

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Instituto de Investigaciones Biomédicas

“REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN *mdh*
EN *Streptomyces coelicolor*”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

ANA PAULINA MENDOZA VON DER BORCH

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MARIA ELENA DEL CARMEN FLORES CARRASCO

MÉXICO, D.F.

DICIEMBRE, 2008



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.

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico brindado mediante la beca número 203409 para la realización de este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo financiero del proyecto 58060 titulado “El Ciclo de los Ácidos Tricarboxílicos en *Sreptomycetes coelicolor*”.

A los miembros de mi Comité Tutorial:

A la Dra. María Elena Flores Carrasco

Al Dr. Luis Servín González

Al Dr. Roberto Arreguín Espinoza

Gracias por su apoyo, orientación y por compartir sus conocimientos durante el desarrollo de este proyecto.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. María Elena Flores Carrasco por todos estos años de aprendizaje, por su asesoría y por el ejemplo que ha sido para mí.

Al Dr. Luis Servín González por sus comentarios y sus consejos siempre tan acertados y por todo su apoyo.

Al Dr. Roberto Arreguín Espinoza por su constante disposición de apoyarme, por sus críticas y su asesoría.

A la Dra. Bertha González Pedrajo y al Dr. José Guillermo Aguilar Osorio por todos sus comentarios y críticas constructivas que sin lugar a duda enriquecieron mi trabajo.

A la auxiliar del Posgrado en Ciencias Biológicas Blanca Huerta Hernández por la buena disposición y el apoyo que me brindó en la realización de los trámites a lo largo de mis estudios de maestría.

DEDICATORIA

A mis padres, doña Lenchis y don Falfus por darme alas y raíces.

A las güeras, la Tatu y la Lucas por tantos recuerdos, por todas las risas y por estar ahí siempre.

Al Sebitas por existir.

Al Uli mi niño por todo el amor, la chispa y la energía, y por convencerme siempre de que no es bueno trabajar tanto y que el tiempo libre es importante.

A la Elenini, la Vane, la Ale y la Natas, las otras carnalitas, y al primi Tomukas; por la convivencia y todos los momentos inolvidables.

A la Tóshiko y la Jasmín, por todo lo que hemos compartido, las emociones, los mitotes, las divagaciones y por lo mucho que me ayudaron para desarrollar este trabajo y para resolver las dudas existenciales.

Al Alfredo por siempre estar dispuesto a ayudar y por tener ese carácter tan noble.

A los demás compañeros, Dr. Bastarrachea, Paty, Saúl, Sara, Don Eduardo y Don Oswaldo por hacer especial mi estancia en el laboratorio.

A Cintia, Gaby, Rocío, Griselda y Norma porque sin ustedes no hubiera logrado ser lo que ahora soy.

Al Dr. Carlos P. Plasencia por todo el apoyo que me ha brindado para poder concluir este trabajo.

CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS.....	1
ABREVIATURAS.....	3
1 RESUMEN.....	5
2 INTRODUCCIÓN.....	7
3 ANTECEDENTES.....	9
3.1 ACTINOMICETOS.....	9
3.1.1 ESTREPTOMICETOS.....	9
3.2 METABOLISMO CELULAR.....	11
3.3 CATABOLISMO DE CARBONO.....	13
3.3.1 VÍAS ANAERÓBICAS.....	17
3.4 CICLO DE LOS ÁCIDOS TRICARBOXÍLICOS (TCA).....	18
3.5 MALATO DESHIDROGENASA (MDH).....	24
3.5.1 MALATO: QUINONA OXIDOREDUCTASA.....	25
3.5.2 ISOFORMAS DE MDH.....	26
3.5.3 PESO MOLECULAR Y SUBUNIDADES.....	26
3.5.4 ESTRUCTURA PRIMARIA, SECUNDARIA Y TERCIARIA.....	27
3.5.5 CATÁLISIS.....	28
3.5.6 pH ÓPTIMO.....	30
3.5.7 OTRAS VÍAS EN QUE PARTICIPA MDH.....	31
3.5.8 RELACIÓN ENTRE MDH Y OTRAS ENZIMAS EN CITOPLASMA.....	31
3.5.9 UBICACIÓN EN EL CROMOSOMA.....	31
3.5.10 REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE MDH.....	32
3.5.11 EFECTO DE LA FUENTE DE CARBONO SOBRE LA EXPRESIÓN DEL GEN <i>mdh</i>	32
3.5.12 EXPRESIÓN Y ACTIVIDAD DE MDH A TRAVÉS DEL TIEMPO DE CRECIMIENTO.....	34
3.5.13 FILOGENIA DE MDH.....	34
3.5.14 LA MALATO DESHIDROGENASA DE <i>S. coelicolor</i>	35
3.6 ASIMILACIÓN DE NUTRIENTES Y REGULACIÓN DEL METABOLISMO EN ESTREPTOMICETOS.....	36
3.6.1 ASIMILACIÓN DE CARBONO.....	37
3.6.2 ASIMILACIÓN DE NITRÓGENO.....	40
4 OBJETIVO.....	44
5 MATERIAL Y MÉTODOS.....	45
5.1 MICROORGANISMO.....	45
5.2 PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN CONCENTRADA DE ESPORAS.....	45
5.3 CULTIVO.....	45
5.4 CUANTIFICACIÓN DE CRECIMIENTO.....	46
5.5 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO LIBRE DE CÉLULAS (ELC).....	46
5.6 ENSAYO DE LA ACTIVIDAD DE MALATO DESHIDROGENASA.....	46
5.7 CUANTIFICACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS EN EL ELC.....	47
5.8 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA.....	47
5.9 DETERMINACIÓN DE LA TEMPERATURA ÓPTIMA DE LA MDH DE <i>S. coelicolor</i>	47
5.10 CUANTIFICACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE NUTRIENTES EN EL MEDIO DE CULTIVO (carbono y nitrógeno).....	47
5.11 EFECTO DE LA FUENTE DE CARBONO SOBRE EL PERFIL DE ACTIVIDAD DE MDH.....	48
5.12 ELECTROFORESIS DE POLIACRILAMIDA Y TINCIÓN DE PROTEÍNAS EN LOS GELES.....	48

5.13 IDENTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE MDH EN GELES DE POLIACRILAMIDA (ZIMOGRAMA).....	48
5.14 EXTRACCIÓN DE LOS ÁCIDOS NUCLEICOS DE <i>S. coelicolor</i>	49
5.15 REACCIÓN DE RETROTRANSCRIPTASA.....	49
5.16 DISEÑO DE INICIADORES.....	49
5.17 AMPLIFICACIÓN POR PCR DE LOS FRAGMENTOS <i>mdh</i> y <i>hrdB</i>	49
5.18 ESTANDARIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE PCR.....	50
5.19 SECUENCIACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR.....	51
5.20 ANÁLISIS DE LOS PRODUCTOS DE PCR.....	51
6 RESULTADOS.....	52
6.1 PERFILES DE ACTIVIDAD DE MDH AL CRECER A <i>S. coelicolor</i> EN MEDIO MÍNIMO SUPLEMENTADO CON CASAMINOÁCIDOS.....	52
6.2 EFECTO DE LA FUENTE DE CARBONO SOBRE EL PERFIL DE ACTIVIDAD DE MDH DE <i>S. coelicolor</i>	54
6.3 RT-PCR SEMICUANTITATIVO.....	63
6.3.1 EXTRACCIÓN DEL RNA TOTAL DE <i>S. coelicolor</i>	63
6.3.2 RT-PCR DE <i>mdh</i> Y <i>hrdB</i>	64
6.3.3 CURVA DE CICLOS DE PCR.....	65
6.3.4 DETERMINACIÓN DE LA CONFIABILIDAD DE RESULTADOS DE RT-PCR SEMICUANTITATIVO.....	67
6.4 TRANSCRIPCIÓN DEL GEN <i>mdh</i> A LO LARGO DEL TIEMPO DE CULTIVO EN MEDIO CON GLUCOSA O FRUCTOSA COMO FUENTES DE CARBONO.....	68
7 DISCUSIÓN.....	71
8 CONCLUSIONES.....	76
9 PERSPECTIVAS.....	77
10 ANEXOS.....	78
ANEXO 1. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN CONCENTRADA DE ESPORAS.....	78
ANEXO 2. ESTANDARIZACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DEL MEDIO MÍNIMO PARA EL CRECIMIENTO DE <i>S. coelicolor</i>	79
ANEXO 3. ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO PARA OBTENER EL ELC.....	80
ANEXO 4. ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO PARA MEDIR ACTIVIDAD DE MDH.....	81
ANEXO 5. CONSERVACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE MDH.....	86
11 BIBLIOGRAFÍA.....	87

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

FIGURAS	PÁGINA
Fig. 1. Ciclo de vida de <i>Streptomyces coelicolor</i>	11
Fig. 2. Fases de la respiración celular.....	14
Fig. 3. Vía de Entner-Doudoroff.....	15
Fig. 4. Ciclo de los ácidos tricarboxílicos.....	21
Fig. 5. Reacción catalizada por la malato deshidrogenasa.....	24
Fig. 6. Estructura tridimensional de la malato deshidrogenasa de <i>Thermus flavus</i>	29
Fig. 7. Secuencia de aminoácidos de la probable malato deshidrogenasa de <i>S. coelicolor</i>	35
Fig. 8. Ubicación cromosómica de los probables genes que codifican para enzimas del TCA en el genoma de <i>S. coelicolor</i>	36
Fig. 9. Esquema general de los sistemas de asimilación de carbohidratos de <i>S. coelicolor</i>	38
Fig. 10. Vía del butiril-CoA para la asimilación de acetato	41
Fig. 11. Localización de los fragmentos de los genes <i>mdh</i> y <i>hrdB</i> amplificados por PCR.....	50
Fig. 12. Perfiles de crecimiento y actividad la MDH de <i>S. coelicolor</i> al cultivarse en MM con fructosa como fuente de carbono suplementado con 0, 0.2 y 0.5 % de casaminoácidos.....	53
Fig. 13. Perfiles de actividad de MDH, consumo de azúcares, amonio y crecimiento de <i>S. coelicolor</i> al cultivarse en MM con glucosa, fructosa, maltosa, malato o acetato como fuentes de carbono..	56
Fig. 14. Perfiles de actividad de MDH, consumo de azúcares, amonio y crecimiento de <i>S. coelicolor</i> al cultivarse en MM con glucosa, fructosa, maltosa, malato o acetato como fuentes de carbono..	58
Fig. 15. Perfiles de actividad de MDH, consumo de azúcares, amonio y crecimiento de <i>S. coelicolor</i> al cultivarse en MM con fructosa suplementado con 0, 0.2 y 0.5% de casaminoácidos	60
Fig. 16. Perfiles de actividad de MDH, crecimiento de la bacteria, y consumo de amonio a lo largo del crecimiento de <i>S. coelicolor</i> cultivado en MM con glucosa o fructosa como fuentes de carbono y en dos controles, uno sin fuente de carbono, ni de nitrógeno pero con casaminoácidos y otro sin fuente de carbono, ni de nitrógeno, ni casaminoácidos.....	61
Fig. 17. Tinción de proteínas y zimogramas de MDH en electroforesis ND-PAGE con los ELC de las diferentes horas de cultivo en MM con glucosa o fructosa como fuentes de carbono.....	62
Fig. 18. Extracción del RNA total de <i>S. coelicolor</i>	64
Fig. 19. RT-PCR de los fragmentos <i>mdh</i> y <i>hrdB</i>	65
Fig. 20. Correlación entre intensidad de las bandas y número de ciclos de PCR para <i>mdh</i> y <i>hrdB</i> ..	66

Fig. 21. Confiabilidad de la cuantificación relativa de la transcripción de <i>mdh</i> en relación a <i>hrdB</i> por medio de RT-PCR semicuantitativo.....	67
Fig. 22. Electroforesis en agarosa de los productos de RT-PCR de los genes <i>mdh</i> y <i>hrdB</i> de <i>S. coelicolor</i> a lo largo del tiempo de cultivo en MM con glucosa o fructosa como fuentes de carbono.....	69
Fig. 23. Perfiles de transcripción del gen <i>mdh</i> y actividad de la enzima de <i>S. coelicolor</i> a lo largo del tiempo de cultivo en MM con glucosa o fructosa como fuentes de carbono	70

FIGURAS EN ANEXOS

PÁGINA

Fig. I. Comparación de la actividad de MDH en diferentes condiciones de extracción	80
Fig. II. Cinética de reacción de MDH con diferentes concentraciones de NADH	82
Fig. III. Cinética de reacción de MDH con diferentes concentraciones de oxaloacetato.....	83
Fig. IV. Efecto de la temperatura sobre la actividad de MDH.....	85
Fig. V. Efecto de diferentes formas de almacenar el ELC sobre la actividad de MDH.....	86

TABLAS

PÁGINA

Tabla 1. PM de la MDH reportado para diferentes organismos.....	27
Tabla 2. pH óptimo de la malato deshidrogenasa reportado para varios organismos.....	30
Tabla 3. Concentraciones de RNA obtenidas en las diferentes etapas de cultivo en MM con glucosa o fructosa como fuentes de carbono.....	69

ABREVIATURAS

ADH	Alcohol deshidrogenasa
ATP	Adenosín trifosfato
BSA	Albúmina sérica bovina
CCR	Represión catabólica por carbono
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
ELC	Extracto libre de células
FADH ₂	Flavina adenina dinucleótido reducido
GlcP	Glucosa permeasa principal
Glc	Glucosa cinasa
ICDH	Isocitrato deshidrogenasa
K _m	Constante de Michaelis-Menten
LDH	Lactato deshidrogenasa
MC	Medio completo
MDH	Malato deshidrogenasa
MM	Medio mínimo
MQO	Malato:quinona oxidoreductasa
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido reducido
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
ND	No desnaturizante
PEP	Fosfoenol piruvato
PM	Peso molecular
PMSF	Fenilmetilsulfonilfluoruro
RNA	Ácido ribonucleico

SDH	Succinato deshidrogenasa
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TCA	Ácido tricloroacético
TNA	Ácidos nucleicos totales
UV	Ultravioleta
V_{\max}	Velocidad máxima de una reacción enzimática
YEMEG	Medio completo con glucosa
YEMES	Medio completo con sacarosa

1 RESUMEN

El metabolismo secundario ha sido muy estudiado en estreptomicetos debido a su gran importancia económica, sin embargo, a pesar de que las moléculas precursoras de este metabolismo provienen del primario, a la fecha se conoce poco acerca de este último en estos organismos.

El ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) es una vía central en el metabolismo primario, es por esto, que en nuestro grupo de estudio estamos interesados en estudiar la regulación y propiedades de las enzimas de este ciclo en *Streptomyces coelicolor*, que es el organismo modelo para este grupo bacteriano.

La L-malato deshidrogenasa (EC 1.1.1.37) (MDH) dependiente de NAD(P)⁺ cataliza la interconversión entre malato y oxaloacetato, que es la última reacción del TCA. Esta enzima ha sido estudiada en gran cantidad de organismos y participa en varias vías metabólicas esenciales, de las cuales la más importante es el TCA.

En este trabajo se estudiaron los perfiles de expresión del gen *mdh* que codifica para la enzima malato deshidrogenasa de *S. coelicolor* a lo largo del tiempo de cultivo en Medio Mínimo y en presencia de diferentes fuentes de carbono.

En todas las condiciones probadas se detectó actividad de la enzima. En fuentes de carbono como fructosa, maltosa, piruvato y malato la actividad aumentó en la primera etapa del cultivo y después disminuyó aunque la bacteria continuó creciendo. En cambio, al cultivar en presencia de glucosa la actividad aumentó durante toda la etapa de crecimiento y disminuyó cuando dejó de crecer lo que sugiere que en estas condiciones está asociada a crecimiento. También se determinó el consumo de carbono y nitrógeno en cada una de las condiciones lo cual mostró que en presencia de glucosa y fructosa la bacteria deja de crecer debido a que se termina el azúcar. El consumo de nutriente fue lento al inicio del cultivo y luego se aceleró. En presencia de fructosa, el aumento en la actividad ocurrió en la etapa de lenta asimilación y en glucosa se observó aumento en la actividad durante toda la etapa de crecimiento. En general, se observó poco o nulo consumo de amonio, lo cual probablemente se debe a que el amonio consumido se compensa con el producido por la degradación de los casaminoácidos o a que también utiliza estos compuestos como fuente de nitrógeno.

En las primeras horas de cultivo en todas las condiciones se detectó muy poco o nulo consumo de nutrientes y se demostró que el crecimiento observado en esta etapa no fue debido a las reservas intracelulares de las esporas pregerminadas ni a la exclusiva utilización de los casaminoácidos como fuente de carbono y nitrógeno, sugiriendo que realmente es debido a los pocos nutrientes consumidos.

Como el perfil de actividad de MDH al crecer en presencia de glucosa fue distinto al observado en las otras fuentes de carbono, se decidió analizar lo que sucede a nivel de la transcripción de este gen en las diferentes etapas de cultivo creciendo en MM con glucosa o fructosa. Los niveles de transcripción fueron determinados mediante RT-PCR semicuantitativo para lo cual fue necesario realizar una serie de estandarizaciones. Los resultados obtenidos mostraron que en ambos casos la transcripción de este gen está asociada al crecimiento ya que los niveles de mRNA aumentan durante la etapa de rápida proliferación y disminuyen cuando lo hace

la velocidad de crecimiento. Esto concuerda con el perfil de actividad de MDH al crecer en presencia de glucosa, sin embargo; sorprendentemente el perfil de transcripción (mRNA del gen *mdh*) es distinto al de actividad de la enzima al cultivar a la bacteria con fructosa como fuente de carbono, ya que mientras la actividad aumenta en las primeras horas de incubación y después disminuye aunque el crecimiento continúa, a nivel de transcripción ocurre lo inverso, es decir, en las primeras horas de cultivo hay una baja transcripción del gen y aumenta mientras el micelio continúa creciendo.

2 INTRODUCCIÓN

Los estreptomicetos son microorganismos que han sido muy estudiados debido a su gran importancia económica ya que producen una gran cantidad de enzimas hidrolíticas y metabolitos secundarios utilizados en la industria. Los productos más conocidos son los antibióticos, sin embargo, existen otros tales como moduladores del sistema inmune o inhibidores de enzimas. A la fecha, más de 5000 antibióticos de los 9000 reportados son producidos por estreptomicetos (Demain, 2006).

Estos organismos también han jugado un importante papel en el desarrollo de la ciencia básica ya que a pesar de ser procariontes muestran muchas diferencias respecto al resto de este grupo de organismos. Entre éstas se encuentra un ciclo de vida complejo con varias etapas de diferenciación (esporas, micelio vegetativo y micelio aéreo); no son organismos unicelulares sino miceliales, su cromosoma es lineal y sus genomas son los más grandes reportados para bacterias. El organismo que se ha utilizado como modelo para este grupo bacteriano es *Streptomyces coelicolor*; actualmente se ha publicado la secuencia completa de su genoma (Bentley *et al.*, 2002).

Los estreptomicetos habitan en el suelo por lo cual los nutrientes que asimilan provienen principalmente de derivados de las plantas; por lo tanto son ricos en carbono y pobres en nitrógeno y fosfatos. Como consecuencia de esto, estos organismos presentan una gran variedad y multiplicidad de vías para catabolizar carbohidratos, así como vías regulatorias globales tales como represión catabólica por glucosa (Hodgson, 2000).

Actualmente se ha observado un gran auge en el estudio de los estreptomicetos ya que tan solo en lo que va de este año, se han publicado más de 400 artículos referentes a estos organismos (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Los antibióticos son originados a partir de compuestos específicos provenientes del metabolismo primario por lo que su sobreproducción requiere de concentraciones suficientes de estos precursores. Así, la ingeniería metabólica permite introducir cambios racionales al metabolismo central para incrementar los flujos de precursores hacia la creación de antibióticos (Borodina *et al.*, 2004).

El metabolismo es la suma de todas las transformaciones químicas que se producen en una célula u organismo y tiene lugar en una serie de reacciones catalizadas enzimáticamente que constituyen las rutas metabólicas. Se divide en anabolismo y catabolismo, siendo éste último la fase degradadora en donde moléculas nutrientes orgánicas se convierten en productos más pequeños y sencillos. Las rutas catabólicas generan energía libre, parte de la cual se conserva en la formación de ATP y transportadores electrónicos reducidos (NADH y NADPH).

En organismos aeróbicos, el catabolismo se conforma por tres rutas principales: glucólisis, ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) y cadena de transporte de electrones. El TCA es la vía metabólica más importante en la producción de energía en las bacterias aeróbicas. La malato deshidrogenasa es la última enzima de este ciclo y cataliza la interconversión entre malato y oxaloacetato utilizando NAD^+ como cofactor (Nelson y Cox, 2008).

A pesar de la gran importancia de los estreptomicetos, a la fecha se conoce muy poco sobre su metabolismo primario (Butler *et al.*, 2002), incluso tomando en cuenta la gran cantidad de publicaciones recientes sobre los estreptomicetos, el TCA ha sido muy poco estudiado en estos organismos (www.ncbi.nlm.nih.gov). Tomando en cuenta que ésta es una vía central en el metabolismo, en nuestro grupo de trabajo nos hemos interesado en estudiar la regulación y propiedades de varias enzimas de esta ruta metabólica en *Streptomyces coelicolor*. Para esto, se han elegido las enzimas isocitrato deshidrogenasa, la α -cetoglutarato deshidrogenasa y la malato deshidrogenasa debido, por un lado, a que pueden representar el flujo a través del ciclo ya que se ubican al inicio, en medio y al final del ciclo, y por otro lado, a que las tres utilizan NADH como cofactor por lo que la actividad puede ser fácilmente determinada ya que este compuesto absorbe a 340nm de longitud de onda. En este trabajo se estudiaron los perfiles de actividad específica de la enzima MDH de este microorganismo a lo largo de las diferentes etapas de cultivo en medio mínimo suplementado y en presencia de varias fuentes de carbono. Además, se analizó la transcripción, es decir la cantidad de mRNA de este gen por medio de RT-PCR semicuantitativo, a lo largo del tiempo de cultivo y en presencia de glucosa o fructosa como fuentes de carbono con el fin de comparar los perfiles de actividad con los de transcripción de este gen.

3 ANTECEDENTES

3.1 ACTINOMICETOS

Las bacterias Gram-positivas se dividen en dos grupos principales: las que poseen un bajo o un alto contenido de G+C en sus DNAs genómicos. Los grupos con bajo G+C incluyen géneros como *Bacillus*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Thermoactinomyces* y *Mycoplasma*. El grupo con alto G+C son los denominados “actinomicetos” e incluyen géneros con diversas características químicas, morfológicas y fisiológicas. Los más sencillos, como los miembros del género *Micrococcus*, *Arthrobacter* y *Corynebacterium* se reproducen por fisión binaria y se presentan en forma de cocos, bacilos cortos o bacilos irregulares. Otros organismos, tales como algunas cepas de *Mycobacterium* y *Nocardia* presentan cierto grado de crecimiento filamentoso seguido de fragmentación. En el otro extremo, se encuentran por ejemplo los *Streptomyces* spp., que presentan un crecimiento filamentoso formando una red de hifas ramificadas (micelio), donde la dispersión se realiza por medio de esporas producidas por una estructura especializada denominada micelio aéreo (Chater y Hopwood 1993; Williams *et al.*, 1984).

3.1.1 ESTREPTOMICETOS

Los estreptomicetos han sido muy estudiados por varias razones: por ser organismos aislados del suelo producen una gran cantidad de enzimas hidrolíticas tales como pectinasas, celulasas y xilanasas capaces de romper compuestos orgánicos complejos; además estos organismos tienen también una gran importancia médica, agrícola e industrial debido a la gran cantidad de metabolitos secundarios que producen tales como antibióticos, promotores de crecimiento, herbicidas, insecticidas, antihelmínticos e inmunosupresores; por la fascinante complejidad morfológica donde pueden catalogarse como multicelulares con diferentes etapas de diferenciación; y por último también son organismos numéricamente importantes ya que incluyen una gran cantidad de géneros bacterianos (Chater y Hopwood 1993; Mahr *et al.*, 2000; Williams *et al.*, 1984).

Recientes análisis *in silico* predicen aproximadamente 30 vías de biosíntesis de metabolitos secundarios en los genomas de *S. coelicolor* y *S. avermitilis* (Reuther y Wohlleben, 2007 y Hopwood, 2003).

Los estreptomicetos habitan en el suelo, donde actúan como organismos saprófitos. En este ambiente hay una gran cantidad de microbios que compiten por los nutrientes, incluyendo bacterias, hongos y protistas, es por eso que el suelo es un ambiente pobre en nutrientes u oligotrófico. Así, estas bacterias son oligótrofos facultativos, ya que son capaces de crecer tanto en un ambiente oligotrófico como en un ambiente rico en nutrientes (Hodgson, 2000). Presentan un complejo ciclo de vida incluyendo diferentes etapas de diferenciación, donde se encuentran al menos tres tipos celulares distintos (esporas, micelio vegetativo y micelio aéreo; Fig. 1). Probablemente, la señal más importante para la diferenciación es la limitación de nutrientes (van Wezel *et al.*, 2007).

A la fecha, se ha puesto mucha atención sobre las vías y regulación del metabolismo secundario así como al proceso de diferenciación en estas bacterias pero ha habido muy poco interés en el estudio de otros componentes de su metabolismo primario, a pesar de que éste proporciona los precursores para el metabolismo secundario (Butler *et al.*, 2002).

Actualmente se conoce la secuencia genómica completa de varias especies de *Streptomyces* tales como *S. coelicolor* A3(2) (Bentley *et al.*, 2000), *S. avermitilis* (Ikeda *et al.*, 2003) y *S. griseus* IFO 13350 (Onhishi *et al.*, 2008), las cuales son las más grandes reportadas para bacterias (8,667,507pb, 9,025,608pb y 8,545,929pb, respectivamente), sus cromosomas son lineales y presentan un alto contenido de G+C (mayor al 70%) y una inusual estructura bifásica, con una parte central en la que se encuentran los genes incondicionalmente esenciales y dos brazos con los genes no esenciales o condicionalmente adaptativos tales como los requeridos para la producción de metabolitos secundarios o para la degradación de quitina y celulosa (Hopwood, 2003). Ensayos de microarreglos mostraron que en condiciones de crecimiento no limitantes de *S. coelicolor* los genes codificados en los 4.9 Mb de la región central del cromosoma se expresan más que los codificados en las regiones de 2.3 Mb y 1.5 Mb de los brazos derecho e izquierdo, mientras que en fase de crecimiento estacionaria los genes expresados se distribuyen a lo largo de todo el cromosoma (Karoonthaisiri *et al.*, 2005).

S. coelicolor A3(2) es el organismo que se ha utilizado como modelo para este grupo bacteriano, esta cepa cuenta con dos plásmidos naturales; uno lineal denominado SCP1 de 365kb y uno circular llamado SCP2 de 31kb. La cepa que carece de estos plásmidos se denomina M145. Produce varios metabolitos secundarios tales como los antibióticos actinorodina y undecilprodigiosina, aunque ninguno de éstos tienen aplicación industrial. El micelio se encuentra septado, encontrándose varias copias del genoma en cada compartimento hifal aunque las esporas son unigenómicas (Bentley *et al.*, 2000).

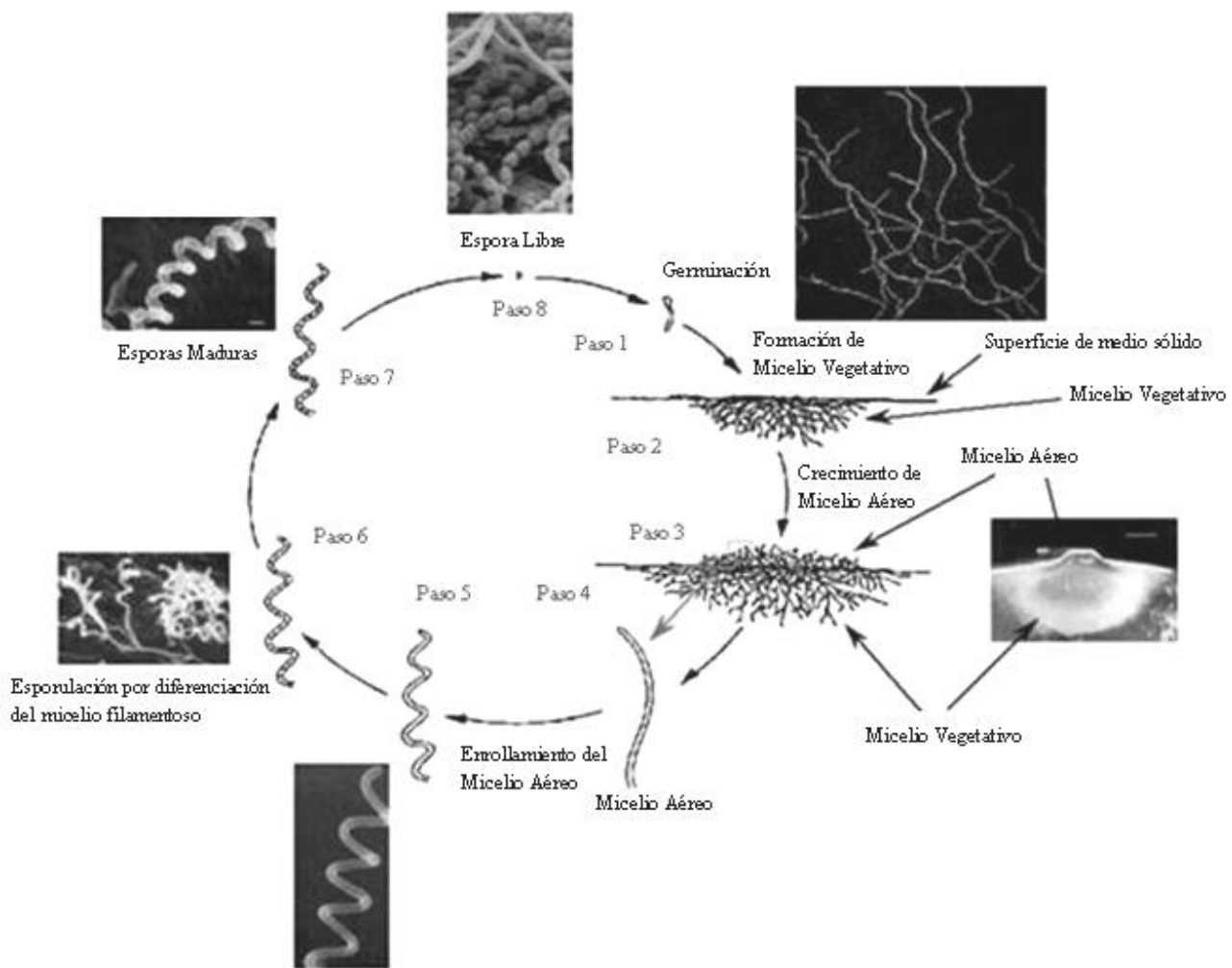


Fig. 1. Ciclo de vida de *Streptomyces coelicolor*.
[http://home.hiroshima-u.ac.jp/mbiotech/hosenkin_lab/Strepto\(Eng\).html](http://home.hiroshima-u.ac.jp/mbiotech/hosenkin_lab/Strepto(Eng).html).

3.2 METABOLISMO CELULAR

El metabolismo es la suma de todas las transformaciones químicas que se producen en una célula u organismo y tiene lugar en una serie de reacciones catalizadas enzimáticamente que constituyen las rutas metabólicas. Éste se divide en anabolismo y catabolismo siendo este último la fase degradadora en donde moléculas nutrientes orgánicas (carbohidratos, grasas y proteínas) se convierten en productos más pequeños y sencillos (ej. ácido láctico, CO_2 , NH_3). Las rutas catabólicas generan energía libre, parte de la cual se conserva en la formación de ATP y transportadores electrónicos reducidos (NADH y NADPH) (Nelson y Cox, 2000).

En el anabolismo, también llamado biosíntesis, precursores pequeños y sencillos se integran en moléculas mucho mayores y complejas, entre las que se cuentan los lípidos, polisacáridos, proteínas y ácidos nucleicos. Las reacciones anabólicas requieren aporte de energía, generalmente en forma de energía libre obtenida de la hidrólisis del ATP y el poder reductor del NADH y NADPH (Nelson y Cox, 2000).

En bacterias, las rutas metabólicas están reguladas a dos niveles. El primero es la forma de respuesta más inmediata para la regulación y es a través de la acción de enzimas alostéricas, que son capaces de cambiar la actividad catalítica en respuesta a moduladores, ya sean estimuladores o inhibidores. El segundo nivel de regulación metabólica consiste en el control de la velocidad de un paso metabólico por regulación de la concentración de su enzima en la célula. La concentración de un enzima en un momento determinado es el resultado de un equilibrio entre su velocidad de síntesis y su velocidad de degradación, estando las dos sujetas a regulación en una escala de tiempo que va de minutos a horas (Nelson y Cox, 2000).

