



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES

“IZTACALA”

**“EVOLUCION MOLECULAR DE ENZIMAS DEPENDIENTES
DE PIRIDOXAL FOSFATO QUE INTERVIENEN EN
VIAS DE BIOSINTESIS DE AMINOACIDOS”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

EDUARDO DIAZ VILLAGOMEZ

MEXICO, D. F.

1992

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradezco :

Al Biol. Antonio Lazcano-Araujo Reyes por la oportunidad y apoyo que me brindó durante la realización de mi trabajo de tesis bajo su dirección, en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias, UNAM.

A los Profesores de la E.N.E.P. Iztacala M. en C. Ramón Moreno, Biol. Irma Dueñas, Biol. Elias Piedra y Biol. Rafael Quintanar por formar parte del jurado calificador.

A la Directora de la E.N.E.P. Iztacala M. en C. Arlette López Trujillo por su ayuda en la agilización de los trámites, lo que facilitó mi partida para iniciar un nuevo ciclo en mi vida.

A la M. en C. Martha Salcedo por ser una parte clave para llegar al camino final; el examen profesional.

Al Dr. Germinal Cocho, al Dr. Pedro Miramontes y al proyecto UNAM-IN 105289 por la beca otorgada.

Al Dr. Joan Oró de la Universidad de Huoston EEUU, por las ideas para la realización de este trabajo.

A Thomas Mills de la Universidad de Huoston EEUU, por su cooperación en este trabajo con la secuencia de la cadena β de la triptofano sintasa de Zea mays.

A Renato Cappello, por su cooperación con los programas de computadora utilizados en este trabajo.

A Ana Velasco, por su asesoramiento en el uso de programas de computadora y por su buena vibra que poca gente tiene.

A Pilar por su apoyo incondicional y por ser lo más importante en mi vida el amor y la amistad.

A mis padres y hermanos por todo su apoyo y cariño que me brindaron para poder llegar a la meta.

A la E.N.E.P. Iztacala UNAM, por la oportunidad de estudiar Biología y darme los mejores amigos.

A mi México mágico por todo lo que llevo dentro de mi ser.

CONTENIDO

RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	2
METODOLOGIA.....	14
RESULTADOS.....	17
DISCUSION.....	33
ALINEACION DE SECUENCIAS.....	33
ARBOL FILOGENETICO DE LAS CADENA β DE LA TRIPTOFANO SINTASA.....	36
CONCLUSIONES.....	40
REFERENCIAS.....	43

RESUMEN

En este trabajo se compararon, primero por separado las secuencias disponibles de la cadena β de la triptofano sintasa, treonina sintasa, treonina deshidratasa y serina deshidratasa, y luego entre ellas. Se pudo comprobar así su origen monofilético, lo que implica que estas cuatro enzimas dependientes de fosfato de piridoxal, e involucradas en la biosíntesis de aminoácidos, provienen de un sólo gen ancestral del cual se originaron a través de varias duplicaciones génicas. Este resultado apoya la hipótesis de una enzima ancestral con poca especificidad por su sustrato.

Se construyó un árbol filogenético con secuencias de la cadena β de la triptofano sintasa, al cual se le puso raíz utilizando como grupo externo la treonina sintasa de Bacillus subtilis. Este árbol discrepa de los árboles universales usando las secuencias de genes parálogos de las FoF₁-ATPasas y de los factores de elongación. Estas diferencias probablemente se deben a varios eventos de transferencia horizontal de genes, lo cual implica que estas moléculas no sean las adecuadas para inferir filogenias de organismos. Estas enzimas dependientes de fosfato de piridoxal presentan un reloj molecular lento, lo que dificulta su utilización como marcadores filogenéticos.

Faltan páginas

N° 2-13

METODOLOGIA

Las secuencias disponibles de la cadena β de la triptofano sintasa, de la treonina sintasa, la treonina deshidratasa y la D-serina deshidratasa de los tres linajes celulares existentes se obtuvieron a partir de búsquedas en los bancos de genes de la Facultad de Ciencias, (UNAM) y del Instituto de Biotecnología UNAM en Cuernavaca, Morelos. Algunas secuencias adicionales se consiguieron bibliográficamente. La secuencia de Zea mays fue proporcionada por Thomas Mills de la Universidad de Houston, EEUU (comunicación personal). Las secuencias fueron obtenidas del Gene Bank en DNA y aminoácidos. Las secuencias de DNA fueron traducidas a aminoácidos con ayuda de programas de computadora. Las secuencias fueron comparadas por computadora en las terminales del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias. Para ello, se utilizaron programas comerciales con algoritmos que permiten realizar los alineamientos de las secuencias, principalmente el Fastp de Lipman y Pearson (Lipman, 1985) y el Clustal (Higgins and Sharp, 1988, 1989). Las secuencias se compararon una por una contra el resto, y también se realizaron alineamientos múltiples para estudiar el grado de similitud con cada una de ellas. A partir de estos resultados, se decidió si existe o no homología entre las proteínas estudiadas, usando los criterios de Doolittle (1989), y se construyó un árbol filogenético en base a los porcentajes de similitud de las cadenas β de la triptofano sintasa, con ayuda de programas de computadora. De esta manera se espera comprender, como evolucionó este grupo de enzimas biosintéticas dependientes de fosfato de pirodoxal.

Tabla 3. Secuencias de la cadena B de la triptofano sintasa

	Organismo	Linaje celular	Referencia
	<u>Escherichia coli</u>	(Eubac.)	Burns y Yanofsky, 1989
G	<u>Salmonella typhimurium</u>	(Eubac.)	Hyde et al. 1988
R			
A	<u>Pseudomonas putida</u>	(Eubac.)	Eberly y Crawford, 1989
M			
	<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	(Eubac.)	Hadero y Crawford, 1986
+	<u>Caulobacter crescentus</u>	(Eubac.)	Ross y Winkler, 1988
G	<u>Brevibacterium lactofermentum</u>	(Eubac.)	Natsui et al. 1986
R			
A	<u>Bacillus subtilis</u>	(Eubac.)	Parrot, 1987
M			
	<u>Bacillus stearothermophilus</u>	(Eubac.)	Ishiwata, 1989
-	<u>Lactobacillus casei</u>	(Eubac.)	Watori et al. 1990
	<u>Thermus thermophilus</u>	(Eubac.)	Koyama y Furukawa, 1989
	<u>Methanococcus voltae</u>	(Arque.)	Sibol y Henriquet, 1988
	<u>Methanobacterium thermoautotrophicum</u>	(Arque.)	Neile et al. 1991
	<u>Haloferax volcanii</u>	(Arque.)	Lan et al. 1990
	<u>Saccharomyces cerevisiae</u>	(Euca.)	Zelkin y Yanofsky, 1982
	<u>Neurospora crassa</u>	(Euca.)	Pratt y DeMoss, 1988
	<u>Cropinus cinereus</u>	(Euca.)	Skrzynia et al. 1989
	<u>Arabidopsis thaliana</u>	(Euca.)	Berlyn, 1989
	<u>Zea mays</u>	(Euca.)	Mills T.. com. per.

Tabla 4. Secuencias de la treonina sintasa

Organismo	Linaje celular	Referencia
<u>Escherichia coli</u>	(Eubac.)	Parsot <u>et al.</u> 1983
<u>Brevibacterium lactofermentum</u>	(Eubac.)	Malumbres <u>et al.</u> 1988
<u>Bacillus subtilis</u>	(Eubac.)	Parsot, 1986
<u>Saccharomyces cerevisiae</u>	(Euca.)	Aas y Rognes, 1990

Tabla 5. Secuencias de la treonina deshidratasa

Organismo	Linaje celular	Referencia
<u>Ratus sp.</u>	(Euca.)	Woda <u>et al.</u> 1988
<u>Saccharomyces cerevisiae</u>	(Euca.)	Kielland-Brand <u>et al.</u> 1984
<u>Salmonella typhimurium</u>	(Eubac.)	Taillon <u>et al.</u> 1988
<u>Escherichia coli</u>	(Eubac.)	Datta <u>et al.</u> 1987

Tabla 6. Secuencias de la serina deshidratasa

Organismo	Linaje celular	Referencia
<u>Ratus sp.</u>	(Euca.)	Ogawa <u>et al.</u> 1988
<u>Homo sapiens</u>	(Euca.)	Ogawa <u>et al.</u> 1989
<u>Saccharomyces cerevisiae</u>	(Euca.)	Seufert, 1990
<u>Escherichia coli</u>	(Eubac.)	Schiltz y Schmittew, 1981

Secuencias de aminoácidos de la triptofano sintasa cadena B (Tabla 3), treonina sintasa (Tabla 4), treonina deshidratasa (Tabla 5) y serina deshidratasa (Tabla 6) disponibles en el banco de genes de Eubacterias (Eubac.), de arqueobacterias (Arque.) y eucariontes (Euca.)

RESULTADOS

En primer lugar se alinearon por separado las secuencias disponibles de cada una de las cuatro enzimas, i.e., cadena β de la triptofano sintasa, treonina sintasa, treonina deshidratasa y serina deshidratasa (Fig. 2-5, Matrices 1-4).

TRIPTOFANO SINTASA β

50

```

TRPBMz      M-----
TRPBAt      MAASGTSATFRASVSSAPSSSSQLTHLKSPFKAVKYTPLSSRSKSSSFS
TRPBNc      -----
TRPBSc      -----
TRPBCc      -----
TRPBMh      M-----DGKFGK-----
TRPBMv      MKCNTK-----
TRPBHv      MSA-----
TRPBTh      MLT-----LPD-----FP
TRPBBS      MY-----
TRPBBA      ME-----
TRPBLc      M-----KTLNETTQQSTRA-----
TRPBBr      MTEKENLGG-----STLLPAY-----
TRPBPa      MT---S---YRNG-----
TRPBpp      MT---QSQYRPG-----
TRPBCr      MNAPAKPNDYSAY-----
TRPBEc      -----TLLNPY-----
TRPBSt      -----TLLNPY-----

```

100

```

TRPBMz      -----QRPDAMGRFG-RFGGKYVTETLMHALTE
TRPBAt      VSCTIAKDPVLMAGSDPALWQRPDSFGRFG-KFGGKYVPETLMHALSE
TRPBNc      ---LHG T I P K-----RFG-EFGGQYVPEALMDCLSE
TRPBSc      ---ENHKHPI-----RFG-DFGGQYVPEALHACLRE
TRPBCc      ---GVENILPA-----RFG-QFGGQYVPESLVDALAE
TRPBMv      --C-----DKNGYFG-EFGGQYIPEVLKPAVEE
TRPBMh      -----DGKFG-KYGGIFVPELLIPALEE
TRPBHv      -----DGKFG-DYGGQYVPEALMPAIEE
TRPBTh      L-----PDARGRFG-PYGGRYVPETLIPALEE
TRPBBS      -----PYPNEIGRYG-DFGGK FVPETLMQPLDE
TRPBBA      -----RVPNEHGRFG-DFGGK FVPETLMLPLEE
TRPBLc      -----GRYKDFGGQYIPELMTLEK
TRPBBr      -----FG-EFGGQFVAESLLPALDQ
TRPBPa      -----PDAKGLFG-GFGGQYVAETLMLPLILD
TRPBpp      -----PDANGLFG-SFGGRYVAETLMLPLVLD
TRPBCr      -----PDAEGRFG-GFGGRYVAETLMLPLVLD
TRPBEc      -----FG-EFGGMYVPQILMPALRQ
TRPBSt      -----FG-EFGGMYVPQILMPALNQ

