



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**Influencia de la modulación alostérica de la fructosa 6-fosfato
cinasa tipo 1 (PFK-1) sobre la velocidad de producción de etanol
en *Saccharomyces cerevisiae*.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO DE ALIMENTOS

PRESENTA:

Macías Hidalgo Víctor Francisco



MÉXICO, D.F.

2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 esta 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 ASIGNADO

Presidente: Profesor José Mariano García Garibay

Vocal: Profesora Sobeida Sánchez Nieto

Secretario: Pofesor Héctor Quezada Pablo

1er Suplente: Agustín Reyo Herrera

2º Suplente: Maricarmen Quirasco Baruch

**Departamento de Bioquímica
Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”**

Asesor del Tema: Héctor Quezada Pablo

Sustentante: Víctor Francisco Macías Hidalgo

"El presente trabajo se financió con recursos provenientes del Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal (proyecto PICS08-5) y del CONACyT (proyecto 106583)".

Cosmos, esencia y causa primordial

“The Cosmos is all that is or ever was or ever will be. Our feeblest contemplations of the Cosmos stir us.

We know we are approaching the greatest of mysteries.”

Carl Sagan

Por ser el origen de todos los acontecimientos que he presenciado y vivido, sin los cuáles no podría encontrarme en éste punto de realización personal, profesional y espiritual. Por los obstáculos, dificultades, facilidades y victorias que he conocido, y que han sido parte esencial en mi formación como ser humano. Por haberme dado la oportunidad de conocer a tanta gente a lo largo de mi vida, que me ha dejado grandes enseñanzas y sabiduría, además de todos los conocimientos con que ahora cuento. Por brindarme la fortaleza, la constancia y la decisión que fueron necesarias durante todo éste proceso. Por otorgarme un lugar en ti, y darme la oportunidad de conocerte y conocerme a mí mismo, desde ésta conciencia y existencia finita.

Porque somos el medio a través del cual, el cosmos se contempla a sí mismo.

A mis padres

Porque ustedes son quienes han contribuido en mayor parte para convertirme en la persona que soy ahora, ya que con su ejemplo aprendí lo que es el esfuerzo, cuando cada día dan lo mejor de sí en todos los aspectos. A pesar de lo duro que a veces los tratara la vida, ustedes siempre tenían cariño, consejos y dedicación. Porque no ha pasado un día en el que ustedes no me apoyaran y me brindaran todo lo necesario para continuar creciendo. Porque han estado siempre a mi lado, ya sea apoyándome y ayudándome para seguir adelante cuando más lo necesitaba o bien viviendo y disfrutando de los mejores momentos y mayores victorias en mi vida. Porque sin ustedes jamás podría haber llegado a dónde estoy. Porque ustedes siempre han procurado mi felicidad, por su gran fortaleza, su infinito amor y todo lo que hemos compartido a lo largo de éstos años.

Porque ustedes son lo que yo, y yo soy lo que ustedes.

A mi hermano

Porque siempre has estado a mi lado, a pesar de tu ausencia física, tu esencia ha permanecido latente, recordándome que no me puedo rendir, que a pesar de cualquier obstáculo, se debe mirar siempre al frente. Porque tú me diste el ejemplo más grande de valor y entereza que jamás haya tenido. Porque tú siempre me das una razón para seguir adelante. Porque espero honrar tu memoria siendo quien soy ahora.

Porque algún día, tú y yo, seremos uno de nuevo.

A mis primos

Porque ustedes siempre han sido mis hermanos en nuestra gran familia. Por todo el tiempo y vivencias que hemos compartido y que forman una parte esencial en mí.

A mis tíos

Porque todos forman parte de una gran familia que siempre ha permanecido unida a pesar del tiempo y los cambios que éste ha traído. Porque sin sus consejos, opiniones y regaños no podría ser la persona que soy.

A mis abuelos

Porque ustedes son el origen de ésta familia. Por el ejemplo que son para mí y el gran amor y comprensión que me brindaron.

A mi tutor

Porque haberme dado la oportunidad de ser parte de éste proyecto. Por darme la confianza de ser parte de su equipo de trabajo. Por el conocimiento y el tiempo compartido durante casi dos años de trabajo que nos tomó concluir éste trabajo. Porque a pesar de no haber sido yo el mejor de los alumnos, me brindó su ayuda y trabajó a mi lado para poder concretar ésta tesis.

A mis amigos

Por la amistad que compartimos. Por todos los momentos y experiencias vividas con ustedes y que siempre estarán formando parte de lo que soy.

ÍNDICE

1. RESUMEN	9
2. INTRODUCCIÓN.....	9
3. ANTECEDENTES.....	12
2.1 Etanol como biocombustible.....	12
2.2 Glicólisis.....	14
2.3 Metabolismo del carbono en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>.....	17
2.4 Control de flujo en glicólisis de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>.....	19
2.5 Regulación de la enzima fuctosa-6-fosfato cinasa en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>.....	22
3. HIPÓTESIS.....	25
4. OBJETIVOS.....	25
4.1 Objetivo general.....	25
4.2 Objetivos particulares.....	25
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
5.1 Extracción de DNA genómico.....	26
5.2 Diseño de oligonucleótidos.....	27
5.3 Amplificación de gen silvestre mediante PCR.....	29
5.4 Generación de gen mutante PFK1P728L.....	31

5.5 Visualización de los productos de PCR mediante Electroforesis.....	33
5.6 Purificación del gen amplificado, purificación del gel.....	34
5.7 Ligación a Vector Pjet1.2/blunt Cloning Vector.....	34
5.8 Generación de bacterias competentes <i>E. coli</i> Top10.....	36
5.9 Transformación de bacterias competentes <i>E. coli</i> Top10.....	36
5.10 Purificación del plásmido, MINI-PREPS.....	38
5.11 Digestiones confirmativas.....	39
5.12 Ligación a Vector multicopia para levadura pRS424.....	39
5.13 Secuenciación	43
5.14 Transformación de levaduras.....	44
5.15 Cultivos.....	45
5.16 Parámetros a evaluar durante fermentación.....	48
5.17 Evaluación del crecimiento durante la fermentación mediante densidad óptica.....	48
5.18 Cuantificación de etanol con cromatografía de gases.....	49
5.19 Cuantificación de glucosa con oxímetro.....	50
5.20 Obtención de extracto celular para determinación de la actividad enzimática de PFK-1.....	52
5.21 Cuantificación de proteína.....	53
5.22 Medición de actividad.....	54
5.23 Evaluación de activación de PFK-1 por F-2,6-BP.....	56
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	57

6.1 Clonación del gen <i>PFK1</i> y <i>PFK1P728L</i> en el plásmido pRS424.....	57
6.2 Actividad enzimática de PFK1 Y PFK1P728L.....	64
6.3 Monitoreo de fermentación.....	67
6.4 Capacidad de crecimiento.....	68
6.5 Consumo de glucosa.....	71
6.6 Cinética de producción de etanol.....	72
7 CONCLUSIONES.....	74
8 BIBLIOGRAFÍA.....	75
9 APÉNDICE.....	79

RESUMEN

Debido a la gran importancia comercial e industrial de la glicólisis en *Saccharomyces cerevisiae*, se realizó un proyecto con el fin de comprender la regulación metabólica de ésta vía. Basándose en una serie de trabajos de distintos grupos de investigación alrededor del mundo, un equipo del Departamento de Bioquímica en el Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”, se dio a la tarea de analizar la cinética de producción de etanol como un indicador de la velocidad de flujo en la vía glicolítica. Dicho análisis se llevó a cabo en distintas condiciones de sobre-expresión, eliminación de inhibición de ciertas enzimas de la vía metabólica y diversas condiciones de demanda de ATP.

Dentro de las distintas condiciones analizadas, una fue la presentada por la sobre-expresión y eliminación de la inhibición alostérica de manera simultánea en la fructosa 6-fosfato cinasa tipo 1 (PFK-1).

Esta tesis trata sobre los resultados que el equipo consiguió bajo la condición de trabajo previamente descrita.

INTRODUCCIÓN

Aquellos microorganismos que pueden metabolizar la glucosa como fuente de energía en ausencia de oxígeno, poseen una variedad de vías metabólicas para regenerar NAD^+ , las cuales llevan a la formación de los llamados productos de fermentación, los que consisten en toda una variedad de moléculas como el ácido láctico, acético y propiónico además de compuestos como el acetona, butanol, isopropanol, acetilmetilcarbinol y el etanol.

Aunque muchos microorganismos producen etanol como producto final de su metabolismo energético, estos constituyen los menos abundantes dentro de la población microbiana y es, dentro de este pequeño grupo, que el género *Saccharomyces* tiene un lugar muy importante, pues se trata de un género de microorganismos que por miles de años ha sido utilizado como el más importante productor de etanol para beneficio del hombre. Es por esto que actualmente *S. cerevisiae* y especies relacionadas tienen una importancia comercial, la cual radica en su gran capacidad para convertir azúcares en etanol y dióxido de carbono de manera rápida y eficiente.

A pesar de esto, hasta la fecha no se han entendido a fondo los mecanismos que regulan el flujo glicolítico y la producción de etanol. Actualmente se sabe que el incremento en la transcripción de los genes que codifican para las enzimas de la glicólisis no provoca un aumento en la producción de etanol (Hauf et al., 2000; Shaaff et al., 1989). A partir de esto se considera que el principal mecanismo de control del flujo es la modulación de la actividad enzimática mediada por sustratos, productos o metabolitos efectores (Lapujade et al., 2007). Sin embargo hasta el momento no se han identificado las enzimas particulares que limitan el flujo de la vía *in vivo*. El entendimiento de la regulación en esta vía permitirá la construcción de cepas modificadas genéticamente con mayor velocidad de producción de etanol, lo que podría reducir los costos de producción y hacer más viable la utilización de este alcohol como combustible alternativo.

Se sabe que la Fructosa 6-fosfato cinasa tipo 1 (Pfk1), se encuentra regulada por un gran número de efectores además de ser uno de los tres pasos irreversibles que se encuentran dentro de la vía glicolítica y es la enzima de menor abundancia en la glicólisis (Fraenkel, 1982), por lo cual es considerada como una de las enzimas determinantes en la regulación del flujo glicolítico (Reibstein et al.,1986). Es por esta razón que, en el desarrollo de la tesis, se trabajó generando un gen mutante de Pfk1 con una mutación sitio dirigida con la que se sustituyó la prolina 728 por un residuo de leucina. Dicho gen mutante codifica para una enzima que no presenta el efecto de inhibición por parte de su más potente inhibidor, el ATP, y tampoco requiere la activación de su activador fisiológico, la fructosa 2,6-bifosfato, ya que se encuentra permanentemente en su forma activa. De esta forma quisimos determinar el papel que ejercen estas modulaciones alostéricas sobre el flujo glicolítico y por tanto en la velocidad de producción de etanol.

ANTECEDENTES

Etanol como biocombustible

Debido a la gran preocupación que se tiene por la inminente escasez del petróleo a causa de su sobreexplotación, aunado a los efectos adversos que su uso ocasiona sobre la salud de las personas como consecuencia de la contaminación ambiental generada por productos de la combustión de combustibles fósiles, y el requerimiento de energía a nivel global que cada vez es mayor, se han estudiado y propuesto fuentes alternativas de energía producidas a partir de fuentes renovables como son los biocombustibles, los cuales están destinados al sector de transporte para ser utilizados como sustitutos de aquellos combustibles derivados del petróleo (Demirbas , 2008) y los cuales resultan ser más amigables con el medio ambiente.

El bioetanol o alcohol etílico es un biocombustible líquido producto de la fermentación de azúcares provenientes de fuentes vegetales, que es llevada a cabo por la acción de microorganismos principalmente levaduras como son *Saccharomyces cerevisiae*. Se trata del biocombustible con mayor producción en el mundo, en la actualidad su producción representa el 94% de la producción total de biocombustibles y se utiliza en vehículos como sustituto de la gasolina, bien como único combustible o en mezclas. Es ampliamente utilizado hoy en día en los Estados Unidos y en Brasil. En Brasil el bioetanol para combustible es derivado de la caña de azúcar y es utilizado puro o mezclado con gasolina en una mezcla que se conoce como gasohol (24% bioetanol, 76% gasolina). En diversos lugares de los Estados Unidos, la cantidad de bioetanol añadida a la gasolina es 10% por

volumen, y se conoce como gasohol o E10. Brasil y Estados Unidos son los líderes mundiales en la producción de bioetanol, el cual es obtenido a partir de caña de azúcar y maíz, respectivamente, y ésta producción en conjunto representa alrededor del 70% de la producción de bioetanol del mundo (Balat, *et al* 2008).

México es un país que se beneficiaría de la introducción del bioetanol como combustible de muchas formas, como por ejemplo en la creación de empleos, conservación de los recursos petrolíferos, ahorro en los intercambios exteriores, motivación de la comunidad científica y tecnológica para desarrollar organismos con mayor capacidad fermentativa, etc. Debido a esto, cada vez se están realizando más estudios e investigaciones para mejorar la eficiencia de los microorganismos utilizados en el proceso de generación de bioetanol.

Esta es la principal razón por la que se realizó este trabajo, como parte de un proyecto que está enfocado en obtener una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* con capacidad incrementada en su velocidad de producción de etanol, mediante la utilización de varias estrategias de ingeniería genética llevadas a cabo de manera simultánea. De esta forma, a partir de este estudio, se aportaron algunos conocimientos para la mayor comprensión de la regulación de la glicólisis y probablemente para la obtención de cepas de uso industrial en la síntesis de bioetanol.

Glicólisis

La formación de dos moléculas de piruvato (de 3 carbonos) por cada molécula de glucosa (6 carbonos), mejor conocida como glicólisis, ocurre en diez pasos, que a su vez se dividen en dos grandes etapas (Figuras 1 y 2). Dentro de la primera etapa, la célula invierte energía en forma de ATP, y ésta comprende desde la fosforilación de la glucosa en su carbono 6 para formar glucosa 6-fosfato, hasta la isomerización de la dihidroxiacetona-fosfato en gliceraldehido 3-fosfato.

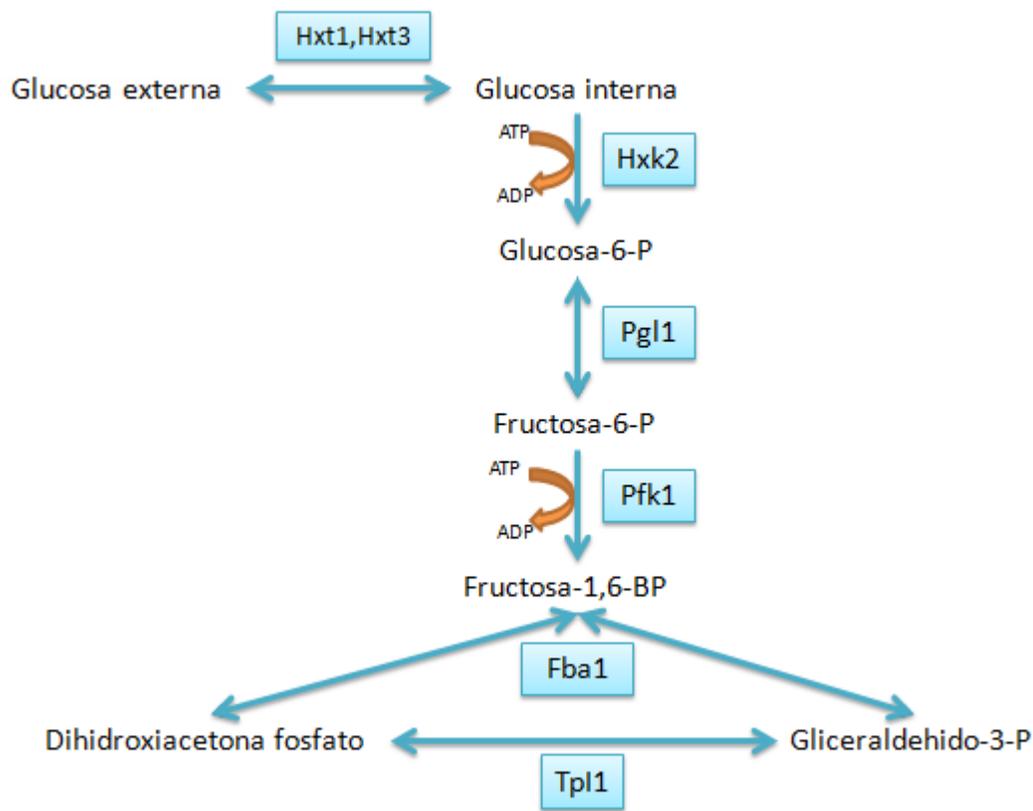


Fig 1.-Parte alta de la glicólisis. Se muestran los sustratos, productos, coenzimas y enzimas responsables de la actividad, además de 2 de los transportadores de hexosas en levadura (Hxt1 y Hxt3)

La segunda etapa comienza cuando las dos moléculas de gliceraldehído 3-fosfato son oxidadas y fosforiladas por fósforo inorgánico (Pi) y finalmente, por medio de una serie de reacciones, son convertidas en dos moléculas de piruvato. Es durante esta segunda etapa donde se obtiene la energía, con la formación de cuatro moléculas de ATP a partir de los pasos que involucran la fosforilación de ADP. La conversión de dos moléculas de gliceraldehído-3-fosfato a dos moléculas de piruvato trae consigo la formación de cuatro moléculas de ATP, sin embargo, al haberse invertido dos moléculas de ATP en la primera fase de la glicólisis, el rendimiento neto es de 2 moles de ATP por mol de glucosa.