Las vías y regulación del metabolismo secundario en actinomicetos han sido muy estudiados por su interés industrial; sin embargo, se conoce muy poco sobre su metabolismo primario a pesar de que éste proporciona los precursores para el metabolismo secundario (Hodgson, 2000).

En este sentido, Novotna y colaboradores (2003) realizaron análisis proteómicos en *Streptomyces coelicolor*, los cuales muestran que la actividad de enzimas del metabolismo central que participan en la glucólisis, el TCA, almacenamiento de nutrientes y proteólisis presentan patrones identificables de síntesis que concuerdan lógicamente con la etapa de crecimiento del

cultivo. Estos estudios también muestran una regulación interactiva entre el metabolismo y el sistema de respuesta a estrés.

Lum *et al* (2004) analizaron los niveles de transcripción de genes de *Sac. erythraea* utilizando microarreglos con las secuencias de genes de *S. coelicolor*. Éstos mostraron que los genes relacionados con el crecimiento se reprimen a las 20 horas de cultivo, justo antes de entrar a la etapa de crecimiento pre-estacionaria.

Las vías del metabolismo central se encuentran muy conservadas en todos los seres vivos, sin embargo; existe una amplia gama de variaciones en el uso relativo de estas vías y algunas no son completamente utilizadas en algunos organismos. Mediante experimentos con ^{13}C se comparó el flujo a través de las principales rutas metabólicas en siete especies de bacterias (*Agrobacterium tumefaciens*, *two pseudomonads*, *Sinorhizobium meliloti*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Zymomonas mobilis* y *Paracoccus versutus*) con el de las bacterias modelo *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis* y se concluyó que las bacterias modelo no son representativas para el metabolismo microbiano, al menos no cuantitativamente, mostrando diferencias significativas principalmente en la intensidad del flujo a través de las vías Entner-Doudoroff, de las pentosas fosfato y del TCA (Fuhrer *et al.*, 2005).

3.3 CATABOLISMO DE CARBONO

La energía utilizada por las células para realizar trabajo biológico proviene de la degradación de la glucosa y otras moléculas combustibles orgánicas, generalmente carbohidratos, los cuales son polihidroxialdehídos o polihidroxicetonas, o bien sustancias que dan lugar a estos compuestos después de su hidrólisis. Según la cantidad de unidades de polihidroxialdehídos o polihidroxicetonas contenidos en la molécula, los carbohidratos se clasifican en monosacáridos, disacáridos, oligosacáridos ó polisacáridos. La D-glucosa es el principal combustible de la mayoría de organismos y ocupa una posición central en el metabolismo (Nelson y Cox, 2000).

Los estreptomicetos habitan en el suelo, en donde los materiales derivados de las plantas son la principal fuente de nutrientes, por lo que es un medio rico en fuentes de carbono y pobre en nitrógeno y fosfatos; como consecuencia, estos organismos presentan una gran variedad de vías catabólicas degradadoras de carbohidratos. Los estreptomicetos obtienen los nutrientes simples secretando complejos enzimáticos extracelulares que rompen las paredes de las plantas.

La inducción de estos complejos enzimáticos es generalmente coordinada por inductores que no siempre tienen relación estructural con el sustrato y en algunos casos tampoco con el producto de ninguna de las enzimas que conforman el complejo; por ejemplo, el producto de la degradación de xilano induce la producción de celulasas (Hodgson, 2000).

La mayor parte de las células eucarióticas y un gran número de bacterias (incluyendo a *Streptomyces*) son aeróbicas y oxidan sus nutrientes completamente a CO_2 y H_2O . El conjunto de los procesos moleculares involucrados en el consumo de O_2 y en la producción de CO_2 por parte de las células se denomina respiración celular. Esta tiene lugar en tres fases principales (Fig. 2). La primera fase, la glucólisis, está constituida a su vez por dos etapas; en la primera ocurren una serie de reacciones por medio de las cuales cada molécula de glucosa proporciona dos moléculas de gliceraldehído-3-fosfato, utilizando dos moléculas de ATP; en la segunda etapa el gliceraldehído-3-fosfato mediante cinco reacciones forma piruvato y se producen cuatro moléculas de ATP y dos de NADH (Nelson y Cox, 2000).

Hay varias vías que pueden proporcionar gliceraldehído-3-fosfato para la segunda etapa de la glucólisis. Hay evidencia de que tanto la glucólisis, como la vía de las pentosas fosfato se encuentran presentes en *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces griseus*, *Streptomyces reticuli* y *Streptomyces scabies* (Cochrane, 1961). Dekleva y Strohl (1988) extendieron estas observaciones a *Streptomyces C5*, *Streptomyces lividans* y *Streptomyces aureofaciens*. Estos autores reportaron la ausencia de dos enzimas claves para la vía de Entner-Doudoroff (Fig. 3) en estos estreptomicetos, sin embargo, en una especie del género *Nonomuraea* se reportó que la glucosa se metaboliza principalmente por la vía de Entner-Doudoroff; este es el primer reporte de que esta vía

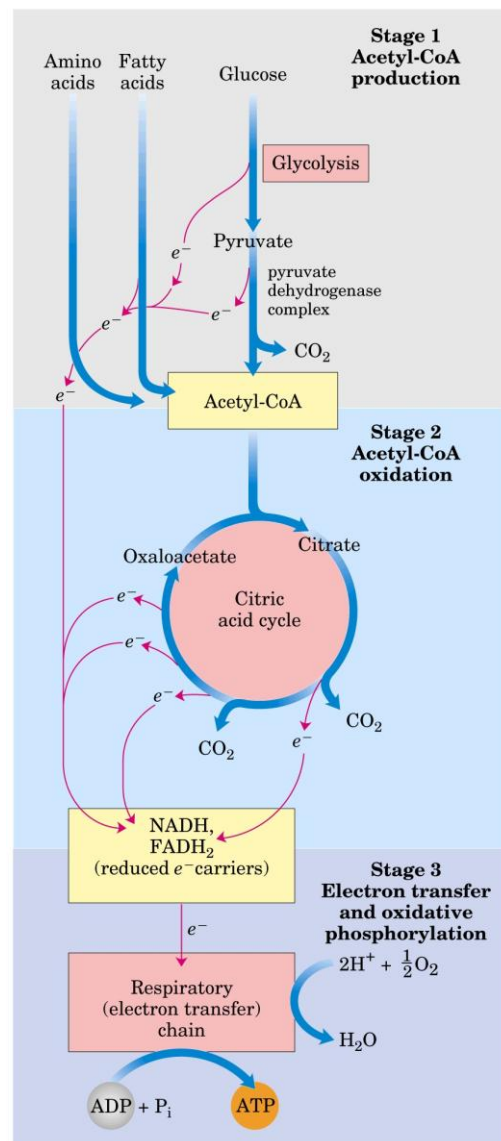


Fig. 2. Fases de la respiración celular (Nelson y Cox, 2000).

es reconocida como la vía catabólica principal para obtener gliceraldehído-3-fosfato en actinomicetos (Gunnarsson *et al.*, 2004). Con estos antecedentes se había considerado que los *Streptomyces* carecen de esta ruta metabólica, sin embargo, Borodina y colaboradores (2005) encontraron que esta vía es activa en *S. tenebrarius* y que la velocidad de su flujo es casi igual al observado para la glucólisis, mientras que el flujo a través de la vía de las pentosas está entre el 10 y el 20% del observada para la glucólisis.

La primera reacción de la segunda etapa de la glucólisis es la producción de 1,3-bifosfoglicerato y NADH a partir de gliceraldehído-3-fosfato y NAD^+ , es catalizada por la

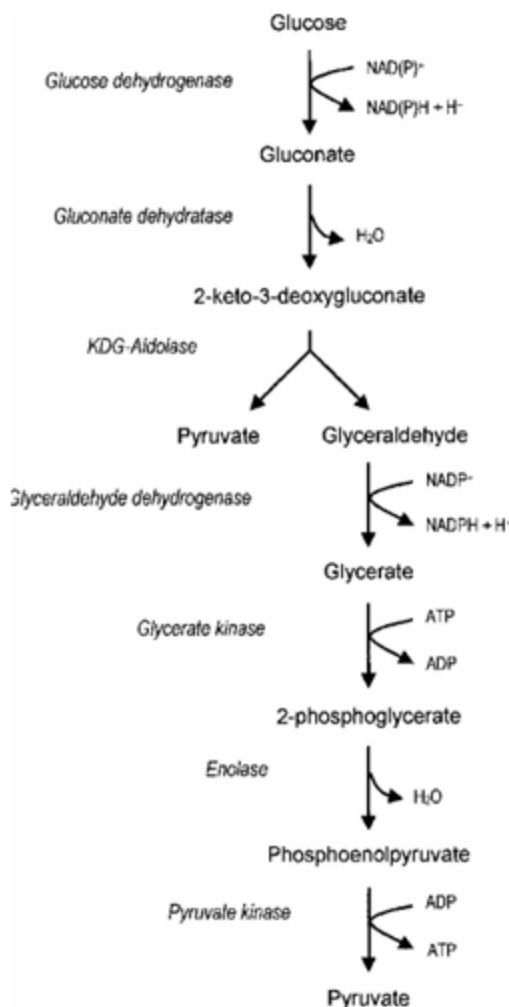


Fig. 3. Vía de Entner-Doudoroff (www.biochemj.org/bj).

gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GADPH), la regulación transcripcional del gen que codifica para esta enzima (*gap*) ha sido estudiada en *S. aureofaciens*, mostrando que en ausencia de glucosa la transcripción del gen se induce al inicio de la formación de micelio aéreo y en presencia de glucosa ocurre durante la formación de micelio aéreo (Kormanec *et al.*, 1997). Posteriormente se demostró que la expresión del gen *gap* se regula por el producto del gen *gapR* que se encuentra río arriba del gen *gap* (Sprounský *et al.*, 2001).

En *S. lividans* la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, primera enzima de la vía de las pentosas, es codificada por dos genes (*zwf1* y *zwf2*) y al transformar cepas mutantes deletadas en cualquiera de estos genes con un plásmido con los genes para los activadores transcripcionales de los genes de actinorodina y undecilprodigiosina se observó un incremento de cerca de 4 veces en la producción de antibióticos comparado con la cepa silvestre, sin afectar el crecimiento (Butler *et al.*, 2002).

La segunda fase, el TCA, sólo ocurre en la respiración aerobia. En ésta, los grupos acetilo se incorporan al ciclo donde son oxidados hasta CO_2 . La energía liberada en esta oxidación se conserva en los portadores de electrones reducidos NADH, NADPH y FADH_2 (Nelson y Cox, 2000).

En la tercera fase de la respiración, la cadena de transporte de electrones y la fosforilación oxidativa, estos cofactores reducidos son a su vez oxidados, liberando protones y electrones. A continuación se produce una transferencia de electrones a lo largo de una cadena de moléculas transportadoras, conocida como cadena respiratoria, hacia el O_2 , que, al reducirse, da lugar a H_2O . Durante este proceso de transferencia electrónica se libera una gran cantidad de energía que se conserva en forma de ATP gracias al proceso denominado fosforilación oxidativa (Nelson y Cox, 2000).

En *Streptomyces coelicolor* se realizaron estudios proteómicos y metabolómicos en crecimiento diáuxico en MM con maltosa y glutamato. El perfil de crecimiento muestra una primera fase (RG1) en la que el organismo usa glutamato como fuente de carbono y nitrógeno, luego se observa una fase de transición (T) en la que el organismo se encuentra en estrés nutrimental debido a que se termina el glutamato; después hay una segunda fase de crecimiento en la cual se utiliza maltosa como fuente de carbono y amonio (producido por la degradación de glutamato) como fuente de nitrógeno (RG2) y por último se presenta la fase estacionaria (S). Los genes que codifican para las enzimas del TCA citrato sintasa, isocitrato deshidrogenasa, malato deshidrogenasa y succinil-CoA sintasa mostraron una alta expresión durante las dos fases de crecimiento (RG1 y RG2) y una marcada disminución en la expresión en las fases T y S. Las enzimas glicolíticas se expresaron principalmente durante RG2. Las enzimas asociadas con el almacenamiento de energía se indujeron en la fase T. Los genes involucrados en el procesamiento de proteínas se expresaron en las fases T y S. En la fase S se observó lisis celular, mayor expresión de proteasas y disminución en la expresión de enzimas del TCA y de la glucólisis. Así, en las fases en las que se detuvo el crecimiento, se reprimió la síntesis de proteínas involucradas en el anabolismo y se activaron los sistemas de reciclamiento de nutrientes (Novotna *et al.*, 2003).

Al analizar la frecuencia de codones de los genes codificados en los genomas de *S. coelicolor* y *S. avermitilis* se predijeron varios genes altamente expresados en estos organismos; dentro de éstos se encontraron la mayoría de los genes involucrados en la glucólisis, en el metabolismo de piruvato y en el TCA, pero sólo se identificaron dos genes (codifican para la transcetolasa y la transaldolasa) de la vía de las pentosas fosfato (Wu *et al.*, 2005).

La mayoría de los organismos se alimentan de varias fuentes de carbono y no sólo de glucosa. Estos nutrientes son degradados a moléculas que se pueden incorporar en ciertos intermediarios del TCA o de la vía glucolítica. Por ejemplo, los polisacáridos como el almidón son degradados en sus monosacáridos constituyentes y fosforilados a glucosa 6-fosfato; de esta manera penetran en la vía glucolítica. Las grasas primero se escinden en sus componentes glicerol y ácido graso. Luego, los ácidos grasos son degradados en fragmentos de dos carbonos y entran en el TCA como acetil-CoA. Las proteínas son degradadas en sus aminoácidos constituyentes. Los aminoácidos son desaminados y el esqueleto de carbono residual se convierte en un grupo acetilo o bien en uno de los compuestos de carbono de la vía glucolítica o del TCA, de manera que puede ser procesado en esta etapa de la vía central (Curtis y Barnes, 1993).

En el 2006, Ruy y colaboradores realizaron modificaciones en puntos clave del metabolismo primario de *S. coelicolor* buscando obtener una sobrepoducción de los antibióticos actinorodina y undecilprodigiosina y observaron que al deletar los genes *zwf1*, *zwf2* y *pgm* que codifican para dos isoformas de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (paso en el que se desvía a la glucosa-6P hacia la vía de las pentosas) y la fosfoglucomutasa (desvía a la glucosa-6P hacia la síntesis de glucógeno), respectivamente, no causaron un aumento en la producción de actinorodina. Sin embargo, la sobreexpresión del gen que codifica para la acetil-CoA carboxilasa (enzima que dirige el acetil-CoA proveniente de la glucólisis hacia la síntesis de antibióticos) sí causó un aumento en la producción de actinorodina.

3.3.1 VÍAS ANAERÓBICAS

La fermentación es un término general que indica degradación anaeróbica de la glucosa u otros nutrientes orgánicos a diversos productos para obtener energía en forma de ATP. En estos procesos anaeróbicos se da lugar a la glucólisis produciendo ácido pirúvico, pero éste no forma acetil-CoA para entrar a TCA sino se reduce para producir ácido láctico o etanol (Nelson y Cox, 2000).

La mayoría de las bacterias que realizan la glucólisis y la vía de las pentosas fosfato pueden crecer anaeróbicamente en glucosa y azúcares relacionados. Sin embargo, los estreptomicetos usualmente se clasifican como aeróbicos obligados (Hodgson, 2000). Se ha demostrado que *S. griseus* produce bajos niveles de lactato al crecer en glucosa en condiciones de poca aeración, lo

que implica la presencia de lactato deshidrogenasa (Hockenhull *et al.*, 1954). Para explicar la causa por la cual los estreptomicetos no pueden crecer anaeróbicamente en glucosa, se ha sugerido que probablemente son sensibles a los desechos producidos por la fermentación. También es probable que se requiera oxígeno para otros procesos celulares esenciales (Hodgson, 2000).

3.4 CICLO DE LOS ÁCIDOS TRICARBOXÍLICOS (TCA)

El TCA, también llamado ciclo de Krebs o ciclo del ácido cítrico es la vía metabólica más importante para la generación de ATP en las bacterias aerobias (Fig. 4); además provee importantes precursores biosintéticos como succinil-CoA y juega un papel clave en la producción de energía cuando la glucólisis es incapaz de satisfacer las necesidades de la célula (Nelson y Cox, 2000).

En el inicio de una vuelta del TCA, también llamado ciclo de los ácidos tricarbóxicos o ciclo del ácido cítrico, el acetil-CoA dona su grupo acetilo al compuesto de cuatro átomos de carbono oxaloacetato, formando una molécula de citrato de 6 carbonos. A continuación el citrato es transformado en isocitrato, otra molécula de seis carbonos, que, al deshidrogenarse con pérdida de CO₂, genera el compuesto de cinco átomos de carbono α-cetoglutarato. Este último compuesto sufre también una pérdida de CO₂ dando lugar finalmente al producto de cuatro carbonos succinato. A continuación el succinato es convertido, mediante una secuencia de tres reacciones enzimáticas, en el compuesto de cuatro carbonos oxaloacetato con el que se inició el ciclo; en este punto el oxaloacetato está listo para reaccionar con otra molécula de acetil-CoA y dar comienzo a una segunda vuelta. En cada vuelta del ciclo se produce la entrada de un grupo acetilo (dos carbonos) en forma de acetil-CoA y la salida de dos moléculas de CO₂ (Fig. 3). Cuatro de los pasos de este proceso son oxidaciones en las que la energía se conserva, con gran eficacia, mediante la formación de cofactores reducidos (NADH y FADH₂) (Nelson y Cox, 2000).

En *Escherichia coli* existe un grupo de genes en el minuto 17 del cromosoma en el que se encuentran nueve genes que codifican enzimas del TCA. Estos genes, *gltA-sdhCDAB-sucABCD*, codifican cuatro enzimas o complejos enzimáticos del TCA (citrato sintasa, succinato deshidrogenasa, α-cetoglutarato deshidrogenasa y succinil-CoA sintetasa) en tres diferentes unidades transcripcionales. Los genes correspondientes a las otras enzimas del TCA, tales como

isocitrato deshidrogenasa, fumarasa y malato deshidrogenasa, se encuentran muy alejados tanto entre ellos como del grupo de nueve genes (Nimmo, 1987).

En algunos microorganismos como *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) se han encontrado variaciones en el TCA. La secuencia genómica de esta bacteria predice la existencia del ciclo completo, sin embargo; recientemente se reportó la ausencia de actividad de α -cetoglutarato deshidrogenasa (KDH) en lisados de Mtb. También se demostró que el gen Rv1248c (que por secuencia se había identificado como componente putativo E1 de KDH) codifica para una α -cetoglutarato descarboxilasa cuyo producto de reacción es semialdehído succínico; se detectó también la actividad de una enzima que deshidrogena a este producto originando succinato obteniendo así una vía alterna para producir succinato a partir de α -cetoglutarato en esta bacteria (Tian *et al.*, 2005).

Wu y colaboradores en el 2005 mediante análisis computacionales de las secuencias genómicas de *S. coelicolor* y *S. avermitilis*, calcularon el índice de adaptación de codones, el cual es un estimador numérico de los niveles de expresión génica y de esta forma predijeron genes altamente expresados (PHX) en estos organismos. Todos los genes del TCA fueron PHX en ambas bacterias. Esto fue distinto a lo reportado para otros organismos como *B. subtilis*, *Hemophilus influenzae* y *Synechocystis* en los que ningún gen de este ciclo es PHX, en *E. coli* sólo los genes que codifican para las enzimas del ciclo que están antes de la succinil-CoA sintetasa fueron PHX. Una posible explicación para esta diferencia entre *Streptomyces* y otras bacterias es que los miembros de este género dependen del TCA no sólo para la producción de ATP sino también como una fuente principal de precursores para el metabolismo primario y el secundario.

En la mayoría de los microorganismos, la regulación del TCA es ejercida a nivel de la actividad de algunos pasos del ciclo. El flujo de átomos de carbono de piruvato en y a través del ciclo del ácido cítrico está bajo una estricta regulación en dos niveles: la conversión de piruvato en acetil-CoA (piruvato deshidrogenasa) y la entrada de acetil-CoA en el ciclo (citrato sintetasa), aunque éste también es regulado a nivel de la isocitrato deshidrogenasa y de la α -cetoglutarato deshidrogenasa (Nelson y Cox, 2000). En *E. coli* se ha observado que la citrato sintasa controla la velocidad del flujo a través del ciclo ya que su actividad se regula por varios compuestos como ATP, acetil-CoA, NADH y α -cetoglutarato; por otro lado, no hay evidencia confiable de que la isocitrato deshidrogenasa tenga un papel importante en el control del ciclo excepto al crecer en acetato o fuentes de carbono equivalentes (Nimmo, 1987). En *C. glutamicum* se ha reportado

regulación post-transcripcional del complejo α -cetoglutarato deshidrogenasa que involucra una serina/treonina cinasa G, cuyo blanco es la región amino terminal de la proteína Odhl, que cuando no se encuentra fosforilada inhibe al complejo α -cetoglutarato deshidrogenasa. Proteínas con secuencias homólogas a la región amino terminal de Odhl se encuentran en varios actinomicetos entre los que se incluye *S. coelicolor* (Bott, 2007).

Tres factores gobiernan la velocidad del flujo a través del ciclo: la disponibilidad de sustrato, la inhibición por productos que se acumulan y la inhibición por retroalimentación alostérica de enzimas iniciales por intermediarios en el ciclo (Nelson y Cox, 2000).

Por mucho tiempo se había dado por hecho que las enzimas del TCA presentan un patrón de expresión constitutivo, sin embargo, en varios microorganismos como *E. coli*, se ha observado que su expresión no es ni constitutiva ni coordinada. En general, estas enzimas se reprimen total o parcialmente en condiciones anaeróbicas. Esta represión es particularmente fuerte para la α -cetoglutarato deshidrogenasa. En este microorganismo también se ha observado que varios genes que codifican para enzimas del TCA están sujetos a represión catabólica por glucosa, tal es el caso de la citrato sintasa, la succinato deshidrogenasa y la α -cetoglutarato deshidrogenasa (Nimmo, 1987).

La actividad específica de la isocitrato deshidrogenasa de *Sac. erythraea*, organismo actinomiceto, mostró un perfil asociado a crecimiento y regulado por la fuente de carbono presentando una mayor actividad al crecer en glucosa o fructosa que la observada en sacarosa, galactosa, lactosa o almidón, la menor actividad se detectó al crecer en presencia de piruvato. Estas diferencias no se debieron a los cambios en la velocidad de crecimiento (Bermúdez *et al.*, 1998; Alvarado y Flores, 2003).

En organismos aeróbicos, el TCA es una vía anfibólica, es decir, que no sólo funciona en el catabolismo oxidativo de carbohidratos, ácidos grasos y aminoácidos, sino que también genera precursores de muchas vías biosintéticas. Ciertos intermediarios del TCA, pueden salir del ciclo y actuar como precursores de aminoácidos, nucleótidos, porfirinas, grupos hemo, ácidos grasos, esteroides y glucosa. El oxaloacetato participa en varias reacciones anabólicas dando lugar a precursores de aminoácidos (aspartato, asparagina, serina, cisteína, fenilalanina, tirosina y triptófano), nucleótidos (pirimidinas) y glucosa. El α -cetoglutarato también participa en la

formación de aminoácidos (glutamato, arginina, prolina y glutamina) y nucleótidos (purinas). El citrato participa en la formación de ácidos grasos y esteroides (Nelson y Cox, 2000).

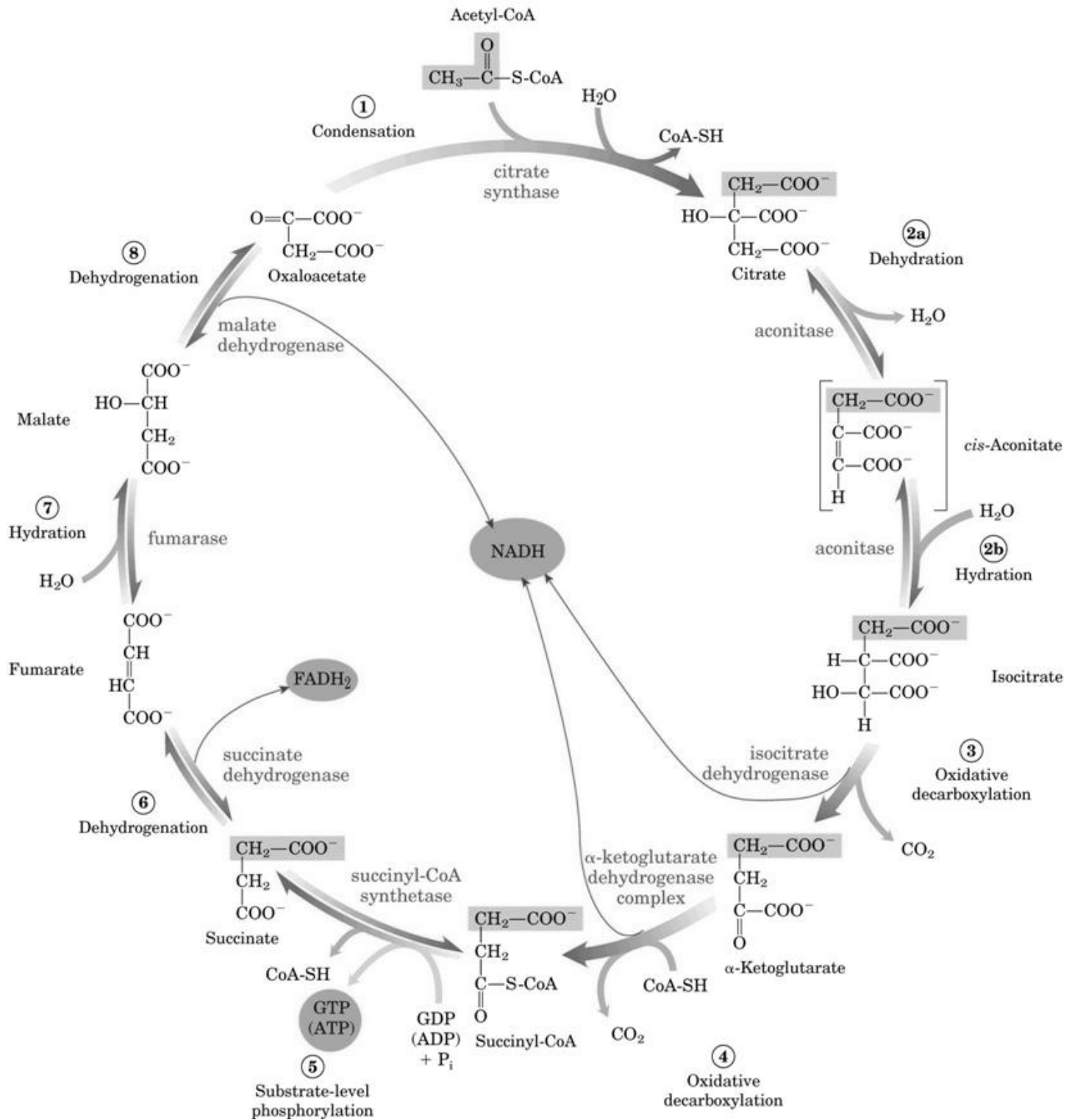


Fig. 4. Reacciones del TCA. Los átomos de carbono sombreados son los que proceden del acetil-CoA (Nelson y Cox, 2000).

Las enzimas del TCA han sido estudiadas en varios estreptomicetos mostrando evidencias de que este ciclo es completo y activo en estos organismos (Cochrane, 1961; Dekleva y Strohl, 1988; Hostalek *et al.*, 1969).

En *S. coelicolor*, una cepa mutante en el gen *citA* que codifica para la citrato sintasa, primera enzima del TCA, mostró acidificación del medio y deficiencias en la diferenciación morfológica y en la biosíntesis de antibióticos. Estas deficiencias en el desarrollo de la cepa mutante se debieron en parte a la acidificación del medio, ya que esta cepa fue capaz de producir micelio aéreo y pigmentos cuando se agregó amortiguador al medio para mantener un pH neutro (Viollier *et al.*, 2001a). Resultados similares se observaron al eliminar el gen *acoA* que codifica para la enzima aconitasa, esto muestra que el TCA está fuertemente relacionado con la diferenciación y la producción de antibióticos en este organismo (Viollier *et al.*, 2001b).

En *E. coli* se ha reportado que al crecer en condiciones aeróbicas en presencia de glucosa como fuente de carbono el flujo a través del TCA es muy bajo y secreta acetato al medio como producto de la degradación de glucosa por la glucólisis, el acetato es posteriormente utilizado cuando la glucosa comienza a escasear activando el flujo del TCA. Por medio de análisis de microarreglos se identificó que la expresión de varios genes (*sdhCDAB*, *sucB*, *sucC*, *acnB*, *fumC* y *mdh*) que codifican para las enzimas del TCA succinato deshidrogenasa, α -cetoglutarato deshidrogenasa, succinil-CoA sintetasa, aconitasa, fumarasa y malato deshidrogenasa respectivamente están corregulados negativamente con la producción de acetato (Veit *et al.*, 2007). Resultados similares fueron reportados para la actinobacteria *C. glutamicum*, que al crecer en acetato el flujo a través de la citrato sintasa fue cuatro veces mayor al observado en glucosa. Los niveles de mRNA de los genes *gltA*, *acn*, *sdhCAB* y *fum* (que codifican para las enzimas citrato sintasa, aconitasa, succinato deshidrogenasa y fumarasa, respectivamente) fueron de entre 1.9 y 3.7 veces mayor al crecer acetato que en glucosa (Bott, 2007). En el caso de *S. alboniger* se observó acidificación del medio al crecer en presencia de glucosa debido a que se secreta piruvato por un desbalance entre la glicólisis y el TCA (Redshaw *et al.*, 1976).

Cuando algún intermediario del TCA lo abandona para actuar como precursor biosintético, se produce un descenso en la velocidad del flujo a través del ciclo. Por medio de reacciones anapleróticas, es posible reponer los intermediarios perdidos del ciclo del ácido cítrico (Nelson y Cox, 2000). En bacterias, el oxaloacetato es restituido principalmente gracias a la PEP carboxilasa que cataliza la reacción de fosfoenolpiruvato (PEP) a oxaloacetato. El malato es resustituido por acción de la enzima málica que cataliza la interconversión entre piruvato y malato (Nelson y Cox, 2000).

En varios estreptomicetos como *S. aureofaciens*, *Streptomyces C5*, *S. coelicolor* y *S. lividans* se ha comprobado que la PEP carboxilasa es la enzima involucrada en la formación anaplerótica de oxaloacetato. Además, en *S. aureofaciens* se ha reportado la presencia de la enzima málica, la cual es responsable de restituir el malato al ciclo mediante la interconversión entre piruvato y malato. En *Streptomyces murayamaensis* y *Streptomyces verticillatus* se reportó la presencia de la fosfato dicinasa, que es responsable de la interconversión entre piruvato y PEP (Hodgson, 2000).

El ciclo del glioxalato, una vía anaplerótica, es una modificación del TCA en donde la degradación de isocitrato no se produce a través de la reacción de la isocitrato deshidrogenasa, sino mediante una desviación catalizada por la isocitrato liasa que da lugar a la formación de succinato y glioxalato. A continuación, el glioxalato se condensa con el acetil-CoA para dar lugar a malato en una reacción catalizada por la malato sintasa. Después ocurren la serie de reacciones del TCA que llevan de malato hasta isocitrato y se reinicia el ciclo, el cual es una vía anabólica que permite la conversión de acetato en oxaloacetato como fuente de fosfoenolpiruvato para la síntesis de carbohidratos (Nelson y Cox, 2000).

En *S. aureofaciens*, *S. lividans*, *S. coelicolor*, *S. arena*, *S. clavuligerus* y *S. collinus* se ha demostrado la presencia de malato sintasa al crecer en compuestos C2, aunque en ninguno de estos casos se encontró actividad de isocitrato liasa, es por eso que se ha sugerido la existencia de una ruta alternativa a la vía del glioxalato en estreptomicetos (Hodgson, 2000). Aunque en varios estreptomicetos se han identificado los genes involucrados en esta vía, a la fecha no se ha logrado demostrar su importancia en la asimilación de acetato (Akopiants *et al.*, 2006). En el genoma de *S. coelicolor* los genes que aparentemente codifican para estas dos enzimas se encuentran juntos y en la misma dirección (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

3.5 MALATO DESHIDROGENASA (MDH)

Esta enzima (L-malato-NAD oxidoreductasa, EC 1.1.1.37) cataliza la interconversión entre malato y oxaloacetato, utilizando NAD(P)^+ como cofactor y es la última enzima del TCA (Fig. 5).

