

03072²⁰
2eje.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

**PAPEL DE LOS GENES DE PIRUVATO CINASA Y SUS
PRODUCTOS EN LA FORMACION DE PIRUVATO EN
*Escherichia coli***

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA
P R E S E N T A:
BIOL. ELIZABETH PONCE RIVAS

1994

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado Designado:

PRESIDENTE: Dr. Francisco Gonzalo Bolívar Zapata

VOCAL: Dr. Armando Gómez Puyou

SECRETARIO: Dr. Miguel Lara Flores

SUPLENTE: Dra. Elda Guadalupe Espín Ocampo

SUPLENTE: Dra. Alejandra Vázquez Ramos

INDICE

	PAGINA
ABREVIATURAS	1
RESUMEN	2
INTRODUCCION	3
OBJETIVOS	9
MATERIALES Y METODOS	10
RESULTADOS	
- Clonación de los genes <i>pykA</i> y <i>pykF</i>	16
- Generación de mutantes <i>pykA</i> y <i>pykF</i> inactivados por inserción	16
- Efecto de las mutaciones <i>pykA</i> y <i>pykF</i> en el crecimiento celular	18
- Utilización de glucosa en las mutantes <i>pyk</i>	19
- Producción de CO ₂ en las mutantes <i>pyk</i>	22
- Efecto de las mutaciones <i>pyk</i> en el crecimiento celular en un fondo PTS	24
- Comparación de secuencias de piruvato cinasas	27
DISCUSION	37
CONCLUSIONES	42
BIBLIOGRAFIA	44

ABREVIATURAS

a.a. - aminoácido

AMP- adenosin monofosfato

ATP- adenosin trifosfato

CPR- velocidad de producción de CO_2

CTAB- hexadecil trimetil bromuro de amonio

EDTA- ácido etilaminotetracético

GTP- guanosin trifosfato

MM- medio mínimo

NADH- nicotinamida-adenin dinucleótido fosfato reducido

OUR- velocidad de producción de oxígeno

CR- reacción en cadena de la polimerasa

PEP- fosfoenolpiruvato

PEPCasa- fosfoenolpiruvato carboxilasa

PT- fosfotransferasa

PTS- sistema de la fosfotransferasa

QCO₂-coeficiente de producción de CO_2

RQU- coeficiente respiratorio

SDS- dodecil sulfato de sodio

TCA- ciclo de los ácidos tricarboxílicos

TD- tiempo de duplicación

U. I. - unidad internacional

RESUMEN

Los genes estructurales de las dos isoenzimas de piruvato cinasa, *pyk A* y *pykF* de *Escherichia coli* fueron clonados. Estos DNAs fueron usados después para interrumpir uno o ambos genes en el cromosoma de *E. coli*. Con estas construcciones se estudió la participación de éstas isoenzimas en la formación de piruvato. Resultados preliminares mostraron que la interrupción del gene *pykF* a nivel cromosomal, produjo alteraciones en los tiempos de duplicación celular. Estos resultados fueron observados sólo después de un cambio de medio de cultivo (de medio mínimo con glucosa y casaminoácidos a uno con medio mínimo con glucosa) y fue más evidente en cepas que carecen de un sistema funcional de transporte de otros azúcares. Nuestros resultados sugieren que bajo las condiciones examinadas, la piruvato cinasa tipo I (codificada por *pykF*) parecería tener un papel más importante en la síntesis de piruvato. Asimismo, la comparación de secuencias realizada a nivel de nucleótidos entre *pykA* y *pykF* así como a nivel de aminoácidos entre piruvato cinasas de diversos organismos incluyendo las de *E. coli*, sugieren que a diferencia de lo reportado por Gilbert y colaboradores (1989), las piruvato cinasas de *E. coli* parecen tener un mismo origen evolutivo.

INTRODUCCION

Las bacterias entéricas como *Escherichia coli* al utilizar glucosa como fuente de carbono producen glucosa 6-P como primer paso en el metabolismo de éste compuesto. Aproximadamente el 70 % de la glucosa 6-P que *E. coli* utiliza para crecer bajo condiciones aeróbicas es metabolizada a través de la vía glicolítica de Embden-Meyerhof-Parnas (Fig. 1). Los productos glicolíticos son después metabolizados en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA). El metabolismo de la glucosa sirve tanto como fuente de energía como de precursores para la síntesis de aminoácidos y otros constituyentes celulares. El otro 30 % de la glucosa 6-P es metabolizado normalmente a través de la vía de las pentosas fosfato que produce NADPH para procesos anabólicos (Miller, 1987).

El piruvato es un intermediario clave en reacciones de catabolismo y biosíntesis en virtualmente todas las células. A partir del piruvato se pueden producir un gran número de compuestos en *E. coli*. Su formación depende de las condiciones de crecimiento y de las necesidades del organismo. Así, el piruvato puede ser oxidado vía acetyl Co-A a través del ciclo de Krebs para generar más energía metabólica (Fig. 2) o servir como precursor en la biosíntesis de aminoácidos de la familia del piruvato (alanina, valina y leucina) (Malcovati, 1973; Garrido, 1977). En condiciones anaeróbicas, utilizando glucosa como fuente de carbono y energía, se puede formar: lactato, acetato, etanol, formiato, CO_2 , etc. (Knappe, 1987; El-Mansi, 1989). Debido a su importancia, existen muchas rutas metabólicas que pueden producir éste compuesto. Cuando los microorganismos como *E. coli* son crecidos en glucosa como la única fuente de carbono, obtienen la mayor parte del piruvato durante el transporte de la glucosa mediante el sistema de la fosfotransferasa (PTS o sistema PT) (Fig. 1) (Holms, 1986). Durante éste proceso, el grupo fosfato del fosfoenolpiruvato (PEP) es transferido a la molécula de glucosa, generando piruvato y glucosa 6-P (Postma, 1987). Otra ruta metabólica para la obtención de piruvato

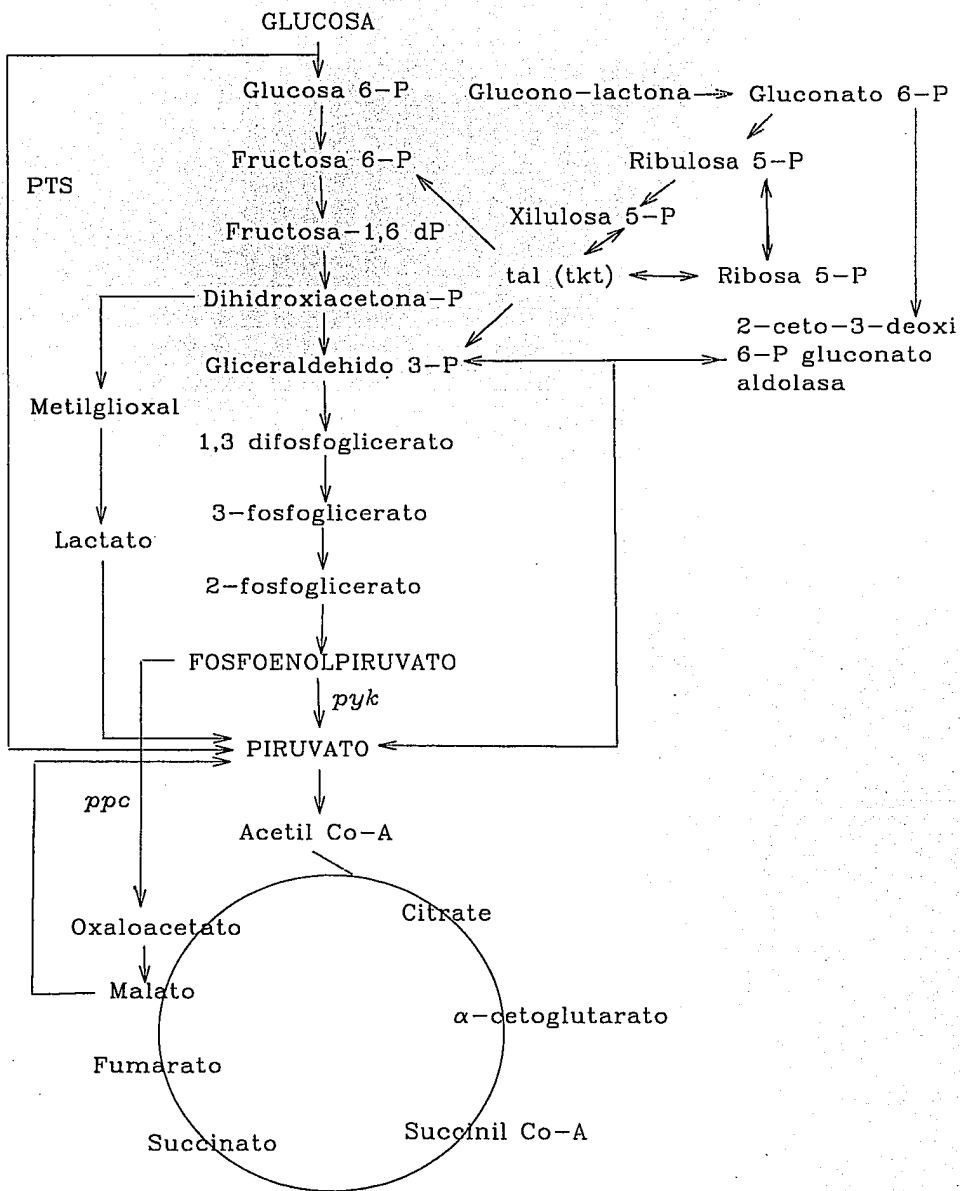


Figura 1. Principales vías metabólicas en *E. coli*.

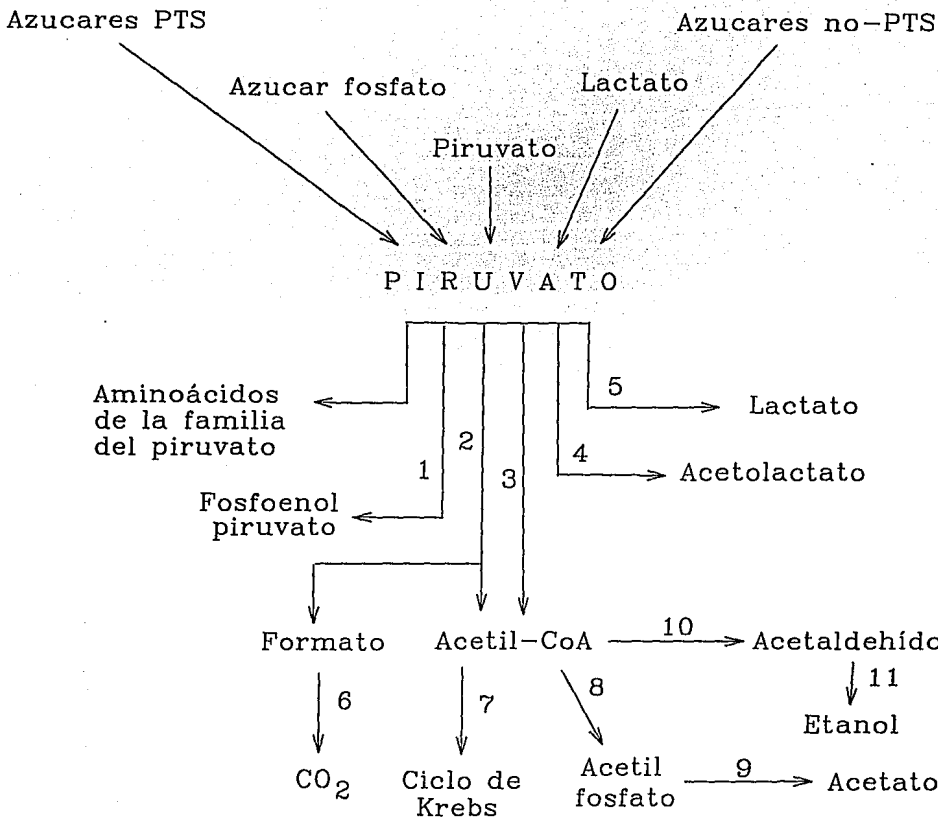


Figura 2. Convergencia de varias rutas metabólicas sobre el piruvato y productos finales de la glicólisis en *Escherichia coli*: 1, PEP sintetasa; 2, Piruvato formato liasa; 3, Piruvato deshidrogenasa; 4, Acetolactato sintetasa; 5, Lactato deshidrogenasa; 6, Complejo formato-hidrógeno liasa; 7, Citrato sintetasa; 8, fosfotransacetilasa; 9, Acetato cinasa; 10, Acetaldehído deshidrogenasa; 11, Alcohol deshidrogenasa.

es a través de la acción de las enzimas piruvato cinasa (EC 2.7.1.40). Estas enzimas catalizan la conversión de PEP y ADP a piruvato y ATP, en la etapa final de la vía glicolítica (Waywood, 1974; Garrido, 1977).

