

1
2ef



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

CARACTERIZACION BIOQUIMICA Y REGULACION DE LA
ISOCITRATO DESHIDROGENASA DE *Saccharopolyspora*
erythraea CA340

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
P R E S E N T A :
BIOL. ALEJANDRA DOLORES ALVARADO JIMENEZ

DIRECTOR DE TESIS: DRA. MARIA ELENA FLORES CARRASCO



MEXICO, D. F.

1999

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

273112



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.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y REGULACIÓN DE LA ISOCITRATO

DESHIDROGENASA DE *Saccharopolyspora erythraea* CA340

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA

ALEJANDRA DOLORES ALVARADO JIMÉNEZ

1999

JURADO

PRESIDENTE: DRA. IRMA AURORA ROSAS PÉREZ

PRIMER VOCAL: DRA. LUISA ALVARINA ALBA LOIS

SEGUNDO VOCAL: DR. CARLOS HUITRÓN VARGAS

TERCER VOCAL: DRA. MARÍA ELENA FLORES CARRASCO

SECRETARIO: DRA. SOCORRO DURÁN VARGAS

SUPLENTE: DR. RENÉ CÁRDENAS VÁZQUEZ

SUPLENTE: DRA. MARÍA LAURA ONGAY LARIOS

Esta tesis se realizó en el Departamento de Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la Dra. María Elena Flores Carrasco.

DEDICATORIAS

A CAROLINA

A MIS PADRES

A BENJAMÍN

A MI HERMANA Y CHUCHÍN

A MIS AMIGOS

A JOSÉ PORQUE CON SU GRAN ESPÍRITU SIEMPRE REFORZO EL MÍO

**"NO PUEDE EL HOMBRE RECIBIR NADA, SI NO LE FUERE DADO POR EL
CIELO", JUAN 3:27.**

**GRACIAS A DIOS POR HABERLOS PUESTO EN MI CAMINO Y SEGUIR
MOSTRÁNDOME A TRAVÉS DE USTEDES LA FIDELIDAD DE SU AMOR.**

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. María Elena Flores que alumbró mi camino espiritual y profesional.

Siempre estará presente en mi vida.

A la I.B.I. Marcela Ramírez por su compañerismo y su gran apoyo técnico en la realización de mi trabajo.

A la M. en I.B.B. Omaira Bermúdez por su gran entusiasmo y ayuda en el desarrollo de mi tesis.

Al Lic. Juan Carlos Romero Hicks por su gran apoyo sin el cual no hubiera podido realizar este avance.

A la Universidad de Guanajuato por apoyarme y permitirme realizar mis estudios de posgrado.

**A mis compañeros por su amistad y su ayuda, Guille, Eduardo, Agustín,
Rosaíba, Vero, Paty.**

INDICE

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS.....	7
ABREVIATURAS.....	11
RESUMEN.....	12
INTRODUCCIÓN.....	13
ANTECEDENTES.....	17
OBJETIVO.....	29
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	33
CONCLUSIONES.....	63
BIBLIOGRAFÍA.....	64

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS.

	PÁGINA
FIG. 1. Vía de biosíntesis de la eritromicina en <i>Saccharopolyspora erythraea</i> CA340.....	18
FIG. 2. Ciclo de Krebs.....	19
FIG. 3. Regulación del Ciclo de Krebs.....	20
FIG. 4. Reacción catalizada por la Isoictrato deshidrogenasa....	21
FIG. 5. Perfiles de crecimiento y de actividad específica de isocitrato deshidrogenasa en <i>Sac. erythraea</i> CA340.....	34
FIG. 6. Zimograma de la ICDH de <i>Sac. erythraea</i>	36
FIG. 7. Perfil de actividad de isocitrato deshidrogenasa en función del pH.....	38
FIG. 8. Perfil de actividad de isocitrato deshidrogenasa en función de la temperatura.	40
FIG. 9. Representación gráfica de Hanes-Woolf de actividad de isocitrato deshidrogenasa en función de la concentración de ác. isocítrico.....	40
FIG. 10. Representación gráfica de Line-Weaver-Burk para el efecto de la concentración de NADP ⁺ sobre la actividad de ICDH de <i>Sac. erythraea</i> CA340.....	42
FIG. 11. Representación gráfica de Hanes-Woolf de actividad de isocitrato deshidrogenasa en función de la concentración	

de NADP ⁺	43
FIG 12. Representación gráfica de Hanes-Wolf de los datos cinéticos de la actividad de ICDH de <i>Sac. erythraea</i> CA 340 en función de diferentes concentraciones de magnesio.....	44
FIG. 13. Representación gráfica de Hanes-Wolf de los datos cinéticos de la actividad de ICDH de <i>Sac. erythraea</i> CA 340 en función de diferentes concentraciones de manganeso.....	45
FIG. 14. Efecto inhibitorio del ATP sobre la actividad de la ICDH.....	46
FIG. 15. Efecto inhibitorio del ADP sobre la actividad de la ICDH.....	47
FIG. 16. Efecto del GTP sobre la actividad de ICDH.....	48
FIG. 17. Efecto del NAD sobre la actividad de ICDH.....	49
FIG. 18. Efecto del NADH sobre la actividad de ICDH.....	49
FIG. 19. Efecto del ácido cítrico sobre la actividad de ICDH.....	50
FIG. 20. Efecto del α -cetoglutarico sobre la actividad de ICDH.....	51
FIG. 21. Efecto del ac. oxaloacético sobre la actividad de ICDH... ..	52
FIG. 22. Efecto del glioxalato sobre la actividad de ICDH.....	53
FIG. 23. Efecto del glioxalato + oxaloacetato sobre la actividad de ICDH.....	53
FIG. 24. Efecto del fosfoenolpiruvato sobre la actividad de ICDH.....	54
FIG. 25. Efecto de la fructosa 1,6-difosfato sobre la actividad de ICDH.....	55
FIG. 26. Efecto del piruvato sobre la actividad de ICDH.	55
FIG. 27. Efecto de la fuente de carbono sobre la síntesis de la ICDH.....	57

FIG. 28. Efecto de la concentración de glucosa sobre la síntesis de ICDH.....	59
FIG. 29. Efecto de la fuente de nitrógeno sobre la síntesis de la ICDH.....	60
TABLA 1. Cofactores de la ICDH en diferentes microorganismos.....	25
TABLA 2. Pesos moleculares de la ICDH en diferentes <i>microorganismos</i>	35
TABLA 3. Inducción de la ICDH por glucosa.....	60

ABREVIATURAS

ADP	Adenosina difosfato
AMP	Adenosina monofosfato
ATP	Adenosin trifosfato
CoA	Coenzima A
Clm	Cloramfenicol
DE-Celulosa	Diaminoetilcelulosa
GTP	Guanosina trifosfato
ICDH	Isocitrato deshidrogenasa
kDa	Kilodaltones
MM	Medio mínimo
MOPS	Ácido 3-(morfolino) propansulfónico
NAD	Nicotinamida adenosin dinucleótido
NADP	Fosfato de nicotinamida adenosin dinucleótido
rpm	Revoluciones por minuto
Sac.	<i>Saccharopolyspora</i>

RESUMEN

Saccharopolyspora erythraea CA340 es un actinomiceto cuya principal característica es la de producir eritromicina, un antibiótico macrólido no poliénico, que se sintetiza a partir de una molécula de propionil CoA y seis moléculas de metilmalonil CoA, por un proceso parecido al de la síntesis de ácidos grasos. Estas moléculas precursoras de la eritromicina se pueden sintetizar a partir de succinil CoA, un intermediario en el ciclo de Krebs. Este ciclo es la vía metabólica más importante para la generación de ATP y de otros compuestos en las bacterias aerobias, sin embargo no se han estudiado ni las enzimas que participan en él ni su regulación en estos microorganismos productores de antibióticos. Es por esta razón que nos interesó estudiar a una de las enzimas importantes en el ciclo, la isocitrato deshidrogenasa, la cual cataliza la descarboxilación oxidativa del ac. isocítrico para generar ac. α -cetoglutárico, que posteriormente es convertido a succinil CoA. En este trabajo se presentan los resultados de la caracterización bioquímica de la isocitrato deshidrogenasa en *Saccharopolyspora erythraea* CA340, así como de la regulación de la actividad y de su síntesis. Los resultados obtenidos mostraron que la actividad de esta enzima es óptima en un rango de valores de pH de 7.5-8.0 utilizando solución amortiguadora de tris-acetatos y a una temperatura de 30°C. La enzima mostró ser dependiente de NADP⁺, para el cual se obtuvo un K_m de 0.026 μ M, valor muy cercano al obtenido para la mayoría de las bacterias. Se obtuvo también un K_m de 0.14 μ M para isocitrato, lo que sugiere una alta afinidad hacia este sustrato. La actividad de la isocitrato deshidrogenasa en la mayoría de los microorganismos requiere de iones divalentes y en nuestro caso, la enzima pudo actuar con Mg²⁺ o con Mn²⁺. Una K_m para Mg²⁺ de 0.51 mM, valor que es más alto que el obtenido para manganeso de 0.039 μ M, indicó que la enzima tiene mayor afinidad por este último. La V_{max} fue de 2.3 μ moles ml⁻¹ min⁻¹. Por lo que respecta a la regulación de la actividad de la isocitrato deshidrogenasa de *Sac. erythraea*, los resultados mostraron que es inhibida por compuestos fosforilados como GTP, ADP y ATP, por algunos intermediarios del ciclo de Krebs como oxaloacetato, ácido cítrico, α -cetoglutarato y la mezcla de oxaloacetato mas glioxalato. Para establecer cual es la regulación de la síntesis de la enzima, primero se obtuvo el perfil de crecimiento y de producción de la ICDH en condiciones donde el microorganismo crece bien. Los resultados mostraron que la enzima se sintetiza de manera asociada al crecimiento, teniendo un máximo a las 72 horas para posteriormente disminuir. También observamos que la producción de esta enzima se incrementa cuando se adicionan al medio de cultivo azúcares fácilmente metabolizables, como la glucosa y la fructosa. Se obtuvo una actividad específica intermedia con sacarosa, galactosa, almidón y menor en acetato, lactosa, piruvato y succinato. Estos resultados sugieren que la síntesis de la ICDH es constitutiva pero estimulada por azúcares fácilmente asimilables. Debido a que la mayor producción se obtuvo con glucosa, se probaron diferentes concentraciones de este azúcar y los resultados mostraron que la actividad específica aumentaba cuando se incrementaba la concentración de glucosa, teniendo un máximo a la concentración de 3%. También se demostró que el efecto de la glucosa se debe a inducción. Con objeto de establecer si la fuente de nitrógeno tenía algún efecto sobre la síntesis de la ICDH, se creció a *Sac. erythraea* CA340 en varias concentraciones de cloruro de amonio y algunos aminoácidos. Los resultados mostraron que en presencia de glucosa como fuente de carbono, la fuente de nitrógeno no tuvo ninguna influencia sobre la producción de ICDH.

INTRODUCCIÓN

Saccharopolyspora erythraea CA340 es un actinomiceto cuya principal característica es la de producir eritromicina, un antibiótico macrólido no poliénico, que se sintetiza a partir de una molécula de propionil CoA y seis moléculas de metilmalonil CoA, por un proceso parecido al de la síntesis de ácidos grasos (Cortés et al., 1995). Estas moléculas precursoras de la eritromicina se pueden sintetizar a partir del succinil CoA, un intermediario en el ciclo de Krebs. A pesar de la importancia comercial que tienen los antibióticos, la mayoría de los cuales se generan a partir de compuestos que provienen del metabolismo primario, poco es lo que se conoce del flujo del carbono y del nitrógeno en estos actinomicetos productores.

Es bien conocido que en bacterias creciendo aeróbicamente, la glucosa es asimilada a través de la vía glicolítica y posteriormente se oxida totalmente en el ciclo de Krebs (McAlister-Henn and Small, 1997). También se ha observado que las enzimas que participan en estas reacciones son constitutivas y que el proceso es regulado por mecanismos de inhibición sobre algunas enzimas claves dentro de las rutas. Así encontramos que la citrato sintetasa, la isocitrato deshidrogenasa y la α -cetoglutarato deshidrogenasa son inhibidas principalmente por ATP, NADH, succinil CoA en algunos microorganismos (Lehninger et al., 1993).

La isocitrato deshidrogenasa (ICDH) dependiente de NADP^+ es una de las enzimas claves del ciclo del ác. cítrico, la cuál cataliza la descarboxilación oxidativa de D-isocitrato para formar α -cetoglutarato, CO_2 y NADPH. El α -

cetoglutarato puede ser posteriormente oxidado dentro del ciclo o aminado reductivamente a glutamato. Por otro lado, el NADPH puede ser usado para reacciones biosintéticas reductivas. De esta manera, la isocitrato deshidrogenasa provee a las células con un intermediario clave del metabolismo energético, así como también con precursores y poder reductor para vías anabólicas, por ejemplo la biosíntesis de aminoácidos (Lehninger et al., 1993).

En *Escherichia coli*, la isocitrato deshidrogenasa es regulada a través de fosforilación reversible por una fosfatasa/cinasa bifuncional de isocitrato deshidrogenasa. Cuando acetato es la única fuente de carbono, la ICDH es fosforilada y entonces inactivada, disminuyendo el flujo de carbono a través del ciclo y permitiendo la operación del ciclo del glioxalato (El-Mansi, 1998).

En la mayoría de los procariotes, ICDH es una enzima dimérica que consiste de subunidades idénticas con pesos moleculares entre 40 000 y 57 000 daltones. Sin embargo existen microorganismos que poseen enzimas monoméricas con pesos moleculares de aproximadamente 80 000 de peso molecular. A pesar de las diferencias en tamaño, todas las ICDHs bacterianas estudiadas hasta la fecha, son similares con respecto a la actividad específica, requerimiento de Mn^{2+} o Mg^{2+} para la actividad, inhibición por oxaloacetato mas glioxalato y sus altas afinidades hacia isocitrato (Eikmanns et al., 1995).

En el caso de *Saccharopolyspora erythraea* CA340 es importante conocer el flujo a través del ciclo de Krebs, ya que los dos precursores de la molécula de eritromicina provienen de succinil CoA., sin embargo a la fecha no se han estudiado las enzimas del ciclo en este microorganismo. Es por esta razón que

consideramos importante estudiar, en principio, las propiedades cinéticas y bioquímicas de la isocitrato deshidrogenasa de *Sacharopolyspora erythraea* CA340, así como los mecanismos regulatorios que se ejercen sobre su actividad y su síntesis, siendo éste el objetivo del trabajo.

Los resultados que se obtuvieron mostraron que la ICDH en *Saccharopolyspora erythraea* CA340 fue dependiente de NADP⁺, al igual que la mayoría de las bacterias; requiere la presencia de Mn⁺² ó Mg²⁺ para su actividad y presenta una alta afinidad hacia el isocitrato. Se observó una actividad óptima a una temperatura de 30°C y un pH de 8.0. En electroforesis en gel de poliacrilamida no desnaturalizante, la ICDH de *Sac. erythraea* CA340 presentó una sola banda de actividad de peso molecular aparente de 130 000 kDa, formada por dos monómeros de 60 000 kDa.

Como se ha reportado en otros microorganismos, GTP, NAD⁺, ADP y ATP inhibieron de forma importante la actividad de ICDH de *Sac. erythraea*. La actividad enzimática también fue inhibida por compuestos intermediarios del ciclo de los ács. tricarboxílicos como el oxaloacetato, el ac. cítrico y el ac. α cetoglutarico, lo que indica que la enzima presenta propiedades alostéricas similares a las de otros microorganismos. En cuanto a su síntesis, la ICDH mostró un patrón de síntesis asociado al crecimiento, teniendo un máximo a las 72 horas y posteriormente decae la actividad notablemente. La síntesis de la ICDH fue estimulada por fuentes de carbono como fructosa y glucosa, azúcares fácilmente metabolizables. Se sintetizó a un nivel intermedio en presencia de sacarosa, galactosa, almidón, acetato y lactosa y presentó casi un 50% de la actividad con

respecto a glucosa, cuando se suministró al medio de cultivo succinato y piruvato en presencia de glicina como fuente de nitrógeno. El efecto que ejerció la glucosa fué de inducción. Por otro lado, al variar la fuente de nitrógeno en el medio de cultivo donde se creció a *Saccharopolyspora erythraea* CA 340 (glicina, glutamina, glutamato, alanina, prolina, cloruro de amonio) y con glucosa como fuente de carbono se observó que no existen diferencias en la síntesis de la ICDH. De acuerdo a estos resultados, podemos sugerir que la síntesis de la ICDH en este microorganismo es constitutiva, que presenta un patrón de regulación de la actividad similar al de otros procariontes y que su síntesis es inducida por la presencia de azúcares fácilmente asimilables.