```

150

TRPBMz LESAFHALATDDEFQKELDGILKDYVGRESPLYFAERLTEHYKRADGEG-
 TRPBAt LESAFYALATDDDFQRELAGILKDYVGRESPLYFAERLTEHYRRENCEGP
 TRPBNc LEEGFNKIKDDPAFWEEYRSYYP-WMGRPGQLHKAERLTEY-----AGGA
 TRPBSc LEKGFDEAVADPTFWEDFKSLYS-YIGRPSLHKAERLTEH-----CQGA
 TRPBCC LEEAHKSAIEDPAFWEEVRSLYT-YSNRPSNLYLAENLTKE-----AGGA
 TRPBMv LKEAYKELKDDDFQNELAYYLKHYAGRETPLYAKNLTEKL-----GGA
 TRPBMh LEAAFHLYSKDRRFNEDLEHYLREYAGRPTGLYHARNLSEKL-----GC-
 TRPBHv LTAYERYVLDNEDGFMDDFRRLRDFGGRPPTLQRADRLSE--RYDREV-
 TRPBTh LEAAYREAKKDPAFLEELDHYLRQFAGRPTPLYHAKRLSE-YW----GGA
 TRPBBS IQTAFKQIKDDPAFREEYKLLKDYSGRPTALTYADRVTEYL-----GGA
 TRPBBa IEAELD KALADESFQEQYIRILOHYSGRPTPLTFAPNLTRQL-----GGA
 TRPBLc VTKAFNDLKDNPFEKAEINDLLVNYANRPSLLYYAKNMTEDL-----GGA
 TRPBBr LEKAFVDATNSPEFREELGGYLRDYLGRPTPLTECSNLPLA--GEGKGF
 TRPBPa LAREYEKAKDDPAFQEEELAYFQRDYVGRPSPLYFAERLTEHC-----GGA
 TRPBPP LAREYEAAKADPKFLEELAYFQRDYIGRPNPLYFAERLTEHC-----GGA
 TRPBCr LGKAYADAKADPEFQAQLKSYNTHYAGRPSPLYFAERLTEHF-----GGA
 TRPBEc LEEAFVSAQKDPEFQAQFNDLLKNYAGRPTALT KCQNITAG--TNTT---
 TRPBSt LEEAFVRAQKDPEFQAQFADLLKNYAGRPTALT KCQNITAG--TRTT---

200

TRPBMz LIYLKREDLNHTGAHKINNAVAQALLAKRLGKQRIIAETGAGQHGVATAT
 TRPBAt LIYLKREDLNHTGAHKINNAVAQALLAKRLGKKRIIAETGAGQHGVATAT
 TRPBNc NIWLKREDLNHTGSHKINNALGQALLARRLGKKKIIAETGAGQHGVATAT
 TRPBSc QIWLKREDLNHTGSHKINNALAQVLLAKRLGKKNVIAETGAGQHGVATAT
 TRPBCC NIWLKREDLNHTGSHKINNALGQILLAKRIGKTRIIAETGAGQHGVATAT
 TRPBMH RVYLKREDLNHTGAHKINNTIGQALLAGYMGKRRLIAETGAGQHGIATAA
 TRPBMv KIYLKREDLLHGGGAHKTNNTIGQALLAKKMGKTRIIAETGAGQHGVGTSM
 TRPBHv --YLKREDLLHGGGAHKLNALGQVLLAKYMGKERIIAETGAGQHGTATAM
 TRPBTh QVFLKREDLLHTGAHKINNTLGQALLARRMGKRRVIAETGAGQHGVSVAT
 TRPBBS KIYLKREDLNHTGSHKINNALGQALLAKKMGKTKIIAETGAGQHGVAPAT
 TRPBBa KMYLKREDLNHTGAHKINNAIGQALLAKRMGKKKLIAETGAGQHGVAAAT
 TRPBPa KIYLKREELNHTGAHKINNCIGQILLARRMGKTRIIAETGAGMHGLATAT
 TRPBLc KIYLKREDLNHTGAHKINNVIGQALLAKHLGKRRLIAETGAGQHGVATAT
 TRPBBr RIFLKREDLVHGGGAHKTNQVIGQVLLAKRMGKTRIIAETGAGQHGTATAL
 TRPBPP KIFFKREELNHTGAHKVNNCIGQVLLAKRMGKRRLIAETGAGMHGVATAT
 TRPBCr KIYFKREDLNHTGSHKINNALGQILLAMRMGKTRIIAETGAGQHGVATAT
 TRPBEc -LYLKREDLLHGGGAHKTNQVLGQALLAKRMGKTEIIAETGAGQHGVASAL
 TRPBSt -LYLKREDLLHGGGAHKTNQVLGQALLAKRMGKSEIIAETGAGQHGVASAL

250

TRPBMz VCRRFGLQCI IYMGAQD MERQALNVFRMRL LGAE--VRAVHSGTATLKDA
 TRPBA t VCARFGLECI IYMGAQD MERQALNVFRMRL LGAE--VRGVHSGTATLKDA
 TRPBNC VCAKFGMECTVFMGAEDVRRQALNVFRMKLLGAK--VVAVEAGSRTL RDA
 TRPBSc ACAKFLGTCTVFMGAEDVRRQALNVFRMRILGAK--VIAVTNGTKTL RDA
 TRPBCC VCAKFGLECVIYMGAEDVRRQALKLFRIEMLGGKAWVIPVHSGSCTLKDA
 TRPBMh AGALFGMDVDVYMGTE DVERQKLN VFRMEI SGA--RVIPVDSGSR TLKDA
 TRPBMv AGALFGLTEIFMGRVDTERQQPNVARMKLLGAK--VTPVDTGSKVLKDA
 TRPBHv ACAHLDMPC E IYMERD INRQRPNVFRMKLNGSE--VNPVTVGRGTLKEA
 TRPBTh VAALFGLCVVYMG EEDVRRQALNVFRMKLLGAE--VRPVAAGSRTL KDA
 TRPBBS VAAKFGFSCTVFMGEEDVARQSLNVFRMKLLGAE--VVPVTSNGNTLKDA
 TRPBBA VAAHFGMDCIVFMGEEDIKRQELNVFRMKLLGAE--VVPVSSGNRTLKDA
 TRPBLc IAALMGMDCEIFMGKEDTRQKLN VYRMELLGAK--VHPVTSGSMVLKDA
 TRPBB r ACALMGLECVVYMGAKDVARQQPNVYRMQLHGAK--VIPVESGSGTLKDA
 TRPBP a VAARFGLQCVIYMGTTDIDRQQANVFRMKLLGAE--VIPVTAGTGLKDA
 TRPBPp VAARFGLPCVIYMGATDIERQQANVFRMKLLGAE--IVPVTAGTGLKDA
 TRPBCr VCARFGLPCVVYMGATDVERQKPNVFRMNL LGAE--VRPVSSGTGTLKDA
 TRPBEC ASALLGLKCR IYMGAKDVERQSPNVFRMLMGAE--VIPVHSGSATLKDA
 TRPBSt ASALLGLKCR IYMGAKDVERQSPNVFRMLMGAE--VIPVHSGSATLKDA

300

TRPBMz TSEAIRDWDMVETTHYILG SVAGPHYPMMVRE FHKVIGKETRRQAMDK
 TRPBA t TSEAIRDWVTN VETTHYILG SVAGPHYPMMVRDFH AVIGKETRKQALEK
 TRPBNC VNEALRYWVN LADTHYI IGS AIGPHFPPTIVRTFQ SVIGNETKQOMLE-
 TRPBSc TSEAFRFVW TNLKTTYV VVGS AIGPHFPPTIVRTFQ SVIGKETKEQFAAM
 TRPBCC VNEAMRDWVTNLSTTHYLVGSAIGPHFPPTIVRDFQKVIGEEIKAQLKEV
 TRPBMh INQAMRDWISSVEDTHYLI GSTMGPHYPPTMVKHFQ SVIGREAREQILEI
 TRPBHv VNEAMRNWTATFENTHYLLGTVMGPHFPPTMVRDFQ SVIGKEVKKQIMEQ
 TRPBBS ISETMRD WETNVEDTHYVIGSVV GPHFPPTSMVRDFQ SVISEEARTQAREK
 TRPBBA TNEAIRYWVQH CEDHFYMI GSVV GPHFPQVVREFQKMIGEEAKDQLKRI
 TRPBLc TNEAIRYWVAH CDDHFYMI GSVV GPHFPK MVRREFQRIIGDEAKEQLAC
 TRPBB r VNATLQEWAS PSDDTFYVLG SAVGPAPFPEMVKHFQ SVISTESKQQLQAK
 TRPBPp VNEALRDW TATFHESHYLLGTRAGPHFPPTIVREFH KVISEEAKAQM LER
 TRPBPp MNEALRDWVTNVDSTFYLI GTVAGPHYPAMVRDFQAVIGKETREQLAEK
 TRPBCr MNEALRDWVTNVDSTFYLI GTVAGPHYPAMVRDFQ SVIIGKETRAQLQEK
 TRPBTh MNEAMRDWVTNVHD TYYLIGTAAGPHYPVMVRDFQ SVIGEEV KRQSLEL
 TRPBEC CNEALRDW SGSYETAHYMLGTAAGPHYPPTIVREFQRMIGEETKAQILER
 TRPBSt CNEALRDW SGSYETAHYMLGTAAGPHYPPTIVREFQRMIGEETKAQILDK

350

TRPBMz W-GGKPDVLVACVGGGSNAMGLFHEF-----VEDQDVRLVGLAAG
 TRPBAt W-GGKPDVLVACVGGGSNAMGLFHEF-----VNDTEVRMIGVEAAG
 TRPBnc KRGLPDVAVVACVGGGSNAVGMFYFNSD-----PSVKLLGVEAGG
 TRPBSc NNGKLPDAVVACVGGGSNSTGMFSPFEHD-----TSVKLLGVEAGG
 TRPBcc -RGKLPDVVACVGGGSNAIGTFYDFIPD-----KSVRLVGVEAGG
 TRPBMH E-GELPDTIIACVGGGSNAIGIFSAFLDDDV-----ELIGAEAGG
 TRPBMv E-ERLPDYLVACIGGGSNAMGLFHPFLSNNISTGNDDAKNVKMIGIEAAG
 TRPBHv L-GRLPDVAVVACAGGGSNMTGAFAEFVDDEETALYAVEAGGSTLEVD---
 TRPBTh F-GRLPDALIAAVGGGSNAIGLFAPF-----AYLPEGRPKLIGVEAAG
 TRPBBS E-GTMPDKVVACVGGGSNAMGMFQAFLNEDV-----ELIGAEAGG
 TRPBba E-GKLPDVIACVGGGSNAIGMFYFPLQDDV-----RLVGVEAAG
 TRPBlc E-AQLPDMVVACVGGGSNAIGSFAAYI-----DDPSVQLVGVEAAG
 TRPBbr T-GKLPDVVACVGGGSNAIGMFADFIDDE-----GVELVGAEPAG
 TRPBPa E-GRLPDSLACVGGGSNAMGLFHPF-----LDDAGVQIVGVEAAG
 TRPBpp E-GRLPDSLACVGGGSNAMGLFHEF-----LEEPSVQIIGVEAGG
 TRPBcr E-GRLPDVAVVACVGGGSNAIGLFHPF-----LGDEGVRIGVEAAG
 TRPBec E-GRLPDAVIACVGGGSNAIGMFADFINET-----NVGLIGVEPGG
 TRPBSt E-GRLPDAVIACVGGGSNAIGMFADFINDT-----SVGLIGVEPGG