En *E.coli* se ha reportado la existencia de dos formas no interconvertibles de piruvato cinasa, la tipo I que es codificada por el gene *pykF* y la tipo II codificada por el gene *pykA* (Malcovati, 1969, Garrido, 1983). Estas difieren en sus propiedades físicas y químicas, en su comportamiento cinético y en su regulación alostérica (Malcovati, 1982). PK-II es activada específicamente por ribosa 5-P y por varios nucleósidos monofosfatos purínicos y pirimidínicos e inhibida por PO_4 y SO_4 (Tabla 1), mientras que PK-I es activada específicamente por fructosa-1,6-difosfato e inhibida por GTP y es susceptible a inhibición por retroalimentación cooperativa por succinil-CoA y ATP (Waywood, 1974). Aunque las dos formas están bajo un control genético independiente, ellas coexisten en un amplio rango de estados metabólicos y nutricionales (Kornberg, 1973; Malcovati, 1973). Durante condiciones que favorecen la glicólisis PK-I es la forma dominante, mientras que PK-II predomina durante la gluconeogénesis (Waywood, 1974). La secuencia nucleotídica de ambos genes se encuentran disponibles en el GenBank. Sin embargo, la secuencia de *pykF* fue obtenida por secuenciación del DNA genómico (Ohara, 1989), mientras que la clonación y secuenciación de *pykA* no ha sido publicada (GenBank release 78).

Se han aislado de manera accidental mutantes carentes de la actividad de PK-II. Estas cepas fueron utilizadas para construir cepas carentes de ambas actividades. Usando estas construcciones, se reportó que bajo condiciones aeróbicas, un PTS funcional puede proveer una cantidad adecuada de piruvato para sostener una velocidad de crecimiento normal. Asimismo, se reporta que mutantes carentes de la actividad de PK-II no mostraron un fenotipo claramente distinguible (Garrido, 1977). Sin embargo, estos experimentos se basaron en el promedio de las mediciones del diámetro de las colonias, usando condiciones de crecimiento que pudieran interferir con el análisis del papel de cada isoenzima PK en

la formación de piruvato.

	Piruvato cinasa tipo II (<i>pykA</i>)	Piruvato cinasa tipo I (<i>pykF</i>)
Actividad predominante	Gluconeogénesis	Glicólisis
Activación	AMP, Ribosa 5-P	Fructosa 1,6-difosfato
Inhibidores	PO_4^{3-} y SO_4^{2-}	GTP y succinil Co-A-ATP
Iones requeridos	Mg^{+2} o Mn^{+2}	Mg^{+2} o Mn^{+2}
Síntesis	Constitutiva	Inducible
Conformación	Tetrámero	Tetrámero
Peso molecular del tetrámero	190,000	225,000
Peso molecular del monómero	51,000	60,000
No. de a.a. por subunidad	484	522
Aminoácido NH2 terminal	Serina	Metionina
pH óptimo	6.3	7.0
Termoestabilidad a 55°C	No estable	Estable
Km con concentraciones variables de PEP	0.5 mM	0.2 mM
Contenido de aminoácidos	Bajo de a.a. aromáticos y alto de a.a. ácidos	Bajo de a.a. aromáticos y alto de a.a. ácidos
No. de pares de bases	1640	1830

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas, cinéticas y otras características de las piruvato cinasas tipo I y II de *E. coli* (Kornberg, 1973; Malcovati, 1969, 1973, 1982; Somani, 1977; Valentini, 1979; Waywood 1974, 1975, 1976).

Con lo que respecta a la composición de aminoácidos y a su posible origen, se ha sugerido que *pykA* es altamente divergente o que no está relacionado con *pykF* (Ohara, 1989) sin embargo, al realizar una comparación de secuencias entre los primeros 50 aminoácidos de PykA y de PykF el 45% de los residuos son idénticos entre ambas secuencias (Valentini, 1991).

La regulación de la actividad de éstas enzimas, parece ser de gran importancia para la fisiología del organismo al controlar los niveles tanto de PEP como de piruvato y al canalizar estos compuestos en direcciones diferentes con propósitos catabólicos, biosintéticos o anapleróticos (Malcovati, 1973). La presencia de dos piruvato cinasas catalizando la misma reacción y la multiplicidad de controles operativos sobre éstas enzimas dan lugar al surgimiento de muchas preguntas sobre su papel fisiológico y sus mecanismos de regulación (Waygood, 1974).

OBJETIVOS

Debido al interés que existe en nuestro laboratorio por el estudio del metabolismo del carbono tanto para la generación de conocimiento básico como para la obtención de metabolitos de interés por ingeniería de vías metabólicas en éste trabajo se planteó como objetivo general el estudiar el papel que desempeñan los genes que codifican para las isoenzimas de piruvato cinasa de *E. coli* (*pykA* y *pykF*) en la formación de piruvato.

Para la realización de éste objetivo se plantearon los siguientes objetivos particulares:

- 1) La clonación de los genes *pykA* y *pykF* de *E. coli*
- 2) La interrupción de los genes *pykA* y *pykF* por la inserción de un gene de resistencia a antibióticos
- 3) La sustitución, en el cromosoma de *E. coli*, de los genes *pykA* y *pykF* silvestres por los genes *pykA* y *pykF* interrumpidos por inserción.
- 4) El estudio del efecto de las mutaciones en la actividad de las isoenzimas de piruvato cinasa
- 5) El estudio del metabolismo celular en las cepa silvestre y en las mutantes en donde se estudiaron en particular:
 - a) La biomasa
 - b) La velocidad de crecimiento
 - d) El consumo de glucosa
 - c) El consumo de oxígeno, y
 - e) La producción de dióxido de carbono
- 6) Por último se llevó a cabo la comparación de las secuencias nucleotídicas y de aminoácidos de las piruvato cinasas (*Pyk-I* y *Pyk-II*).

MATERIAL Y METODOS

Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento.

Las cepas usadas en este trabajo se enlistan en la tabla 2. Para las fermentaciones, las células fueron crecidas aeróbicamente a 37°C en medio mínimo M-9 suplementado con 2 g/L de glucosa y con y sin casaminoácidos (Sambrook, 1989). Algunos de los experimentos de cinética de crecimiento fueron realizados en un fermentador de 6 Lt LSL Biolafitte (New Jersey, USA). En esos experimentos, el oxígeno disuelto se mantuvo arriba del 20%

Técnicas de DNA recombinante y de secuenciación de nucleótidos.

Los métodos de digestión con enzimas de restricción, aislamiento de DNA y de fragmentos de restricción así como los de ligación, transformación y transducción se realizaron según lo reportado por Sambrook (1989). Para la clonación de los genes estructurales de las piruvato cinasas, ambos genes fueron amplificados por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizándose dos grupos de oligonucleótidos complementarios a *pykA* o a *pykF*. El DNA de la cepa JM101 fue utilizado como molde. Después del paso de desnaturalización inicial a 97°C por 10 min, se llevaron a cabo 30 ciclos de amplificación. Las temperaturas y períodos de tiempo usados en cada ciclo fueron: 97°C por 1 min, 55°C por 45 s, y 67°C por 2.15 min. Las secuencias nucleotídicas de los oligonucleótidos son las siguientes:

5' CGTTACCACGTTAGGCCCCAGCAACAGATCG y

5' CGCGTGGTATTAGTAGAACCCACGGTACTC para *pykA*, y

5' AATGCTGGACGCTGGCATGAACGTTATGCG y

5' GCGGTGTTAGTAGTGCCGCTCGGTACCAGT para *pykF*.

Tabla 2. Cepas bacterianas usadas en este estudio.

Cepas	Genotipo o fenotipo relevante	Fuente
JM101	<i>supE thi (lac-proAB) [F' traD36 proAB lacI^qZ M15]</i>	Colección de laboratorio
ATCC 47002	F- <i>recB21 recC22 sbc15 leu-6 ara-14 his-4 λ-</i>	ATCC*
PB12	Como la JM101 pero <i>ptsHIcrr: :kan; glucosa+</i>	Colección de laboratorio
PB23	Como la JM101 pero <i>pykA : : kan</i>	Este trabajo
PB24	Como la JM101 pero <i>pykF : : cam</i>	Este trabajo
PB25	Como la JM101 pero <i>pykA : : kan pykF : : cam</i>	Este trabajo
PB26	Como PB12 pero <i>pykA : : kan</i>	Este trabajo
PB27	Como PB12 pero <i>pykF : : cam</i>	Este trabajo

*American Type Culture Collection, Rockville, Md.

Los productos de PCR fueron purificados mediante electroforesis y el kit de GlassMAX de GIBCO BRL (Gaithersburg, USA). Esos DNAs fueron clonados dentro del sitio *SmaI* de M13mp19. Los fagos recombinantes fueron identificados por análisis de restricción y la secuencia de los fragmentos clonados fueron obtenidos mediante el método de secuenciación Sengenasa, versión 2.0 como lo sugiere el proveedor (United State Biochemical Corp.).

Después de confirmar la secuencia de los genes *pykA* y *pykF*, éstos fueron subclonados como fragmentos EcoRI-HindIII en pUC19 y llamados pPykA y pPykF, respectivamente (ver Fig. 3).

Construcción de mutantes.

La estrategia general para la construcción de las interrupciones de los genes en el cromosoma se presentan en la Fig. 3. Para la interrupción de *pykA*, el plásmido pPykA fue digerido con la enzima *BglII* y ligado a un fragmento de DNA el cual contiene el gene de resistencia a kanamicina, que fue aislado de pNK862 por la digestión con *BamHI* (Way et al., 1984). El gene *pykF* fue interrumpido de la misma forma, excepto que el gen de resistencia a cloranfenicol contenido en un fragmento de DNA fue aislado de pCAT19 por la digestión con la enzima *SmaI* y ligado a pPykF previamente linearizado con la enzima *StuI* (Claibone, 1992). Después de transformar células competentes de JM101, éstas fueron plateadas en cajas con LB/agar con kanamicina o cloranfenicol. La identidad de los plásmidos fue confirmada por análisis de restricción. Los plásmidos resultantes fueron llamados pPykA-Km y pPykF-Cm respectivamente. Ambos plásmidos fueron linearizados por digestión con la enzima de restricción *HindIII* o *EcoRI* y usados para transformar células competentes de ATCC 47002 como se describió previamente (Oden, 1990). Las recombinantes que contenían las mutaciones integradas al cromosoma, fueron aisladas como Ap sensibles, Cm o Km resistentes, y posteriormente transducidas a cepas de *E. coli* JM101 o PB12 utilizando al fago P1vir (Silhavy, 1984)

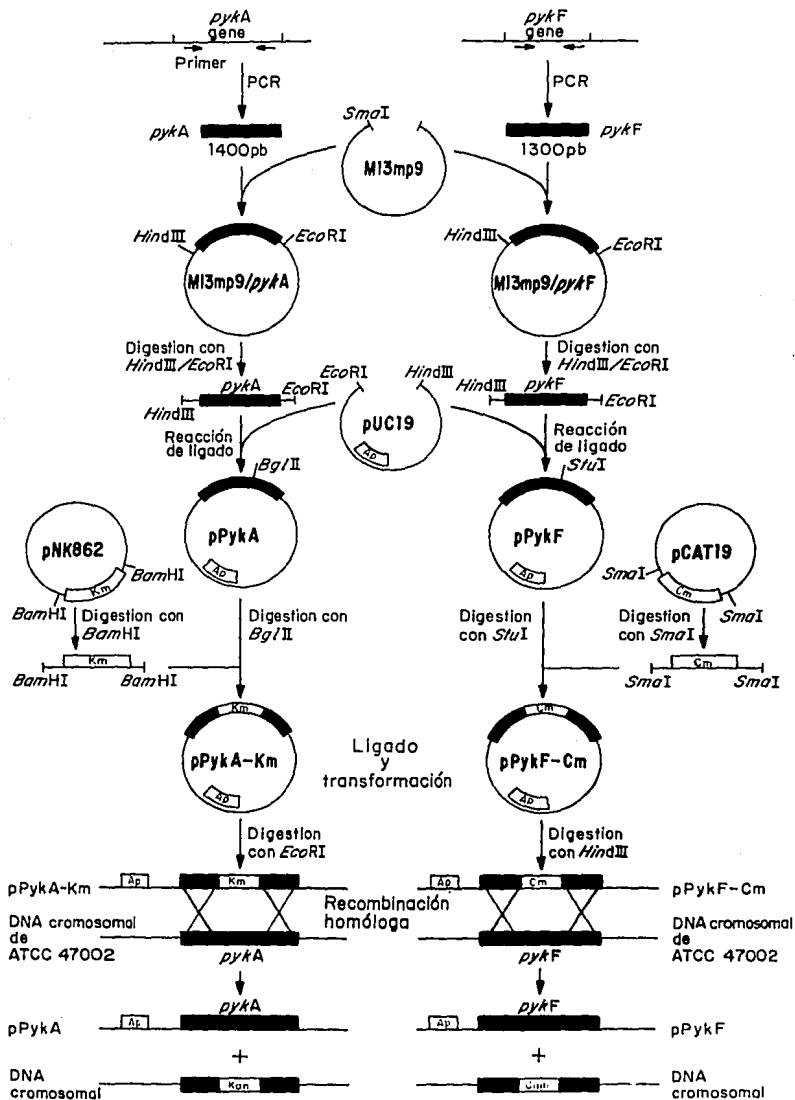


Fig. 3. Clonación de los genes estructurales de *pykA* y *pykF* y construcción de mutantes por inserción.