ANTECEDENTES.

Los actinomicetos son un grupo de microorganismos muy importantes biotecnológicamente, ya que de ellos se obtiene el 70% de los antibióticos usados en la clínica para combatir a las enfermedades, así como también muchas enzimas hidrolíticas usadas en la industria (Morosoli et al., 1997). A este grupo pertenece *Saccharopolyspora erythraea* CA340, microorganismo productor de eritromicina, un antibiótico macrólido no poliénico sintetizado a partir de una molécula de propionil CoA y 6 moléculas de metilmalonil CoA (Fig. 1) (Cortés et al., 1995). A la fecha se han publicado numerosos artículos relacionados con la genética, regulación y producción de la eritromicina (Hsieh and Kolattukudy, 1994; Donadio et al., 1996; Roberts et al., 1993; Caffrey et al., 1992; Reeve and Baumberg, 1998), sin embargo no existen estudios acerca del metabolismo primario y tampoco se conoce la relación que existe entre metabolismo primario y metabolismo secundario, ya que estos procesos implican la existencia de enzimas específicas que posibilitan la formación de compuestos en una ruta ó secuencia determinada, para que pueda sintetizarse el metabolito secundario en cuestión. En el caso de la eritromicina, a partir del succinilCoA se sintetizan los dos precursores de la molécula, el propionilCoA y el metilmalonilCoA como se muestra en la figura 1. El succinilCoA se forma durante el ciclo de Krebs, sin embargo a la fecha no se ha estudiado el flujo del carbono a través del ciclo ni como se regulan las enzimas que participan en él en *Saccharopolyspora erythraea* ni en otros actinomicetos productores de antibióticos.

EL CICLO DE KREBS.

El ciclo de los ácidos tricarboxílicos es la vía metabólica más importante para la generación de ATP en las bacterias aerobias, además provee importantes precursores biosintéticos como succinil CoA y juega un papel clave en la producción de energía cuando la glicólisis es incapaz de satisfacer las necesidades de la célula. Lleva a cabo la oxidación completa de una molécula de

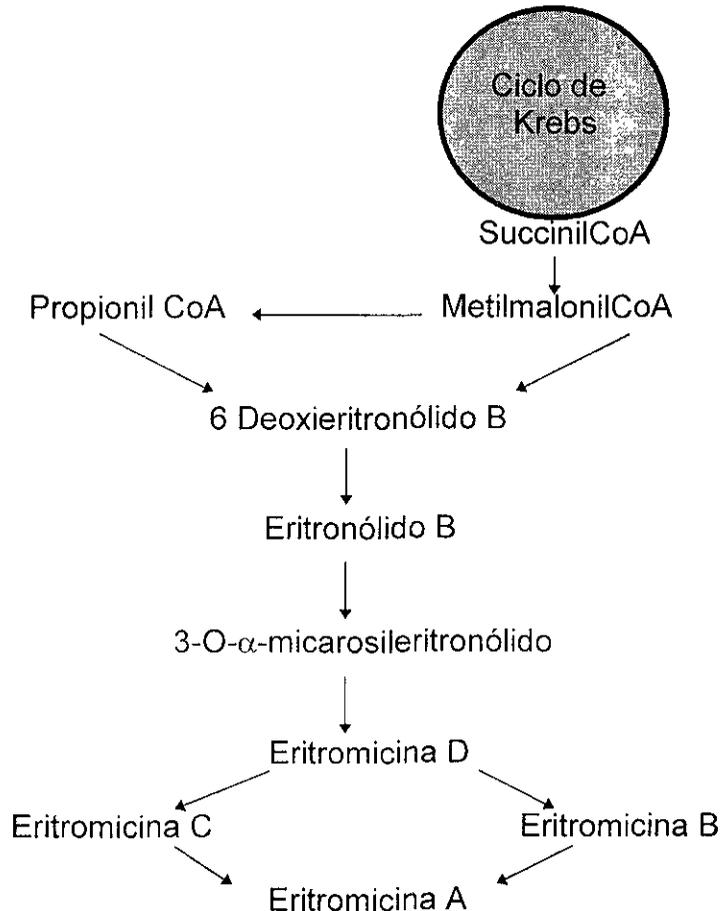


Fig. 1. Vía de biosíntesis de eritromicina en *Sac. erythraea* CA340.

glucosa a CO₂, generando NADH, FADH₂ y ATP (Lehninger et al., 1993). En este ciclo (Fig. 2) se llevan a cabo varias reacciones enzimáticas, cuyo objetivo final es

la oxidación total de una molécula de glucosa. Para empezar una vuelta del ciclo, acetilCoA dona su grupo acetilo al oxaloacetato para formar un compuesto de 6 carbonos que es el citrato. Citrato es entonces transformado en isocitrato, también una molécula de seis átomos de carbono, la cual es deshidrogenada con pérdida de CO_2 para generar un compuesto de 5 átomos de carbono, el α -cetoglutarato. Este último sobrelleva la pérdida de CO_2 y proporciona el succinato, compuesto de cuatro átomos de carbono. El succinato es entonces enzimáticamente convertido en tres pasos en oxaloacetato nuevamente, con el cual el ciclo empieza. Cuatro de los ocho pasos en este proceso son oxidaciones, en las cuales la energía de oxidación es conservada con alta eficiencia en la formación de cofactores reducidos (NADH y FADH_2) (Lehninger, 1993).

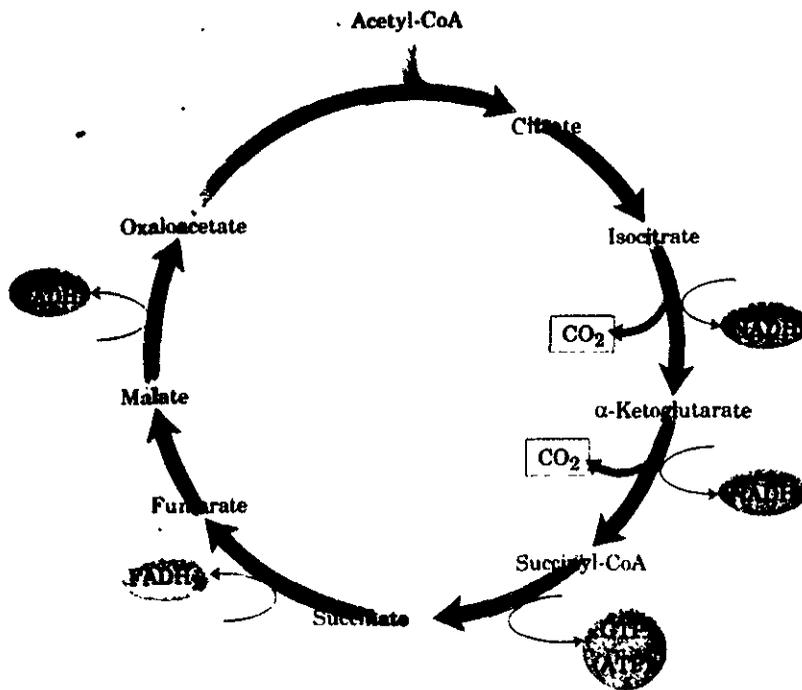


Fig. 2. Ciclo de Krebs.

En la mayoría de los microorganismos la regulación del ciclo de Krebs es ejercida a nivel de la actividad de algunos pasos del ciclo. El flujo de átomos de carbono de piruvato en y a través del ciclo del ácido cítrico está bajo una estricta regulación a dos niveles: La conversión de piruvato en acetil CoA (piruvato deshidrogenasa) y la entrada de acetil CoA en el ciclo (citrato sintetasa), aunque el ciclo también es regulado a nivel de la isocitrato deshidrogenasa y α -cetoglutarato deshidrogenasa (Lehninger, 1993) (Fig. 3).

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

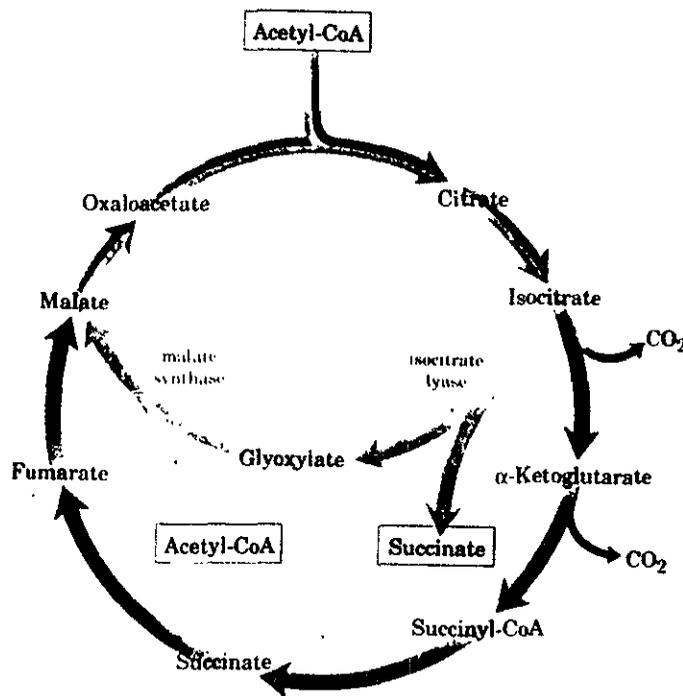


Fig. 3. Regulación del ciclo de Krebs.

ISOCITRATO DESHIDROGENASA.

Como ya se mencionó, uno de los pasos importantes en el ciclo de Krebs es el de la isocitrato deshidrogenasa (isocitrato:NADP⁺ oxidoreductasa) dependiente de NADP⁺ ó de NAD⁺ (ICDH; EC 1.1.1.42 y 1.1.1.41), la cuál cataliza la reacción de la descarboxilación oxidativa del ac. isocítrico a ac. α -cetoglutárico (Fig. 4).

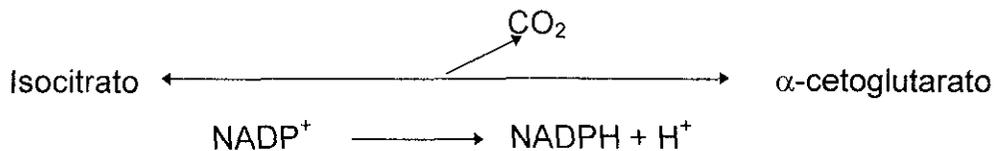
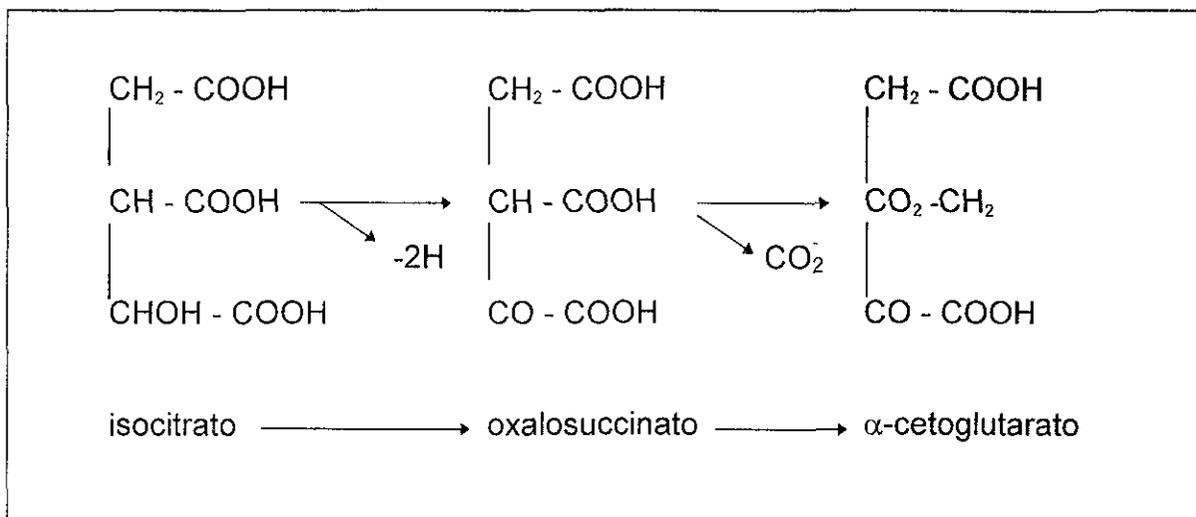


Fig. 4. Reacción catalizada por la isocitrato deshidrogenasa.

Aunque isocitrato deshidrogenasas dependientes de NADP^+ y NAD^+ han sido descritas en procariontes, la mayoría de las bacterias tienen únicamente la enzima que requiere NADP^+ (Muro-Pastor and Florencio, 1994). En eucariontes como *Saccharomyces cerevisiae*, tres isoenzimas distintas difieren en sus subunidades estructurales, así como también en cuanto a su localización celular, como han sido descritos recientemente (Loftus et al., 1994). Existen entonces 3 clases de ICDH(s), una multimérica dependiente de NAD^+ , localizada en la mitocondria. Las otras dos enzimas, citoplásmica y mitocondrial, homodiméricas dependiente de NADP^+ (Zhao and McAlister-Henn, 1996). Por su importante papel en la célula, esta enzima ha sido muy estudiada con respecto a su cinética, estructura y características regulatorias.

La ICDH está codificada en un solo gen y algunos de ellos han sido clonados y secuenciados de microorganismos como *Anabaena* (Muro-Pastor and Florencio, 1994), *Thermus thermophilus* (Yaoi et al., 1994), *E. coli* (Lee et al., 1995), *Bacillus subtilis* (Jin and Sonenshein, 1994), *Caldococcus noboribetus* (Aoshima et al., 1996), *Sphingomonas yanoikuyae* (Wang and Lau, 1995) *Streptococcus mutants* (Cvitkovitch et al., 1996), *Corynebacterium glutamicum* (Eikmanns et al., 1994) y *Synechocystis* (Muro-Pastor et al., 1996) entre otros. La homología de secuencia entre las enzimas bacterianas y las eucarióticas es significativa. Por ejemplo, las NADP -isocitrato deshidrogenasas de *E. coli* y *S. cerevisiae* comparte un 33% de identidad en la secuencia (Lee et al., 1995). Inclusive se ha reportado que existen regiones conservadas (Eikmanns et al., 1995).

COFACTOR, TEMPERATURA Y PH:

La velocidad de reacción de cada una de las reacciones enzimáticas dependerá del pH, de la concentración del cofactor, así como también de las concentraciones intracelulares del sustrato o del producto, que son los elementos primarios para la regulación de la actividad enzimática (Copeland, 1996). La mayoría de las ICDH de las bacterias tienen el mismo requerimiento en cuanto a su cofactor Mn^{2+} ó Mg^{2+} para ser activas. En algunos casos, se prefiere uno de los dos, así encontramos que en cianobacterias existe una mayor afinidad hacia el ión Mn^{2+} (Muro-Pastor et al., 1996) al igual que en *E. coli* (Miller et al., 1996).

La temperatura y el pH son determinantes para que se lleve a cabo la actividad enzimática. En el caso de la ICDH existe una gran variabilidad en cuanto a estos parámetros. Se ha reportado que en *S. cerevisiae* esta enzima tiene un pH óptimo de 7.5 a 8.0 y una temperatura óptima de 30°C (Loftus et al., 1994). En el grupo de las arqueobacterias en el que existen bacterias termofílicas como *Sulfolobus solfataricus*, la actividad óptima de la ICDH se encuentra en una temperatura de 80°C y un pH 4.0 (Camacho et al., 1995).