El equilibrio de esta reacción se encuentra muy desplazado hacia la síntesis de malato en condiciones termodinámicas estándar. Sin embargo, en la célula intacta, el oxaloacetato está siendo continuamente retirado por la reacción altamente exergónica de la citrato sintasa; como consecuencia de ello, la concentración intracelular de oxaloacetato se mantiene en niveles muy bajos ($< 10^{-6}\text{M}$), lo que impulsa el equilibrio de la reacción de la malato deshidrogenasa hacia la formación de oxaloacetato (Nelson y Cox, 2000).

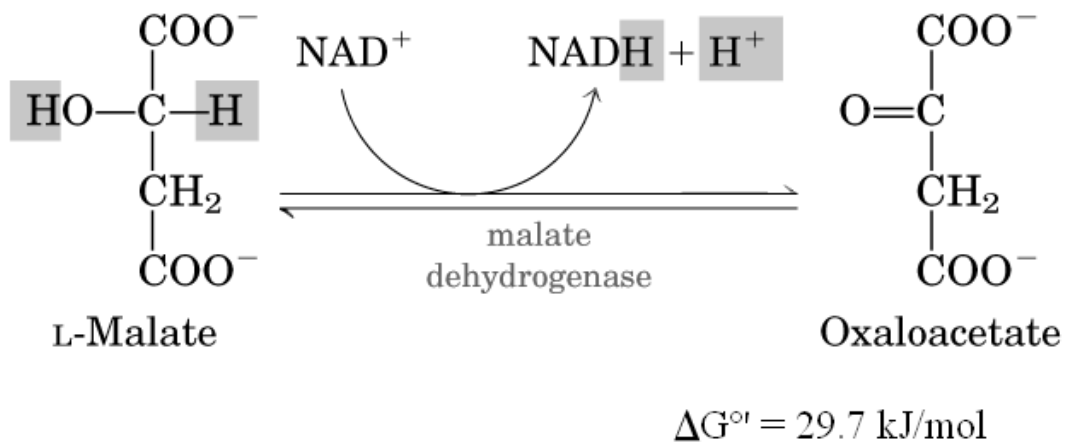


Fig. 5. Reacción catalizada por la malato deshidrogenasa (Nelson y Cox, 2000).

En algunos organismos como *Pseudomonas fluorescens* y *P. putida* se ha observado que la participación de la malato deshidrogenasa para el flujo del TCA es muy baja y en su lugar el malato es convertido en piruvato por medio de la enzima málica y éste es a su vez convertido en oxaloacetato mediante la piruvato carboxilasa (Fuhrer *et al.*, 2005).

3.5.1 MALATO: QUINONA OXIDOREDUCTASA

En bacterias Gram-positivas y Gram-negativas tales como *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Mycobacterium*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *E. coli* y *Corynebacterium glutamicum*, se ha detectado otra enzima que cataliza la interconversión entre malato y oxaloacetato denominada malato:quinona oxidoreductasa (EC 1.1.99.16) (MQO), pero a diferencia de la MDH que se encuentra en citoplasma, esta enzima se asocia a la membrana celular y no usa NAD^+ como aceptor de electrones, sino que éstos son donados a quinonas u otros aceptores artificiales en condiciones *in vitro*. En algunos organismos como *Mycobacterium smegmatis* y *Pseudomonas ovalis* no se encontró MDH dependiente de NAD^+ . La actividad de MQO usualmente requiere cofactores adicionales como FAD^+ , quinonas, lípidos o detergentes (Molenaar *et al.*, 1998). La ΔG° para la oxidación de malato por la MDH es de +28.6 kJ/mol, mientras que la ΔG° de la reacción catalizada por la MQO es de -55 o -18.9 kJ/mol dependiendo si el aceptor es ubiquinona o menaquinona respectivamente; esto sugiere que cuando ambas enzimas están presentes al mismo tiempo, catalizan la reacción en direcciones opuestas (Molenaar *et al.*, 2000).

En *Corynebacterium glutamicum*, las actividades de MQO, MDH y succinato deshidrogenasa (SDH) se regulan coordinadamente en respuesta a la fuente de carbono, mostrando una menor actividad al crecer en glucosa que en sustratos como lactosa, piruvato o acetato en los que se requiere una mayor actividad del TCA para el crecimiento. MQO es la enzima principal para la catálisis de la oxidación de malato a oxaloacetato (Molenaar *et al.*, 2000).

En *E. coli* la expresión del gen de *mgo* también se regula por la fuente de carbono, mostrando una menor expresión al crecer en glucosa como fuente de carbono, que en manitol, glicerol, lactato, succinato, malato, acetato y la mayor expresión se observa al crecer en piruvato. La expresión de esta enzima parece estar bajo represión catabólica al igual que los genes *mdh* y *sdh* (succinato deshidrogenasa). La actividad de esta enzima fue muy alta durante la fase de crecimiento exponencial y disminuye dramáticamente al entrar en fase estacionaria. Tanto MDH como MQO están presentes al mismo tiempo en esta bacteria; sin embargo, no se ha encontrado un papel significativo de MQO en la oxidación de malato aunque en mutantes con delección en el gen de *mdh*, la MQO sustituye parcialmente sus funciones (Rest van der *et al.*, 2000).

3.5.2 ISOFORMAS DE MALATO DESHIDROGENASA

Se han identificado muchas isoformas de MDH, las cuales difieren en su localización subcelular y en su especificidad por el cofactor (NAD^+ o NADP^+); el significado fisiológico de las diferentes isoformas de esta enzima es que participan en diferentes vías metabólicas. En eucariontes, las diferencias en función corresponden a diferencias en la localización subcelular (Gietl, 1992 y Mikulášová *et al.*, 1998). En células eucarióticas se encuentran al menos dos isoformas de MDH; una mitocondrial y una citosólica. Los tejidos vegetales contienen múltiples isoformas de esta enzima, encontrándose en microcuerpos tales como glioxisomas y peroxisomas, en mitocondrias, en cloroplastos y en el citosol (Gietl, 1992). En *Saccharomyces cerevisiae* hay 3 isoformas de esta enzima: la MDH1 se encuentra en la mitocondria y es la que participa en el TCA. La interrupción en este gen causa incapacidad de crecer en acetato como fuente de carbono, siendo este un fenotipo compartido con otras levaduras mutadas en genes que codifican para otras enzimas de este ciclo; la MDH2 participa en la gluconeogénesis, es una enzima citosólica y también es requerida para crecer en acetato como fuente de carbono al igual que otras enzimas gluconeogénicas como la PEPcarboxinasa; la MDH3 se encuentra en el peroxisoma y participa en el ciclo del glioxalato (Gibson y McAlister-Henn, 2003). En *Methanobacterium thermoautotrophicum* se encuentran dos malato deshidrogenasas; una es específica para NAD^+ y cataliza la deshidrogenación de malato aproximadamente a un tercio de la velocidad a la que cataliza la reducción de oxaloacetato; la otra puede utilizar igualmente NAD^+ y NADP^+ como coenzimas y cataliza esencialmente solo la reducción de oxaloacetato (Thompson *et al.*, 1998). En la mayoría de las malato deshidrogenasas eucarióticas y bacterianas, la eficiencia con NADP(H) no excede del 1.5% de la eficiencia con NAD(H) (Benveniste y Munkres, 1970), excepto la MDH de cloroplastos de plantas que es específica para NADPH (Issakidis *et al.*, 1992), la MDH de *Methanothermus fervidus* (Honka *et al.*, 1990) y una MDH de *Methanobacterium thermoautotrophicum* (Thompson *et al.*, 1998).

3.5.3 PESO MOLECULAR Y SUBUNIDADES

Las MDHs son enzimas homomultiméricas con subunidades de peso molecular de 30 a 40 kDa (Tabla 1). Estas enzimas son casi siempre homodímeros u homotetrámeros (Sundaram *et al.*, 1980; Bonneté *et al.*, 1993; Maloney *et al.*, 2004) aunque se ha reportado un solo caso de MDH homooctamérica en la diatomea *Nitzschia alba* (Yueh *et al.*, 1989) y una tetramérica con dos subunidades diferentes (α y β) en *Neurospora crassa* (Munkres, 1970). Las MDHs se dividen en dos grupos filogenéticos, en el primero se encuentran las MDHs homodiméricas, mientras en el segundo se encuentran las MDHs más cercanamente emparentadas a las lactato deshidrogenasas (LDH) por lo cual son homotetraméricas (Madern, 2002) aunque se ha reportado un solo caso en *Archaeoglobus fulgidus* de una enzima homodimérica perteneciente a este grupo (Irimia *et al.*, 2004).

Tabla 1. PM de la MDH reportado para diferentes organismos.

Microorganismo:	PM de las subunidades (kDa)	PM total (kDa)	Fuente:
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	34	66.5	Labrou y Clonis 1997
<i>Escherichia coli</i>	30	60	www.ncbi.nlm.nih.gov
<i>Streptomyces aureofaciens</i>	38	70	Mikulášová <i>et al.</i> , 1998
<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	35	70	Langelandsvik <i>et al.</i> , 1997
<i>Talaromyces emersonii</i>	35	70	Maloney <i>et al.</i> , 2004
<i>Bacillus termofílico</i>	35	140	Wynne <i>et al.</i> , 1996

Cada subunidad de MDH contiene dos dominios estructural y funcionalmente diferentes; el sitio de unión al dinucleótido y el sitio activo. El primer dominio, es similar en estructura y función a otras enzimas dependientes de nicotinamida dinucleótido (Langelandsvik *et al.*, 1997).

3.5.4 ESTRUCTURA PRIMARIA, SECUNDARIA Y TERCIARIA

Se han reportado una gran cantidad de secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de MDHs de eucariontes, arqueobacterias y eubacterias (Madern, 2002) y se ha observado que la

estructura secundaria se encuentra relativamente conservada entre especies y consta de aproximadamente 40% α -hélice, 20% hojas- β y 40% asas (Maloney *et al.*, 2004).

Las secuencias de aminoácidos de las MDHs mitocondriales de mamíferos, levaduras y de *E. coli* muestran un porcentaje de identidad entre 55 y 60%. Sin embargo, las secuencias de aminoácidos de las MDHs mitocondrial y citosólica de ratón presentan tan solo un 23% de identidad lo que concuerda con la teoría endosimbiótica del origen de las mitocondrias. Por otro lado, la MDH de *Thermus flavus* tiene una mayor identidad con la MDH citosólica eucarionte (55%) que con la enzima mitocondrial (20%) (Musrati *et al.*, 1998).

Se ha identificado una secuencia consenso amino-terminal para MDHs de seis cepas de actinomicetos (*Streptosporangium roseum*, *Planomonospora venezuelensis*, *Microtetraspora glauca*, *Actinoplanes missouriensis*, *Streptomyces atratus* y *Kibdelosporangium aridum*). Al comparar estas secuencias con las de otros organismos, se observó que es muy similar a la reportada para *Thermus flavus* y a la citoplásmica de mamíferos (Rommel *et al.*, 1989). Así, la secuencia de aminoácidos del extremo amino-terminal reportada para *S. aureofaciens* (TRTPVNVTVTGAAGQIGYAL) presenta un 100% de identidad con las de *S. coelicolor*, *S. atratus*, *S. avermitilis*, *Kibdelosporangium aridum* y *Thermobifida fusca* (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Las MDHs de muchos organismos se han cristalizado, tales como las de *Thermus flavus* (Kelly *et al.*, 1993), *Aquaspirillum arcticum* (Kim *et al.*, 1999), *Haloaracula marismortui* (Richard *et al.*, 2000), *Archaeoglobus fulgidus* (Irimia *et al.*, 2004) y *E. coli* (Hall *et al.*, 1992) (Fig. 6). Entre MDHs lejanamente relacionadas, hay generalmente una baja identidad, en ocasiones menor al 20%; a pesar de esto, la estructura tridimensional es esencialmente idéntica entre las diferentes MDHs y LDHs (Goward y Nicholls, 1994).

3.5.5 CATÁLISIS

El sitio activo de MDH consiste en una “burbuja hidrofóbica”, que contiene sitios de unión a sustrato y al anillo nicotinamida de la coenzima. El asa se encuentra muy conservada entre las diferentes MDHs (residuos 98-110) lo que refleja su crucial papel en la catálisis (Musrati *et al.*, 1998). El dominio catalítico contiene seis aminoácidos involucrados en la catálisis. Éstos están muy conservados entre especies encontrándose también en las LDHs aunque los aminoácidos

involucrados en la especificidad a sustrato son diferentes (Langelandsvik *et al.*, 1997). El residuo 53 es importante para la unión a la coenzima; en las MDHs dependientes de NAD^+ , este sitio corresponde a aspartato pero en las MDHs de cloroplastos de plantas, específicos de NADP^+ , este sitio corresponde a glicina. Hay 3 residuos de arginina (R102, R109 y R171) que se encuentran conservados en todas las MDHs y son importantes para la unión a sustrato y la catálisis. Los residuos H195 y la D168 se encuentran muy conservados en todas las MDHs y LDHs secuenciadas lo que sugiere que ambas enzimas operan mediante un mecanismo similar (Goward y Nicholls, 1994). Estos dos residuos interactúan mediante puentes de hidrógeno y pueden funcionar como un sistema de intercambio de protones durante la catálisis lo que permite al anillo imidazol de la histidina actuar como ácido y como base. Esto puede explicar la mayor fuerza de unión de la MDH citoplásmica al NADH que al NAD^+ (Musrati *et al.*, 1998).

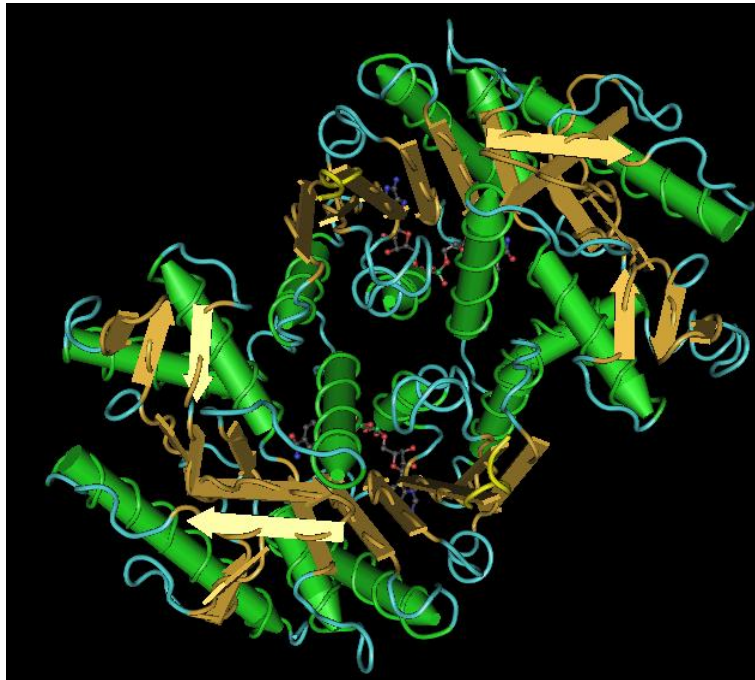


Fig. 6. Estructura tridimensional de la malato deshidrogenasa de *Thermus flavus* (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Se ha sugerido que la estructura dimérica es crítica para la actividad de la enzima, varios residuos de aminoácidos altamente conservados se encuentran en la interfase, aparentemente los residuos D45 y S226 juegan un papel importante en el proceso de dimerización. La estabilidad de

la unión entre subunidades de la MDH de *E. coli* es el resultado de enlaces puentes de hidrógeno y contactos hidrofóbicos (Breiter *et al.*, 1994).

Se han identificado cinco residuos de aminoácidos que distinguen a la malato deshidrogenasa de *E. coli* de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH). La incorporación de estos cinco cambios en la secuencia de la MDH causó la conversión completa de esta enzima por LDH (Yin y Kirsch, 2007).

3.5.6 pH ÓPTIMO

Los valores de pH óptimo reportados para la reducción de oxaloacetato por la malato deshidrogenasa, tanto para procariontes como para eucariontes, se encuentran entre 7 y 8 incluyendo a la MDH de *S. aureofaciens*, que tiene un pH óptimo de 8 (Mikulášová *et al.*, 1998), mientras que para la oxidación de malato el valor aproximado es de 10 (Tabla 2). Se ha aceptado que la His195 es un residuo clave para la actividad de MDH, ya que debe protonarse por la unión a oxaloacetato y desprotonarse por unión a malato, lo que explica que el valor de pH óptimo se encuentre tan conservado entre especies (Ingold y Hudson, 1993).

Tabla 2. pH óptimo de la malato deshidrogenasa reportado para varios organismos

Microorganismo	pH óptimo reducción	pH óptimo oxidación	Fuente
<i>P. stutzeri</i>	8	10.5	Labrou y Clonis, 1997
<i>Vibrio sp.</i>	8	9.5	Ohkuma <i>et al.</i> , 1996
<i>T. emersonii</i>	7.5	10	Maloney <i>et al.</i> , 2004
<i>S. aureofaciens</i>	8		Mikulášová <i>et al.</i> , 1998
<i>S. ruber</i>	7.5		Madern y Zaccai 2004
<i>H. marismortui</i>	7.6		Madern y Zaccai 2004
Corazón de pollo	7.8	10	Kitto y Kaplan, 1966
<i>Ilyanassa obsoleta</i>	7.9		Meizel y Markert, 1967
<i>Bacillus termofílico</i>	7.5-8.0	11-11.5	Wynne <i>et al.</i> , 1996

3.5.7 OTRAS VÍAS EN QUE PARTICIPA MDH

El oxaloacetato actúa como precursor de varias vías biosintéticas dando lugar a aminoácidos, nucleótidos y azúcares y es a su vez restituido en el ciclo por medio de vías anapleróticas (Nelson y Cox, 2000). Así, esta enzima participa en diversas actividades metabólicas además del TCA, tales como la biosíntesis de aspartato y la gluconeogénesis (Banaszak y Bradshaw, 1975) y forma parte de vías biosintéticas como el ciclo del glioxalato y la producción de succinil-CoA a partir de oxaloacetato. Esta última vía ocurre principalmente en condiciones anaeróbicas y la reacción se realiza en dirección de oxaloacetato a malato, es decir, en sentido contrario al TCA, sin embargo, en *E. coli* se ha reportado en condiciones aeróbicas con glucosa como fuente de carbono cuando la energía requerida por la célula es satisfactoriamente proporcionada por la glucólisis (Nimmo, 1987).

3.5.8 RELACIÓN ENTRE MDH Y OTRAS ENZIMAS EN CITOPLASMA

La MDH2 de *Saccharomyces cerevisiae*, enzima citosólica que participa en la gluconeogénesis, se relaciona *in vivo* con la PEP carboxinasa y la fructosa-1,6-bifosfatasa facilitando el flujo metabólico a través de la gluconeogénesis. Se ha sugerido que esta enzima se inhibe cuando el organismo crece en presencia de glucosa como fuente de carbono; esto puede mostrar una ventaja fisiológica al remover las enzimas que interfieren con la velocidad de la glicólisis (Gibson *et al.*, 2003).

3.5.9 UBICACIÓN EN EL CROMOSOMA

Tanto en *Thermus flavus* (Nishiyama *et al.*, 1991) como en *T. thermophilus* (Park y Kilbane, 2004) y en *T. aquaticus* (Nicholls *et al.*, 1990) el gen que codifica para MDH (*mdh*) se encuentra en un operón junto a los genes que codifican para las subunidades α y β de la succinil-CoA sintetasa (*scsA* y *B*); el codón de término de *scsB* se sobrelapa con el de inicio de *scsA* y la región intercistronica entre *scsA* y *mdh* es muy corta. En *E. coli*, el gen *mdh* se encuentra ubicado en el

minuto 70 de su cromosoma circular, alejado de los demás genes que codifican para enzimas del TCA (Nimmo, 1987).

3.5.10 REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE MDH

En general, las MDHs dependientes de NAD^+ no están sujetas a regulación a nivel de actividad, a excepción de la enzima mitocondrial que depende de control alostérico por citrato. En cambio las LDHs de eubacterias están sujetas a regulación alostérica por fructosa 1,6-bifosfato (Goward y Nicholls, 1994).

Frecuentemente se ha observado que altas concentraciones de oxaloacetato tienen un efecto inhibitorio sobre la malato deshidrogenasa (Madern y Zaccai, 2004; Labrou y Clonis, 1997; Langelandsvik *et al.*, 1997); la enzima de *Sac. erythraea*, organismo muy similar a los *Streptomyces* también mostró este comportamiento (Mendoza, 2005); sin embargo, la actividad de la MDH de *S. aureofaciens* no se vio afectada a altas concentraciones de sustrato (Mikulášová *et al.*, 1998). Ésta es la única MDH que se ha caracterizado bioquímicamente en este género bacteriano.

La MDH de algunos organismos como *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Archaeoglobus fulgidus* y *E. coli* también se inhibe por NADH (Thompson *et al.*, 1998; Langelandsvik *et al.*, 1997; Nimmo, 1987). La de *M. thermoautotrophicum* se inhibe además por NADPH, mientras que la de *A. fulgidus* por malato (Langelandsvik *et al.*, 1997).

3.5.11 EFECTO DE LA FUENTE DE CARBONO SOBRE LA EXPRESIÓN DEL GEN *mdh*

Para varios microorganismos se ha reportado que la expresión del gen *mdh* está regulada por la fuente de carbono. Por ejemplo, en *T. thermophilus*, la expresión del operón en el que se encuentra *mdh* varía en un rango de dos veces dependiendo de la fuente de carbono, pero en todos los casos hay expresión mostrando un nivel basal. Se observa una menor expresión al crecer en MM con glucosa o en medio completo; la mayor expresión se observa al crecer en presencia de malato, seguida de succinato, piruvato y glutamato (Park y Kilbane, 2004).

En 1966, Gary y colaboradores y en 1985, Sutherland y cols. demostraron que la cantidad de MDH en células de *E. coli* se reduce en presencia de glucosa y en condiciones anaeróbicas y se

induce por acetato y malato. En 1995, Park y cols. confirmaron que la expresión de este gen se regula por represión catabólica, mostrando una menor expresión al crecer en medio completo Luria (LB) o en medio mínimo (MM) con glucosa, que al crecer en MM con otras fuentes de carbono tales como glicerol, piruvato, acetato, fumarato y succinato. La mayor expresión se observa en piruvato, la cual es aproximadamente 10 veces mayor a la observada en LB con glucosa en condiciones aeróbicas. En condiciones aeróbicas se observa aproximadamente el doble de expresión que en condiciones anaeróbicas. El producto del gen *arcA* es un regulador negativo de la expresión del gen *mdh*, mostrando un efecto regulatorio mucho más fuerte en condiciones anaeróbicas. Los patrones de regulación por la fuente de carbono observados para el gen *mdh* son similares a los reportados para citrato sintasa (*gltA*) y para succinato deshidrogenasa (*sdhCDAB*) (Park *et al.*, 1995).

En *Corynebacterium glutamicum*, las actividades de MQO, MDH y SDH se regulan coordinadamente en respuesta a la fuente de carbono. En orden ascendente la actividad de estas tres enzimas en las diferentes fuentes de carbono fue la siguiente: glucosa, fructosa, manitol, lactato, piruvato y la mayor actividad se obtuvo en acetato. Estas tres enzimas mostraron respectivamente 3.4, 3.1 y 1.8 veces mayor actividad al crecer en acetato que en glucosa (Molenaar *et al.*, 2000).

Al cultivar a *Sac. erythraea* en glucosa, galactosa o lactosa como fuentes de carbono se observaron perfiles de actividad muy similares, mientras que al crecer en presencia de fructosa se indujo la síntesis de esta enzima (Mendoza, 2005).

En *Talaromyces emersonii* se realizaron análisis de Northern blot para determinar las diferencias en la transcripción de *mdh* al crecer al hongo en diferentes fuentes de carbono (glucosa, galactosa, lactosa, trealosa, melibiosa, rafinosa, xilano, pectina cítrica y pectina cítrica con glucosa). En todas las muestras se observó expresión, lo cual concuerda con el sobreentendido de que las enzimas del TCA son constitutivas; sin embargo, se observaron diferencias en la intensidad de las bandas, lo cual muestra el efecto de sustratos inductores en la expresión de *mdh*. En general, se observó un mayor nivel de expresión en monosacáridos y disacáridos como glucosa, galactosa, melibiosa y trehalosa. El nivel de expresión fue notablemente menor en oligosacáridos y polisacáridos como rafinosa, xilano y pectina cítrica. Esto puede reflejar una mayor rapidez metabólica al crecer al organismo en fuentes de carbono más simples (Maloney *et al.*, 2004).

3.5.12 EXPRESIÓN Y ACTIVIDAD DE MDH A TRAVÉS DEL TIEMPO DE CRECIMIENTO

La expresión de *mdh* a través del tiempo de crecimiento de *T. emersonii*, al crecer en pectina como fuente de carbono, se mantuvo constante (Maloney *et al.*, 2004).

La actividad de la MDH de *Sac. erythraea* al crecer en fuentes de carbono como (glucosa, galactosa y lactosa) se mantuvo constante a lo largo de las diferentes etapas de crecimiento, sin embargo; al crecer a esta bacteria en presencia de fructosa se observó una inducción de la síntesis de la enzima, mostrando un valor máximo de actividad a las 72 horas de cultivo (Mendoza, 2005).

3.5.13 FILOGENIA DE MDH

La L-MDH dependiente de NAD(P)⁺, la L-lactato deshidrogenasa (L-LDH) dependiente de NAD⁺ y la alcohol deshidrogenasa (ADH) son miembros de una superfamilia de deshidrogenasas y se encuentran distribuidas en los tres dominios: arqueobacterias, eubacterias y eucariotas (Banaszak y Bradshaw 1975; Birktoft *et al.*, 1989). La L-lactato deshidrogenasa cataliza la interconversión entre piruvato y lactato durante la fermentación láctica. La alcohol deshidrogenasa participa en la reducción de acetaldehído a etanol para la fermentación alcohólica. Se han hecho estudios filogenéticos sobre la relación entre L-MDH y L-LDH que claramente muestran que dos eventos ancestrales de duplicación génica son necesarios para explicar la existencia de dos funciones enzimáticas y de tres grupos principales en la superfamilia: L-LDH, (LDH-like) L-MDH y L-MDH. Los tres tipos de enzimas se han reportado tanto en eubacterias como en eucariotas, sin embargo, en arqueobacterias sólo se han encontrado la (LDH-like) L-MDH y la LDH (Madern, 2002).

Un árbol filogenético con 31 MDHs de arqueobacterias mostró que éstas se dividen en 5 grupos claramente separados en líneas taxonómicas, lo que sugiere que la transferencia horizontal de MDHs entre estas bacterias ha sido mínima (Yennaco y Holden, 2007).

3.5.14 LA MALATO DESHIDROGENASA DE *S. coelicolor*

El probable gen que codifica para la malato deshidrogenasa en *S. coelicolor* se encuentra codificado en la región central del cromosoma en el gen SCO4827 del genoma, la secuencia cuenta con 990 bases lo que corresponde a 329 aminoácidos (Fig. 7) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

	10	20	30	40	50	60
MTRTPVNVTV	TGAAGQIGYA	LLFRIASGQL	LGADVVPVKLR	LLEITPALKA	AEGTAMELDD	
	70	80	90	100	110	120
CAFPLLQIE	ITDDPNVAFD	GANVALLVGA	RPRTKGMERG	DLLEANNGGIF	KPQ GKAINDH	
	130	140	150	160	170	180
AADDIKVLV	VGNPANTNALI	AQAAAPDVPA	ERFTAMTRLD	HN RALTQLAK	KTGSTVADIK	
	190	200	210	220	230	240
RLTIWGNHSA	TQYPDIFHAT	VAGKNAAE TV	NDEKWL ADEF	IPTVAKRGAA	IIEARGASSA	
	250	260	270	280	290	300
ASAANAAIDH	VYTWVNGTAE	GDWTSMGIPS	DGSYGVPEGI	ISSFPVTTKD	GSYEIVQGLD	
	310	320				
INEFSRARID	ASVKELSEER	EAVRGLGLI				

Fig. 7. Secuencia de aminoácidos de la probable malato deshidrogenasa de *S. coelicolor*. En cuadros: residuos involucrados en la unión a cofactor. En negritas: residuos involucrados en la unión a sustrato (<http://ca.expasy.org/uniprot>).

La secuencia de aminoácidos del producto de expresión del gen *mdh* tiene una alta identidad con las secuencias de esta proteína de muchos otros organismos tales como *S. avermitilis* (94%), *Sac. erythraea* (83%), *T. fusca* (82%), *M. avium* (72%), *C. glutamicum* (64%), *T. flavus* (64%) y la enzima citosólica de ratón (52%). En cambio, sólo tiene un 32% de identidad con la región amino terminal de la enzima de *E. coli* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Los genes que codifican para las enzimas del TCA no están unidos en el cromosoma de *S. coelicolor*, sin embargo, la mayoría de éstos se encuentran entre el SCO4808 (codifica para succinil-CoA sintetasa) y el SCO5281 (codifica para el componente E1 de la α -cetoglutarato deshidrogenasa) (Fig. 8).

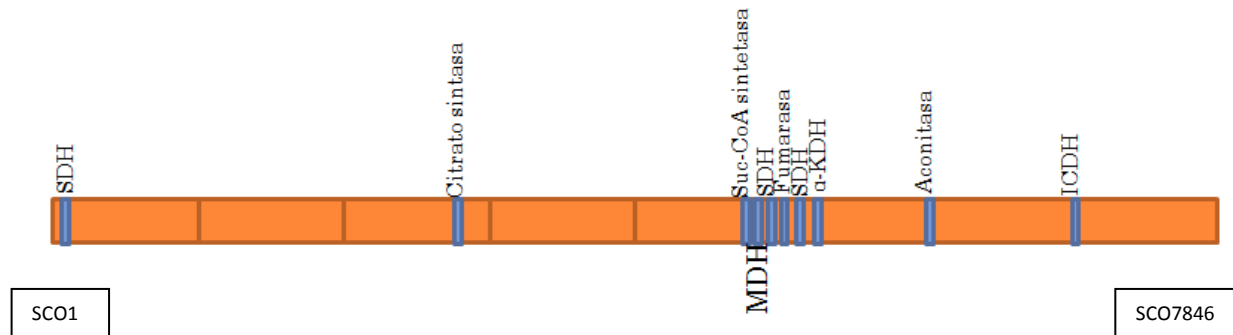


Fig. 8. Ubicación cromosómica de los probables genes que codifican para enzimas del TCA en el genoma de *S. coelicolor*, las líneas delgadas marcan cada 1000 SCOs, las líneas gruesas representan los genes que codifican para la enzima indicada en cada caso (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

3.6 ASIMILACIÓN DE NUTRIENTES Y REGULACIÓN DEL METABOLISMO EN ESTREPTOMICETOS

La situación normal de una colonia de *Streptomyces* que habita en el suelo es crecer en limitación de nutrientes en un ambiente competitivo (Hodgson, 2000). Como estos organismos no presentan movilidad, no son capaces de desplazarse a regiones con mejores condiciones nutricionales, de modo que han desarrollado mecanismos de adaptación para desarrollarse por un lado en una permanente limitación de nutrientes y por otro con rápidos cambios en las condiciones ambientales. Así, requieren una gran cantidad de vías anabólicas y catabólicas controladas por mecanismos de regulación sofisticados para sobrevivir en estas condiciones (Ruther y Wohllenben, 2007). Esto podría explicar los grandes tamaños genómicos de estas bacterias (7-9 Mb; Bentley *et al.*, 2002).

La gran variedad de vías degradadoras de carbohidratos reflejan la gran variedad de carbohidratos en el suelo. Esta multiplicidad de vías ha ocasionado el desarrollo de redes regulatorias tanto globales como específicas tales como la represión catabólica por glucosa (Hodgson, 2000). Así, los nutrientes son utilizados de acuerdo a su valor evolutivo, es decir, las

fuentes de carbono preferenciales se utilizan primero. Los mecanismos moleculares que están detrás de estos procesos, tales como la detección de nutrientes, el transporte y su regulación son poco entendidos (Parche *et al.*, 2000).

La principal señal que induce el proceso de diferenciación y la producción de metabolitos secundarios en estreptomicetos es la limitación de nutrientes, de modo que existe una estrecha relación entre los diferentes procesos metabólicos. Se han reportado varias mutantes en genes que codifican para diversas enzimas del metabolismo primario que afectan el proceso de diferenciación y de producción de metabolitos secundarios, lo que evidencia una compleja red regulatoria. Tal es el caso de mutantes nulas en varios genes del sistema pts (*ptsH*, *ptsI* y *crr*) las cuales muestran un fenotipo calvo (Nothaft *et al.*, 2003; Rigali *et al.*, 2006), al igual que la mutante nula en el gen que codifica para la enzima del TCA aconitasa (Viollier *et al.*, 2001).

