

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



**POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
BIOMÉDICAS**

**CLONACIÓN, EXPRESIÓN Y CARACTERIZACIÓN
BIOQUÍMICA DE LA ISOCITRATO DESHIDROGENASA
DE *STREPTOMYCES COELICOLOR*.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A :

JOSUÉ SAÚL CRUZ RABADÁN

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MARÍA ELENA FLORES CARRASCO

MÉXICO, D.F.

NOVIEMBRE, 2009



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.

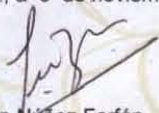
Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 18 de mayo de 2009, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** del alumno **CRUZ RABADÁN JOSUÉ SAÚL** con número de cuenta **096398177** con la tesis titulada **"CLONACIÓN, EXPRESIÓN Y CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA ISOCITRATO DESHIDROGENASA DE *Streptomyces coelicolor*"**, realizada bajo la dirección de la: **DRA. MARIA ELENA DEL CARMEN FLORES CARRASCO**

Presidente: DRA. ANA MARÍA CEVALLOS GAOS
Vocal: DRA. BERTHA MARIA JOSEFINA GONZALEZ PEDRAJO
Secretario: DRA. MARIA ELENA DEL CARMEN FLORES CARRASCO
Suplente: DR. GUILLERMO AGUILAR OZORIO
Suplente: DR. ROBERTO ARREGUÍN ESPINOSA DE LOS MONTEROS

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 5 de noviembre de 2009.


Dr. Juan Nájera Farfán
Coordinador del Programa

AGRADECIMIENTOS

AL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS, UNAM

**ESTE TRABAJO SE LLEVÓ A CABO CON EL APOYO DEL PROYECTO 58060 OTORGADO
POR CONACYT**

**A CONACYT POR LA BECA OTORGADA DURANTE LOS DOS AÑOS DEL PROGRAMA DE
POSGRADO**

**AGRADEZCO MUY ESPECIALMENTE A MI TUTORA, DRA. MARIA ELENA FLORES
CARRASCO, QUIEN ME HA BRINDADO SU ASESORÍA Y AYUDA TANTO EN LO
ACADÉMICO COMO EN LO PERSONAL**

**A LOS MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORAL, DRA. ANA MARÍA CEVALLOS Y
DR. ROBERTO ARREGUÍN POR SU ASERTADA ASESORÍA DURANTE EL DESARROLLO
DEL PROYECTO**

**A LA DRA. BERTHA GONZÁLEZ Y AL DR. GUILLERMO AGUILAR POR LAS
CORRECCIONES REALIZADAS AL MANUSCRITO ORIGINAL**

AGRADECIMIENTOS

**A MIS AMIGOS, ALFREDO, SARA, TOSHIKO, PAULINA, JAZMIN, DR. FERNANDO
BASTARRACHEA Y PATY QUIENES ME BRINDARON SU AMISTAD Y SU AYUDA
DURANTE MI ESTANCIA EN EL LABORATORIO**

DEDICATORIA

**LA CULMINACIÓN DE ESTA TESIS DESEO DEDICARLA A LAS SIGUIENTES PERSONAS
DE MANERA MUY ESPECIAL:**

**A MIS PADRES, IRA Y ARTURO QUIENES SIEMPRE ME HAN MOTIVADO Y APOYADO
INCONDICIONALMENTE PARA ALCANZAR TODAS MIS METAS**

**A MI HERMANO JOHN, QUIEN SIEMPRE ME HA BRINDADO SU AYUDA Y HA SIDO
SOLIDARIO EN TODO MOMENTO**

**A MARYBELL QUIEN DESDE HACE VARIOS AÑOS HA ESTADO A MI LADO
APOYÁNDOME Y BRINDÁNDOME SU CARIÑO**

**A MI ABUELA CARMELITA, QUIEN SIEMPRE CREYÓ EN MÍ PARA CULMINAR ESTE
POSGRADO**

A VÍCTOR Y NAHUM QUE SIEMPRE HAN ESTADO A MI LADO

ÍNDICE

	Página
RESUMEN.....	8
ABSTRACT.....	9
ANTECEDENTES.....	10
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	31
HIPÓTESIS.....	32
OBJETIVOS.....	32
MATERIAL Y MÉTODOS.....	33
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	38
DISCUSIÓN FINAL.....	67
CONCLUSIONES.....	69
BIBLIOGRAFÍA.....	70

CLONACIÓN, EXPRESIÓN Y CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA ISOCITRATO DESHIDROGENASA DE *STREPTOMYCES COELICOLOR*.

RESUMEN

Las bacterias del género *Streptomyces* tienen importancia biotecnológica ya que de estos microorganismos se obtienen metabolitos secundarios importantes como son los antibióticos. A pesar de este hecho, el metabolismo primario ha sido poco estudiado en comparación con otros microorganismos, como lo es el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, el cual por un lado provee a la célula de poder reductor como NADPH o FADH y por otro es fuente de compuestos como oxaloacetato, succinil-CoA o α -cetoglutarato, que son precursores de otras moléculas como aminoácidos. Muchos antibióticos producidos por estos organismos derivan de intermediarios de este ciclo. Mutantes deletadas para algunas de las enzimas de ciclo de los ácidos tricarboxílicos en *S. coelicolor* mostraron que no producen actinorodina ni undecilprodigiosina y su crecimiento se interrumpe por la falta de hifas aéreas y no esporulan.

Una de las enzimas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos es la isocitrato deshidrogenasa (ICDH) cuya síntesis en varios microorganismos depende de la fuente de carbono usada en el medio y se ha visto que compuestos como el GTP, ADP o ATP pueden inhibir la actividad de esta enzima, así como por algunos intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Como parte de un proyecto general sobre el estudio del metabolismo primario en *S. coelicolor*, este trabajo tiene por objeto caracterizar una enzima clave que participa en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, como es la isocitrato deshidrogenasa que cataliza la reacción de descarboxilación oxidativa del ácido isocítrico generando ácido α -cetoglutarico, CO_2 y NADPH. En este trabajo se purificó DNA de *Streptomyces coelicolor* y se subclonó el SCO7000 (que es el probable ORF que codifica para la isocitrato deshidrogenasa) en un vector de expresión para su producción como proteína de fusión con tallo de histidinas en el extremo amino terminal, generándose el plásmido pR-ICD. Posteriormente se transformó la cepa de *Escherichia coli Top10F'* para propagarlo y después se introdujo en la cepa BL21(DE3)pLys para su sobreexpresión. La actividad y estabilidad de la proteína recombinante se evaluó *in vitro*. El peso molecular se verificó mediante electroforesis (80 kDa). La actividad específica de la enzima purificada aumentó más de 40 veces en comparación con el extracto libre de células de *S. coelicolor*. Los resultados mostraron que la proteína recombinante pura permanece activa en amortiguador de fosfatos que contiene diferentes concentraciones de imidazol; se encontró que la mayor actividad es a pH 7.8 y mostró los siguientes valores cinéticos: K_m para isocitrato de 4.4 μM y V_{max} de 0.149 $\mu\text{molas}/\text{min}$; K_m para manganeso de 8.0 μM y V_{max} de 0.200 $\mu\text{molas}/\text{min}$; K_m para NADP^+ de 1.07 μM y V_{max} de 21.5 $\mu\text{molas}/\text{min}$. La actividad de la enzima se inhibió por compuestos como ATP, ADP, oxaloacetato, alfa-cetoglutarato y ácido cítrico, mientras que el glioxalato resultó ser un efector positivo de la actividad de la enzima, lo cual indica que dentro del ciclo del ácido cítrico, la ICDH es una enzima que mantiene una estricta regulación del flujo de carbono.

CLONING, EXPRESSION AND BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF STREPTOMYCES COELICOLOR ISOCITRATE DEHYDROGENASE.

ABSTRACT

Streptomyces genus Bacteria have biotechnological importance since secondary metabolites as antibiotics are obtained from these microorganisms. Despite this fact, primary metabolism such as its tricarboxylic acid cycle has not been well studied as much as other microorganisms, TCA cycle provides reducing power to the cell as NADPH or FADH and is also a source of compounds such as oxaloacetate, succinyl-CoA and α -ketoglutarate, which are precursors of other molecules such as amino acids. Many antibiotics produced by these organisms derive from these cycle intermediaries. Mutants delete for some of the enzymes of the TCA cycle in *S. coelicolor* showed actinorodine not produce or undecylprodigiosine and its growth is interrupted by the lack of aerial hyphae and sporulate not. Isocitrate dehydrogenase (ICDH) an enzymes present in the tricarboxylic acid cycle, whose synthesis depends on the carbon source used in the medium, this enzyme is in several organisms. Compounds such as GTP, ADP or ATP can inhibit the activity of this enzyme, as well as some intermediates of tricarboxylic acid cycle. As part of an overall project on the study of primary metabolism in *S. coelicolor*, this work is aim to characterize a key enzyme involved in the tricarboxylic acid cycle, such as isocitrate dehydrogenase that catalyzes the reaction of oxidative decarboxylation of isocitric acid generating α -ketoglutaric acid, CO₂ and NADPH. In this study we purified DNA from *Streptomyces coelicolor* and SCO7000 (which is the likely ORF encoding the isocitrate dehydrogenase) was subcloned in an expression vector to be produce as a fusion protein with a histidine stem in the amino terminal, generating plasmid pR-ICD. Subsequently we transformed *Escherichia coli* Top10F strain to propagate it and then introduced into BL21 (DE3) plys strain for overexpression. Recombinant protein activity and stability was evaluated in vitro. Molecular weight was verified by electrophoresis (80 kDa). Specific activity of the purified enzyme increased more than 40 times compared with cell-free extract of *S. coelicolor*. The results showed that pure recombinant protein remains active in phosphate buffer containing different concentrations of imidazole. We found that the enzyme highest activity is at pH 7.8 and showed the following kinetic values: Km for isocitrate is 4.4 μ M and Vmax of 0.149 μ moles/min, Km for manganese is 8.0 μ M and Vmax of 0.200 μ moles/min, Km for NADP⁺ of 1.07 μ M and Vmax of 21.5 μ moles/min. The enzyme activity was inhibited by compounds such as ATP, ADP, oxaloacetate, alpha-ketoglutarate and citric acid, while the glyoxalate proved to be a positive effector of enzyme activity, indicating that within the citric acid cycle, the ICDH is an enzyme that maintains a strict regulation of carbon flux.

ANTECEDENTES

Al género *Streptomyces* pertenecen las bacterias Gram-positivas que viven en el suelo y crecen en material en descomposición. Son del orden Actinomicetales y como la mayoría de los cuales tienen una importancia médica y biotecnológica ya que poseen una gran capacidad para la producción de una variedad de metabolitos secundarios (Keiser, 2000). La importancia de *Streptomyces* en la medicina se debe a la producción de más de dos tercios de los antibióticos derivados naturalmente (y de muchas otras sustancias tales como agentes antitumorales e inmunosupresores), todo esto por medio de complejas rutas del metabolismo secundario (Bentley *et al.*, 2002).

Los *Streptomyces* son también importantes por las enzimas que producen. Por ejemplo, la glucosa isomerasa es muy usada en la conversión de glucosa a fructosa que es un azúcar 2.5 veces más dulce. Producen también muchas otras enzimas hidrolíticas que son utilizadas en la industria (Hodgson 2000).

En su nicho ecológico estas bacterias son cruciales para reciclar el carbono ya que degradan remanentes insolubles de otros organismos tales como lignocelulosa y quitina (que son los más abundantes biopolímeros en el mundo), haciendo a *Streptomyces* un organismo central en el reciclamiento del carbono (Bentley *et al.*, 2002). Hay ahora buena evidencia del crecimiento de actinomicetos en suelos marinos indicando que no se circunscriben a suelos (Mincer *et al.*, 2002).

Estas bacterias tienen un complejo ciclo de vida que incluye diferenciación del microorganismo en distintos tipos celulares: cuando la espora germina da lugar al crecimiento del micelio-sustrato, que después se diferencia tanto morfológica como metabólicamente (Hoobs, 1989). Las células de estas bacterias permanecen asociadas formando largos filamentos, los cuales se elongan por crecimiento apical desde el extremo y al mismo tiempo se ramifican en una compleja red de micelio. *Streptomyces* tiene un patrón de crecimiento bifásico que después de la fase de crecimiento inicial hay una breve interrupción; después continúa la acumulación de masa acompañado por el desarrollo de hifas aéreas sobre la superficie de la colonia y comienza el metabolismo secundario (Viollier *et al.*, 2001). En estas hifas aéreas se forman septos que darán lugar a cadenas de esporas con lo cual se cierra el ciclo (**Fig.1**). Durante el ciclo de vida de la bacteria filamentosa *Streptomyces*, la diferenciación morfológica está muy integrada con los procesos de ciclo celular y crecimiento, como también con el comportamiento multicelular complejo que involucra moléculas señalizadoras y coordinación con el metabolismo secundario (Flärdh, 2009).

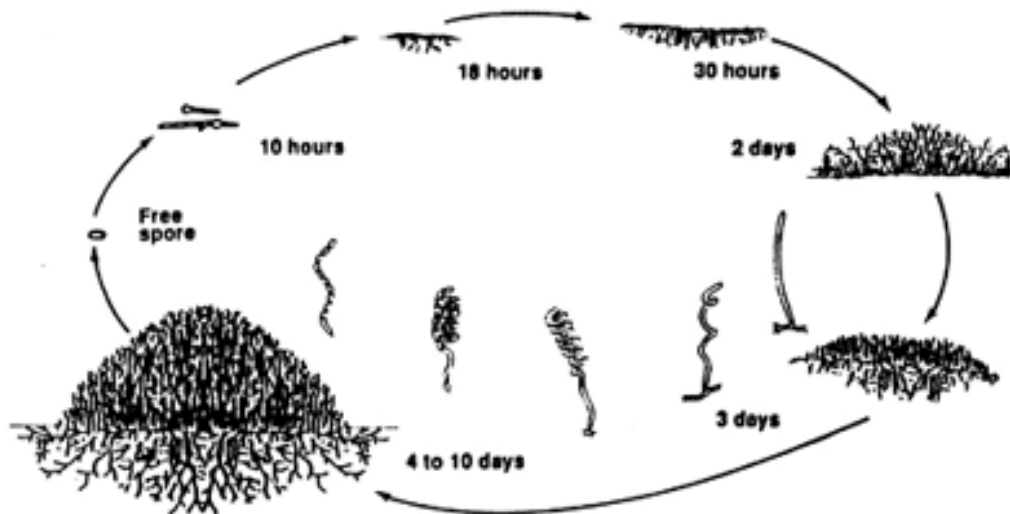


Figura 1. Ciclo de vida del género *Streptomyces*.

Streptomyces coelicolor A3(2) es la especie mejor estudiada del género. La secuenciación de su genoma muestra un cromosoma de 8,667,507 pares de bases (pb) con un contenido de 72.12% de G-C, similar al encontrado en los géneros *Saccharopolyspora*, *Amycolatopsis*, y *Micromonospora*. Sin embargo, se han encontrado segmentos cortos de DNA de bajo G-C en una región no codificante del grupo de genes de la actinorodina (Bentley *et al.*, 2002).

El cromosoma es lineal como ocurre en otros organismos de este género. En la región central se encuentra el origen de replicación (*oriC*), el cual se encuentra flanqueado por la mayoría de los genes esenciales involucrados en los procesos de división celular, replicación del ADN, transcripción, traducción y síntesis de aminoácidos. En los extremos existen repeticiones invertidas terminales (TIR's), cuyos extremos 5' se encuentran unidos a proteínas de manera covalente para mantener al cromosoma unido en forma circular. Cerca de estos extremos se encuentran los genes que intervienen en las funciones no esenciales tales como metabolismo secundario (**Fig. 2**).

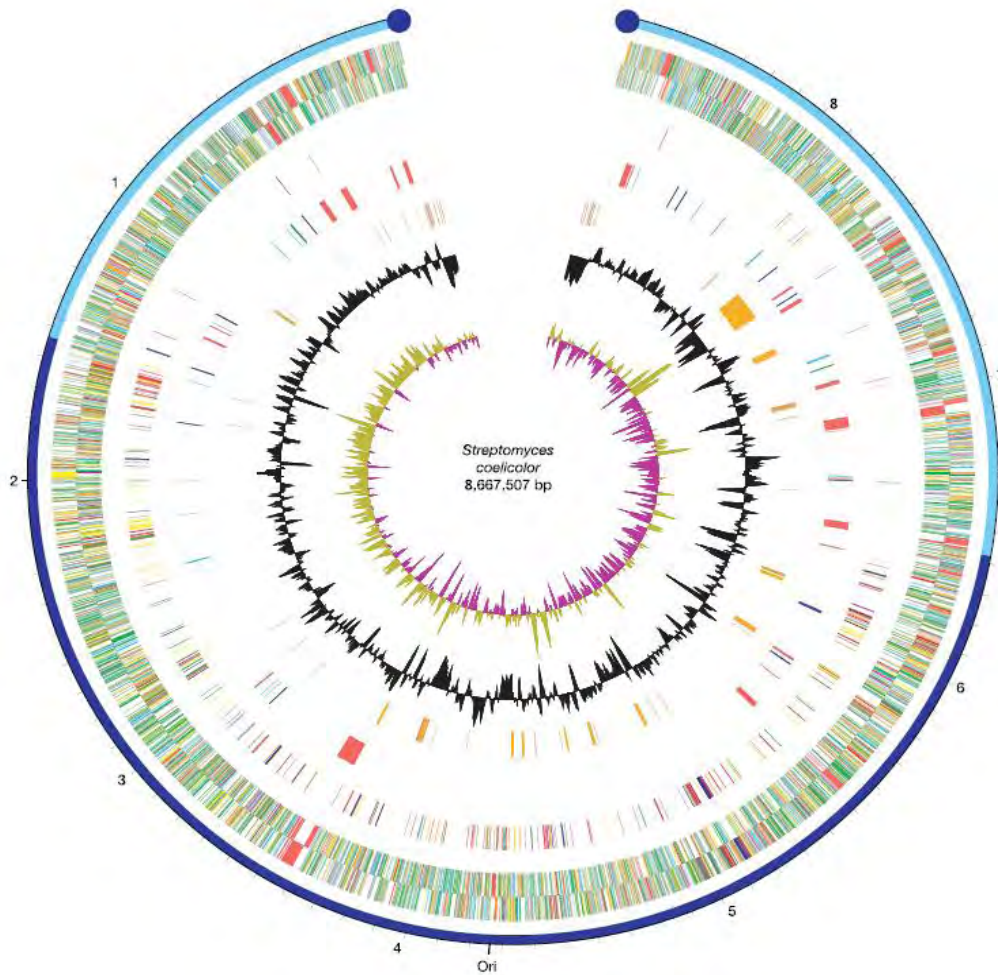


Figura 2. Representación circular del cromosoma de *S. coelicolor*. La escala externa está numerada en dirección contraria a las manecillas del reloj en megabases e indica la región central (azul oscuro) y los brazos del cromosoma (azul claro). Círculos 1 y 2 (desde afuera hacia adentro) son todos los genes (hebra 5'-3' y 3'-5') en donde cada color representa una función (negro, metabolismo energético; rojo, información del metabolismo secundario y de transferencia (Bentley *et al.*, 2002).