Un número considerable de ICDHs se distingue por sus requerimientos de cofactores y por su localización subcelular. Algunos microorganismos poseen una ICDH dependiente de $NADP^+$, en otros es dependiente de NAD^+ , pudiéndose hallar ambos tipos en la misma bacteria como es el caso de *E. coli* (Thorness and Koshland, 1987), *Thermoplasma acidophilum* (Camacho et al., 1995) y *T. thermophilus* (Imada et al., 1991); en levaduras como *S. cerevisiae* (Loftus et al.,

1994) se pueden encontrar 3 isoenzimas distintas con respecto a su localización intracelular y a su dependencia del cofactor. Así encontramos entonces una NADP⁺-ICDH en el citosol; NAD⁺-ICDH y NADP⁺-ICDH en mitocondria, ó como en *Candida tropicalis* (Kawachi et al., 1997) que presenta NAD⁺-ICDH en peroxisomas ó NAD⁺-ICDH en mitocondria. La mayoría de las bacterias poseen solamente una ICDH dependiente del NADP⁺ como por ejemplo en *Corynebacterium glutamicum* (Eickmanns et al., 1995), aunque también algunos eucariontes poseen este tipo de enzima como *Cephalosporium acremonium* (Olano et al., 1995).

PESO MOLECULAR:

En la mayoría de los procariontes, la ICDH es una enzima dimérica constituída por subunidades idénticas con pesos moleculares entre 40,000 y 57,000 KDa. Sin embargo, *Vibrio parahemolyticus*, *Rhodomicrobium vannielii* y *Azotobacter vinelandii* poseen una ICDH monomérica, con un peso molecular de alrededor de 85,000 KDa (Eickmanns et al., 1994), al igual que *Corynebacterium glutamicum* (Eickmanns et al., 1994), *Desulfobacter vibriodormis* (Steen et al., 1998) y *Caldococcus noboribetus* (Aoshima et al., 1996). En *Candida tropicalis*, *Phycomyces blakesleeanus* y *S. cerevisiae* se ha reportado la presencia de enzimas octáméricas, de gran peso molecular y que pueden estar formadas por una sola subunidad o por dos subunidades distintas (Yamamoto et al., 1995;

Alvarez-Fillafañe et al., 1996; Keys and McAlister-Henn, 1990). En la tabla 1 se muestran algunos casos reportados.

TABLA 1. Pesos moleculares reportados para procariontes y eucariontes.			
Microorganismo	PM (KDa)	Estructura (KDa)	Referencia
<i>Archaeoglobus fulgidus</i>		Monómero (42)	Steen et al., 1995
<i>Azotobacter vinelandii</i>	80	Monómero	Eikmanns et al., 1995
<i>Caldococcus noboribetus</i>	48	Monómero	Aoshima et al., 1996
<i>Candida tropicalis</i>			
Peroxisomal-NADP	90	Dimérica (45)	Yamamoto et al., 1995
Mitochondrial-NAD	360	Octámero (41 y 38)	
<i>Caldococcus noboribetus</i>	90	Homodimérica	Aoshima & Oshima, 1997
<i>Cephalosporium acremonium</i>	140	Dimérica (75)	Olano et al., 1995
<i>Desulfobacter vibrioformis</i>	80	Monómero	Steen et al., 1995
<i>Escherichia coli</i>	90	Dímero (45)	Suzuki et al., 1995
<i>Haloferax volcanii</i>		Dímero (62)	Camacho et al., 1995
<i>Neurospora crassa</i>	277	Octámero (42 y 38)	
<i>Phycomyces blakesleeanus</i>	338	Octámero (40.5)	Alvarez-V. et al., 1996
<i>Phytium ultimum</i>	96	Dímero (48)	Kim et al., 1996
<i>Rhodocrobium vannielii</i>	80	Monómero	Eikmanns et al., 1995
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>			
Mitochondrial-NAD	310	Octámero (39 y 40)	Keys and M. 1990
<i>Sulfolobus solfataricus</i>		Dímero (45)	Camacho et al., 1995
<i>Vibrio</i> sp. ABE-I		Monomérica <i>icdI</i>	Suzuki et al., 1995
		Dimérica <i>icdII</i>	
<i>Vibrio parahemolyticus</i>	80	Monomérica	Eikmanns et al., 1995

EFFECTORES:

Algunas enzimas alostéricas responden a 2 ó más moduladores específicos, cada uno de ellos unido a un centro específico de la enzima. La inhibición de algunos enzimas por metabolitos específicos, constituye un elemento importante en la regulación del metabolismo intermediario.

La ICDH puede ser activada o inhibida por una serie de efectores entre los que se encuentran compuestos fosforilados como AMP, ADP o ATP que se reportan como efectores negativos en *Synechocystis* (Muro-Pastor et al., 1996).

Por otro lado, algunos intermediarios del ciclo de Krebs, como oxaloacetato, α -cetoglutarato y glioxalato tienen un efecto de inhibición sobre la actividad de ICDH en estos microorganismos. La enzima de *C. glutamicum* fue completamente inhibida por una mezcla de 1 mM de oxaloacetato más 1 mM de glioxalato. Ningún efecto sobre la actividad fue observado con 1 mM de oxaloacetato o 1 mM de glioxalato solos. Tampoco ATP, ADP, AMP, fructosa 1,6-bisfosfato, gliceraldehído 3-fosfato, 3-fosfoglicérico, fosfoenolpiruvato, piruvato o cualquier otro intermediario del ciclo a una concentración de 1 mM tuvieron efecto sobre la actividad de la ICDH (Eikmanns et al., 1995).

REGULACIÓN DE LA ISOCITRATO DESHIDROGENASA A NIVEL DE SÍNTESIS:

La síntesis de ICDH de muchos microorganismos ha sido reportada como variable cuando las células son crecidas en diferentes fuentes de carbono como

en *Bacillus subtilis* donde la actividad específica disminuyó hasta 2 veces cuando el microorganismo está creciendo en glucosa, α -cetoglutarato ó glutamato. En *Bacillus subtilis*, también se ha observado que las actividades de las enzimas del ciclo de Krebs se inducen bajo condiciones que también inducen la esporulación (Jin et al., 1997). En *S. cerevisiae* también se encontró que los niveles de ICDH son más bajos en glucosa que en otras fuentes de carbono (Keys and McAlister-Henn, 1990).

En bacterias entéricas como *K. aerogenes*, *S. typhimurium*, *Serratia marscecens* (Eikmanns et al., 1994), la actividad específica de ICDH fue encontrada 3 a 4 veces más baja durante el crecimiento en acetato que durante el crecimiento en glucosa. En *E. coli*, la ICDH es regulada por modificación postraducciona, via una fosforilación reversible por una enzima fosfatasa/cinasa bifuncional. Cuando la fuente de carbono es acetato, la ICDH es fosforilada y entonces inactivada, disminuyendo entonces el flujo de carbono a través del ciclo del ácido cítrico y permitiendo la operación del ciclo del glioxalato (Miller et al., 1996; El-Mansi, 1998). La ICDH es fosforilada en una serina que se encuentra en su sitio activo. La fosforilación bloquea la unión del isocitrato, inactivando a la enzima (Laporte, 1993). La modulación de la actividad enzimática de la ICDH ayuda a la célula a mantener las cantidades óptimas de los intermediarios del ciclo de Krebs.

Por lo que respecta al control de la expresión del gene *icd* de *E. coli*, se ha observado que existe regulación a nivel de transcripción, mediada por la proteína ArcA, en respuesta a cambios en la disponibilidad de oxígeno y de fuente de

carbono. ArcA parece funcionar como un represor de transcripción clásico a través de su unión a un sitio que se traslapa con el promotor de *icd* durante condiciones de crecimiento anaeróbico (Chao et al., 1997).

En *C. glutamicum* se ha reportado que la actividad específica de la ICDH estuvo entre 0.9 y 1.1 U mg⁻¹ sin importar la fuente de carbono utilizada en el medio de crecimiento. La actividad específica también fue idéntica cuando las células fueron recogidas en las fases temprana, media y tardía de crecimiento, lo que sugiere que la síntesis de la enzima es constitutiva (Eikmanns et al., 1995).

Vibrio sp. cepa ABE-1 tiene dos ICDHs distintas codificadas por dos genes diferentes, *icdI* e *icdII*, los cuales son regulados de manera distinta a nivel transcripcional. Los niveles de ARNm del *icdII* se incrementan al bajar la temperatura de crecimiento mientras que el ARNm correspondiente a *icdI* es afectado por la fuente de carbono (Suzuki et al., 1995).

Por otro lado, *Phycomyces blakesleeanus* presenta 2-3 veces mayor actividad en acetato que en glucosa, al igual que en levaduras (Alvarez-Villafañe et al., 1996).

En cianobacterias como *Synechocystis* y *Anabaena* sp. se presenta una represión por nitrógeno sobre la síntesis de la ICDH debido a que en estos microorganismos, el α -cetoglutarato producido por la reacción catalizada por la ICDH no puede ser posteriormente oxidado, y por lo tanto entra directamente al ciclo GS/GOGAT y tiene un papel biosintético muy claro relacionado a la asimilación de nitrógeno (Muro-Pastor et al., 1996).

OBJETIVO GENERAL:

Caracterización bioquímica de la isocitrato deshidrogenasa de *Saccharopolyspora erythraea* CA340.

OBJETIVOS:

- 1) Obtener el pH óptimo, temperatura óptima, peso molecular, K_m para isocitrato, para NADP^+ , para Mg^{+2} y para Mn^{+2} .
- 2) Establecer cuales son los efectores positivos y negativos de la actividad de ICDH.
- 3) Establecer si la síntesis de la enzima es constitutiva, así como su perfil de producción en diferentes condiciones de crecimiento.

MATERIAL Y METODOS

MICROORGANISMO: *Saccharopolyspora erythraea* CA340.

CONSERVACION DE LA CEPA: Se inocularon cajas de agar YEMES (4 g/l de extracto de levadura, 4 g/l de sacarosa, 10 g/l de extracto de malta y 15 g/l de agar) con 0.1 ml de suspensión de esporas de *Saccharopolyspora erythraea* CA340. Las cajas se incubaron a 32°C hasta esporulación. Este procedimiento se repite cada mes.

CULTIVO: Para el perfil de crecimiento y la producción de la enzima, se inocularon 100 ml de medio YEMEG líquido (Hopwood et al., 1985) contenidos en un matraz Erlenmeyer de 500 ml, con 10^8 esporas de *Sac. erythraea* CA 340 y se incubaron a 32°C con agitación rotatoria (200 rpm) por 24 horas. Después este tiempo, se lavó el micelio dos veces con solución salina estéril y el micelio se resuspendió en el mínimo volumen de medio mínimo (MM). Con esta suspensión miceliar se inocularon 1000 ml de MM que contenía en g/l: 25 g de $K_2 HPO_4$, 0.5 g de $MgSO_4$, 0.02 g de $FeSO_4$, 0.05 g de $ZnSO_4$ y 0.001g de $MnCl_2$, 0.001 g de $CoCl_2$, 20 g de MOPS, 10 g de glucosa como fuente de carbono y 2 g de glicina como fuente de nitrógeno. El pH se ajustó a 7.6 con NaOH 10 N. Los matraces se incubaron a 32°C con agitación de 200 rpm. A los diferentes tiempos, el micelio se recuperó por centrifugación, se lavó una vez con buffer Tris-acetatos 0.01M pH 7.6 y se resuspendió en el mínimo volumen de solución amortiguadora de Tris-acetatos pH 7.6 con glicerol al 40%. El micelio se mantuvo a -20°C hasta la

determinación de la actividad. Bajo estas condiciones se conserva una buena actividad de ICDH aproximadamente de 7 a 10 días.

EXTRACTO LIBRE DE CÉLULAS: El paquete micelar se centrifugó y se lavó con buffer Tris acetatos 0.01M pH 7.6 y se resuspendió en el mínimo volúmen del mismo buffer. Posteriormente se sonicó en un sonicador Soniprep 150 MSE durante 3 minutos en frío, para romper el micelio. Para separar los restos celulares se centrifugó a 4°C y 18,000 rpm por un lapso de 30 min.

PURIFICACIÓN PARCIAL: El extracto libre de células se mezcló con DEAE-celulosa (v/v), se agitó durante 5 minutos y se filtró para separar la resina. La resina se lavó con solución de NaCl 0.1M, 0.15M, 0.2M, 0.25M, 0.3 M 0.4 M y 0.5 M en solución amortiguadora de Tris-acetatos. En cada lavado la resina se dejaba agitando durante 5 minutos y después se filtraba. La enzima eluye con el lavado de 0.2 M de cloruro de sodio. Este sobrenadante se dializó y concentró en conos de membrana de ultrafiltración Centriflo (Amicon Div.) por centrifugación en una centrifuga clínica Solbat a 4°C durante 10 min a 5,000 rpm. Este extracto libre de células se precipitó con sulfato de amonio haciendo dos cortes uno a 70% y otro a 90%. La enzima precipita en este último corte. La enzima se vuelve a dializar, concentrar y la fracción que queda en el cono se utilizó como fuente de la enzima.

ENSAYO DE LA ACTIVIDAD DE ISOCITRATO DESHIDROGENASA: La actividad de la enzima fué ensayada midiendo el incremento en la absorbancia a 340 mm debido a la aparición de NADPH. La mezcla de reacción estuvo formada por una solución amortiguadora de Tris-acetato pH 7.6, 0.16 M, NADP 0.5 mM,

0.8mM MnSO₄, isocitrato 3 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 340 nm en función del tiempo.

IDENTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE ICDH EN GELES DE POLIACRILAMIDA: Después de la electroforesis en poliacrilamida al 8%, los geles se sumergen en una solución que contiene Tris (pH 7.9) 200 mM, NADP⁺ 0.4 mM, isocitrato 15 mM, bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5 difenil-2H-tetrazòlio 0.4 mM y metosulfato de fenazina 0.5 mM (Muro-Pastor et al., 1994).

CUANTIFICACIÓN DE CRECIMIENTO DE *Saccharopolyspora erythraea* CA 340: El crecimiento se cuantificó como proteína por el método de Lowry usando albúmina sérica bovina como estándar, de acuerdo a la metodología reportada por Flores y Sánchez (1985).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La isocitrato deshidrogenasa es una enzima muy importante dentro del ciclo de Krebs que ha sido aislada de una gran variedad de microorganismos, sin embargo ha sido muy poco estudiada en los actinomicetos en general y mucho menos en los productores de antibióticos. Es por esta razón que se debieron establecer las condiciones de crecimiento de *Sac. erythraea* CA340 para obtener un extracto libre de células con una alta actividad de la enzima y determinar sus parámetros fisicoquímicos óptimos. En principio se creció a este microorganismo en un medio mínimo con sacarosa (2%) y glicina (20 mM) para obtener los perfiles de crecimiento y de actividad específica de ICDH. En la figura 5 se observa que la síntesis de la enzima se lleva a cabo desde el inicio de la fermentación, incrementándose la actividad específica hasta las 72 horas, que es cuando alcanza los valores máximos; posteriormente tiende a disminuir. Este perfil coincide con la fase exponencial de crecimiento, estando entonces la biosíntesis de la isocitrato deshidrogenasa asociada al crecimiento. En *Bacillus subtilis* se ha reportado que la ICDH, junto con otras enzimas del ciclo se sintetizan hasta que el microorganismo entra en fase estacionaria (Jin and Shonenshein, 1994) y en *C. glutamicum* se sintetiza durante todas las fases de crecimiento (Eikmanns et al., 1995), así que no parece haber una fase común en donde se sintetice esta enzima. Es probable que en *Sac. erythraea* se requiera que el ciclo de Krebs funcione bien durante el crecimiento, para que haya una poza suficiente de

intermediarios, especialmente el succinilCoA ya que a partir de éste se sintetizan los precursores directos de la eritromicina.