3.6.1 ASIMILACIÓN DE CARBONO

Los estreptomicetos habitan en el suelo y tienen una contribución sustancial en la degradación de una amplia variedad de biopolímeros provenientes de desechos vegetales y animales. Estos compuestos, que incluyen xilano, quitina y celulosa son degradados por enzimas extracelulares y los productos entran a la célula gracias a la acción de transportadores específicos que generalmente reconocen mono o disacáridos (Hodgson, 2000). La actividad y regulación de los mecanismos de asimilación de nutrientes determinan el estado nutricional de la célula e influyen en la morfogénesis y en la producción de antibióticos.

A través de un análisis de la secuencia genómica de *S. coelicolor* se identificaron 81 permeasas ABC entre las que se encuentran sistemas de transporte de celobiosa, celotriosa, α -glucósidos, lactosa, maltosa, maltodextrinas, ribosa, azúcar alcoholes, xilosa y β -xilósidos. Aparentemente, la glucosa se incorpora mediante co-transporte dependiente de protones; una permeasa dependiente de sodio regula la asimilación de galactosa y el glicerol entra por medio de difusión facilitada (Fig. 9) (Bertram *et al.*, 2004). La fructosa y la N-acetilglucosamina entran por medio de un sistema de fosfotransferasa (PTS) (van Wezel *et al.*, 2007). La gran cantidad de exoenzimas y sistemas ABC en *Streptomyces* (5 a 10 veces mayor que en otras bacterias) subraya su amplia capacidad metabólica.

Las bacterias han desarrollado mecanismos para regular la utilización de las fuentes de carbono de forma coordinada, de modo que las fuentes de carbono preferenciales se utilizan primero. Esto ha sido muy estudiado en bacterias Gram-negativas como *E. coli* así como en Gram-positivas con bajo contenido de G+C como *B. subtilis* (Steinmetz, 1993). En ambos grupos bacterianos, las proteínas del sistema fosfotransferasa (PTS) catalizan la asimilación de más de 20 carbohidratos diferentes por medio de la transferencia secuencial de un grupo fosforilo del fosfoenolpiruvato (PEP) a un residuo de histidina de la enzima E1, que a su vez lo transfiere a HPr y éste a la enzima II(ABC) que finalmente fosforila al azúcar. El estado de fosforilación de las proteínas del PTS refleja el estado nutricional de las células, que regula la asimilación de carbono por mecanismos conocidos como represión catabólica por carbono (CCR) proporcionando un control global de los operones involucrados en la utilización de carbono por medio de la acción de reguladores maestros, denominados CcpA (proteína de control catabólico A) en bacterias Gram-positivas con bajo contenido de GC y Crp (proteína receptora de cAMP) en bacterias Gram-negativas (Brükner y Titgemeyer, 2002 y Nothaft *et al.*, 2003).

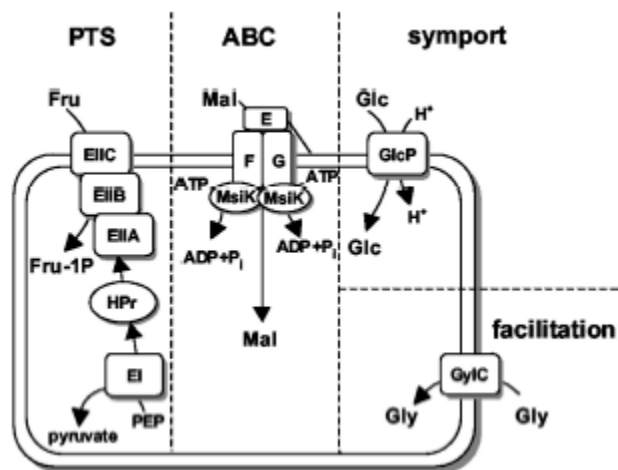


Fig. 9. Esquema general de los sistemas de asimilación de carbohidratos de *S. coelicolor*. Los azúcares representativos de cada sistema de transporte son fructosa (Fru) para PTS, maltosa (Mal) para ABC, glucosa (Glc) para simporte y glicerol (Gly) para difusión facilitada. Abreviaturas: E, MalE; F, MalF; G, MalG; EIIA, enzima IIA; EIIB, enzima IIB; EIIIC, enzima IIC; PEP, fosfoenolpiruvato (Bertram *et al.*, 2004).

Se han reportado muchos ejemplos de CCR en estreptomicetos, la cual afecta la utilización de muchos azúcares, síntesis de enzimas extracelulares como agarasa y α -amilasa, producción de antibióticos y esporulación, sin embargo; este proceso no parece estar regulado por un sistema

PTS como en otras bacterias, en cambio la enzima glicolítica glucosa cinasa (Glc; gen *glkA*) juega un papel central en este proceso (Paulsen, 1996, Mahr *et al.*, 2000, van Wezel *et al.*, 2007 y Rigali *et al.*, 2006). La secuencia de esta proteína reveló que pertenece a la familia de proteínas ROK (la cual incluye seis represores transcripcionales de operones de catabolismo de azúcares, tres cinasas de azúcares y tres marcos de lectura abiertos no identificados) aunque no presenta dominio de unión a DNA lo que sugiere que requiere asociarse a otro factor para efectuar la represión catabólica (Paulsen, 1996 y Titgemeyer *et al.*, 1994). Mutantes en *glkA* son insensibles a represión catabólica por glucosa y el reestablecimiento de la actividad por la introducción de una glucosa cinasa funcional de *Zymomonas mobilis* no restablece el control catabólico (Angell *et al.*, 1994).

GlcP constituye el principal sistema de entrada de glucosa de *S. coelicolor*, aunque se encontraron dos loci distintos en el genoma de esta bacteria, *glcP1* y *glcP2* localizados en la parte central y en el brazo derecho del cromosoma respectivamente, su secuencia nucleotídica sólo varía en una base pero esto no genera cambios en la secuencia de aminoácidos (van Wezel *et al.*, 2005).

En el 2007, van Wezel y colaboradores demostraron que la síntesis de Glk es constitutiva a lo largo de las diferentes etapas de cultivo de *S. coelicolor* pero su actividad catalítica es modulada dependiendo de la fuente de carbono: mientras cultivos en etapa exponencial en medio con glucosa muestran una alta actividad de esta enzima, en presencia de manitol la actividad fue muy baja. La actividad de la enzima fue directamente proporcional a la cantidad de dos isoformas de Glk observadas mediante análisis de Western blot. Aparentemente se forma un complejo entre Glk y la glucosa permeasa principal (GlcP) ya que en mutantes *glkA*⁻ se observa una considerable disminución en la acumulación de glucosa, además hay una correlación entre los perfiles de actividad de estas dos enzimas y análisis de Western blot mostraron que Glk se encuentra en la fracción de membrana cuando se expresa GlcP. La acción regulatoria de Glk es a nivel transcripcional pero carece de motivos de unión a DNA por lo que se propone que interactúa con factores transcripcionales. Por otro lado, en el 2005, Imriskova y colaboradores reportaron la purificación y caracterización bioquímica de la Glk de *S. coelicolor* mostrando que es una enzima tetramérica con un 96% de la actividad enzimática en la fracción citosólica y mediante zimogramas se demostró la ausencia de isoformas de esta enzima.

En *Streptomyces* se ha identificado la presencia de un sistema PTS que probablemente se relaciona con el proceso de desarrollo (Parche *et al.*, 2000; Nothaft *et al.*, 2003 y Rigali *et al.*, 2006). Este sistema se encontró por análisis de las secuencias reportadas para los genes involucrados comparadas con el genoma de *S. coelicolor*, así se encontraron los siguientes genes: *ptsI*, homólogo a la enzima I; *ptsH*, homólogo a HPr; *crr*, homólogo a la enzima IIA y seis genes que codifican para componentes azúcar-específicos (Parche *et al.*, 2000). Posteriormente, la función de *crr* y *HPr* se demostró experimentalmente (Kamionka *et al.*, 2002 y Nothaft *et al.*, 2003).

En el 2006, Rigali y colaboradores demostraron que altas concentraciones extracelulares de N-acetilglucosamina, el monómero de la quitina, evita que *S. coelicolor* se desarrolle más allá del micelio vegetativo. Esta señal es transmitida por un regulador de la familia GntR denominado DasR, que controla el regulón N-acetilglucosamina, incluyendo los genes del sistema PTS necesarios para la asimilación de este carbohidrato. Deleciones en *dasR* o en genes del sistema PTS resultan en un fenotipo calvo (no produce micelio aéreo ni esporas). Este fue el primer reporte en el que se evidencia a nivel molecular una relación directa entre el metabolismo de carbono y la diferenciación, mostrando un tipo de regulador metabólico, que detecta el estado nutricional del hábitat, manteniendo el micelio vegetativo hasta que las circunstancias cambien.

En varias bacterias se ha reportado que la asimilación de acetato es acompañada por la vía del glioxalato, sin embargo aunque en varios estreptomicetos se han identificado los genes involucrados en esta vía a la fecha no se ha logrado demostrar su importancia en la asimilación de acetato, de hecho para *S. collinus* la vía del butiril-CoA (Fig. 10) es crítica para el crecimiento en este compuesto como única fuente de carbono. Para *S. cinnamonensis* se demostró que ni el ciclo del glioxalato ni la vía del butiril-CoA son funcionales, lo que sugiere la existencia de una ruta alternativa para la asimilación de acetato (Akopiants *et al.*, 2006).

3.6.2 ASIMILACIÓN DE NITRÓGENO

Las bacterias Gram-positivas pueden utilizar amonio (NH_4^+) y muchos otros compuestos como fuentes de nitrógeno, estos compuestos deben ser enzimáticamente degradados hasta amonio o glutamato ya que la principal vía de asimilación de nitrógeno es a través de glutamina la cual es producida por la enzima glutamina sintetasa (GS) utilizando amonio y glutamato. La

mayoría de los aminoácidos, el nitrato y la urea proporcionan amonio intracelular, mientras algunos aminoácidos como prolina, arginina e histidina proporcionan glutamato (Fisher, 1993).

En la mayoría de las bacterias existen dos vías generales para la asimilación de amonio. A altas concentraciones de amonio (> 1mM) la glutamato deshidrogenasa sintetiza glutamato de α -cetoglutarato y amonio sin consumo de ATP. A bajas concentraciones de nitrógeno, la glutamato deshidrogenasa no es capaz de catalizar la reacción eficientemente debido a su alto valor de K_m . En estas condiciones, la asimilación de amonio se realiza por otras dos enzimas: la glutamina sintetasa (GS) y la glutamato sintasa (GOGAT). GS cataliza la formación de glutamina dependiente de ATP a partir de glutamato y amonio. GOGAT cataliza la síntesis de dos moléculas de glutamato a partir de glutamina y α -cetoglutarato. El glutamato y la glutamina son los donadores de nitrógeno para las reacciones biosintéticas. En muchos ambientes naturales (tales como el suelo en el que habitan los estreptomicetos) el nitrógeno es un factor limitante por lo que la vía GS/GOGAT es la vía predominante para su asimilación en estos procariontes. Así, GS es la enzima clave en el metabolismo de nitrógeno (Reuther y Wolleben, 2007).

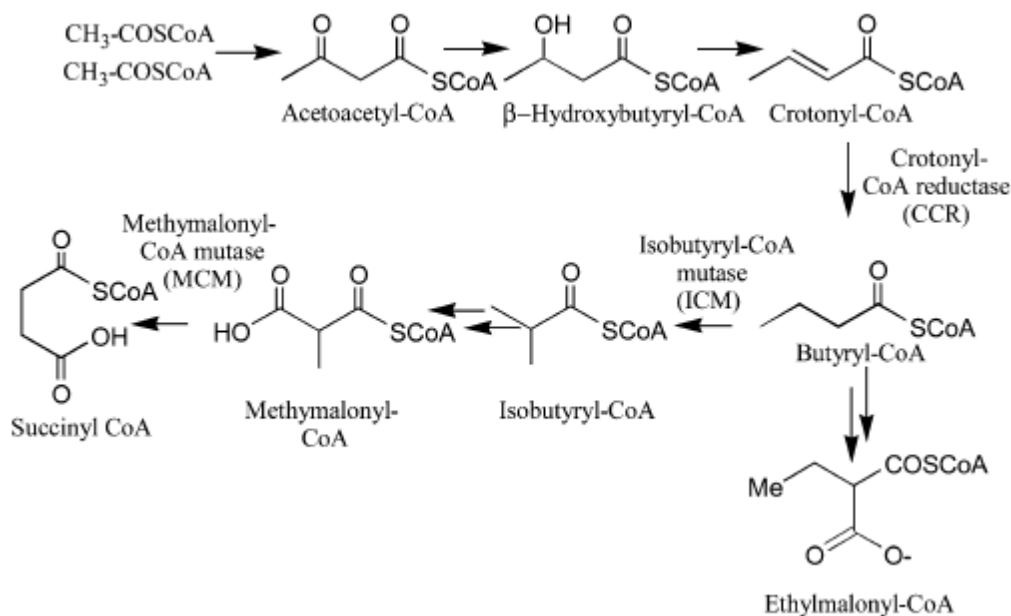


Fig. 10. Vía del butiril-CoA para la asimilación de acetato (Akopiants *et al.*, 2006).

Muchos genomas bacterianos contienen un solo gen que codifica para GS, sin embargo, en el genoma de *S. coelicolor* se identificaron cinco genes con similitud a genes de GS: *glnA*, *glnII*,

glnA2, *glnA3* y *glnA4* aunque aparentemente sólo *glnA* y *glnII* se expresan y sus productos son activos (Rexer *et al.*, 2006). El producto de *glnA* (GSI) es una enzima termoestable, similar a otras GS procarióticas; su transcripción es constante a lo largo de las diferentes etapas de crecimiento y la actividad de GSI es detectable en todas las fases de crecimiento. La actividad de GSII (producto de *glnII*) aumenta predominantemente durante la diferenciación morfológica, esta enzima es muy similar a la que se encuentra en eucariontes lo que sugiere que fue adquirida mediante transferencia horizontal (Fink *et al.*, 2002).

El paso que une al metabolismo de carbono con el de nitrógeno es la conversión de α -cetoglutarato a glutamato y luego a glutamina. Por lo tanto, no es sorprendente que en bacterias Gram-negativas la concentración intracelular de α -cetoglutarato y glutamina determinan la expresión de los genes involucrados en el metabolismo de nitrógeno (Sonenshein, 1993).

En bacterias entéricas la síntesis de la enzima GS, de varias aminoácido-permeasas y de enzimas degradadoras ocurre a bajas velocidades durante el crecimiento en presencia de altos niveles de amonio. Durante el crecimiento en condiciones limitantes de amonio, la expresión de estas enzimas aumenta gracias al sistema global de regulación por nitrógeno (Ntr). Los componentes claves de este sistema son las proteínas NtrB y NtrC. La primera es una cinasa que fosforila y desfosforila a NtrC en respuesta a la concentración intracelular de glutamina y α -cetoglutarato. La forma fosforilada de NtrC es una proteína de unión a DNA que activa la transcripción de genes regulados por nitrógeno cuando la concentración de glutamina/ α -cetoglutarato es baja. No todos los genes se regulan directamente por NtrC, por ejemplo, la transcripción del gen *nac* se activa por el sistema Ntr en condiciones de poco amonio, y la proteína Nac activa la expresión de varios genes involucrados en la utilización de ureasas, histidina, y prolina (Fisher, 1993).

El amonio no es la fuente de nitrógeno preferencial de *B. subtilis* y varias vías degradadoras son reguladas en respuesta a compuestos distintos del amonio que contienen nitrógeno. La expresión de la prolina oxidasa y las enzimas involucradas en la degradación de histidina no son significativamente elevadas durante el crecimiento en amonio, pero su síntesis es fuertemente inhibida por el crecimiento en presencia de aminoácidos. La glutamina, no el amonio, reprime la expresión de las primeras dos enzimas de la vía de degradación de arginina (Atkinson *et al.*, 1990).

En *B. subtilis* se ha reportado una elevada expresión de enzimas degradadoras de histidina, prolina y arginina al comienzo del crecimiento estacionario en medio nutritivo de esporulación, lo que sugiere que estos aminoácidos son utilizados por la célula durante su adaptación a crecer en un ambiente con nutrientes limitados (Fisher, 1993).

El control del catabolismo de aminoácidos de los estreptomicetos refleja la ausencia relativa de catabolitos nitrogenados en el suelo. Los aminoácidos inducen aproximadamente la mitad de las vías catabólicas para degradarlos y la otra mitad son constitutivas. Existen pocos ejemplos del control global del catabolismo de carbono y nitrógeno de aminoácidos en estos organismos. Esto se ha tomado como un reflejo de la naturaleza oligotrófica de su nicho ecológico. Como los aminoácidos no se encuentran en el suelo, los estreptomicetos han invertido poco en desarrollar mecanismos para regular su asimilación (Hodgson, 2000).

4 OBJETIVO

Analizar la expresión del gen *mdh* que codifica para la enzima malato deshidrogenasa de *Streptomyces coelicolor* a través de los perfiles de actividad y de transcripción del gen largo de las diferentes etapas de crecimiento en medio mínimo suplementado y en presencia de diferentes fuentes de carbono.

5 MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 MICROORGANISMO

Streptomyces coelicolor M145, cepa prototrófica de *S. coelicolor* A(3)2 carente de los plásmidos naturales SCP1 y SCP2, organismo modelo para los estreptomicetos (Bentley, 2002).

5.2 PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN CONCENTRADA DE ESPORAS

Se platearon cajas con medio MS (harina de soya 2%, manitol 2%, extracto de levadura 0.5% y agar 2%, la harina se esteriliza 15 min por separado luego se adicionan el resto de los componentes y se esteriliza todo junto 25 min) con 100 µl de diluciones 10^{-7} o 10^{-8} de una solución de esporas original que contenía aproximadamente 10^{10} esporas por mililitro con el fin de obtener colonias aisladas, éstas se utilizaron para platear nuevas cajas con medio MS y se incubaron una semana a 29°C, a partir de éstas se obtuvo la solución concentrada de esporas siguiendo la metodología reportada por Kieser y colaboradores (2000) modificada en este trabajo como se detalla en el anexo 1 obteniendo una concentración aproximada de 3×10^{10} esporas viables por mililitro. La solución concentrada de esporas se almacenó indefinidamente a -20°C en glicerol al 20%.

5.3 CULTIVO

Para cultivar a *S. coelicolor* en presencia de las diferentes fuentes de carbono se siguió la metodología reportada por Strauch y colaboradores (1991) para obtener crecimiento disperso. Así, se pregerminaron 3×10^9 esporas durante 8 hr a 29°C con agitación rotatoria (300 rpm) en 100 ml de medio 2xYT (triptona 1.6%, extracto de levadura 1% y NaCl 0.5%). Después de este tiempo, se centrifugó el micelio, se lavó asépticamente y se resuspendió en 5 ml de agua estéril. Con 2.5 ml de esta suspensión de esporas germinadas, se inocularon 200 ml de medio mínimo (MM) suplementado con casaminoácidos contenidos en un matraz Erlenmeyer de 1000 ml. El MM

contenía: 2.093% de MOPS, 0.5% de NaCl, 0.03% de K_2HPO_4 , 0.05% de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 5% de PEG 8000, 0.2% de $(NH_4)_2SO_4$, 0.2% de casaminoácidos, 15 μ l de antiespumante (Antifoam Sigma), fuente de carbono a una concentración final de 0.5% ó 0.028M y 400 μ l de elementos traza ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 2.5%, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 1%, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0.05%, $CaCl_2$ anhidro 0.05% y $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.05%). El pH se ajustó a 7 con NaOH 1N. La estandarización de la composición del MM se detalla en el anexo 2. Los matraces se incubaron a 29°C con agitación a 200 rpm y se tomaron muestras a las diferentes horas de cultivo para cuantificar la actividad enzimática de MDH, crecimiento y concentraciones de azúcar y de amonio así como para extraer RNA para determinar la transcripción del gen *mdh*.

5.4 CUANTIFICACIÓN DE CRECIMIENTO

El crecimiento se cuantificó por absorbancia a 450 nm en un espectrofotómetro Shimadzu Modelo UV-1201 y como proteína por el método de Lowry usando albúmina sérica bovina como estándar de acuerdo a la metodología reportada por Flores y Sánchez (1985). La proteína se determinó por este método ya que se utiliza ácido tricloroacético para lisar las células y precipitar las proteínas, las cuales son posteriormente disueltas utilizando NaOH 4N, el cual interfiere para la cuantificación con otros métodos como el de Bradford.

5.5 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO LIBRE DE CÉLULAS (ELC)

A los diferentes tiempos de incubación, el micelio se recuperó por centrifugación a 5,000 rpm durante 10 min, se lavó una vez con amortiguador Tris-HCl 0.01M, pH 7.5 y se resuspendió en 1 ml de este mismo amortiguador por cada gramo de pellet. Posteriormente se sonicó en un equipo Vibra-Cell Modelo 9130 durante 1 minuto en intervalos de 15 s, manteniendo las muestras en hielo. Para separar los restos celulares se centrifugó a 13,200 rpm por un lapso de 11 min. El extracto libre de células (ELC) se usó para la determinación de actividad y para las separaciones de proteínas por electroforesis en poliacrilamida. La concentración de proteína se determinó por el método de Bradford (1976) utilizando albúmina sérica bovina como estándar, la elección de este método se debió a que presenta una mayor sensibilidad en comparación con el de Lowry. Se realizaron las determinaciones, por lo menos por triplicado, en todos los casos. La estandarización de la técnica para obtener el ELC se detalla en el anexo 3.

5.6 ENSAYO DE LA ACTIVIDAD DE MALATO DESHIDROGENASA

La actividad de la enzima se determinó midiendo la disminución en la absorbancia a 340 nm en un espectrofotómetro Shimadzu Modelo UV-160U debido a la desaparición de NADH. La mezcla de reacción contenía 0.01 M de amortiguador Tris-HCl, pH 7.5, 0.1 mM de NADH, 0.2 mM de ácido oxaloacético y extracto libre de células en un volumen final de 1 ml (Mendoza, 2005). La reacción se inició por adición de oxaloacetato e inmediatamente se leyó la disminución en la absorbancia a 340 nm a 50°C en función del tiempo. La actividad volumétrica se reportó en μ moles de NADH oxidado por minuto por ml de extracto. En todos los casos la actividad se midió por lo menos por triplicado. La estandarización de esta técnica se detalla en el anexo 4. La actividad de la enzima se puede conservar durante seis días almacenando el ELC a 4°C como se muestra en el anexo 5.

5.7 DETERMINACIÓN DE LA TEMPERATURA ÓPTIMA DE LA MDH DE *S. coelicolor*

Con el fin de estandarizar la técnica para medir la actividad de la enzima se determinó la temperatura óptima para esta enzima como se muestra en el anexo 3. Para esto, se conectó el espectrofotómetro a un circulador termostático Broma Modelo 2219 Multitemp II y de esta forma se determinó la actividad de la enzima en un rango de 10°C hasta 80°C. El coctel de reacción se incubó durante un minuto a la temperatura deseada antes de iniciar la reacción por adición de oxaloacetato.

5.8 CUANTIFICACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS EN EL ELC

La concentración de proteínas en el ELC se cuantificó por medio del método de Bradford (Bradford, 1976) y se reporta en mg de proteína por ml de ELC. Para cada muestra la concentración de proteínas se determinó por triplicado.

5.9 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA

Con el fin de estandarizar las condiciones óptimas para determinar adecuadamente la actividad específica, se se determinó mediante el cociente de la actividad volumétrica entre la concentración de proteína en el ELC y se reporta en μ moles de NADH oxidado por min por mg de proteína.

5.10 CUANTIFICACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE NUTRIENTES EN EL MEDIO DE CULTIVO (carbono y nitrógeno)

A partir del sobrenadante producido al centrifugar una muestra de cultivo de cada condición durante 10 min a 5000 rpm, se determinó la concentración de azúcares reductores por medio del método de DNS utilizando glucosa como estándar reportado por Miller en 1959 y la concentración de amonio por el método de fenol-hipoclorito con sulfato de amonio como estándar (Weatherburn, 1967).

5.11 EFECTO DE LA FUENTE DE CARBONO SOBRE EL PERFIL DE ACTIVIDAD DE MDH

Se creció a *S. coelicolor* M145 en matraces Erlenmeyer de 1000 ml con 200 ml de MM con las siguientes fuentes de carbono: glucosa, fructosa, maltosa, acetato y malato a una concentración de 0.5% ó 28 mM. Se tomaron muestras a las 0, 12, 18, 24, 36, 60 y 84 hr de cultivo para medir actividad, crecimiento y concentración de azúcares y amonio en el medio. Las muestras de tiempo cero se tomaron del medio 2xYT utilizado para inocular el MM tomando en cuenta la dilución. El experimento con maltosa, acetato y malato se realizó por duplicado, mientras que con glucosa y fructosa se hizo por triplicado.

5.12 ELECTROFORESIS DE POLIACRILAMIDA Y TINCIÓN DE PROTEÍNAS EN LOS GELES

La separación de proteínas de los ELCs por electroforesis en poliacrilamida se realizó en geles al 9% siguiendo la metodología reportada por Bollag y colaboradores (1996) en condiciones

no desnaturalizantes (ND-PAGE) adicionando 2 µg de proteína por pozo. Las proteínas se tiñeron con la técnica de nitrato de plata.

5.13 IDENTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE MDH EN GELES DE POLIACRILAMIDA (ZIMOGRAMA)

Para la identificación de las bandas de actividad en los geles ND-PAGE, se agregaron 15.43 mg de NADH a 70 ml del amortiguador de electroforesis y después del corrimiento, los geles se lavaron dos veces por 10 min en amortiguador Tris-HCl 0.01M, pH 7.5. Después se colocaron en 15 ml de una mezcla de reacción conteniendo 10 mg de oxaloacetato y 5 mg de NADH. Después de unos minutos de incubación a temperatura ambiente, los geles se colocaron sobre un transiluminador bajo luz UV y se observaron bandas oscuras de actividad sobre un fondo claro (Mendoza, 2005).

5.14 EXTRACCIÓN DEL ÁCIDOS NUCLEICOS DE *S. coelicolor*

El DNA se extrajo utilizando el Kit de Extracción de gDNA de Sangre (Eppendorf). Los ácidos nucleicos totales (TNAs) se extrajeron mediante el método de Kirby modificado (Kieser et al., 2000). Las muestras de TNA fueron tratadas una hora a 37°C con 7.5 U de DNAsal libre de RNasa (Promega) en 40 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM MgSO₄ y 1 mM CaCl₂. Las concentraciones de ácidos ribonucleicos se determinaron por absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000; su integridad fue confirmada por electroforesis en agarosa al 2%.

5.15 REACCIÓN DE RETROTRANSCRIPTASA

50 ng de RNA fueron convertidos a cDNA utilizando la enzima transcriptasa reversa M-MLV (Promega) y 10 pmoles de cada iniciador antisentido. Para cada muestra de RNA se realizó un control negativo de PCR sin transcriptasa reversa para verificar que no hubiera producto de reacción por contaminación con DNA genómico. Siempre se incluyó también un control positivo de PCR utilizando DNA como templado.

5.16 DISEÑO DE INICIADORES

Para la amplificación por PCR de los fragmentos de cDNA deseados se diseñaron iniciadores sentido (5' CAGTACCCGGACATCTTCCA 3') y antisentido (5' GAACTCGTTGATGTCCAGGC 3'), mediante el programa DNAMAN, para obtener un fragmento de 329 pb del gen *mdh*. Para el gen *hrdB* se utilizaron los iniciadores reportados por Aigle y colaboradores en el 2005 que producen un producto de PCR de 109 pb (sentido: 5' CGC GGCATG CTC TTC CT 3'; antisentido: 5' AGG TGG CGT ACG TGG AGA AC 3') (Fig. 11).

5.17 AMPLIFICACIÓN POR PCR DE LOS FRAGMENTOS *mdh* y *hrdB*

La amplificación por PCR se realizó incubando 1 µl de cDNA (proveniente de 2 ng de RNA) en 20 µl de volumen de reacción (amortiguador GoTaq 1x, dNTPs 0.2 mM, MgCl₂ 1.5 mM, iniciadores 0.15 µM, DMSO 5% y 0.5 U de Taq polimerasa). La enzima utilizada fue la GoTaq (Promega). Se realizaron 36 ciclos de reacción para *mdh* y 38 para *hrdB*, en ambos casos cada ciclo consistió en desnaturalización (1 min a 94°C), hibridación entre templado e iniciadores (30 seg a 55°C) y extensión (30 seg 72°C).

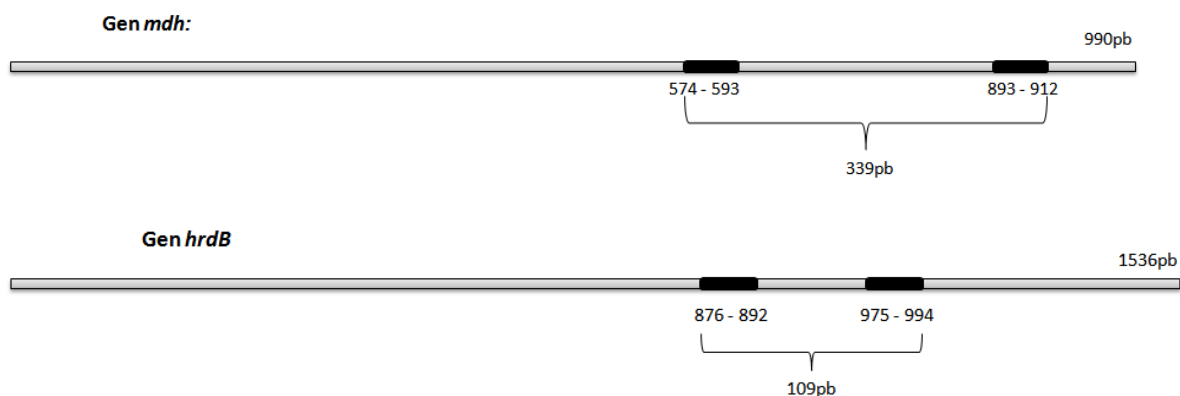


Figura 11. Localización de los fragmentos de los genes *mdh* y *hrdB* amplificados por PCR. Gris: gen completo. Negro: iniciadores. El gen *mdh* contiene 990 pb y el fragmento amplificado es de 339 pb. El gen *hrdB* tiene 1536 pb y el fragmento amplificado es de 109 pb.

5.18 ESTANDARIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE PCR

Esta metodología se estandarizó como se ha indicado por Marone y colaboradores en el 2001. Se utilizó al gen *hrdB* como control ya que se ha reportado que su transcripción es constitutiva (Kang *et al.*, 1997).

Se realizó una curva de concentración de magnesio en el PCR y se probaron concentraciones desde 1 hasta 4 mM, mediante la cual se concluyó que el mejor rendimiento y con menos bandas inespecíficas se obtiene con 1.5 mM de MgCl₂. Igualmente se probaron diferentes concentraciones de iniciadores, de 0.15 a 0.45 μM, en los tres casos se obtuvo un buen rendimiento aunque con 0.15 μM se detectaron menos bandas inespecíficas, por lo cual se eligió esta concentración. Finalmente, se realizó una curva de ciclos por medio de la cual se decidió efectuar 36 ciclos para *mdh* y 38 para *hrdB*.

5.19 SECUENCIACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR

Se secuenciaron mediante una reacción de PCR con los iniciadores antisentido utilizando el Kit Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems) utilizando un secuenciador automático ABI-PRISM 310 (Perkin Elmer) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.

5.20 ANÁLISIS DE LOS PRODUCTOS DE PCR

Los productos de PCR se corrieron en geles de agarosa al 2% durante 25 minutos a 120 volts y las intensidades de las bandas obtenidas se observaron y analizaron con el sistema de imágenes Gel Logic 200 (Kodak).