Se sabe que estas regiones tienen una tendencia a sufrir grandes deleciones y amplificaciones con una frecuencia que va de 0.1 hasta 1% de forma

espontánea e incluso es mayor después del tratamiento con componentes que dañan el DNA o interfieren con su replicación.

Esta cepa contiene 2 plásmidos, el SCP1 que es lineal con 365 kilobases (kb) el cual contiene los genes de biosíntesis y resistencia para metilenomicina y el SCP2 que es circular y tiene un tamaño de 31 kb, que es de bajo número de copias y se replica bidireccionalmente desde un origen para generar nuevas copias del plásmido de doble cadena (Bentley *et al.*, 2002).

Debido a su importancia médica y biotecnológica se ha estudiado a fondo el metabolismo secundario de *S. coelicolor* y se sabe que por lo menos sintetiza 4 antibióticos: actinorodina, undecilprodigiosina, metilenomicina y antibiótico dependiente de calcio (CDA) (Bibb 1996). Por otro lado la secuencia del genoma reveló 18 probables conjuntos de genes que podrían codificar para enzimas del metabolismo secundario. Por el contrario se ha estudiado relativamente poco el metabolismo primario de estos organismos (Hodgson 2000).

PRODUCCIÓN DE ANTIBIÓTICOS POR *Streptomyces*

Se sabe que el género *Streptomyces* produce una gran cantidad de antibióticos y otra clase de metabolitos secundarios. En general el orden de los *Actinomycetales* produce dos terceras partes de los antibióticos conocidos y entre estos, cerca del 80% son producidos por el género *Streptomyces*. La **tabla 1** describe algunos antibióticos así como algunas de sus características.

Antibiótico	Productor	Clase química	Blanco	Aplicación
Actinomicina D	<i>Streptomyces</i> spp.	Peptídico	Transcripción	Antitumoral
Avermectina	<i>S. avermitilis</i>	Macrólido	Canales de iones cloro	Antiparasitario
Bialafos	<i>S. hygroscopicus</i>	Peptídico	Glutamina sintetasa	Herbicida
Cloranfenicol	<i>S. venezuelae</i>	N-dicloroacilfenilpropanaide		Antibacterial
Ácido clavulánico	<i>S. clavuligerus</i>	β -lactámico	Inhibidor de la β -lactamasa	Antibacterial
Desferroxamina	<i>S. pilosus</i>	Péptidico	Quelador de hierro	Purga hierro en sobrecarga de hierro
FK506 (tacrolimus)	<i>S. hygroscopicus</i>	Macrólido	Se une a la proteína FK	Inmunosupresor
Higromicina B	<i>S. hygroscopicus</i>	Aminoglucósido		Antihelmíntico
Lincomicina	<i>S. lincolnensis</i>	Amida-azúcar		Antibacterial
Mitramicina	<i>S. argillaceus</i>	Ácido aureólico	Alquilación del DNA	Antitumoral
Mitomicina C	<i>S. caespitosus</i> <i>S. verticillatus</i>	Benzoquinona	Entrecruzamiento de DNA	Antitumoral
Natamicina	<i>S. nataensis</i>	Polieneo tetraeno	Membrana (formador de poro)	Antifúngico
Candidina	<i>S. griseus</i>	Macrólido	Membrana (formador de poro)	Antifúngico
Daptomicina	<i>S. roseosporus</i>	Lipopeptídico		Antibacterial

Tabla 1. Antibióticos producidos por *Streptomyces*. (Tomada de Kieser *et al.*, 2000).

La producción de antibióticos en *Streptomyces* es dependiente de la fase de crecimiento. En medio líquido, la producción empieza cuando el cultivo disminuye en velocidad de crecimiento mientras que en cultivos de agar, la producción coincide con el comienzo de la diferenciación morfológica. Muchos antibióticos son

el producto de complejas rutas biosintéticas, con un conjunto de varios genes involucrados en la síntesis de tal componente. Estos genes contienen generalmente genes reguladores de rutas específicas, los cuales actúan como activadores transcripcionales y son así mismo sujetos a un control por genes regulatorios pleiotrópicos. El comienzo de la síntesis de un antibiótico es determinado por la tasa de crecimiento, señalización de moléculas (Horinouchi, 1994), por desequilibrios en el metabolismo (Hood *et al.*, 1992), así como también por estrés fisiológico (Hobbs *et al.*, 1992).

METABOLISMO

Se conoce como metabolismo a la suma de todas las reacciones químicas que ocurren en la célula. Generalmente al metabolismo se le divide en dos categorías: anabolismo y catabolismo. El anabolismo es la síntesis de moléculas complejas a partir de moléculas más sencillas con consumo de energía y el catabolismo es el proceso mediante el cual moléculas más grandes y complejas son descompuestas en moléculas más pequeñas y sencillas liberándose energía en el proceso. Algunas reacciones están presentes en ambos tipos de metabolismo. Todas estas reacciones se clasifican dentro del metabolismo primario, es decir, son procesos que de forma directa intervienen en la supervivencia de la célula. En cambio, el metabolismo secundario incluye todas las rutas metabólicas que no son esenciales para la supervivencia de la célula, tales como la producción de antibióticos y pigmentos. Sin embargo, no todos los actinomicetos producen metabolitos secundarios.

METABOLISMO PRIMARIO DEL GÉNERO *Streptomyces*

En la mayoría de los estreptomicetos, la ruta de la glucólisis está en operación (Cochrane, 1961), ya que existe evidencia que soporta el uso de las vías Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) y hexosamonofosfato más pentosa monofosfato (Hmp) en *Streptomyces coelicolor*, *S. griseus* y *S. scabies* (Hodgson, 2000). En el primer microorganismo, Obanye *et al.* (1996) encontró que las vías EMP son activas durante la fase de crecimiento exponencial y que la Hmp está presente en la transición entre exponencial y estacionaria, cuando el metabolismo secundario es más activo. *S. clavuligerus* no puede metabolizar glucosa como fuente de carbono y energía, pero puede usar almidón (García-Domínguez *et al.*, 1989).

El ciclo de los ácidos tricarboxílicos parece estar completo y activo en ciertos estreptomicetos. Dekleva (1988) demostró un ciclo completo en *Streptomyces* C5, mientras que Hostalek *et al.* (1969b) lo estudiaron en *S. aureofaciens*; sin embargo en ambos estudios utilizaron cepas mejoradas.

El estudio detallado del catabolismo del glicerol y de la galactosa ha revelado diferencias y similitudes en el metabolismo observado en otras bacterias. Estas rutas del catabolismo de estos compuestos son inducibles y están sujetas a represión catabólica. La represión catabólica es la habilidad de una fuente de carbono para ser metabolizada eficientemente y prevenir la utilización de fuentes de carbono alternativas. Este tipo de regulación metabólica está ampliamente distribuida en bacterias, y en el caso del género *Streptomyces*, puede inhibir también la producción de antibióticos (Cortés *et al.*, 1986).

En todas las especies de *Streptomyces* estudiadas, la principal ruta de asimilación de nitrógeno es por la vía de glutamato sintetasa (GS) de los cuales existen dos tipos: GSI que se parece a aquellos sistemas encontrados en la mayoría de los procariontes y GSII que es más parecido al tipo de los eucariontes (Wray, 1988).

Una diferencia importante en la biosíntesis de aminoácidos entre *Streptomyces* y bacterias entéricas es la regulación. En bacterias unicelulares, la regulación se lleva a cabo a nivel transcripcional, con el producto de la vía controlando negativamente la expresión de los genes que codifican a las enzimas biosintéticas. Este mecanismo funciona con la unión del aminoácido a proteínas que entonces reconocen ciertas regiones en el DNA para reprimir la síntesis del RNA mensajero. Existen reportes que mencionan que la biosíntesis de arginina y de aminoácidos aromáticos puede ser objeto de represión por retroalimentación y se ha encontrado un atenuador río arriba del gen *trpEG* el cual codifica para la primera enzima de la ruta de triptofano. Por otro lado, los genes que codifican las enzimas para la parte final de la ruta están regulados por fase de crecimiento (Hu *et al.*, 1999).

EL CICLO DE LOS ÁCIDOS TRICARBOXÍLICOS

En organismos aeróbicos, la glucosa y otros azúcares, ácidos grasos y la mayoría de los aminoácidos son finalmente oxidados para producir CO₂ y H₂O a través del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (**Fig. 3**). Así, la respiración celular ocurre en tres etapas principales. En la primera, las moléculas orgánicas son oxidadas para dar fragmentos de dos carbonos como acetil-CoA. En la segunda

fase, estos grupos acetil entran al ciclo de los ácidos tricarboxílicos para ser oxidados enzimáticamente a CO_2 . La energía liberada es conservada en transportadores de electrones reducidos como NADH y FADH_2 . En la tercera etapa, estos cofactores reducidos son oxidados dando protones (H^+) y electrones, los cuales son transferidos a la cadena de transporte de electrones y al O_2 para formar H_2O . Durante este proceso una gran cantidad de energía es liberada y conservada mediante ATP.

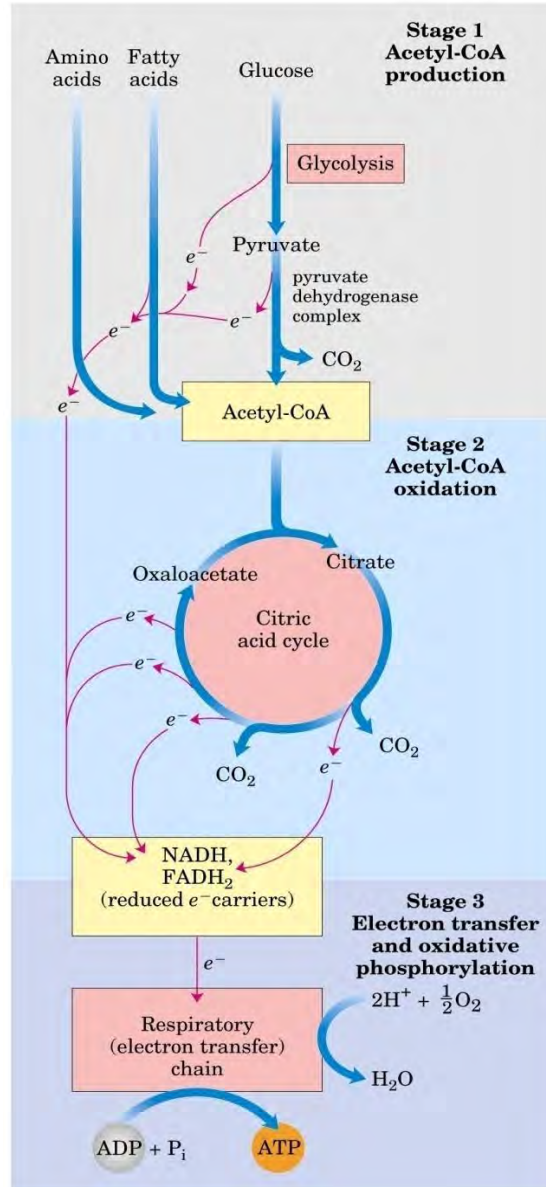


Figura 3. Catabolismo de proteínas, grasas y carbohidratos. (Tomado de Lehninger, 1993).

El ciclo de los ácidos tricarbónicos también es una fuente importante de precursores para construir moléculas tales como aminoácidos o nucleótidos y un

componente del ciclo, el oxaloacetato es un importante precursor de la glucosa, mediante gluconeogénesis.

El ciclo incluye una serie de reacciones de óxido-reducción, lo cual va a generar electrones con alta energía que serán usados para la síntesis de ATP. Se debe tener en mente que este ciclo sólo remueve electrones del acetil-CoA y usa estos electrones para formar NADH o FADH₂. El ciclo inicia con la entrada de acetil-CoA para que la citrato sintasa catalice la condensación de acetil-CoA con oxaloacetato para formar citrato.

La aconitasa cataliza la formación reversible de isocitrato a partir de citrato; el isocitrato es entonces oxidado para formar alfacetoglutarato por medio de la isocitrato deshidrogenasa en una reacción que libera CO₂. El alfacetoglutarato sufre otra deshidrogenación y descarboxilación para formar succinil-CoA y CO₂. El succinil-CoA reacciona con GDP y fósforo inorgánico para formar succinato y GTP en una fosforilación a nivel de sustrato. El succinato es entonces oxidado para dar fumarato por la succinato deshidrogenasa, una enzima que está unida a FAD que es parte de la membrana plasmática de las bacterias (o de la membrana interna de las mitocondrias en eucariontes). El fumarato es reversiblemente hidratado por la fumarasa para dar L-malato, el cual es oxidado por la malato deshidrogenasa unida a NAD para regenerar una molécula de oxaloacetato. Así ésta última se puede combinar con acetil-CoA e iniciar otra vuelta en el ciclo (**Fig. 4**).

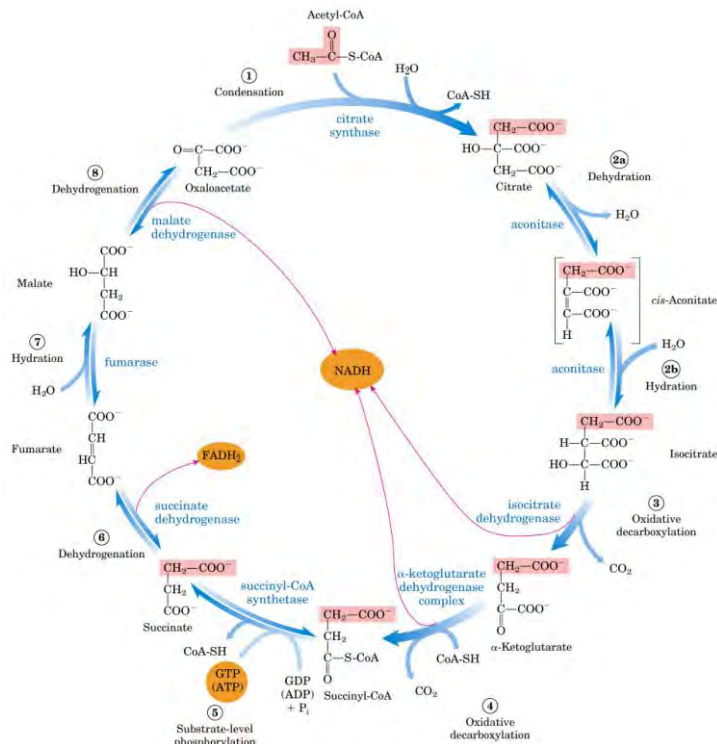


Figura 4. El ciclo de los ácidos tricarboxílicos (Tomado de Lehninger, 1993).

En organismos aeróbicos, el ciclo del ácido cítrico es una ruta anfibólica (sirve tanto en procesos catabólicos como anabólicos). Por medio de varias enzimas auxiliares, algunos intermediarios del ciclo como el alfa-cetoglutarato o el oxaloacetato, pueden ser removidos del ciclo y sirven como precursores de aminoácidos (**Fig. 5**). Tanto el aspartato como el glutamato tienen el mismo esqueleto de carbono que el oxaloacetato y alfa-cetoglutarato, respectivamente y son sintetizados por simple transaminación. A su vez estos carbonos son usados para construir otros aminoácidos así como también purinas y pirimidinas. También el oxaloacetato es convertido en glucosa durante la gluconeogénesis. El Succinil-

CoA es un intermediario en la síntesis del anillo de porfirina del grupo hemo, los cuales sirven como acarreadores de electrones en los citocromos.

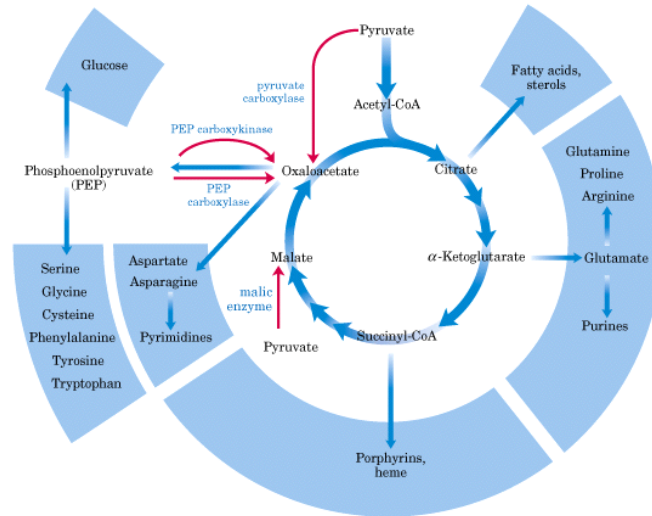


Figura 5. Intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos sirven como precursores de diversos compuestos (Tomado de Lehninger, 1993).

Se ha reportado que en algunos microorganismos como *E. coli* y levaduras, el acetato es usado como fuente de carbono para generar fosfoenolpiruvato para la síntesis de glúcidos, ya que en estos organismos existe una vía que permite la producción de oxaloacetato a partir de acetato: el ciclo del glioxalato.

En este ciclo el acetil-CoA se condensa con oxaloacetato para dar citrato, que después da lugar al isocitrato. Pero a diferencia del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, el isocitrato sirve como sustrato para la isocitrato liasa dando lugar a glioxalato y a succinato. Posteriormente el glioxalato se condensa con acetil-CoA resultando malato por la malato sintasa. Finalmente el malato se oxida a

oxaloacetato, el cual puede condensarse con acetil-CoA para comenzar nuevamente con el ciclo (**Fig. 6**).