Para poder establecer sus propiedades fisicoquímicas, primero se llevó a cabo una semipurificación de la enzima a través del uso de DEAE-celulosa y de precipitación con sulfato de amonio. En la tabla 2 se muestran los resultados obtenidos y se puede observar que se logra un incremento de actividad específica de 11 veces. Después de dializar y concentrar la enzima se determinaron cuales eran los requerimientos de la enzima con respecto a pH y temperatura óptimas, cofactores y iones metálicos.

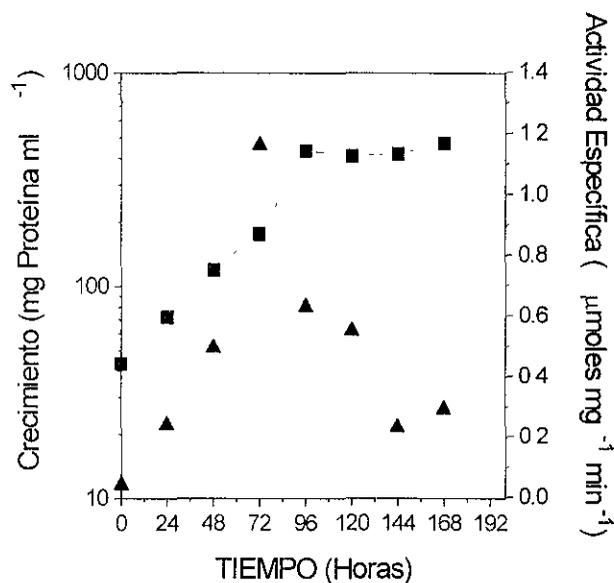


FIG. 5. Perfiles de crecimiento y de actividad específica de la isocitrato deshidrogenasa de *Saccharopolyspora erythraea* CA340 crecida en sacarosa 2% y 20 mM de glicina. Las condiciones de crecimiento y medición de actividad fueron las que se reportan en Material y Métodos.

TABLA 2. Purificación parcial de la Isocitrato deshidrogenasa de *Sac. erythraea* CA340.

Condición	Act. específica*	Factor de purificación
Ext. Libre de células	0.55	1
0.2M de NaCl	1.98	3.6
Precipitado de 90% $(NH_4)_2SO_4$	6.29	11.4

* $\mu\text{moles mg}^{-1} \text{min}^{-1}$

Para establecer el peso molecular aparente de la enzima, se sometió a electroforesis en geles de poliacrilamida al 8% en condiciones no desnaturalizantes y se reveló el gel para actividad de acuerdo a la metodología reportada por Muro-Pastor y Florencio (1994). En estas condiciones, se observa una sola banda de actividad que tuvo un peso molecular aproximado de 130 kDa (Fig. 6). Después de que se mantiene la enzima en sulfato de amonio por varios días, esta banda se desplaza a un peso molecular de 60 kDa. Esto sugiere que la enzima es dimérica. Este peso molecular coincide con el reportado para otros microorganismos (Aoshima and Oshima, 1997; Leyland and Kelly, 1991; Steen et al., 1998).

Se ha reportado que la ICDH puede usar NAD^+ ó $NADP^+$ para llevar a cabo la actividad y que requiere iones de magnesio o manganeso. Los resultados obtenidos con la enzima de *Sac. erythraea* mostraron que la actividad era mucho

mayor con NADP^+ que con NAD^+ , resultado que coincide con otras enzimas aisladas de microorganismos procariontes, como *C. glutamicum* (Eikmanns et al., 1995; Miyazaki, 1996; Camacho et al., 1995). Con respecto al ión requerido, la actividad fue mayor con manganeso que con magnesio, al igual que en otras bacterias como *Synechocystis* sp. (Muro-Pastor et al., 1996) y en *E. coli* (Miller et al., 1996), por lo que en los siguientes experimentos utilizamos una concentración de 0.5 mM de NADP^+ y 0.8 mM de sulfato de manganeso en la mezcla de reacción.

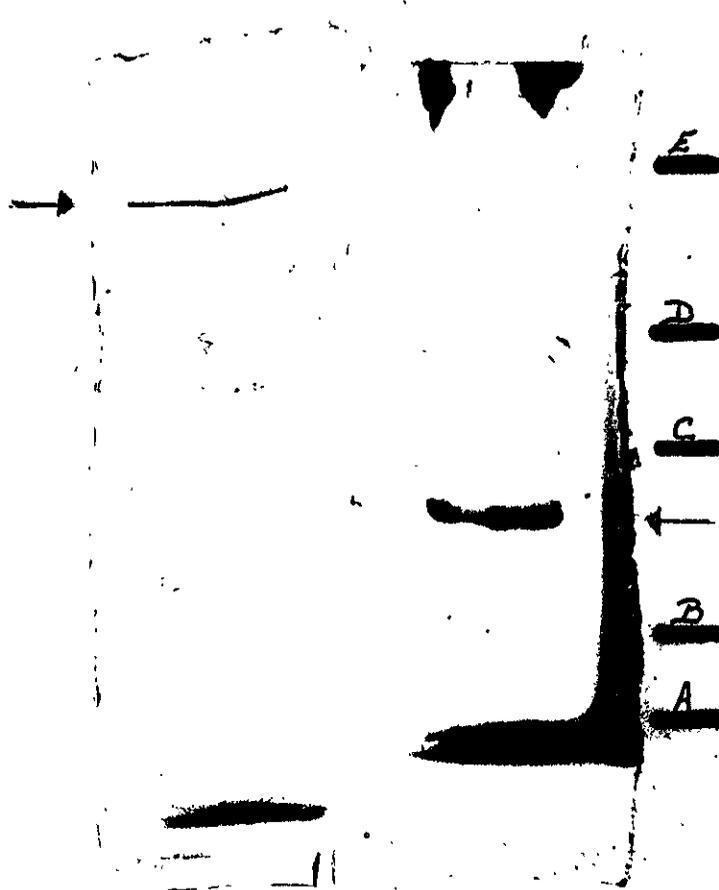


Fig. 6. Zimograma de ICDH de *Sac. erythraea* CA340 en gel de poliacrilamida al 8%. Los marcadores de peso molecular usados fueron (A) inhibidor de tripsina 32800, (B) anhidrasa carbónica 45000, (C) albúmina sérica bovina 85000, (D) β -galactosidasa 127000 y (E) miosina 208000.

EFECTO DEL PH.

En virtud de que desconocíamos las condiciones óptimas de reacción para la ICDH de *S. erythraea* CA340 procedimos a establecer el pH óptimo para la actividad. En la literatura encontramos en los estudios realizados en diferentes microorganismos, que la enzima presenta su máxima actividad en un rango de pH 7.5-9.5. Así encontramos que *Desulfobacter vibrioformis* tiene un pH óptimo entre 8-9 (Steen et al., 1998), *Pythium ultimum* pH 8.5-9.5 (Kim et al, 1996), *Anabaena* sp. pH 7.5-9.5 (Muro-Pastor et al, 1996), *Cephalosporium acremonium* entre pH 8.5-9.0 (Olano et al., 1995), *S. cerevisiae* entre pH 7.5-8.0 (Loftus et al., 1994), *E. coli* entre pH 7.5-9.5 (Miller et al., 1996), encontrando algunas excepciones como en el caso de *Sulfolobus solfataricus*, microorganismo cuya ICDH se reporta con un pH óptimo de 4.0 (Camacho et al., 1995). Con estos antecedentes para obtener el pH óptimo de la ICDH de *Sac. erythraea* CA340 se utilizaron tres diferentes soluciones amortiguadoras para cubrir un rango de valores de pH de 5 a 10.75, citrato-fosfato 0.1 M (pH 5.75 a 7.75), Tris-acetato 0.01M (pH 7.0 a 8.75) y glicina-NaOH 0.2 M (pH 8.5 a 10.5). En la figura 7 se muestran los resultados obtenidos y se puede observar que la enzima presenta su máxima actividad a un pH 7.5 con solución amortiguadora de Tris-acetato 0.01 M.

EFECTO DE LA TEMPERATURA.

Para establecer la temperatura óptima se incubó la mezcla de reacción a diferentes temperaturas. En la figura 8 se muestran los resultados y se puede observar que la actividad fue óptima a 30°C, decayendo muy rápidamente a temperaturas mayores. Esta temperatura concuerda con la obtenida para *C.*

glutamicum (Eikmanns et al., 1995), *C. acremonium* (Olano et al., 1995) y *S. cerevisiae* (Loftus et al., 1994), sin embargo, este parámetro es muy variable en otros microorganismos y así encontramos reportes de temperaturas óptimas hasta de 80°C como es el caso de ciertas arqueas hipertermofílicas, *Sulfolobus solfataricus* (Camacho et al., 1995) ó *Archaeoglobus fulgidus* (Steen et al., 1997), lo cual hace referencia al tipo de hábitat de los diferentes microorganismos.

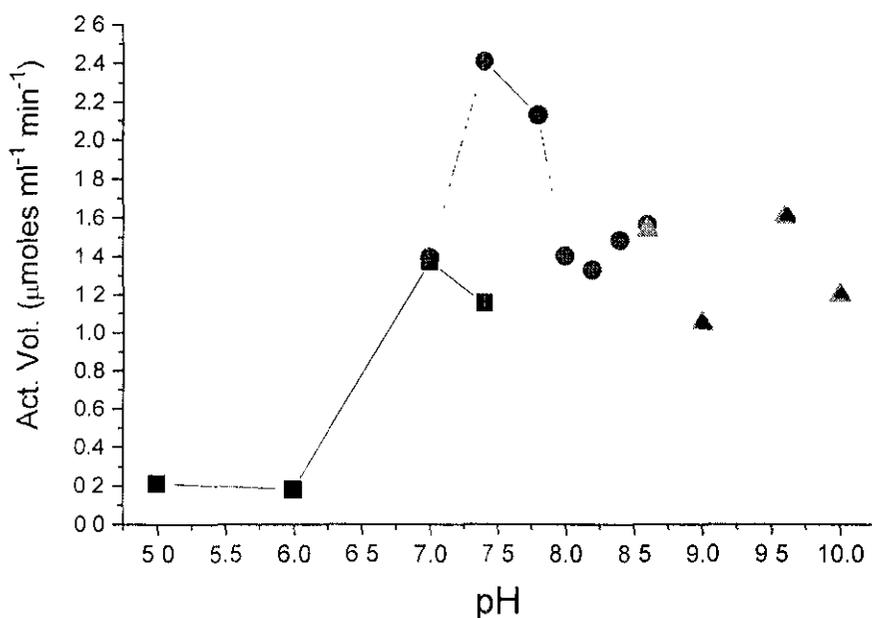


Fig. 7. Efecto del pH sobre la actividad de ICDH de *Sac. erythraea* CA340. La actividad fue medida en solución amortiguadora de citrato fosfato 0.1 M (■), solución amortiguadora de Tris-acetato 0.01 M (●) y solución amortiguadora de glicina-NaOH 0.1 M (▲). La medición de actividad fue realizada como se describe en material y métodos.

Debido a dificultades técnicas para medir la actividad de la enzima a esta temperatura, ya que el espectrofotómetro disponible no tiene control de

temperatura decidimos hacer las determinaciones a temperatura ambiente teniendo un promedio de 27°C.

PROPIEDADES CINÉTICAS.

En el ciclo de Krebs, la ICDH cataliza la descarboxilación oxidativa del isocitrato para formar el ácido α -cetoglutarato, en una reacción irreversible. Se ha reportado que en la mayoría de los microorganismos, esta enzima tiene gran afinidad por el isocitrato y para establecer si la ICDH de *Sac. erythraea* se comportaba de la misma manera, se midió la actividad en función de la concentración del isocitrato. En la fig. 9 se muestran los resultados después de graficar los datos de acuerdo a la ecuación de Hanes-Wolf, (Copeland, 1996) y se pudo determinar una K_m de 0.14 μM que sugiere la gran afinidad de la ICDH de *Sac. erythraea* CA340 por el isocitrato, característica que comparten prácticamente todos los procariontes. Este valor es menor que otros reportados, los cuales se encuentran dentro del rango, que va de 3.3 μM para *Rhodospirillum rubrum* a 74 μM de *Mycobacterium phlei* (Roy and Packard, 1998; Leyland and Kelly, 1991; Kuldeep et al., 1987). La velocidad máxima obtenida de esta misma gráfica tuvo un valor de 2.30 $\mu\text{moles ml}^{-1} \text{ min}^{-1}$. Este parámetro está reportado de 68 U/mg para la enzima de *Haloferax volcanii* (Camacho et al., 1995) y 233 U/mg para *Desulfobacter vibrioformis* (Steen et al., 1998).

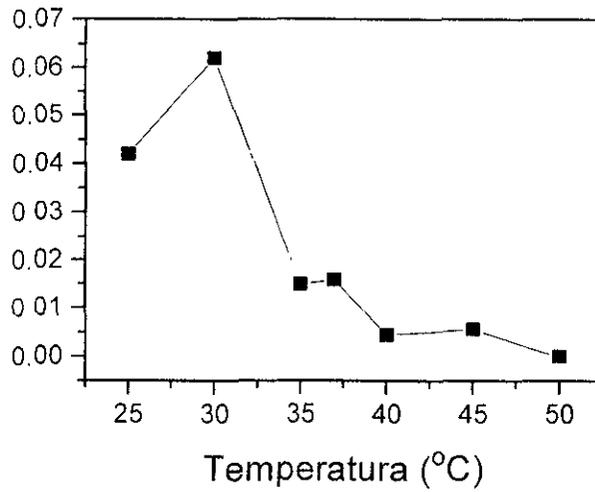


Fig. 8. Efecto de la temperatura sobre la actividad de la ICDH de *Sac. erythraea* CA340. La actividad fue medida como se describe en material y métodos.

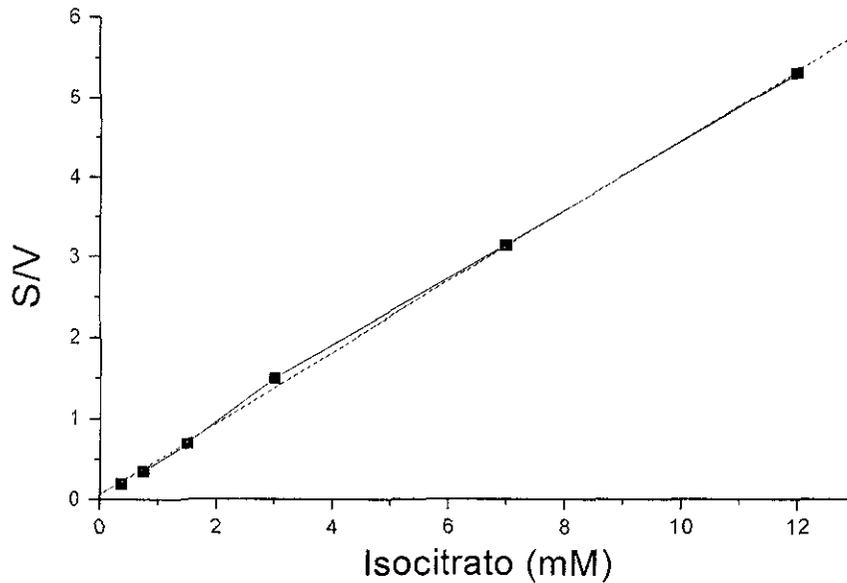


Fig. 9.- Representación de Hanes-Wolf de los datos cinéticos de la actividad de ICDH en función de diferentes concentraciones de isocitrato. La actividad enzimática fue medida como se describe en material y métodos.