Es también durante esta fase, que a partir de la oxidación del gliceraldehído-3-fosfato se generan moléculas de NADH, pues el NAD^+ funciona como aceptor de los electrones que el gliceraldehído-3-fosfato pierde en su oxidación, y debido a que las células mantienen sólo una cantidad limitada de NAD^+ es necesario reoxidar el NADH formado, de lo contrario la glicólisis eventualmente iría disminuyendo. Una de las formas en que este NAD^+ se regenera de forma anaerobia, es la fermentación.

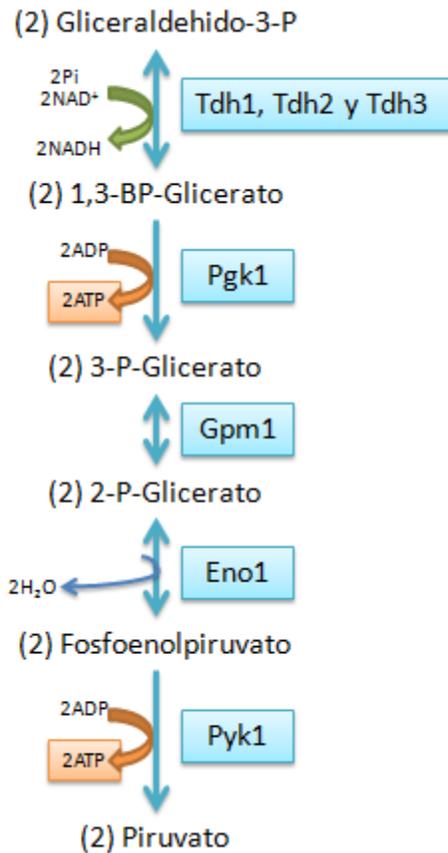


Fig.2.-Parte baja de la glicólisis. Se muestran los sustratos, productos, coenzimas y enzimas que son responsables de la actividad.

Basados en lo anterior, la ecuación general de la glicólisis tiene la siguiente forma:



Metabolismo del Carbono en *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae es un organismo con flexibilidad metabólica, esto es, que puede cambiar rápidamente su metabolismo respiratorio a fermentativo en respuesta a las concentraciones de oxígeno y fuentes de carbono disponibles. Es capaz de utilizar una gran variedad de mono, di y oligosacáridos, etanol, acetato, glicerol y lactato. Sin embargo, es la glucosa su fuente de carbono favorita, y la fermentación a través de la vía Embden-Meyerhof. Esta vía es tan importante para *S. cerevisiae* que de hecho las enzimas que participan en ella representan entre el 30-65% de sus proteínas totales solubles (Dickinson, 1999). Dicha vía es también conocida como glicólisis, que consiste estrictamente en la conversión de glucosa a piruvato, aunque en la levadura se incluye frecuentemente la formación del etanol como producto final. Esto se debe a que en presencia de fuentes fermentables de carbono, a pesar de estar en presencia de oxígeno *Saccharomyces cerevisiae* prefiere la fermentación frente a la respiración.

En presencia de glucosa, independientemente de la presencia de oxígeno, la síntesis de las enzimas necesarias para la utilización de disacáridos como sacarosa y maltosa, galactosa y para la utilización de fuentes no fermentables de carbono como etanol, acetato, glicerol, piruvato y lactato, así como para el desarrollo mitocondrial, se encuentran reprimidas (Dickinson, 1999). Para que esta represión cese, es necesario llegar a concentraciones por debajo del 0.8 mM de glucosa en el medio, es decir, es por debajo de esta concentración que ocurre la inducción de las enzimas respiratorias y los componentes mitocondriales de la

cadena transportadora de electrones. Este cambio metabólico ocurre completamente durante la fase estacionaria de crecimiento, donde si hay etanol disponible resultante de la fermentación previa, éste es consumido por la célula. Es esta represión catabólica por parte de la glucosa, lo que da origen al crecimiento diáuxico en glucosa (Diderich, et al., 2001) durante el cual se observa que inicialmente, la glucosa se cataboliza fermentativamente a dióxido de carbono, etanol y pequeñas cantidades de otros subproductos como acetato, glicerol y piruvato. Parte de éste azúcar es catabolizado respiratoriamente o utilizado para producir biomasa. Finalmente, el etanol y otros productos fermentativos que fueron producidos durante el crecimiento en glucosa son consumidos a dióxido de carbono y agua y parcialmente incorporado en biomasa.

A este proceso de producir etanol a partir de glucosa bajo condiciones de crecimiento aerobias se conoce como “Efecto Crabtree” (Diderich *et al*, 2001).

Como se menciona anteriormente, la glicólisis es la vía metabólica energética preferida por *S. cerevisiae*, sin embargo, al estar generalmente reprimidos sus componentes respiratorios, debido a la presencia de glucosa, fue necesario que ésta levadura desarrollara otra forma de regenerar el NAD^+ que utilizó previamente durante la glicólisis, y esto lo logra al convertir el piruvato en etanol. Este proceso es posible gracias a dos reacciones más en el metabolismo de *S. cerevisiae*, posteriores a la generación del piruvato. La primera reacción consiste en una descarboxilación irreversible del piruvato mediada por la piruvato descarboxilasa, teniendo como producto al acetaldehído. Durante la segunda reacción, el acetaldehído es reducido a etanol por acción del alcohol deshidrogenasa, y es en este paso donde se regenera el NAD^+ .

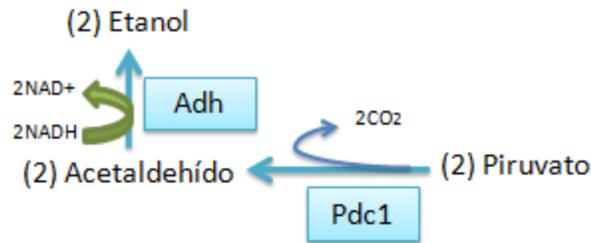


Fig.3.-Oxidación del NADH con la consecuente formación de etanol

Control de flujo en glicólisis de *Saccharomyces cerevisiae*

En la mayoría de las vías metabólicas, no existe un solo paso limitante que ejerza el control sobre el flujo de una vía metabólica, más bien, hay un número de reacciones sobre las cuales está repartido dicho control. Al día de hoy, no ha sido posible determinar cuáles son los pasos limitantes en el flujo glicolítico de *Saccharomyces cerevisiae* y que por tanto sean los que ejerzan el mayor control del flujo de esta vía, sin embargo, se han hecho numerosas propuestas basadas en modelos predictivos y en las propiedades cinéticas que tienen las diversas enzimas que componen la vía glicolítica. Una de estas propuestas señala un número de reacciones clave que han sido identificadas como aquellas que pudieran estar teniendo un control sobre la vía, como son el transporte y las diversas fosforilaciones que ocurren durante la misma. Dicha importancia, en el caso de las fosforilaciones, recae en el hecho de que las enzimas involucradas en catalizarlas están sujetas a inhibición *in vivo*; la hexocinasa se inhibe por trehalosa-6-fosfato (Blazquez et al., 1993), mientras que la Pfk1 y la piruvato

cinasa se inhiben por ATP. En otra propuesta, se señala la gran importancia que tiene el ATP, uno de los productos de la glicólisis, sobre la regulación de esta vía (Larsson et al., 2000) ya que dicho metabolito genera inhibición en diversos sitios de ésta, siendo esta inhibición mayor en dos pasos que son la fosforilación de la fructosa-6-fosfato mediada por la Pfk1 y la generación de piruvato a partir de fosfoenolpiruvato mediada por la piruvato cinasa, ambas reacciones pertenecientes a las consideradas como etapas clave. Aunado a esto se ha propuesto que la regulación glicolítica a nivel transcripcional y traduccional tiene una importancia muy limitada, en cambio, el control alostérico tiene una relevancia mucho mayor (Sierkstra et al., 1992). Todas estas propuestas apoyan por lo tanto, la hipótesis de que la regulación alostérica ejercida por el ATP sobre ciertas enzimas de la glicólisis tiene un gran control en el flujo de la vía.

Diversos grupos de investigación han trabajado entonces, en eliminar las inhibiciones a las que están sujetas la hexocinasa y la fosfofructocinasa, sin lograr aumentar el flujo glicolítico (Bonini et al., 2003; Rodicio et al., 2000), algo de esperarse ya que como antes se mencionaba, lo más probable es que el control de flujo se encuentre distribuido en un cierto número de enzimas. De esta manera, otros grupos de trabajo, llevaron a cabo la tarea de sobre-expresar diversas combinaciones de enzimas de la vía de manera simultánea, sin embargo el resultado tampoco fue exitoso (Tabla 1).

Enzima (s)	Actividad (Veces de sobre-expresión)	Flujo a etanol (% Control)	Referencia
Hxk	13.9	107	Schaaf, I., et al, 1989
Pfk-1	3.7	102	Schaaf, I., et al, 1989
Pyk	8.6	107	Schaaf, I., et al, 1989
Pdc	3.7	85	Schaaf, I., et al, 1989
Adh	4.8	89	Schaaf, I., et al, 1989
Pfk-1 + Pyk	5.6+1.3	107	Schaaf, I., et al, 1989
Pdc + Adh	3.7+5.9	94	Schaaf, I., et al, 1989
Gapdh+Pgk+Eno+Pyk+Pdc+Adh	1.4+1.7+16+4+10.4+1.08+1.4	121	Hauf, J., et al, 2000
Gapdh+Pgk+Pgm+Eno+Pyk+Pdc+Adh	1.5+1.4+3.4+1.5+2.5+1.1+1.2	94	Smits, HP., et al, 2000

Tabla 1.- Sobre-expresión de enzimas glicolíticas en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Moreno *et al*, 2005)

Esto es algo que puede explicarse con el hecho de que la sola sobreexpresión no toma en cuenta que a pesar de haber una mayor cantidad de enzima, ésta puede seguir siendo inhibida por la cantidad de inhibidor presente en la célula, dando como resultado que la catálisis in vivo no se vea incrementada aunque haya más enzima.

Regulación de la enzima fructosa-6-fosfato cinasa en *Saccharomyces cerevisiae*

La fructosa-6-fosfato cinasa, es la enzima que se encarga de catalizar la segunda reacción irreversible dentro de la glicólisis, dicha reacción consiste en la adición de un grupo fosfato a la molécula fructosa-6-fosfato dando como resultado la fructosa-1,6-bifosfato con consumo de una molécula de ATP. La Pfk en *Saccharomyces cerevisiae* es un hetero-octámero conformado por 4 subunidades α y 4 β , codificadas por los genes *PFK1* y *PFK2* respectivamente, cosa que sugiere que la enzima surgió de un evento de duplicación génica, donde aparentemente la mitad N-terminal de cada subunidad retuvo la función catalítica y la mitad C-terminal la capacidad alostérica. Dicha enzima es conocida también por estar sometida a un gran número de reguladores alostéricos como son el ATP, AMP, fructosa-6-fosfato, fructosa-2,6-bifosfato, fructosa-1,6-bifosfato, citrato y NH_4^+ (Reibstein et al., 1986). Siendo la fructosa-2,6-bifosfato el más potente activador de las Pfk eucarióticas, incluida la de *Saccharomyces cerevisiae*, y el ATP su más potente inhibidor (Heinisch, et al., 1996; Rodicio et al, 2000). Es esta fuerte regulación metabólica lo que ha hecho que ésta enzima sea propuesta como un punto de control en la glicólisis. Sin embargo la activación ejercida por la fructosa-2,6-bifosfato parece ser importante sólo en estados de transición, como lo es un cambio en la fuente de carbono, y si la célula es cultivada en glucosa, ésta activación resulta irrelevante, dejando entonces al ATP como su más importante regulador, siendo la enzima inhibida a concentraciones de 0.5-2 mM de ATP

(Rodicio et al., 2000) mientras la concentración citosólica de este metabolito en *Saccharomyces cerevisiae* es de 2.5 mM, lo cual es suficiente como para inhibir a la PFK. Un grupo de investigación entonces (Rodicio et al., 2000) basándose en un trabajo previo (Lobo et al., 1982), donde un número de mutantes insensibles al ATP fueron obtenidas mediante un screening génico, identificaron una base alterada como la responsable de la desaparición de inhibición por ATP, y a su vez, introdujeron dicha modificación en los genes *PFK1* y *PFK2* a través de mutagénesis sitio dirigida.

Obtuvieron como resultado, tres cepas insensibles a la inhibición por ATP y la activación por fructosa 2,6-bisfosfato (F-2,6-BP), y que aparentemente derivaba de que las Pfk mutantes se encontraban siempre en su conformación más afín por su sustrato como se observa en las siguientes gráficas:

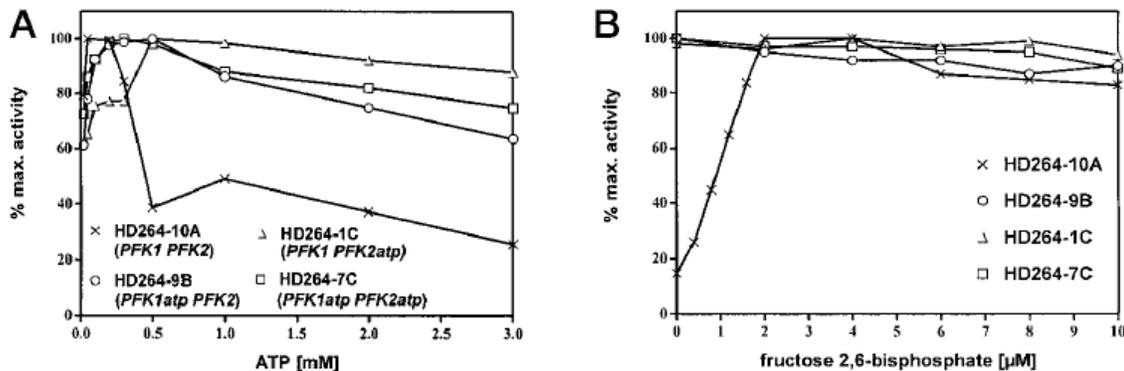


Fig.4.- Comparación de la actividad de las cepas silvestres y mutantes portando los genes *PFK1* y *PFK2*. Las cepas mutantes indicadas con el subíndice "atp" después del gen mutante. Panel A) actividades a distintas concentraciones de ATP. Panel B) Actividades a diferentes concentraciones de F-2,6-BP.

Las distintas cepas diferían en que la mutación (P728L) había sido introducida tanto en el gen *PKF1* y *PFK2*, de manera individual o simultánea, concluyendo así mismo que dicha diferencia resultaba irrelevante en la activación e inhibición de

las distintas enzimas mutantes. La mutación que otorgaba estas nuevas propiedades a las enzimas consistía en un cambio del aminoácido 728; prolina, por leucina. Sin embargo y a pesar de ello, no se encontraron diferencias en cuanto al consumo de glucosa y la producción de etanol, cosa que puede deberse a que a pesar de estar la enzima mutante presente, ésta quizás no se encuentre en una concentración como para generar diferencia, pero que podría solucionarse sobre-expresando al gen mutante.

Dados estos antecedentes, en el presente trabajo comparamos las velocidades de producción de etanol de una cepa que sobre-expresa el gen silvestre con una cepa que sobre-expresa una forma de la enzima Pfk1 no regulable alostéricamente; es decir, que es insensible a inhibición por ATP y que no requiere al activador fructosa 2,6 bifosfato.

HIPÓTESIS

La sobre-expresión de una forma de Pfk insensible a la inhibición por ATP, aumentará la velocidad de producción de etanol en *S. cerevisiae*.

OBJETIVOS

Objetivo General

Generar una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* que sobre-exprese una forma de fosfofructocinasa insensible a inhibición por ATP y estudiar el efecto que esto tiene sobre la velocidad de producción de etanol comparada con una cepa que sobre-expresa el gen silvestre.

Objetivos Particulares

- Generar una copia del gen de fosfofructocinasa silvestre mediante PCR
- Generar una forma de fosfofructocinasa insensible al ATP mediante una mutación sitio dirigida
- Clonar el gen *PFK1* silvestre en un plásmido multicopia (pRS426), bajo la presencia de su propio promotor y terminador, transformar con el plásmido resultante una cepa silvestre de *Saccharomyces cerevisiae*.