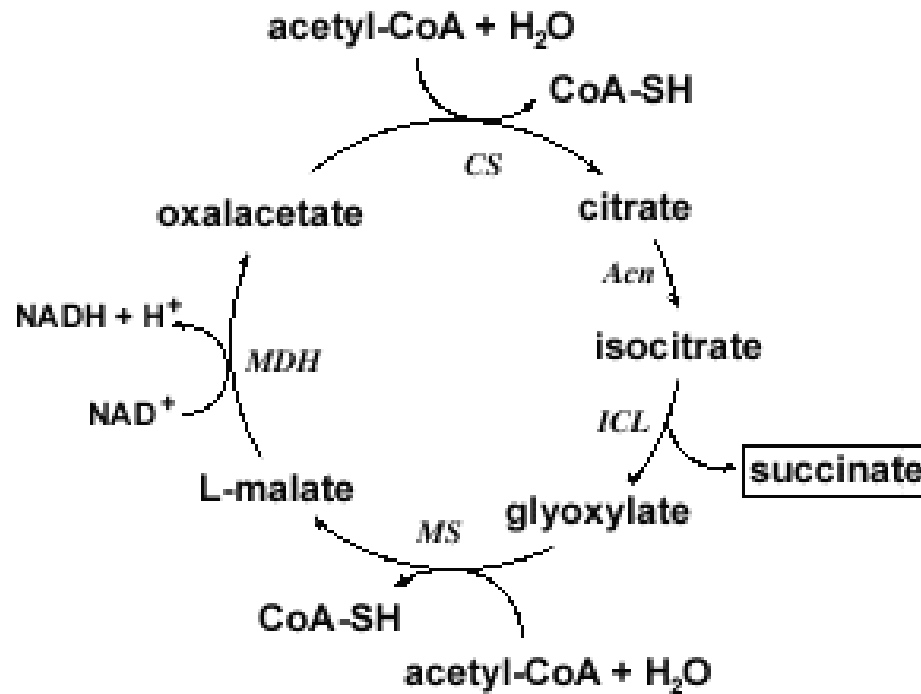


Figura 6. El ciclo del glioxalato.

Cuando algunos intermediarios del ciclo son removidos para usarse como precursores de otras moléculas, el decremento resultante en la concentración de dichos intermediarios podría disminuir el flujo a través del ciclo. Sin embargo, estos intermediarios pueden ser repuestos por reacciones anapleróticas. De este modo en circunstancias normales, las reacciones que sirven para sintetizar precursores y las que sirven para reponer intermediarios del ciclo se encuentran

en equilibrio facilitando que la concentración de cada uno de los intermediarios del ciclo permanezca prácticamente constante.

REGULACIÓN DEL CICLO DE KREBS

En estas vías metabólicas, la regulación es ejercida por enzimas alostéricas para asegurar la producción de intermediarios a una velocidad necesaria y evitar la sobreproducción de compuestos. El flujo de átomos de carbono está sujeto a regulación en dos niveles: primero la conversión de piruvato en acetil-CoA y segundo, la entrada de este último al ciclo. Es importante mencionar que el ciclo también está regulado por la acción de dos enzimas dentro de esta ruta: la isocitrato deshidrogenasa y la alfacetoglutarato deshidrogenasa.

Antes de entrar al ciclo, el piruvato es convertido en acetil-CoA por medio de un complejo enzimático, la piruvato deshidrogenasa, el cual es inhibido de forma alostérica por moléculas como ATP, acetil-CoA ó NADH, los cuales son indicadores de un estado energéticamente alto dentro de la célula. En cambio, compuestos como AMP, CoA o NAD⁺ son activadores alostéricos del complejo piruvato deshidrogenasa (**Fig. 7**). La piruvato deshidrogenasa (PDH) determina que el piruvato entre o no al ciclo de Krebs para su oxidación. Este complejo enzimático a pesar de no ser parte del ciclo, tiene un papel importante sobre la regulación del flujo de metabolitos que vienen desde la glucólisis. PDH es un complejo multienzimático compuesto por tres enzimas: E1, piruvato deshidrogenasa; E2, acetil transferasa; E3, dihidrolipolil deshidrogenasa, las cuales son responsables de descarboxilar al piruvato y de transferir el residuo

acetil al CoA para formar acetilCoA. Este complejo se encuentra asociado a dos enzimas que tienen papeles regulatorios. Una de ellas, PDH cinasa es específica para la PDH y su papel es fosforilar y de esta forma inactivar al componente piruvato deshidrogenasa del complejo. La otra enzima es PDH fosfatasa y su función es eliminar el grupo fosfato y de esta forma activar al complejo piruvato deshidrogenasa. PDH también se regula por la disponibilidad de sus coenzimas, NAD^+ y CoA (Galway, 2004).

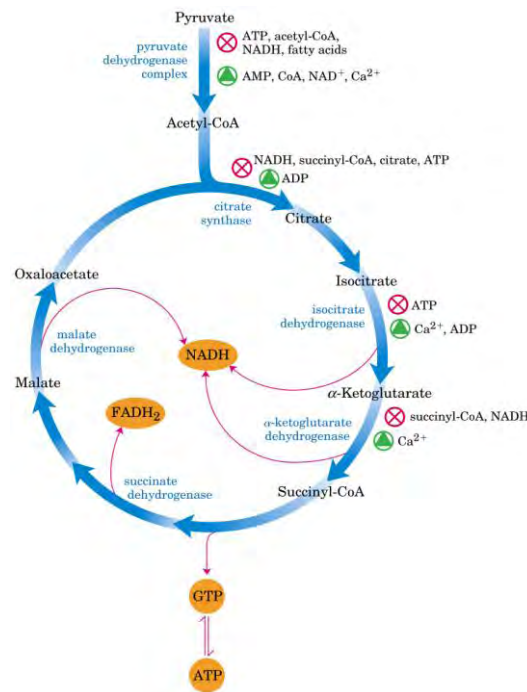


Figura 7. Regulación del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (Tomado de Lehninger, 1993).

Tres factores se encargan de mantener la velocidad del flujo del ciclo de los ácidos tricarboxílicos: la disponibilidad de sustratos, la inhibición a cargo de

productos acumulados y la retroinhibición alostérica de las enzimas de las primeras reacciones dentro del ciclo.

Dentro del ciclo existen enzimas que catalizan reacciones altamente exergónicas: la isocitrato deshidrogenasa y la alfa-cetoglutarato deshidrogenasa, ya que el NADH (producto de ambas enzimas) se acumula e inhibe ambas reacciones. De modo similar el succinil-CoA inhibe a la alfa-cetoglutarato deshidrogenasa (y también a la citrato sintasa); el citrato bloquea a la citrato sintasa; el ATP inhibe tanto a la isocitrato deshidrogenasa como a la citrato sintasa, pero esta última inhibición es revertida por ADP que actúa como un activador alostérico (Lehninger, 1993).

El succinato puede convertirse en oxaloacetato y a continuación en fosfoenolpiruvato y éste puede que actuar como precursor de glucosa a través de las reacciones que llevan a cabo la gluconeogénesis (**Fig. 5**).

El isocitrato por lo tanto se encuentra presente tanto en el ciclo de Krebs como en el de glioxalato y por lo tanto es un intermediario crucial en ambos ciclos, lo cual implica una coordinación en la regulación de estas vías. En *E. coli*, la isocitrato deshidrogenasa está regulada por una proteína que tiene tanto actividad de cinasa (que la fosforila y por tanto la inactiva) como de fosfatasa (donde se elimina el fosfato y reanuda su actividad). La inactivación de la ICDH desvía al isocitrato hacia el ciclo del glioxalato donde se inicia la ruta hacia la gluconeogénesis. Cuando se reactiva la ICDH (eliminando el fosfato) entra más isocitrato al ciclo de los ácidos tricarbóxicos para generar energía. Esta actividad fosfatasa que reanuda a la ICDH es estimulada por algunos intermediarios del

ciclo de Krebs o por moléculas que indican una baja carga energética dentro de la célula (**Tabla 2**).

Compuestos que inhiben la actividad cinasa	Compuestos que estimulan la actividad fosfatasa
Citrato	Isocitrato
Isocitrato	Alfacetoglutarato
Alfacetoglutarato	Oxaloacetato
Oxaloacetato	ADP
ADP	
NADP+	

Tabla 2. Efectores alostéricos de la proteína cinasa/fosfatasa reguladora de la ICDH en *E.coli* (Tomada de Lehninger, 1993).

Los mismos intermediarios que dan lugar a la activación de la ICDH, son inhibidores alostéricos de la isocitrato liasa. De esta forma se reparte el isocitrato entre los dos ciclos. Si se inactiva la ICDH, el isocitrato se dirige al ciclo del glioxilato; pero cuando está activa, el isocitrato se dirige al ciclo de los ácidos tricarboxílicos para generar energía (**Fig. 8**).

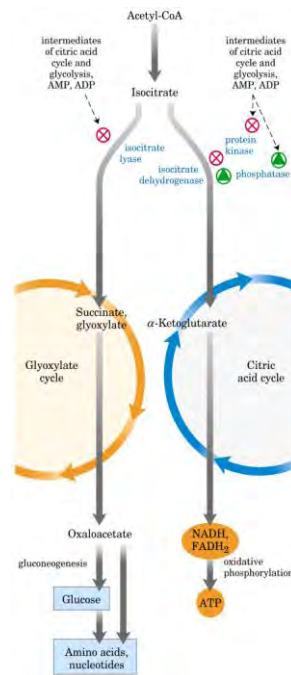


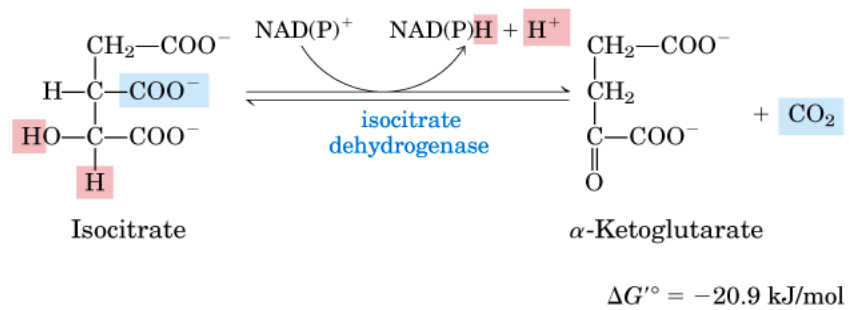
Figura 8. El isocitrato puede tener dos destinos diferentes (Tomado de Lehninger, 1993).

En *Streptomyces coelicolor* se realizaron estudios proteómicos y metabolómicos en crecimiento diáuxico en Medio Mínimo con maltosa y glutamato. El perfil de crecimiento mostró una primera fase (RG1) en la que el organismo usó el glutamato como fuente de carbono y nitrógeno; luego se observó una fase de transición (T) en la que el organismo se encuentra en estrés nutricional debido a que se termina el glutamato. Después se inició una segunda fase de crecimiento, en la cual se utilizan maltosa como fuente de carbono y amonio (producido por la degradación del glutamato) como fuente de nitrógeno (RG2) y finalmente se presentó la fase estacionaria (S). Los genes que codifican para las enzimas citrato sintasa, isocitrato deshidrogenasa, malato deshidrogenasa y succinil-CoA sintetasa 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. Los genes

correspondientes también mostraron un alto nivel de transcripción en las mismas fases (Novotna *et al.*, 2003).

ISOCITRATO DESHIDROGENASA

Una de las reacciones clave dentro del ciclo de los ácidos tricarboxílicos es la de la isocitrato deshidrogenasa (1.1.1.41 y 1.1.1.42) ya sea dependiente de NADP⁺ o NAD⁺, que cataliza la descarboxilación oxidativa del ácido isocítrico generando alfa-cetoglutarato como se muestra en el siguiente diagrama:



A esta enzima también se lo conoce como oxalosuccinato descarboxilasa, y pertenece a la clase de enzimas oxidoreductasas que actúan sobre el grupo de donadores CH-OH.

Existen varios estudios de la ICDH de diversos organismos tanto eucariontes como procariontes, como se muestra en la **tabla 3**, en donde se puede observar que hay una diversidad en cuanto al tamaño y conformación de la ICDH en diferentes microorganismos.

Tabla 3. Pesos moleculares reportados para ICDH de diferentes organismos.

Microorganismo	P.M. (Kda)	Estructura (KDa)	Referencia
<i>Candida tropicalis</i> Peroxisomal-NADP Mitochondrial-NAD	90 360	Dimérica (45) Octamérica (41 y 38)	Yamamoto (1995)
<i>Cephalosporium acremonium</i>	140	Dimérica (75)	Olano (1995)
<i>Escherichia coli</i>	90	Dimérica (45)	Suzuki (1995)
<i>Vibrio parahemolyticus</i>	80	Monomérica	Eikmanns (1995)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	310	Octamérica (39 y 40)	Keys (1990)
<i>Saccharopolyspora erythraea</i>	130	Dímero (60)	Alvarado (2003)
<i>Paracoccus denitrificans</i>	180	Dímero (90)	Janiczek et al. (2004)

Esta proteína pertenece a una familia de enzimas que exhiben una gran diversidad en cuanto a la composición de aminoácidos, especificidad del cofactor, requerimiento de iones metálicos y estado oligomérico. Puede usar como aceptor de electrones coenzimas como NAD^+ o NADP^+ y principalmente requiere iones divalentes como al Mg^{++} ó Mn^{++} . Tanto la composición de subunidades como el peso molecular pueden variar como se muestra en la **tabla 3**.

El alineamiento de la ICDH (SCO7000) de *S. coelicolor* mediante el programa BLAST a nivel de proteína indica que los organismos con quien comparte más identidad son los enlistados en la **tabla 4**.

Organismo	Porcentaje de identidad
<i>Streptomyces coelicolor</i>	100 %
<i>Streptomyces avermitilis</i>	86 %
<i>Streptomyces griseus</i>	82 %

<i>Frankia alni</i>	81 %
<i>Nocardioides sp.</i>	75 %
<i>Arthrobacter aurescens</i>	71 %
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	67 %

Tabla 4. Porcentaje de identidad de ICDH de diferentes organismos.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La isocitrato deshidrogenasa es una enzima clave dentro del metabolismo primario y es parte importante del ciclo del ácido cítrico ya que los productos de la reacción catalizada por esta enzima sirven como sustratos para otras reacciones. El α -cetoglutarato puede servir para formar glutamato y posteriormente sintetizar otros aminoácidos. Por otro lado, en esta reacción también se forman moléculas con poder reductor como NAD(P)H.

El género *Streptomyces* ha sido estudiado extensamente en cuanto al metabolismo secundario dado que es fuente importante de diversos metabolitos secundarios tales como antibióticos e inmunosupresores. Sin embargo, se conoce menos del metabolismo primario en comparación con otros géneros bacterianos. Se ha reportado en la literatura que bacterias como *E. coli* mantienen una regulación dentro del ciclo del ácido cítrico mediante la inhibición ejercida de diversos intermediarios del mismo sobre la actividad de la isocitrato deshidrogenasa. Por otro lado, se sabe que en *Streptomyces coelicolor* algunas enzimas del ciclo son necesarias tanto para la producción de antibióticos como para la diferenciación celular. Es por ello que como parte de un proyecto global del estudio del metabolismo primario, y más concretamente del ciclo del ácido cítrico, se ha decidido estudiar a la ICDH, verificando si el SCO7000 corresponde con una enzima activa y determinando cual es su regulación a nivel de actividad. El SCO7000 es un marco de lectura abierto que consiste en 2220 pb, por lo que la proteína correspondiente tendría un tamaño de 739 aminoácidos.

HIPÓTESIS

El SCO7000 es la secuencia codificante para la isocitrato deshidrogenasa en *Streptomyces coelicolor* y su actividad es regulada por inhibición ejercida por diversos intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos.

OBJETIVOS

General:

- Caracterización bioquímica de la Isocitrato deshidrogenasa de *Streptomyces coelicolor*

Particulares:

- Clonar el gen *icd* en el plásmido pRSET-A y expresarlo en *E. coli*
- Purificar la enzima por Cromatografía de Afinidad a Metales Inmovilizados
- Obtener parámetros cinéticos

MATERIAL Y MÉTODOS

MICROORGANISMOS: *Streptomyces coelicolor* M45, *Escherichia coli* Top10F' y *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS.

CULTIVO: Se inocularon cajas de medio YEMEG (4g/l extracto de levadura, 4g/l de glucosa, 10g/l de extracto de malta y 15g/l de agar) con esporas de *Streptomyces coelicolor* y se incubaron a 29 °C durante 4-5 días. Al cabo de este tiempo, las esporas se rasparon y se colocaron en glicerol al 10% para mantenerlas congeladas a -20 °C hasta su uso. Para la obtención y purificación del DNA, se inoculó medio YEMES líquido con 0.1 ml de la suspensión de esporas y se incubó el matraz a 29 °C con agitación de 200 rpm. Después de 24 horas 10 ml de este medio se utilizaron para inocular 90 ml del mismo medio conteniendo 0.5% de glicina y se volvió a incubar con las mismas condiciones. Después de 24 horas de centrifugó el micelio y se colocó en amortiguador Tris-HCl pH 7.0 con 1 mg/ml de lisozima para la formación de protoplastos. Para purificar el DNA total se utilizó el método de fenol-cloroformo (Sambrook, 1989).

Para el crecimiento de *E. coli* se usó el medio LB (triptona 10g/l, extracto de levadura 5g/l, cloruro de sodio 10g/l).

AMPLIFICACIÓN DEL SCO7000. En base a la secuencia del cromosoma de *Streptomyces coelicolor* (www.kegg.com) se diseñaron los oligonucleótidos complementarios a cada uno de los extremos del SCO7000. En el extremo 5' la secuencia fue: 5'-AGCGGAGCTCGAGATGGACTGACTCGA-3' y en el extremo 3'

la secuencia fue: 5'-GCGGGGAATTCGAGGATCAGG-3' y fueron obtenidos de Invitrogen. Estos oligonucleótidos contienen sitios de restricción para ser digeridos por las enzimas de restricción *EcoRI* y *XhoI*, respectivamente. Posteriormente se realizó la amplificación del SCO7000 mediante PCR amortiguador 10X 2 µl; dNTP's 0.4 µl; MgSO₄ 0.8 µl; oligonucleótidos 0.5 µl de cada uno; DNA 1.0 µl; Polimerasa Platinum Hi-Fi de la marca Invitrogen 0.5 µl; DMSO 1.0 µl; H₂O 13.8 µl para un volumen total de 20 µl. El termociclador se ajustó a las siguientes temperaturas por 30 ciclos: desnaturalización 95 °C 10 min, desnaturalización 94 °C 1 min, alineamiento 61°C 1 min, extensión 68°C 2 min, extensión final 68°C 10 min.