Como ya se mencionó anteriormente, tanto el NAD^+ como el NADP^+ pueden actuar como coenzimas de la ICDH. En la mayoría de los microorganismos procariontes, la ICDH muestra dependencia por NADP^+ , mientras que en los eucariontes encontramos isoenzimas, las cuales presentan una localización subcelular distinta y que pueden usar uno u otro compuesto. En el caso de la ICDH de *Sac. erythraea* CA340 se estableció que la actividad es dependiente del NADP^+ ya que la enzima presenta actividad muy baja cuando a la mezcla se le añade NAD^+ . Esta dependencia era de esperarse, ya que este microorganismo es un procarionte y al igual que en *Sac. erythraea* CA340, *Haloferax volcanii*, *Sulfolobus solfataricus* (Camacho et al., 1995), *Desulfobacter vibriodormis* (Steen et al., 1998), *Halobacterium salinarium* (Camacho et al., 1995), *Anabaena* sp. (Muro-Pastor et al., 1996) y *Streptococcus mutans* (Cvitkovich et al., 1996) comparten esta característica, aunque también existen algunos eucariontes cuya ICDH es dependiente de NADP^+ y no de NAD^+ como *C. acremonium* (Olano et al., 1995).

Con objeto de establecer la K_m hacia NADP^+ se midió la actividad a diferentes concentraciones de este cofactor obteniéndose una curva de Line-Weaver-Burk típica de inhibición por sustrato (Fig. 10), en la cual no se pudo obtener el K_m (Stephanopoulos et al., 1998). A través de graficar las actividades en las concentraciones más bajas y bajo el formato de Hanes-Woolf se obtuvo un K_m aparente de $0.026 \mu\text{M}$ como se puede observar en la figura 11 y que indica una gran afinidad de ICDH hacia el NADP^+ . Este fue un valor muy semejante al

reportado para la ICDH-NADP⁺ en *Candida tropicalis* (0.016 μ M; Yamamoto et al., 1994), y en *C. acremonium* (0.0295 μ M; Olano et al., 1995).

Por otra parte, la enzima precisa de la adición de iones divalente tales como el Mn⁺² y el Mg⁺² principalmente. En el caso de *Sac. erythraea* se utilizaron también otros iones divalentes como Ni⁺², Cu⁺², Zn⁺², en la mezcla de reacción enzimática sin embargo no se obtuvo actividad (datos no mostrados). Por lo tanto sólo se calcularon las K_m(s) tanto para Mn⁺² como para Mg⁺² y como se puede observar en las figuras 12 y 13, los valores que se obtuvieron para estos iones fueron 0.039 μ M y 0.511 mM respectivamente. Estos resultados indican que la enzima tiene una actividad 10 veces mayor con mnganeso, aunque presenta actividad también con el magnesio. Se han reportado los valores de K_m para estos iones en las enzimas ICDH de *Synechocystis* sp. (Muro-Pastor et al., 1996) y en *E. coli* (Miller et al., 1996), en los cuales también se presenta una mayor afinidad por Mn²⁺.

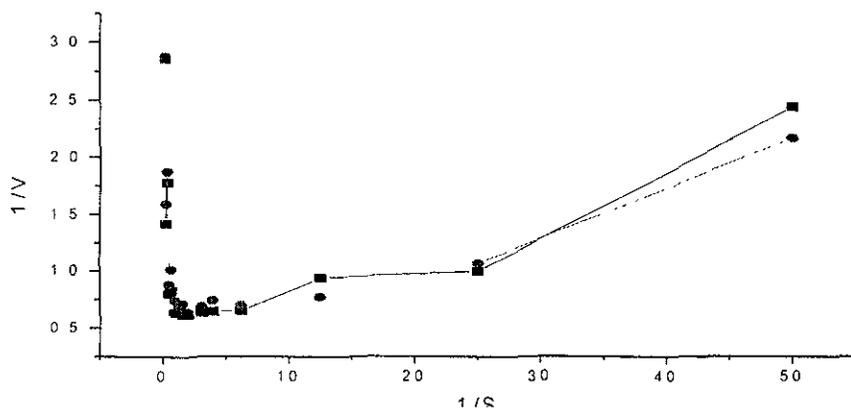


Fig. 10. Representación gráfica de Line-Weaver-Burk para el efecto de la concentración de NADP⁺ sobre la actividad de ICDH de *Sac. erythraea* CA340. La actividad fue medida como se describe en material y métodos.

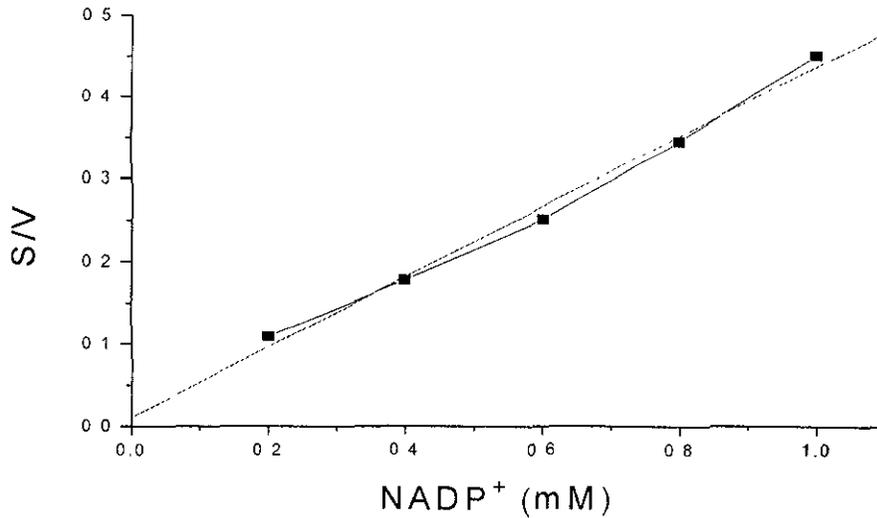


Figura 11. Representación gráfica de Hanes-Wolf de los datos cinéticos de la actividad de ICDH en función de diferentes concentraciones de NADP⁺. La actividad enzimática fue medida como se describe en material y métodos.

EFACTORES POSITIVOS Y NEGATIVOS DE LA ACTIVIDAD DE ICDH-NADP⁺. AMP, ADP y ATP.

La reacción de descarboxilación oxidativa de ICDH es considerada como un paso clave en el ciclo de Krebs. Esta reacción es esencialmente irreversible bajo determinadas condiciones fisiológicas. La ICDH puede ser activada o inhibida por una serie de efectores; por ejemplo es fuertemente inhibida por ATP, también es inhibida en cualquier condición metabólica en la que aumente la concentración de ADP en la célula (Eikmanns et al., 1995; Muro Pastor et al., 1996; Miller et al., 1996). En la fig. 14 se muestra el efecto que tuvo el ATP sobre la actividad de la

isocitrato deshidrogenasa de *Sac. erythraea*. Se puede observar que la actividad de la enzima se inhibe aproximadamente 50% con ATP 1 mM y la actividad disminuye al aumentar la concentración de este compuesto.

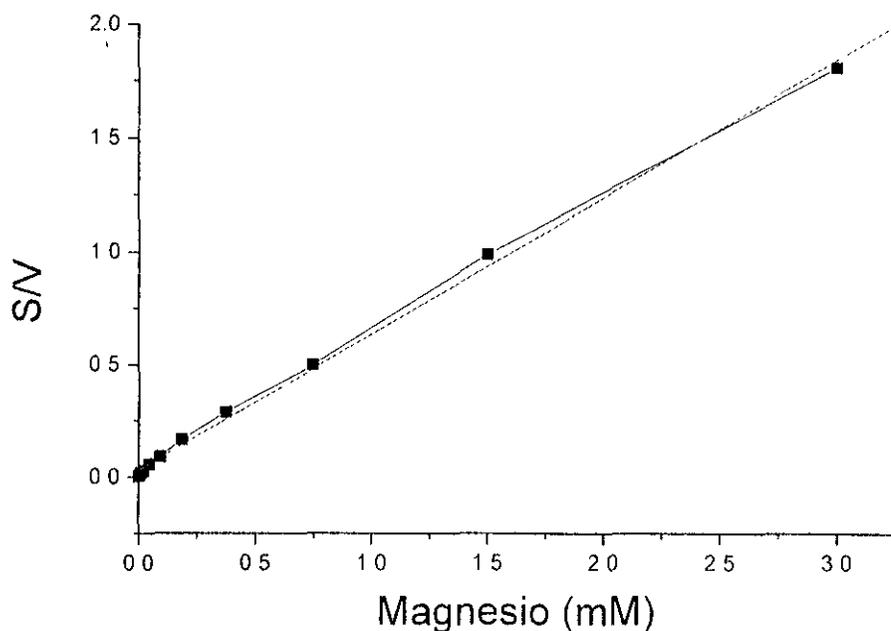


Figura. 12. Representación gráfica de Hanes-Wolf de los datos cinéticos de la actividad de ICDH de *Sac. erythraea* CA 340 en función de diferentes concentraciones de magnesio. La actividad enzimática fue medida como se describe en material y métodos.

El ADP también presentó un efecto inhibitorio sobre la ICDH aunque en menor grado que el ATP como se puede observar en la figura 15, ya que 1 mM de este compuesto inhibe aproximadamente un 20% y la inhibición se incrementa poco al aumentar la concentración de este compuesto. Tanto el ATP como el ADP

han sido reportados como inhibidores de la actividad enzimática, ejemplo de ello lo tenemos en una cianobacteria como *Synechocystis* (Muro-Pastor et al., 1996), cuya ICDH es inhibida en un 50% por el ADP y en un 70% por el ATP a una concentración de 1 mM.

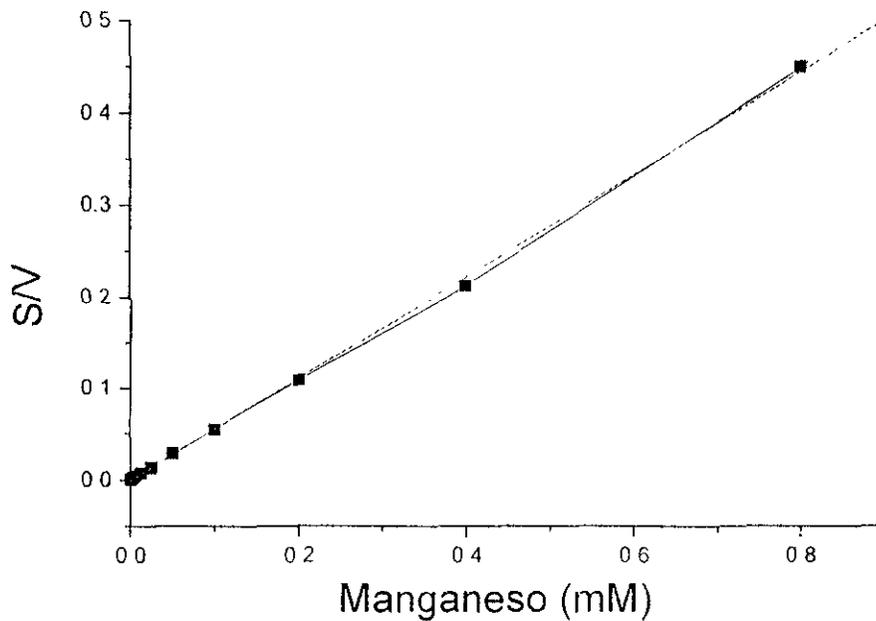


Figura. 13. Representación gráfica de Hanes-Wolf de los datos cinéticos de la actividad de ICDH de *Sac. erythraea* CA 340 en función de diferentes concentraciones de manganeso. La actividad enzimática fue medida como se describe en material y métodos.

Se probó también el efecto de GTP, el cual tiene poco efecto sobre la actividad de la ICDH. En la fig. 16 se puede observar que 1mM de este compuesto tuvo un efecto inhibitorio de poco más del 10%, mucho menor que el mostrado por ATP y ADP. El efecto inhibitorio de estos tres compuestos a concentraciones mayores, las cuales no pueden ser alcanzadas fisiológicamente, puede llegar hasta el 100% (datos no mostrados).

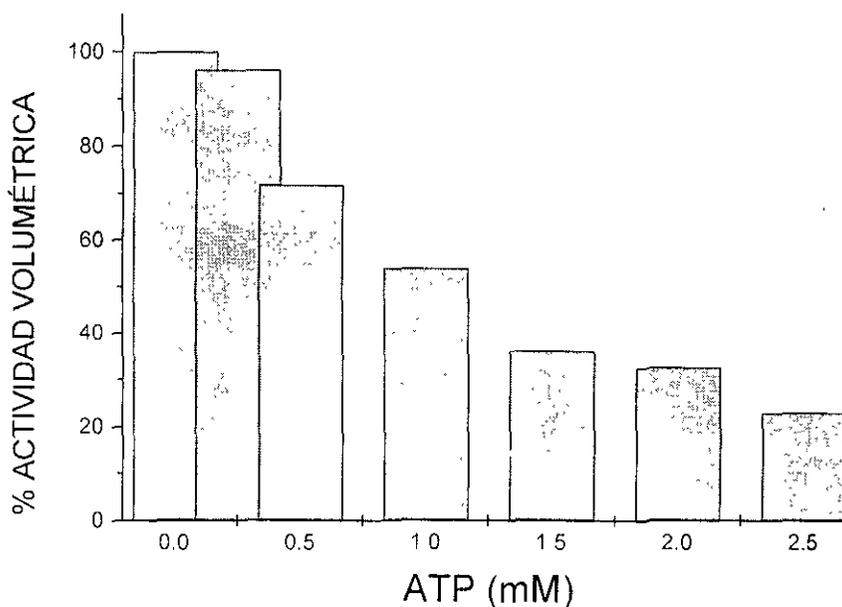


Fig. 14. Efecto de la concentración de ATP sobre la actividad de ICDH de *Sac. erythraea* CA340. La actividad fue determinada como se describe en Material y Métodos.

La inhibición de algunas enzimas por metabolitos específicos constituye un elemento importante en la regulación del metabolismo intermediario. La actividad sigue una serie de respuestas particulares y diferentes en varios microorganismos, por ejemplo mientras que en *S. cerevisiae*, el AMP se comporta

como un efector positivo (Zhao and McAlister-Henn, 1997); en *C. glutamicum* (Eikmanns et al., 1994), los compuestos fosforilados AMP, ADP y ATP no tienen ningún efecto en la actividad enzimática; o como en *Synechocystis* (Muro-Pastor et al., 1996) existe una inhibición del 23% con AMP, 50% con ADP y 70% con los compuestos fosforilados ATP, ADP y GTP. Con los mismos compuestos, en *Sac. erythraea* CA340, la ICDH se inhibe a una concentración de 2.5 mM en un 80%, 55% y 22% respectivamente (Fig. 14, 15 y 16).

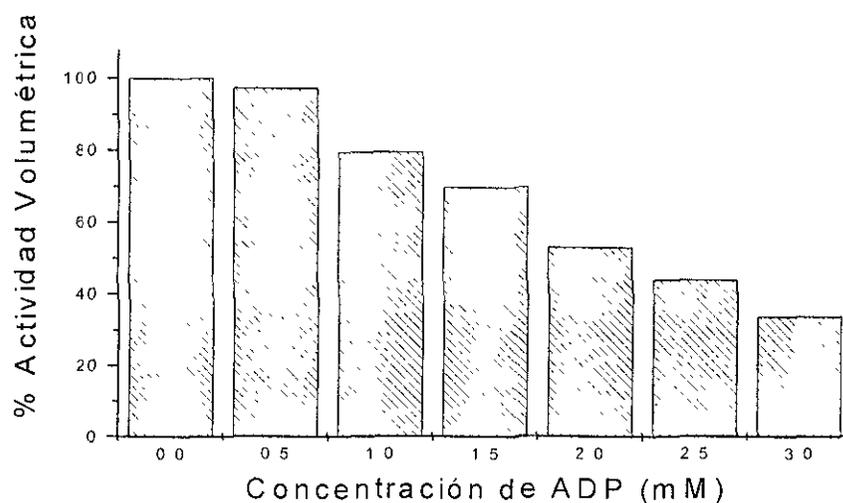


Fig.15. Efecto del ADP sobre la actividad de ICDH de *Sac. erythraea* CA340. La actividad fue medida como se describe en Material y Métodos.

