

POSGRADO EN CIENCIAS NATURALES E INGENIERÍA

ESTUDIO *in silico* DE LA ASIMILACIÓN DE ACETATO Y EL NODO
DEL ISOCITRATO ENTRE *A. schindleri* ACE y *E. coli* A NIVEL DE
ESTRUCTURA Y DE FLUJOS DE CARBONO

PRESENTA:

ING. BIÓL. LORENA QUIROZ PALACIOS

MATRICULA: 2193800807

DIRECTOR: Dr. JUAN CARLOS SIGLA ALANIS

ASESORES: Dr. ALVARO R. LARA

Dr. GERARDO PÉREZ HERNÁNDEZ

CUAJIMALPA, CIUDAD DE MÉXICO, 28 DE ENERO DE 2022



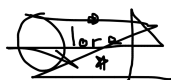
Esta idónea comunicación de resultados fue realizada dentro del Programa de Maestría del **Posgrado en Ciencias Naturales e Ingeniería** de la División de Ciencias Naturales e Ingeniería (DCNI) de la Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Cuajimalpa. El trabajo teórico fue realizado de diciembre-2019 a enero-2022 en el DPT de la DCNI.

DECLARACIÓN DE CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México, D. F. el día 28 del mes enero del año 2022, la que suscribe **Lorena Quiroz Palacios** alumna del Programa de Maestría en Ciencias Naturales e Ingeniería de la División de Ciencias Naturales e Ingeniería de la Universidad Autónoma Metropolitana- Unidad Cuajimalpa, manifiesta que es autor (a) intelectual de la presente idónea comunicación de resultados titulada; “Estudio *in silico* de la asimilación de acetato y el nodo del isocitrato entre *A. schindleri* ACE y *E. coli* a nivel de estructura y de flujos de carbono” realizada bajo la dirección del Dr. Juan Carlos Sigala Alanís y cede los derechos de este trabajo a la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM) para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráfico o de datos del trabajo, sin el permiso expreso del director del trabajo como representante de la UAM. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: (jsigala@cua.uam.mx)

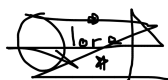
Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.



Lorena Quiroz Palacios

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

“El que suscribe, Lorena Quiroz Palacios, alumna del Programa de Maestría en Ciencias Naturales e Ingeniería declara que los resultados reportados en esta idónea comunicación de resultados, son producto de mi trabajo con el apoyo permitido de terceros en cuanto a su concepción y análisis. Así mismo, declaro que hasta donde es de mi conocimiento no contiene material previamente publicado o escrito por otras (s) persona (s) excepto donde se reconoce como tal a través de citas y que este fue usado con propósitos exclusivos de ilustración o comparación. En este sentido, afirmo que cualquier información sin citar a un tercero es de mi propia autoría. Declaro, finalmente, que la redacción de este trabajo es producto de mi propia labor con la dirección y apoyo de mi director y de mi comité tutorial, en cuanto a la concepción del proyecto, al estilo de la presentación y a la expresión escrita.”



Lorena Quiroz Palacios

DECLARACIÓN DE NO LUCRO:

El que suscribe, Lorena Quiroz Palacios alumna del Programa de Maestría en Ciencias Naturales e Ingeniería, manifiesta su compromiso de no utilizar con fines de difusión, publicación, protección legal por cualquier medio, licenciamiento, venta, cesión de derechos parcial o total o de proporcionar ventajas comerciales o lucrativas a terceros, con respecto a los materiales, datos analíticos o información de toda índole, relacionada con las actividades e intercambios de información derivados de la relación de investigación académica y tecnológica desarrollada entre la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM) y Lorena Quiroz Palacios



Lorena Quiroz Palacios

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Juan Carlos Sigala Alanís quién me abrió las puertas en su grupo de investigación, por guiarme siempre con paciencia, amabilidad y alegría desde la licenciatura, así como a los doctores Gerardo Pérez Hernández, Alvaro R. Lara por orientarme a lo largo de todo el proyecto. Además, agradezco a los doctores Roberto Olivares Hernández y Rodrigo Said Razo Hernández quiénes me apoyaron con sus valiosos conocimientos para poder concluir el proyecto.

Al CONACyT por impulsar estudios de posgrado a través de sus becas.

MUCHAS GRACIAS

A MI FAMILIA

A mi papá por su cariño incondicional, por acompañarme y guiarme, sus enseñanzas siempre me recuerdan lo importante de esforzarme para ser mejor profesionalmente, pero sobre todo como persona.

A mi mamá, por su cariño incondicional, por estar siempre a mi lado apoyando cada decisión que he tomado y por impulsarme a creer en mí misma.

A mis abuelitos por su apoyo a lo largo de toda mi vida. Mi abuelita por contagiarme su entusiasmo para seguir avanzando.

A mis hermanos por estar siempre a mi lado, apoyándome en todo momento, por confiar en mí, en las cosas que hago y las decisiones que tomo.

A mi esposo por ser mi compañero de vida, por su cariño, por su paciencia y apoyo incondicional.

MUCHAS GRACIAS

CONTENIDO

RESUMEN.....	11
ÍNDICE DE TABLAS.....	12
ÍNDICE DE FIGURAS.....	14
ABREVIATURAS.....	20
NOMENCLATURA.....	21
1. INTRODUCCIÓN.....	22
2. MARCO TEÓRICO.....	24
2.1 Género <i>Acinetobacter</i>	24
2.2 <i>Acinetobacter schindleri</i> ACE como cepa de estudio.....	24
2.3 <i>E. coli</i> como cepa de referencia.....	25
2.4 Metabolismo de acetato en <i>A. schindleri</i> ACE y <i>E. coli</i>	25
2.4.1 Transporte de acetato a través de la membrana celular.....	25
2.4.2 Ruta AckA-Pta.....	26
2.4.3 Ruta Acs.....	29
2.4.4 Ciclo de los ácidos tricarboxílicos y ruta del glioxilato (nodo del isocitrato).....	31
2.4.5 Sobreflujo metabólico y su mitigación.....	34
2.5 Detoxificación de acetato en residuos de biomasa lignocelulósica.....	36
2.6 Análisis de balance de flujo (FBA).....	39
2.6.1 Análisis de variabilidad de flujo.....	40
2.6.2 Eliminación <i>in silico</i> de genes.....	40
2.7 Análisis bioinformático de proteínas.....	41
2.7.1 Alineamiento de secuencias.....	42
2.7.2 Árboles filogenéticos.....	43
2.7.3 Predicción de estructura secundaria, terciaria y cuaternaria de proteínas.....	44

2.7.4 Mapeo de la zona de interfase con Getcontacts.....	49
3. OBJETIVOS.....	49
3.1 OBJETIVO GENERAL.	49
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.	49
4. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN.....	50
5. HIPÓTESIS.	50
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	50
6.1 Análisis de balance de flujo (FBA).....	50
6.2 Análisis bioinformático de proteínas:.....	53
6.2.1 Estudio de las Icdh de <i>A. schindleri</i> ACE y <i>E. coli</i> a nivel de estructura primaria, secundaria y terciaria.	53
6.2.2 Mapeo de la zona de interfase.....	58
6.2.3 Estudio de las Icl de <i>A. schindleri</i> ACE y <i>E. coli</i> a nivel de estructura primaria, secundaria y terciaria.....	58
6.2.4 Estudio de las GlcB de <i>A. schindleri</i> ACE y <i>E. coli</i> a nivel de estructura primaria, secundaria y terciaria.....	63
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	68
7.1 Efecto de la delección <i>in silico</i> del gen <i>ackA</i> y <i>acs</i> en la simulación de flujos de carbono de <i>A. schindleri</i> ACE y <i>E. coli</i> JM101.....	68
7.1.1 <i>A. schindleri</i> ACE.	68
7.1.2 <i>E. coli</i> JM101.	71
7.2 Análisis de sensibilidad de la actividad de la enzima isocitrato deshidrogenasa e isocitrato liasa mediante FBA en <i>A. schindleri</i> ACE y <i>E. coli</i> JM101.....	74
7.2.1 Análisis de sensibilidad de flujos en <i>A. schindleri</i> ACE.	74
7.2.2 Análisis de sensibilidad de flujos en <i>E. coli</i> JM101.	76
7.3 Análisis de variabilidad de la actividad de las enzimas isocitrato deshidrogenasa e isocitrato liasa mediante FBA en <i>A. schindleri</i> ACE y <i>E. coli</i> JM101.....	78

7.3.1	Ánálisis de variabilidad de <i>A. schindleri</i> ACE.....	79
7.3.2	�n�alisis de variabilidad en <i>E. coli</i> JM101.....	80
7.4	Estructura de proteínas.....	82
7.4.1	Isocitrato deshidrogenasa (Icdh).....	82
7.4.2	Icdh-III.....	89
7.4.3	Isocitrato liasa (Icl).....	103
7.4.4	Malato sintasa G.....	117
7.5	Correlación entre análisis de FBA y estructura de proteínas.....	127
8.	CONCLUSIONES.....	128
9.	PERSPECTIVAS.....	129
10.	REFERENCIAS.....	130
11.	ANEXOS.....	140
11.1	Anexo I.....	140
11.2	Anexo II.....	141
11.3	Anexo III.....	142
11.4	Anexo IV.....	145
11.5	Anexo V.....	148
11.6	Anexo VI.....	149
11.7	AnexoVII.....	157
11.8	AnexoVIII.....	158

RESUMEN

En este trabajo de investigación se realizó un estudio *in silico* de la asimilación de acetato y el nodo del isocitrato entre *A. schindleri* ACE y *E. coli* a nivel de flujos de carbono y de estructura.

Respecto a los flujos de carbono, se emplearon análisis de balance de flujo metabólico (FBA), se deletaron *in silico* los genes *ackA* y *acs* en cada bacteria y se analizó la distribución de flujos así como la repercusión que las deleciones tienen sobre la velocidad específica de crecimiento. Se encontró que al deletar *ackA* en *A. schindleri* ACE la μ no cambia con respecto al control, pero cuando se elimina *acs* la μ disminuye un 24%. Por otra parte, con respecto a *E. coli*, al deletar *ackA* la bacteria es incapaz de crecer pero cuando se elimina *acs* la μ aumenta un 12%. Se realizaron también análisis de sensibilidad de flujo de las enzimas Icdh e Icl, así como análisis de variabilidad de flujo (FVA). Con estos se encontró que los flujos de Icdh e Icl en *A. schindleri* ACE son prácticamente el doble que los de *E. coli* JM101, y la μ es muy sensible a esos cambios de flujo. Finalmente, los flujos de la Icdh e Icl son poco flexibles en *A. schindleri* ACE (0.01 mmol/DCW/h) en comparación con los flujos de las Icdh (7.02 mmol/DCW/h) e Icl (5.96 mmol/DCW/h) de *E. coli* JM101 para lograr una μ máxima.

Por último, estructuralmente se estudiaron las enzimas Icdh, Icl y GlcB de ambas bacterias a nivel de estructura primaria, secundaria y terciaria. Se encontró que las enzimas Icdh e Icl tienen una conformación distinta entre ambas bacterias, lo que implicaría el tener actividades enzimáticas distintas. Así mismo, se observó que en las dos bacterias GlcB tiene una conformación similar.

Este trabajo contribuye a la comprensión de las posibles diferencias metabólicas entre *A. schindleri* ACE y *E. coli* cuando emplean acetato como única fuente de carbono.

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1: Datos cinéticos de *E. coli* JM101 y *A. schindleri* ACE (Sigala *et al.* 2019).

Tabla 2. Icdh-I e Icdh-III analizadas de 64 especies del género *Acinetobacter* y la secuencia de la Icdh de *E. coli*.

Tabla 3. Icl seleccionadas de 60 especies del género *Acinetobacter* y la secuencia de la Icl de *E. coli*.

Tabla 4: GlcB seleccionadas de 61 especies del género *Acinetobacter*, la secuencia de la GlcB de *E. coli*.

Tabla 5. Variabilidad de flujo de Icdh e Icl de *A. schindleri* ACE.

Tabla 6. Variabilidad de flujo de enzimas involucradas en el metabolismo central de carbono de *A. schindleri* ACE.

Tabla 7. Flexibilidad de la μ de *A. schindleri* ACE con respecto al intervalo de flujo de Icdh e Icl.

Tabla 8. Variabilidad de flujo de Icdh e Icl de *E. coli* JM101.

Tabla 9. Variabilidad de flujo de enzimas involucradas en el metabolismo central de carbono de *E. coli* JM101.

Tabla 10. Icdh-I e Icdh-III del género *Acinetobacter* y de *E. coli*.

Tabla 11. Conservación de los residuos de la zona de interfase de la Icdh-III del género *Acinetobacter* con respecto a los residuos de la zona de interfase de *A. baumannii*.

Tabla 12. GlcB resueltas y depositadas en el PDB con mayores % de identidad con respecto a la secuencia de *A. schindleri* ACE.

Tabla 13. Correlación entre flujos de Icdh, Icl y GlcB control de FBA con respecto a los datos obtenidos a nivel estructural.

Tabla 14. Bases de datos, servidores y herramientas empleadas en la metodología.

Tabla 15. 10 PDBs análogos a la enzima Icl identificados por I-TASSER con mayor parentesco.

Tabla 16: Datos de la eliminación de *ackA-pta* y *acs* en *A. schindleri* ACE mediante FBA.

Tabla 17. Datos de la eliminación de *ackA-pta* y *acs* en *E. coli* JM101 mediante FBA.

Tabla 18. Residuos de la zona de interfase de las subunidades A_B, A_C, A_D, B_C, B_D y C_D de 6G1O.pdb de *Pseudomonas aeruginosa* con respecto a la secuencia de la Icl de *A. schindleri* ACE.

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1: Ruta AckA-Pta.

Figura 2. Unidad de transcripción del operón *ackA-pta* (tomado de ecocyc).

Figura 3. Vías de activación de acetato y su vinculación con el metabolismo central (De Mets *et al.* 2019).

Figura 4. Regulación del operón *acs-yfcH-actP*. Las líneas verdes indican activación, las púrpuras indican inhibición, y las flechas amarillas indican transcripción (tomada de Ecocyc).

Figura 5. Rutas de producción y consumo de acetato en *E. coli* y *A. schindleri* ACE (Quiroz L, 2019).

Figura 6. Reacciones que conforman el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (CATC) y la ruta del glioxilato (RG) (Quiroz L, 2019).

Figura 7. Sitio de fosforilación de la enzima isocitrato deshidrogenasa de *E. coli*. A) Representación de la estructura completa de la enzima (Hurley *et al.* 1989), b) Estructura de la enzima (PDB: 3ICD); el sitio de fosforilación (serina 113) encuentra en amarillo con rojo.

Figura 8. Unidades de transcripción del gen *icd* de *E. coli* (tomado de Ecocyc).

Figura 9. Elementos de regulación del operón *aceBAK* de *E. coli* (tomado de Ecocyc); el gen *aceB* codifica la enzima malato sintasa A, el gen *aceA* codifica la enzima isocitrato liasa (Icl) y el gen *aceK* codifica la enzima isocitrato deshidrogenasa quinasa/fosfatasa.

Figura 10. Principales componentes y estructura de la lignocelulosa. A) Celulosa, b) hemicelulosa y c) Lignina (Isikgor & Becer, 2015).

Figura 11. Diagrama de flujo de la metodología del análisis de FBA para *E. coli* JM101 y *A. schindleri* ACE. * Se toman como flujos control los flujos para *E. coli* JM101 y *A. schindleri* ACE publicados por J. Sigala y colaboradores, 2019.

Figura 12. Diagrama de flujo de recopilación de secuencias Icdh-I e Icdh-III del género *Acinetobacter*.

Figura 13. Diagrama de flujo de recopilación de secuencias Icl género *Acinetobacter* y la Icl de *E. coli*.

Figura 14. Diagrama de flujo de la recopilación de secuencias GlcB del género *Acinetobacter* y la GlcB de *E. coli*.

Figura 15. Flujos metabólicos de *A. schindleri* ACE control (azul) y de la delección *in silico* de *ackA* (rojo). La condición control y *A. schindleri* ACE *acs*⁻ muestran que no hay cambios en los flujos. *A. schindleri* ACE *ackA*⁻ con respecto al control disminuye un 22%.

Figura 16. Flujos metabólicos de *E. coli* JM101 control (azul) y con delección *acs* (naranja). *E. coli* *acs*⁻ muestra un aumento de la μ del 12%, mientras que *E. coli* *ackA*⁻ es un gen esencial, pues al ser deletado se muestra una μ de 0.

Figura 17: Intervalo de flujos de carbono de Icl e Icdh y su efecto sobre la μ de *A. schindleri* ACE.

Figura 18: Influencia de la relación de flujos de Icdh/Icl sobre la μ de *A. schindleri* ACE.

Figura 19. Intervalo de flujos de carbono de Icl e Icdh y su efecto sobre la μ de *E. coli*.

Figura 20. Relación de flujos de Icdh/Icl vs μ del modelo metabólico de *E. coli*, al modular Icl.

Figura 21. Dendograma de Icdh-I (400 aa) del género *Acinetobacter* con respecto a la Icdh-I de *E. coli* (método de distancias medias).

Figura 22. Superposición de cadena A de 35 Icdh de *E. coli* visualizadas en VMD. Residuos con RMSF de 0-5 (amarillo), residuos con RMSF de 5 a 10 (azul) y residuos con RMSF entre 10 y 15 (verde). Se identifica en color rojo la serina-113 correspondiente al sitio de fosforilación mediado por AceK.

Figura 23. Diferencias entre ICDH-I de *E. coli* con ligando (1AI2.pdb) y una sin ligando (6ICD.pdb).

Figura 24. Conservación del sitio activo de las Icdh-I del género *Acinetobacter* tomando como referencia los residuos conocidos para la Icdh-I de *E. coli*.

Figura 25. Diferencias a nivel de secuencia de la ICDH-I del género *Acinetobacter* con respecto a la de *E. coli* (método de distancias medias).

Figura 26. Dendograma de Icdh-III del género *Acinetobacter* con respecto a la Icdh-I de *E. coli* (método de distancias medias).

Figura 27. Diferencias a nivel de secuencia de la Icdh-III del género *Acinetobacter* con respecto a la de *E. coli*.

Figura 28. Dendograma de las Icdh-I y III de bacterias del género *Acinetobacter* con respecto a la de *E. coli* (método de distancias medias).

Figura 28. Dendograma de las Icdh-I (rojo), Icdh-III (Verde) de bacterias del género *Acinetobacter* con respecto a la de *E. coli* (método de distancias medias). En azul se muestra la Icdh de *E. coli* y las Icdh-I del género *Acinetobacter* con las que tiene más cercanía evolutiva

Figura 29. Predicción de la estructura de la Icdh-III de *A. schindleri* ACE en I-TASSER y SWISS MODEL.

Figura 30. Interacciones de zona de interfase de las subunidades A B de la Icdh-III de *A. baumannii* comparadas con los residuos de Icdh-III de *A. schindleri* ACE. Los residuos del recuadro rojo son aquellos en los que difieren ambas proteínas.

Figura 31. Zona de interfase de la subunidad A y B de la estructura de Icdh-III de *A. baumannii* con respecto a la Icdh-III de *A. schindleri* ACE. En verde se observa la subunidad A, en amarillo la subunidad B, en rojo la zona de interfase que podrían compartir las Icdh-III de *A. schindleri* ACE y de *A. baumannii*, y en morado los residuos que no comparten ambas estructuras.

Figura 32. Predicción de Icdh-III de *A. schindleri* ACE en SWISS MODEL tomando como plantilla la estructura de la Icdh-III de *A. baumannii* (PDB: 5Z16). Los sitios en rojo corresponden a los residuos catalíticos de la proteína, en amarillo la subunidad A y en verde la subunidad B. Imagen visualizada en VMD.

Figura 33. Conservación de los residuos de la zona de interfase de la Icdh-III (740 aa) del género *Acinetobacter* con respecto a la Icdh-III de *A. baumannii*.

Figura 34. Conservación del sitio activo de las Icdh-III del género *Acinetobacter*.

Figura 35. Se muestra la estructura de la Icdh de ambas bacterias. **a)** Icdh de *A. schindleri* ACE (en verde se observa la subunidad A y en amarillo la subunidad B, los sitios catalíticos se observan en rojo). **b)** Idhc de *E. coli*: 1AI2.pdb (naranja) y en rojo se muestra el ion Ca^+ . **c)** Superposición de Icdh de *A. schindleri* ACE subunidad A (verde) con respecto a la Icdh de *E. coli* (naranja). Los iones se encuentran en azul, en rojo se encuentran los residuos del sitio activo de la Icdh de *E. coli* y en magenta los de la Icdh de *A. schindleri* ACE. **d)** El sitio de unión a sustrato se resalta en cian para *E. coli* y para *A. schindleri* ACE los residuos resaltados en rojo oscuro. **e)** El sitio de unión a NADP^+ para *A. schindleri* ACE se observa en morado y rosa para *E. coli*.

Figura 36. Dendograma de la Icl de *E. coli* y las Icl del género *Acinetobacter*.

Figura 37. Porción del alineamiento y conservación del sitio activo de Icl de *E. coli* y las Icl del género *Acinetobacter*.

Figura 38. Estructura de Icl de *Pseudomonas aeruginosa* (6G1O.pdb). **a)** Subunidad A (azul) subunidad B (blanco), subunidad C (verde), subunidad D (magenta). **b)** Subunidad A de Icl de *Pseudomonas aeruginosa*, en azul se observa la puntuación EDIA mayor a 0.8, en magenta los átomos que tienen una puntuación entre 0.4 y 0.8 y en rojo los que tienen una puntuación menor a 0.4.

Figura 39. Porción del alineamiento de las Icl de *Acinetobacter* tomando como referencia los residuos referentes a la catálisis de la Icl de *Pseudomonas aeruginosa*.

Figura 40. Porción del alineamiento de las Icl de *Acinetobacter* en el que se aprecia algunas de las diferencias respecto a la Icl de *Pseudomonas aeruginosa*.

Figura 41. Mapeo de zona de interfase de la Icl de *P. aeruginosa* (PDB: 6G1O) con respecto a la Icl de *A. schindleri* ACE.

Figura 42. Predicción de la Icl de *A. schindleri* ACE resaltando: **a)** los sitios catalíticos más importantes: residuo de unión a magnesio: aspartato 184 (rojo), sitio activo: cisteína 222

(naranja) y sitio de unión a sustrato: treonina (verde), y b) cada subunidad de la proteína con un color distinto: A (azul), B (rojo), C (cyan) y D (morado). Imágenes visualizadas en VMD.

Figura 43. Conservación de los residuos de la zona de interfase de la Icl de *Pseudomonas aeruginosa* con respecto a las Icl del género *Acinetobacter*.

Figura 44. a) Icl de *A. schindleri* ACE. se muestran sus cuatro subunidades y sitios catalíticos en esferas de colores b) Icl de *E. coli* se muestran sus cuatro subunidades y sitios de unión a ligando en amarillo. c) Superposición de la subunidad A de *E. coli* (verde), sitio activo (rojo) con respecto a la subunidad D de la Icdh de *A. schindleri* ACE (azul) y su sitio activo en naranja.

Figura 45. Dendograma de las GlcB del género *Acinetobacter* incluyendo la de *E. coli*.

Figura 46. Alineamiento y conservación del sitio activo de GlcB de *E. coli* y de las *Acinetobacter*.

Figura 47. Superposición de los PDB 1D8C, 1P7T, 1Y8B, 2JQX., 2GQ3, 5VFB de las GlcB de la Tabla 12. Se empleó el programa R y se visualizaron en VMD.

Figura 48. Valores de RMSF de los residuos de la superposición los PDB 1D8C, 1P7T, 1Y8B, 2JQX., 2GQ3, 5VFB de las GlcB de la Tabla 12.

Figura 49. Superposición de los 5 modelos generados de la GlcB de *A. schindleri* ACE en SWISS MODEL.

Figura 50. Superposición de los modelos de la estructura de la GlcB de *A. schindleri* ACE obtenidos en SWISS MODEL (azul) y en I-TASSER (amarillo).

Figura 51. Predicción de la GlcB de *A. schindleri* ACE resaltando los sitios de unión a Acetil Co-A (Rojo), sitio activo (Azul), sitio de unión a glioxilato (verde) y sitio de unión a magnesio (morado).

Figura 52. Superposición de la GlcB de *E. coli* (1P7T.pdb) contra el modelo de la GlcB de *A. schindleri* ACE, en rojo se observan los sitios catalíticos conservados.

Figura 53. Superposición de GlcB (rojo) con respecto a AceB (azul) de *E. coli*.

Figura 54. RMSF de la superposición de GlcB y AceB de *E. coli*.

Figura 55. Dendograma de GlcB de diferentes especies del género *Acinetobacter* y de *E. coli* con respecto a la AceB de *E. coli*.

Figura 56. Grafico de Ramachandran de la estructura de la Icdh predicha en SWISS MODEL obtenida de Saves V6.0.

Figura 57: Grafico de Ramachandran de la estructura de la Icl predicha en SWISS MODEL obtenida de Saves V6.0.

Figura 58: Grafico de Ramachandran de la estructura de la GlcB predicha en I- TASSER obtenida de Saves V6.0.

ABREVIATURAS

<i>A. schindleri</i> ACE	<i>Acinetobacter schindleri</i> ACE
<i>E. coli</i>	<i>Eschericia coli</i>
<i>E. coli</i> JM101	<i>Eschericia coli</i> JM101
<i>aceA</i>	gen que codifica la enzima isocitrato liasa
<i>acs</i>	gen que codifica la enzima acetil-CoA sintetasa
<i>ackA</i>	gen que codifica la enzima acetato quinasa
<i>Pps</i>	gen que codifica la enzima fosfoenol piruvato sintetasa
CATC	Ciclo de los ácidos tricarboxilicos
Acs	Enzima acetil-CoA sintetasa
Pta	Enzima fosfato acetiltransferasa
<i>ackA</i>	Enzima acetato quinasa
Acetil-CoA	Acetil coenzima A
NADH	Nicotin Adenin Dinucleotico
ATP	Adenosin trifosfato
acetil-F	Acetil fosfato
Icdh	Enzima Isocitrato deshidrogenasa
<i>icd</i>	gen que codifica la enzima isocitrato deshidrogenasa
Icl	Enzima isocitrato liasa

NOMENCLATURA

μ	Velocidad específica de crecimiento
$Y_{X/S}$	Rendimiento biomasa sustrato
q_{Ace}	Tasa específica de consumo de acetato
q_{O_2}	Tasa específica de consumo de oxígeno
q_{CO_2}	Tasa específica de consumo de dióxido de carbono
RQ	Cociente respiratorio
DCW	Dry cell weight (Peso de la célula seca)

1. INTRODUCCIÓN.

Algunos organismos en los diferentes dominios de la vida utilizan mecanismos de asimilación y excreción de acetato para equilibrar el flujo de carbono y electrones (Sigala *et al.* 2019); mientras que algunos lo utilizan como fuente primaria de carbono, otros lo pueden usar como fuente de carbono secundario o bien, lo generan como subproducto.

Acinetobacter schindleri ACE es una bacteria gram negativa que utiliza acetato como fuente de carbono primaria que induce una velocidad específica de crecimiento (μ) de 0.89 h^{-1} en presencia de 5.5 g/L de acetato de sodio (Sigala *et al.* 2017). Sin embargo, la bacteria en la que más se ha estudiado el metabolismo de acetato es *Escherichia coli* debido a su participación en distintos procesos como la motilidad, formación de biopelículas, sobreflujo metabólico, respuestas al estrés y fisiopatología (Sigala *et al.* 2019; Bernal, Castaño-Cerezo y Cánovas 2016; El-Mansi *et al.* 2006).

El nicho natural de las enterobacterias es el intestino, ahí se encuentran presentes acetato y otros ácidos grasos de cadena corta que participan en la colonización y mantenimiento de las poblaciones microbianas, además de modular las respuestas fisiopatológicas de *E. coli* y otras bacterias (Bernal, Castaño-Cerezo y Cánovas 2016).

A pesar de que el acetato es una de las fuentes de carbono biodisponible en el nicho natural de *E. coli*, esta enterobacteria presenta un fenómeno llamado represión catabólica del carbono (RCC) donde al tener varias fuentes de carbono disponibles, utiliza la glucosa preferencialmente reprimiendo la absorción de otros sustratos por medio de mecanismos de regulación génica globales y específicos. Hasta que la glucosa se agota comienza a activar la maquinaria celular para catabolizar de manera jerárquica las demás fuentes de carbono que tiene biodisponibles (Aidelberg *et al.* 2014). Con glucosa como sustrato *E. coli* JM101 crece a una μ de 0.70 h^{-1} , mientras que con acetato como único sustrato tiene una μ de 0.28 h^{-1} (Sigala *et al.* 2009).

Por su parte, *A. schindleri* ACE no es capaz de utilizar pentosas ni hexosas, pero crece con acetato como única fuente de carbono a altas velocidades (Sigala *et al.* 2017). Lo anterior evidencia posibles diferencias genéticas y de regulación entre ambos grupos de bacterias al metabolizar acetato.

Recientemente, en nuestro grupo de trabajo se realizó un estudio de comparación fisiológica y transcripcional del catabolismo de acetato entre *A. schindleri* ACE y *E. coli* JM101, en el cual se demuestra que la ruta preferencial de *A. schindleri* ACE para asimilar acetato es la de dos pasos AckA-Pta, de modo contrario a *E. coli* JM101 que prefiere la ruta mediada por Acs. Además, se observa una sobreexpresión de los genes de la ruta del glioxilato (*aceA* y *glcB*) en *A. schindleri* ACE respecto a *E. coli* JM101 (Sigala *et al.* 2019). A partir de dichas observaciones surge la necesidad de entender el por qué ocurre eso en *A. schindleri* ACE, cuáles pueden ser las diferencias en la regulación genética y estructural de las enzimas involucradas en el nodo del isocitrato, así como en las de asimilación del acetato.

Por tal razón, en el presente proyecto se estudia el metabolismo de acetato en *A. schindleri* ACE de manera comparativa con *E. coli* JM101 a nivel bioinformático, realizando un análisis de flujos metabólicos (FBA) con modelos metabólicos reducidos de ambas cepas. Con estos modelos se observará el efecto de deleciones *in silico* de los genes *ackA* y *acs* sobre los flujos del metabolismo central de carbono. También se llevará a cabo una modulación de los flujos de las enzimas isocitrato deshidrogenasa (Icdh) e isocitrato liasa (Icl) bajo distintas condiciones. Por otra parte, se caracterizarán las propiedades estructurales relacionadas con la función biológica de las enzimas Icdh, Icl y malato sintasa G (GlcB) de *A. schindleri* ACE y de *E. coli* utilizando diversos análisis a nivel de estructura primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria de las proteínas. Debido a que las estructuras de las proteínas de *A. schindleri* ACE no se encuentran resueltas, se realizará una predicción de su estructura terciaria o cuaternaria para la identificación de motivos y dominios importantes para su función.

Finalmente, es importante destacar que la comprensión del metabolismo de acetato tiene gran relevancia al menos en dos áreas:

1. Mitigación del sobreflujo metabólico en los cultivos de alta densidad celular de *E. coli*.
2. Detoxificación de acetato de hidrolizados de biomasa lignocelulósica (Irmak, S. 2017).

2. MARCO TEÓRICO.

2.1 Género *Acinetobacter*.

El género *Acinetobacter* pertenece al orden *Pseudomonadales* y comprende bacterias Gram negativas estrictamente aeróbicas no fermentativas que pueden crecer a una amplia gama de temperaturas (20-42°C). Son saprófitos ubicuos, comunes y de vida libre; se encuentran en diferentes hábitats, incluidos el agua, suelo y piel humana (Sigala *et al.* 2017; Towner 2006).

Estos microorganismos pueden utilizar como fuente de carbono una variedad de compuestos entre los que se encuentran ácidos orgánicos, compuestos fenólicos, alcoholes alifáticos, algunos aminoácidos, ácidos grasos, hidrocarburos no ramificados, y relativamente pocas cepas pueden usar glucosa. Dicha diversidad metabólica hace que los miembros del género *Acinetobacter* sean adecuados para estudiar una variedad de vías metabólicas inusuales (Towner 2006).

2.2 *Acinetobacter schindleri* ACE como cepa de estudio.

A. schindleri ACE fue aislada en el laboratorio de nuestro grupo de trabajo como contaminante de una mutante de *E. coli* PB12 *maeB::loxP* cultivada en medio mineral M9 con acetato como fuente de carbono y 30 µg/mL de kanamicina, tiene un solo cromosoma circular de 3,001,209 pb, seis plásmidos de diferentes tamaños. Contiene 3,021 genes, 27 pseudogenes, 21 rRNA y 85 tRNA (Sigala *et al.* 2017). Puede catabolizar sustratos gluconeogénicos como acetato, succinato y lactato, además tiene genes que codifican para el transporte y degradación de ácidos grasos. Sin embargo, no puede metabolizar glucosa, ya que carece de genes *edd* y *eda* de la ruta Entner-Duodoroff, así como genes que codifican para enzimas glucolíticas tales como la glucocinasa, 6-fosfofructocinasa (PfkA), piruvato cinasa (Pyk), además del sistema fosfotransferasa (PTS). También carece de los genes *gnd* y *zwf* de la parte oxidativa de la vía de las pentosas fosfato, por lo que no puede utilizar compuestos aromáticos y no es capaz de crecer en fuentes de carbono comunes como la glucosa, xilosa, glicerol o citrato (Sigala *et al.* 2017).

A. schindleri ACE crece a una μ de 0.89 h⁻¹ en medio mineral con acetato como única fuente de carbono (Sigala *et al.* 2017). Tiene al menos un transportador de acetato que es homólogo al gen *actP* de *E. coli* (AsACE_CH00168). Una vez dentro de la célula, el acetato se transforma en acetil-CoA; esta reacción se puede llevar a cabo por un paso y esta mediada

por Acs o bien, en dos pasos por la vía AckA-Pta, teniendo como intermediario al acetil fosfato (Ac-P) (Sigala *et al.* 2017; Sigala *et al.* 2019). Por otra parte, *aceA* que codifica la enzima isocitrato liasa y el gen *glcB* que codifica la malato sintasa G se transcriben de forma independiente y no en un operón como ocurre en *E. coli* (Sigala *et al.* 2017; 2019).

2.3 *E. coli* como cepa de referencia.

E. coli es una enterobacteria gram negativa con forma de bastón, es aerobia facultativa, por lo tanto, puede activar o reprimir las enzimas metabólicas requeridas dependiendo de los niveles de oxígeno. Su genoma completo contiene una sola molécula circular dúplex compuesta por 4,639,221 pb. Las regiones codificadoras de proteínas corresponden al 87.8% del genoma, mientras que el 0.8 % codifica ARN estables y el 0.7 % consiste en repeticiones no codificantes, el 11 % restante codifica para funciones reguladoras, entre otras. Además, el flujo de carbono está estrictamente regulado por redes reguladoras sofisticadas (Idalia, V. & Bernardo, F. 2017). Varias cepas de *E. coli* con diferentes genotipos se usan como sistemas de expresión para la producción de diversas proteínas recombinantes debido a que se conoce su genoma completo, es de fácil manipulación genética y se ha estudiado mucho su fisiología y metabolismo (Lara 2011). Aunado a ello, se pueden obtener cultivos de alta densidad celular y, en consecuencia, alta concentración de producto utilizando glucosa como sustrato principal (Shiloach *et al.* 1996). *E. coli* JM101 puede utilizar sustratos acetogénicos o gluconeogénicos, alcanza una μ de 0.7 h^{-1} en medio mineral con glucosa como única fuente de carbono (Flores *et al.* 2005), mientras que cuando se cultiva con acetato como única fuente de carbono sólo alcanza una μ de 0.33 h^{-1} (Sigala *et al.* 2019).

2.4 Metabolismo de acetato en *A. schindleri* ACE y *E. coli*.

2.4.1 Transporte de acetato a través de la membrana celular.

El acetato es un ácido lipofílico que permea la membrana celular en sus formas aniónicas y neutras. Sin embargo, se han identificado dos transportadores de membrana de acetato en *E. coli*:

1.- Una acetato permeasa (ActP) codificada por el gen *actP* (anteriormente *yjch*) que pertenece a la familia de transportadores de sodio y es altamente específica para los compuestos con cadenas cortas de carbono como acetato, glicolato y propionato (Sá-Pessoa *et al.* 2013). Se ha encontrado como un dímero localizado en la membrana interna (Stenberg

et al. 2005). Además, se ha reportado que tiene una constante de afinidad (K_m) de $5.4 \mu\text{M}$ para acetato y una velocidad máxima (V_{max}) de $19.6 \text{ nmol/min/mg enzima}$ (Gimenez *et al.* 2003).

2.- La proteína simporter de succinato-acetato/protón (SatP) codificada por el gen *satP* (antes *YaaH*) se comporta como un transportador secundario dependiente de la fuerza protón motriz, y está involucrada en el transporte de acetato y del succinato. Se ha reportado con constantes de afinidad a pH 6.0 de $1.24 \pm 0.13 \text{ mM}$ para el ácido acético y $1.18 \pm 0.10 \text{ mM}$ para ácido succínico (Sá-Pessoa *et al.* 2013).

Se sugiere también que el transporte transmembrana facilitado es el principal mecanismo de absorción de acetato en *E. coli* (Bernal, Castaño-Cerezo y Cánovas 2016).

En el caso de *A. schindleri* ACE, se ha reportado que dicha bacteria cuenta con al menos un transportador de acetato que es homólogo al gen *actP* de *E. coli* (AsACE_CH00168). Al analizar el nivel de expresión de *actP* y *AsACE* no se observaron diferencias entre las cepas *A. schindleri* ACE y *E. coli* JM101; no obstante, *A. schindleri* ACE consumió acetato un 44% más rápido en comparación con *E. coli* JM101 (Sigala *et al.* 2019). Además, se sabe que en *E. coli*, *actP* se cotranscribe con *acs*; contrario a *A. schindleri* ACE donde ambos genes se encuentran en diferentes posiciones del genoma (Sigala *et al.* 2019).

Una vez dentro de la célula, el acetato se activa en forma de acetil-coA y existen dos rutas para tal efecto. Ambas rutas están presentes tanto en *E. coli* como en *A. schindleri* ACE (Sigala *et al.* 2019). Una de las rutas se da en dos pasos, AckA-Pta (*ackA-pta*), y la otra ruta se da en un paso y está mediada por la enzima Acs. Ambas son dependientes de ATP, lo que implica gasto energético en las células al comenzar el catabolismo de acetato (Valgepea *et al.* 2010).

2.4.2 Ruta AckA-Pta.

En *E. coli* la ruta AckA-Pta bajo condiciones aerobias es reversible, es decir, funciona tanto para la producción como para el consumo de acetato. La dirección del flujo de carbono está regulada termodinámicamente y depende de la concentración celular de este metabolito (Enjalbert *et al.* 2017). Esta ruta es de alta afinidad con una K_m de 7-10 mM (Enjalbert *et al.* 2017). Una reacción es catalizada por la enzima acetato cinasa codificada por el gen *ackA*, y

utiliza como cofactor Mg^{2+} . La otra reacción es catalizada por la enzima fosfato-acetil transferasa codificada por el gen *pta* (Fig. 1).



Figura 1: Ruta AckA-Pta.

Los genes *pta/ackA* forman parte de un operón que se expresa constitutivamente (Castaño-Cerezo *et al.* 2009) y está regulado transcripcionalmente de forma positiva por Fnr, ArcA y CreB. Sus promotores son *ackAp* y *ptap*; *ackA* se encuentra regulado por un ARN pequeño SdhX que inhibe la traducción de ARNm (Fig 2). Se ha reportado que SdhX ajusta el flujo de carbono al regular negativamente los niveles de acetato cinasa y juega un papel importante en el proceso de vincular la expresión de los genes del ciclo de los ácidos tricarbónicos con la regulación del metabolismo de acetato, mejorando el crecimiento de *E. coli* en acetato (De Mets *et al.* 2019).



Figura 2. Unidad de transcripción del operón *ackA-pta* (tomado de ecocyc).

El intermediario acetil-fosfato (Ac-P) es rico en energía y puede actuar como señal global en procesos como la regulación de la división celular, la formación de biopelículas, así como su relación con ciertos procesos patogénicos (El-Mansi *et al.* 2006).

Por su parte, la enzima acetil-transferasa actúa como un sensor para la concentración intracelular de CoA-SH, y en *E. coli* regula algunos procesos celulares por fosforilación o acetilación de proteínas y otras moléculas (Enjalbert *et al.* 2017); se sabe que el acetil-CoA puede influenciar la regulación de casi 100 genes (Valgepea *et al.* 2010).

El acetato puede ser excretado de las células de *E. coli* durante un proceso llamado desbordamiento de acetato que involucra estas dos enzimas Pta y AckA, mismas que están conectadas con el metabolismo central (De Mets *et al.* 2019). Durante la fase de crecimiento exponencial, el acetil-CoA que proviene del piruvato (producto de la glicólisis) puede

convertirse en acetyl fosfato por Pta y luego en acetato por AckA (Fig. 3) (De Mets *et al.* 2019).

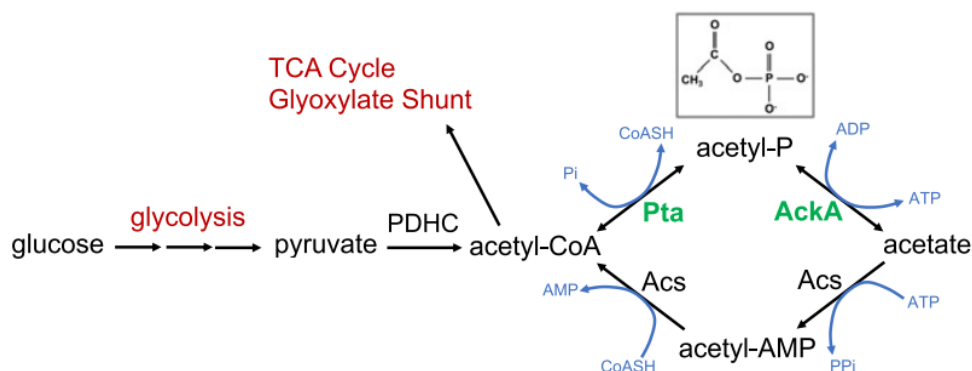


Figura 3. Vías de activación de acetato y su vinculación con el metabolismo central (De Mets *et al.* 2019).

En dirección contraria, *E. coli* usa la vía AckA-Pta que resulta en la síntesis de acetyl-CoA a partir de acetato. Esta vía generalmente se activa cuando hay altas concentraciones de acetato extracelular (≥ 8 mM) (De Mets *et al.* 2019). Sin embargo, cuando las células se encuentran en fase estacionaria, con baja concentración de oxígeno disuelto se activa la vía Acs que es irreversible y de alta afinidad cuando el carbono es limitante (De Mets *et al.* 2019; Sigala *et al.* 2017).

Además de la vía Pta-AckA de generación de acetato en *E. coli*, se ha reportado otra vía mediada por la enzima piruvato oxidasa codificada por el gen *poxB*. Esta enzima lleva a cabo la descarboxilación oxidativa de piruvato a acetato generando CO_2 (Enjalbert *et al.* 2017), jugando un papel importante en la eficiencia del crecimiento de *E. coli* al mantener la reserva de CoA-SH aunque no es esencial en el inicio durante la fase estacionaria (Dittrich, Bennett y San 2005).

Por su parte, aunque *A. schindleri* ACE también tiene los genes *ackA-pta* y *acs*, no se ha reportado que sea capaz de generar acetato ya que no cataboliza glucosa. En principio, podría utilizar ambas vías para catabolizar acetato, pero se observó además que *acs* estaba altamente subexpresado en *A. schindleri* ACE en comparación con *E. coli* JM101, en contraste con los genes *ackA* y *pta* que se sobreexpresaron (Sigala *et al.* 2019).

2.4.3 Ruta Acs.

En la otra ruta por la cual el acetato es activado está involucrada la enzima acetil-CoA sintetasa codificada por el gen *acs*. Esta es una enzima de alta afinidad utilizada para eliminar pequeñas concentraciones de acetato, <10 mM al agotarse la fuente principal de carbono (glucosa) (Bernal *et al.* 2016). La reacción que cataliza es irreversible, se produce como metabolito intermedio acetil-AMP, utiliza Mg^{2+} como cofactor y su pH óptimo es 8.5 (Valgepea *et al.* 2010; Uniprot) y se muestra en la ecuación 1.



Se ha reportado una K_m de acetato para la Acs de *E. coli* de 200 μM (0.2 mM) (Valgepea *et al.* 2010), tiene una función principalmente catabólica y su expresión está vinculada a la vía de derivación de AckA-Pta y glioxilato (Bernal *et al.* 2016). La expresión del gen *acs* se encuentra muy regulada en *E. coli*; este gen forma parte del operón *acs-yjcH-actP* (Fig.4). Como se mencionó antes, el gen *actP* codifica un transportador de membrana de acetato, mientras que la función de la proteína codificada por *yjcH* sigue siendo desconocida (Bernal *et al.* 2016).