400

TRPBMz HGVDTDKHAATLTGKQVGVVHGSMSYLLQDDDGQVIEPHSISAGLDYPGV
 TRPBAt FGLDSGKHAATLTGKDVGVVHGMASYLLQDDDGQIIEPHSISAGLDYPGV
 TRPBnc DGVDTPRHSATLTAGSKGVLHGVRTYILQNQYQIETHSISAGLDYPGV
 TRPBSc DGVDTKFHSATLTAGRPGVFGVVKTYVFLQSDGQVHDTHSVSAGLDYPGV
 TRPBcc EGIDGKHSATLSMGQPGVVLHGVRTYILQDKAGQIIEPHSISAGLDYPGV
 TRPBMH EGIESGNHGATLSAGSEGVVHGSLSYVLLQDDDGQINEAHSVSAGLDYPGV
 TRPBMv KGLNTSLHGASITKGEKGVVHGMVSYFLQDEDEGQIEEAYSISAGLDYPGI
 TRPBHv EEAGVAPNSASLTGSEGIHVGARTLLQDRDGGQIMESHVSAGLDYAGV
 TRPBTh EGLSTGRHAASIGAGKRGVHGSYMYLLYDHDGQITPAHSVSAGLDYPGV
 TRPBBS KGIDTPLHAATISKGTGVVHGSLSYVLLQDEDEGQIIEPHSISAGLDYPGI
 TRPBba KGIDTPYHAATITKGTGVVHGMVSYFLQDEDEGQIIEPHSISAGLDYPGV
 TRPBlc KGADTDRTAATIERGSGVIFHGMKSLFMQNEDEGQIDPVYSISAGLDYPGV
 TRPBbr EGLDSGKHGATITNGQIGILHGTRSYLMRNSDGGQVEESYSISAGLDYPGV
 TRPBPa HGIDTGKHAASLNGGVPVHGNRTYLLQDADGQIIDAHSISAGLDYPGI
 TRPBpp HGVHTDKHAASLNGGVPVHGNRTYLLQDEDEGQITDAHSISAGLDYPGI
 TRPBcr HGVSTDKHAASLTGGRPGVHGNRTYLLQDDDGQIIDAHSISAGLDYPGI
 TRPBec HGIETGEHGAPLKHGRVGIYFGMKAPMMQTEDEGQIEESYSISAGLDFFPSV
 TRPBSt HGIETGEHGAPLKHGRVGIYFGMKAPMMQTEDEGQIEESYSISAGLDFFPSV

	450
TRPBMz	GPEHSFLKDIGRAEYDSVTDQEALDAFKRVSRLGII PALETSHALAYLE
TRPBAT	GPEHSFFKDMGRAEYYSITDEEALFAFKRVSRLGII PALETSHALAYLE
TRPBNc	GPELSNWKDERAKFVAATDAQAFEGFRLMSQLEGI I PALESSHGIW GAL
TRPBSc	GPELAYWKSTGRAQFIAATDAQALLGFKLLSQLEGI I PALESSHAVYGAC
TRPBcC	GPEHAWLKDSGRADYVVC TDEDALRGFRMLTQKEGI I PALESSHAIWEGV
TRPBMH	GPEHAYLME TGRAMYEPITDAEALRGFKLLSRCEGIMPALESAHAIAACLE
TRPBMv	GPEHAYLHNLGRVQYASATDKQALKAFMELTRTEGI I PALESSHAIAYAI
TRPBHv	GPELAHLVDTGRVTVAVNVDDDAALTA FHRLSQMEGI I PALESAHAFGYLE
TRPBTh	GPEHSYYADAGVAEYASVTDEEALGFKLLARLEGI I PALESAHA IAYAA
TRPBBS	GPEHAYLHKSGRVTYDSITDEEAVDALKLLSEKEGILPAIESAHALAKAF
TRPBBA	GPEHAYLASIGRVRYESVTDEEAVAAFRLLAQTEGI I PAIESAHAVAKAV
TRPBPa	GPEHAWLHDIGRVEYTSITDDEALEAFHTCCRLEGI I PALESSHALAEVF
TRPBpp	GPEHAYLHEVKRVEYVSI TDDEALDAFHATCRLEGI I PALESSHALAEAI
TRPBCr	GPEHSFLHDIGRAEYVSTTDTEALEAFKLCSTLEGI I PALEPAHALARVG
TRPBLc	GPEHAALAQEGRAQYVGITDDEAVEAFYIAKQEGIVAAIESCHAIAYVE
TRPBBr	GHSTHTCTPPARTTLVSPTPKPSKHS -SSLARYEGI I PRGTGILTRVRLRL
TRPBEC	GPQHAYLNSTGRADYVSI TDDEALEAFKTLCLHEGI I PALESSHALAHL
TRPBSt	GPQHAYLNSIGRADYVSI TDDEALEAFKTLCRHEGI I PALESSHALAHL
	500
TRPBMz	KLCPTLADGVR-----VVVNCSSGRGDKDVHTASKYLDV-----
TRPBAT	KLCPTLSGDTR-----VVLNFSGRGDKDVQTVAKYLD-----
TRPBNc	ELAKTMK-PDED-----VVICLSGRGDKDVQSVADELP IIGPKIGWD
TRPBSc	ELAKTMK-PDQH-----LVINISGRGDKDVQSVIAEVLPLGPKIGWD
TRPBcC	KIAKSLP-KDKD-----IVICLSGRGDKDVEQISELLPKWADKLDWH
TRPBMH	KYASKPENRGKT-----VIVNLSGRGDKDMFLAAGLLGV-----
TRPBMv	ENAGNMD-KDDI-----MVINLSGRGDKDLNLTVINAV--HK-----
TRPBHv	VWSSGPDAPDAENADDLGEYVVVNVVSGRGDKDLESAIEETERYDIDIAPN
TRPBBS	KLAKGMD-RGQL-----ILVCLSGRGDKDVNTLMNVLE----E----
TRPBBA	ELAQSMS-PDET-----VLI CLSGRGDKDVQTMRRHLGAKEGE----
TRPBPa	KRAPSLP-KEHI-----MNVNLSGRGDKDMQTVMMHMQ-QE-----
TRPBpp	KRAPKLP-KDHL-----MVVCLSGRGDKDMQTVMNHMAAQE-----
TRPBCr	EIAQELG-KGKI-----VVMNLCGRGDKDIFTVAEAL---G-----
TRPBTh	KVVPEDM-KDQV-----VVINLSGRGDKDVTEVMRLLGGE-----
TRPBLc	KIAPQMA-KDQI-----IIC T LSGRGDKDVASIAGYK G-----
TRPBBr	KRAKTAEEEGQNLT-----ILVLSGRGDKDV DHRAGTLEENP-----
TRPBEC	KMMRENPDKEQLL-----VVNLSGRGDKDI-----FTVHD-----
TRPBSt	KMMREQPEKEQLL-----VVNLSGRGDKDI-----FTVHD-----

Fig. 2. Alineación de las secuencias de la cadena β de la triptofano sintasa (TRPB). Lea mays (Mills, com. per.) Arabidopsis thaliana (TRPBAT)(Berlyn, 1989), Neurospora crassa (TRPBNc)(Pratt y DeMoss, 1988), Coprinus cinereus (TRPBcC)(Skrzynia et al. 1989), Saccharomyces cerevisiae (TRPBSc)(Zalkin y Yanofsky, 1982), Methanobacterium thermoautotrophicum (TRPBMH)(Weile et al. 1991), Methanococcus voltae (TRPBHv)(Sibol y Henriquet, 1988), Haloferox volcanii (TRPBHv)(Lam et al. 1990), Thermus thermophilus (TRPBTh)(Koyama y Furukawa, 1989), Bacillus subtilis (TRPBBS)(Parsot, 1987), Bacillus stearothermophilus (TRPBBA)(Ishiwata, 1989), Lactobacillus casei (TRPBLc)(Natori et al. 1990), Brevibacterium lactofermentum (TRPBBr)(Matsui et al. 1986), Caulobacter crescentus (TRPBCr)(Ross y Winkler, 1988), Pseudomonas aeruginosa (TRPBPa)(Hadero y Crawford, 1986), Pseudomonas putida (TRPBpp)(Eberly y Crawford, 1989), Salmonella typhimurium (TRPBSt)(Hyde et al. 1988) y Escherichia coli (TRPBEC)(Burns y Yanofsky, 1989).

	Th	Ba	Bs	Lc	Br	Cr	Pa	Pp	St	Ec	Sc	Nc	Cc	At	Hv	Bv
Th	✓															
Ba	60.2	✓														
Bs	58.0	72.4	✓													
Lc	52.7	57.1	57.3	✓												
Br	50.8	49.2	50.5	49.1	✓											
Cr	63.8	58.9	57.5	52.8	52.1	✓										
Pa	61.9	59.6	58.1	55.2	49.4	74.0	✓									
Pp	60.8	59.0	58.4	52.7	49.3	71.2	84.4	✓								
St	52.2	53.5	54.9	52.8	55.5	57.4	55.8	55.3	✓							
Ec	55.7	53.2	56.0	52.2	56.0	57.4	54.5	55.0	96.5	✓						
Sc	57.6	57.8	55.6	50.5	46.6	59.4	55.4	55.8	52.7	52.7	✓					
Nc	59.8	61.2	58.3	53.7	50.9	59.9	57.3	57.1	52.1	51.8	74.4	✓				
Cc	58.1	57.6	57.1	53.9	53.5	60.4	59.2	57.5	53.5	53.8	62.3	66.3	✓			
At	62.2	59.5	57.7	52.1	49.7	65.3	65.3	61.9	56.3	55.8	59.5	58.8	59.4	✓		
Hv	59.9	55.7	55.7	54.8	51.8	58.1	59.6	59.9	54.6	55.0	51.1	52.8	53.5	57.2	✓	
Bv	51.9	51.1	49.9	47.7	45.5	54.8	52.9	52.6	49.0	49.2	49.2	49.2	49.0	55.3	49.0	✓

Matriz # 1. Porcentajes de similitud entre las secuencias de la cadena B de la triptofano sintasa. *Thermus thermophilus*, (Th)(Koyama y Furutawa, 1990), *Bacillus stearothermophilus* (Ba)(Ishiwata et al. 1989), *Bacillus subtilis* (Bs)(Parsot, 1987), *Lactobacillus casei* (Lc)(Watori et al. 1990), *Brevibacterium lactofermentum* (Br)(Matsui et al. 1986), *Caulobacter crescentus* (Cr)(Ross y Winkler, 1988), *Pseudomonas aeruginosa* (Pa)(Hadero and Crawford, 1986), *Pseudomonas putida* (Pp)(Eberly y Crawford, 1989), *Salmonella typhimurium* (St)(Crawford et al. 1980), *Escherichia coli* (Ec), *Saccharomyces cerevisiae* (Sc)(Zalkin y Yanofsky, 1982), *Neurospora crassa* (Nc)(Burns y Yanofsky, 1989), *Coprinus cinereus* (Cc)(Skrzynia et al. 1989), *Arabidopsis thaliana* (At)(Berlyn et al. 1989), *Methanococcus voltae* (Hv)(Sibold y Henriquet, 1988) y *Haloferax volcanii* (Bv)(Lam et al. 1990).