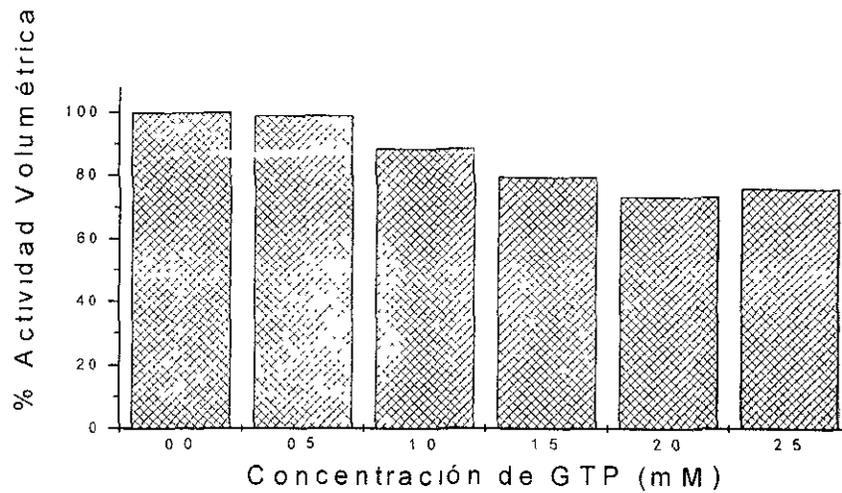


Fig. 16. Efecto de la concentración de GTP sobre la actividad de ICDH de *Sac. erythraea* CA340. La actividad fue medida como se describe en Material y Métodos. NAD y NADH.

El efecto del NAD^+ sobre la actividad de la ICDH en *S. erythraea* CA 340 es negativo, disminuyendo hasta un 75% a una concentración 5mM (Fig. 17), mientras que el NADH no presenta efecto alguno sobre ICDH-NADP (Fig. 18), aunque a concentraciones mucho menores. Este compuesto no se probó a concentraciones mayores, ya que absorbe a 340 nm y entonces se hizo difícil distinguir el incremento en la absorbancia debido a la actividad de la enzima. El NAD^+ también actúa como inhibidor de otras enzimas, como la de *Phytium ultimum* (Kim et al., 1996) o *Thermoplasma acidophilum* (Camacho et al., 1995).

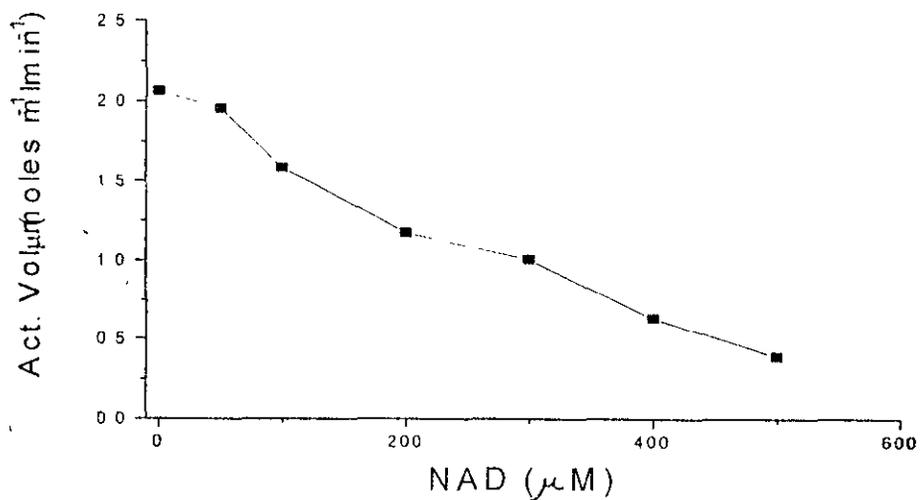


Fig. 17. Efecto de la concentración de NAD^+ sobre la actividad de ICDH de *Sac. erythraea* CA340. La actividad fue medida como se describe en Material y Métodos.

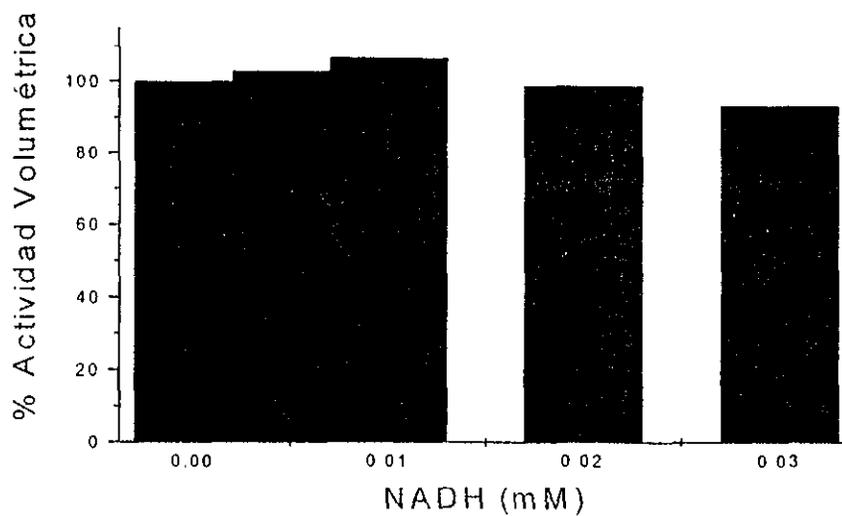


Fig. 18. Efecto de la concentración de NADH sobre la actividad de ICDH de *Sac. erythraea* CA340. La actividad fue medida como se describe en Material y Métodos.

INTERMEDIARIOS DEL CICLO DE KREBS.

El oxaloacetato, citrato, α -cetoglutarato y glioxalato son compuestos intermediarios del ciclo de Krebs que intervienen de forma directa sobre la actividad de la ICDH en muchos microorganismos, razón por la cual se probó su efecto sobre la actividad de esta enzima. En nuestro caso, el citrato disminuye la actividad de ICDH-NADP⁺ en *Saccharopolyspora erythraea* CA 340 en un 75% a una concentración 2mM (Fig. 19), mientras que la actividad de la ICDH-NAD mitocondrial en *Candida tropicalis* aumenta en presencia de este compuesto (Yamamoto et al., 1994). Algunos de estos compuestos también son inhibidores de la ICDH de *Synechocystis* (Muro-Pastor et al., 1996 y *Candida tropicalis* (Yamamoto et al., 1994)

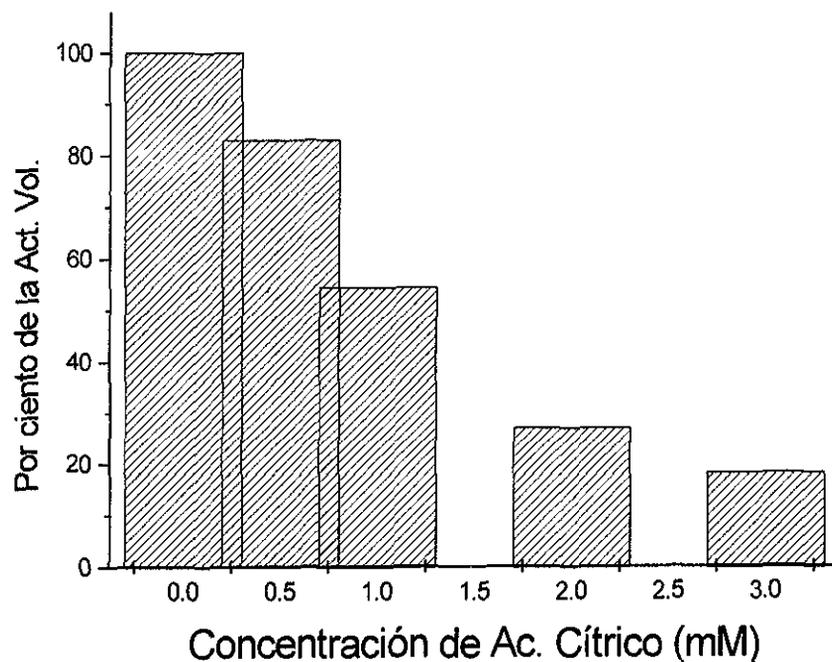


Fig. 19. Efecto de la concentración de ác. cítrico sobre la actividad de ICDH de *Sac. erythraea* CA340. La actividad fue medida como se describe en Material y Métodos.

En el caso del α -cetoglutarato (Fig. 20), el efecto sobre ICDH es casi idéntico al del citrato e influye como un efector negativo disminuyendo la actividad enzimática en un 70% al igual que la actividad de ICDH-NADP⁺ en *Candida tropicalis* en peroxisomas (Yamamoto et al., 1994). En el caso del oxaloacetato, la isocitrato deshidrogenasa mostró una fuerte inhibición, del 100% a una concentración de 2.5 mM (Fig. 21).

También se ha reportado que el glioxalato puede tener efecto negativo sobre la actividad de la ICDH (Muro-Pastor et al., 1996). En la figura 22 se muestran los resultados obtenidos al adicionar glioxalato a la mezcla de reacción y se puede observar que este compuesto causa una inhibición muy marcada desde concentraciones de 0.5 mM, alcanzando un nivel de disminución de la actividad de 40% a una concentración de 2.5 mM.

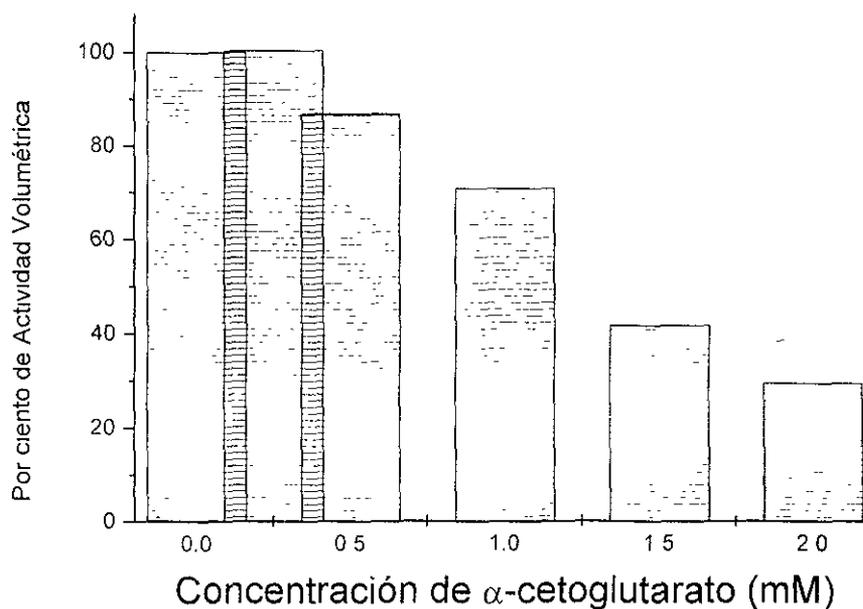


Fig. 20. Efecto de la concentración de α -cetoglutarato sobre la actividad de ICDH de *Sac. erythraea* CA340. La actividad fue medida como se describe en Material y Métodos.

Por otro lado, la mezcla glioxalato más oxaloacetato (Fig. 23) tuvo un efecto negativo sobre la actividad también desde 0.5 mM, pero alcanzando casi el 100% de inhibición a la concentración de 2.5 mM. La enzima de *C. glutamicum* presenta un comportamiento distinto, ya que la mezcla de 1 mM de glioxalato-oxaloacetato es la que tiene un efecto muy marcado sobre la actividad. El oxaloacetato, α -cetoglutarato y citrato tienen un efecto inhibitorio significativo pero a concentraciones mayores (Eikmanns et al., 1995).

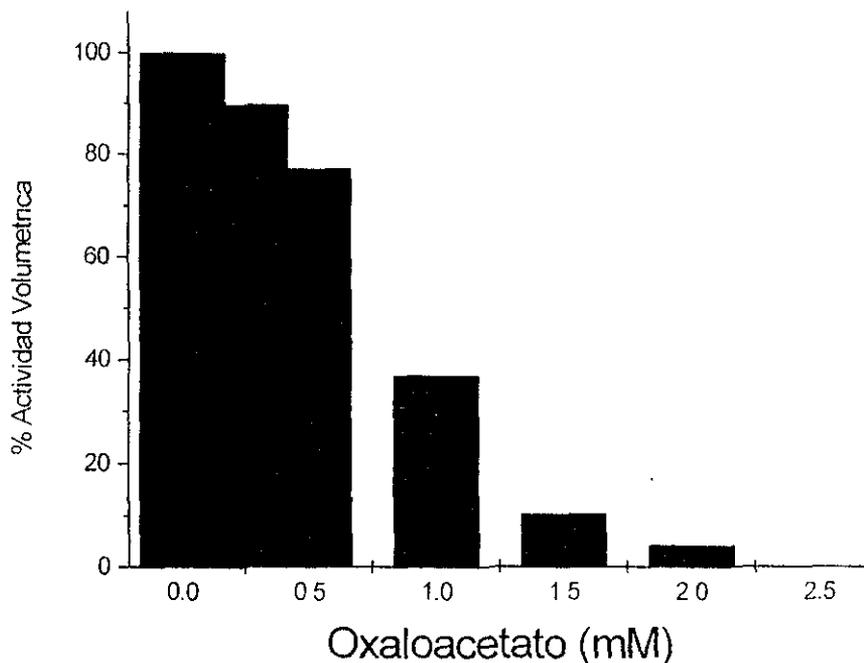


Fig. 21. Efecto de la concentración de oxaloacetato sobre la actividad de ICDH de *Sac. erythraea* CA340. La actividad fue medida como se describe en Material y Métodos.

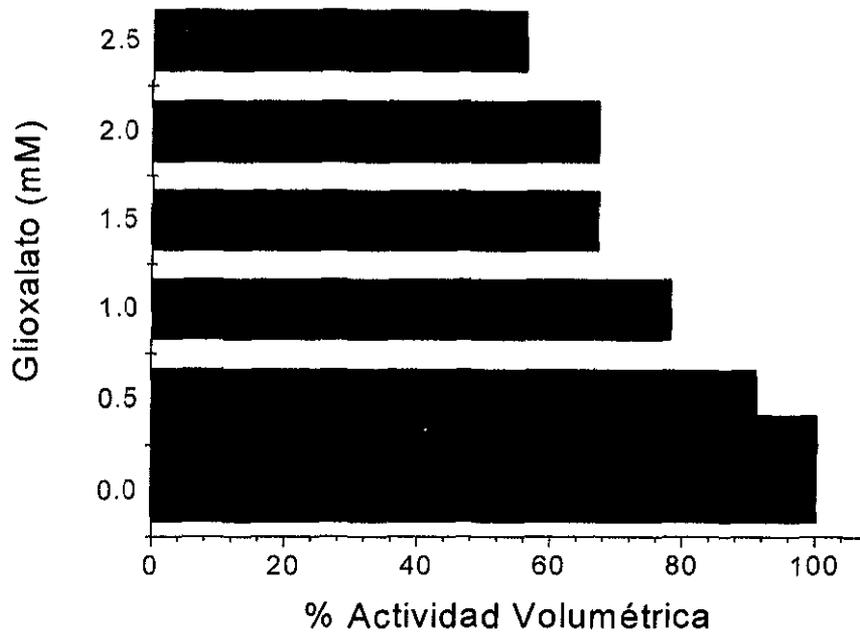


Fig. 22. Efecto del glioxalato sobre la actividad de ICDH de *Sac. erythraea* CA340. La actividad fue medida como se describe en material y métodos.