CLONACIÓN DEL SCO7000: Tanto el amplicón como el vector de clonación pRSET-A (Invitrogen) se purificaron del gel de agarosa usando el kit QIAquick Gel Extraction Kit de Qiagen y el kit Wizard Plus SV Minipreps de Promega, respectivamente. Se digirieron con las enzimas de restricción *EcoRI* y *XhoI*, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Posteriormente se hizo la ligación del plásmido con el amplicón usando ligasa del fago T4 (New England Biolabs) incubando toda la noche a 4°C, lo cual resultó en un nuevo plásmido llamado pR-ICD el cual se usó para las siguientes transformaciones bacterianas después de confirmar que contenía el inserto.

IDENTIFICACIÓN DEL AMPLICON Y DEL VECTOR EN GELES DE AGAROSA.

Para observar la integridad y pureza de los plásmidos y los amplicones se realizó

una electroforesis en geles de agarosa al 0.8% y tiñendo con bromuro de etidio. Las bandas se visualizaron en un transiluminador con lámpara de UV (Hoefer).

CULTIVO DE *Escherichia coli*: Los stocks de células competentes, tanto de *E. coli* (Top10F') como de BL21(DE3)pLyS, se mantuvieron acorde la información proporcionada por el fabricante (INVITROGEN), es decir, en viales a -80°C hasta ser transformadas con el vector apropiado. Al vial conteniendo la cepa bacteriana se le agregaron 4 µl del vector pR-ICD; posteriormente se incubó en hielo por 1 hora e inmediatamente se le sometió a un choque térmico por 15 min. a 37°C. Se centrifugó por 1 min a 13 000 rpm, se desechó el sobrenadante y se inoculó el pellet en medio sólido LB conteniendo ampicilina a una concentración final de 100 µg/ml. Al siguiente día se sembraron de 4 a 6 colonias en medio sólido LB conteniendo ampicilina a una concentración de 100 µg/ml.

PILOTOS DE EXPRESIÓN: 4 colonias seleccionadas se cultivaron en 10 ml de medio LB por toda la noche y al siguiente día se usaron para inocular un matraz con 25 ml de medio LB con ampicilina. La temperatura de incubación fue de 37 °C a 250 rpm por aproximadamente 3 h ó hasta alcanzar una densidad óptica entre 0.4 y 0.6 a 595 nm mediante un espectrofotómetro (Shimadzu). En este momento se adicionó IPTG a una concentración final de 0.5 mM y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente. El paquete celular se obtuvo por centrifugación a 10,000 rpm durante 10 minutos a 4 °C y se guardó a -80 °C. Se seleccionó la clona que

presentó mayor producción de ICDH observado a través de electroforesis en poliacrilamida-SDS.

PURIFICACIÓN DE ICDH: La enzima se purificó mediante el sistema ProBond de Invitrogen, que consiste en una cromatografía de afinidad a metales inmovilizados para proteínas recombinantes que están unidas a una cola de histidinas. Al paquete celular que se tenía almacenado a -80°C se le agregaron 32 ml de “native binding buffer” (Manual de Purificación, Invitrogen) con lisozima a una concentración final de 1 mg/ml y se incubó en hielo por 30 minutos. Después de este tiempo, se lisaron a las células mediante un sonicador (Lab-Line Instruments), por 6 pulsos de 10 segundos con intervalos de 10 segundos para enfriamiento. El extracto libre de células (ELC) se obtuvo por centrifugación a 15,000 rpm por 15 minutos a 4°C (SORVALL) y se guardó el sobrenadante en refrigeración. A continuación se siguió el procedimiento de purificación recomendado por el fabricante (Invitrogen) utilizando una columna previamente cargada con níquel.

ENSAYO DE LA ACTIVIDAD DE ICDH: La actividad de la enzima se determinó en un espectrofotómetro mediante el incremento en la absorbancia a 340 nm debido a la formación de NADPH. El coctel de reacción estuvo formado por buffer universal pH 7.8 (ácido bórico 1.7 g/l; ácido cítrico 6 g/l; fosfato de potasio monobásico 3.8 g/l); NADP^{+} 0.5 mM; MnSO_4 5 mM; isocitrato 30 mM y la enzima en un volumen final de 1 ml. La reacción se inició por la adición de la enzima e inmediatamente se leía el incremento en la absorbancia a 340nm en función del tiempo.

DETERMINACIÓN DE LA PUREZA DE ICDH POR SDS-PAGE: Se observó la pureza de las bandas de proteína por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8% teñidos con azul de Coomassie .

ZIMOGRAMA DE ICDH: Se agregó NADP^+ a una concentración de 0.4 mM al amortiguador de corrida durante la electroforesis en poliacrilamida en condiciones no desnaturalizantes. Posteriormente el gel se lavó con buffer Tris-HCl 0.01M pH 7.0 y se sumergió en amortiguador universal pH 7.8 con MnSO_4 5 mM, isocitrato 30 mM, se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente y finalmente se visualizó en el transiluminador con radiación UV.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La isocitrato deshidrogenasa es una enzima clave dentro del ciclo del ácido cítrico que ha sido estudiada en una gran variedad de organismos, pero ha recibido menos atención en el género *Streptomyces* ya que en estos organismos el objetivo primordial ha sido el estudio del metabolismo secundario. Por esta razón el objetivo de este trabajo fue la clonación del probable gen que codifica a la ICDH de *S. coelicolor* y su caracterización bioquímica. Para identificar el gen se analizó la secuencia del DNA de *S. coelicolor* reportada y se encontró que el SCO7000 era el probable gen que codifica a la ICDH. Por lo tanto se diseñaron oligonucleótidos en los extremos del gen e incluyendo sitios de restricción (*EcoRI* y *XhoI*) para poder clonarlo posteriormente (**Fig. 9**).

Entry	SCO7000 CDS S.coelicolor
Gene name	idh, SC8F11.26c
Definitio n	isocitrate dehydrogenase
Orthology	KO: K00031 isocitrate dehydrogenase [EC: 1.1.1.42]
Pathway	PATH: sco00020 Citrate cycle (TCA cycle) PATH: sco00480 Glutathione metabolism PATH: sco00720 Reductive carboxylate cycle (CO2 fixation) PATH: sco01100 Metabolic pathways
Class	Metabolism; Carbohydrate Metabolism; Citrate cycle (TCA cycle) [PATH: sco00020] Metabolism; Energy Metabolism; Reductive carboxylate cycle (CO2 fixation) [PATH: sco00720] Metabolism; Metabolism of Other Amino Acids; Glutathione metabolism [PATH: sco00480] BRITE hierarchy
SSDB	Ortholog Paralog Gene cluster GFIT
Motif	Pfam: IDH Motif

Other DBs	GeneDB: SCO7000 Kitasato: SCO7000 JCVI-CMR: NT02SC8828 NCBI-GI: 21225286 NCBI-GeneID: 1102438 UniProt: Q9KZF3
LinkDB	<input type="button" value="All DBs"/>
Position	complement (7771060..7773279) <input type="button" value="Genome map"/>
AA seq	739 aa <input type="button" value="AA seq"/> <input type="button" value="DB search"/> MTDSTIIYTHTDEAPALATYSFPLPVVAYASQAGVAVETRDISLAGRI IALFPEYLTEDQ RIPDALAELGELAKTPAANI IKLPNISASIPQLKAAVAELQGGYALPAYPDDPKTDEER DIRARYDKVKGSAVNPVLRREGNSDRRAPASVKNYAKTHPHRMGAWTGESKTNVATMGEND FRSTEKSAVIAEDGTLRIELVGDDGTTVLRESVPVKKDEVVDASVLRVAALREFLTAQV ARAKAEGILYSVHLKATMMKVSDPIIFGHVVRAFFPKTFAQYGDVLAKAGLTPNDGLGGI YKGLLESLPEGAIEIKASFDAELAEGPELAMVSDKGITNLHVPSDVIIDASMPAMIRTS MVGADGGHEHDALAVIPDSSYAGVYQAVIEDCRANGAYDPSTMGSPVNVGLMAQKAEYGS HDKTFEIPPTGTVRLVDAAGNAVLEQTVSAGDIFRACQTKDAPIRDWVKLAVTRARATGD PAVFWLDEGRAHDANLIAKVKQYLSEHDTEGLDIRILDPEATKLSVERIRRGENTISVT GNVLRDYLTDLFPILLELGTSAKMLSVVPLMAGGGLFETGAGGSAPKHVQQLVKEDYLRWD SLGEFFALVPSLEKYAEATGNKAKVLADTLDRATATFLNEDKSPTRRVGGIDNRGSHFY LSLYWAQELAKQTDADLAKAFAPLAETLTASEQKIVEELNAVQGKPAEIGGYYQPDP AAKIMRPSTWNEALASLA
NT seq	2220 nt <input type="button" value="NT seq"/> +upstream <input type="text" value="0"/> nt +downstream <input type="text" value="0"/> nt gtgactgactcgaccatcatctatacacacactgacgagccccggccctggcgacgtat tcgttcctgcccgggtggtccgggctacgcctcgcagggcgggtgctcgcggtcgagaccgc gacatctcgtgcccggccgcacatcatcgccctgttcccggagtagctcaccgaggaccag cgcaccccggagcgcctcgcggagctgggagctggccaagacgcccgcgccaacatc atcaagctgcccgaacatctcggcgctccatcccgcagctcaaggccgcccgtcgcgagttg cagggccaaggctacgcgctgcccggcctaccggagcagccgaagaccgagcagggagcgc gacatccgcgcccgtacgacaaggtcaagggtcgcggtcaaccggctcctgcgcgag ggcaactccgaccggcgcgcccggcgtcggtagaagaactacgccaagaccaccgcac cgcatgggcccctggaccggcgagtcacaagaccaactggcgaccatggcgagaaacgac ttccgctccaccgagaagtcggcggtgatcgccgaggacggcaccctcgggatcgagctg gtcggcgacgacggcaccaccacgtgctgcgcgagtcgggtgcccggtagaagaaggacgag gtcctcgacgcctcctgctgctgcccgcctgcccgcctgcccgcagttcctcaccgagcagtc gcccgcgccaaggccgagggcctcctactcgggtgacactgaaggccacgatgatgaag gtctccgacccgatcatcttcggccacgtggtcgcgccccttcttcccgaagaccttcgcc cagtagcggcgacgtgctcgcgaagccggcctcaccggacgacggcctgggcccgcac tacaaggccctggagtcctcggcggggcgcgagatcaaggcgtcctcgacggcggag ctggccgagggcccggagctggccatggtcgactccgacaagggcatcaccaacctgcac gtgcccctcgagctcatcatcgacgcgtccatgcccggccatgatccgcacctccggctcac atgtggggcgcggacggcggcgagcacgacgcctcgcgctgatcccggactcctcgttac gcccgtgtgtaccaggccgtcatcgaggactgcccgcgccaacggcgcctacgacctcc acctatgggttcgggtcccgaacgtcggcctcatggcgagaaaggccgaggtacggcagc cacgacaagaccttcgagatccccaccagggcaccgtccgcctggtcgacgcccggggc aacgcggtgctggagcagcgggtctccgcccggtagatcttcccgcctgccagaccaag gacgcgcccgatccgcgactgggtgaagctggccgtcaccggcggcccgcgccaaccggcgc ccggccgtcttctggctggacgagggccgcgcccacgacgccaacctgatcgccaaggtc aagcagtagcctgctggagcagcaccgagggcctggacatccggatcctcgaccgggtc gaggcgaccaagctgtcggtaggagcctccgcccggcgagaaacacctctcggctacc ggcaactgctgcgcgactacctgaccgacctgttcccgatcctggagctgggaccagc gccaagatgctgtcggctcgtcccgcgtatggcggggcggcggcctcttcgagaccgggtgc ggcgggttcggccccgaagcagctgcagcagctggtcaaggaggactacctgcgctgggac tcgctcggtaggttcttcgcccgtggtgcccgtccctggagaagtagccgagggccacgggc aacggcaaaqccaagqttctcaccgacaccctcaccgacccacggcagcgttctcctcaac

```
gaggacaagtccccgaccgcccgcgctcggcggcatcgacaaccgcgggcagccacttctac
ctgtccctgtactgggcgaggagctggcgaagcagaccgacgacgaggacctggccaag
gccttcgccccgctcggcagacgctcaccgagcagcagaagatcgtcgaggagctg
aacgccgtccagggcaagccggccgagatcggcgggtactaccagcccgaccgccaag
gccgccaagatcatgcccgcgaccacctggaacgaggcgtggcgtccctcgctga
```

Usando DNA de *S. coelicolor* como templado se amplificó un fragmento de 2.2 Kb (**Fig. 10**), el cual se clonó en el plásmido pRSET-A (Invitrogen) después de purificarse y digerirse con las enzimas respectivas (**Fig. 10**).

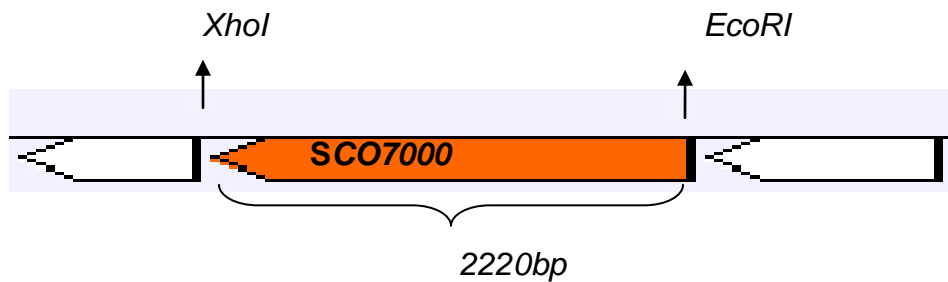


Figura 9. El fragmento de 2220 pb (SCO7000)

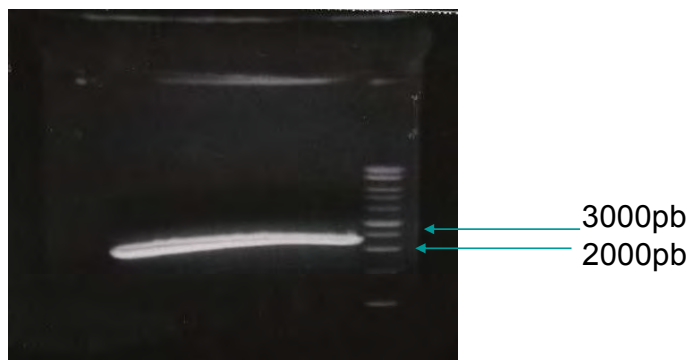


Fig. 10. Separación del fragmento amplificado por electroforesis en agarosa. Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% que muestra la amplificación del gen *icd* de *S. coelicolor*. Se cargaron 80 ul del producto de PCR.

El plásmido generado se denominó pR-ICD, el cual se verificó mediante una doble digestión con las mismas enzimas usadas para la anterior restricción dando un patrón de bandas como se muestra en la **figura 11**, en donde se observa que al digerirlo con las dos enzimas de restricción da bandas con peso correspondiente al vector solo (2.9 Kb) y al amplicón de (2.2 Kb) (segundo carril). Las digestiones sencillas sólo linearizan al plásmido dando una banda de 5.1 Kb, confirmado de esta manera que el fragmento conteniendo el gene *icdh* está inserto en el plásmido en los sitios correspondientes.

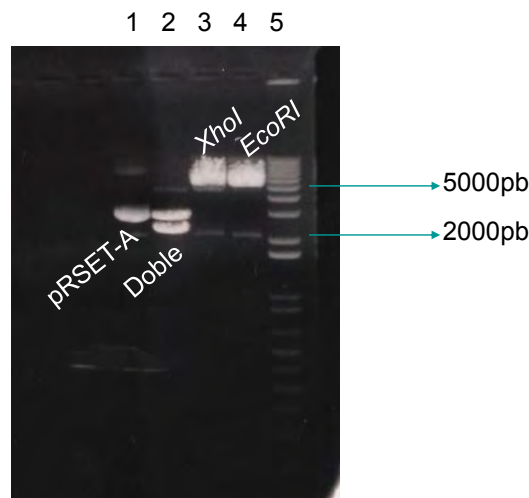


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. Carril 1 pRSET_A, 2 doble digestion del pRICD, 3 pRICD digerido con *XhoI*, pRICD digerido con *EcoRI*

A continuación con el plásmido pR-ICD purificado se transformó *E. coli* BL21(DE3)pLysS, cepa en la cual se va a realizar la expresión. Con colonias únicas se realizaron los pilotos de expresión en 10 ml de medio LB agregando IPTG 1 mM e incubando a diferentes tiempos posteriores a la inducción (desde 1

hasta 6 horas). Los extractos libres de células obtenidos se analizaron por SDS-PAGE para observar la producción de una proteína recombinante de 84 KDa correspondiente al producto del SCO7000. Como se puede observar en la **figura 12**, la proteína ICDH se expresó en todas las condiciones pero se seleccionó el tiempo de 2 horas para la producción de la proteína, ya que no hubo diferencias significativas en los diferentes tiempos de inducción.

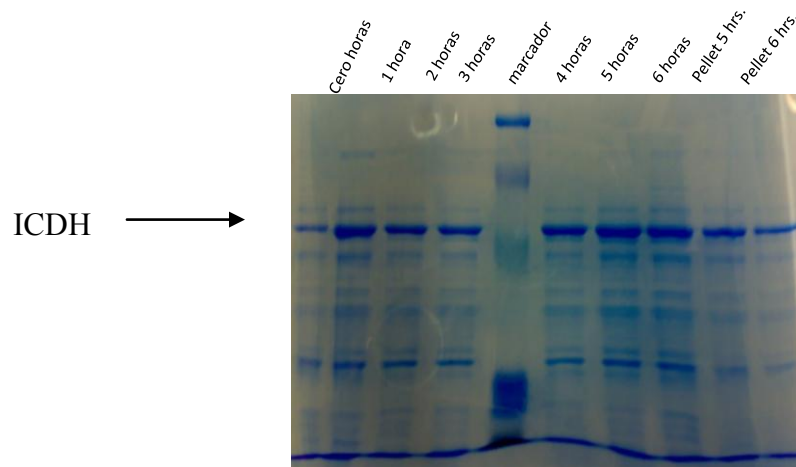


Figura 12. Separación de proteínas en SDS PAGE al 8% de los ELCs obtenidos después de inducir con IPTG (1 mM) e incubados a diferentes tiempos.

