

2EJ



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EVOLUCION TEMPRANA DEL METABOLISMO DE
PIRIMIDINAS: IMPLICACIONES PARA LA
CARACTERIZACION METABOLICA
DEL GENANCESTRO

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:

LUIS JOSE DELAYE ARREDONDO

DIRECTOR DE TESIS:

DR. ANTONIO EUSEBIO LAZCANO-ARAUJO REYES



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM

1999

TESIS CON
VALIA 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:
Evolución temprana del metabolismo de pirimidinas: implicaciones
para la caracterización metabólica del cenacestro

realizado por Luis José Delaye Arredondo

con número de cuenta 9367966-8 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Dr. Antonio Lazcano-Araujo Reyes

A. Lazcano-Araujo

Propietario

Dra. Alicia Negrón Mendoza

Alicia Negrón

Propietario

Dra. Valeria Franciasca Eugenia
Leopoldina De Maria De Guadalupe Souza Saldivar

Valeria Souza

Supiente

Dr. Luis Felipe Jimenez García

Luis Jimenez

Suplente

M. en C. Arturo Carlos II Becerra Bracho

FAC. DE CIENCIAS

Consejo Departamental de Biología

Edna Maria Suarez Diaz



DRA. EDNA MARIA SUAREZ DIAZ
DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Microbiología A-107 de la Facultad de Ciencias de la UNAM. Bajo la dirección del Dr. Antonio Lazcano-Araujo Reyes. Con el apoyo de una beca tesis proporcionada por la Fundación UNAM y gracias al proyecto PAPIIT IN213598.

Índice

Resumen

Abreviaturas

1. Introducción.

- 1.1 Biosíntesis de nucleótidos de pirimidinas
- 1.2 Evolución de rutas metabólicas.
- 1.3 Planteamiento.
- 1.4 Objetivos.

2. Material y métodos.

3. Resultados y discusión.

- 3.1 Distribución filogenética de los genes de la biosíntesis de pirimidinas
- 3.2 Implicaciones de las habilidades metabólicas del LCA a partir de la distribución de genes de pirimidinas en los tres dominios celulares.
- 3.3 El orden de los genes de biosíntesis de pirimidinas en los genomas completos secuenciados.
- 3.4 Evolución temprana del metabolismo de pirimidinas.
 - 3.4.1 Fosfo-ribosil-transferasa de pirimidinas y ribosa-fosfato pirofosfocinasa.
 - 3.4.2 Dihidroratasa y dihidropirimidinasa.
 - 3.4.3 CTP sintasa y carbamoil-fosfato sintasa
 - 3.4.4 Nucleósido-fosfato cinasa, dTMP cinasa, nucleósido-trifosfato-adenilato cinasa y citidilato cinasa.
- 3.5 Filogenias de las enzimas de la biosíntesis de pirimidinas pertenecientes a los tres dominios.
- 3.6 Síntesis prebiótica de pirimidinas.

4. Conclusiones.

5. Referencias.

6. Apéndice.

Resumen.

La distribución filogenética de los genes de biosíntesis de pirimidinas sugiere que es una ruta muy antigua que ya se encontraba presente en el último ancestro común de todos los seres vivos (es decir, el cenancestro) y muy probablemente desde antes. La evidencia indica que el cenancestro poseía la síntesis *de novo* casi completa hasta citosina tri-fosfato, podía sintetizar desoxirribonucleótidos a partir de ribonucleótidos y, finalmente, era capaz de catalizar la formación de deoxitimidina tri-fosfato a partir de deoxiuridina mono-fosfato. lo que sugiere que su genoma era de DNA. El orden relativo de los genes del metabolismo de pirimidinas no se encuentra conservado entre los genomas estudiados, salvo en el caso de los micoplasmas (*Mycoplasma genitalium* y *M. pneumoniae*) en donde el orden aparece prácticamente idéntico, lo cual es fácil de entender dada la cercanía filogenética entre estos dos organismos. Al comparar los genes de la biosíntesis de pirimidinas de los genomas completos de *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*, *Haemophilus influenzae*, *Bacillus subtilis*, *Mycoplasma genitalium*, *M. pneumoniae*, *Synechocystis sp.*, *Methanococcus jannaschii*, *Methanobacterium thermoautotrophicum*, y *Saccharomyces cerevisiae* entre sí, junto con los genes que los rodean, se encontró que las especies filogenéticamente más cercanas comparten estructuras similares en el acomodo de los genes. Sin embargo, con estos genomas completos secuenciados no es posible determinar la organización espacial de los genes de la biosíntesis de pirimidinas en el último ancestro común (cenancestro), ni tampoco determinar la estructura de(l) el (los) operon(es) de estos mismos genes que estuvieran presentes en el cenancestro; con excepción de los genes *pyrA* y *pyrB* de la enzima carbamoil-fosfato sintasa, cuyo arreglo a lo largo de los tres dominios sugiere que estos se encontraban contiguos ya en el cenancestro. El análisis de las secuencias reveló que existen cuatro grupos monofiléticos de enzimas dentro de la biosíntesis de pirimidinas, lo que sugiere que al menos parte de la ruta de biosíntesis de pirimidinas fue formada por un extenso fenómeno de duplicaciones paralogas, posiblemente vía *patchwork*. Se calcularon árboles de distancia para las secuencias compartidas por los tres

dominios para estudiar su viabilidad como marcadores filogenéticos. De los 14 grupos de genes ortólogos, cuatro apoyan una filogenia Archaea-Eucarya, cinco una filogenia Bacteria-Archaea como grupos hermanos, uno como Bacteria-Eucarya y cuatro no mostraron un agrupamiento claro de los dominios celulares. También se estudiaron las distintas propuestas de síntesis prebióticas de pirimidinas y su relación con los datos obtenidos a partir del análisis de secuencias bajo las hipótesis de evolución de rutas metabólicas. Los datos sugieren que el metabolismo de pirimidinas se ensambló principalmente mediante un mecanismo de *patchwork* (Jensen 1976). Al parecer la síntesis de desoxirribonucleótidos evolucionó a partir de ribonucleótidos en un proceso que se conoce como evolución "hacia delante" Granick (1957). No se encontraron evidencias de más de dos pasos metabólicos contiguos que apoyen un mecanismo de evolución tipo Horowitz.

Abreviaturas.

CPS, carbamoil-fosfato sintasa; DHO, dihidroorotato; DHU, dihidouracilo; EC, Enzyme Code (Código de Enzimas); FAD, flavina adenina dinucleótido; GAT, glutamino amido-transferasa; LCA, último ancestro común de todos los seres vivos actuales (cenancestro); UV, rayos ultra violeta.

a entender el papel que ha tenido la duplicación génica en el ensamblaje evolutivo de uno de los procesos centrales de la vida, así como cual era la naturaleza del material genético del cenancestro.

Por otra parte, el problema del enraizamiento del árbol universal está íntimamente ligado a la naturaleza del último ancestro común de todos los seres vivos. Cuatro diferentes filogenias de genes parálogos (Iwabe *et al* 1989, Gogarten *et al* 1989, Brown y Doolittle 1995, Lawson 1996), proveen un consenso general de que la raíz de árbol universal, queda en alguna parte en el dominio Bacteria, posicionando a Archaea y Eucarya como grupos hermanos. De cualquier forma, existe incertidumbre de este enraizamiento, pues cada conjunto de genes parálogos presenta problemas particulares (Brown y Doolittle 1997). Al parecer, los genes que participan en los llamados roles informativos, tienden a generar filogenias en donde los dominios Archaea y Eucaria aparecen como grupos hermanos, mientras que los genes que participan en roles metabólicos no. En este trabajo se han hecho árboles filogenéticos a partir de las enzimas ortólogas de la biosíntesis de pirimidinas, presentes en los tres dominios con el fin de estudiar las relaciones filogenéticas de los genes que conforman éste metabolismo.

Este es el primer intento por hacer un análisis evolutivo del origen de la ruta biosintética de pirimidinas. Hemos analizado el papel que la duplicación génica ha tenido en la evolución temprana del metabolismo de pirimidinas, así como cuales eran las posibles habilidades de biosíntesis de pirimidinas en el último ancestro común de todos los seres vivos, y las filogenias generadas a partir de las enzimas homólogas presentes en los tres dominios celulares.

La naturaleza del cenancestro, así como el origen y la evolución temprana de las rutas biosintéticas básicas son dos preguntas que pueden ser ahora abordadas gracias a la disponibilidad de una gran cantidad de las secuencias de genes pertenecientes a los tres dominios celulares: Archaea, Bacteria y Eucarya, y la información que nos proveen los genomas secuenciados.

1.1 Biosíntesis de nucleótidos de pirimidinas.

La primera parte de la biosíntesis *de novo* de las pirimidinas comienza con la formación de carbamoil-fosfato a partir de glutamina, HCO_3^- y ATP (en este punto se conecta con la biosíntesis de la arginina) y termina con la formación de orotato.

| Enzima | Reacción | Gen |
|---------------------------------|---|--|
| Carbamoil-fosfato sintasa | glutamina + HCO_3^- + 2ATP ↓ | |
| Aspartato carbamoil transferasa | carbamoil-fosfato → síntesis de arginina ↓ | <i>pyrAa, pyrAb</i> <i>pyrB, pyrI</i> |
| Dihidroorotasa | carbamoil-aspartato ↓ | <i>pyrC</i> |
| Dihidroorotato oxidasa | dihidroorotato ↓ | <i>pyrD</i> |
| Orotato fosforibosiltransferasa | orotato (+PRPP) ↓ | <i>pyrE</i> |
| OMP descarboxilasa | orotidina 5'-fosfato (OMP) ↓ | <i>pyrF</i> |
| Uridilato cinasa | Uridina 5'-fosfato (UMP) ↓ | <i>pyrH</i> |
| Nucleosido difosfato cinasa | UDP ↓ | <i>ndk</i> |
| CTP sintasa | UTP ↓ CTP | <i>pyrG</i> |

Figura 1. Enzimas y genes involucrados directamente en la síntesis *de novo* de pirimidinas.

En la segunda parte, al orotato se le agrega una ribosa fosforilada por medio de la enzima orotato fosforribosiltransferasa para formar OMP, con el cual se forma UMP mediante la acción de la OMP descarboxilasa, (Figura 1).

A partir del uridilato se forman todos los demás nucleótidos de pirimidinas *de novo* por medio de una serie de reacciones que incluyen fosforilaciones, aminaciones, desaminaciones, oxidaciones y reducciones. La síntesis de pirimidinas vía las rutas de salvamento consiste principalmente de las siguientes reacciones: a) conversión directa de base a ribonucleótido por las fosforibosil transferasas; b) conversión directa de nucleosido a nucleótido por las nucleósido cinasas y c) conversión reversible de base a nucleosido por las nucleósido fosforilasas. Las mismas reacciones ocurren en las rutas de salvamento de purinas.

El catabolismo de pirimidinas se realiza separando los nucleósidos en sus respectivas bases y azúcares, para después excretar la base, o romper el anillo para formar NH_4^+ , CO_2 y β -aminoácidos (Berens *et al*, 1995).

1.2 Evolución de rutas metabólicas.

La aparición de las rutas biosintéticas básicas fue uno de los eventos principales durante la evolución temprana de la vida, ya que permitió a los organismos primitivos volverse menos dependientes de las fuentes externas de aminoácidos, purinas, pirimidinas y otros compuestos que se debieron acumular en el ambiente primitivo como resultado de la síntesis prebiótica (Fani *et al*, 1995).

El primer intento por explicar el origen de las rutas metabólicas basado en las ideas de Oparin (1938) fue propuesto por Norman H. Horowitz (1945), quien propuso que el aumento y evolución de las vías biosintéticas es debido a la adquisición secuencial de enzimas en un orden inverso a la dirección de biosíntesis de las rutas actuales (Figura 2). Así, la última enzima de la ruta biosintética sería la más antigua y la primer enzima, la más nueva. Es por eso que esta hipótesis es también conocida como hipótesis retrógrada.

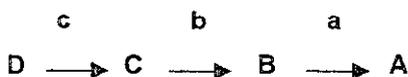


Fig 2. La enzima **a** toma el compuesto **B** y lo transforma en **A**, al agotarse **B** en el medio prebiótico, el gen de la enzima **a** da origen a la enzima **b** por medio de una duplicación génica, seguida de mutación. La nueva enzima utiliza el compuesto **C** para producir **B**, y así sucesivamente.

Sin embargo, esta teoría tiene limitaciones (Lazcano *et al*, 1995) entre las cuales destacan:

- a) la mayoría de los intermediarios metabólicos son químicamente inestables y es difícil de explicar su síntesis y acumulación en los ambientes prebióticos.
- b) la mayoría de los intermediarios metabólicos son compuestos fosforilados que no pueden permear las membranas primordiales en ausencia de un sistema

especializado de transporte, los cuales probablemente estaban ausentes en las células primitivas.