TREONINA SINTASA

		50
THRSBr	M-----YKGLLKQYASYLPVN-----	
THRSBs	M-----WKGLIHQYKEFLPVT-----	
THRSEc	M----KLYNLKDHNEQ--VSFAQAVTQGLGKNQGLFFPHDLPEFSLTEI-	
THRSSc	MPNASQVYRSTRSSPKTISFEEAIIQGLATDGGLFIPPTIPQVDQATLF	
		100
THRSBr	-----EKTPDVSLMEG-----NTPLIPLL	
THRSBs	-----DQTPALTLHEG-----NTPLIHL	
THRSEc	DEMLKLDVTRSAKILSAFIG-DEIPQEILEERVRAAFA-----FP	
THRSSc	NDWSKLSFQDLAFAIMRLYIAQEEIPDADLKDLIKRSYSTFRSDEVTPLV	
		150
THRSBr	NISKQLGVQLYGKYEGANPTGSFKDRGM-----VMAVAKAKEEGSE	
THRSBs	KLSEQLGIELHVKTEGVNPTGSFKDRGM-----VMAVAKAKEEGND	
THRSEc	APVANVESDVGCLELFHGPTLAFKDFGGRFMAQMLTHI-----AG	
THRSSc	QNVTGDKENLHILELFHGPTYAFKDVALQFVGNLFYFLQRTNANLPEGE	
		200
THRSBr	----AIICASTGNTSASAA-AYAARLGMKCIIVIPEGKIA--HGKLAQAV	
THRSBs	----TIMCASTGNTSAAAA-AYAARANMKCIVIIIPNGKIA--FGKLAQAV	
THRSEc	DKPVTILTATSGDTGAAVAHAHAFYGLPNVKVVILYPRGKISPLQEKLFCTL	
THRSSc	KKQITVVGATSGDTGSAAIYGLRGKDKDVSFVILYPTGRISPIQEEQMTTV	

```

                250
THR SBr  AYGA-EIISIEGNFDDALKAVRNIAAEEPITL-----VNSVNPYRIEGQ
THR SBs  MYGA-EIIAIDGNFDDALKIIVRSICEKSPIAL-----VNSVNPYRIEGQ
THR SEc  -GGNIETVAIDGDFDACQALVKQAFDDEELKVALGLNSANSINISRLLAQ
THR SSc  PDENVQTLVSTGTDFDNCQDIVKAIIFGDKEFNSKHNVGAVNSINWARILAQ

                300
THR SBr  KTAAFEICDQLQNAPDV----LAIPVGNAGNITAYWKGFCYEYKKGKGYKK
THR SBs  KTAAFEVCEQLGEAPDV----LAIPVGNAGNITAYWKGFKYHEKNGTGL
THR SEc  ICYYFEAVAQLPQETRNQLV-VSVP SGNFGDLTA---GL--LAKSLGLPV
THR SSc  MTTYFYSFQATNGKDSKKVKFVVP SGNFGDILA---GY--FAKKMGLPI

                350
THR SBr  PRIH--GFEAEGAAAIVKGVHIEEPETIATAIR----IGNPASW-----
THR SBs  PKMR--GFEAEGAAAIVRNEVIENPETIATAIR----IGNPASW-----
THR SEc  KRFAIATNVNDTVPRFLHDGQWSPKAT-QATLSNAMDV SQPNWPRV---
THR SSc  EKLA IATNENDILDRFLKSGLYERSDKVAATLSPAMDILISSNFERLLWY

                400
THR SBr  ---SYAVEAAEQSHGEI-----DMV
THR SBs  ---DKAVKAAEESNGKI-----DEV
THR SEc  -----EELFRRKIWQL-----KELGYAAV
THR SSc  LAREYLANGDDLKAGEIVNNWFQELKTNGKFQVDKSIIEGASKDFTSERV

                450
THR SBr  SDEEILHA-----Y-----RLLAKE-----G
THR SBs  TDDEILHA-----Y-----QLIARVE-----G
THR SEc  DDETTQQTMR ELKELG-----YTSEPHAAVAYRAL-----RDQLNPGEYG
THR SSc  SNEETSETIKKIYESSVNP KHYILDPHTAVGVCATERLIAKDNDSIQY-

                500
THR SBr  VFAEPGSNASLAGVIKHVESG----KIKKGETVVAVLTGNGLKDPDIAIS
THR SBs  VFAEPGSCASIAGVLKQVKSG----EIPKGSKVAVLTGNGLKDPNTAVD
THR SEc  LFLGTAHPAKFKESVEAILG-----ETLDLPKELA-----E
THR SSc  ISLSTAHPAKFADAVNNALSGFSNYSFEKDVLPBELKKLSTLKKLKFIE

                526
THR SBr  SNQLDIASVSN DIEQIKDH IKGVIMS
THR SBs  ISEIKPVTLP TDEDSILEYVKGAA RV
THR SEc  RADLPLL SHNLPADFAALRKLMMNHQ
THR SSc  RADVELVKNAIEEELAKMK-----L

```

Fig. 3. Alineación de las secuencias de treonina sintasa (THRS) de *Brevibacterium lactofermentum* (THRSBr) (Malumbres et al. 1988), *Bacillus subtilis* (THRSBs) (Parsot, 1986), *Escherichia coli* (THRSec) (Parsot et al. 1983) y *Saccharomyces cerevisiae* (THRSSc) (Aas y Rognes, 1990).

	THRSEC	THRSBs	THRSBr	THRSSc
THRSEC	--			
THRSBs	24.1	--		
THRSBr	21.6	69.0	--	
THRSSc	35.5	21.0	21.6	--

Matriz # 2. Porcentajes de similitud entre las secuencias de la tronina sintasa THRS de *Escherichia coli* (THRS_{Ec})(Parsot et al. 1983), *Bacillus subtilis* (THRS_{Bs})(Parsot, 1986), *Brevibacterium lactofermentum* (THRS_{Br})(Malumbres et al. 1988) y *Saccharomyces cerevisiae* (THRS_{Sc})(Aas y Rogner, 1990).

TREONINA DESHIDRATASA

		50
THRDra	MAA-----	QESL
THRDec	MHITYDLPVAIDDIIEAKQ-----RLAGRIYKTGMPRS-----	
THRDst	MAES---QPL-SVAPEG-----	
THRDsc	MSATLLKQPLCTVVRQKQSKVSGLNLRLKAHLHRQHLSPLIKLHSEL	
		100
THRDra	HVK-----TPLRDSMALSKVAGTSVFLKMD	
THRDec	-----NY-----FSERCKGEIFLKFE	
THRDst	-----AEYLRAVLRAPVYEAQVTPLQKMEKLSSRLDNVILVKRE	
THRDsc	KLDELQTDNTPDYVRLVLRSSVYDVINESPISQGVGLSSRLNTNVILKRE	
		150
THRDra	SSQPSGSFKIRG-IGHLCKMKAKQGCKHFVCSSAGNAGMATAYAARRLGL	
THRDec	NMQRTGSEFKIRGAFNKLSSLTDAEKRKGVVACSAGNHAQGVSLSCAMLGI	
THRDst	DRQPVHSEFKLRGAYAMTGLTEEQKAHGVIASAGNHAQGVAFSSARLGV	
THRDsc	DLLPVFSFKLRGAYNMIAKLDDSQRNQGVIIACSAGNHAQGVAFAAKHLKI	
		200
THRDra	PATIVVPSTTPALTIERLKNEGATVEVVGEMLDEAIQLAKALEKNNPGWV	
THRDec	DGKVVMPKGAPKSKVAATCDYSAEVVLHGDNFNDTIKAVSEIVEME-GRI	
THRDst	KSLIVMPKATADIKVDVAVRGLGGEVLLHGANFDEAKAKAIELAQQQ-GFT	
THRDsc	PATIVMPVCTPSIKYQNVSRLLGSQVVLYGNDFDEAKAECAKLAER-GLT	
		250
THRDra	YISPFDDPLIWEGHTSLVKELKETLSA--KPGAVILSVGGGGLLCGVVQG	
THRDec	FIPPYDDPKVIAGQGTIGLEIMEDL---YVDNVIVPIGGGGLIAGIAVA	
THRDst	WVPPFDHPMVIAGQGTLALELLQ---DSHLDRVFPVGGGGLAAGVAVL	
THRDsc	NIPPFDPYVIAGQGTVAMEILRQVRTANKIGAVFVPVGGGGLIAGIGAV	

```

                                                    300
THRDRa    LREVGWEDVPIIAMETFGAHSFHA AVKEGKLVTLPKITSVAKALGVNTVVG
THRDEc    IKSIN-PTIRVIGVQSENVHGMAASFHSGEITTHRTTGT LADGCDVSRPG
THRDS t    IKQLM-PQIKVIAVEAEDSACLKAAL EAGHPVDLPRVGLFAEGVAVKRIG
THRDS c    LKRVA-PHIKTIGVETYDAATLHNSLQRNQR TPLPVVGT FADGTSVRMIG

                                                    350
THRDRa    AQT LKLFYEHPIFSEVISDQEA VTAIEKFVDDEKILVEPACGAALAA---
THRDEc    NLTYEIVRELVD DIDLVLVSEDEIRNSMIALIQ RNKVVTEGAGALACAAL--
THRDS t    DETFRLCQEYLD DIIITVDSDAICAAMKDL FEDVRAVAEP SGALALAGMKK
THRDS c    EETFRAVQQV VDEVVLVNTDEICA AVKDI FEDTRSIV EP SGALSVAGMKK

                                                    400
THRDRa    -----
THRDEc    LSGKLDQYIQNRKT--VSIISGGNIDLSRVSQITG-----
THRDS t    YIA--QHNIRGER--LAHVLSGANVNFHGLRYVSE RCELGEQREGLLTVT
THRDS c    YISTVHPEIDHTKNTYVPI LSGANMNFDR LR FVSERAVLGEGKEVFMLVT

                                                    450
THRDRa    -----VYSGV-----
THRDEc    -----
THRDS t    IPEEKGNFPKFCQLLGGRMVTEFN YRFADAKN-----ACIFVGVRS
THRDS c    LPDVPGAFKMKQKIIHPRSVTEFSYRYNEHRHESSEVPKAYIYTSFSV V

                                                    500
THRDRa    -----VCRLQA-----EARL-
THRDEc    -----
THRDS t    QGLEERKEIITQLCDGGYSVVDLS DDEMAKLHVRYMVGG RPSKPLQERLY
THRDS c    DREKEIKQVMQQLNALGFEAVDISDNELAKSHGRYL VGG-ASKVPNERII

                                                    550
THRDRa    -----QTPLASLVVIVCGGSNISLAQLQALKAQLG-----
THRDEc    -----
THRDS t    SFEPESP GALLKFLHTLGTHWNISLFHYRSHGTDYGRVLA AFELGDHEP
THRDS c    SFEPERPGALTRFLGGLSDSWNLTLFHYRNHGADIGKVL AGISVPPREN

                                                    529
THRDRa    -----LNEL-----LK-
THRDEc    -----FVDA
THRDS t    -DFETRLHELGYECHDESNNPAFRFFLAG
THRDS c    LTFQKFL EDLGYTYHDETDNTVYQKFLKY