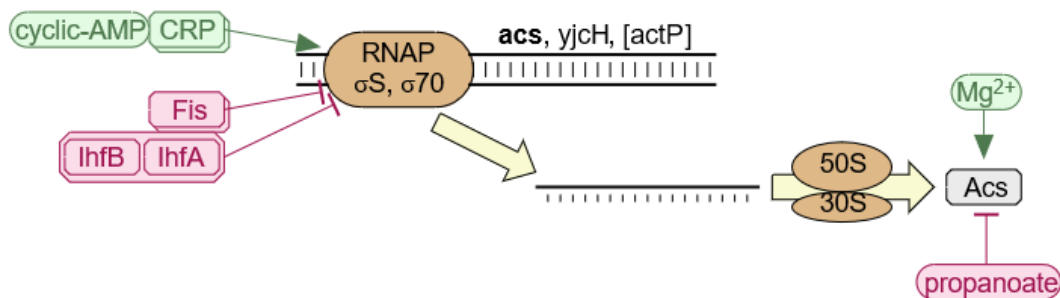


Figura 4. Regulación del operón *acs-yjcH-actP*. Las líneas verdes indican activación, las púrpuras indican inhibición, y las flechas amarillas indican transcripción (tomada de Ecocyc).

El operón está regulado por la limitación de carbono y oxígeno, así como el aumento del flujo a través de las vías asociadas al acetato y durante su crecimiento en acetato (Bernal, Castaño-Cerezo y Cánovas 2016). La transcripción depende de σ^{70} y está reprimida por σ^S ; además está regulado positivamente por CRP-AMPC, negativamente por las proteínas nucleoides Fis e IHF-B e IHF-A (Bernal *et al.* 2016), y opera en ausencia (o limitación) de azúcares (Bernal, Castaño-Cerezo y Cánovas 2016). La expresión de este gen está ligada a

la ruta AckA-Pta y a la ruta del glioxilato (RG), y está regulada directamente por represión catabólica. La transcripción del operón se activa en *E. coli* durante la fase de crecimiento estacionaria para habilitarla a utilizar acetato como fuente de carbono (Castaño-Cerezo *et al.* 2009).

El AMPc está vinculado a la represión catabólica, donde *E. coli* consume preferencialmente glucosa antes de metabolizar otros sustratos gluconeogénicos. En exceso de glucosa, el nivel de AMPc es bajo debido a que la adenilato ciclasa se encuentra inhibida y CRP inactiva (Enjalbert *et al.* 2017). Por el contrario, en ausencia de glucosa se produce gradualmente más AMPc, mismo que se puede unir a CRP, permitiendo así la expresión de genes y operones involucrados en el catabolismo de fuentes de carbono alternativas de glucosa (como el operón *acs-yfcH-actP*), genes del ciclo de los ácidos tricarbónicos, otros genes gluconeogénicos e incluso genes involucrados en el sistema PTS (Valpea *et al.* 2010).

A pesar de que el gen *acs* se encuentra presente en *A. schindleri* ACE, éste se encuentra altamente subexpresado en comparación con el de *E. coli* JM101 (Sigala *et al.* 2019). Esto pudiera deberse a distintos factores, la regulación de estos genes es distinta en ambas bacterias, comenzando con que en *A. schindleri* ACE los genes no se encuentran cotranscritos como en el operón de *E. coli* (*acs-yfcH-actP*), se encuentran en diferentes posiciones del genoma (Sigala *et al.* 2019), y por lo tanto su regulación es distinta. A nivel bioquímico resultaría también interesante comparar los valores de K_m de acetato de Acs presente en *A. schindleri* ACE.

Las vías de síntesis y excreción de acetato antes descritas se muestran en la Figura 5.

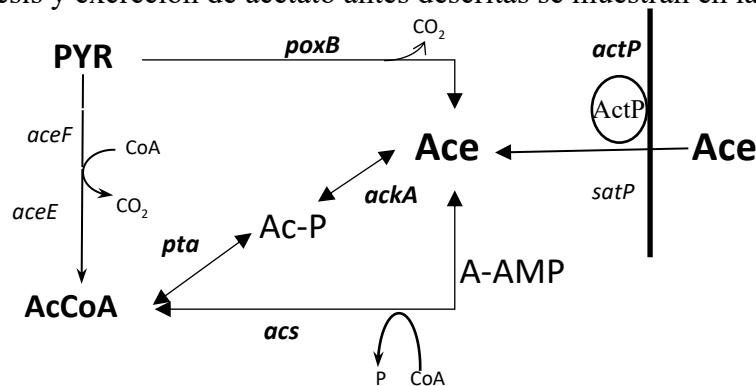


Figura 5. Rutas de producción y consumo de acetato en *E. coli* y *A. schindleri* ACE (Quiroz L, 2019).

2.4.4 Ciclo de los ácidos tricarbónicos y ruta del glioxilato (nodo del isocitrato).

Cuando el acetato entra a la célula sigue el proceso de oxidación hasta dióxido de carbono y agua ($C_2H_4O_2 + 2O_2 \rightarrow 2 CO_2 + H_2O$). El ciclo de los ácidos tricarbónicos inicia con la condensación de acetil-CoA y el oxaloacetato (OAA). El acetil-CoA es una molécula que conecta el metabolismo de acetato, glucólisis y ciclo de los ácidos tricarbónicos (CATC) (Fig. 6) sus funciones principales son generar poder reductor en forma de NADPH para procesos anabólicos, y en forma de NADH para la obtención de energía por el proceso de fosforilación oxidativa (Quiroz L, 2019).

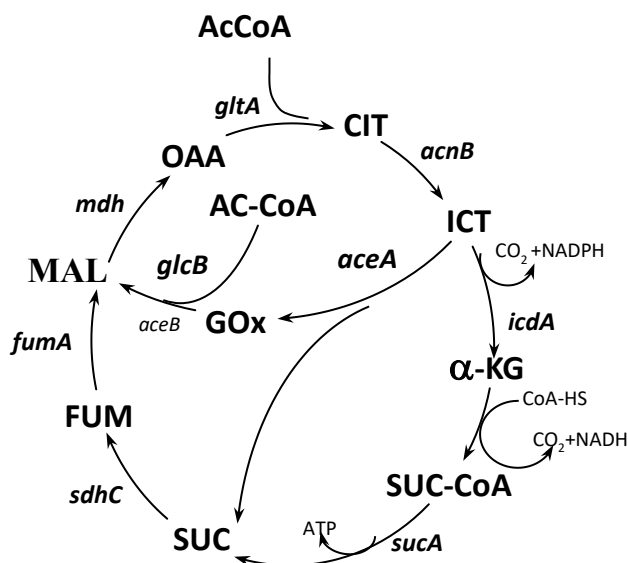


Figura 6. Reacciones que conforman el ciclo de los ácidos tricarbónicos (CATC) y la ruta del glioxilato (RG) (Quiroz L, 2019).

El CATC consta de 8 reacciones, pero hay un punto en el que bajo determinadas condiciones se da la bifurcación entre CATC y la RG a partir del isocitrato. El isocitrato puede continuar en el CATC y biotransformarse en α -cetoglutarato (α -KG) por acción de la enzima Icdh codificada por el gen *icd*. La reacción se muestra en la ecuación 2 y utiliza Mg^{2+} como cofactor:



En *E. coli* la enzima Icdh está regulada por fosforilación/desfosforilación mediada por el regulador AceK que se transcribe a partir del operón aceBAK que codifica las enzimas de la ruta del glioxilato; la modulación de esta actividad enzimática le permite modular cambios rápidos entre CATC y la RG (Walsh, K., & Koshland, D. E., Jr 1985). Para que la enzima esté activa debe estar desfosforilada; se ha demostrado que la fosforilación/inactivación de esta enzima es un requisito para que *E. coli* crezca en acetato (El-Mansi *et al.* 2006). El sitio de fosforilación se encuentra en la serina 113 al final de la hélice d (Fig.7a) (Hurley *et al.* 1989). En la figura 7b se muestra dicha serina 113 resaltada en amarillo con rojo.

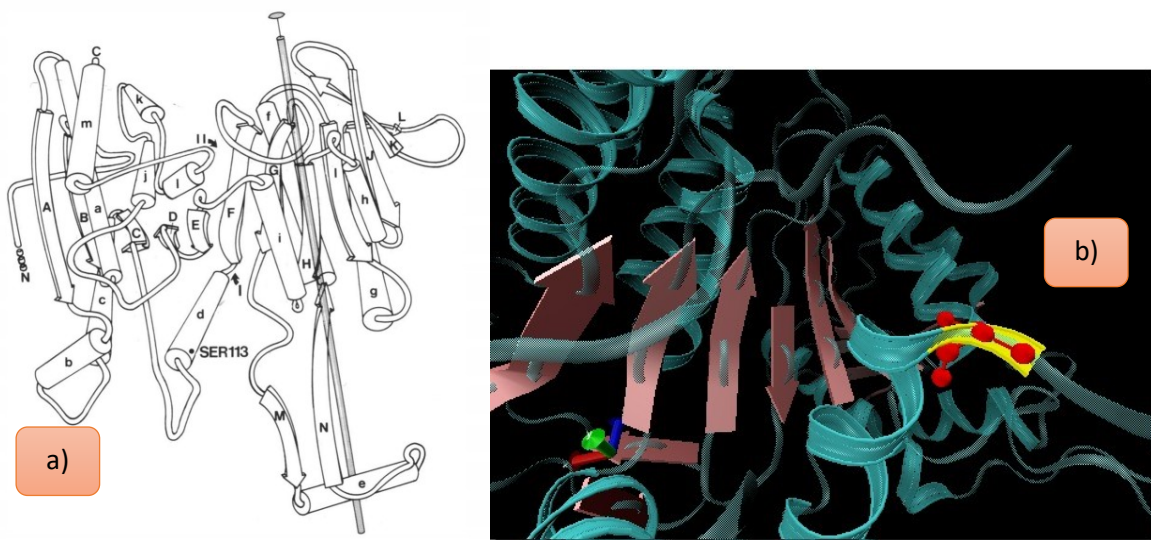


Figura 7. Sitio de fosforilación de la enzima isocitrato deshidrogenasa de *E. coli*. A) Representación de la estructura completa de la enzima (Hurley *et al.* 1989), b) Estructura de la enzima (PDB: 3ICD); el sitio de fosforilación (serina 113) encuentra en amarillo con rojo.

Otro aspecto que incide en la actividad de la enzima Icdh es que muestra inhibición alostérica por fosfoenolpiruvato (Ogawa *et al.* 2007). Se ha sugerido que el flujo a través de Icdh es esencial para que pueda operar el switch de acetato y su catabolismo (El-Mansi *et al.* 2006; Quiroz 2019). En la Figura 8 se observan las unidades de transcripción del gen *icd*, CRA es un regulador dual de unión a DNA y regula de forma positiva la transcripción del gen *icd*, además de que activa el inicio de la transcripción del operón *aceBAK* (El-Mansi *et al.* 2006).

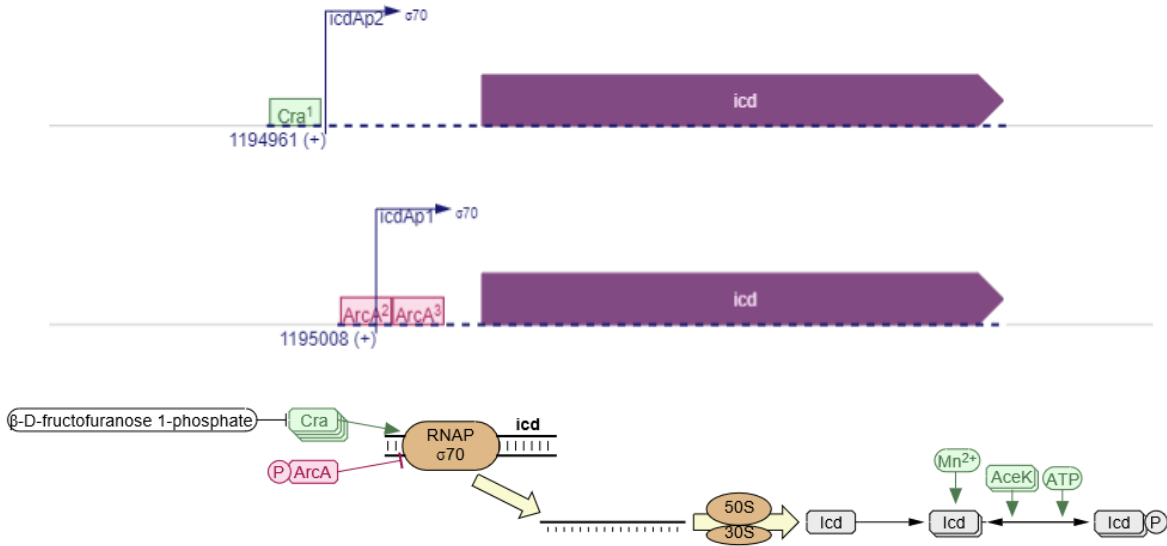


Figura 8. Unidades de transcripción del gen *icd* de *E. coli* (tomado de Ecocyc).

En *E. coli* el operón *aceBAK* (Fig. 9) incluye el gen *aceB* que codifica la enzima malato sintasa A, *aceA* que codifica la isocitrato liasa y *aceK* que codifica la enzima isocitrato deshidrogenasa quinasa/fosfatasa. ArcA controla la expresión de algunos genes del metabolismo central de carbono, incluyendo el CATC (Perrenoud y Sauer 2005). Ambos reguladores ArcA y ArcB forman parte de un sistema de transducción de señales de dos componentes que regula la expresión de genes en respuesta a condiciones oxido reducción (Perrenoud y Sauer 2005). El operón *aceBAK* está regulado transcripcionalmente por IclR y FadR.

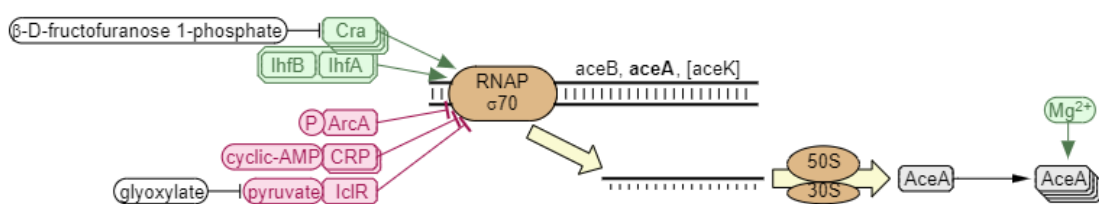


Figura 9. Elementos de regulación del operón *aceBAK* de *E. coli* (tomado de Ecocyc); el gen *aceB* codifica la enzima malato sintasa A, el gen *aceA* codifica la enzima isocitrato liasa (Icl) y el gen *aceK* codifica la enzima isocitrato deshidrogenasa quinasa/fosfatasa.

La enzima Icl codificada por el gen *aceA* cataliza la formación reversible de succinato y glioxalato a partir de isocitrato (Isocitrato \rightarrow Succinato + Glioxilato) y es una reacción que

utiliza Mg^{2+} como cofactor. La isocitrato liasa y la malato sintasa A participan en la RG para producir malato a partir de dos moléculas de acetil-CoA. Esta ruta hace uso de 6 de las 8 reacciones del CATC y es necesaria durante el crecimiento de acetato para poder generar biomasa y evitar dos descarboxilaciones del CATC. Por lo tanto, en exceso de glucosa esta inactiva la RG (Kim *et al.* 2012) pero cuando se empleó acetato como único sustrato la actividad de Icl se vio ampliamente favorecida (Quiroz, 2019; Kornberg 1966).

Las enzimas Icl e Icdh compiten por su sustrato común (el isocitrato). Por lo tanto, el nodo del isocitrato es un punto de regulación importante para el metabolismo de carbono (Castaño-Cerezo *et al.* 2014; Sigala *et al.* 2019). Hasta ahora se sabe que *A. schindleri* ACE no tiene en su genoma el gen de la isocitrato deshidrogenasa quinasa/fosfatasa (*aceK*), por lo que la Icdh no se regula por fosforilación. Además, las enzimas de la RG no se encuentran en un operón como en *E. coli*. En *E. coli* además de la malato sintasa A codificada por el gen *aceB* también se encuentra el gen *glcB* que codifica la malato sintasa G. Por su parte, *A. schindleri* ACE sólo cuenta con el gen *glcB* que codifica la malato sintasa G, es decir, no tiene el gen *aceB* que codifica la malato sintasa A.

En la comparación transcripcional que se realizó entre *A. schindleri* ACE y *E. coli* JM101 se observó que los genes de la ruta del glioxilato se sobreexpresaron en *A. schindleri* ACE, mientras que los niveles de transcripción de *icd* y *sucA* se mantuvieron igual, aunque hubo mayor flujo de carbono a través de RG y CATC en *A. schindleri* ACE (Sigala *et al.* 2019).

2.4.5 Sobreflujo metabólico y su mitigación

El sobreflujo metabólico también conocido como desbordamiento de acetato ocurre cuando *E. coli* crece en condiciones aerobias y exceso de glucosa. Este fenómeno se presenta cuando el CATC se limita por lo que el acetil-CoA se acumula y se excreta como acetato, lo que permite la generación de CoASH aunque no está claro cómo funciona la regulación (Castaño-Cerezo *et al.* 2009). La generación de acetato en cultivos de *E. coli* se ha considerado un problema biotecnológico ya que disminuye la productividad, el rendimiento biomasa/sustrato así como el rendimiento biomasa producto. Como ya se mencionó, ésta es la bacteria más estudiada y se utiliza como fábrica celular para generar productos de interés en el área farmacéutica, alimentaria, textil y ambiental. Por lo general se utilizan altas concentraciones

de glucosa como sustrato (en condiciones aerobias), lo que deriva en altas concentraciones de acetato (Shojaosadati *et al.* 2008; Shiloach *et al.* 1966; Lara 2011).

El ácido acético ($pK_a = 4.8$) es un metabolito indeseable en los cultivos de *E. coli*, ya que al ser un ácido orgánico lipófilo se impregna fácilmente en la membrana, desacoplando el gradiente de protones transmembranal. Cuando atraviesa la célula se disocia en el ión acetato y un H^+ , el protón acidifica el citoplasma y el anión aumenta la presión osmótica (Wolfe 2005) y dependiendo de la cepa se inhibe la formación de proteína a concentraciones que varían de 5 a 10 g/L (Eiteman & Altman 2006; Wolfe 2005). Además, representa un desperdicio de esqueletos de carbono que podrían destinarse a la generación del producto de interés (Eiteman & Altman 2006; Wolfe 2005; De Mey *et al.* 2007). Se han propuesto diversas estrategias para disminuir la generación o presencia de acetato en los cultivos de alta densidad celular, éstas pueden agruparse en dos: a nivel genético y a nivel de bioproceso (Eiteman & Altman 2006; De Mey *et al.* 2007). Las modificaciones genéticas se centran en la comprensión del metabolismo central y en cómo mediante su regulación se puede lograr disminuir la producción de acetato. Por ejemplo, se ha interrumpido el sistema fosfotransferasa para la captación de glucosa, aunque repercute negativamente en la tasa de crecimiento específico (De Mey *et al.* 2007); también se ha probado inactivar las vías de síntesis de acetato, aumentar el flujo de carbono hacia el CATC modificando su regulación o sobreexpresando algunas enzimas (De Mey *et al.* 2007).

Otros ejemplos puntuales son:

- Sobreexpresión de sRNA (*sgrS*), disminuyendo la producción de acetato en cepas de *E. coli* K12 (JM101 y MG1655), debido a que *sgrS* interactúa con el mRNA del gen *ptsG* disminuyendo su traducción y por lo tanto el transporte de glucosa (Negrete *et al.* 2013).
- Sobreexpresión de una enzima piruvato carboxilasa heteróloga (*Pyc*) que cataliza la conversión de piruvato en oxalacetato de forma directa, lo que disminuye hasta un 80% la acumulación de acetato a una velocidad específica de crecimiento de 0.4 h^{-1} en la cepa *poxB-pyc* (Vemuri *et al.* 2005).

- Aumento de la eficiencia del metabolismo aeróbico por la expresión de la hemoglobina de *Vitreoscilla stercoraria* (VHb) debido a que aumenta el consumo de NADH en la cadena respiratoria lo que conduce a una mayor actividad en el CATC (Pablos *et al.* 2014).

Estas estrategias reflejan la necesidad de seguir generando conocimiento sobre las vías catabólicas de acetato y su regulación.

Por otro lado, las otras estrategias utilizadas para mitigar el sobreflujo metabólico en cultivos de alta densidad celular de *E. coli* se centra directamente en los bioprocesos y comprenden la modificación del medio y/o las condiciones de operación del cultivo. Por ejemplo, la modificación de temperatura, régimen de agitación, tensión de oxígeno disuelto, pH, incluso modificar la concentración del sustrato limitante (Eiteman & Altman 2006; Wolfe 2005; De Mey *et al.* 2007).

2.5 Detoxificación de acetato en residuos de biomasa lignocelulósica.

La biomasa lignocelulósica es muy abundante y biorenovable en la tierra (Isikgor & Becer, 2015). A partir de ella se pueden producir una amplia gama de productos de valor agregado, incluidos biocombustibles (como el etanol, hidrógeno, etc), diversos bioproductos como proteína recombinante e incluso productos químicos de importancia industrial (Irmak, S. 2017). La biomasa lignocelulósica está constituida principalmente por celulosa, hemicelulosa y lignina, además también puede contener en pequeñas cantidades grupos acetilo, minerales y sustituyentes fenólicos (Harris, 2012 & Isikgor y Becer, 2015) (Fig. 10).

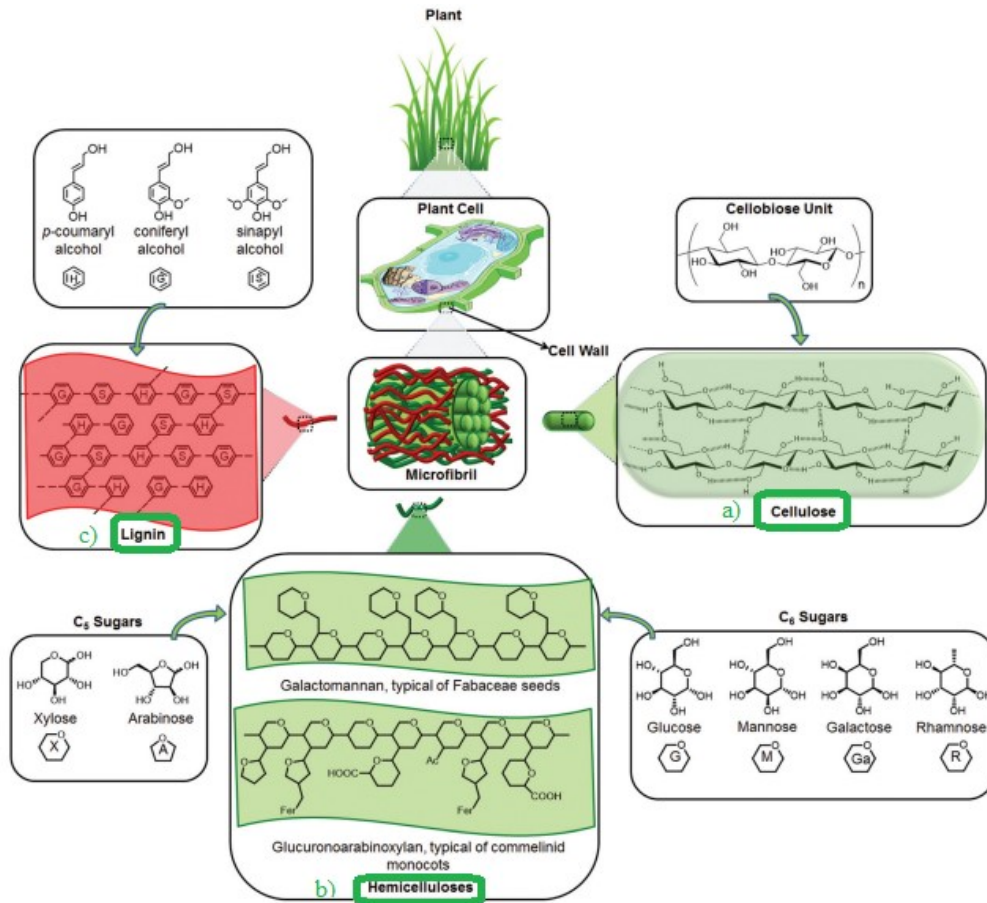


Figura 10. Principales componentes y estructura de la lignocelulosa. a) Celulosa, b) hemicelulosa y c) Lignina (Adaptada de Isikgor & Becer, 2015).

La proporción de esos elementos varía dependiendo del origen de la biomasa lignocelulósica, por ejemplo (Isikgor & Becer, 2015):

- Madera dura: Álamo, roble, eucalipto.
- Madera blanda: Pino, abeto Douglas, abeto.
- Residuos agrícolas: Paja de trigo, casco de cebada, paja de cebada, paja de arroz, cáscaras de arroz, paja de avena, mazorcas de maíz, tallos de maíz, bagazo de caña de azúcar, paja de sorgo, entre otros.
- Pastos y zacate.

A continuación, se mencionan algunas características de los componentes principales de la biomasa lignocelulósica:

Celulosa

El componente principal de la biomasa lignocelulósica es la celulosa, y ésta a su vez forma parte de la mitad del carbono orgánico en la biosfera. La celulosa está compuesta por cadenas lineales de glucosa conectadas por enlaces β 1-4, dichas cadenas interactúan entre sí por puentes de hidrógeno dando origen tanto a zonas amorfas como a zonas muy ordenadas generando una estructura cristalina, razones por las cuales es insoluble en agua, es rígida y presenta resistencia a ataques enzimáticos (Harris, 2012 & Isikgor y Becer, 2015) (Fig. 10 a).

Hemicelulosa

Es el segundo polímero más abundante y tiene una estructura aleatoria y amorfa, que se compone de varios heteropolímeros que incluyen xilano, galactomanano, glucuronoxilano, arabinoxilano, glucomanano y xiloglucano. Su composición varía dependiendo de su origen. Si proviene de maderas blandas (coníferas), está constituida principalmente por combinaciones de galactosa, manosa y glucosa; si proviene de maderas duras (latifoliadas) está constituida principalmente por xilosa y glucosa (Harris, 2012; Isikgor & Becer, 2015) (Fig. 10 b).

Lignina

Es un polímero tridimensional de unidades fenilpropanoides, funciona como pegamento celular y proporciona resistencia a la compresión del tejido vegetal y las fibras individuales que proporcionan resistencia contra insectos y patógenos (Harris, 2012; Isikgor & Becer, 2015). Las unidades monoméricas de fenilpropanoide correspondientes en el polímero de lignina se identifican como unidades de *p*-hidroxifenilo (H), guaiacilo (G) y siringilo (S), respectivamente (Fig. 10 c) (Harris, 2012; Isikgor & Becer, 2015).

La celulosa y la hemicelulosa contienen hidratos de carbono fermentables que mediante conversión/fermentación biológica pueden generar distintos productos (Chuetor *et. al.* 2019). Sin embargo, para que esto suceda se requiere fraccionar la biomasa lignocelulósica. Ello puede llevarse a cabo por diferentes métodos de pretratamiento, los cuales se dividen en métodos mecánicos, químicos, fisicoquímicos, biológicos, o alguna combinación, cada uno de ellos presenta ventajas y desventajas (Isikgor & Becer, 2015).

Uno de los pretratamientos más simples y por tanto más utilizados es la hidrólisis ácida a altas temperaturas. Además de permitir la obtención de carbohidratos fermentables, este procedimiento tiene el inconveniente de formar subproductos derivados de la lignocelulosa, que pueden inhibir o desactivar enzimas y biocatalizadores microbianos. Estos compuestos tóxicos incluyen derivados de furanos, compuestos fenólicos, derivados de lignina y ácidos carboxílicos (Kim 2018; Amin et al. 2017; Mills 2009). Dentro de los ácidos orgánicos que se generan se encuentran el ácido acético y el ácido fórmico, siendo el primero de ellos el compuesto inhibidor más abundante en los hidrolizados. El ácido acético se encuentra en un intervalo de concentración de 1 a 10 g/L (Mills 2009). Por ello es importante encontrar formas de detoxificar estos hidrolizados y así obtener un mayor rendimiento del producto de interés en procesos biotecnológicos subsecuentes.

Se propone utilizar a *A. schindleri* ACE como agente detoxificador del ácido acético presente en los hidrolizados de la biomasa lignocelulósica, o bien, entender mejor cómo *A. schindleri* ACE metaboliza tan eficientemente este ácido orgánico y poder transferir esas cualidades metabólicas a otras cepas de *Acinetobacter*, como lo es *A. baylyi* ADP1 o incluso a cepas de *E. coli*.

2.6 Análisis de balance de flujo (FBA).

El análisis de balance de flujo (Flux Balance Analysis) es un método matemático utilizado para analizar el flujo de metabolitos a través de una red metabólica, lo que hace posible predecir la tasa de crecimiento de un organismo o la tasa de producción de un metabolito biotecnológicamente importante. Para ello se utilizan reconstrucciones a escala genómica de la red metabólica del organismo de interés, o modelos reducidos (Orth *et al.* 2010).

La construcción del modelo matemático del metabolismo (a escala genómica o reducido) se inicia a partir de los balances de materia de cada metabolito interno de la red metabólica, lo que genera un conjunto de Ecuaciones Diferenciales Ordinarias (EDO), estas se simplifican considerando que el sistema se encuentra en estado estacionario (tasa de crecimiento constante), al realizar esa suposición, las EDO se reducen a un sistema lineal de ecuaciones.

Cada fila de la matriz representa una reacción (n reacciones). Las entradas en cada columna son los coeficientes estequiométricos de los metabolitos que participan en una reacción. Hay un coeficiente negativo para cada metabolito consumido y un coeficiente positivo para cada

metabolito que se produce. Se utiliza un coeficiente estequiométrico de cero para cada metabolito que no participa en una reacción en particular (Orth *et al.* 2010).

Debido a que el conjunto de ecuaciones lineales no tiene solución única para una red de tamaño genómico, se plantea su solución por medio de un problema de optimización utilizando programación lineal, y para resolverlo se propone el uso de una función objetivo que es la velocidad de crecimiento a esta estrategia se le conoce como Balance de Flujo Metabólico por sus siglas en inglés Flux Balance Analysis (FBA). Dependiendo de las restricciones que se utilicen se pueden hacer diferentes análisis, entre ellos, delección de genes, análisis de variabilidad que permiten evaluar la flexibilidad que tiene la red, permitiendo así un análisis más robusto de la red metabólica (Hay, J., & Schwender, J., 2011).

2.6.1 Análisis de variabilidad de flujo

El análisis basado en restricciones de redes estequiométricas permite la simulación de estados de flujo celular bajo un estricto balance de masa de todos los metabolitos celulares (Hay, J., & Schwender, J., 2011), sin embargo, los patrones de flujo intracelular predichos por la optimización lineal empleados en FBA no son únicos, pueden existir muchos escenarios de flujo posibles y alternativos que pueden operar con la misma optimización, para ello, el espacio de soluciones puede explorarse mediante varios métodos, uno de ellos es conocido como análisis de variabilidad de flujo (FVA) que permite identificar para cada reacción el rango de valores de flujo permitidos en la optimización (Hay, J., & Schwender, J., 2011).

FVA se utiliza para encontrar el flujo mínimo y máximo de reacciones en la red mientras se mantenga algún estado de la red. Las aplicaciones de FVA para la biología de sistemas moleculares incluyen, entre otras, la exploración de óptimos alternativos, el estudio de distribuciones de flujo en un crecimiento subóptimo, investigación de la flexibilidad y la redundancia de la red (Gudmundsson, S., & Thiele, I., 2010).

2.6.2 Eliminación *in silico* de genes.

El análisis de knockout se ha convertido en una técnica importante para el estudio de las redes metabólicas y en la ingeniería metabólica ya que la eliminación de un gen o algunos genes en conjunto pueden repercutir de manera directa en toda la red metabólica pudiendo generarse al menos 3 casos. a) Generar más biomasa y/o producto deseado, b) Disminuir la generación de biomasa y/o producto c) Que la delección sea letal para el microorganismo y una sola delección

sea suficiente para que el microorganismo sea incapaz de crecer bajo ciertas condiciones fisiológicas (Goldstein & Bockmayr, 2015, Tomar, N., & De, R. K. 2013).

La evaluación global de la delección de genes particulares en microorganismos se puede realizar tanto experimentalmente como *in silico*, una forma práctica es evaluar mediante FBA las delecciones *in silico*, estas delecciones pueden llegar a describir el impacto de cada posible knockout de reacción en una red metabólica, pudiendo elegir genes importantes dentro del metabolismo del microorganismo de interés y después poder comprobarlo experimentalmente, (Goldstein & Bockmayr, 2015, Tomar, N., & De, R. K. 2013).

2.7 Análisis bioinformático de proteínas.

La bioinformática es un campo de la ciencia en la que convergen diversas disciplinas como las matemáticas aplicadas, estadística, inteligencia artificial, química, bioquímica, informática y las tecnologías de la información. Se ocupa del desarrollo y aplicación de datos analíticos y métodos teóricos, modelado matemático y técnicas de simulación por computadora para estudiar sistemas biológicos. Su objetivo es facilitar el descubrimiento de nuevas ideas biológicas, así como crear perspectivas globales a partir de las cuales se pueden discernir principios unificadores en biología. Se pueden realizar análisis y caracterización de moléculas biológicas, en particular proteínas, que juegan un papel importante en todos los procesos celulares y evolutivos de los organismos (Hernández-Domínguez, E. M. *et al*, 2019). En las últimas décadas, las tecnologías de secuenciación denominadas de próxima generación, en conjunto con la bioinformática han facilitado la recolección y análisis de gran cantidad de datos genómicos, transcriptómicos, proteómicos y metabolómicos de diferentes organismos que han permitido predicciones sobre la regulación de la expresión, transcripción, traducción, estructura y mecanismos de acción de las proteínas, así como la homología, mutaciones y procesos evolutivos que generan cambios estructurales y funcionales a lo largo del tiempo (Hernández-Domínguez, E. M. *et al*, 2019). La bioinformática abarca dos campos de aplicación complementarios entre sí; éstos incluyen el desarrollo de herramientas informáticas y bases de datos, y su aplicación en la generación de conocimiento biológico para comprender mejor los sistemas vivos (Hernández-Domínguez, E. M. *et al*, 2019). Los programas pueden hacer uso de bases de datos. Algunas de acceso abierto para la investigación académica y otras bajo el pago de una licencia que han sido

creadas con información en constante crecimiento y gestionada por instituciones de diversos sectores.

En el presente proyecto se utilizaron diversas herramientas bioinformáticas para caracterizar las propiedades estructurales relacionadas con la función biológica de las proteínas Icdh, Icl y GlcB de *A. schindleri* ACE y de *E. coli* utilizando análisis a nivel de estructura primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria.

Las bases de datos, servidores y herramientas que se utilizan se encuentran en el Anexo I.

2.7.1 Alineamiento de secuencias.

Los alineamientos de secuencias son fundamentales para la identificación de genes, la construcción de filogenia, el modelado de estructura de proteínas, el diseño de proteínas y la anotación funcional de proteínas (Marti-Renom *et al.* 2004). Existen distintos tipos de alineamientos:

De acuerdo con el número de secuencias a alinear:

- Pareado (dos secuencias)
- Múltiple (más de dos secuencias)

De acuerdo con la región a alinear:

- Local (subregión de la secuencia)
- Global (secuencia completa)

A partir de dichos alineamientos es posible encontrar la similitud, la identidad o la homología entre las secuencias de interés. Se considera que dos secuencias son homólogas cuando comparten un origen evolutivo y tienen un porcentaje de identidad mayor al 30% para residuos de aminoácidos (Pearson W. R. 2013).

Existen distintas herramientas y algoritmos que permiten hacer el alineamiento de secuencias; uno de ellos es el alineamiento múltiple de secuencias con el algoritmo de Clustal Omega en la plataforma de EMBL-EBI (Madeira *et al.*, 2019). Esta herramienta utiliza métodos de alineación progresiva, es decir, aquellas con mejor puntuación de alineación se alinean primero, luego se reúnen grupos de secuencias progresivamente más distantes hasta

que se obtiene una alineación global. El algoritmo comienza calculando una matriz de distancia aproximada entre cada par de secuencias basándose en puntuaciones de alineación de secuencias por pares. Estas puntuaciones se calculan utilizando los parámetros de alineación por pares para ADN y secuencias de proteína. Después el algoritmo utiliza el método de unión de vecinos con enraizamiento de punto medio para crear un árbol guía que se utiliza para generar una alineación global. El árbol guía sirve como una plantilla aproximada para los clados que tienden a compartir características de inserción y eliminación, lo que generalmente proporciona un resultado cercano al óptimo, especialmente cuando el conjunto de datos contiene secuencias con diversos grados de divergencia por lo que el árbol guía es menos sensible al ruido (Higgins D *et al.* 1994).

Las secuencias de aa que se utilizan en este tipo de análisis pueden venir de distintas bases de datos, como la Universal Protein Resource (UNIPROT) (Bateman *et al.*, 2021). Esta base de datos es un recurso completo para la secuencia de proteínas y los datos de anotación en la que colaboran el Instituto Europeo de Bioinformática (EMBL-EBI) (Lopez, R. 2008), el Instituto Suizo de Bioinformática SIB y el Protein Information Resource (PIR). Otra base de datos útil es el KEGG por sus siglas en inglés que significan Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (Kanehisa, M., & Goto, S. 2000).

2.7.2 Árboles filogenéticos.

Un árbol filogenético puede definirse como un árbol etiquetado con hojas que representan la historia evolutiva de un conjunto de taxones, ya sea con o sin raíz (Huson, D. H., & Bryant, D., 2006). El concepto de red filogenética es otro término utilizado para representar cualquier red en la que los taxones están representados por nodos y sus relaciones evolutivas están representadas por bordes; en el caso de los árboles filogenéticos, los bordes se denominan ramas (Huson, D. H., & Bryant, D., 2006). La relación evolutiva de un conjunto de taxones suele estar representada por un árbol filogenético, y este modelo ha facilitado enormemente la discusión y prueba de hipótesis (Huson, D. H., & Bryant, D., 2006). Existen distintos softwares para crear árboles filogenéticos, como lo es Jalview (Waterhouse AM *et al.*, 2009). Este programa hace el cálculo de árboles a partir de alineamientos de secuencias. De manera particular, los árboles se generan a partir de un alineamiento completo usando una de dos medidas de distancia y construyendo el árbol a partir de uno de dos algoritmos.

Medidas de distancia: Los árboles se calculan sobre la base de una medida de similitud entre cada par de secuencias en la alineación:

- **PID:** El porcentaje de identidad entre las dos secuencias en cada posición alineada, PID considera el número de símbolos sin espacios alineados equivalentes multiplicados por 100 y se divide entre el número mínimo de posiciones sin espacios en cualquiera de ambas secuencias). Este número refleja el número de bases o residuos idénticos por cada 100 pares de bases o residuos.
- **BLOSUM62, PAM250, DNA:** Estas opciones utilizan una de las matrices de sustitución disponibles para calcular una suma de puntuaciones para los pares de residuos en cada posición alineada.
- **Similitud de características de secuencia:** Estos árboles se construyen a partir de la matriz de distancia entre las características de secuencia observadas en cada columna de la alineación.

Métodos de construcción de árboles que emplea Jalview:

Este programa utiliza dos métodos de agrupación aglomerativa:

- **UPGMA tree:** UPGMA significa método de grupos de pares no ponderados utilizando promedios aritméticos. Los clústeres se forman y amplían de forma iterativa al encontrar una secuencia o miembro con la menor disimilitud promedio entre los miembros del clúster.
- **Neighbour Joining o árbol de unión de vecinos:** Este método aplica un algoritmo para encontrar el árbol con las ramas más cortas.

2.7.3 Predicción de estructura secundaria, terciaria y cuaternaria de proteínas.

La predicción de la estructura 3D de proteínas a partir de su secuencia de aminoácidos es uno de los problemas sin resolver más importantes de la biofísica y la biología computacional (Haiyou *et al.* 2018). Sin embargo, es un área que se ha ido desarrollando en gran medida desde finales del siglo XX. Por ejemplo, en 1973 Anfinsen demostró que toda la información que una proteína necesita para plegarse correctamente está codificada en su secuencia de aminoácidos (llamado dogma de Anfinsen); ésta determina la composición molecular básica de la proteína y su estructura nativa corresponde a la conformación más estable con la menor

energía libre. Sin embargo, es complejo incluir las interacciones que la proteína puede tener con las moléculas de disolvente circundantes, además de que el espacio conformacional es enorme y difícil de predecir (Haiyou *et al.* 2018). Por ello, se han propuesto distintos enfoques para hacer predicciones de plegamiento. Uno de ellos se basa en tomar como plantilla una estructura homóloga resuelta del Protein Data Bank (PDB); este es un método conocido como reconocimiento de subprocesos o pliegues que hacen coincidir la secuencia objetivo con estructuras homólogas cercanas y distantes basadas en algún algoritmo, y toma las mejores coincidencias como plantilla estructural. Tanto el modelado de homología basado en la comparación de secuencias como los métodos de enhebrado basados en el reconocimiento de dominios o sectores de plegamiento, pueden denominarse métodos de predicción de estructura basados en plantillas (Haiyou *et al.* 2018) y representan uno de los enfoques más utilizados por algunos servidores que prestan el servicio de predicción de estructura 3D de proteínas.

En el presente proyecto se utilizarán dos servidores para la predicción de estructuras tridimensionales.:

I-TASSER.

El servidor llamado Iterative Threading ASSEmbly Refinement (I-TASSER (J Yang *et al.* 2015, A Roy *et al.* 2010 & Y Zhang, 2018) tiene un enfoque jerárquico para la predicción de la estructura de proteínas y la anotación de funciones basadas en el plegamiento. De manera general tiene el siguiente procedimiento:

1. Identifica las plantillas estructurales del PDB mediante el enfoque de múltiples subprocesos ocupando un servidor de meta-hilos local (Local Meta-Threading Server (LOMETS), esto es para una secuencia determinada LOMETS genera modelos 3D mediante la recopilación de plantillas estructurales de alta puntuación de 11 programas de subprocesos instalados localmente (Cethreader, FFAS3D, Hhpred, Hhsearch, MUSTER, Neff-MUSTER, PPAS, PRC, PROSPECT2, SP3 y SparksX). Luego esas plantillas se conjuntan con modelos atómicos de longitud completa construidos mediante simulaciones iterativas de ensamblaje de fragmentos basadas en plantillas.

2. Se obtiene información sobre la función del objetivo volviendo a relacionar los modelos 3D a través de la base de datos de funciones de proteínas BioLip, la cual es una base de datos curada semi-manualmente para interacciones ligando-proteína de alta calidad y biológicamente relevantes, lo que permite hacer una detección de ligando virtual y anotación de la función de la proteína.

Cabe resaltar que I-TASSER se clasificó como el servidor número 1 para la predicción de muchas estructuras (J Yang *et al.* 2015, A Roy *et al.* 2010 & Y Zhang, 2018). El servidor está en desarrollo activo con el objetivo de seguir utilizando algoritmos de última generación.

SWISS MODEL.

Es un servidor de modelado de homología de estructuras de proteínas totalmente automatizado. Es accesible a través del servidor web Expasy o desde el programa DeepView (Swiss Pdb-Viewer). Su funcionalidad incluye el modelado de complejos homo y heteroméricos a partir de las secuencias de aminoácidos; este es uno de los servidores de modelado de estructuras más utilizados en el mundo (Waterhouse *et al.*, 2018).

El flujo de trabajo general de SWISS MODEL se basa en un modelado comparativo y consta de los siguientes pasos (Waterhouse *et al.*, 2018):

1. Datos de entrada: La proteína diana se puede proporcionar como secuencia de aminoácidos, ya sea en formato FASTA, Clustal o como texto sin formato. Alternativamente, se puede especificar un código de acceso de UniProtKB. Si la proteína diana es heteromérica, es decir, consta de diferentes cadenas de proteínas como subunidades, se deben especificar secuencias de aminoácidos o códigos de acceso UniProtKB para cada subunidad.
2. Búsqueda de plantillas: Los datos proporcionados en el paso 1 sirven como consulta para buscar estructuras proteicas relacionadas con la evolución frente a la biblioteca de plantillas SWISS-MODEL SMTL. SWISS-MODEL realiza esta tarea utilizando dos métodos de búsqueda en la base de datos: BLAS, que es rápido y suficientemente preciso para plantillas estrechamente relacionadas, y Hhblits, que agrega sensibilidad en caso de homología remota.