- c) La hipótesis retrógrada implica que, los pasos sucesivos en las rutas metabólicas deben de ser químicamente similares. Con la excepción de los siguientes ejemplos no se conocen muchos casos que satisfagan esta condición: 1) las enzimas de la biosíntesis de la β -cistationasa y cistation γ -sintasa (Belfaiza *et al.* 1986); 2) la protoclorofilida reductasa y clorin reductasa, las cuales están involucrados en la biosíntesis de la bacterioclorofila (Burke *et al.*, 1993); y 3) los productos de los genes *hisA* y *hisF*, los cuales participan en el anabolismo de la histidina (Fani *et al.*, 1995); Los genes *metB* y *metC* (segundo y tercer paso de la biosíntesis de la histidina respectivamente) reportados como homólogos y los genes *argA* y *argB* (primer y segundo paso en la biosíntesis de la arginina respectivamente) también homólogos (Riley, 1996) (Islas, S. comunicación personal) . Sin embargo, el caso de los genes *argA* y *argB* no se puede considerar como un caso concluyente de el mecanismo de evolución retrógrada, ya que las dos enzimas catalizan reacciones químicamente equivalentes y durante la evolución temprana de esta ruta pudo existir una enzima ancestral más inespecífica que catalizara ambas reacciones (Islas *et al.* 1988).
- d) Finalmente, el hecho de que se encuentren dos enzimas que son homólogas y que catalicen pasos secuenciales, también puede ser explicado por la hipótesis de *patchwork* (Becerra *et al.*, 1997b).

Por otro lado, Waley (1969) propuso que la evolución de las rutas metabólicas podía ser debida a cambios mínimos en la copia de un gen duplicado teniendo como resultado una nueva enzima capaz de catalizar una reacción similar. Independientemente, Ycas (1974) y Jensen (1976) arguyeron que las rutas biosintéticas primordiales fueron ensambladas por el reclutamiento de enzimas lentas e ineficientes con una baja especificidad por el sustrato (Fig. 3).

Si dicho proceso ha tenido lugar en el pasado, entonces deben de quedar huellas de este en las secuencias aminoacídicas de las enzimas que participan en las rutas metabólicas actuales. Existen pruebas de que esto fue así. La homología (a) de las ATP fosforibosiltransferasas (*hisG*) junto con otras fosforibosiltransferasas y nucleotidasas; (b) de los genes *hisC* y *hisH* de la biosíntesis de histidina (Fani, Liò y Lazcano, 1995); (c) las adenina deaminasas, AMP deaminasa y adenilsuccinato sintasa; y (d) las inosina monofosfato deshidrogenasa con las guanosina monofosfato reductasa (Becerra y Lazcano 1997) forman parte de las primeras evidencias de que dicho proceso ha tenido lugar en la evolución de las rutas biosintéticas. Este mismo tipo de evolución en *patchwork* parece ser el responsable al menos en parte, de la ruta biosintética de pirimidinas. Como se demuestra en este trabajo, la homología entre la CTP sintasa (EC 6.3.4.2) y la carbamoil-fosfato sintasa (EC 6.3.5.5); el grupo monofilético formado por las enzimas nucleosido-fosfato cinasa (EC 2.7.4.4), dTMP cinasa (EC 2.7.4.9), nucleosido-trifosfato-adenilato cinasa (EC 2.7.4.10) y citidilato cinasa (EC 2.7.4.14); el de las enzimas dihidroorotasa (EC 3.5.2.3) y la dihidropirimidinasa (EC 3.5.2.2); y finalmente, el conjunto de la ribosa-fosfato pirofosfocinasa (EC 2.7.6.1), orotato forforibosiltransferasa (EC 2.4.2.10) y uracil fosforibosiltransferasa (EC 2.4.2.9), apoyan esta idea.

Una tercera hipótesis de evolución metabólica fue generada por Granick (1957) la cual está basada en la creencia Haeckeliana de que la ontogenia recapitula la filogenia, por lo que concluyó que la biosíntesis de algunos productos relativamente complicados podía ser explicada a partir de compuestos más sencillos por una evolución "hacia delante". Este modelo asume que los compuestos bioquímicos simples son más antiguos que los compuestos finales complejos y por lo tanto que las enzimas que catalizan los primeros pasos en una ruta biosintética son más antiguas que las enzimas que catalizan los últimos pasos. De esta manera los pasos de la ruta biosintética reflejan su historia evolutiva.

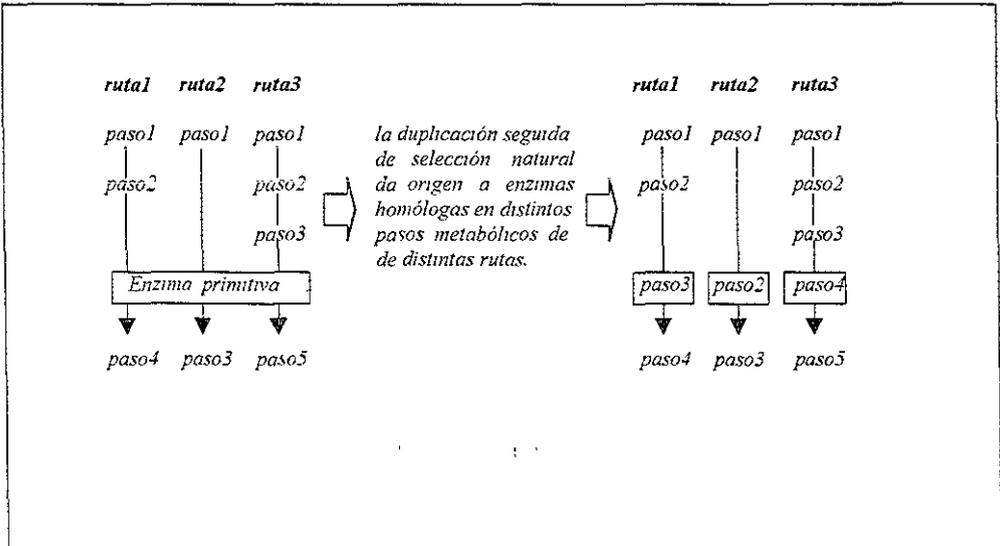


Figura 3. Ensamblaje de las rutas metabólicas, mediante un mecanismo de *patchwork*.

1.3 Planteamiento.

La naturaleza del último ancestro común de todos los seres vivos, es una cuestión fundamental que puede ser ahora abordada por los evolucionistas moleculares gracias a la información disponible.

La síntesis de nucleótidos de pirimidinas se encuentra entre los procesos centrales de la vida ya que se encarga de sintetizar parte de los bloques constructores del RNA y el DNA. Determinar las habilidades que el LCA podía tener para metabolizar pirimidinas, nos puede ayudar a entender la naturaleza del genoma del cenancestro, es decir, si este era de DNA o de RNA. En principio, el genoma del cenancestro puede ser visto como el conjunto de genes y estructuras genómicas que son compartidas por los tres dominios, ya que a partir de esta lista se puede sugerir la estructura de las rutas metabólicas de LCA (Brown y Doolittle 1997). Por último, en algunos casos es posible deducir la estructura de las rutas metabólicas anteriores al cenancestro a partir de grupos monofiléticos de enzimas encontrados en los genes presentes en sus descendientes. Ello permite asomarse a etapas de evolución metabólica previas, que hasta ahora no han sido descritas.

Es generalmente aceptado que los primeros seres vivos se originaron a partir de la sopa primitiva, y que dependían de la abundancia y diversidad de los compuestos orgánicos de origen prebiótico para su supervivencia (Oparin, 1938). Los problemas relacionados con la síntesis abiótica de todos los precursores metabólicos y su acumulación en la sopa primitiva, limitan la validez de la hipótesis retrógrada (Horowitz 1945). Por el contrario, los resultados obtenidos a partir de la distribución de genes en el genoma, la estructura de los operones de pirimidinas, y el análisis de las secuencias parecen indicar que el metabolismo de pirimidinas fue ensamblado mediante una serie de duplicaciones parálogas probablemente vía *patchwork*. Estudiar éste proceso es el objetivo central de este trabajo.

1.4 Objetivos.

- Determinar el papel de la duplicación génica en la evolución temprana del metabolismo de pirimidinas.
- Generar una propuesta sobre las habilidades metabólicas de la biosíntesis de pirimidinas del cenacestro.

2. Material y métodos.

Se utilizaron las secuencias disponibles de los genes que codifican las proteínas que participan en la ruta de biosíntesis de pirimidinas:

| | |
|--|----------------|
| carbamoil-fosfato sintasa | (EC 6 3.5.5) |
| aspartato-carbamoil transferasa | (EC2.1.3.2) |
| dihidroorotasa | (EC 3.5.2.3) |
| dihidroorotato oxidasa | (EC 1.3.3.1) |
| orotato fosfo-ribosil-transferasa | (EC 2.4.2.10) |
| orotidina 5'-fosfato descarboxilasa | (EC 4.1.1.23) |
| ribosa fosfato pirofosfocinasa | (EC 2.7.6.1) |
| orotato reductasa | (EC 1.3.1.14) |
| uracil deshidrogenasa | (EC 1.1.99.19) |
| uracil fosfo-ribosil-transferasa | (EC 2.4.2.9) |
| dihidropirimidina deshidrogenasa (NADP+) .. | (EC 1.3.1.2) |
| tioredoxin reductasa (NADPH) | (EC 1.6.4.5) |
| ribonucleótido reductasa | (EC 1.17.4.1) |
| ribonucleótido-trifosfato reductasa | (EC 1.17.4.2) |
| timidilato sintasa | (EC 2.1.1.45) |
| desoxicitidilato 5-hidroximetil transferasa .. | (EC 2.1.2.8) |
| purina nucleosido fosforilasa | (EC 2.4.2.1) |
| pirimidina nucleosido fosforilasa | (EC 2.4.2.2) |
| uridina fosforilasa | (EC 2.4.2.3) |
| timidina fosforilasa | (EC 2.4.2.4) |
| timidina cinasa | (EC 2.7.1.21) |
| uridina cinasa | (EC 2.7.1.48) |
| desoxicitidina cinasa | (EC 2.7.1.74) |
| uridilato cinasa | (EC 2.7.4.-) |
| nucleosido-fosfato cinasa | (EC 2.7.4.4.) |
| nucleosido-difosfato cinasa | (EC 2.7.4.6) |
| timidilato cinasa | (EC 2.7.4.9) |
| nucleósido-trifosfato-adenilato cinasa | (EC 2.7.4.10) |
| citidilato cinasa | (EC 2.7.4.14) |
| 5'-nucleotidasa | (EC 3.1.3.5) |
| dihidropirimidinasa | (EC 3.5.2.2) |
| citosina deaminasa | (EC 3.5.4.1) |
| citidina deaminasa | (EC 3.5.4.5) |
| dCMP deaminasa | (EC 3.5.4.12) |
| dCTP deaminasa | (EC 3.5.4.13) |
| apirasa | (EC 3.6.1.5) |
| dCTP pirofosfatasa | (EC 3.6.1.12) |
| dUTP pirofosfatasa | (EC 3.6.1.23) |
| CTP sintasa | (EC 6 3.4.2) |

Las secuencias fueron obtenidas de los siguientes bancos de datos en internet :

Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

(<http://www.genome.ad.jp/kegg/kegg2.html>) ;

EC Enzyme (<http://www.bis.med.jhmi.edu/Dan/proteins/ec-enzyme.html>) ;

SRSWWW (<http://www.embl-heidelberg.de/srs/srsc>) ;

Microbial Genome Database, (<http://mbgd.genome.ad.jp/>)

y de las direcciones de los genomas completos en internet :

Escherichia coli, (<http://genome4.aist-nara.ac.jp/>) ;

Haemophilus influenzae, (<http://www.tigr.org/tdb/mdb/hidb/hidb.html>) ;

Helicobacter pylori, (<http://www.tigr.org/tdb/mdb/hpdb/hpdb.html>) ;

Bacillus subtilis, (<http://www.pasteur.fr/Bio/SubtilList.html>) ;

Mycoplasma genitalium, (<http://www.tigr.org/tdb/mdb/mgdb/mgdb.html>) ;

Mycoplasma pneumoniae, (http://www.zmbh.uni-heidelberg.de/M_pneumoniae/MP_Home.html) ;

Synechocystis sp., (<http://www.kazusa.or.jp/cyano/cyano.html>) ;

Methanococcus jannaschii, (<http://www.tigr.org/tdb/mdb/mjdb/mjdb.html>) ;

Methanobacterium thermoautotrophicum

(<http://www.genomecorp.com/htdocs/sequences/methanobacter/abstract.html>) ,

Archaeoglobus fulgidus, (<http://www.tigr.org/tdb/mdb/afdb/afdb.html>) ;

Saccharomyces cerevisiae, (<http://genome-www.stanford.edu/Saccharomyces/>).

Las secuencias fueron comparadas por medio de un análisis pareado usando el algoritmo Pearson (Pearson and Lipman, 1988; Pearson, 1990) el cual forma parte del programa FASTA. Las comparaciones de secuencias que dieron un valor de identidad mayor al 20% en 100 aminoácidos fueron alineadas usando el programa ClustalW 1.6 (Higgins *et al*, 1989), y se buscaron bloques conservados con el programa Macaw 2.0 5 (Schuler *et al*, 1991).

