

DIFERENCIAS EN EL NODO DEL ISOCITRATO ENTRE *A. schindleri* ACE Y *E. coli* JM101.

Lorena Quiroz¹, Alvaro R. Lara², Dolores Reyes-Duarte², Juan Carlos Sigala². Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Cuajimalpa, ¹Posgrado en Ciencias Naturales e Ingeniería, ²Departamento de Procesos y Tecnología, Cuajimalpa de Morelos, C.P. 05348, Ciudad de México. (lore200295@gmail.com)

Palabras clave: *Acinetobacter*, *isocitrato deshidrogenasa*, *actividad enzimática*.

Introducción. *Acinetobacter schindleri* ACE (ACE) es una bacteria gram negativa que utiliza acetato como fuente de carbono primaria a una velocidad específica de crecimiento (μ) de 0.93 h^{-1} (1). Sin embargo, la bacteria en la que más se ha estudiado el metabolismo de acetato es *Escherichia coli* (*E. coli*). Particularmente JM101 crece a una μ de 0.33 h^{-1} (1,3). Investigar las diferencias que favorecen el catabolismo acelerado de acetato en ACE con respecto a *E. coli* sigue siendo importante, ya que tiene aplicaciones en la mitigación del sobreflujo metabólico de *E. coli*, y además ACE puede utilizarse como agente detoxificador de acetato en hidrolizados de biomasa lignocelulósica. Para ello es importante entender cómo se lleva a cabo el catabolismo de acetato. El acetato entra a la célula, se activa en forma de acetyl coA y entra el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (CAT). En el nodo del isocitrato del CAT, dependiendo de las condiciones fisiológicas, el catabolismo puede continuar hacia la parte baja de CAT, o bien desviarse hacia la ruta del glioxilato. Dentro de las principales diferencias entre ambas bacterias, existe sobreexpresión de los genes de la ruta del glioxilato en ACE respecto a JM101(1). El objetivo del presente trabajo es caracterizar a nivel bioinformático y experimental las principales diferencias en las enzimas que toman parte en el nodo del isocitrato entre ACE y JM101.

Metodología. A nivel bioinformático se empleó análisis de balance de flujo (FBA) a partir de modelos metabólicos reducidos, uno para JM101 y otro para ACE. Para el análisis de la estructura de Icdh se emplearon Clustal-Omega y Jalview para realizar y visualizar alineamientos de secuencias de aminoácidos. Para predecir la estructura terciaria de las enzimas se emplearon servidores como I-TASSER y SWISS MODEL. A nivel experimental: Se sobreexpresó la enzima Icdh de ACE en JM101 y se observó el efecto en la velocidad específica de crecimiento tanto con glucosa como con acetato como fuente de carbono. Por otra parte, la medición de la actividad enzimática de la Icdh de ACE y JM101 se siguió espectrofotométricamente a 340 nm por la aparición de NADPH. Se sobreexpresó la enzima Icdh

de ACE en JM101 utilizando un vector pAJM 336 que se encuentra bajo el promotor lac inducible con IPTG, y se llevaron a cabo cinéticas para determinar su efecto en la μ .

Resultados.

Las enzimas del nodo del isocitrato son la Icdh e Icl. El análisis del alineamiento de secuencia y la estructura 3D tanto de la Icdh como la Icl entre ACE y *E. coli* evidencia que pertenecen a familias evolutivamente distantes. Por otra parte, tras medir la actividad enzimática se determinó que la Icdh de ACE tiene una actividad 22% mayor que la Icdh de JM101, lo que es interesante ya que estudios a nivel transcripcional indican que en ambas bacterias hay un mismo nivel de expresión de *icd* (1).

Al sobreexpresar la Icdh de ACE en JM101 pICD con 3 g/L de acetato como fuente de carbono utilizando 0.25 mM de IPTG, se observa que hay una disminución del 39% en la μ , lo que concuerda con los análisis de FBA, pues para que exista una μ máxima en ACE las actividades de Icdh e Icl deben encontrarse en una relación cercana a 1, por lo que si se quisiera lograr ese efecto en JM101 sería necesario sobreexpresar tanto la Icdh como la Icl.

Conclusiones. La Icdh de ACE tiene una actividad 22% mayor que la Icdh de JM101, ambas Icdh son evolutivamente diferentes en secuencia y estructura. Finalmente, para aumentar la μ en JM101 con acetato como fuente de carbono sería necesario sobreexpresar tanto la Icdh como la Icl de ACE al mismo tiempo.

Agradecimiento. A los profesores que guiaron y dirigieron el proyecto, así como al CONACYT por la beca de doctorado (CVU: 1030454).

Bibliografía.

1. Sigala J., Quiroz L., Arteaga E., Olivares R., Lara A., & Martínez A. (2019), *Microbiology Letters*, 366.
2. Sigala J., Suárez B., Lara A., Le Borgne S., Bustos P., Santamaría R., ... & Martínez A. (2017). *Microbiology*.
3. Bernal C. & Cánovas (2016), *Applied Microbiology and Biotechnology*.