3. Selección de plantilla: Cuando se completa la búsqueda de la plantilla, las plantillas se clasifican de acuerdo con la calidad esperada de los modelos resultantes, según lo estimado por la Estimación de la calidad del modelo global (GMQE) y la Estimación de la calidad de la estructura cuaternaria (QSQE). Las plantillas y alineaciones mejor clasificadas se comparan para verificar si representan estados conformacionales alternativos o cubren diferentes regiones de la proteína objetivo. En este caso, se seleccionan automáticamente varias plantillas y se crean diferentes modelos en consecuencia. Para brindar al usuario la opción de utilizar plantillas alternativas a las seleccionadas automáticamente, todas las plantillas se muestran en forma de tabla con un conjunto descriptivo de características. Además, las vistas gráficas interactivas facilitan el análisis y la comparación de las plantillas disponibles en términos de sus estructuras tridimensionales, similitud de secuencia y características de estructura cuaternaria.
4. Construcción de modelos: Para cada plantilla seleccionada, se genera automáticamente un modelo de proteína 3D transfiriendo primero las coordenadas del átomo conservadas según lo definido por la alineación objetivo-plantilla. Las coordenadas de residuos correspondientes a inserciones / deleciones en la alineación se generan mediante modelado de bucle y se obtiene un modelo de proteína de átomo completo construyendo las cadenas laterales de aminoácidos no conservadas. SWISS-MODEL se basa en el marco de biología estructural computacional de OpenStructure y el motor de modelado ProMod3 para realizar este paso.
5. Estimación de la calidad del modelo: Para cuantificar los errores de modelado y proporcionar estimaciones sobre la precisión esperada del modelo, SWISS-MODEL se basa en la función de puntuación QMEAN. El cual utiliza potenciales estadísticos de fuerza media para generar estimaciones de calidad global y por residuo. Las estimaciones de calidad local se mejoran mediante restricciones de distancia por pares que representan información de conjunto de todas las estructuras de plantilla encontradas.

Adicionalmente, los usuarios expertos pueden cargar directamente alineaciones de secuencia de plantilla de destino personalizadas, estructuras de plantilla o archivos de proyecto DeepView en formularios de entrada separados (Waterhouse *et al*, 2018).

Pruebas de validación de modelos 3D con SAVES v6.0.

Además de los algoritmos propios de los softwares antes mencionados, existen otros servidores como SAVES v6.0 (Colovos, C., & Yeates, T.O. 1993, Bowie et al., 1991, Luethy et al., 1992) que evalúan la calidad de la predicción de las proteínas, considerando diversos parámetros, este servidor se basa en el análisis y aprobación de 6 variables:

1. Verificación 3D: Determina la compatibilidad de un modelo atómico 3D con su propia secuencia de aminoácidos, asignando una clase estructural en función de su ubicación y entorno (alfa, beta, si es polar, no polar, etc), comparándolas con estructuras consideradas adecuadas.
2. Errat: Analiza las estadísticas de interacciones no enlazadas entre diferentes tipos de átomos y traza el valor de la función de error frente a la posición de una ventana deslizante de 9 residuos, calculada mediante una comparación con estadísticas de estructuras altamente refinadas.
3. Probar: Calcula los volúmenes de átomos en macromoléculas utilizando un algoritmo que trata a los átomos como esferas duras y calcula una desviación estadística Z-score para el modelo de PDB altamente resuelto (2 Å o mejor) y refinado (factor R de 0.2 o mejor) de estructuras depositadas.
4. Procheck: Comprueba la calidad estereoquímica de la estructura de una proteína mediante el análisis de la geometría, residuo por residuo y la geometría de la estructura general.
5. Whatcheck: Derivado de un subconjunto de herramientas de verificación del programa de verificación de proteínas del programa Whatif, lo cual realiza un control exhaustivo de muchos parámetros estereoquímicos de los residuos en el modelo.
6. Cryst: Este programa busca en el PDB entradas que tengan una celda unitaria similar a su archivo de entrada, se requiere registro CRYST1.

2.7.4 Mapeo de la zona de interfase con Getcontacts.

Un mapeo de la zona de interfase entre subunidades de proteínas permite clasificar interacciones entre los límites de las proteínas. Dado que la interfaz puede estar definida por una superficie que separa las dos proteínas, es posible crear un mapa de interacción que permita realizar comparaciones en 2D. Este análisis se utiliza cuando las proteínas a estudiar tienen un estado oligomérico distinto a un monómero, por ejemplo, que se encuentre como homodímero u homotetrámero.

En el presente proyecto se utilizará Getcontacts que es un sitio de análisis de interacción para estructuras y conjuntos moleculares.

3. OBJETIVOS.

3.1 OBJETIVO GENERAL.

Caracterizar *in silico* a las enzimas que toman parte en las vías de asimilación de acetato y el nodo del isocitrato en *A. schindleri* ACE a nivel estructural y de flujos de carbono.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1. Efectuar un análisis de eliminación *in silico* de los genes *ackA-pta* y *acs*, y evaluar su efecto en la distribución de flujos de carbono y en el valor de la μ en el modelo de *A. schindleri* ACE y de *E. coli* JM101 empleando acetato como fuente de carbono.
2. Llevar a cabo un análisis de modulación de las actividades de la isocitrato deshidrogenasa (Icdh) y la isocitrato liasa (Icl), y evaluar su efecto en la distribución de flujos y la μ en el modelo de *A. schindleri* ACE y de *E. coli* JM101 empleando acetato como fuente de carbono.
3. Realizar un análisis de variabilidad de flujo de Icdh e Icl en *A. schindleri* ACE y *E. coli* JM101 empleando acetato como fuente de carbono.
4. Caracterizar las propiedades estructurales relacionadas con la función biológica de las Icdh de *A. schindleri* ACE y de *E. coli* utilizando diversos análisis a nivel de estructura primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria de las proteínas.
5. Caracterizar las propiedades estructurales relacionadas con la función biológica de las Icl de *A. schindleri* ACE y de *E. coli* utilizando diversos análisis a nivel de estructura primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria de las proteínas.

6. Caracterizar las propiedades estructurales relacionadas con la función biológica de las GlcB de *A. schindleri* ACE y de *E. coli* utilizando diversos análisis a nivel de estructura primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria de las proteínas.

4. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN.

1. ¿Cómo es la redistribución de flujos metabólicos al deletar *in silico* los genes *ackA* y *acs* en un modelo metabólico reducido?
2. ¿Cómo es la redistribución de flujos metabólicos al modular *in silico* las actividades de Icdh e Icl en un modelo metabólico reducido?
3. ¿Es posible identificar *in silico* las características estructurales de las enzimas Icdh, Icl y GlcB de *A. schindleri* ACE? De ser así, ¿estas características estructurales permiten explicar algunas de las diferencias en función/regulación de las enzimas de *A. schindleri* ACE respecto a las de *E. coli*?

5. HIPÓTESIS.

El análisis de flujos metabólicos *in silico* junto con la diferenciación estructural de las enzimas Icdh, Icl y GlcB contribuirán a la comprensión del catabolismo acelerado de acetato que presenta *A. schindleri* ACE en comparación con *E. coli*.

6. MATERIALES Y MÉTODOS.

6.1 Análisis de balance de flujo (FBA).

Se utilizó una versión reducida del modelo metabólico a escala genómica de *E. coli* iAF1260, con una ecuación de biomasa simplificada (Orth *et al.* 2014; Sigala *et al.* 2019). Esta versión contiene 82 reacciones que incluyen las principales reacciones del metabolismo del carbono central, algunas reacciones del sistema de transporte de electrones, transporte de acetato, reacciones anapleróticas y asimilación de amoníaco, entre otras (Sigala *et al.* 2019).

Por otra parte, se utilizó el modelo metabólico de *A. schindleri* ACE basado en la versión reducida de *E. coli* iAF1260, tal cual se encuentra descrito en Sigala *et al.* 2019. En ese modelo se eliminaron las reacciones del metabolismo de carbono central que están ausentes en el genoma de *A. schindleri* ACE. Por ejemplo, glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PDH), gluconato 6 fosfato deshidrogenasa (GND), enzimas de la vía de las pentosas fosfato (PPP),

piruvato cinasa, 6-fosfofructocinasa y el sistema de fosfotransferasa (PTS) de transporte de glucosa. Por lo tanto, el modelo final contiene 71 reacciones (Sigala *et al.* 2019).

Se tomaron en cuenta algunos valores cinéticos de los experimentos de Sigala y colaboradores (2019) en los que *E. coli* JM101 y *A. schindleri* ACE crecen utilizando acetato como única fuente de carbono (Tabla 1).

Tabla 1: Datos cinéticos de *E. coli* JM101 y *A. schindleri* ACE (Sigala *et al.* 2019).

Parámetro	Cepa	
	<i>E. coli</i> JM101	<i>A. schindleri</i> ACE
μ (h ⁻¹)	0.33 ± 0.008	0.93 ± 0.02
Y_{XS} (g _{DCW} g _{Acc} ⁻¹)	0.29 ± 0.05	0.58 ± 0.02
q_{Ace} (g _{Acc} g _{DCW} ⁻¹ h ⁻¹)	1.11 ± 0.14	1.60 ± 0.10
q_{O_2} (mmolO ₂ g _{DCW} ⁻¹ h ⁻¹)	15.38 ± 1.09	14.06 ± 1.19
q_{CO_2} (mmolCO ₂ g _{DCW} ⁻¹ h ⁻¹)	14.1 ± 1.21	12.07 ± 0.55
RQ (mmol _{CO2} mmol _{O2} ⁻¹)	0.92 ± 0.01	0.86 ± 0.03

Se empleó el software Matlab 2020b para resolver el problema de programación lineal para la red metabólica simplificada de los dos modelos. En ambos casos se utilizó la función linprog, la cual resuelve un problema de optimización utilizando programación lineal; para *A. schindleri* ACE se utilizó el algoritmo “dual-simplex”, mientras que para *E. coli* JM101 el algoritmo “interior-point”. Estos algoritmos se ocuparon con la finalidad de lograr una solución factible. Se resolvió el problema utilizando como función objetivo la generación de biomasa (maximizando) o bien, maximizando el consumo de acetato para observar de una mejor manera cómo cambia la distribución de los flujos metabólicos bajo las condiciones descritas en la Figura 11.

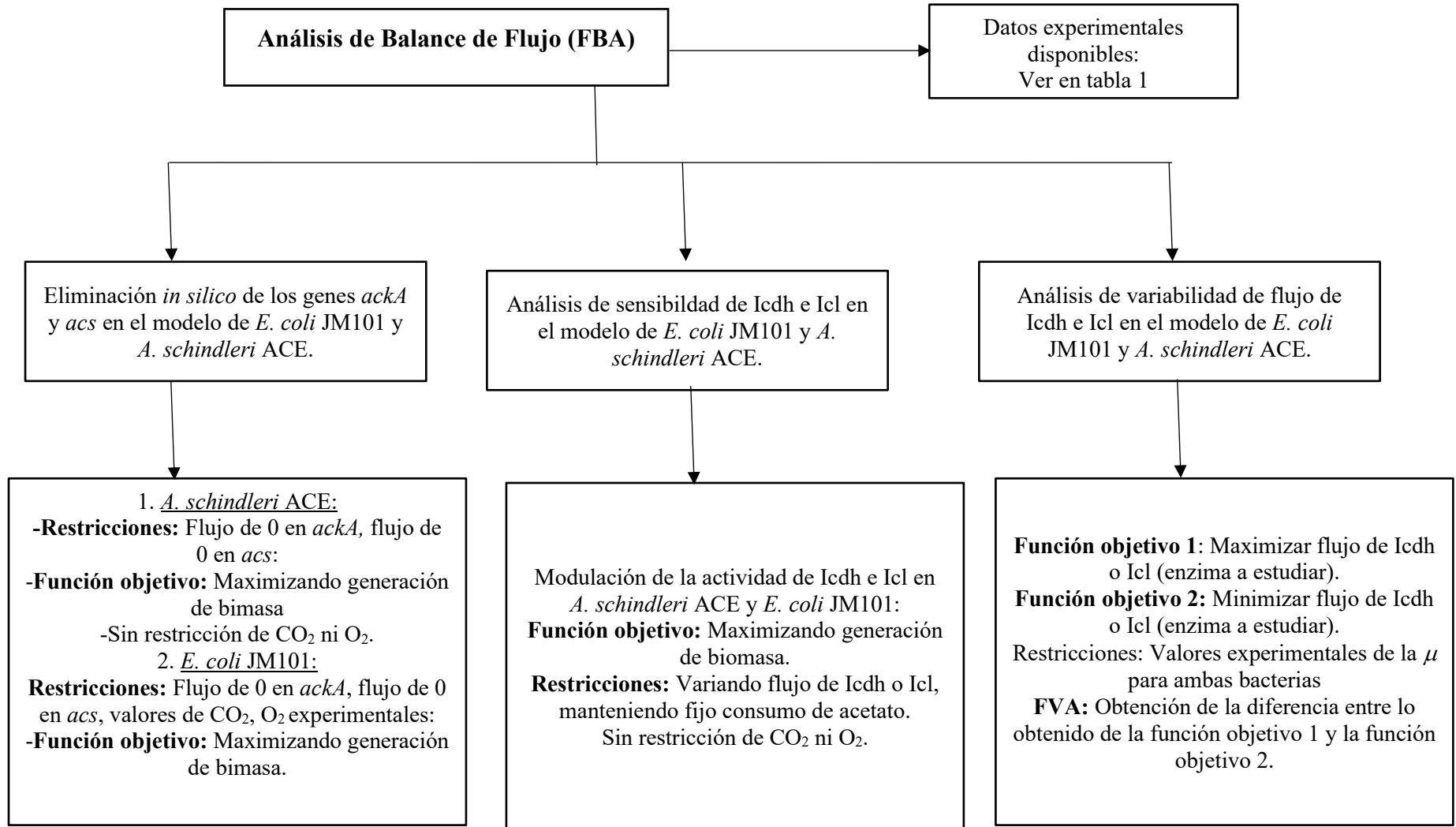


Figura 11. Diagrama de flujo de la metodología del análisis de FBA para *E. coli* JM101 y *A. schindleri* ACE. * Se toman como flujos control los flujos para *E. coli* JM101 y *A. schindleri* ACE publicados por J. Sigala y colaboradores, 2019.

6.2 Análisis bioinformático de proteínas:

6.2.1 Estudio de las Icdh de *A. schindleri* ACE y *E. coli* a nivel de estructura primaria, secundaria y terciaria.

La enzima isocitrato deshidrogenasa cataliza la reacción mostrada en la ecuación 3:



En la naturaleza existen dos tipos de Icdh según su especificidad, dependientes de NAD^+ y dependientes de NADP^+ . Se diferencian 3 subfamilias filogenéticas entre todas las Icdh (Wang, *et. al.* 2018);

- Tipo I: Se pueden encontrar en diferentes estados oligoméricos: homodiméricos, homo-tetraméricos, hetero-oligoméricos. Tienen una longitud alrededor de 400 aa y se encuentran en arqueas, bacterias y mitocondrias.
- Tipo II: Se encuentran como homodiméros y tienen una longitud alrededor de 400 aa.
- Tipo III: Se encuentran como monómeros u homodiméros, con una longitud cercana a los 740 aa.

Aunque los Icdh de las subfamilias de tipo I y II comparten un número aproximado de aminoácidos y una topología similares, sus porcentajes de identidad de secuencia primaria son menores al 15% (Wang, *et. al.* 2018). La Icdh de *E. coli* pertenece a la subfamilia I mientras la Icdh de *A. schindleri* ACE pertenece a la subfamilia III.

En el presente proyecto se tomaron las secuencias en formato FASTA de aminoácidos (aa) de dos bases de datos, KEEG y UNIPROT.

- Las secuencias de las enzimas Icdh, Icl y GlcB de *A. schindleri* ACE se tomaron del genoma publicado en el KEEG cuya URL se encuentra a continuación https://www.genome.jp/kegg-bin/show_organism?org=asj
- Para la recopilación de las secuencias de las Icdh del género *Acinetobacter* se utilizó la base de datos UNIPROT. La selección de las secuencias a estudiar se presenta en la Figura 12. La Icdh de *E. coli* se toma de UNIPROT (ID: P08200).

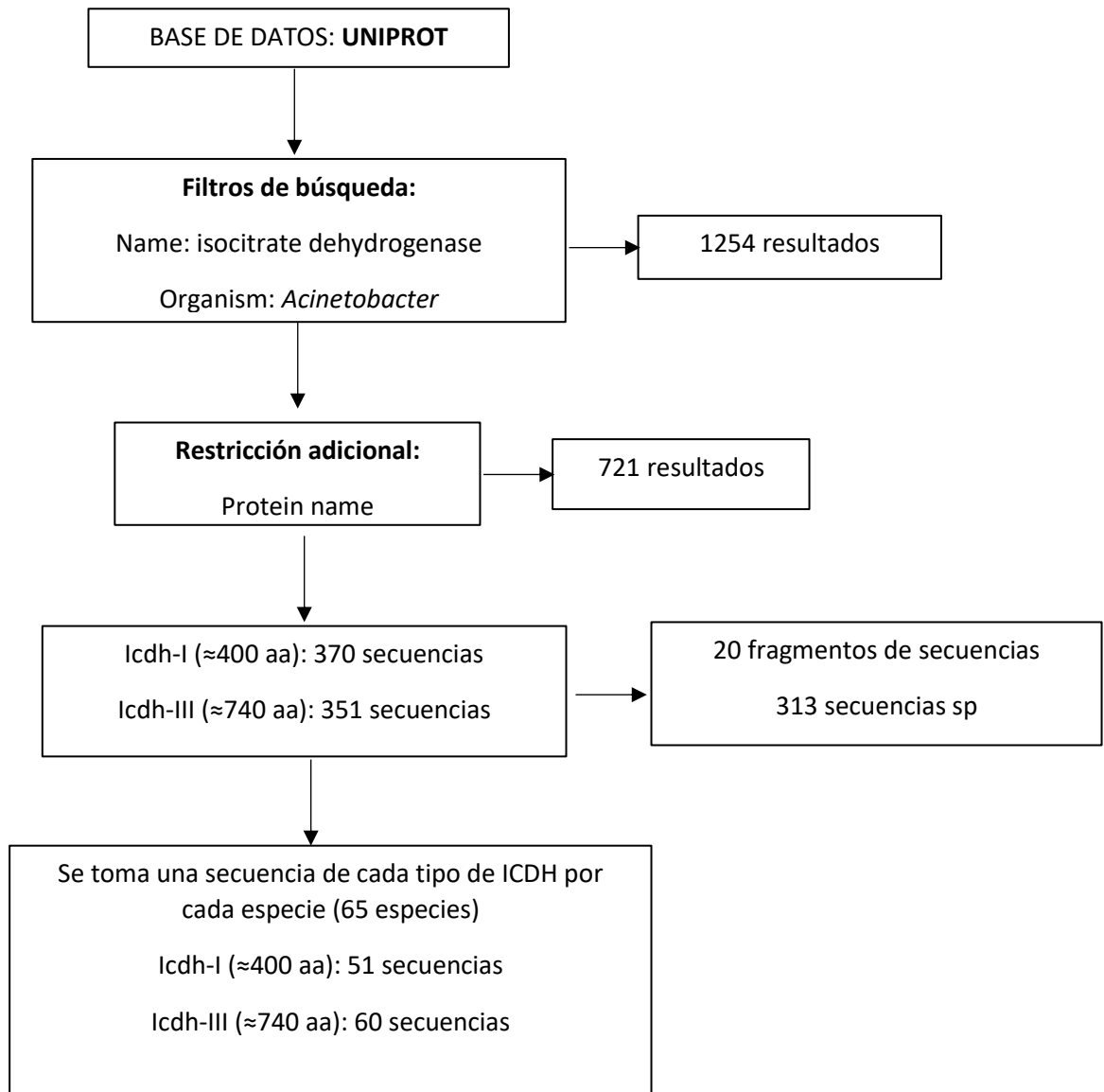


Figura 12. Diagrama de flujo de recopilación de secuencias Icdh-I e Icdh-III del género *Acinetobacter*.

El nombre e ID de las secuencias Icdh que se seleccionaron se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Icdh-I e Icdh-III analizadas de 64 especies del género *Acinetobacter* y la secuencia de la Icdh de *E. coli*, *Las secciones en gris indican que la bacteria no tiene en su genoma esa proteína.

	Organismo	ID	Icdh-I (400 aa)	ID	Icdh-III (740 aa)
1	<i>Escherichia coli</i> _strain_K12	P08200	416		
2	<i>Acinetobacter baumannii</i>	<u>V5VAJ9</u>	418	<u>V5VCI0</u>	745
3	<i>Acinetobacter pittii</i>	<u>A0A0Q1VG52</u>	418	<u>A0A0Q1VEW8</u>	745
4	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	<u>A0A446ZH72</u>	418	<u>A0A446ZH64</u>	745
5	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	<u>A0A380TZ27</u>	417	<u>A0A380U136</u>	743
6	<i>Acinetobacter oleivorans</i>	<u>A0A0B2UAU6</u>	418	<u>A0A0B2U5X4</u>	745
7	<i>Acinetobacter guillouiae</i>	<u>A0A6A1RXK3</u>	418	<u>A0A077L736</u>	743
8	<i>Acinetobacter tjernbergiae</i> DSM 14971	<u>V2WC92</u>	418	<u>V2V554</u>	743
9	<i>Acinetobacter qingfengensis</i>			<u>A0A1E7QYP3</u>	745
10	<i>Acinetobacter chinensis</i>	<u>A0A3B7M3H2</u>	417	<u>A0A3B7M3S9</u>	743
11	<i>Acinetobacter baylyi</i> (strain ATCC 33305 / BD413 / ADP1)	<u>Q6FCZ2</u>	436	<u>Q6FCZ5</u>	743
12	<i>Acinetobacter venetianus</i>	<u>A0A150HY93</u>	418	<u>A0A150HXR2</u>	743
13	<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	<u>A0A1L6KP91</u>	418	<u>A0A1L6KP77</u>	743
14	<i>Acinetobacter schindleri</i> ACE			<u>AsACE_CH0104</u> 3	745
15	<i>Acinetobacter junii</i>	<u>A0A380UI43</u>	418	<u>A0A5P1B616</u>	743
16	<i>Acinetobacter nosocomialis</i>	<u>A0A241YHN8</u>	418	<u>K9BDW1</u>	745
17	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	<u>A0A2K8UQE4</u>	418	<u>A0A4Y3IXY2</u>	743
18	<i>Acinetobacter proteolyticus</i>	<u>A0A2N0WD89</u>	418	<u>A0A653K4A0</u>	743
19	<i>Acinetobacter bereziniae</i>	<u>A0A0A8TIS9</u>	418	<u>A0A5C4TV04</u>	743
20	<i>Acinetobacter beijerinckii</i> CIP	<u>N9DZ37</u>	418	<u>N9F773</u>	743
21	<i>Acinetobacter indicus</i>	<u>A0A2L2J1I5</u>	418	<u>A0A6C0XZP0</u>	745
22	<i>Acinetobacter gerneri</i> DSM 14967	<u>N8YBS8</u>	417	<u>N8ZEE7</u>	745

23	<i>Acinetobacter soli</i>			<u>A0A1P8EIB3</u>	744
24	<i>Acinetobacter gyllenbergii</i>	<u>A0A1B8UC61</u>	418	<u>A0A1B8UC39</u>	743
25	<i>Acinetobacter bouvetii</i>	<u>A0A4Q7AV53</u>	417	<u>A0A4V2DPD7</u>	744
26	<i>Acinetobacter tandoii</i>			<u>A0A515BGR7</u>	743
27	<i>Acinetobacter radioresistens</i>	<u>A0A2T1J3P6</u>	418	<u>A0A2T1J3B9</u>	745
28	<i>Acinetobacter bohemicus</i>	<u>A0A1I6NS20</u>	417	<u>A0A1I6NS13</u>	743
29	<i>Acinetobacter rudis</i> CIP 110305			<u>S3P031</u>	745
30	<i>Acinetobacter brisouii</i> CIP 110357	<u>V2URM3</u>	418	<u>V2UMT8</u>	743
31	<i>Acinetobacter lactucae</i>	<u>R8YWW7</u>	418	<u>R8YW37</u>	745
32	<i>Acinetobacter parvus</i> DSM	<u>N8QE76</u>	418	<u>N8RRW4</u>	743
33	<i>Acinetobacter towneri</i>			<u>A0A1E8E4G8</u>	744
34	<i>Acinetobacter parvus</i> DSM 16617	<u>N8QE76</u>	418	<u>N8RRW4</u>	743
35	<i>Acinetobacter colistiniresistens</i>	<u>N9RAZ2</u>	418	<u>N9PRV0</u>	743
36	<i>Acinetobacter larvae</i>	<u>A0A1B2M094</u>	417	<u>A0A1B2M0U4</u>	743
37	<i>Acinetobacter equi</i>			<u>A0A0N9W421</u>	743
38	<i>Acinetobacter ursingii</i>	<u>A0A2N6VDI1</u>	419	<u>A0A3G9G4K4</u>	743
39	<i>Acinetobacter seifertii</i> N8S9R2	<u>A0A5E9PIC8</u>	418	<u>N8S9R2</u>	745
40	<i>Acinetobacter variabilis</i>	-		<u>N9NSV9</u>	745
41	<i>Acinetobacter defluvii</i>	<u>A0A2S2FG49</u>	418	<u>A0A2S2FBA4</u>	744
42	<i>Acinetobacter wuhouensis</i>	<u>A0A385C1S2</u>	418	<u>A0A385C363</u>	743
43	<i>Acinetobacter cumulans</i>			<u>A0A3A8G2T7</u>	744
44	<i>Acinetobacter gandensis</i>	<u>A0A1A7RDG8</u>	417	<u>A0A1A7R550</u>	744
45	<i>Acinetobacter idrijaensis</i>	<u>A0A098Y7F3</u>	418	<u>A0A098YID3</u>	743
46	<i>Acinetobacter pseudolwoffii</i>			<u>A0A2H9YPQ4</u>	743
47	<i>Acinetobacter celticus</i>			<u>A0A1C3CUD5</u>	743
48	<i>Acinetobacter pragensis</i>	<u>A0A151XZ64</u>	417	<u>A0A151XYC6</u>	744
49	<i>Acinetobacter marinus</i>	<u>A0A1G6GM08</u>	418	<u>A0A1G6M0X6</u>	743
50	<i>Acinetobacter kookii</i>	<u>A0A1G6IGA9</u>	417	<u>A0A1G6N215</u>	743
51	<i>Acinetobacter populi</i>	<u>A0A1Z9Z0A0</u>	418	<u>A0A1Z9YZ94</u>	745
52	<i>Acinetobacter kyonggiensis</i>	<u>A0A1H3G4S0</u>	417	<u>A0A1H3G5F1</u>	743
53	<i>Acinetobacter puyangensis</i>	<u>A0A240E696</u>	417	<u>A0A240E5P9</u>	745

54	<i>Acinetobacter guerryae</i>	<u>A0A3A8EMU3</u>	419	<u>A0A3A8EIP8</u>	743
55	<i>Acinetobacter dispersus</i>	<u>A0A6P1LHM1</u>	417	<u>A0A6P1LFN1</u>	743
56	<i>Acinetobacter sichuanensis</i>	<u>A0A371YVI6</u>	418	<u>A0A371YTK8</u>	743
57	<i>Acinetobacter albensis</i>	<u>A0A1C4GSD5</u>	417	<u>A0A1C4GSA2</u>	745
58	<i>Acinetobacter halotolerans</i>	<u>A0A4Q6XH14</u>	418	<u>A0A4Q6XAA0</u>	743
59	<i>Acinetobacter wanghuae</i>			<u>A0A5Q0P0W3</u>	744
60	<i>Acinetobacter piscicola</i>	<u>A0A4Q4GZ02</u>	417	<u>A0A4Q4GZB1</u>	744
61	<i>Acinetobacter lanii</i>	<u>A0A6G8S5Y8</u>	418	<u>A0A6G8S2Q8</u>	745
62	<i>Acinetobacter shaoyimingii</i>	<u>A0A6G8RUJ7</u>	418	<u>A0A6G8RWT8</u>	744
63	<i>Acinetobacter nectaris</i>	<u>V2TQ73</u>	418		
64	<i>Acinetobacter boissieri</i>	<u>A0A1G6H5F9</u>	417		
65	<i>Acinetobacter apis</i>	<u>A0A217EF45</u>	417		

Las secuencias de las Icdh mostradas en la tabla 2 se utilizaron para hacer alineamientos, dendogramas, mapeo de la zona de interfase, entre otros análisis.

Para los alineamientos de secuencia, a la secuencia 11 que pertenece a *Acinetobacter baylyi* se le eliminaron los primeros 18 aa debido a que se encontraban lejanos al sitio catalítico y no es una región de interés en este estudio. Se empleo el servidor Clustal Omega Multiple Sequence Alignment < EMBL-EBI.

Predicción de la estructura tridimensional de la Icdh de ACE

La única secuencia dilucidada de las Icdh del género *Acinetobacter* pertenece a la Icdh de *A. baumannii*, esta se encuentra resuelta como homodimero, es la primera estructura dimérica que se ha informado que se originó a partir de las Icdh de la subfamilia III (Wang *et al.* 2018). Además, se verifica su clasificación complejo-proteína determinado por HyPPI prediction server que se encuentra en el servidor Proteins plus (<https://proteins.plus>) (Schneider *et al.* 2013).

Para hacer la predicción de la Icdh de *A. schindleri* ACE se utilizaron los servidores I-TASSER y SWISS MODEL. Las predicciones se validaron mediante Saves v6.0, su gráfico de Ramachandran y su estado oligomérico con un mapeo en la zona de interfase.

6.2.2 Mapeo de la zona de interfase.

Un mapeo de la zona de interfase entre subunidades de proteínas permite clasificar interacciones entre los límites de las proteínas. Dado que la interfaz puede estar definida por una superficie que separa las dos proteínas, es posible crear un mapa de interacción que permita realizar comparaciones en 2D. Este análisis se utiliza cuando las proteínas a estudiar tienen un estado oligomérico distinto a un monómero, por ejemplo, que se encuentre como homodímero u homotetrámero. De manera general, esto se lleva a cabo empleando distintas herramientas bioinformáticas y el proceso se describe a continuación:

1. Selección de secuencias que se van a analizar. Es necesario que al menos una de las secuencias ya este resuelta estructuralmente. Esta secuencia es la proteína que se toma como referencia.
2. Se hace una búsqueda de los residuos que interactúan en la zona de interfase entre cada subunidad. En este proyecto, esto se realizó con el programa Getcontact (<https://getcontacts.github.io/>). Los archivos de salida con la red de contactos que se generaron tienen extensión JSON que se visualiza en la interfaz flareplot.
3. Estas interacciones se visualizaron en FLAREPLOT y en VMD.
4. A partir de la identificación de los residuos involucrados en la zona de interfase de la proteína dilucidada, se hizo un alineamiento de secuencia con la proteína que se está estudiando (Icdh) y se hizo una búsqueda dentro del alineamiento de los residuos identificados en la zona de interfase.
5. Dependiendo de los residuos que se conserven en la zona de interfase, se puede inferir si la proteína que se está estudiando pudiere compartir el mismo estado oligomérico que la proteína de referencia.

6.2.3 Estudio de las Icl de *A. schindleri* ACE y *E. coli* a nivel de estructura primaria, secundaria y terciaria.

La enzima isocitrato liasa (Icl) cataliza la reacción presentada en la ecuación 4:



Utiliza Mg^{2+} como cofactor y está codificada por el gen *aceA*.

En *E. coli* se encuentra en el operón *aceBAK*, mientras que en *A. schindleri* ACE no se encuentra en ningún operón. En el presente proyecto se tomaron las secuencias en formato FASTA de aa de las bases de datos KEEG y UNIPROT tal como en la sección 6.2.1. Para la recopilación de las secuencias de las Icl del género *Acinetobacter* se utiliza la base de datos UNIPROT. La selección de las secuencias a estudiar se presenta en la Figura 13. La Icl de *E. coli* se toma de UNIPROT (ID: [P0A9G6](#)).

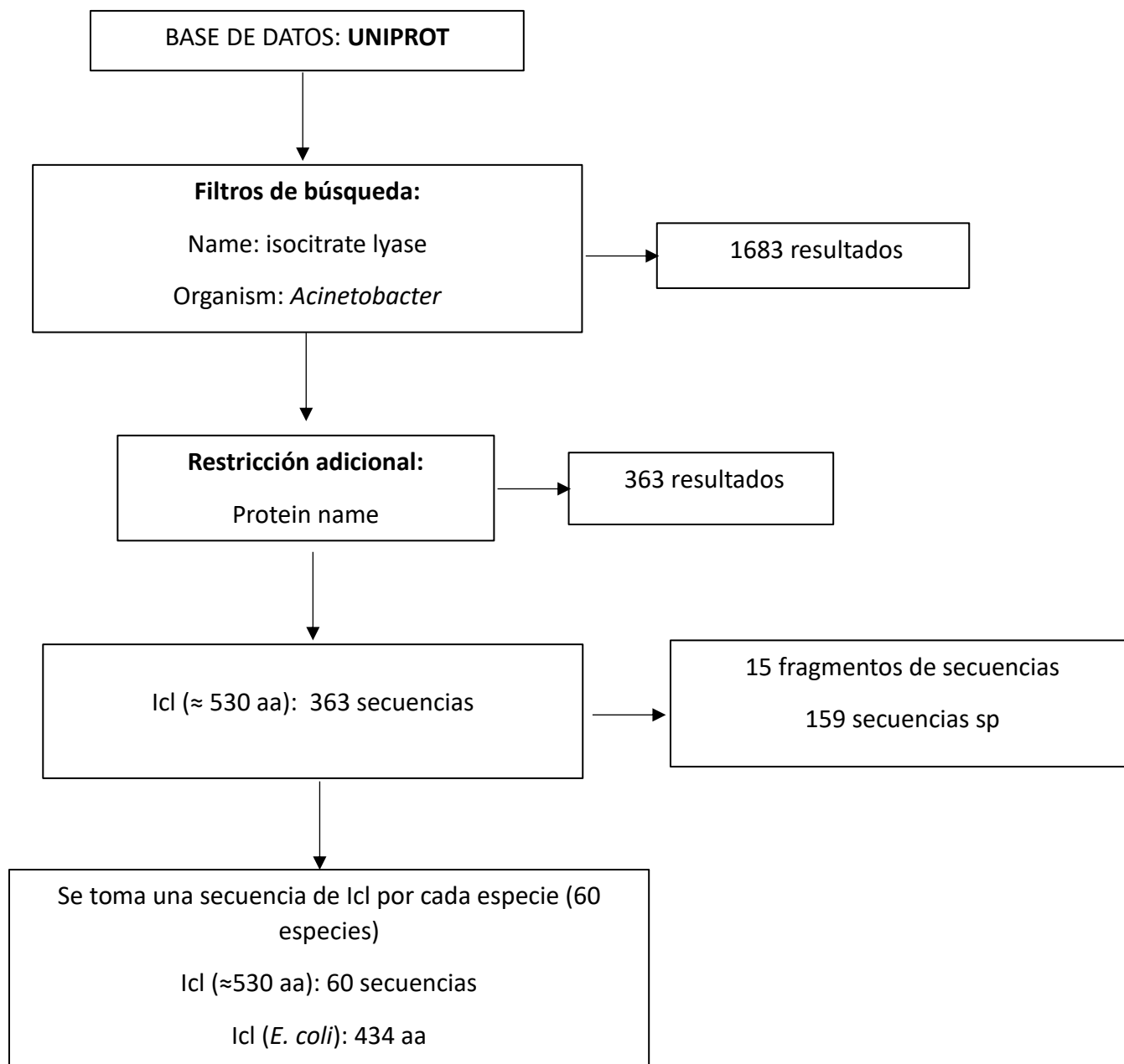


Figura 13. Diagrama de flujo de recopilación de secuencias Icl género *Acinetobacter* y la Icl de *E. coli*.

El nombre y las ID de las secuencias de las Icl que se seleccionaron se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Icl seleccionadas de 60 especies del género *Acinetobacter* y la secuencia de la Icl de *E. coli*.

	Organismo	ID	Longitud
1	<i>Acinetobacter baumannii</i>	<u>V5VH61</u>	534
2	<i>Acinetobacter guillouiae</i>	<u>A0A077KW22</u>	534
3	<i>Acinetobacter baylyi</i>	<u>Q6FD89</u>	532
4	<i>Acinetobacter schindleri</i> ACE	<u>AsACE_CH02022</u>	533
5	<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	<u>A0A1L6KLC5</u>	532
6	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	<u>A0A2K8UPQ4</u>	533
7	<i>Acinetobacter junii</i>	<u>A0A380UN25</u>	532
8	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	<u>A0A510WYH6</u>	534
9	<i>Acinetobacter bereziniae</i>	<u>A0A0A8TTK0</u>	534
10	<i>Acinetobacter oleivorans</i>	<u>A0A0B2UAN6</u>	534
11	<i>Acinetobacter gernerii</i> DSM	<u>N8ZU57</u>	534
12	<i>Acinetobacter indicus</i>	<u>A0A1Z9Z4B2</u>	533
13	<i>Acinetobacter venetianus</i>	<u>A0A150HQU8</u>	534
14	<i>Acinetobacter tandoii</i>	<u>A0A5N4WTT9</u>	534
15	<i>Acinetobacter beijerinckii</i> CIP	<u>N9EDR4</u>	534
16	<i>Acinetobacter radioresistens</i>	<u>A0A2T1IYR3</u>	534
17	<i>Acinetobacter bohemicus</i>	<u>A0A1I6Q901</u>	533
18	<i>Acinetobacter parvus</i> DSM	<u>N8RU15</u>	534
19	<i>Acinetobacter towneri</i>	<u>A0A1E8E5K3</u>	533
20	<i>Acinetobacter brisouii</i> CIP	<u>V2UVI8</u>	534
21	<i>Acinetobacter bouvetii</i>	<u>A0A4Q7ARZ5</u>	534
22	<i>Acinetobacter nosocomialis</i>	<u>A0A0A7XTC4</u>	534
23	<i>Acinetobacter soli</i>	<u>A0A1P8EIH5</u>	534
24	<i>Acinetobacter colistiniresistens</i>	<u>N9R6Q8</u>	534
25	<i>Acinetobacter variabilis</i>	<u>N9NWD2</u>	533

26	<u><i>Acinetobacter tjernbergiae</i> DSM</u>	<u>V2V2X7</u>	534
27	<u><i>Acinetobacter defluvii</i></u>	<u>A0A2S2FEW3</u>	534
28	<u><i>Acinetobacter calcoaceticus</i></u>	<u>F0KGW7</u>	534
29	<u><i>Acinetobacter larvae</i></u>	<u>A0A1B2LXN9</u>	533
30	<u><i>Acinetobacter equi</i></u>	<u>A0A0N9VWG7</u>	533
31	<u><i>Acinetobacter ursingii</i></u>	<u>A0A3G9FTV3</u>	532
32	<u><i>Acinetobacter celticus</i></u>	<u>A0A1C3CY18</u>	533
33	<u><i>Acinetobacter idrijaensis</i></u>	<u>A0A098YM67</u>	533
34	<u><i>Acinetobacter wuhouensis</i></u>	<u>A0A385C812</u>	534
35	<u><i>Acinetobacter cumulans</i></u>	<u>A0A3A8G012</u>	534
36	<u><i>Acinetobacter kookii</i></u>	<u>A0A1G6H3R1</u>	534
37	<u><i>Acinetobacter gandensis</i></u>	<u>A0A1A7R8V3</u>	534
38	<u><i>Acinetobacter populi</i></u>	<u>A0A1Z9YYE6</u>	534
39	<u><i>Acinetobacter marinus</i></u>	<u>A0A1G6JPH0</u>	531
40	<u><i>Acinetobacter pseudolwoffii</i></u>	<u>A0A2H9YTC7</u>	533
41	<u><i>Acinetobacter qingfengensis</i></u>	<u>A0A1E7REI2</u>	532
42	<u><i>Acinetobacter chinensis</i></u>	<u>A0A3B7LX59</u>	533
43	<u><i>Acinetobacter albensis</i></u>	<u>A0A1C4GSH2</u>	533
44	<u><i>Acinetobacter kyonggiensis</i></u>	<u>A0A1H3J037</u>	533
45	<u><i>Acinetobacter piscicola</i></u>	<u>A0A4Q4GT90</u>	534
46	<u><i>Acinetobacter guerrae</i></u>	<u>A0A3A8EN27</u>	534
47	<u><i>Acinetobacter shaoyimingii</i></u>	<u>A0A6G8RXR6</u>	534
48	<u><i>Acinetobacter puyangensis</i></u>	<u>A0A240E5X6</u>	533
49	<u><i>Acinetobacter wanghuae</i></u>	<u>A0A5Q0P493</u>	533
50	<u><i>Acinetobacter lanii</i></u>	<u>A0A6G8S286</u>	533
51	<u><i>Acinetobacter pittii</i></u>	<u>A0A0M3BV67</u>	534
52	<u><i>Acinetobacter proteolyticus</i></u>	<u>A0A653K8B9</u>	534
53	<u><i>Acinetobacter gyllenbergii</i></u>	<u>A0A1B8UF55</u>	534
54	<u><i>Acinetobacter seifertii</i></u>	<u>N8QVA1</u>	534
55	<u><i>Acinetobacter rudis</i> CIP 110305</u>	<u>S3NJY9</u>	533

56	<i>Acinetobacter lactucae</i>	<u>A0A1V0KDM5</u>	534
57	<i>Acinetobacter pragensis</i>	<u>A0A151XXC8</u>	534
58	<i>Acinetobacter dispersus</i>	<u>A0A6P1LL33</u>	534
59	<i>Acinetobacter halotolerans</i>	<u>A0A4Q6XD35</u>	533
60	<i>Acinetobacter sichuanensis</i>	<u>A0A371YRE2</u>	534
61	<i>E. coli (strain K12)</i>	<u>P0A9G6</u>	434

Las secuencias de las Icl mostradas en la tabla 3 se utilizaron para hacer alineamientos, dendogramas, mapeo de la zona de interfase, entre otros análisis.

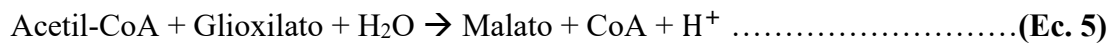
- Para los alineamientos de secuencia se empleó el servidor Clustal Omega Multiple Sequence Alignment [EMBL-EBL](#).
- Hasta ahora ninguna Icl del género *Acinetobacter* ha sido resuelta estructuralmente, por lo que se realiza una búsqueda de Icl que compartan alto porcentaje de identidad con la Icl de *A. schinderei* ACE.
- Se utilizaron los servidores I-TASSER y SWISS MODEL para hacer la predicción de la estructura de la Icl de *A. schinderei* ACE.
- De acuerdo con la predicción realizada con I-TASSER, la Icl de *Pseudomonas aeruginosa* presenta el mayor porcentaje de identidad (73.4 %) y una desviación cuadrática media (RMSD) de 0.93, el resto de los PDBs no superan el 30 % de identidad ni valores de RMSD mayores a 2 (Ver anexo II), por lo tanto, la proteína elegida como referencia es la Icl de *Pseudomonas aeruginosa* (PDB ID: 6G1O).
- Se valida la predicción mediante Saves v6.0 y su estado oligomérico con un mapeo en la zona de interfase y se obtiene su grafico de Ramachandran.

Nota: El RMSD es una medida estándar de distancia estructural entre coordenadas. Mide la distancia promedio entre grupos de átomos, este valor representa el grado de divergencia de las estructuras alineadas, valores cercanos a 0 indicaría que son proteínas prácticamente iguales.

6.2.4 Estudio de las GlcB de *A. schindleri* ACE y *E. coli* a nivel de estructura primaria, secundaria y terciaria.

Existen dos isoformas de la enzima malato sintasa. La malato sintasa A codificada por el gen *aceB* y la malato sintasa G codificada por el gen *glcB*.

La malato sintasa G (GlcB) cataliza la reacción presentada en la ecuación 5:



y utiliza Mg^{2+} como cofactor.

Tanto *A. schindleri* ACE como el resto de las bacterias del género *Acinetobacter* reportadas hasta este momento cuentan sólo con la malato sintasa G, mientras que *E. coli* cuenta con ambas, la malato sintasa G y la malato sintasa A. En el presente proyecto se realizó una comparación entre ambas isoformas, con mayor énfasis en el análisis de la malato sintasa G. Se tomaron las secuencias en formato FASTA de (aa) de las bases de datos KEEG y UNIPROT. Para la recopilación de las secuencias de las GlcB del género *Acinetobacter* se utilizó la base de datos UNIPROT. La selección de las secuencias a estudiar se presenta en la figura 14. La Icl de *E. coli* se toma de UNIPROT (ID: [P37330](#)).