- Clonar el gen de *PFK1* insensible a ATP en un plásmido multicopia (pRS426), bajo la presencia de su propio promotor y terminador, transformar con el plásmido resultante una cepa silvestre de *Saccharomyces cerevisiae*.
- Comparar las velocidades de producción de etanol, crecimiento y consumo de glucosa entre la cepa que sobre-expresa el gen mutante y la cepa que sobre-expresa el gen silvestre.
- Comparar la actividad enzimática de ambas cepas, y su inhibición por ATP

MATERIALES Y MÉTODOS

Extracción de DNA Genómico

Las células de *Saccharomyces cerevisiae* se cultivaron en medio mínimo MMHML (ver apéndice) durante toda una noche a 30°C en agitación (250 rpm). Al día siguiente se recolectaron por centrifugación (3000 rpm , 5 minutos), se desechó el sobrenadante y el botón de células se resuspendió en agua estéril. Dichas células se transfirieron a un microtubo de 1.5 mL nuevo y estéril. Nuevamente se colectaron por centrifugación (13000 rpm, 10 s) y a este botón se agregó 200µL de una solución de lisis: tritón X-100 2%, SDS 1%, NaCl 100 mM, Tris-HCl 10 mM pH 8 y Na-EDTA 1 mM. Posteriormente se añadieron 200 µL de una mezcla de fenol-cloroformo en partes iguales y 0.3 g de perlas de vidrio (710-1,180 µm diámetro). Se agitó la mezcla en vortex a la máxima velocidad durante 5 minutos y se agregaron 200 µL de buffer amortiguador TE. Se centrifugó durante 5 minutos a 14000 rpm en una microcentrífuga, recuperando después la fase acuosa teniendo cuidado de no tocar las otras fases. Se repitió el lavado con fenol-cloroformo y la centrifugación sin perlas de vidrio las veces que fueron necesarias para dejar de observar una nata blanca. Con el fin de precipitar el DNA, se agregó 1 mL de etanol al 100 % mezclando por inversión 5 veces. Se centrifugó a 14000 rpm durante 4 minutos y se desechó el sobrenadante. El pellet que se obtuvo se resuspendió en 400 µL de TE y se agregaron 10 µL de RNAsa (10 mg/mL). Se

incubó durante 30 minutos a 37°C y se agregaron 10 µL de acetato de amonio 4M más 1 mL de etanol al 100 % mezclando por inversión 5 veces. Se centrifugó a 14000 rpm por 2 minutos y se desechó el sobrenadante. Se dejó secar el pellet por aproximadamente 30 minutos y se resuspendió con 50 µL de agua estéril utilizando la punta de la pipeta. Se cargaron 1-3 µL de muestra de DNA en un gel de agarosa 0.8 % a 100 volts por 30 minutos y se visualizó en una cámara de UV.

Diseño de oligonucleótidos

Para llevar a cabo el diseño de los oligonucleótidos fue necesario conocer la secuencia de DNA del gen de interés, la cual se extrajo de las bases de datos *Saccharomyces cerevisiae* Genome Database (<http://www.yeastgenome.org/>). Además de conocer el codón de la mutación P728L el cual se obtuvo del trabajo previo (Rodicio et al., 2000). Una vez hecho esto, con ayuda de un programa llamado “Oligo Calc: Oligonucleotide Properties Calculator” (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>) se generaron los oligonucleótidos tomando en cuenta los siguientes puntos para elegir la secuencia de los mismos:

- La secuencia debe terminar con una o 2 bases G o C.
- La longitud debe ser de preferencia de 20-30 nucleótidos.
- El porcentaje de GC (%GC) debe ser mayor a 40 (entre 40 y 60). Los nucleótidos G y C deben estar distribuidos uniformemente a lo largo del oligonucleótido.

- La temperatura de fusión (T_m) ajustada a sal debe ser de 65-70°C y no deben diferir los oligonucleótidos sentido y antisentido por más de 5°C.
- No debe haber puntas complementarias ni bases complementarias mayores a 3 bases.
- Para el oligonucleótido antisentido se utiliza la secuencia de la hebra complementaria.

Las secuencias de los oligonucleótidos generados fueron:

NOMBRE	SECUENCIA
PFK1NotFo	5'- AGCATCGTGCATGGGATAGCGGCTAGT -3'
PFK1NotRe	3'- CGATATGATACACATAACAATGAGCAAT -5'
P728LFo	5'- GCCACTGTTTCTAATAACGTTCTAGGTACCGAATACTCACTTGGTGTTG -3'
P728LRe	3'-CAACACCAAGTGAGTATTCGGTACCTAGAACGTTATTAGAAACAGTGGC -5'

Dichos oligonucleótidos fueron los utilizados para amplificar el gen de interés y a su vez generar el gen mutante.

Amplificación de gen silvestre por PCR

Utilizando los oligonucleótidos

NOMBRE	SECUENCIA
PFK1NotFo	5'- AGCATCGTGTCATGGGATAGCGGCTAGT -3'
PFK1NotRe	3'- CGATATGATACACATAACAATGAGCAAT -5'

y con el DNA genómico de *Saccharomyces cerevisiae* como templado, se prosiguió a amplificar el gen de interés utilizando la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Mezcla de reacción

H₂O.....a 50 µL
 Buffer *Pfx*.....5 µL
 MgSO₄.....1.5 mM
 DNA genómico.....1µg aprox
 Oligonucleótido sentido.....0.15 nmol/µL
 Oligonucleótido antisentido.....0.15 nmol/µL
 dNTP's..... 0.2 mM
 BSA.....0.001 mg
 Enzima *Pfx* DNA polimerasa.....1 µL

La reacción se llevó a cabo en un termociclador con el siguiente programa:

TEMPERATURA	TIEMPO	
95 °C	3 minutos	
95°C	30 segundos	35 ciclos
Temp. alineamiento	1 minuto	
68°C	2-3 minutos	
68°C	10 minutos	
4°C		

La temperatura de alineamiento, así como el tiempo de extensión difieren dependiendo del fragmento a amplificar. Se recomienda que la temperatura de alineamiento sea 5°C por debajo de la T_m ajustada a sal recomendada en (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>). El tiempo de extensión debe ser proporcional al tamaño del gen, generalmente, por cada 1000pb el tiempo recomendado será de 1 minuto de extensión.

Generación de gen mutante PFK1P728L

Para lograr introducir la mutación en el gen se siguió un protocolo el cuál consistió en amplificar el gen en dos partes con los siguientes oligonucleótidos:

Para la primer parte del gen:

NOMBRE	SECUENCIA
PFK1NotFo	5'- AGCATCGTGCATGGGATAGCGGCTAGT -3'
P728LRe	3'-CAACACCAAGTGAGTATTCGGTACCTAGAACGTTATTAGAAACAGTGGC -5'

Para la segunda parte del gen:

NOMBRE	SECUENCIA
P728LFo	5'- GCCACTGTTTCTAATAACGTTCTAGGTACCGAATACTCACTTGGTGTTG -3'
PFK1NotRe	3'- CGATATGATACACATAACAATGAGCAAT -5'

De tal forma que el extremo final del primer amplicón tuviera esa parte complementaria en el extremo inicial del segundo amplicón. Una vez que se tuvieron purificados los dos amplicones, éstos se sometieron a una digestión con la enzima de restricción DraIII con el fin de generar diversos fragmentos que al ligarse formaron una variedad de secuencias de ADN dentro de las cuáles el gen PFK1P728L era uno de los resultados.

Digestión de los amplicones

H₂O.....a 20 µL

Buffer2 µL

BSA 2 µL

Amplicón purificado2 µL

Dra III..... 1 µL

Esta mezcla de reacción se incubó a una temperatura de 37°C durante 3 horas.

Una vez transcurridas las 3 horas, se procedió a inactivar a la enzima DraIII para poder llevar a cabo la ligación. La inactivación se realizó incubando la mezcla de reacción a 65°C durante 16 minutos.

Ligación de los fragmentos resultantes de la restricción

Mezcla de amplicón digerido 1.....20 µL

Mezcla de amplicón digerido 2.....20 µL

ATP.....10 mM

T4 DNA ligasa.....2 µL

Ésta mezcla de reacción se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se dejó a 16°C durante 12 horas.

Para poder separar el fragmento deseado, es decir el gen PFK1P728L, de todos los otros distintos patrones de ligación que se pudieran haber generado, se realizó entonces un PCR pero ésta vez utilizando los oligonucleótidos:

NOMBRE	SECUENCIA
PFK1NotFo	5'- AGCATCGTGCATGGGATAGCGGCTAGT -3'
PFK1NotRe	3'- CGATATGATACACATAACAATGAGCAAT -5'

Con lo cual se amplificó el gen PFK1P728L y fue posible separarlo del resto mediante una electroforesis.

Visualización de los productos de PCR mediante Electroforesis

Después de amplificar el fragmento de interés por medio de PCR, se verificó que el producto correspondiera con aquel que deseábamos amplificar. Esto se logró mediante una electroforesis en gel de agarosa. Se cargó el producto de PCR en un gel de agarosa 0.8% con bromuro de etidio (6×10^{-4} mg/mL) y simultáneamente se cargó en el mismo gel un marcador de peso molecular (1kb DNA plus ladder Invitrogen) con el fin de conocer el tamaño de cada uno de los fragmentos de DNA que se amplificaron. Se le añadió a cada muestra colorante de cargado 5X (0.25% azul bromofenol, 0.25% xilen-cianol, 30% glicerol). El gel se colocó en una cámara de electroforesis la cual contenía buffer TBE 0.5X (44.6mM Tris, 0.5mM EDTA y 45mM ácido bórico) y se aplicó una corriente de 100 volts. Debido a que el bromuro de etidio se intercala entre las bases del DNA y fluoresce al ser expuesto a luz UV, se hizo uso de un transiluminador con luz UV para observar el resultado.

Purificación del gen amplificado, purificación del gel

Esta técnica se realizó con ayuda del kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up system (Promega), el cual está diseñado para purificar fragmentos de DNA provenientes de geles de agarosa o bien del producto de PCR directo de la reacción de amplificación. Se cortó la banda perteneciente al fragmento deseado directamente del gel con ayuda de un bisturí y el transiluminador de luz UV en modo de baja intensidad para no dañar a la molécula de DNA. Se purificó siguiendo el protocolo de un kit que consistió en disolver primero el gel en presencia de guanidina isotiocianato (Membrane Binding Solution). Posteriormente el DNA se aisló mediante centrifugación haciendo que la banda del gel disuelto pasase a través de una membrana de sílica quedando el DNA adherido a ésta. Se hicieron un par de lavados a los fragmentos de DNA unidos a la membrana con una solución llamada Membrane Wash Solution y finalmente se eluyó el DNA en agua.

Ligación a Vector Pjet1.2/blunt Cloning Vector

pJET1.2/blunt es un vector de clonación linearizado, que acepta insertos desde 6pb hasta 10kb. El extremo 5' del sitio de clonación contiene grupos fosfato por lo tanto no se necesitó la fosforilación de productos de PCR para su ligación. El vector recircularizado expresaría una enzima de restricción letal, sin embargo este gen se interrumpe cuando algún inserto es aceptado, con lo cual sólo colonias transformadas con el plásmido y el inserto crecieron.

Debido a que los distintos productos de PCR obtenidos eran todos de extremos romos, se siguió entonces el protocolo sugerido por el Kit CloneJet PCR Cloning Kit de Fermentas para este tipo de productos de PCR el cual consistió en lo siguiente:

Se llevó a cabo la reacción de ligación teniendo cuidado de agregar todos los componentes enfriando el medio de reacción en un baño de hielo.

Mezcla de Reacción

H₂O.....3 µL
2X Reaction Buffer10 µL
Producto purificado de PCR5 µL
Pjet1.2/BLUNT Cloning Vector.....1µL
T4 DNA Ligasa.....1µL

A esta mezcla se le agitó en Vortex a la máxima velocidad por 3-5 segundos

La mezcla de ligación se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos.

Una vez transcurrido este tiempo, la mezcla se utilizó directamente para transformar bacterias competentes.

Generación de bacterias competentes *E. coli* Top10

Se realizó un preinóculo en 5 ml de medio LB (ver apéndice) en el que se sembró una colonia de bacterias, dejándolas crecer durante toda una noche. A partir de éste preinóculo, se sembraron 500µL del mismo en un nuevo medio de 50ml de LB, dejándole crecer a 37°C hasta tener una densidad óptica de 0.4-0.5 a 600nm. Una vez alcanzada esta densidad, se enfrió el cultivo por 10 min en hielo. A continuación se transfirió a un tubo falcon de 50ml estéril para centrifugar el cultivo durante 10 minutos a 3500rpm teniendo cuidado de haber enfriado previamente la centrífuga a 4°C. La pastilla de células resultante se resuspendió en 33 ml de una solución de CaCl₂ 0.1 M estéril y enfriada a 4°C. Esta mezcla se incubó durante una hora en hielo. Posteriormente se centrifugó de nuevo durante 10 minutos a 3500 rpm. El pellet se resuspendió en 2 ml de solución CaCl₂ 0.1M y glicerol al 17 %. Esta mezcla se transfirió a tubos eppendorf estériles y previamente enfriados en hielo, en alícuotas de 100 µL. Los tubos con las células competentes se guardaron a -70°C hasta su uso.

Transformación de bacterias competentes *E. coli* Top10

Las células competentes son aquellas células que sufrieron algún tratamiento físico o químico y por lo tanto son capaces de permitir la entrada de DNA plasmídico foráneo a través de su membrana que es permeable.

Las células competentes son muy sensibles a cambios en la temperatura o a ruptura mecánica causada por el pipeteo, por lo tanto es muy importante trabajar gentilmente con estas bacterias. Las bacterias competentes previamente congeladas, se descongelaron en un baño de mezcla hielo-agua y se tomaron alícuotas de 200 μL de las mismas por cada transformación que se realizó. Se mezclaron con el DNA plasmídico a transformar (10 μL de mezcla de ligación) y se incubaron en un baño de hielo-agua por 30 minutos para que hubiera interacción con la membrana permeable de las células competentes y de esta forma el DNA que contenía el plásmido pudiera entrar a la célula. Pasado el tiempo, se llevó a cabo un choque térmico de la mezcla durante exactamente 45 segundos a 42°C para favorecer la entrada del DNA plasmídico debido a que a esta temperatura la membrana de la célula se volvía más permeable. Se transfirieron de nuevo al baño de hielo-agua durante 2 minutos, de esta forma se retornó la estabilidad a la membrana quedando en el interior de las células competentes el DNA plasmídico que logró transformarse. Posteriormente, se agregaron a cada transformación 800 μL de medio LB y se incubaron a 37°C, durante 1 hora en agitación para que se recuperaran las bacterias del tratamiento térmico. Concluido el tiempo de recuperación, se centrifugaron por 5 minutos a 3,500 rpm, se eliminó el exceso de medio LB y se resuspendió el pellet con la punta de la pipeta. Finalmente se sembraron 100 μL de bacterias en cajas de medio LB con ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) como antibiótico para la selección de colonias transformantes.

Purificación del plásmido, MINI-PREPS

Las colonias que resultaron positivas en la transformación se inocularon en 5 mL de medio LB con ampicilina y se incubaron durante toda la noche a 37°C en agitación. Al día siguiente se centrifugaron las células a 3500 rpm durante 5 minutos, se decantó el sobrenadante y se continuó el protocolo para purificar el plásmido con el kit Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega). Este sistema de purificación utiliza como base una membrana de silica en donde se retiene el DNA obteniendo DNA plasmídico altamente puro. El proceso comienza al resuspender el botón de células con una solución llamada Cell resuspension Solution la cual es una solución isotónica que se utiliza para este fin, posteriormente se rompieron las células con “Lysis Solution” y se trataron con “Alkaline Protease Solution” esto para inactivar las nucleasas. Se dejaron incubar durante cinco minutos y se neutralizaron con “Neutralization Solution”. Se centrifugaron y se recuperó el sobrenadante el cual contenía al plásmido, se hicieron dos lavados con “2X Wizard Plus SV Minipreps Column Wash Solution” previamente diluido con etanol y finalmente se eluyó la columna con “Nuclease Free Water” para recuperar el DNA plasmídico que fue retenido en la membrana para depositarlo diluido en el agua dentro de un tubo eppendorf.

Digestiones confirmativas

Era importante asegurarnos de la identidad del gen que se introdujo en el plásmido, para lo cual fue necesario hacer digestiones con enzimas de restricción que nos dieran patrones específicos de digestión, los cuales coincidieran con lo esperado para cada gen y de esta forma continuar con la clonación. Para cada reacción se utilizaron diferentes cantidades de DNA plasmídico purificado, se utilizaron 0.5 μL de la enzima de restricción adecuada para cada caso, 2 μL de buffer específico para cada enzima de restricción (New England Biolabs), 2 μL de albúmina de suero bovino o BSA (si era necesario ya que algunas enzimas lo requerían). Se incubaron durante una hora a 37°C y transcurrido el tiempo cada muestra se cargó en un gel de agarosa 0.8 % y se corrió a 100 volts y al final, el patrón de bandas obtenido se visualizó por electroforesis.

Ligación a Vector multicopia para levadura pRS424

pRS426 es un vector multicopia de levadura ya que contiene en su secuencia un sitio de replicación 2-micrones, cuenta también con el gen TRP1 el cual permitió la selección de levaduras transformadas por auxotrofia a triptófano, además de contar con un origen de replicación para bacterias y el gen de resistencia al antibiótico ampicilina (Figura 4) (Thomas, *et al* 1992).

