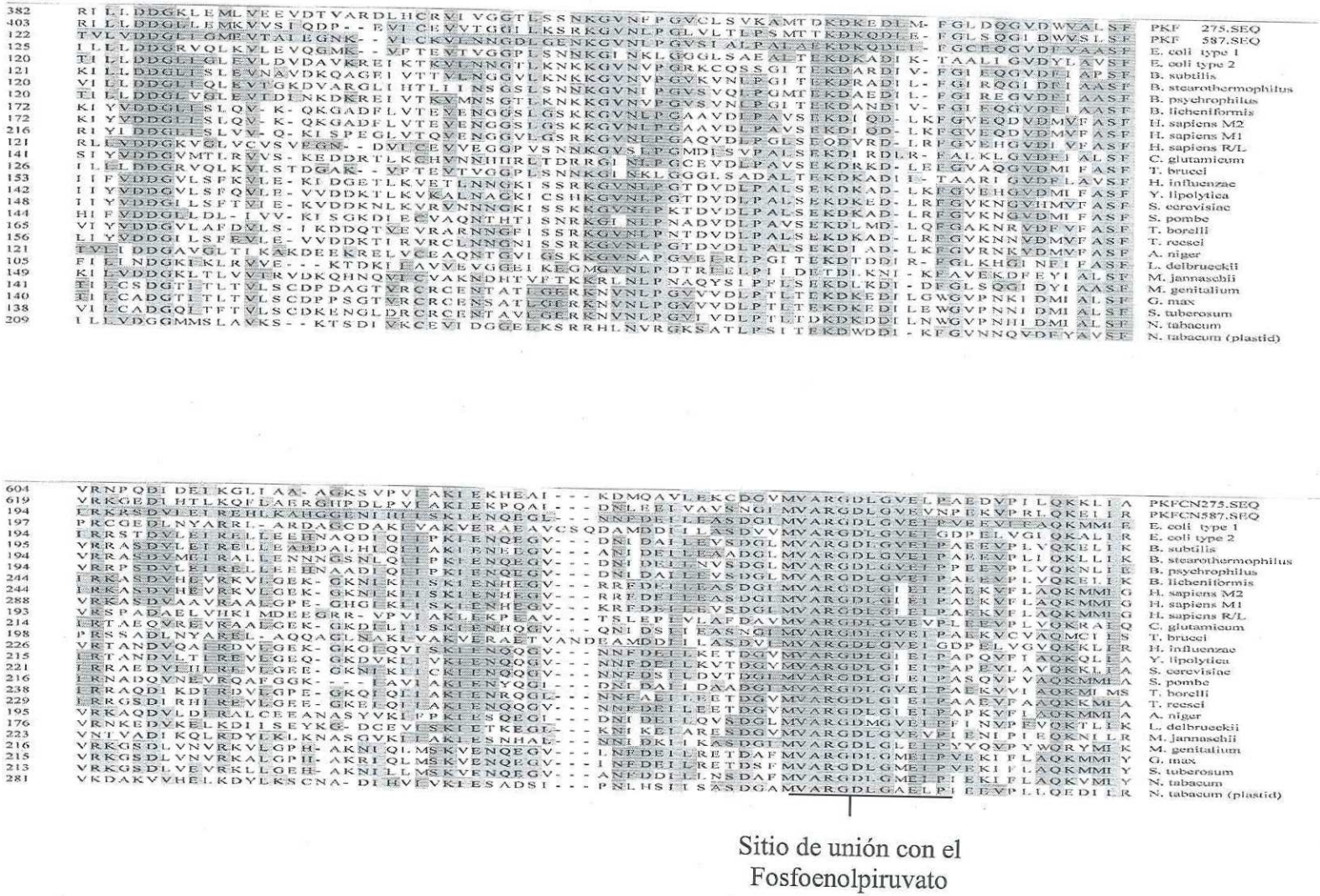
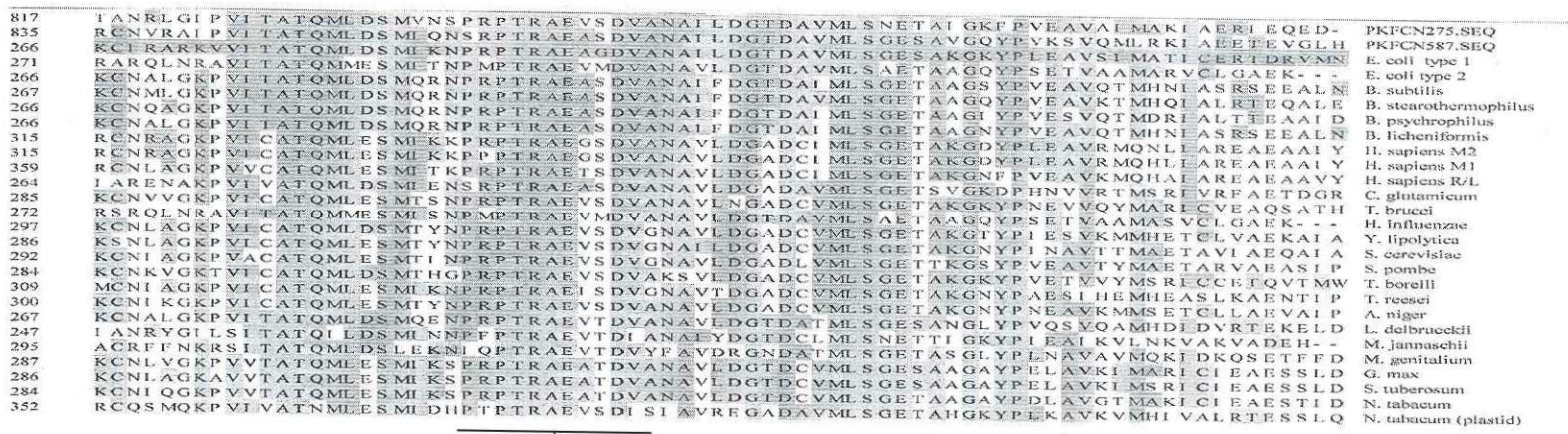


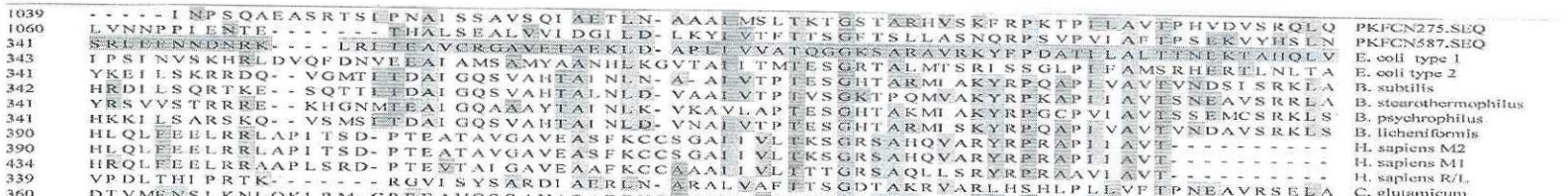
Figura 7. Alineamiento de secuencias de aminoácidos del gen piruvato cinasa. Los números del margen izquierdo indica el numero del aminoácido. La secuencias de *Synechocystis* sp. PCC6803 se encuentra indicada por PykF 275 para el gen sll1275 y PykF587 para el gen sll0587. El alineamiento fue basado en la secuencia consenso de *pyk*F (tipo I) de *E. coli.*

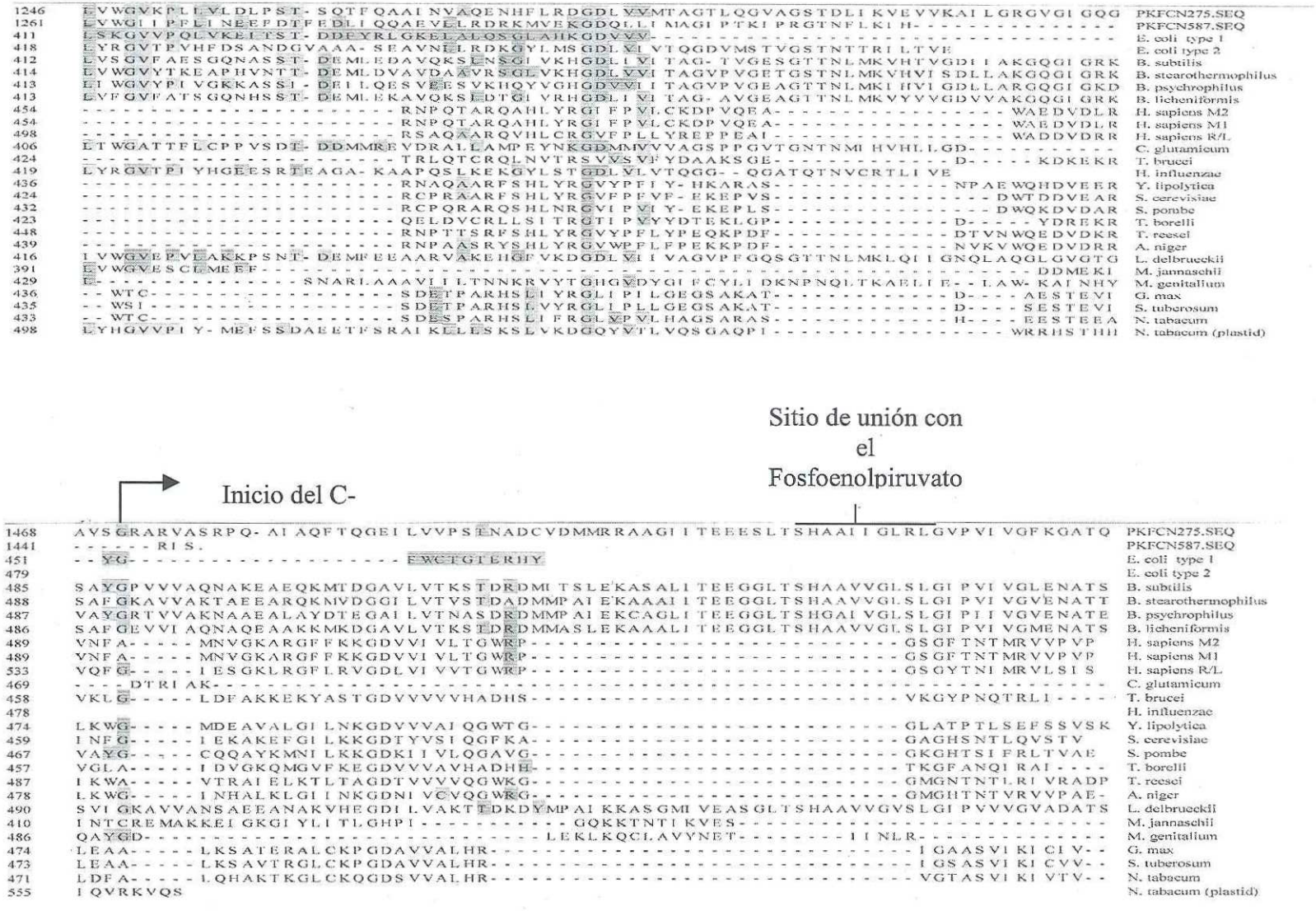

Sitio de unión con el K+
Sitio de unión con el K+


PKF 275.SEQ
PKF 587.SEQ
E. coli type 1
E. coli type 2
B. subtilis
B. stearothermophilus
B. psychrophilus
B. licheniformis
H. sapiens M2
H. sapiens M1
H. sapiens R/L
C. glutamicum
T. brucei
H. influenzae
Y. lipolytica
S. cerevisiae
S. pombe
T. borelli
T. reesei
A. niger
L. delbrueckii
M. jannaschii
M. genitalium
G. max
S. tuberosum
N. tabacum
N. tabacum (plastid)
PKFCN275.SEQ
PKFCN587.SEQ
Sitio de unión con el
Fosfoenolpiruvato



Sitio de unión con
el
Fosfoenolpiruvato




Sitio de unión con el Fosfoenolpiruvato
Inicio del C-

1690	KIRDGAIVTIDAQKGLIYSGALPPVSKG-.EDHD	PKFCN275.SEQ
1450		PKFCN587.SEQ
462		E. coli type 1
479		E. coli type 2
560	ILTDGQDITVDASRGAVYQGR-------ASVL	B. subtilis
563	LFKDGQEITVDGGFGAVYRGH-------ASVL	B. stearothermophilus
562	LIQHGKEITMDAESGVIYNGH-------ASVL	B. psychrophilus
561	ILKEGEDITVDSARGAVYKGR-------ASVL	B. licheniformis
530		H. sapiens M2
530		H. sapiens M1
574		H. sapiens R/L
475	-------------------------------L	C. glutamicum
497	-----------------Y------------LP	T. brucei
478		H. influenzae
517	LFNT-NLLDYKT-----YSMVIKSVNGGVLYK	Y. lipolytica
499		S. cerevisiae
508		S. pombe
496	-----------------Y------------IK	T. borelli
530	---D-HL-------------------GIGQME	T. reesei
520	---E-NL-------------------GLA--E	A. niger
565	KIADGSTLTVDARRGAIYQGE-------VSNL	L. delbrueckii
447	-------------------------------I	M. jannaschii
510	-------------------------------K	M. genitalium
511	-------------------------------K	G. max
510	-------------------------------K	S. tuberosum
508	-------------------------------K	N. tabacum
562		N. tabacum (plastid)

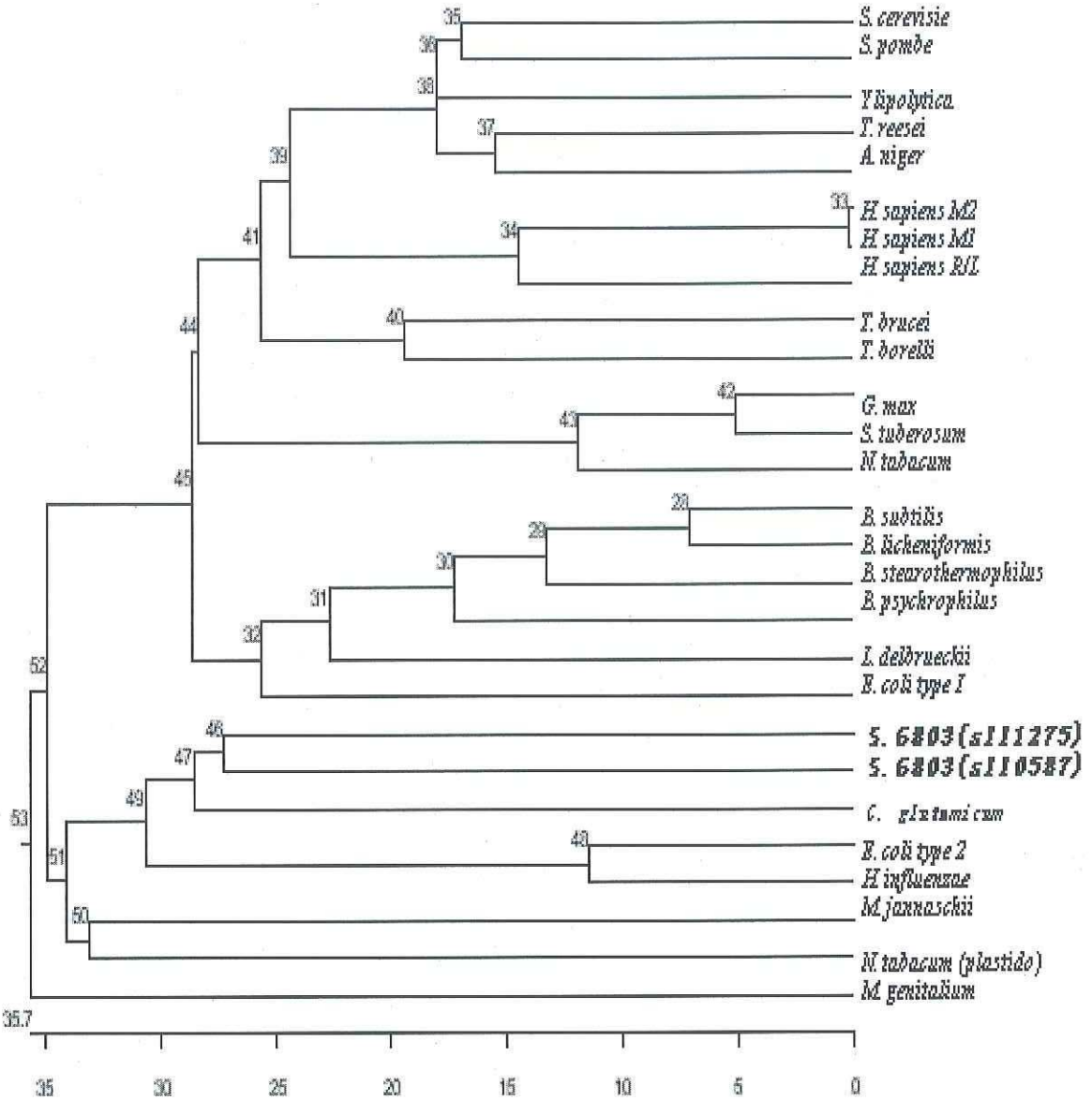


Figura 8. Árbol filogenético de 27 piruvato cinasas de diferentes organismos. El largo de cada brazo representa la distancia entre pares de secuencias. El árbol fue construido utilizando el programa de computo Dnastar opción Megaling.