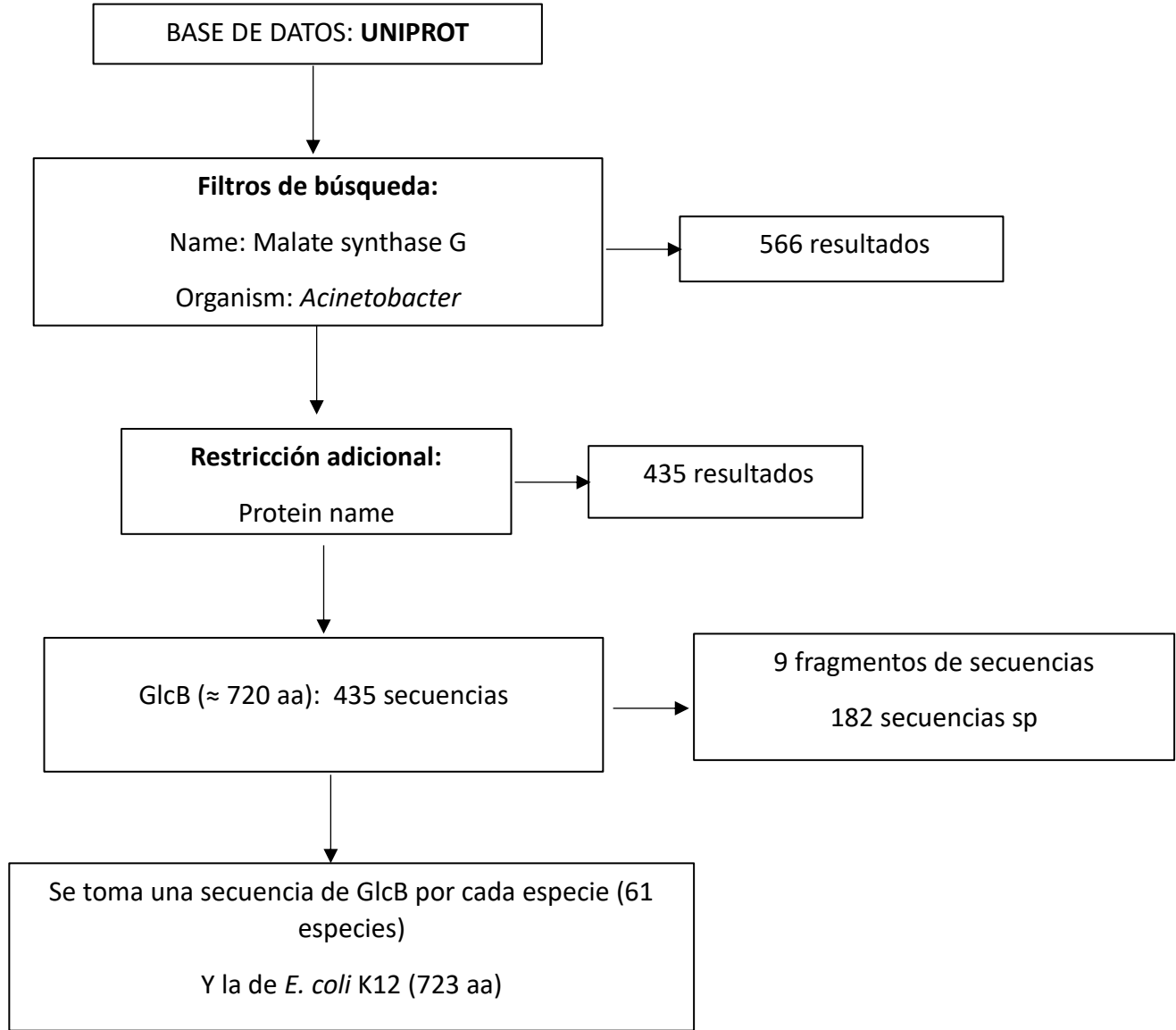


Figura 14. Diagrama de flujo de la recopilación de secuencias GlcB del género *Acinetobacter* y la GlcB de *E. coli*.

El nombre y ID de las secuencias de la GlcB que se seleccionaron se muestran en la tabla 4.

Tabla 4: GlcB seleccionadas de 61 especies del género *Acinetobacter*, la secuencia de la GlcB de *E. coli*.

No.	Organismo	ID	Longitud
1	<i>Acinetobacter pittii</i>	<u>A0A1431Z59</u>	721
2	<i>Acinetobacter bereziniae</i>	<u>A0A0A8TJJ3</u>	720

3	<u><i>Acinetobacter guillouiae</i></u>	<u>A0A077L0T4</u>	720
4	<u><i>Acinetobacter lanii</i></u>	<u>A0A6G8S4W4</u>	720
5	<u><i>Acinetobacter shaoyimingii</i></u>	<u>A0A6G8RUS1</u>	720
6	<u><i>Acinetobacter calcoaceticus</i></u>	<u>A0A446ZKB1</u>	721
7	<u><i>Acinetobacter oleivorans</i></u>	<u>A0A0B2UEX5</u>	721
8	<u><i>Acinetobacter baylyi</i> (strain ATCC 33305 / BD413 / ADP1)</u>	<u>Q6F9Z8</u>	720
9	<u><i>Acinetobacter indicus</i></u>	<u>A0A1Z9Z9I5</u>	721
10	<u><i>Acinetobacter baumannii</i></u>	<u>A0A059ZRX9</u>	721
11	<u><i>Acinetobacter venetianus</i></u>	<u>A0A137XKH3</u>	720
12	<u><i>Acinetobacter beijerinckii</i> CIP 110307</u>	<u>N9FK53</u>	720
13	<u><i>Acinetobacter gernerii</i> DSM 14967 = CIP 107464</u>	<u>N8ZRQ5</u>	720
14	<u><i>Acinetobacter gyllenbergii</i></u>	<u>A0A1B8UGG1</u>	720
15	<u><i>Acinetobacter bouvetii</i></u>	<u>A0A4Q7AT80</u>	720
16	<u><i>Acinetobacter tandoii</i></u>	<u>A0A5N4W740</u>	721
17	<u><i>Acinetobacter rudis</i> CIP 110305</u>	<u>S3N7C6</u>	721
18	<u><i>Acinetobacter bohemicus</i></u>	<u>A0A1I6T1U7</u>	720
19	<u><i>Acinetobacter soli</i></u>	<u>A0A1P8EFP0</u>	720
20	<u><i>Acinetobacter lwoffii</i></u>	<u>A0A4Y3J2D3</u>	721
21	<u><i>Acinetobacter schindleri</i> ACE</u>	<u>AsACE_CH01699</u>	721
22	<u><i>Acinetobacter parvus</i> NIPH 1103</u>	<u>N8RG91</u>	720
23	<u><i>Acinetobacter lactucae</i></u>	<u>A0A1V0KBQ5</u>	721
24	<u><i>Acinetobacter brisouii</i> CIP 110357</u>	<u>V2UTP4</u>	721
25	<u><i>Acinetobacter haemolyticus</i></u>	<u>A0A372MN00</u>	720
26	<u><i>Acinetobacter johnsonii</i></u>	<u>A0A239RQY5</u>	720
27	<u><i>Acinetobacter colistiniresistens</i></u>	<u>S3T9U3</u>	720
28	<u><i>Acinetobacter tjernbergiae</i> DSM 14971 = CIP 107465</u>	<u>V2V501</u>	720
29	<u><i>Acinetobacter seifertii</i></u>	<u>N8S853</u>	721
30	<u><i>Acinetobacter townneri</i></u>	<u>A0A1E8E187</u>	721

31	<u><i>Acinetobacter junii</i></u>	<u>A0A365PJF9</u>	720
32	<u><i>Acinetobacter equi</i></u>	<u>A0A0N9VFF3</u>	720
33	<u><i>Acinetobacter nosocomialis</i></u>	<u>A0A5Q0RQ88</u>	721
34	<u><i>Acinetobacter ursingii</i></u>	<u>A0A3F3L3J3</u>	721
35	<u><i>Acinetobacter variabilis</i></u>	<u>N9MHD7</u>	721
36	<u><i>Acinetobacter larvae</i></u>	<u>A0A1B2LYE8</u>	721
37	<u><i>Acinetobacter defluvii</i></u>	<u>A0A2S2FE05</u>	720
38	<u><i>Acinetobacter wuhouensis</i></u>	<u>A0A385C3B6</u>	720
39	<i>Acinetobacter radioresistens</i>	<u>A0A2T1IZW0</u>	721
40	<u><i>Acinetobacter qingfengensis</i></u>	<u>A0A1E7QYQ7</u>	720
41	<u><i>Acinetobacter cumulans</i></u>	<u>A0A3A8FV70</u>	720
42	<u><i>Acinetobacter gandensis</i></u>	<u>A0A1A7RA44</u>	720
43	<u><i>Acinetobacter idrijaensis</i></u>	<u>A0A098YK71</u>	721
44	<u><i>Acinetobacter pseudolwoffii</i></u>	<u>A0A2H9YQG0</u>	721
45	<u><i>Acinetobacter celticus</i></u>	<u>A0A1C3CVW3</u>	720
46	<u><i>Acinetobacter pragensis</i></u>	<u>A0A151Y388</u>	720
47	<u><i>Acinetobacter chinensis</i></u>	<u>A0A3B7LUZ1</u>	720
48	<u><i>Acinetobacter kookii</i></u>	<u>A0A1G6GRM1</u>	720
49	<u><i>Acinetobacter puyangensis</i></u>	<u>A0A240ED72</u>	720
50	<u><i>Acinetobacter populi</i></u>	<u>A0A1Z9YYU0</u>	720
51	<u><i>Acinetobacter marinus</i></u>	<u>A0A1G6GMJ2</u>	720
52	<u><i>Acinetobacter albensis</i></u>	<u>A0A1C4GUX6</u>	720
53	<u><i>Acinetobacter kyonggiensis</i></u>	<u>A0A1H3IBB2</u>	720
54	<u><i>Acinetobacter proteolyticus</i></u>	<u>A0A2N0WEH2</u>	720
55	<u><i>Acinetobacter guerrae</i></u>	<u>A0A3A8ENQ0</u>	721
56	<u><i>Acinetobacter dispersus</i></u>	<u>A0A6P1LJ8</u>	720
57	<u><i>Acinetobacter sichuanensis</i></u>	<u>A0A371YL35</u>	720
58	<u><i>Acinetobacter halotolerans</i></u>	<u>A0A4Q6XLL9</u>	720
59	<u><i>Acinetobacter wanghuae</i></u>	<u>A0A5Q0P3A3</u>	721
60	<u><i>Acinetobacter piscicola</i></u>	<u>A0A4Q4H1Q3</u>	721

61	<i>Acinetobacter boissieri</i>	<u>A0A1G6IY41</u>	721
62	<i>E coli</i>	<u>P37330</u>	723

Las secuencias de las GlcB mostradas en la tabla 3 se utilizaron para hacer alineamientos, dendogramas, entre otros análisis. Para los alineamientos de secuencia se empleó el servidor Clustal Omega. Hasta ahora ninguna GlcB del género *Acinetobacter* ha sido dilucidada estructuralmente. Se hace una búsqueda de distintas GlcB reuelttas, y se consideró la que tiene mayor porcentaje de identidad con la GlcB de *A. schinderei* ACE.

Para hacer la predicción de la GlcB de *A. schinderei* ACE se utilizaron dos servidores: I-TASSER y SWISS MODEL. Se validó la predicción mediante Saves v6.0 y se determinó su grafico de Ramachandran.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

7.1 Efecto de la deleción *in silico* del gen *ackA* y *acs* en la simulación de flujos de carbono de *A. schindleri* ACE y *E. coli* JM101.

A continuación, se describen y analizan de manera general los resultados obtenidos de la deleción *in silico* de los genes *ackA* y *acs* de *A. schindleri* ACE, así como la comparación con su control. Posteriormente se hará lo mismo con los resultados de *E. coli* JM101, comparándolos con su control.

7.1.1 *A. schindleri* ACE.

Para el FBA de *A. schindleri* ACE se tomó como único valor experimental la μ (0.93 h^{-1}) y se optimizó maximizando el consumo de acetato (Sigala *et. al.* 2019). Dichos flujos se observan en color azul de la figura 15.

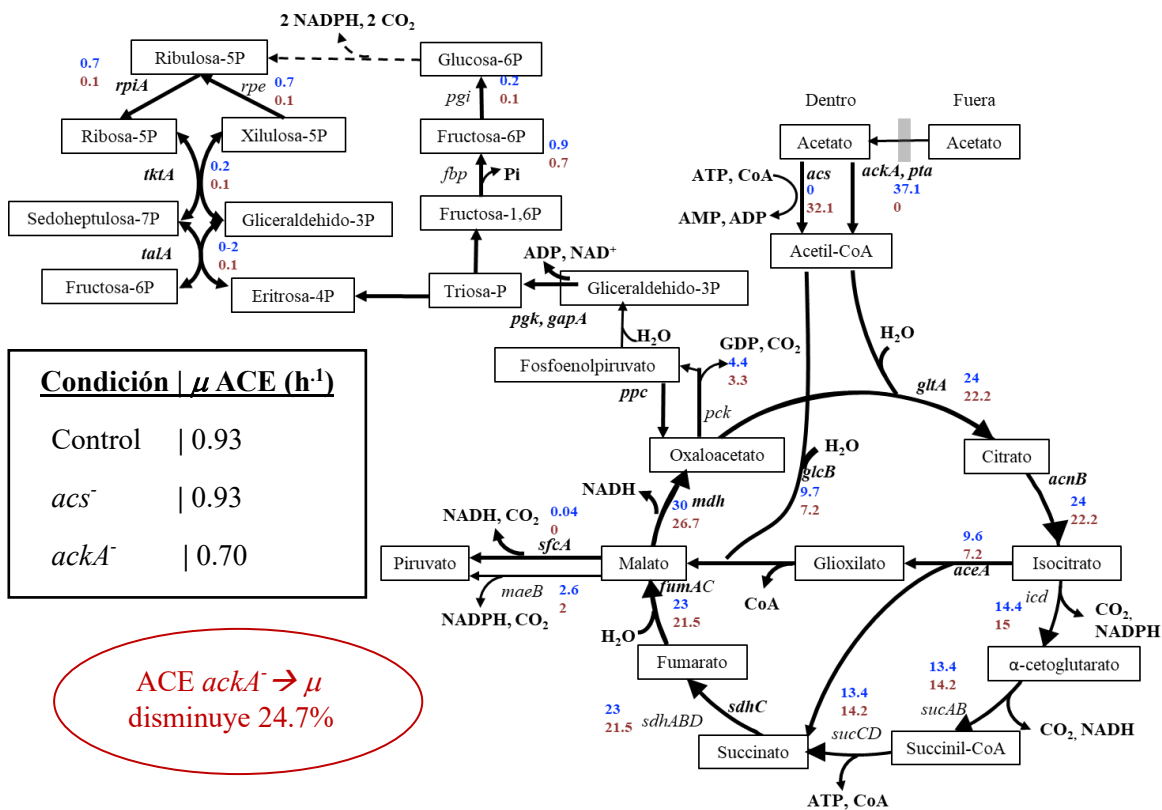


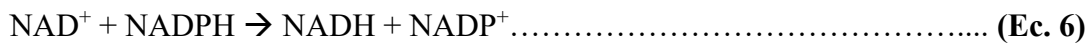
Figura 15. Flujos metabólicos de *A. schindleri* ACE control (azul) y de la deleción *in silico* de *ackA* (rojo). La condición control y *A. schindleri* ACE *acs*⁻ muestran que no hay cambios en los flujos. *A. schindleri* ACE *ackA*⁻ con respecto al control disminuye un 24.7%.

Sin embargo, para fines de este estudio donde se espera ver la redistribución de los flujos en el metabolismo central de *A. schindleri* ACE al realizar la delección *in silico* de los genes *ackA* y *acs*, no se pueden tomar en cuenta las mismas restricciones que en el control debido a que al tener fija una μ sería imposible observar la variabilidad en este parámetro al hacer dichas delecciones. Por tanto, se utilizó como parámetro fijo la demanda de oxígeno óptima requerida para que *A. schindleri* ACE alcance una μ de 0.93 h^{-1} , y se optimizó maximizando el valor de la μ .

Al realizar la delección *in silico* de *acs*, los flujos en las vías metabólicas del metabolismo central del carbono se comportaron de la misma manera que en el control. Por tanto, en la Figura 15 en color rojo sólo se muestran los flujos obtenidos cuando se realiza la delección de *ackA*. Los detalles de todos los flujos obtenidos de la vía metabólica completa en el control y en la propuesta de función objetivo y restricción se pueden encontrar en el Anexo III.

Al realizar la delección de *ackA* se observa que la μ disminuye 24.7% respecto al control. Aunado a ello, la q_s también se ve alterada, disminuyendo un 16.2%, lo cual indica que la eliminación de la vía AckA-Pta repercute negativamente en el crecimiento de *A. schindleri* ACE. Sin embargo, su crecimiento aún es posible con esta delección. En principio, se observaba que el modelo metabólico reducido utilizado para este estudio arrojaba un flujo de 0 para Acs (Sigala *et al*, 2019) pero al deletar *in silico* *ackA* todo el flujo se redirige a la vía Acs, siendo esta vía la utilizada para asimilar la totalidad del acetato. Por su parte, en el nodo del isocitrato se presenta un ligero incremento de flujo del 4.1% en *A. schindleri ackA* hacia la formación de α -cetoglutarato por actividad de la Icdh. En consecuencia, el flujo hacia la formación de glioxilato por actividad de la Icl disminuye en un 25 %. Cabe mencionar que la relación de flujos de Icdh/Icl para el caso control es de 1.5, mientras que para *ackA* esta relación aumenta a 2.1, es decir, aumenta un 40%. Lo anterior indica que se requiere que el flujo se dirija en mayor medida hacia CATC que a la RG. Probablemente esta sea la razón por la que la μ disminuya para *A. schindleri ackA* ya que parte del carbono se pierde en dos descarboxilaciones del CATC. Es interesante observar que bajo el escenario *ackA* en el que el flujo a través de Icdh tiene un aumento ligero, el flujo a través de MaeB disminuye 23% mientras que el flujo debido a SfcA se queda en 0 y el de Mdh disminuye 11%.

El flujo hacia el citocromo CYTBOB_4 permanece constante, y el flujo hacia el citocromo NADH16 aumenta sólo un 3%. Por otro lado, se presenta un incremento debido a la actividad de una de las transhidrogenasas (NADTRHD), la cual aumenta su flujo de 0 mmol /DCW/h a 4.21 mmol / DCW/h, es decir, aumenta su flujo 421%. NADTRHD es una transhidrogenasa que presenta la reacción descrita en la ecuación 6



Parece ser que en *A. schindleri* ACE *ackA*⁻ es importante la actividad de NADTRHD para mantener un balance favorable de poder reductor, lo cuál resulta interesante, ya que para *E. coli* si se ha reportado, que dependiendo de la transhidrogenasa de estudio y bajo ciertas condiciones fisiológicas, la sobreexpresión de algunas transhidrogenasas puede aumentar tanto el rendimiento del producto como la disponibilidad de NADPH (Jan *et al.* 2013).

PckA es una de las enzimas que conecta el flujo de CATC hacia la ruta gluconeogénica y disminuye 25% en *A. schindleri* ACE *ackA*⁻ como consecuencia de la disminución concertada en la asimilación de acetato y en los flujos de CATC. Por otra parte, el flujo de fosfoenol piruvato sintetasa (Pps) es de 0, lo que evidenciaría que el flujo a través de las enzimas málicas es sólo para suplir a la célula de piruvato para generación de biomasa y generar algo de poder reductor. En la parte superior de la vía gluconeogénica de *A. schindleri* ACE, el flujo a través de Fbp decrece un 22%.

Finalmente, dado que se utilizó como parámetro fijo el requerimiento de oxígeno, no se puede ver esta variable bajo estas condiciones. Dado que el modelo metabólico utilizado es un modelo reducido, valdría la pena realizar las mismas simulaciones utilizando un modelo metabólico a escala genómica que involucre más reacciones, además de realizar de manera experimental las deleciones de *ack* y *acs* para determinar cómo es que dichas modificaciones influyen en la μ , q_s , $Y_{x/s}$ y coeficiente respiratorio.

7.1.2 *E. coli* JM101.

Los parámetros control para FBA de *E. coli* JM101 fueron los valores experimentales de consumo de O₂, generación de CO₂, μ (0.33 h⁻¹) y se optimizó maximizando el consumo de acetato (Sigala *et. al.*2019). Los flujos obtenidos se presentan en color azul en la figura 16 y se consideran como control. Por otro lado, no se pudo mantener como parámetro fijo la μ (0.33 h⁻¹) en las simulaciones de inactivación *in silico* del gen *ackA* y *acs* en *E. coli*. Por tal motivo, al igual que en el caso de *A. schindleri* ACE se optimiza maximizando la μ , aunque se mantienen los otros parámetros experimentales fijos: consumo de O₂ y generación de CO₂. En la figura 16 se observan en color naranja los flujos de *E. coli* JM101 *acs*⁻.

Es interesante mencionar que el modelo en *E. coli* JM101 *ackA*⁻ predice que la μ es igual a 0, es decir, la cepa no es capaz de crecer (Anexo IV). Esto concuerda con estudios realizados previamente por Castaño Cerezo y colaboradores en 2009 donde al hacer el *knock-out* de *pta* observaron que se generó un fenotipo que altera más su crecimiento cuando se deletó *acs*. Además, demostraron que la delección de *pta* redujo la capacidad de *E. coli* de crecer en acetato como fuente de carbono, además de afectar la expresión de varios genes relacionados con las vías metabólicas centrales. Cuando se usa acetato como fuente de carbono, la expresión conjunta de *pta* y *acs* es crucial para el crecimiento y la asimilación del sustrato. A nivel adaptativo, la deficiencia de *pta* hace que la cepa sea más sensible a cambios ambientales y desregula el metabolismo central (Castaño & Cerezo *et al.* 2009).

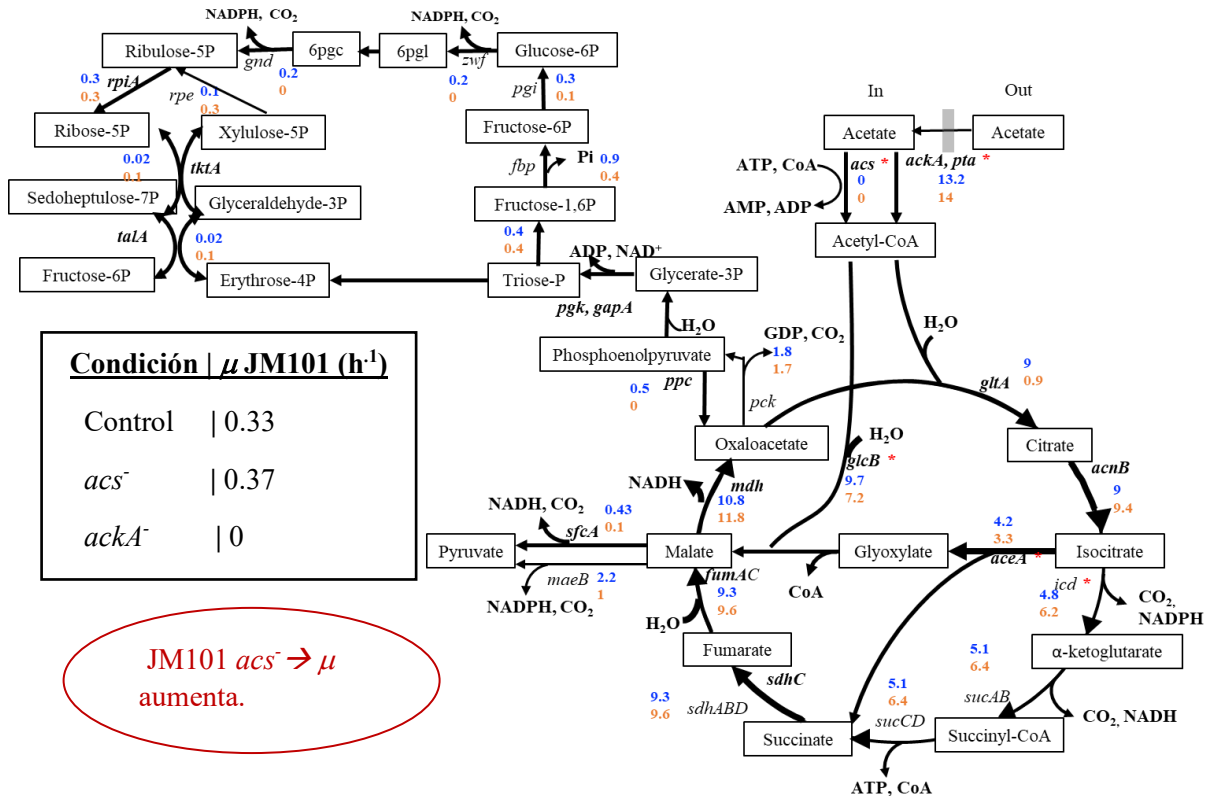


Figura 16. Flujos metabólicos de *E. coli* JM101 control (azul) y con deleción *acs* (naranja). *E. coli acs*⁻ muestra un aumento de la μ del 12%, mientras que *E. coli ackA*⁻ es un gen esencial, pues al ser deletado se muestra una μ de 0.

Para *E. coli* JM101 *acs*⁻ se observa que la μ aumenta de 0.33 a 0.37 h^{-1} , valor que se encuentra dentro del intervalo experimental (Sigala et al, 2019). Sin embargo, en el modelo el flujo hacia Icdh aumenta un 27% mientras que el flujo hacia Icl disminuye un 20%. Por su parte, la malato deshidrogenasa dependiente de $NADP^+$ (*maeB*) disminuye su flujo de 2.2 a 1, lo cual tiene sentido debido al incremento en la actividad de Icdh. Lo anterior también justifica la disminución de la μ , ya que en el CATC por acción de la isocitrato deshidrogenasa y la α -cetoglutarato deshidrogenasa se generan 2 de las 3 descarboxilaciones del CATC. Aunado a ello, el flujo NAD^+ disminuye un 81%, favoreciendo una mayor disponibilidad de $NADPH$. Por su parte, la malato deshidrogenasa dependiente de NAD^+ disminuye su flujo de 0.4 a 0.1, aunque el flujo hacia Mdh aumenta 9% como respuesta a su requerimiento de $NADH$.

Para *E. coli* JM101 al igual que en *A. schindleri* ACE, el flujo de fosfoenol piruvato sintetasa (Pps) es de 0, lo que evidenciaría que el flujo a través de las enzimas málicas es sólo para suplir a la célula de piruvato para generación de biomasa y generar algo de poder reductor. Por tanto, el flujo de CATC hacia la ruta gluconeogénica se da principalmente por la PckA y no hay una variación significativa entre el control y *E. coli* JM101 *acs*⁻. Finalmente, el flujo a través de Fbp disminuye 55%, lo que indica que el flujo hacia la parte superior de gluconeogénesis disminuye en general.

Con respecto a la fase oxidativa de la ruta de las pentosas fosfato, el flujo de las enzimas G6PDH y GND disminuyen en su totalidad; esto tiene concordancia con lo reportado por Oh *et al.* 2002 quienes proponen que Icdh es la principal fuente de NADPH en el metabolismo de acetato. Lo anterior supone que el papel principal de la vía de las pentosas fosfato en el metabolismo de acetato de *E. coli* es proporcionar eritrosa-4-P y ribosa 5-fosfato para biosíntesis de nucleótidos y aminoácidos aromáticos, y su función como fuente de NADPH es insignificante. Cabe mencionar que *A. schindleri* ACE no cuenta con G6PDH ni GND, por lo que esta parte de la vía de la PP no se considera en el modelo.

Por su parte, al comparar la fase no oxidativa de la ruta de las pentosas fosfato tanto en *E. coli* como en *A. schindleri* ACE se observa que los flujos en *A. schindleri* ACE *ackA*⁻ son casi iguales que en *E. coli* JM101 *acs*⁻.

Finalmente, es importante mencionar que a partir del modelo metabólico reducido utilizado anteriormente en nuestro grupo (Sigala *et al.*, 2019) en el que se toman como restricciones valores experimentales de consumo de O₂, generación de CO₂, μ (0.33 h⁻¹), el modelo arrojaba un flujo hacia Acs de 0. Este dato no concuerda con lo reportado experimentalmente por Oh *et al.* 2002, quienes demostraron por medio de un análisis transcripcional que Acs es la principal vía de asimilación de acetato en *E. coli* en comparación a su crecimiento en glucosa. Faltaría en el modelo poder establecer la parte que corresponda a los flujos entre AckA-Pta y Acs, ya que si la asimilación de acetato como fuente de carbono en el crecimiento de *E. coli* se debe principalmente a la vía Acs, parte del flujo se debe dar por la vía de AckA-Pta ya que esta última tiene mayor influencia en el metabolismo de *E. coli*.

Como se mencionó en los antecedentes, AckA-Pta es una ruta reversible con una K_m de 7-10 mM que se encuentra en un operón expresado de manera constitutiva y que genera

acetilfosfato, que es un intermedio inestable y que se sabe fosforila proteínas relacionadas con diferentes vías de transducción de señales (Castaño & Cerezo *et al.* 2009). Cuando se deleta alguno de los dos genes *ackA* o *pta* se presenta una afectación a nivel global y en el crecimiento de *E. coli* por lo que se espera exista un flujo a través de esta vía al crecer *E. coli* en acetato como única fuente de carbono.

Valdría la pena realizar una búsqueda de modelos a escala genómica de *E. coli* que involucren mecanismos regulatorios, así como hacer uso de metodologías que existen sobre cómo integrar datos de expresión y observar si los datos determinados por Oh *et al.* 2002 se pueden replicar al utilizar los parámetros experimentales publicados por J. Sigala y colaboradores en 2019.

7.2 Análisis de sensibilidad de la actividad de la enzima isocitrato deshidrogenasa e isocitrato liasa mediante FBA en *A. schindleri* ACE y *E. coli* JM101.

Hasta ahora se sabe que la enzima Icdh se regula en *E. coli* pero no en *Acinetobacter*. Es importante tomar en cuenta cómo se lleva a cabo en *E. coli* la regulación de las enzimas que se encuentran involucradas en el nodo del isocitrato (Icdh e Icl). En *E. coli* los genes *aceK* (isocitrato deshidrogenasa cinasa/fosfatasa bifuncional), *aceA* (isocitrato liasa) y *aceB* (malato sintasa A) se encuentran en el operón *aceBAK*, mientras que, *A. schindleri* ACE no tiene el gen *aceB* ni el gen *aceK*. Para *E. coli* la Icdh se encuentra activa cuando está desfosforilada y gradualmente disminuye su afinidad por el sustrato a medida que se fosforila; estas actividades están mediadas por AceK. El operón *aceBAK* se encuentra regulado a su vez por otros factores de transcripción como IcIR, en el que el glioxilato favorece su estado dimérico inactivo mientras que el piruvato aumenta la unión de IcIR al promotor *aceBp* estabilizando la forma dimérica de la proteína. El operón *aceBAK* también se encuentra regulado por CRA.

A continuación, se presenta el análisis de modulación de la actividad de Icdh de *A. schindleri* ACE y *E. coli* JM101.

7.2.1 Análisis de sensibilidad de flujos en *A. schindleri* ACE.

Debido a que en *A. schindleri* ACE no existe regulación en Icdh, es importante observar cómo se distribuyen o modulan los flujos del nodo del isocitrato. Esto se realiza por FBA bajo la condición de que la μ sea la máxima reportada experimentalmente (0.93 h^{-1}). Para ello, primero se deletaron los genes *icd* y *aceA* por separado, lo que resultó en que el modelo

no tenía resolución. Con la delección de cualquiera de los dos genes *icd* y *aceAA*, *schindleri* ACE es incapaz de crecer con acetato como fuente de carbono, concordando con lo reportado para *E. coli*, ya que, sin esos genes (*icd* y *aceA*), es incapaz de crecer utilizando acetato como fuente de carbono (Castaño & Cerezo *et al.* 2009). Posteriormente, se modularon las actividades de Icdh e Icl para evaluar su efecto en la distribución de flujos y la μ . El parámetro control del FBA para este caso fue el consumo de acetato (EX_ac (e)) con un valor de de 37.13 mmol/DCW/h lo que equivale a 1.52 g de acetato/L*h, se optimizó maximizando la μ y se variaron los flujos de Icl en un intervalo de 0.85 hasta 27 mmol/DCW/h (Figura 17 y 18).

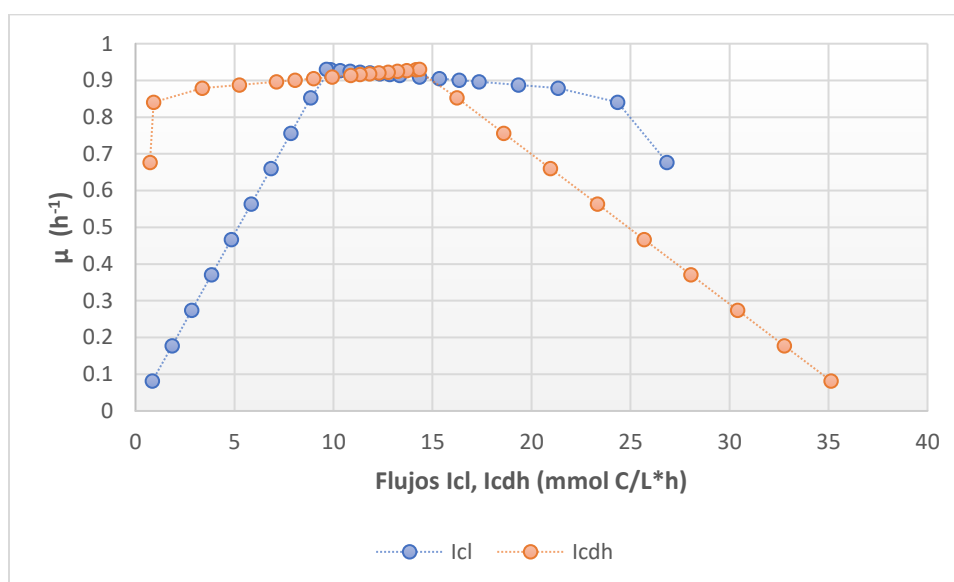


Figura 17: Intervalo de flujos de carbono de Icl e Icdh y su efecto sobre la μ de *A. schindleri* ACE.

El análisis comienza con el caso extremo donde Icl se fija en 0.84 mmol/DCW/h; para ello, el flujo calculado de Icdh sería 35.13 mmol/DCW/h, con una relación Icdh/Icl de 41.8 y una μ de 0.08 h^{-1} . Esto puede deberse a que aún bajo esa restricción de Icl, *A. schindleri* ACE aún es capaz de crecer aunque a una μ baja. Es claro que para que *A. schindleri* ACE crezca a su μ máxima, es necesario mantener los flujos de Icdh e Icl en un intervalo de 10 a 15 mmol/DCW/h. Es decir, cualquiera de los dos flujos de Icdh e Icl pueden variar su proporción, ya sea que haya mayor flujo hacia Icdh o Icl, siempre y cuando no excedan ese intervalo (10 a 15 mmol/DCW/h). Esto se aprecia de una mejor manera en la Figura 18 en la que se observa que una relación de flujos de Icdh/Icl con valores de 1 a 1.5 favorecen los

valores máximos de μ , llegando a tener un mayor flujo debido a Icdh (14.35 mmol/DCW/h) que de Icl (9.64 mmol/DCW/h).

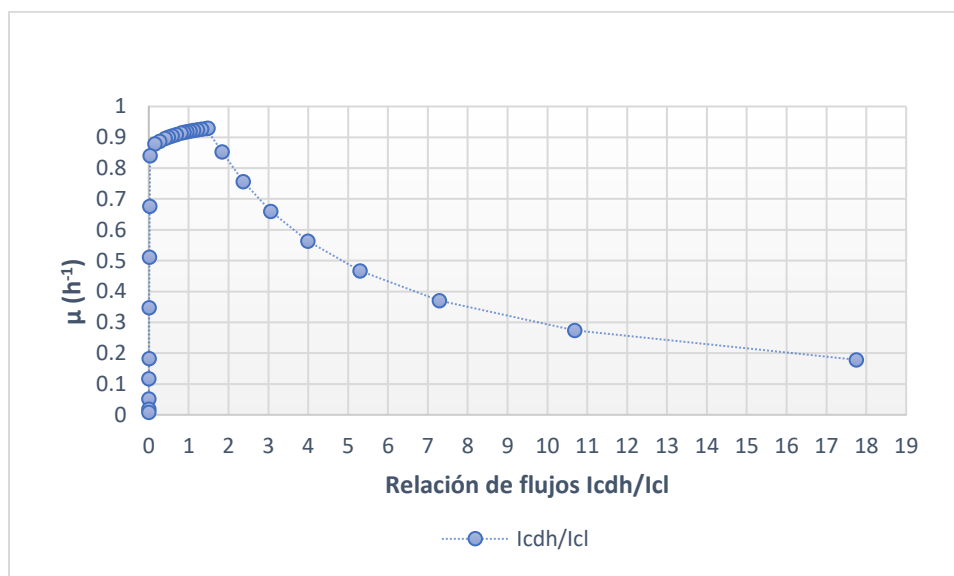


Figura 18: Influencia de la relación de flujos de Icdh/Icl sobre la μ de *A. schindleri* ACE.

En esta simulación se varía el flujo de Icl en un intervalo de 0.85 hasta 27 mmol/DCW/h. Con esto se establece que para alcanzar una μ máxima en *A. schindleri* ACE, deberá estar más activo el CATC que la RG; aunque es necesario el acoplamiento de ambas vías permitiendo así la generación de NADH para la producción de energía necesaria, así como el ahorro de esqueletos de carbono. Como se ha mencionado, para *A. schindleri* ACE no se presenta una regulación de la actividad de Icdh e Icl como ocurre en *E. coli*.

7.2.2 Análisis de sensibilidad de flujos en *E. coli* JM101.

Como todas las bacterias que crecen utilizando acetato como única fuente de carbono, *E. coli* requiere de la actividad de las enzimas de la RG. En esta vía, la Icl compite por el isocitrato con la Icdh; Icdh tiene mayor afinidad por el isocitrato en comparación con Icl. A pesar de ello, el flujo a través de la Icl se lleva a cabo por una alta concentración intracelular de isocitrato y la fosforilación/inactivación reversible de Icdh de la cual hemos hablado anteriormente. De manera general, Icdh experimenta cambios de dominio y/o cambios conformacionales de ajuste inducido para adaptarse a la unión de la cinasa/fosfatasa de Icdh (AceK), cuya función es fundamental para la adaptación y crecimiento de *E. coli* utilizando

acetato como fuente de carbono (Cozzone & El-Mansi, 2005). Al igual que en *A. schindleri* ACE, se realizó la modulación de la actividad de Icdh e Icl utilizando FBA. Para este caso se tomaron como restricciones el intervalo de consumo de O₂ y la generación de CO₂ experimentales (Tabla 1). Con esto en consideración, se maximizó la biomasa y se varió el flujo de Icl (Figura 19 y 20).

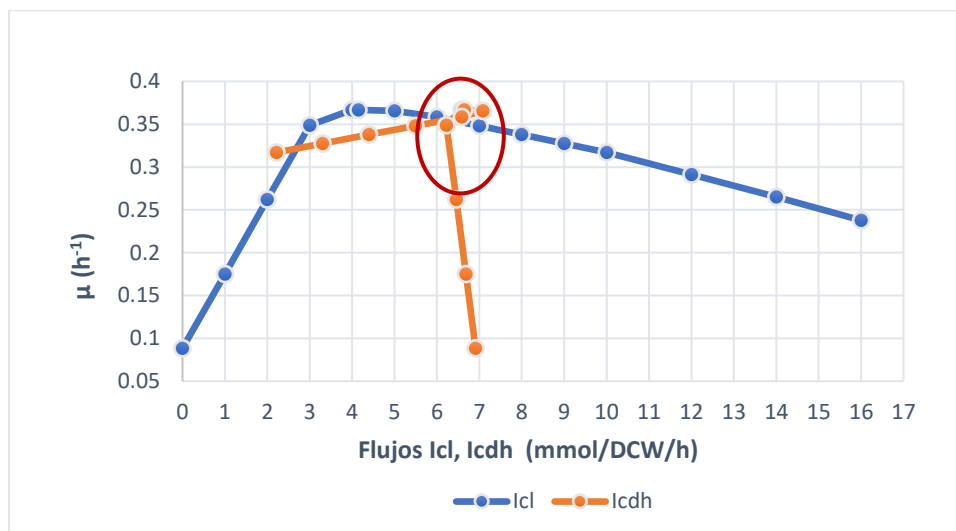


Figura 19. Intervalo de flujos de carbono de Icl e Icdh y su efecto sobre la μ de *E. coli*. En rojo se observa como decae la μ cuando se sigue incrementando el flujo de Icl

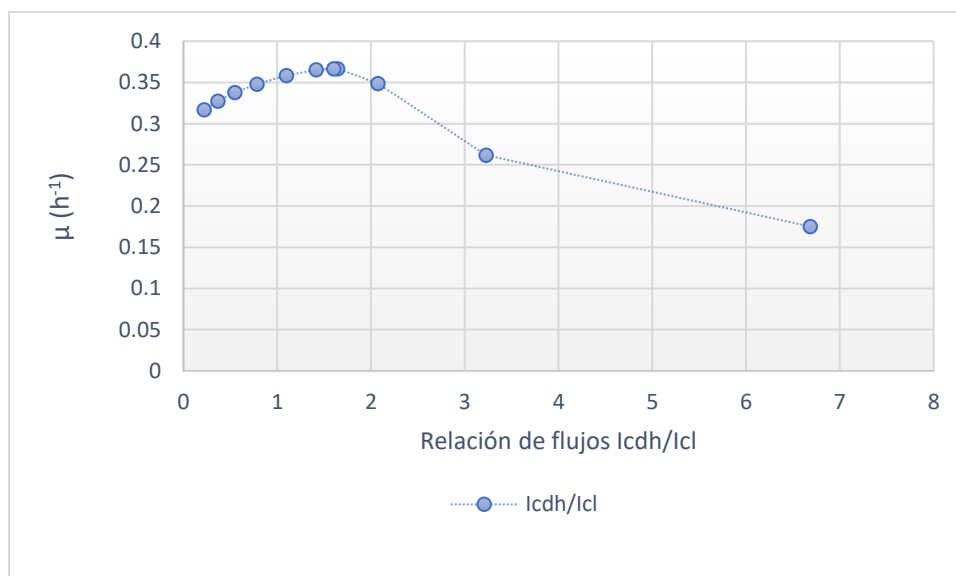


Figura 20. Relación de flujos de Icdh/Icl Vs μ del modelo metabólico de *E. coli*, al modular Icl.

En la figura 19 se observa que al incrementar el flujo de Icl, los cambios en la Icdh son muy sensibles, pues pequeñas variaciones hacen que la μ baje.

Como ya se mencionó, cuando *E. coli* crece con acetato como única fuente de carbono Icl e Icdh compiten por su sustrato común. De manera general, el flujo a través de Icl genera los precursores utilizados para la biosíntesis, mientras que la mayor parte del flujo (95%) a través de la Icdh se dedica al suministro de potencial redox y NADH que se empleará en la fosforilación oxidativa para la producción de ATP. Lo que la célula hace es ajustar el flujo a través de Icdh para que la tasa de suministro de NADPH y ATP sea igual a las demandas de biosíntesis (Holms W. H., 1987). Bajo este esquema, tanto en la Figura 18 como en la 19, se observa que, para que *E. coli* crezca de forma óptima utilizando acetato como única fuente de carbono, se debe tener un equilibrio entre los flujos de Icl e Icdh. Sin embargo, es contrastante que la máxima μ que se alcanza es 1/3 de la de *A. schindleri* ACE. Seguramente la regulación en las enzimas del nodo del isocitrato limita en parte el crecimiento de *E. coli* en acetato en comparación con lo que ocurre en las *Acinetobacter*.

Es interesante que la relación Icdh/Icl (Fig. 20) está en un intervalo de 1.14 a 1.87, y que valores cercanos a 1.5 como en el caso de *A. schindleri* ACE sean los más adecuados. Esto nuevamente pone de manifiesto el equilibrio que se requiere entre CATC y RG para que mantenerse sea viable el crecimiento de *E. coli*. En este caso el intervalo en el que Icdh e Icl pueden modular su actividad es entre 2 y 7 mmol/DCW/h, es decir, las enzimas tienen un intervalo más amplio que las de *A. schindleri* ACE, aunque los flujos de *E. coli* de Icdh e Icl en todos los casos son menores que en *A. schindleri* ACE. Esto apoya el por qué *A. schindleri* ACE tiene una mayor μ , ya que hay mayor flujo hacia ambas vías (CATC como RG) manteniendo elevados los niveles de NADH y NADPH, permitiendo así a la célula generar suficiente energía para síntesis de biomasa a una velocidad considerablemente mayor a la de *E. coli*.

7.3 Análisis de variabilidad de la actividad de las enzimas isocitrato deshidrogenasa e isocitrato liasa mediante FBA en *A. schindleri* ACE y *E. coli* JM101.

El análisis de variabilidad se utiliza para identificar los flujos máximo y mínimo de las reacciones en la red metabólica mientras se mantiene algún estado de la red fijo. Esto permite

encontrar soluciones óptimas alternativas, así como evaluar la flexibilidad de la red ((Hay, J., & Schwender, J., 2011).

7.3.1 Análisis de variabilidad de *A. schindleri* ACE.

Para este caso se utilizaron como restricciones experimentales del consumo de acetato de 37.13 mmol/DCW/h y la μ de 0.93 h⁻¹. A partir de ello, se determinó el flujo máximo y el mínimo para cada enzima (Icdh e Icl). La diferencia de flujos de cada una resulta en el intervalo de flujo en el que la enzima puede operar bajo las restricciones descritas (Tabla 5).

Tabla 5. Variabilidad de flujo de Icdh e Icl de *A. schindleri* ACE.