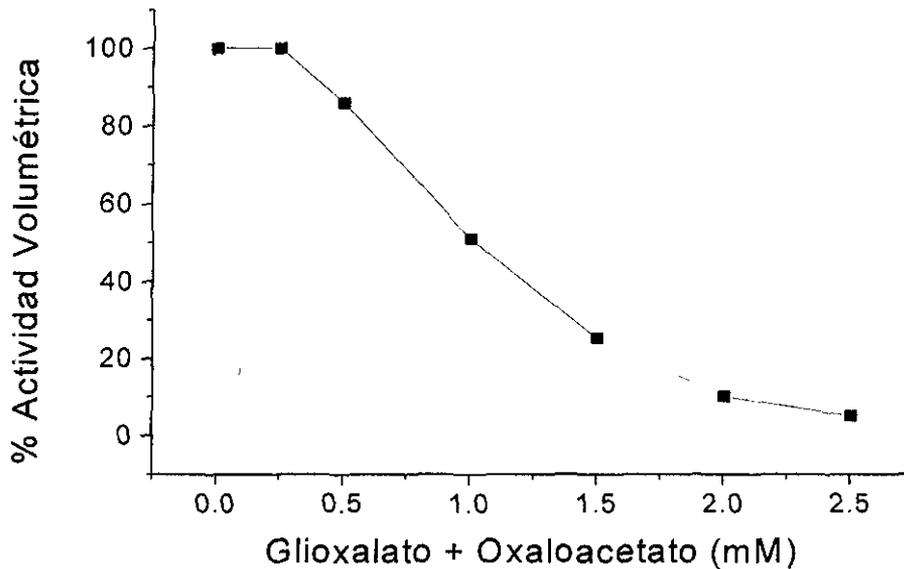


Fig. 23. Efecto del glioxalato + oxaloacetato sobre la actividad de ICDH de *Sac. erythraea* CA340. La actividad fue medida como se describe en material y métodos.

INTERMEDIARIOS DE LA GLICÓLISIS.

En la literatura se reporta que algunos intermediarios de la vía glicolítica tienen un efecto negativo sobre la actividad de isocitrato deshidrogenasa en varios microorganismos. Por esta razón se determinó el efecto de algunos compuestos intermediarios de la glicólisis como fosfoenolpiruvato, fructosa 1,6-difosfato y piruvato, de los cuales sólo el segundo compuesto tuvo un efecto inhibitorio pero a concentraciones arriba de 50 mM. Los otros dos no tuvieron efecto sobre la actividad enzimática de isocitrato deshidrogenasa de *Sac. erythraea* CA 340 (Figs. 24, 25 y 26). Estos resultados son similares a los reportados para *C. glutamicum* (Eikmanns et al., 1995).

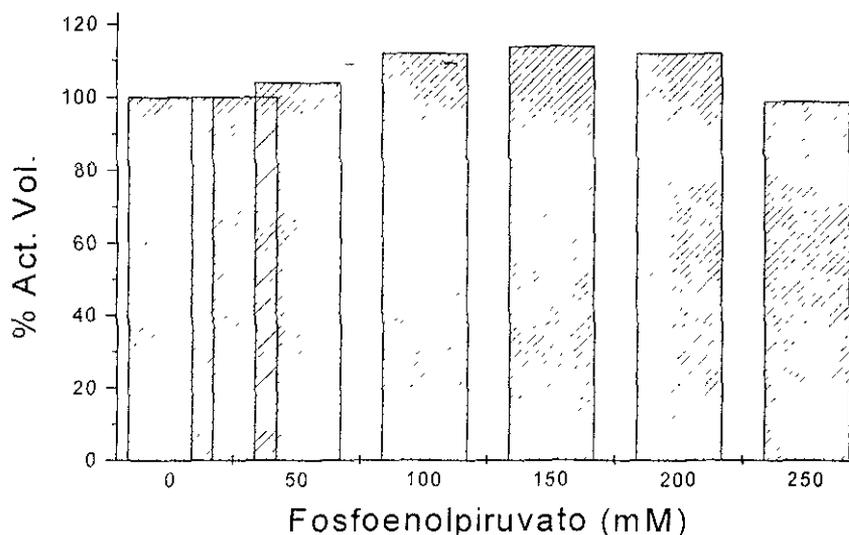


Fig. 24. Efecto del fosfoenolpiruvato sobre la actividad de ICDH de *Sac. erythraea* CA340. La actividad fue medida como se describe en material y métodos.

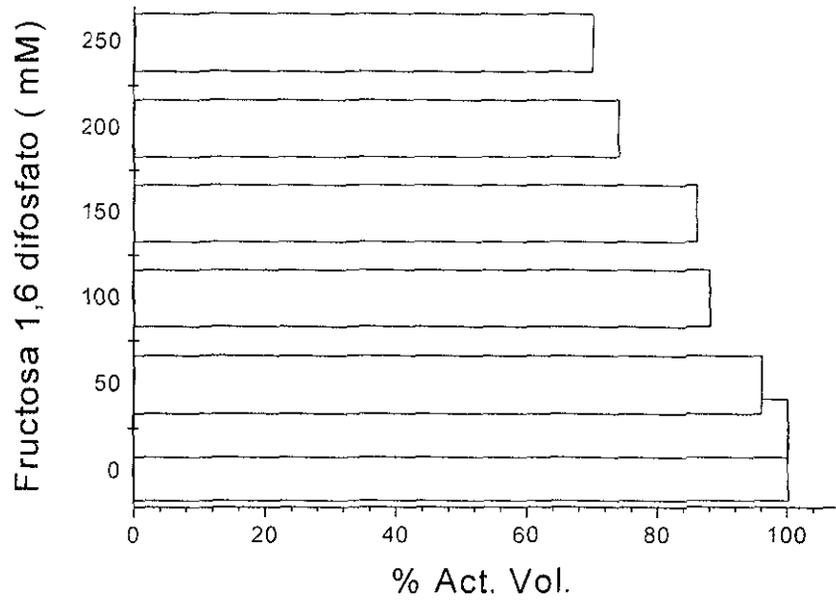


Fig. 25. Efecto del fructosa 1,6-difosfato sobre la actividad de ICDH de *Sac. erythraea* CA340. La actividad fue medida como se describe en material y métodos.

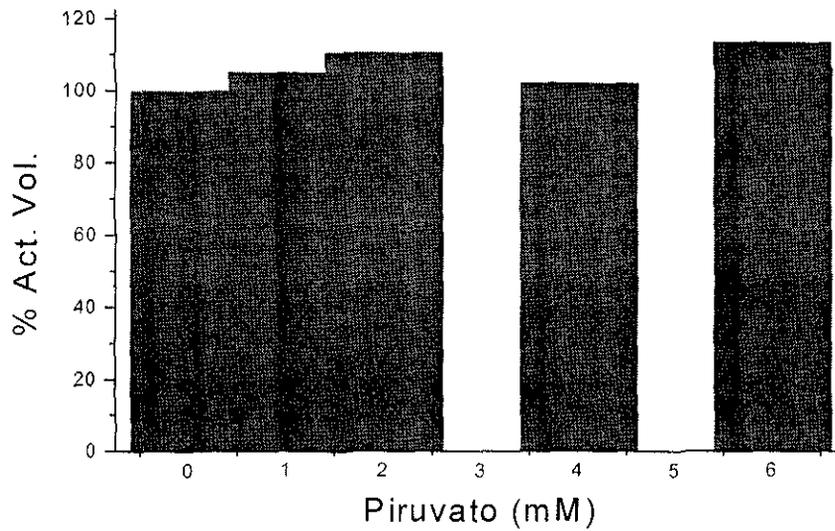


Fig. 26. Efecto de piruvato sobre la actividad de ICDH de *Sac. erythraea* CA340. La actividad fue medida como se describe en material y métodos.

REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS DE LA ICDH:

Como se mencionó anteriormente, la ICDH de *Sac. erythraea* CA340 se sintetiza de manera asociada al crecimiento, teniendo un máximo a las 72 horas en sacarosa como fuente de carbono (Fig. 5). Con objeto de establecer si la síntesis de la enzima se comporta de manera constitutiva, se creció al microorganismo en diferentes fuentes de carbono y a las 48 h se midieron los niveles de la ICDH presentes. En la Fig. 27 se puede observar que los niveles de ICDH nunca llegan a cero en las condiciones probadas. Esto quiere decir que existe un nivel constitutivo que se presenta en fuentes de carbono como succinato o piruvato, mientras que la adición al medio de cultivo de azúcares fácilmente asimilables, como la glucosa o la fructosa, indujeron la síntesis de esta enzima a niveles que llegan al doble del nivel basal. Otros azúcares, como sacarosa, galactosa, almidón, etc., inducen en menor nivel, pero sin llegar a los niveles de succinato o piruvato. Estos resultados sugieren que el microorganismo sintetiza ciertos niveles de la ICDH constitutivamente, los cuales se pueden incrementar dependiendo de la facilidad con la que se asimile la fuente de carbono utilizada lo cuál acelera el metabolismo.

El incremento en la síntesis de la ICDH favorecido por la glucosa fue dependiente de la concentración de glucosa como se puede observar en la figura 28, ya que existe un incremento en la actividad específica de 46% de la concentración de 4% con respecto a la de 0.5% a las 24 horas. Esta diferencia se

hace más marcada a las 48 h en donde el incremento de la actividad específica fue de poco más de doble de la concentración de 0.5% a la de 4%.

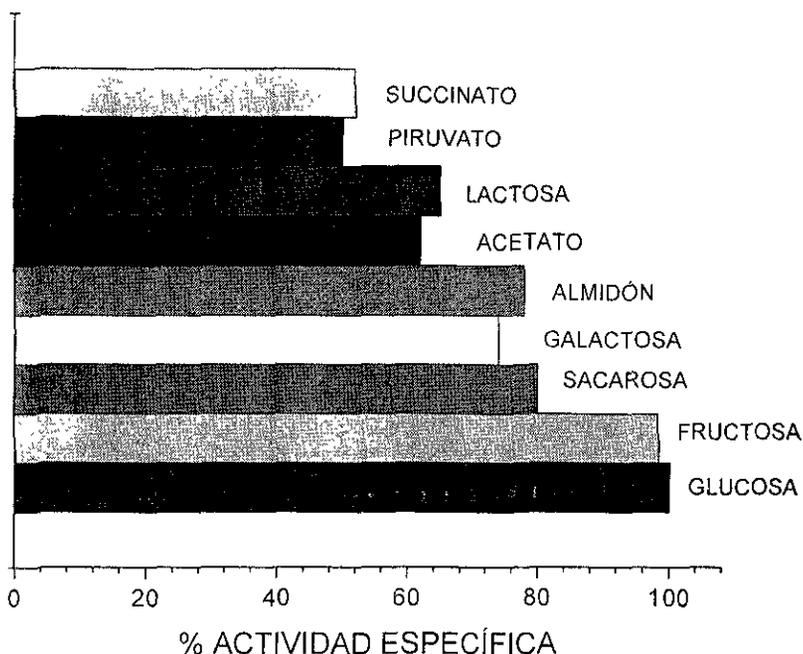


Fig. 27. Efecto de la adición de diferentes fuentes de carbono a una concentración de 1% sobre la síntesis de ICDH de *Sac. erythraea* CA340. La actividad fue medida a las 48 horas de crecimiento en las condiciones que se describen en material y métodos.

Esto probablemente se debe a que a este tiempo la concentración de glucosa en el medio de cultivo ya era mucho más baja y por lo tanto ya no hay efecto sobre la síntesis. Estos datos contrastan con los obtenidos en otros microorganismos, en donde la síntesis de la ICDH se ve afectada por la glucosa adicionada al medio de cultivo. Tal es el caso de *Vibrio* sp. (Suzuki et al., 1995) y

de *E. coli* (Miller et al., 1996). Aquí otra vez, quizá la facultad de *Sac. erythraea* de producir eritromicina, le comprometa a tener un metabolismo de carbono muy activo que le permita tener suficientes intermediarios para su síntesis.

Con objeto de establecer si los azúcares fácilmente asimilables realmente inducían la síntesis de la ICDH, se probó el efecto de la adición de glucosa, en presencia o ausencia de cloramfenicol para inhibir la síntesis de proteínas de novo, a un cultivo crecido en lactosa durante 24 horas. En la tabla 3 se muestran los resultados y se observa que la adición de la glucosa al medio provocó un incremento del 42% de la actividad específica de la ICDH en 4 horas. Los controles, uno con cloramfenicol y el otro sin adición de glucosa, no presentan este aumento en la actividad específica.

Con objeto de establecer si la síntesis de ICDH de *Sac. erythraea* era afectada por la fuente de nitrógeno, se creció a este microorganismo en diferentes fuentes de nitrógeno a una concentración de 20 mM en presencia de 2% de glucosa como fuente de carbono. Los resultados se muestran en la figura 29 y se puede observar que la fuente de nitrógeno no afectó la síntesis de la ICDH en presencia de glucosa. Esto contrasta con los resultados obtenidos por Bermúdez et al. (1998), en donde se reporta un efecto negativo sobre la síntesis de esta enzima de *Sac. erythraea* CA340, por la presencia de diferentes concentraciones de amonio en el medio de cultivo, pero con sacarosa como fuente de carbono. Es probable que la inducción por glucosa, efecto ya mostrado, contrarreste el efecto negativo reportado.

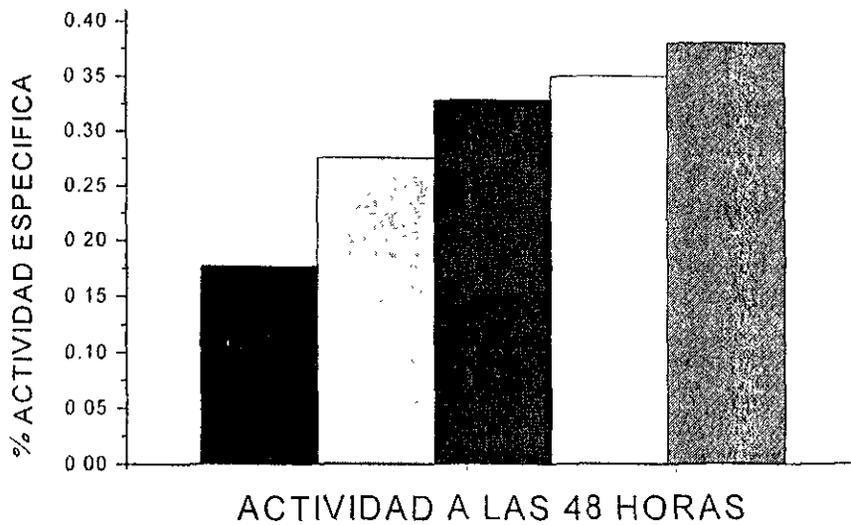
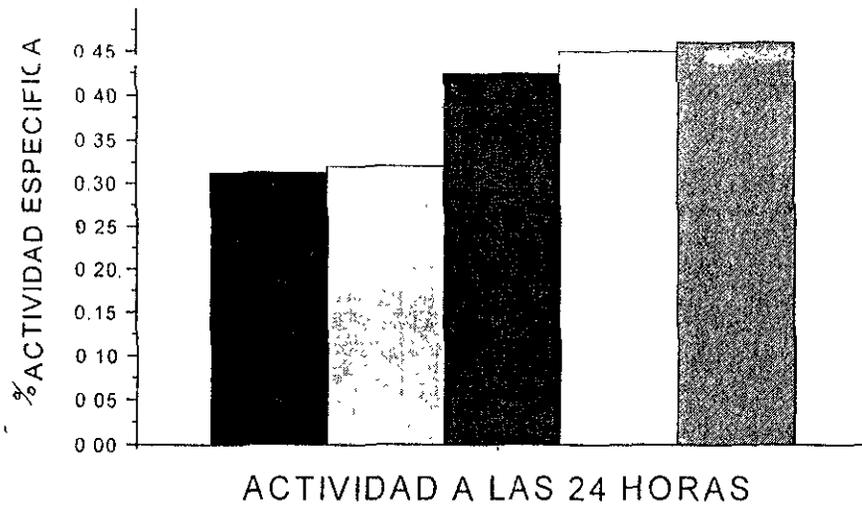


Fig. 28. Efecto de la concentración de glucosa adicionada al medio de cultivo sobre la actividad específica de ICDH de *Sac. erythraea* CA340 a las 24 y 48 h de crecimiento

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

Tabla 3. Inducción de la síntesis de ICDH por 2% glucosa en *Sac. erythraea* CA340.