2) Análisis de restricción teórico.

Con el propósito de analizar las secuencias potenciales de codificar para las enzimas Pyk de la cianobacteria se llevo a cabo el análisis de restricción teórico de los genes. Este análisis servirá para poder corroborar los patrones de restricción de los productos amplificados por PCR, así como para la selección de sitios de corte únicos para realizar la interrupción de los genes con marcadores de resistencia a antibióticos.

En la figura 9 se observa el análisis de restricción para el gen *pyk*F(sll1275) y en la figura 10 el análisis para el gen *pyk*F(sll0587). A partir de estos datos, que se aprecian en un mapa sencillo con un listado de enzimas, se seleccionaron los sitios de restricción o enzimas para llevar a cabo la digestión de los productos de PCR de cada uno de los genes.

Las enzimas que fueron seleccionadas tienen un sitio único de corte dentro de la secuencia de cada uno de los genes. El gen sll1275 tiene un tamaño de 1926 pb para la cual se seleccionó la enzima *Eco*R V, que reconoce la secuencia GAT↓ATC (el sitio de corte está indicado con la flecha) cortando en la posición de 1038 pb, dando lugar a dos fragmentos: uno con el tamaño de 1038 pb y el otro de un tamaño de 888 pb (Fig. 9). Asimismo para el gen sll0587 con un tamaño de 1602 pb, se seleccionó la enzima *Cla* I, que reconoce la secuencia AT↓CGAT dando lugar a dos fragmentos: uno de 719 pb y otro fragmento de 883 pb (Fig. 10). Además también se utilizó la enzima *Eco*R V con la cual se obtuvieron los fragmento de 636 pb y 966 pb (Fig. 11), la cual es otra opción de corte para la interrupción.

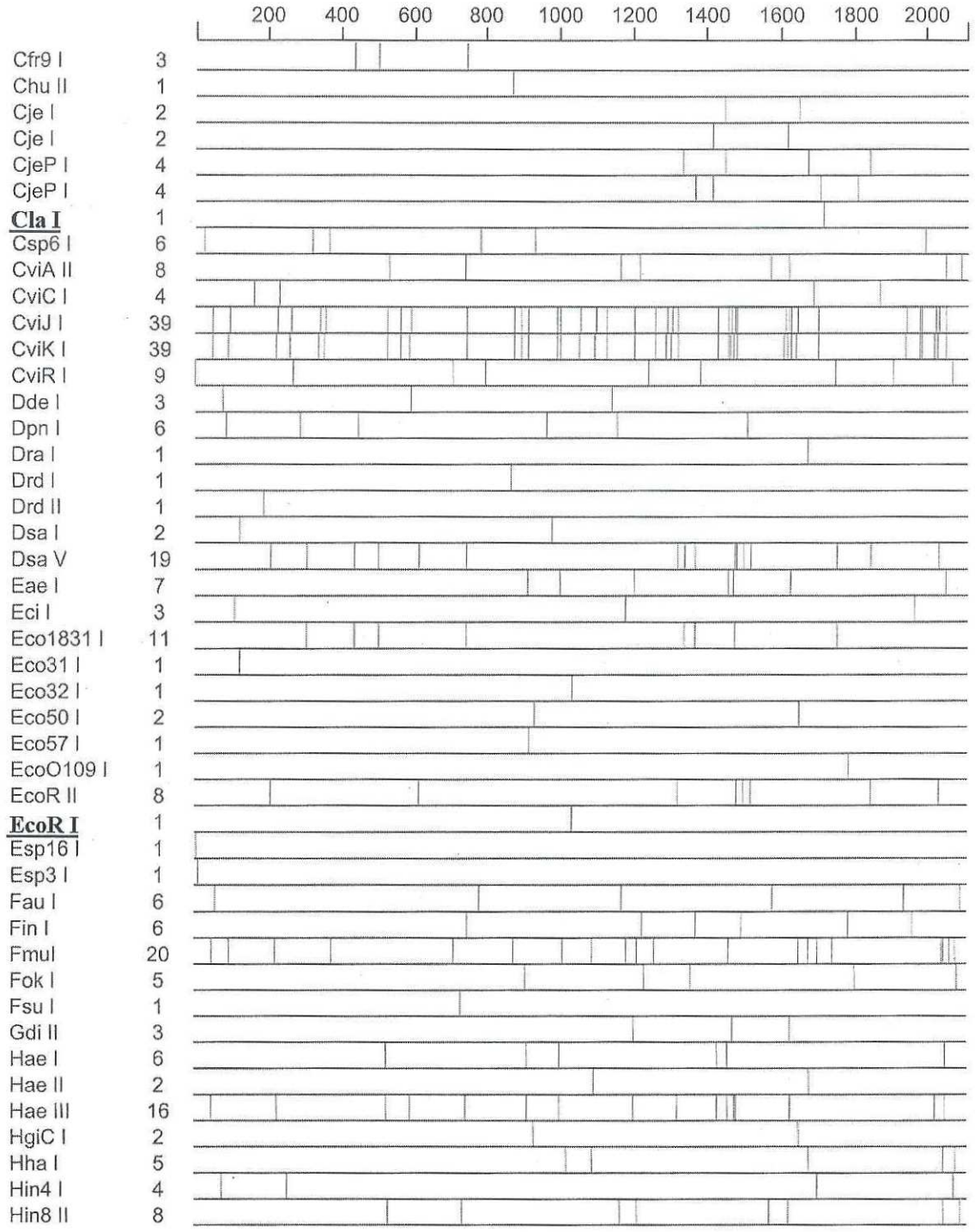


Figura 9. Esquema del análisis de restricción teórico realizado en el programa Dnastar para el gen *pyk*F(sll1275) de *Synechocystis* sp. PCC6803.

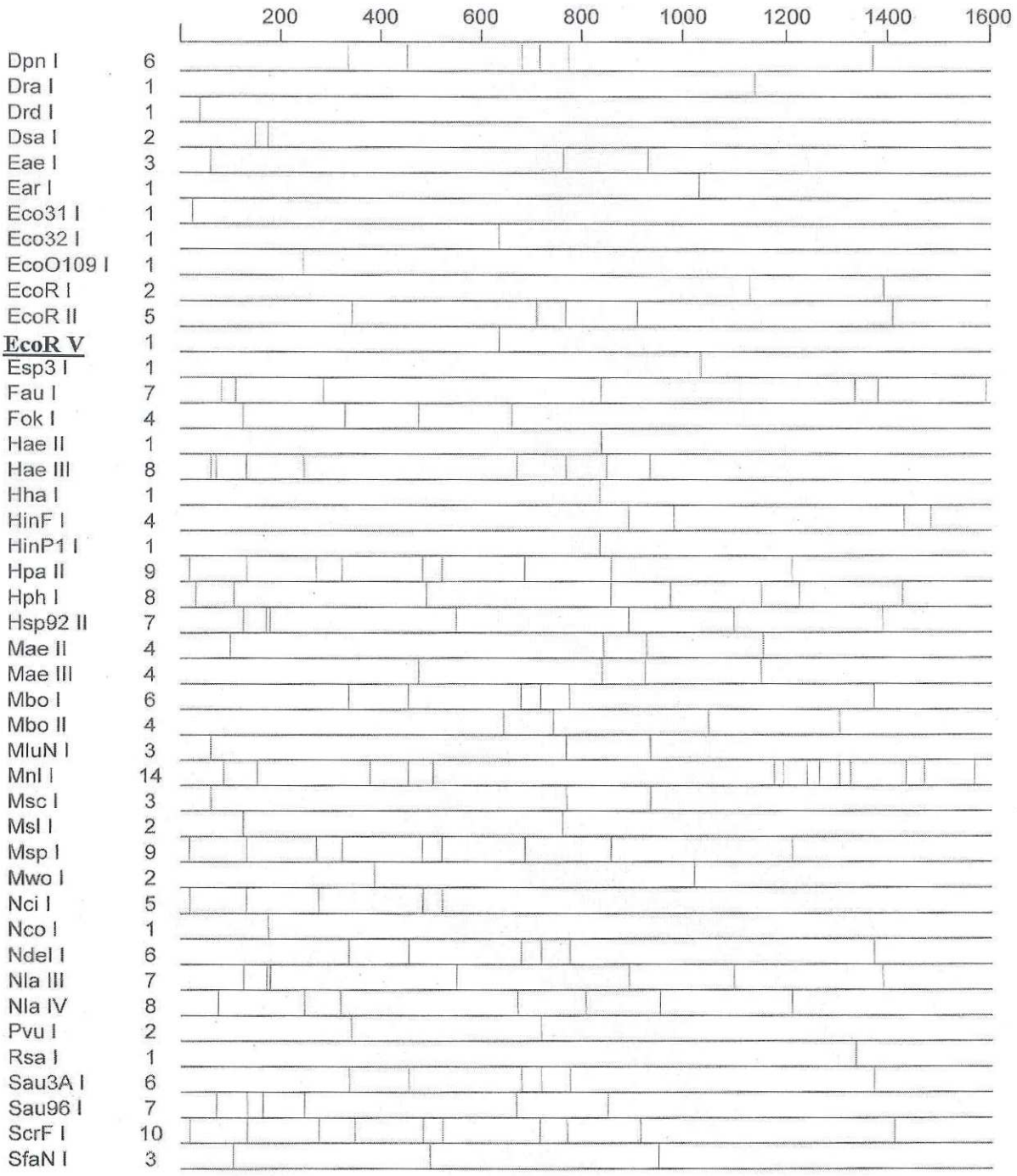


Figura 10. Esquema del análisis de restricción por medio del programa Dnastar del gen *pyk*F(sll0587) de *Synechocystis* sp. PCC6803.

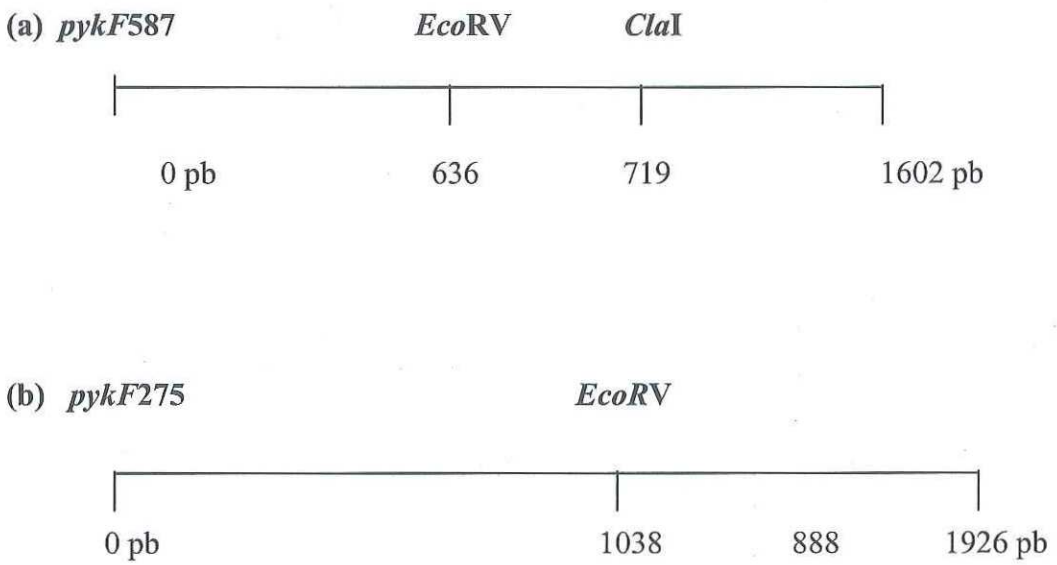


Figura 11. Esquemas de los dos genes *pyk* de *Synechocystis* sp. PCC6803 con los tamaños de cortes con las enzimas seleccionadas *Eco*RV y *Cla*I .

3) Extracción de ADN cromosomal.

Para llevar a cabo la amplificación de los genes potenciales de codificar par la Pyk de la cianobacteria se realizó la extracción de ADN cromosomal. Como se observa en la Fig. 12, se obtuvo ADN cromosomal en buenas condiciones, teniendo una concentración de entre 300 y 400 ng/µl. Este ADN sirvió de templado para la amplificación de los genes *pyk* de la cianobacteria.

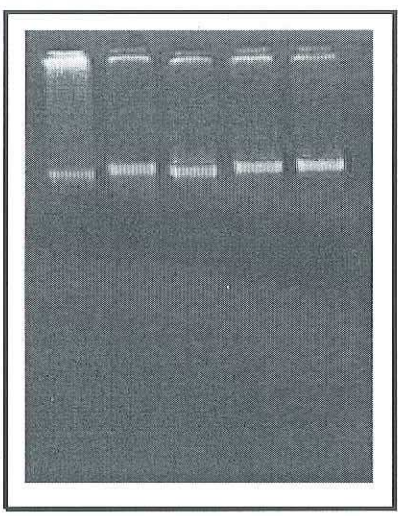


Figura 12. ADN cromosomal de *Synechocystis* sp. PCC 6803 en un gel de agarosa al 1.2%.

4) Análisis de restricción experimental.