Enzima	Flujo mínimo (mmol /DCW/h)	Flujo máximo (mmol /DCW/h)	Intervalo de flujo (mmol /DCW/h)
Icdh	14.34	14.35	0.01
Icl	9.65	9.66	0.01

El intervalo en el que pueden variar los flujos de Icdh e Icl en *A. schindleri* ACE es mínimo, con un valor de 0.01 mmol/DCW/h. Una interpretación de este resultado es que para que exista una elevada μ (0.93 h⁻¹) es indispensable que dichos flujos funcionen cercanos a sus valores máximos. Resulta interesante que, al extender el análisis de variabilidad de flujo a otras enzimas involucradas en el metabolismo central del carbono (Tabla 6), la tendencia es similar, es decir, el intervalo de flujo en el que funcionan esas enzimas se restringe a su máxima capacidad.

Tabla 6. Variabilidad de flujo de enzimas involucradas en el metabolismo central de carbono de *A. schindleri* ACE.

Enzima	Flujo mínimo (mmol /DCW/h)	Flujo máximo (mmol /DCW/h)	Intervalo de flujo (mmol /DCW/h)
ACKr	37.11	37.13	0.02
ACONTa	24.00	24.00	0.00
ACONTb	24.00	24.00	0.00
ACS	0.00	0.02	0.02
AKGDH	13.34	13.35	0.01
FBP	0.93	0.93	0.00

ME1	0.00	0.06	0.06
ME2	2.57	2.65	0.08
PPC	0.00	0.01	0.01
PPCK	4.33	4.36	0.03
PPS	0.00	0.01	0.01
PTAr	-37.13	-37.11	0.02
SUCOAS	-13.35	-13.34	0.01

Para corroborar lo dicho anteriormente, se espera que al disminuir la μ gradualmente aumente el intervalo de flujo de las enzimas (Tabla 7). Se observa que a μ menores de 0.93 h^{-1} la distribución de flujos en todo el modelo puede variar y reacomodarse.

Tabla 7. Flexibilidad de la μ de *A. schindleri* ACE con respecto al intervalo de flujo de Icdh e Icl.

$\mu \text{ (h}^{-1}\text{)}$	Intervalo de flujo de Icdh (mmol /DCW/h)	Intervalo de flujo de Icl (mmol /DCW/h)
0.93	0.01	0.01
0.7	19.23	19.23
0.5	24.34	24.34
0.33	28.69	28.69

7.3.2 Análisis de variabilidad en *E. coli* JM101.

Para este caso se utilizaron como restricciones el flujo de generación de CO_2 experimental (12.80-15.31 mmol/DCW/h), el intervalo del consumo de O_2 experimental (-16.47 a -14.29 mmol/DCW/h) y la μ de 0.33 h^{-1} . Al igual que en el caso anterior, se determinaron los flujos máximos y mínimos para cada enzima (Icdh e Icl), y la diferencia de éstos resulta en el intervalo de flujo en el que puede operar cada enzima (Tabla 8).

Tabla 8. Variabilidad de flujo de Icdh e Icl de *E. coli* JM101.

Enzima	Flujo mínimo (mmol /DCW/h)	Flujo máximo (mmol /DCW/h)	Intervalo de flujo (mmol /DCW/h)
Icdh	0.87	7.89	7.02

Icl	2.78	8.75	5.96
-----	------	------	------

Debido a que el intervalo en el que pueden variar los flujos de Icdh e Icl es de 7.02 y 5.96 mmol/DCW/h respectivamente, se puede interpretar que para la μ de 0.33 h⁻¹ existe un intervalo de operación dos órdenes de magnitud más amplio con respecto al intervalo de flujo en *A. schindleri* ACE. Es decir, en *E. coli* JM101 estas enzimas tienen mayor flexibilidad de flujos quizá porque operan para sustentar una μ casi tres veces menor que en el caso de *A. schindleri* ACE. Por otro lado, se procedió a determinar la variabilidad de flujo de otras enzimas involucradas en el metabolismo central de carbono de *E. coli* JM101 (Tabla 9). Es claro que para todas ellas el intervalo de flujo para la μ dada es mayor que en el caso de *A. schindleri* ACE.

Al igual que en el caso de *A. schindleri* ACE, también se realizó un análisis de la variabilidad de Icdh e Icl al aumentar gradualmente la μ (datos no mostrados). Sin embargo, no se observó una tendencia clara que evidencie que mientras aumente la μ , el intervalo de flujo de las enzimas disminuye también. Lo anterior puede deberse a que tal como funciona la red del modelo de *E. coli* JM101 no se sustenta un aumento de μ por arriba del valor experimental.

Tabla 9. Variabilidad de flujo de enzimas involucradas en el metabolismo central de carbono de *E. coli* JM101.

Enzima/reacciones	Flujo mínimo (mmol /DCW/h)	Flujo máximo (mmol /DCW/h)	Intervalo de flujo (mmol /DCW/h)
ACKr	7.67	21.56	13.88
ACS	0.00	5.41	5.41
AKGDH	1.68	7.64	5.95
EX_akg	-4.24	2.71	6.95
FBP	0.33	4.38	4.06
ICDHyr	0.87	7.89	7.02
ICL	2.78	8.75	5.96
ME1	0.00	5.69	5.69
ME2	0.00	8.15	8.15
PTAr	-21.56	-7.67	13.88

7.4 Estructura de proteínas.

A continuación se describe el análisis con respecto a las proteínas estudiadas.

7.4.1 Isocitrato deshidrogenasa (Icdh).

Como se observa en la tabla 10, más detalladamente en la sección 6.2.1, *A. schindleri* ACE cuenta con una Icdh agrupada en la subfamilia III y tiene una longitud de 745 aa mientras que *E. coli* tiene una Icdh agrupada en la subfamilia I y tiene una longitud de 416 aa. Es interesante mencionar que 48 de 645 especies del género *Acinetobacter* cuentan con Icdh-I e Icdh-III (entre ellas; *A. baylyi* ADP1), 3 cuentan sólo con una Icdh-I y 12 especies del género *Acinetobacter* cuentan sólo con una Icdh-III.

Tabla 10. Icdh-I e Icdh-III del género *Acinetobacter* y de *E. coli*.

	Icdh-I (400 aa)	Icdh-III (740 aa)
Bacterias del género <i>Acinetobacter</i>	51 secuencias 417-419 aa	60 secuencias 743-745 aa
<i>A. schindleri</i> ACE		745 aa
<i>A. baylyi</i> ADP1	436 aa	743 aa
<i>E. coli</i> K12	416 aa	

7.4.1.1 Icdh-I.

En el dendograma de la Figura 20 se observa el parentesco a nivel de secuencia que tienen las Icdh-I del género *Acinetobacter*. Las secuencias de *Acinetobacter* comparten un porcentaje de identidad entre el 86 y el 99%. La secuencia de *E. coli* actúa como control externo, el nodo con el que tiene más cercanía evolutiva (punto verde) es en el que se encuentra la Icdh de *Acinetobacter nectaris*, *Acinetobacter boissieri* y *Acinetobacter apis*:

1. *Acinetobacter nectaris* (418 aa) → Aislada del néctar de flores polinizadas por insectos mediterráneo. Se ha reportado que no crece con acetato como fuente de carbono (Álvarez-Pérez, *et al.* 2013).
2. *Acinetobacter boissieri* (417 aa) → Aislada del néctar floral de plantas polinizadas por insectos salvajes del mediterráneo. Se ha reportado que no crece con acetato como fuente de carbono (Álvarez-Pérez, *et al.* 2013).
3. *Acinetobacter apis* (417 aa) → Aislada del tracto intestinal de una abeja melífera, se ha reportado su crecimiento en ácido succínico y glucosa (Kim *et al.*, 2014).

Del nodo resaltado con un punto rojo en la Figura 20 se agrupan distintas Icdh-I del género *Acinetobacter*, entre estas se encuentran las de *A. baylyi* ADP1, *A. calcoaceticus*, *A. oleivorans*, *A. pittii*, *A. lactucae*, *A. seifertii* y *A. baumannii*. Este nodo es importante, porque las cepas más estudiadas del género *Acinetobacter* incluyen a *A. baylyi* ADP1 y a *A. baumannii* (recuadros verdes de Fig. 21).

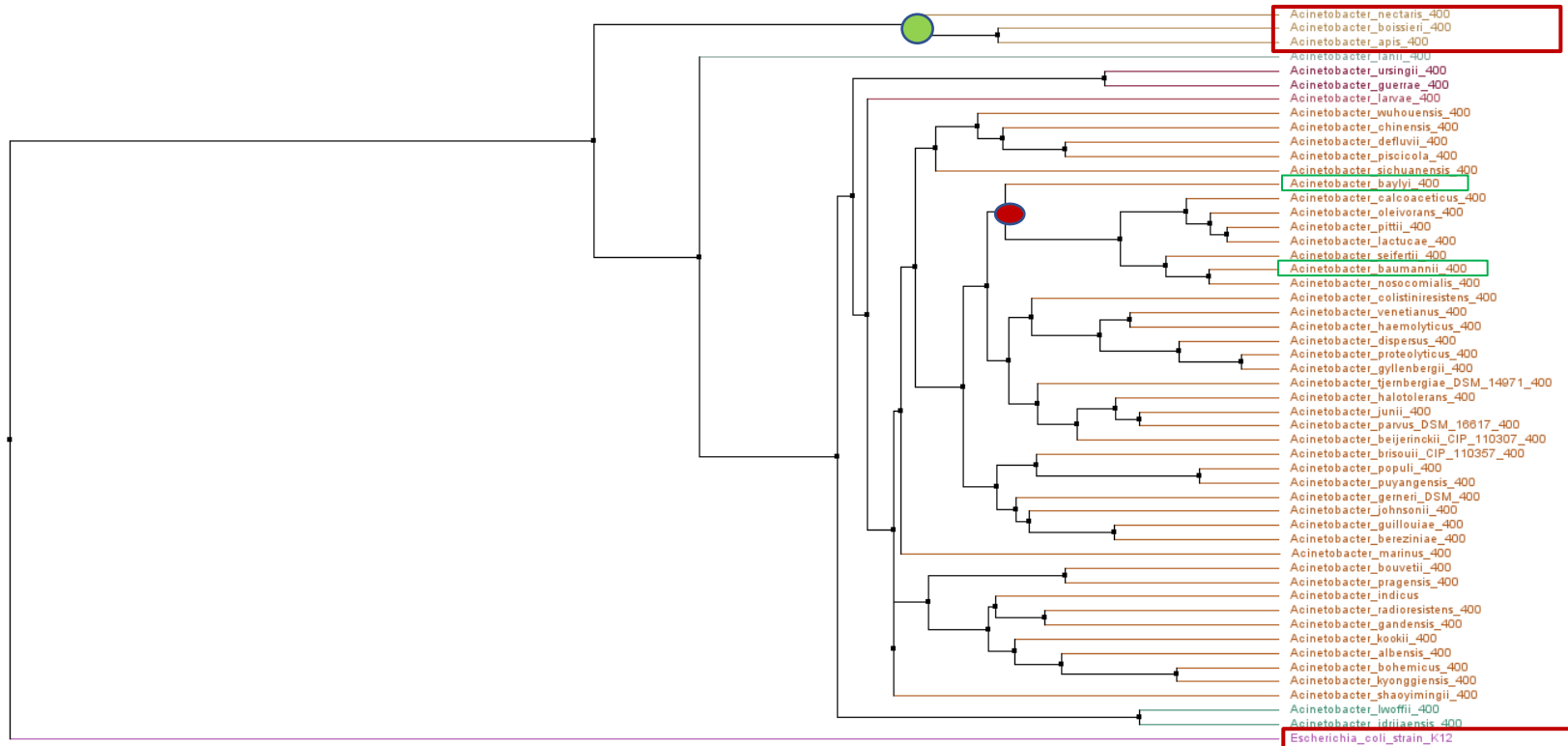


Figura 21. Dendograma de Icdh-I (400 aa) del género *Acinetobacter* con respecto a la Icdh-I de *E. coli* (método de distancias medias).

7.4.1.2 Características generales de la Icdh-I de *E. coli*.

Hasta ahora se han reportado 35 estructuras de la Icdh-I de *E. coli* en el PDB, de las cuales 7 no están con ligando y 28 si tienen algún ligando. En la figura 22 se observa una superposición de las 35 estructuras. Además, se calcularon las fluctuaciones cuadráticas medias (RMSF) que es una medida del desplazamiento de un átomo o grupo de átomos en particular en relación con una estructura de referencia, promediando sobre el número de átomos (Martínez, L., 2015); dicho de otra forma, se aplica el teorema de Pitágoras entre los residuos de la proteína. Un RMSF bajo indica que no hay fluctuación entre las estructuras por otra parte, un RMSF alto puede reflejar grandes desplazamientos de un pequeño subconjunto estructural dentro de una estructura rígida general (Martínez, L., 2015). En color amarillo se observan las zonas con un RMSF de 0-5, en color azul se observan las zonas con un RMSF de 5 a 10 y en verde las zonas que corresponden a un RMSF entre 10 y 15.

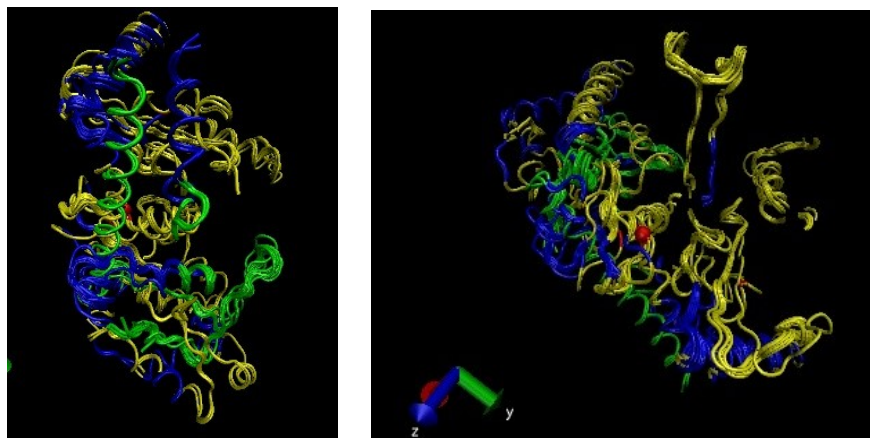


Figura 22. Superposición de cadena A de 35 Icdh de *E. coli* visualizadas en VMD. Residuos con RMSF de 0-5 (amarillo), residuos con RMSF de 5 a 10 (azul) y residuos con RMSF entre 10 y 15 (verde). Se identifica en color rojo la serina-113 correspondiente al sitio de fosforilación mediado por AceK.

Por otra parte, también se realizó una superposición utilizando el programa YASARA de una estructura con ligando (1AI2.pdb) y una sin ligando (6ICD.pdb) (Fig. 23). Se observa en verde la subunidad A y en morado la subunidad B. La estructura atómica del sustrato ICA (complejo de calcio isocitrato) se muestra en color azul, los átomos grises corresponden al ligando NADP⁺.

Lo que refleja esta superposición es que no hay una fluctuación relevante entre las estructuras con ligando y las estructuras sin ligando, por lo que es confiable utilizar arbitrariamente alguna de las Icdh-I de *E. coli* dilucidadas en el pdb como referencia.

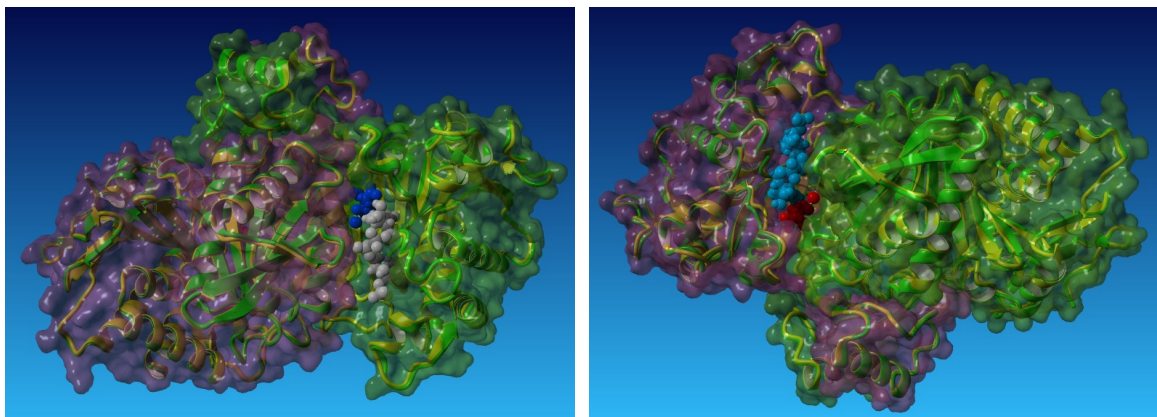


Figura 23. Diferencias entre ICDH-I de *E. coli* con ligando (1AI2.pdb) y una sin ligando (6ICD.pdb).

7.4.1.3 Conservación del sitio activo de las Icdh-I del género *Acinetobacter* tomando como referencia los residuos conocidos para la Icdh-I de *E. coli*.

De acuerdo con los datos reportados en Uniprot para la Icdh-I de *E. coli* (P08200), los dos residuos críticos del sitio activo corresponden a tirosina 160 y lisina 230. Los residuos del sitio de unión a NADP⁺ son asparagina 352, tirosina 391 y arginina 395. Los residuos del sitio de unión a sustrato son serina 113 (sitio de fosforilación), asparagina 115, arginina 129 y arginina 153.

En la Figura 24 se observa una porción del alineamiento de las secuencias de las enzimas Icdh-I del género *Acinetobacter* con respecto a la Icdh-I de *E. coli*. En un recuadro verde se identifican los sitios correspondientes al sitio crítico para catálisis, en rojo los residuos de unión a NADP⁺ y en naranja los residuos del sitio de unión a sustrato; para todos los casos hay una conservación del 100%. Todas estas proteínas Icdh-I pertenecientes al género *Acinetobacter* comparten un porcentaje de identidad mayor al 74% con la secuencia de *E. coli*.

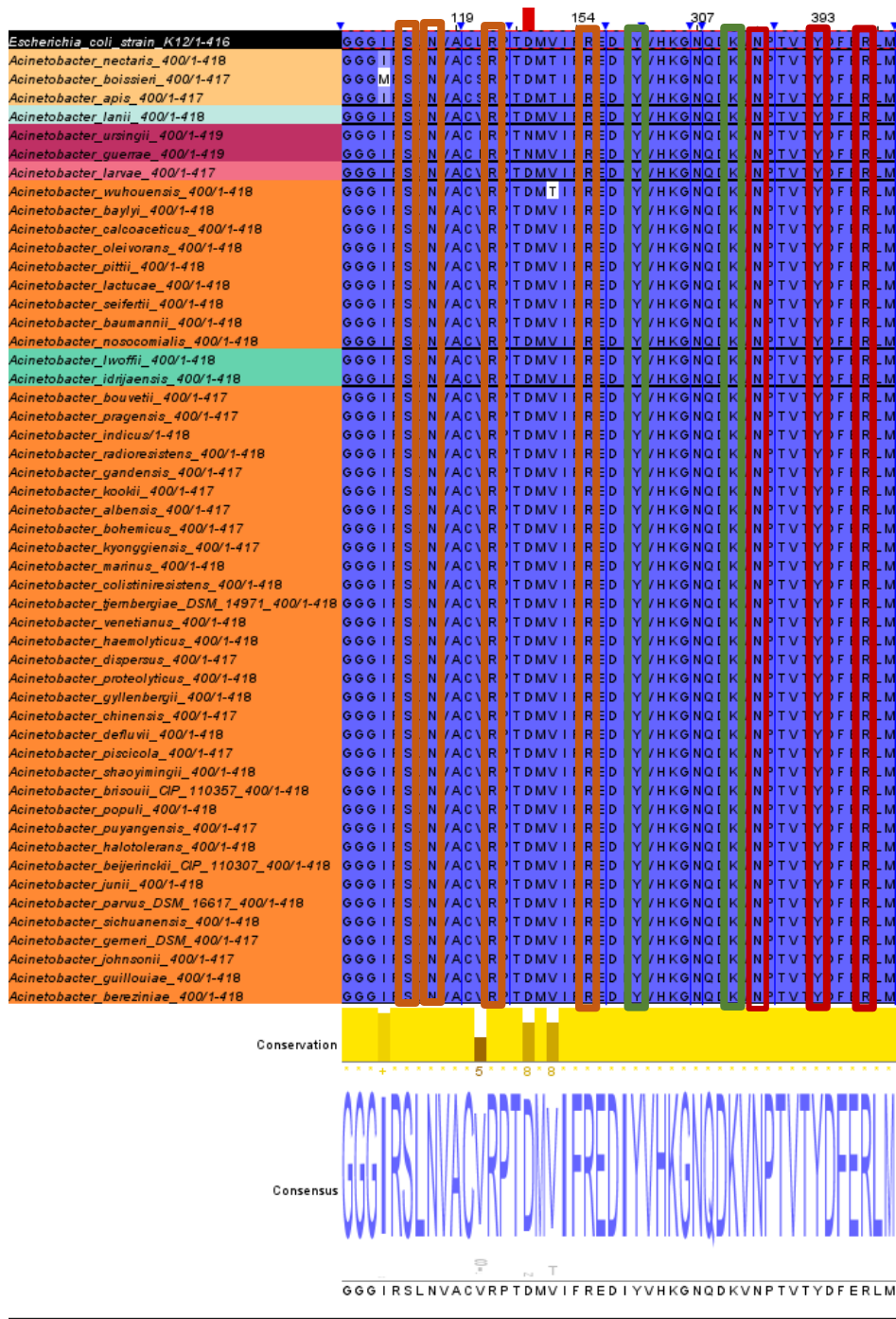


Figura 24. Conservación del sitio activo de las Icdh-I del género *Acinetobacter* tomando como referencia los residuos conocidos para la Icdh-I de *E. coli*.

Por otra parte, en la Figura 25 se observan en otra porción del alineamiento las diferencias a nivel de secuencia de la Icdh-I del género *Acinetobacter* con respecto a la de *E. coli*. Estas diferencias se observan en el carboxilo terminal, amino terminal y en algunas secciones

específicas, por ejemplo, del residuo 17 al 23. También se introduce un gap en el aspartato 83 (D83) y en la valina 84 (V84).

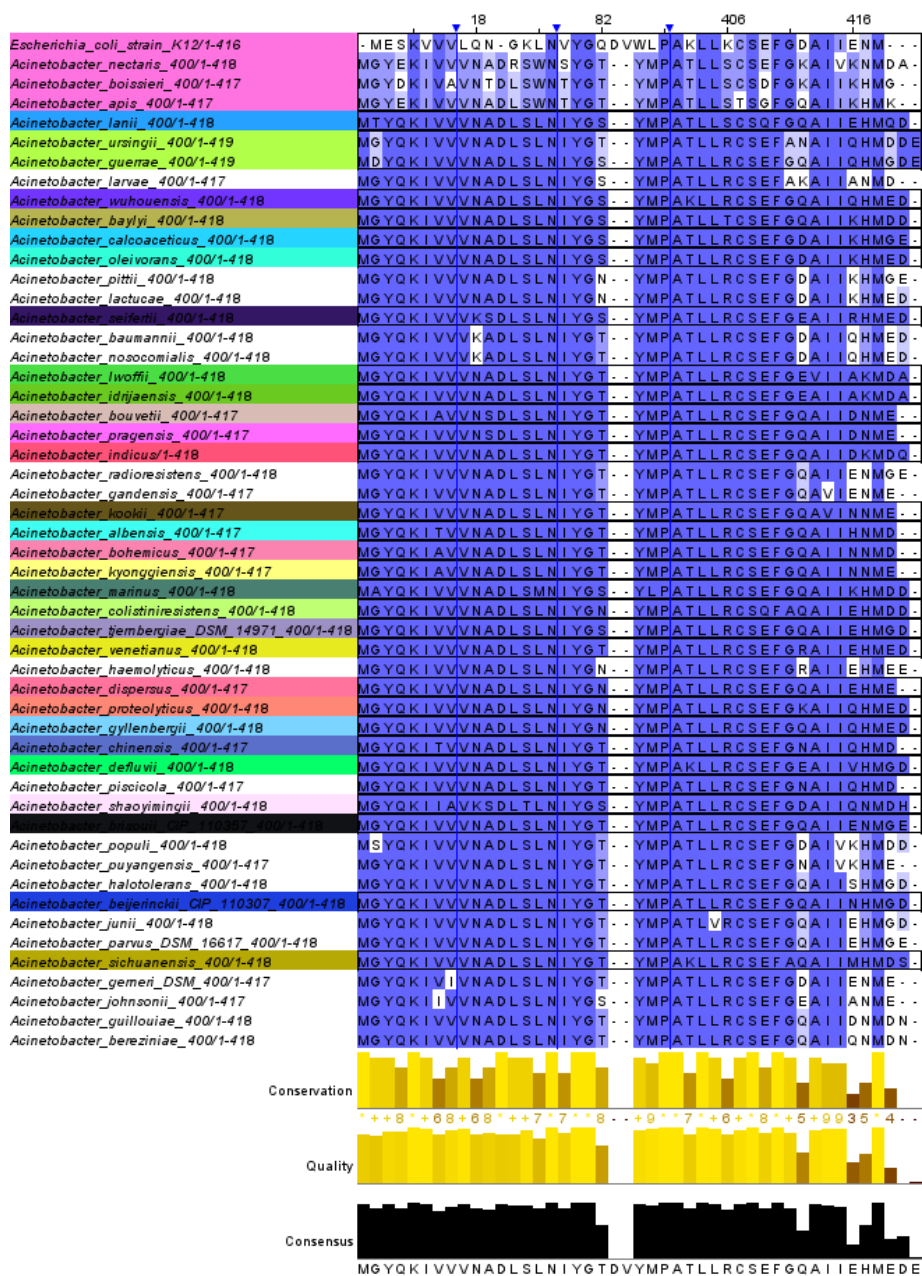


Figura 25. Diferencias a nivel de secuencia de la ICDH-I del género *Acinetobacter* con respecto a la de *E. coli* (método de distancias medias).

7.4.2 Icdh-III.

En la Figura 26 se observa el dendograma que incluye las Icdh-III del género *Acinetobacter*. A manera de comparación se incluye la Icdh-I de *E. coli* que sirve como grupo control externo. En recuadros rojos se observan las Icdh-III que comparten mayor cercanía evolutiva con *A. schindleri* ACE, *A. baylyi* ADP1 y a *A. baumannii*. Las especies del nodo que comparte la secuencia de *A. schindleri* ACE son las siguientes:

- *Acinetobacter indicus*. Bacteria que ha sido aislada de un vertedero de hexaclorociclohexano, así como del intestino de termitas. Particularmente la cepa *Indicus* KTCV2 se ha utilizado como productora de celulasa en cultivos cuyo objetivo es generar bioetanol (Karlapudi *et al.*, 2019). También se ha reportado que *Acinetobacter indicus* tiene la capacidad de utilizar otros sustratos como el benzoato, etanol, DL- lactato, fenilacetato, pero no es capaz de catabolizar manosa, D -fructosa, rafinosa, celobiosa, xilosa, manitol, *meso* -inositol, sacarosa, sorbosa, citraconato, adipato, putrescina, l- aspartato, l -histidina, l -arginina, l -ornitina, l- lisina, β -alanina o D- malato (Malhotra *et al.*, 2012).
- *Acinetobacter variabilis*: Se ha reportado que se han aislado distintas cepas de una variedad de muestras clínicas humanas en diferentes ubicaciones geográficas, se sabe que crece en acetato como fuente de carbono y no es capaz de crecer con β -alanina, citraconato, d -gluconato, d -glucosa, levulinato, trigonelina (Krizova *et al.*, 2015).

Las secuencias de las Icdh-III del género *Acinetobacter* comparten entre el 20.36 y el 22.42% de identidad con la Icdh-I de *E. coli*. A lo largo del alineamiento de la Figura 27 se observa que son distintas las secciones del amino y carboxilo terminal de las *Acinetobacter* y de *E. coli*, además de que se introducen muchos huecos (gaps). Esta información junto con el dendograma anterior indican que las proteínas tienen un origen evolutivo distinto y no son comparables a nivel de secuencia.



Figura 26. Dendrograma de Icdh-III del género *Acinetobacter* con respecto a la Icdh-I de *E. coli* (método de distancias medias).

En la Figura 28 se muestra un dendrograma con dos grandes grupos monofiléticos que corresponden a las Icdh-I y III, respectivamente. Claramente se puede estipular una divergencia evolutiva entre estas dos enzimas. Dentro del grupo de las Icdh-I (recuadro rojo grande), se observa un subgrupo en el que divergen las Icdh-I del género *Acinetobacter* y la Icdh-I de *E. coli* resaltada de azul. En el recuadro verde se agrupan las Icdh-III del género *Acinetobacter*, y en azul se localiza la *A. schindleri* ACE.

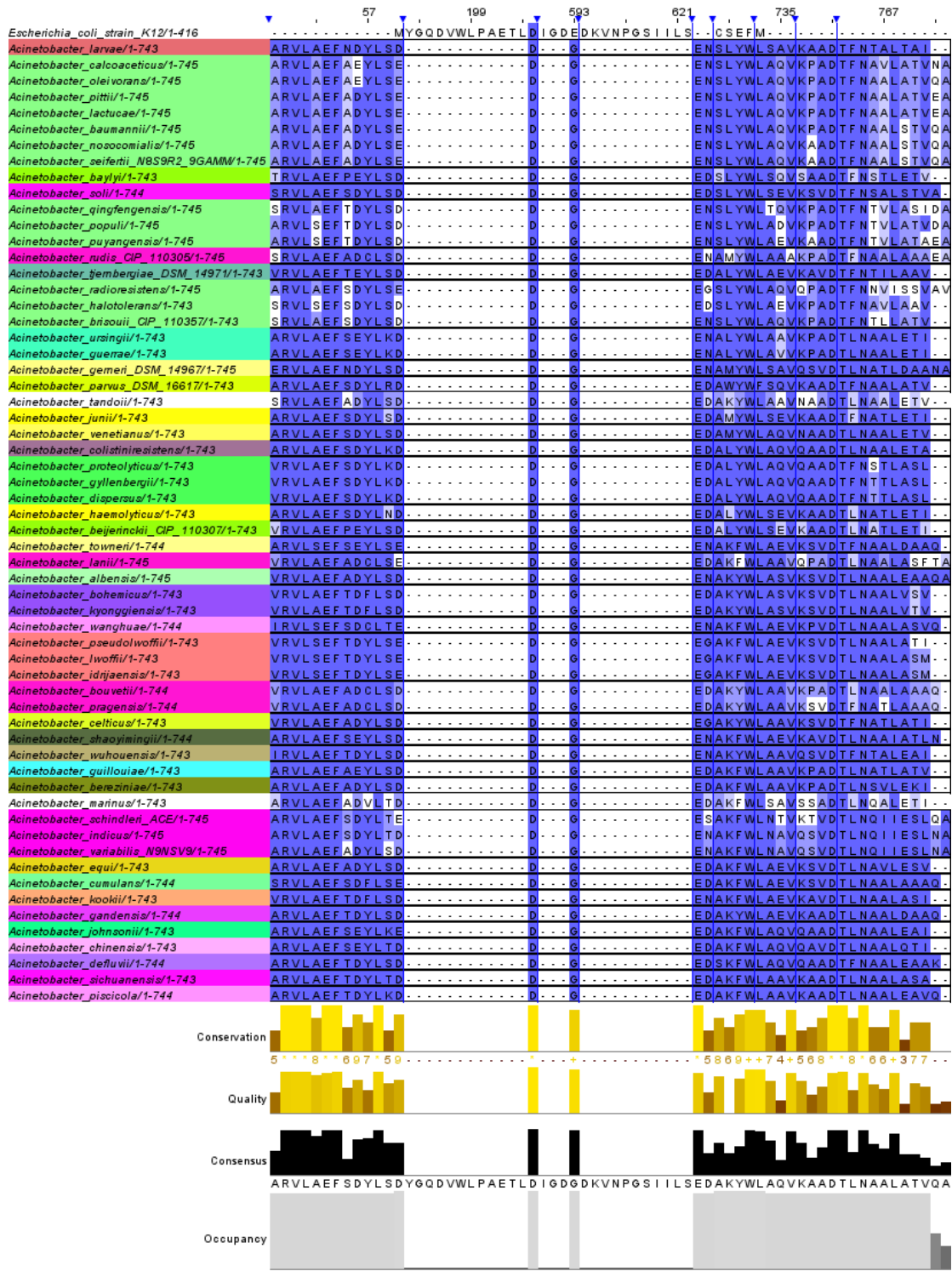


Figura 27. Diferencias a nivel de secuencia de la Icdh-III del género *Acinetobacter* con respecto a la de *E. coli*.

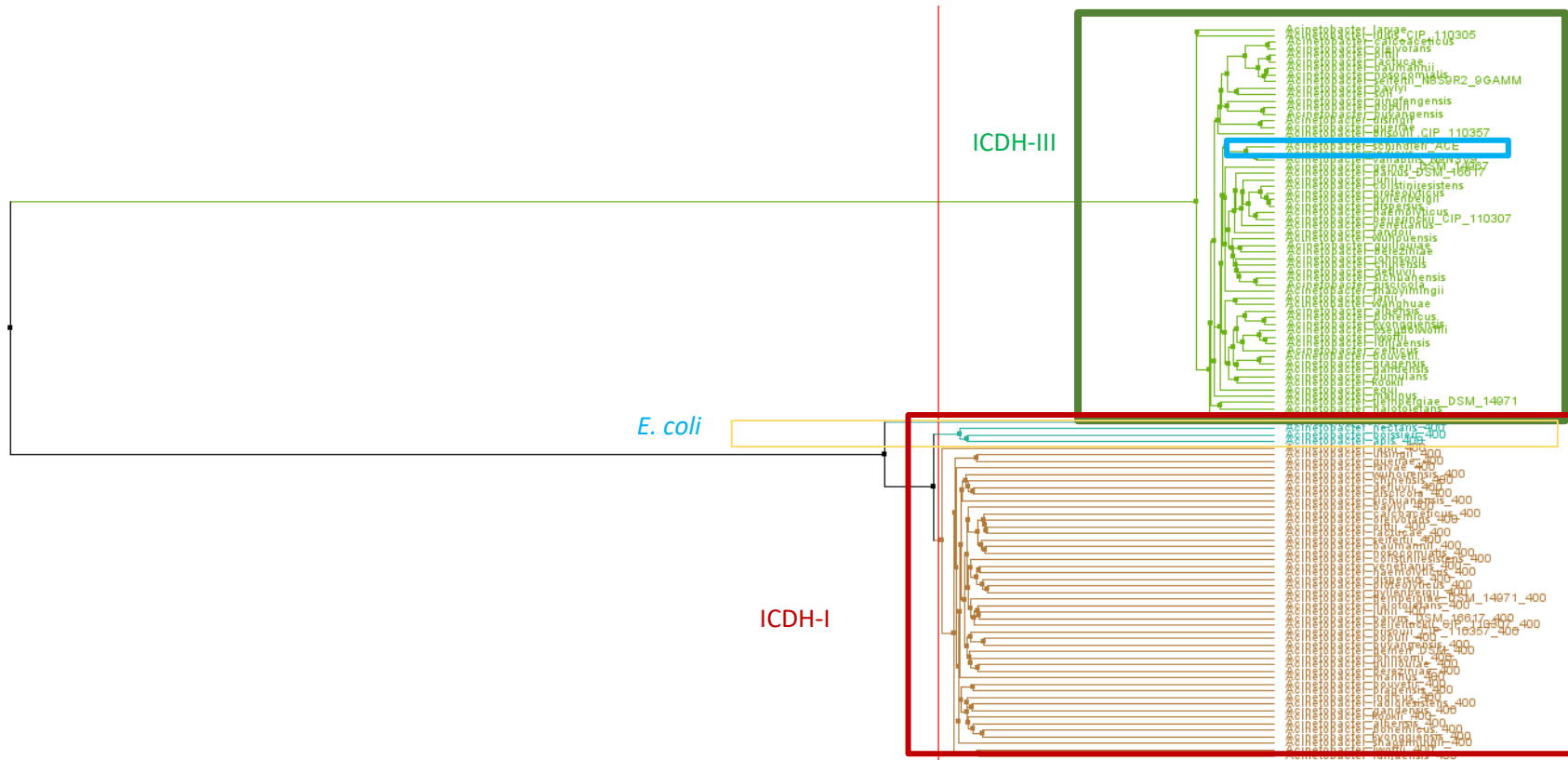


Figura 28. Dendrograma de las Icdh-I (rojo), Icdh-III (Verde) de bacterias del género *Acinetobacter* con respecto a la de *E. coli* (método de distancias medias). En azul se muestra la Icdh de *E. coli* y las Icdh-I del género *Acinetobacter* con las que tiene más cercanía evolutiva

7.4.2.1 Análisis estructural de la Icdh-III de *A. schindleri* ACE.

Hasta ahora se han caracterizado Icdh con diferentes estados oligoméricos: monómeros, homodímeros, homotetrameros y hetero-oligómeros: (Wang *et al.*, 2018). La Icdh-III de *A. schindleri* ACE no ha sido dilucidada estructuralmente, por lo que es necesario predecir su estructura terciaria para poder analizarla.

7.4.2.2 Predicción del estado oligomérico de la Icdh de *A. schindleri* ACE.

Existen distintos servidores que permiten hacer predicción de la estructura tridimensional de las proteínas. En el presente proyecto se hizo uso de dos, I-TASSER y SWISS MODEL; ambas herramientas bioinformáticas tienen características diferentes. I-TASSER no genera modelos oligoméricos en un solo paso (homodímeros, homotetrameros o hetero-oligómeros) pero permite obtener los PDBs que comparten mayor porcentaje de identidad con la proteína que se está estudiando. Por otra parte, SWISS MODEL puede generar en un solo paso la predicción de estado terciario o cuaternario de proteínas, incluso permite tomar como plantilla algún PDB específico, se predijo la estructura de la Icdh-III de *A. schindleri* ACE en ambos servidores (Fig. 29). Como era de esperarse, en I-TASSER se modeló la proteína como un monómero pero en SWISS MODEL como homodímero. A continuación, se verificó el estado oligomérico que tiene más probabilidad de existir.

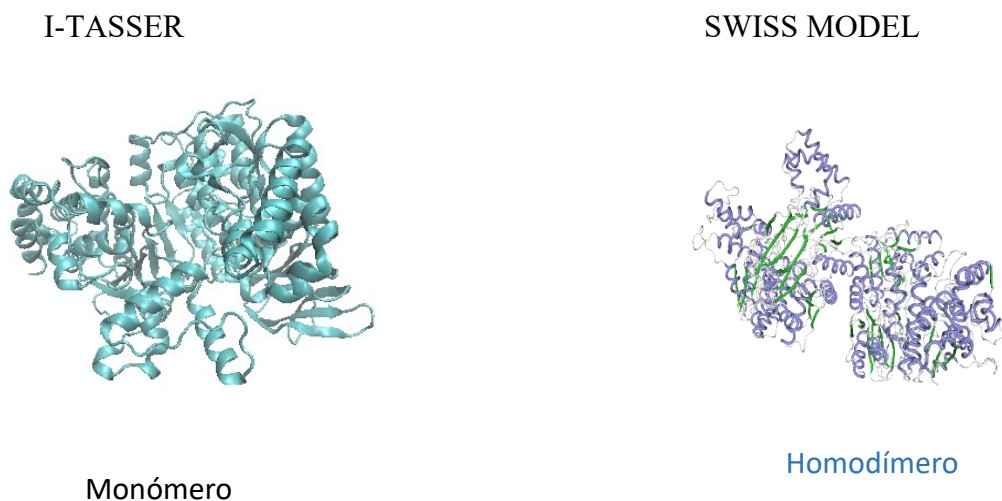


Figura 29. Predicción de la estructura de la Icdh-III de *A. schindleri* ACE en I-TASSER y SWISS MODEL.

Se encontró que la única estructura dilucidada de las Icdh-III del género *Acinetobacter* es la de *A. baumannii* (PDB: 5Z16) y tiene las siguientes características:

- Comparte un 91.6% de identidad con la de *A. schindleri* ACE.
- La longitud de ambas proteínas es de 745 aa, por lo que tendrían un 100 % de cobertura.
- La proteína resuelta se encuentra en estado homodimérico de acuerdo con lo reportado por Wang *et al.* 2018, aunado a ello, se corroboró determinado la clasificación de las interacciones proteína-proteína que arroja que la interfaz entre las cadenas A y B del complejo 5Z16.pdb se clasifica como complejo permanente (52%), complejo transitorio (19%) y artefacto del cristal (28%). El complejo permanente, que predomina en esta estructura indica que la proteína es estable en su estado homodimérico y las subunidades se desnaturalizarían tras la disociación del complejo.
- Tomando los puntos anteriores como referencia, 5z16.pdb se puede utilizar como plantilla para modelar la estructura 3D de la ICDH-III de *A. schindleri* ACE en SWISS MODEL.

Para determinar si la Icdh-III de *A. schindleri* ACE tiene el mismo estado oligomérico que la de *A. baumannii* se realizó un mapeo de la zona de interfase entre las proteínas. El mapeo en la zona de interfase permite hacer una comparación a partir de los residuos que interactúan en la interfaz de la subunidad A y la subunidad B de la Icdh-III de *A. baumannii* con los residuos de la Icdh-III de *A. schindleri* ACE para determinar cuántos residuos de la zona de interfase se comparten y se conservan.

7.4.2.3 Mapeo de zona de interfase de Icdh de *A. baumannii* con respecto a la Icdh de *A. schindleri* ACE.

El mapeo de la zona de interfase entre subunidades de proteínas permite clasificar interacciones entre los límites de las proteínas. Dado que la interfaz puede estar definida por una superficie que separa las dos proteínas es posible crear un mapa de interacción que permita realizar comparaciones en 2D. Para este caso particular el mapeo de la zona de interfase en la estructura de Icdh-III de *A. baumannii* es importante porque se pueden diferenciar los residuos que se encuentran en la zona de interfase que separa la subunidad A

de la subunidad B. Estos residuos se pueden comparar con la estructura primaria de la Icdh-III de *A. schindleri* ACE y con ello determinar si esta enzima cuenta con los mismos residuos de los que se encuentran en la zona de interfase de la Icdh-III de *A. baumannii*. Si la Icdh-III de *A. schindleri* ACE cuenta con más del 70% de los residuos homólogos a la zona de interfase de la Icdh-III de *A. baumannii*, existirá una gran probabilidad de que el estado oligomérico de la Icdh-III de *A. schindleri* ACE sea el mismo que el de la Icdh-III de *A. baumannii*, es decir, un homodímero. Las interacciones marcadas entre la subunidad A y la B (Fig. 30) fueron comparadas con la estructura primaria de la Icdh-III de *A. schindleri* ACE y sólo difieren en dos residuos (histidina 398 y glutamina 241) que se encuentran resaltados en la Figura 30. Esto corresponde a que un 95% de los residuos de la zona de interfase se conservan entre ambas proteínas.



Figura 30. Interacciones de zona de interfase de las subunidades A B de la Icdh-III de *A.*

baumannii comparadas con los residuos de Icdh-III de *A. schindleri* ACE. Los residuos del recuadro rojo son aquellos en los que difieren ambas proteínas.

Como se observa en la Figura 31, los únicos residuos de la zona de interfase de ambas subunidades que no comparten las secuencias de Icdh-III de *A. schindleri* ACE y de *A. baumannii* se encuentran en la periferia de la interfase. Por lo tanto, es muy probable que el estado oligomérico de la Icdh-III de *A. schindleri* ACE sea igual que el de la Icdh-III de *A. baumannii*, es decir, la Icdh-III de *A. schindleri* ACE será un homodímero (Fig. 32).

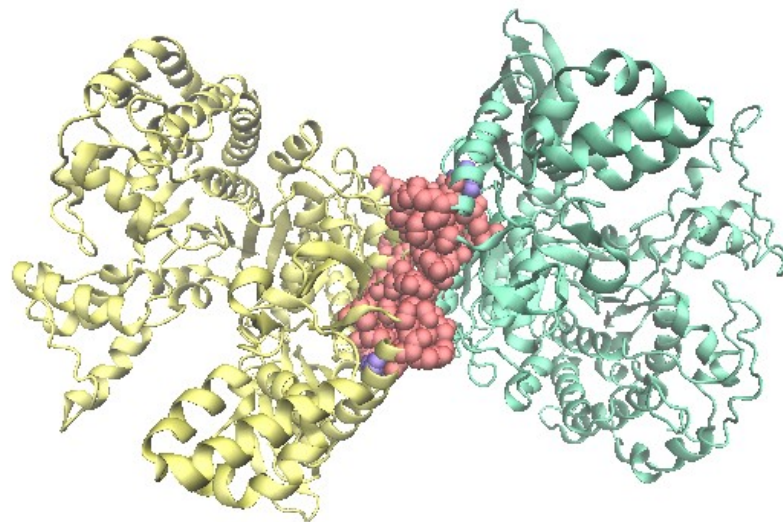


Figura 31. Zona de interfase de la subunidad A y B de la estructura de Icdh-III de *A. baumannii* con respecto a la Icdh-III de *A. schindleri* ACE. En verde se observa la subunidad A, en amarillo la subunidad B, en rojo la zona de interfase que podrían compartir las Icdh-III de *A. schindleri* ACE y de *A. baumannii*, y en morado los residuos que no comparten ambas estructuras.