6 RESULTADOS

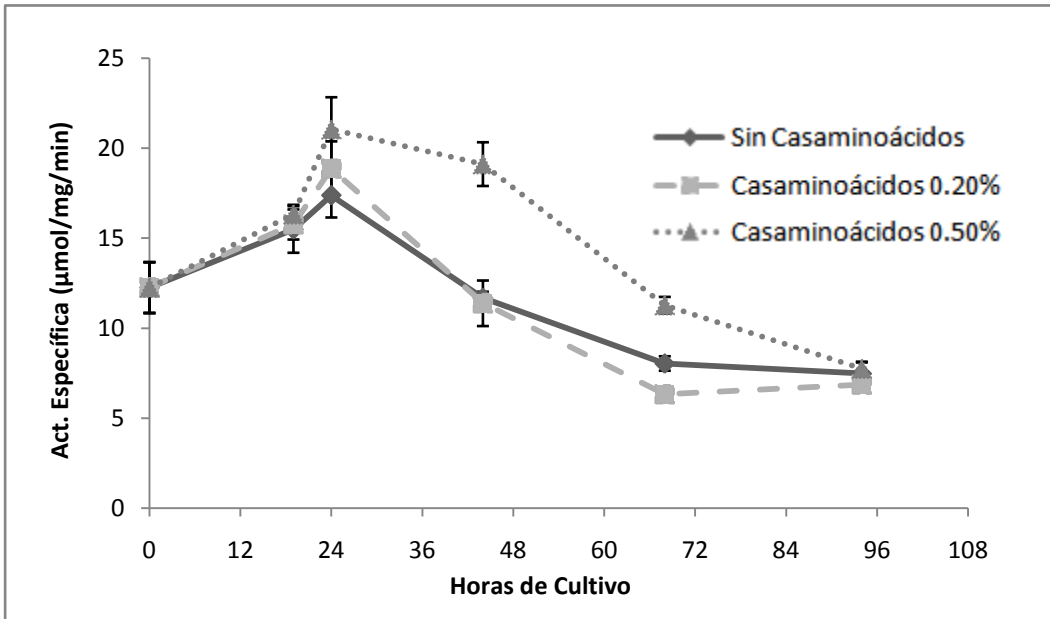
6.1 PERFILES DE ACTIVIDAD DE MDH AL CRECER A *S. coelicolor* EN MEDIO MÍNIMO SUPLEMENTADO CON CASAMINOÁCIDOS

Se ha reportado que *S. coelicolor* crece muy poco y muy lento en medio mínimo por lo que varios autores han optado por suplementarlo con casaminoácidos (Kieser *et al.*, 2000; Strauch *et al.*, 1991, Komanec *et al.*, 1997). En nuestro caso, decidimos asegurarnos de que la presencia de estos compuestos en el medio de cultivo no afectara el perfil de actividad de MDH. Con este fin se creció a la bacteria en medio sin casaminoácidos y en presencia 0.2 y 0.5% estos compuestos y se tomaron muestras de micelio en diferentes etapas de crecimiento para obtener los perfiles de actividad y crecimiento (Fig. 12 A y B respectivamente).

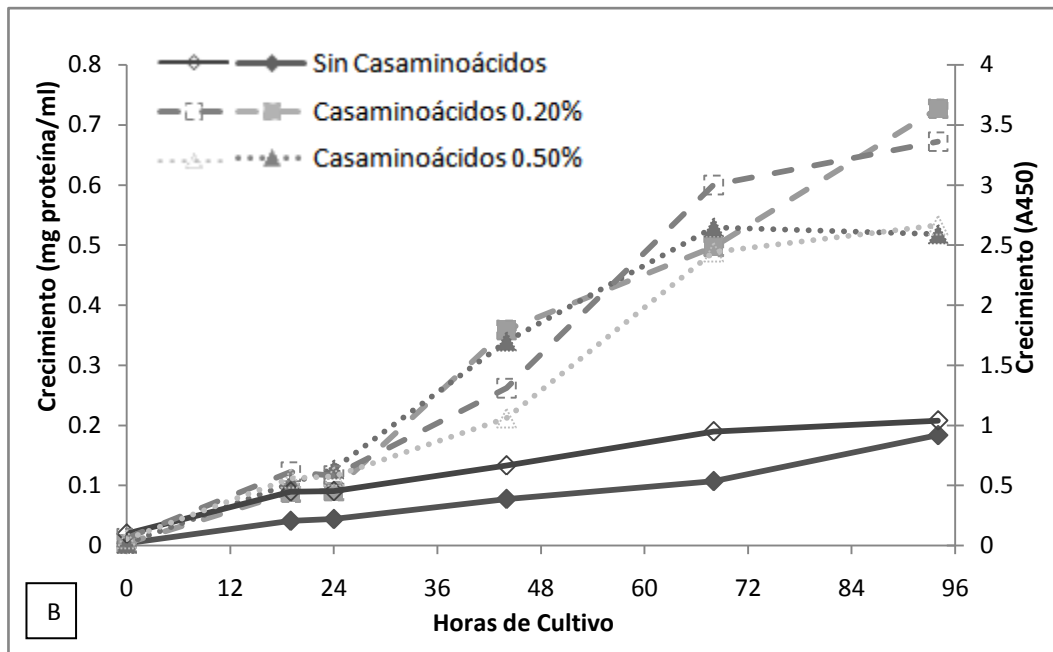
El perfil de actividad específica de la MDH de *S. coelicolor* mostró que la actividad aumenta durante las primeras horas de crecimiento hasta llegar a un valor máximo a las 24 horas y después disminuye. Este perfil fue prácticamente idéntico sin casaminoácidos y adicionando 0.2% de estos en el medio (Fig. 12 A); aunque la presencia de estos compuestos causó un aumento considerable en el crecimiento (Fig. 12 B) con 0.5% de casaminoácidos el perfil de actividad es esencialmente igual aunque la velocidad a la que disminuye la actividad después de alcanzar el pico es menor a la observada en las otras concentraciones. Basándonos en estos resultados se decidió adicionar 0.2% de casaminoácidos en los próximos experimentos.

Por otro lado, estos resultados también muestran que efectivamente se logró obtener un crecimiento disperso de la bacteria ya que la gráfica de crecimiento cuantificado por medio de la absorbancia a 450 nm es muy similar a la obtenida al cuantificarlo como proteína por el método de Lowry (Fig. 12 B).

Con base en los resultados obtenidos en este experimento se estableció cultivar a la bacteria durante cuatro días tomando muestras a las 0, 12, 18, 24, 36, 60 y 84 horas.



A



B

Figura 12. Perfiles de actividad específica de la malato deshidrogenasa (A) y de crecimiento de *S. coelicolor* (B) al cultivarse en MM con fructosa como fuente de carbono suplementado con 0, 0.2 y 0.5 % de casaminoácidos. En B) Símbolos vacíos: crecimiento cuantificado por A_{450} ; símbolos llenos: crecimiento cuantificado como proteína por el método de Lowry.

6.2 EFECTO DE LA FUENTE DE CARBONO SOBRE EL PERFIL DE ACTIVIDAD DE MDH DE *S. coelicolor*

Después de realizar todas las estandarizaciones necesarias, finalmente fue posible cultivar a *S. coelicolor* en medio mínimo suplementado y en presencia de diferentes fuentes de carbono, obtener el ELC de las diferentes etapas de crecimiento para cuantificar la actividad específica de MDH y determinar si los perfiles obtenidos se relacionan con los de crecimiento o con el consumo de azúcares o de amonio.

Las fuentes de carbono que se probaron en este estudio fueron glucosa, fructosa, maltosa, acetato y malato, las cuales fueron elegidas por las siguientes razones: glucosa es la fuente de carbono más fácilmente asimilable por este organismo, además de que se han reportado una gran cantidad de ejemplos de represión catabólica por este sustrato (Hodgson, 2000). En *Sacharopolyspora erythraea* se reportó un perfil de actividad de MDH distinto al crecer en medio con fructosa que en otras fuentes de carbono (Mendoza, 2005). Novotna y colaboradores en el 2003 realizaron análisis proteómicos de *S. coelicolor* en crecimiento diáuxico en MM con maltosa y glutámico como fuentes de carbono y nitrógeno, y reportaron que la síntesis de MDH ocurre al inicio del crecimiento y posteriormente se detiene.

A pesar de las dificultades que presenta trabajar con este tipo de bacterias se lograron obtener perfiles muy similares en las diferentes repeticiones. Así, en la figura 13 podemos analizar los perfiles observados en cada una de las fuentes de carbono probadas.

Al crecer en presencia de glucosa como fuente de carbono el perfil de actividad de MDH parece estar asociado al crecimiento ya que cuando la bacteria se encuentra en la etapa de crecimiento miceliar la actividad se incrementa a lo largo del tiempo y disminuye cuando la bacteria deja de crecer. Esto se relaciona también con el perfil de consumo de azúcares ya que mientras hay crecimiento hay consumo de glucosa y deja de crecer cuando se termina este nutriente. Respecto al consumo de amonio se observa que este disminuye mientras el micelio está en crecimiento pero su concentración aumenta cuando deja de crecer, esto puede deberse al amonio producido por la degradación de los casaminoácidos (Fig. 13 A).

A diferencia de lo observado en glucosa, al crecer en presencia de fructosa la actividad de MDH se induce en las primeras horas de cultivo y después disminuye aunque la bacteria continúa

creciendo. El consumo de nutrientes es muy bajo o nulo en las primeras horas de cultivo, justo cuando la actividad aumenta, cuando el consumo de nutrientes se acelera el perfil de actividad comienza a declinar, es decir, cuando la bacteria crece en medio con fructosa como fuente de carbono, el perfil de actividad no está asociado a crecimiento pero sí a un cambio metabólico relacionado con la asimilación de carbono y nitrógeno (Fig. 13 B).

Cuando la bacteria fue cultivada en presencia de maltosa como fuente de carbono la actividad se incrementó en las primeras horas de cultivo, en las cuales se observó consumo de este nutriente, después de lo cual se detectó una fase lag en el crecimiento, el consumo de maltosa se detuvo y la actividad comenzó a disminuir aunque sorprendentemente la bacteria continuó creciendo durante varios días más (Fig. 13 C).

Al crecer en presencia de acetato ó malato como fuentes de carbono la actividad también aumentó en las primeras horas de cultivo para después disminuir aunque el crecimiento continúa durante varios días (Fig. 13 D y E).

En la figura 14 podemos comparar los perfiles obtenidos entre las diferentes fuentes de carbono. Los perfiles de crecimiento nos muestran que en presencia de glucosa el crecimiento es más rápido que en las otras fuentes de carbono y en maltosa, acetato y malato se observa un menor y más lento crecimiento (Fig. 14 A).

Al comparar los perfiles de actividad observamos que todos son similares ya que aumentan en las primeras horas de cultivo y después disminuyen (Fig. 14 B), sin embargo en glucosa se observa una diferencia ya que después de aumentar al inicio del crecimiento, en vez de declinar la actividad (como en los otros casos) se observa una pequeña meseta y después vuelve a incrementarse hasta llegar a un máximo cuando entra a la etapa de crecimiento estacionaria. Por otro lado, estos perfiles nos muestran que la velocidad a la que decae la actividad es proporcional a la velocidad de crecimiento, así; en presencia de glucosa el crecimiento es más rápido y la velocidad a la que decae la actividad en el tiempo de cultivo también es la más rápida, mientras que en acetato y malato el crecimiento es más lento al igual que la velocidad a la que disminuye la actividad de MDH.

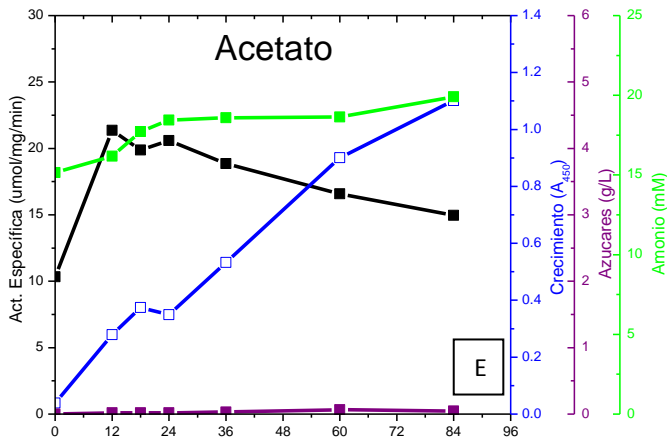
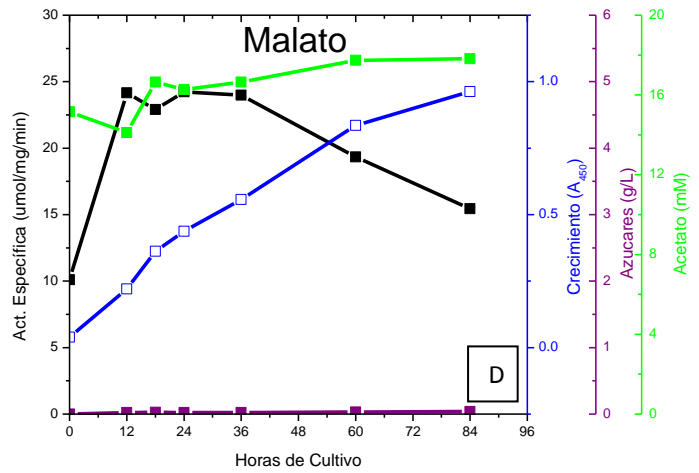
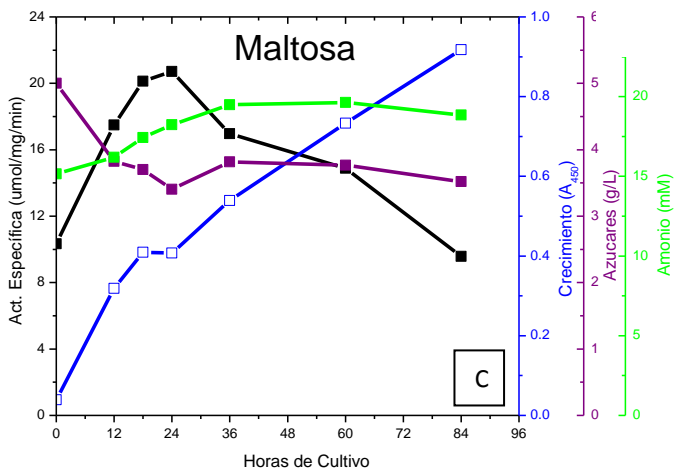
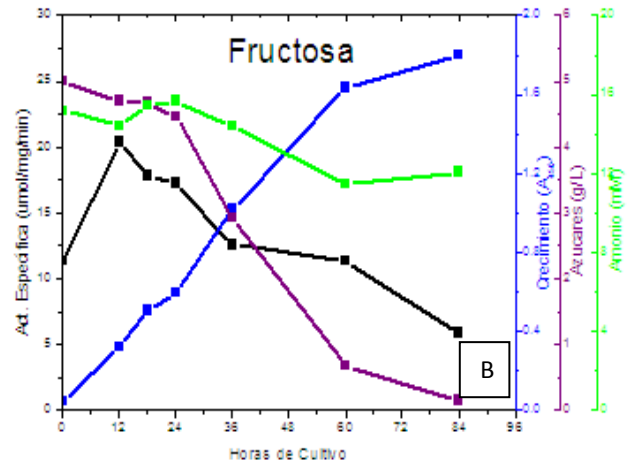
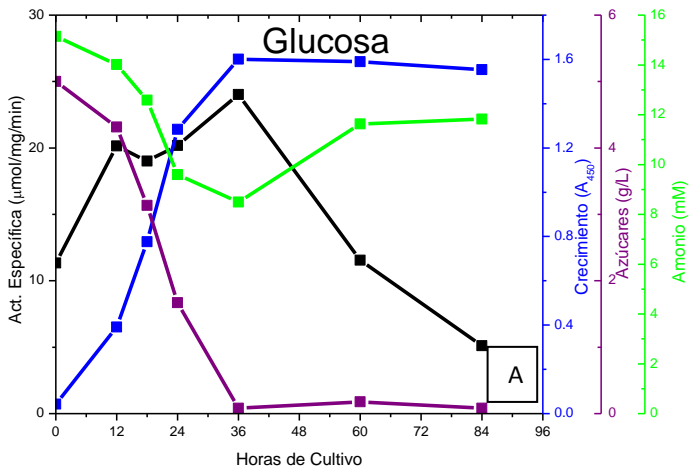


Figura 13. Perfiles de actividad específica de la malato deshidrogenasa (negro), consumo de azúcares (morado), amonio (verde) y crecimiento (azúl) de *S. coelicolor* al cultivarse en MM suplementado en presencia de diferentes fuentes de carbono: A) glucosa, B) fructosa, C) maltosa, D) malato y E) acetato.

Tanto en presencia de glucosa como de fructosa la fuente de carbono se consume completamente, aunque esto ocurre más rápidamente en glucosa; sin embargo, en el caso de maltosa, ésta sólo es consumida en las primeras horas de cultivo sugiriendo que el crecimiento posterior es debido a la utilización de los casaminoácidos (Fig. 14 C).

La figura 14 D nos muestra los perfiles de consumo de fuente de nitrógeno (amonio), resultando sorprendente que en presencia de fuentes de carbono como maltosa, acetato y malato no se detectó consumo de este nutriente lo que puede deberse a que éste se compensa con el amonio producido por la degradación de los casaminoácidos. Al crecer en presencia de glucosa la velocidad de consumo de amonio fue mayor a la observada en fructosa, lo que concuerda con las velocidades de crecimiento y de consumo de azúcares.

Las figuras 14 C y D nos muestran un bajo consumo de carbono y nitrógeno (amonio) en las primeras horas de cultivo justamente en la etapa que presenta un aumento en la actividad de MDH, para explicar esto, planteamos que una o varias de las siguientes hipótesis podrían causar el crecimiento observado en esta etapa:

1. Está utilizando los casaminoácidos como fuente de carbono y nitrógeno.
2. Está creciendo a partir de las reservas intracelulares de las esporas pre-germinadas, ya que antes de inocular en MM las esporas se pre-germinan durante 8 h en MC 2xYT.
3. El crecimiento realmente es debido a los pocos nutrientes que consume.

Para resolver este punto se cuantificó la concentración de nutrientes a lo largo del tiempo de cultivo de la bacteria en MM en presencia y ausencia de casaminoácidos (Fig. 15). Los resultados muestran que en presencia de casaminoácidos los nutrientes son consumidos a baja velocidad al inicio del cultivo (alrededor de las primeras 18 horas de incubación) y después el consumo se acelera hasta que se acaba la fuente de carbono (Fig. 15 B). Por el contrario, en ausencia de casaminoácidos, el consumo de nutrientes es muy bajo durante todo el tiempo de cultivo lo que seguramente se debe a la baja velocidad de crecimiento (Fig. 15 A). Esto descarta nuestra primera hipótesis mostrando que el crecimiento observado al inicio del cultivo no es debido al consumo de casaminoácidos, ya que de ser así, en su ausencia, se observaría una mayor velocidad de consumo de fructosa y de amonio.

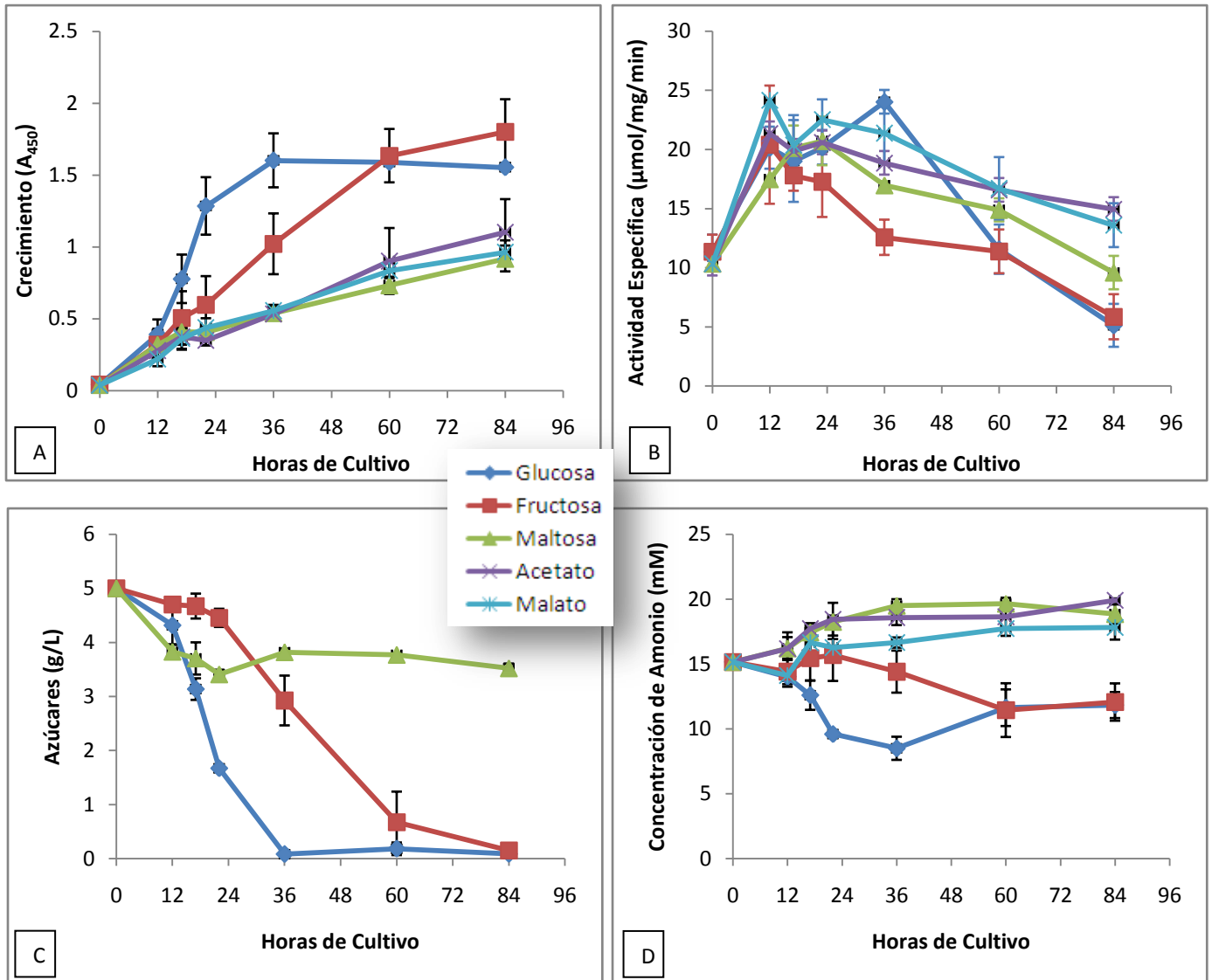


Figura 14. Perfiles de A) crecimiento, B) actividad específica de malato deshidrogenasa, C) consumo de azúcares y D) consumo de amonio al cultivar a *S. coelicolor* en MM suplementado en presencia de glucosa, fructosa, maltosa, acetato ó malato como fuentes de carbono.

Con el fin de elucidar entre las otras dos hipótesis se cultivó a la *S. coelicolor* en MM suplementado con casaminoácidos con fructosa o glucosa como fuentes de carbono y dos matraces control: uno sin fuente de carbono ni de nitrógeno ni casaminoácidos y otro sin fuente de carbono ni de nitrógeno pero con casaminoácidos (Fig. 16). En ausencia de casaminoácidos y de fuentes de carbono y nitrógeno no se detectó crecimiento (Fig. 16 A) lo que nos indica que las reservas intracelulares de las esporas pre-germinadas no son las causantes del crecimiento observado al inicio del cultivo con lo que descartamos la segunda hipótesis. La figura 16 B nos muestra que en todos los casos la actividad de MDH aumentó al inicio el cultivo (aunque en glucosa presenta una segunda fase de inducción, como se había observado ya anteriormente) y la intensidad de esta inducción parece estar inversamente relacionada con la velocidad de crecimiento, así en MM con glucosa se observó un mayor crecimiento y la actividad de MDH a las 12 h es menor a la observada en las otras condiciones mientras que en ausencia de nutrientes (control 1) se detectó la mayor actividad de MDH a las 12 h y el crecimiento fue nulo (Fig. 16 A y B). Como era de esperarse, en ausencia de nutrientes no se detectó amonio mientras en presencia de casaminoácidos pero sin otra fuente de carbono ni nitrógeno hubo liberación de amonio al medio por la degradación de estos compuestos (Fig. 16 C).

De esta forma se descartaron las primeras dos hipótesis sobre el crecimiento observado en las primeras horas de cultivo y su relación con el poco consumo de nutrientes lo que sugiere fuertemente que la tercera hipótesis es la correcta, es decir el crecimiento realmente es debido al consumo de nutrientes y estimulado por los casaminoácidos. Sin embargo, el consumo de carbono y nitrógeno no es tan claramente detectado a causa de la baja velocidad de crecimiento en esta etapa (aproximadamente en las primeras 18 horas de cultivo).

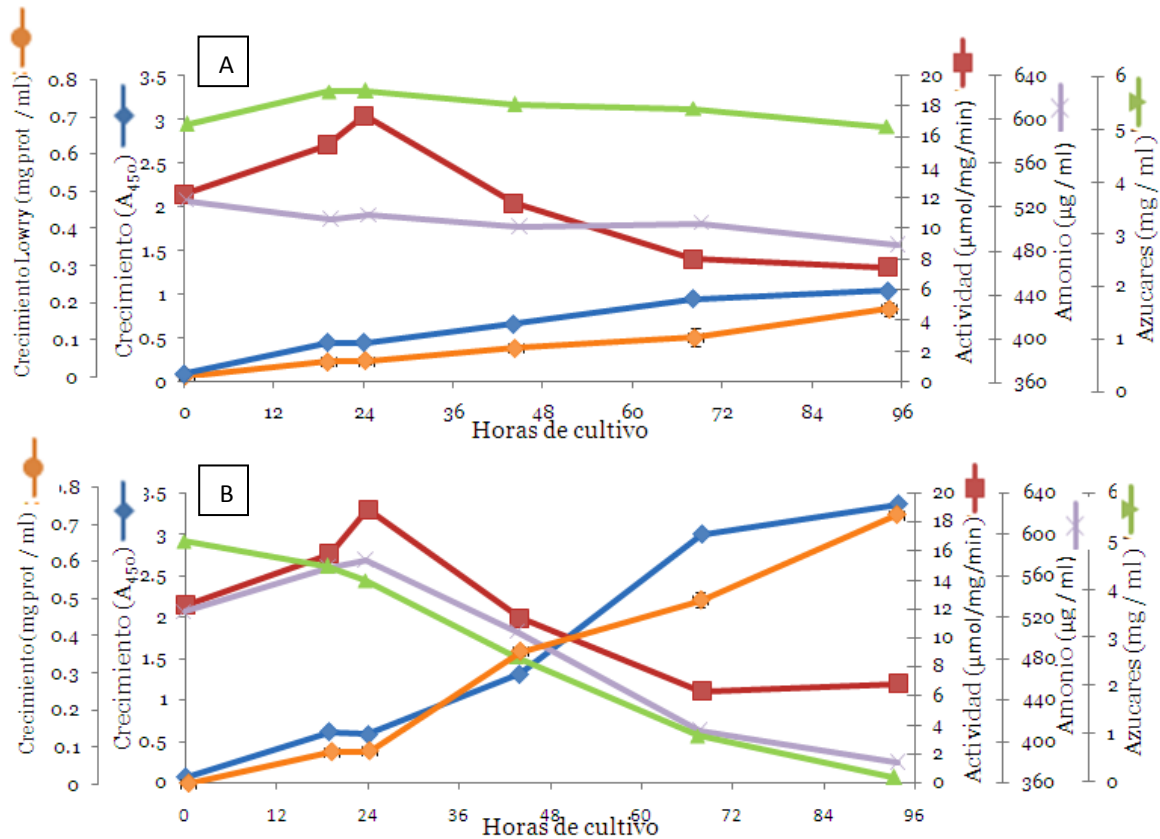


Figura 15. Perfiles de actividad de MDH, crecimiento de la bacteria cuantificado como proteína por el método de Lowry y como A₄₅₀, consumo de azúcar (fructosa) y consumo de amonio a lo largo del crecimiento de *S. coelicolor* cultivado en A) MM sin casaminoácidos y B) MM suplementado con 0.2% de casaminoácidos.

Para verificar los resultados obtenidos en los perfiles de actividad las muestras de ELC de los diferentes tiempos de cultivo en medio con glucosa y fructosa se corrieron en geles de acrilamida al 9% en condiciones no desnaturizantes y se realizaron los zimogramas, posteriormente se tiñeron para proteínas para analizar el patrón general de bandas y mediante el cálculo del RF identificar la banda correspondiente a nuestra enzima (Fig. 17). Los zimogramas nos confirman que en todas las muestras de ELC tenemos proteína activa. Al teñir estos geles nativos (ND) con nitrato de plata notamos que la enzima corre un poco debajo de la banda monomérica de albúmina sérica bovina de 66 kDa, lo cual concuerda con lo reportado en la bibliografía para otras MDHs, que son generalmente homodiméricas u homotetraméricas con un peso molecular aproximado de 30 kDa para cada subunidad (Tabla 1).

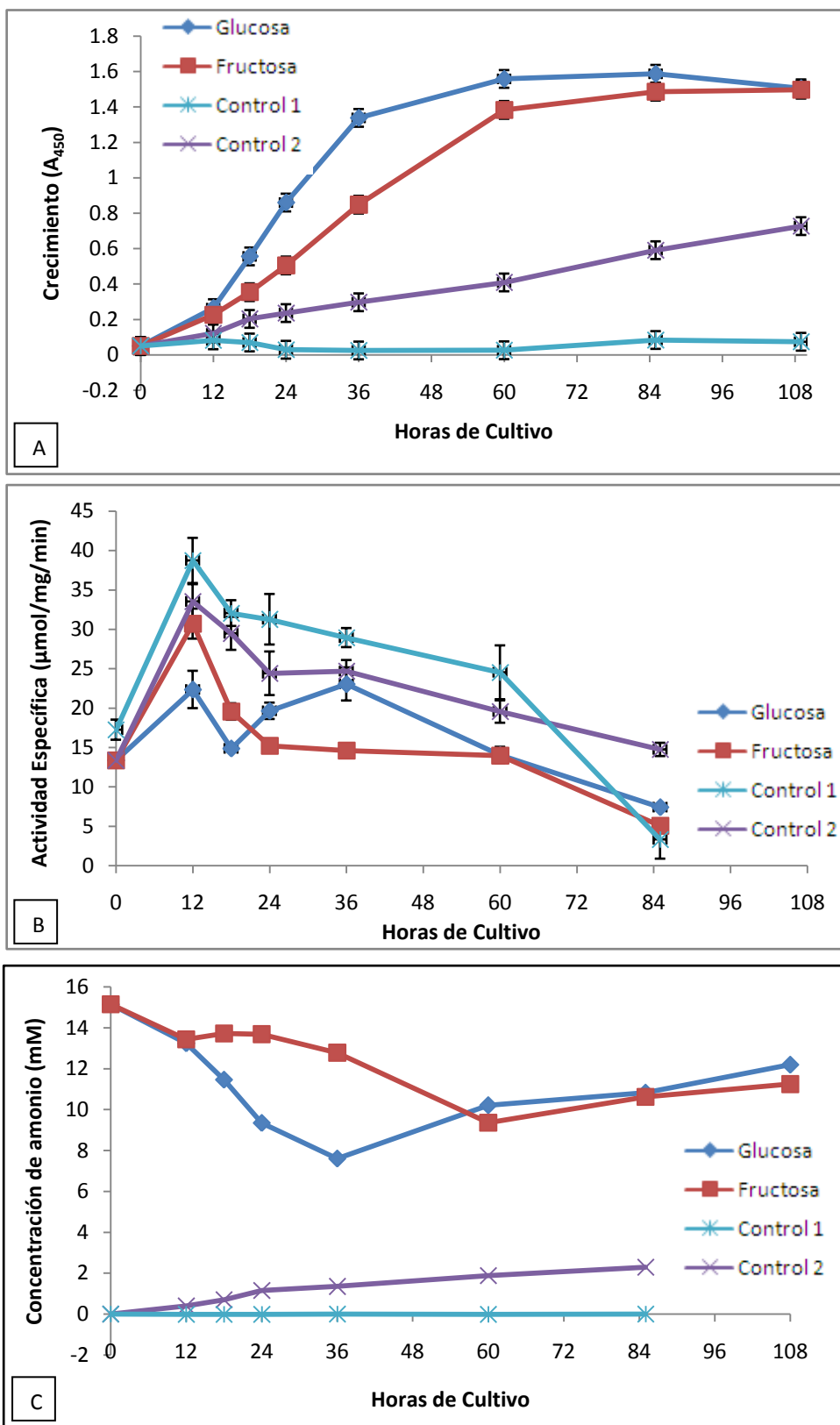


Figura 16. Perfiles de A) crecimiento de la bacteria, B) actividad de MDH y C) consumo de amonio a lo largo del crecimiento de *S. coelicolor* cultivado en MM con glucosa o fructosa como fuentes de carbono y en los siguientes controles de medio mínimo: 1) sin fuente de carbono, ni de nitrógeno, ni casaminoácidos; 2) sin fuente de carbono, ni de nitrógeno, con casaminoácidos.