Para realizar éste análisis, primero se realizó el diseño de los oligonucleótidos para amplificar cada uno de los genes completos de *pyk*F en *Synechocystis* sp. PCC 6803. Para su diseño se analizaron los primeros 20 pb alrededor del codón de inicio y al final de la secuencia. En el caso del gen *pyk*F (sll1275) se obtuvo un oligo con un tamaño de 20 pb y una temperatura de hibridación (Tm) de 58° C. Este oligo se ubica al lado del codón de inicio del gen y tiene una mayoría de bases G y C (ver materiales y métodos). Además en la parte de inicio de 5'→3' contiene una secuencia de reconocimiento para la enzima *Hind* III, sitio que no se encuentra presente dentro de la secuencia del gen *pyk*F (sll1275).

Asimismo, el diseño del oligonucleótido reverso también presenta un tamaño de 20 pb y una Tm de 62°C y contiene el sitio de reconocimiento para la enzima *Eco*RI, ya que esta secuencia no se encuentra presente dentro del fragmento del gen *pyk*F de *Synechocystis* sp. PCC6803.

Para el gen *pyk*F (sll0587) se diseñó un oligo con un tamaño igual a los anteriores, el cual tiene una temperatura de fusión de 62°C y un sitio de reconocimiento para *Hind* III, mientras que el oligo para la cadena complementaria del gen tiene un tamaño de 22 pb, una Tm de 66°C y presenta un sitio de reconocimiento para la enzima *Bam*H I (Fig. 10). Todos estos sitios de reconocimiento para enzimas fueron con el fin de poder digerir el producto de PCR y tener extremos cohesivos para poder clonarlos en un plásmido.

Una vez diseñados los oligonucléotidos se realizó la amplificación de cada uno de los genes por medio de PCR utilizando como templado el ADN cromosomal de *Synechocystis* sp. PCC 6803.

Los productos obtenidos fueron un fragmento de 1602 pb para el gen *pyk*F (sll0587) y uno de 1926 pb. Estos tamaños corresponden a los tamaños teóricos esperados (Fig. 13).

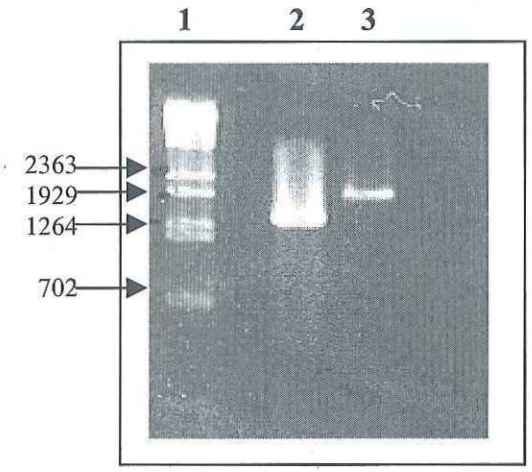


Figura 13. Productos de PCR en gel de agarosa al 1.2%; marcador BstE II (carril 1), amplificación de *pykF*275 (carril 2) y *pykF*587 (carril 3).

Una vez realizada la amplificación se realizó el análisis de restricción el gen *pyk*F (slll275) con la enzima *Eco*R V. Como se observa en el Fig. 14, con esta enzima se obtuvieron los 2 fragmentos esperados uno de 1038 pb y otro de 888 pb. El gen *pyk*F (sll0587) fue digerido con la enzima *Cla* I obteniendo dos fragmentos con un tamaño de 719 pb y 883 pb. Asimismo fue digerido con la enzima *Eco*R V, resultando un fragmento de 636 pb y otro de 966 pb.

A partir del análisis de restricción para el gen *pyk*F (sll0587) se observó que aunque la digestión con la enzima *Eco*R V fue completa y de la enzima *Cla* I fue parcial, los tamaños de los fragmentos fueron los esperados y cualquiera de las 2 enzimas podría ser utilizada para la interrupción del gen.

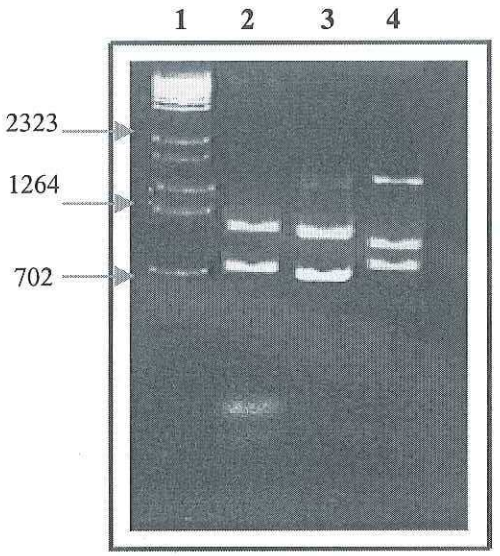


Figura 14. Digestión de los productos de PCR: Carril 1 Marcardor *Bst*E II, carril 2 *pyk*F1275 digerido por *Eco*R V, carril 3 y 4 *pyk*F587 digerido con *Eco*RV y *Cla* I.

5) Clonación de los genes *pyk*F (sll1275 y sll0587) en el plásmido pUC19.

Con la finalidad de amplificar los genes completos de las dos secuencias de *pyk* se analizaron las secuencias de los genes para encontrar el codon de inicio al igual que las

bases de terminación de los dos genes. Adicionalmente se buscó que ambos genes quedaran en fase de lectura con el promotor del plásmido. El tamaño del gen sll1275 es de 1926 pb y su codón de inicio es ATG, para el caso del gen sll0587, este tiene un tamaño de 1602 pb y su codón de inicio es GTG.

Los primeros oligos utilizados fueron los del grupo I (tabla I) que fueron diseñados al igual que los oligos del grupo II y III con secuencias que son reconocidas por enzimas de restricción específicas, con el fin de amplificar un fragmento menor de los genes *pyk* por PCR pero que conservaran los sitios de corte para enzimas de restricción. Por lo tanto, los productos amplificados fueron digeridos con las enzimas que reconocen esas secuencias (tabla I), lo que produjo extremos cohesivos que son complementarios a los extremos cohesivos obtenidos de la digestión del ADN plasmídico con estas mismas enzimas.

El primer criterio de selección de las células o colonias transformadas con el vector de clonación (es decir el plásmido pUC19 con el gen *pyk* unido al sitio de clonación múltiple) fue el observar crecimiento de colonias blancas sobre las cajas de medio LB que contenían IPTG, X-Gal y Ampicilina ya que las células que contienen al plásmido silvestre presentaron una coloración azul.

Las colonias seleccionadas fueron transferidas a cajas nuevas y a partir de éstas se realizó la extracción plasmídica de algunas colonias (Fig. 15). Como se observa en esta figura sí se obtuvó ADN plasmídico para el caso de las colonias transformadas con los dos genes de *pyk* aunque a baja concentración.

El control fue el ADN plasmídico pUC19 obtenido de colonias azules, el cual dio un patrón un poco diferente a los anteriores.

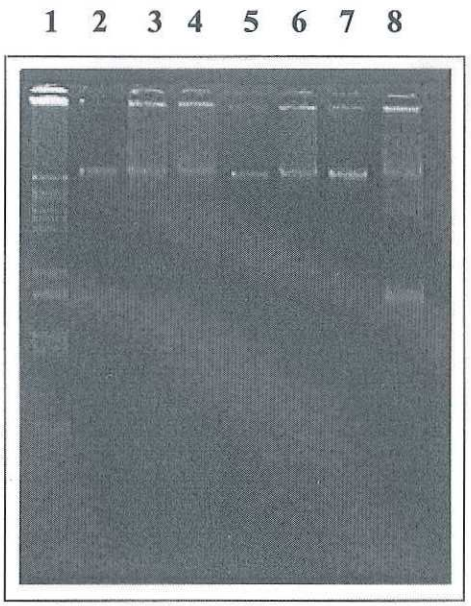


Figura 15. ADN plasmídico a partir de las colonias transformadas con pUC19 y los genes *pyk*F de *Synechocystis* sp. PCC6803. Carril 1 Marcardor *Bst*E II, Carriles 2-4 pUC19 con el inserto de *pyk*F(sll1275) , Carriles 5-7 pUC19 con *pyk*F(sll0587) y Carril 8 pUC19 silvestre.

Al realizar varias digestiones con las enzimas *Hind* III y *Eco*R I por separado con el fin de linealizar el plásmido, deberíamos de obtener un fragmento de un tamaño de 4733 pb para el gen *pyk*F(sll1275) y 4186 pb para el gen *pyk*F(sll0587). Al correr el ADN plasmídico no se observaron los fragmentos esperados porque el ADN se veía degradado. Asimismo, se realizaron amplificaciones por PCR para éstas colonias con los oligos específicos, sin embargo no se obtuvieron amplificaciones de ninguna de las colonias transformadas.

Después de varias repeticiones con los mismos resultados anteriores se diseñaron nuevos oligos que fueron los del grupo II (tabla I), los cuáles amplificaban un tamaño más

pequeño (1200 pb) para cada uno de los genes en comparación a las amplificaciones con los oligos del grupo I (Fig.16). Esto se hizo con la finalidad de amplificar los genes sin los sitios de regulación (codón de inicio y las secuencias de terminación), debido a que estas regiones permiten expresar a los genes completos en *E. coli* y esta pudiera ser dañino para la célula.

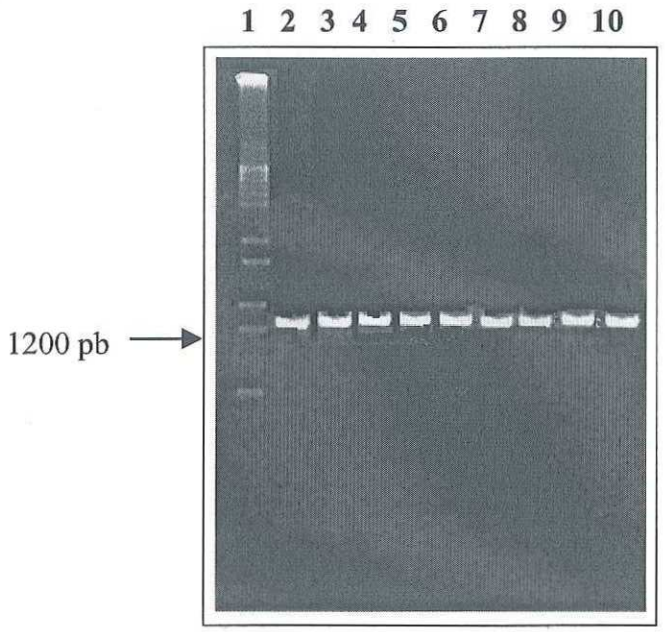


Figura 16. Amplificación por PCR de los genes *pyk*F(sll0587) y *pyk*F(sll1275) con Los oligonucleótidos del grupo II, amplificando un fragmento de 1200 pb. Carril: 1 Marcardor *Bst*E II, Carriles 2-6 sll0587 y los carriles 7-10 sll1275.

Antes de transformar la reacción de ligación con estas nuevas secuencias amplificadas de Pyk se corrió una muestra de ésta. Como se puede observar en la Fig. 17 en la reacción de ligado de pUC19 sin Pyk, que fue digerido con las enzimas *Eco*R I/*Hind* III mostró el fragmento esperado de 2686 pb. La reacción de ligación con los genes de *pyk*F(sll1275) digeridos con las mismas enzimas anteriores mostraron un fragmento de

1200 pb, obteniéndose los mismos resultados para pUC19 digerido con *Bam*H I/*Hind* III y el gen *pyk*F(sll0587).

En la reacción de ligación se observó un patrón de bandeo, el cuál nos indica que hubo ligación ya que el plásmido no puede ligarse por si mismo por los extremos rasurados que resultaron después de la digestión, por tanto el bandeo podría ser por las diferentes posibilidades de unión entre el plásmido y el gen *pyk*, es decir, unión del extremo *Eco*R I o *Hind* III con el gen *pyk* y en otros ligación completa a pesar de que continúa observándose el fragmento del gen *pyk* en las reacciones de ligación.

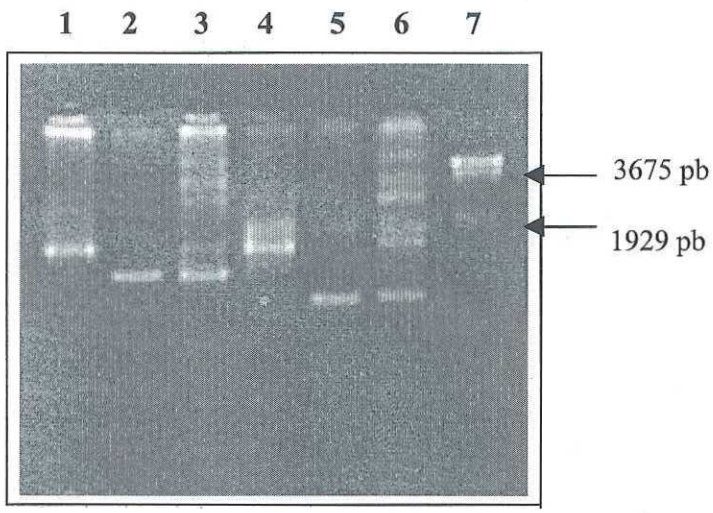


Figura 17. Reacción de ligación. Carril 1: pUC19 cortado con *Eco*RI/*Hind*III, Carril 2: *pyk*(sll1275), Carril 3: ligación pUC19-*pyk*, carril 4: pUC19 cortado con *Bam*HI/*Hind*III, Carril 5: *pyk*(sll0587) y carril 6: Marcador *Bst*EI.

Una vez confirmado que se estaba llevando a cabo la ligación entre pUC19 y Pyk se continuó bajo los mismos criterios que en las transformaciones anteriores, y a partir de las

colonias blancas se obtuvieron los ADN's plasmídicos con tamaños iguales a los experimentos anteriores.

La digestión se realizó con las mismas enzimas de restricción para linearizar el plásmido, donde se observaría un fragmento de 3886 pb para cada uno de los genes. Sin embargo, al correr los ADN's digeridos se observo degradación de éstos ADN's, al igual que las digestiones de las transformaciones anteriores donde se utilizaron los oligonuclétidos del grupo I. De igual manera estos ensayos se realizaron varias veces sin buenos resultados. Debido a que en otros organismos se ha presentado la misma problemática al intentar clonar los genes *pyk* (Muñoz, 1999 comunicación personal) se realizó un análisis de hidrofobicidad de la secuencia Pyk que se conoce como índice antigénico de la secuencia.

Para ello se realizó el análisis de las dos secuencias en el programa DnaStar en la opción PROTEAN para el gen *pyk*F(s111275), *pyk*F(s110587) de *Synechocystis* sp. PCC6803, el gen *pyk*F de *B. subtilis* y *pyk*A de *E. coli* (Fig. 18). En estos análisis entre mayor es el índice antigénico mayor es la hidrofobicidad. Sin embargo, es menor el grado de flexibilidad de la secuencia al igual que las regiones de doblez resultando así proteínas rígidas. En la Fig. 18 puede observarse que el índice antigénico (indicado por los picos) es alto a lo largo de ambas secuencias de la cianobacteria al igual que *B. subtilis*, En cambio la enzima de *E. coli* presenta un bajo índice antigénico con mayor grado de hidrofobicidad y regiones de doblez en comparación a la cianobacteria y *B. subtilis*, es decir, presenta una proteínas más flexible.