Para la construcción de árboles filogenéticos se hizo un alineamiento múltiple de secuencias usando el programa ClustalW con la matriz de sustitución Blosum 30 y una penalización abierta de gap 20. Una matriz del número estimado de diferencias de aminoácidos entre pares de secuencias fue calculado, usando el programa PROTDIST del paquete Phylip 3.5c con las opción del programa Dayhoff. Para estimar los límites de confianza de los puntos de ramificación en los árboles filogenéticos, se utilizó un análisis *neighbor-joining* con los programas SEQBOOT, NEIGHBOR y CONSENSE del paquete *Phylip 3.5c*. Las secuencias incluidas en este estudio se sometieron también a un análisis de *Dotplot* (que se encuentra en la dirección: <http://aices.med.umn.edu/rawdot.html>) para buscar duplicaciones internas. Las estructuras secundarias fueron calculadas en el servidor de Internet "The Predict Protein server by Burkhard Rost" con la dirección: (<http://www.embl-heidelberg.de/predictprotein/predictprotein.html>); para el método SOPMA http://www.ibcp.fr/serv_pred.html; y para el método de GOR (<http://molbio.soton.ac.uk/compute/GOR.html>).

| Enzimas / Ruta | Eco | Hpy | Hin | Bsu | Mge | Mpn | Syn | Mja | Mth | Afu | Sce |
|-----------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 6.3.5.5 (s) <i>novo</i> | | | | * | | | | | | | |
| 6.3.5.5 (l) <i>novo</i> | | | | * | | | | | | | |
| 2.1.3.2 <i>novo</i> | | | | * | | | | | | | |
| 3.5.2.3 <i>novo</i> | | | | * | | | | | | | |
| 1.3.99.11 <i>novo</i> | | | | | | | | | | | |
| 1.3.3.1 <i>novo</i> | | | | * | | | | | | | |
| 2.4.2.10 <i>novo</i> y salvamento | | | | * | | | | | T | * | * |
| 4.1.1.23 <i>novo</i> | | | | * | | | | | | | |
| 2.7.4.-- interconversión | * | * | * | * | | * | * | * | * | * | * |
| 2.7.4.6 interconversión | * | * | * | * | | * | * | * | * | * | * |
| 6.3.4.2 interconversión | * | * | * | * | | * | * | * | * | * | * |
| 2.7.6.1 interconversión | * | * | * | * | | * | * | * | * | * | * |
| 1.6.4.5 interconversión | * | * | * | * | | * | * | * | * | * | * |
| 1.17.4.1 α interconversión | ** | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * |
| 1.17.4.1 β interconversión | ** | * | * | * | * | * | * | * | * | * | ** |
| 1.17.4.2 interconversión | * | | * | * | | * | * | * | * | * | * |
| 2.1.1.45 interconversión | * | | * | * | | * | * | * | * | * | * |
| 2.4.2.1 salvamento | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * |
| 2.4.2.2 salvamento | | | | * | | | | | | | |
| 2.4.2.3 salvamento | * | | * | * | | | | | | | |
| 2.4.2.4 interconversión | * | | * | * | | * | * | * | * | * | * |
| 2.4.2.9 salvamento | * | | * | * | | * | * | * | * | * | * |
| 2.7.1.21 salvamento | * | | * | * | * | * | * | * | * | * | * |
| 2.7.1.48 salvamento | * | | * | * | | * | * | * | * | * | * |
| 2.7.4.9 interconversión | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * |
| 2.7.4.14 interconversión | * | | ** | * | * | * | * | * | * | * | * |
| 3.1.3.5 interconversión | * | | * | * | | * | * | * | * | * | * |
| 3.5.4.1 interconversión | * | | * | * | | * | * | * | * | * | * |
| 3.5.4.5 interconversión | * | | * | * | * | * | * | * | * | * | * |
| 3.5.4.12 interconversión | * | | * | * | * | * | * | * | * | * | * |
| 3.5.4.13 interconversión | * | * | * | * | | * | * | ** | * | * | * |
| 3.6.1.23 interconversión | * | * | * | * | | * | * | * | * | * | * |

Tabla 1. Distribución filogenética de los genes para la biosíntesis de pirimidinas en los genomas secuenciados. El (*) significa la presencia del gen. En gris oscuro se muestran los genes compartidos por los tres dominios; en gris claro los genes que solo se comparten por dos dominios, los que se encuentran en todos los genomas analizados presentan una letra 'T'. Abreviaturas: Eco (*E. coli*); Hpy (*H. pylori*); Hin (*H. influenzae*); Bsu (*B. subtilis*); Mge (*M. genitalium*); Mpn (*M. pneumoniae*); Syn (*Synechocystis* sp.); Mja (*M. jannaschii*); Mth (*M. thermoautotrophicum*); Afu (*A. fulgidus*); Sce (*S. cerevisiae*).

| Proteínas que codifican los genes presentes en todos los genomas estudiados | | |
|---|---------------------------------|--------------------------|
| Código EC | Nombre de la proteína | Ruta en la que participa |
| 2.7.6.1 | Ribosa fosfato pirofosfosintasa | Salvamento |
| 2.7.4.9 | Timidilato cinasa | Interconversión |

Tabla 2.1 Muestra las proteínas conservadas en todos los genomas estudiados.

| Proteínas que codifican los genes presentes en los tres Dominios | | |
|--|-------------------------------------|--------------------------|
| Código EC | Nombre de la proteína | Ruta en la que participa |
| 6.3.5.5 | Carbamoi-fosfato sintasa | <i>Novo</i> |
| 2.1.3.2 | Aspartato-carbamoi transferasa | <i>Novo</i> |
| 3.5.2.3 | Dihidroorotasa | <i>Novo</i> |
| 1.3.3.1 | Dihidroorotato oxidasa | <i>Novo</i> |
| 2.4.2.10 | Orotato fosfo-ribosil-transferasa | <i>Novo</i> |
| 4.1.1.23 | Orotidina 5'-fosfato descarboxilasa | <i>Novo</i> |
| 2.7.4.6 | Nucleósido-difosfato cinasa | interconversión |
| 6.3.4.2 | CTP sintasa | interconversión |
| 1.6.4.5 | Tiorredoxin reductasa (NADP+) | interconversión |
| 1.17.4.1 | Ribonucleotido reductasa | interconversión |
| 2.1.1.45 | Timidilato sintasa | interconversión |
| 2.7.4.-- | Uridilato cinasa | interconversión |
| 2.4.2.4 | Timidina fosforilasa | interconversión |

Tabla 2.2 Muestra las proteínas conservadas en los tres dominios.

| Proteínas que codifican los genes que están presentes en Bacteria y Archaea | | |
|---|-------------------------------------|--------------------------|
| Código EC | Nombre de la proteína | Ruta en la que participa |
| 1.17.4.2 | Ribonucleotido-trifosfato reductasa | interconversión |
| 2.7.4.14 | Citidilato cinasa | interconversión |
| 3.1.3.5 | 5'-nucleotidasa | interconversión |
| 3.5.4.13 | dCTP deaminasa | interconversión |

Tabla 2.3 Muestra las proteínas conservadas en los genomas de las Bacterias y de las Archaeas.

| Proteínas que codifican los genes que están presentes en Bacteria y Eucarya | | |
|---|-----------------------|--------------------------|
| Código EC | Nombre de la proteína | Ruta en la que participa |
| 3.5.4.1 | Citosina deaminasa | interconversión |
| 3.5.4.5 | Citidina deaminasa | interconversión |

Tabla 2.4 Muestra las proteínas conservadas en los genomas de Bacterias y Eucaryas.

| Proteínas que codifican los genes que están presentes en Archaea y Eucarya | | |
|--|-----------------------|--------------------------|
| Código EC | Nombre de la proteína | Ruta en la que participa |
| 2.7.1.48 | Uridina cinasa | salvamento |
| 3.5.4.12 | dCMP deaminasa | interconversión |
| 3.6.1.23 | dUTP pirofosfatasa | interconversión |

Tabla 2.5 Muestra los genes conservados en los genomas de Archaeas y Eucarya.

| Proteínas que codifican los genes que están presentes en Bacteria | | |
|---|-----------------------------------|--------------------------|
| Código EC | Nombre de la proteína | Ruta en la que participa |
| 2.4.2.1 | Purina nucleósido fosforilasa | salvamento |
| 2.4.2.2 | Pirimidina nucleósido fosforilasa | salvamento |
| 2.4.2.3 | Uridina fosforilasa | salvamento |
| 2.7.1.21 | Timidina cinasa | salvamento |

Tabla 2.6 Muestra las proteínas conservadas en los genomas bacterianos.

La enzima uridilato cinasa (2.7.4.--) se encuentra en los tres dominios (Tabla 1), sin embargo el gen en *S. cerevisiae* es más parecido a la adenilato cinasa que a la uridilato cinasa de bacterias, por lo que probablemente se trate de una sustitución no ortóloga.

Como se puede apreciar en la Tabla 3 existe cierto nivel de redundancia de los genes para la biosíntesis de pirimidinas en los organismos con genomas secuenciados. *S. cerevisiae* presenta mayor nivel de redundancia que los organismos procariontes. Sin embargo es notable que en contra de lo que se piensa, estos presentan también un cierto número de copias de un mismo gen.

| Organismo | Nombres de los genes | Enzima |
|-------------------------------|---|--|
| Bacteria | | |
| <i>E. coli</i> | <i>nrdA, nrdB, nrdE, nrdF</i> | Ribonucleótido reductasas (EC 1.17.4.1) |
| <i>H. pylori</i> | <i>HP0266, HP0581</i> | Dihidrooratasas <i>pyrC</i> (EC 3.5.2.3) |
| <i>H. influenzae</i> | <i>upp, pyrR</i> | Uracil fosforribosiltransferasas (EC 2.4.2.9) |
| <i>B. subtilis</i> | <i>pyrDII, pyrD thyA, thyB</i> | Dihidroorotato oxidasas (EC 1.3.3.1) Timidilato sintasas (EC 2.1.1.45) |
| <i>Synechocystis sp</i> | <i>slr0406, slr1018</i> | Dihidrooratasas <i>pyrC</i> (EC 3.5.2.3) |
| Archaea | | |
| <i>M. jannaschii</i> | <i>carB1, carB2 Mj0430, Mj1102</i> | Carbamoilfosfato sintasas sub. grande (EC 6.3.5.5) dCTP deaminasas (EC 3.5.4.13) |
| <i>M. thermoautotrophicum</i> | <i>carB1, carB2</i> | Carbamoilfosfato sintasas sub grande (EC 6.3.5.5) |
| Eucarya | | |
| <i>S. cerevisiae</i> | <i>URA10, URA5 PRS1, PRS2, PRS3, PRS4 YDR353w, YHR106w RNR1, RNR2, RNR3, RNR4</i> | Orotato fosforribosiltransferasa (EC 2.4.2.10) Ribosa fosfato pirofosfocinasas (EC 2.7.6.1) Tiorredoxin reductasas (EC 1.6.4.5) Ribonucleótido reductasas (EC 1.17.4.1) |

Tabla 3. Organismos con genes redundantes del metabolismo de pirimidinas. El gen *pyrDII* de *Synechocystis sp.* probablemente sea una subunidad de la proteína del gen *pyrD*.

En la Tabla 4, se puede observar que algunos de los organismos con genomas secuenciados carecen enzimas importantes en el metabolismo de pirimidinas. Cuando es claro que ello no es debido a una adaptación a la vida parasitaria (como ocurre en *Synechocystis sp.*, *M. thermoautotrophicum* y *A. fulgidus*), es probable que estas ausencias se puedan explicar suponiendo que las funciones bioquímicas de los productos de los genes faltantes son realizadas por otras enzimas que no son homólogas a las enzimas con las cuales se realizó la búsqueda (en tal caso estos genes no serán reconocidos por las técnicas de análisis de secuencia, en donde se identifica a los genes por su similitud con una secuencia conocida); o por enzimas que tienen una función secundaria menor compensatoria.

Es importante subrayar que, conforme se avance en el conocimiento bioquímico de estos organismos estas tablas estarán sujetas a cambios.

| | |
|-------------------------------|--|
| <i>H. influenzae</i> | Carbamoil fosfato sintasa (EC 6.3.5.5.) Aspartato carbamoil transferasa (EC 2.1.3.2) Dihidroorotasa (EC 3.5.2.3) |
| <i>M. genitalium</i> | Carbamoil fosfato sintasa (EC 6.3.5.5.) Aspartato carbamoil transferasa (EC 2.1.3.2) Dihidroorotasa (EC 3.5.2.3) Dihidroorotato oxidasa (EC 1.3.3.1) Orotato fosfo-ribosil-transferasa (EC 2.4.2.10) Orotidina 5'-fosfato descarboxilasa (EC 4.1.1.23) Uridilato cinasa (EC 2.7.4.--) Nucleósido difosfato cinasa (EC 2.7.4.6) CTP sintasa (EC6.3.4.2) |
| <i>M. pneumoniae</i> | Carbamoil fosfato sintasa (EC 6.3.5.5.) Aspartato carbamoil transferasa (EC 2.1.3.2) Dihidroorotasa (EC 3.5.2.3) Dihidroorotato oxidasa (EC 1.3.3.1) Orotato fosfo-ribosil-transferasa (EC 2.4.2.10) Orotidina 5'-fosfato descarboxilasa (EC 4.1.1.23) Nucleósido difosfato cinasa (EC 2.7.4.6) CTP sintasa (EC6.3.4.2) |
| <i>Synechocystis sp.</i> | Tiorredoxin reductasa (EC 1.6.4.5) |
| <i>M. thermoautotrophicum</i> | Orotato fosfo-ribosil-transferasa (EC 2.4.2.10) Nucleósido difosfato cinasa (EC 2.7.4.6) |
| <i>A. fulgidus</i> | Orotidina 5'-fosfato descarboxilasa (EC 4.1.1.23) Ribonucleótido reductasa subunidad β (EC 1.17.4.1) |

Tabla 4. Enzimas faltantes de la biosíntesis de pirimidinas en distintos organismos.

3.2 Implicaciones para las habilidades metabólicas del LCA a partir de la distribución de genes de pirimidinas en los tres dominios celulares.