Determinaciones de glucosa

Las concentraciones de glucosa en el medio de cultivo fueron determinadas después de centrifugar las muestras por 5 min. a 12000 g. La glucosa remanente en el sobrenadante fue determinada utilizando un analizador de glucosa (Modelo 2700, Yellow Springs Instruments, Yellow Spring OH).

Análisis enzimático

Para el análisis de actividad de piruvato cinasa, las células fueron crecidas en medio mínimo conteniendo sales esenciales, NH_4 y glucosa a 2 g/l (Sambrook, 1989) hasta la fase logarítmica tardía y cosechadas por centrifugación. Los paquetes celulares fueron lavados con buffer fosfatos sodio-potasio 5mM y EDTA 1mM (pH 7.5). Las células fueron lisadas por sonicación y el sobrenadante colectado luego de ser centrifugadas a 23,000 g a 0°C por 20 minutos. La actividad de piruvato cinasa fue medida por un método indirecto, en el que se monitorea espectrofotométricamente la disminución de NADH a 340 nm, esencialmente como se reporta por Malcovati et al. (1982). La actividad se reporta como unidades internacionales de enzima por miligramo de proteína (U.I./mg). Una unidad internacional de piruvato cinasa se define como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 micromol de piruvato por minuto por mg de proteína. La concentración de proteínas fue determinada por el método descrito por Lowry (Lowry, 1951), utilizando albúmina sérica bovina como patrón.

Hibridación por Southern

El DNA genómico fue extraído de las cepas de *E. coli* por lisis celular con dodecil sulfato de sodio (SDS) y precipitación selectiva con hexadeciltrimetil bromuro de amonio (CTAB) (Wilson, 1987). El DNA fue transferido a membranas de nylon (Nytran, Schleicher & Schuell). Las condiciones de prehibridación, hibridación y lavado se llevaron a cabo como lo sugiere el fabricante. Los fragmentos

de DNA usados como sondas fueron marcados con (α - ^{32}P) dCTP con el kit de random primer (Boehringer (Mannheim, Germany)).

Medición del consumo de O_2 y producción de CO_2

Para llevar a cabo las determinaciones tanto del oxígeno consumido como del dióxido de carbono producido a lo largo de las fermentaciones de las cepas mutantes y silvestre, se utilizó un espectrómetro de masas para gases (Perkin-Elmer modelo 1200). El espectrómetro de masas permite analizar la fracción molar de los gases de interés a lo largo de toda la fermentación. Conociendo además las fracciones de entrada y salida del O_2 y del CO_2 , es posible calcular tanto la velocidad de consumo de oxígeno (OUR), como la velocidad de producción de dióxido de carbono (CPR); parámetros que proveen información acerca de la actividad metabólica de las células.

Para el cálculo del OUR se requiere obtener la diferencia entre la fracción de O_2 a la entrada (A) y la fracción de O_2 a la salida (B); así como el flujo del gas en el fermentador (F), el volumen de medio de cultivo (V) y el volumen molar del aire (V_m) ($V_m = 22.4 \times 10^6 \text{ m}^3/\text{mmol}$). La ecuación que se utilizó para la obtención del OUR es la siguiente:

$$\text{OUR} = (A-B) F/V.V_m$$

Por otro lado, para el cálculo del CPR, se requiere obtener en este caso, la diferencia entre la fracción de CO_2 a la salida (C) y la fracción de CO_2 a la entrada (D); así como el flujo del gas en el fermentador (F), el volumen del medio de cultivo (V) y el volumen molar del aire (V_m). La ecuación para el cálculo del CPR es la siguiente:

$$\text{CPR} = (C-D) F/V.V_m$$

Las unidades en las que se pueden expresar éstos parámetros son en mmol/L.s ó en $\text{mol/m}^3.\text{s}$.

RESULTADOS

Clonación de los genes *pykA* y *pykF*

Usando PCR y oligonucleótidos específicos para cada uno de los genes de piruvato cinasa se clonaron ambos genes estructurales en plásmidos multicopia como se describe en la Figura 3. Las secuencias nucleotídicas de ambos genes fueron determinadas y resultaron casi idénticas a las secuencias depositadas (Genbank). No se confirmó si las diferencias observadas eran reales o no.

Generación de mutantes *pykA* y *pykF* inactivadas por inserción

Mutantes en uno o ambos genes *pyk* fueron aislados después de una mutagénesis insercional de las clonas *pykA* y *pykF*, pPykA y pPykF. Esto fue hecho utilizando genes de resistencia a kanamicina o a cloranfenicol provenientes de los plásmidos pNK862 y pCAT19, respectivamente (Ver Fig. 3 y material y métodos). Las mutaciones fueron después integradas al cromosoma de *E. coli* en la cepa ATCC 47002 por un evento de doble recombinación homóloga y subsecuentemente transducidas a las cepas JM101 y PB12 por experimentos de transducción con el fago P1. Para confirmar la interrupción de los genes, recombinantes resistentes a cloranfenicol o kanamicina fueron analizadas por hibridación por Southern (Fig. 4), así como por la amplificación de los genes mutados por medio de PCR y por la medición de la actividad enzimática de piruvato cinasa en ausencia de uno o de ambos genes (Tabla 3). Cuando uno de los dos genes fue interrumpido (*pykA*), el nivel enzimático de la piruvato cinasa funcional mostró ser la misma que la obtenida para la misma enzima de la cepa parental. Por otro lado, se observó que la piruvato cinasa tipo I codificada por *pykF* es la enzima que mostró tener actividad, lo cual coincide con lo reportado en la literatura ya que la piruvato cinasa que presenta la mayor actividad cuando se utiliza una fuente de carbono glicolítica como en éste caso, es la PK-I mientras que

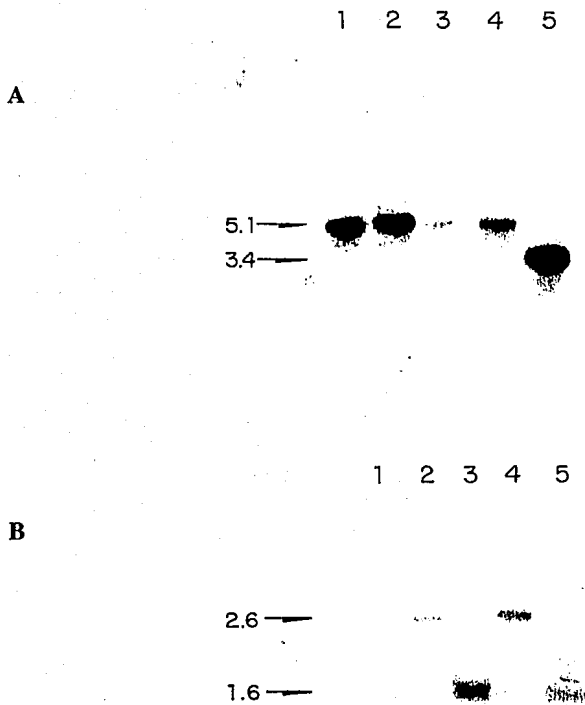


Figura 4.

Southern realizados para comprobar las interrupciones en el cromosoma de los genes *pyk*, por la inserción de cassetes de resistencia a antibióticos en la parte media de los genes. Para el gene *pykA* el DNA cromosomal de las distintas cepas se digirió con las enzimas *EcoRI-SalI* (A), mientras que para el gene *pykF*, el DNA cromosomal fué digerido con la enzima *AseI* (B). Como sonda se utilizaron los productos de PCR de los genes de piruvato cinasa, *pykA* (A) o *pykF* (B).

A. Interrupción del gene *pykA* con el gene de resistencia a kanamicina (1.6 Kb). Línea 1 y 2, PB23; líneas 3 y 4, PB25 y línea 5, JM101.

B. Interrupción del gene *pykF* con el gene de resistencia a cloranfenicol (1 Kb). Líneas 1 y 5, JM101; línea 2, PB24; línea 3, PB23 y línea 4, PB25.

cuando la fuente de carbono es gluconeogénica, la enzima que se encuentra principalmente activa es la PK-II (Malcovati, 1973).

Cepas	Fenotipo	PK-II (<i>pykA</i>)	PK-I (<i>pykF</i>)
JM101	WT	0.02	0.16
PB23	<i>pykA</i> :: kan	0	0.15
PB24	<i>pykF</i> :: cam	0	0
PB25	<i>pykA</i> :: kan <i>pykF</i> :: cam	0	0

Tabla 3. Actividad específica de las enzimas piruvato cinasas de *E. coli* en extractos crudos de células crecidas en matraces con medio mínimo con glucosa y cosechadas en fase logarítmica tardía (expresado en U.I./mg de proteína).

Efecto de las mutaciones *pykA* y *pykF* en el crecimiento celular

Con el objeto de examinar la función de los genes *pyk* y sus productos en el metabolismo celular, se llevaron a cabo varias fermentaciones con las cepas *pyk*. En todos los experimentos que se reportan, los fermentadores fueron inoculados con la misma cantidad de células y el crecimiento fue monitoreado por la medición de la turbidez del cultivo.

Los cultivos fueron crecidos hasta fase exponencial en medio M-9 suplementado con casaminoácidos. Cuando las células alcanzaron 0.5 de DO, fueron lavadas y usadas para inocular un fermentador que contenía medio mínimo (MM) M-9 con glucosa (2 g/l). Durante las fermentaciones se mantuvieron constantes la velocidad de agitación (600 rpm), el pH (7.4) y la temperatura (37°C).

Las fermentaciones mostradas en la Fig. 5, en las que el inóculo proviene de un medio mínimo con glucosa y casaminoácidos, se observa que tanto la cepa silvestre como las mutantes alcanzaron la misma densidad óptica final. Sin embargo, la velocidad de crecimiento de la mutante *pykF* fue diferente, ya que ésta mutante alcanzó la máxima densidad celular hasta las 9 horas de la fermentación, mientras

que la silvestre y la mutante *pykA* sólo requirieron de 7 horas. Los tiempos de duplicación (TD) obtenidos a partir de la velocidad de crecimiento, también mostraron diferencias entre las cepas. Como se observa en la Fig. 5 la cepa con el menor tiempo de duplicación celular es la mutante *pykA* con un TD de 1.3. Las mutantes en *pykF* y la doble mutante tuvieron tiempos de duplicación aun mayores (1.9 y 1.5, respectivamente), lo que nos indica que éstas cepas tuvieron un crecimiento mas lento comparado con la cepa silvestre y la mutante en *pykA*. Por tanto, las mutaciones al parecer alteraron la actividad metabólica de las células. Por otro lado, la doble mutante *pykApykF* mostró una fase lag muy larga (7 horas de *pykApykF* vs. 3 horas de la cepa silvestre) sin embargo, una vez que empezó a crecer alcanzó la misma biomasa que las demás cepas aunque mostró un tiempo de duplicación mayor que la silvestre (Fig. 5). Estos comportamientos se repitieron en los diferentes experimentos realizados. Cada fermentación se realizó por lo menos por duplicado.

Utilización de glucosa en las mutantes *pyk*

Los resultados mostrados en la Fig. 5 indican que las mutaciones en los genes *pyk* afectaron el crecimiento celular transitoriamente. Basados en estas observaciones, se decidió medir la cantidad de glucosa remanente en el medio a lo largo de esta misma fermentación para determinar si el consumo de glucosa también estaba alterado. Las células fueron removidas de las muestras por medio de centrifugación, y la glucosa remanente fue medida por un método enzimático acoplado; glucosa oxidasa-peroxidasa (ver materiales y métodos). Como se observa en la Fig. 5, sólo la doble mutante *pykApykF* mostró una diferencia significativa en el perfil de consumo de glucosa. De hecho, existe una correlación entre el período lag observado en la curva de crecimiento de la doble mutante y el retraso en el consumo de glucosa. Asimismo el tiempo en el que la glucosa se agotó del medio (11 horas) coincide con el tiempo el que la doble mutante *pykApykF* llegó a su crecimiento máximo.