Con el fin de disminuir el índice antigénico y de ésta manera que el gen sea más estable dentro de pUC19, se diseñaron nuevos oligonucleótidos que amplificaron a partir de

1038 pb a 2058 pb (346–686 aminoácidos) para el gen sll1275 y de 676 pb a 1500 pb (225-500 aa) para el gen sll0587.

Las amplificaciones obtenidas con los oligos del grupo III mostraron un tamaño de 1010 pb para el gen *pyk*F (sll1275) y 824 pb para el gen *pyk*F(sll0587). Estos se utilizaron para los ensayos de clonación en el plásmido pUC19 (Fig. 19).

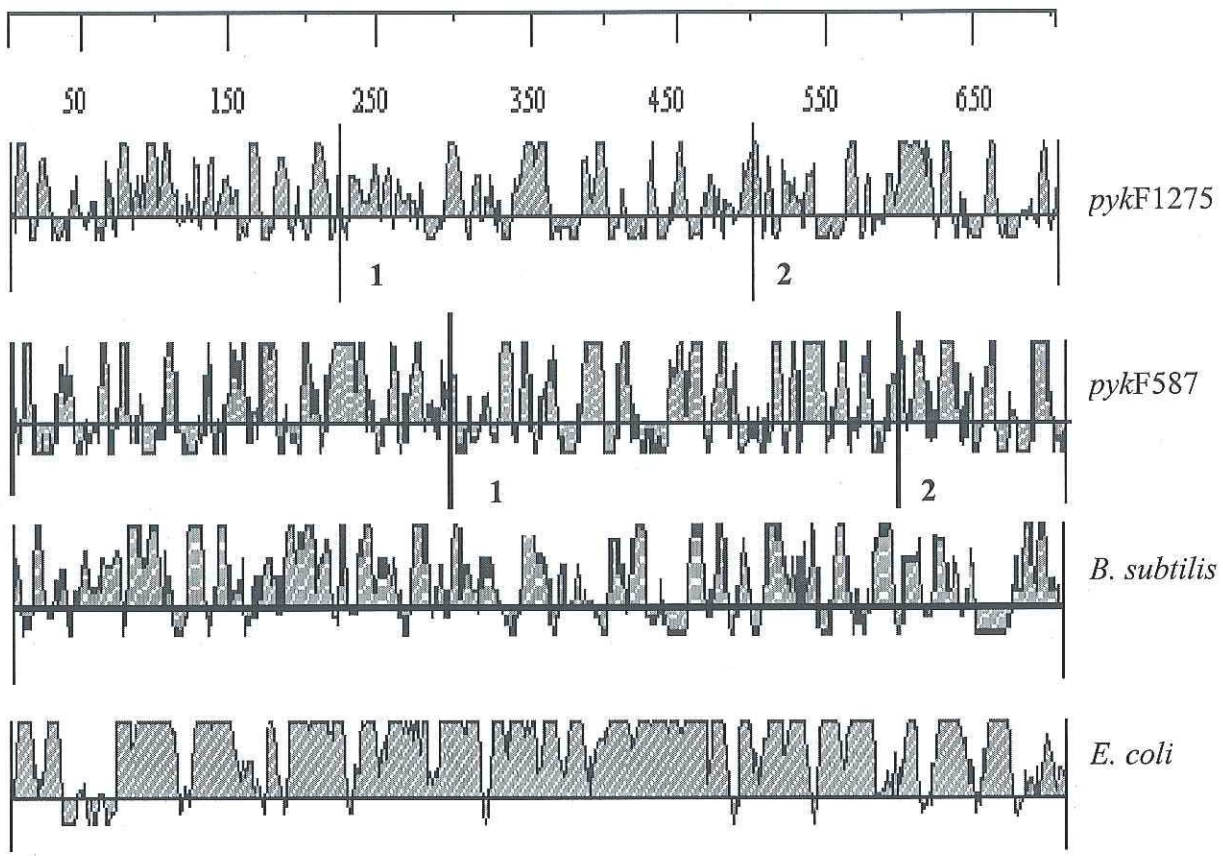


Figura 18. Análisis de la secuencia proteíca en el programa Dnastar (1994) en la opción Protean del gen *pyk*F(sll0587) y *pyk*F(sll1275) de *Synechocystis* sp. PCC6803, *pyk*A de *B. subtilis* y *pyk*A de *E. coli*. El número 1 indica donde inicia el fragmento amplificado y el 2 donde termina.

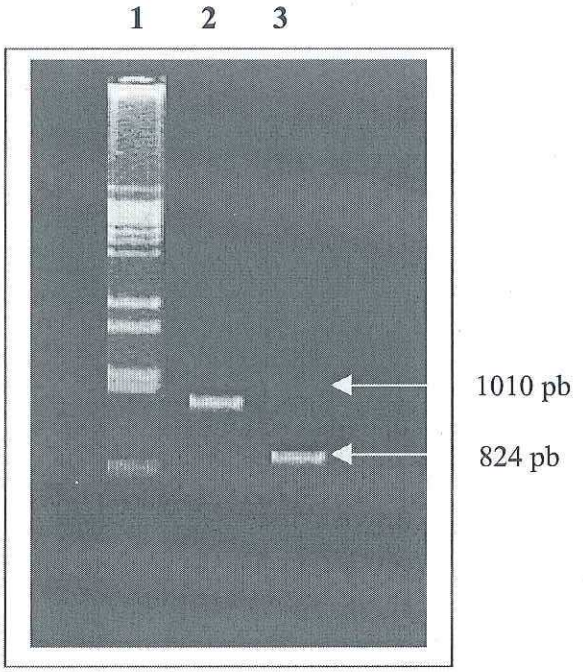


Figura 19. Amplificación por PCR con los oligonucleótidos del grupo III en agarosa al 1.2%. Carril 1: Marcardor *Bst*E II, Carril 2: fragmento de 1010 pb del gen *pyk*F (sll1275) y Carril 3: fragmento de 824 pb del gen *pyk*F(sll0587).

Al realizar las digestiones del ADN plasmídico, no se obtuvo ningún fragmento debido a que éste ADN se degradó por completo, observándose un barrido en el gel de agarosa al 1.2%. Este ADN plasmídico se utilizó como templado al hacer una reacción de PCR con los oligonucleótidos específicos del grupo III, de la cual no se obtuvo amplificación para ninguno de los dos genes de *pyk*. Probablemente el problema es una vez que entra a la célula, ya que se observó (Fig. 17) que si ocurría ligación entre el plásmido pUC19 y cada uno de los genes *pyk*.

ANALISIS FISIOLOGICO.

1) Cinéticas de crecimiento en diferentes condiciones de cultivo.

Los cultivos de *Synechoccystis* sp. PCC6803 que estuvieron en presencia de luz blanca con y sin glucosa alcanzaron una densidad óptica final de 10.003 ($801.31x10^6$ $cel.ml^{-1}$) y los cultivos sin glucosa 7.77 ($581.65x10^6$ $cel.ml^{-1}$).

Como puede observarse en la Fig. 20 se presentó un mayor crecimiento en los cultivos con glucosa en comparación a los cultivos sin glucosa, encontrándose una diferencia significativa (P=0.000134) con un 95% de confiabilidad entre los dos cultivos. Por otro lado, los cultivos con glucosa presentaron una mayor diferencia significativa (P=0.000020) haciendo una comparación con el resto de los cultivos (luz azul y oscuridad, con y sin glucosa). Los valores de la densidad óptica de los cultivos en presencia de luz azul con medio con glucosa, no tuvieron diferencias significativas (P=0.8566) en comparación con los cultivos sin glucosa, no obstante la mayor densidad óptica (27 días) de 2.008 ($1.96x10^8$ $cel.ml^{-1}$) y 1.2 ($1.35x10^8$ $cel.ml^{-1}$), respectivamente (Tabla III). El día 19 del cultivo se observó una disminución de crecimiento, tanto para cultivos a los que se les adicionó glucosa como aquellos que no contenían glucosa, siendo de 1.5 y 2.8 veces menor con respecto al día anterior.

Los cultivos que estuvieron en oscuridad sin glucosa prácticamente no presentaron crecimiento celular, ya que la densidad óptica se mantuvo alrededor de 0.06 ± 0.01 ($49x10^7$ $cel.ml^{-1}$) durante toda la curva de crecimiento. Para los cultivos que estuvieron en oscuridad pero con glucosa como única fuente de carbono, se observó un pequeño incremento de la densidad óptica en la fase inicial de crecimiento

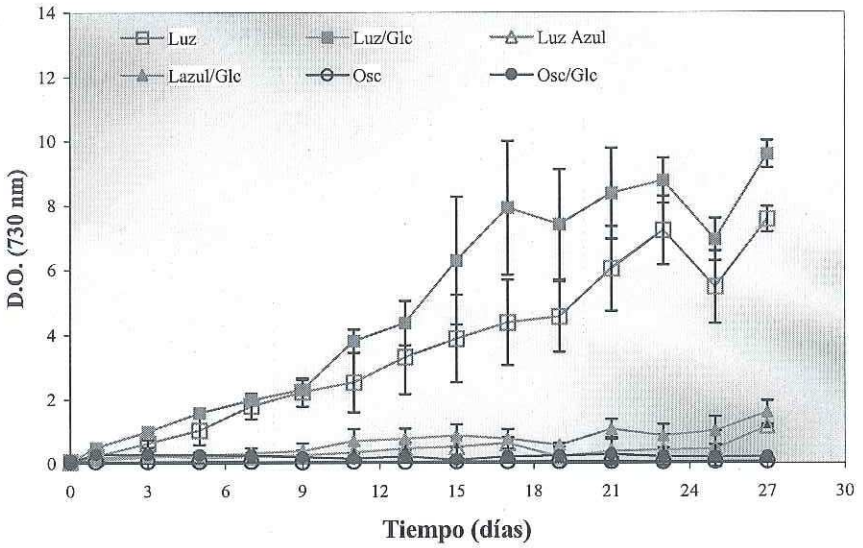


Figura 20. Valores promedio de la densidad óptica (D.O.) evaluada para cultivos estáticos de *Synechocystis* sp. PCC6803, mantenidos bajo exposición de luz blanca, luz azul, y obscuridad. En el medio de cultivo se consideró la adición de glucosa. Los símbolos sólidos son los que contienen glucosa y los abiertos sin la adición de glucosa.

Tabla III. Concentración promedio de células ($x10^6$ $cel.ml^{-1}$) para cultivos estáticos de *Synechocystis* sp. PCC6803, mantenidos bajo exposición de luz blanca, luz azul y obscuridad. En el medio de cultivo se consideró la adición de glucosa.

Días	Luz Blanca	Luz/Glc	Oscuridad	Osc/Glc	Luz Azul	Azul/Glc
0	48.29 (±0.5)	48.19 (±0.07)	49.15 (±0.2)	48.42 (±0.87)	47.25 (±1.17)	52.93 (±1.86)
1	62.24 (±2.6)	82.43 (±1.8)	48.74 (±0.34)	66.66 (±0.57)	57.23 (±1.47)	53.36 (±1.72)
3	92.25 (±9.2)	119.85 (±6.0)	48.37 (±0.87)	65.90 (±11.3)	66.13 (±7.72)	60.43 (±5.48)
5	122.98 (±33.6)	164.11 (±1.4)	49.00 (±0.56)	64.92 (±0.57)	59.51 (±0.87)	63.48 (±7.28)
7	180.16 (±30.1)	194.83 (±0.3)	48.80 (±1.97)	64.01 (±0.57)	62.76 (±7.28)	69.20 (±11.3)
9	212.59 (±33.0)	218.82 (±23.0)	47.21 (±0.33)	59.54 (±0.87)	65.98 (±11.3)	74.20 (±17.5)
11	235.59 (±70.2)	307.27 (±54.0)	48.57 (±0.70)	56.37 (±0.57)	73.54 (±15.1)	97.78 (±28.3)
13	295.12 (±86.9)	399.92 (±85.0)	48.01 (±0.90)	61.60 (±5.52)	84.31 (±12.3)	102.22 (±25.0)
15	337.99 (±102)	520.36 (±150.0)	48.85 (±0.53)	53.04 (±1.72)	78.38 (±15.1)	110.26 (±26.8)
17	375.58 (±99.5)	644.07 (±157.0)	48.67 (±0.35)	60.98 (±5.52)	93.01 (±13.4)	102.27 (±23.0)
19	388.95 (±82.3)	604.72 (±130.0)	49.35 (±0.71)	62.95 (±3.82)	61.59 (±0.57)	87.64 (±4.77)
21	501.44 (±98.7)	677.74 (±61.6)	49.25 (±0.54)	66.05 (±0.57)	82.11 (±27.9)	125.42 (±23.3)
23	590.97 (±80.5)	707.63 (±30.8)	47.66 (±0.77)	60.60 (±0.57)	118.72 (±23.0)	154.28 (±17.7)
25	458.31 (±35.8)	569.16 (±28.6)	48.64 (±0.30)	60.98 (±5.52)	127.65 (±23.3)	158.90 (±11.1)
27	616.20 (±30.0)	769.41 (±18.4)	48.82 (±0.53)	60.60 (±0.57)	135.21 (±2.5)	196.35 (±27.6)

Para los cultivos que estuvieron en oscuridad pero con glucosa como única fuente de carbono, se observó un pequeño incremento de la densidad óptica en la fase inicial de crecimiento la cual fue 4 veces mayor en comparación a las que no tenían glucosa. Presentaron una densidad óptica de 0.294 ($6.7x10^7$ cel.ml^{-1}), la cuál se mantuvo sin cambio a lo largo de toda la cinética.

Las densidades ópticas fueron graficadas linealmente, ya que en escala logarítmica no pueden apreciarse las diferencias observadas por el manejo de datos estadísticos.

Se observó el mismo comportamiento de crecimiento celular y concentración de proteínas (Fig. 21) que se determinaron en diferentes puntos de la curva de crecimiento y en cada una de las condiciones de crecimiento.

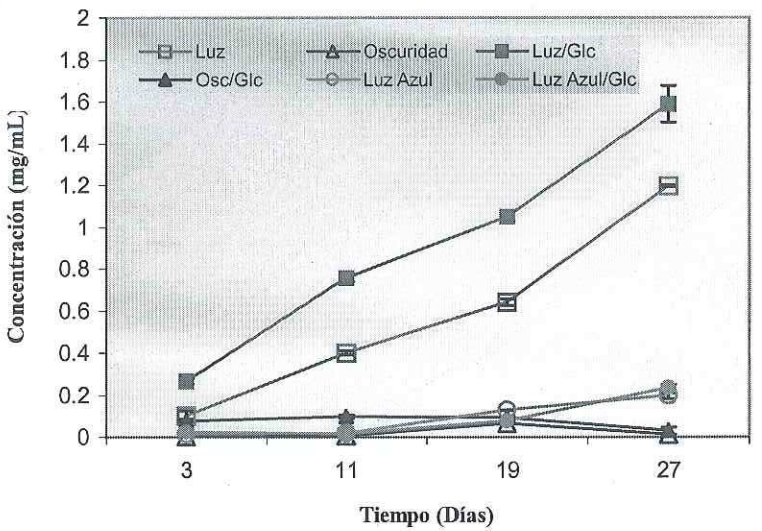


Figura 21. Valores promedio de proteínas evaluadas en diferentes puntos de la curva de crecimiento para cultivos estáticos de *Synechocystis* sp. PCC6803, mantenidos bajo exposición de luz blanca, luz azul, y obscuridad. En el medio de cultivo se consideró la adición de glucosa.