CONDICIÓN	0 HORAS	4 HORAS	% DE INCREMENTO
	ACTIVIDAD ESPECÍFICA*		
Sin Adición	0.387	0.402	104
+ Gluc 2%	0.327	0.464	142
+Gluc2% +Clm	0.363	0.331	91.3

* $\mu\text{moles mg}^{-1} \text{min}^{-1}$

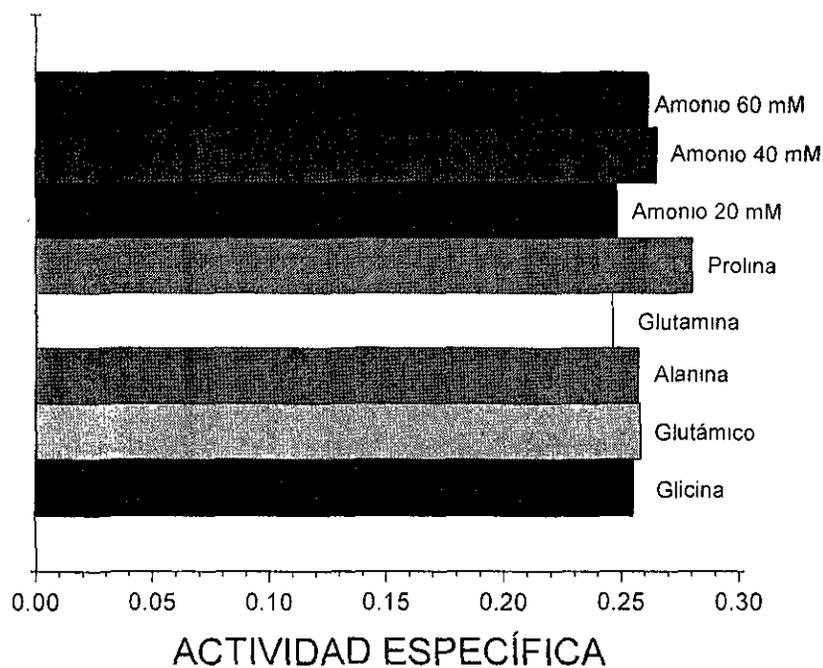


Fig. 29. Efecto de la fuente de nitrógeno (20 mM) sobre la síntesis de ICDH de *Sac. erythraea* CA340 a las 24 horas de crecimiento. La actividad fue medida como se describe en material y métodos.

En resumen podemos decir que la ICDH de *Sac. erythraea* CA340 es una enzima importante dentro del ciclo de Krebs, ya que su síntesis es constitutiva en un cierto nivel pero también si la fuente de carbono es fácilmente asimilable, entonces se puede sintetizar a mayores niveles, permitiendo una actividad metabólica acelerada. Indirectamente esto indicaría que la síntesis de succinilCoA, compuesto importante para la síntesis de los precursores de eritromicina, no es limitante para la formación del antibiótico en estas condiciones de crecimiento. También los resultados reportados indican que *Sac. erythraea* está adaptado a producir precursores, metilmalonilCoA y propionilCoA, en las cantidades necesarias para una buena producción de eritromicina, inclusive hemos establecido en nuestro laboratorio que el α -cetoglutarato generado en el ciclo de Krebs, no es desviado hacia la síntesis de glutamato por la enzima glutamato deshidrogenasa, porque esta actividad no está presente en extractos libres de células obtenidos bajo diferentes condiciones de crecimiento (datos no mostrados). Por lo tanto, todo el α -cetoglutarato generado por la ICDH es convertido a succinilCoA, parte del cual sigue en el ciclo y parte es utilizado por la metilmalonilCoA mutasa para formar metilmalonilCoA. Entonces a partir de este compuesto se sintetizaría el propionilCoA.

Por lo que respecta a la regulación de la actividad de la ICDH de *Sac. erythraea* CA340 se encontró que se ajusta a los patrones reportados, mostrando inhibición por carga energética y por intermediarios del ciclo, aunque las concentraciones son un poco más altas que las que inhiben en otros microorganismos. Probablemente se requieran concentraciones más altas por la

necesidad de una poza de succinilCoA aún en condiciones donde el metabolismo esté llegando a su límite, ya que es aquí cuando se sintetiza la eritromicina.

CONCLUSIONES.

- *Saccharopolyspora erythraea* CA340 presenta actividad de isocitrato deshidrogenasa, la cual se comporta como una enzima constitutiva, asociada a la etapa de crecimiento exponencial.
- La ICDH es una enzima dimérica con un peso molecular de 130 000 kDa.
- La ICDH presenta una gran afinidad por isocitrato y por NADP⁺, aunque este último compuesto a concentraciones altas inhibe la actividad.
- La ICDH tiene una mayor afinidad por el manganeso.
- La actividad de la ICDH se inhibe por ATP, ADP, GTP, NAD⁺, α -cetoglutarato, oxaloacetato, glioxalato y la mezcla glioxalato-oxaloacetato.
- Los intermediarios de la vía glicolítica, fructosa 1,6 difosfato, fosfoenolpiruvato y piruvato no tienen efecto sobre la actividad de ICDH.
- La síntesis de la ICDH es inducida por glucosa y otros azúcares fácilmente asimilables.
- La fuente de nitrógeno no tiene efecto sobre la síntesis de la ICDH.

BIBLIOGRAFÍA.

- Alvarez-Villafañe, E., Soler, J., del Valle P., Busto, F. and D. de Arriaga. 1996. Two NAD⁺-Isocitrate dehydrogenase forms in *Phycomyces blakesleeanus*. induction in response to acetate growth and characterization, kinetics, and regulation of both enzyme forms. *Biochemistry* 35, 4741-4752.
- Atkins, A. and S. Baumberg. 1998. Expression in *Streptomyces lividans* and *Saccharopolyspora erythraea* of gene fusions between the *eryA* promoter region and *aph* as reporter gene. *Biotechnology Letters* 20, 579-584.
- Aoshima, M. and T. Oshima. 1997. Purification and characterization of isocitrate dehydrogenase from a hyperthermophilic archaeobacterium, *Caldococcus noboribetus*. *Biochim. Biophys. Acta* 1340, 227-234.
- Aoshima, M., Yamagishi, A. and T. Oshima. 1996. Eubacteria-type isocitrate dehydrogenase from an Archaeon: Cloning, sequencing, and expression of a gene encoding isocitrate dehydrogenase from a hyperthermophilic archaeobacterium, *Caldococcus noboribetus*. *Arch. Biochem Biophys.* 336, 77-85.
- Bermúdez, O., Padilla, P., Huitrón, C. and M.E. Flores. 1998. Influence of carbon and nitrogen source on synthesis of NADP⁺-isocitrate dehydrogenase, methylmalonyl-coenzyme A mutase, and methylmalonyl-coenzyme A decarboxylase in *Saccharopolyspora erythraea* CA340. *FEMS Microbiology Letters* 164, 77-82.
- Berredjem, A., Garnier, D., Prima Putra, D. and B. Botton. 1998. Effect of nitrogen and carbon sources on growth and activities of NAD and NADP dependent isocitrate dehydrogenases of *Laccaria bicolor*. *Mycol. Res.* 102, 427-434.
- Caffrey, P., Bevitt, D.J., Staunton, J. and P.F. Leadlay. 1992. Identification of DEBS 1, DEBS 2 and DEBS 3, the multienzyme polypeptides of the erythromycin-producing polyketide synthase from *Saccharopolyspora erythraea*. *FEBS* 304, 225-228
- Camacho, M.L., Brown, R.A., Bonete, M-J., Danson, M.J. and D.W. Hough. 1995. Isocitrate dehydrogenases from *Haloferax volcanii* and *Sulfolobus solfataricus*: enzyme purification, characterisation and N-terminal sequence. *FEMS Microbiol. Letts.* 134, 85-90.
- Chao, G., Shen, J., Tseng, C.P., Park, S-J. and R.P. Gunsalus. 1997. Aerobic regulation of isocitrate dehydrogenase gene (*icd*) expression in *Escherichia coli* by the *arcA* and *fnr* gene products. *J. Bacteriol.* 179, 4299-4304.

- Copeland, R.A. 1996. Enzymes. A practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis, 1^a. Ed. Wiley-VCH. Pubs. U.S.A., pp 93-119.
- Cortés, J., Wiesmann, K.E.H., Roberts, G.A., Brown, M.J.B., Staunton, J. and P.F. Leadlay. 1995. Repositioning of a domain in a modular polyketide synthase to promote specific chain cleavage. *Science* 268, 1487-1489.
- Cvitkovitch, D.G., Gutiérrez, J.A. and S. Bleiweis. 1997. Role of citrate pathway in glutamate biosynthesis by *Streptococcus mutans*. *J. Bacteriol.* 179, 650-655.
- Donadio, S., Staver, M.J. and L. Katz. 1996. Erythromycin production in *Saccharopolyspora erythraea* does not require a functional propionyl-CoA carboxylase. *Molecular Microbiology* 19, 977-984.
- Eikmahns, B.J., Rittmann, D. and H. Sahn. 1995. Cloning, sequence analysis, expression, and inactivation of the *Corynebacterium glutamicum icd* gene encoding isocitrate dehydrogenase and biochemical characterization of the enzyme. *J. Bacteriol.* 177, 774-782.
- El-Mansi, E.M.T. 1998. Control of metabolic interconversion of isocitrate dehydrogenase between catalytically active and inactive forms in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Letts.* 166, 333-339.
- Flores, M.E. and S. Sánchez. 1985. Nitrogen regulation of erythromycin formation in *Streptomyces erythraeus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 26, 191-195.
- Hopwood, D.A., Bibb, M.J., Chater, K.F., Kieser, T., Bruton, C.J., Kieser, H.M., Lydiate, D.J., Smith, C.P., Ward, J.M. and H.Schrempf. 1985. Genetic Manipulation of *Streptomyces*. The John Innes Foundation, England.
- Hsieh, Y-J. and P.E. Kolattukudy. 1994. Inhibition of erythromycin synthesis by disruption of malonyl CoA decarboxylase gene *ery M* in *Saccharopolyspora erythraea*. *J. Bacteriol* 176, 714-724.
- Jin, S. and A. L. Shonenshein. 1994. Transcriptional regulation of *Bacillus subtilis* citrate synthase genes. *J. Bacteriol.* 176, 4680-4690.
- Kawachi, H., Shimizu, K., Atomi, H., Sanuki, S., Ueda, M. and A. Yanaka. 1997. Gene analysis of an NADP-linked isocitrate dehydrogenase localized in peroxisomes of n-alkane-assimilating yeast *Candida tropicalis*. *Eur. J. Biochem.* 250,
- Keys, D.A. and L. McAister-Henn. 1990. Subunit structure, expression, and function of NAD(H)-specific isocitrate dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 172, 4280-4287.

- Kim, H., Mozaffar, Z. and J. D. Weete. 1996. A dual cofactor-specific isocitrate dehydrogenase from *Pythium ultimum*. *Can. J. Microbiol.* 42, 1241-1247.
- Kuldeep, R., Dhariwal, R. and T.A. Venkatasubramanian. 1987. NADP-specific isocitrate dehydrogenase of *Mycobacterium phlei* ATCC 354. *J. Gen. Microbiol.* 133, 2457-2460.
- Laporte, D.C. 1993. The isocitrate dehydrogenase phosphorylation cycle: Regulation and enzymology. *J. of Cellular Biochemistry* 51, 14-18.
- Lee, M.E., Dyer, D.H., Klein, O.D., Bolduc, J.M., Stoddar, B.L. and D.E. Koshland, Jr. 1995. Mutational analysis of the catalytic residues lysine 230 and tyrosine 160 in the NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase from *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 34, 378-384.
- Lehninger, A.L., Nelson, D.L. and M.M. Cox. 1993. *Principles of Biochemistry*. Worth Pubs. New York, second edition, pp. 446-472.
- Leyland, M.L. and D.J. Kelly. 1991. Purification and characterization of a monomeric isocitrate dehydrogenase with dual coenzyme specificity from the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. *Eur. J. Biochem.* 202, 85-93.
- Loftus, T., Hall, L., Anderson, S.L. and L. McAlister-Henn. 1994. Isolation, characterization and disruption of the yeast gene encoding cytosolic NADP-specific isocitrate dehydrogenase. *Biochem. J.* 33, 9661-9667.
- McAlister-Henn and W.C. Small. 1997. Molecular genetics of yeast TCA cycle isozymes. *Progr. in Nucleic Ac. Res.* 57, 317-339.
- Morosoli, R., Shareck, F. and D. Kluepfel. 1997. Protein secretion in streptomycetes. *FEMS Microbiology Letters* 146, 167-174.
- Miller, S.P., Karschnia, E.J., Ikeda, T.P. and D.C. Laporte. 1996. Isocitrate dehydrogenase kinase/Phosphatase. *J. Biol. Chem.* 271, 19124-19128.
- Miyazaki, K. 1996. Isocitrate dehydrogenase from *Thermus aquaticus* YT1: Purification of the enzyme and cloning, sequencing, and expression of the gene. *Appl. Environm. microbiol.* 62, 4627-4631.
- Muro-Pastor, M.I., Reyes, J.C. and F.J. Florencio. 1996. The NADP⁺-Isocitrate dehydrogenase gene (*icd*) is nitrogen regulated in cyanobacteria. *J. Bacteriol.* 178, 4070-4076.
- Muro-Pastor, M.I. and F.J. Florencio. 1994. NADP⁺-Isocitrate dehydrogenase from the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120: Purification and characterization of the enzyme and cloning, sequencing and disruption of the *icd* gene. *J. Bacteriol.* 176, 2718-2726.

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

Reeve, L.M. and S. Baumberg. 1998. Physiological controls of erythromycin production by *Saccharopolyspora erythraea* are exerted at least in part at the level of transcription. Biotechnol. Letts. 20, 585-590.

Roberts, G.A., Staunton, J. and P.F. Leadlay. 1993. Heterologous expression in *Escherichia coli* of an intact multienzyme component of the erythromycin-producing polyketide synthase. Eur. J. Biochem. 214, 305-311.

Roy, S.O. and T.T. Packard. 1998. NADP-Isocitrate dehydrogenase from *Pseudomonas nautica*: Kinetic constant determination and carbon limitation effects on the pool of intracellular substrates. Appl. and Environm. Microbiol. 64, 4958-4964.

Steen, I.H., Lien, T. and N-K. Birkeland. 1997. Biochemical and phylogenetic characterization of isocitrate dehydrogenase from a hyperthermophilic archaeon, *Archaeoglobus fulgidus*. Arch. Microbiol. 168, 412-420.

Steen, I.H., Madsen, M.S., Birkeland, N-K. and T. Lien. 1998. Purification and characterization of a monomeric isocitrate dehydrogenase from the sulfate-reducing bacterium *Desulfobacter vibrioformis* and demonstration of the presence of a monomeric enzyme in other bacteria. FEMS Microbiology Letters 160, 75-79.

Stephanopoulos, G., Aristidou, D. and J. Nielsen. 1998. Metabolic Engineering. Academic Press.

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

Thorness, P.E. and D. Koshland. 1987. Inactivation of isocitrate dehydrogenase by phosphorylation is mediated by the negative charge of phosphate. J. Biol. Chem. 262, 10422-10425.

Wang, Y. and P.C.K. Lau. 1996. Sequence and expression of an isocitrate dehydrogenase-encoding gene from a polycyclic aromatic hydrocarbon oxidizer, *Sphingomonas yanoikuyae* B1. Gene 168, 15-21.

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

Yaoi, T., Miyasaki, K. and T. Oshima. 1994. Roles of Arg 231 and Tyr284 of *Thermus thermophilus* isocitrate dehydrogenase in the coenzyme specificity. FEBS letters 355, 171-172.

Zhao, W-N. and L.McAlister-Henn. 1996. Assembly and function of a cytosolic form of NADH-specific isocitrate dehydrogenase in yeast. The J. Biol. Chem. 271, 10347-10352.