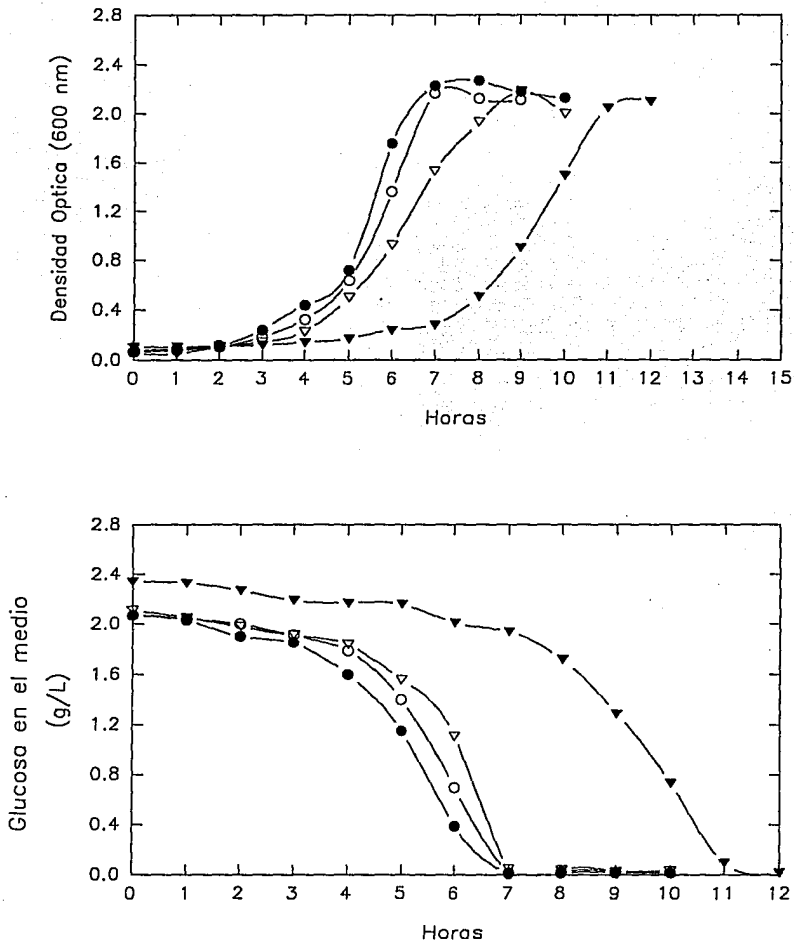


Figura 5. Cinética de crecimiento y gráfica de consumo de glucosa en la cepa silvestre y mutantes en piruvato cinasa en medio mínimo con glucosa (2g/L). ○ , silvestre; ● , *pykA*⁻; ▽ , *pykF*⁻; ∇ , *pykA*⁻ *pykF*⁻.

Estos resultados sugieren que las alteraciones en el metabolismo del PEP por las mutaciones en *pyk* tienen un fuerte efecto en la habilidad de las células para responder a condiciones en las que se lleva a cabo un cambio de nutrientes (p.e. de medio mínimo (MM) con glucosa y casaminoácidos a MM con glucosa y sin casaminoácidos). No obstante, este efecto fue liberado después del período lag donde el consumo de glucosa fue mínimo. Una vez pasado éste retraso en el consumo de glucosa, la doble mutante *pykApykF* fue capaz de utilizar la glucosa con una velocidad similar a la de la cepa parental (ver Fig. 5). Por otro lado, el cultivo de la cepa *pykF* consumió toda la glucosa en 7 horas, pero a ese tiempo el cultivo alcanzó solo el 68 % de la densidad óptica máxima; éstos resultados sugieren que éstas células pueden usar diferentes estrategias para iniciar y mantener el crecimiento celular. A pesar de estas diferencias, todas las cepas alcanzaron la misma densidad óptica.

Por otro lado, las pendientes de las curvas de consumo de glucosa mostraron ser muy parecidas para el caso de la cepa silvestre y la mutante en *pykA*, siendo éstas de alrededor de 0.7. Sin embargo, la mutante en *pykF* y la doble mutante mostraron pendientes ligeramente menores a las de las cepas anteriores (0.6 y 0.54, respectivamente). Este comportamiento coincide con los tiempos de duplicación celular mostrados por las cepas, ya que por ejemplo la doble mutante es la cepa que mostró la pendiente menor de todas las curvas de consumo de glucosa y el mayor tiempo de duplicación celular en las curvas de crecimiento (Fig. 5).

Producción de CO₂ en mutantes *pyk*

Para determinar las diferencias en cuanto a la producción de CO₂ entre la cepa silvestre y las mutantes se determinó la velocidad con que las cepas producían CO₂ (CPR), ya que éste es un buen indicador de la actividad metabólica de los microorganismos. Normalmente al crecer las células, el CPR tiende a incrementarse. En muchas fermentaciones el CPR alcanza un pico y luego cae (Williams, 1988). De las curvas obtenidas (fig. 6) se puede observar que todas llegan mas o menos a un mismo valor de CPR. Sin embargo, nuevamente la doble mutante muestra un retraso con respecto a las otras cepas, el cual coincide con la fase lag de crecimiento. Asimismo los puntos máximos de producción de CO₂ coinciden con los tiempos en que las cepas agotan la glucosa del medio. Para determinar que tan similar era la producción de CO₂ entre las diferentes cepas, se obtuvieron los coeficientes de producción de CO₂ (QCO₂), considerándose únicamente la velocidad de producción de CO₂ durante la fase exponencial de crecimiento para todas las cepas, para evitar así una mala interpretación de los valores de CRP por el alargamiento de la fase lag de la doble mutante. Los resultados mostraron que los coeficientes de producción de CO₂ son muy similares entre sí (tabla 3), lo que nos indica que aparentemente todas las cepas producen CO₂ con la misma velocidad. Los coeficientes de correlación fluctuaron entre 0.97 y 0.99. Los datos de la velocidad de producción de oxígeno (OUR) no fueron tomados en cuenta debido a que se ha reportado que cuando los valores de OUR son bajos, éstos pueden ser poco precisos ya que en la mayoría de las fermentaciones la concentración de oxígeno sólo puede ser reducida en un 5 % de la concentración normal del oxígeno del aire que es del 20.9 %, por lo que si los valores de OUR son bajos, como en éste caso, por la poca biomasa que se tiene la falta de precisión inherente será mayor (Williams, 1988). Como consecuencia de esto los valores de coeficiente respiratorio (RQU) que se refieren a la proporción molar que hay entre el CO₂ producido por las células y el oxígeno consumido por ellas, también tenderán a ser erróneos.

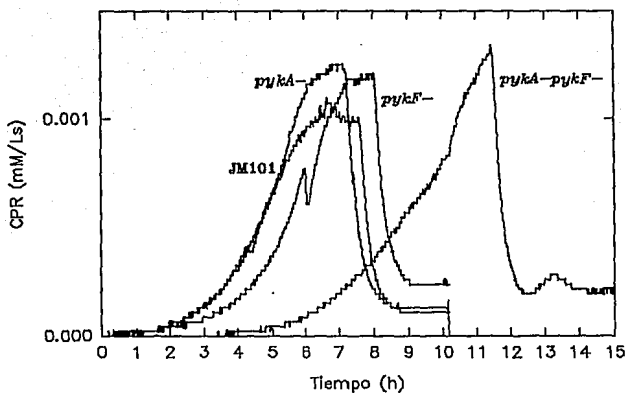


Fig. 6. Velocidad de producción de CO_2 (CPR) en la cepa silvestre y mutantes en piruvato cinasa de *E. coli*.

Cepas	QCO_2 ($\text{mMCO}_2/\text{g}_p\text{s}$)	r
JM101	2.81×10^{-3}	0.97
PB23	3.35×10^{-3}	0.99
PB24	3.23×10^{-3}	0.99
PB25	2.81×10^{-3}	0.99

Tabla 3. Valores de coeficientes de producción de CO_2 (QCO_2) de la cepa silvestre y mutantes en piruvato cinasa en *E. coli* obtenidos a partir del cálculo de las pendientes de las rectas de producción específica de CO_2 y coeficientes de correlación de las regresiones lineales efectuadas (r).

Efecto de las mutaciones *pyk* en el crecimiento celular en un fondo *pts*

Se sabe que el sistema PT es la principal fuente de piruvato en *E. coli* (Holms, 1986). Utilizando una cepa de *E. coli* con una delección de los genes *ptsH*, *ptsI* y *crr* (PB12), se aisló una mutante capaz de transportar glucosa utilizando la permeasa *galP* (*PTS⁻ gluc⁺*).

Al utilizar ésta cepa para evaluar el efecto de las mutaciones en *pykA* y *pykF* en el crecimiento en la ausencia de un sistema PT funcional (Fig. 7) se puede observar que la introducción de la mutación *pykA* en el fondo *ptsH ptsI crr*, disminuyó el tiempo de duplicación, ya que mientras la cepa PB12 tuvo un tiempo de duplicación celular (TD) de 2.35, la PB26 tuvo un TD de 2.1 (Fig. 7). Este comportamiento en el crecimiento es similar al observado al introducir la mutación *pykA* en las cepas con un sistema PTS funcional (Fig. 5). Por otro lado, la introducción de la mutación *pykF* en el fondo *PTS⁻* (PB27) retrasó el crecimiento celular, siendo el TD de 2.4. Esto sugiere que en la ausencia de PTS, la enzima PK-I codificada por el gene *pykF*, es la principal fuente de piruvato. Sin embargo, aun en la ausencia de un PTS funcional y de la enzima piruvato cinasa I activa, las células son capaces de alcanzar la misma biomasa que las cepas con un PTS funcional, aun teniendo tiempos de duplicación mayores (Fig. 7).

El hecho de que la cepa *PTS⁻ pykF* fuera la que tuviera el menor crecimiento se puede explicar si se toma en cuenta que *PykF* es la piruvato cinasa que se encuentra principalmente activa cuando se utiliza glucosa como fuente de carbono (Waywood, 1974), por lo que si la cepa carece de PTS y de *PykF* para formar piruvato tendrá que hacer uso de otras vías que formen piruvato (ver discusión y Fig. 8).

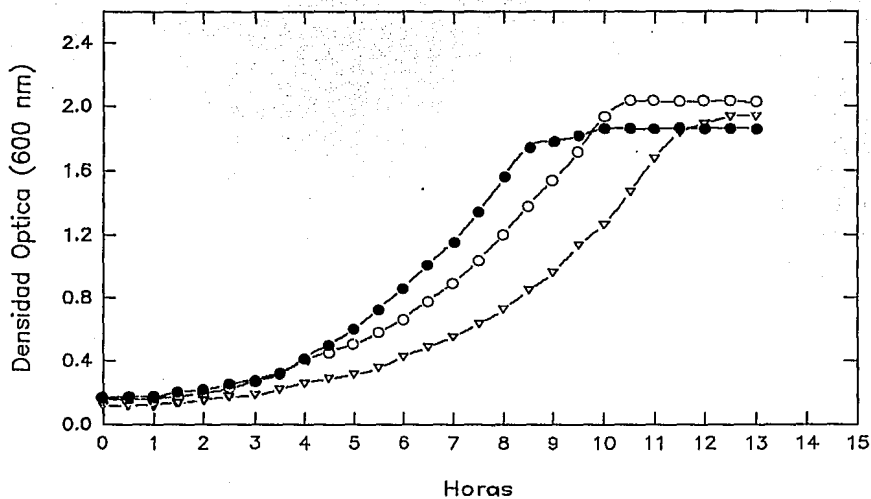


Fig. 7 Efecto de las mutaciones *pykA* o *pykF* en el crecimiento celular en la cepa PB12 que tiene un fondo *ptsHIcrr*; glucosa +. o, PB12; ●, PB26 (*pykA*); ▽, PB27 (*pykF*).