Se obtuvieron diferencias significativas en el contenido proteíco de *Synechocystis* sp. PCC6803 para los cultivos que estuvieron en presencia de luz blanca, tanto para aquellos que no se adicionó glucosa como a los que se les adicionó glucosa (P=0.000163), siendo mayor la diferencia en éste último.

Los cultivos que fueron mantenidos en luz azul con y sin glucosa (P=0.00124), al igual que los cultivos que estuvieron en completa oscuridad con y sin glucosa presentaron diferencias significativas, siendo mayor la concentración proteíca para los cultivos que en presencia de luz azul. Sin embargo, los cultivos que estuvieron en presencia de luz azul como los que estuvieron en completa oscuridad no presentaron diferencias significativas entre ellos (P=0.924 y 1.000).

La mayor concentración promedio de proteínas se obtuvo en los cultivo que estuvieron en presencia de luz blanca y con glucosa (1.59 $mg.ml^{-1}$) en el día 27 de cultivo y los que estuvieron sin glucosa (1.05 $mg.ml^{-1}$) (Fig. 20).

Los cultivos que estuvieron en presencia de luz azul presentaron una concentración máxima con valores promedio de 0.197 $mg.ml^{-1}$ y a los que se les adicionó glucosa una concentración promedio de 0.236 $mg.ml^{-1}$, ambas a los 27 días de cultivo (Fig. 20).

En el caso de los cultivos que estuvieron en completa oscuridad y sin glucosa presentaron como mayor concentración promedio 0.063 $mg.ml^{-1}$ durante el día 19 de cultivo. Los cultivos con glucosa presentaron 0.0967 $mg.ml^{-1}$ al día 11 de cultivo, por lo que se obtuvo la misma tendencia observada por el conteo de células y la medición de densidad óptica (Fig. 19 y Tabla III).

2) Actividad de piruvato cinasa en *Synechocystis* sp. PCC 6803.

Con el propósito de confirmar la presencia de dos genes diferentes y tener un mejor entendimiento del papel relativo de las dos enzimas de la cianobacteria, se midieron las actividades enzimáticas con los dos activadores de las enzimas de *E. coli*.

Las actividades específicas se obtuvieron a partir de los extractos crudos en 4 diferentes puntos de la cinética de crecimiento, por lo que se abarcaron las diferentes fases de crecimiento de *Synechocystis* sp. PCC 6803.

Las diferentes reacciones que se llevaron a cabo se muestran en la Tabla I. La reacción uno que se utilizó como control no mostró ninguna actividad, por lo tanto la enzima NADH deshidrogenasa utilizada para medir indirectamente la actividad de la enzima no reacciona con el extracto crudo por sí solo, es decir, es dependiente de PEP. Al utilizarse PEP saturado (reacción 2) la actividad fue la misma a la obtenida al adicionar AMP (reacción 3) o Fructosa-1,6-difosfato (reacción 4) al igual que sucede en *E. coli*. En la siguiente reacción donde se utilizó PEP no saturado (0.1 mM) se observó una pendiente de cero (Tabla IV), pero al adicionar el sustrato F16bP obtuvimos una pendiente de 0.02, lo cuál también pudo observarse al adicionar AMP dando una pendiente (A_{730}/min) de 0.01, las cuales muestran indirectamente la actividad de Pyk. Aunque los valores fueron bajos, estos fueron repetitivos.

Esto deja en evidencia la existencia de actividad de la enzima Pyk con los mismos activadores de las enzimas de *E. coli*. Sin embargo, para las reacciones donde se utilizó PEP sin saturación (0.1 mM) solo se presentó actividad en la presencia con F1,6bF y AMP.

Tabla IV. Condiciones de las reacciones para determinar la eficiencia de la actividad de Pyk a Temperatura de 25°C.

Reacción	PEP	AMP	F16bF	ρ_{730}/min*
1	-	-	-	0
2	1 mM	-	-	0.017
3	1 mM	0.125 mM	-	0.017
4	1 mM	-	0.125 mM	0.017
5	0.1 mM	-	-	0
6	0.1 mM	0.125 mM	-	0.01
7	0.1 mM	-	0.125 mM	0.02

* El extracto crudo se obtuvo de un cultivo bajo luz blanca y una D.O. de 3.5.

A partir de estos resultados, se decidió realizar las mediciones de Pyk en presencia de PEP sin saturar en la presencia de AMP o F1,6bF para todas las muestras. Debido a la tendencia similar con los activadores AMP y F1,6bF de las enzimas Pyk en *E. coli* y *Synechocystis* sp. PCC 6803, las dos actividades diferentes detectadas en la cianobacteria fueron nombradas como PykA y PykF.

Por esta misma razón las actividades específicas de PykA y PykF en la cianobacteria se calcularon de la misma forma que en *E. coli* (ver materiales y métodos).

Como se observa en la Fig. 21 y 22 los valores de actividad específica de PykA y PykF fluctuaron mucho a lo largo de la curva de crecimiento. Esta tendencia se observó en las diferentes condiciones de crecimiento. Las actividades más altas se obtuvieron para PykF en la parte inicial y final de los cultivos donde se llegó a obtener actividades de más de 16 UI/mg de proteína.

El análisis de varianza paramétrica mostró diferencias significativas entre los valores de actividad específica de PykA (F=5.473, P=0.0203) entre los cultivos que estuvieron con luz blanca con o sin glucosa (Fig. 21). La mayor actividad específica observada fue de 11.024 UI/mg de proteína, al inicio de la cinética de crecimiento, para los cultivos con glucosa. Posteriormente la actividad disminuyó 33 veces y se mantuvo a esos niveles el resto de la curva de crecimiento.

En cambio los cultivos que estuvieron sólo bajo luz blanca presentaron una actividad entre 9.5633 y 5.1053 UI/mg de proteína, con excepción del día 19 del cultivo en donde se observó una notable disminución de la actividad (14 veces) (Fig 21).

Por otro lado, los cultivos que estuvieron con luz azul sin glucosa no presentaron diferencias significativas con respecto a los que estuvieron con glucosa ni con los valores de las actividades de PykA obtenidas en las diferentes condiciones de cultivo (F=5.473, luz blanca P=0.0748, luz/Glc P=0.996, Osc P=0.101, Osc/Glc P=0.242 y luz azul/Glc P=0.975).

En el caso de la actividad específica de PykF no se observaron diferencias significativas entre los cultivos que estuvieron en luz blanca con o sin adición de glucosa (F=7.425, P=0.666). En cambio para las otras condiciones de cultivo se observaron diferencias significativas (osc P=0.0009, osc/glc P=0.012, luz azul P=0.0041 y luz azul/glc P=0.011).

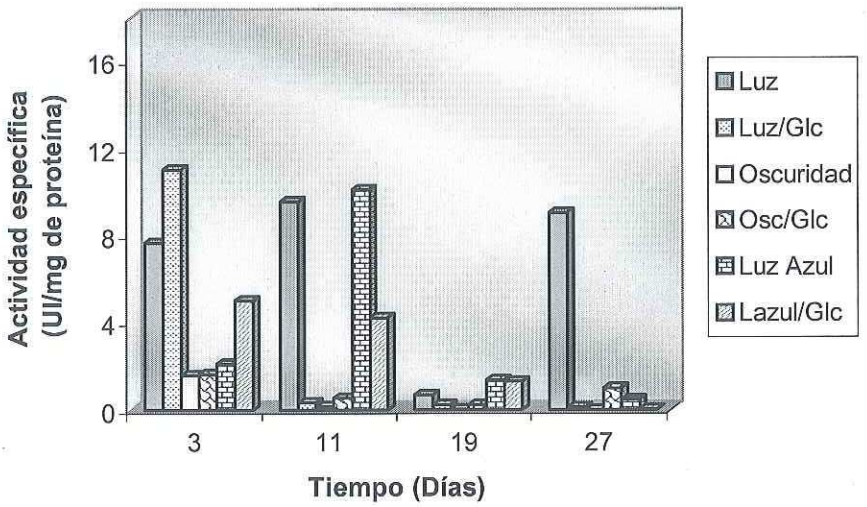


Figura 22. Valores promedio de la actividad específica de PykA en diferentes condiciones evaluada a lo largo de la curva de crecimiento para cultivos estáticos de *Synechocystis* sp. PCC6803, mantenidos bajo exposición de luz blanca, luz azul, y obscuridad. En el medio de cultivo se consideró la adición de glucosa.

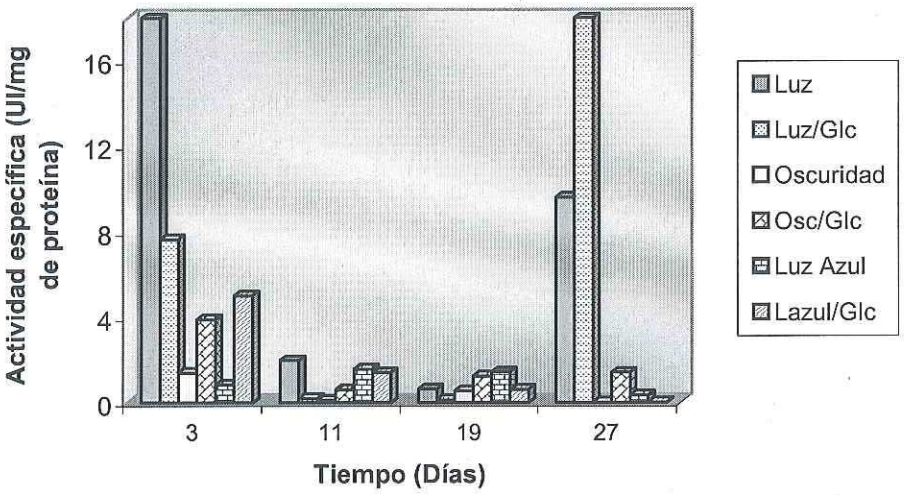


Figura 23. Valores promedio de la actividad específica de PykF en diferentes condiciones evaluada a lo largo de la curva de crecimiento para cultivos estáticos de *Synechocystis* sp. PCC6803, mantenidos bajo exposición de luz blanca, luz azul, y obscuridad. En el medio de cultivo se consideró la adición de glucosa.

La mayor actividad específica de PykF se observó en el tercer día de cultivo (19.024 UI/mg de proteína) en aquellos que estuvieron en luz blanca. Después disminuyó 9 veces y el último día aumento 14 veces (9.603 UI/mg de proteína) en comparación al tercer día de cultivo (Fig. 22). En cambio los cultivos en donde se adicionó glucosa se observó una mayor actividad en el último día de cultivo (19.328 UI/mg de proteína).

En los cultivos en la presencia de luz azul sin glucosa no se observaron diferencias significativas ($F=7.425$, $P=0.999$), ya que se mantuvo una actividad específica menor a 1.58 piruvato/min.mg de proteína a lo largo de la cinética de crecimiento. En los cultivos a los que se le adicionó glucosa se observo una actividad de 5.022 UI/mg de proteína al inicio del cultivo y se observo una disminución de la actividad a lo largo de este.

En los cultivos que estuvieron en completa oscuridad prácticamente no se detectó actividad de Pyk mientras que en los cultivos a los que se le adicionó glucosa se observó una actividad de 1.62 UI/mg de proteína al inicio del crecimiento. Sin embargo, estos no fueron significativamente diferentes entre sí ($P=0.959$) (Fig. 22).

A) Actividad de piruvato cinasa PykA y PykF en presencia de Luz Blanca.

En estas condiciones se observó que la actividad de la enzima PykF fue tres veces mayor que PykA en el día 3 de la cinética de crecimiento. Esta diferencia en la actividad se invirtió el día 11, donde se detectó mayor actividad de PykA. El día 19 la actividad disminuyó hasta 0.673 UI/mg de proteína, teniendo la misma actividad específica para el caso de las dos enzimas. Sin embargo, el último día de cultivo se observó un incremento en la actividad de PykF de 1.5 veces en comparación con PykA (Fig. 24).

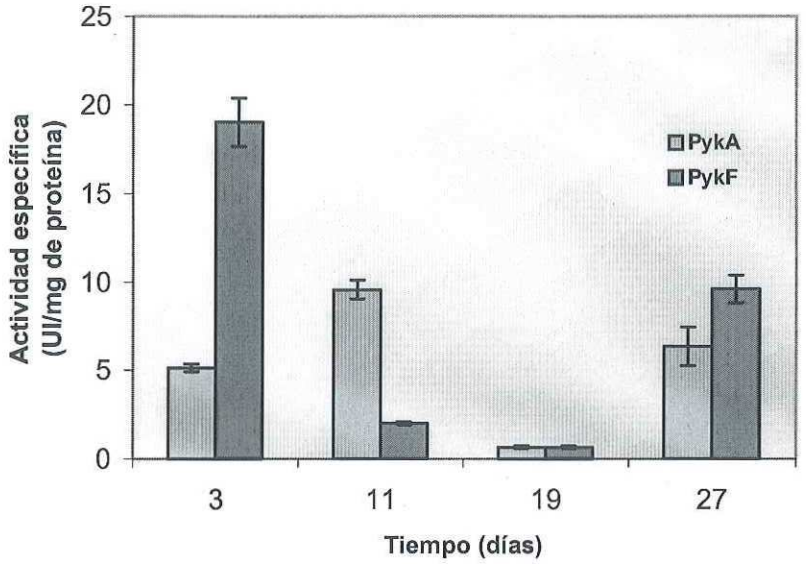


Figura 24. Valores promedio de la actividad específica de PykA y PykF para cultivos de *Synechocystis* sp. PCC6803, mantenidos bajo exposición de luz blanca sin la adición de glucosa.

Para los cultivos que se les adicionó glucosa se observó que al inicio del crecimiento se presentó una mayor actividad de PykA (11.95 UI/mg de proteína), caso contrario a los cultivos donde no se adicionó glucosa (Fig. 25). En estos últimos cultivos a partir del día

11, la actividad de las dos enzimas permaneció alrededor de 0.14 UI/mg de proteína. Sin embargo, al último día de cultivo la actividad de PykF llegó hasta 16.662 UI/mg de proteína.

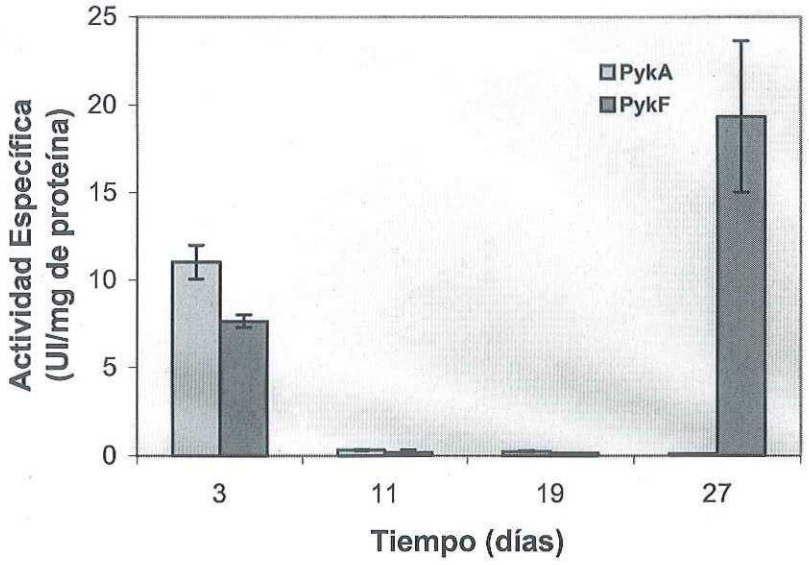


Figura 25. Valores promedio de la actividad específica de PykA y PykF para cultivos de *Synechocystis* sp. PCC6803, mantenidos bajo exposición de luz blanca con la adición de glucosa.