Para determinar la concentración de IPTG a la cual se induce la mayor cantidad de enzima se realizaron diferentes pilotos de expresión con 0.5 mM, 0.75 mM y 1 mM. Nuevamente en todas las condiciones se observó presencia de ICDH, sin embargo en las primeras 2 horas, en la concentración 0.5 mM de IPTG fue donde se induce una mayor cantidad de enzima, siendo esta concentración la usada para posteriores experimentos, así como el tiempo de dos horas (**Fig. 13**).

Hay que resaltar el hecho de que la ICDH de *Streptomyces coelicolor* se expresó bien en *Escherichia coli*, a pesar del alto contenido de GC en el gen, lo que indica que no es problema el uso de codones y que hay suficientes RNAt para los que se usan menos en esta bacteria.

Por otro lado, el crecimiento a 22 °C permitió que la mayor cantidad de proteína recombinante fuera soluble en lugar de irse a cuerpos de inclusión, lográndose un buen rendimiento de producción de la ICDH en *E. coli*.

INDUCCIÓN A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE IPTG A 22°C

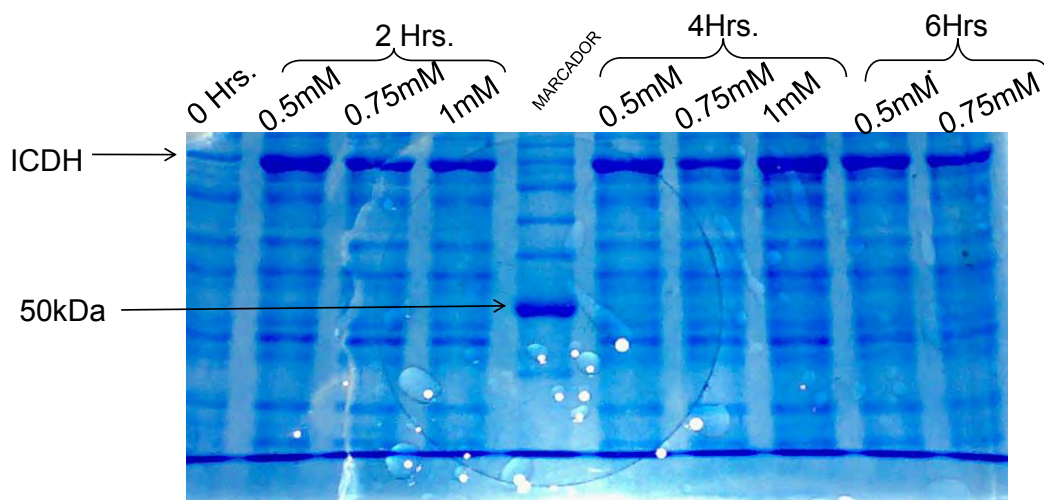


Figura 13. Electroforesis en gel de acrilamida al 8% que muestra la inducción del gen *icd* de *S. coelicolor* expresado en *E. coli* BL21, cargando 10ug/carril.

Con base en los resultados de estos pilotos de expresión, se realizó la inducción en volúmenes mayores manteniendo las condiciones óptimas para posteriormente purificar la proteína de 84 KDa a través de la bandera de histidinas

a través de IMAC. En la **figura 14** se observa el análisis por SDS-PAGE del proceso de purificación hasta llegar prácticamente a un 100% de pureza.

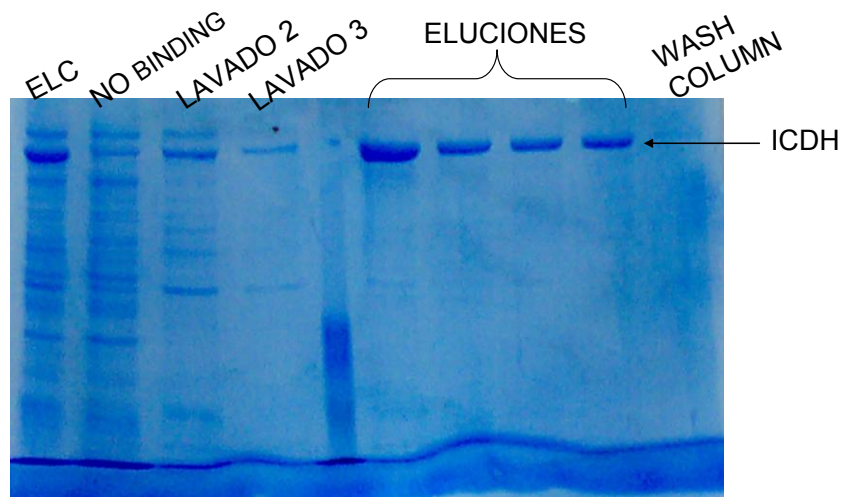


Figura 14. Electroforesis en gel de acrilamida al 8% mostrando la purificación de la ICDH expresada en *E. coli* BL21(DE3)pLys cargando 10ug/carril excepto en la eluciones donde se cargaron 40ul por carril.

Uno de los problemas al expresar proteínas en *E. coli* en grandes cantidades es que su plegamiento puede ser deficiente y por lo tanto no ser activas. Sin embargo, en nuestro caso se obtuvieron buenos rendimientos y la ICDH obtenida tiene una actividad considerable.

La purificación no se logró al 100% porque quedaron trazas de proteínas que contaminan la preparación, pero que no afectaron su actividad.

La proteína purificada mostró una alta actividad específica de ICDH tal como se muestra en la **figura 15**, que incluso es 40 veces más alta que la actividad específica obtenida con el Extracto Libre de Células de *S. coelicolor*. La enzima de *Sinechocystis sp. 6803* también ha sido purificada y se obtuvo una actividad específica de 15.7 U/mg de proteína, la cual es parecida a la obtenida en este trabajo (Muro-Pastor y Florencio, 1992).

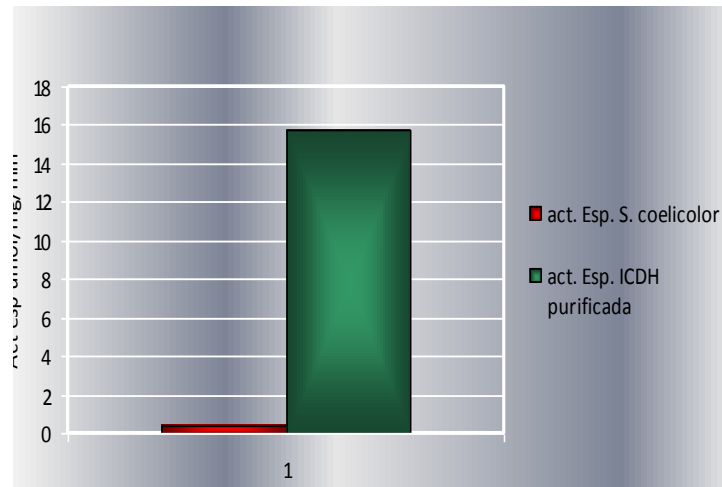


Figura 15. Comparación de la actividad específica de la ICDH de ELC de *S. coelicolor* y de la enzima recombinante purificada de *E. coli*.

Se ha reportado que en diferentes organismos la ICDH puede ser dependiente tanto de NADP^+ como de NAD ó dependiente de iones Mn^{+2} o Mg^{+2} para ser activa. Se ha reportado que *Candida tropicalis* que tiene 2 isoenzimas, una presente en mitocondria que es dependiente de NAD^+ y otra que tiene localización citoplasmática y depende de NADP^+ para ser activa (Yamamoto, 1995). Para determinar cuáles son los sustratos de la ICDH de *S. coelicolor* se

midió la actividad enzimática usando cada uno de estos cofactores, con lo cual se demostró que esta enzima es muy selectiva en cuanto a las coenzimas que puede utilizar y depende específicamente de la presencia de iones Mn^{+2} y $NADP^+$ tal como se ve en los valores mostrados en la **tabla 5**, al igual que la de *Synechocystis* sp. PCC 6803, aunque esta enzima puede usar tanto Mg^{2+} como Mn^{2+} (Muro-Pastor y Florencio, 1992).

Sustrato	Actividad ($\mu\text{moles mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$)
Mg^{+2}	0
Mn^{+2}	15.79
$NADP^+$	15.79
NAD^+	0

Tabla 5. Actividad específica de ICDH con diferentes cofactores.

Una vez teniendo a la proteína pura y establecidos la coenzima y los cofactores necesarios, se determinaron las mejores condiciones para almacenarla y poder establecer la estabilidad de la preparación pura. Se compararon tres diferentes temperaturas de almacenamiento en presencia y ausencia de glicerol, ya que se ha demostrado que este compuesto puede proteger a las enzimas durante su congelamiento. En la **figura 16** se muestra que la enzima es estable por 200 horas cuando se mantiene en presencia de glicerol al 10%,

independientemente de la temperatura a la cual se almacene, ya que entre -20°C , 4°C ó a -80°C no hay diferencias importantes. Lo contrario con lo que ocurre a las mismas temperaturas, pero en ausencia del glicerol en donde la actividad enzimática decae notablemente a partir de 48 horas de almacenamiento. Se ha reportado que el glicerol tiene un efecto protector para las enzimas ya que parece protegerlas contra la desnaturalización y las mantiene estables. Por lo que se encontró que agregando glicerol al 10% la actividad se mantiene por más de 200 horas de almacenamiento. Hay que enfatizar que el glicerol no sólo estabiliza sino que tiene un efecto estabilizador de la enzima. Este es un fenómeno que no se ha reportado para ninguna otra isocitrato deshidrogenasa.

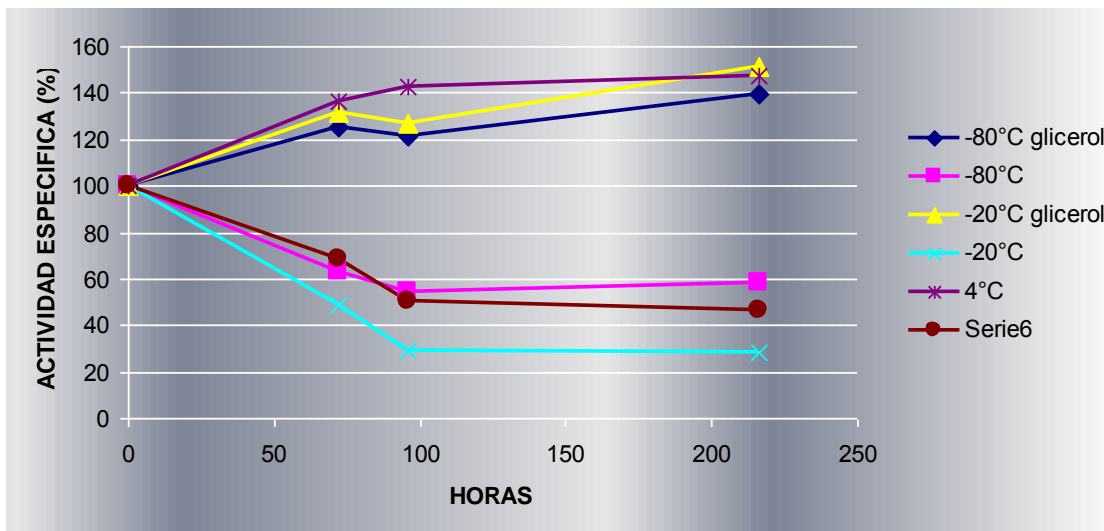


Figura 16. Estabilidad a la temperatura de almacenamiento de la ICDH en presencia y ausencia de glicerol al 10%.

Con estas condiciones establecidas se procedió a determinar el pH y la temperatura óptimos de reacción. Para establecer la temperatura óptima de

actividad de la enzima, se incubó la mezcla de reacción a diferentes temperaturas y se determinó la aparición del NADPH en estas condiciones.

En la **figura 17** se puede observar que la actividad fue óptima a 50°C y decayó rápidamente a temperaturas mayores. Sin embargo, esta temperatura no concuerda con la óptima de crecimiento de *S. coelicolor* la cual es de 29°C aunque no se ha reportado si es capaz de crecer a temperaturas más altas. Para el caso de *Saccharopolyspora erythraea* la temperatura óptima de actividad de la ICDH coincide con la del crecimiento del microorganismo que es de 30°C (Alvarado, 2003). Lo mismo ocurre para *Sulfolobus solfataricus* que es una arquea, en el que tanto la temperatura de crecimiento y de actividad es de 80°C, lo cual corresponde con el hábitat del microorganismo en cuestión (Camacho *et al.*, 1995). Por otro lado, se ha reportado que las ICDH de *Mycobacterium tuberculosis* tienen un óptimo de 40 °C ambas (Banerjee *et al.*, 2005).

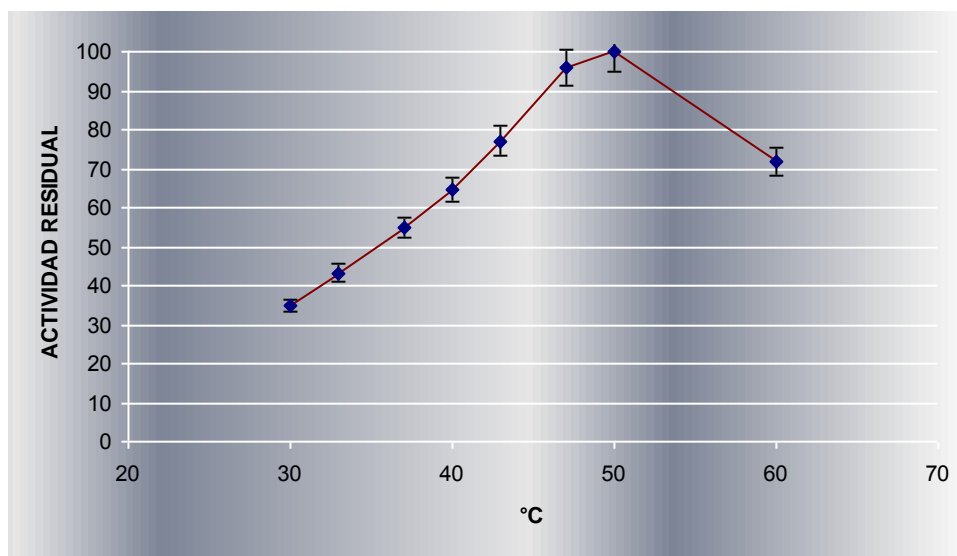


Figura 17. Efecto de la temperatura sobre la actividad específica de la ICDH de *S. coelicolor*.

Para los ensayos de cinética fue necesario establecer un rango de pH y el amortiguador apropiado en el cual exista la más alta actividad enzimática. De esta forma se probaron diferentes soluciones amortiguadoras tales como amortiguador de fosfatos y amortiguador universal en las cuales se encontró que el pH de 7.8 es el óptimo de actividad como se muestra en las **figura 18**, en donde utilizando amortiguador de fosfatos el pH máximo se encuentra poco antes de 8.0 y concuerda con los resultados obtenidos con amortiguador universal. A valores de pH más altos la actividad disminuye drásticamente. Esto corresponde con el rango de pH reportado en la literatura, ya que por ejemplo, en *S. cerevisiae* se encuentra entre 7.5 y 8.0 (Loftus *et al.*, 1994), el de la enzima de *Bacillus* sp. es de 7.9 (Shikata *et al.*, 1988), mientras que la ICDH de *Mycobacterium tuberculosis* presenta un valor óptimo de 7.5 (Banerjee *et al.*, 2005). La enzima de *Saccharopolyspora erythraea* tuvo un máximo de actividad en 7.5 también (Alvarado, 2003), la de *Vibrio* sp. de 8 (Ochiai *et al.*, 1979), mientras que la isocitrato deshidrogenasa de *E. coli* es activa en el rango de valores de pH entre 7.5 y 9.5 (Miller *et al.*, 1996). Sin embargo existen excepciones a estos valores, como es el caso de *Sulfolobus solfataricus* en el que el pH óptimo para esta proteína es de 4.0 (Camacho *et al.*, 1995).

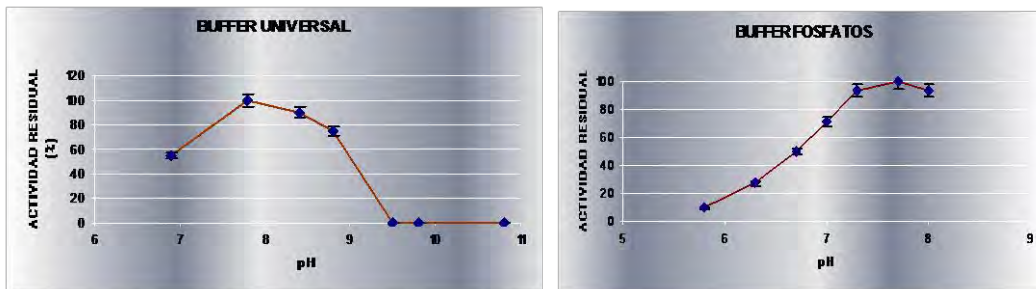


Figura 18. Efecto del pH sobre la actividad enzimática de ICDH de *S. coelicolor* en presencia de dos soluciones amortiguadoras, buffer fosfatos y Buffer universal.

CINÉTICA

La ICDH es una enzima que pertenece a la clase de las oxidoreductasas, por lo tanto, en la reacción química que llevan a cabo existe la transferencia de electrones (iones hidruro o átomos de H^+), por lo que en la reacción se necesita un aceptor de estos electrones y en este caso la molécula es $NADP^+$. Algunas enzimas requieren además, un componente químico adicional llamado cofactor que son iones inorgánicos y en esta reacción se necesita Mn^{2+} . Se determinaron los valores de V_{max} y K_m para la ICDH en presencia de su sustrato, coenzima y cofactor. Cuando se midió la actividad en presencia de diferentes concentraciones de isocitrato, los resultados mostraron un comportamiento cinético tipo Michaelis-Menten en donde a mayor concentración de sustrato mayor actividad hasta que la enzima llega a saturación (**Fig. 19**). El mismo tipo de cinética se observó cuando se utilizaron diferentes concentraciones de iones Mn^{2+} y $NADP^+$ (**Figs. 20 y 21**).