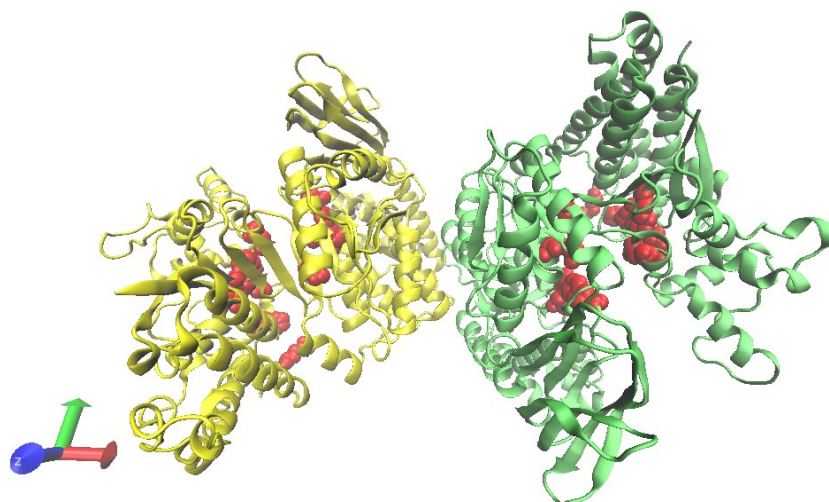


Figura 32. Predicción de Icdh-III de *A. schindleri* ACE en SWISS MODEL tomando como plantilla la estructura de la Icdh-III de *A. baumannii* (PDB: 5Z16). Los sitios en rojo corresponden a los residuos catalíticos de la proteína, en amarillo la subunidad A y en verde la subunidad B. Imagen visualizada en VMD.

Adicionalmente, se validó la predicción de la proteína en Saves v6.0 y tuvo un ERRAT de 92.14, pasa la verificación completa con un 95.45%. El gráfico de Ramachandran permite aproximar la estructura secundaria del péptido. Para la Icdh de *A. schindleri* ACE predicha indica que el 89.4% de los residuos se encuentran en las regiones más favorecidas (Ver anexo V). Finalmente, se hace una superposición entre la proteína tomada como plantilla (5z16.pdb) y la estructura predicha obteniendo un valor de la desviación de la raíz cuadrada media (RMSD) de 0.1 en cada subunidad. Por lo tanto, se concluye, que la predicción es de calidad.

A partir del análisis de la zona de interfase se estudia la conservación de los residuos de la zona de interfase de la Icdh-III de todas las bacterias del género *Acinetobacter* (Tabla 11, Fig. 33).

Tabla 11. Conservación de los residuos de la zona de interfase de la Icdh-III del género *Acinetobacter* con respecto a los residuos de la zona de interfase de *A. baumannii*.

No. De residuo	Aminoácido	Conservación
168, 170, 172, 174, 176, 177, 244, 247, 376, 386, 389, 390, 393, 397, 494, 525, 529, 537	(K, W, Q, H, S, H, D, E, K, R, Q, E, N, W, Y, V, R, R)	100 %
169	(Cambio de Q por P en <i>Acinetobacter variabilis</i>)	

241	(Cambio de E por Q en <i>Acinetobacter baumannii</i>)	
398	En <i>A. baumannii</i> H, pero hay una distribución con N	

En general, se obtuvo el mismo comportamiento que se observó en la Icdh-III de *A. schindleri* ACE. Sólo se detectaron cambios en:

- *Acinetobacter variabilis*: La glutamina 169 por prolina, en este caso este residuo cambia de ser un residuo hidrofílico a un residuo hidrofóbico.
- *Acinetobacter baumannii*: en el residuo 241 hay una variación entre glutamato y glutamina en todas la Icdh-III del género *Acinetobacter*, aunque en *A. baumannii* (estructura de referencia) el residuo 241 es una glutamina. En el residuo 398 hay una combinación entre histidina y asparagina. Particularmente en *A. baumannii* se encuentra presente la histidina. Se considera que ese residuo se conserva de manera parcial ya que la histidina está cargada positivamente mientras que la asparagina es un residuo polar sin carga y tiene un comportamiento hidrofílico.

De ahí en fuera todos los demás residuos que se encuentran en la zona de interfase se conservan en todas las Icdh-III del género *Acinetobacter*, por lo que es muy probable que todas tengan ese estado oligomérico.

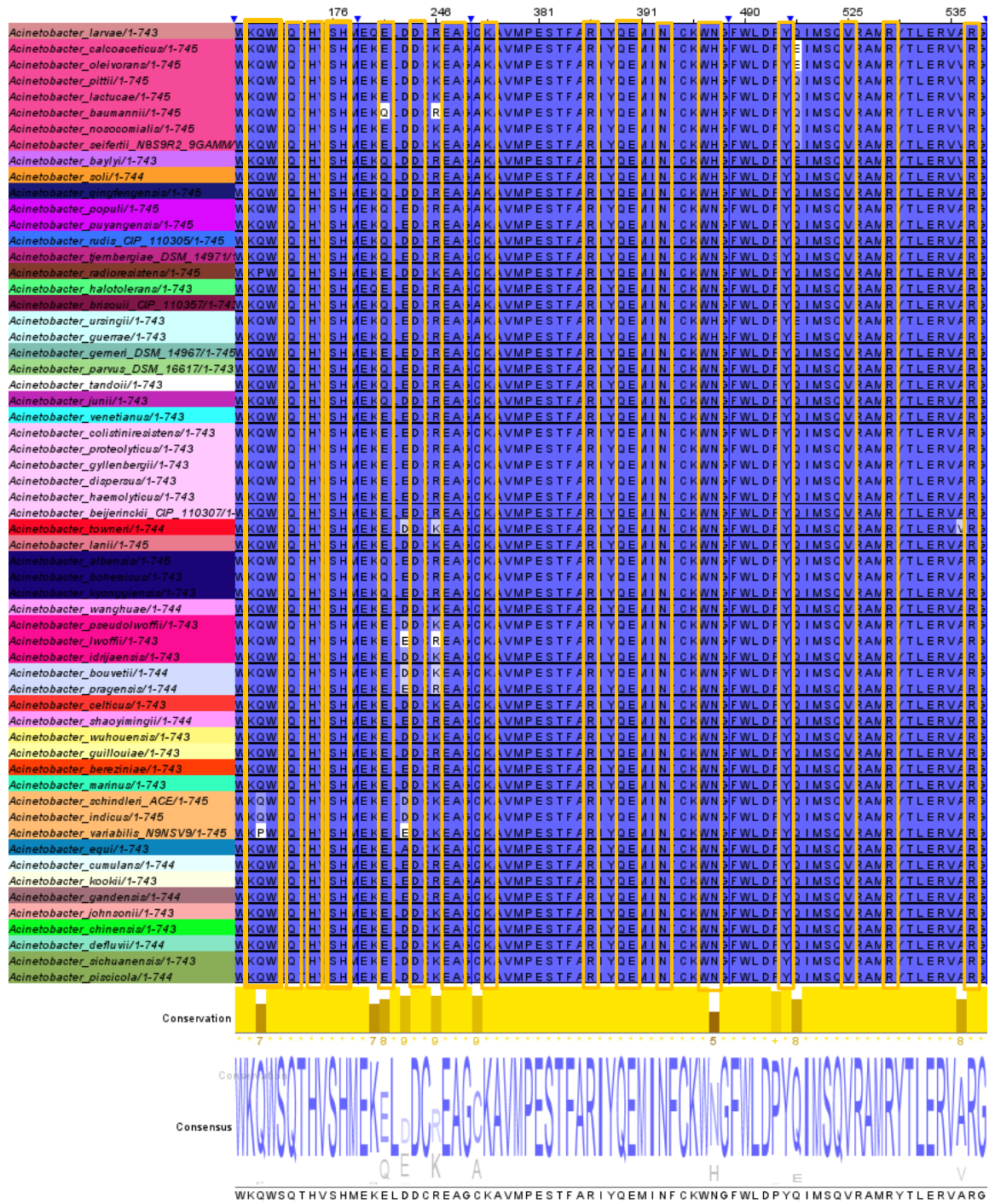


Figura 33. Conservación de los residuos de la zona de interfase de la Icdh-III (740 aa) del género *Acinetobacter* con respecto a la Icdh-III de *A. baumannii*.

Además, se observa la conservación del sitio activo de las Icdh-III incluyendo la Icdh de *A. schindleri* ACE con respecto a la Icdh de referencia (Icdh-III de *A. baumannii*). En la Figura 34 se observan:

Los dos residuos del sitio crítico para catálisis corresponden a:

- ✓ Alanina 257: Se conserva 100 %.
- ✓ Tirosina 422: Se conserva 100 %.

Sitio de unión a NADP⁺:

- ✓ Asparagina 137: Se conserva 100 %.
- ✓ Histidina 592: Se conserva 100 %.
- ✓ Arginina 652: Se conserva 100 %.

Sitio de unión a sustrato:

- ✓ Arginina 147: Se conserva 100 %.
- ✓ Arginina 550: Se conserva 100 %.
- ✓ Lisina 84: Se conserva 100 %.
- ✓ Leucina 85: Se conserva 100 %.
- ✓ Prolina 86: Se conserva 100 %.
- ✓ Asparagina 87: Se conserva 100 %.
- ✓ Isoleucina 88: Se conserva 100 %.
- ✓ Serina 89: Se conserva 100 %.

En todos los casos, a nivel de estructura primaria se conservan al 100 % los residuos que corresponden al sitio crítico para catálisis, sitio de unión a NADP⁺ y sitio de unión a ligando (Fig. 34).

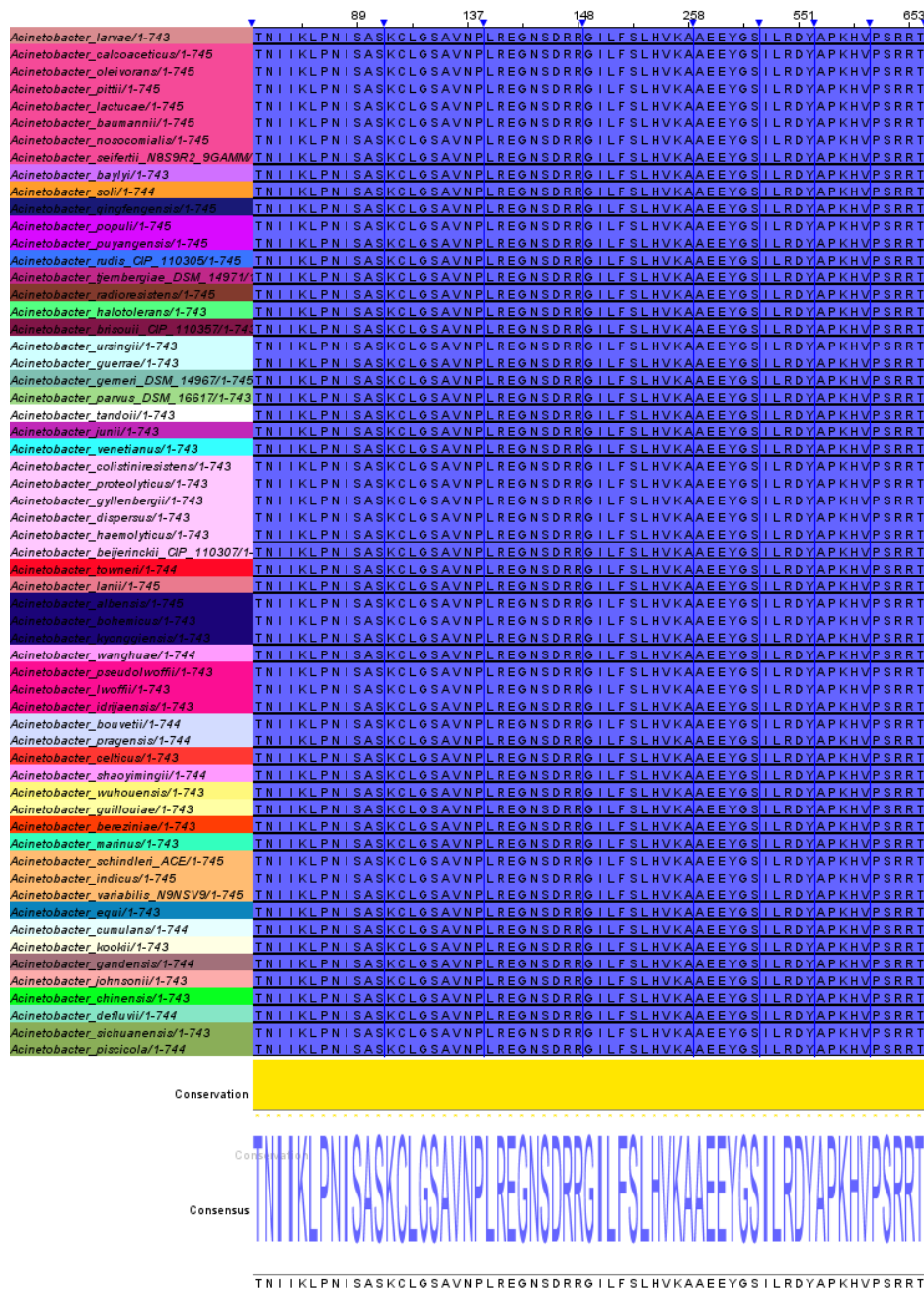


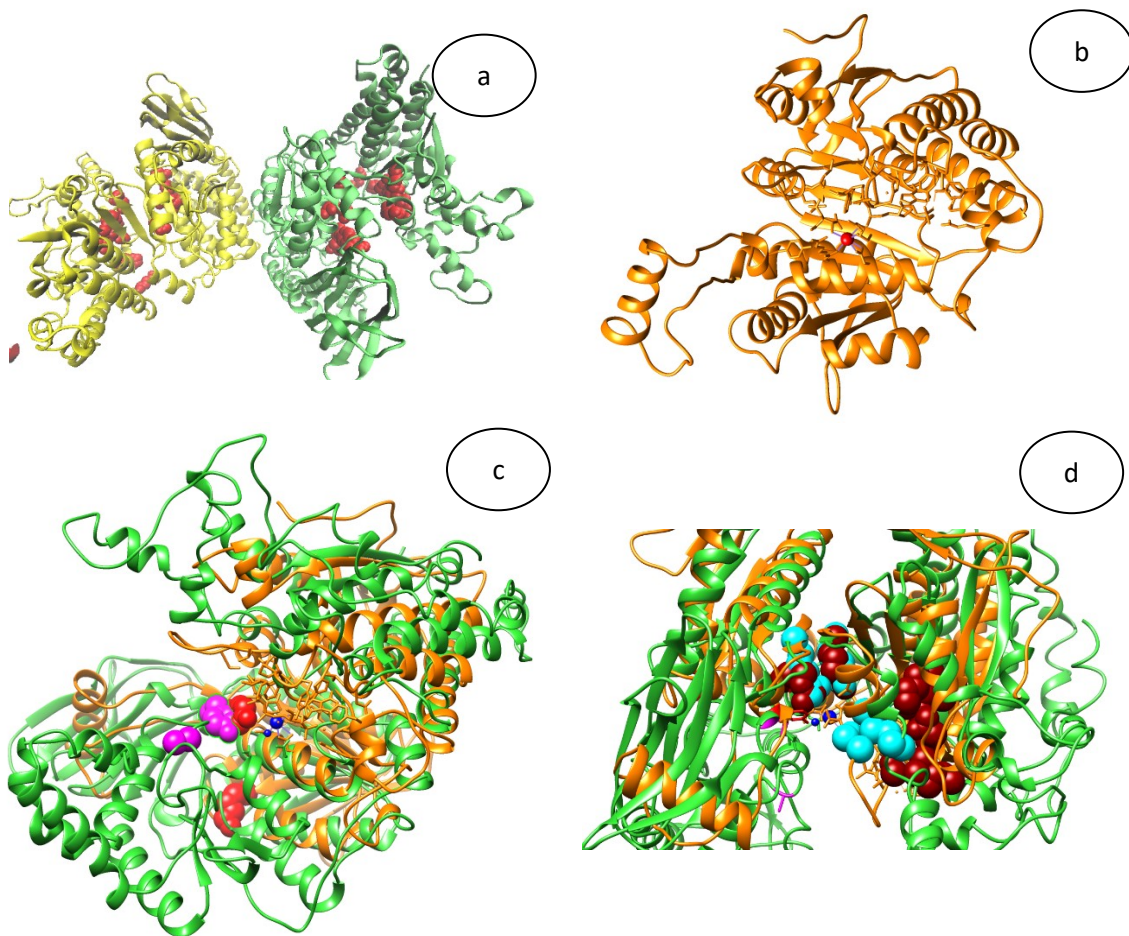
Figura 34. Conservación del sitio activo de las Icdh-III del género *Acinetobacter*.

7.4.2.4. Comparación entre la Icdh-III de *A. schindleri* ACE Vs la Icdh de *E. coli*.

Se hace una superposición de las estructuras de la Icdh de *A. schindleri* ACE con respecto a la Icdh de *E. coli*, estas estructuras difieren en:

- La Icdh de *A. schindleri* ACE se encuentra como homodímero (Fig 35 a).
- La Icdh de *E. coli* se encuentra como monómero (Figura 35 b).
- Comparten un 8.65 % de identidad a nivel estructural.
- Tienen un RMSD de 2.53.

En la Figura 35, se observan los sitios catalíticos; Sitio activo (Fig 35 c), sitio de unión a sustrato (Fig 35 d) y sitio de unión a NADP⁺ (Fig 35 e). Esto sugiere que ambas proteínas tienen una conformación diferente, sin embargo, al menos el sitio de unión a sustrato (Fig 35 d) se encuentra en una posición cercana.



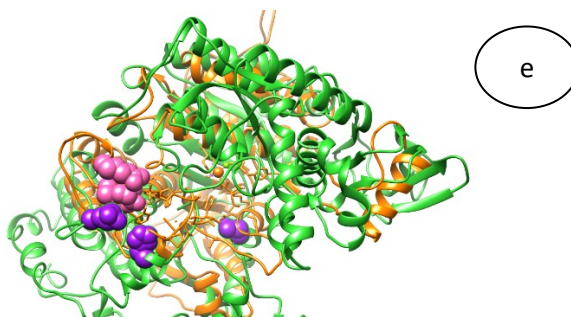


Figura 35. Se muestra la estructura de la Icdh de ambas bacterias. **a)** Icdh de *A. schindleri* ACE (en verde se observa la subunidad A y en amarillo la subunidad B, los sitios catalíticos se observan en rojo). **b)** Idhc de *E. coli*: 1AI2.pdb (naranja) y en rojo se muestra el ion Ca^+ . **c)** Superposición de Icdh de *A. schindleri* ACE subunidad A (verde) con respecto a la Icdh de *E. coli* (naranja). Los iones se encuentran en azul, en rojo se encuentran los residuos del sitio activo de la Icdh de *E. coli* y en magenta los de la Icdh de *A. schindleri* ACE. **d)** El sitio de unión a sustrato se resalta en cian para *E. coli* y para *A. schindleri* ACE los residuos resaltados en rojo oscuro. **e)** El sitio de unión a NADP^+ para *A. schindleri* ACE se observa en morado y rosa para *E. coli*.

7.4.3 Isocitrato liasa (Icl).

En la Figura 36 se muestra el dendograma de las Icl del género *Acinetobacter*; se incluye además la Icl de *E. coli* a manera de comparación. La Icl de *E. coli* se encuentra más cercana evolutivamente con la Icl de *Acinetobacter soli*; esta especie se aisló por primera vez del suelo de un bosque en el monte de Baekwoon, República de Corea (Kim *et al.*, 2008) aunque también se ha reportado que *A. soli* está presente en aislados de *Acinetobacter* que causaron bacteriemia en un hospital terciario japonés (Endo *et al.*, 2014).

Por su parte, la Icl de *A. schindleri* ACE tiene un 31.4% de identidad con la Icl de *E. coli*. No obstante, en el árbol se generan claramente dos grupos, una que incluye a la Icl de *E. coli* mientras que el otro contiene a las Icl del género *Acinetobacter*. Además, en la figura 37 se observa parte del alineamiento de la Icl de *E. coli* con respecto a las Icl del género *Acinetobacter*. Se conocen los residuos importantes para la catálisis de la Icl de *E. coli* (UniProtKB – P0A9G6 (ACEA_ECOLI)):

- **Sitio de unión a magnesio:** Aspartato 157 (no se conserva a nivel de estructura primaria en las Icl de *Acinetobacter*).
- **Sitio activo:** Cisteína 195 (no se conserva a nivel de estructura primaria en las Icl de *Acinetobacter*).

- **Sitio de unión a sustrato:** Arginina 232 (no se conserva a nivel de estructura primaria en las Icl de *Acinetobacter*) y Treonina 351 (no se conserva a nivel de estructura primaria en las Icl de *Acinetobacter*).
- **Familia y dominios (sitio de unión a sustrato):**
 - Serina 91, valina 92 y lisina 93 (no se conserva a nivel de estructura primaria en las Icl de *Acinetobacter*)
 - Glicina 196 e histidina 197 (no se conserva a nivel de estructura primaria en las Icl de *Acinetobacter*)
 - Asparagina 317, Cisteína 318, Serina 319, Prolina 320 y Serina 321 (no se conserva en las Icl de *Acinetobacter*)

Además, se observa un alto número de Gaps entre la secuencia de *E. coli* y las de *Acinetobacter*. Debido a que los sitios importantes para la catálisis de la Icl de *E. coli* en comparación con las Icl del género *Acinetobacter* no se conservan a nivel de estructura primaria, aunado al dendograma de la Figura 36, se concluye estas enzimas son evolutivamente distantes y no son comparables a nivel de estructura primaria.

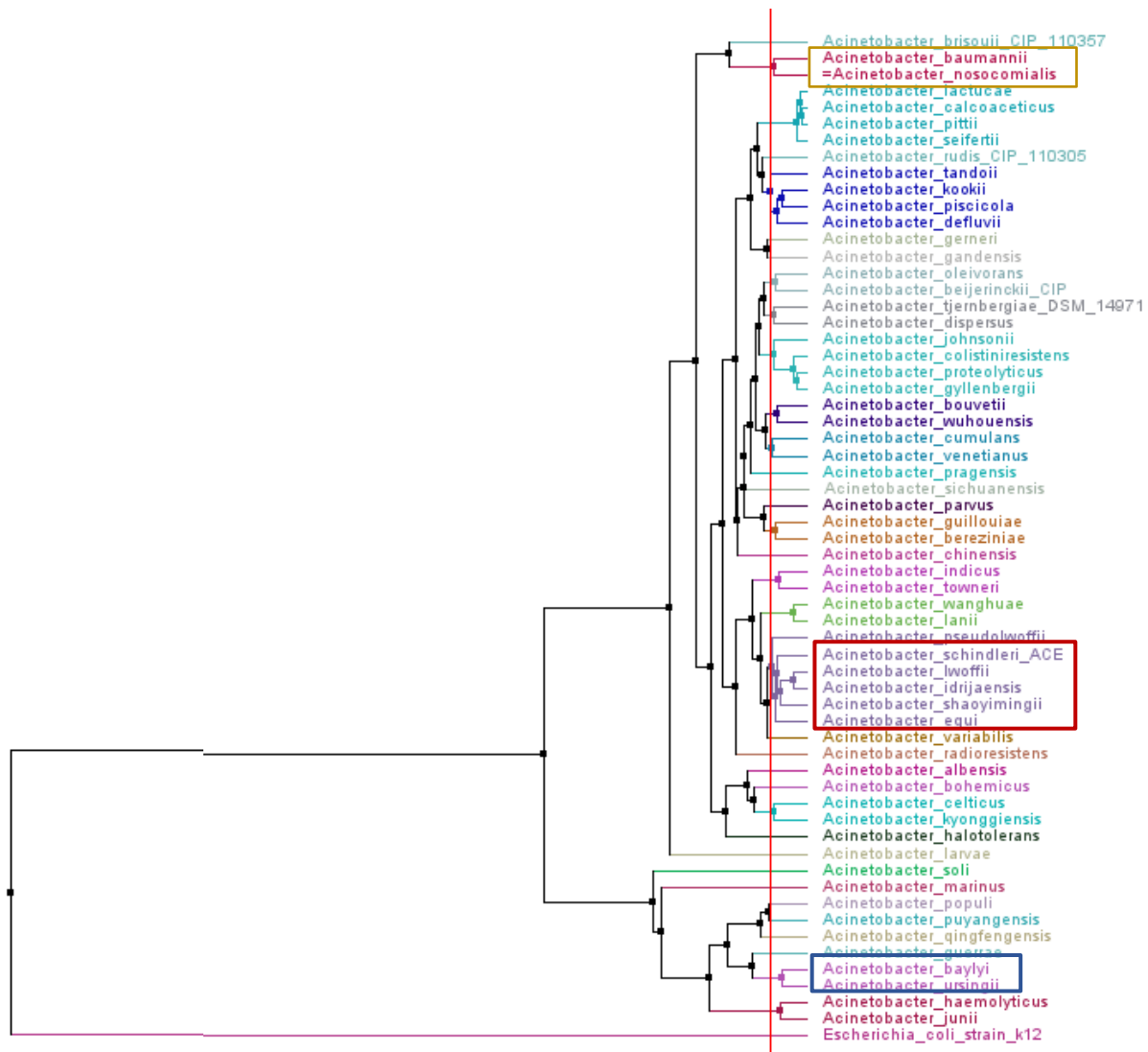


Figura 36. Dendograma de la Icl de *E. coli* y las Icl del género *Acinetobacter*.

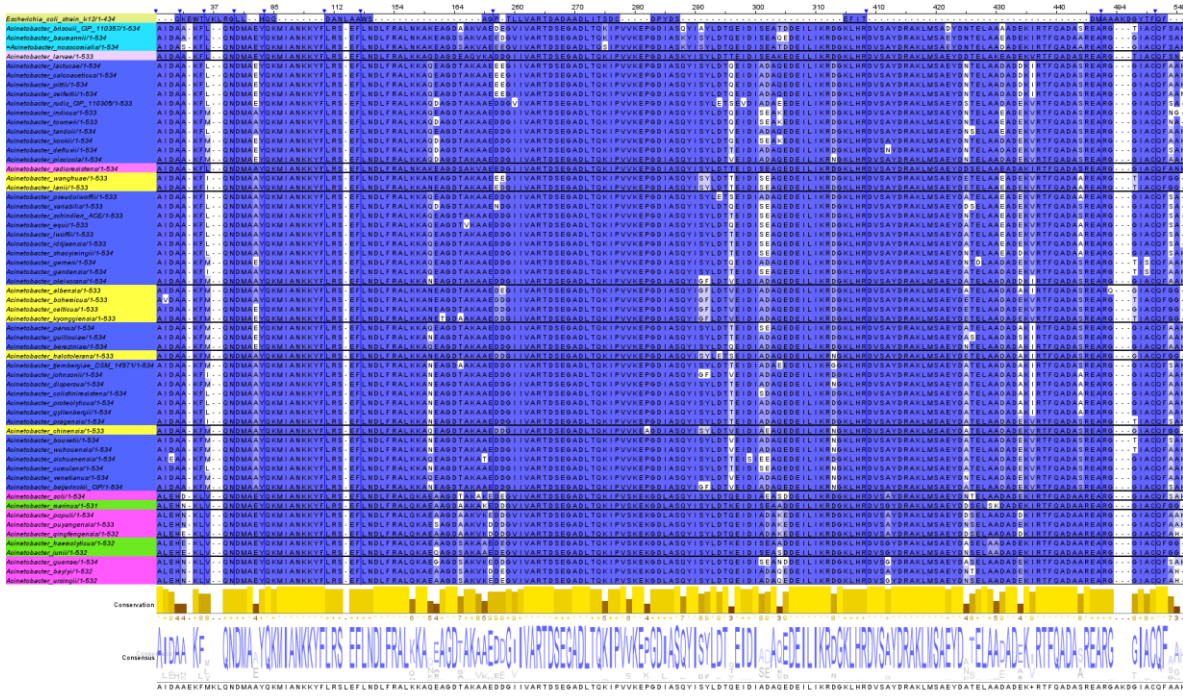


Figura 37. Porción del alineamiento y conservación del sitio activo de Icl de *E. coli* y las Icl del género *Acinetobacter*.

7.4.3.1 Análisis estructural de la Icl de *A. schindleri* ACE.

Hasta ahora la Icl de *A. schindleri* ACE no ha sido dilucidada estructuralmente, tampoco alguna Icl del género *Acinetobacter*.

7.4.3.2 Predicción de la Icl de *A. schindleri* ACE.

La primera predicción que se realizó fue empleando el servidor I-TASSER. Sin embargo, la estructura no cumplía con los estándares mínimos al ser evaluada por Saves v6.0.

I-TASSER utiliza como plantillas las PDBs que tienen el mayor porcentaje de identidad con la proteína de estudio. Al realizar la predicción se obtuvieron 10 PDBs de Icl con los que la proteína de *A. schindleri* ACE compartía mayor porcentaje de identidad:

- *Pseudomonas aeruginosa* (PDB: 6G10) comparte un 73.4 % de identidad con respecto a la Icl de *A. schindleri* ACE, y se encuentra como homo-tetramero (Fig 38 a) (Crousiles *et al.* 2018 & Dun *et al.* 2019).

- Icl de *A. schindleri* ACE tiene una longitud de 533 aa.
- Icl de *P. aeruginosa* tiene una longitud de 531 aa.
- La puntuación de densidad de electrones para átomos individuales (EDIA) generado en protein plus se muestra en a Figura 38 b, los valores por encima de 0.8 marcan un buen soporte (en azul de la Fig. 38 b), los valores de 0.4 a 0.8 marcan un soporte medio (en magenta de la Fig. 38 b) y los valores por debajo de 0.4 marcan un soporte bajo (en rojo de la Fig. 38 b) (Meider *et al.* 2018). Esto indica que la mayoría de los átomos tienen un buen soporte. Por lo tanto, se considera como una plantilla para hacer la predicción de la Icl de *A. schindleri* ACE.

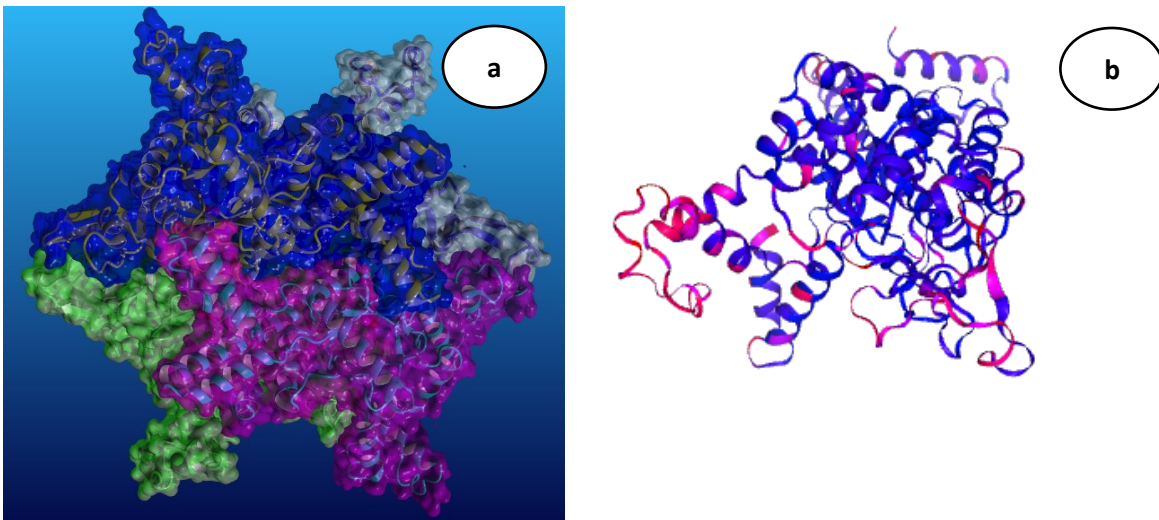


Figura 38. Estructura de Icl de *Pseudomonas aeruginosa* (6G1O.pdb). **a)** Subunidad A (azul) subunidad B (blanco), subunidad C (verde), subunidad D (magenta). **b)** Subunidad A de Icl de *Pseudomonas aeruginosa*, en azul se observa la puntuación EDIA mayor a 0.8, en magenta los átomos que tienen una puntuación entre 0.4 y 0.8 y en rojo los que tienen una puntuación menor a 0.4.

A partir de estos datos, se hizo:

- Un alineamiento de las Icl del género *Acinetobacter* con respecto a la Icl de *E. coli* para ver las similitudes y las diferencias a nivel de secuencia.
- Un mapeo en la zona de interfase de la subunidad A_B, A_C, A_D, B_C, B_D y C_D de la Icl de *P. aeruginosa* y se compara con los residuos del alineamiento la Icl de *A.*

schindleri ACE para observar cuántos residuos de la zona de interfase comparten, y determinar el posible estado oligomérico de la proteína Icdh de *A. schindleri* ACE.

7.4.3.3 Conservación del sitio activo a nivel de estructura primaria de las Icl del género *Acinetobacter* tomando como referencia los residuos conocidos para la Icl de *Pseudomonas aeruginosa*.

Se identificaron los datos relevantes asociados a la catálisis de la Icl de *Pseudomonas aeruginosa* de UniprotKB-Q9I0K4(ACEA_PSEAE), y se compararon con los residuos del alineamiento de las Icl del género *Acinetobacter* (Fig. 39).



Figura 39. Porción del alineamiento de las Icl de *Acinetobacter* tomando como referencia los residuos referentes a la catálisis de la Icl de *Pseudomonas aeruginosa*.

Se observa en la Figura 39 que todos los residuos se conservan al 100 % a nivel de estructura primaria en los siguientes sitios:

- **Residuo de unión a magnesio**
 - ✓ Aspartato 184: Se conserva 100 %
- **Sitio activo**
 - ✓ Cisteína 222: Se conserva 100 %
- **Sitio de unión a sustrato**
 - ✓ Treonina 451 Se conserva 100 %
- **Familia y dominios**
 - ✓ 101-103 (S, G, W): Se conserva 100 %
 - ✓ 223-224 (G, H): Se conserva 100 %
 - ✓ 380-384 (N, N, S, P, S): Se conserva 100 %

Las diferencias que se observan entre la Icl de *P. aeruginosa* y las Icl del género *Acinetobacter* se presentan en el amino terminal, se introducen algunos gaps en el carboxilo terminal, y en general, las secuencias difieren alrededor de un 26% (Fig. 40).

7.4.3.4 Mapeo de la zona de interfase de la Icl de *Pseudomonas aeruginosa* con respecto a la de *A. schindleri* ACE.

Una vez identificados los residuos de las subunidades de la de la zona de interfase de la estructura resuelta de la Icl de *P. aeruginosa* (PDB: 6G1O), se compararon con los residuos de la Icl de *A. schindleri* ACE utilizando como referencia el alineamiento entre estas dos proteínas. En el Anexo V se muestra el resumen de lo antes mencionado. De los 534 aa que constituyen a la Icl 6G1O, 112 están involucrados en las distintas zonas de interfase entre sus subunidades. De esos 112 residuos, *A. schindleri* ACE comparte 82 aa lo que equivale a un 73% de identidad. Sin embargo, si se analiza el cambio de residuo entre ambas proteínas se observa que 8 residuos que cambiaron entre las proteínas corresponden a residuos con las mismas propiedades fisicoquímicas; Serina 21, Asparagina 26, Leucina 90, Aspartato 111, Alanina 273, Leucina 299, Aspartato 303 e Isoleucina 432, resaltados en el Anexo V. De esta forma, esos 8 residuos se conservan de manera parcial, y comparten el 80% de similitud de los residuos de la zona de interfase.

Finalmente, en la Figura 41 se observa el mapeo de zona de interfase de la Icl 6G1O con respecto a la Icl de *A. schindleri* ACE. Los residuos conservados equivalen al 70-80% y se encuentran resaltados en amarillo, los residuos no conservados que representan aproximadamente el 30% se muestran en verde, la subunidad A se observa en color azul, la subunidad B se encuentra en color rojo, la subunidad C en color cyan y la subunidad D en morado.

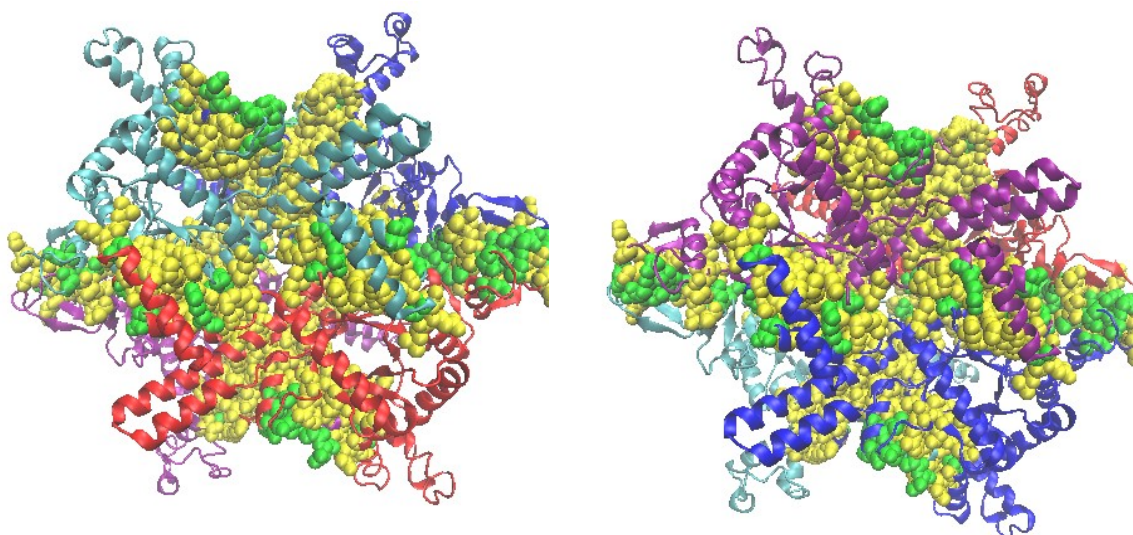


Figura 41. Mapeo de zona de interfase de la Icl de *P. aeruginosa* (PDB: 6G1O) con respecto a la Icl de *A. schindleri* ACE. En amarillo se muestran los residuos que comparten ambas proteínas, mientras que en verde, aquellos residuos que son distintos.

Dados estos resultados, se puede utilizar la Icl de *P. aeruginosa* 6G1O en estado homotrameric como plantilla para modelar la Icl de *A. schindleri* ACE. Para ello se utilizó el servidor SWISS MODEL, tuvo una cobertura del 91%, además, la calidad de la predicción se verificó mediante Saves v6.0, y se obtuvieron los siguientes parámetros: ERRAT: 97.48 y VERIFY: 84.72%. Además, en el Anexo VII se observa el gráfico de Ramachandran de la predicción de la Icl, teniendo un 93.2 % de residuos en regiones favorecidas, además se realizó una superposición entre la Icl de *P. aeruginosa* y el modelo de la Icl de *A. schindleri* ACE, y se obtuvo el valor de RMSD calculado con el software Chimera 1.16, para cada subunidad se observa un RMSD de 0.072 y un porcentaje de identidad de 73.46 en todas las subunidades.

En la Figura 42 se observa también la predicción de la Icl de *A. schindleri* ACE resaltando sus sitios catalíticos más importantes:

- **Residuo de unión a magnesio:** Aspartato 184 (rojo)
- **Sitio activo:** Cisteína 222 (naranja)

- **Sitio de unión a sustrato:** Treonina (verde).

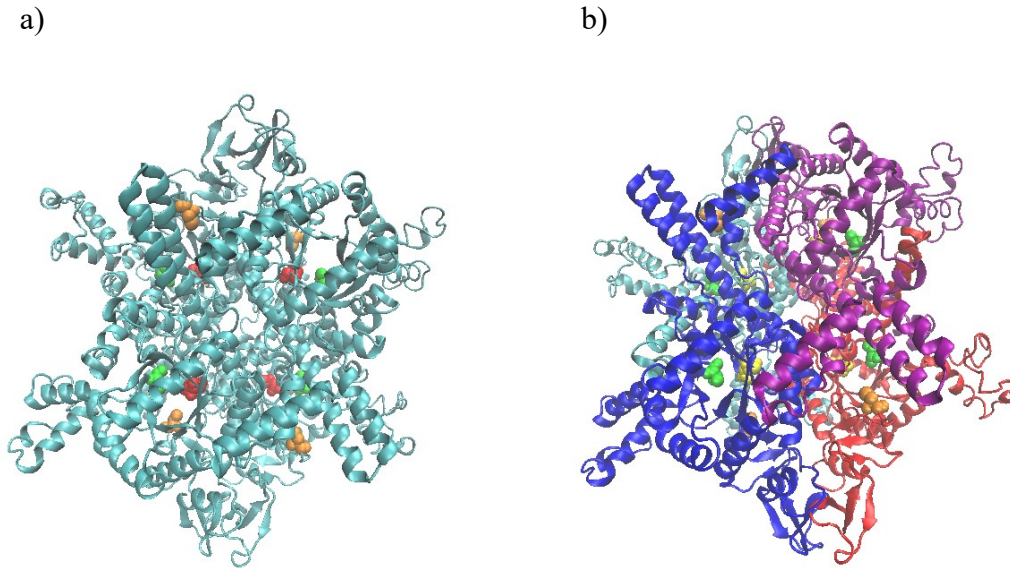


Figura 42. Predicción de la Icl de *A. schindleri* ACE resaltando: a) los sitios catalíticos más importantes: residuo de unión a magnesio: aspartato 184 (rojo), sitio activo: cisteína 222 (naranja) y sitio de unión a sustrato: treonina (verde), y b) cada subunidad de la proteína con un color distinto: A (azul), B (rojo), C (cyan) y D (morado). Imágenes visualizadas en VMD.

Se realizó un análisis para ver el comportamiento de las Icl del género *Acinetobacter* en la zona de interfase con respecto a la de *P. aeruginosa* 6G1O (Fig. 43). Las Icl del género *Acinetobacter* comparten entre si un porcentaje de identidad mayor al 84%, excepto 10 especies que tienen un porcentaje de identidad del 84 al 89%: *A. soli*, *A. marinus*, *A. populi*, *A. puyangensis*, *A. qingfengensis*, *A. haemolyticus*, *A. junii*, *A. guerrae*, *A. baylyi* y *A. ursingii*. Ésto se ve reflejado en la figura 43 donde están ubicados los residuos involucrados en la zona de interfase dentro del alineamiento; a partir de *A. soli* son menos los residuos que se conservan en esta zona de interfase. De ahí en fuera, con las Icl que tienen un porcentaje de identidad mayor al 91% se esperaría se comporten de manera análoga o muy similar a lo obtenido con el análisis de la Icl de *A. schindleri* ACE.

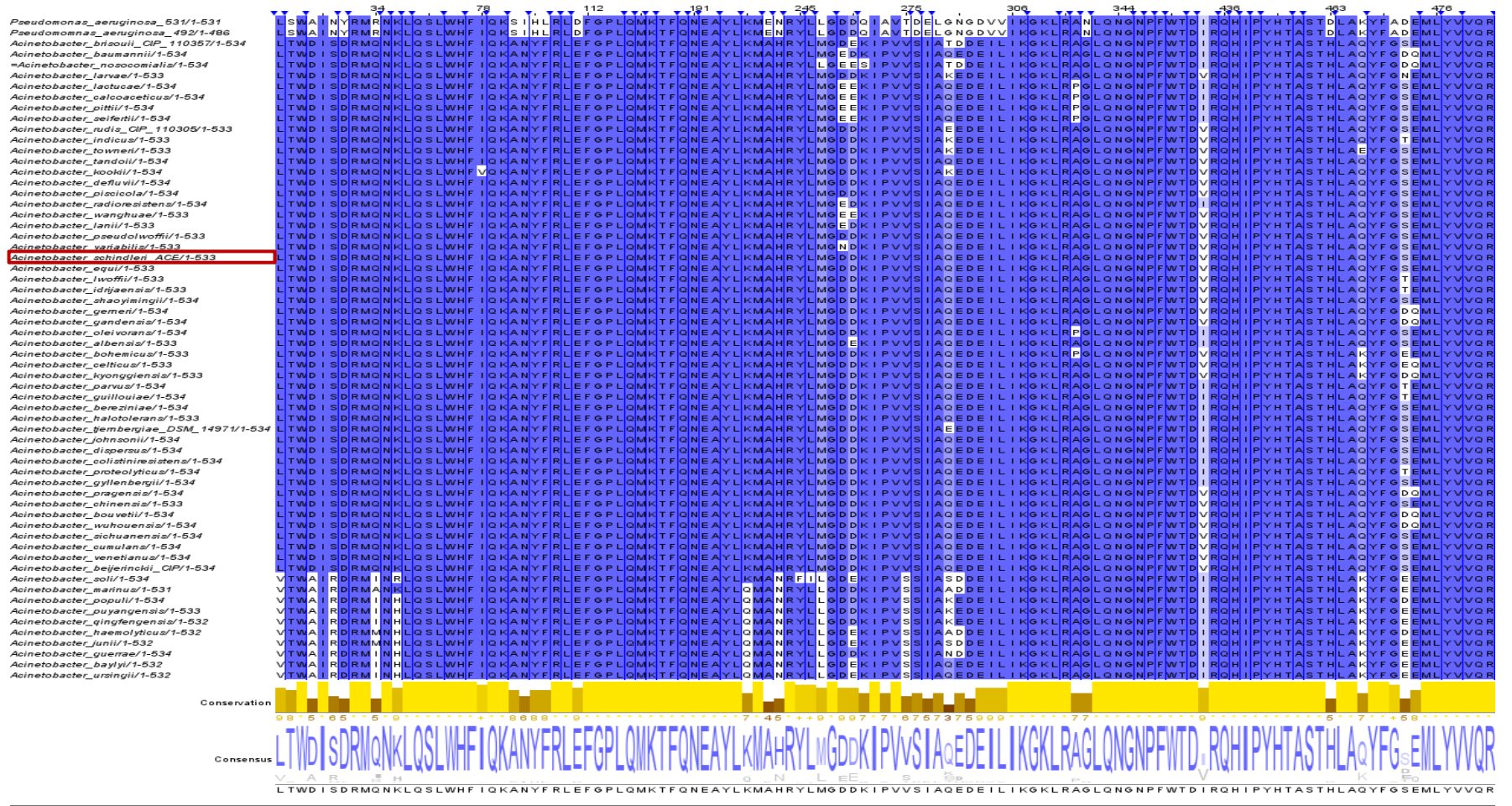


Figura 43. Conservación de los residuos de la zona de interfase de la Icd de *Pseudomonas aeruginosa* con respecto a las Icd del género *Acinetobacter*.