B) Actividad de piruvato cinasa PykA y PykF en presencia de Luz Azul.

Como se observa en la Fig. 26 los cultivos bajo luz azul no presentaron diferencias significativas (F=5.47, P=0.99) entre PykA y PykF en cada una de las etapas del cultivo, oscilando las actividades específicas entre 0.8463 y 1.5871 UI/mg de proteína. A excepción del día 11 donde se observo una actividad de 10.196 UI/mg de proteína, la cuál es 6 veces mayor a la actividad de la enzima PykF en el mismo día de cultivo.

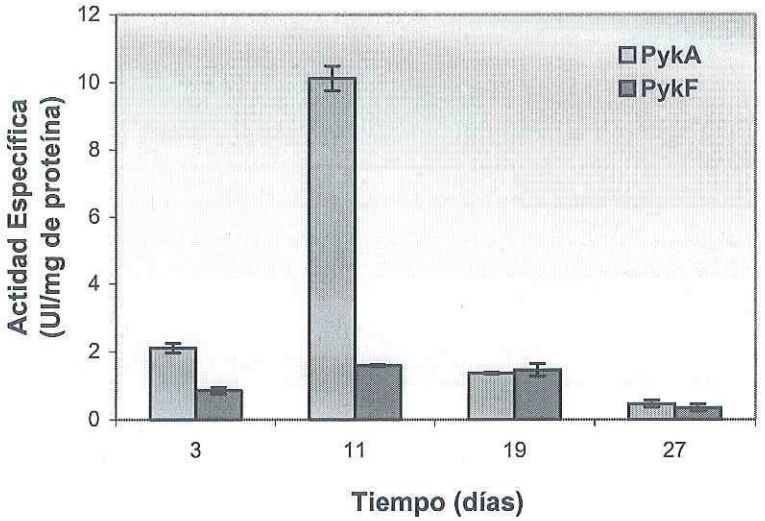


Figura 26. Valores promedio de la actividad específica de PykA y PykF para cultivos de *Synechocystis* sp. PCC6803, mantenidos bajo exposición de luz azul sin la adición de glucosa.

Los cultivos en donde se le adicionó glucosa difieren en la tendencia observada para los cultivos que estuvieron en presencia de luz azul sin la adición de glucosa, ya que la mayor actividad fue evaluada al inicio de la curva con 4.99 UI/mg de proteína, la cual fue disminuyendo gradualmente a lo largo de la curva de crecimiento (Fig. 27).

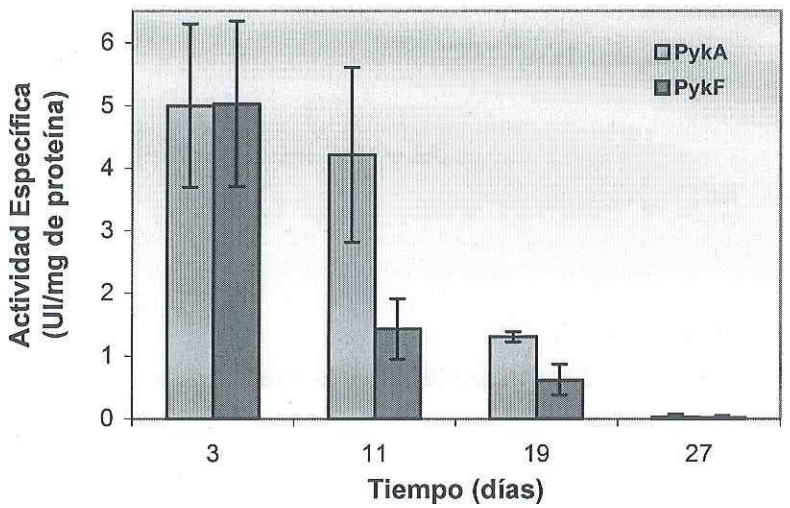


Figura 27. Valores promedio de la actividad específica de PykA y PykF para cultivos de *Synechocystis* sp. PCC6803, mantenidos bajo exposición de luz azul con la adición de glucosa.

C) Actividad de piruvato cinasa PykA y PykF en completa oscuridad.

Se observó una mayor actividad de PykA en el tercer día de crecimiento (1.4084 UI/mg de proteína) y después se observaron valores de actividad menores que fueron disminuyendo gradualmente a lo largo de la cinética de crecimiento hasta llegar a una actividad de 0.00826 μmoles/min.mg de proteína en el último día del cultivo (Fig. 28).

Por otro lado, la mayor actividad de PykF fue también el tercer día de crecimiento (1.4125 UI/mg de proteína), disminuyendo en la misma proporción que PykA, con excepción del día 19 que se observó un aumento de la actividad de PykF (0.7405 UI/mg de proteína) en comparación al punto anterior.

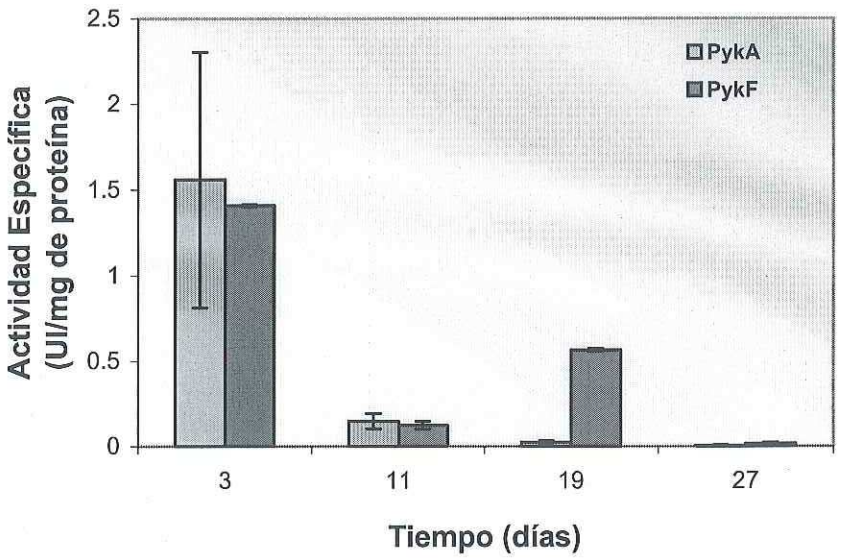


Figura 28. Valores promedio de la actividad específica de PykA y PykF para cultivos de *Synechocystis* sp. PCC6803, mantenidos completa oscuridad sin la adición de glucosa.

En los cultivos con glucosa se detectó una actividad de PykA de 1.559 UI/mg de proteína al tercer día de crecimiento, el cuál disminuyó gradualmente y el día 27 aumento a 1.02 UI/mg de proteína (Fig. 29).

En cambio para la enzima PykF en el tercer día de crecimiento se determinó una actividad de 3.912 UI/mg de proteína, el cuál disminuyó 6.5 veces el día 11 y para el día 19 aumento 1.6 veces. Se observo mayor actividad de PykF que PykA en los días 3 y 19 de los cultivos que estuvieron en oscuridad con glucosa (Fig. 28).

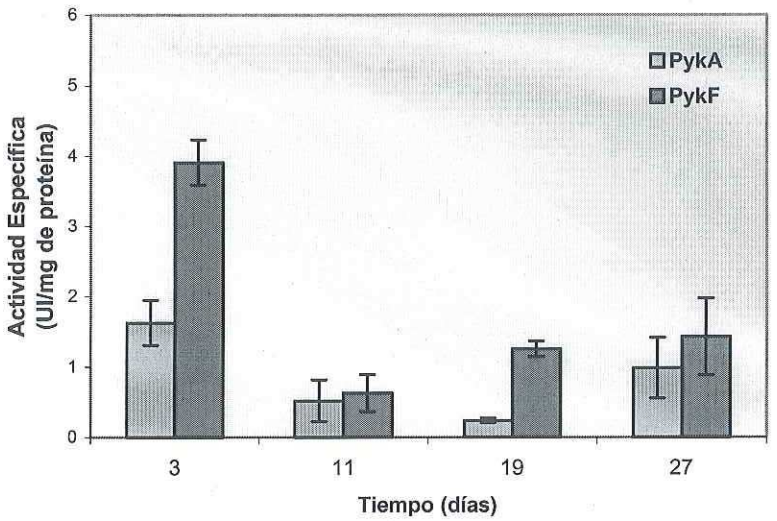


Figura 29. Valores promedio de la actividad específica de PykA y PykF para cultivos de *Synechocystis* sp. PCC6803, mantenidos bajo completa oscuridad y con la adición de glucosa.

VIII. DISCUSIÓN.

a) Análisis de secuencias de los genes de piruvato cinasa.

A la fecha sólo el genoma de la cianobacteria unicelular *Synechocystis* sp. PCC 6803 ha sido secuenciado completamente, siendo el único microorganismo fototrófico. La secuencia se encuentra depositada en el banco de genes CianoBase (Kaneko y Tabita, 1997), en donde se reporta la presencia de dos secuencias con un alto potencial de codificar la enzima piruvato cinasa, ubicadas en dos regiones diferentes del genoma, las cuales presentan una homología mayor con la piruvato cinasa tipo F de *B. stearothermophilus* (47.4%) y *Agrobacterium .vitis* (43.1%).

El alineamiento realizado con las secuencias de aminoácidos de las enzimas Pyk de diferentes organismos, mostró un alto grado de conservación entre todas las secuencias analizadas, incluyendo a las dos secuencias potenciales de codificar para piruvato cinasas de *Synechocystis* sp. PCC 6803. Esta conservación se hizo más evidente entre los sitios de unión al complejo enzimático, es decir, donde se unen los intermediarios necesarios para la formación de piruvato y los cationes que catalizan la transfosforilación del fosfoenolpiruvato al ADP.

Una característica notable, es que sólo la secuencia del gen *pyk*(sll1275) de *Synechocystis* sp. PCC6803 presenta una región carboxilo terminal larga de 52 aminoácidos, como la encontrada en los microorganismos del género *Bacillus* (Sakai y Ohta,1993). Lo anterior sugiere una mayor relación filogenética con este grupo que con el otro gen pykF de la cianobacteria (sll0587). El análisis de secuencias realizado con diferentes piruvato cinasas confirma este hecho ya que *pyk*F(sll1275) mostró un mayor

porcentaje de similitud con *B. stearothermophilus* (45%) que con el otro gen de piruvato cinasa de la cianobacteria (41.1%).

Aunque la secuencia C-terminal de *B. stearothermophilus* es mas larga que la de *pyk*F (sll1275), (aproximadamente 110 pb) ambas regiones C-terminal contienen un sitio de unión al fosfoenolpiruvato. Esta región esta altamente conservada entre enzimas relacionadas con el fosfoenolpiruvato y que es llamado motivo de unión con el PEP. Dichas enzimas son la piruvato fosfato dicinasa del maíz, la enzima I del sistema fosfotransferasa en *E. coli* y *S. typhimurium* y fosfoenolpiruvato sintasa de *E. coli,* las cuales realizan la reacción inversa de la piruvato cinasa de la mayoría de los microorganismos. En *pyk*F(sll1275) el sitio de unión al PEP fue localizado entre los aminoácidos 1507 y 1538 de la enzima.

Es poco probable que la región C-terminal larga presente en *Bacillus* y en el gen *pyk*F(sll1275) de *Synechocystis* sp. PCC6803, sea esencial para la actividad enzimática o para la regulación alostérica, ya que no todas las Pyk cuentan con esta región. Sin embargo, se ha sugerido que pudiera tener la función de estabilidad estructural o especificidad de los efectores alostéricos de la enzima (Sakai y Ohta, 1993).

Dado que el nombre de *pyk*F del gen sll1275 de la cianobacteria fue dado por la alta homología de esta secuencia con el gen *pyk*F de *B. stearothermophilus*, esto sugiere que la piruvato cinasa codificada por el gen *pyk*F(sll1275) de *Synechocystis* sp. PCC6803 pudiera tener características similares a las del gen y la enzima piruvato cinasa de *B. stearothermophilus.* El gen *pyk* de este último organismo presenta un alto porcentaje de homología con el gen *p*ykF (piruvato cinasa tipo 1) de *E. coli.* Sin embargo, la enzima es activada por AMP como sucede con la piruvato cinasa tipo 2 (PykA) de *E. coli* y no por

fructosa 1,6-bifosfato que es el activador de la tipo 1 (Sakai y Ohta, 1993). Por lo tanto, dado que se obtuvieron dos actividades diferentes de piruvato cinasa en la cianobacteria, cabe a posibilidad que la codificada por el gen sll1275 sea la que es activada por AMP y la otra por fructosa-1,6-bifosfato.

Por tanto, las dos secuencias de *pyk* de *Synechocystis* sp. PCC6803 no solo comparten las características básicas presentes en todas las enzimas de piruvato cinasas, sino también características específicas de algunos grupos. En este sentido los análisis realizados indican que a nivel de secuencia los genes sll1275 y sll0587 efectivamente codifican para 2 piruvato cinasas diferentes como sucede en *E. coli* y otras enterobacterias (Malcovati *et al.*, 1973).

Por otra parte, el árbol filogenético realizado a partir de las secuencias de aminoácidos de diferentes piruvato cinasas si bien permite inferir homologías entre las diversas especies por ser una enzima muy conservada entre éstos grupos, no resulta muy válido el hablar de relaciones evolutivas debido a que para ello se requeriría de realizar un análisis filogenético utilizando genes ribosomales como el 16S. No obstante esto, Valentín *et al.* (1993) reportan que desde un punto evolutivo, la PykF es considerada como una forma de transición de la Pyk localizada entre el ancestro PykA y las enzimas más recientes de eucariotes.

Debido a que los dos genes de piruvato cinasa de *E. coli* aparecen en brazos distantes y presentan un porcentaje de homología menor entre si (33.1%), al que presentan con otros genes de piruvato cinasa de otros organismos. Estos genes, han sido considerados como que tienen orígenes evolutivos diferentes. Desde este punto de vista, los genes de piruvato cinasa de la cianobacteria *Synechocystis* sp. PCC6803, tienen un mayor porcentaje

de homología entre sí (41.1%) mayor al presentado por los dos genes *pyk* de *E.coli.* Esto podría indicar que ambos genes tienen un mismo origen evolutivo, sin embargo para poder confirmar esto será necesario realizar otro tipo de análisis.

Cabe señalar que los genes de piruvato cinasa de la cianobacteria aparecen en el mismo grupo del árbol filogenético donde se encuentra la Pyk del plástido de *N. tabacum.* De hecho la teoría endosimbiótica sugiere la simbiosis de ciertos tipos de células con bacterias fotosintéticas, como las cianobacterias cuyo orígen se remonta desde el período Precámbrico (Golubic, 1983).

b) Clonación de los genes *pyk*F(sll1275) y *pyk*F(sll0587) en el plásmido pUC19.