El estudio de la biología de la distribución filogenética de los genes de la biosíntesis de pirimidinas en los tres dominios celulares (Archaea, Bacteria y Eucarya) nos permite hacer inferencias sobre la naturaleza del cenancestro. Como se muestra en la Tabla 1, casi toda la ruta de biosíntesis hasta la formación de CTP de se encuentra muy bien conservada en los tres dominios, lo que sugiere que estaba ya presente en el LCA. Además, se encuentran conservadas un grupo de enzimas que permiten proponer que el cenancestro tenía la capacidad de sintetizar dTTP, lo que implica que era un organismo perteneciente al mundo del DNA (Figura4).

Es muy probable que la capacidad de formar desoxirribonucleótidos a partir de ribonucleótidos haya formado parte de las habilidades metabólicas de LCA, ya que: a) la subunidad grande de la ribonucleótido reductasa (EC 1.17.4.1) se encuentra presente en los tres dominios celulares (*Archaeoglobus fulgidus* AF1664, *Escherichia coli* b2234, *Saccharomyces cerevisiae* YER070w) ; b) el análisis de secuencia y la caracterización bioquímica de la ribonucleótido reductasa del arqueon *Pyrococcus furiosus* ha mostrado que esta enzima comparte similitudes considerables con sus contrapartes eubacterianas y eucariontes (Riera *et al*, 1997), y c) es probable que el centro catalítico de todas las ribonucleótido reductasas sea homólogo (Tauer *et al* 1997). La distribución filogenética de los genes para la biosíntesis de pirimidinas nos da una imagen de LCA que es capaz de metabolizar *vía novo* nucleótidos hasta CTP (Figura 3a), catalizar la formación de ribonucleótidos en desoxirribonucleótidos, sintetizar dTTP, reciclar al uracilo para formar UMP, y catalizar la formación de timidina a partir de timina (Figura 4).

3.3 El orden de los genes de biosíntesis de pirimidinas en los genomas secuenciados.

Orden de genes a lo largo del genoma.

Así como se puede sugerir la estructura de las rutas metabólicas del cenancestro observando la distribución de los genes en los seres vivos y haciendo una lista de los genes que se encuentran en los tres dominios, en principio, es posible sugerir la existencia de otros rasgos en el cenancestro a partir de observar su distribución filogenética.

Con el fin de intentar reconstruir la posición de los genes de biosíntesis de pirimidinas en el genoma del último ancestro común de los tres dominios, se estudió la distribución espacial de los genes del metabolismo de pirimidinas en los distintos genomas secuenciados, estos son los genomas de los organismos: *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*, *Haemophilus influenzae*, *Bacillus subtilis*, *Mycoplasma genitalium*, *M. pneumoniae*, *Synechocystis sp.* *Methanococcus jannaschii*, *Methanobacterium thermoautotrophicum*, y *Saccharomyces cerevisiae*. Sin embargo, no fue posible hacer una reconstrucción del estado ancestral de la organización debido a las grandes diferencias que existen en la distribución de los genes en los distintos organismos, es bien sabido que los operones no se encuentran en eucariontes (ver apéndice Fig. 24-34).

Los genes del metabolismo de pirimidinas se encuentran organizados de formas muy distintas en los diferentes genomas analizados aquí. Por ejemplo: en *B. subtilis* existe un operon que consiste de varios genes de la biosíntesis *de novo* de pirimidinas (Fig. 32) organización que no se repite en ninguno de los otros genomas. Solamente en *M. genitalium* como en *M. pneumoniae* las secuencias comparten prácticamente el mismo acomodo de los genes a lo largo del genoma (Fig. 35), lo que se puede explicar debido a la cercanía filogenética entre las dos especies Sin embargo, para *B. subtilis* que es su pariente, más cercano de entre los organismos estudiados aquí, el orden de las secuencias no se encuentra

conservado con respecto a los micoplasmas. El caso extremo al de *B. subtilis* se presenta en *Synechocystis* sp. ya que los genes se encuentran totalmente dispersos en el genoma (Fig. 36).

Operones de pirimidinas conservados en los tres dominios.

Siguiendo la misma lógica, es posible inferir la existencia de operones del metabolismo de pirimidinas (o al menos de genes contiguos) que estuvieran presentes en el cenancestro, a partir de su distribución actual en los tres dominios. En este análisis se incluyó también al Arquea *Arqueoglobus fulgidus*.

Al estudiar el orden de los marcos de lectura que se encuentran alrededor de los genes de pirimidinas, se encontró que, el orden de los genes ha sufrido grandes re-acomodos a lo largo de su evolución, y que solamente el orden de los genes *carA* y *carB* se encuentra conservado tanto en Archaea, Bacteria y Eucarya. Aunque no se puede descartar la idea de que estas estructuras también se hayan formado debido a una convergencia evolutiva o que se encuentren en distintos microorganismos debido al transporte horizontal.

Los genes *carA* y *carB* (carbamoil fosfato sintasa).

La evolución de la carbamoil fosfato sintasa ya ha sido estudiada (van den Hoff *et al.* 1995). En los microorganismos estudiados, los genes *carA* y *carB* se encuentran contiguos, con excepción de *Synechocystis* sp., *M. jannaschii* y *H. pylori*. En *S. cerevisiae* está fusionada a un gen no funcional de dihidroorotasa y a un gen funcional de aspartato-transcarbamoilasa (Fig. 5).

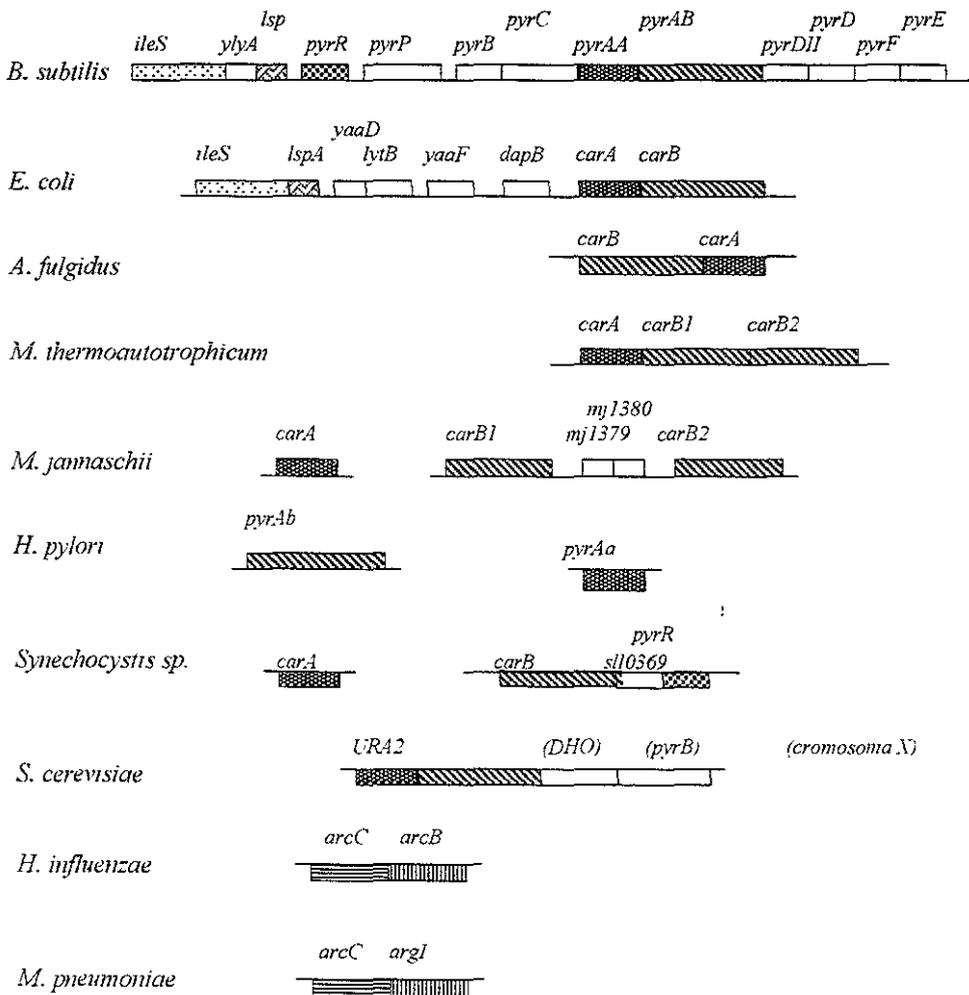
Carbamoil-fosfato sintasa (*carA*, *carB*).

Figura 5. Muestra los genes *carA*, *carB* y los genes contiguos que cuando estan conservados en las distintas especies estudiadas aquí. *ileS* (isoleucil-tRNA sintetasa), *ylyA* (desconocida), *lsp* y *lspA* (señal peptidasa II), *ylyB* (hipotética), *pyrR* (proteina reguladora), *pyrP* (uracil permeasa), *pyrB* (aspartato carbamoil transferasa), *pyrC* (dihidroorotasa) *pyrDII* y *pyrD* (dihidroorotato deshidrogenasa), *pyrF* (OMP descarboxilasa) *pyrE* (Orotato PRtasa), *yaaD* (hipotética) *lytB*(función regulatoria) *yaaF* (hipotética), *dapB* (dihidropicolinato reductasa), *my1379* y *my1380* (hipotéticas), *sl10369* (hipotética), *arcC* (carbamoil cinasa), *arcB* y *arcI* (ornitina carbamoil transferasa) *URA2* (proteina multifuncional de pirimidinas) *DHO* (dihidroorotasa no funcional en *S. cerevisiae*).

Tanto en *H. influenzae* como en *M. pneumoniae* carecen de los genes *carA* y *carB*. Sin embargo, *H. influenzae* posee los genes *arcC* (carbamato cinasa) *arcB* (ornitina carbamoil transferasa, involucrada al metabolismo de la arginina) y *M. pneumoniae* tiene los genes *arcC* y *argI* (ornitina carbamoil transferasa). Los dos genes se encuentran contiguos en ambos organismos (Fig. 5). El gen *arcC* sintetiza carbamoil fosfato por lo que, al parecer, es una redundancia funcional. El gen *argI* de *H. influenzae* tiene un 25.9% de identidad con el gen *pyrB* (aspartato carbamoil transferasa, la segunda enzima en la biosíntesis de pirimidinas *de novo*) de *H. pylori* por lo que probablemente sean homólogas.

Micoplasmas.

Un caso especial fue el orden de los genes en las dos especies de micoplasmas estudiadas aquí ya que éste se encuentra extremadamente conservado, a tal grado que prácticamente en todos los casos estudiados, los marcos de lectura que se encuentran alrededor de los genes de pirimidinas representan los mismos genes en ambas especies; situación que probablemente no sea cierta para todos los demás genes en estos organismos (Fig. 35).

3.4 Evolución temprana del metabolismo de pirimidinas

La identidad encontrada entre las secuencias aminoacídicas de las proteínas que participan en la biosíntesis de las pirimidinas, sugieren que éstas forman varios grupos monofiléticos. A continuación se describen las estructuras de estos conjuntos.

3.4.1 Fosfo-ribosil-transferasa de pirimidinas y ribosa-fosfato pirofosfocinasa.

Las fosforribosil-transferasas que participan en el metabolismo de pirimidinas son enzimas que participan en la ruta de salvamento de nucleótidos de pirimidina. La reacción que catalizan tanto la uracil fosforribosil-transferasa (EC 2.4.2.9) como la orotato fosforribosil-transferasa (EC 2.4.2.10) es la siguiente:



La ribosa-fosfato pirofosfocinasa (EC 2.7.6.1) actúa en la síntesis del 5'-fosfo- α -D ribosil-1-pirofosfato, el cual es utilizado tanto por las fosforribosil-transferasas de purinas como de pirimidinas para salvar las bases libres por medio de la reacción anterior. La actividad catalítica se puede resumir en la ecuación siguiente:



La distribución filogenética de estas tres enzimas incluyen organismos de los tres dominios celulares (Archaea, Bacteria y Eucarya) lo que sugiere que ya estaban presentes en el último ancestro común de todos los seres vivos (Tabla 1).

La enzima ribosa-fosfato pirofosfocinasa parece ser imprescindible para el metabolismo de los seres vivos, ya que se encuentra en todos los genomas completos analizados. Es además una enzima antigua y altamente conservada (Tekaia, Dejon y Lazcano, en prep.). En cambio la orotato fosforribosiltransferasa

no se encuentra ni en *M. genitalium*, *M. pneumoniae* tal vez debido a su adaptación a la vida como parásitos. Sin embargo esta enzima si se encuentra en *H. influenzae*, que también es un parásito intracelular. En *M. thermoautotrophicum* solo se han encontrado firmas de fosfo-ribosil-transferasas de purinas y pirimidinas.

En la alineación se puede observar una zona conservada cercana al sitio de unión al fosfo-ribosil-pirofosfato. La estructura secundaria también refleja este sitio conservado mostrando una estructura tipo hélice (Figuras 6, 40 y 41).