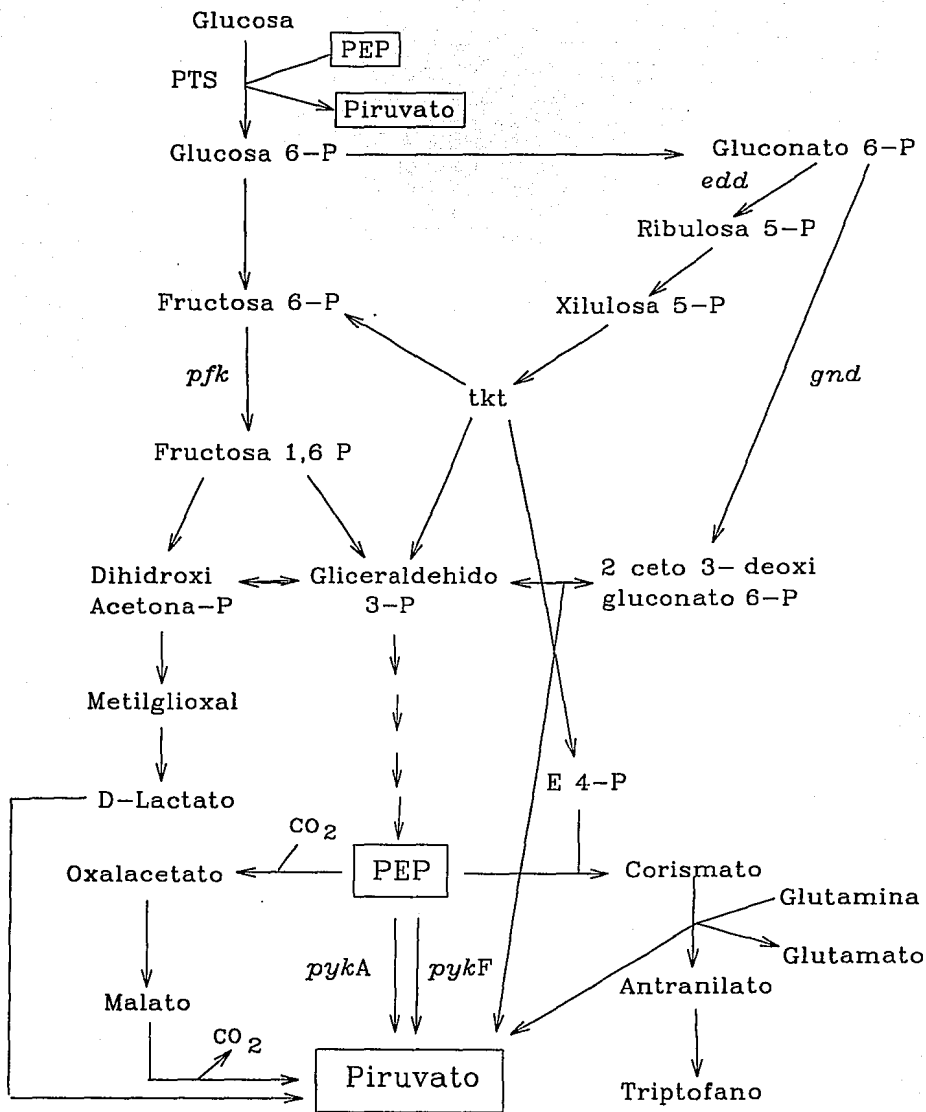


Figura 8. Principales vías de formación de piruvato en *E. coli*.

Comparación de secuencias de piruvato cinasas

Con el objeto de determinar el grado de similitud existente entre las piruvato cinasas de *E. coli* así como las de otros organismos, tanto a nivel de secuencia nucleotídica como de aminoácidos, se llevó a cabo una comparación de secuencias, utilizándose para ello los bancos Swiss-Prot y Pir-Prot para proteínas y Genbank para genes.

Las secuencias nucleotídicas y de aminoácidos de las piruvato cinasas de *E. coli* fueron utilizadas para hacer una búsqueda contra todas las secuencias depositadas tanto en el banco Swiss-Prot como en el GenBank por medio del programa fasta de Italia .

Al comparar el DNA de *pykA* o el de *pykF* de *E. coli* contra las secuencias de nucleótidos del GenBank, los genes que presentaron el más alto grado de similitud con los genes de *E. coli* fueron el de la piruvato cinasa de *Bacillus stearothermophilus* y el de la 6-fosfofructocinasa del mismo organismo, aunque éste último con un valor menor. Por otro lado, al hacer la comparación de las enzimas PykA o PykF contra el banco de proteínas los valores más altos fueron para 13 piruvato cinasas de 8 organismos diferentes. Todas éstas secuencias fueron sacadas del banco de datos y alineadas junto con las dos de *E. coli* por medio del programa de alineamientos múltiples de Wisconsin (pileup) (Fig. 9). La única secuencia procariota además de las de *E. coli* fue la de *Spiroplasma citri* (SPICI), ya que las otras proteínas son de organismos eucariotas.

RAT	MEGPAGYLR	RASVAQLTQE	LGTAFFQQQQ	LPAAMADTFI	EHLCLLDIDS	QPVAARSTSIATI
HUMAN	MEGPAGYLR	RASVAQLTQE	LGTAFFQQQQ	LPAAMADTFI	EHLCLLDIDS	EPVAARSTSIATI
CAT	SKPHSD	VGTAFTQTQQ	LHAAMADTFI	EHMCRLLDIDS	PPITARNTGIICTI
CHICK	SKHHD	AGTAFTQTQQ	LHAAMADTFI	EHMCRLLDIDS	EPTIARNTGIICTI
ASPNI	MAASSLDHL	SNRMKLEWHSKLN	TEMPAKNFRRTSIICTI
YEAST	MSRLERLTSL	NVVAGSDLRRTSIIGTI
SOLTU	MANIDIAGIM	KDLPNDGRIPKTKIVCTI
SPICI	MDKFINEKMKRTKIITI
E.C-A	MRRLRRTKIVTTL
E.C-F	MKKTIVCTI

S.C. MEGPAGYLR RASVAK E GTAFIQ QQ LHAAMADTFI EHC LDIDS PITARN I I TI

100

150

RAT	GPASRSVDRL	KEMIKAGMNI	ARLNFSHGSH	EYHAESIANI	REATESFATS	PLSYRPAVAI	LDTKGPEIR	..TGVLQGGP	ESEVEIVKGS	QVLVTVDPKF
HUMAN	GPASRSVERL	KEMIKAGMNI	ARLNFSHGSH	EYHAETIANV	REAVSFAGS	PLSYRPAVAI	LDTKGPEIR	..TGILQGGP	ESEVELVKGS	QVLVTVDPAF
CAT	GPASRSVEIL	KEMIKSGMNV	ARLNFSHGTH	EYHAETIKNV	RAATESFASD	PITYRPAVAI	LDTKGPEIR	..TGLIKGSG	TAEVELKKA	TKITLDNAY
CHICK	GPASRSVDKL	KEMIKSGMNV	ARLNFSHGTH	EYHEGTIKNV	REATESFASD	PITYRPAVAI	LDTKGPEIR	..TGLIKGSG	TAEVELKKA	ALKVTLDNAF
ASPNI	GPKTNSVEKI	NALRRAGLNV	VRMNFSGSY	EYHQSVIDHA	REAEKQAAG	...RPVAIA	LDTKGPEIR	..TG..NTVG	DKDIPKAGH	EMNISTDEQY
YEAST	GPKTNMPETL	VALRKAGLNI	VRMNFSGSY	EYHKSVIDNA	RKSEELYPGRPLAIA	LDTKGPEIR	..TG..TTTN	DVDYPIPPNH	EMIFTTDDKY
SOLTU	GPSSRTVPMI	EKLLRAGMNV	ARFNFSHGTH	EYHQETLDNL	KIAMQNTQILCAVM	LDTKGPEIR	..TGF..TD	GKPIQLKEGQ	EITVSTD..Y
SPICI	GPSTHSPGAI	EELFKRGMTT	IRLNFSHGSH	AEQGARIWA	REVSAKIGKPTISVL	LDTKGPEIHW	RIRGLLQKSL	NIYHQMNNSL	MSPSPFCKFL
E.C-A	GPATDRDNNL	EKVIARAGANV	VRMNFSGSP	EDEKMRADKV	REIAAKLGRHVALI	GDLOGPKIR	..VSTFK...	EGKVFNLIGD	KFLLDANIG
E.C-F	GPKTESEEMI	AKMIDAGMNV	MRLNFSHGDI	AEBGQRIQNL	RNVMSKTGKTAAIL	LDTKGPEIR	..T..MKLEG	GNDVSLKAGQ	TFFTTDRKSV

S.C. GP S S E L EM KAGMNV RINFSHGTH E HAE I NV REATE ASD PI YRPVAI LDTKGPEIR TGLIK S T VEL G L I T D

200

250

RAT	QTRGDAKTW	VDYHNITRVV	AVGGRIYDD	GLISLVVQKI	GPE.GLV.TE	VEHGGILGSR	KGVNLPNTEV	DLPGLSEQDL	ID.LRFQVQH	NVDIIFASFV
HUMAN	RTRGNANTVV	VDYPNIVRVV	PVGGRIYDD	GLISLVVQKI	SPE.GLV.TQ	VENGGVLGSR	KGVNLPGAQV	DLPGLSEQDV	RD.LRFQVEH	GVDIVFASFV
CAT	MEKCDENVLV	LDYKNICKVV	EVGSKVYVDD	GLISLVVKEK	GAD.FLV.TE	VENGGSLGSK	KGVNLPGAAV	DLPVASEKDI	QD.LKFGVEQ	DVDMVFASFI
CHICK	MENCDENVLV	VDYKNLIKVI	DVGSKIYVDD	GLISLVVKEK	GKD.FVM.TE	VENGGMLGSK	KGVNLPGAAV	DLPVASEKDI	QD.LKFGVEQ	NVDMVFASFI
ASPNI	ATASDDQNMV	VDYKNITKVI	SAGKLIYVDD	GILSFEVLEV	VDDKTLR.VR	CLNNGNISR	KGVNLPGTDV	DLPALSEKDI	SD.LKFGVKN	KVDMVFASFI
YEAST	AKACDDKIMV	VDYKNITKVI	SAGRIIYVDD	GVLSPQVLEV	VDDKTLK.VK	ALNAGKICSH	KGVNLPGTDV	DLPALSEKDK	ED.LRFQVKN	GVMHVFASFI
SOLTU	TIKGNEMELI	MSYKILVMDL	KPNTLLCAD	GTITLTVLSC	DPSPGTVRCR	CENTATLGER	KVNLPGVVV	DLPITLTERKD	EDILEWGVPN	NIDMIALSFV
SPICI	HYHYTLILLK	KTKKQLLKIV	KKLLKLSQSH	YNLAHLGRETWTSS	FCFNERPSIW	RLLS.SFKQI	VTSFKISLVS	KVLIKL....
E.C-A	KBEGDREKVG	IDVYGLPADV	VPGLILLDD	GRVQLKVLV	QGKM..VFTE	VTVGGPLSNM	KGINKLGGGL	SAEALTEKDK	AD.IKTAALI	GVUYLAVSFP
E.C-F	IGNSE..MVA	VTYEGTDDL	SVGNTVLVDD	GLIGMEVTAI	EGNK.VI.CK	VLNNGDLGEN	KGVNLPGVSI	ALPALAERDK	QD.LIFGCEQ	GVDFVAASFI

S.C. DEN L VDYKNI K V GS I DD G ISL V E A L NGG LGSK KGVNLPGAAV DL ALSEKD D LKFGV DVDMV SFI

300

RAT RKASDVLAVR DAL.GPEGQN IKIISKIENH EGV...KRFD EILEVSDGIM VARGDLGIEI PAEKVFLAQK MMIGRCNLG KPVVCAQML ESMITKRPRT
 MAN RKASDVAAVR AAL.GPEGHG IKIISKIENH EGV...KRFD EILEVSDGIM VARGDLGIEI PAEKVFLAQK MMIGRCNLG KPVVCAQML ESMITKRPRT
 CAT RKASDVHAVR KVL.GEKGKN IKIISKIENH EGV...RRFD EILEASDGIM VARGDLGIEI PAEKVFLAQK MMIGRCNRAG KPVICATQML ESMIKKRPRT
 CHICK RKAADVHAVR KVL.GEKGKH IKIISKIENH EGV...RRFD EIMEASDGIM VARGDLGIEI PAEKVFLAQK MMIGRCNRAG KPIICATQML ESMIKKRPRT
 ASPNI RRGSDIRHIR EVL.GEEGRE IQIIAKIENQ QGV...NNFD EILEETDGVN VARGDLGIEI PAPKVFIAQK MMIACNKIG KPVICATQML ESMTYNRPRT
 YEAST RTANDVLTIR EVL.GEQGKD VKIIVKLENQ QGV...NNFD EILKVTDGVN VARGDLGIEI PAPEVFLAQK KLIKSNLAG KPVICATQML ESMTYNRPRT
 SOLTU RKGSDLVNVR KVL.GPHAKR IQLMSRVENQ EGV...INFD EILRETSDFM VARGDLGMEI PVEKIFLAQK MMYIKCNLAG KAVVTATQML ESMIKSPART
 SPICI
 E.C-A RCGEDLNVAR R.LARDAGCD AKIVAKVERA EAVCSQDAMD DIIILASDVN VARGDLGVEI GDPELVGIQK ALIKRRARQLN RAVITATQMM ESMITNPMPT
 E.C-F RKRSDVIEIR EHLKAHGGEN IHIISKIENQ EGL...NNFD EILEASDGIM VARGDLGVEI PVEEVIFAQK MMIEKCRIR KVVITATQML DSMIKNRPRT