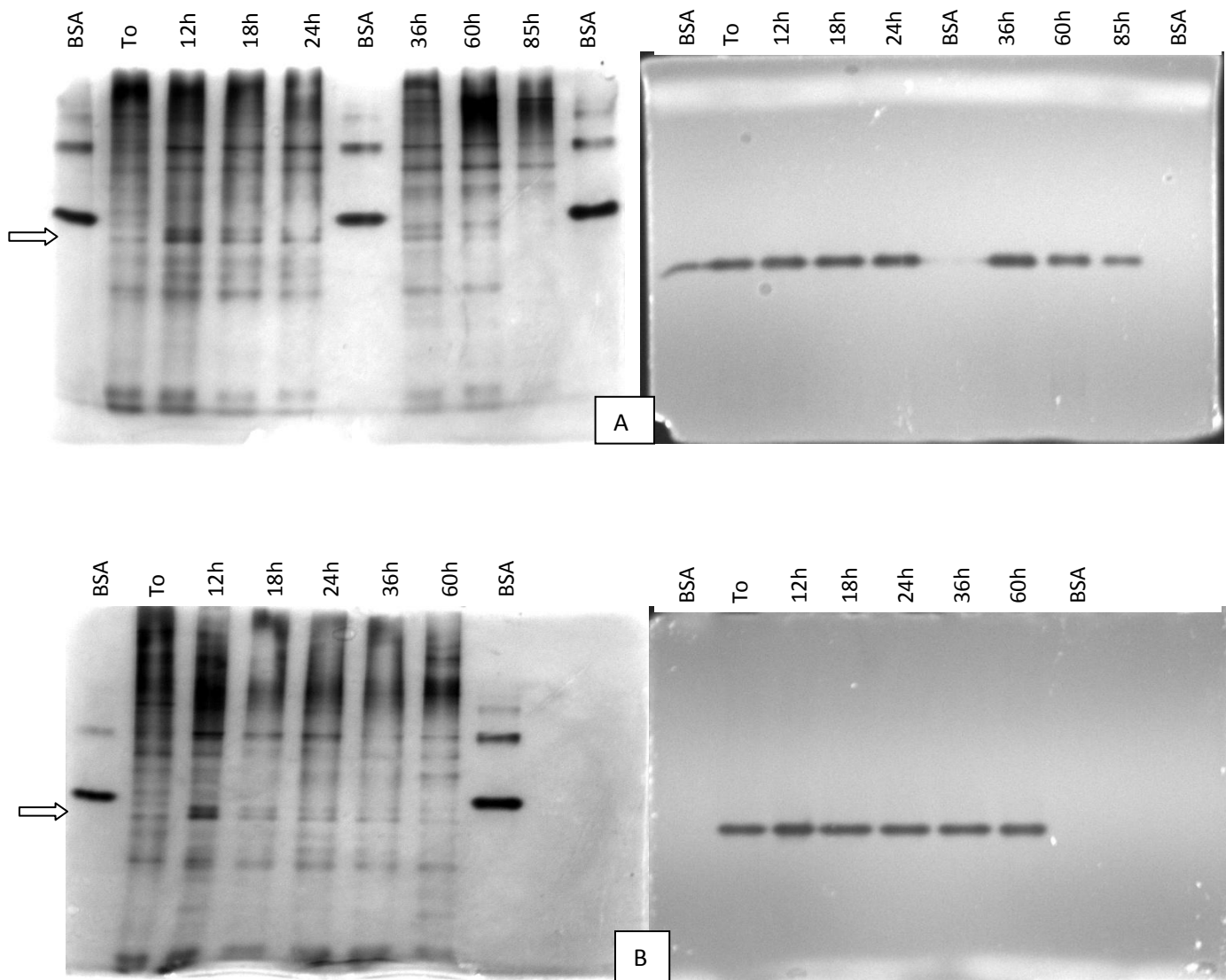


Figura 17. Electroforesis ND-PAGE al 9% con los ELCs de diferentes horas de cultivo de *S. coelicolor* crecido en MM con A) glucosa o B) fructosa como fuente de carbono. A la izquierda: Tinción de proteínas con nitrato de plata. A la derecha: Zimogramas de MDH. En cada pozo se pusieron 2 μ g de proteína total. Las flechas indican la posición de MDH.

6.3 RT-PCR SEMICUANTITATIVO

Como el perfil de actividad de MDH al crecer en presencia de glucosa fue distinto al observado en las otras fuentes de carbono, se decidió analizar lo que sucede a nivel de la transcripción de este gen en las diferentes etapas de cultivo creciendo en glucosa o fructosa como fuentes de carbono. Los niveles de transcripción fueron determinados mediante RT-PCR semicuantitativo.

La técnica de RT-PCR semicuantitativo se basa en cuantificar la intensidad de las bandas en un gel de agarosa producidas por productos de PCR provenientes de la amplificación de un fragmento del gen de interés de diferentes muestras de cDNA. Partiendo de que para todas las amplificaciones por PCR se utiliza el cDNA proveniente de una misma cantidad de RNA, las diferencias en la intensidad de las bandas son causadas por las diferencias en los niveles de transcripción de una muestra a otra. Sin embargo, para corroborar que las diferencias observadas no son debidas al error experimental se debe incluir la amplificación de un fragmento control perteneciente a un gen cuya transcripción se ha demostrado que es constitutiva. Para esto, en este trabajo se utilizó como control el gen que codifica para HrdB, el factor sigma principal de esta bacteria (gen *hrdB*), cuya transcripción se ha demostrado que es constitutiva aunque su producto es activo solamente durante la etapa de crecimiento exponencial (Kang *et al.*, 1997).

6.3.1 EXTRACCIÓN DEL RNA TOTAL DE *S. coelicolor*

El RNA utilizado para obtener el cDNA para realizar la curva de ciclos de PCR y determinar la confiabilidad de las cuantificaciones se extrajo a partir de un cultivo de *S. coelicolor* incubado durante 18 hr en MM con glucosa como fuente de carbono con el fin de que se encontrara bien crecido y en etapa de crecimiento exponencial para obtener una buena concentración de RNA, que se utilizó para todas las estandarizaciones.

A partir de este cultivo se tomaron 3 muestras de 50 ml cada una y se extrajo el RNA estas se denominaron 1, 2 y 3 (Fig. 18). En las diferentes muestras se obtuvo un muy buen rendimiento de RNA, además de que se logró obtener bastante limpio ya que la relación de absorbancia a 260/280 es mayor a 2 en todos los casos, también fue notorio el buen estado de las muestras de RNA ya

que se observan claramente las dos bandas correspondientes a las subunidades del rRNA, la subunidad grande es mas gruesa y no se detecta un barrido debajo de la subunidad chica.

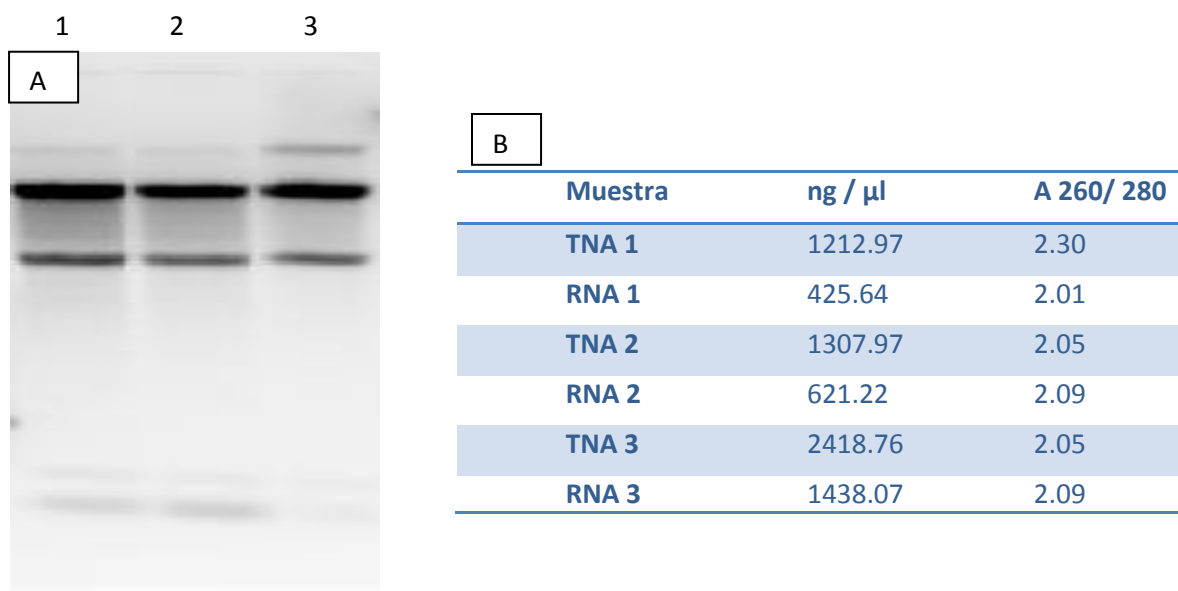


Figura 18. Gel de agarosa al 2%. A) RNA total de *S. coelicolor*. B) Tabla de concentración y pureza de las muestras de RNA y TNA (ácidos nucleicos totales).

6.3.2 RT-PCR DE *mdh* Y *hrdB*

Mediante una reacción con retrotranscriptasa con los iniciadores antisentido para ambos fragmentos se obtuvo el cDNA de *mdh* y *hrdB*. A partir de este cDNA se amplificaron por PCR los fragmentos *mdh* y *hrdB* utilizando DNA como control positivo de amplificación y RNA como control negativo (Fig. 19). Es notorio que, tanto utilizando DNA como RNA como templado se obtiene una única banda bien definida y del tamaño esperado como producto de la amplificación y no se detectó amplificación en los controles negativos. Estos productos de PCR se secuenciaron con lo que se comprobó que las bandas observadas en el gel realmente son y solo son los productos de PCR desados.

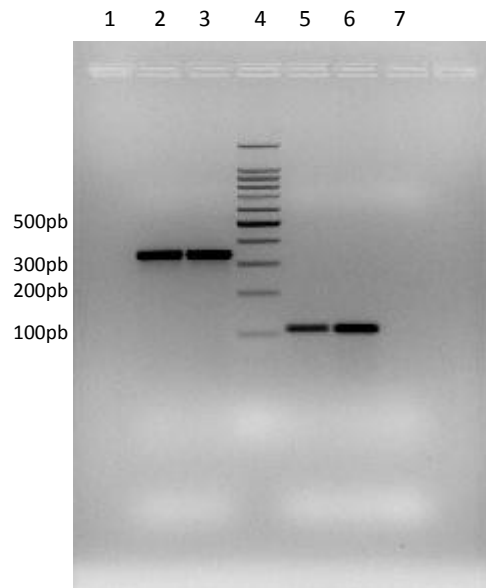


Figura 19. RT-PCR de los fragmentos *mdh* y *hrdB*. Pozos: 1) control negativo *mdh*; 2) RT-PCR *mdh*; 3) control positivo *mdh*; 4) MPM 100pb Promega; 5) RT-PCR *hrdB*; 6) control positivo *hrdB*; 7) control negativo *hrdB*.

6.3.3 CURVA DE CICLOS DE PCR

Para la realización de un RT-PCR semicuantitativo es necesario dejar esta reacción los suficientes ciclos para obtener una banda claramente observable en un gel de agarosa pero tampoco deben ser demasiados ciclos ya que la reacción se debe encontrar en la etapa lineal y no en la estacionaria para que la cuantificación sea válida. Para determinar cuántos ciclos son los adecuados se realizaron reacciones de PCR con diferentes ciclos como se muestra en la figura 20 A. Al analizar la intensidad de las bandas obtenidas en el gel por los productos de amplificación se obtienen las gráficas mostradas en la figura 20 B y C.

Basándonos en estos resultados se decidió realizar 36 ciclos para *mdh* y 38 para *hrdB* en las cuantificaciones relativas de las diferentes muestras de RNA.

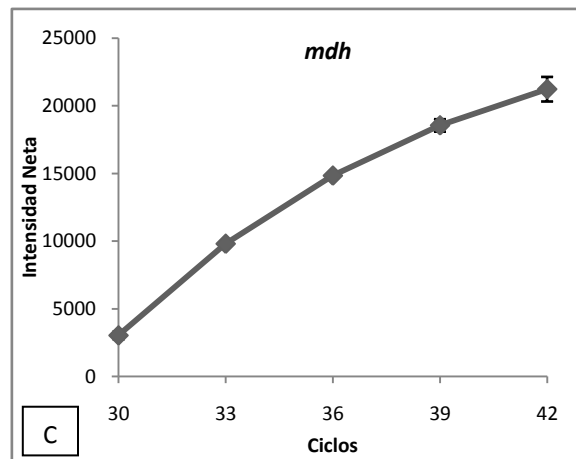
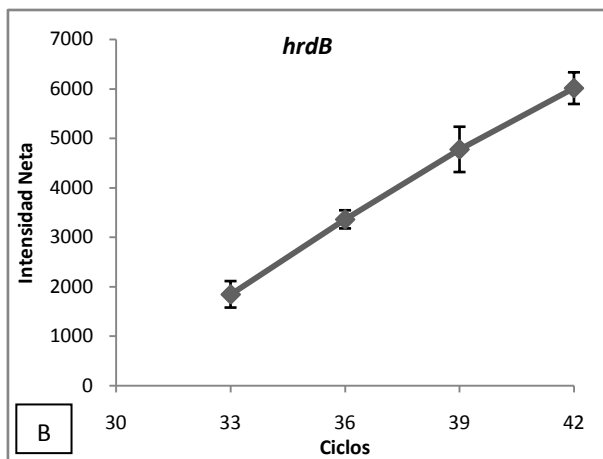
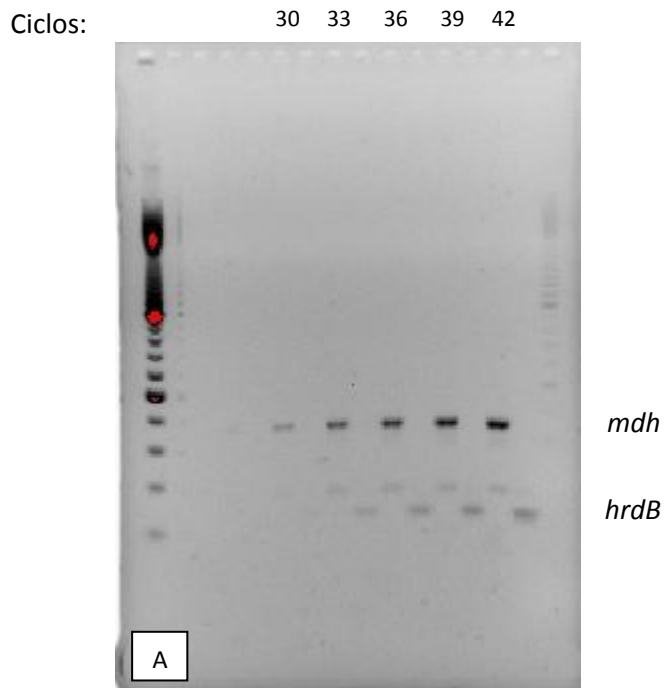


Figura 20. Correlación entre intensidad de las bandas y número de ciclos de PCR para *mdh* y *hrdB*. A) Gel de agarosa al 2%. B y C) Gráficas de los porcentajes de intensidad neta de las bandas mostradas por los amplicones de *hrdB* y *mdh* respectivamente obtenidos a los diferentes ciclos de PCR.

6.3.4 DETERMINACIÓN DE LA CONFIABILIDAD DE RESULTADOS DE RT-PCR SEMICUANTITATIVO

Al realizar esta técnica existen varios factores que pueden causar error experimental. Primero al obtener el RNA debido a que puede haber variaciones en los niveles de degradación, también puede haber errores de pipeteo y manipulación al realizar la reacción con retrotranscriptasa, en el PCR y al adicionar las muestras al gel, por último al analizar la intensidad de las bandas en el transiluminador también hay cierto nivel de error. Así, con el fin de determinar la confiabilidad de los resultados obtenidos por esta técnica se analizó la transcripción del gen *mdh* de las tres muestras de RNA (1, 2 y 3), las cuales, como provienen del mismo cultivo bacteriano, deben mostrar exactamente la misma expresión de este gen. Además para cada caso el PCR se realizó por triplicado, por lo que tenemos nueve muestras que deben mostrar la misma transcripción (Fig. 21).

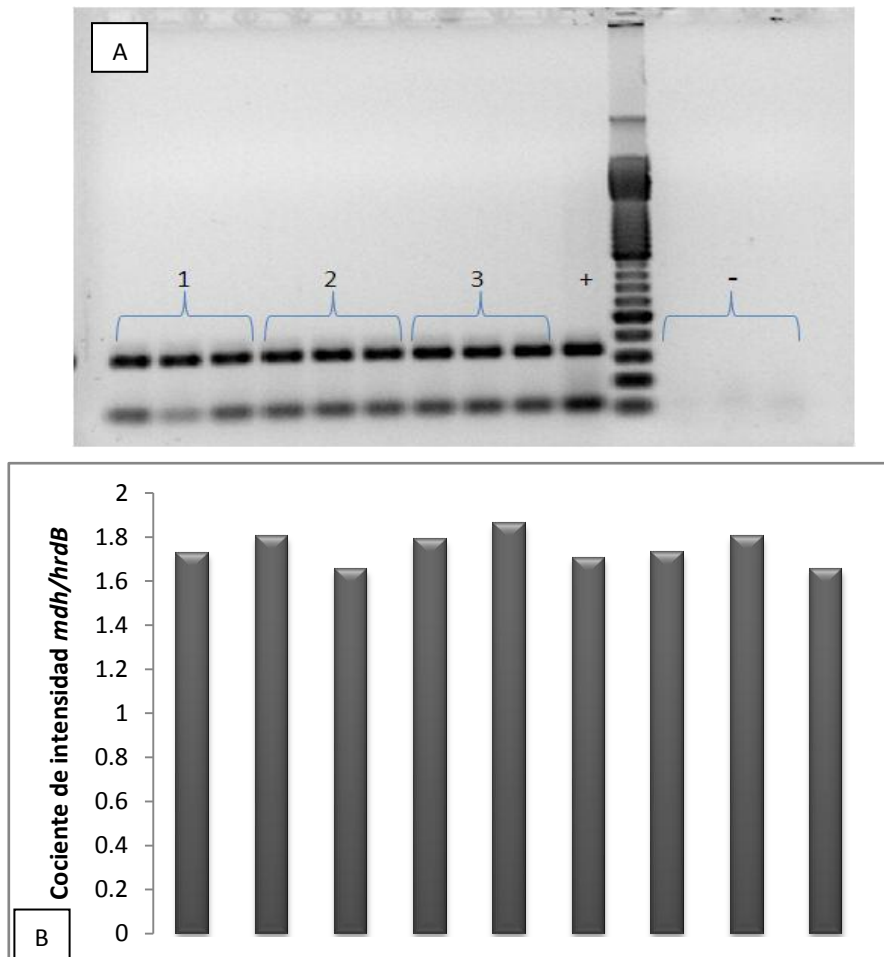


Figura 21. Confiabilidad de la cuantificación relativa de la transcripción de *mdh* en relación a *hrdB* de las muestras de RNA A, B y Z provenientes del mismo cultivo bacteriano realizando cada PCR por triplicado. A) Gel de agarosa al 2% con los productos de amplificación por PCR. El signo + indica el control positivo y el signo - el negativo. B) Gráfica de los cocientes de intensidad neta *mdh/hrdB*.

Para analizar estos datos se calculó el cociente obtenido al dividir la intensidad de cada banda de *mdh* entre su correspondiente valor de *hrdB* (Fig. 21). Los resultados muestran un buen valor de confiabilidad en donde la desviación estándar es menor al 4% del valor cuantificado.

6.4 TRANSCRIPCIÓN DEL GEN *mdh* A LO LARGO DEL TIEMPO DE CULTIVO EN MEDIO CON GLUCOSA O FRUCTOSA COMO FUENTES DE CARBONO

Para analizar la transcripción de *mdh* se obtuvieron las muestras de RNA de las diferentes etapas de cultivo en MM con glucosa o fructosa como fuentes de carbono. Se tomaron 10 ml de medio de cada condición para no afectar mayormente los niveles de aireación en el cultivo, es por esto que en algunas muestras en las que había poco crecimiento o donde el cultivo estaba ya en etapa estacionaria se obtuvo muy poco RNA como se muestra en la tabla 3. A pesar del bajo rendimiento obtenido se realizó el RT-PCR semicuantitativo (Fig. 22 y 23), aunque no fue posible realizar un gel para analizar la calidad del RNA.

Tabla 1. Concentraciones de RNA obtenidas en las diferentes etapas de cultivo en MM con glucosa o fructosa como fuentes de carbono.

Horas de Cultivo:	Glucosa (ng de RNA / μ l)	Fructosa (ng de RNA / μ l)
To	37.45	37.45
12	10.29	8.12
18	71.23	14.15
24	101.21	12.72
36	105.45	87.43
60	127.56	166.68
84	6.51	109.24

Al analizar los datos arrojados por las intensidades de las bandas mostradas en la figura 22 se obtuvieron las gráficas de los perfiles de transcripción del gen *mdh* al cultivar a la bacteria en MM con glucosa o fructosa como fuentes de carbono (Figura 23). Estas gráficas muestran que en el medio de pregerminación hay una alta transcripción de este gen, la cual disminuye considerablemente al cambiar a la bacteria de medio de cultivo, aunque en todas las muestras se obtuvo producto de amplificación de PCR lo que muestra un nivel de transcripción basal. En las

dos fuentes de carbono probadas la transcripción del gen está asociada al crecimiento ya que la cantidad de este mRNA aumenta cuando la bacteria está en etapa de rápida proliferación y disminuye cuando baja la velocidad. Esto concuerda con el perfil de actividad de la enzima al crecer en presencia de glucosa, sin embargo, sorprendentemente el perfil de transcripción es distinto al de actividad al cultivar a la bacteria con fructosa como fuente de carbono, ya que mientras la actividad aumenta en las primeras horas de incubación y después disminuye aunque el crecimiento continúa, la transcripción del gen aumenta mientras el micelio continúa creciendo.

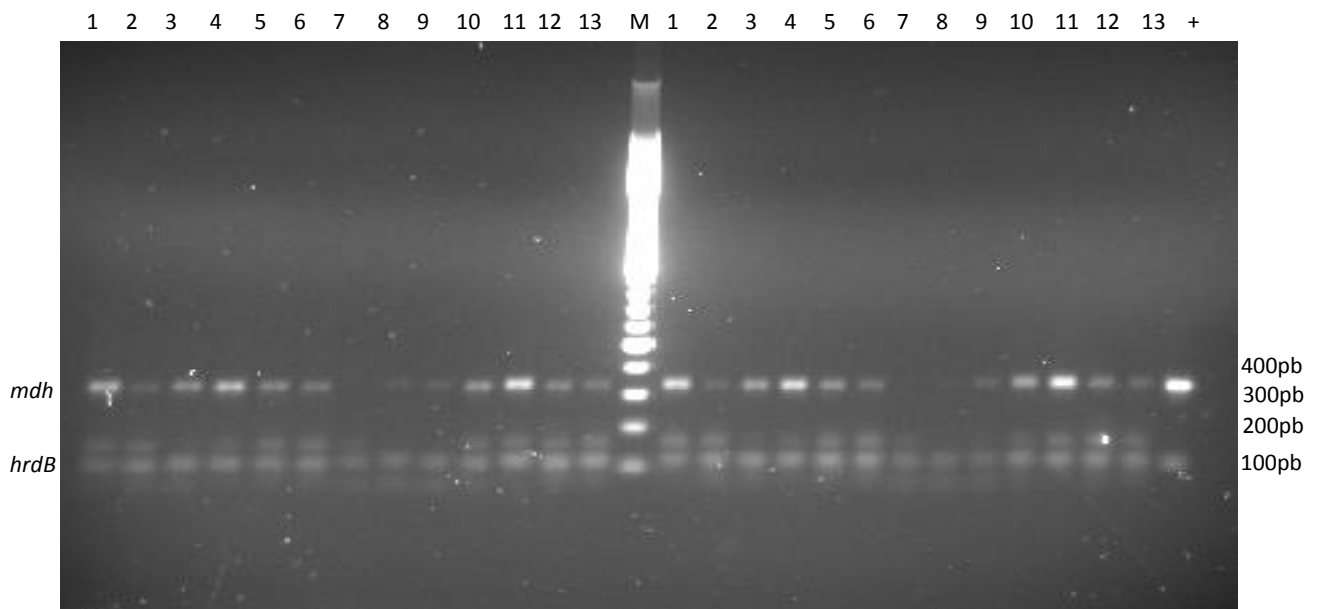


Figura 22. Electroforesis en agarosa al 2% de los productos de RT-PCR de los genes *mdh* y *hrdB* de *S. coelicolor* a lo largo del tiempo de cultivo en MM con glucosa o fructosa como fuentes de carbono. El gen *hrdB* se utiliza como control de transcripción constitutivo. Pozos: 1) MC, 2-7) 12, 18, 24, 36, 60, 84 horas de cultivo en MM con glucosa como fuente de carbono, 8-13) 12, 18, 24, 36, 60, 84 horas de cultivo en MM con fructosa como fuente de carbono M) MPM 100 pb Promega, +) control positivo donde se usa DNA como templado. Los números están duplicados porque son repeticiones de las mismas muestras para confirmar los resultados.

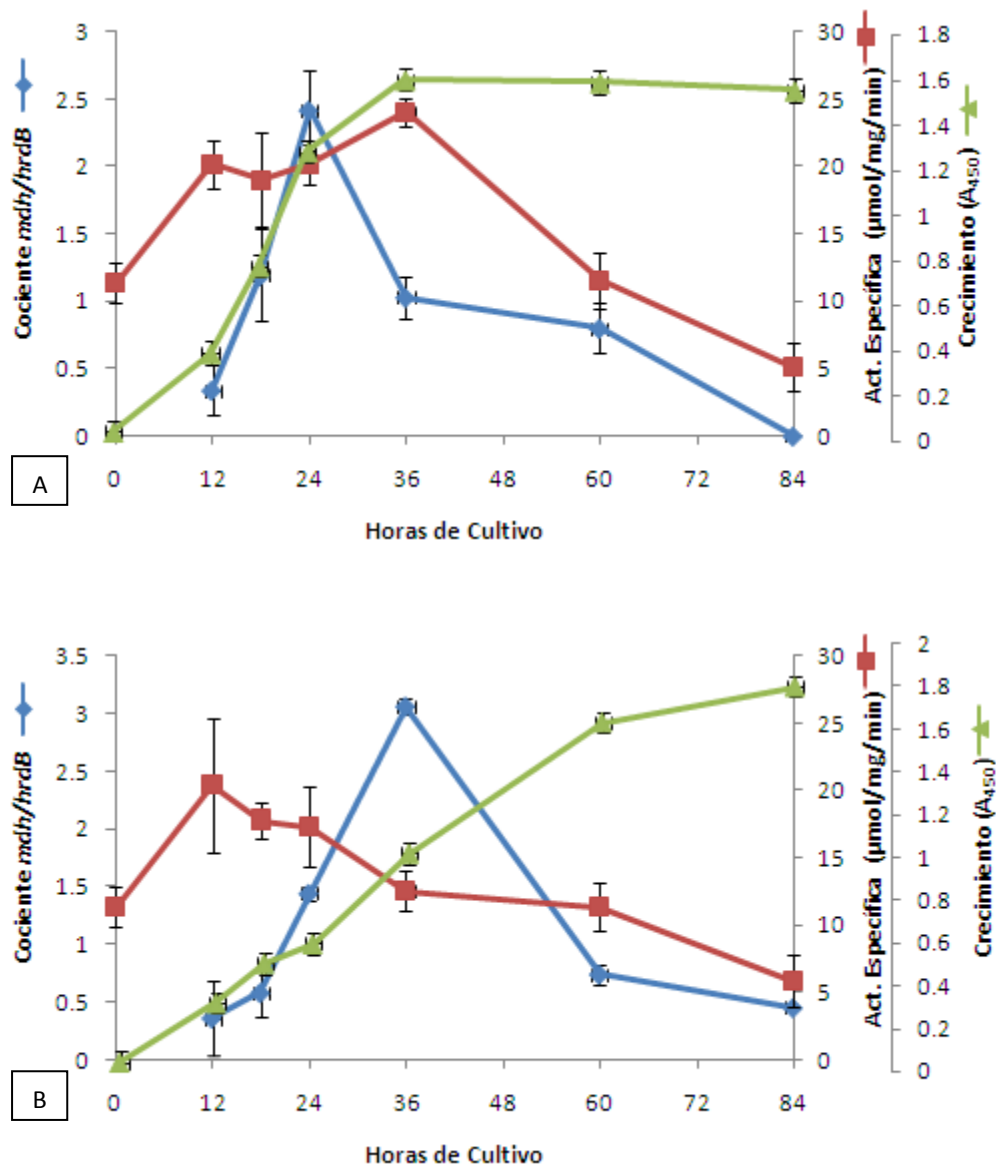


Figura 23. Perfiles de crecimiento (triángulos verdes), transcripción del gen *mdh* (rombos azules) y actividad de MDH (cuadros rojos) de *S. coelicolor* a lo largo del tiempo de cultivo en MM con A) glucosa o B) fructosa como fuentes de carbono. Los valores de transcripción se determinaron por medio de RT-PCR semicuantitativo utilizando el gen *hrdB* como control constitutivo.

7 DISCUSIÓN

En todas las etapas de cultivo y en todas las fuentes de carbono probadas (glucosa, fructosa, maltosa y acetato) se encontró actividad de MDH. Sin embargo, al crecer a la bacteria en presencia de glucosa se encontró una diferencia sustancial en el perfil de actividad al observado en las otras fuentes de carbono (Fig. 13 y 14).

Al crecer a *Streptomyces coelicolor* en presencia de fructosa la actividad de MDH aumenta al iniciar el cultivo y después disminuye aunque la bacteria continúa creciendo, por lo que aparentemente no está asociada a crecimiento. En cambio, en presencia de glucosa como fuente de carbono la actividad sí está asociada a crecimiento ya que aumenta mientras la bacteria se encuentra en la etapa de proliferación y disminuye cuando deja de crecer. En presencia de maltosa, piruvato y malato los perfiles de actividad y crecimiento fueron muy simiales a los observados en fructosa; sin embargo, hubo muy poca proliferación celular por lo que resulta difícil determinar que el perfil de actividad no está asociado a crecimiento, como ocurre en fructosa (Fig. 13).

Estos resultados son similares a los reportados por Novotna y colaboradores (2003), quienes por medio de análisis proteómicos de *S. coelicolor* en crecimiento diáuxico en MM con maltosa y glutámico como fuentes de carbono y nitrógeno concluyeron que la síntesis de MDH se induce al inicio del crecimiento y posteriormente se detiene, este patrón lo observaron también en otras enzimas del TCA como succinato deshidrogenasa, citrato sintasa e isocitrato dehidrogenasa.

Para complementar la información obtenida en los perfiles de actividad, se decidió estudiar los perfiles de transcripción del gen *mdh* al crecer en presencia de glucosa y fructosa, ya que el perfil de actividad observado en glucosa fue distinto al de las otras fuentes de carbono. Por definición, la transcripción de un gen es el proceso mediante el cual la información genética contenida en una hebra de DNA se utiliza para especificar una secuencia de bases complementaria en una cadena de mRNA (Nelson y Cox, 2008).

Los perfiles de transcripción se determinaron mediante un RT-PCR semicuantitativo, mostrando que el perfil del gen *mdh* de *S. coelicolor* al crecer en MM con glucosa o con fructosa como fuentes de carbono está asociada a crecimiento, es decir, la cantidad de este mRNA

aumenta cuando la bacteria está en etapa de rápida proliferación y disminuye cuando baja la velocidad de crecimiento (Fig. 23).

El perfil de transcripción del gen concuerda con el de actividad de la enzima al crecer en presencia de glucosa, sin embargo; en presencia de fructosa el perfil de transcripción se asocia a crecimiento pero la actividad aumenta al inicio del cultivo y después disminuye aunque el crecimiento continúa durante varios días más (Fig. 23). Al comparar esto con lo reportado en la literatura encontramos que se han reportado otros casos en los cuales el perfil de actividad de una enzima no concuerda con el de transcripción del gen que la codifica, tal es el caso del gen *hrdB* que codifica para el factor sigma principal de *S. coelicolor*, cuya transcripción es constitutiva, es decir, la concentración de mRNA es considerablemente constante en todas las etapas de crecimiento, sin embargo, su actividad está asociada a crecimiento ya que su producto sólo es funcional durante la etapa de proliferación por lo que reconoce promotores de genes que se transcriben preferencialmente durante la etapa de crecimiento exponencial (Kang *et al.*, 1997). Otro ejemplo similar es el caso de la enzima glucosa cinasa de *S. coelicolor* que mediante análisis de Western blot se demostró que la concentración de esta proteína se mantiene constante en las diferentes etapas de cultivo y en diferentes fuentes de carbono; sin embargo, su actividad catalítica se regula por la fuente de carbono, es decir, mientras en presencia de glucosa se observa una alta actividad, en presencia de manitol, la actividad es muy baja (van Wezel *et al.*, 2007).