El probable origen común de las fosfo-ribosil-transferasas de purinas y las nucleósido fosforilasas de purinas (Becerra *et al*, 1997b) sugiere que estas enzimas (fosfo-ribosil-transferasas de pirimidinas y pirofosfocinasas) forman parte de un grupo más grande de enzimas homólogas.

```

-----MKFFGDKMIVSGSQSCHLAFVAVG
b1207 -----MPDMKLVAGNATFELASGNT
YBL068W MVIDLEHVVDYIMVPSQIQVQVASTAWVSESREDMAINSIKLLAGNSH
MJ1109 -----
b3642 -----
b2498 -----
YHR128W -----

MJ1366 -----KILTRVEVYKRPFDNEIVYIVDEINDDAVVINTQKNQ--N-EVIVETHLVDAIPQK
b1207 -----KYTSLGDAVYGRFSDGVEVSVQINENVRGGDFIITQSTCAP--INDMELVAVVDALR
YBL068W -----KGIPLSKVGVYQVSNKETSVTTEGESLRDEDVVIQTGTIGEQAIDREFAKLLIILH
MJ1109 -----
b3642 -----
b2498 -----
YHR128W -----MNA
-----MNPFFFLASPELYLYTYVYYPNKG-----FVSK

MJ1366 -----VVKKITVVPYLYAYRQKFN-PGEA-----NI-VDKLFTIN-----EFTI
b1207 -----AGRITAVLPYFGYARQDRVRSARVPTAVVADL-----GVDRVIVDLHAGVGGFFD
YBL068W -----ARKITVYVFNFPYAKKDK-SRAPV-----AGADHVITMDLHAGVGGFFH
MJ1109 -----MDK-----VHILKVGCCIRFGEFTLASGKKSNIYIDIKKATF
b3642 -----MFA-----VTEALVGLKGFETLKSGRKS-PYFFNAGLFN
b2498 -----KSKMKIVEVKHPT-----EMREQDISP-----TADLETE
YHR128W -----QVSEVDFKVVYLLPQTHL-----VIRNKNTREB-----HPLVQ

MJ1366 -----IPFIYGDVAVKIAEYVK-----NDPIVLPADKGL-----NAEYDYLEKT
b1207 -----VPVDNVFGSPVILDDWAL-----NLDNPIVSPDIGV-----DTDMAIIBKR
YBL068W -----IPVDNLYAEPVYVIRKAVYDFDNAILVSPDAGK-----DLNEALIKKE
MJ1109 -----NPEKLVGEEIINEIKD-----EDVYVAGVELGSVPLAVSIIA-----QKPLLIVRK
b3642 -----T-----GIEFDLLFGPAYK-----HDDLDPYCFNR
b2498 -----KVTIEGWNGPVEIDQIKG-----KKITVYVILRAGLQVYVLEVP-----SARISVVGMY
YHR128W -----KQIVETDTNENFEGVFMG-----KICGVSIYRAGE-----SVRICKLLO

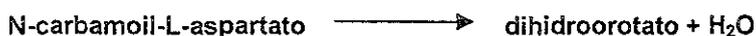
MJ1366 -----RLSPT-----APKTLDAKDRVFIVDIIIST-----GOGAKKIIAACVHPV
b1207 -----RPRANVSCV-----MHIIGDVAGRDCVLWDDMIDTGG-----GAKRVEAYATHPI
YBL068W -----RQKANEVSK-----MVLVGDVINKSCLWDDMADTCG-----GAKEVIAIVTHGI
MJ1109 -----KPKDYGTKN-----KIEGELKEGDKYVIVEDVTT-----NGGIVDKVFWVDR
b3642 -----KKAADHGEG-----GNLVGSALQCHVMLVDVYTAGT-----GATLACVLSIDR
b2498 -----RNEETLE-----KESKSHIDERMATINDPLATG-----GCCSSIKVLVAVAA
YHR128W -----RDEETALP-----KELPEDI SERVYFLDPMLATG-----RGGVVKPERYFLNLI

```

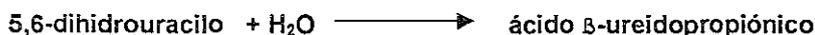
Figura 6. Alineación de las secuencias de ribosa-fosfato pirofosfoquinas provenientes de los organismos: *M. jannaschii* (MJ1366), *E. coli* (b1207), *S. cerevisiae* (YBL068W), con orotato fosforibosiltransferasa de *M. jannaschii* (MJ1109), *E. coli* (b3642), y con uracil fosforibosiltransferasa de *E. coli* (b2498) y *S. cerevisiae* (YHR128W). Los asteriscos (*) indican la presencia de aminoácidos idénticos, un punto (.) aminoácidos similares. En casillas se muestran los sitios de unión al fosforribosil-pirofosfato. En gris claro se muestra la estructura secundaria de lámina beta y en gris oscuro las hélices alfa evaluados con el método de Rost and Sanders (1993).

3.4.2 Dihidroorotasa y dihidropirimidinasas.

La dihidroorotasa (EC 3.5.2.3) es la enzima que cataliza la ciclización del carbamoilaspartato por medio de una deshidratación, produciendo dihidroorotato, la forma reducida del orotato (Kornberg y Baker1992). Esta reacción se puede resumir de la siguiente manera:



Las dihidrooratasas de *M. jannaschii* y *M. thermoautotrophicum* son homólogas a las dihidropirimidinasas (EC 3.5.2.2) que también son conocidas con el nombre de hidantoniasas. No ocurre así con las dihidrooratasas de bacterias y eucariontes. Esta enzima cataliza una de las reacciones de degradación de pirimidinas que en cierta forma es contraria a la reacción catalizada por la enzima dihidroorotasa, ya que ésta abre el anillo del uracilo



En la alineación (Fig. 7) se puede observar el sitio de unión a Zn que se encuentra conservado en las enzimas.

Las dihidrooratasas junto con las AMP- y citosina desaminasas, alantoniasas, hidantoniasas, e imidazolonepropionasas, pertenecen a la superfamilia de las ureasas (Holm *et al*, 1996 en Becerra y Lazcano 1997b). Ello sugiere que en la antigüedad existía una enzima poco específica involucrada en reacciones con compuestos heterocíclicos (Becerra y Lazcano 1997b).


```

HUMAN          DDFTKIPNGVNGVEDRMSVIWEKGVHSGKMDENRFVAVTSTNAAKIFNLYPRKGRIAVGS
JC2310        GDFTKIPNGGPIIEDRVSIILFSEGKGRITLNQFVDIVSTRIAKLFGLPFKGRTIIVGA
PPDHD         RRLQSHFPQQAPPASK--TAWRCCGMPVSTAGDCRCMSSLR-----
MTH1127       --IWDAPPPIPNLEV-VLKLLLLTVSKGRMSLSTIRRLAEEPARI FGLR-SKGRI AEGM
MJ1490        --VKNCPSGIPGIET-IVPLTLNLVVKGLISLFDATIRVLSKVPKIFNIN---NKIEEGN
                *

HUMAN          DADIVIWDPKGRTRTISAKTHHQAVNFENIFEGMVCHGVPLVTISRGKVVEAGVFSVTAGD
JC2310        DADLVI PDPTVERVISAEETHHMAVDYNPFEGMKVTGEPVSVLCRGEFVVVRDKQFVKGPGY
PPDHD         -----
MTH1127       DADFTVIDLKETGRIRSDDEFYSKAHYTPFEGFSYTGGPVMTIVRGRAVMRDG--EVLEGN
MJ1490        LANLTIIDLKKEGKINAELEFKSKAKFSPFDGWEVKGFPITYTVINGTLYEAYGCKC-----

HUMAN          GKFI PRKPF AEYIYKRIKQRDRCTCTPTPVERAPYKGEVATLKS RVTKEDATAGTRKQ AHP
JC2310        GQYVVKRAKYGALMADQDVVKMS-----
PPDHD         -----
MTH1127       GRYI PAEHDGKHGSA-----
MJ1490        -----

```

Figura 7. Alineación de las secuencias de dihidropirimidinasas provenientes de los organismos: *Homo sapiens* (Human), *Pseudomonas putida* (PPDHD), *Bacillus stearothermophilus* (JC2310), con las secuencias de dihidrooratasas de los organismos: *M. thermoautotrophicum* (MTH1127), *M. jannaschii* (MJ1490). Los asteriscos (*) indican la presencia de aminoácidos idénticos, un punto (·) aminoácidos similares

3.4.3 CTP sintasa y carbamoil-fosfato sintasa.

La enzima CTP sintasa (EC 6.3.4.2) cataliza la formación de CTP, a partir de:



En esta reacción el NH_3 puede reemplazar a la glutamina. La enzima carbamoil-fosfato sintasa (EC 6.3.5.5) cataliza la formación de carbamoil-fosfato, con lo cual el metabolismo de pirimidinas se conecta con el metabolismo de arginina. La reacción que cataliza esta enzima es la siguiente:



En la alineación (Fig. 8) se puede ver conservado el sitio activo glutamino-amino-transferasa (GAT). La enzima carbamoil-fosfato está compuesta de dos subunidades, una subunidad pequeña la cual es responsable de la hidrólisis de la glutamina, y otra subunidad grande que es responsable de la síntesis ATP-dependiente de carbamoilfosfato a partir de NH_3 y bicarbonato.

El mecanismo enzimático para la síntesis de carbamoilfosfato a partir de NH_3 , bicarbonato y ATP involucra la activación del bicarbonato a través de la formación del carboxifosfato, el cual sufre de un ataque nucleofílico por NH_3 para formar carbamato. El carbamato es fosforilado por un segundo ATP para dar el producto final que es carbamoilfosfato (Raushel *et al*, 1978). Los dos subdominios "cinasas" de esta enzima se originaron a partir de una duplicación génica antes de la diversificación de los tres dominios celulares (Hoff *et al*, 1995). Ambas enzimas pertenecen a una gran familia de glutaminamidotransferasas tipo-G. La homología de estas enzimas junto con otras glutaminamidotransferasas tipo-G involucradas en la formación de GMP, triptófano y otras moléculas, junto con el gen *hisH*, esta bien establecida (Zalkin 1985). Ello sugiere que duplicaciones parálogas antiguas jugaron un papel importante en dar forma al metabolismo de pirimidinas.

```

PYRG_ECOLI      --TNYIFVTGGVSSLGKGLAAASLAAILEARGLNVTIMKLDPIYNVDPGTMSPIQHGE
MJ1174         VKIMKFI FITGGVSSLGKGI TAASLGRLLKARGFKVNMIKIDPQLIDAGTMSPYEHGE
PYRG_HUMAN     ---MKYILVTGGVISGIGKGI IASSVGTILKSCGLHVTSIKIDPYNINIDAGTFSPEYHGE
CARA_ECOLI     -----MKSA
MJ1019        -----DKYMEA
CARA_YEAST     -----MSSAATKA

PYRG_ECOLI      VFTVEDGAET-DL DLGHYERFIRT KMSRRNNFTTGRIYSDVLRKERRGDYLGAT--VQVI
MJ1174         VVFTEDGGES-DL DLGHYERFIDENLTKNNNITTKIYWSVLTKERKGBYLKGT--VQVI
PYRG_HUMAN     VFLVDDGGEV-DL DLGNAYERFLDIRLTKDNNLTGKIYQYVINKERKGDYLGKT--VQVV
CARA_ECOLI     LLVLEDGTQFHGRAIGATGS AVGEVVF--NTSMTG--YQEILTDP-S--Y-SR----QIV
MJ1019        VLILEDGTILKKGKFGABKEVFGELVF--TTVMTG--YVEVLTDP-S--Y-KG----QIV
CARA_YEAST     TFCIQNGPSFEGISFGANKSVAGETVF--TTSLVG--YVESMTDP-----SYRGQIL--
                *           *           .   .   *   *   .

PYRG_ECOLI      PHITNAIKERVLE-----GGEGHDVVLVEIGGTGVDIESLPFLEAIRQMAVEIGREH
MJ1174         PHITNEIKDWIKN-----LGEGYDITIVEIGGTGVDIESLPFLEAIRQPKKDVGKEN
PYRG_HUMAN     PHITDAIQEWVMRQALIPVDEDCLEPQVCVIEELGGTVGDI ESMPFIEAFRQFQFKVKREN
CARA_ECOLI     -----TLT-YPHIGNVGTNDAD--EESS-----QVHAQG
MJ1019        -----MMT-YPLEGNYGVKKDW--FESD-----GIRKAG
CARA_YEAST     -----VFTQPLIGNYGVPSGEARDEYNLLKLYFESPHIH
                .           *           *           *

PYRG_ECOLI      TLFMHLTLVPYMAASGEVTKPTQHSVKELLSIGIQPDILICRSDRAVPANERAKIALFC
MJ1174         VLYIHVSLLPYIRAAGELKTKPTQHSVKELRSIGIQPDILICRTEMPISDKIREKLALFC
PYRG_HUMAN     FCNIHVSLVPQPSSTGEQKTKPTQNSVRELRLGLSPDLVVCRCNSPLDTSVKEKISMFC
CARA_ECOLI     LVIRDPLI----ASNFRNTEDLSSYLKRHNIVAI A-DIDTRKLTRLLRE---KGAQNGC
MJ1019        FVVREV-----TSKALDDFLKEYDIPGIQ-DIDTRFLTRKIRD---KGVVKSC
CARA_YEAST     VVGIVVAEYAY-QYSHWTAVESLAQWCQREGVAAIT-VGDTRELTVQVLE---QGSSLGR

PYRG_ECOLI      NVPEKAVISLKDVDSIYKIPGLLKSQGLDDYICKRFSLNC-PEAN--LSEWEQVIFEEAN
MJ1174         DVDKEAVIEARDARTIYEVPLNLEKEGLGKLVTKKLNLPD-REFD--LDEWRKFVDRVIN
PYRG_HUMAN     HVEPEQVICVHDVSSIYRVPLLEEQGVVDYFLRRLDLPIERQPKMLMKWKEMADRYDR
CARA_ECOLI     ILAGDNP----DAALALEKARAFPGLNGLMDLAKEVTTAEA-----Y-SWTQGSWLLTG
MJ1019        LKVAEEISDD-EISELLERVKRYSDISDIDLVLVSTKE-----
CARA_YEAST     ITLADHD---PVPYVNMKMTNLVAQVTTKKPFHVSALPG-----

```

Figura 8. Alineación de las secuencias de CTP sintasas provenientes de los organismos: *E. coli* (PYRG_ECOLI), *M. jannaschii* (MJ1174), *Homo sapiens* (PYRG_HUMAN) con carbamoil-fosfato sintasas (subunidad pequeña) de *E. coli* (CARA_ECOLI), *M. jannaschii* (MJ1019) y *S. cerevisiae* (CARA_YEAST). Los asteriscos (*) indican la presencia de aminoácidos idénticos, un punto (.) aminoácidos similares.