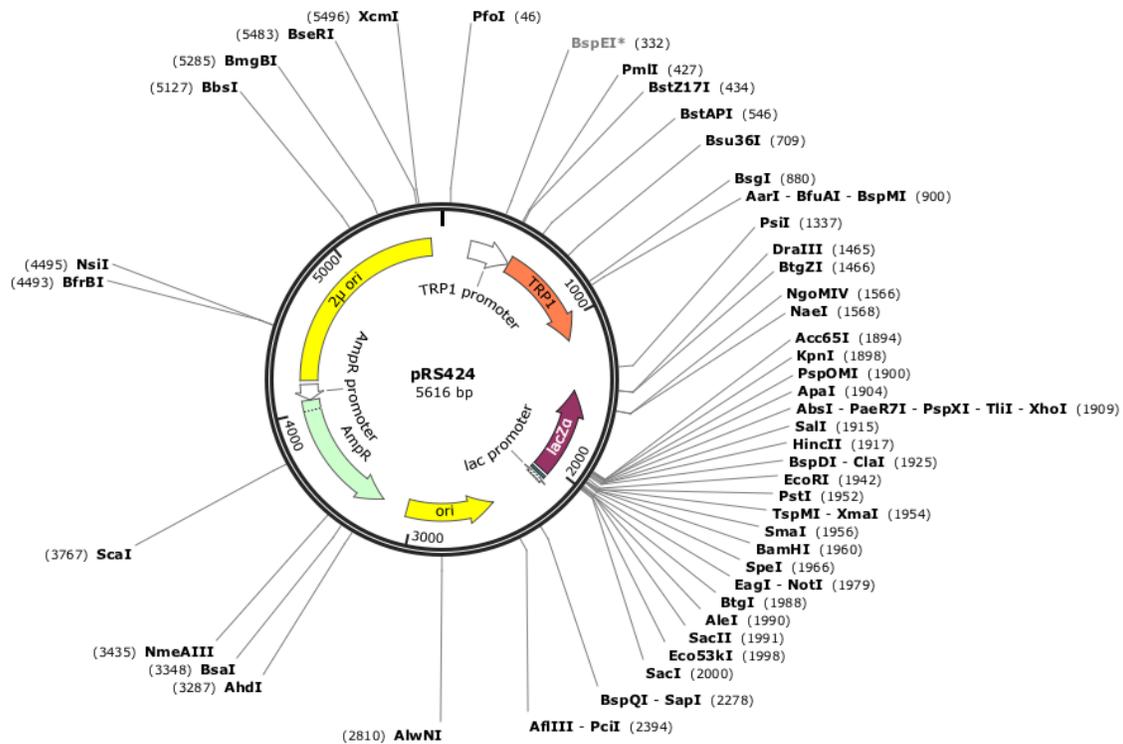


Fig. 4.- Diagrama del plásmido pRS424. El gen TRP1 es el marcador de selección para levaduras por prototofía a triptófano. El gen AmpR es el marcador de selección para bacterias por resistencia a ampicilina. El origen de replicación μ ori permitió a las levaduras mantener de 10 a 20 copias de plásmidos en el núcleo. El origen de replicación ori permitió replicar el plásmido en *E. coli*

Este vector se sometió a una digestión con la enzima NotI la cual lo linealizó dejando en cada uno de sus extremos, sitios cohesivos “sticky ends” los cuales son los sitios donde el gen de interés posteriormente se ligó, para lo cual fue necesario desfosforilar dichos sitios en el plásmido y así evitar que se recircularizara sin antes haber incorporado el gen de interés a su secuencia, la desfosforilación se llevó a cabo de la siguiente manera. Se utilizó fosfatasa alcalina de camarón o SAP (Shrimp alkaline phosphatase) (Fermentas) por sus

siglas en inglés, para catalizar la liberación de grupos fosfato- 5' de DNA, RNA o nucleótidos. Esta fosfatasa también puede remover grupos fosfato de proteínas.

Mezcla de reacción

H₂O..... Lo necesario para 20 µL finales de mezcla
10X Buffer SAP2 µL
pRS424300 ng
SAP11 µL

La mezcla se incubó durante una hora a 37°C y posteriormente se sometió a una segunda incubación a 65°C por 15 minutos para inactivar a la enzima.

Ligación

Se realizó una mezcla para la ligación con los siguientes componentes:

Buffer ligasa.....2 µL
Ligasa.....1 µL
Vector Prs424 desfosforilado.....4 µL
Inserto.....10 µL
H₂O.....a 20 µL

Esta mezcla se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente, para posteriormente dejarse durante toda la noche a 16°C. Una vez transcurrido este tiempo, se utilizó esta mezcla directamente para transformación de bacterias *E. coli* TOP10 competentes, esto con la finalidad de que la bacteria produjera muchas copias del plásmido y así obtener una mayor cantidad del mismo, el cuál fue después extraído de las colonias positivas con el método de Mini prep. Se realizó entonces una confirmación de la identidad del gen mediante una digestión con enzimas de restricción. Una vez que se había confirmado la identidad positiva del gen que contenía el plásmido se procedió a utilizarlo para transformar levaduras competentes. Los dos plásmidos resultantes se llamaron PVmut y PVwild. El plásmido PVmut contenía al gen PFKP728L y el plásmido PVwild, contenía al gen silvestre.

Secuenciación

Ambos vectores PVmut y PVwild se enviaron a secuenciar utilizando la técnica de secuenciación automática usando los oligonucleótidos T3Promotor, T7Promotor así como la siguiente lista:

Oligonucleótido	Secuencia
PFK1secl1Fo	5'-CAAGTTGAGTGAGGTTGATGCTTC-3'
PFK1secl2Fo	5'-GGTCGTAGACAAGCTGCAGGC-3'
PFK1secl3Fo	5'-GGTTAGCTACTCTACAAGGTGTCG-3'
PFK1secl4Re	5'-GCTTCATTTTTCTTGTTCCATTGTTTCG-3'
P728LFo	5'-GCCACTGTTTCTAATAACGTTCTAGGTACCGAATACTCACTTGGTGTTG-3'
P728Re	3'-CAACACCAAGTGAGTATTCGGTACCTAGAACGTTATTAGAAACAGTGGC-5'

Esto con la ayuda de la unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. La secuencia resultante se comparó con la secuencia identificada para cada gen en el banco de secuencias GDB. De esta forma nos aseguramos de que en la construcción no hubiera mutaciones, supresiones o inserciones introducidas por el método de la PCR.

Transformación de levaduras

Se preparó un pre-cultivo con una colonia aislada de la cepa BY474trp⁻ a tratar y se incubó a 30°C en agitación en medio YPD durante toda la noche. Al día siguiente de la transformación se utilizó dicho pre-cultivo para inocular 50 mL de medio YPD en una densidad óptica de 0.25 a 600nm. El cultivo se incubó a 30°C en agitación hasta que alcanzó una densidad óptica de 0.5-0.6. Una vez alcanzada dicha densidad óptica, se prosiguió a centrifugar el cultivo a 3000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente para coleccionar las células. Se resuspendió el

pellet en 40 mL de agua estéril y se centrifugó nuevamente a 3000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente para coleccionar las células lavadas. Éstas se resuspendieron en 1 mL de agua estéril y se transfirieron a un tubo eppendorf de 1.5 mL estéril, en donde se centrifugaron a 14000 rpm por 5 segundos, eliminando el sobrenadante. Posteriormente se lavaron con 1 mL de TE/LiOAc (ver apéndice) recién preparado y se resuspendieron en 200 μ L de TE/LiOAc. Se colocaron 50 μ L de células en un tubo eppendorf de 1.5 mL estéril para cada muestra a transformar. A cada tubo problema se le agregaron 10 μ L de DNA acarreador 10 mg/mL (DNA de esperma de salmón previamente hervido e incubado en hielo durante 5 minutos) y 7 μ L de DNA plasmídico. También se hicieron dos controles, un tubo sin DNA acarreador ni DNA plasmídico y otro tubo sólo con DNA acarreador, esto con el objetivo de verificar que se hubiera llevado a cabo de manera correcta la transformación. Se mezcló cada tubo con la pipeta y se agregó a cada uno 300 μ L de PEG/TE/LiOAc (ver apéndice) al 45% recién preparado, se mezcló nuevamente. Se incubaron a 30°C con agitación durante 30 minutos y después se sometió a un choque térmico por 15 minutos a 42°C, invirtiendo los tubos cada 3 minutos. Concluido el tiempo de incubación, se centrifugaron por 5 minutos a 3,500 rpm, se eliminó el exceso de reactivos y se resuspendió el resto con la punta de la pipeta. Finalmente se sembraron 100 μ L de cada tubo de transformación en cajas de medio mínimo (MMHMLU).

Se realizaron las siguientes transformaciones:

CEPA	PLÁSMIDO	DESCRIPCIÓN
BY4741trp-	pVmut	Cepa transformada con Prs4242 que contiene el gen PFK1P728L
BY4741trp-	pVwildtype	Cepa transformada con Prs4242 que contiene el gen PFK1

Cultivos

Preparación de medios de Cultivo

Se llevaron a cabo fermentaciones alcohólicas en 100 mL de medio mínimo (MMHMLU) que contiene sales, vitaminas, trazas (ver apéndice) y glucosa como fuente de carbono (5 %) adicionado con los aminoácidos histidina (0.02 g/L), metionina (0.02 g/L), leucina (0.1 g/L) y con uracilo (0.02 g/L), en una atmósfera microaeróbica. Dicha atmósfera se logró implementando un sistema en envases de material de vidrio (viales) con tapón de goma de caucho y tapa de aluminio, sellados con pinzas.

El procedimiento que se siguió para preparar los medios fue el siguiente: Se prepararon 100 mL de medio mínimo en cada vial y se taparon con papel de aluminio, de ésta forma se colocaron en la autoclave para ser esterilizados. Por otro lado se colocaron los tapones de goma de caucho y las tapas de aluminio de cada vial en un recipiente cubierto con papel de aluminio y se esterilizaron por separado. La esterilización en autoclave se llevó a cabo durante 15 minutos a

121°C. Concluido éste tiempo se dejaron enfriar los viales a temperatura ambiente.

Se agregó a cada medio los aminoácidos requeridos (0.02 g/L His, 0.02 g/L Met, 0.1 g/L Leu y 0.02 g/L Ura). Con guantes estériles se colocaron los tapones de goma de caucho y las tapas de aluminio y se sellaron con ayuda de las pinzas. Todo esto se llevó a cabo en condiciones asépticas. El volumen de aire que quedó en el frasco fue de aproximadamente 1/3 del total en el vial por lo que las condiciones de crecimiento se consideraron microaerofílicas.

Se dejaron reposar los viales en una incubadora a 30°C durante toda la noche y al día siguiente se sacaron para inocular cada uno.

Condiciones de crecimiento

Los cultivos se mantuvieron a una temperatura de 30°C durante un período de 75 horas que duró cada fermentación. Dichos cultivos con una atmósfera microaeróbica se mantuvieron estáticos en la incubadora.

Pre-cultivo

Se prepararon 50 mL de medio mínimo (MMHMLU) por cada pre-cultivo en un matraz de 250 mL el cual se inoculó a partir de una azada de la cepa transformada y resembrada en medio mínimo (MMHMLU) sólido, esto con el objetivo de asegurarse que la cepa se encontrara fresca. Se mantuvieron en agitación (250 rpm) en una incubadora a 30°C durante 12 horas.

Concluido el tiempo de los pre-cultivos iniciadores, se tomó muestra de cada uno y se hizo una dilución 1:10 de la misma para tomar su lectura de densidad óptica a 600 nm. El dato de absorbancia que arrojó la muestra se multiplicó por la dilución, posteriormente se dividió entre la densidad óptica a la cual se quería llegar, de esta forma conocíamos las veces que debíamos diluir la muestra y finalmente se dividió el volumen del frasco de cultivo a inocular entre las veces a diluir lo cual nos dio por resultado los mL del pre-cultivo que llevarían a los 100 mL de medio nuevo a la densidad óptica deseada. Se tomó el volumen respectivo y se prosiguió a inocular cada sistema. Se hizo uso de una jeringa de 10 mL para inocular a los viales que se encontraban en una atmósfera microaeróbica. Una vez inoculado cada vial, se tomó una muestra de cada uno para asegurar que la densidad óptica fuera la correcta y similar en cada uno de los cultivos para poder comparar eficientemente los distintos parámetros a evaluar.

Parámetros a evaluar durante la fermentación

Los parámetros que se evaluaron durante las fermentaciones fueron crecimiento, esto mediante la lectura de densidad óptica a 600 nanómetros, cuantificación de

etanol por cromatografía de gases y cuantificación del consumo de glucosa con ayuda de un oxímetro y la enzima glucosa oxidasa.

La cepa BY4741 con el gen *trp1* inactivo y con el vector pVMut y la cepa transformada con el vector pVWild fueron evaluadas como cepas problemas.

Evaluación del crecimiento durante la fermentación mediante densidad óptica

La densidad óptica se determinó a una longitud de onda de 600 nm en un espectrofotómetro UV-1800 SHIMADZU. La lectura se realizó directamente de la muestra y si era necesario se hacía una dilución para que la absorbancia medida estuviera en un intervalo entre 0.1-0.6. Como blanco se utilizó una muestra de agua.

Para construir las curvas de crecimiento se tomaron muestras de 1 mL cada 2 horas durante las primeras 8 horas de la fermentación, a las 24 horas y a las 48 horas. Se tomó como tiempo inicial el tiempo al cuál se inoculó cada cultivo. Se leyó la absorbancia de cada muestra y se construyó una gráfica de densidad óptica contra tiempo de fermentación.

Para calcular la velocidad específica de crecimiento (μ), se eligió de cada curva de crecimiento la fase exponencial y se prosiguió a hacer un análisis lineal. Se obtuvo la pendiente (m) a partir de una gráfica $\gamma(DO_{600})$ vs tiempo. Se utilizaron las siguientes fórmulas para calcular el tiempo dichos parámetros:

$$td = \text{Log}2/m$$

$$\mu = \text{ln}2/td$$

Cuantificación de etanol con cromatografía de gases

Se utilizó un cromatógrafo de gases GC-2010 SHIMADZU. Se utilizó una columna HP-PLOT/U AGILENT de una longitud de 30 m, 10 μm de espesor de la membrana y un diámetro interno de 0.32 mm. El software utilizado fue GC Solution de SHIMADZU. El tiempo de análisis fue de 15 minutos, a una temperatura del inyector de 180°C y el modo de inyección fue Split, con un ratio de Split de 100. El gas acarreador fue Helio y el modo del control de flujo fue mediante presión. La presión fue de 75 KPa, el flujo total de 89.9 mL/min, el flujo de la columna 0.86 mL/min, la velocidad lineal 26.2 cm/s y el flujo de purga 3 mL/8min. Temperatura del detector FID de 200°C.

Se seleccionaron muestras al tiempo inicial (t_0), a las 8 horas (t_8), a las 23 h (t_{24}), a las 48 h (t_{48}), 55 h (t_{55}) y 75 h (t_{75}) de la fermentación. Se tomó una alícuota de 1 mL en un tubo eppendorf de 1.5 mL y se centrifugó a 13000 rpm durante 2 minutos, se recuperó el sobrenadante. Se diluyeron las muestras 1:10 y se filtraron con una malla Millipore 0.45 μm . De esta forma, se inyectaron 2 μL de cada muestra directamente al cromatógrafo de gases.

Se construyó una curva de calibración para la cuantificación de etanol en las muestras, utilizando etanol comercial (SIGMA) al 95 %. La curva patrón cubrió los porcentajes de etanol: 0.01 %, 0.095 %, 0.02 %, 0.03 %, 0.05 % y 0.19 %. Posteriormente, se convirtieron a mmoles de etanol y se construyó la gráfica de área sobre la curva contra mmoles de etanol. Se extrapolaron los datos

experimentales y se obtuvieron los mmoles de etanol respectivos de cada muestra.

Cuantificación de glucosa

Se tomaron muestras de los medios de cultivo en diversos puntos de la fermentación (0, 7, 22, 31, 48, 54 y 75 horas) con las cuáles se realizó la determinación de la concentración de glucosa en el medio. El cálculo se realizó mediante el método de la Glucosa Oxidasa. Dicho método consiste en cuantificar el oxígeno presente en un medio de reacción donde está presente la glucosa por medio de un oxímetro, el cual cuantifica la resistencia al paso de la corriente eléctrica mediante un electrodo, traduciendo la medición en un porcentaje de oxígeno. Una vez se conoció el valor de oxígeno presente, se agregó glucosa oxidasa. Ésta enzima es normalmente extraída del hongo *Aspergillus niger* y es una oxidoreductasa que cataliza la oxidación de la glucosa formando peróxido de hidrógeno y D-glucono- δ -lactona con consumo de oxígeno, por lo que evaluando el cambio en el valor del oxígeno presente, se pudo saber la cantidad de glucosa presente en el medio.

Medio de reacción:

Buffer de acetato de sodio pH= 5.5 1.7 mL
Glucosa oxidasa 1:1010 μ L
Muestra.....Lo necesario

La medición se realizó en un baño de temperatura constante a 25°C para mantener en condiciones óptimas a la enzima, además era importante ésta temperatura ya que el coeficiente de difusión del oxígeno en el acetato de sodio depende directamente de la temperatura.

Antes de comenzar el ensayo, el acetato de sodio debió ser burbujeado por aproximadamente 10 minutos, con el fin de asegurar que se encontrara saturado de oxígeno.

El ensayo comenzó colocando 1.7 ml de buffer de acetato en la celda del oxímetro y esperando a que el valor arrojado fuera estable, entonces se agregó un poco de ditionita, el cual es un compuesto que reacciona muy rápidamente con el oxígeno y consume el total del mismo en la celda. Este valor se utilizó entonces como cero químico.