7.4.3.5. Comparación entre la Icdl de *A. schindleri* ACE Vs la Icl de *E. coli*.

Ambas estructuras se encuentran como homotetrameros. Icl de *A. schindleri* ACE (Fig 44 a) e Icl de *E. coli* (Fig 44 b), se procede a mostrar la superposición de la subunidad D de la Icl de *A. schindleri* ACE con respecto a la subunidad A de Icl de *E. coli* (Fig 44), ya que son las subunidades que se superponen, estas comparten un 24.65% de identidad y tienen un RMSD de 1.81, como se observa en la Figura 44 c, el sitio activo en la superposición para cada proteína parece encontrarse en diferentes zonas de la proteína.

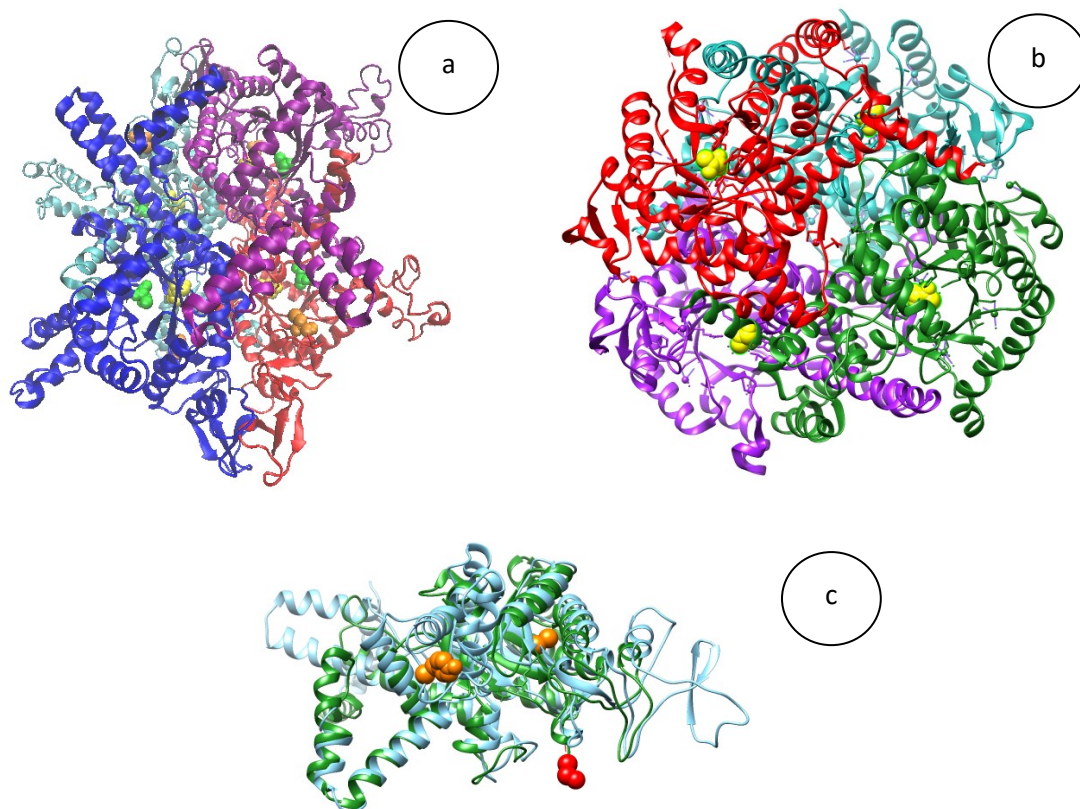


Figura 44. a) Icl de *A. schindleri* ACE, se muestran sus cuatro subunidades y sitios catalíticos b) Icl de *E. coli*, se muestran sus cuatro subunidades y sitios de unión a ligando en amarillo. c) Superposición de la subunidad A de *E. coli* (verde), sitio activo (rojo) con respecto a la subunidad D de la Icdh de *A. schindleri* ACE (azul) y su sitio activo en naranja.

7.4.4 Malato sintasa G.

Existen 2 isoformas de la malato sintasa, AceB y GlcB. *E. coli* cuenta con *glcB* y *aceB* en su genoma mientras que *A. schindleri* ACE sólo tiene *glcB*.

7.4.4.1 Comparación de las GlcB de *E. coli* y de *Acinetobacter*.

En la Figura 45 se observa el dendograma de las GlcB del género *Acinetobacter* junto con la de *E. coli*, siendo esta un grupo control externo. La secuencia de la GlcB de *A. boissierii* es la mas cercana evolutivamente a la de *E. coli*. *A. boissierii* fue aislada del néctar floral de plantas silvestres polinizadas por insectos mediterráneos (Álvarez *et al.* 2013).

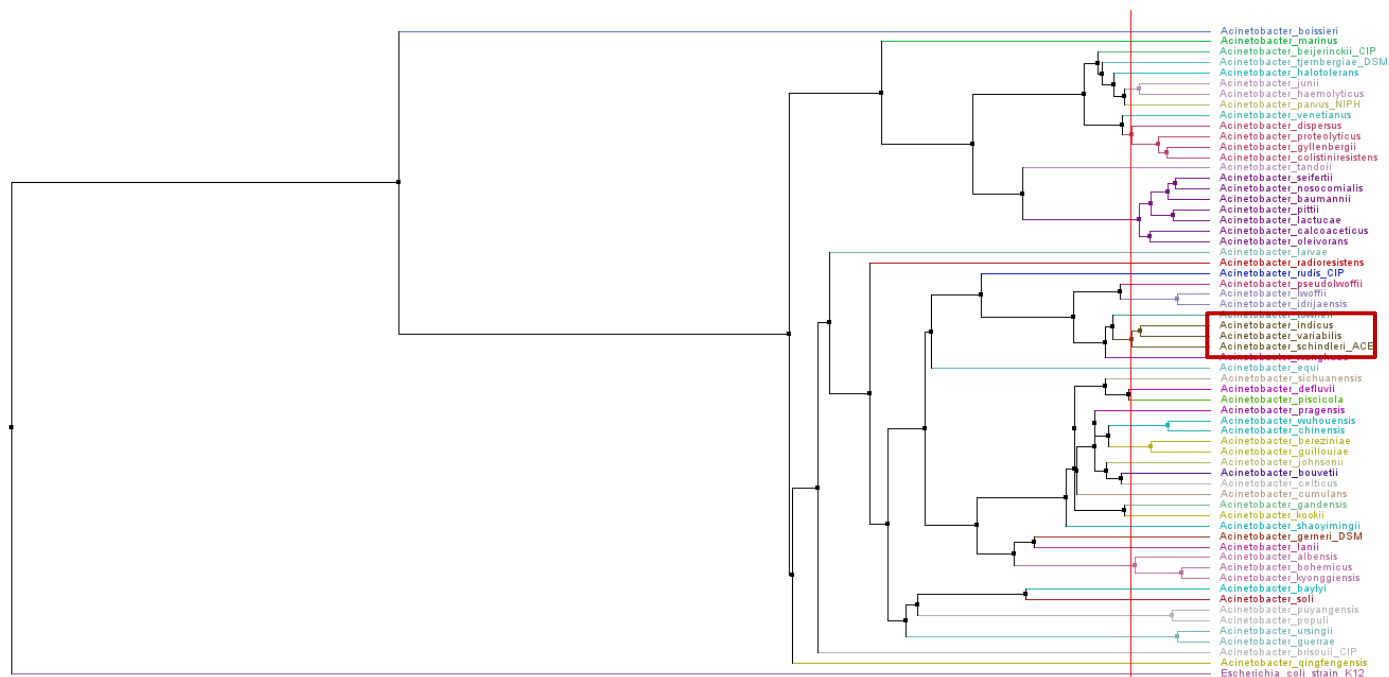


Figura 45. Dendograma de las GlcB del género *Acinetobacter* incluyendo la de *E. coli*.

En la Fig. 45 se observa en un recuadro rojo la secuencia la GlcB de *A. schindleri* ACE junto con las que comparte mayor cercanía evolutiva (Secuencias de *A. indicus* y *A. variabilis*). Es interesante que las secuencias de GlcB e Icdh-III de estos organismos compartan cercanía evolutiva con las de *A. schindleri* ACE.

7.4.4.2 Alineamiento y conservación del sitio activo de las GlcB de *E. coli* y de *Acinetobacter*.

La secuencia de GlcB de *E. coli* comparte 58.6% de identidad con la de *A. schindleri* ACE. Tomando como referencia los residuos importantes para la catálisis de GlcB de *E. coli* (UniProtKB - P37330 (MASZ_ECOLI)) se aprecia la siguiente conservación a nivel de estructura primaria de sitios en la de *A. schindleri* ACE:

Sitios de unión a Acetil Co-A.

- Valina 118: Se conserva 100 %.
- Serina 274: Se conserva 100 %.
- Arginina 311: Se conserva 100 %.
- Prolina 536: Se conserva 100 %.

Sitio activo.

- Arginina 338: Se conserva 100 %.
- Aspartato 631: Se conserva 100 %.

Sitio de unión a glioxilato.

- Arginina 338: Se conserva 100 %.
- Glutamato 427: Se conserva 100 %.
- G, F, L, D (posición: 452-455): El único residuo que cambia es la leucina 454 por metionina, ambos son apolares e hidrofóbicos aunque la metionina contiene azufre (S).

Sitio de unión a magnesio.

- Glutamato 427: Se conserva 100 %.
- Aspartato 455: Se conserva 100 %.

En la Figura 46 se corrobora que los sitios catalíticos importantes de la proteína mencionados anteriormente se conservan 100 % a nivel de estructura primaria entre todas las GlcB del

género *Acinetobacter* estudiadas en el presente proyecto con respecto a la GlcB de *E. coli*. Por tanto, pueden llegar a tener actividades catalíticas similares.

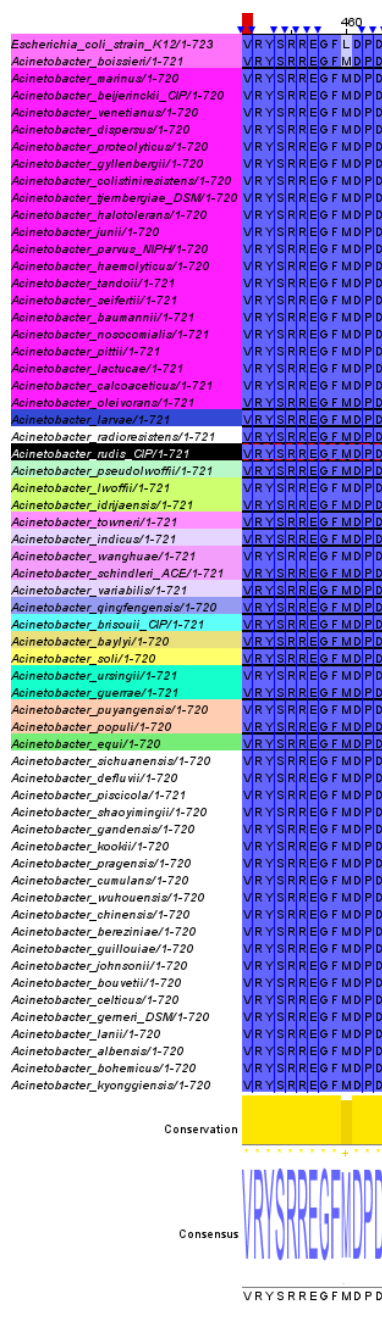


Figura 46. Alineamiento y conservación del sitio activo de GlcB de *E. coli* y de las *Acinetobacter*.

7.4.4.3 Predicción de la estructura de GlcB de *A. schindleri* ACE.

La GlcB de *A. schindleri* ACE no ha sido dilucidada estructuralmente, hasta ahora se sabe que las GlcB bacterianas se encuentran en forma monomérica (Anstrom *et al.*, 2003).

El primer acercamiento que se tuvo de la predicción de la estructura terciaria de la GlcB de *A. schindleri* ACE se obtuvo del servidor I-TASSER; dentro de la lista de PDBs que se toman como plantilla, se muestran las de mayor % de identidad en la Tabla 12.

Tabla 12. GlcB resueltas y depositadas en el PDB con mayores porcentajes de identidad con respecto a la secuencia de *A. schindleri* ACE.

Microorganismo	% de identidad
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (PDB: 5VFB, 5OAS)	64.4
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (PDB: 2GQ3)	59.4
<i>E. coli</i> K12 (PDB: 1D8C, 1P7T, 1Y8B, 2JQX)	58.5

Se realizó una superposición de los PDBs de la tabla 12 (Fig. 47) y se calcularon los valores de RMSF (Fig. 48). Aunque en su mayoría los residuos tienen un RMSF con valores menores a 6, existe una zona cercana al residuo 600 con un RMSF cercano a 10. Es decir, existen ciertas zonas que fluctúan entre las 6 estructuras superpuestas. Por ello, se tomaron por separado como plantillas las siguientes estructuras: 5OAS y 5VFB de *Pseudomonas aeruginosa*, 2GQ3 de *Mycobacterium tuberculosis* y 1D8C de *E. coli* K12. De esta forma se generaron 5 modelos distintos de la GlcB de *A. schindleri* ACE en SWISS MODEL. Estos modelos se superpusieron (Fig. 49) y se observa que no hay fluctuaciones significativas entre sí, por lo que se podrían utilizar cualquiera de estos 5 modelos.

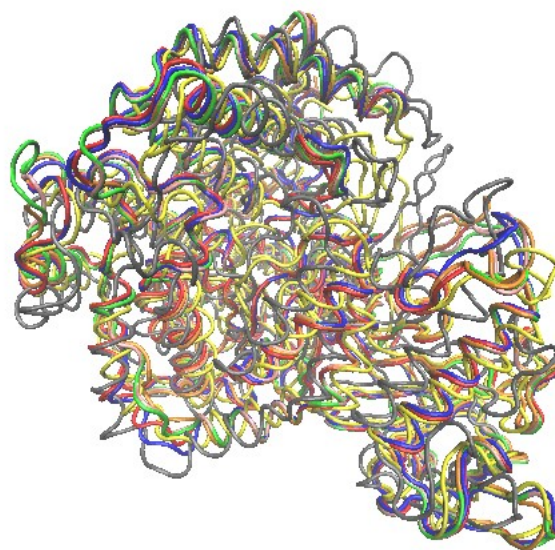


Figura 47. Superposición de los PDB 1D8C, 1P7T, 1Y8B, 2JQX., 2GQ3, 5VFB de las GlcB de la Tabla 12. Se empleó el programa R y se visualizaron en VMD.

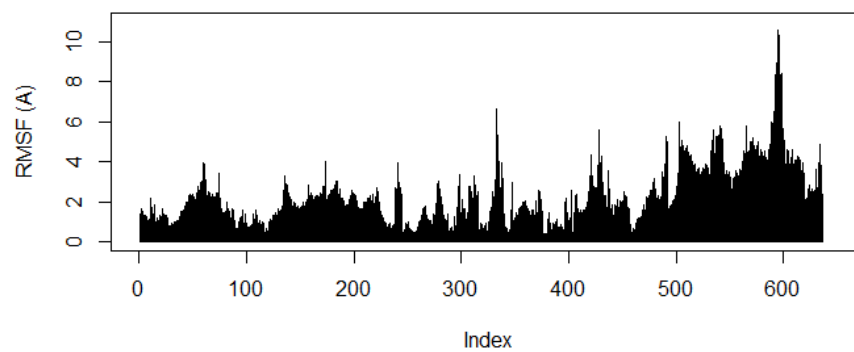


Figura 48. Valores de RMSF de los residuos de la superposición los PDB 1D8C, 1P7T, 1Y8B, 2JQX., 2GQ3, 5VFB de las GlcB de la Tabla 12.

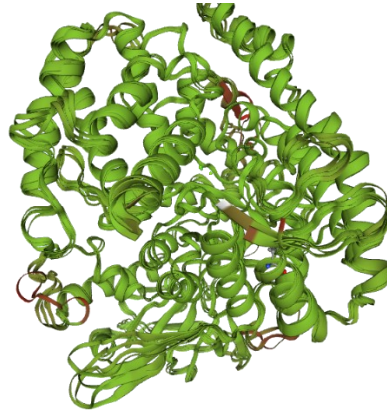


Figura 49. Superposición de los 5 modelos generados de la GlcB de *A. schindleri* ACE en SWISS MODEL.

Adicionalmente, se realizó otro análisis en el que se tomó como plantilla la GlcB de *E. coli* y se modeló en SWISS MODEL. Este modelo se comparó con el modelo que se predijo en I-TASSER mediante una superposición en YASARA (Fig. 50).

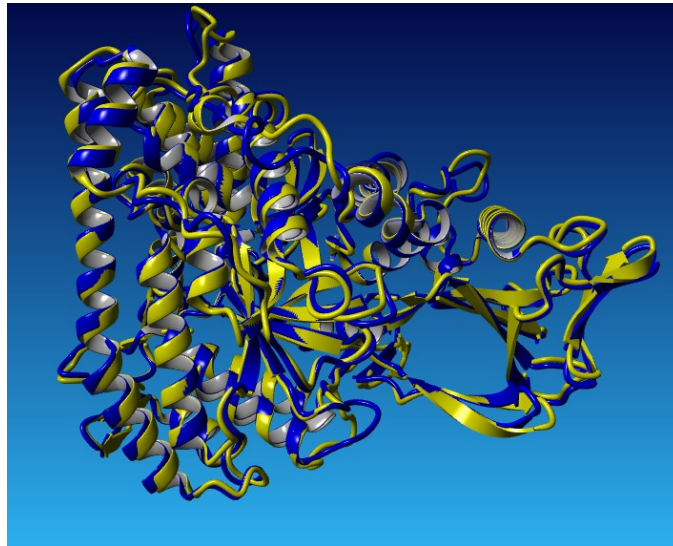


Figura 50. Superposición de los modelos de la estructura de la GlcB de *A. schindleri* ACE obtenidos en SWISS MODEL (azul) y en I-TASSER (amarillo).

Se observa que ambos modelos generados para la GlcB de *A. schindleri* ACE son muy similares y pasan los estándares que evalúa Saves v6.0. Sin embargo, la predicción por I-TASSER tiene mejores datos de validación y por tanto se utilizará este modelo en los subsecuentes análisis (ERRAT: 94.6 y VERIFY: 88.08), adicionalmente se obtuvo la grafica de Ramachandran que arroja que el 91.9 % de los residuos se encuentran en zonas favorecidas (Ver anexo VIII).

En la Figura 51 se resaltan los sitios catalíticos de la estructura de I-TASSER de la GlcB de *A. schindleri* ACE. Estos incluyen los siguientes

Sitios de unión a Acetil Co-A (Rojo): Valina 118, Serina 274, Arginina 311, Prolina 536.

Sitio activo (Azul): Arginina 338 y Aspartato 631.

Sitio de unión a glioxilato (verde): Arginina 338, Glutamato 427, Glicina 452, Fenilalanina 453, Metionina 454 y Aspartato 455.

Sitio de unión a magnesio (morado): Glutamato 427 (428) y Aspartato 455 (456).

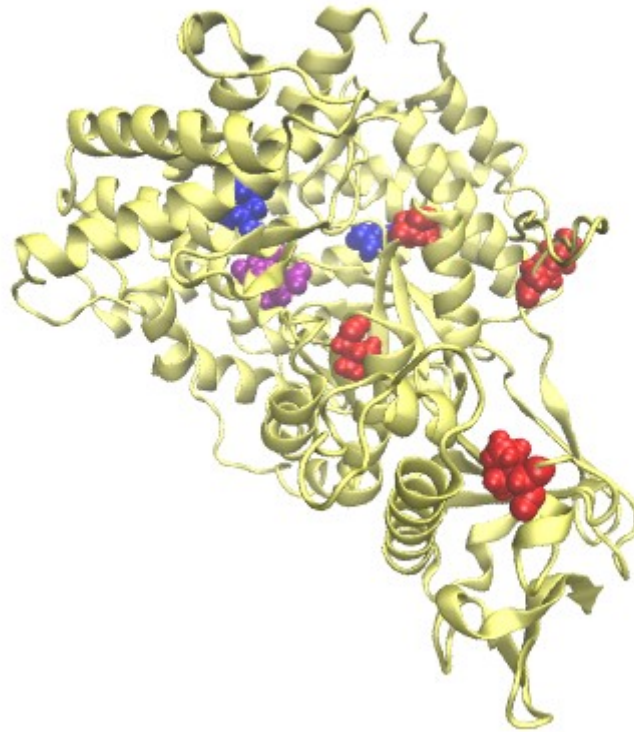


Figura 51. Predicción de la GlcB de *A. schindleri* ACE resaltando los sitios de unión a Acetil Co-A (Rojo), sitio activo (Azul), sitio de unión a glioxilato (verde) y sitio de unión a magnesio (morado).

En la Figura 52 se observa la superposición de la GlcB de *A. schindleri* ACE con respecto a la GlcB de *E. coli*, estas comparten un 56.94 % de identidad y un RMSD de 0.301, por su parte, sin embargo, al resaltar su sitio activo: en rojo para *E. coli* (Prolina 536) y en morado

para *A. schindleri* ACE (Arginina 338 y Aspartato 631) se observa que estos sitios se encuentran en diferentes zonas.



Figura 52. Superposición de la GlcB de *E. coli* (1P7T.pdb) contra el modelo de la GlcB de *A. schindleri* ACE, en rojo se observan el sitio activo de la GlcB de *E. coli* y en morado el sitio activo de la GlcB de *A. schindleri* ACE.

7.4.4.4 Comparación de las malato sintasas GlcB y AceB de *E. coli*.

En *E. coli*, la GlcB tiene una longitud de 723 aa, mientras que la AceB consta de 533 aa. Se ha reportado que la isoforma G monomérica (GlcB) se encuentra sólo en bacterias, mientras que la isoforma A oligomérica (AceB) se encuentra en bacterias, plantas y otros organismos (Anstrom *et al.*, 2003). La GlcB y la AceB de *E. coli* comparte apenas un 18.47 % de identidad. No obstante, se realizó una superposición de ambas estructuras (Fig. 53) y se observa claramente que las dos proteínas son muy distintas estructuralmente. Se calculó el

valor de RMSF (Fig. 54) y se determinó que sólo algunos residuos (alrededor de 400) son los que pueden superponerse, es posible que estos sitios conservados correspondan al sitio catalítico de las proteínas. Sin embargo, los valores de RMSF son mayores a 5, por lo que se evidencia que existen muchas fluctuaciones entre ambas estructuras, lo cual concuerda con el porcentaje de identidad que comparten dichas proteínas.

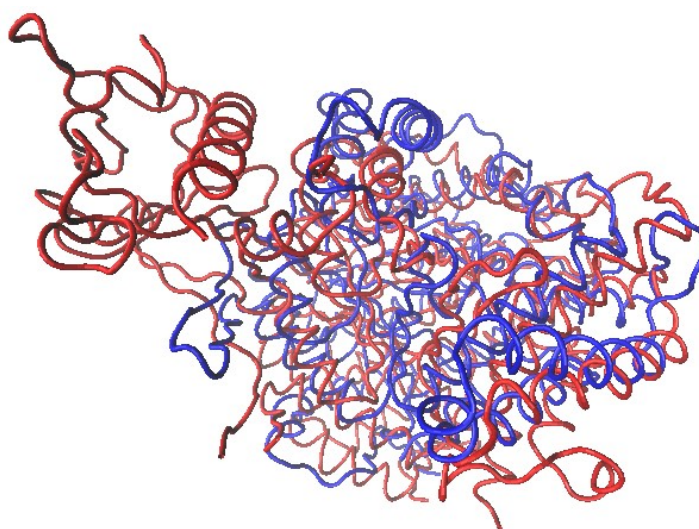


Figura 53. Superposición de GlcB (rojo) con respecto a AceB (azul) de *E. coli*.

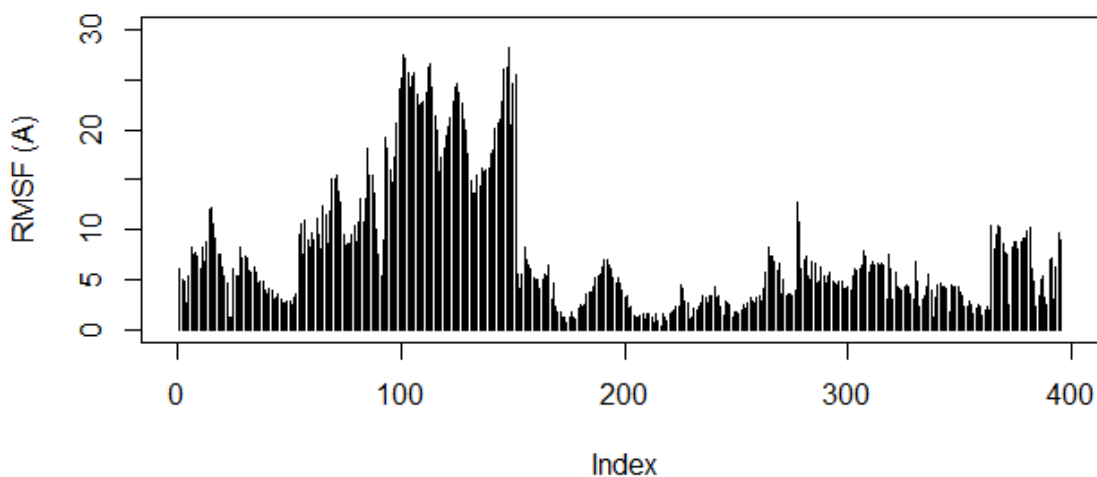


Figura 54. RMSF de la superposición de GlcB y AceB de *E. coli*.

Dados estos resultados, se espera que la comparación de GlcB de *A. schinderei* ACE con la AceB de *E. coli* tengan un comportamiento similar al descrito anteriormente.

7.4.4.5 Comparación de las GlcB de *Acinetobacter* y la AceB de *E. coli*.

Las GlcB de las distintas especies del género *Acinetobacter* tienen una longitud de entre 720 y 721 aa, en contraste con los 533 aa de la AceB de *E. coli*. En el dendograma de la Fig. 55 se observa que la raíz está dada por la secuencia de la AceB de *E. coli* (la rama morada), mientras que en el resto del árbol se agrupan las GlcB del género *Acinetobacter* y la GlcB de *E. coli*. GlcB de *E. coli* con comparte entre el 54 y el 59% de identidad respecto a las GlcB de las diferentes especies del género *Acinetobacter*. Por otro lado, AceB de *E. coli* comparte el 20.48% de identidad con respecto a GlcB de *A. schindleri* ACE. Es interesante mencionar que aún entre las GlcB del género *Acinetobacter*, estas comparten un porcentaje de identidad en un intervalo de 69 a 99%.

Los sitios catalíticos de AceB de *E. coli* con respecto a la GlcB del género *Acinetobacter* no se conservan a nivel de estructura primaria, lo cual es concordante con el porcentaje de identidad que éstas comparten ($\approx 20\%$).

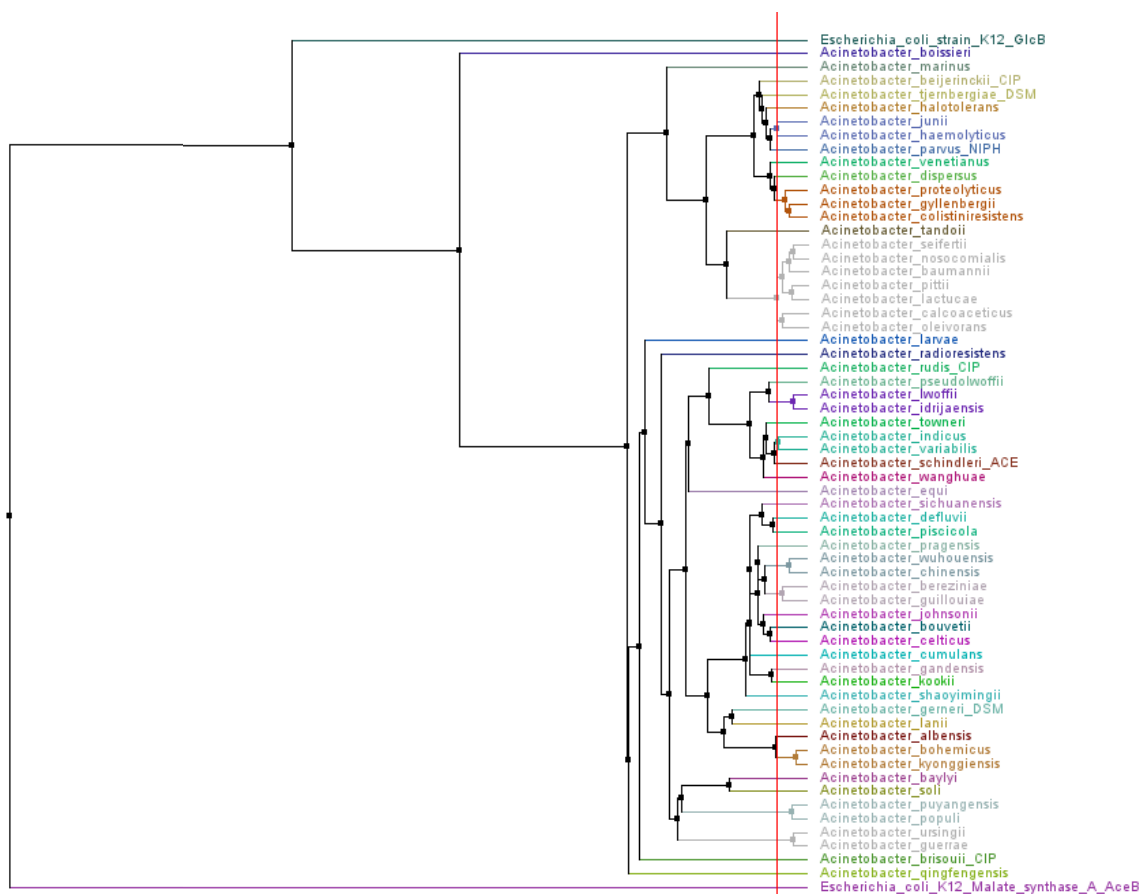


Figura 55. Dendograma de GlcB de diferentes especies del género *Acinetobacter* y de *E. coli* con respecto a la AceB de *E. coli*.

7.5 Correlación entre análisis de FBA y estructura de proteínas.

En la tabla 13 se observan los flujos de Icdh, Icl y GlcB de *E. coli* y de *A. schindleri* ACE control utilizados en FBA, donde *A. schindleri* ACE crece a una μ de 0.93 h^{-1} y *E. coli* crece a una μ de 0.93 h^{-1} utilizando acetato como fuente de carbono. Se observa que los flujos hacia Icdh e Icl son distintos en ambas bacterias, sin embargo, el flujo de GlcB es el mismo para ambas. Esto concuerda con el análisis estructural, debido a que, tras determinarse que Icdh e Icl tienen una conformación distinta entre ambas bacterias, se espera que sus actividades catalíticas sean diferentes, sin embargo, el parecido entre GlcB de *A. schindleri* ACE y *E. coli* sugiere que podrían tener datos cinéticos semejantes.

Tabla 13. Correlación entre flujos de Icdh, Icl y GlcB control de FBA con respecto a los datos obtenidos a nivel estructural.

Enzima	Flujo control FBA (mmol C/ DCW*h) A. schindleri ACE	Flujo control FBA (mmol C/DCW*h) E. coli	Parecidas estructuralmente
Icdh	14.4	4.8	NO
Icl	9.6	4.2	NO
GlcB	9.7	9.7	SI

8. CONCLUSIONES.

- El análisis de eliminación *in silico* en *A. schindleri* ACE permitió determinar que la vía preferencial de consumo de acetato es la de AckA-Pta, tal como se había sugerido a partir de los análisis transcripcionales (Sigala et al., 2017). De igual manera, este tipo de análisis permitió identificar una afectación en el crecimiento de *E. coli* JM101 en acetato al tener inactiva la vía de asimilación AckA-Pta.
- La modulación de las actividades de Icdh y de Icl *in silico* mostró que para alcanzar una μ máxima se tienen valores aproximadamente 3 veces más elevados de flujos de carbono en *A. schindleri* ACE que en *E. coli* JM101. Esto concuerda con el análisis de variabilidad de estas enzimas pues hay una menor flexibilidad de sus flujos en *A. schindleri* ACE en comparación con los de *E. coli* JM101 para sus respectivas μ máximas. De hecho, se observó que para alcanzar una μ de 0.93 h^{-1} en el modelo metabólico de *A. schindleri* ACE, los flujos de buena parte de las enzimas del metabolismo central de carbono funcionan en su máximo nivel.
- El análisis estructural demostró que tanto Icdh como Icl son enzimas que tienen una conformación distinta en ambas bacterias, esto implicaría que las actividades enzimáticas pueden ser sustancialmente distintas. La desregulación de las actividades alrededor del nodo de isocitrato que se presenta en *A. schindleri* ACE justificaría de forma importante el aumento de actividad simultánea de Icdh y de Icl que se ha predicho en los modelos metabólicos.
- Para el caso de *A. schindleri* ACE, es muy probable que la Icdh-III se encuentra como homodímero y la Icl como homotetrámero. Adicionalmente, en este género de bacterias las Icdh están más conservadas que las Icl.
- La GlcB de *A. schindleri* ACE es estructuralmente parecida a la de *E. coli* y compensa sin mayor problema la actividad de la AceB que se encuentra en *E. coli* pero no en *A. schindleri* ACE.

9. PERSPECTIVAS.

1. Probar con un modelo metabólico a escala genómica de *A. schindleri* ACE las simulaciones realizadas con el modelo reducido.
2. Inactivar experimentalmente *ackA-pta* y *acs* en *A. schindleri* ACE y obtener los datos cinéticos de crecimiento y consumo de sustrato.
3. Medir experimentalmente las actividades enzimáticas de las 3 proteínas de estudio (Icdh, Icl y GlcB) tanto en *E. coli* JM101 como en *A. schindleri* ACE.

10. REFERENCIAS.

- Anstrom, D. M., Kallio, K., & Remington, S. J. (2003). Structure of the *Escherichia coli* malate synthase G: pyruvate: acetyl-coenzyme A abortive ternary complex at 1.95 Å resolution. *Protein Science*, 12(9), 1822-1832.
- Aidelberg, G., Towbin, B. D., Rothschild, D., Dekel, E., Bren, A., & Alon, U. (2014). Hierarchy of non-glucose sugars in *escherichia coli*. *BMC Systems Biology*, 8(1), 133-133. doi:10.1186/s12918-014-0133-z
- Altschul, S. F., & Pop, M. (2017). Sequence Alignment.
- Álvarez-Pérez, S., Lievens, B., Jacquemyn, H., & Herrera, C. M. (2013). *Acinetobacter nectaris* sp. nov. and *Acinetobacter boissieri* sp. nov., isolated from floral nectar of wild Mediterranean insect-pollinated plants. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 63(Pt_4), 1532-1539.
- Amin, F. R., Khalid, H., Zhang, H., Rahman, S. u., Zhang, R., Liu, G., & Chen, C. (2017). Pretreatment methods of lignocellulosic biomass for anaerobic digestion. *AMB Express*, 7(1), 1-12. doi:10.1186/s13568-017-0375-4
- Arteaga G. J.E. Estudio de la biotransformación de furfural en cepas de *Acinetobacter*. Tesis de maestría. Universidad Autónoma Metropolitana. Febrero 2020.
- Bateman, A., Martin, M. J., Orchard, S., Magrane, M., Agivetova, R., Ahmad, S., Alpi, E., Bowler Barnett, E. H., Britto, R., Bursteinas, B., Bye-A-Jee, H., Coetzee, R., Cukura, A., Silva, A. Da, Denny, P., Dogan, T., Ebenezer, T. G., Fan, J., Castro, L. G., ... Zhang, J. (2021). UniProt: The universal protein knowledgebase in 2021. *Nucleic Acids Research*, 49(D1), D480–D489. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1100>.
- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., ... & Bourne, P. E. (2000). The protein data bank. *Nucleic acids research*, 28(1), 235-242.
- Bernal, V., Castaño-Cerezo, S., & Cánovas, M. (2016). Acetate metabolism regulation in *Escherichia coli*: Carbon overflow, pathogenicity, and beyond. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(21), 8985-9001. doi:10.1007/s00253-016-7832-x.
- Bowie, J. U., Luthy, R., & Eisenberg, D. (1991). A method to identify protein sequences that fold into a known three-dimensional structure. *Science*, 253(5016), 164-170.

- Castaño-Cerezo, S., Pastor, J. M., Renilla, S., Bernal, V., Iborra, J. L., & Cánovas, M. (2009). An insight into the role of phosphotransacetylase (*pta*) and the acetate/acetyl-CoA node in *escherichia coli*. *Microbial Cell Factories*, 8(1), 54-54. doi:10.1186/1475-2859-8-54
- Castaño-Cerezo, S., Bernal, V., Post, H., Fuhrer, T., Cappadona, S., Sánchez-Díaz, N. C., ... & Cánovas, M. (2014). Protein acetylation affects acetate metabolism, motility and acid stress response in *Escherichia coli*. *Molecular systems biology*, 10(11), 762.
- Chuetor, S., Champreda, V., & Laosiripojana, N. (2019). Evaluation of combined semi-humid chemo-mechanical pretreatment of lignocellulosic biomass in energy efficiency and waste generation. *Bioresource Technology*, 292, 121966. doi:10.1016/j.biortech.2019.121966
- Ceccarelli, C., Grodsky, N. B., Ariyaratne, N., Colman, R. F., & Bahnson, B. J. (2002). Crystal structure of porcine mitochondrial NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase complexed with Mn²⁺ and isocitrate insights into the enzyme mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, 277(45), 43454-43462.
- Colovos, C., & Yeates, T. O. (1993). Verification of protein structures: patterns of nonbonded atomic interactions. *Protein science*, 2(9), 1511-1519.
- Cozzone, A. J., & El-Mansi, M. (2005). Control of isocitrate dehydrogenase catalytic activity by protein phosphorylation in *Escherichia coli*. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 9(3-4), 132-146.
- Crousilles, A., Dolan, S. K., Brear, P., Chirgadze, D. Y., & Welch, M. (2018). Gluconeogenic precursor availability regulates flux through the glyoxylate shunt in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Biological Chemistry*, 293(37), 14260-14269
- De Berardinis, V., Salanoubat, M., Besnard, M., Le Fèvre, F., Richez, C., Pezo, V., . . . Kreimeyer, A. (2008). A complete collection of single-gene deletion mutants of *acinetobacter baylyi* ADP1. *Molecular Systems Biology*, 4(1), 174-n/a. doi:10.1038/msb.2008.10
- De Mets, F., Van Melderren, L., & Gottesman, S. (2019). Regulation of acetate metabolism and coordination with the TCA cycle via a processed small RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(3), 1043-1052.

- De Mey, M., De Maeseneire, S., Soetaert, W., & Vandamme, E. (2007). Minimizing acetate formation in *E. coli* fermentations. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 34(11), 689-700.
- Deng, H., Jia, Y., & Zhang, Y. (2018). Protein structure prediction. *International Journal of Modern Physics B*, 32(18), 1840009.
- Dittrich CR, Bennett GN, San KY. Characterization of the acetate-producing pathways in *Escherichia coli*. *Biotechnol Prog* 2005;**21**:1062-1067.
- Crousilles, A., Dolan, S. K., Brear, P., Chirgadze, D. Y., & Welch, M. (2018). Gluconeogenic precursor availability regulates flux through the glyoxylate shunt in *Pseudomonas aeruginosa*. *The Journal of biological chemistry*, 293(37), 14260–14269. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.004514>.
- Eiteman, M. A., & Altman, E. (2006). Overcoming acetate in *Escherichia coli* recombinant protein fermentations. *Trends in biotechnology*, 24(11), 530-536.
- El-Mansi M, Cozzone AJ, Shiloach J *et al*. Control of flux through enzymes of central and intermediary metabolism during growth of *Escherichia coli* on acetate. *Current Opinion in Microbiology* 2006;**9**:173-179.
- Endo, S., Yano, H., Kanamori, H., Inomata, S., Aoyagi, T., Hatta, M., ... & Kaku, M. (2014). High frequency of *Acinetobacter soli* among *Acinetobacter* isolates causing bacteremia at a tertiary hospital in Japan. *Journal of clinical microbiology*, 52(3), 911-915.
- Enjalbert B, Millard P, Dinclaux M *et al*. Acetate fluxes in *Escherichia coli* are determined by the thermodynamic control of the Pta-AckA pathway. *Scientific reports* 2017;**7**
- Fährrolfes, R.; Bietz, S.; Flachsenberg, F.; Meyder, A.; Nittinger, E.; Otto, T.; Volkamer, A.; Rarey, M. (2017). ProteinsPlus: a web portal for structure analysis of macromolecules. *Nucleic Acids Research*, 45:W337-W343.
- Flores N, Flores S, Escalante A *et al*. Adaptation for fast growth on glucose by differential expression of central carbon metabolism and gal regulon genes in an *Escherichia coli* strain lacking the phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system. *Metab Eng* 2005;**7**(2):70–87.

- George, D. G., Dodson, R. J., Garavelli, J. S., Haft, D. H., Hunt, L. T., Marzec, C. R., ... & Barker, W. C. (1997). The protein information resource (PIR) and the PIR-international protein sequence database. *Nucleic acids research*, 25(1), 24-27.
- Gimenez, R., Nuñez, M. F., Badia, J., Aguilar, J., & Baldoma, L. (2003). The gene *yjcG*, cotranscribed with the gene *acs*, encodes an acetate permease in *escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 185(21), 6448-6455. doi:10.1128/JB.185.21.6448-6455.2003.
- Goldstein, Y. A., & Bockmayr, A. (2015). Double and multiple knockout simulations for genome-scale metabolic network reconstructions. *Algorithms for Molecular Biology*, 10(1), 1-10.
- Gudmundsson, S., & Thiele, I. (2010). Computationally efficient flux variability analysis. *BMC bioinformatics*, 11(1), 1-3.
- Hay, J., & Schwender, J. (2011). (Brassica napus L.) embryos. *The Plant Journal*, 67(3), 526-541.
- Hernández-Domínguez, E. M., Castillo-Ortega, L. S., García-Esquivel, Y., Mandujano-González, V., Díaz-Godínez, G., & Álvarez-Cervantes, J. (2019). Bioinformatics as a Tool for the Structural and Evolutionary Analysis of Proteins. In *Computational Biology and Chemistry*. IntechOpen.
- Higgins D., Thompson J., Gibson T. Thompson J. D., Higgins D. G., Gibson T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22:4673-4680. (1994)
- Hurley, J. H., Thorsness, P. E., Ramalingam, V., Helmers, N. H., Koshland, D. E., & Stroud, R. M. (1989). Structure of a bacterial enzyme regulated by phosphorylation, isocitrate dehydrogenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(22), 8635-8639.
- Holms W. H. (1987). Control of flux through the citric acid cycle and the glyoxylate bypass in *Escherichia coli*. *Biochemical Society symposium*, 54, 17-31.
- Huson, D. H., & Bryant, D. (2006). Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Molecular biology and evolution*, 23(2), 254-267.