La fase lag es la etapa que sigue de la inoculación al medio y es un período de adaptación. Cuando el cultivo microbiano cambia de un ambiente a otro es necesario reorganizar los constituyentes micro y macromoleculares. Esto involucra la síntesis o represión de enzimas o componentes estructurales de la célula. Como consecuencia la fase lag puede ser muy corta o relativamente larga (Wang *et al.*, 1979).

Esta fase de adaptación, en la que se detiene la síntesis de muchas proteínas, puede relacionarse con el aumento observado en el perfil de actividad de MDH en las primeras horas de cultivo en presencia de fructosa, maltosa, acetato y málico como fuentes de carbono (Fig. 14), debido a una estabilidad diferencial de las proteínas intracelulares, lo que concuerda con el poco consumo de nutrientes observado en esta etapa, es decir, la enzima MDH probablemente es más estable que el promedio de las proteínas intracelulares lo que provocaría un aumento en la actividad específica. Esto se sustenta también al observar que al inocular a la bacteria en MM sin

fuentes de carbono ni de nitrógeno ni casaminoácidos se observa el mismo perfil de actividad de MDH, que aumenta en las primeras horas de cultivo (Fig. 16).

Análisis de microarreglos en *Sac. erythraea* mostraron que la transcripción del gen *sucD* que codifica para la enzima del TCA succinil-CoA ocurre en las primeras horas de cultivo, mostrando que el mRNA aumenta durante las primeras horas de incubación y disminuye cuando baja la velocidad de crecimiento (Lum *et al.*, 2004), este perfil es similar al observado en este trabajo para el gen *mdh* de *S. coelicolor*.

Los perfiles obtenidos en las diferentes fuentes de carbono en *S. coelicolor* reportados en este trabajo, son diferentes a los obtenidos para otros organismos, tales como *E. coli* y *T. thermophilus* en donde se observa una mayor expresión al crecer en fuentes de carbono menos fácilmente asimilables como acetato y málico que en las preferenciales como glucosa y fructosa (Park y Kilbane, 2004; Park *et al.*, 1995). La actividad de la enzima de *C. glutamicum* también fue considerablemente mayor al crecer en acetato que en glucosa (Molenaar *et al.*, 2000). En cambio, en *T. emersonii* se reportó una mayor transcripción de *mdh* al crecer en presencia de mono y disacáridos que en oligo y polisacáridos (Maloney *et al.*, 2004). Mientras en *Sac. erythraea* el gen presenta un patrón de expresión constitutivo en fuentes de carbono como glucosa, galactosa y lactosa, y se induce al utilizar fructosa como fuente de carbono. Es decir, en las primeras fuentes de carbono la actividad específica fue relativamente constante a lo largo de todo el tiempo del cultivo, manteniéndose incluso durante la etapa de crecimiento estacionaria, sin embargo, en presencia de fructosa se observó un incremento en la actividad hasta llegar a un máximo a las 96 horas, aunque el cultivo estaba en etapa estacionaria desde las 72 horas de incubación (Mendoza *et al.*, 2005).

Las fuentes de carbono glucosa, fructosa y maltosa son incorporadas al metabolismo catabólico por medio de la glucólisis por lo que se podría pensar que causan el mismo efecto metabólico; sin embargo, esto depende también de otros factores tales como los mecanismos de transporte de estos nutrientes al medio intracelular que en muchas bacterias están relacionados con la regulación de vías metabólicas globales. En este sentido, estos tres nutrientes se asimilan mediante diferentes vías: la fructosa es transportada por medio de un sistema PTS, la maltosa mediante un sistema de permeasas ABC y la glucosa se incorpora mediante co-transporte dependiente de protones (Bertram *et al.*, 2004), probablemente esto se relaciona con la diferencia en los perfiles de actividad observados al crecer en presencia de glucosa, ya que se ha reportado

que la glucosa cinasa, que se asocia intracelularmente a la glucosa permeasa participa en la regulación de muchas proteínas (Rigali *et al.*, 2006 y van Wezel *et al.*, 2007).

Se demostró que el crecimiento observado en las primeras horas de cultivo no es debido a las reservas intracelulares de las esporas pregerminadas ni a la exclusiva utilización de los casaminoácidos como fuente de carbono y nitrógeno, sugiriendo que realmente se debe a los pocos nutrientes consumidos (Fig. 15 y 16).

En general, en este trabajo se detectó poco o nulo consumo de amonio, esto puede deberse a que el amonio consumido se reestablece por el producido por la degradación de los casaminoácidos (Fig. 14). Por otro lado, en la bacteria Gram+ *B. subtilis* el amonio no es la fuente de nitrógeno preferencial y la expresión de genes que codifican para enzimas degradadoras de algunos aminoácidos como prolina e histidina no se inhiben en presencia de amonio (Atkinson *et al.*, 1990). Para estreptomicetos se ha reportado que los aminoácidos inducen aproximadamente la mitad de las vías catabólicas para degradarlos y la otra mitad son constitutivas y existen pocos ejemplos de regulación del catabolismo de estos compuestos, lo que se ha tomado como un reflejo de su nicho ecológico, en el que hay una gran variedad de fuentes de carbono pero es pobre en nitrógeno y fosfatos (Hodgson, 2000).

A pesar de la trascendencia de entender el metabolismo primario en estreptomicetos y de la gran importancia de la regulación por carbono en estos organismos, a la fecha sólo se ha realizado un estudio similar a éste, en donde se analiza la transcripción del gen *gap* de *Streptomyces aureofaciens* que codifica para la enzima de metabolismo primario gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa a lo largo de las diferentes etapas de cultivo y en presencia de diferentes fuentes de carbono, mostrando que en ausencia de glucosa la transcripción se induce al inicio de la formación de micelio aéreo y en presencia de glucosa se induce durante la formación de micelio aéreo (Kormanec *et al.*, 1997).

La actividad de MDH no se vio afectada por la presencia de inhibidor de serin-proteasas ni de agentes quelantes y reductores ni por la ultrafiltración lo que sugiere que la enzima no es susceptible a la acción de proteasas, iones, metales u otras moléculas de bajo peso molecular (Fig. 1). Lo que concuerda con lo reportado en la revisión de Goward y Nicholls, 1994 donde mencionan que en general, las MDHs dependientes de NAD⁺ no están sujetas a regulación a nivel de actividad, a excepción de la enzima mitocondrial que depende de control alostérico por citrato.

La adición de 0.2% de casaminoácidos al MM de cultivo no afectó el perfil de actividad de MDH ya que el perfil de actividad obtenido fue idéntico al observado en ausencia de estos compuestos, sin embargo, sí se observó una diferencia significativa en el crecimiento por lo que se determinó adicionarlos al medio de cultivo (Fig. 12).

En *S. coelicolor* se ha reportado el estudio de otras dos enzimas del TCA, citrato sintasa (Viollier *et al.*, 2001a) y aconitasa (Viollier *et al.*, 2001b); sin embargo el enfoque es muy distinto al del presente trabajo, ya que en estos reportes el interés era analizar el efecto de estas enzimas en la producción de metabolitos secundarios y en la diferenciación morfológica, para esto se construyeron cepas mutantes en los genes que codifican para estas enzimas y se observó que en ambos casos las cepas mutantes fueron incapaces de producir micelio aéreo y esporas, estos efectos fueron parcialmente eliminados al adicionar amortiguador al medio para mantener un pH neutro.

En el presente año se han publicado más de 400 artículos en revistas científicas de arbitraje internacional reportando investigaciones sobre diferentes aspectos de estreptomicetos (www.ncbi.nlm.nih.gov), lo que nos muestra un gran auge en el estudio de estos organismos. A pesar de esto, a la fecha se conoce muy poco sobre la regulación y propiedades de las enzimas del metabolismo primario y en particular del TCA en estas bacterias. El TCA es una vía metabólica central y participa tanto en el anabolismo como en el catabolismo (Nelson y Cox, 2008).

Es por esto que el estudio reportado en el presente trabajo, en donde analizamos la regulación de la expresión del gen que codifica para la malato deshidrogenasa, resulta sumamente trascendente para poder comprender el metabolismo primario de este importante grupo bacteriano. Así, para tener un entendimiento más global de la regulación del flujo a través del TCA es conveniente analizar varias enzimas del ciclo, en nuestro grupo de estudio se están investigando también las enzimas α -cetoglutarato deshidrogenasa y la isocitrato deshidrogenasa.

8 CONCLUSIONES

- En todas las etapas de crecimiento y en todas las fuentes de carbono probadas en este estudio (glucosa, fructosa, maltosa, acetato y malato) se detectó actividad de MDH.
- El perfil de actividad de MDH observado a lo largo de las diferentes etapas de cultivo de *S. coelicolor* se regula por la fuente de carbono, ya que al crecer en presencia de glucosa se observa un perfil distinto que al crecer en otras fuentes de carbono.
- Al cultivar a la bacteria en glucosa como fuente de carbono el perfil de actividad de MDH está asociado a crecimiento.
- Al cultivar a *S. coelicolor* en fructosa, maltosa, acetato o malato como fuentes de carbono la actividad de MDH aumenta al inicio del crecimiento.
- La transcripción del gen *mdh* al cultivar a la bacteria en glucosa o fructosa como fuentes de carbono está asociada a crecimiento.

9 PERSPECTIVAS

- Realizar perfiles de actividad de MDH al cultivar a *S. coelicolor* en MM con diferentes concentraciones de glucosa para ver si el efecto observado de esta fuente de carbono sobre el perfil de actividad de esta enzima depende de la concentración de este compuesto.
- Analizar los perfiles de actividad y transcripción de los genes que codifican para las otras enzimas del TCA en esta bacteria para tratar de elucidar si tienen un patrón de regulación común.

10 ANEXOS

ANEXO 1. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN CONCENTRADA DE ESPORAS

Es conocido que trabajar con estreptomicetos es complicado debido a que es muy difícil realizar experimentos perfectamente repetibles, de hecho de un cultivo a otro se observan notorias diferencias fenotípicas, incluso se pueden encontrar variaciones en velocidad de crecimiento, tiempo de esporulación y desarrollo de pigmentos entre diferentes colonias cultivadas en una misma caja de medio sólido. Con el fin de reducir esta variación intrínseca de los cultivos aumentando la confiabilidad y repetitividad de los experimentos se preparó una solución concentrada de esporas para partir siempre del mismo inóculo en las diferentes repeticiones de los experimentos ya que este se puede almacenar indefinidamente a -20°C .

Este se realizó siguiendo la metodología reportada por Kieser y colaboradores (2000) aunque debido a la presencia de problemas de contaminación se hicieron las siguientes modificaciones: en vez de esterilizar el medio durante 15 minutos en autoclave a 120°C , la harina de soya se esterilizó primero 15 min por separado, luego se adicionaron los demás ingredientes y se volvió a someter durante 25 min a 120°C ; además, se eliminó el paso en que se sonicen las esporas para desagruparlas debido a que esto también podría ser causa de contaminación; y por último se realizaron diluciones de la solución de esporas original para inocular cajas con medio MS y obtener colonias aisladas, estas se utilizaron para platear cajas con MS (una colonia por caja) en donde después de incubar una semana a 29°C se obtuvo una cama de esporas sobre la caja, que fueron raspadas para obtener la solución concentrada.

La solución concentrada de esporas se diluyó hasta 10^{-9} veces y se platearon cajas con diluciones desde 10^{-6} hasta 10^{-9} , se cuantificaron las colonias obtenidas determinando así la existencia de aproximadamente 3×10^{10} esporas viables por mililitro de solución.

ANEXO2. ESTANDARIZACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DEL MEDIO MÍNIMO PARA EL CRECIMIENTO DE *S. coelicolor*

Para elegir el medio mínimo (MM) más adecuado para crecer a *S. coelicolor* se incubó a la bacteria en los siguientes medios mínimos de crecimiento, sometiendo a las mismas condiciones de temperatura y agitación y se tomaron muestras después de uno y dos días de incubación:

- a) 0.05% K_2HPO_4 , 0.02% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.001% $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.2% (15mM) de $(NH_4)_2SO_4$ y 1% (56mM) glucosa, pH 7 (Kieser *et al.*, 2000).
- b) 2% MOPS, 0.5 g NaCl, 0.03% K_2HPO_4 , 0.113% (10mM) de $(NH_4)_2SO_4$, 0.05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.002% $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.005% $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.0001% $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 0.0001% $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ y 1.8% (100mM) de glucosa, pH 7 (Escalante *et al.*, 1999).
- c) 0.25% K_2HPO_4 , 0.5% NaCl, 0.05% $MgSO_4$, 0.05% $FeSO_4$, 0.005% $ZnSO_4$, 0.0001% $MnCl_2$, 0.0001% $CoCl_2$, 1% (56mM) glucosa, 0.2% (66mM) de glicina y 1% MOPS, pH 7.8 (Flores y Sánchez, 1985).

El micelio se centrifugó mostrando un mayor volumen de paquete celular en el MM reportado por Escalante y cols. en 1999, por lo cual se decidió utilizar este medio para la realización de los siguientes experimentos. Sin embargo, como ha sido reportado por muchos autores, resulta complicado obtener crecimiento disperso de estreptomicetos, principalmente cuando se cultivan en medio mínimo. Como consecuencia se tiene poca reproducibilidad en los experimentos ya que se forman pellets de micelio, causando diferentes condiciones microaerófilas dentro de un mismo cultivo (Hobbs *et al.*, 1989; Doull y Vining, 1989). Para evitar este problema se adicionó al medio 5% de PEG 8000, se siliconizaron los matraces para impedir que el micelio se adhiriera a la superficie, se introdujeron resortes de acero inoxidable a cada matraz y se siguió la metodología reportada por Strauch *et al.*, (1991) para obtener crecimiento disperso de estas bacterias. También se realizó otra modificación al contenido del medio adicionando las concentraciones de fuente de carbono y nitrógeno (28 y 15.15 mM respectivamente) que se han utilizado en otros trabajos en los que se realizan comparaciones en medios con diferentes fuentes de carbono (Hodgson, 1982).

ANEXO 3. ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO PARA OBTENER EL ELC

Con el fin de evitar la pérdida, desnaturalización o inactivación de la MDH en el proceso de extraer a la enzima de su contexto intracelular se comparó la actividad calculada a partir de ELC obtenido mediante varios procedimientos.

Se probaron dos soluciones amortiguadoras diferentes para lavar y resuspender el micelio utilizado para obtener el ELC, es decir el amortiguador en el que quedan disueltas las proteínas intracelulares en el extracto, la primera fue amortiguador Tris-HCl 0.01M pH7, a la segunda se le agregó a este amortiguador DTT 1 mM (agente reductor), PMSF 35 µg/ml (inhibidor de serin-proteasas) y EDTA 0.3 mg/ml (quelante de iones metálicos, principalmente cobre, hierro y cobalto). También se probó ultrafiltrando los extractos (Fig. I).

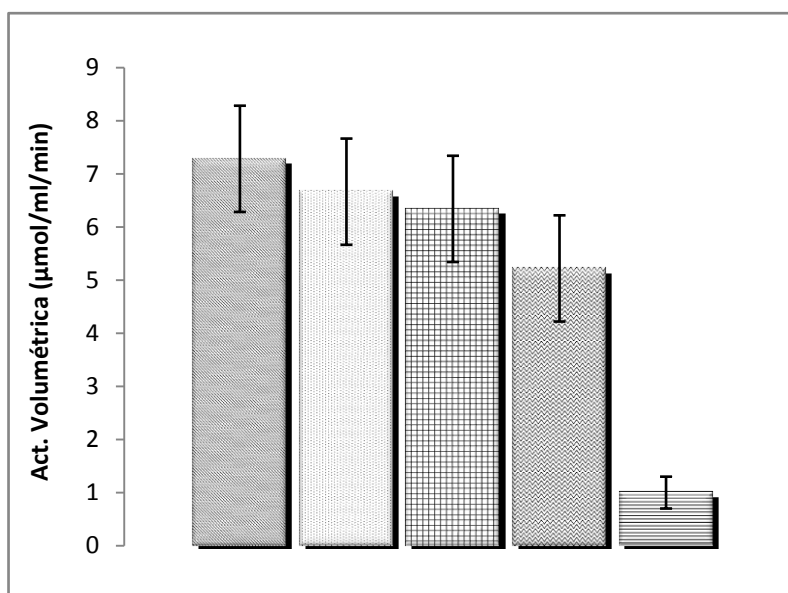


Figura I. Comparación de la actividad de MDH en diferentes condiciones de extracción. Diagonales: amortiguador Tris-HCl 0.01M pH 7; puntos: Tris-HCl 0.01M pH 7 con 35µg/ml PMSF, 0.3 mg/ml EDTA y 1mM DTT; cuadros: ELC ultra filtrado obtenido con amortiguador Tris-HCl 0.01M pH 7, zig-zag: ELC ultra filtrado obtenido con amortiguador Tris-HCl 0.01M pH 7 con 35µg/ml PMSF, 0.3 mg/ml EDTA y 1mM DTT; horizontales: sobrenadante del ultrafiltrado.

No se observó diferencia significativa entre las distintas formas de obtener el ELC por lo que se decidió usar amortiguador Tris-HCl 0.01M sin dializar. Estos resultados sugieren que la actividad de esta enzima no es ve afectada por la acción de proteasas, iones, metales u otras moléculas pequeñas.

ANEXO 4. ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO PARA MEDIR ACTIVIDAD DE MDH

Como se ha reportado en gran cantidad de artículos (Maloney *et al.*, 2004; Labrou y Clonis, 1997; Mikulášová *et al.*, 1998; Madern, 2002; Nishiyama *et al.*, 1991) la actividad de esta enzima puede ser fácilmente detectable debido a que el NADH absorbe a 340 nm de longitud de onda. De esta forma, se prepara la mezcla de reacción en una celda de cuarzo y se cuantifica el aumento o la disminución en la absorbancia en función del tiempo debido a la aparición o desaparición de NADH respectivamente.

La reacción catalizada por esta enzima tiene una ΔG° de 29.7 kJ/mol lo que implica que el equilibrio de la reacción está desplazado en sentido contrario al ciclo de Krebs (Nelson y Cox, 2000). Es por esto, que para cuantificar experimentalmente la actividad de esta enzima muchos autores han decidido medirla en sentido contrario a como ocurre en este ciclo, es decir de oxaloacetato a malato (Mikulášová *et al.*, 1998; Madern, 2002; Nishiyama *et al.*, 1991; Park *et al.*, 1995), ya que de esta forma es más probable lograr detectar actividad cuando la concentración de enzima es baja, además de que se requiere una menor concentración de sustratos. Esto se refleja en los valores de Km reportados para las MDHs de diferentes organismos, que generalmente muestran una afinidad de un orden de magnitud mayor por oxaloacetato que por malato (Labrou y Clonis, 1997; Langelandsvik *et al.*, 1997; Madern y Zaccai, 2004; Maloney *et al.*, 2004; Mendoza, 2005; Mikulášová *et al.*, 1996; Ohkuma *et al.*, 1996; Pitson *et al.*, 1999; Thompson *et al.*, 1998; Wynne *et al.* 1996). Por estas razones, en este estudio la actividad de la enzima se determinó en el sentido de oxaloacetato hacia malato, a pesar de que en el ciclo de Krebs se realiza en sentido contrario.

Para obtener una adecuada medición de la actividad enzimática es necesario tomar en cuenta los siguientes puntos: 1) el sustrato y la coenzima deben estar en exceso en el coctel de reacción ya que el factor limitante de velocidad debe ser la enzima, 2) la actividad de muchas enzimas se ve afectada en altas concentraciones de sustrato, producto o cofactor, por lo tanto, se debe verificar que la cantidad de estas sustancias en el coctel de reacción no tengan un efecto negativo sobre la actividad de la enzima y 3) la cantidad de NADH debe ser suficientemente baja para que el espectrofotómetro realice una buena detección de la absorbancia a 340 nm.

Con el fin de determinar la concentración adecuada de NADH se midió actividad con diferentes concentraciones de este compuesto (10, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 300 y 400 μM). La actividad obtenida con una concentración de NADH 10, 20, 40 y 60 μM fue muy baja debido a que éste no se encontraba en exceso en la reacción, por otro lado, con 300 y 400 μM la medición en el espectrofotómetro fue muy inexacta debido a que las altas concentraciones de este compuesto causaron valores de absorbancia muy elevados, encontrándose en el límite de la capacidad de absorción del espectrofotómetro. En cambio, con concentraciones de entre 80 y 120 μM se logró determinar adecuadamente la actividad de la enzima por lo que se decidió utilizar NADH 100 μM en cada reacción (Fig. II).

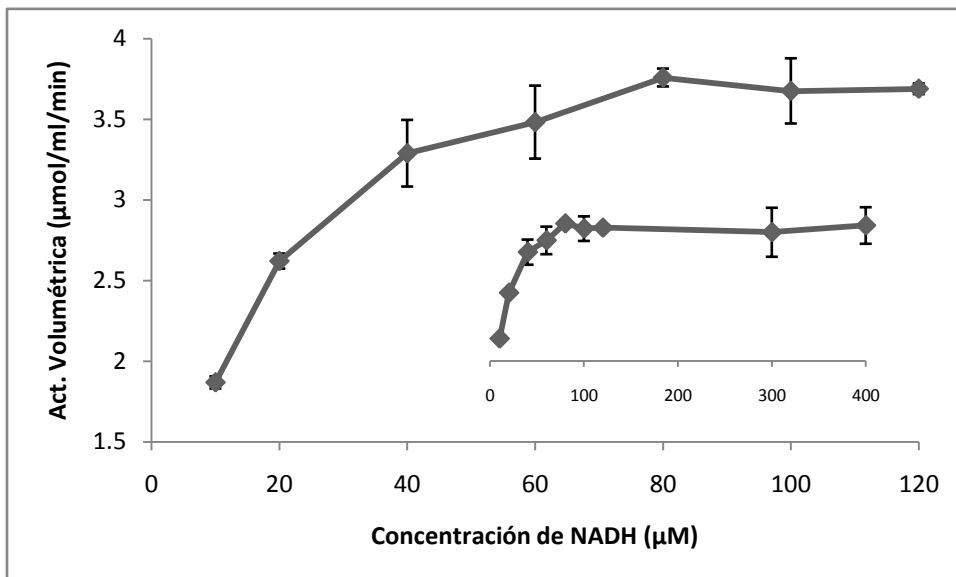


Figura II. Cinética de reacción de MDH con diferentes concentraciones de NADH. La gráfica anexa muestra un rango más amplio de concentraciones de este sustrato.

De la misma forma, también se determinó la concentración adecuada de oxaloacetato para la reacción comparando la actividad volumétrica obtenida en un rango de entre 15 y 740 μM de este compuesto (Fig. III) mostrando que la actividad de esta enzima se puede determinar correctamente con una concentración mayor a 120 y menor a 300 μM . Con una menor concentración el sustrato no se encuentra en exceso, mientras que con una concentración mayor a 300 μM la enzima se inhibe por sustrato. Con oxaloacetato 420 μM se observa un 14% de

inhibición y con 740 μM la inhibición es del 39%. La inhibición por exceso de oxaloacetato ha sido reportada para las malatos deshidrogenasas de otros organismos como *Salinibacter ruber*, *Pseudomonas stutzeri* y *Archaeoglobus fulgidus* (Madern y Zaccai, 2004; Labrou y Clonis, 1997; Langelandsvik *et al.*, 1997) sin embargo, sorprendentemente la enzima de *S. aureofaciens* no se inhibe por este sustrato (Mikulášová *et al.*, 1998).

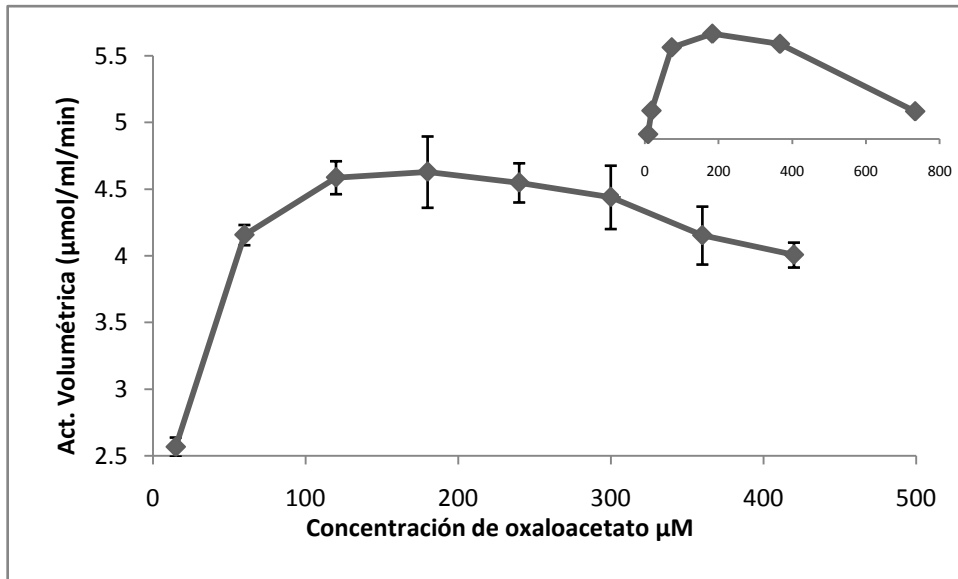


Figura III. Cinética de reacción de MDH con diferentes concentraciones de oxaloacetato. La gráfica anexa muestra un rango mas amplio de concentraciones de este sustrato.

Con estos datos se realizaron las gráficas y la ecuación de Lineveawer-Burk para determinar los valores de K_m de la enzima para NADH y oxaloacetato, la velocidad máxima de la reacción calculada de esta forma no es válida como constante cinética ya que para calcularla se necesitaría tener la enzima pura y no un extracto libre de células como es el caso. Para muchas reacciones enzimáticas calcular la K_m a partir de ELC tampoco es válido debido a que los sustratos pueden desviarse hacia otras reacciones enzimáticas causando alteraciones en la concentración de estos compuestos en el coctel de reacción, sin embargo, en el caso de MDH, los sustratos requerirían de otros compuestos adicionales para participar en otras reacciones por lo cual esto no sucede, es por esto que podemos calcular adecuadamente la K_m de esta enzima utilizando ELC. Así, la K_m para oxaloacetato fue 14 μM y para NADH 13 μM .

Al comparar los valores de K_m obtenidos para la malato deshidrogenasa de *S. coelicolor* con los reportados para otros organismos se observa que los valores obtenidos en este estudio se encuentran entre los más bajos reportados, mostrando que esta enzima presenta una alta afinidad por ambos sustratos (Labrou y Clonis, 1997; Langelandsvik *et al.*, 1997; Madern y Zaccai, 2004; Maloney *et al.*, 2004; Mendoza, 2005; Mikulášová *et al.*, 1996; Ohkuma *et al.*, 1996; Pitson *et al.*, 1999; Thompson *et al.*, 1998; Wynne *et al.* 1996).

También con el fin de establecer las condiciones óptimas para cuantificar la actividad enzimática de MDH se realizó una curva de temperatura (Fig. IV A), mostrando por un lado que la actividad de la enzima es muy susceptible a las variaciones de la temperatura ambiente ya que a 30°C se observa 2.4 veces más actividad que a 10°C y a 75°C la actividad es casi 11 veces mayor a la observada a 10°C, por otro lado también podemos notar que sorprendentemente la temperatura óptima de la enzima es 75°C a pesar de que el mayor crecimiento de *S. coelicolor* ocurre a 29°C. Sin embargo, la figura IV B nos muestra que esta enzima es sumamente inestable a esta temperatura ya que en tan solo 1.5 minutos pierde casi el 80% de la actividad, mientras que a 60°C la enzima se mantiene estable durante por lo menos 3 minutos y a 50°C durante 5 minutos.

A partir de estos resultados se determinó la necesidad de regular esta variable en el espectrofotómetro con el fin de realizar todas las cuantificaciones de actividad a la misma temperatura ya que de esta forma eliminamos parte del error experimental causado por las variaciones en la temperatura ambiente, para esto se eligió 50°C debido a que ahí se observa una alta actividad de la enzima, aproximadamente 5 veces mayor a la observada a 20°C, lo que permite detectar más fácilmente la actividad en muestras que contengan una baja concentración de enzima y al mismo tiempo a esta temperatura la enzima se mantiene estable durante por lo menos 5 minutos lo que permite cuantificar tranquilamente la actividad en las diferentes muestras de ELC.

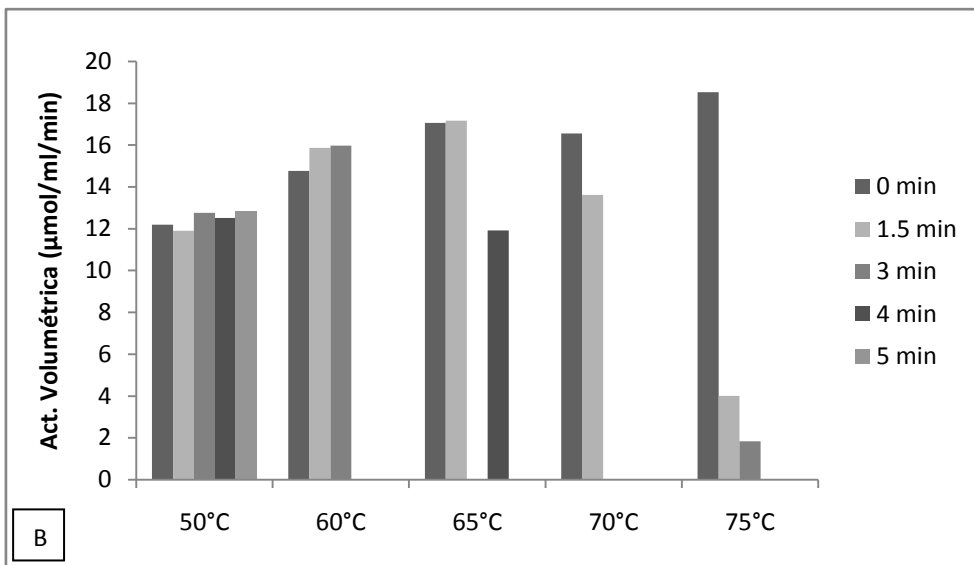
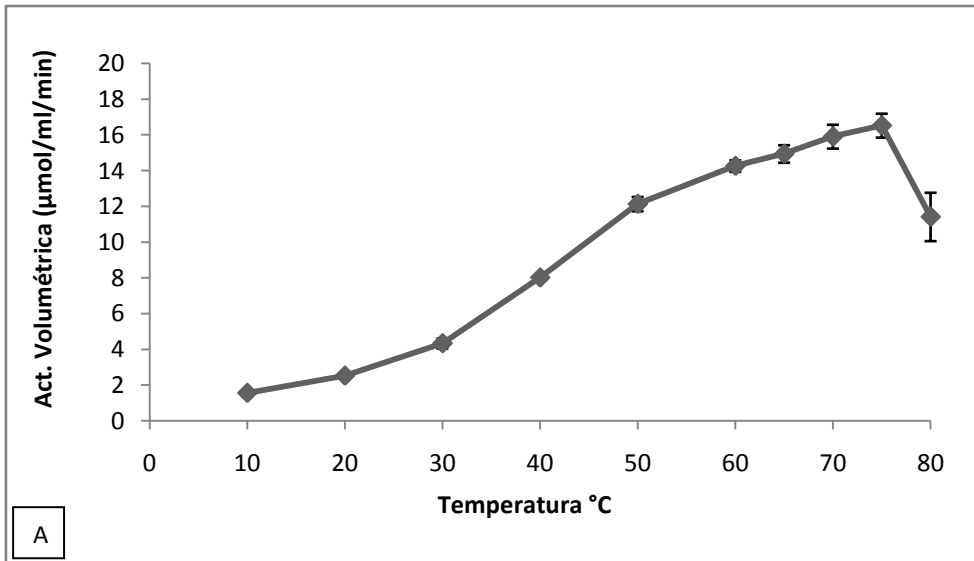


Figura IV. Efecto de la temperatura sobre la actividad de MDH. A) Actividad de MDH a diferentes temperaturas manteniendo a la enzima a 4°C hasta la medición de la actividad, B) Actividad de MDH a diferentes temperaturas después de incubar a la enzima de 0 a 5 minutos a la temperatura en cuestión.

ANEXO 5. CONSERVACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE MDH

Para cumplir con los objetivos planteados en este estudio fue necesario manejar una gran cantidad de muestras cada día, obtener el ELC, medir actividad y cuantificar las proteínas. Esto resulta sumamente complicado, además de que en ocasiones es necesario verificar la actividad y la proteína cuantificadas previamente. Por estas razones fue necesario encontrar un método, mediante el cual, la actividad de esta enzima se conserve durante varios días ya sea en el micelio o en el ELC. Para esto, se calculó la actividad de la enzima en extractos almacenados durante varios días en diferentes condiciones: congelando a -20°C el ELC, refrigerándolo a 4°C y congelando el micelio en glicerol al 20% (Fig. V).