Los siguientes ensayos, ya no utilizaron a la ditionita, si no que se agregó al medio una cantidad de muestra de la que se quería conocer el valor de glucosa presente, de forma tal que consumiera más del 20 % y menos del 90 % de lo obtenido en el ensayo con ditionita para tener una medición confiable.

Los cálculos se realizaron dividiendo el valor arrojado en cada muestra entre aquel obtenido en el ensayo del cero químico, éste cociente se multiplicó por 780 que es el factor de difusión del oxígeno en 1.7 ml de acetato de sodio a 25°C. Éste valor se multiplicó por la dilución realizada a la muestra y el resultado nuevamente se multiplicó por 1000 para arrojar la concentración de glucosa en mM.

Obtención de extracto celular para determinación de la actividad enzimática de PFK1

Para poder determinar la actividad enzimática de la enzima PFK1 y PFK1P728L fue necesario realizar un extracto proteico de la levadura, éste se realizó siguiendo la metodología que se muestra a continuación:

Las células de levadura se recolectaron a una DO_{600nm} de 0.6 después de haberse duplicado. Se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 minutos, se eliminó el medio sobrante y se lavaron con 20 mL de agua fría. Las células lavadas se traspasaron a un tubo eppendorf de 1.5 mL, se centrifugaron y se eliminó el agua restante. Se agregaron 100 μ L de Buffer MOPS 50 mM pH 7, DTT 1 mM, EDTA 1 mM y PMSF 1 mM. Posteriormente, se agregaron aproximadamente 600 μ L de perlas de vidrio a cada tubo y se llevaron a cabo 6 ciclos de 1 minuto vórtex y 1 minuto de reposo en hielo. Se centrifugaron a 14000 rpm durante 10 minutos a 4°C y se recuperó el extracto celular, antes de poder llevar a cabo la medición de actividad, fue necesario cuantificar la cantidad de proteína contenida en cada extracto.

CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA

La concentración de proteína se determinó mediante el método de Lowry (Lowry *et al*, 1951). Se hizo una dilución 1:10 de cada muestra a cuantificar y se repartió en alícuotas de 10 μ L, 15 μ L y 20 μ L en tubos de ensaye y se llevaron a 100 μ L con agua. Paralelamente se realizó una curva patrón de concentraciones de 0, 20, 40, 60 y 80 μ g de albúmina de suero de bovino (BSA, 1 mg/ml) aforadas a 100 μ L con agua. Posteriormente a todas las muestras se les agregó 1 mL de la mezcla

solución A y solución B en una proporción de 50:1 (ver apéndice), se agitaron y se incubaron durante diez minutos a temperatura ambiente. Concluido el tiempo, se les añadió 100 μ L de Folín diluido 1:2 y nuevamente se agitó a cada muestra. Se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente y finalmente se leyó la absorbancia de cada una a 660nm en un espectrofotómetro UV-1800 SHIMADZU. Se construyó una curva patrón de absorbancia contra concentración de BSA y se ajustó a una línea recta con regresión lineal obteniendo de esta forma la ecuación de la recta para extrapolar las absorbancias que arrojó cada muestra y así conocer la concentración de proteína.

Medición de actividad

Una vez obtenidos los extractos se procede a realizar la medición la cuál consiste en un método óptico, midiendo la oxidación del NADH a 340nm y 25°C. Se elige la oxidación de NADH como marcador debido a que el ensayo consiste en la formación de fructosa 1,6-bifosfato, el producto de la reacción catalizada por la PFK1, el cuál es transformado por medio de la fructosa 1,6-bifosfato aldolasa en gliceraldehido -3- fosfato, que a su vez es transformado en 1,3-bifosfaglicerato mediante la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa. Es ésta última reacción que al ser dependiente de NADH permite realizar la medición, siendo la estequiometria de 1 mol de fructosa-1,6-bifosfato por cada 2 moles de NADH oxidado.

Mezcla de Reacción

Buffer KME (ver apéndice..... Lo suficiente para un total de 1 mL

MgCl₂ 10 mM

NADH 0.15mM 0.003 mM

Mix TPI/PGDH/FBA 1:10..... 50 U/ml de cada una

ATP..... 0.5 mM

Extracto celular 1:10..... 5 µL

F-6-P..... 1 mM

El ensayo se arranca agregando la fructosa-6-fosfato, y después de un breve periodo de estabilidad de aproximadamente un minuto, comienza a haber un cambio en la absorbancia de manera lineal, y éste se registra durante los próximos 2 a 3 minutos.

El cálculo de la actividad se realizó en base a las siguientes fórmulas:

$$\frac{\text{Lowry (mg/mL)}}{\text{dilución extracto}} * \frac{\text{Alícuota}}{1000} = \text{mg de Proteína por celda}$$

$$\frac{m}{\epsilon} * \frac{60}{\text{Proteína}} = \text{Actividad } (\mu\text{mol} * \text{min}^{-1} \text{ mgP}^{-1})$$

Donde: m = La pendiente obtenida del ensayo de actividad (Km/ V_{max})

ϵ = Coeficiente de extinción molar para NADH ($6.317 \cdot 10^3$ L/mol*cm)

Proteína: mg puestos por celda

Extracto	Concentración de Proteína (mg/ml)
Mutante1	2.71
Mutante2	3.83
Mutante3	4.39
Silvestre1	3.66
Silvestre2	4.62
Silvestre3	4.51

Tabla 2.- Resultados del ensayo de Lowry para determinar la concentración de proteína en los extractos.

La dilución de los extractos fue de 1:10 y se utilizaron 50 μ L de extracto diluido para el ensayo.

Evaluación de activación de PFK1 por F-2,6-BP

Con el propósito de conocer si la mutación P728L efectivamente tuvo un efecto en la enzima, se decidió evaluar el factor de activación que su activador más potente tenía sobre ésta, así como compararlo con el factor que arrojaba la activación de la enzima silvestre. Para ello se siguió el ensayo antes descrito para medir la actividad enzimática, con la variante de que a la mezcla de reacción se le añadió fructosa-2,6-bifosfato, siendo la mezcla de reacción final de la siguiente forma:

Mezcla de Reacción

Buffer KME.....	Lo suficiente para un total de 1mL
MgCl ₂	10 mM
NADH 0.15mM	0.003 mM
Mezcla TPI/PGDH/FBA 1:10.....	50 U/ml de cada una
ATP.....	0.5 mM
F-2,6-BP.....	10 mM
Extracto celular 1:10.....	5 µL
F-6-P.....	1 mM

El cálculo para la actividad igualmente fue siguiendo el procedimiento antes descrito. Una vez obtenida la actividad, ésta se dividió entre los resultados arrojados en el ensayo para medir actividad enzimática sin F-2,6-BP. De esta operación se interpretó el cociente arrojado como el factor de activación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Clonación del gen *PFK1* y *PFK1P728L* en el plásmido pRS424

Con ayuda de la base de datos *Saccharomyces cerevisiae* Genome Database (<http://www.yeastgenome.org/>) se diseñaron oligonucleótidos para amplificar el gene y clonarlo. En la siguiente figura, se muestra la secuencia que se obtuvo para el gen *PFK1*, así como el cambio que se introdujo en la secuencia para generar la mutación *P728L*:

```
ATGCAATCTCAAGATTCATGCTACGGTGTTCATTTCAGATCTATCATCACAAATGATGAA
GCTTTATTCAAGAAGACCATTCACTTTTATCACACTCTAGGATTTGCAACTGTGAAAGAT
TTCAACAAATTCAAACATGGTGAAAAATAGCTTACTATCTTCAGGGACTTCCAAGATTCC
TTGAGAGAAGTTTGGTTAGAATCTTTCAAGTTGAGTGAGGTTGATGCTTCTGGGTTCCGT
ATACCACAACAAGAAGCTACTAACAAGGCTCAAAGTCAAGGTGCTCTATTAAGATTTCGT
TTAGTGATGTCTGCTCCAATCGATGAACTTTTCGACACCAACGAAACCGCCACAATCACT
TATTTCTCTACTGATTTGAACAAGATTGTCGAGAAAATCCCAAAACAAAGCCGAAAAATTG
TCCGATACCTTAGTGTTTTTGAAGATCCAATGGGCAACAACATCACCTTCTCAGGCTTA
GCTAATGCAACCGATTCCGCTCCAACCTCCAAGATGCTTTCTTAGAAGCTACCTCCGAA
GACGAAATCATCTCTAGAGCTTCTTCCGATGCTTCTGACTTACTAAGACAAACATTGGGC
TCTTCTCAAAAGAAGAAGAAGATTGCTGTCATGACTTCTGGTGGTGATTCTCCAGGTATG
AATGCCGCTGTTTCGTGCCGTTGTTTCGTACAGGTATACATTTCCGGCTGTGATGTTTTGCT
GTTTACGAAGGTTACGAAGGTTTACTAAGAGGCGGTAATATTTAAAGAAAATGGCTTGG
GAAGATGTCAGAGGTTGGTTAAGTGAAGGTGGTACTTTGATTGGTACTGCTCGTTCTATG
GAATTCAGAAAGCGTGAGGGTTCGTAGACAAGCTGCAGGCAATTTAATTTTCGCAAGGTATT
GACGCTTTGGTTGTTTGGTGGTGTGTTCTTTAACCGGTGCTGATCTTTTCAGACAC
GAATGGCCATCTTTGGTTGATGAATTGGTTGCAGAAGGTAGATTCACTAAAGAAGAAGTC
GCCCCATACAAGAATTTGTCCATTGTTGGTCTTGTCCGGTTCATCGATAATGATATGTCT
GGTACTGACTCTACCATTTGGTGTCTTATCTGCTTTGGAAAGAATCTGTGAAATGGTTGAC
TACATTGATGCCACCGTAAATCCCCTCCCGTGCCTTTGTTGTTGAAGTTATGGGTAGA
CATTGTGGTTGGTTGGCTTGTATGGCTGGTATTGCTACCGGTGCCGATTACATTTTTATT
CCAGAAAGAGCTGTTCCCTCACGGAAAATGGCAGGACGAATTGAAGGAAGTGTGCCAAAGA
CACAGAAGTAAGGGTAGAAGAAATAACACAATTATTGTCGCTGAAGGTGCTTTAGATGAT
CAATTAACCCCTGTTACTGCCAATGACGTCAAAGATGCTTTGATTGAATTGGGTCTAGAC
ACCAAGGTAACCATTCAGGTACAGTTCAAAGAGGTGGTACAGCTGTTGCTCATGACAGA
TGTTTAGCTACTCTACAAGGTGTCGATGCTGTTAAGGCCGTTCTGGAATTTACCCCTGAA
ACTCCTTCTCCATTAATTGGTATTTTAGAAAACAAGATAATTAGAATGCCATTGGTTGAA
TCTGTGAAGTTGACTAAATCTGTTGCCACTGCCATTGAAAACAAGATTTTCGATAAGGCA
ATTTCTTTAAGAGACACAGAATTTATTGAACTTTACGAAAACCTTCTTATCCACTACCGTT
AAAGATGATGGTTCCGAATTATTGCCAGTATCTGACAGACTAAACATTGGTATTGTCCAT
GTTGGTGCCCATCTGCTGCTTTGAACGCTGCCACCGTGCCGCAACTCTATACTGTTTG
TCTCACGGCCATAAACCATACGCTATCATGAATGGTTTCAGTGGATTGATTCAAACCGGT
GAAGTGAAGGAACATCATGGATTGATGTCGAAAACGGCATAACTGGGTGGTTCCGAA
ATCGGTACGAACAGATCTGTTGCTTTCAGAAGATTTGGGTACCATTGCTTACTACTTCCAA
AAGAACAAGCTAGACGGTTTGATTATCTTGGTGGTTTTGAAGGTTTCAGGTCCTTGAAG
CAATTGGCTGACGGTAGAACCCAACACCCAATCTTTAACATTCCAATGTGTTTGTATCCA
GCCACTGTTTCAACAACGTTCCAGGTTACTGAATACTCACTTGGTGTGATACCTGTTTG
AACGCATTAGTCAATTCACTGATGACATCAAACAGAGTGCTTCTGCGACAAGAAGAAGA
GTCTTCGTCTGTGAAGTCCAAGGTGGTCACTCTGGTTACATCGCTTCTTCACTGGTTTA
ATCACTGGTGTGTTTTCAGTGTACACTCCAGAAAAGAAGATCGACTTAGCTTCTATCAGA
GAAGATATAACTCTATTTAAAAGAGAACTTTTCGTCACGACAAAGGTGAAAACGAAACGGT
AAGCTATTGGTTAGAAACGAACAAGCTTCTAGCGTATATAGCACTCAATTGTTGGCTGAC
```

ATCATCTCTGAAGCAAGCAAGGGTAAGTTGGTGTTAGAACTGCTATCCCAGGCCATGTT
 CAACAAGGTGGTGTTCATCTTCTAAAGACCGTGTACCGCTTCCAGATTTGCTGTCAAA
 TGTATCAAGTTTATCGAACAAATGGAACAAGAAAAATGAAGCTTCTCCAAACACTGACGCT
 AAGGTTTTGAGATTCAAGTTCGATACTCACGGTAAAAGGTACCAACTGTTGAGCACGAA
 GATGACTCTGCTGCTGTATCTGTGTTAATGGTTCTCACGTTTCCTTCAAGCCAATGCT
 AACCTTTGGGAAAACGAAACCAACGTTGAATTAAGAAAGGTTTTGAAGTTCACCTGGGCT
 GAATACAACAAGATTGGTGACATCCTGTCCGGTAGATTAAAGTTGAGAGCTGAGGTAGCC
 GCTTTAGCCGCTGAAAACAAATGA

Fig 5.- Secuencia codificante para PFK1 donde se señala el codón que fue sustituido por un codón que codifica para leucina. En este codón se cambió la segunda base de C a T, generando el nuevo codón CTA

A partir de ésta secuencia fue que se generaron los 4 oligonucleótidos con los que se trabajó:

NOMBRE	SECUENCIA
PFK1NotFo	5'- AGCATCGTGCATGGGATAGCGGCTAGT -3'
PFK1NotRe	3'- CGATATGATACACATAACAATGAGCAAT -5'
P728LFo	5'- GCCACTGTTTCTAATAACGTTCTAGGTACCGAATACTCACTTGGTGTG -3'
P728LRe	3'-CAACACCAAGTGAGTATTCGGTACCTAGAACGTTATTAGAAACAGTGGC -5'

Una vez que ambos genes se obtuvieron, éstos se ligaron al vector pRS424 generando las siguientes construcciones:

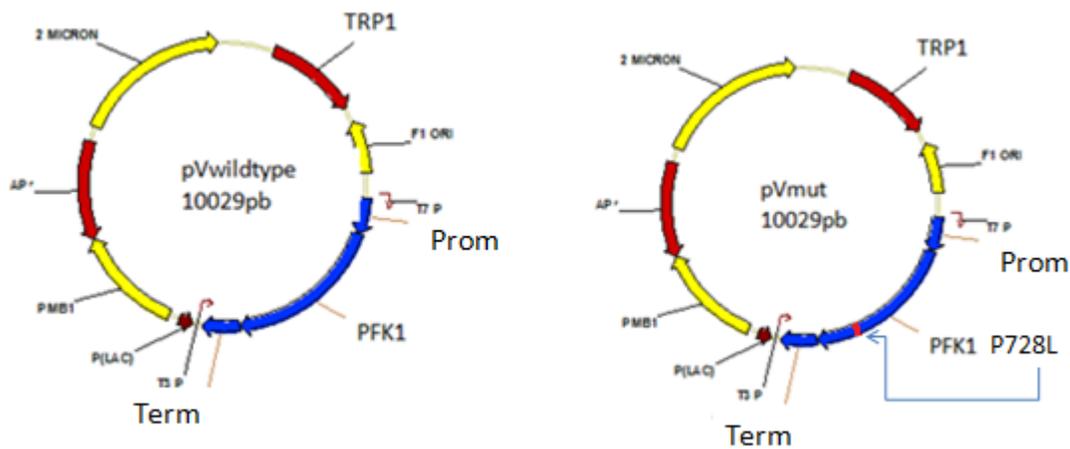


Fig 6. Plásmidos pVwildtype y pVmut con los genes *PFK1* y *PFKP728L* insertados. El promotor se presenta como Prom, el terminador como Term y las regiones codificantes como *PFK1* y *PFK1P728* donde la mutación se encuentra señalada y marcada con rojo

Para corroborar que efectivamente la ligación había sido exitosa y la identidad de los genes insertados, se realizó el análisis de restricción, siendo los patrones de bandas observados en la electroforesis en gel de agarosa los esperados para cada caso:

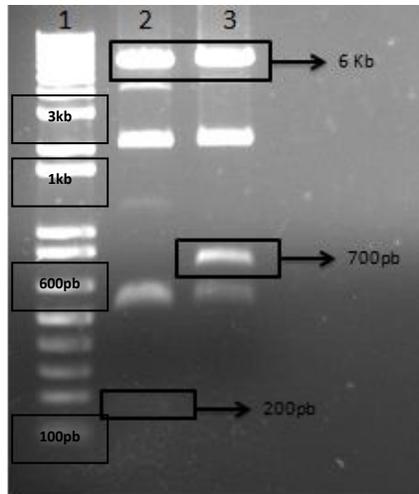


Fig 7.- Electroforesis en gel de agarosa de la restricción de pVmut y pVWt digeridos con KpnI, donde se muestra el marcador de peso molecular en el carril 1. Carril 2 pVmut digerido con la enzima KpnI, se observa una banda de 6kb perteneciente al plásmido pRS424, una banda de 200pb, otra de 500pb y 3kb que corresponden al gen *PFK1-P728L*. En el carril 3 se muestra pVWt digerido con KpnI y tenemos la misma banda de 6kb perteneciente a pRS424, una banda 3kb y otra de 700pb que confirman la identidad del gen como PFK1