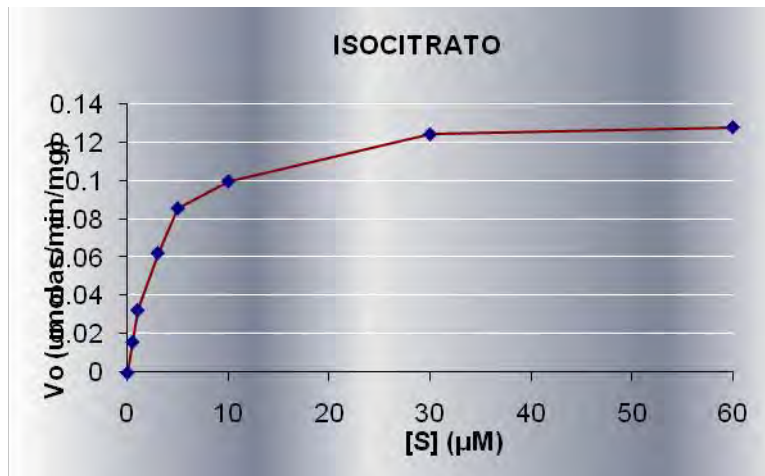


Fig 19. Efecto de diferentes concentraciones de isocitrato sobre la actividad de la ICDH.

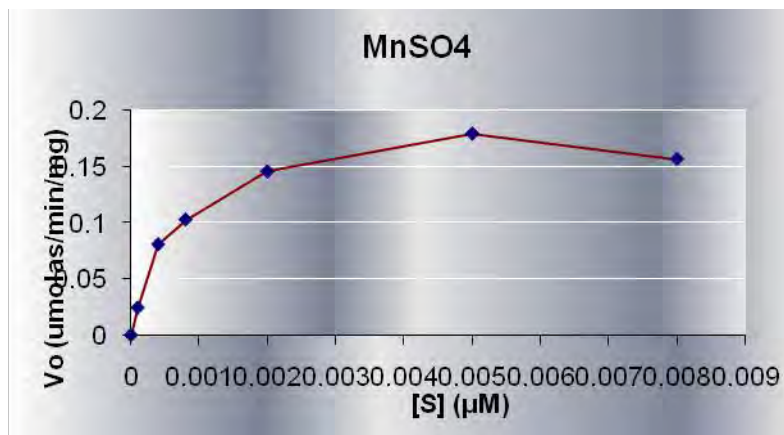


Fig 20. Efecto de diferentes concentraciones de Mn^{2+} sobre la actividad de la ICDH.

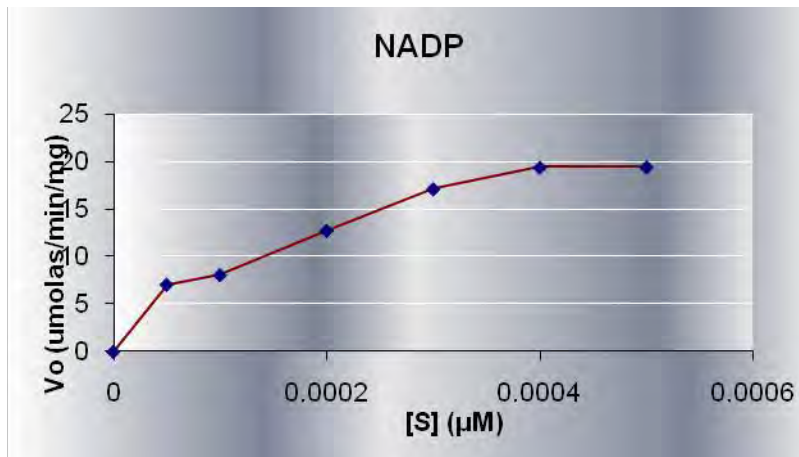


Fig 21. Efecto de diferentes concentraciones de NADP⁺ sobre la actividad de la ICDH.

Al linearizar estos resultados con los métodos de Lineweaver-Burk y Hanes-

Wolf, los valores de K_m y V_{max} obtenidos se muestran en la **tabla 6 y figuras 22,**

23 y 24.

Compuesto	LineWeaver-Burk		Hanes-Wolf	
	K_m µM	V_{max} µmoles $mg^{-1} min^{-1}$	K_m µM	V_{max} µmoles $mg^{-1} min^{-1}$
Isocitrato	4.4	0.14	2.7	0.135
Mn ²⁺	8.0	0.20	5.19	0.173
NADP ⁺	1.07	21.5	1.9	27.4

Tabla 6. Valores cinéticos para isocitrato, Mn^{2+} y $NADP^+$ de la isocitrato deshidrogenasa de *S. coelicolor*.

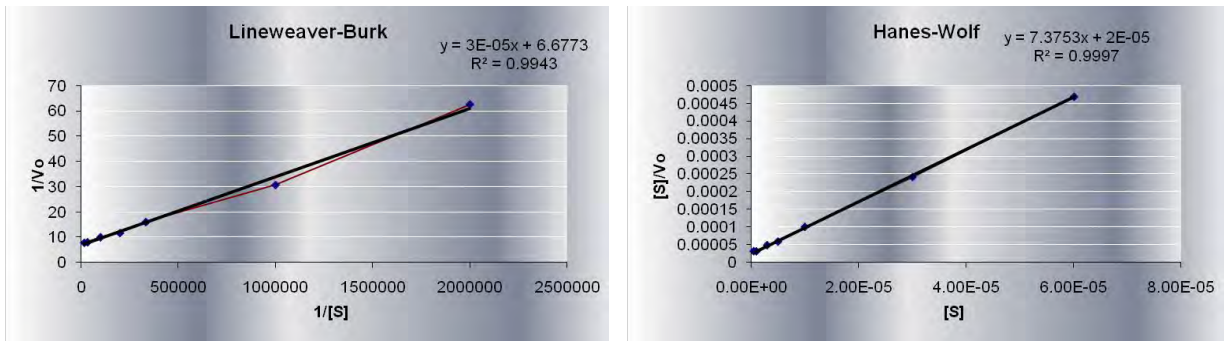


Figura 22. Linearización de la curva de actividad en función de la concentración de isocitrato.

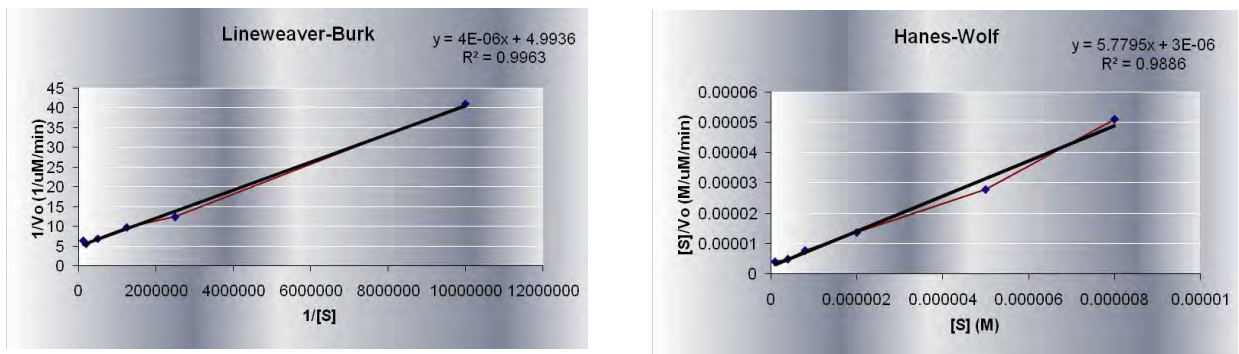


Figura 23. Linearización de la curva de actividad en función de la concentración de Mn^{2+} .

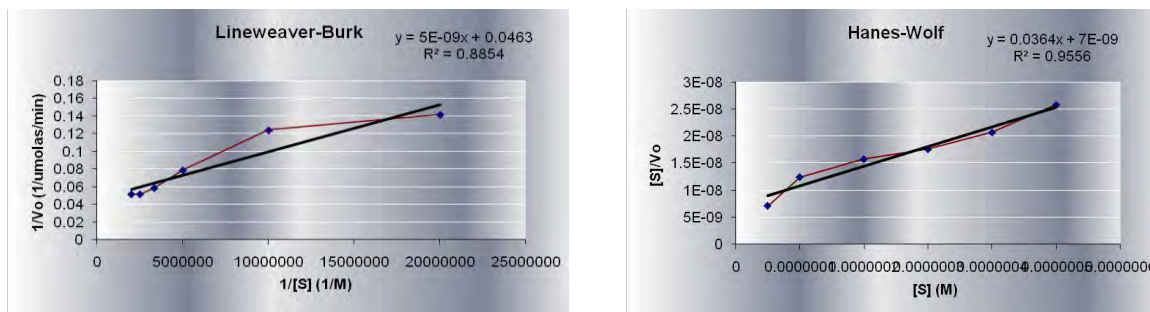


Figura 24. Linearización de la curva de actividad en función de la concentración de NADP⁺.

Estos valores de K_m y V_{max} son mayores a los obtenidos en las isoenzimas de *M. tuberculosis* (Banerjee et al., 2005).

Efectores positivos y negativos de la actividad de la ICDH.

La actividad de muchas enzimas puede ser inhibida por la unión de distintas moléculas específicas. Esta inhibición es útil como un mecanismo de control en los sistemas biológicos, en donde actúan enzimas alostéricas regulando ciertas rutas metabólicas. Se ha reportado que la actividad de ICDH en diferentes microorganismos se encuentra regulada mediante la inhibición ejercida por diversos intermediarios del ciclo del ácido cítrico, como es el caso reportado en *Saccharopolyspora erythraea* en donde moléculas como ATP, ácido cítrico, oxaloacetato ó alfa-cetoglutarato fueron efectores negativos de la actividad de la ICDH (Alvarado, 2003).

En el ciclo del ácido cítrico se oxidan por completo moléculas tales como Acetil-CoA, que proviene desde la ruta de la glucólisis. Durante el ciclo se genera energía en forma de ATP y también poder reductor con moléculas como NADPH, NADH y FADH. Estas moléculas son un indicador de alta carga energética y por lo tanto, por su concentración se establece que en momentos ya no se requiere más energía y no es necesario continuar con el ciclo. Algunas enzimas de esta ruta, incluyendo a la ICDH, se inhiben con ese tipo de moléculas. En el caso de la ICDH

de *S. coelicolor* se encontró que tanto el ATP como el ADP a concentraciones superiores a 1 mM inhiben más del 20% y 60% de la actividad de la enzima, respectivamente. Mientras que usando 1.5 mM de ATP y 5mM de ADP se inhibe hasta al 70% de la actividad (**Figuras 25 y 26**). Estos resultados están acordes con lo reportado para *Saccharopolyspora erythraea* en donde existe inhibición por estos mismos intermediarios del ciclo (Alvarado, 2003).

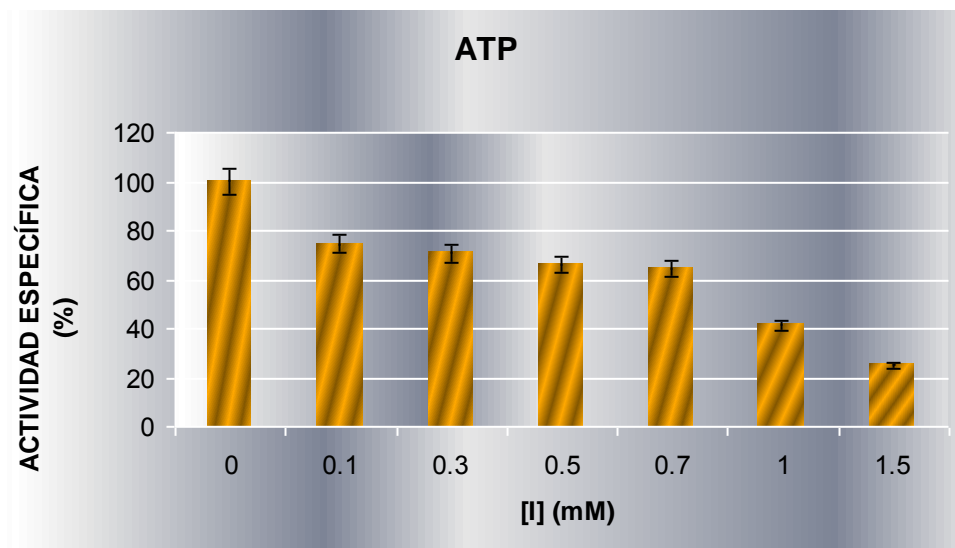


Figura 25. Inhibición de la actividad de ICDH con diferentes concentraciones de ATP.

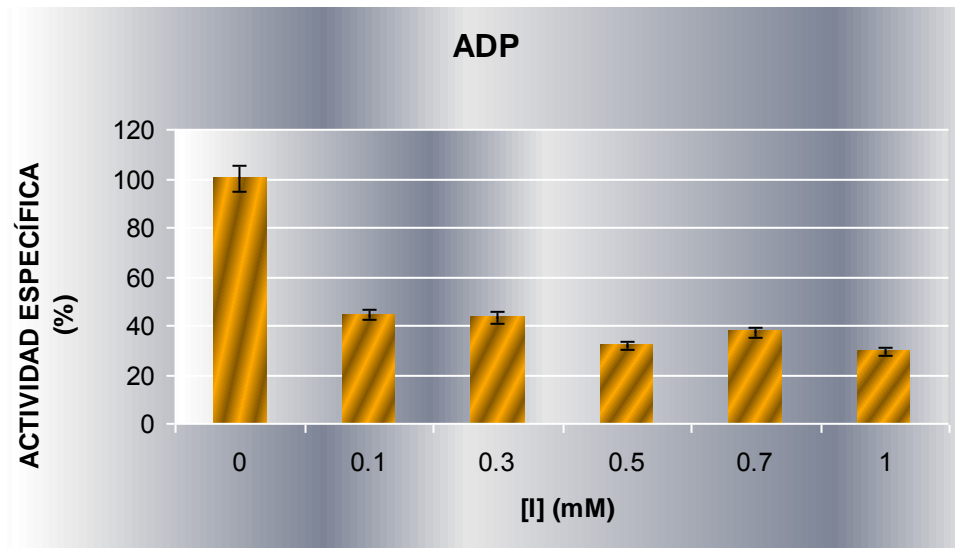


Figura 26. Inhibición de la actividad de ICDH con diferentes concentraciones de ADP.

La inhibición por ATP también se ha observado en la citrato sintasa de *S. aureofaciens*, la cual fue estimulada por AMP, sin embargo NAD no tuvo efecto (Hostalek et al. 1969^a).

Igualmente se probó el efecto de diferentes intermediarios del ciclo del ácido cítrico como el oxaloacetato sobre la actividad de la ICDH, el cual tiene un efecto como inhibidor ya que con 0.5 mM disminuye la actividad enzimática en más del 60% y con 2 mM hasta de un 90% (**Fig. 27**).

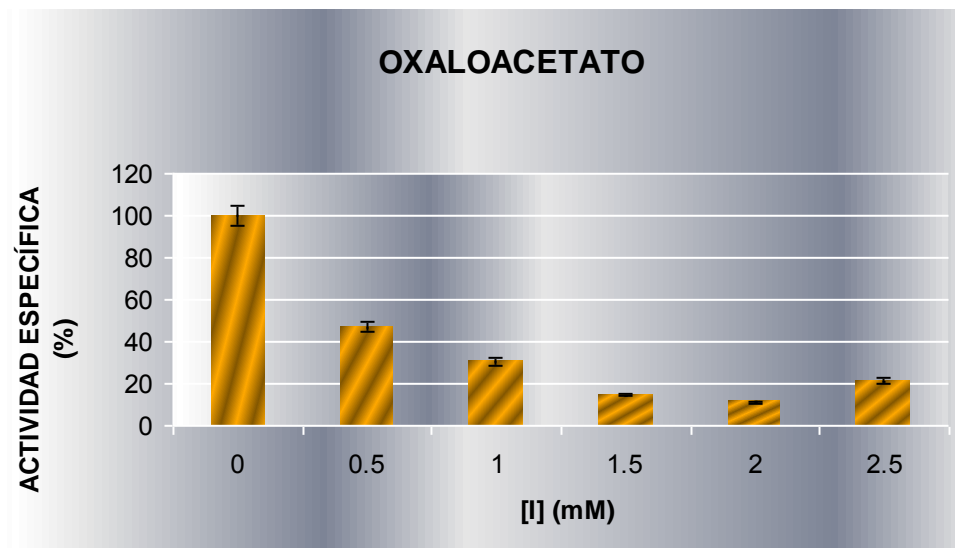


Figura 27. Efecto de diferentes concentraciones de oxaloacetato sobre la actividad de la ICDH.

Cuando se agregó alfa-cetoglutarato a la mezcla de reacción, se observó una reducción cercana al 60% para 0.5 y 1mM y se acentuó a concentraciones mayores alcanzando niveles de inhibición de casi 90% (**Fig. 28**).

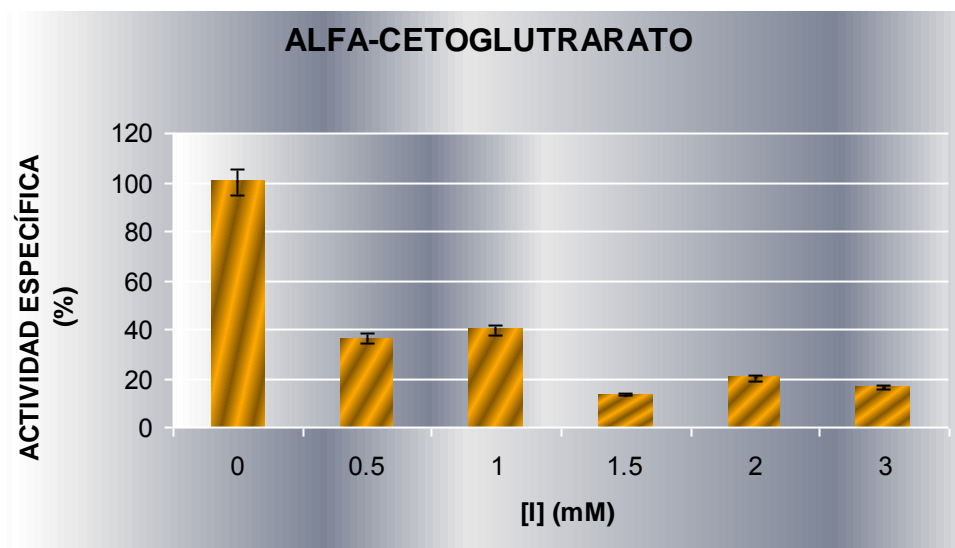


Figura 28. Efecto de diferentes concentraciones de alfa-cetoglutarato sobre la actividad de la ICDH.

En el caso del citrato, el efecto fue una inhibición muy marcada disminuyendo la actividad enzimática en más de un 90% en concentraciones de 2 mM (**Fig. 29**).