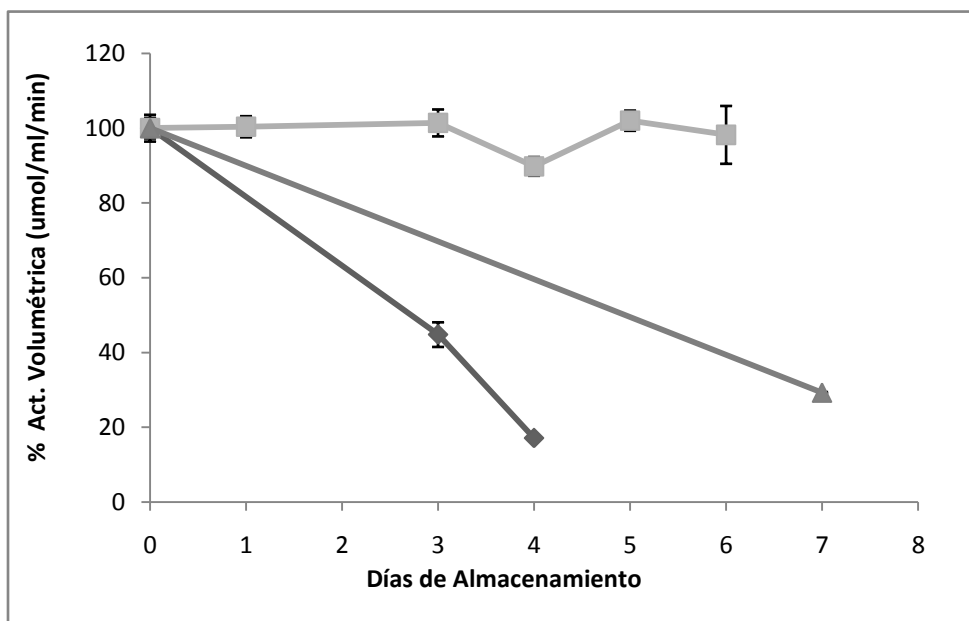


Figura V. Efecto de diferentes formas de almacenar el ELC sobre la actividad de malato deshidrogenasa. Cuadros: el ELC se almacenó a 4°C ; rombos: el ELC se almacenó a -20°C ; triángulos: el micelio se almacenó a -20°C con glicerol al 20%.

Los resultados obtenidos muestran que la actividad de la enzima no se conserva congelando a -20°C el micelio ni el ELC, sin embargo sí se conserva durante por lo menos 6 días refrigerando el ELC a 4°C .

11 BIBLIOGRAFÍA

1. Aigle B, Pang X, Decaris B, Leblond P. Involvement of AlpV, a new member of the Streptomyces antibiotic regulatory protein family, in regulation of the duplicated type II polyketide synthase alp gene cluster in Streptomyces ambofaciens. J Bacteriol. 2005 Apr;187(7):2491-500.
2. [Akopiants K, Florova G, Li C, Reynolds KA](#). Multiple pathways for acetate assimilation in *Streptomyces cinnamonensis*. J Ind Microbiol Biotechnol. 2006; 33(2):141-50.
3. Alvarado A, Flores ME. Characterization and regulation of NADP⁺-isocitrate dehydrogenase from Saccharopolyspora erythraea. Biotechnol Lett. 2003; 25(14):1175-8.
4. Banaszak, L.J. y Bradshaw, R.A. Malate dehydrogenases. In *The enzymes* (Boyer, P.D., ed.). 1975; vol. 9, pp 369-396. Academic Press, New York.
5. [Angell S, Lewis CG, Buttner MJ, Bibb MJ](#). Glucose repression in *Streptomyces coelicolor* A3(2): a likely regulatory role for glucose kinase. Mol Gen Genet. 1994; 25;244(2):135-43.
6. [Atkinson MR, Wray LV Jr, Fisher SH](#). Regulation of histidine and proline degradation enzymes by amino acid availability in Bacillus subtilis. J Bacteriol. 1990; 172(9):4758-65.
7. Bentley SD, Chater KF, Cerdeño-Tárraga AM, Challis GL, Thomson NR, James KD, Harris DE, Quail MA, Kieser H, Harper D, Bateman A, Brown S, Chandra G, Chen CW, Collins M, Cronin A, Fraser A, Goble A, Hidalgo J, Hornsby T, Howarth S, Huang CH, Kieser T, Larke L, Murphy L, Oliver K, O'Neil S, Rabinowitsch E, Rajandream MA, Rutherford K, Rutter S, Seeger K, Saunders D, Sharp S, Squares R, Squares S, Taylor K, Warren T, Wietzorrek A, Woodward J, Barrell BG, Parkhill J, Hopwood DA. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). Nature. 2002; 9;417(6885):141-7.
8. Benveniste, K. y Munkres, K.D. Cytoplasmic and mitochondrial malate dehydrogenase of *Neurospora*. Regulatory and enzymic properties. Biochimica et Biophysica Acta. 1970; 220, 161-177.
9. Bermúdez, O., Padilla, P., Huitrón, C. y Flores, M.E. Influence of carbon and nitrogen source on synthesis of NADP⁺ -isocitrate dehydrogenase, methylmalonyl-coenzyme A mutase, and methylmalonyl-coenzyme A decarboxylase in *Saccharopolyspora erythraea* CA340. FEMS Microbiol Lett. 1998; 164, 77-82.
10. [Bertram R, Schlicht M, Mahr K, Nothaft H, Saier MH Jr, Titgemeyer F](#). In silico and transcriptional analysis of carbohydrate uptake systems of *Streptomyces coelicolor* A3(2). J Bacteriol. 2004; 186(5):1362-73.
11. Birktoft, J.J., Rhodes, G. y Banaszak, L. J. Refined crystal structure of cytoplasmic malate dehydrogenase at 2.5Å°. Biochem. 1989; 28, 6065-6081.
12. Bollag, D.M., Rozycki, M.D. y Edelstein, S.J. Protein Methods. 1996; 2nd edition. Ed. Wiley-Liss.
13. Bonneté, F., Ebel, C., Zaccai, G. y Eisenberg, H. A biophysical study of halophilic malate dehydrogenase in solution: revised subunit structure and solvent interactions in native and recombinant enzyme. Journal of Chemical Society Faraday Trans. 1993; 89, 2659-2666.
14. [Borodina I, Schöller C, Eliasson A, Nielsen J](#). Metabolic network analysis of *Streptomyces tenebrarius*, a *Streptomyces* species with an active entner-doudoroff pathway. Appl Environ Microbiol. 2005; 71(5):2294-302.

15. Bott, M. y Niebisch, A. The respiratory chain of *Corynebacterium glutamicum*. J Biotechnol. 2003; 104, 129-153. Review.
16. [Bott M.](#) Offering surprises: TCA cycle regulation in *Corynebacterium glutamicum*. Trends Microbiol. 2007; 15(9):417-25. Review.
17. Bradford, MM. A rapid sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976; 72, 248-254.
18. [Breiter DR, Resnik E, Banaszak LJ.](#) Engineering the quaternary structure of an enzyme: construction and analysis of a monomeric form of malate dehydrogenase from *Escherichia coli*. Protein Sci. 1994 Nov;3(11):2023-32.
19. [Brückner R, Titgemeyer F.](#) Carbon catabolite repression in bacteria: choice of the carbon source and autoregulatory limitation of sugar utilization. FEMS Microbiol Lett. 2002 Apr 9;209(2):141-8. Review.
20. Birktoft, J.J., Rhodes, G. y Banaszak, L. J. Refined crystal structure of cytoplasmic malate dehydrogenase at 2.5Å°. Biochem. 1989; 28, 6065-6081.
21. Bollag, D.M., Rozycki, M.D. y Edelstein, S.J. Protein Methods. 1996. 2nd edition. Ed. Wiley-Liss.
22. Bonneté, F., Ebel, C., Zaccai, G. y Eisenberg, H. A biophysical study of halophilic malate dehydrogenase in solution: revised subunit structure and solvent interactions in native and recombinant enzyme. J Chem Society Faraday Trans. 1993; 89, 2659-2666.
23. Bott, M. y Niebisch, A. The respiratory chain of *Corynebacterium glutamicum*. J Biotech. 2003; 104, 129-153.
24. Bradford, MM. A rapid sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976; 72, 248-254.
25. [Butler MJ, Bruheim P, Jovetic S, Marinelli F, Postma PW, Bibb MJ.](#) Engineering of primary carbon metabolism for improved antibiotic production in *Streptomyces lividans*. Appl Environ Microbiol. 2002 Oct;68(10):4731-9.
26. **Chater KF y Hopwood DA.** *Streptomyces*, p. 83-99. En A. L. Sonenshein, J. A. Hoch, and R. Losick (ed.), *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacteria: biochemistry, physiology, and molecular genetics. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 1993.
27. Cochrane, V.W. Physiology of actinomycetes. Annual Rev Microbiol. 1961; 15, 1-26.
28. Curtis, E. y Barnes, N.S. Biología. 1993; Ed. Panamericana. 5^aed.
29. Dekleva, M.L. y Strohl W.R. Biosynthesis of epsilon-rhodomyacinone from glucose by *Streptomyces* C5 and comparison with intermediary metabolism of other polyketide-producing streptomycetes. Can J Microbiol. 1988; 34, 1235-1240.
30. Demian A.L. From natural product discovery to commercialization: a success story. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2006; 33, 486-495.
31. Doull JL, Vining LC. Culture conditions promoting dispersed growth and biphasic production of actinorhodin in shaken cultures of *Streptomyces coelicolor* A3(2). FEMS Microbiol Lett. 1989 Dec;53(3):265-8.
32. Escalante, L., Ramos, I., Imriskova, I., Langley, E. y Sanchez, S. Glucose repression of anthracycline formation in *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. Appl Microbiol Biotechnol. 1999; 52, 572-578.
33. **Fisher S.** Utilization of amino acids and other nitrogen-containing compounds, p. 221-228. En A. L. Sonenshein, J. A. Hoch, and R. Losick (ed.), *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacteria: biochemistry, physiology, and molecular genetics. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 1993.

34. [Fink D, Weissschuh N, Reuther J, Wohlleben W, Engels A](#). Two transcriptional regulators GlnR and GlnRII are involved in regulation of nitrogen metabolism in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Microbiol*. 2002 Oct;46(2):331-47.
35. Flores, M.E. y Sánchez, S. Nitrogen regulation of erythromycin formation in *Streptomyces erythreus*. *FEMS Microbiology Letters*. 1985; 26, 191-195.
36. [Führer T, Fischer E, Sauer U](#). Experimental identification and quantification of glucose metabolism in seven bacterial species. *J Bacteriol*. 2005 Mar;187(5):1581-90.
37. Gary, C.T., Wimpenny, J.W.T. y Mossan, M.R. Regulation of metabolism in facultative bacteria. II. Effects of aerobiosis, anaerobiosis and nutrition on the formation of Krebs cycle enzymes in *Escherichia coli*. *Bioch Bioph Acta*. 1996; 117, 33-41.
38. [Genda T, Nakamatsu T, Ozak H](#). Purification and characterization of malate dehydrogenase from *Corynebacterium glutamicum*. *J Biosci Bioeng*. 2003;95(6):562-6.
39. Gibson, N. y McAlister-Henn, L. Physical and genetic interactions of cytosolic malate dehydrogenase with other gluconeogenic enzymes. *J Biol Chem*. 2003; 278, 25628-25636.
40. Gietl, C. Malate dehydrogenase isoenzymes: Cellular locations and role in the flow of metabolites between the cytoplasm and cell organelles. *Bioch Bioph Acta*. 1992; 1100, 217-234.
41. Goward, C.R. y Nicholls, D.J. Malate dehydrogenase: A model for structure, evolution, and catalysis. *Protein Science*. 1994; 3, 1883-1888.
42. Gunnarsson, N., Mortensen, U.H., Sosio, M. y Nielsen, J. Identification of the Entner-Doudoroff pathway in an antibiotic-producing actinomycete species. *Mol Microbiol*. 2004; 52, 895-902.
43. Hall, M.D., Levit, D.G. y Banaszak, L.J. Crystal structure of *Escherichia coli* malate dehydrogenase. A complex of the apoenzyme and citrate at 1.87 Å resolution. *J Mol Biol*. 1992; 226, 867-882.
44. Hobbs G, Frazer C, Gardner D, Cullum J, Oliver S. Dispersed growth of *Streptomyces* in liquid culture. *Appl Microbiol Biotechnol*. 1989; 31:272-277.
45. Hockenull, D.J.D., Fantes, K.H., Hervert, M. y Whitehead, B. Glucose utilization by *Streptomyces griseus*. *J Gen Microbiol*. 1954; 10, 353-370.
46. Honka, E., Farbry, S., Niermann, T., Palm, P. y Hensel, R. Properties and primary structure of the L-malate dehydrogenase from the extremely thermophilic archaeobacterium *Methanothermus fervidus*. *Europ J Biochem*. 1990; 188, 623-632.
47. Hodgson DA. Glucose repression of carbon source uptake in *Streptomyces coelicolor* A3(2) and its perturbation in mutants resistant to 2-deoxyglucose. *J Gen Microbiol*. 1982; 128:2417-2430.
48. Hodgson DA. Primary metabolism and its control in streptomycetes: a most unusual group of bacteria. *Adv Microb Physiol*. 2000; 42:47-238. Review.
49. [Hopwood DA](#). The *Streptomyces* genome--be prepared! *Nat Biotechnol*. 2003 May;21(5):505-6.
50. Hostalek, Z., Tinterova, M. y Jechova, V. Regulation of biosynthesis of secondary metabolites. I. Biosynthesis of chlortetracycline and tricarboxylic acid cycle activity. *Biotechnol Bioeng*. 1969; 11, 539-548.
51. [Ikeda H, Ishikawa J, Hanamoto A, Shinose M, Kikuchi H, Shiba T, Sakaki Y, Hattori M, Omura S](#). Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nat Biotechnol*. 2003 May;21(5):526-31.
52. Imriskova I, Arreguín-Espinosa R, Guzmán S, Rodríguez-Sanoja R, Langley E, Sanchez S. Biochemical characterization of the glucose kinase from *Streptomyces coelicolor* compared to *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. *Res Microbiol*. 2005 Apr;156(3):361-6.

53. Ingold, C.T. y Hudson, H.J. The Biology of Fungi. 1993; 6th ed. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands.
54. Irimia, A., Vellieux, F.M., Madern, D., Zaccari, G., Karshikoff, A., Tibbelin, G., Ladenstein, R., Lien, T. y Birkeland, N. The 2.9 Å resolution crystal structure of malate dehydrogenase from *Archaeoglobus fulgidus*: Mechanisms of oligomerisation and thermal stabilisation. J Mol Biol. 2004; 335, 343-356.
55. Issakidis, E., Miginiac-Maslow, M., Decottignies, P., Jacquot, J-P. Crétin, C. y Gadat, P. Site-directed mutagenesis reveals the involvement of an additional thioredoxin-dependent regulatory site in the activation of recombinant sorghum leaf NADP-malate dehydrogenase. J Biol Chem. 1992; 267, 21577-21583.
56. Kang JG, Hahn MY, Ishihama A, Roe JH. Identification of sigma factors for growth phase-related promoter selectivity of RNA polymerases from *Streptomyces coelicolor* A3(2). Nucleic Acids Res. 1997 Jul 1;25(13):2566-73.
57. [Kamionka A, Parche S, Nothaft H, Siepelmeyer J, Jahreis K, Titgemeyer F](#). The phosphotransferase system of *Streptomyces coelicolor*. Eur J Biochem. 2002 Apr;269(8):2143-50.
58. [Karoonthaisiri N, Weaver D, Huang J, Cohen SN, Kao CM](#). Regional organization of gene expression in *Streptomyces coelicolor*. Gene. 2005 Jun 20;353(1):53-66.
59. Kelly, C.A., Nishiyama, M., Ohnishi, Y., Beppu, T. y Birktoft, J. Determinants of protein thermostability observed in the 1.9-Å crystal structure of malate dehydrogenase from the thermophilic bacterium *Thermus flavus*. Biochem. 1993; 32, 3916-3922.
60. Kieser, T., Bibb, M.J., Buttner, M.J., Chater, K.F. y Hopwood, D.A. Practical *Streptomyces* Genetics. 2000. The John Innes Foundation. England.
61. Kim, S.-Y., Hwang, K.Y., Kim, S.H., Sung, H.C., Han, Y.S. y Cho, Y. Structural basis of cold adaptation, sequence, biochemical properties, and crystal structure of malate dehydrogenase from a psychrophile *Aquaspirillum arcticum*. J Biol Chem. 1999; 274, 11761-11767.
62. Kitto, G.G. y Kaplan, N.O. Purification and properties of chicken heart mitochondrial and supernatant malic dehydrogenases. Biochem. 1966; 5, 3966-3980.
63. [Kormanec J, Lempel'ová A, Nováková R, Rezuchová B, Homérová D](#). Expression of the *Streptomyces aureofaciens* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene (gap) is developmentally regulated and induced by glucose. Microbiology. 1997 Nov;143 (Pt 11):3555-61.
64. Kuijk van, B.L.M. y Stams, A.J.M. Purification and characterization of malate dehydrogenase from the syntrophic propionate-oxidizing bacterium strain MPOB. FEMS Microbiol Lett. 1996; 144, 141-144.
65. Labrou, N.E. y Clonis, Y.D. L-Malate dehydrogenase from *Pseudomonas stutzeri*: Purification and characterization. Arch Biochem Bioph. 1997; 337, 103-114.
66. Langelandsvik, A.S., Steen, I.H., Birkeland, N. y Lien, T. Properties and primary structure of a thermostable L-malate dehydrogenase from *Archaeoglobus fulgidus*. Arch Microbiol. 1997; 168, 59-67.
67. Lum, A.M., Huang, J., Hutchinson, C.R. y Kao, C.M. Reverse engineering of industrial pharmaceutical-producing actinomycete strains using DNA microarrays. Metabolic Engineering. 2004; 6, 186-196.
68. Madern, D. Molecular evolution within the L-malate and L-lactate dehydrogenase superfamily. Journal of Molecular Evolution. 2002; 54, 825-840.

69. Madern, D. y Zaccai, G. Molecular adaptation: the malate dehydrogenase from the extreme halophilic bacterium *Salinibacter ruber* behaves like a non-halophilic protein. *Biochim.* 2004; 86, 295-303.
70. [Mahr K, van Wezel GP, Svensson C, Kregel U, Bibb MJ, Titgemeyer F.](#) Glucose kinase of *Streptomyces coelicolor* A3(2): large-scale purification and biochemical analysis. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2000 Dec;78(3-4):253-61.
71. Maloney, A.P., Callan, S.M., Murray, P.G. y Tuohy, M.G. Mitochondrial malate dehydrogenase from the thermophilic, filamentous fungus *Talaromyces emersonii*. Purification of the native enzyme, cloning and overexpression of the corresponding gene. *Europ J Biochem.* 2004; 271, 3115-3126.
72. Marone M, Mozzetti S, De Ritis D, Pierelli L, Scambia G. Semiquantitative RT-PCR analysis to assess the expression levels of multiple transcripts from the same sample. *Biol Proced Online.* 2001 Nov 16;3:19-25.
73. Meizel, S. y Markert, C.L. Malate dehydrogenase isozymes of the marine snail, *Ilyanassa obsoleta*. *Arch Biochem Bioph.* 1967; 122, 753-765.
74. Mendoza AP. Malato deshidrogenasa: Efecto de la fuente de carbono sobre el perfil de actividad en *Saccharolyspora erythraea* CA340. Tesis de la Licenciatura de Biología. Fac. de Ciencias, UNAM. México D.F. 2005.
75. Mikulášová, D., Kollárová, M., Miginiac-Maslow, M., Decottignies, P., Jacquot, J., Kutejová, E., Mernik, N., Egyudová, I., Mustrati, R. y Horecká, T. Purification and characterization of the malate dehydrogenase from *Streptomyces aureofaciens*. *FEMS Microbiol Lett.* 1998; 159, 299-305.
76. Miller, G.L., Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, *Anal. Chem.*, 1959, 31: 426-428.
77. Molenaar, D., Rest van der, M.E. y Petrovic, S. Biochemical and genetic characterization of the membrane-associated malate dehydrogenase (acceptor) from *Corynebacterium glutamicum*. *Europ J Biochem.* 1998; 254, 395-403.
78. Molenaar, D. Rest van der, M.E., Drysch, A. y Yücel, R. Functions of the membrane-associated and cytoplasmic malate dehydrogenase in the citric acid cycle of *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol.* 2000; 182, 6884-6891.
79. Munkres, K.D. Allosteric y multifunctional properties of *Neurospora* mitochondrial malate dehydrogenase. *Biochim Bioph Acta.* 1970; 220, 149-160.
80. Mustrati RA, Kollárová M, Mernik N, Mikulášová D. Malate dehydrogenase: distribution, function and properties. *Gen Physiol Biophys.* 1998 Sep;17(3):193-210. Review.
81. Nelson, D.L. y Cox, M.M. *Lehninger Principles of Biochemistry.* 2000; Ed Freeman & Company. New York. 3^d edition.
82. Nelson, D.L. y Cox, M.M. *Lehninger Principles of Biochemistry.* 2008; Ed Freeman & Company. New York. 5th edition.
83. Nicholls, D., Sundaram, T.K., Atkinson, T. y Minton, N.P. Cloning and nucleotide sequences of the *mdh* and *sucD* genes from *Thermus aquaticus* B. *FEMS Microbiol Lett.* 1990; 70, 7-14.
84. Nimmo, H.G. The tricarboxylic acid cycle and anaplerotic reactions, p.156-169. In F.C. Neidhart, J.L. Ingraham, K.B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter and H.E. Umbarger (eds.), *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: celular and molecular biology, 1990; vol. 1. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
85. Nishiyama, M., Horinouchi, S. y Beppu, T. Characterization of an operon encoding succinyl-CoA synthetase and malate dehydrogenase from *Thermus flavus* AT-62 and its expression in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genomics.* 1991; 226, 1-9.

86. [Nothaft H, Dresel D, Willimek A, Mahr K, Niederweis M, Titgemeyer F](#). The phosphotransferase system of *Streptomyces coelicolor* is biased for N-acetylglucosamine metabolism. *J Bacteriol.* 2003 Dec;185(23):7019-23.
87. Novotna, J., Vohradsky, J., Berndt, P., Gramajo, H., Langen, H., Li, X., Minas, W., Orsaria, L., Roeder, D. y Thompson, C. Proteomic studies of diauxic lag in the differentiating prokaryote *Streptomyces coelicolor* reveal a regulatory network of stress-induced proteins and central metabolic enzymes. *Mol Microbiol.* 2003; 48, 1289-1303.
88. Ohkuma, M., Ohtoko, K., Takada, N., Hamamoto, T., Usami, R., Kudo, T. y Horikoshi, K. Characterization of malate dehydrogenase from deep-sea psychrophilic *Vibrio* sp. Strain no. 5710 and cloning of its gene. *FEMS Microbiol Lett.* 1996; 137, 247-252.
89. [Ohnishi Y, Ishikawa J, Hara H, Suzuki H, Ikenoya M, Ikeda H, Yamashita A, Hattori M, Horinouchi S](#). The Genome Sequence of the Streptomycin-Producing Microorganism *Streptomyces griseus* IFO 13350. *J Bacteriol.* 2008 Mar 28.
90. Paradkar, A., Trefzer, A., Chakraborty, R. y Stassi, D. *Streptomyces* genetics: a genomic perspective. *Critical Rev Biotech.* 2003; 23, 1-27.
91. [Parche S, Nothaft H, Kamionka A, Titgemeyer F](#). Sugar uptake and utilisation in *Streptomyces coelicolor*: a PTS view to the genome. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2000 Dec;78(3-4):243-51.
92. Park, S., Cotter, P.A. y Gunsalus, R.P. Regulation of malate dehydrogenase (*mdh*) gene expression in *Escherichia coli* in response to oxygen, carbon and heme availability. *J Bacteriol.* 1995; 177, 6652-6656.
93. Park, H.S. y Kilbane, J.J. Gene expression studies of *Thermus thermophilus* promoters *PdnaK*, *Parg* and *Pscs-mdh*. *Lett Appl Microbiol.* 2004; 38, 415-422.
94. [Paulsen IT](#). Carbon metabolism and its regulation in *Streptomyces* and other high GC gram-positive bacteria. *Res Microbiol.* 1996 Jul-Sep;147(6-7):535-41. Review.
95. Pitson, S.M., Méndez, G.L., Srinivasan, S. y Hazell, S.L. The tricarboxylic acid cycle of *Helicobacter pylori*. *Europ J Biochem.* 1999; 260, 258-267.
96. Redshaw, P.A., McCann, P.A., Sankaran, L., y Pogell, B.M. Control of differentiation in streptomycetes: involvement of extrachromosomal deoxyribonucleic acid and glucose repression in aerial mycelia development. *J Bacteriol.* 1976; 125, 698-705.
97. Rest van der, M.E., Frank, C. y Molenaar, D. Functions of the membrane-associated and cytoplasmic malate dehydrogenase in the citric acid cycle of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 2000; 182, 6892-6899.
98. [Reuther J, Wohlleben W](#). Nitrogen metabolism in *Streptomyces coelicolor*: transcriptional and post-translational regulation. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 2007;12(1-2):139-46. Review.
99. [Rexer HU, Schäberle T, Wohlleben W, Engels A](#). Investigation of the functional properties and regulation of three glutamine synthetase-like genes in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Arch Microbiol.* 2006 Dec;186(6):447-58. Epub 2006 Aug 24.
100. Richard, S.B., Madern, D., Garcin, E. y Zaccà, G. Halophilic adaptation: novel solvent protein interactions observed in the 2.9 and 2.6 Å resolution structures of the wild type and a mutant of malate dehydrogenase from *Haloarcula marismortui*. *Biochem.* 2000; 39, 992-1000.
101. [Rigali S, Nothaft H, Noens EE, Schlicht M, Colson S, Müller M, Joris B, Koerten HK, Hopwood DA, Titgemeyer F, van Wezel GP](#). The sugar phosphotransferase system of *Streptomyces coelicolor* is regulated by the GntR-family regulator DasR and links N-acetylglucosamine metabolism to the control of development. *Mol Microbiol.* 2006 Sep;61(5):1237-51.

102. [Rommel TO, Hund HK, Speth AR, Lingens F.](#) Purification and N-terminal amino-acid sequences of bacterial malate dehydrogenases from six actinomycetales strains and from *Phenylobacterium immobile*, strain E. *Biol Chem Hoppe Seyler*. 1989 Jul;370(7):763-8.
103. [Ryu YG, Butler MJ, Chater KF, Lee KJ.](#) Engineering of primary carbohydrate metabolism for increased production of actinorhodin in *Streptomyces coelicolor*. *Appl Environ Microbiol*. 2006 Nov;72(11):7132-9. Epub 2006.
104. Sonenshein A. Introduction to metabolic pathways, p. 127-132. *En* A. L. Sonenshein, J. A. Hoch, and R. Losick (ed.), *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacteria: biochemistry, physiology, and molecular genetics. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 1993.
105. [Sprusanský O, Rezuchová B, Homerová D, Kormanec J.](#) Expression of the *gap* gene encoding glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Streptomyces aureofaciens* requires GapR, a member of the AraC/XylS family of transcriptional activators. *Microbiology*. 2001 May;147(Pt 5):1291-301.
106. Steinmetz M. Carbohydrate catabolism: pathways, enzymes, genetic regulation, and evolution, p. 157-170. *En* A. L. Sonenshein, J. A. Hoch, and R. Losick (ed.), *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacteria: biochemistry, physiology, and molecular genetics. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 1993.
107. Sundaram, T.K., Wright, I.P. y Wilkinson, A.E. Malate dehydrogenase from thermophilic and mesophilic bacteria. Molecular size, subunit structure, amino acid composition, immunochemical homology and catalytic activity. *Biochem*. 1980; 19, 2017-2022.
108. Sutherland, P. y McAlister-Henn, L. Isolation and expression of the *Escherichia coli* gene encoding malate dehydrogenase. *J Bacteriol*. 1985; 163, 1074-1079.
109. [Tian J, Bryk R, Itoh M, Suematsu M, Nathan C.](#) Variant tricarboxylic acid cycle in *Mycobacterium tuberculosis*: identification of alpha-ketoglutarate decarboxylase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Jul 26;102(30):10670-5.
110. Titgemeyer F, Reizer J, Reizer A, Saier MH Jr. Evolutionary relationships between sugar kinases and transcriptional repressors in bacteria. *Microbiology*. 1994; 140: 2349-54.
111. Thompson, H., Tersteegen, A., Thauer, R.K. y Hedderich, R. Two malate dehydrogenases in *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Arch Microbiol*. 1998; 170, 38-42.
112. van Kuijk BL, Stams AJ. Purification and characterization of malate dehydrogenase from the syntrophic propionate-oxidizing bacterium strain MPOB. *FEMS Microbiol Lett*. 1996 Nov 1;144(2-3):141-4.
113. [van Wezel GP, Mahr K, König M, Traag BA, Pimentel-Schmitt EF, Willimek A, Titgemeyer F.](#) GlcP constitutes the major glucose uptake system of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Microbiol*. 2005 Jan;55(2):624-36.
114. [van Wezel GP, König M, Mahr K, Nothaft H, Thomae AW, Bibb M, Titgemeyer F.](#) A new piece of an old jigsaw: glucose kinase is activated posttranslationally in a glucose transport-dependent manner in *streptomyces coelicolor* A3(2). *J Mol Microbiol Biotechnol*. 2007;12(1-2):67-74.
115. [Veit A, Polen T, Wendisch VF.](#) Global gene expression analysis of glucose overflow metabolism in *Escherichia coli* and reduction of aerobic acetate formation. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2007 Feb;74(2):406-21.
116. Viollier, P.H., Minas, W., Dale, G.E., Folcher, M. y Thompson, C. Role of acid metabolism in *Streptomyces coelicolor* morphological differentiation and antibiotic biosynthesis. *J Bacteriol*. 2001a; 183, 3184-3192.

117. [Viollier PH, Nguyen KT, Minas W, Folcher M, Dale GE, Thompson CJ](#). Roles of aconitase in growth, metabolism, and morphological differentiation of *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol*. 2001b;183(10):3193-203.
118. Waksman, S.A. y Henrici A.T. Family II. Actinomycetaceae Buchanan. 1948; p. 929-980. En Breed R.S., Murray E.G.D. y Hitchens A.P. (ed.), *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 6th ed. The Williams and Wilkins Co., Baltimore.
119. Wang, D., Cooney, C., Demian, A., Dunnill, P. *Fermentation and Enzyme Technology*. Ed. John Wiley and sons. 1979.
120. Weatherburn, M.W. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia, *Anal. Chem*. 1967. 39: 971-974.
121. Welch, T.J. y Bartlett, D.H. Cloning, sequencing and over expression of the gene encoding malate dehydrogenase from the deep-sea bacterium *Photobacterium* species strain SS9. *Biochim Biophys Acta*. 1997; 1350, 41-46.
122. Williams, S.T., Sharpe, M.E. y Holt, J.G. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 1984; Vol. 4. Williams and Wilkins.
123. [Wu G, Culley DE, Zhang W](#). Predicted highly expressed genes in the genomes of *Streptomyces coelicolor* and *Streptomyces avermitilis* and the implications for their metabolism. *Microbiol*. 2005 Jul;151(Pt 7):2175-87.
124. Wynne, S.A., Nicholls, S.J., Schwen, M.D. y Sundaram, T. K. Tetrameric malate dehydrogenase from a thermophilic *Bacillus*: cloning, sequence and overexpression of the gene encoding the enzyme and isolation and characterization of the recombinant enzyme. *Biochem J*. 1996; 317, 235-245.
125. [Yennaco LJ, Hu Y, Holden JF](#). Characterization of malate dehydrogenase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrobaculum islandicum*. *Extremophiles*. 2007 Sep;11(5):741-6. Epub 2007 May 9.
126. [Yin Y, Kirsch JF](#). Identification of functional paralog shift mutations: conversion of *Escherichia coli* malate dehydrogenase to a lactate dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Oct 30;104(44):17353-7. Epub 2007 Oct 18.
127. Yueh, A.Y., Cheng, C.H.S. y Lai, Y.K. Purification and molecular properties of malate dehydrogenase from the marine diatom *Nitzschia alba*. *Biochem J*. 1989; 258, 221-228.
128. [http://home.hiroshimau.ac.jp/mbiotech/hosenkin_lab/Strepto\(Eng\).html](http://home.hiroshimau.ac.jp/mbiotech/hosenkin_lab/Strepto(Eng).html)
129. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>