Además de esto, era necesario estar seguros de que la secuencia de los genes insertados en los plásmidos pVmut y pVwildtype fueran las deseadas, por lo que dichos plásmidos fueron secuenciados con ayuda de la unidad de biología molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, obteniendo como resultados las siguientes secuencias en las figuras 8 y 9.

```

AGCATCGTGCATGGGATAGCGGCTAGTAAAAAAGAAAATTAATATCTCATTAACAAAGT
TATTGTACATAATCCGGTACAATATTCTTCAATGTACTCTCTAATATCGAGCACACTGGC
AATATTCATGCACACATTCGCCTAATGCTGACGAATGCTTAATCAGTGCAATTACTGCCA
CCCTCTTGATATGTGGGCTAAATCCTTTAGGACCTGTAAAAAATGCAATCACGTTTTTAC
ATTTTTTTTTTTCTTGCGGAATTGCGGAATTTCCAGTTGGCAGCGTTATCCGATTTGAG
ATCGACTTGCATCAACCTTTGAAAAATATAAGGATGAGAAAAGTAAAATCGGTTTTTTTTT
TCCATTGTCGTCATCAACATGATTTTTTAAATAAATAAATACGATTTTTTATTTTTTTTC
CCTTCTTTGTTTTTGTGTTTGTATTCCCATCTTCATTATTAATTCTTCCGCTCTTAAT
AAAGGAGTTTTTTTTATTATCTTCTTGTGTAATCATCCTTTTTCTTTAATTTTTCTTCCTTT

```

TCTTTTTCTCTTTACTGGTTTTTTTTACTTCTTTTATTCTCAACCATCTAAAGAATATTATT
GCTTTCTACCAATAAAATCTGTTAATTCTATTTGGATTGTCGTCTACTCAAGTCTCGCCT
AGTAAATAAACGATAAAACAAATTTGAAGTAAGAATAACAATATAGGGAGAGAAATTTTTC
TATTTTTAATTTTCGAAACAGGTACCAAAAAATCTAAGTTCACTTTAGCACTATTTGGGAA
AGCTTTTATATAAAAAATCTGAAACAAAAATCATATCAAAGATGCAATCTCAAGATTCATG
CTACGGTGTTCATTTCAGATCTATCATCACAAATGATGAAGCTTTATTCAAGAAGACCAT
TCACTTTTATCACACTCTAGGATTTGCAACTGTGAAAGATTTCAACAAATTCAAACATGG
TGAAAATAGCTTACTATCTTCAGGGACTTCCCAAGATTCCTTGAGAGAAGTTTGGTTAGA
ATCTTTCAAGTTGAGTGAGGTTGATGCTTCTGGGTTCCGTATAACCACAACAAGAAGCTAC
TAACAAGGCTCAAAGTCAAAGTGCTCTATTTAAAGATTTCGTTAGTGATGCTGCTCCAAT
CGATGAAACTTTTCGACACCAACGAAACCCGCCACAATCACTTATTTCTCTACTGATTTGAA
CAAGATTGTCGAGAAATTTCCCAAAACAAGCCGAAAAATTTGTCGATACCTTAGTGTTTTT
GAAAGATCCAATGGGCAACAACATCACCTTCTCAGGCTTAGCTAATGCAACCGATTCCGC
TCCAACCTCCAAGATGCTTTCTTAGAAGCTACCTCCGAAAGACGAAATCATCTCTAGAGC
TTCTTCCGATGCTTCTGACTTACTAAGACAAACATTGGGCTCTTCTCAAAGAAGAAGAA
GATTGCTGTCATGACTTCTGGTGGTGATTCTCCAGGTATGAATGCCGCTGTTTCGTGCCGT
TGTTTCGTACAGGTATACATTTCCGGCTGTGATGTTTTTGGCTGTTTACGAAGGTTACGAAGG
TTTACTAAGAGGCGGTAAATATTTAAAGAAAATGGCTTGGGAAGATGTCAGAGGTTGGTT
AAGTGAAGGTGGTACTTTGATTGGTACTGCTCGTTCTATGGAATTCAGAAAGCGTGAGGG
TCGTAGACAAGCTGCAGGCAATTTAATTTTCGCAAGGTATTGACGCTTTGGTTGTTTGTGG
TGGTGATGGTTCTTTAACCAGGTGCTGATCTTTTCAGACACGAATGGCCATCTTTGGTTGA
TGAATTGGTTGCAGAAGGTAGATTCACTAAAGAAGAAGTCGCCCCATACAAGAATTTGTC
CATTGTTGGTCTTGTCCGTTCCATCGATAATGATATGTCTGGTACTGACTCTACCATTGG
TGCTTATTCTGCTTTGGAAAGAATCTGTGAAATGGTTGACTACATTGATGCCACCGCTAA
ATCCCACTCCCGTGCCTTTGTTGTTGAAGTTATGGGTAGACATTGTGGTTGGTTGGCCTT
GATGGCTGGTATTGCTACCGGTGCCGATTACATTTTTATTCCAGAAAGAGCTGTTCTCTCA
CGAAAATGGCAGGACGAATTTGAAGGAAGTGTGCCAAAGACACAGAAGTAAGGTTAGAAG
AAATAACACAATATTGTGCTGCTGAAGGTGCTTTAGATGATCAATTAACCCCTGTTACTGC
CAATGACGTCAAAGATGCTTTGATTGAATTGGGTCTAGACACCAAGGTAACCATTCTAGG
TCACGTTCAAAGAGGTGGTACAGCTGTTGCTCATGACAGATGGTTAGCTACTCTACAAGG
TGTCGATGCTGTTAAGGCCGTTCTGGAATTTACCCTGAAACTCCTTCTCCATTAATTGG
TATTTTAGAAAACAAGATAATTAGAATGCCATTGGTTGAATCTGTGAAGTTGACTAAATC
TGTTGCCACTGCCATTGAAAACAAGATTTTCGATAAGGCAATTTCTTTAAGAGACACAGA
ATTTATTGAACTTTACGAAAACCTTCTTATCCACTACCGTTAAAGATGATGGTTCCGAATT
ATTTGCCAGTATCTGACAGACTAAACATTGGTATTGTCCATGTTGGTGCCCCATCTGCTGC
TTTGAACGCTGCCACCCGTGCCGCAACTCTATACTGTTTGTCTCACGGCCATAAACCATA
CGCTATCATGAATGGTTTTCAGTGGATTGATTCAAACCGGTGAAGTGAAGGAAGTATCATG
GATTGATGTCGAAAACCTGGCATAAATTTGGGTGGTTCCGAAATCGGTACGAACAGATCTGT
TGCTTACAGAAGATTTGGGTACCATTGCTTACTACTTCCAAAAGAACAAGCTAGACGGTTT
GATTATTCTTGGTGGTTTTTGAAGGTTTTCAGGTCCCTTGAAGCAATTGCGTGACGGTAGAAC
CCAACACCCAATCTTTAACATTCCAATGTGTTTGAATCCAGCCACTGTTTCTAACAACGT
TCCAGGTACTGAATACTCACTTGGTGTGATACCTGTTTGAACGCATTAGTCAATTACAC
TGATGACATCAAACAGAGTGCTTCTGCGACAAGAAGAAGAGTCTTCGTCTGTGAAGTCCA
AGGTGGTCACTCTGGTTACATCGCTTCTTTCACTGGTTAATCACTGGTGTGTTTCAGT
GTACACTCCAGAAAAGAAGATCGACTTAGCTTCTATCAGAGAAGATATAACTCTATTTAA
AGAGAACCTTTCGTACGACAAAGGTGAAAACAGAAACGGTAAGCTATTGGTTAGAAACGA
ACAAGCTTCTAGCGTATATAGCACTCAATTTGTTGGCTGACATCATCTCTGAAGCAAGCAA
GGGTAAGTTTTGGTGTAGAACTGCTATCCCAGGCCATGTTCAACAAGGTGGTGTCCATC
TTCTAAAGACCGTGTACCGCTTCCAGATTTGCTGTCAAATGTATCAAGTTTTATCGAACA
ATGGAACAAGAAAATGAAGCTTCTCCAAACACTGACGCTAAGGTTTTGAGATTCAAGTT
CGATACTCACGGTGAAGGTTACCAACTGTTGAGCACGAAGATGACTCTGCTGCTGTTAT
CTGTGTTAATGGTTCTCACGTTTCCCTTCAAGCCAATTGCTAACCTTTGGGAAAACGAAAC
CAACGTTGAATTAAGAAAGGTTTTTGAAGTTCACTGGGCTGAATACAACAAGATTGGTGA
CATCCTGTCCGGTAGATTAAGTTGAGAGCTGAGGTAGCCGCTTTAGCCGCTGAAAACAA
ATGAATGATTGCAATGAAAAGTTTTAAGTTAAGCAAAAGGAGGTAAAAATGGCATGCACTT
TAATTTTTATACAATCGTTTTTTTTGTCTATAAGACTTATTTATGTATCTGTTGTTTTCTT
TTTCTATCCTCTATTTTTGTCTATTTGTCTTTGTTTTACTCTTTTTTCATTATTATTTCTT

TATATAATTTTTGTACGATATGATACACATAACAATGAGCAAT

Fig8.- Secuencia del plásmido pVwt, la zona sombreada corresponde a la región codificante para el gen PFK1, y las bases anteriores a ésta, a la región del promotor. Se observa que no hubo ningún cambio en relación a la secuencia reportada por la base de datos.

AGCATCGTGCATGGGATAGCGGCTAGTAAAAAAGAAAATTAATATCTCATTAACAAAAGT
TATTGTACATAATCCGGTACAATATTCTTCAATGTACTCTCTAATATCGAGCACACTGGC
AATATTCATGCACACATTCGCTAATGCTGACGAATGCTTAATCAGTGCAATTACTGCCA
CCCTCTTGATATGTGGGCTAAATCCTTTAGGACCTGTAAAAAATGCAATCACGTTTTTCAC
ATTTTTTTTTTTCTTGCAGGAATTGCGGAATTTCCAGTTGGCAGCGTTATCCGATTTGAG
ATCGACTTGCATCAACCTTTGAAAAATATAAGGATGAGAAAAGTGAAATCGGTTTTTTTTT
TCCATTGTGTCATCAACATGATTTTTTAAATAAATAAATACGATTTTTTTATTTTTTTTC
CCTTCTTTGTTTTTGTGTTTTGCTTATTTCCCATCTTCATTATTAATTTCTTCCGCTCTTAAT
AAAGGAGTTTTTTTTATTATCTTCTTGTGTAATCATCCTTTTTTCTTTAATTTTTCTTCTTTT
TCTTTTTCTCTTTACTGGTTTTTTTTACTTCTTTATTCTCAACCATCTAAAGAATATTATT
GCTTTCTACCAATAAAATCTGTTAATTCTATTTGGATTGTGCTACTCAAGTCTCGCCT
AGTAAATAAACGATAAACAAAATTTGAAGTAAGAATAACAATATAGGGAGAGAAAATTTTTT
TATTTTTAATTTGAAACAGGTACCAAAAAATCTAAGTTCACTTTAGCACTATTTGGGAA
AGCTTTTATATAAAAAATCTGAAACAAAATCATATCAAAGATGCAATCTCAAGATTCATGC
TACGGTGTTCATTCAGATCTATCATCACAAATGATGAAGCTTTATTCAAGAAGACCATTAC
TTTTATCACACTCTAGGATTTGCAACTGTGAAAAGATTTCAACAAAATTCAAACATGGTGAAAAT
AGCTTACTATCTTCAGGGACTTCCCAAGATTCCTTGAGAGAAGTTTGGTTAGAATCTTTCAAG
TTGAGTGAGGTTGATGCTTCTGGGTTCCGTATACCACAACAAGAAGCTACTAACAAGGCTCAA
AGTCAAGGTGCTCTATTAAGATTTCGTTTAGTGATGTCTGCTCCAATCGATGAACTTTTCGAC
ACCAACGAAACCGCCACAATCACTTATTTCTCTACTGATTTGAACAAGATTGTGAGAAAATTC
CCAAAACAAGCCGAAAAATTTGTCGATACCTTAGTGTTTTTGAAGATCCAATGGGCAACAAC
ATCACCTTCTCAGGCTTAGCTAATGCAACCGATTCCGCTCCAACCTCCAAGATGCTTTCTTA
GAAGCTACCTCCGAAGACGAAATCATCTCTAGAGCTTCTTCCGATGCTTCTGACTTACTAAGA
CAAACATGGGCTCTTCTCAAAAAGAAGAAGATTGCTGTGATGACTTCTGGTGGTGATTCT
CCAGGTATGAATGCCGCTGTTTCGTGCGGTTGTTCTGACAGGTATACATTTCCGGCTGTGATGTT
TTTTGCTGTTTACGAAGGTTACGAAGGTTTACTAAGAGGCGGTAAATATTTAAAGAAAATGGCT
TGGGAAGATGTCAGAGGTTGGTTAAGTGAAGGTGGTACTTTGATTGGTACTACTCGTTCTATG
GAATTCAGAAAGCGTGAGGGTCGTAGACAAGCTGCAGGCAATTTAATTTCCGAAGGTATTGAC
GCTTTGGTTGTTTGTGGTGGTGATGGTTCTTTAACCGGTGCTGATCTTTTCAGACACGAATGG
CCATCTTTGGTTGATGAATTGGTTGCAGAAGGTAGATTCACTAAAGAAGAAGTCGCCCCATAC
AAGAATTTGTCCATTGTTGGTCTTGTGCGGTTCCATCGATAATGATATGTCTGGTACTGACTCT
ACCATTGGTGCCTTATCTGCTTTGGAAAGAATCTGTGAAATGGTTGACTACATTTGATGCCACC
GCTAAATCCCCTCCCGTGCCTTTGTTGTTGAAGTTATGGGTAGACATTTGTTGGTTGGTTGGCC
TTGATGGCTGGTATGCTACCGGTGCCGATTACATTTTTATTCCAGAAAAGAGCTGTTCCCTCAC
GGAAAATGGCAGGACGAATTTGAAGGAAGTGTGCCAAAGACACAGAAGTAAGGGTAGAAGAAAAT
AACACAATTTATGTCGCTGAAGGTGCTTTAGATGATCAATTAACCCCTGTTACTGCCAATGAC
GTCAAAGATGCTTTGATTGAATTGGGTCTAGACACCAAGGTAACCATTCTAGGTCACGTTCAA
AGAGGTGGTACAGCTGTTGCTCATGACAGATGGTTAGTACTCTACAAGGTGTCGATGCTGTT
AAGGCCGTTCTGGAATTTACCCCTGAACTCCTTCTCCATTAATTGGTATTTTAGAAAACAAG
ATAATTAGAATGCCATTGGTTGAATCTGTGAAGTTGACTAAATCTGTTGCCACTGCCATTGAA
AACAAAGATTTTCGATAAGGCAATTTCTTTAAGAGACACAGAATTTATTGAACCTTTACGAAAAC
TTCTTATCCACTACCGTTAAAGATGATGGTTCCGAATTTATTGCCAGTATCTGCACAGACTAAAC
CTATACTGTTTTGTCTACGGCCATAAACCATACGCTATCATGAATGGTTTTCAGTGGATTGATT
CAAACCGGTGAAGTGAAGGAACATATCATGGATTGATGTCGAAAACCTGGCATAAATTTGGGTGGT
TCCGAAATCGGTACGAACAGATCTGTTGCTTCCAGAAAGATTTGGGTACCATTGCTTACTACTTC
CAAAGAACAAGCTAGACGGTTTTGATTATCTTGGTGGTTTTGAAGGTTTTCAGGTCCTTGAAG
CAATTGCGTGACGGTAGAACCCAACACCCAATCTTTAACATTCCAATGTGTTTGAATCCAGCC
ACTGTTTCTAA■AACGTTCT■AGGTAC■GAATACTCACTTGGTGGTTGATACCTGTTTGAACGCA
TTAGTCAATTACACTGATGACATCAAACAGAGTGCTTCTGCGACAAGAAGAAGAGTCTTCGTC

TGTGAAGTCCAAGGTGGTCACTCTGGTTACATCGCTTCTTTCACTGGTTTAACTCACTGGTGCTG
 TTTCAGTGTACACTCCAGAAAAGAAGATCAACTTAGCTTCTATCAGAGAAGATATAACTCTATT
 AAAAGGGAACCTTCGTACAGCAAAGGTGAAAACAGAAACGGTAAGCTATTGGTTAGAAACGAA
 CAAGCTTCTAGCGTATATAGCACTCAATTGTTGGCTGACATCATCTTGAAGCAAGCAAGGGTA
 AGTTTGGTGTAGAACTGCTATCCCAGGCCATGTTCAACAAGGTGGTGTCCATCTTCTAAAGA
 CCGTGTCAACGCTTCCAGATTGCTGTCAAATGTATCAAGTTTATCGAACAATGGAACAAGAAA
 AATGAAGCTTCTCAAACACTGACGCTAAGGTTTGGAGATTCAAGTTCGATACTCACGGTGAAA
 AGGTACCAACTGTTGAGCACGAAGATGACTCTGCTGCTGTTATCTGTGTTAATGGTTCTCACGT
 TTCCTTCAAGCCAATTGCTAACCTTTGGGAAAACGAAACCAACGTTGAATTAAGAAAGGGTTTT
 GAAGTTCACCTGGCTGAATACAACAAGATTGGTGACATCCTGTCCGGTAGATTAAAGTCGAGAG
 CTGAGGTAGCCGCTTAGCCGCTGAAAACAAATGACGATATGATACACATAACAATGAGCAAT

Fig9.- Secuenciación del plásmido pVmut, se muestra la secuencia real del gen PFK1P728L generado, donde se muestra sombreada la zona codificante, además en rojo la mutación introducida y en amarillo 5 mutaciones que se generaron de manera espontánea durante la construcción del gen.