S.C. RKASDV EVR KVL G GKN IKIISKIENH EGV RFD EIL ASDGTM VARGDLGIEI PA KVF AQK MMI RCN G KPVI ATQML ESMI KPRT

400

RAT RAETS DVANA VLDGADCIML SGETAKGSFP VEAVMMQHAH AREAEAAYVH RQLFEE LRRA APLSRDPTVEV TAIGAVEASF KCCA.AAIIV LTKTGRSAQL
 HUMAN RAETS DVANA VLDGADCIML SGETAKGNFF VEAVKMQHRI AREAEAAYVH RQLFEE LRRA APLSRDPTVEV TAIGAVEAAF KCCA.AAIIV LTTTGRSAQL
 CAT RAEGSDVANA VLDGADCIML SGETAKGDYP LEAVRMQHLL AREAEAAMFH RKLFEELVRG SSHSTDLMEA MAMGSVEASY KCLA.AALIV LTSSEGRSAHL
 CHICK RAEGSDVANA VLDGADCIML SGETAKGDYP LEAVRMQHAH AREAEAAMFH RQFEEILRH SVHHPREDA MAAGVEASF KCLA.AALIV MTESEGRSAHL
 ASPNI RAEVSDVANA VLDGADCIML SGETAKGNYP CEAVTMMSET CLLAEVAIPH FNVFDELRLN APRPTDTVES IAMAASVASL ELNA.GAIVV LTTSGNTARM
 YEAST RAEVSDVANA VLDGADCIML SGETAKGNYP INAVTMAET AVIAEQAIAY LPNYDDMRNC TPKEPTSTET VAASAVAAVF EQKA.KAIIV LSTSGTTPRL
 SOLTU RAEATDVANA VLDGADCIML SGETAKGNYP ELAVKIMSRI CIEAESLND EAIKEMIRIC TPLPMSPLES LASSAVRTAN KARA.KLIVV LTRGGSTAKL
 SPICI
 E.C-A RAEVSDVANA VLDGADCIML SAETAAGQYP SETVAMARV CLGAEKI... PSINVSXKRL DVQFDNVEEA IAMSAMYAN HLKGVTAIIT MTESEGRSALM
 E.C-F RAEAGDVANA VLDGADCIML SGETAKGKYP LEAVSIMATI CERTDRVMNS RLEFNNDNRK LRI...TEA VCRGAVETA E K LDA.PLIVV ATQGGKSARA

S.C. RAE SDVANA LDGAD IML SGETAKGDYP EAV I AE AV H FEE R D EA A GAV AS K A IIV LTKSRSRAH

500

RAT LSQYRPRAAV IAV..... TRSA QAAQVHLR GVFPILLYREP PEA...IWA DDVDRRVQFG IESGKLRGFL RVGDLVIVVT G.WRFGSGYT
 HUMAN LSRYPRAAV IAV..... TRSA QAAQVHLR GVFPILLYREP PEA...IWA DDVDRRVQFG IESGKLRGFL RVGDLVIVVT G.WRFGSGYT
 CAT VSKYRPRAPI IAV..... TRNH QTAQAHLR GIVFPVCKDP VQE...AWA EDVDRVNLGA MNVKGARFFF HKGDVVIVLT G.WRFGSGFT
 CHICK VSKYRPRAPI IAV..... TRND QTAQAHLR GIVFPVCKDP AHD...AWA EDVDRVNLGA MNVKGARFFF KTGDLVIVLT G.WRFGSGYT
 ASPNI ISKYRPNVPI IMV..... TRNP AATRYSHLYR GVWPFYFPEK KDFDNVKIQT EDVDRRLKNG INHGLKLGII NKGDNIVCVQ G.WRFGMGHT
 YEAST VSKYRPNVPI ILV..... TRCP RAARFSLYR GVWPFVYF EK EP...VSDWT DDVEARINFG IEKAKFEGIL KKGDTYYSIQ G.FKAGAGHS
 SOLTU VAKYRPAVPI LSVVVPVLT DSDFDWSISDE TPARRSLVYR GLIPLLGEKS AKATD...S ESTEVEILEAA LKSAVTRGLC KPGDAVVALL ...RIGSASV
 SPICI
 E.C-A TSRISSEGLPI FAM..... SRHE RTINLTALYR GVTPVHFD... SA NDGVAASAEA VNLLDRKGYL MSGDLVIVTQ GVMSTYVGSST
 E.C-F VRKYFPDATI LAL..... TTNE KTAHQVLVSK GVVPQLVKE... I TSTDFFYRGL KELALQSGLA HKGDVVVYV...G.FWCTGTGR

S.C. VSKYRP PI I V TRN QTA A L R GV P KD D WA EDVD VN G MN G GF K GDVVI L G WR GAG T

600

RAT NIMRVLSVS.
HUMAN NIMRVLSIS.
CAT NTMRVVPV.
CHICK NTMRVVPV.
ASPNI NTVRVVPAEE NLGLSE
YEAST NTLQVSTV... ..
SOLTU IKICVVK... ..
SPICI
E.C-A NTRILTVE.
E.C-F HY.....

S.C. NTMRVVPV

Figura 9.

Alineamiento múltiple de secuencias de varias piruvato cinasas. RAT, *Rattus norvegicus*; HUMAN, *Homo sapiens*; CAT, *Felis catus*; CHICK, *Gallus gallus*; ASPNI, *Aspergillus niger*; YEAST, *Sacharomyces cerevisiae*; SOLTU, *Solanum tuberosum*; E.C.-A (pykA) y E.C-F (pykF) de *Escherichia coli*; and SPICI, *Spiroplasma citri*.

Las zonas punteadas representan aminoácidos que no se encuentran presentes en las otras proteínas. La secuencia mostrada abajo del alineamiento representa la secuencia consenso obtenida a partir de todas las piruvato cinasas alineadas (S. C.). En ésta secuencia, las letras en negrillas muestran los aminoácidos que son idénticos en todas las proteínas, las letras de la S. C. que no están en negrillas representan aminoácidos conservados mientras que los huecos representan aminoácidos no conservados.

El alineamiento mostró que hay un alto grado de conservación no sólo entre PykA y PykF de *E. coli*, sino entre todas las piruvato cinasas alineadas. Esta conservación se hizo más patente en la región central de las mismas, lo que nos habla de posibles dominios funcionales de las proteínas. Con la ayuda de una matriz se obtuvo una secuencia consenso a partir del alineamiento, poniéndose con negrillas los aminoácidos que son idénticos en todas las secuencias, mientras que los otros aminoácidos que aparecen en ésta secuencia corresponden al aminoácido predominante donde hubieron cambios conservados. Los espacios en blanco son cambios no conservados. La secuencia consenso obtenida de ésta forma representa el 70 % de la proteína total, mientras que si sólo se toman en cuenta los aminoácidos de la secuencia consenso que son idénticos en todas las proteínas, representa el 20 % de la secuencia completa. Esto confirma el alto grado de conservación que hay entre las piruvato cinasas de procariotas y eucariotas, sobretodo si se toma en cuenta que entre mayor número de secuencias sean alineadas es menor la probabilidad de que el aminoácido sea idéntico en todas ellas o de que los cambios sean conservados. Asimismo, el número de huecos que hay en el alineamiento es muy pequeño lo que nos vuelve a hablar de su alta similitud.

Con la secuencia consenso obtenida se realizó otro fasta contra todo el banco de Swiss-Prot. para ver si se detectaban otras secuencias con alta similitud. De éste análisis se obtuvo que aparte de las piruvato cinasas, la secuencia de la proteína 6-fosfogluconato deshidratasa de *E. coli* es similar a la de la secuencia consenso de las piruvato cinasas. Esta proteína participa en la vía de Enter-Doudoroff catalizando el paso del gluconato 6-P a la 2-ceto-3 deoxi-6-P gluconato aldolasa a partir de la cual se pueden formar gliceraldehído 3-P y piruvato (Fraenkel, 1987)(Fig. 8). Al llevarse a cabo un análisis estadístico llamado rbf2 entre la secuencia consenso obtenida y la secuencia de la proteína 6-fosfogluconato deshidratasa, para determinar si el parecido entre las 2 secuencias era significativo o no, se obtuvo que la 6-fosfogluconato deshidratasa tiene una similitud importante con la secuencia

consenso, lo que nos habla de su alto parecido con las proteínas piruvato cinasas de los distintos organismos. No obstante, el valor de rdf2 obtenido al comparar cualquiera de las secuencias de las piruvato cinasas con la secuencia consenso fue mayor que el mostrado al realizar el análisis estadístico entre la enzima de la vía de Entner-Doudoroff y la secuencia consenso. Esto es debido a la alta conservación que existe entre todas las piruvato cinasas analizadas.

En base al alineamiento múltiple de las proteínas, se obtuvo un dendograma (Fig. 10) el cual si bien no es una reconstrucción filogenética de las proteínas, sí muestra el grado de similitud entre las mismas. En éste dendograma se observa un grupo que engloba a las piruvato cinasas de los organismos superiores, las cuales muestran un alto grado de similitud. También se observa que la PK-I de *E. coli* tiene una mayor semejanza con el grupo anteriormente citado que la PK-II y que la proteína que se parece menos a las demás, en el dendograma, es la 6-P gluconato deshidratasa.

Asimismo, se llevó a cabo el alineamiento de la secuencia consenso de proteínas con cada una de las piruvato cinasas de *E. coli* utilizando el programa BESTFIT de Wisconsin, obteniéndose una similitud del 44 % entre las dos secuencias. Por otro lado, el alineamiento de las dos secuencias nucleotídicas de *E. coli* entre sí mostró que cerca del 50 % de los nucleótidos son idénticos (Fig. 11). El valor de rdf2 entre estas dos secuencias fue muy alto, lo que habla de su alta similitud.

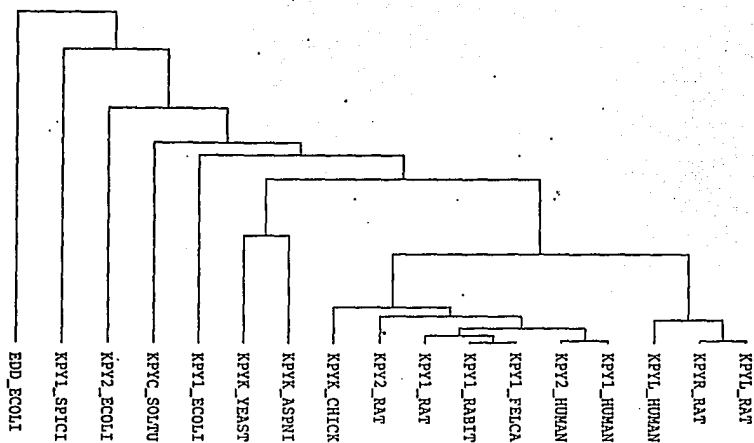


Fig. 10. Dendrograma obtenido a partir del alineamiento múltiple de las piruvato cinasas mediante el programa pileup de Wisconsin. KPY se refiere a las piruvato cinasas de diferentes organismos y EDD se refiere a la enzima 6-fosfogluconato deshidratasa. ECOLI (*Escherichia coli*), SPICI (*Spiroplasma citri*), SOLTU (*Solanum tuberosum*), YEAST (*Sacharomyces cerevisiae*), ASPNI (*Aspergillus niger*), CHICK (*Gallus gallus*), RAT (*Rattus norvegicus*), RABBIT (*Oryctolagus cuniculus*), HUMAN (*Homo sapiens*).