3.4.4 Nucleosido-fosfato cinasa, dTMP cinasa, nucleosido-trifosfato-adenilato cinasa y citidilato cinasa.

Estas enzimas son transferasas (EC 2.7.4.-) que participan en la ruta de interconversión de pirimidinas transformando los nucleósidos monofosfatos en nucleósidos difosfatos. Exceptuando el caso de la nucleosido-trifosfato-adenilato cinasa (2.7.4.10), en donde el GTP es el donador y el AMP el aceptor del fosfato, la reacción general de estas enzimas es la siguiente:



Existe cierta confusión en la literatura científica, ya que según Kornberg y Baker (1992) las nucleosido monofosfato cinasas son altamente específicas para el sustrato, con dos excepciones conocidas: la citidilato cinasa, que también actúa en UMP, y la dTMP cinasa, que también actúa sobre dUMP pero es específica la forma para desoxi. Por otra parte, en el banco de enzimas EC la enzima nucleosido-fosfato cinasa está como inespecífica para una amplia variedad de nucleósidos monofosfatos.

Como se ha demostrado en este trabajo, el sitio conservado en estas enzimas (Fig. 9) es un sitio de unión a nucleótido (ATP o GTP) conocido como Walker A (Michaelis 1995), este sitio está bien conservado en la superfamilia de las "ATP-binding cassette (ABC)" (Decottignies y Goffeau 1997).

El hecho de que exista una nucleosido-difosfato cinasa poco específica, sugiere que anteriormente pudo haber también una nucleosido-monofosfato cinasa muy inespecífica que por un proceso de duplicación y especialización dio origen a las nucleosido-monofosfato cinasas actuales. Esta especialización pudo resultar de una presión de selección a fin de tener una regulación más estricta en la biosíntesis de nucleósidos difosfato. Tanto la dTMP cinasa como la citidilato cinasa se encuentran en los tres dominios, por lo que su presencia en el último ancestro común universal es probable. Ello sugiere también la presencia de un genoma de DNA en el cenestro

```

SMNPK      MTDQKLAKAKVI FVLGGPSSGKGTQCEKLVQK-----TFHNHLS--SGDLLRAEV
KTHY_METJA ----MVDNMFIVFEGIDGSGKTTQSKLLAKKMDAF-----WTYEPSNSLVGKIIREIL
HI0456     -----MKGKFIIVHGLEGAGKSSAHQS VVRVLHELGIQDVVFTREPGGTPLAEKLRHLI
AK3        ---MASKLLRAVILGPPGSGKGTVCQRI AQN-----FGLQHLS--SGHFLRENI
KAD3_RAT   ---GASGRLLRAVIMCAPGSGKGTSSSRITKH-----FELKHLN--SGDLLRQNM
MJ0656     -----MIITIGGLPGTGTTLAKMIAEK-----YNLRHVC--AGFIIFREMA
b0910      ---MTAIPAVITIDGPGSAGKGLCKAMAEA-----IQWHLLD--SGAIVRVLA
           * * * * *
SMNPK      QSGSP---KGKELKAMMERGELVPLE--VVLALLKEAMIN----WTK-----
KTHY_METJA SGKTE---VDNKTLLALLFAADRI---EHTKLIKEELKK-----RD-----
HI0456     KHETE---EPVTDKAEALLMLYARIQ--LVENVIKPALMQG-----LD-----
AK3        KASTE---VGEAMAKQYIEKSLVDPDH--VITRLMMSELENRRGQHWLLDGFPRTLGQAEAL
KAD3_RAT   LQGT E---I AVLAKSFIDQGLIPDD--DMTRLALHELKMLTQCSWLLDGFPRTLGQAEAL
MJ0656     KEMGM---DLQEFQSYAEQHK EI--DE--EIDRRQVEIAKQ-----
b0910      LAALHHHV DVA SEDALVPLASHLDVRFVSTNGNLEVI LEG-----ED---VSGEIRTQE

SMNPK      -----IVISLSIRYPRELDQGIKFEKEVCP--CL--CVINFDVS----EEMVRKRLKRAE
KTHY_METJA ----VVCDRYLYSSIAAYQ--SVAGVDENFI--KSINRYALK---PDIVFLLIVDIET
HI0456     -----KWVVGDRHDMSSQAYQGGGRQLDPHF M--LTLKETVLGNFEPDLTIYLDIDPSV
AK3        DKICEVDLVISLNI PPFETLKDRLSRRWIHPPSG--RVYNLDFNP--PHVHGIDDVTGEP
KAD3_RAT   DRVYQIDTVINLNVPEFVIKLRRLTARWIHPASG--RVYNI EFPN--PKTVGIDDLTGEP
MJ0656     -----GNVVLEGRLAAWMLLKNGIKP-----DLTIWFKA--PLEVRAERI SKRE
b0910      VANAA SQVAAPFRVREALLRQRAFRELPLGLIADGRDMGTVVFP--DAPVKIFLDASSEER

SMNPK      TSNRV--DDNEE---TIVKRF--RTFNE----LTKPVI EHYKQQ-----NKVITIDASGT
KTHY_METJA ALKR---VTK-----DIFEKK--DFLKK-----VQDKYLELAEEY-----NFIVIDTTKKS
HI0456     GLARARGR GEL---DRIEQMDLDFPHR----TRARYLELVKDN-----PKAVVINA EQS
AK3        LVQQE--DDKPE---AVAARL--RQYK----VAKPVI ELYKSRGVLHQFSGTETNKIWPY
KAD3_RAT   LIQRE--DDKPE---TVIKRL--KAYEA----QTEPVLQYYQKRGVLETFSGTETNKIRPH
MJ0656     NIDK--DVALK---KMIERE--ASEKK----RYKETYNIDLDD--LSIYDLVIDT SKWD-
b0910      AHRMLQLQEKGFVNFERLLAEIKERDDRDRNRVAVAPLVPA A-----DALVLDSTTLS

SMNPK      VDAIFDKVNHELQKFGVK----
KTHY_METJA VEEVHNEIIGYLNIPH-----
HI0456     IELVQADIESAVKNWWSNEK-
AK3        VYTLFSNKITPIQSKEA----Y
KAD3_RAT   VYSFLQMKVPETIQKASVTP--
MJ0656     VEGVFNIVSSAIDNLKK-----
b0910      IEQVIEKALQYARQKLALA---

```

Figura 9. Alineación de las secuencias de nucleosido-fosfato cinasas provenientes del organismo: *Schistosoma mansoni* con dTMP cinasas proveniente de *M. jannaschii* (KTHY_METJA), *H. influenzae* (HI0456), con la nucleosido-trifosfato-adenilato cinasa de *H. sapiens* (AK3), *Ratus norvegicus* (KAD3_RAT), y con citidilato cinasa de *M. jannaschii* (MJ0656) y *E. coli* (b0910). En una caja se muestra el sitio de unión a ATP o GTP.

Como se puede observar en la Tabla 5, varios de los sitios de homología entre las secuencias resultaron ser sitios de unión al sustrato.

| Grupos de enzimas homólogas | Sitio conservado |
|---|-------------------------------|
| Ribosa fosfato pirofosfocinasa (EC 2.7.6.1) Uracil fosfo-ribosil-transferasa (EC 2.4.2.9) Orotato fosforribosiltransferasa (EC 2.4.2.10) | sitio de unión a PRPP |
| CTP sintasa (EC 6.3.4.2) Carbamoil-fosfato sintasa (cadena glutaminica) (EC 6.3.5.5) | sitio de unión GAT |
| Nucleósido-fosfato cinasa (EC 2.7.4.4) dTMP cinasa (EC 2.7.4.9) Nucleósido-trifosfato-adenilato cinasa (EC 2.7.4.10) Citidilato cinasa (EC 2.7.4.14) | sitio de unión a ATP o GTP |
| Dihidroratasa (EC 3.5.2.3) Dihidropirimidinasa (EC 3.5.2.2) | sitio de unión a Zinc |

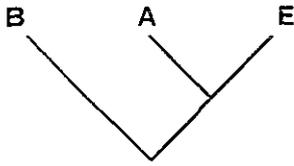
Tabla 5. Sitios de unión al sustrato conservados entre los grupos monofiléticos de enzimas de la biosíntesis de pirimidinas.

3.5 Filogenias de las enzimas de la biosíntesis de pirimidinas pertenecientes a los tres dominios.

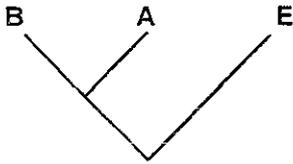
Se realizó un análisis filogenético de las enzimas para la biosíntesis de pirimidinas que se encuentran en los tres dominios, y que por lo tanto probablemente estaban presentes en el LCA. Distintos grupos de proteínas ortólogos forman distintos árboles evolutivos (fig 10).

Los árboles filogenéticos generados con este método son solamente aproximaciones gruesas de las relaciones evolutivas entre los genes. Análisis filogenéticos, más completos y precisos, requieren de un mayor número de replicas *bootstrap* y el uso comparativo de una variedad de diferentes métodos tales como máxima parsimonia y máxima verosimilitud. Ello será objeto de un trabajo posterior.

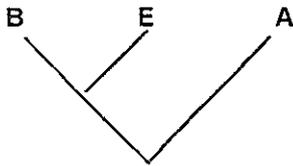
Como se puede observar en los valores de *bootstrap*, (ver apéndice), algunos de los árboles filogenéticos no son muy robustos. Además, en algunos de los casos las filogenias no son totalmente claras, como en el gen de *E. coli* de timidina fosforilasa, (Fig. 16), el cual no se ubica dentro de ningún grupo, lo mismo para la proteína timidilato cinasa (slr0379) de *Synechocystis* sp. (Fig. 17) y para la aspartato carbamoil-transferasa (pyrB_ARATH) de *Arabidopsis thaliana* (Fig. 20). Es posible que estos resultados sean debidos tal vez a una rápida tasa de divergencia. Así mismo, en el árbol generado por la CTP sintasa *H. pylori* aparece junto con las Archaeas tal vez debido a un fenómeno de transporte horizontal. Sin embargo el valor de *bootstrap* no es muy alto, por lo que es una filogenia poco robusta.



Orotidina 5'-fosfato descarboxilasa
 CTP sintasa
 Ribosa fosfato pirofosfocinasa
 Carbamoil-fosfato sintasa (sub. pequeña)



Carbamoil-fosfato sintasa (sub. grande)
 Nucleosido-difosfato cinasa
 Timidina fosforilasa
 Timidilato cinasa
 Ribonucleótido reductasa (sub. grande)



Aspartato carbamoiltransferasa (sub. cat.)

Distribución filogenética

no clara

Timidilato sintasa
 Dihidroratasa
 Dihidrorotato oxidasa
 Orotato fosforibosiltransferasa

Fig. 10. Las filogenias hechas a partir de distintos genes ortólogos del metabolismo de pirimidinas sugieren distintas relaciones para las relaciones evolutivas entre los tres dominios. **B** : Bacteria, **A** : Archaea, **E** : Eucarya.

Filogenias de enzimas que tienden a agrupar a Archea y Eucarya.

En esta figura filogenética así como en la otras, el tipo de letra indica al dominio al que el organismo pertenece. Negritas (Eucarya), mayúsculas (Archaea), sencilla (Bacteria). Los números muestran el porcentaje de ocurrencia de los nodos en 100 replicaciones bootstrap. Los organismos fueron seleccionados al azar.

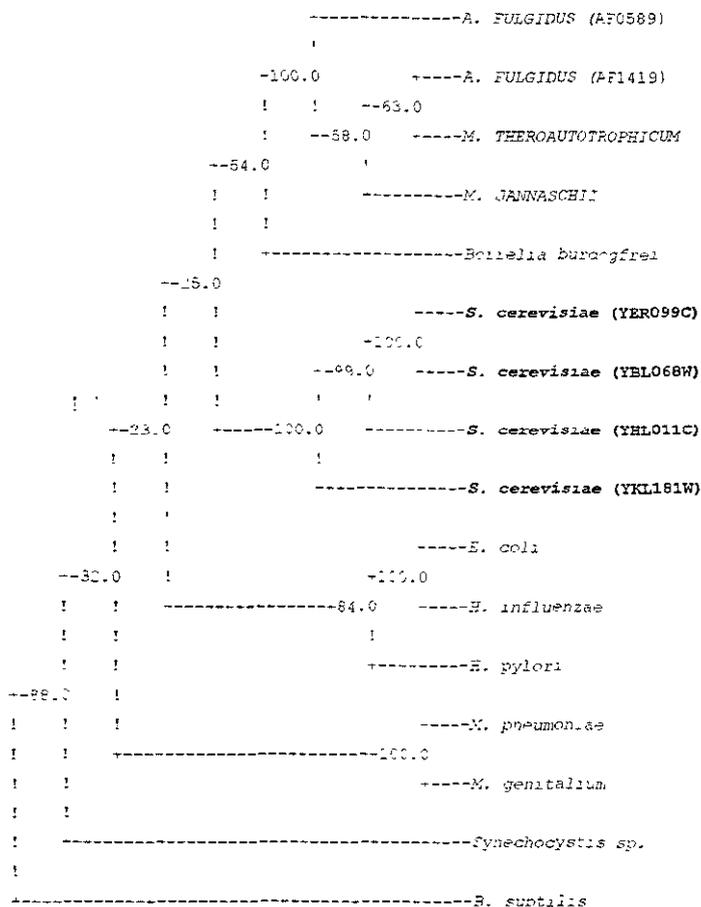


Figura 11. Filogenia de la ribosa fosfato pirofosfocinasa (*prs*).