La realización del análisis de restricción teórico de las secuencias de piruvato cinasa permitió determinar con precisión que enzimas estaban presentes dentro del gen y cuales no, con el fin de seleccionar los sitios de restricción que estarían en los oligonucleótidos. Además, poder seleccionar los sitios de corte para llevar a cabo la interrupción de los genes con marcadores de resistencia a antibióticos.

Lo anterior permitió realizar las digestiones de los productos de PCR de los genes *pyk* de *Synechocystis* sp. PCC6803 con las enzimas seleccionadas *Cla* I y *Eco*R V, se produjeran los fragmentos esperados por el análisis teórico. En el caso del gen *pyk*F(s110587) existe la opción de la utilización de las dos enzimas *EcoR* V y *Cla* I que también pueden utilizarse para la interrupción de los genes con marcadores de resistencia a antibióticos.

Con lo que respecta a la clonación de los fragmentos amplificados, el propósito de utilizar los oligonucleótidos del grupo I fue poder clonar la secuencia completa de cada uno

de los genes para que estos quedaran en fase de lectura con el promotor del plásmido, con el fin de obtener la expresión de la proteína de Pyk.

Sin embargo, el hecho de no haber podido obtener la clonación pudiera explicarse por el hecho de que pudiera tener efectos negativos en *E. coli* el expresar a la *pyk* de la cianobacteria en altas concentraciones, como sucede al utilizar al plásmido multicopia pUC19. Este efecto ya ha sido reportado en otros microorganismos, como *Sacharomyces cerevisiae,* donde se ha vió que altos niveles del gen silvestre o del ARNm tuvieron efectos negativos sobre el crecimiento celular (Moore, *et al.*, 1990).

Por otro lado, los fragmentos a clonar eran relativamente grandes (1602 y 1926 pb) en comparación al tamaño del plásmido utilizado (2,686 pb), siendo aproximadamente la mitad del tamaño del plásmido, lo que pudo haber dificultado la clonación o la estabilidad del fragmento dentro del plásmido. La región carboxilo terminal de los genes *pyk* son secuencias ricas en A y T's, las cuales pudieran formar asimismo estructuras terciarias e incluso interferir en la estabilidad del gen.

Dado que se comprobó que la ligación de los genes *pyk* que se estaba llevando a cabo, auque en forma parcial, y por otro lado una vez transformado este producto de ligación se observaron colonias blancas al ser plateadas en las cajas con IPTG, esto sugirió que se estaba dado un problema de expresión como el citado anteriormente. El hecho tener colonias blancas indico que el gen *pyk* se insertó dentro del sitio múltiple de clonación, lo que interrumpió al gen *LacZ* de pUC19, y por lo tanto no se expresó la proteína β-galactosidasa que en presencia de X-Gal produciría colonias azules.

Para descartar los problemas citados anteriormente se intentó la clonación de un fragmento de menor tamaño para ambos genes (1200 pb) e incluso se transformó utilizando una mutante de *E. coli* que carece de ambos genes *pyk*. Sin embargo, al no volverse a obtener transformantes y tras comprobar que la reacción de ligación se estaba llevando a cabo aunque sea en forma parcial, esto apoyó más la idea de que el problema era que la secuencia de *pyk* de la cianobacteria de alguna manera resultaba letal para *E. coli* como se sabe que ha llegado a ocurrir en otros genes (Cutting y Vander Horn, 1990).

En el caso del gen *pyk* de *B. subtilis*, este tuvo que ser clonado en dos partes, ya que no fue posible la clonación del gen completo en *E. coli* (Muñoz *et al.*, 1997). Asimismo al tratar de clonar el gen *pyk*F de *B. subtilis* se le presentaron los mismos problemas como en el caso de los genes de *Synechocystis* sp. PCC6803.

Al analizar el índice antigénico de las secuencias *pyk* de la cianobacteria se observó una relación directa con el grado de hidrofobicidad de las secuencias. Esto es debido a que el índice antigénico es determinado según los valores de hidrofobicidad de la proteína, la probabilidad de superficie expuesta, flexibilidad y estructura secundaria. De esta manera un alto índice antigénico indicaría también una superficie expuesta y un menor grado de flexibilidad, resultando estructuras secundarias menos complejas.

Dado que los patrones de picos o crestas del índice antigénico obtenidos para *Synechocystis* sp. PCC6803 y *B. subtilis* fueron semejantes entre sí, pero diferentes a los de *E. coli* (ver anexo). Esto sugiere que al ser hidrofóbicas son menos estables en la célula ya que no es compatible con el citoplasma. Además existirían mas regiones con superficie expuesta, ya que presentan menor grado de flexibilidad por lo que son reconocidas como extrañas para la célula provocando que sea letal.

En cambio para *E. coli* que presenta menor índice antigénico y mayor grado de flexibilidad tiene un menor número de regiones expuestas a la superficie, además de ser hidrofílica, por tanto es mas compatible con el citoplasma.

Debido a los resultados obtenidos con este análisis, se decidió realizar la amplificación de los genes de un tamaño menor para reducir el índice antigénico y éste no causar problemas a las células de *E. coli* al momento de transformar el producto de ligación. Sin embargo, aparentemente la región amplificada continuó siendo letal y no pudieron aislarse plásmidos con el gen insertado a partir de las colonias blancas que se obtuvieron. Por lo tanto, se tendría que probar ya sea con un fragmento todavía mas pequeño o bien implementar una metodología alternativa para comprobar cual de los genes corresponde a cada enzima, así como para otros estudios del metabolismo.

c) Crecimiento de *Synechocystis* sp. PCC6803 en diferentes condiciones de cultivo.

Anderson y McIntosh (1991) reportan que el crecimiento de *Synechocystis* sp. PCC6803 en presencia de luz blanca, medio BG11 y con agitación, presentó una densidad óptica menor a 1.0 a los 10 días de cultivo. Sin embargo, a ese mismo tiempo en este trabajo se obtuvo una densidad óptica de 1.58 y a los 27 días, estando el cultivo en fase estacionaria, se obtuvo una densidad óptica 7.77 alcanzando mayor biomasa final que lo reportado. Estas diferencias pueden deberse a las condiciones del cultivo ya que los autores utilizaron agitación por rotación a 150 rpm y pulsos de luz, mientras que en este experimento la agitación fue por burbujeo de aire y con fotoperíodo (12 hr- 12 hr).

También se menciona que con luz azul se obtiene una densidad óptica de 1.0 a los 10 días encontrándose en fase estacionaria y nosotros obtuvimos 0.98, coincidiendo en éste

punto. Sin embargo, el crecimiento se mantuvo a 0.98 (±0.22) durante todo el tiempo que continuó el cultivo, difiriendo estos resultados con lo reportado por Anderson y McIntosh (1991), ya que mencionan que tienen un crecimiento semejante entre los cultivos en presencia de luz blanca y luz azul.

El hecho de que los cultivos en presencia de luz azul presentaran un mayor crecimiento con glucosa, se puede deber a que la luz azul activa el crecimiento heterotrófico en ésta cianobacteria y la posibilidad de regulación en el ciclo celular o división celular en el ámbito fisiológico o nivel de expresión de genes (Anderson y McIntosh, 1991). Se ha reportado que existe un efecto positivo en las enzimas glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, 6-fosfogluconato deshidrogenasa y enzimas glicolíticas en plantas y algas verdes. Esto podría ser una razón para el aumento de crecimiento de la cianobacteria cuando está en presencia de glucosa y luz azul, ya que el crecimiento fue 1.6 veces mayor en comparación a los cultivos sin glucosa. Por lo tanto, *Synechocystis* sp. PCC6803 es capaz de crecer fotoheterotróficamente en luz azul como en luz blanca.

Por el contrario en los cultivos que estuvieron en oscuridad con y sin glucosa, no se presentó crecimiento, por tanto el crecimiento de la cianobacteria *Synechocystis* sp. PCC 6803 es rigurosamente en presencia de luz, ya que no puede crecer heterotróficamente bajo completa oscuridad confirmando lo descrito por Anderson y McIntosh (1991).

Tandeau de Marsac y Houmard (1993) reportan que ésta incapacidad de la mayoría de las cianobacterias por crecer en oscuridad a expensas de una fuente de carbono exógeno, se debe a la falta de un eficiente sistema de transporte de azúcar para introducirlo a la célula y/o por un rango bajo del sistema de respiración para la síntesis de ATP.

d) Actividades de las piruvato cinasa PykA y PykF de *Synechocystis* sp. PCC6803.

Para llevar a cabo las mediciones de la actividad de Pyk se estandarizó la metodología para *Synechocystis* sp. PCC6803, aunque se tomó como base la metodología de *A. variabilis* (Perarce y Carr, 1969). Para ello fue necesario evaluar el efecto de PEP saturado y sin saturar así como la adición de activadores tales como AMP y F1,6bF, que son requeridos por las enzimas de *E. coli*, PykA y PykF, respectivamente. Dado que para *Synechocystis* sp. PCC6803 se obtuvo actividad con PEP sin saturar tanto con AMP como F1,6bF igual que *E. coli*, no fue raro pensar que se podía tratar de dos isoenzimas producto de los dos genes diferentes encontrados en la cianobacteria.

Pearce y Carr (1969) reportan actividad sólo con F1,6bF en *A. variabilis* lo cual aparentemente no presentan una curva sigmoidal, a diferencia de *E. coli* que sí presenta una curva característicamente sigmoidal.

Por analogía de las actividades presentadas en *Synechocystis* sp. PCC6803 con *E. coli,* las enzimas de piruvato cinasa de la cianobacteria se nombraron como PykA y PykF, dado que fueron activadas por AMP y F1,6bF, respectivamente.

A diferencia de *E. coli* en que ambas actividades enzimáticas se mantienen constantes, a lo largo de toda la cinética de crecimiento, en *Synechocystis* sp. PCC6803 la actividad de ambas enzimas fluctuó a lo largo del cultivo en todas las condiciones lo que sugiere que estas enzimas o sus genes están regulados fuertemente y dependiendo de las necesidades metabólicas de la célula es que se expresa uno u otro gen o se activa una u otra enzima. Asimismo las actividades obtenidas por la cianobacteria fueron muy superiores a las mostradas por *E. coli* y otros microorganismos, esto podría deberse a que hay alta síntesis de los diferentes activadores y efectores necesarios para la actividad de la enzima,

además que en *Synechocystis* sp. PCC6803 existen 12 números de copias genómicas por célula (Labarre *et al*; 1989). Por lo tanto, existe un mayor nivel de la enzima Pyk en *Synechocystis* sp. PCC6803 en comparación a otros microorganismos con menor número de copias, como *E. coli* que contiene un solo cromosoma. Asimismo, dado que en cianobacterias no existe el sistema de la fosfotransferasa de azúcares (PTS),el cuál es el principal formador de piruvaro en la célula en *E. coli*, las enzimas de piruvato cinasa en cianobacterias pudieran tener un papel todavía mas relevante que en *E. coli.* Lo anterior la hace a *Synechocystis* sp. PCC6803 una cepa de gran interés para la producción de compuestos de interés biotecnológico que utilicen piruvato como sustrato como es el caso de los pigmentos carotenoides y el polihidroxibutirato que se utiliza para la producción de plástico biodegradables.

Por otro lado, como se pudo observar al comparar la actividad de PykA y PykF en las diferentes condiciones, en muchas de las ocasiones cuando se obtuvo una actividad alta de una, la actividad de la otra fue baja lo que se podría explicar que por un lado la enzima que es activada por AMP funciona cuando la carga energética de la célula es baja (poco ATP y mucho AMP) y la que es activada por F1,6bF cuando la célula cuenta con una fuente de carbono que es catabolizada por la vía de Emdem Meyerhoff Parnas.

En los cultivos en donde se utilizan sustratos glicolíticos, como la glucosa utilizada en estos experimentos, la enzima PykF de *E. coli* está principalmente activa, mientras que PykA lo está en la presencia de sustratos gluconeogénicos (Malcovati *et al.*, 1973). Sin embargo en la cianobateria *Synechocystis* sp. PC6803 no se presentó una relación directa entre la actividad de PykF de *Synechocystis* sp. PCC6803 con la concentración del azúcar presente en el medio de cultivo ya que no se observó una mayor actividad de PykF al inicio

de las curvas de crecimiento, que es donde se esperaría que hubiera glucosa, y una baja actividad al final del cultivo. Suponemos que se encuentra mayormente activa la vía de pentosas fosfato, la cuál es utilizada principalmente en comparación de otras vías en cianobacterias.

La excepción a esta fueron los cultivos de *Synechocystis* sp. PCC6803 que estuvieron en presencia de luz azul, donde sí se observó una disminución de la actividad de PykF al disminuir la glucosa. Dado que se detectó un aumento de crecimiento en los cultivos con glucosa es lógico pensar que al transcurrir el tiempo en los cultivos disminuía la concentración de glucosa. Tampoco se detectaron altos niveles de actividad de PykA al final de la curva de crecimiento, ya que los valores se mantuvieron fluctuando a lo largo del cultivo y en algunas condiciones incluso disminuyó al final de este cultivo. Esto podría deberse a que hay un efecto positivo de la luz azul con algunas enzimas de la vía de pentosas fosfato como se ha reportado en plantas y otros microorganismos fotosínteticos (Ruyters, 1981). En cambio en aquellos que se les adicionó glucosa se presentó una correlación directa entre la actividad de las dos enzimas y la concentración de glucosa. En este cultivo también se observó mayor actividad de PykA que de PykF.

En los cultivos en oscuridad con glucosa se observó mayor actividad de PykF a lo largo de la curva, probablemente porque se encontraba más activa la vía glicolítica para metábolizar la glucosa, ya que al no estar en presencia de luz existe baja actividad de la vía pentosas fosfato. Los cultivos que no se les adicionó glucosa sólo al inicio se observó mayor actividad de PykA probablemente podría deberse a la adaptación de la cianobacteria, que no se realizó un preinóculo de estos cultivos en oscuridad.

Podría pensarse entonces que las enzimas Pyk están reguladas por otros sustratos diferentes a *E. coli*, así como por condiciones ambientales o factores externos que modifican el metabolismo de la célula. El conocer estos factores y los sustratos específicos resultan de gran interés si se desea realizar cultivos con una mayor producción de piruvato.

En la reacción enzimática no sólo se produce piruvato para que sea metabolizado por el ciclo de lo ácidos tricarboxílicos o para la producción de pigmentos, aminoácidos y otros compuestos, sino que también se produce ATP a nivel de sustrato, lo que aumenta la carga energética de la célula. Por otro lado la vía de Emden Meyerhoff Parnas podría ser que se encuentre activa, aunque probablemente en menor grado que la vía de las pentosas fosfato, ya que según los estudios en realizados *A. variabilis* (Pearce y Carr, 1969), esta última parece ser la vía metabólica principal para el metabolismo de la glucosa en cianobacterias. Sin embargo, no hay que olvidar que las vías metabólicas son flexibles y varios intermediarios metabólicos pueden participan o son producto de diferentes vías metabólicas.

En lo que respecta a los diferentes cultivos de *Synechocystis* sp. PCC6803, al parecer existe una relación entre de las condiciones en las que fueron crecidas con la actividad de las enzimas de piruvato cinasa, ya que las mayores actividades de la enzima Pyk se presentaron en los cultivos que estuvieron en presencia de luz blanca con glucosa y sin glucosa.