Como se puede observar, en el caso de la secuencia del gen silvestre generado (Fig 8), no hubo diferencias con el gen reportado con la base de datos; sin embargo para el caso del gen mutante (Fig 9), fueron detectadas 5 mutaciones indeseadas, de las cuáles una vez traducidas a proteína, sólo 4 tenían realmente un efecto, dichas mutaciones se muestran en la tabla 3:

Mutaciones no deseadas		
Posición de aminoácido	Aminoácido original	Aminoácido insertado
796	Ácido aspártico	Asparagina
809	Ácido glutámico	Glicina
844	Serina	Fenilalanina
976	Leucina	Serina

Tabla 3.- Mutaciones generadas en el gen PFK1P728L

Actividad enzimática de PFK1 Y PFK1P728L

Para verificar que la enzima PFK1 tuviera además de una secuencia correcta, una actividad enzimática, y para analizar que a pesar de las mutaciones el gen *PFK1P728L* codificara una proteína activa, se realizó un ensayo de actividad enzimática. Los resultados muestran que la cepa que sobre-expresa a la enzima PFK1P728L tuvo una actividad enzimática que no muestra diferencia significativa con la cepa que sobre-expresa al gen silvestre, además de esto, ambas cepas tuvieron los mismos niveles de enzima que una cepa transformada con el plásmido pRS426 sin ningún gen clonado. Lo que indica que las proteínas codificadas por los genes *PFK* clonados en los plásmidos pVwildtype y pVmut no fueron activas, o bien que las proteínas no fueron expresadas y la actividad corresponde a cepas no transformadas.

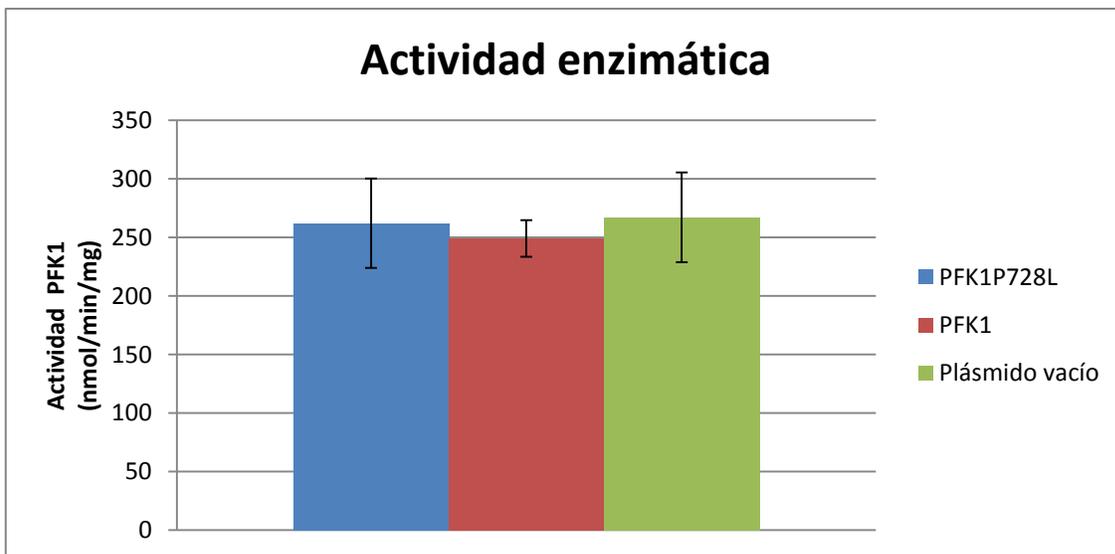


Fig10.- Gráfica donde se observa la actividad enzimática (nmol/min/mg) de las cepas sobre-expresantes y una no sobre-expresante de PFK1. La barra azul es la cepa transformada con el plásmido pVmut y que expresa a la PFK1P728L. La barra roja es la cepa transformada con el plásmido pVwt y que sobre-expresa a la PFK1. La barra verde es una cepa transformada con pRS426 vacío.

Este resultado sugiere que ambas enzimas no son activas, es posible que las mutaciones introducidas al menos en una de las proteínas durante el proceso de clonación hayan repercutido de alguna forma en la actividad de la enzima PFK1P728L, por lo que a continuación se decidió realizar un experimento más para corroborar este efecto. Ésta vez se puso a prueba la activación de la proteína, utilizando el activador más potente que se conoce para ésta enzima, por lo que se realizó un ensayo de actividad enzimática en el cuál se adicionó a la mezcla de reacción 10 μ M de F-2,6-BP. Una vez más se obtuvieron resultados que sugieren que ninguna de las proteínas sobre-expresadas es activa, pues tuvieron un factor de activación igual que el mostrado por la enzima extraída de la cepa transformada con pRS426 vacío, algo que no era esperado por el equipo

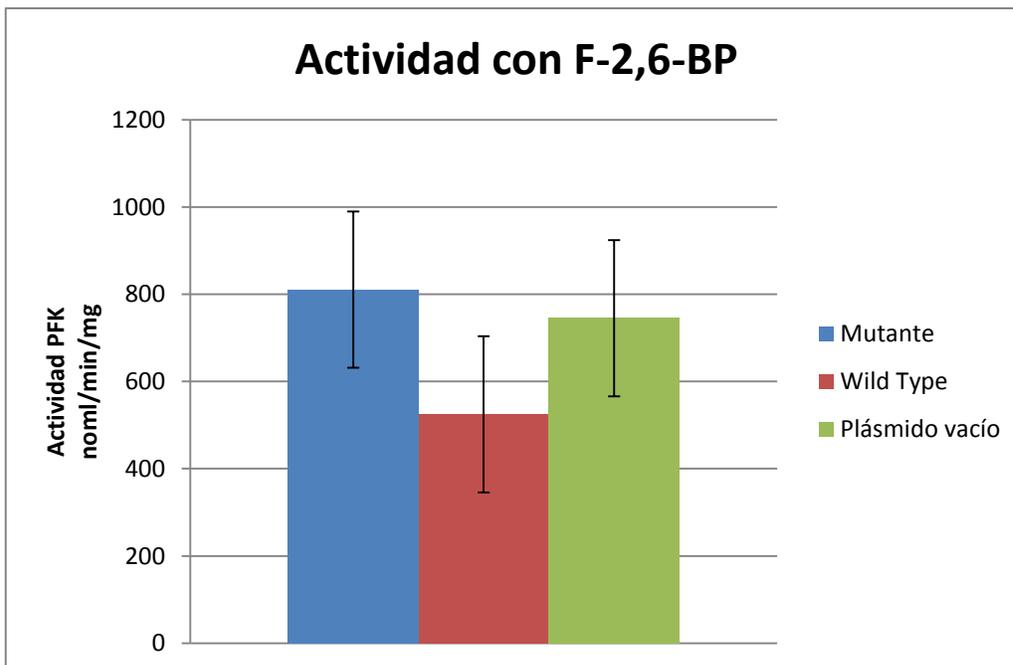


Fig11.- Actividad de PFK en presencia del activador fructosa 2,6- bifosfato. La barra azul corresponde a las cepas transformadas con pVmut la cual contiene al plásmido pRS424 con el gen *PFK1P728L*. La barra roja corresponde a la cepa transformada con el plásmido pVwt y que sobre-expresa a PFK1. La barra verde corresponde a la cepa transformada con el plásmido vacío.

Para poder hacer más evidente la similitud en cuanto a la activación, se obtuvo un factor del cociente resultante de dividir la actividad de la enzima activada entre la actividad mostrada por la enzima sin activador

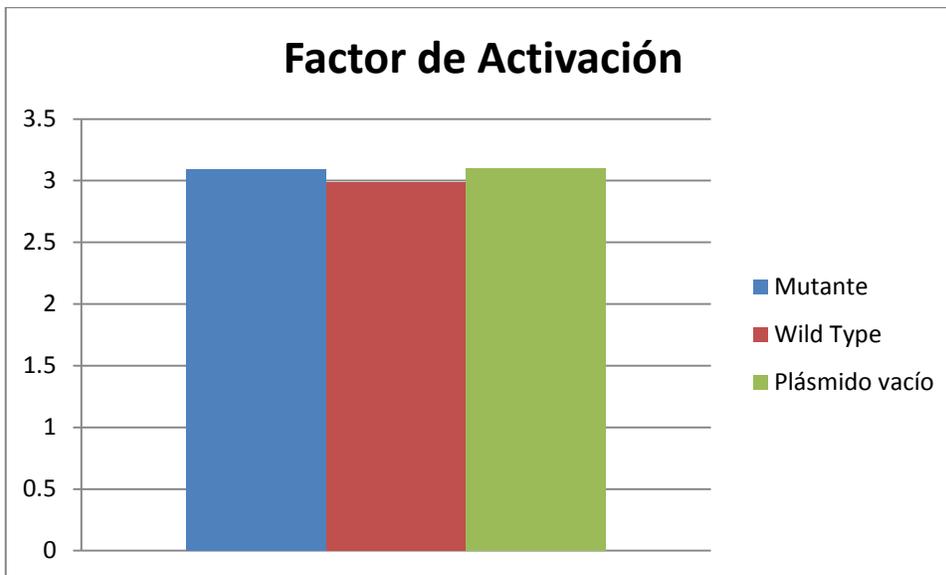


Fig12.-Factores de activación de los distintos extractos proteicos. La barra azul representa a la cepa transformada con el plásmido pVmut y que expresa a *PFK1P728L*. La barra roja representa a la cepa transformada con el plásmido pVwt y que sobre-expresa a *PFK1*. La barra verde representa a la cepa transformada con el plásmido pRS426 vacío.

Se puede ver en la gráfica que para ambos extractos se tiene un factor de activación prácticamente idéntico y sin diferencia con el factor de activación mostrado por el extracto generado de la cepa con plásmido vacío. Una vez más los resultados sugieren que las proteínas generadas por los genes *PFK1P728L* y *PFK1* contenidos en los plásmidos pVmut y pVwt, no poseen actividad enzimática. Es posible que las mutaciones adquiridas durante el proceso de construcción del gen tengan algo de peso en estos resultados, sin embargo el equipo tiene la hipótesis de que, al ser la enzima Pfk en *Saccharomyces cerevisiae* un hetero-

octámero conformado por 4 subunidades α y 4 β , codificadas por los genes *PFK1* y *PFK2* respectivamente, es necesario expresar de manera conjunta al gen *PFK2* para así poder generar hetero-octámeros que presenten el efecto de ser insensibles a sus activadores e inhibidores, además de aumentar la cantidad de enzima.

Se intentó evaluar la sobre-expresión de la Fructosa 6-fosfato cinasa tipo 1 mediante hibridación tipo Western blot, para ello se utilizaron anticuerpos que reconocen a las PFK1 de humano y ratón, sin embargo, dichos anticuerpos no reconocieron a la PFK1 de levadura, por lo que no obtuvimos resultados de éste ensayo.

A pesar de lo anterior, se monitoreo si existía alguna modificación en la capacidad de crecimiento y fermentación en las cepas.

Monitoreo de fermentación

Paralelamente al ensayo de actividad enzimática, se realizó una fermentación en medio microaerofílico. Para esto se evaluaron tres puntos de la fermentación: Capacidad de crecimiento, consumo de glucosa y producción de etanol.

Capacidad de crecimiento

Se evaluó la capacidad de crecimiento a 30°C de la cepa BY4741 *trp⁻* que sobre-expresaba el gen *PFK1*, así como de aquella que sobre-expresaba el gen mutante *PFK1-P728L* en un medio de cultivo con 5% de glucosa como fuente de carbono y en condiciones de microaerofilia. La capacidad de crecimiento se midió en función de la variación de la densidad óptica con el tiempo y también obteniendo la velocidad específica de crecimiento en la fase estacionaria (μ). Los resultados arrojados por ambos parámetros, no mostraron diferencia alguna entre las dos cepas.

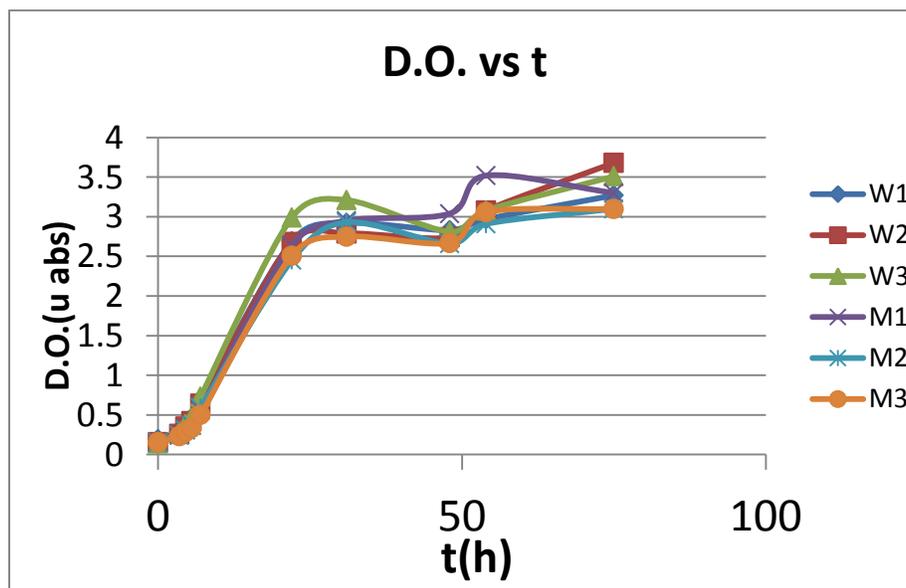


Fig13.- Comparación de la velocidad de crecimiento de 3 colonias de la cepa BY474 TRP- que sobre-expresa el gen *PFK1* (W) y 3 colonias de la cepa BY474 TRP- que sobre-expresa el gen *PFK1-P728L* (M). Se puede apreciar un comportamiento muy similar.

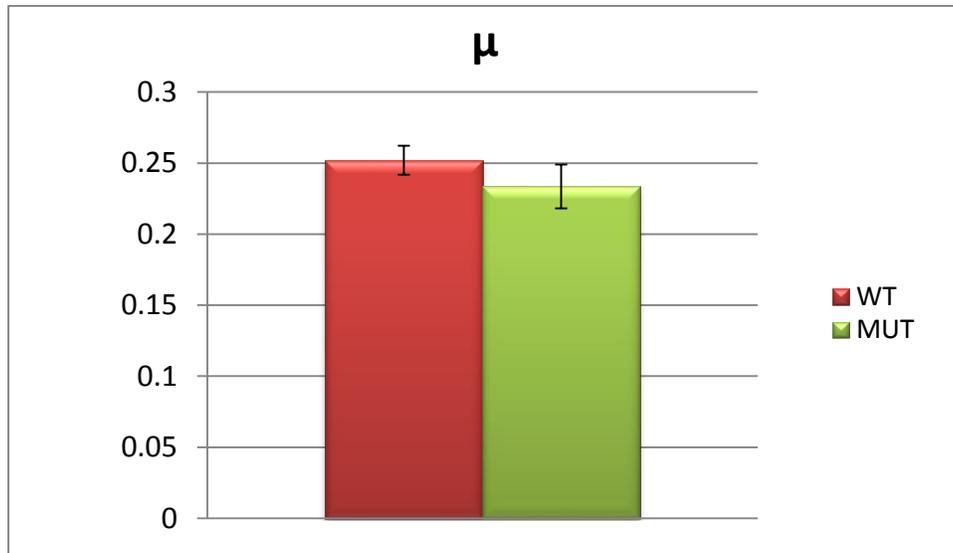


Fig14.- Velocidad específica de crecimiento de las cepas BY474 TRP- que expresan el gen *PFK1* (WT) y *PFK1-P728L* (MUT) respectivamente se observa que a pesar de haber una diferencia, ésta no es significativa al considerar el valor de la desviación estándar.

Estos resultados muestran que la transformación con el plásmido pVMut no tiene ningún efecto sobre la velocidad de crecimiento de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* en comparación con otra cepa de la misma levadura que fue transformada pero con el plásmido pVWt. Sin embargo, al realizar ésta misma comparación con una cepa carente de plásmido, se encontró que la velocidad específica de crecimiento es menor para la cepa BY474 trp- que fue transformada con el plásmido que contiene al gen mutante.