```

Fig. 4. Alineación de las secuencias de treonina deshidratasa (THRD) de *Ratus* sp. (THRDRa) (Woda et al. 1988), *Saccharomyces cerevisiae* (THRDS c) (Kielland-Brand et al. 1984), *Escherichia coli* (THRDEc) (Datta et al. 1987) y *Salmonella typhimurium* (THRDS t) (Taillon et al. 1988).

	THRDRa	THRDSc	THRDSt	THRDEc
THRDRa	---			
THRDSc	27.1	---		
THRDSt	26.4	44.7	---	
THRDEc	24.6	35.0	36.8	---

Matriz 3. Indices de similitud entre las secuencias de treonina deshidratasa (THRD) de *Ratus* sp. (THRDRa) (Hoda et al. 1988), *Saccharomyces cerevisiae* (THRDSc) (Kielland-Brand et al. 1984), *Escherichia coli* (THRDEc) (Datta et al. 1987) y *Salmonella typhimurium* (THRDSt) (Taillon et al. 1988).

SERINA DESHIDRATASA

		50
SERDHu	MMSG--EPLHVKTPIRDSMAL-----SKMAGTSVYLKM-----	
SERDRa	MAAQ--ESLHVKTPLRDSMAL-----SKVAGTSVFLKM-----	
SERDSc	MEMT--H--YEKTLIRQVFN-----NGKTNVSWFYVKH-----	
SERDEc	MENAKMNSLIAQYPLVKDLVALKETTFWPNPGTSLAEGLPVVLTEQDVQ	
		100
SERDHu	-----DSAQPSGSFKIRGIG-HFCKRWAKQGCAHFVC	
SERDRa	-----DSSQPSGSFKIRGIG-HLCKMKAKQGCKHFVC	
SERDSc	-----EILQPGGSFKSRGIG-HLIRK-----	
SERDEc	DAHARLSRFAPYLAKAFPETAATGGIIESELVAIPAMQKRLEKEYQPIS	
		150
SERDHu	SS-----	
SERDRa	SSVVQIWGSRM-----RGRSHS-----GDEQPHVRSQALLP---DTPSPL	
SERDSc	-----SNQQPLSEGSGKLA---VFSS---	
SERDEc	GQLLLKDSHLPISGSIKARGGIYEVLAHAEKLALEAGLLTLDDDYSKLL	
		200
SERDHu	-A-----GNAGMAAAYAARQLGVPATIVVPGTTPALTIE	
SERDRa	TA-----GNAGMATAYAARRLGLPATIVVPSSTTPALTIE	
SERDSc	SG-----GNAGLAAATACRSMALNCSVVVPKTKPRMVK	
SERDEc	SPEFKQFFSQYSIAVGSTGNLGLSIGIMSARIGFKVTVHMSADARAWKKA	
		250
SERDHu	RLKNEGATCKVVGELLDEAFE-----LAKALAKNPNGWVYIPFDDPLIW	
SERDRa	RLKNEGATVEVVGEMLDEAIQ-----LAKALEKNNPGWVYISPFDDPLIW	
SERDSc	KIQSAGAKVIHGDHWGEADEYLRHKLMAQESQHSKTLVYVHPFDNETIW	
SERDEc	KLRTHGVTVVEYEQDYGVAVE-----EGRKAAQSDPNCFFIDDENSRTLF	

```

300
SERDHu  EGHASIVKELKETLWE-----KPGAIALSVGGGGLLCGVVQGLQECG
SERDRa  EGHTSLVKELKETLSA-----KPGAIVLSVGGGGLLCGVVQGLREVQ
SERDSc  EGHSTIVDEIIEQLKEND--ISLPRVKALVCSVGGGGLFSGIIKGLDRNH
SERDEc  LGYSVAGQRLKAQFAQQGRIVDADNPLFVYLPCCGVGGGGVAFGLK-LA

350
SERDHu  WGD-VPVIAMETFGAHSFHAATTAG--KLVSLPKITSVAKALGVKTVGSQ
SERDRa  WED-VPIIAMETFGAHSFHAAVKEG--KLVTLPKITSVAKALGVNTVGAQ
SERDSc  LAEKIPVVAVETAGCDVLNKSLLKKG--SPVTLKLTSVATSLASPYIASF
SERDEc  FGDHVHCFFAEPHSPCMLLGVHTGLHDQISVQDI-GIDNLTAADGLAVG

400
SERDHu  ALKLFQEHPIFSEV-----ISDQEAVAIAIEKFVDDKILVEPANGAALAA
SERDRa  TLKLFYEHPIFSEV-----ISDQEAVTAIEKFVDDKILVEPACGAALAA
SERDSc  AFESFNKYGCKSVV-----LSDQDVLATCLRYADDYFNIVEPACGASLHL
SERDEc  RASGFVGRAMERLLDGFYTLSDQTMYDMLGWLAQEGERIRLEPSALAGMAG

450
SERDHu  VYS--HVIQKLQLEGNLRTPPL--PSLVVIVCGGSNISLAQLRALKEQLGM
SERDRa  VYS--GVVCRLOAEGRLQTPL--ASLVVIVCGGSNISLAQLQALKAQLGL
SERDSc  CYH--PEILEDILEQKIYED---DIVIIACGGSCMPYEDLVKASSTLNV
SERDEc  PQRVCASVSYQQMHGFSAEQLRNTTHLVWATGGGMVPEEEMNQY---LAK

SERDHu  TNRLPK
SERDRa  -NELLK
SERDSc  S-----
SERDEc  G-----R

```

Fig. 5. Alineación de las secuencias de la serina deshidratasa (SERD) de *Homo sapiens* (SERDHu)(Ogawa et al. 1989), *Ratus sp.* (SERDRa)(Ogawa et al. 1988), *Saccharomyces cerevisiae* (SERDSc)(Seufert, 1990) y *Escherichia coli* (SERDEc)(Marceau, 1988).

	SERDRa	SERDHu	SERDSc	SERDEc
SERDRa	---			
SERDHu	82.9	---		
SERDSc	32.7	34.8	---	
SERDEc	21.9	20.9	17.7	---

Matriz # 4. Indices de similitud entre las secuencias de la serina deshidratasa (SERD) de *Homo sapiens* (SERDHu)(Ogawa et al. 1989), *Ratus sp.* (SERDRa)(Ogawa et al. 1988), *Saccharomyces cerevisiae* (SERDSc)(Seufert, 1990) y *Escherichia coli* (SERDEc)(Marceau, 1988).

Otros índices de similitud fueron obtenidos a partir de la alineación de las secuencias de la cadena β de la triptofano sintasa contra las secuencias de la treonina sintasa, treonina deshidratasa y serina deshidratasa (Tabla 7 y 8).

Tabla 7 de Porcentajes de similitud

TRPB	SERDRa	SERDRu	SERDSc	SERDEc	THRDRa	THRDSc	THRDSt	THRDEc
TRPBc	20.0	23.7	23.9	25.0	18.4	21.5	23.4	19.2
TRPBst	27.1	23.7	21.5	25.0	23.5	20.7	23.4	19.2
TRPBBr	25.8	26.4	26.3		25.8	20.3	39.1	17.8
TRPBp	25.4	20.5	13.7		23.4	75.0	16.8	24.1
TRPBPa	25.4		24.9	25.0	24.3		19.0	28.7
TRPBc	23.9	14.8	24.1	27.5	21.8	33.3		27.7
TRPBs	21.5	27.6	21.9	15.9	21.5	25.0	14.4	29.7
TRPBa	58.3		25.3	44.4	58.3	20.6	47.4	26.4
TRPBc	20.0	30.6	41.2		22.8	21.9	20.8	23.6
TRPBth	39.4		20.2	20.7	25.4	19.8	29.4	25.0
TRPBat	31.3	28.6	23.2		31.3	16.8	22.2	22.8
TRPBsc	18.2	26.9	20.9	28.2	18.7	25.0	21.4	24.3
TRPBc	36.4	20.5	23.1	19.1	36.4	25.0		20.6
TRPBc	42.9	53.3	23.0		42.9	22.0	25.6	25.0
TRPBv	37.5	37.5	20.4	34.2	37.5	23.2		22.7
TRPBh	34.2	19.3			20.3	23.0	19.3	18.3
TRPBv	34.2	31.3	20.8		42.1	32.1	29.3	25.3

Porcentajes de similitud de las secuencias de la cadena β de la triptofano sintasa (TRPB) de *Escherichia coli* (TRPBc)(Burns y Yanofsky, 1989), *Salmonella typhimurium* (TRPBst)(Crawford et al. 1980), *Brevibacterium lactofermentum* (TRPBBr) (Matsui et al. 1986), *Pseudomonas putida* (TRPBp)(Kerly y Crawford, 1989), *Pseudomonas aeruginosa* (TRPBPa)(Hadero y Crawford, 1986), *Caulobacter crescentus* (TRPBc)(Ross y Winkler, 1988), *Bacillus subtilis* (TRPBs)(Parsot, 1987), *Bacillus stearothermophilus* (TRPBa) (Ishiwata et al. 1989), *Lactobacillus casei* (TRPBc)(Matori et al. 1990), *Thermus thermophilus* (TRPBth) (Koyama y Furukawa, 1990), *Arabidopsis thaliana* (TRPBat)(Berlyn et al. 1989), *Saccharomyces cerevisiae* (TRPBsc) (Ialkin y Yanofsky, 1982), *Neurospora crassa* (TRPBc) (Pratt y DeNoss, 1988), *Coprinus cinereus* (TRPBc)(Skrzynia et al. 1989), *Methanococcus voltae* (TRPBv) (Sibold y Henriquet, 1988), *Methanobacterium thermoautotrophicum* (TRPBh)(Meile et al. 1991) y *Haloflex volcanii* (TRPBv)(Lam et al. 1990) contra las secuencias de Serina deshidratasa (SERD) de *Ratus* sp. (SERDRa)(Ogawa et al. 1988), de *Homo sapiens* (SERDRu)(Ogawa et al. 1989), *Saccharomyces cerevisiae* (SERDSc)(Seufert, 1990), *Escherichia coli* (SERDEc) (Marceau, 1988) y con las secuencias de la treoninas deshidratasa (THRD) de *Ratus* sp. (THRDRa)(Woda et al. 1988), *Saccharomyces cerevisiae* (THRDSc)(Kielland-Brand et al. 1984), *Salmonella typhimurium* (THRDSt)(Taillon et al. 1988) y *Escherichia coli* (THRDEc)(Datta et al. 1987). Los huecos en la tabla se deben a que el programa de computadora no alineo ese par de secuencias.