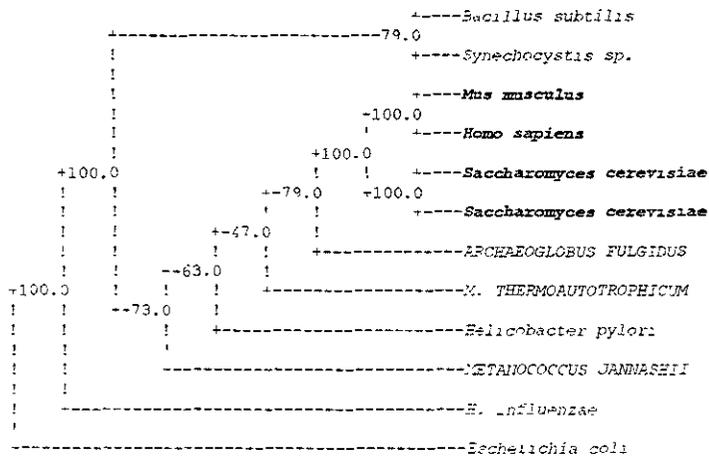


Figura 12. Filogenia de la CTP sintasa (*pyrG*).

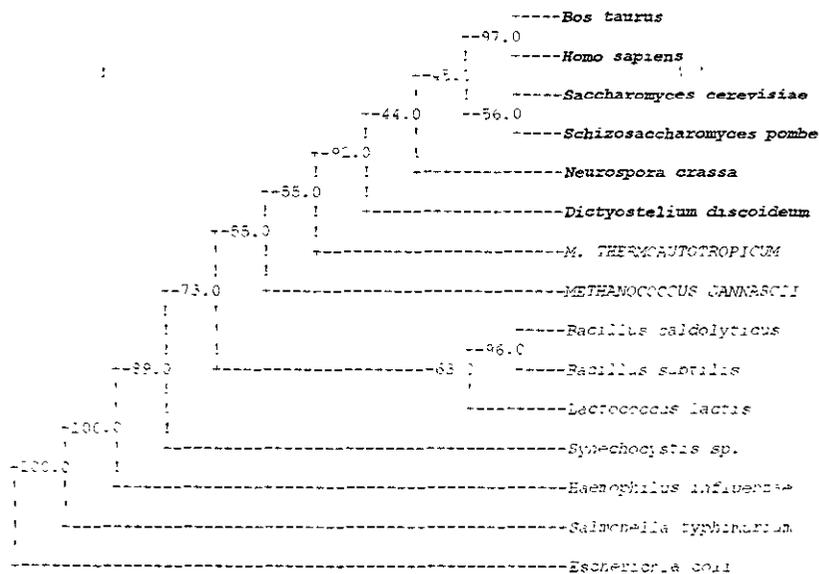


Figura 13. Filogenia de la orotidine 5'-fosfato descarboxilasa (*pyrF*).

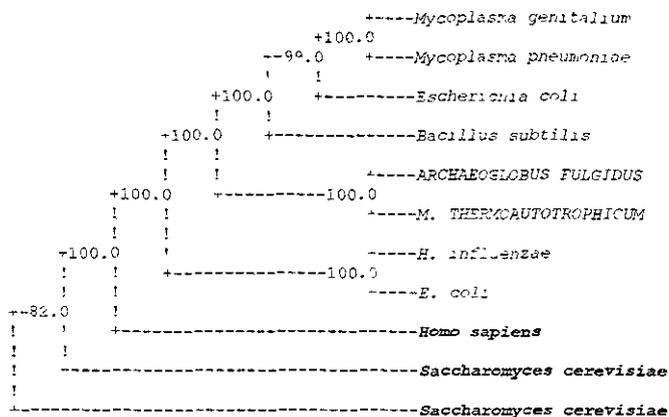


Figura 18. Filogenia de la ribonucleótido reductasa (cadena larga) (*nrdA*).

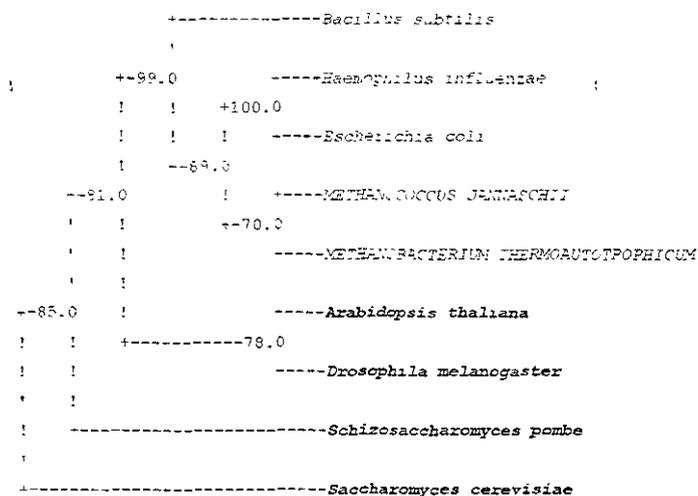


Figura 19. Filogenia de la nucleosido difosfato cinasa (*ndk*).

Filogenias que tienden a agrupar Bacteria y Archaea.

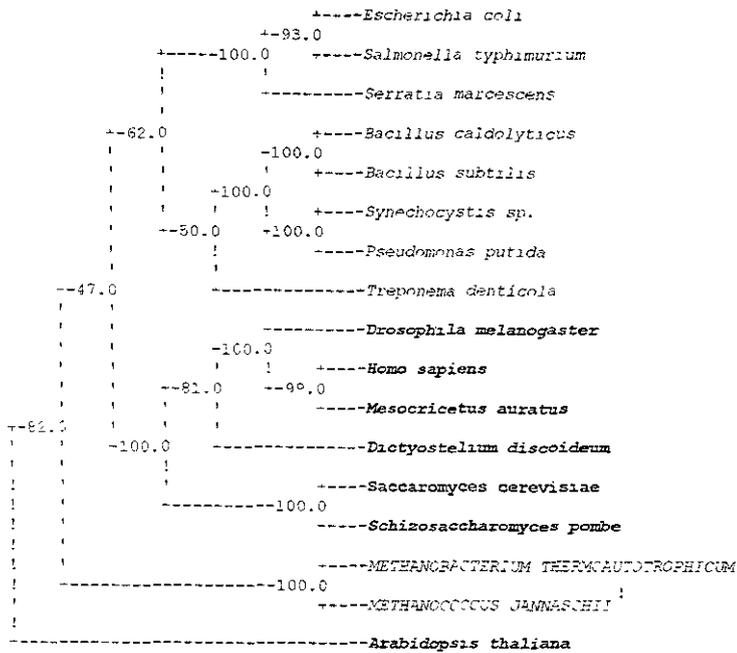


Figura 20. Filogenia de la aspartato carbamoiltransferasa (*pyrB*).

Filogenias que no generan un agrupamiento claro de los dominios.

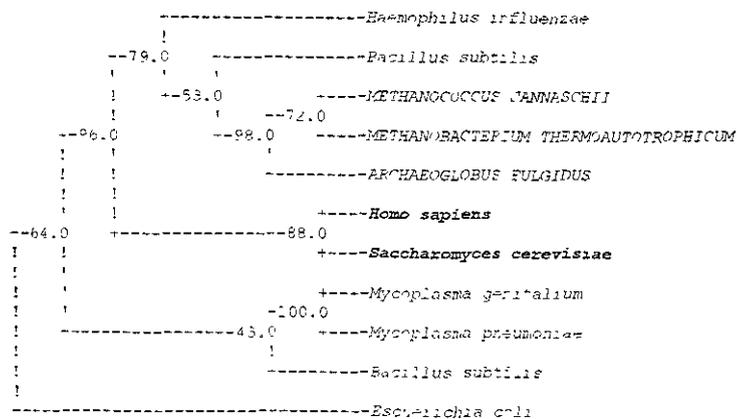


Figura 21. Filogenia de la timidilato sintasa (*thyA*).

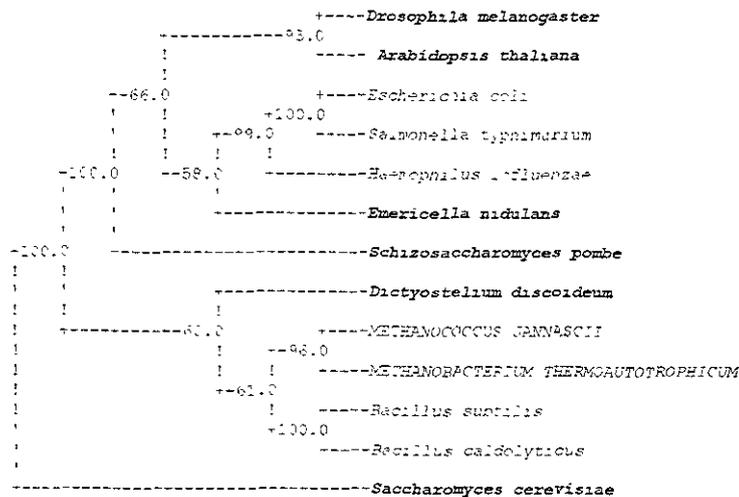


Figura 22. Filogenia de la dihidroorotato oxidasa (*pyrD*).

Las filogenias de las enzimas carbamoil-fosfato sintasa (sub. pequeña) y dihidroorotato oxidasa presentan una proximidad de Archaea con bacterias Gram (+), esta cercanía filogenética ya ha sido reportada antes (Fani *et al.* 1995).

Recientemente se publicó una lista (Brown and Doolittle, 1997) de varias filogenia universales generadas a partir de genes ortólogos, estas filogenias fueron enraizadas por medio del método del punto medio. Estas filogenias se clasificaron de acuerdo al orden de cladogénesis de los tres dominios celulares. Las filogenias generadas en este trabajo se aunaron a esta clasificación (Tabla 6).

| Grupos hermanos | Enzimas reportadas (Brown and Doolittle, 1997) | Enzimas del metabolismo de pirimidinas. |
|-------------------------|---|---|
| Archaea-Eucarya | Arginino succinato sintetasa Aspartil-tRNA sintetasa ATPasa subunidad alfa ATPasa subunidad beta DNA polimerasa B Ef1alfa/Tu Ef-G/2 HSP60 Isoleucil-tRNA sintetasa Proteina ribosomal (18) RNA polimerasa subunidad A RNA polimerasa subunidad B SecY Tryptofanil-tRNA sintetasa Tirosil-tRNA sintetasa | Orotidina 5'-P descarboxilasa CTP sintetasa Ribosa fosfato pirofosfocinasa Carbamoil-P sintetasa (pequeña) |
| Bacteria-Archaea | ALADH Citrato sintetasa FGART Glutamato deshidrogenasa II Glutamino sintetasa I Girasa B <i>hisA, hisC, hisF, hisG, hisI/E</i> HSP70 IMPDH Proteina ribosomal (3) <i>trpD</i> | Carbamoil-P sintetasa (grande) Nucleosido-difosfato cinasa Timidina fosforilasa Timidilato cinasa Ribonucleótido reductas gran. |
| Bacteria-Eucarya | Enolasa FeMn superoxido dismutasa GAPDH <i>hisB</i> PGK <i>proC</i> <i>trpB</i> | Aspartato carbamoil transferasa |
| Otra | Acetil-coenzima A sintetasa Glu-tRNA reductasa Dihidrofolato reductasa <i>hisD, hisH</i> Fotoliasa <i>trpA, trpC, trpE, trpG</i> | Dihidroorotasa Dihidroorotato oxidasa OPRTasa Timidilato sintetasa Ribosa fosfato pirofosfocinasa |

Tabla 6. Muestra la clasificación de las filogenias universales de acuerdo a el orden de cladogénesis de los tres dominios celulares.

Evolución en *patchwork* y filogenia de enzimas.

Un dato interesante obtenido a partir del análisis de secuencias nos muestra que la enzima dihidroorotasa (E.C. 3.5.2.3), que participa en la síntesis *de novo* del orotato y la enzima dihidropirimidinasa o hidantoinasa (E.C. 3.5.2.2) de la síntesis de degradación de pirimidinas, forman un grupo monofilético. Estas dos enzimas pertenecen a una familia de enzimas homólogas todavía más grande, que incluye a las alantoinasas e imidazolonepropionasas, las cuales pertenecen a la superfamilia de las ureasas (Holm *et al*, 1996). Se construyó un árbol de distancia usando los genes que codifican para las enzimas: dihidroorotasa, dihidropirimidinasa y alantoinasa, con el fin de estudiar las relaciones evolutivas entre estos (Figura 25).

Un buen enraizamiento de este árbol probablemente ayudaría a entender cual de las dos rutas (*de novo* o degradación) es más antigua, arrojando luz sobre etapas tempranas en la evolución del metabolismo de pirimidinas. Sin embargo, para poder hacer un buen enraizamiento es necesario contar con un grupo externo, y en este momento no contamos con un buen criterio para elegir a un gen que pueda servir como grupo externo a este cladograma.