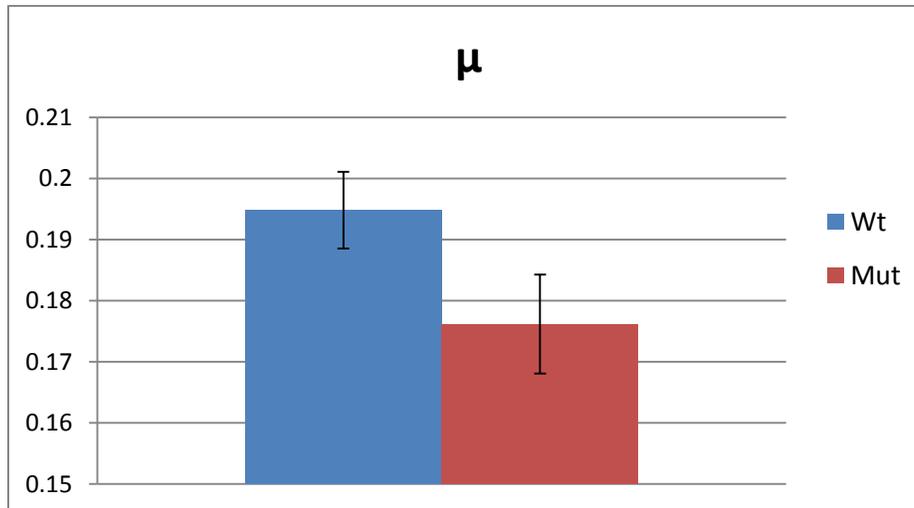


Fig15.- Gráfica que compara la velocidad específica de crecimiento de una cepa BY474TRP- (Wt) y BY474TRP- que expresa el gen PFK1-P728L (Mut). Se puede apreciar que ésta es menor y con diferencia significativa para la cepa expresa el gen mutante.

Éste comportamiento puede atribuirse al gasto de energía extra que tiene la cepa transformada para poder mantener las múltiples copias del plásmido y a su vez expresar los diversos genes que éste codifica.

Consumo de glucosa

El consumo de glucosa fue medido a las 0, 7, 22, 31, 48, 54 y 75 horas de iniciada la fermentación en los tres lotes de cepa Wild type y en los tres lotes de cepa Mutante. Se realizó una gráfica de este consumo para poder comparar los cambios en concentración en el medio de cultivo. El resultado arrojado es que no hay diferencia en la velocidad de consumo de glucosa entre las cepas, lo cual sugiere que no se logró aumentar la capacidad de consumo de glucosa y sugiere que tampoco se podrá aumentar la velocidad de producción de etanol.

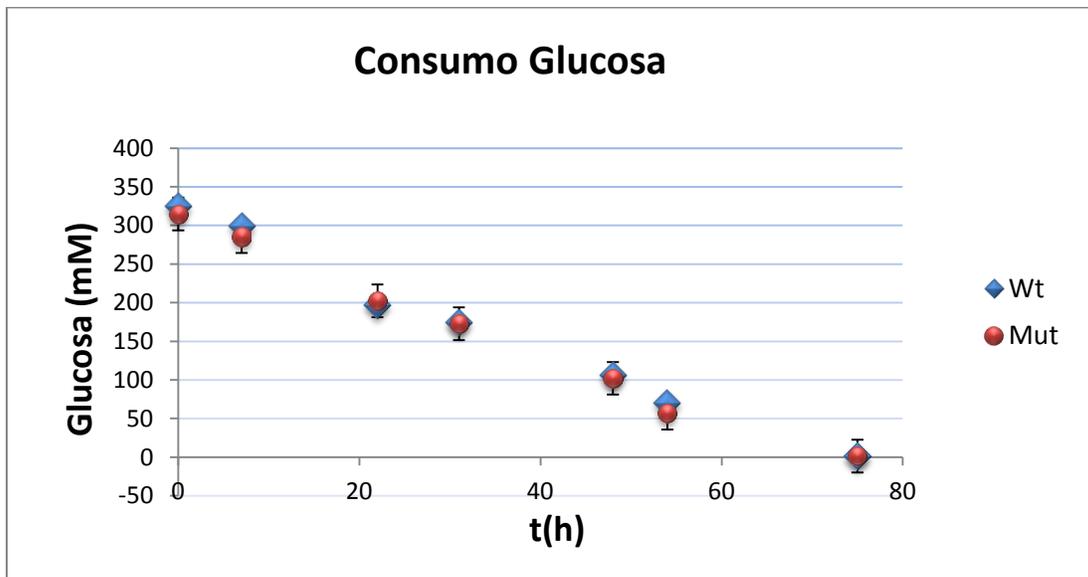


Fig16.-Consumo de glucosa de las dos cepas sobre-expresantes de PFK1, mutante y silvestre. Se muestra el promedio de la concentración de glucosa en el medio de cultivo en distintos puntos de la fermentación para las cepas Wild type y Mutante. Se puede ver que no hay diferencia entre las dos cepas.

Cinética de producción de etanol

Se determinó la concentración de etanol presente en el medio de cultivo en diversos tiempos durante la fermentación que cubrieran todas las fases durante una curva de crecimiento. De los datos obtenidos se realizó una gráfica para comparar las concentraciones de etanol alcanzadas por ambas cepas. Como era esperado, no se observó diferencia significativa entre las dos cepas durante la curva de crecimiento.

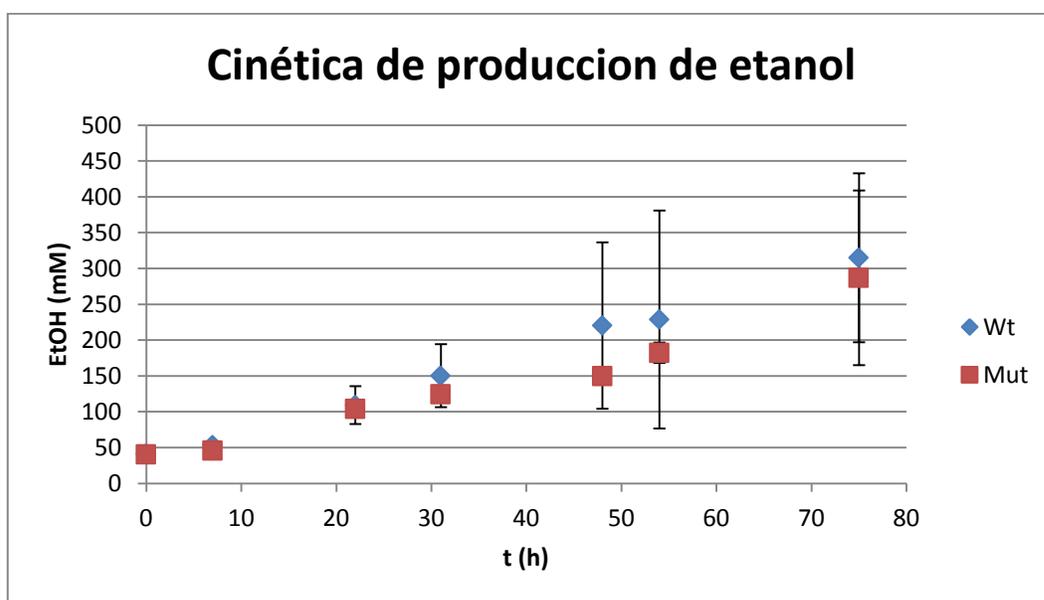


Fig17.- Curva temporal de la concentración de etanol (mM) presente en el medio de cultivo para las cepas. La cepa mutante transformada con el plásmido pVmut es representada con azul (Wt) y la cepa que sobre-expresa al gen silvestre transformada con el plásmido pVwt se representa en rojo (Mut). No se puede observar diferencia significativa entre las concentraciones alcanzadas en ninguno de los tiempos medidos.

Los resultados obtenidos muestran que es posible que a pesar de haber integrado los genes silvestre y mutante a los plásmidos para levadura, la proteína no se logró expresar y es debido a esto que no hay ninguna diferencia aparente al comparar las actividades enzimáticas de las cepas transformantes con la actividad enzimática que obtenemos de una cepa sin transformar. Para descartar esto, sería necesario realizar un Western-Blot con un anticuerpo capaz de reconocer a la PFK de levadura y así comparar la cantidad de enzima presente en cada una de las cepas, así como realizar un RT-PCR para corroborar que el gen se transcriba. Otra explicación posible es que no sea posible aumentar la actividad de Pfk solo con la sobre-expresión de *PFK1* y probablemente sea necesaria la sobre-expresión de la otra isoforma codificada por el gen *PFK2*. Por lo anterior no se logró aumentar el consumo de glucosa, ni tampoco aumentar la velocidad con la que se produce etanol. Este resultado sugiere una vez más, que para alterar una vía metabólica son necesarios varios cambios simultáneos, ya que la robustez de la célula le permite responder a perturbaciones y mantener su metabolismo inalterado. Es posible que, para lograr aumentar el flujo de la vía glicolítica, sea necesario además del trabajo realizado en ésta tesis, eliminar las inhibiciones a las que se ven sometidas las otras dos enzimas consideradas como puntos de control en esta vía, las cuales son la hexocinasa y la piruvato cinasa. Además de esto también es necesario explorar el efecto de éstas modificaciones conjuntamente con un aumento en el transporte y la demanda de ATP, ya que se ha sugerido que estos procesos también tienen un papel muy importante en el control del flujo glicolítico (Koebmann et al., 2002).

CONCLUSIONES

- Se lograron obtener las construcciones genéticas, en las que se insertaron el gen de PFK1 y de PFK1P728L en un plásmido multicopia para levadura.
- Al realizar la secuenciación de la construcción genética del gen mutante, se observaron 5 mutaciones, de las cuales 4 pudieran haber tenido un efecto en la enzima ya que los cambios consecuentes eran por aminoácidos con propiedades distintas a los presentes en la enzima silvestre. La secuencia del gen silvestre generado, fue idéntica a la esperada.
- No hubo diferencia en la actividad enzimática de las cepas mutante y silvestre.
- Insertar la mutación P728L en la isoforma codificada por el gen *PFK1* no es suficiente para eliminar la inhibición por ATP ni la activación por F2,6BP en la enzima Pfk in vivo.
- No hubo diferencia en ninguno de los parámetros evaluados durante la fermentación microaerófila.

BIBLIOGRAFÍA

- **Balat M, Balat H, Öz C.** Progress in bioethanol processing. *Progress in Energy and Combustion Science*. 2008; **34**(5):551–573.
- **Blazquez, M.A., Lagunas, R., Gancedo, C., Gancedo, J.M.,** Trehalose-6-phosphate, a new regulator of yeast glycolysis that inhibits hexokinases. *FEBS Lett*. 1993; 329, 51-54.
- **Boles, E., and C. P. Hollenberg.** The molecular genetics of hexose transport in yeasts. *FEMS Microbiol*. 1997; **21**:85–111.
- **Bonini, B.M., Van Dijck, P., Thevelein, J.M.,** Uncoupling of the glucose growth defect and the deregulation of glycolysis in *Saccharomyces cerevisiae* Tps1 mutants expressing trehalose-6-phosphate-insensitive hexokinase from *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochimica et Biophysica acta*. Septiembre 3, 2003. 1606(1-3): 83-89.
- **Christianson T., Sikorski R., Dante M., Shero J., Hieter P.** *Gene*, Volume 110, Issue 1, 2 January 1992, 119-122
- **Demirbas, A.** Energy Conversion and Management, *El Sevier*. 2008, 49, 2106-2116.
- **Daran-Lapujade, P., Rossell, S., van Gulik, W.M., Luttik, M.A., de Groot, M.J., Slijper, M., Heck, A.J., Daran, J.M., de Winde, J.H., Westerhoff, H.V., Pronk, J.T., Bakker, B.M.** The fluxes through glycolytic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae* are predominantly regulated at posttranscriptional levels. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007, **104** (40):15753-8.

- **Dickinson, R., Schweizer, M.** The metabolism and molecular physiology of *Saccharomyces cerevisiae*. Taylor & Francis, 1999.
- **Elbing, K., Larsson, C., et al.** Role of Hexose Transport in Control of Glycolytic Flux in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied And Environmental Microbiology*, Sept. 2004, p. 5323–5330
- **Fraenkel, D. G.** Carbohydrate metabolism. In *The molecular Biology of the Yeast Saccharomyces: Metabolism and Biosynthesis*, 1982 pp. 1-37. **Hahn-Hägerdal, B., Galbe, M., Gorwa-Grauslund, M.F., Lidén, G., Zacchi, G.** Bio-ethanol--the fuel of tomorrow from the residues of today. Trends Biotechnol. 2006 Dec;24(12):549-56.
- **Hauf, J., Zimmermann, F., Müllera, S.** Simultaneous genomic overexpression of seven glycolytic enzymes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme and Microbial Technology*, 2000, Vol. 26 (9–10), , pp. 688-698
- **Heinisch, J.J., Boles, E., Timpel, C.,** A yeast phosphofructokinase insensitive to the allosteric activator fructose 2,6-biphosphate. *The Journal of Biological Chemistry*, Julio 5, 1996, 271, pp. 15928-15933.
- **Koebmann, B.J., Westerhoff, H.V., Snoep, J.L., Solem, C., Pedersen, M.B., Nilsson, D., Michelsen, O., Jensen, P.R.** The extent to which ATP demand controls the glycolytic flux depends strongly on the organism and conditions for growth. *Mol Biol Rep.* 2002; 29(1-2):41-5.

- **Lapujade, D., Rossell, S., Westerhoff, H.** The fluxes through glycolytic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae* are predominantly regulated at posttranscriptional levels. *PNAS*. 2007, Vol. 104, no. 40, pp. 15735-15758.
- **Larsson, C., Pålman, I.L., Gustafsson, L.** The importance of ATP as a regulator of glycolytic flux in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 2000, 16(9):797-809.
- **Lobo, Z., Maitra, P.K.** 1982, *FEB Letters*. 139, 93-96.
- **Nelson D., Cox M.** Lehninger. Principios de Bioquímica. Ed. Omega, 4ta Edición.
- **O'Zcan, S., Johnston, M.** Function and Regulation of Yeast Hexose Transporters. *Microbiology And Molecular Biology Reviews*, Sept. 1999, P. 554–569
- **Reibstein, D., den Hollander, J. A., Pilkis, S.J. & Shulman, R. G.,** Studies on the regulation of yeast phosphofructo-1-kinase: its role in anaerobic and aerobic glycolysis. *Biochemistry*, 1986, 25, 219-227
- **Rodicio, R., Strauß, A., Heinisch, J. J.,** Single point mutations in either gene encoding the subunits of the heterooctameric yeast phosphofructokinase abolish allosteric inhibition by ATP., *Journal of Biological Chemistry*, 2000, Vol. 275, No. 52, pp. 40952-40960.
- **Schaaff, I., Heinisch, J., Zimmermann, F.K.** Overproduction of glycolytic enzymes in yeast. *Yeast*. 1989, 5(4):285-90.
- **Sierkstra, L.N., Verbakel, J. M., Verrips, C.T.** Analysis of transcription and translation of glycolytic enzymes in glucose-limited continuous cultures of

Saccharomyces cerevisiae, *Journal of general Microbiology*, Diciembre, 1992. 138 (12): 2559-2566

- http://www.sener.gob.mx/webSener/res/PE_y_DT/pub/Biocombustibles_en_Mexico_Estudio_Completo.pdf
- *Saccharomyces cerevisiae* Genome Database
(<http://www.yeastgenome.org/>)
- Oligo Calc: Oligonucleotide Properties Calculator
(<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>)

APÉNDICE

▪ MEDIOS DE CULTIVO

Medio LB para bacterias	1L
Triptona	10g
Extracto de levadura	5g
NaCl	10g
Agar	20g
Ampicilina stock(25 mg/mL)	1mL

Medio YPD para levaduras	1L
Extracto de levadura	10g
Peptona de caseína	20g
Dextrosa anhidra	20g
Agar	20g

Medio mínimo para levaduras (HML)	1L
Stock de vitaminas [*]	1000µL
Stock de trazas ^{**}	1000µL
Stock de sales ^{***}	20mL
Glucosa	20g
Sulfato de amonio	5g
Agar	25g

⁺ El medio es enriquecido con Histidina, Metionina y Leucina para propiciar el crecimiento de las levaduras.

Aminoácido	Concentración en el medio g/L
Histidina	0,02
Metionina	0,02
Leucina	0,1

*Stock de Vitaminas	(1000x)
Biotina	2mg
Pantotenato de calcio	400mg
Ácido fólico	2mg

Niacina	400mg
Ácido p-amino benzoico	200mg
Piridoxina	400mg
Riboflavina	200mg
Tiamina-HCl	400mg
Inositol	200mg
H ₂ O	1000mL
** Stock de Trazas	(1000x)
Ácido Bórico	500mg
Sulfato cúprico	40mg
Ioduro de potasio	100mg
Cloruro férrico	200mg
Sulfato de magnesio	400mg
Molibdato de sodio	200mg
Sulfato de zinc	400mg
H ₂ O	1000mL

***** Stock de Sales**

Fosfato monobásico de potasio	50g
Sulfato de magnesio	5g
Cloruro de sodio	1g
Cloruro de calcio	1g
H ₂ O	1000mL
Cloroformo	5mL