El hecho de que la actividad de PykF disminuya a la mitad de la cinética de crecimiento y que se observe una mayor actividad de PyKA, probablemente podría deberse a que en cianobacterias se utiliza mayormente la ruta de pentosas fosfato. En *E. coli* se sabe que PykA además de ser activada por AMP también es activada por ribosa-5-fosfato

que es un intermediario en la vía de pentosas fosfato (Sakai y Otha, 1993).

En lo que se refiere a organismos fotótrofos se tienen reportes de la presencia de diferentes enzimas de piruvato cinasa en ciertos órganos y etapas de crecimiento de plantas como *R. communis* y *N. tabacum*. Sin embargo, hablando específicamente de microorganismos, la cianobacteria *Synechocistys* sp. PCC6803 junto con la microalga *Chlorella* (Ruyters, 1981) son los dos únicos microorganismos fotótrofos, que se conocen a la fecha, que presentan dos isoenzimas de piruvato cinasa.

VIII. CONCLUSIONES.

- Las secuencias de *pyk*F(sll1275) y *pyk*F(sll0587) de *Synechocystis* sp. PCC6803 presentan un alto grado de homología con las secuencias de piruvato cinasa depositadas en los bancos de datos, mostrando una gran conservación en los sitios de unión de PEP, F1,6bF y K^+.
- La secuencia del gen *pyk*F(sll1275) *Synechocystis* sp. PCC6803 presenta una región carboxilo terminal larga similar a la presente en las piruvato cinasas del género *Bacillus* con la que presenta mayor similitud en comparación a otras piruvato cinasas.
- La secuencia C-terminal del gen *pyk*F(sll1275) presenta una región de alta homología con *B. stearothermophilus*, llamado motivo de unión del PEP.
- Las secuencias potenciales de codificar para las piruvato cinasas de *Synechocystis* sp. PCC6803 tiene un mayor porcentaje de homología con la piruvato cinasa activada con F1,6bF de otros organismos que con la piruvato cinasa activada con AMP.
- *Synechocystis* sp. PCC6803 no es capaz de crecer en glucosa en ausencia de luz, por lo que se confirma lo reportado por Ripka (1972) sobre su capacidad de crecimiento fotoheterotrófico pero no quimioheterotrófico, como ha sido reportado por otros autores.
- Se implementó la técnica de medición de actividad de la enzima piruvato cinasa para la cianobacteria *Synechocystis* sp. PCC6803.
- Se detectaron dos actividades de piruvato cinasa diferentes. Una en la presencia de PEP y AMP y la otra de PEP y F1,6bF como sucede en *E. coli*, por lo que fueron nombradas como en este microorganismo (PykA y PykF, respectivamente).

- A diferencia de *E. coli* que muestra una actividad de PykA y PykF constante a lo largo de la curva de crecimiento en MM con glucosa, en *Synechocystis* sp. PCC6803 las actividades de ambas enzimas fluctuaron a lo largo de la curva en todas las condiciones examinadas.
- La mayor actividad de PykA en *Synechocystis* sp. PCC6803 fue obtenida en la presencia de luz blanca actividad que se mantuvo en la mayoría de los puntos analizados. Asimismo se detectaron actividades importantes al inicio de la curva en luz con glucosa y en la fase exponencial de crecimiento con luz azul.
- A diferencia de *E. coli*, la enzima activada por frustosa-1,6-bisfosfato (PykF) no parece estar principalmente activa en la presencia de sustratos glicolíticos.
- El hecho de que la luz azul tenga un efecto positivo en la actividad de PykA y no en la de PykF, sugiere que las enzimas son activadas en diferentes condiciones energéticas y metabólicas de la célula. Además coincide con reportes de aumentos de actividad de enzimas glicolíticas en plantas y algas verdes.
- La actividad de PykA de la cianobacteria llegó a ser hasta 250 veces la actividad mostrada por *E. coli* en MM/glucosa, mientras que para PykF esta fue 40 veces mayor a lo obtenido para PykF de *E. coli.*
- La alta actividad de piruvato cinasa observada en algunas condiciones de crecimiento de *Synechocystis* sp. PCC6803 implica una gran disponibilidad de piruvato que puede ser utilizado para la biosíntesis de compuestos de interés biotecnológico que utilicen al piruvato como sustrato.

- Tanto los resultados del análisis de secuencias como los de actividad enzimática sugieren la presencia de dos piruvato cinasas en la cianobacteria *Synechocystis* sp. PCC6803, reguladas de manera diferencial.

IX. LITERATURA CITADA.

Allen M.M. 1968. Simple conditions of growth of unicellular blue-green on plates. J. Phycol. 4: 1-4 p.

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

Ausbel F., Brent R., Kingston R., Moore D., Seidman J., Smith J. y Struhl K. 1992. Short Protocols. En Molecular Biology. 2da Edición. Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons. A5-12pp.

Bartley G.E. y Scolmik P.A. 1989. Plant carotenoids: pigments for photoprotection, visual attraction, and human health. The Plant Cell 7: 1027-1038 p.

Blakeley S., Gottlob-McHugh S., Wan J., Crews L., Miki B., Ko K. y Dennis D. 1995. Molecular characterization of plastid pyruvate kinase from castor and tabacco. Plant Molecular Biology 27: 79-89 p.

Boles E., Jong-Gubbels P. y Pronk J. 1998. Identification and Characterization of MAE1, the *Saccharomyces cerevisiae* Structural Gene Encoding Mitochondrial Malic Enzyme. Journal of Bacteriology. 180(11): 2875-2882 p.

Boles E., Schulte F., Miosga T., Freidel K., Schlüter E., Zimmermann F., Hollenberg C. y Heinisch J. 1997. Characterization of a Glucose-Repressed Pyruvate Kinase (Pyk2p) in *Saccharomyces cerevisiae* that is catalytically insensitive to fructose-1,6-Biphosphate. Journal of Bacteriology. 179(9): 2987-2993 p.

Broedel S. Jr. y Richard E. W. Jr. 1990. Genetic, tagging, cloning, and DNA sequence of the *Synechococcus* sp. PCC7942 gene (*gnd*) encoding 6-phosfhogluconate

dehydrogenase. Journal of Bacteriology 172(7): 4023-4031 p.

Burke R., Tekamp-Olson P. y Najarian R. 1983. The isolation, characterization and sequence of the pyruvate kinase gene of *Saccharomyces cerevisiae.* The Journal of Biological Chemistry 258(4): 2193-2201.

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

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

Charng Y.Y. 1992. Molecular cloning and expression of the gene encoding ADP-glucose pyrophosphorylase from the cyanobacterium *Anabaena sp.* 20(1): 37-47 p.

Chávez S., J. C. Reyes, F. Chauvat, F.J. Florencio y P. Candau. 1995. The NADP-glutamate dehydrogenase of the cyanobacterium *Synechocystis* 6803: cloning, transcripcional analysis and disruption of the *gdh*A gene. Plant Molecular Biology 28: 173-188 p.

Consler T., Suzanne H. Woodard y James C. Lee. 1989. Effects of primary sequence differences on the global structure and function of an enzyme: A study of pyruvate kinase isozymes. Biochemistry. 28: 8756-8764 p.

Creighton, D.J. y I.A. Rose. 1976. Oxalacetate decarboxylase activity in muscle is due to pyruvate kinase. J. Biol. Chem. 251(1): 69-72 p.

Curatti L., Folc E., Desplats P., Abratti G., Limones V., Herrera-Estrella L. y Salerno G. 1998. Sucrose-Phosphate Synthase from *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803: Identification of the *sps*A Gene and Characterization of the Enzyme Expressed in *Escherichia coli.* Journal of Bacteriology. 180(24): 6776-

6779 p.

Cutting M. y Vander Horn P. 1990. In: Molecular Biological Methods for *Bacillus subtilis.* Ed. John Wiley & Sons, 1250 pp.

Ernest E., Callens M., Uttaro A., Chevalier N., Opperdoes F., Muirhead H. y Michels P. 1998. Pyruvate Kinase of *Trypanosoma brucei*: Overexpression, Purification, and Functional Characterization of Wild-Type and Mutated Enzyme. Protein expression and purification. 13: 373-382 p.

Ernest I., Opperdoes F.R. y Michels P.A.M. 1994. Cloning and sequence analysis of the gene encoding pyruvate kinase in *Trypanoplasma borelli.* Bioch. and Biophysical Research Communication. 201(2): 727-732 p.

Emmerling M., Bailey J.E. y Sauer U. 1999. Glucose Catabolism of *Escherichia coli* Strain with Increased Activity and Altered Regulation of Key Glycolytic Enzymes. Metabolic Engineering. 1:117-127 p.

Ferino F. y Chauvat F. 1989. A promoter-probe vector-host system for the cyanobacterium, *Synechocystis* PCC6803. Gene. 84: 257-266 p.

Gibson L.J. y Tabita F.R. 1996. The molecular regulation of the reductive pentose phosphate pathway in proteobacteria and cyanobacteria. Arch. Microbiol. 166: 141-150 p.

Ferris M.J. y Hirsch C.F. 1991. Method for Isolation and Purification of Cyanobacteria. Appl. Environ. Microbiol. 57(5):1448-1452 p.

Golden S. 1999. Comunicación personal. Department of Biology. Texas University. Texas, USA.

Golubic S. 1983. Stromatolites, fossil and recent: a case history. En: P. Westbroek and E.

W. de Jong Eds. Biomineralization and Biological Metal Acumulation 313-326 p.

Gubler M., M. Jetten, S. Ho Lee y A. J. Sinskey. 1994. Cloning of the pyruvate kinase gene (*pyk*) of *Corinebacterium glutamicum* y site-specific inactivation of *pyk* in a lysine-producing *Corinebacterium glutamicum* Strain. App. Env. Microbiology. 60(7): 2494-2500 p.

Kaneko T., S. Sato, H. Kotani, A. Tanaka, E. Asamizu, Y. Nakamura, N. Miyajima, M. Hirosawa, M. Sugiura y S. Tabata. 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: 109-136 p.

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

Katayama Mitsunori, Yoh Wada y Masayuki Ohmori. 1995. Molecular Cloning of the Cyanobacterial Adenylate Cyclase gene from the Filamentous Cyanobacterium *Anabaena cylindrica*. Journal of Bacteriology. 177(13): 3873-3878 p.

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

Kodaki T., Katagiri F., Asano M., Izui K. y Katsuki H. 1985. Cloning of phosphoenolpyruvate carboxylase gene from a cyanobacterium, *Anacystis nidulans*, in *Escherichia coli.*. J Biochem 97(2):533-539.

Kohler U., R. Cerff y H. Brinkmann. 1996. Transaldolase genes from the cyanobacteria

Anabaena variabilis and *Synechocystis* sp. PCC6803: comparison with other eubacterial and eukaryotic homologues. Plant Molecular Biology. 30: 213-218 p.

Kuhlemeier C.J., V.J.P. Teeuwsen, M.J.T. Janssen y G.A. van Arkel. 1984. Cloning of a third nitrate reductase gene from the cyanobacterium *Anacystis nidulans* R2 using a shuttle cosmid library. Gene. 31: 109-116 p.

Laughlin L.T. y Reed G.H. 1997. The monovalent cation requirement of rabbit muscle pyruvate kinase is eliminated by substitution of lysine for glutamate 117. Archies of Bioch. and Biophysics. 348(2): 262-627.

Lowry O., Rosebrough N., Farr A. y Randall R. 1951. Protein determination with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.

Malcovati M., G. Valentini, H.L. Kornberg 1973. Two forms of pyruvate kinase in *E. coli*: Their properties and regulation. Acta Vitamin. Enzymol. 27: 96-111 p.

Malcovati M. y Valentini G. 1982. AMP and fructose 1,6 bisphosphate-activated pyruvate kinase from *Escherichia coli.* Met. Enzymol. 90: 170-179.

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

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

Moore P. A., Bettany, A.J.E. y Brown, A. Jr. 1990. Multiple copies of the pyruvate kinase gene offect yeast cell growth. J. Gen Microbiol. 136: 2359-2366 p.

Muirhead H., D.A. Clayden, D. Barford, C.G. Lorimer, L.A. Fothergill-Gilmore, E. Schiltz y W. Schmitt. 1986. The Structure of Cat Muscle Pyruvate Kinase, The EMBO Journal. 5(3): 475-481 p.

Muñoz Márquez E., S. LeBorgne, F. Bolivar y F. Valle. 1997. Molecular cloning of the Gene that codes for the Pyruvate Kinase of *Bacillus Subtilis*, primary characterization of a strain carrying thes Gene insertionally inactivated. Microbiol. 39: 129-140 p.

Muñpz Márquez E. 1999. Comunicación personal. Facultad de ciencias químicas UABC. Tijuana, B.C.

Noguchi, T., H. Inoue y T. Tanaka 1986. The M1 and M2 type isozymes of the pyruvate kinase are produced from the same gene by alternative RNA splicing. J. Biol. Chem. 261, 13807-13812 p.

Paniagua Michel J. Bückle Ramirez F., Granados Machuca C. y Loya Salinas D. 1989. Manual de metodologías y alternativas para el cultivo de microalgas. Segunda edición. CICESE. Ensenada, B.C.

Pearce J. y Carr N.G. 1969. The Incorporation and Metabolism of Anabaena *variabilis*, J. Gen. Microbiol. 54: 451-462 p.

Patterson G. .M. L. 1996. Biotechnological Applications of Cyanobacteria. J. of Scientific & Industrial Research. 55: 669-684 p.

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

Ponce E., Flores N., Martinez A., Valle F. Y Bolivar F. 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.

Ruyters, G. 1981. Isoenzymes of pyruvate kinase in a chlorophyll-free *Chlorella* mutant and their blue-light-mediated interconversion. Z. Pflanzenphysiol. 103: 109-113.

Saeki T., M. Hori y H. Umezawa. 1974. Pyruvate kinase of *Escherichia coli*. Its role in supplying nucleoside triphosphates in cells under anaerobic conditions. J. Biochem. 76: 631-637 p.

Sakai H. y Ohta T. 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 and pyruvate kinase constitute an operon. Eur. J. Biochem. 277: 851-859 p.

Sambrook D., Fristsch J.E.F. y Maniatis. 1989. Molecular cloning. A laboratory manual, 2da ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. N.Y. USA.

Sánchez S. M. P. y Voltolina D. 1996. Effect of blue-green light on growth rate and chemical composition of three diatoms. Journal of Applied Phycology 8: 419-423 p.

Scanlan D., Shanthy S., Julie N., Micholas H. y Noel G. Carr. 1995. Characterization of *zwf* mutant of *Synechococcus* sp. PCC7942. Journal of Bacteriology. 177(9): 2550-2553 p.

Steiner P., Martin F., James E.B. y Uwe S. 1998. Cloning and expression of the

Zymomonas mobilis pyruvate kinase gene in *Escherichia coli*. Gene. 220: 31-38 p.

Tandeau de Marsac N. y Houmard J. 1993. Adaptation of cyanobacteria to environmental stimuli: new steps towards molecular mechanisms. FEMS Microbiology Reviews. 104:119-190 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 Industrial Microbiology. 17: 458-462 p.

Valentini G., Chiarelli L., Fortín R., Speranza M., Galizzi A. y Mattevi A. 1993. The Allosteric Regulation of Pyruvate Kinase. J. Biol. Chem. 275(24):18145-18152 p.