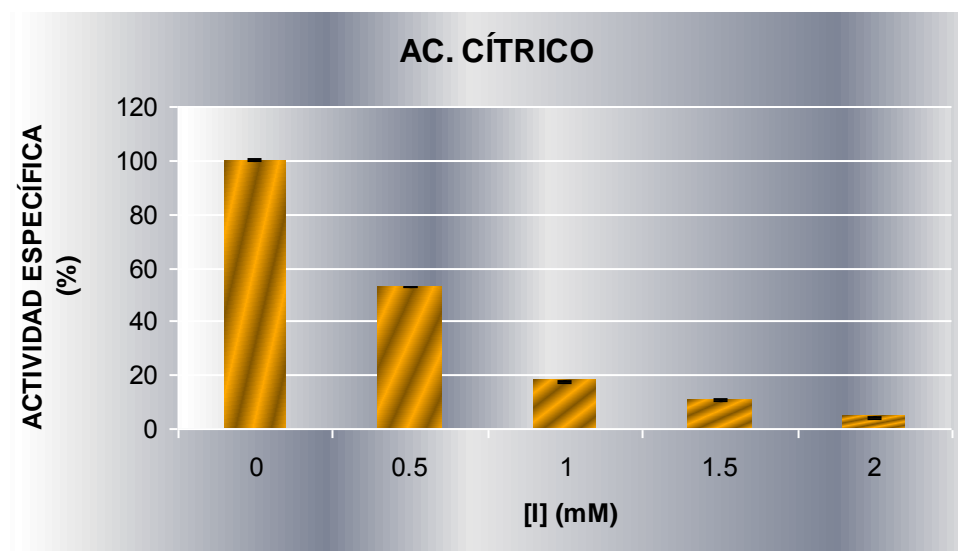


Figura 29. Efecto de diferentes concentraciones de ácido cítrico sobre la actividad de la ICDH.

El efecto del glioxalato no fue inhibitorio ya que a mayor concentración de tal compuesto la actividad de la enzima se aumenta (**Fig. 30**), fenómeno contrario a lo reportado para la ICDH de *Saccharopolyspora erythraea* en donde a mayores concentraciones de glioxalato menor fue la actividad enzimática (Alvarado, 2003).

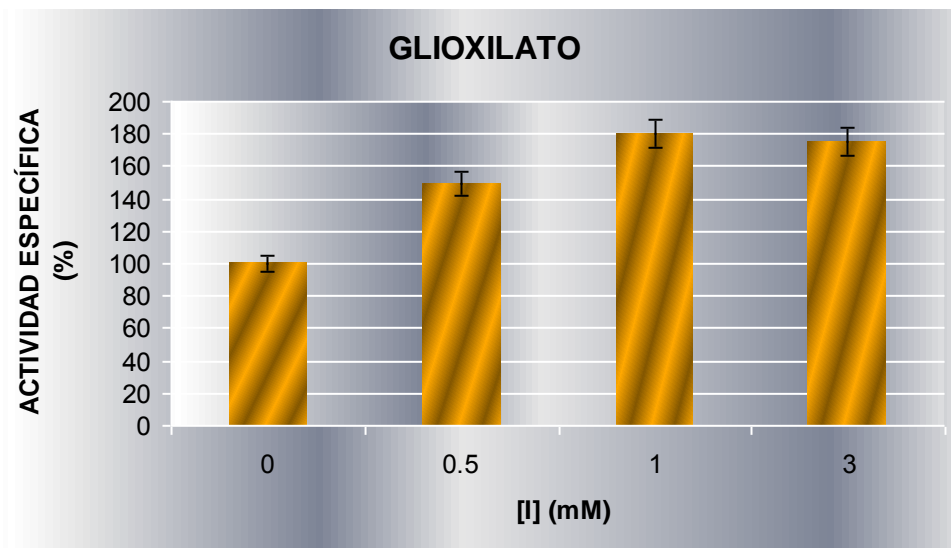


Figura 30. Efecto de diferentes concentraciones de glioxalato sobre la actividad de la ICDH.

El isocitrato puede tomar dos rutas distintas: la primera es seguir a través del ciclo del ácido cítrico para formar alfa-cetoglutarato, o bien, convertirse a glioxalato y posteriormente a malato a través del ciclo del glioxalato. Al desviarse a esta última ruta puede ser que bajo determinadas circunstancias se acumule glioxalato en la célula y que, en estas condiciones, la disponibilidad de poder reductor o de energía sea baja y por ello esta acumulación de glioxalato active a la ICDH para que ya no siga el flujo hacia ciclo de glioxalato, sino que el isocitrato siga a través del ciclo del ácido cítrico formando primero alfa-cetoglutarato y después continúe oxidando los intermediarios de este ciclo obteniendo poder reductor y energía.

Ya que los resultados anteriores mostraron efectos inhibitorios por intermediarios del ciclo de los ácidos tricarbóxicos pero a concentraciones

relativamente altas, se realizaron mezclas de intermediarios del ciclo del ácido cítrico que ya habían mostrado efecto negativo sobre la ICDH para determinar si éste era acumulativo por la presencia de dos inhibidores distintos en una misma mezcla de reacción. Primero se probó con una mezcla de oxaloacetato-ATP (**Fig. 31**).

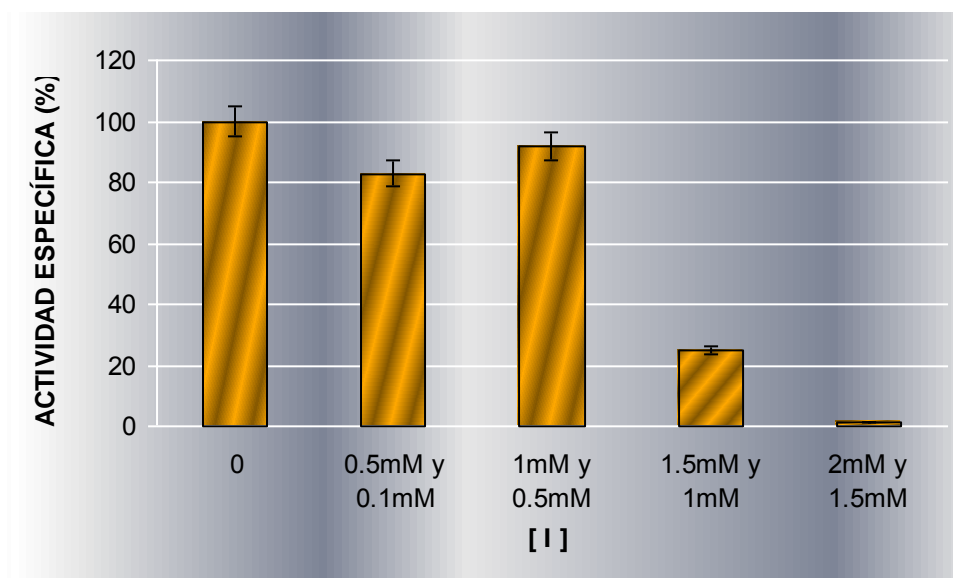


Figura 31. Efecto de diferentes concentraciones de una mezcla de oxaloacetato-ATP sobre la actividad de la ICDH.

Esta mezcla, al igual que con cada uno de los componentes por separado tuvo un efecto negativo sobre la actividad pero alcanzando cerca del 100% de inhibición a concentraciones de 2 mM de oxaloacetato más 1.5 mM de ATP. Tomando en cuenta las gráficas de cada uno de estos compuestos por separado se puede concluir que el oxaloacetato tiene un efecto de inhibición

mayor al que presenta el ATP, tal vez debido a que estos dos compuestos tienen un sitio distinto de unión a la enzima.

La siguiente mezcla que se probó fue ATP-citrato. La **figura 32** muestra que esta mezcla tiene un efecto inhibitorio sobre la actividad de la enzima pero a diferencia de lo observado con el ATP y con el citrato por separado, el efecto de estos compuestos no es acumulativo probablemente debido a que el ATP y el ácido cítrico comparten el mismo sitio de unión a la ICDH y por lo tanto compiten por ese sitio y el citrato no puede ejercer su inhibición totalmente.

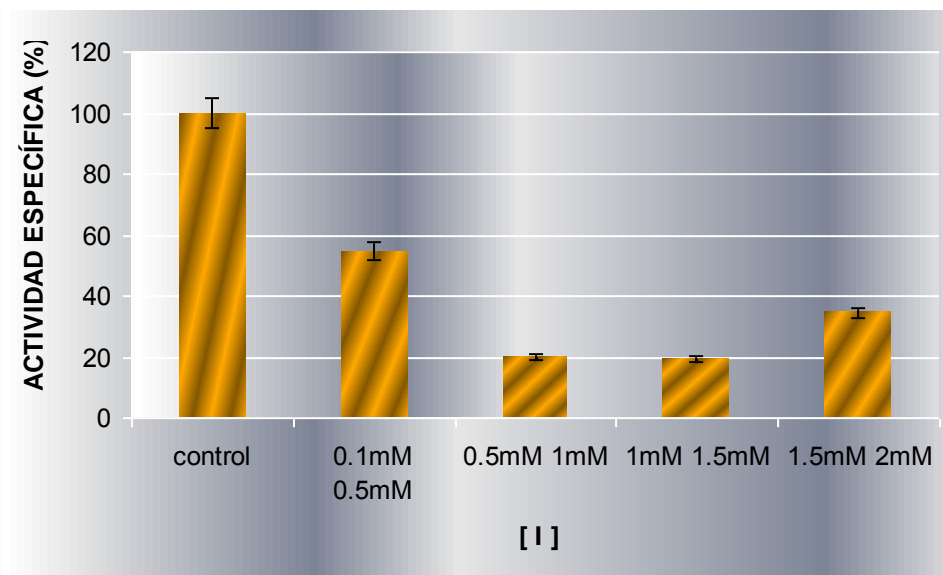


Figura 32. Efecto de diferentes concentraciones de la mezcla ATP-citrato sobre la actividad de la ICDH.

Por último, se determinó el efecto de la mezcla alfa-cetoglutarato-oxaloacetato. Igualmente tuvo un efecto negativo sobre la ICDH y la inhibición resultó acumulativa ya que con 2 mM de cada uno de los compuestos se obtuvo el 100% de inhibición, lo cual podría indicar que estos intermediarios del ciclo del ácido cítrico no comparten el mismo sitio de unión en la ICDH (**Fig. 33**).

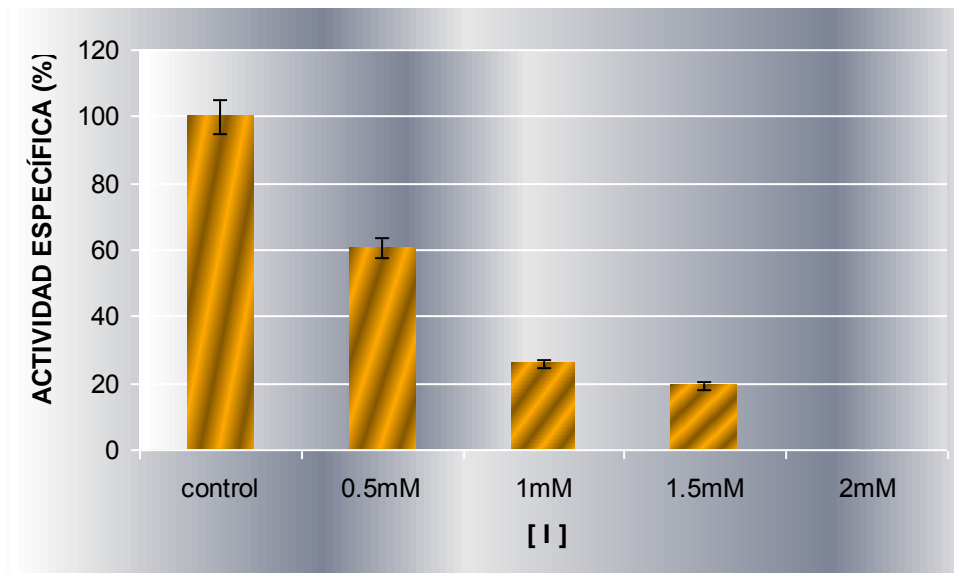


Figura 33. Efecto de distintas concentraciones de alfa-cetoglutarato-oxaloacetato sobre la actividad de la ICDH.

Cualquier sustancia que reduce la velocidad de una reacción catalizada enzimáticamente es considerada un inhibidor. Esta inhibición de la actividad de una enzima es uno de los principales mecanismos regulatorios presentes en las células. Los estudios de inhibición nos dan una idea acerca de la especificidad de la enzima, de la arquitectura física de su sitio activo y del mecanismo de reacción.

Dentro de la inhibición enzimática existen tres tipos: inhibición competitiva, en donde el inhibidor compite con el sustrato por el sitio activo; inhibición no competitiva, en donde el inhibidor se une a un sitio distinto al del sustrato y la enzima se inactiva tanto si el sustrato está presente como si no lo está y la inhibición incompetitiva, donde el inhibidor también se une a un sitio distinto al del sustrato, solo que el inhibidor solo se une a la enzima si el sustrato se encuentra unido a ésta (Lehninger, 1993).

El alfa-cetoglutarato, intermediario del ciclo del ácido cítrico y producto de la descarboxilación oxidativa de la ICDH mostró ser un inhibidor de esta enzima, del tal forma que se trató de determinar a qué tipo de inhibidor pertenecía, para lo cual se realizaron experimentos de saturación para el isocitrato en presencia y ausencia del inhibidor (alfa-cetoglutarato) como se muestra en la **figura 34**, donde se observa la curva de la velocidad vs la concentración de sustrato, donde se aprecia que en presencia del inhibidor la velocidad decrece de manera notoria. Para obtener valores de V_{max} y K_m se realizó una regresión lineal, dando como resultado la gráfica que se muestra en la **figura 35**. Se puede observar que cuando se agrega la molécula inhibidora, la intersección en el eje de las y y no ocurre en el mismo punto como tampoco lo hace en el otro eje, lo cual indica que el alfa-cetoglutarato es un inhibidor incompetitivo y por lo tanto la K_{mapp} se incrementa. En el caso de la ICDH de *Synochocystis*, ésta fue inhibida no competitivamente por ADP y 2-cetoglutarato con respecto a isocitrato y de una manera competitiva por NADPH (Muro-Pastor, 1992).

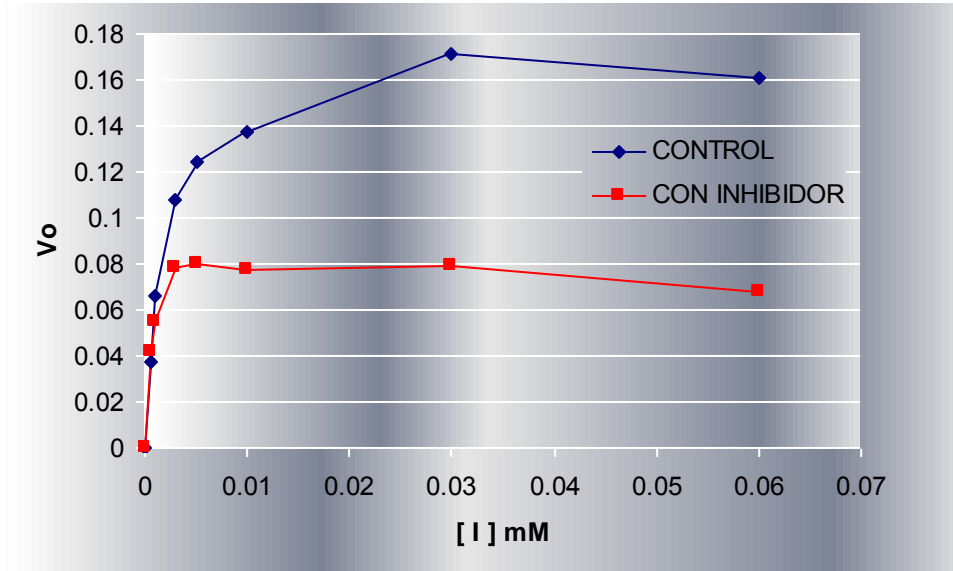


Figura 34. Cinética de la actividad de la ICDH en función de la concentración de isocitrato en presencia y ausencia de α -cetoglutarato.

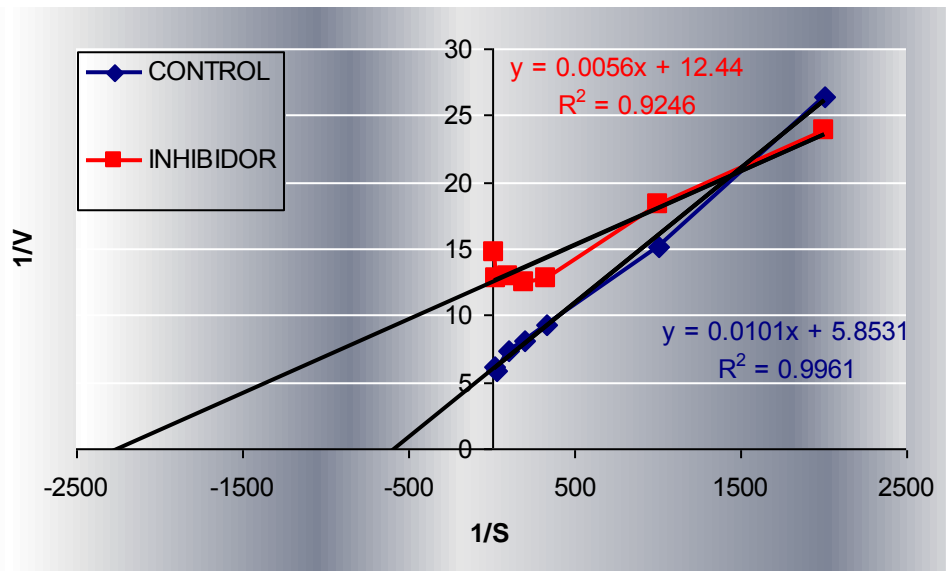


Figura 35. Linearización de la cinética de ICDH en presencia α -cetoglutarato.

Como se mencionó anteriormente, la isocitrato deshidrogenasa de *E. coli* se regula principalmente por fosforilación/desfosforilación en respuesta a las

concentraciones de ciertos compuestos. Este fenómeno es llevado a cabo por la ICDH cinasa/fosfatasa, la cual tiene las dos actividades en el mismo polipéptido. La fosforilación bloquea la unión del isocitrato y por lo tanto hay pérdida de actividad (LaPorte, 1993; Cozzone y El-Mansi, 2005). Este mecanismo regulatorio parece no existir en *S. coelicolor*, el cual tampoco existe en *Corynebacterium glutamicum* (Imabayachi *et al.*, 2006), sin embargo, no podemos descartarlo con los resultados mostrados.