151 ACTTTGGACTGTAGAACTCAACGACTCAAAAACAGGCACTCACGTTGGGC 200 *pykF*
1CTTAATTTAAGTGA 14 *pykA*
201 TGAGACACAAAGCACACATTCTCTGCACGCTTTTCGATGTACACTATCC 250
15 CGATCGCTAAAAACGACTGTCACCTGTCCCTAAATCTTATACGACATC.CGAA 63
251 TTAGAGCGAGGACCACCACATTTTCGTAATACCGGATTCGCTTCCGGCAG 300
64 TGAGATTAATTTATCGCCATCGCGGGCTTATTCATTCCGATTCATGTT 113
301 TGCGCCAGAAAAGCAAGTTTCTCCCATCCTTCTCAACTTAAAGACTAAGA 350
114 CAAGCAACACCTGGTTGTTTCAGTCAACGGAGTATTACATGTCCAGAAGG 163
351 CTGTCAATGAAAAGACCAAAATTGTTTGCACCATCGGACCGAAAACCGAA 400
164 CTTCCGAGA....ACAAAATCGTTACCACGTTAGGCCAGCAACAGAT 208
401 TCTGAAGAGATGTTAGCTAAAATGCTGGACGCTGGCATGAACGTTATGCG 450
209 CGCGATAATAATCTTGAAAAAGTTATCGCGGGGGGTGCCAACGTTGTAGC 258
451 TCTGAACCTTCTCTCATGGTGACTATGCAGAAACACGGTCAGCGCATTCAGA 500
259 TATGAACCTTTCTCACGGCTCGCCTGAAGATCACAAAATGCGCGCGGATA 308
501 ATCTGCGCAACGTTGATGAGCAAACCTGGTAAAACCGCCGCTATCCTGCTT 550
309 AAGTTCGTGAGATTGCCGCAAAACTGGGGCGTCATGTGGCTATTCTGGGT 358
551 GATACCAAAGTCCCGAAATCCGCACCATGAACTGGAAAGCGGTAACGA 600
359 GACCTCCAGGGGCCAAAATCCGTGTATCCACCTTTAAAGAAGGCCAAGT 408
601 CGTTTCTCTGAAAGCTGGTCAGACCTTTACTTTCACCCTGATAAATCTG 650
409 TTTCTCAATATTGGGGATAAAATCCTGCTCGACGCCAACCTGGGTAAG 458
651 TTATCGGCAACAGCGAAAATGGTTGCGGTAACGTATGAAGGTTTCACTACT 700
459 GTGAAGGCGCAAAAGAAAAGTCGGTATCGACTACAAAAGCCCTCCTGCT 508
701 GACCTGTCTGTTGGCAACACCGTACTGGTTGACGATGGTCTGATCGGTAT 750
509 GACCTGCTGCTGGTGACATCCCTGCTGCTGGACGATGGTTCGCGTCCAGTT 558
751 GGAAGTTACGCCATTGAAGGTAACAAAGTTATCTGTAAGGTGCTGAACA 800
559 AAAAGTACTGGAAGTTCAGGGCATGAAAGTGTTCACCGAAGTCACCGTCG 608
801 ACGGTGACCTGGGCGAAAACAAAGGTGTGAACCTGCCTGGCGTTTCCATT 850
609 GTGGTCCCCCTCTCCAACAATAAAGGTATCAACAAACTTGGCGGGCGGTTTG 658
851 GCTCTGCCAGCACCTGGCTGAAAAGACAAACAGGACCTGATCTTTGGTTG 900
659 TCGGCTGAAGCGCTGACCGAAAAGACAAAGCAGACATTAAGACTGCGGC 708

901 CGAACAAAGCGTAGACTTTGTTGCTGCTTCCTTTATTTCGTAAGCGTTCTG 950
 709 GTTGATTGGCGTAGATTACCTGGCTGTCTCCTTCCCACGCTGTGGCGAAG 758
 951 ACGTTATCGAAATCCCGTAGCACCTGAAAGCGCACGGCGGCGAAAACATC 1000
 759 ATCTGAACTATGCCCGT...CGCCTGGCACGCGATGCAGGATGTGATGCG 805
 1001 CACATCATCTCCAAAATCGAAAACCGAAGGCCCTCAACAAC..... 1042
 806 AAAATGTTGCCAAGGTTGAACGTGCGGAAGCCGTTTGCACCCAGGATGC 855
 1043 .TTCACGAAATCCTCGAAGCCTCTGACGGCATCATGGTTGCGCGTGGCG 1091
 856 AATGGATGACATCATCCTCGCCTCTGACGTGTAATGGTTGACGTTGGCG 905
 1092 ACCTGGGTGTAGAAATCCCGGTAGAAGAAGTTATCTTCGCCCAGAAGATG 1141
 906 ACCTCGGTGTGGAAATTTGGCGACCCGGAACGGTTCGGCATTCAGAAAGCG 955
 1142 ATGATCGAAAATGTATCCGTGCACGTAAGTCGTTATCACTGCGACCCA 1191
 956 TTGATCCGTGTCGCGGTAGTAAACCGGAGCGGTAATCAGCGCGACCCA 1005
 1192 GATGCTGGATTCCATGATCAAAAACCCACGCCCGACTGCGCGAGAAGCCG 1241
 1006 GATGATGGAGTCAATGATTAATAACCCGATGCCGACGCGTGCAGAAGTCA 1055
 1242 GTGACGTTGCAAACGCCATCCTCGACGGTACTGACGCACTGATGCTGTCT 1291
 1056 TGGACGTAGCAAACGCCGTTCTGATGTTACTGACGCTGTGATGCTGTCT 1105
 1292 GGTGAATCCGCAAAGGTAATAACCCGCTGGAAGCGGTTTCTATCATGGC 1341
 1106 GCAGAAACTGCCGCTGGGCGAGTATCCGTCAGAAACCGTTGACGCCATGGC 1155
 1342 GACCATCTGCGAACGTACCGACCGCGTGATGAACAGCCGTTCTCGAGTTCA 1391
 1156 GCGCGTTTGCTGGGTGCGGAAAAAATCCCGAGCATCAACGTTTCTAAAC 1205
 1392 ACAATGACAACCGTAAACTGCGCA...TTACCGAAGCGGTATGCCGTTGGT 1438
 1206 ACCGTCTGGACGTTCACTTCGACAATGTGGAAGAAGCTATTGCCATGTCA 1255
 1439 GCCGTTGAAACTGCTGAAAACCTG...GATGCTCCGCTGATCGTGGTTGC 1485
 1256 GCAATGTACGCACTAACCACCTGAAAGCGTTACGGCGATCATCACCAT 1305
 1486 TACTCAGGGCGGTAATCTGCTCGCGCAGTACGTAATACTTCCCGGATG 1535
 1306 GACCGAATCGGGTCGTACCGCGCTGATGACCTCCCGTATCAGCTCTGGTC 1355
 1536 CCACCATCTTGGCACTGACCACCAACGAAAAACGGCTCATCAGTTGGTA 1585
 1356 TGCCAATTTTCGCCATGTGCGGCCATGAACGTACGCTGAACCTGACTGCT 1405
 1586 CTGAGCAAAGGCGTTGTGCCGAGCTTGTAAAGAGATCACTTCTACTGA 1635
 1406 CTCTATCGTGGCGTTACGCCGTTGACCTTTGATAGCGCTAATGACGGCGT 1455

```

1636 TG..ATTTC.TACCGTCTGGG.TAAAGA.ACTGG.CTCTGCAG.AGCGGTCTGG.C 1683
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
1456 AGCAGCTGCCAGCGAAGCGGTTAATCTGCTGCGCGATAAAGTTACTTGA 1505
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
1684 ACACAAAGGTGACGTTGTAGTTTATGGTTCTGGTGCAC.TGGTACCGAG.C 1733
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
1506 TGTCTGGTGACCTGGTGATTGTCACCCAGGGCGACGTGATGAGTACCGTG 1555
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
1734 GGC.ACTACTAACACCGCATCTG.TTACGTC.CCTGTAATATGCTTTTGTG.A 1783
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
1556 GGT.TCTACTAATACCACGCGTATTTTAA.CGGTAGAGTAAGTACGTTGCCG 1605
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
1784 ATTAATTTGTATATCGAAGAGCCCTGATGGGGTTTTTTATTTATCGAT 1830
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
1606 GATCGGGCGAAAACGCCACATCCGGCCTACAGTTC..... 1640

```

Fig. 11. Alineamiento de las secuencias nucleotídicas de *pykF* vs. *pykA* de *E. coli*. Las rayas verticales señalan los nucleótidos que son idénticos en ambas secuencias mientras que los huecos indican cambios no conservados. Los puntos arriba de las secuencias representan la separación cada 10 bases.

DISCUSION

Se ha reportado que al crecer células de *Escherichia coli* en MM con glucosa, de todo el PEP formado, el 66% es utilizado para el transporte y fosforilación de la glucosa por el PTS, el 16.2% se utiliza para la formación de oxaloacetato por la acción de la enzima PEPCasa, el 14.5% para la formación de piruvato por las enzimas piruvato cinasas y el 3.3% es utilizado para la biosíntesis en general (Holms, 1986). Por tanto, de las 2 moléculas de PEP que se forman durante el metabolismo de la glucosa, al menos una de ellas es utilizada por el PTS para transportar y fosforilar una molécula de glucosa para producir glucosa 6-P y piruvato.

Garrido y colaboradores (1977) reportaron que en la ausencia de actividad de piruvato cinasa y bajo condiciones aeróbicas, un sistema PT funcional puede proveer a la célula de una cantidad adecuada de piruvato para sostener velocidades de crecimiento normales. En el mismo reporte, debido a que la ausencia de la piruvato cinasa tipo II pareció no afectar el crecimiento sobre cualquiera de las fuentes de carbono probadas, el papel de PK-II continua siendo poco claro.

El presente trabajo demuestra que bajo ciertas condiciones, mutaciones en uno solo de los genes *pyk* no tuvo efectos en el crecimiento celular y en el consumo de glucosa. Sin embargo, la doble mutación *pykA pykF* tuvo un fuerte efecto, incrementando el tiempo de duplicación y produciendo una fase lag de aproximadamente 7 horas tanto en el crecimiento como en el consumo de glucosa. Estos datos sugieren que bajo condiciones en las que las células se cambian de un MM con glucosa y casaminoácidos a uno con glucosa pero sin casaminoácidos, que es cuando las células pudieran requerir canalizar la mayor parte del carbono a través de la vía glicolítica y el ciclo de los ácidos tricarbóxicos para generar todos los intermediarios biosintéticos, un sistema PT funcional y PK-I son suficientes para tener un crecimiento normal.

Por otro lado, las células que llevan la doble mutación *pykA pykF*, requirieron de un período de adaptación, después del cual fueron capaces de reasumir el crecimiento, aunque con un TD menor que el de la silvestre, así como de alcanzar la misma biomasa final. Estos resultados pueden explicarse de varias formas. Por ejemplo:

1) Es posible que en la ausencia de actividad de las piruvato cinasas el sistema PTS no sea suficiente para sostener un crecimiento normal por lo que se requiera hacer funcionar otras vías. Este papel podría ser llevado a cabo por la vía de Entner-Doudoroff, la cual es una vía inducible para el catabolismo del gluconato que produce gliceraldehído 3-P y piruvato como productos finales (Fraenkel, 1987). Una vez que éste mecanismo ha sido activado, la célula es capaz de reasumir velocidades de crecimiento similares a las de la cepa silvestre (Figs. 8 y 12).

2) La doble mutación *pykA pykF* podría alterar la proporción intracelular de PEP y piruvato, afectando a algunas de las enzimas o sistemas que sensan dichas moléculas. Un candidato para esto es la enzima fosfofructocinasa que cataliza la fosforilación de fructosa 6-P por ATP para producir fructosa 1,6-bP. Esta es una enzima alostérica activada por nucleósidos difosfatos e inhibida por PEP (Fraenkel, 1987). La inhibición a éste nivel podría parar la glicólisis en una etapa muy temprana. En forma similar a la primera explicación, la fase lag observada en la doble mutante *pykApykF* podría ser el resultado de un mecanismo que la célula desencadena con el objeto de activar otra(s) ruta(s) metabólica(s) para poder producir piruvato.

3) La inhibición de la fosfofructocinasa por las altas concentraciones de PEP pudiera provocar la acumulación de fructosa 6-P, que es el sustrato de ésta enzima, así como la acumulación de glucosa 6-P, primer intermediario de la vía glicolítica, cuya acumulación se ha reportado que es capaz de inhibir al componente II del PTS al igual que sucede con otros carbohidratos fosfatos (Postma, 1987).

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

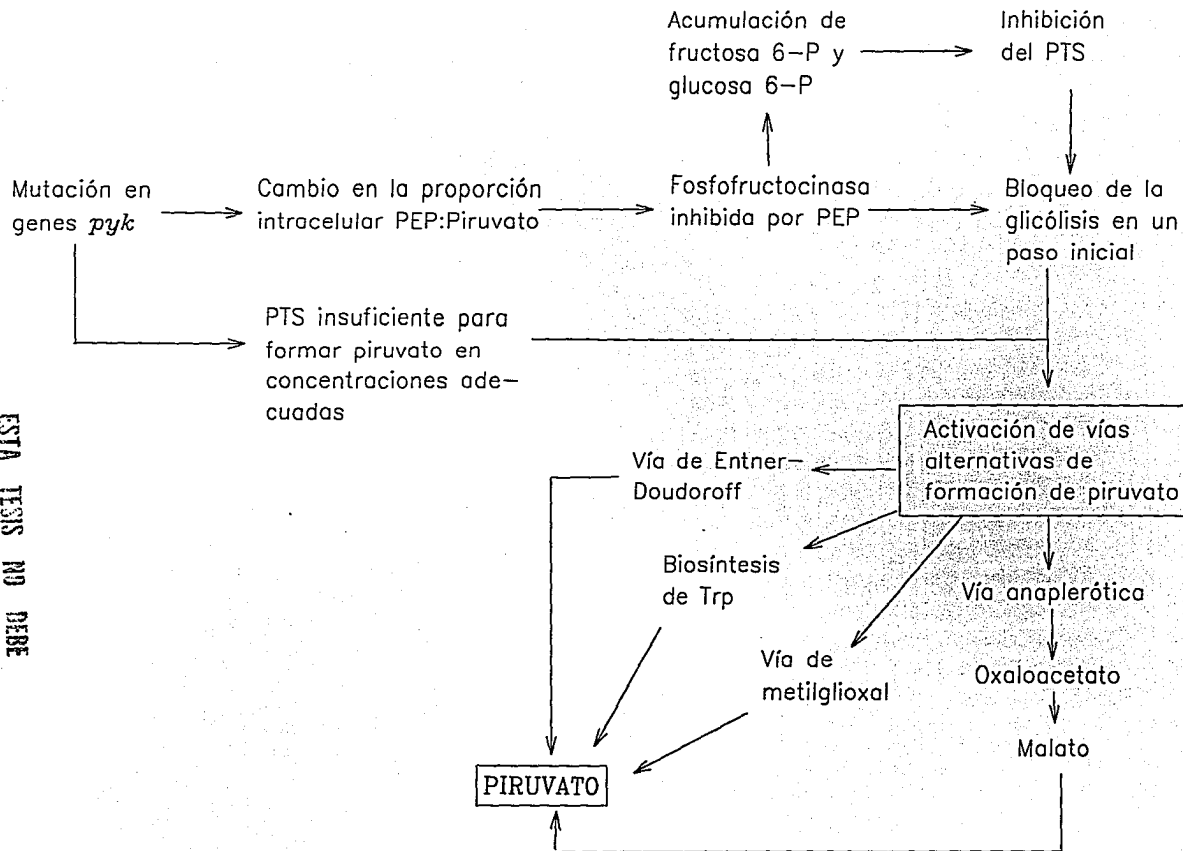


Figura 12. Modelo propuesto para explicar el alargamiento de la fase lag en la doble mutante de piruvato cinasa.