Tabla 8. Porcentajes de similitud

TRPB	THRSBs	THRSBr	THRSBc	THRSSc
TRPBKc	22.8	27.7	15.6	33.3
TRPBSt	35.4	27.7	14.9	33.3
TRPBBr	21.4	23.9	23.2	24.3
TRPBPP	32.8	34.3	16.7	
TRPBPa		36.6		
TRPBCr	35.1	32.3	12.6	33.3
TRPBBS	26.5	26.0	25.6	
TRPBBA	26.9	33.8	13.5	
TRPBLc	28.2	40.9		32.4
TRPBTh	32.0	35.0	24.2	34.3
TRPBAt	26.5	30.0	13.4	22.3
TRPBSc	25.0	26.7	37.5	
TRPBWc		22.8	21.6	
TRPBCC	24.3	23.2		
TRPBWv	31.7	34.5	25.0	18.9
TRPBWv	27.2	28.7		21.1

Porcentajes de similitud de las secuencias de la cadena β de la triptofano sintasa (TRPB) de *Escherichia coli* (TRPBKc) (Burns y Yanofsky, 1989), *Salmonella typhimurium* (TRPBSt) (Crawford et al. 1980), *Brevibacterium lactofermentum* (TRPBBr) (Matsui et al. 1986), *Pseudomonas putida* (TRPBPP) (Eberly y Crawford, 1989), *Pseudomonas aeruginosa* (TRPBPa) (Hadero y Crawford, 1986), *Caulobacter crescentus* (TRPBCr) (Ross y Winkler, 1988), *Bacillus subtilis* (TRPBBS) (Parsot, 1987), *Bacillus stearothermophilus* (TRPBBA) (Ishiwata et al. 1989), *Lactobacillus casei* (TRPBLc) (Natori et al. 1990), *Thermus thermophilus* (TRPBTh) (Koyana y Furukawa, 1990), *Arabidopsis thaliana* (TRPBAt) (Berlyn et al. 1989), *Saccharomyces cerevisiae* (TRPBSc) (Ialkin y Yanofsky, 1982), *Neurospora crassa* (TRPBWc) (Pratt y DeMoss, 1988), *Coprinus cinereus* (TRPBCC) (Skrzynia et al. 1989), *Methanococcus voltae* (TRPBWv) (Sibold y Henriquet, 1988), y *Haloferax volcanii* (TRPBWv) (Lam et al. 1990) contra las secuencias de la treonina sintasa (THRS) de *Bacillus subtilis* (THRSBs) (Parsot, 1986), *Bacillus lactofermentum* (THRSBr) (Malumbres et al. 1988), *Escherichia coli* (THRSBc) (Parsot et al. 1983), *Saccharomyces cerevisiae* (THRSSc) (Aas y Rognes, 1990). Los huecos en la tabla se deben a que el programa de computadora no alineo ese par de secuencias.

Por otro lado se alinearon las secuencias de la treonina sintasa con las secuencias de la treonina deshidratasa y serina deshidratasa obteniendo sus porcentajes de similitud (Tabla 9). En la tabla 10 se muestran los porcentajes de similitud entre las treoninas deshidratasas y las serinas deshidratasas.

Tabla 9. de Porcentajes de similitud.

THRS	SERDRa	SERDHu	SERDSc	SERDEC	THRDra	THRDSc	THRDSt	THRDEC
THRSEc		43.8				22.2		24.8
THRSBr	27.7	26.6	25.5	20.8	23.5	22.8	26.3	24.1
THRSBa	30.9	24.4	25.7		22.6	20.2	28.3	21.9
THRSSc			23.3				23.6	

Porcentajes de similitud de las secuencias de la treonina sintasa (THRS) de *Bacillus subtilis* (THRSBs), *Bacillus lactofermentum* (THRSBr), *Escherichia coli* (THRSEc), *Saccharomyces cerevisiae* (THRSSc) contra las secuencias de Serina deshidratasa (SERD) de *Ratus sp.* (SERDRa)(Ogawa et al. 1988), de *Homo sapiens* (SERDHu)(Ogawa et al. 1989) de *Saccharomyces cerevisiae* (SERDSc)(Seufert, 1990), de *Escherichia coli* (SERDEC)(Marceau et al. 1988) y con las secuencias de la treonina deshidratasa (THRD) de *Ratus sp.* (THRDra)(Noda et al. 1988), de *Saccharomyces cerevisiae* (THRDSc)(Kielland-Brand et al. 1984), de *Salmonella typhimurium* (THRDSt)(Taillon et al. 1988) y de *Escherichia coli* (THRDEC)(Datta et al. 1987). Los huecos en la tabla se deben a que el programa de computadora no alineo ese par de secuencias.

Tabla 10. de Porcentajes de similitud

	SERDRa	SERDHu	SERDSc	SERDEC
THRDra	99.2	82.5	33.3	
THRDSc	26.6	27.8	25.7	25.6
THRDSt	26.1	27.8	26.6	18.9
THRDEC	22.1	22.2	21.2	14.3

Porcentajes de similitud de las secuencias de la Serina deshidratasa de Ratus sp. (SERDRa)(Ogawa et al. 1988), de Homo sapiens (SERDHu)(Ogawa et al. 1989), de Saccharomyces cerevisiae (SERDSc)(Seufert, 1990), de Escherichia coli (SERDEC)(Marceau et al. 1988) contra las secuencias de la treonina deshidratasa (THRD) de Ratus sp. (THRDra)(Woda et al. 1988), de Saccharomyces cerevisiae (THRDSc)(Kielland-Brand et al. 1984), de Salmonella typhimurium (THRDSt)(Taillon et al. 1988) y de Escherichia coli (THRDEC)(Datta et al. 1987). Los huecos en la tabla se deben a que el programa de computadora no alineo ese par de secuencias.

Por último, se construyo un árbol filogenético de las cadenas β de la triptofano sintasa, pertenecientes a los tres linajes celulares, al que se le puso raíz mediante la treonina sintasa de B. subtilis. El árbol se realizo usando el método de parsimonia con secuencias proteicas (Fig. 6).

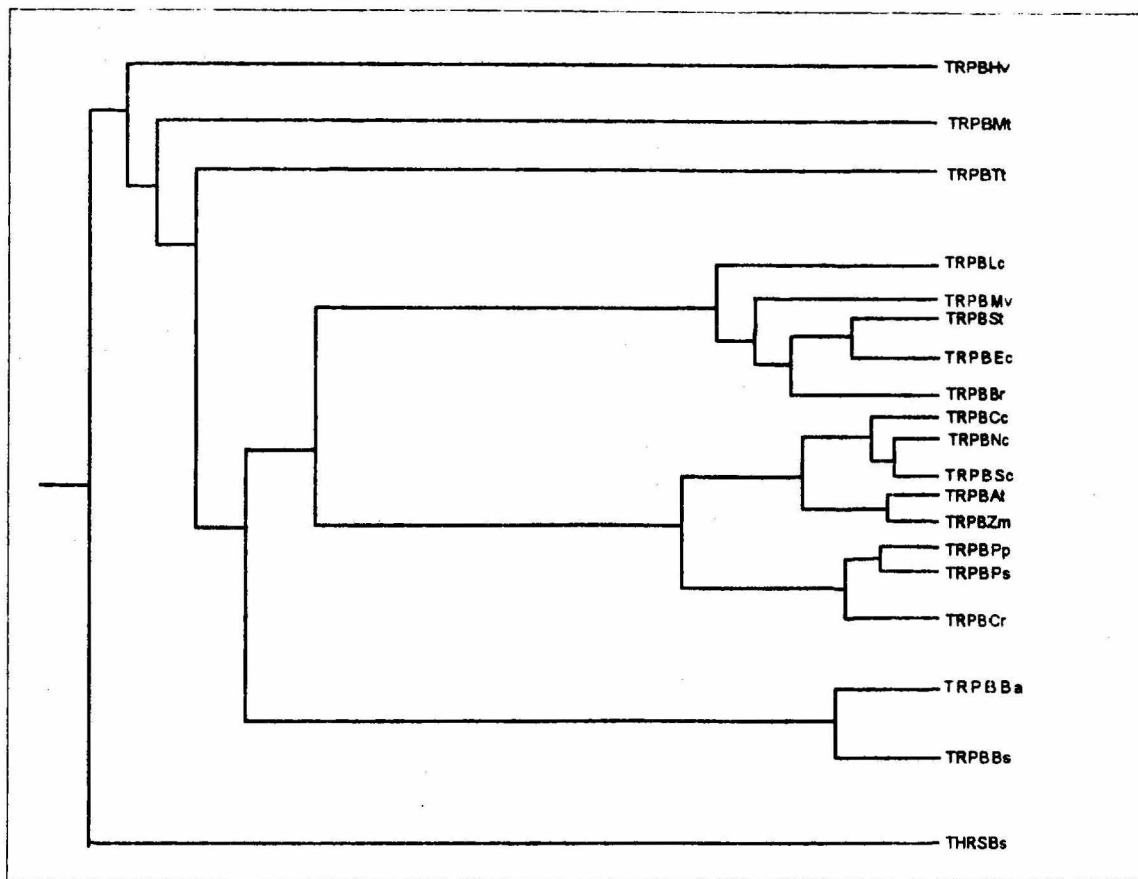


Fig. 6. Arbol filogenético de las secuencias de proteínas de la cadena b de la triptofano sintasa, obtenido por el método de parsimonia. *Thermus thermophilus* (TRPBTt)(Koyama y Furukawa, 1989), *Bacillus stearothermophilus* (TRPBBa)(Ishiwata, 1989), *Bacillus subtilis* (TRPBBs)(Parsot, 1987), *Lactobacillus casei* (TRPBLc)(Natori et al. 1990), *Brevibacterium lactofermentum* (TRPBBr)(Matsui et al. 1986), *Caulobacter crescentus* (TRPBCr)(Ross y Winkler, 1988), *Pseudomonas aeruginosa* (TRPBPp)(Hadero y Crawford, 1986), *Pseudomonas putida* (TRPBPp)(Crawford, 1988), *Salmonella typhimurium* (TRPBSi)(Hyde et al. 1988), *Escherichia coli* (TRPBEc)(Burns y Yanofsky, 1989), *Saccharomyces cerevisiae* (TRPBSc)(Zalkin y Yanofsky, 1982), *Neurospora crassa* (TRPBNc)(Pratt y DeMoss), *Coprinus cinereus* (TRPBCc)(Skrzyminia et al. 1989), *Arabidopsis thaliana* (TRPBAi)(Berlyn, 1989), *Zea mays* (TRPBZm)(Mills com. per.) *Methanococcus voltae* (TRPBMv)(Siboi y Henniquet, 1988), *Haloflexax volcanii* (TRPBHv)(Lam et al. 1990), *Methanobacterium thermoautotrophicum* (TRPBMH)(Melle et al. 1991), y la treonina sintasa de *B. subtilis* (THRSBs)(Parsot, 1986).