Determinación del peso molecular.

Durante la purificación de la enzima se observó un peso molecular de más de 80 kDa aproximadamente (incluyendo la bandera de 6His) en geles SDS-PAGE. Una de las isoenzimas que se encuentran en *Mycobacterium tuberculosis* tiene un peso cercano al de la proteína de *S. coelicolor* (86 kDa; Banerjee *et al.*, 2005). De esta forma, se optó por hacer electroforesis en condiciones no desnaturizantes (gel nativo) para determinar el peso molecular de la proteína (**Fig. 36**). Como se muestra en la figura existen dos bandas diferentes en el carril donde se cargó la enzima; una banda mayoritaria con un peso molecular de 130 kDa aproximadamente y otra banda más tenue de alrededor de 60 kDa. A diferencia de los resultados en SDS-PAGE, donde solo se apreciaba una sola banda. Estos resultados sugieren que se trata de una enzima dimérica formada por dos subunidades idénticas.

Estos resultados concuerdan con los reportados para otras enzimas de origen bacteriano como las de *Mycobacterium tuberculosis* que presenta dos isoenzimas, una monomérica y la otra dimérica (Vinekar, 2009).

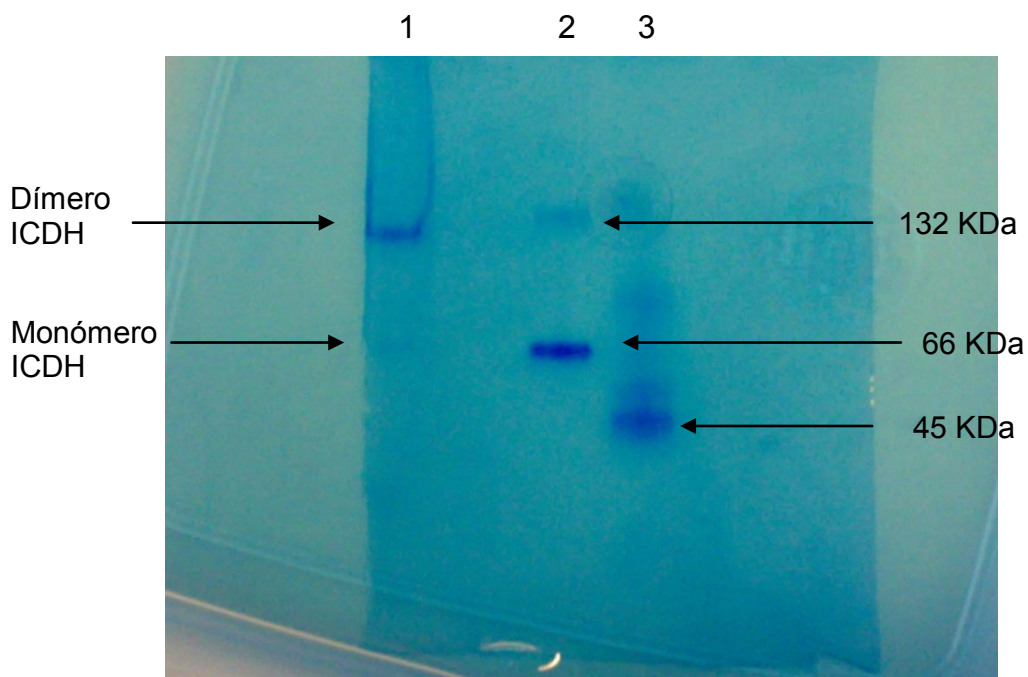


Figura 36. Electroforesis de proteínas en condiciones no desnaturizantes de la ICDH pura obtenida. Carril 1, 10 μ g de la ICDH pura. Carril 2, albúmina sérica bovina; carril 3, lactoalbumina.

Para corroborar estos resultados y determinar de manera precisa que fracción es la que tiene actividad se hicieron zimogramas de la proteína (**Fig. 37**).

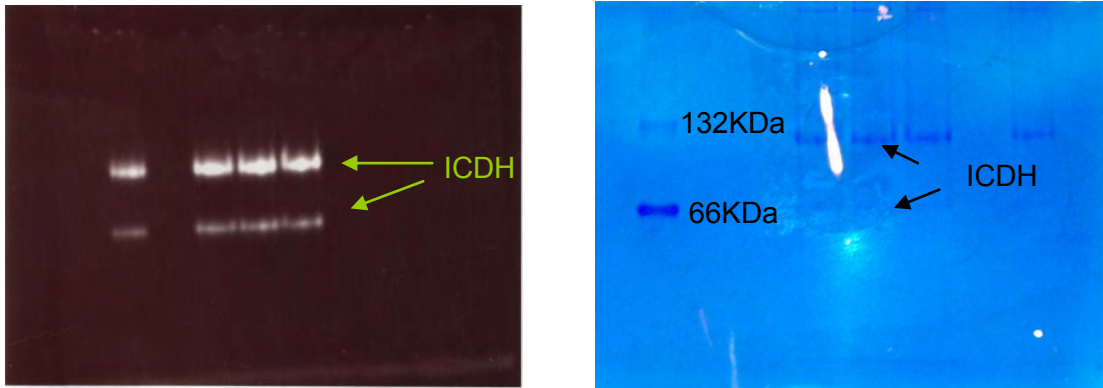


Figura 37. Zimogramas de ICDH de *Streptomyces coelicolor*. (A) gel expuesto a radiación UV. (B) gel teñido con azul de Coomassie, usando como marcador albúmina.

Cuando se reveló el gel en el transiluminador a 340 nm, se observaron las dos bandas de actividad bien definidas, aunque con menor intensidad en la banda correspondiente al monómero. Estas bandas corresponden a dos pesos diferentes de la proteína, como se demostró al teñir el gel nativo con azul de Coomassie, el cual muestra una fracción mayoritaria con un peso molecular de aproximadamente 130 kDa y otra banda con la mitad de intensidad con más de 60 kDa. Esto indica por un lado, que la mayoría de la enzima se encuentra presente como un dímero y por otro lado, que la proteína es activa tanto en dímero como en monómero. A juzgar por el zimograma, el dímero posee el doble de actividad, probablemente debido a que en cada subunidad existe un sitio activo de unión al isocitrato y por esta razón, la fracción monomérica tiene aproximadamente la mitad de actividad. El peso molecular de la fracción dimérica coincide con otras ICDH reportadas en la literatura como la ICDH de *S. erythrae* con 130 kDa (Alvarado, 2003).

DISCUSIÓN FINAL

La secuenciación del genoma de *S. coelicolor* (Bentley, 2002) indicó que en teoría posee los ORF correspondientes a los genes de las enzimas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Esto quedó demostrado cuando se midió la actividad de la enzima en los extractos libres de células de *S. coelicolor* y cuando, ya clonado el SCO7000, se purificó la proteína de *E. coli*. Para verificar que efectivamente se trataba de la ICDH se usaron blancos de la reacción sin isocitrato en donde no se observó actividad enzimática alguna.

Parte importante de la caracterización de una enzima es determinar a que tipo de cinética pertenece. Existen enzimas que muestran curvas sigmoideas en donde una vez que se une la primera molécula de sustrato altera la afinidad de las siguientes moléculas y se unen más fácilmente a la enzima. Este tipo de cinéticas son no Michaelianas. Como lo muestran las figuras 19, 20 y 21, esta

enzima sigue una cinética tipo Michaelis-Menten, en donde a mayor concentración de sustrato la enzima se satura y alcanza su velocidad máxima de reacción.

Existen moléculas que reducen o anulan la actividad de una enzima. Estas moléculas son conocidas como inhibidores enzimáticos los cuales se unen a la enzima de forma reversible o irreversible. Durante el presente trabajo se usaron diferentes intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos tales como alfacetoglutarato, oxaloacetato, ATP, ADP y citrato, y todos, con excepción del glioxalato, inhibieron la actividad de la ICDH. Esto representa que dentro de la célula esta enzima se encuentra regulada. Existen enzimas que se inhiben por el producto de la reacción que catalizan, como se vio con el alfacetoglutarato (fig. 28) lo que indica que cuando existe una alta concentración de tal compuesto el flujo de carbono dentro del ciclo debe disminuir para no acumularse. Lo mismo ocurre con los demás intermediarios como el ATP que es una molécula de alta carga energética lo cual significa que si esta se acumula no se necesita generar más energía. Por el contrario, el glioxalato resulto ser un efector positivo de la actividad lo cual que sugiere que cuando se eleva la concentración de este compuesto la enzima se activa o aumenta su actividad para que ya no se genere mas glioxalato y para que el flujo de carbono prosiga hacia el ciclo de los ácidos tricarboxílicos.

Existe una variedad de conformaciones dentro de la ICDH de diferentes especies de organismos, tales como monómeros, dímeros, trímeros, tetrámeros u octámeros. Como se logró comprobar en este trabajo, el SCO7000 codifica para una proteína con un tamaño de 80kDa lo cual corresponde con el peso de la

proteína purificada (fig. 14). Sin embargo, al realizar el ND-PAGE se observa una banda con un peso aproximado de más de 130kDa lo cual corresponde con el dímero de la proteína. Para comprobar que el dímero tuviera actividad, se realizó el zimograma de la proteína (fig. 37) lo que demostró que tanto el monómero como el dímero son formas activas de la enzima. Esto es probablemente debido a que cada monómero tiene un sitio activo de unión al sustrato y ambos tienen actividad.

Conclusiones

- El SCO7000 es el gen que codifica para la ICDH en *Streptomyces coelicolor*
- *E. coli* es capaz de expresar el gen *icd* de *S. coelicolor*
- Se obtuvo enzima pura y funcional
- La ICDH tiene una cinética tipo Michaelis-Menten para el isocitrato, Mn^{+2} y NADP
- La ICDH se inhibe por oxaloacetato, α -cetoglutarato, ATP, ADP y citrato
- El alfa-cetoglutarato es un inhibidor incompetitivo de la ICDH
- El glioxalato es un efector positivo de la ICDH
- La ICDH es activa tanto en dímero como monómero

Bibliografía

Alvarado A, Flores ME. (2003). Characterization and regulation of NADP⁺-isocitrate dehydrogenase from *Saccharopolyspora erythraea*. *Biotechnol. Letts.* 25, 1175-1178.

Banerjee S, Nandyala A, Podili R, Katoch VM, Hasnain SE. (2005). Comparison of *Mycobacterium tuberculosis* isocitrate dehydrogenase (ICD-1 and ICD-2) reveals differences in coenzyme affinity, oligomeric state, pH tolerance and phylogenetic affiliation. *BMC Biochem.* 29, 6-20.

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, Parhill J, Hopwood DA. (2002). Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* 417, 141-147.

Bibb M. (1996). The regulation of antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology* 142, 1335-1344.

Camacho ML, Brown RA, Bonete MJ, Danson MJ, Hough DW. (1995). Isocitrate dehydrogenase from *Haloferax volcanii* and *Sulfolobus solfataricus*: enzyme purification, characterization and N-terminal sequence. *FEMS Microbiol. Letts.* 134, 85-90.

Cochrane VW. (1961). Physiology of actinomycetes. *Ann. Rev. Microbiol.* 15, 1-26.

Cortés J, Liras P, Castro JM, Martín JF. (1986). Glucosa regulation of cephamycin biosynthesis in *Streptomyces lactamdurans* is exerted on the formation of alpha-aminoadipyl-cysteinyl-valine and deacetoxycephalosporin C synthase. *J Gen Microbiol.* 132, 1805-1814.

Cozzone AJ, El-Mansi M. (2005). Control of isocitrate dehydrogenase catalytic activity by protein phosphorylation in *Escherichia coli*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 9, 132-146.

Dekleva ML, Strohl WR. (1988). Biosynthesis of e-rhodomyacinone from glucose by *Streptomyces* C5 and comparison with intermediary metabolism of other polyketide-producing streptomycetes. *Ca. J. microbial.* 33, 1129-1132.

Flärdh K, Buttner MJ. (2009). *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 36-49.

Galway JG. (2004). Metabolism at a glance. 3^{er} Ed. Blackwell editions.

García-Domínguez M, Martín JF, Liras P. (1989). Characterization of sugar uptake in wild-type *Streptomyces clavuligerus*, which is impaired in glucose uptake, and in a glucose-utilizing mutant. *J. Bacteriol.* 171, 6808-6814.

Hodgson DA. (2000). Primary metabolism and its control in streptomycetes: a most unusual group of bacteria. *Adv Microb Physiol.* 42: 47-238.

Hoobs G, Frazer CM, Gardner DCJ. (1989). Dispersed growth of *Streptomyces* in liquid culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 31, 272-277.

Hood DW, Heidstra R, Swoboda UK, Hodgson DA. (1992). Molecular genetics analysis of proline and tryptophan biosynthesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2): interaction between primary and secondary metabolism- a review. *Gene* 115, 5-12.

Hostalek Z, Ryabushko TA, Cudlin J, Vanek Z. (1969a). Regulation of biosynthesis of secondary metabolites. IV. Inhibition of citrate synthase in *Streptomyces aureofaciens* by adenosine triphosphate. *Folia Microbiol.* 14, 121-127.

Hostalek Z, Tinterova M, Jechova V. (1969b). Regulation of biosynthesis of secondary metabolites. I. Biosynthesis of chlortetracycline and tricarboxylic acid cycle activity. *Biotechnol. Bioeng.* 11, 539-548.

Horinouchi S, Beppu T. (1994). A-factor as a microbial hormone that controls cellular differentiation and secondary metabolism in *Streptomyces griseus*. *Mol. Microbiol.* 12, 859-864.

Hu DS, Hood DW, Heidstra R, Hodgson DA. (1999). The expression of the *trpD*, *trpC* and *trpBA* genes of *Streptomyces coelicolor* A3(2) is regulated by growth rate and growth phase but not by feedback repression. *Mol. Microbiol.* 32, 869-880.

Imabayashi F., Aich S, Prasad L, Delbaere LT. (2006). Substrate-free structure of a monomeric NADP isocitrate dehydrogenase: an open conformation phylogenetic relationship of isocitrate dehydrogenase. *Proteins* 63, 100-112.

Janiczek O, Glatz Z, Wimmerová M, Psotová J. (2004). Purification and some properties of isocitrate dehydrogenase from *Paracoccus denitrificans*. *Prep. Biochem. Biotechnol.* 34, 279-289.

Keiser T, Bibb M, Buttner M, Chater K, Hopwood D. (2000). Practical *Streptomyces* genetics. The John Innes Foundation, Norwich, United Kingdom.

Keys D, McAlister-Henn L. (1990). Subunit structure, expression and function of NAD-specific isocitrate dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 172, 4280-4287.

LaPorte DC. (1993). The isocitrate dehydrogenase phosphorylation cycle: regulation and enzymology. *J. Cell. Biochem.* 51, 14-18.

Lehninger A, Cox M, Nelson D. (1993). Principles of biochemistry. 2a Ed. Worth Pub.

Loftus T, Hall L, Anderson SL, McAlister-Henn L. (1994). Isolation, characterization and disruption of the yeast gene encoding cytosolic NADP-specific isocitrate dehydrogenase. *Biochem. J.* 33, 9661-9667.

Miller SP, Karschnia EJ, Ikeda TP, Laporte DC. (1996). Isocitrate dehydrogenase kinase/phosphatase. *J. Biol. Chem.* 271; 19124-19128.

Mincer TJ, Jensen PR, Kauffman CA, Fenical W. (2002). Widespread and Persistent Populations of a Major New Marine Actinomycete Taxon in Ocean Sediments. *Appl. Env. Microbiol.* 68, 5005-5011.

Muro-Pastor MI, Florencio FJ. (1992). Purification and properties of NADP-isocitrate dehydrogenase from the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Eur. J. Biochem.* 203, 99-105.

Novotna J, Vohrasdky j, Berndt P, Gramajo H, Langen H, Li X, Minas W, Orsaria L, Roeder D, Thompson C. (2003). 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.* 48, 1289-1303.

Obanye AIC, Hobbs G., Gardner DCJ, Oliver SG. (1996). Correlation between carbon flux through the pentosa phosphate pathway and production of the antibiotic methylenomycin in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology* 142, 133-137.

Ochiai T, Fukunaga N, Sasaki S. (1979). Purification and some properties of two NADP⁺-specific isocitrate dehydrogenase from an obligately psychrophilic marine bacterium, *Vibrio* sp., strain ABE-1. *J. Biochem.* Vol. 86, No. 2 377-384.

Olano J, de Arriaga D, Busto F and Soler J. (1995). Kinetics and thermostability of NADP-isocitrate dehydrogenase from *Cephalosporium acremonium*. *Appl. Environm. Microbiol.* 61, 2326-2334.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. 2da Ed. New York: Cold Spring Harbor.

Shikata S, Ozaki K, Kawai S, Ito S, Okamoto K. (1988). Purification and characterization of NADP⁺-linked isocitrate dehydrogenase from an alkalophilic *Bacillus*. *Biochim. Biophys. Acta.* 952, 282-289.

Suzuki M, Sahara T, Tsuruka J, Takada Y and Fukunaga N. (1995). Differential expression in *Escherichia coli* of the *Vibrio* sp. strain ABE-I *icd-I* and *icd-II* genes encoding structurally different isocitrate dehydrogenase isozymes. J. Bacteriol. 177, 2138-2142.

Wray LV, Fisher SH. (1988). Cloning and nucleotide sequence of the *Streptomyces coelicolor* gene encoding glutamine synthetase. Gene. 71, 247-256.

Vinekar R, Ghosh I. (2009). Determination of phosphorylation sites for NADP-specific isocitrate dehydrogenase from *Mycobacterium tuberculosis*. J. Biomol. Struct. Dyn. 26, 741-754.

Viollier P, Minas W, Dale G, Folcher M, Thomson C. (2001). Role of acid metabolism in *Streptomyces coelicolor* morphological differentiation and antibiotic biosynthesis. J. Bacteriol. 183, 3184-3192.

Yamamoto S, Atomi H, Ueda M, Tanaka A. (1995). Novel NADP-linked isocitrate dehydrogenase present in peroxisomes of n-alkaline-utilizing yeast, *Candida tropicalis*: comparison with mitochondrial NAD-linked isocitrate dehydrogenase. Arch. Microbiol. 163, 104-111.