En estas circunstancias, una opción de la célula para bajar los niveles de éstos carbohidratos así como para producir piruvato, podría ser la activación de la vía de Entner-Doudoroff, con lo cual podrían bajar los niveles de los carbohidratos fosfatos y el sistema PT podría funcionar adecuadamente.

Otras vías alternativas de formación de piruvato pudieran ser la vía anaplerótica de la PEPCasa, la cual cataliza la conversión de PEP a oxaloacetato, del cual se puede formar malato y de ahí piruvato. La vía del metilglicoxal también da como producto final piruvato, sin embargo sería poco probable que esta estuviera activa ya que las altas concentraciones de PEP inhiben a la metilglicoxal sintetasa (Irani, 1977). Asimismo, se puede formar piruvato en uno de los pasos de biosíntesis del aminoácido triptofano (Stryer, 1988) (ver Fig. 8).

Los retrasos observados en los cultivos de las mutantes *pyk* para reasumir el crecimiento celular así como los altos niveles de consumo de glucosa, fueron obtenidos solo después de un cambio de medio (de MM/glucosa y casaminoácidos a MM/glucosa), lo que sugiere que bajo estas condiciones se creó una situación metabólica especial donde las células requirieron de un período de adaptación, probablemente para reorganizar sus rutas metabólicas y reasumir su crecimiento.

El análisis de las mutaciones *pykA* y *pykF* en un fondo *pts⁻* sugiere que la enzima PK-I (codificada por *pykF*), podría ser la principal proveedora de piruvato. Esto concuerda con el hecho de que PK-I es activada por fructosa 1,6 difosfato, un intermediario de la vía glicolítica, mientras PK-II responde a 5'-AMP y a pentosas monofosfatos (Waywood, 1974).

Una observación adicional, fue el hecho de que en los experimentos, la presencia de la mutación *pykA* mejoró la cinética de crecimiento del cultivo (Figs. 5 y 7). Posiblemente bajo las condiciones examinadas (una alta concentración inicial de glucosa), una cepa con las dos piruvato cinasas funcionales, podrían producir piruvato a un nivel en el que el ciclo de los ácidos tricarbóxicos se llegue a saturar. Esta condición podría provocar que se lleve a cabo un tipo de fermentación ácido-

mixta, con el consecuente decremento del crecimiento sobre glucosa. Es posible que la mutación *pykA* disminuya el flujo de carbono a través del nodo PEP-piruvato, disminuyendo con ello el gasto de carbono.

Por otro lado, en lo que respecta a la comparación de secuencias, se observó que tanto a nivel de nucleótidos como de aminoácidos existe un gran parecido entre las piruvato cinasa de *E. coli*, sobretudo en la región central de las mismas. Asimismo, a partir de los análisis de *rdf2* (ver resultados) se obtuvieron valores de desviaciones muy por arriba del promedio para ser consideradas con una similitud importante, lo que sugiere muy fuertemente que éstos dos genes probablemente tuvieron un mismo origen. Esto difiere de lo reportado por el grupo de Gilbert, quienes sugirieron que el gene *pykA* es altamente divergente del gene *pykF* o que no está relacionado con él (Ohara, 1989). Asimismo, el alineamiento de las piruvato cinasas de distintos organismos realizadas con el programa *pileup* de *Wisconsin* (ver Fig. 9) mostró un alto grado de similitud entre todas las proteínas obtenidas, sobretudo en la región central, lo que nos habla de posibles dominios funcionales.

CONCLUSIONES

- La existencia de dos piruvato cinasas en *E. coli* que catalizan la misma reacción enzimática pero que están reguladas de manera diferente le permite a la bacteria tener un mayor control sobre la formación de piruvato, el cual es un compuesto clave del metabolismo de la glucosa.
- La mutación en el gene *pykA* de *E. coli* produjo solo una ligera disminución del tiempo de duplicación en comparación con la cepa silvestre, mientras que mutaciones en *pykF* o en ambos genes (*pykA* y *pykF*) causaron un alargamiento de la fase lag de crecimiento y del consumo de glucosa así como un incremento en el tiempo de duplicación celular en comparación con la silvestre y la mutante *pykA*.
- El alargamiento de la fase lag de la doble mutante en piruvato cinasa pudiera deberse al bloqueo momentáneo del sistema PTS y/o a la inhibición de la enzima fosfofructocinasa como resultado del incremento en la relación PEP/piruvato ya que ésta es una medida de la carga energética de la célula. En este caso vías como la de Entner-Doudoroff pudiera ser la encargada de disminuir la acumulación de carbohidratos fosfato y de la formación de piruvato.
- Bajo condiciones aeróbicas y en presencia de un sistema PT funcional, las células requirieron de las enzimas piruvato cinasas para reasumir el crecimiento luego de haber sido cambiadas de un MM/glucosa y casaminoácidos a un MM con glucosa como la única fuente de carbono.
- Tanto la cepa silvestre como las cepas mutantes en uno o ambos genes de piruvato cinasa produjeron CO₂ con la misma velocidad en la fase exponencial de crecimiento.
- El crecimiento de la mutante en *pykF* en un fondo PTS⁻glucosa⁺ se vio mayormente afectado que la cepa *pykA*⁻PTS⁻ debido a que la piruvato cinasa tipo I es la enzima que se encuentra principalmente activa cuando se utiliza glucosa como fuente de carbono.

- En ausencia de las enzimas piruvato cinasa tipo A o tipo F así como de un PTS funcional, la vía del metilglicoxal o la vía de Entner-Doudoroff, alternativas de la vía glicolítica, pueden permitir cierta producción de piruvato, aunque en cantidades insuficientes para poder permitir tiempos de duplicación normales.
- A diferencia de lo reportado por el grupo de Gilbert que sugiere que *pykA* es altamente divergente de *pykF* o que no están relacionados, la comparación de secuencias de las piruvato cinasas mostraron un alto grado de similitud entre sí, tanto a nivel de nucleótidos como de aminoácidos lo que sugiere un origen común de las mismas.
- Las piruvato cinasas examinadas, tanto de organismos procariontas como eucariotas, muestran un alto grado de similitud con las piruvato cinasas de *E. coli*, sobre todo en la región central de las mismas lo que nos habla de posibles dominios funcionales.

BIBLIOGRAFIA

- Claibone, W. F. (1992) An improved chloramphenicol resistance gene cassette for site-directed marker replacement mutagenesis. *Biotechniques*. 12,223-225
- Garrido, P.A. and Cooper, R.A. (1977) Pyruvate formation during the catabolism of simple hexose sugars by *Escherichia coli*: studies with pyruvate kinase-negative mutants. *J. Bacteriol.* 129, 1208-1214
- Garrido, P.A. and Cooper, R.A. (1983). Evidence for two distinct pyruvate kinase genes in *Escherichia coli* K-12. *FEBS Lett.* 162, 420-422
- El-Mansi, E.T. and Holms, W.H. (1989) Control of carbon flux to acetate excretion during growth of *Escherichia coli* in batch and continuous culture. *J. Gen. Microbiol.* 153, 2875-2883
- Fraenkel, D.G. (1987) Glycolysis, pentose phosphate pathway and Entner-Doudoroff pathway. Vol.1 pp. 142-150 *In Escherichia coli and Salmonella typhimurium*. Neidhardt, F.C. Ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Holms, W. H. (1986) Current topics in cellular regulation. Horecker, B. L. Ed. Academic Press, Inc. Vol. 28. p.p. 69-105
- Irani, M. H. and P. K. Maitra (1977) Properties of *Escherichia coli* mutants deficient in enzymes of glycolysis. *J. Bacteriol.* 132,398-410
- Knappe, J. (1987) Anaerobic dissimilation of pyruvate. Vol.1 pp.151-155. *In Escherichia coli and Salmonella typhimurium*. Neidhardt, F.C. Ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Kornberg, H. L. (1973) Control *in situ* of the pyruvate kinase activity of *Escherichia coli*. *FEBS Letters* 32 (2):257-259
- Lowry, O.H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193,265-275
- Malcovati, M. G. (1969) Two types of pyruvate kinase in *Escherichia coli* K-12. *Biochim. Biophys. Acta.* 178, 420-423
- Malcovati, M. G. (1973) Two forms of pyruvate kinase in *Escherichia coli*: Their properties and regulation. *Acta Viotaminol. Enzymol.* 27,96-111
- Malcovati, M. G. (1982) AMP- and fructose 1,6-bisphosphate-activated pyruvate kinases from *Escherichia coli*. *Methods in Enzymol.* 90, 170-179
- Miller, J.E., K. C. Backman et al. (1987). Production of phenylalanine and organic acids by phosphoenolpyruvate carboxylase-deficient mutants of *Escherichia coli*. *J. Ind. Microbiol.* 2,143-149

- Oden, K. L., De Veaux, L. C. et al (1990) Genomic replacement in *Escherichia coli* K-12 using covalently closed circular plasmid DNA. *Gene*. 96:29-36
- Ohara, O. , R. L. Dorit and W. Gilbert (1989) Direct genomic sequencing of bacterial DNA:the pyruvate kinase I gene of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86,6883-6887
- Postma, P.W. (1987) Phosphotransferase system for glucose and other sugars. Vol.1 pp. 127-141. *In Escherichia coli and Salmonella typhimurium*. Neidhardt, F.C. Ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C. .
- Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis (1983) Molecular cloning. A laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Silhavy, T. J. et al (1984) Experiments with gene fusions. Cold Spring Harbor, N. Y.
- Somani, B. L., Valentini, G. and Malcovati, M. (1977) Purification and molecular properties of the AMP-activated pyruvate kinase from *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta*. 482:52-63
- Strayer, L. (1988) Biochemistry. 3rd. ed. W. H. Freeman and Company. N. Y., U.S.A.
- Valentini, G., Iadarola, P. et al (1979) Two forms of pyruvate kinase from *Escherichia coli* a comparison of chemical and molecular properties. *Biochim. Biophys. Acta*. 570:248-58
- Valentini, G., Stoppini, m. et al (1991) Bacterial pyruvate kinase have a shorter N-terminal domain. *Biol. Chem*. 372:91-93
- Way, J. C., M. A. Davies et al (1984) New Tn10 derivatived for transposon mutagenesis and for construction of *lacZ* operon fusions by transposition. *Gene* 32,369-379
- Waywood, E. B. and Sanwal, B.D. (1974) The control of pyruvate kinases of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem*. 249:265-274
- Waywood, E. B. Rayman, M. K. and Sanwal, B. D. (1975) The control of pyruvate kinases of *Escherichia coli*. II. Effectors and regulatory properties of the enzyme activated by ribose 5-phosphate. *Can. J. biochem*. 53:444-454
- Waywood, E. B. and Sanwal, B. D. (1976) The control of pyruvate kinase of *Escherichia coli*. Binding of substrate and allosteric effectors to the enzyme activated by fructose 1,6-biphosphate. *Biochem*. 15(2):277-282
- Wilson, K. (1987) Preparation of genomic DNA from bacteria. *In Current protocols in molecular biology*. John Wiley & Sons, U.S.A.
- Williams, D. (1988) Problems of measurement and control in biotechnological processes. Winkler, M. A. Ed. *In Chemical Engineering problems in biotechnology*. p. 167-213