DISCUSION

ALINEACION DE SECUENCIAS

En la matriz # 1 se puede observar que los índices de similitud entre la mayoría de las cadenas β de la triptofano sintasa se encuentran en el rango 50-60 %. Tomando en cuenta el criterio de Doolittle (1989), de que a partir de una similitud mínima de 15 % entre dos secuencias de al menos 100 aminoácidos cada una, estas poseen un origen común, es evidente que todas las cadenas β de las triptofano sintasa son homólogas entre sí. Esto significa que un gen que codificaba para esta proteína se encontraba ya presente en el último ancestro común.

Podemos observar también que ésta proteína ha sido muy conservada a través de la evolución, ya que los índices de similitud obtenidos (50-60 %) son muy superiores al valor de decisión de Doolittle (1989) de 15 %. Por lo tanto, el reloj molecular de la cadena β de la triptofano sintasa debe ser muy lento.

Los índices de similitud encontrados entre las cuatro secuencias disponibles de treonina sintasas (tres de eubacterias y una de eucariote), se encuentran en el orden de 20-30 %, o superiores como en el caso de B. subtilis y B. lactofermentum que presentaron una similitud de 69.0 % y es lógico ya que las dos eubacterias son Gram positivas. Por lo tanto, es posible que la treonina sintasa se encontrara también en el último ancestro, y probablemente su reloj

molecular es más rápido que el de la triptofano sintasa cadena β .

De igual manera, los índices de similitud encontrados, por un lado entre las cuatro secuencias de treonina deshidratasa (de dos eubacterias y dos de eucariontes), y por otro, entre las cuatro secuencias de serina deshidratasa (de una eubacteria y tres de eucariontes), son también del orden de 20-40%, de manera que estas enzimas posiblemente se encontraran también en el último ancestro, y probablemente su evolución procedió a un ritmo similar al de las treonina sintasas. La manera ideal de probarlo sería alinear cada una de las secuencias disponibles de la treonina sintasa, treonina deshidratasa y serina deshidratasa con su gen homólogo de arqueobacterias si existiera la secuencia en el banco de genes.

Al analizar las tablas 7-10, encontramos valores significativos de similitud entre todas las secuencias disponibles de las cuatro enzimas analizadas. Esto significa que estas enzimas dependientes de fosfato de piridoxal involucradas en biosíntesis de aminoácidos y con características bioquímicas similares (Fig. 1), conforman en realidad un grupo natural. Es decir, los genes que las codifican seguramente provienen de un sólo gen ancestral del que se originaron a través de varias duplicaciones génicas que tal vez ocurrieron antes de la separación en eubacterias y arqueobacterias.

Sin embargo, los índices de similitud obtenidos al comparar cada enzima por separado con cada una de las restantes (Tablas 7-10) son

todos muy similares (20-30 %), de manera que resulta imposible establecer el orden en el cual se produjeron las divergencias que dieron lugar a los genes de las respectivas proteínas. Si suponemos un reloj molecular constante, entonces se podría afirmar que las divergencias se produjeron de manera casi simultánea, apareciendo rápidamente varios genes que divergieron a ritmos de cambio parecidos.

En el caso de genes parálogos estos están evolucionando independientemente el uno del otro desde el momento de la duplicación génica aunque se encuentren en el mismo organismo, o en organismos separados filogenéticamente.

Por lo tanto los valores individuales de comparaciones de diferentes proteínas en diferentes organismos no tienen valor. Lo importante es determinar si las enzimas son o no idénticas entre sí, para lo cual lo ideal sería realizar "secuencias consenso", es decir a partir de todas las secuencias disponibles deducir la posible secuencia ancestral de la enzima.

En las tablas 7-10 se observan índices de similitud que no corresponden al promedio general obtenido de las alineaciones entre los cuatro tipos de moléculas con las que se trabajó. Esto se debe a que estas cuatro enzimas presentan un reloj molecular errático el cual provoca que estas proteínas no sean buenos marcadores para realizar filogenias que muestren una topología de un árbol universal como

ocurre con las histonas de Tetrahymena sp. (ciliado) y la actina de Oomycetes (hongo) que son otro ejemplo de malos marcadores evolutivos (Sogin, 1993).

ARBOL FILOGENETICO DE LAS CADENA β DE LA TRIPTOFANO SINTASA

El árbol obtenido utilizando secuencias proteínicas se muestra en la Fig. 6, pero se aleja de los árboles universales de Gogarten et al. (1989), Iwabe et al. (1989) y Woese et al. (1990). Por una parte las arqueobacterias no aparecen como un grupo definido, aunque sus dos representantes (H. volcanii y M. thermoautotrophicum) presentan las secuencias de la cadena β de la triptofano sintasa menos parecidas al resto. Sin embargo, esta falta de definición probablemente se deba simplemente al desequilibrio existente en el mínimo de secuencias utilizadas de los diferentes linajes. En efecto, sólo se dispone de tres secuencias de arqueobacterias, que provienen de diferentes grupos, ya que Methanobacterium y Methanococcus corresponden a dos líneas divergentes de arqueobacterias metanógenas. En la realización de este mismo árbol, se cuenta con un antecedente de como la escasez de secuencias de algún grupo puede alterar la topología general del mismo. Antes de incorporar en nuestro análisis la secuencia de la planta de maíz (Zea mays), los eucariontes tampoco se definían como un grupo monofilético, y la secuencia de A. thaliana se agrupaba con Pseudomonas y Caulobacter. En cambio, al incluir una segunda secuencia vegetal (Zea mays), las cinco secuencias eucariontes ahora presentes se agruparon de forma natural, definiéndose el grupo de los eucariontes. Es importante hacer notar

que ahora este se subdivide en dos grupos naturales, i.e., hongos y plantas. Los animales no aparecen en este árbol ya que no sintetizan triptofano (Yanofsky y Crawford, 1987).

Sin embargo, en nuestro árbol los eucariontes aparecen en el interior del grupo de las eubacterias, cercanos unidos a las bacterias púrpura de los géneros Pseudomonas y Caulobacter. Esta posición del grupo eucarionte parecería indicar que el gen de la cadena β de la triptofano sintasa detectado en estos organismos fue transferido horizontalmente de la mitocondria al núcleo. Esto no es una posibilidad tan remota; según Margulis (1981), las mitocondrias descienden de eubacterias púrpuras aerobias, similares a los generos actuales Paracoccus, Bdellovibrio y Daptobacter. Esto permite especular que con la endosimbiosis que el gen original codificado en el núcleo eucarionte se perdió o dejó de expresarse y fue suplantado por el gen mitocondrial. Por otro lado, sabemos que la actividad de triptofano sintasa se ha perdido efectivamente en muchos vertebrados, entre ellos el hombre, que carecen de la capacidad de sintetizar triptofano; ello llevaría a la especulación que en estos animales, ambos genes de la triptofano sintasa cadena β , i.e., el nuclear y el mitocondrial, se han perdido.

Si suponemos que la hipótesis anterior es correcta, es decir, que las secuencias disponibles de la cadena β de la triptofano sintasa de eucariontes probablemente son de origen mitocondrial, es decir eubacteriano, el árbol obtenido representa una filogenia coherente

del grupo de las eubacterias. En efecto, se destaca la gran línea de las bacterias púrpura que incluye por un lado al grupo de Pseudomonas y Caulobacter, que es el más cercano a las secuencias mitocondriales, y por otro, a los géneros cercanos Escherichia y Salmonella. Según el árbol de la Fig. 7, el grupo más relacionado con las bacterias púrpura es el de las bacterias Gram positivas del género Bacillus, y como línea más alejada dentro de las eubacterias aparece la especie Thermus thermophilus. Esta topología general si corresponde con la presentada por Woese (1987), usando secuencias de 16S rRNA.

Sin embargo, en el grupo de las bacterias púrpura aparecen tres secuencias pertenecientes a organismos que, según la filogenia de Woese (1987), no pertenecen a este grupo. Una de ellas corresponde a la arqueobacteria metanógena Methanococcus voltae. Como se discutió anteriormente, la posición de las secuencias arqueobacterianas en el árbol obtenido no es confiable, debido al escaso número de sus representantes. Por otra parte, aparecen entre las bacterias púrpura, cerca de Escherichia y Salmonella, dos secuencias de bacterias Gram positivas i.e., Lactobacillus y Brevibacterium. Este último fenómeno se debe probablemente a transferencias horizontales de genes provenientes de bacterias púrpura similares a E. coli y S. typhimurium, aunque también hay que tomar en cuenta la posibilidad de que los autores que reportaron las secuencias hayan usado cepas equivocadas de organismos. De hecho, Crawford y Milkman (1991) proponen que todo el operon trp de B. lactofermentum proviene de un transporte horizontal a partir de enterobacterias, ya que el arreglo de los genes (todos contiguos, con fusión de los genes trpC y trpF),

la regulación por represión y atenuación y la secuencia de aminoácidos, son similares en todas las bacterias entéricas y en B. lactofermentum (Matsui et al. 1986, Crawford y Milkman, 1991). Según el árbol de la Fig. 6, pudo haber existido otra transferencia del gen trpB a partir de una enterobacteria hacia otra Gram positiva, L. casei. Ello supondría que las transferencias entre estos dos grupos en particular, i.e., bacterias entericas y Gram positivas, han ocurrido más de una vez.

Por último, vemos que la secuencia de la treonina sintasa de B. subtilis aparece como grupo externo a todas las cadenas β de las triptofano sintasas, como es de esperarse si los genes que codifican a estas enzimas provienen de una duplicación génica anterior a la divergencia de los tres linajes celulares. La comparación con la secuencia de la treonina sintasa, permite poner raíz al árbol de las cadenas β de la triptofano sintasa, y parece indicar que las secuencias arqueobacterianas son más antiguas que el resto. Sin embargo, ya se ha mencionado que la posición de las secuencias arqueobacterinas en este árbol no es confiable.