- Idalia, V. M. N., & Bernardo, F. (2017). *Escherichia coli* as a model organism and its application in biotechnology. *Recent Advances on Physiology, Pathogenesis and Biotechnological Applications. In Tech Open, Rijeka, Croatia*, 253-274.
- Imabayashi, F., Aich, S., Prasad, L., & Delbaere, L. T. (2006). Substrate-free structure of a monomeric NADP isocitrate dehydrogenase: An open conformation phylogenetic relationship of isocitrate dehydrogenase. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 63(1), 100-112.
- Irmak, S. (2017). Biomass as raw material for production of high value products. *Biomass Volume Estimation and Valorization for Energy*, 202-218.
- Isikgor, F. H., & Becer, C. R. (2015). Lignocellulosic biomass: A sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers. *Polymer Chemistry*, 6(25), 4497-4559. doi:10.1039/c5py00263.
- Kabir, M. M., & Shimizu, K. (2004). Metabolic regulation analysis of *icd*-gene knockout *Escherichia coli* based on 2D electrophoresis with MALDI-TOF mass spectrometry and enzyme activity measurements. *Applied microbiology and biotechnology*, 65(1), 84-96.
- Karlapudi, A. P., Venkateswarulu, T. C., Srirama, K., Dirisala, V. R., Kamarajugadda, B. P., Kota, R. K., & Kodali, V. P. (2019). Purification and lignocellulolytic potential of cellulase from newly isolated *Acinetobacter indicus* KTCV2 strain. *Iranian Journal of Science and Technology, Transactions A: Science*, 43(3), 755-761.
- Kanehisa, M., & Goto, S. (2000). KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic acids research*, 28(1), 27-30.
- Kim, P. S., Shin, N. R., Kim, J. Y., Yun, J. H., Hyun, D. W., & Bae, J. W. (2014). *Acinetobacter apis* sp. nov., isolated from the intestinal tract of a honey bee, *Apis mellifera*. *Journal of microbiology*, 52(8), 639-645.
- Kim, D., Baik, K. S., Kim, M. S., Park, S. C., Kim, S. S., Rhee, M. S., ... & Seong, C. N. (2008). *Acinetobacter soli* sp. nov., isolated from forest soil. *The Journal of Microbiology*, 46(4), 396-401.
- Kim D. (2018). Conversi3n fisicoqu3mica de la lignocelulosa: efectos inhibidores y estrategias de desintoxicaci3n: una mini revisi3n. *Mol3culas (Basilea, Suiza)* , 23 (2), 309. <https://doi.org/10.3390/molecules23020309>.

- Kornberg HL. The role and control of the glyoxylate cycle in *Escherichia coli*. *Biochemical Journal* 1966;99(1):1–11.
- Krizova, L., McGinnis, J., Maixnerova, M., Nemeč, M., Poirel, L., Mingle, L., ... & Nemeč, A. (2015). *Acinetobacter variabilis* sp. nov. (formerly DNA group 15 sensu Tjernberg & Ursing), isolated from humans and animals. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 65(Pt 3), 857.
- Mills, T., Sandoval, N. and Gill, R. (2009). Cellulosic hydrolysate toxicity and tolerance mechanisms in *Escherichia coli*. *Biotechnology for biofuels*. 2:26.
- Meyder, A.; Nittinger, E.; Lange, G.; Klein, R.; Rarey, M. (2017). Estimating Electron Density Support for Individual Atoms and Molecular Fragments in X-ray Structures. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 57(10): 2437–2447.
- Lara, Á. R. (2011). Producción de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. *Revista mexicana de ingeniería química*, 10(2), 209-223.
- Lopez, R. (2008). Biological Data Resources at the EMBL-EBI. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 10(2), 120–128. Recuperado a partir de <https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/9197>
- Lüthy, R., Bowie, J. U., & Eisenberg, D. (1992). Assessment of protein models with three-dimensional profiles. *Nature*, 356(6364), 83-85.
- Madeira, F., Park, Y. M., Lee, J., Buso, N., Gur, T., Madhusoodanan, N., ... & Lopez, R. (2019). The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic acids research*, 47(W1), W636-W641.
- Malhotra, J., Anand, S., Jindal, S., Rajagopal, R., & Lal, R. (2012). *Acinetobacter indicus* sp. nov., isolated from a hexachlorocyclohexane dump site. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 62(Pt_12), 2883-2890.
- Marti-Renom, M. A., Madhusudhan, M. S., & Sali, A. (2004). Alignment of protein sequences by their profiles. *Protein Science*, 13(4), 1071-1087.
- Martínez, L. (2015). Automatic identification of mobile and rigid substructures in molecular dynamics simulations and fractional structural fluctuation analysis. *PloS one*, 10(3), e0119264.

- Negrete, A., Majdalani, N., Phue, J. N., & Shiloach, J. (2013). Reducing acetate excretion from *E. coli* K-12 by over-expressing the small RNA SgrS. *New biotechnology*, 30(2), 269-273.
- Ogawa, T., Murakami, K., Mori, H., Ishii, N., Tomita, M., & Yoshin, M. (2007). Role of phosphoenolpyruvate in the NADP-isocitrate dehydrogenase and isocitrate lyase reaction in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 189(3), 1176–1178. <https://doi.org/10.1128/JB.01628-06>
- Oh, M. K., Rohlin, L., Kao, K. C., & Liao, J. C. (2002). Global expression profiling of acetate-grown *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 277(15), 13175-13183.
- Orth, J. D., Thiele, I., & Palsson, B. Ø. (2010). What is flux balance analysis?. *Nature biotechnology*, 28(3), 245-248.
- Orth, J. D., Conrad, T. M., Na, J., Lerman, J. A., Nam, H., Feist, A. M., & Palsson, B. Ø. (2011). A comprehensive genome-scale reconstruction of *Escherichia coli* metabolism—2011. *Molecular systems biology*, 7(1), 535.
- Pablos, T. E., Sigala, J. C., Le Borgne, S., & Lara, A. R. (2014). Aerobic expression of *Vitreoscilla* hemoglobin efficiently reduces overflow metabolism in *Escherichia coli*. *Biotechnology journal*, 9(6), 791-799.
- Parimi, N. S., Durie, I. A., Wu, X., Niyas, A. M., & Eiteman, M. A. (2017). Eliminating acetate formation improves citramalate production by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Microbial cell factories*, 16(1), 114.
- Pearson, W. R. (2013). An introduction to sequence similarity (“homology”) searching. *Current protocols in bioinformatics*, 42(1), 3-1.
- Perrenoud A, y Sauer U. Impact of global transcriptional regulation by ArcA, ArcB, Cra, Crp, Cya, Fnr, and Mlc on glucose catabolism in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 2005;3171-3179.
- Quiroz P.L. Comparación fisiológica y transcripcional del catabolismo de acetato entre *Escherichia coli* JM101 y *Acinetobacter schindleri* ACE. Tesis de maestría. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Cuajimalpa, Ciudad de México, 2019.

- Sargsyan, K., Grauffel, C., & Lim, C. (2017). How molecular size impacts RMSD applications in molecular dynamics simulations. *Journal of chemical theory and computation*, 13(4), 1518-1524.
- Sá-Pessoa, J., Paiva, S., Ribas, D., Silva, I. J., Viegas, S. C., Arraiano, C. M., & Casal, M. (2013). SATP (*YaaH*), a succinate-acetate transporter protein in *Escherichia coli*. *Biochemical Journal*, 454(3), 585-595. doi:10.1042/BJ20130412.
- Schneider, N., Lange, G., Hindle, S., Klein, R., Rarey, M. (2013). A consistent description of HYdrogen bond and DEhydration energies in protein–ligand complexes: methods behind the HYDE scoring function. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 27(1):15-29.
- Schöning-Stierand, K.; Diedrich, K.; Fährrolfes, R.; Flachsenberg, F.; Meyder, A.; Nittinger, E.; Steinegger, R.; Rarey, M. (2020). ProteinsPlus: interactive analysis of protein–ligand binding interfaces. *Nucleic Acids Research*, 48:W48-W53.
- Shiloach, J., Kaufman, J., Guillard, A. S., & Fass, R. (1996). Effect of glucose supply strategy on acetate accumulation, growth, and recombinant protein production by *Escherichia coli* BL21 (λ DE3) and *Escherichia coli* JM109. *Biotechnology and bioengineering*, 49(4), 421-428.
- Sigala JC, Flores S, Flores N et al. Acetate metabolism in *Escherichia coli* strains lacking phosphotransferase system; evidence of carbon recycling strategies and futile cycles. *J Mol Microbiol Biotechnol*. 2009;16(3,4):224–235.
- Sigala, J. C., Suárez, B. P., Lara, A. R., Le Borgne, S., Bustos, P., Santamaría, R. I., ... & Martínez, A. (2017). Genomic and physiological characterization of a laboratory-isolated *Acinetobacter schindleri* ACE strain that quickly and efficiently catabolizes acetate. *Microbiology*.
- Sigala, J., Quiroz, L., Arteaga, E., Olivares, R., Lara, A. R., & Martínez, A. (2019). Physiological and transcriptional comparison of acetate catabolism between *Acinetobacter schindleri* ACE and *Escherichia coli* JM101. *FEMS Microbiology Letters*, 366(12) doi:10.1093/femsle/fnz151
- Stenberg, F., Chovanec, P., Maslen, S. L., Robinson, C. V., Ilag, L. L., von Heijne, G., & Daley, D. O. (2005). Protein complexes of the *Escherichia coli* cell

envelope. *The Journal of biological chemistry*, 280(41), 34409–34419. <https://doi.org/10.1074/jbc.M506479200>.

- Shojaosadati, S. A., Varedi Kolaei, S. M., Babaeipour, V., & Farnoud, A. M. (2008). Recent advances in high cell density cultivation for production of recombinant protein. *Iranian Journal of Biotechnology*, 6(2), 63-84
- Song, P., Wang, M. L., Zheng, Q. Y., Wang, P., & Zhu, G. P. (2020). Isocitrate dehydrogenase 1 from *Acinetobacter baumannii* (AbIDH1) enzymatic characterization and its regulation by phosphorylation. *Biochimie*, 181, 77-85.
- Tomar, N., & De, R. K. (2013). Comparing methods for metabolic network analysis and an application to metabolic engineering. *Gene*, 521(1), 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.03.017>
- Towner K. The genus *Acinetobacter*. *Prokaryotes*, 2006;6:746-758.
- Renilla S, Bernal V, Fuhrer T et al. Acetate scavenging activity in *Escherichia coli*: interplay of acetyl-CoA synthetase and the PEP-glyoxylate cycle in chemostat cultures. *Appl Microbiol Biotechnol* 2012;93:2109-2124
- Valgepea K, Adamberg K, Nahku R et al. Systems biology approach reveals tan overflow metabolim of acetate in *Escherichia coli* is triggered by carbon catabolite repression of acetyl-CoA synthetase. *BMC Systems Biology* 2010;4(166).
- Vemuri, G. N., Minning, T. A., Altman, E., & Eiteman, M. A. (2005). Physiological response of central metabolism in *Escherichia coli* to deletion of pyruvate oxidase and introduction of heterologous pyruvate carboxylase. *Biotechnology and bioengineering*, 90(1), 64-76.
- Walsh, K., & Koshland, D. E., Jr (1985). Branch point control by the phosphorylation state of isocitrate dehydrogenase. A quantitative examination of fluxes during a regulatory transition. *The Journal of biological chemistry*, 260(14), 8430–8437.
- Wan, P., & Che, D. (2013). Constructing phylogenetic trees using interacting pathways. *Bioinformatics*, 9(7), 363.
- Wang, P., Wu, Y., Liu, J., Song, P., Li, S., Zhou, X., & Zhu, G. (2018). Crystal structure of the isocitrate dehydrogenase 2 from *Acinetobacter baumannii* (AbIDH2)

reveals a novel dimeric structure with two monomeric-IDH-like subunits. *International journal of molecular sciences*, 19(4), 1131.

- Waterhouse AM, Procter JB, Martin DMA, Clamp M, Barton GJ (2009) Jalview Version 2: un editor de alineación de secuencias múltiples y un banco de trabajo de análisis. *Bioinformatics* 25: 1189-1191. [doi: 10.1093 / bioinformática / btp033](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp033)
- Jan, J., Martinez, I., Wang, Y., Bennett, G. N., & San, K. Y. (2013). Metabolic engineering and transhydrogenase effects on NADPH availability in *Escherichia coli*. *Biotechnology progress*, 29(5), 1124-1130.
- J Yang, R Yan, A Roy, D Xu, J Poisson, Y Zhang. La suite I-TASSER: predicción de la estructura y función de las proteínas. *Nature Methods*, 12: 7-8 (2015).
- A Roy, A Kucukural, Y Zhang. I-TASSER: una plataforma unificada para la predicción automatizada de la estructura y función de las proteínas. *Nature Protocols*, 5: 725-738 (2010)
- Yasutake, Y., Watanabe, S., Yao, M., Takada, Y., Fukunaga, N., & Tanaka, I. (2002). Structure of the monomeric isocitrate dehydrogenase: evidence of a protein monomerization by a domain duplication. *Structure*, 10(12), 1637-1648.
- Y Zhang. Servidor I-TASSER para la predicción de la estructura de proteínas en 3D. *BMC Bioinformatics*, vol 9, 40 (2008).
- Zhao, J., & Shimizu, K. (2003). Metabolic flux analysis of *Escherichia coli* K12 grown on ¹³C-labeled acetate and glucose using GC-MS and powerful flux calculation method. *Journal of biotechnology*, 101(2), 101-117.

11. ANEXOS

11.1 Anexo I.

Tabla 14. Bases de datos, servidores y herramientas empleadas en la metodología

Base de datos	Enlace (URL)	Cita
Instituto Europeo de Bioinformática (EMBL-EBI)	https://www.ebi.ac.uk/about	Lopez, R (2008)
Instituto Suizo de Bioinformática (S6IB)	https://www.sib.swiss/	-
Universal Protein Resource (UNIPROT)	https://www.uniprot.org/	Bateman <i>et al</i> , (2021)
Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEEG).	https://www.genome.jp/kegg/	Kanehisa, M., & Goto, S. 2000.
Protein Information Resource (PIR)	https://proteininformationresource.org/	George <i>et al</i> . 1997
Protein data bank (PDB)	https://www.rcsb.org/	Berman <i>et al</i> . 2000
Servidores	Enlace (URL)	Cita
SWISS-MODEL	https://swissmodel.expasy.org/interactive	Waterhouse <i>et al</i> , 2018
GetContacts	https://getcontacts.github.io/	-
SAVES v6.0	https://saves.mbi.ucla.edu/	Colovos, C., & Yeates, T.O. 1993,

		Bowie <i>et al.</i> , 1991, Luethy <i>et al.</i> , 1992
I-TASSER	https://zhanggroup.org/I-TASSER/	J Yang <i>et al.</i> 2015, A Roy <i>et al.</i> 2010 & Y Zhang, 2018
Clustal Omega en la plataforma de EMBL-EBI	https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/	Madeira <i>et al.</i> , 2019
PROTEINS PLUS	https://proteins.plus	Schöning-Stierand <i>et al.</i> 2020 & Fahrrolfes <i>et al.</i> 2017
Herramientas	Enlace (URL)	Cita
Jalview	https://www.jalview.org/	Waterhouse AM <i>et al.</i> , 2009
FLAREPLOT	https://gpcrviz.github.io/flareplot/?p=create	-

11.2 Anexo II.

Tabla 15. 10 PDBs análogos a la enzima Icl identificados por I-TASSER con mayor parentesco.

Click to view	Rank	PDB Hit	TM-score	RMSD ^a	IDEN ^a
	1	6g1oA	0.901	0.93	0.722
	2	6edwA	0.729	2.63	0.225
	3	1dquA	0.696	2.63	0.234
	4	3oq8A	0.669	2.21	0.279
	5	1igwC	0.669	2.12	0.303
	6	3i4eA	0.665	1.87	0.284
	7	1f8iA	0.663	2.17	0.257
	8	3lg3A	0.654	2.13	0.296
	9	3eolB	0.587	1.81	0.273
	10	3m0jA	0.505	2.74	0.175

11.3 Anexo III

Tabla 16: Datos de la eliminación de *ackA-pta* y *acs* en *A. schindleri* ACE mediante FBA.

	Abreviación	OF max ac (sin restringir CO ₂ y O ₂) Biomasa fija	OF max ac (sin restringir CO ₂ y O ₂) Biomasa fija <i>ack</i> ⁻	OF max ac (sin restringir CO ₂ y O ₂) Biomasa fija <i>acs</i> ⁻	OF Biomass_max (sin restringir CO ₂ ni biomasa fija) <i>ack</i> ⁻	OF Biomass_max (sin restringir CO ₂ ni biomasa fija) <i>acs</i> ⁻
1	ACKr	37.13	0.00	37.13	0.00	37.12
2	ACONTa	24.00	29.06	24.00	22.20	23.99
3	ACONTb	24.00	29.06	24.00	22.20	23.99
4	ACS	0.00	42.19	0.00	32.06	0.00
5	Act2r	37.13	42.19	37.13	32.06	37.12
6	ADK1	0.00	42.19	0.00	32.06	0.00
7	AKGDH	13.35	18.41	13.35	14.21	13.35
8	AKGt2r	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
9	ATPM	8.39	8.39	8.39	8.39	8.39
10	ATPS4r	94.85	137.04	94.85	105.38	94.84
11	CO2t	-34.68	-44.81	-34.68	-34.41	-34.68
12	CS	24.00	29.06	24.00	22.20	23.99
13	CYTBO3_4	67.21	87.46	67.21	67.20	67.20
14	ENO	-3.86	-3.86	-3.86	-2.90	-3.86
15	EX_ac(e)	-37.13	-42.19	-37.13	-32.06	-37.12
16	EX_akg(e)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
17	EX_co2(e)	34.68	44.81	34.68	34.41	34.68
18	EX_fum(e)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
19	EX_gln_L(e)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
20	EX_glu_L(e)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
21	EX_h(e)	-18.47	-65.73	-18.47	-50.12	-18.47
22	EX_h2o(e)	41.45	93.77	41.45	71.56	41.45

23	EX_mal_L(e)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
24	EX_nh4(e)	-5.07	-5.07	-5.07	-3.81	-5.07
25	EX_o2(e)	-33.60	-43.73	-33.60	-33.60	-33.60
26	EX_pi(e)	-3.42	-3.42	-3.42	-2.57	-3.42
27	EX_pyr(e)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
28	EX_succ(e)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
29	FBA	-0.93	-0.93	-0.93	-0.69	-0.92
30	FBP	0.93	0.93	0.93	0.69	0.92
31	FRD7	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
32	FUM	22.99	28.06	22.99	21.45	22.99
33	FUMt2_2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
34	GAPD	-2.47	-2.47	-2.47	-1.86	-2.47
35	GLNS	0.24	0.24	0.24	0.18	0.24
36	GLNabc	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
37	GLUDy	-4.83	-4.83	-4.83	-3.63	-4.83
38	GLUN	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
39	GLUSy	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
40	GLUt2r	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
41	H2Ot	-41.45	-93.77	-41.45	-71.56	-41.45
42	ICDHyr	14.35	19.41	14.35	14.96	14.35
43	ICL	9.65	9.65	9.65	7.24	9.64
44	MALS	9.65	9.65	9.65	7.24	9.64
45	MALt2_2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
46	MDH	30.00	35.07	30.00	26.71	30.00
47	ME1	0.04	2.63	0.04	0.00	0.00
48	ME2	2.60	0.00	2.60	1.98	2.63
49	NADH16	44.21	59.40	44.21	45.75	44.21

50	NADTRHD	0.00	2.46	0.00	4.21	0.04
51	NH4t	5.07	5.07	5.07	3.81	5.07
52	O2t	33.60	43.73	33.60	33.60	33.60
53	PDH	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
54	PGI	-0.19	-0.19	-0.19	-0.14	-0.19
55	PGK	2.47	2.47	2.47	1.86	2.47
56	PGM	3.86	3.86	3.86	2.90	3.86
57	PIt2r	3.42	3.42	3.42	2.57	3.42
58	POX	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
59	PPC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
60	PPCK	4.35	4.35	4.35	3.26	4.35
61	PPS	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
62	PTAr	-37.13	0.00	-37.13	0.00	-37.12
63	PYRt2r	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
64	RPE	-0.67	-0.67	-0.67	-0.50	-0.67
65	RPI	-0.67	-0.67	-0.67	-0.50	-0.67
66	SUCct2_2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
67	SUCct3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
68	SUCDi	22.99	28.06	22.99	21.45	22.99
69	SUCOAS	-13.35	-18.41	-13.35	-14.21	-13.35
70	TALA	-0.17	-0.17	-0.17	-0.12	-0.17
71	THD2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
72	TKT1	-0.17	-0.17	-0.17	-0.12	-0.17
73	TKT2	-0.50	-0.50	-0.50	-0.38	-0.50
74	TPI	-0.93	-0.93	-0.93	-0.69	-0.92
75	Biomass	0.93	0.93	0.93	0.70	0.93

11.4 Anexo IV.

Tabla 17. Datos de la eliminación de *ackA-pta* y *acs* en *E. coli* JM101 mediante FBA.

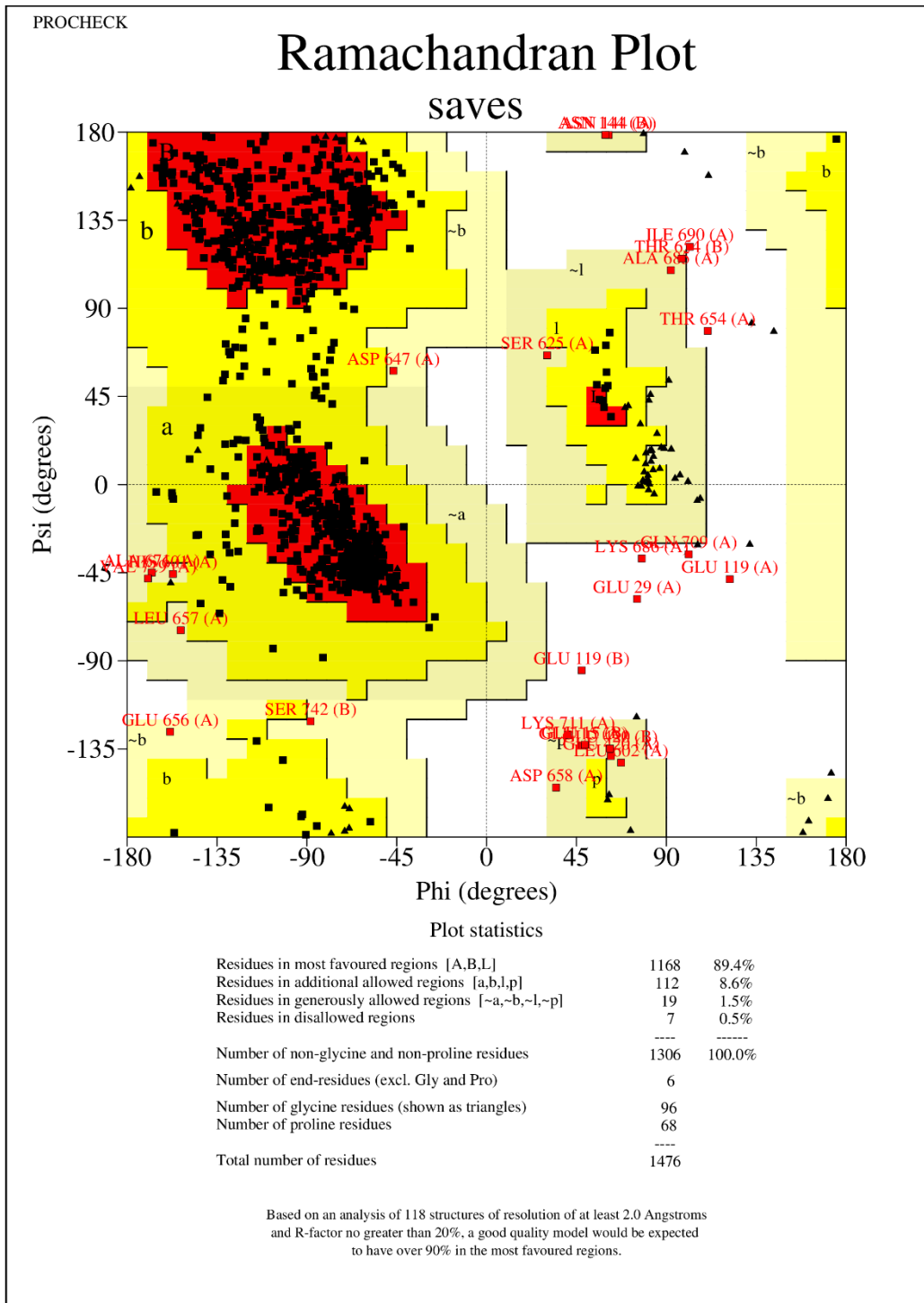
	Abreviación	OF ac_max (intervalo de valores experimentales, biomasa fija)	OF ac_max (intervalo de valores experimentales, biomasa fija) ACKr-	OF ac_max (intervalo de valores experimentales, biomasa fija) ACS-	OF max biomass (intervalo de valores experimentales) ACKr-	OF max biomass (intervalo de valores experimentales) ACS-
1	ACKr	13.215	EXITFLAG =	13.229	0.000	13.991
2	ACONTa	8.981		8.966	5.915	9.394
3	ACONTb	8.981	-2.000	8.966	5.915	9.394
4	ACS	0.000		0.000	9.373	0.000
5	ACt2r	13.080		13.080	5.105	13.991
6	ADK1	0.403		0.331	13.535	0.000
7	AKGDH	5.118		5.304	0.666	6.374
8	AKGt2r	0.638		0.638	1.020	0.595
9	ATPM	8.390		8.390	8.390	8.390
10	ATPS4r	40.352		40.180	39.972	40.787
11	CO2t	-15.310		-15.310	-15.310	-15.310
12	CS	8.981		8.966	5.915	9.394
13	CYTBO3_4	28.580		28.580	28.580	28.580
14	ENO	-1.449		-1.464	-0.210	-1.527
15	EX_ac(e)	-13.080		-13.080	-5.105	-13.991
16	EX_akg(e)	-0.638		-0.638	-1.020	-0.595
17	EX_co2(e)	15.310		15.310	15.310	15.310
18	EX_fum(e)	0.000		0.000	0.000	0.000
19	EX_glc(e)	0.000		0.000	0.000	0.000
20	EX_gln_L(e)	0.000		0.000	0.000	0.000
21	EX_glu_L(e)	0.000		0.000	0.000	0.000
22	EX_h(e)	-7.738		-7.738	-16.518	-7.805
23	EX_h2o(e)	16.437		16.437	22.643	16.798
24	EX_mal_L(e)	0.000		0.000	0.000	0.000
25	EX_nh4(e)	-1.799		-1.799	0.000	-2.005
26	EX_o2(e)	-14.290		-14.290	-14.290	-14.290
27	EX_pi(e)	-1.214		-1.214	0.000	-1.353
28	EX_pyr(e)	0.000		0.000	0.000	0.000
29	EX_succ(e)	0.000		0.000	0.000	0.000
30	FBA	-0.406		-0.422	-0.210	-0.366
31	FBP	0.926		0.964	2.410	0.366

32	FRD7	0.000		0.000	0.000	0.000
33	FUM	9.264		9.249	6.935	9.593
34	FUMt2_2	0.000		0.000	0.000	0.000
35	G6PDH2r	0.235		0.280	0.631	0.000
36	GAPD	-0.955		-0.971	-0.210	-0.977
37	GLCpts	0.000		0.000	0.000	0.000
38	GLNS	0.084		0.084	0.000	0.094
39	GLNabc	0.000		0.000	0.000	0.000
40	GLUDy	-1.715		-1.715	0.000	-1.911
41	GLUN	0.000		0.000	0.000	0.000
42	GLUSy	0.000		0.000	0.000	0.000
43	GLUt2r	0.000		0.000	0.000	0.000
44	GND	0.235		0.280	0.631	0.000
45	H2Ot	-16.572		-16.585	-26.910	-16.798
46	ICDHyr	4.836		5.021	-0.354	6.176
47	ICL	4.145		3.945	6.269	3.219
48	MALS	4.145		3.945	6.269	3.219
49	MALt2_2	0.000		0.000	0.000	0.000
50	MDH	10.788		10.861	1.962	11.770
51	ME1	0.432		0.444	7.828	0.066
52	ME2	2.189		1.889	3.413	0.976
53	NADH16	19.181		19.183	17.378	18.987
54	NADTRHD	2.496		2.758	7.491	0.451
55	NH4t	1.799		1.799	0.000	2.005
56	O2t	14.290		14.290	14.290	14.290
57	PDH	1.148		0.919	2.811	0.000
58	PFK	0.520		0.542	2.200	0.000
59	PGI	-0.302		-0.348	-0.631	-0.075
60	PGK	0.955		0.971	0.210	0.977
61	PGL	0.235		0.280	0.631	0.000
62	PGM	1.449		1.464	0.210	1.527
63	PIt2r	1.214		1.214	0.000	1.353
64	POX	0.135		0.148	4.268	0.000
65	PPC	0.545		0.565	6.719	0.000
66	PPCK	1.762		1.870	2.767	1.718
67	PPS	0.403		0.331	4.163	0.000
68	PTAr	-13.215		-13.229	0.000	-13.991
69	PYK	0.000		0.000	0.000	0.000
70	PYRt2r	0.000		0.000	0.000	0.000

71	RPE	-0.081		-0.051	0.421	-0.264
72	RPI	-0.315		-0.331	-0.210	-0.264
73	SUCct2_2	0.409		0.449	3.539	0.000
74	SUCct3	0.409		0.449	3.539	0.000
75	SUCDi	9.264		9.249	6.935	9.593
76	SUCOAS	-5.118		-5.304	-0.666	-6.374
77	TALA	0.019		0.034	0.210	-0.066
78	THD2	1.016		1.302	3.170	0.000
79	TKT1	0.019		0.034	0.210	-0.066
80	TKT2	-0.100		-0.085	0.210	-0.199
81	TPI	-0.406		-0.422	-0.210	-0.366
82	Biomass	0.330		0.330	0.000	0.368

11.5 Anexo V.

Figura 56. Grafico de Ramachandran de la estructura de la Icdh predicha en SWISS MODEL obtenida de Saves V6.0.



saves_01.ps

11.6 Anexo VI.

Tabla 18. Residuos de la zona de interfase de las subunidades A_B, A_C, A_D, B_C, B_D y C_D de 6G1O.pdb de *Pseudomonas aeruginosa* con respecto a la secuencia de la Icl de *A. schindleri* ACE.

Posición	Res	Res	Veces que aparece	ACE	CAMBIO	<i>P. aeruginosa</i>	ACE	Observación
14	LEU	L	2	SI				
21	SER	S	4	NO	Cambio por T	SERINA	TREONINA	Ambos son polares sin carga (Hidrofílicos)
22	TRP	W	1	SI				
24	ALA	A	1	NO	Cambio por D	ALANINA	ASPARTATO	A es hidrofóbico D está cargado negativamente (ácido)
25	ILE	I	3	SI				
26	ASN	N	1	NO	Cambio por S	ASPARAGINA	SERINA	Ambos son polares sin carga (Hidrofílicos)
29	TYR	Y	1	NO	Cambio por D	TIROSINA	ASPARTATO	Y es aromático (hidrofóbico). D está cargado negativamente (ácido)
33	MET	M	3	SI				

34	ARG	R	2	NO	Cambio por Q	ARGININA	GLUTAMINA	R está cargado positivamente (básico). Q es polar sin carga (hidrofilico)
37	ASN	N	1	SI				
40	LYS	K	3	SI				
43	LEU	L	1	SI				
69	GLN	Q	2	SI				
70	SER	S	1	SI				
71	LEU	L	2	SI				
74	TRP	W	2	SI				
75	HIS	H	2	SI				
77	PHE	F	2	SI				
78	ILE	I	1	SI				
81	GLN	Q	1	SI				
82	LYS	K	2	SI				
85	SER	S	2	NO	Cambio por A	SERINA	ALANINA	S es hidrofilico y A es apolar e hidrofóbico
86	ILE	I	1	NO	Cambio por N	ISOLEUCINA	ASPARAGINA	I es apolar e hidrofóbico. N es hidrofilico
89	HIS	H	2	NO	Cambio por Y	HISTIDINA	TIROSINA	H cargado positivamente (básico). Y es aromático (hidrofóbico)

90	LEU	L	2	NO	Cambio por F	LEUCINA	FENILALANINA	L es apolar e hidrofóbico. F es aromático (hidrofóbico)
96	ARG	R	1	SI				
108	LEU	L	3	SI				
111	ASP	D	1	NO	Cambio por E	ASPARTATO	GLUTAMATO	(ambos cargados negativamente; ácidos)
112	PHE	F	2	SI				
113	GLY	G	1	SI				
114	PRO	P	2	SI				
115	LEU	L	1	SI				
118	GLN	Q	1	SI				
120	MET	M	3	SI				
123	LYS	K	1	SI				
135	THR	T	1	SI				
136	PHE	F	2	SI				
139	GLN	Q	1	SI				
191	ASN	N	1	SI				
193	GLU	E	1	SI				
194	ALA	A	1	SI				
196	TYR	Y	1	SI				
197	LEU	L	3	SI				
201	LYS	K	2	SI				
218	ASP	D	1	Si				
241	ASN	N	1	NO	Cambio por H	ASPARAGINA	HISTIDINA	N es hidrofílico.

								H está cargado positivamente (básico)
244	ARG	R	2	SI				
245	TYR	Y	4	SI				
248	LEU	L	3	SI				
249	GLU	E	3	SI				
250	LEU	L	1	NO	Cambio por N	LEUCINA	ASPARAGINA	L es apolar e hidrofóbico. N es hidrofílico
253	ASP	D	2	SI				
271	GLN	Q	1	NO	Cambia por K	GLUTAMINA	LISINA	Q es polar sin carga (hidrofílico). K está cargado positivamente (básico)
272	ILE	I	2	SI				
273	ALA	A	1	NO	Cambia por P	ALANINA	PROLINA	A es apolar e hidrofóbico. P es apolar e hidrofóbico
274	VAL	V	2	SI				
275	THR	T	2	NO	Cambia por V	TREONINA	VALINA	T es hidrofílico. V es apolar e hidrofóbico
283	ASP	D	1	NO	Cambia por S	ASPARTATO	SERINA	D cargado negativamente (ácido).

								S es polar sin carga (hidrofilico)
296	GLU	E	4	NO	Cambia por I	GLUTAMATO	ISOLEUCINA	E cargado negativamente (ácido). I es apolar (hidrofóbico)
299	LEU	L	1	NO	Cambia por A	LEUCINA	ALANINA	L es apolar e hidrofóbico. A es apolar e hidrofóbico
300	GLY	G	1	NO	Cambia por Q	GLICINA	GLUTAMINA	G es apolar e hidrofóbica. Q es polar sin carga (hidrofilico)
301	ASN	N	3	NO	Cambia por E	ASPARAGINA	GLUTAMATO	N es hidrofilico. E está cargado negativamente (ácido)
302	GLY	G	3	NO	Cambia por D	GLICINA	ASPARTATO	G es apolar e hidrofóbica. D está cargado negativamente (ácido)
303	ASP	D	2	NO	Cambio por E	ASPARTATO	GLUTAMATO	D cargado negativamente (ácido).

								E está cargado negativamente (ácido)
304	VAL	V	1	NO	Cambio por I	VALINA	ISOLEUCINA	V cargado negativamente (ácido). I es apolar (hidrofóbico)
305	VAL	V	2	NO	Cambio por L	VALINA	LEUCINA	V cargado negativamente (ácido). L es apolar (hidrofóbico)
306	ILE	I	2	SI				
307	LYS	K	6	SI				
310	GLY	G	1	SI				
311	LYS	K	1	SI				
312	LEU	L	2	SI				
317	ARG	R	2	SI				
319	ALA	A	1	SI				
321	ASN	N	3	NO	Cambia por G	ASPARAGINA	GLICINA	N es hidrofílico. G es apolar e hidrofóbico
342	LEU	L	1	SI				
343	GLN	Q	1	SI				
344	ASN	N	1	SI				
345	GLY	G	1	SI				
381	ASN	N	1	SI				

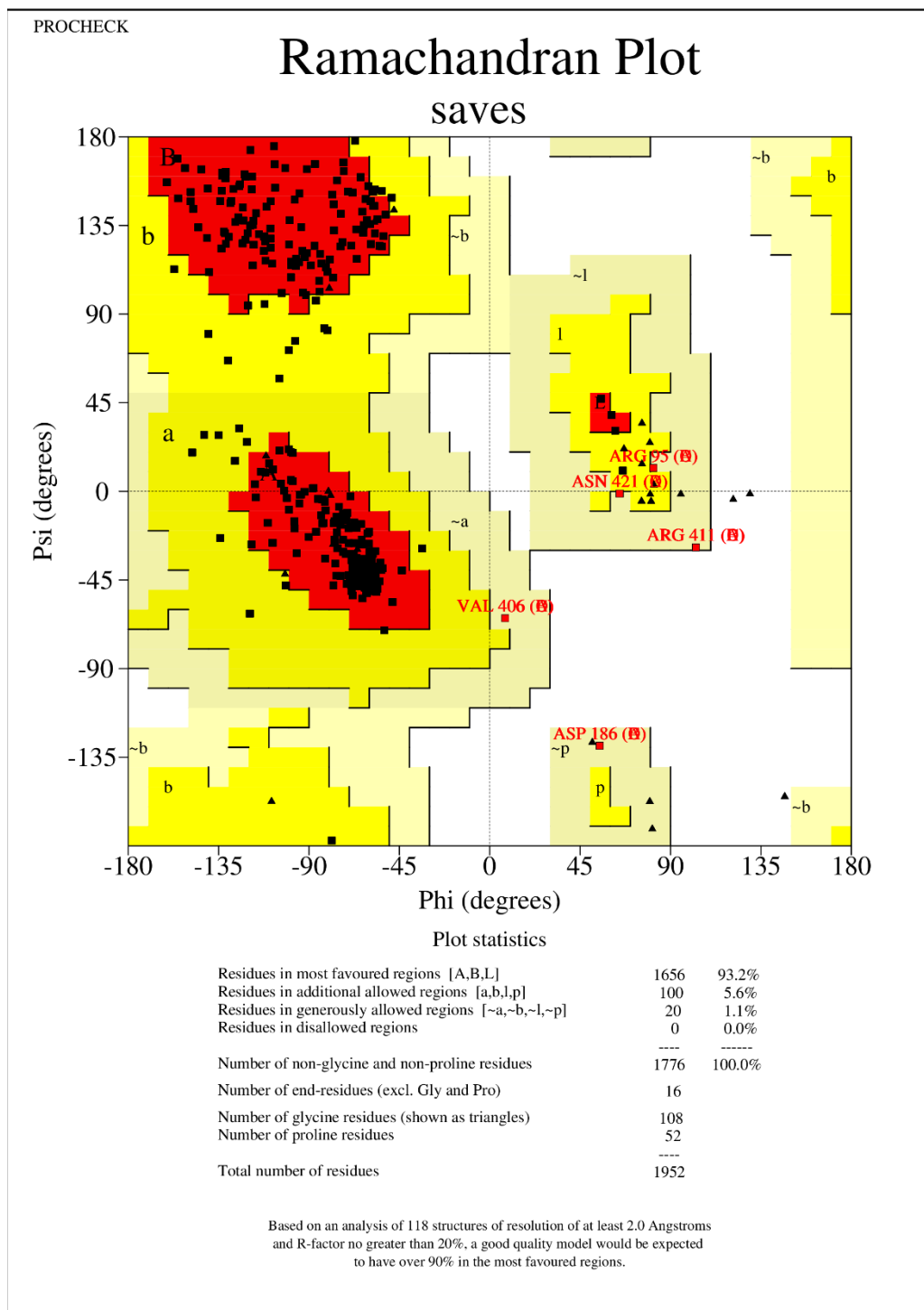
383	PRO	P	2	SI				
385	PHE	F	1	SI				
387	TRP	W	2	SI				
388	THR	T	1	SI				
429	ASP	D	2	SI				
432	ILE	I	1	NO	Cambio por V	ISOLEUCINA	VALINA	I es apolar e hidrofóbico. V es apolar e hidrofóbico
433	ARG	R	2	SI				
436	GLN	Q	2	SI				
448	HIS	H	1	SI				
450	ILE	I	3	SI				
453	PRO	P	1	SI				
455	TYR	Y	1	SI				
456	HIS	H	2	SI				
457	THR	T	2	SI				
459	ALA	A	1	SI				
461	SER	S	1	SI				
462	THR	T	2	SI				
463	ASP	D	2	NO	Cambio por H	ASPARTATO	HISTIDINA	D cargado negativamente (ácido). H está cargado positivamente (básico)
465	LEU	L	1	SI				
466	ALA	A	1	SI				
467	LYS	K	1	NO	Cambio por Q	LISINA	GLUTAMINA	L es apolar e hidrofóbico.

								Q es polar sin carga (hidrofilico)
469	TYR	Y	6	SI				
470	PHE	F	6	SI				
471	ALA	A	1	NO	Cambio por G	ALANINA	GLICINA	A es apolar e hidrofóbico. G es apolar e hidrofóbico
472	ASP	D	1	NO	Cambio por S	ASPARTATO	SERINA	D cargado negativamente (ácido). S es polar sin carga (hidrofilico)
473	GLU	E	1	SI				
475	MET	M	3	SI				
476	LEU	L	2	SI				
478	TYR	Y	4	SI				
479	VAL	V	1	SI				
482	VAL	V	2	SI				
483	GLN	Q	3	SI				
484	ARG	R	2	SI				

11.7 AnexoVII

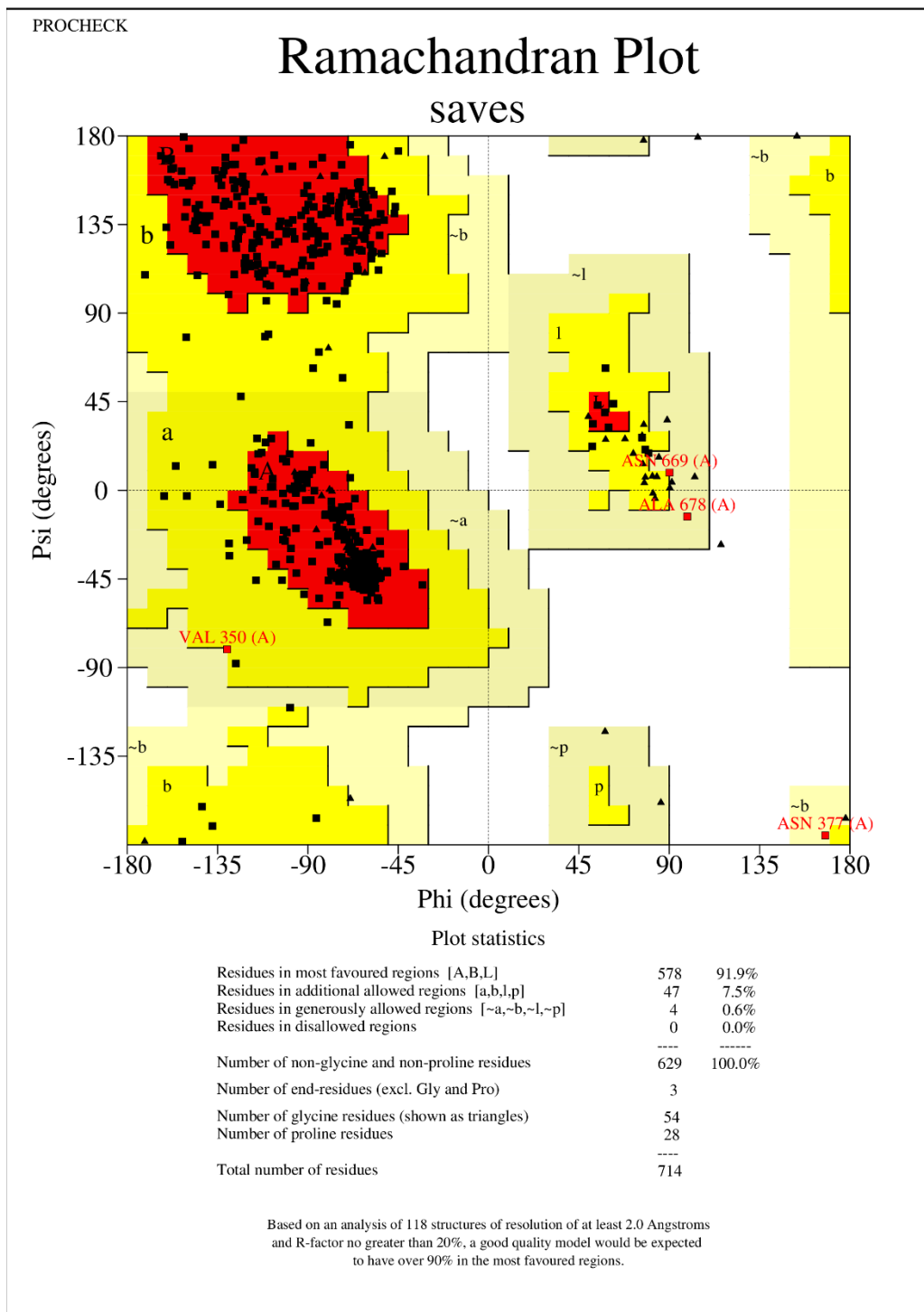
Figura 57: Grafico de Ramachandran de la estructura de la Icl predicha en SWISS

MODEL obtenida de Saves V6.0.



saves 01.ds

Figura 58: Grafico de Ramachandran de la estructura de la GlcB predicha en I- TASSER obtenida de Saves V6.0.



saves_01.ps