CONCLUSIONES

El árbol de las cadenas β de la triptofano sintasa presentado aquí adolece de un defecto severo que escapa a los límites de este trabajo: el de la disponibilidad de secuencias. Por otra parte, la historia de estas enzimas es compleja, debido a varios eventos de transferencia horizontal de genes, lo cual implica que esta molécula no es indicada para reflejar filogenias de organismos, sino únicamente de genes. Esta enzima, así como el resto de las enzimas dependientes de fosfato de piridoxal analizadas en este trabajo, presentan un reloj molecular errático, lo que dificulta su utilización como indicadores filogenéticos.

La alta similitud (50-60%) existente entre las secuencias de aminoácidos de la cadena β de la triptofano sintasa de eubacterias y arqueobacterias demuestra claramente que esta enzima se hallaba presente en el último ancestro común y ha evolucionado en forma lenta. De igual manera, el análisis de las pocas secuencias disponibles de treonina sintasas, treonina deshidratasas y serina deshidratasas parece indicar que éste es también el caso para estas tres enzimas. Si así fuera, el último ancestro común poseía ya un grupo diversificado de por lo menos cuatro enzimas dependientes de piridoxal fosfato, involucradas en la biosíntesis de aminoácidos. Este ancestro sería capaz de sintetizar además de la histidina (Beckler y Reeve 1986), por lo menos triptofano y treonina, ya que las triptofano y treonina sintasas son las enzimas que catalizan el último paso de sus respectivas vías, dando así lugar al aminoácido

correspondiente. Además, las rutas que llevan a la síntesis de lisina, metionina e isoleucina parten de metabolitos de la vía biosintética de la treonina, de manera que, una vez establecida la vía que lleva al primer aminoácido, las siguientes pueden aparecer rápidamente. En particular, la biosíntesis de la isoleucina parte de la treonina, y el primer paso lo realiza la treonina deshidratasa, dando lugar al α -cetobutirato (Umberger, 1983). Es decir, es posible que el último ancestro fuera capaz de sintetizar varios, o todos, los aminoácidos de la familia del aspartato. Esto implica que la capacidad de biosíntesis de aminoácidos del último ancestro fueron posiblemente muy superiores a los de muchos vertebrados, entre ellos el hombre, que han perdido las enzimas responsables de la síntesis de estos aminoácidos. Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que el último ancestro presentaba una compleja red de síntesis de aminoácidos, lo cual, sumado a las demás características que ya tendría, nos presentan la descripción de un organismo de una complejidad considerable, probablemente no muy distante de la existente en los procariontes actuales (Lazcano et al. 1992).

La homología de las diferentes enzimas dependientes de fosfato de piridoxal analizadas en este trabajo sugiere que todas ellas provienen de un mismo gen ancestral, y que aparecieron tras varias duplicaciones génicas, seguidas de una creciente especialización en cada uno de los genes resultantes. Dados los porcentajes de similitud tan elevados obtenidos al comparar a las diferentes enzimas entre sí, no se puede determinar el orden en el que ocurrieron las

divergencias. Sin embargo, podemos decir que éstas sucedieron casi simultáneamente.

Por otra parte, la existencia de un gen ancestral a este grupo de genes que codifican para enzimas dependientes de fosfato de piridoxal implica que, en tiempos anteriores a la divergencia de arqueobacterias y eubacterias, existieron organismos que presentaban una enzima capaz de unir fosfato de piridoxal e involucrada en la biosíntesis de varios aminoácidos. Esta enzima debe haber presentado una especificidad muy inferior a la de sus descendientes actuales, la cual se adquirió a través de la evolución a partir de duplicaciones génicas y divergencia de secuencias. Este resultado apoya la hipótesis de Jensen, de que las células ancestrales poseían un número reducido de enzimas, poco reguladas y con una ambigua especificidad por el sustrato (Jensen, 1976) y la hipótesis de Dunathan y Voet, de una proteína ancestral dependiente de fosfato de piridoxal (Dunathan y Voet, 1974).

Finalmente, habrá que agregar que la existencia de un gen ancestral a otros que, sin embargo, ya se encontraban presentes en el último ancestro común, implica que existieron organismos mucho más simples que éste. La caracterización de estos estadios del desarrollo evolutivo se podrá llevar a cabo a través del estudio de genes parálogos antiguos, que hayan divergido antes de la separación de arqueobacterias y eubacterias.

REFERENCIAS

- Aas S.F., Rognes S.E. (1990). Nucleic Acids Res. 18:665.
- Benner S.A., Alleman R.K., Ellington A.D., Ge L., Glasfeld A., Leanz G.F., Krauch T., MacPherson L.J., Moreney S., Piccirilli J.A. and Weinhold E. (1987). Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 52:53
- Berlyn M.B., Last R.L. and Fink G.R. (1989). Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86:4604-4608.
- Blake C. (1974). Nature. 250: 284-285
- Beckler G.S. and Reeve J.N. (1986). Mol. Gen. Genet. 204:113
- Burns D.M. and Yanofsky C. (1989). J. Biol. Chem. 264:3840.
- Crawford I. and Milkman R. (1991). Orthologous and Paralogous Divergence, Reticulate Evolution, and Lateral Gene Transfer in Bacterial trp Genes. En Selander R.K., Clark A.G. and Whittam T.S. (eds) Evolution at the Molecular Level. Sinauer, Chicago.
- Crawford I.P., Nichols B.P., Yanofsky C. (1980). J. Mol. Biol. 142:489.
- Datta P., Gosst.J., Omnaas J.R. and Patil R.V. (1987). Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84:393.
- Dayhoff M.O. and Schwatz R.M. (1978). Evolution of early life inferred from protein and ribonucleic acid sequence. En Origin of Life, Noda H. (ed.) Center for Academic Publications, Tokyo. p 547.
- Doolittle, R. 1989. ON ORFS AND URFS. Sunlight California Press.
- Dunathan H.C. and Voet J.G. (1974). Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 71:3888.
- Eberly L., Crawford I.P. (1989). Biochimie. 71:521.
- Francino M.P. (1992). Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM.
- Gorgarten J.P., Kibak H., Dittrich P., Taiz L., Bowman E.J., Manolson M.F., Poole R.J., Date T., Oshima T., Konishi J., denda K., Yoshida M. (1989a) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86:6661
- Hadero A. and Crawford I.P. (1986). Mol. Biol. Evol. 3:191.
- Higgins D.G. and Sharp P.M. (1988). Gene. 73:237.
- Higgins D.G. and Sharp P.M. (1989). CABIOS. 5:151.
- Horowitz N.J. (1945). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 31: 153.

- Horowitz N.J. (1965). In Evolving Genes and Proteins. Bryson, V. and Vogel H.J. Academic Press, New York. p 15.
- Hyde C.C., Ahmed S.A., Padlan E.A., Miles E.W. and Davies D.R. (1988). J. Biol. Chem. 263:17857.
- Ishiwata K., Yoshino S., Iwamori S., Suzuki T., Makiguchi N. (1989). Agrić. Biol. Chem. 53:2941.
- Iwabe N., Kuma K., Hasegawa M., Osawa S. and Miyata T. (1989). Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86:9355.
- Jensen, R. (1976). Annu. Rev. Microbiol. 30: 409.
- Jensen, R. and Byng, G. (1982). The partitioning of biochemical pathways. En: M. Rattazi, J. Scandalios and G. Whitt (eds), Isozymes: Cur. Top. Bio Med Res. 5, Alan R. Liss, New York, p. 143.
- Jensen, R. (1985). Mol. Biol. Evol. 2: 92.
- Kielland-Brandt M.C., Holmberg S., Petersen J.G.L., Nilsson-Tillgren T. (1984). Carlsberg Res. Commun. 49:567
- Koyama, Y. and Furukawa, K. (1990). J. Bacteriol. :3490.
- Lazcano A., Fox G.E. and Oró J. (1992). Life before DNA: the Origin and Early Evolution of Early Archean Cells. En R.P. Mortlock (ed). The Evolution of Metabolic Functions. CRC Press, Boca Raton.
- Lam W.L., Cohen A., Tsouluhas D. and Doolittle W.F. (1990). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87:6614.
- Lipman D.J., and Pearson W.R. (1985). Science. 227:1435
- Malumbres M., Mateos L.M., Guerrero C., Martin J.F. (1988). Nucleic Acids Res. 16:9859.
- Marceau M., McFall E., Lewis S.D., Shafer J.A. (1988). J. Biol. Chem. 263:16926
- Margulis L. (1981). Symbiosis in Cell Evolution. Freeman.
- Matsui K., Sano K., Ohtsubo E. (1986). Nucleic. Acids. Res. 14:10113
- Meile L., Stettler R., Banholzer R., Kotik M. and Leisinger T. (1991). J. Bacteriol. 173:5017
- Natori Y., Kano Y. and Imamoto F. (1990). J. Biochem. 107:248.
- Noda C., Ito K., Nakamura T. and Ichihara A. (1988). FEBS LETTERS. 224:331.

- Ogawa H., Gomi T., Konishi K., Date T., Nakashima H., Nose K., Matsuda Y., Peraino C., Pitot H.C. and Fujioka M. (1989). J. Biol. Chem. 264:15818
- Ogawa H., Miller D.A., Dunn T., Su Y., Burcham J.M., Peraino C., Fujioka M., Babcock K., Pitot H.C. (1988). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:5809
- Oparin A.I. (1924). Proiskhodenie Zhisni. Moscovsky Rabotchii, Moscow.
- Parsot C., Cossart P., Saint-Girons I., Cohen G.N. (1983). Nucleic Acids Res. 11:7331.
- Parsot C. (1986). EMBO J. 5:3013.
- Parsot, C. (1987). Proc. Natl. Aca. Sci U.S.A. 84: 5207.
- Parsot C. and Cohen G.N. (1988). J. Biol. Chem. 263:14654.
- Phillips A.T. and Wood W. (1965). J. Biol. Chem. 240:4703.
- Pratt M.L. and DeMoss J.A. (1988). J. Biol. Chem. 263:6872.
- Ross C.M. and Winkler M.E. (1988). J. Bacteriol. 170:757.
- Seufert W. (1990). Nucleic Acids Res. 18:3653
- Sibold L. and Henriquet M. (1988). Mol. Gen. Genet. 214:439.
- Skrzynia C., Binninger D.M., Alspaugh J.A. II and Pukkila P.J. (1989). Gene 81:73.
- Sogin M. (1993). En S. Bengton (ed). Early life in earth. Columbia Univ. Press. (en prensa).
- Taillon B.E., Little R. and Lawther R.P. (1988). Gene. 63:245.
- Umbarger H.E. (1983). Biosynthesis of Amino Acids. En Biochemistry. Zubay G. (ed.) Addison-Wesley, Reading, MA. p 828.
- Waley G. (1969). Comparative Biochemistry and Physiology 30: 1.
- Woese C.R. (1987). Microbiol. Rev. 51:221.
- Woese C.R., Kandler O. and Wheelis M.L. (1990). Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87:4576
- Yças M. (1974). J. Theor. Biol. 44:145-160.
- Zalkin H. and Yanofsky C. (1982). J. Biol. Chem. 257:1491-1500.
- Zuckermandl E. and Pauling L. (1965). J. Theoret. Biol. 8:357-366.