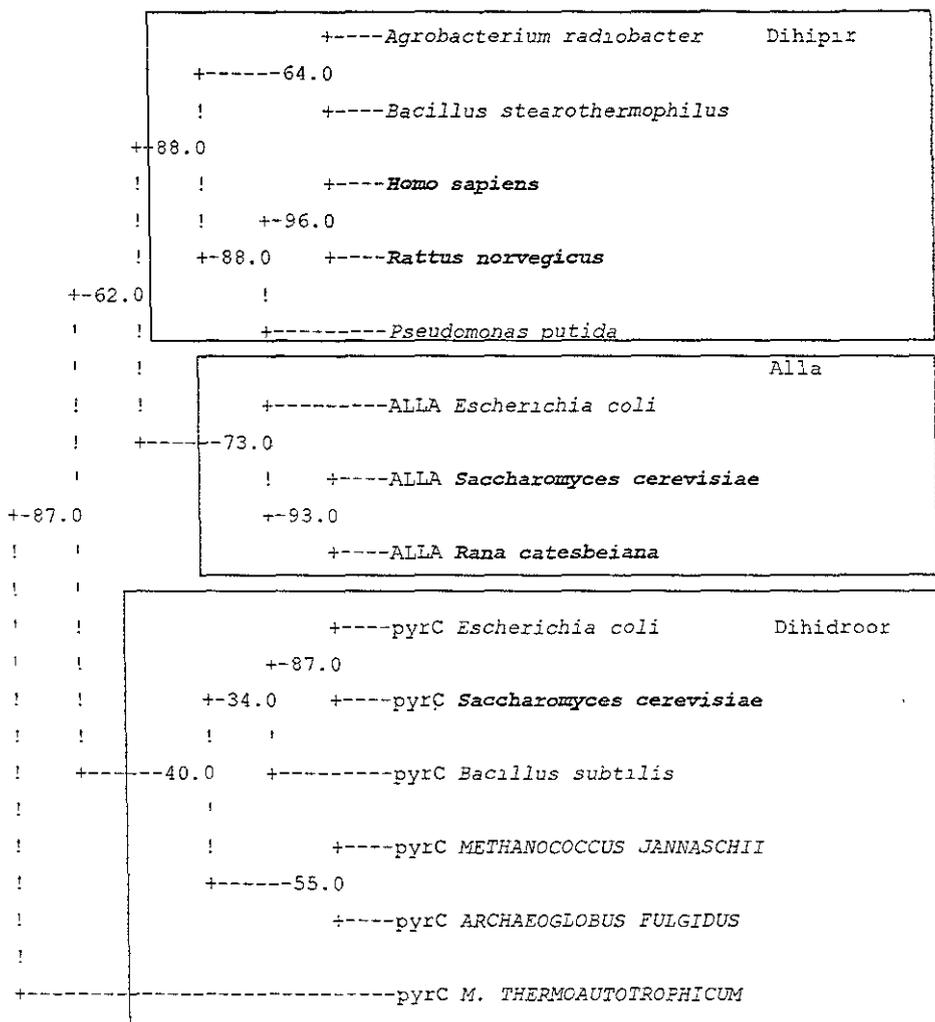


Fig 25. Árbol filogenético creado a partir de las secuencias de aminoácidos de la dihidroorotasa (Dihidroor) (E.C. 3.5.2.3), de los organismos: *Methanococcus jannaschii*, *Archaeoglobus fulgidus*, *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, de la dihidropirimidinasa (Dihipir) (3.5.2.2) de *Pseudomonas putida*, *Bacillus stearothermophilus*, *Agrobacterium radiobacter*, *Rattus norvegicus*, *Homo sapiens* y de la aiantoinasa (Alla) (3.5.2.5) de *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli* y *Rana catesbeiana*. Los organismos pertenecientes al dominio Archaea aparecen en mayúsculas, mientras que los pertenecientes al dominio Eucarya están en negritas.

3.6 Síntesis prebiótica de pirimidinas.

El primer experimento de Miller (1953) sobre la síntesis prebiótica de moléculas orgánicas abrió todo un nuevo campo de estudio en origen de la vida. Desde entonces varios experimentos simulando las condiciones primitivas de la Tierra se han realizado para estudiar la evolución química.

Los experimentos que se han realizado para explicar la síntesis prebiótica de las pirimidinas demuestran que es posible sintetizar citosina a partir de cianoacetileno y cianato: el primer precursor es producido por una descarga eléctrica en una mezcla de CH_4/NH_3 (Sanchez, *et. al*, 1966; Ferris, *et. al*, 1968) en Robertson y Miller (1995), pero esta reacción requiere relativamente altas concentraciones de cianato ($>0.1 \text{ M}$), las cuales son poco probables en un medio acuoso pues el cianato se hidroliza rápidamente a CO_2 y NH_3 (Robertson y Miller 1995). Otra síntesis explorada es la reacción de cianoacetaldehído con urea, pero a bajas concentraciones de urea, esta reacción no produce cantidades detectables de citosina (Ferris, *et. al*, 1974).

A partir de β - alanina y urea en condiciones moderadas, se sintetizó dihidrouracilo y después se deshidrogenó con radiación UV para producir uracilo (Chittenden y Schwartz, 1976), (la conversión de uracilo a partir del dihidrouracilo por este medio, después de 24 horas es del 2% sin base y del 22% en la presencia de montmorillonita). Sin embargo, a la fecha, la síntesis prebiótica más efectiva de pirimidinas está reportado por Robertson y Miller (1995) en donde a partir de una solución concentrada de urea, como la que pudo haber existido en una laguna en evaporación en la Tierra primitiva, el cianoacetaldehído reacciona para formar citosina en porcentajes del 30 al 50%. A partir de esta citosina, el uracilo puede ser formado por hidrólisis del grupo amino.

¿Horowitz en la evolución del metabolismo de pirimidinas?

Con la excepción del carbamoil-fosfato, todas las moléculas que integran la biosíntesis de orotato son posibles compuestos prebióticos (Fig. 26).

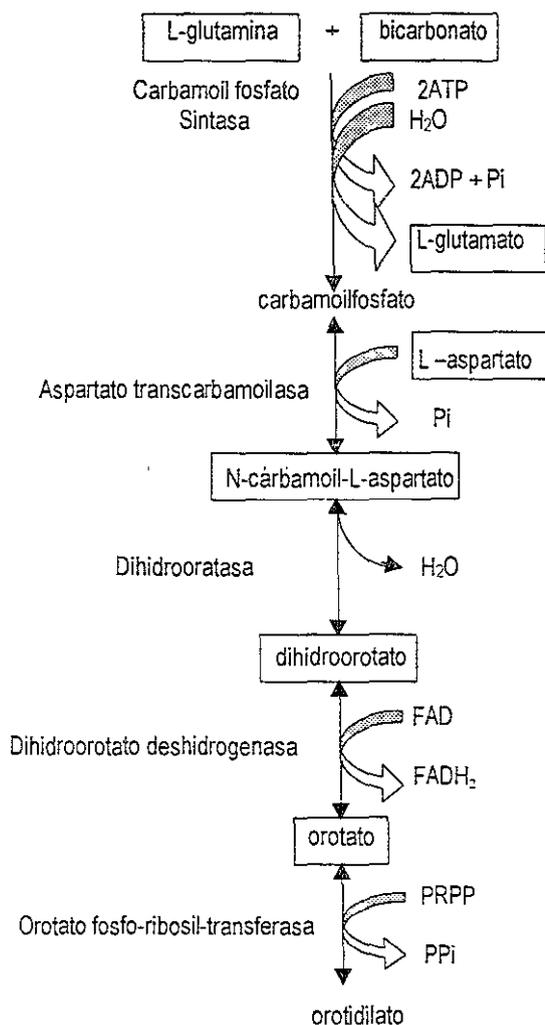


Fig. 26. Biosíntesis *de novo* de OMP. Los compuestos encerrados en cajas probablemente estaban presentes en el medio prebiótico. (Basado en Peretó, *et. al.*, 1997).

Estos datos, junto con la síntesis prebiótica semiparalela a la síntesis de uracilo reportado por Yamagata *et. al*, (1990), abren la posibilidad de que la evolución de la biosíntesis de uracilo haya seguido un modelo tipo Horowitz. La hipótesis de Horowitz establece una conexión con la síntesis prebiótica de los compuestos orgánicos y las etapas tempranas del origen de la vida. Sin embargo, los problemas relacionados con la acumulación de estos intermediarios en la Tierra prebiótica, así como el hecho de no encontrar homología entre las distintas enzimas que conforman la ruta biosintética que sugiera que estas evolucionaron a partir de duplicaciones de genes en un orden inverso, no apoyan la idea de una evolución retrógrada. Por otro lado, es evidente que el hecho de que exista una síntesis semi-paralela bajo condiciones prebióticas de uracilo, no prueba por sí mismo la hipótesis retrógrada.

Es posible que la evolución de la biosíntesis de uracilo haya seguido un modelo distinto al de la hipótesis retrógrada, ya que los primeros seres vivos pudieron utilizar las pirimidinas formadas a partir de la síntesis prebiótica propuesta por Robertson y Miller, (1955) la cual no es paralela a la síntesis biológica.

De igual manera, no hay que suponer que la evolución temprana de todos los metabolismos, estén acoplados a las síntesis prebióticas de sus intermediarios, como pudo ser el caso del metabolismo de pirimidinas.

¿Reacciones semi-enzimáticas en la evolución temprana del metabolismo de pirimidinas?

Es probable que algunas partes del metabolismo ancestral estuvieran regidas por reacciones semi-enzimáticas (Lazcano y Miller, 1998) como probablemente ocurrió con la síntesis de purinas, en donde la adenina fosfo-ribosil-transferasa, es capaz de utilizar el compuesto prebiótico 4-aminoimidazol-5-carboxamida para condensar el producto 5-amino-4-imidazolcarboxamida, el cual es un intermediario de la biosíntesis *de novo* de purinas (Becerra y Lazcano 1997).

La enzima CTP sintasa (EC 6.3.4.2), que cataliza la formación de CTP a partir de ATP, UTP y glutamina, puede aceptar también NH_3 como donador de hidrógeno.

Es posible que esta reacción sea un vestigio de un metabolismo más sencillo cuando aún no existía un metabolismo sofisticado del nitrógeno para satisfacer todas las necesidades fisiológicas, y se dependía más directamente de las fuentes de nitrógeno del medio. El nitrógeno en forma de NH_3 es producido abióticamente en grandes cantidades por una reacción en las ventilas hidrotermales (Brandes *et al.* 1998).

Por otro lado, la descarboxilación fotoquímica del ácido orótico, que tiene como resultado la formación de uracilo, fue descrita por Ferris y Joshi (1978) lo que sugiere una posible vía prebiótica para la formación de este compuesto, este dato abre la posibilidad de que el metabolismo temprano de pirimidinas estuvo formado por este paso semi-enzimático. En la actualidad esta reacción es realizada por un grupo de enzimas homólogas entre sí (Tabla 7), que son capaces de utilizar una serie de moléculas como aceptores de hidrógeno, entre ellos el ferrocianuro el cual es un compuesto prebiótico. Probablemente algunas partes de la evolución temprana del metabolismo de pirimidinas estuvieron acopladas a la síntesis prebiótica de sus intermediarios mientras que otras no.

Sin embargo, es importante ser cauteloso con las extrapolaciones que podamos hacer respecto al origen semi-enzimático del metabolismo. Por una parte, el análisis de secuencias no puede ir más allá de un período en el cual ya había síntesis de proteínas mediado por ribosomas. Por otro lado, la idea de rutas semi-enzimáticas debe de involucrar no solo, reacciones espontáneas y eficientes, sino también descripciones coherentes de cómo catálisis biológicas primitivas y menos específicas pudieron haber existido.

Orotato reductasa (NADH)

EC 1.3.1.14

Reacción: **dihidroorotato + NAD⁺ → orotato + NADH**

Cofactor: FAD, FMN

Organismos en que se encuentra:

Emericella nidulans (Ascomycotina)Dihidroorotato oxidasa

EC 1.3.3.1

Reacción: **dihidroorotato + O₂ → orotato + H₂O₂**

(el ferricianuro puede actuar como aceptor)

Cofactor: FAD, FMN

Organismos en que se encuentra:

*Escherichia coli**Methanobacterium thermoautotrophicum**Saccharomyces cerevisiae**Bacillus subtilis*Dihidroorotato deshidrogenasa

EC 1.3.99.11

Reacción: **dihidroorotato + aceptor → orotato + aceptor reducido**

(el oxígeno puede actuar como aceptor, pero más lentamente que el 2,6-dicloroindofenol y el 1,10-fenantrolina)

Cofactor: Hierro, Zinc

Organismos en que se encuentra:

Dictyostelium discoideum (sarcomastigóforo)*Synechocystis* sp.**Tabla 7.** Enzimas que catalizan la descarboxilación del OMP.

4. Conclusiones.

Tiempo y modo de evolución del metabolismo de pirimidinas.

Mecanismos de evolución.

El análisis de secuencias nos permite encontrar grupos monofiléticos de enzimas. Las características de las enzimas de cada grupo monofilético (paso metabólico en el que participan, tipo de reacción bioquímica que catalizan) nos permite inferir el proceso evolutivo que ha ocurrido de acuerdo a las tres hipótesis de evolución metabólica antes mencionadas. De ahí que una serie de homologías entre las proteínas que conforman el metabolismo de pirimidinas parezcan indicar que una parte de este evolucionó mediante un mecanismo tipo *patchwork* (Fig 27). Entre estas homologías se encuentran las siguientes:

- a) La homología entre la subunidad pequeña de la carbamoil-fosfato sintasa y la CTP sintasa. La homología de estas enzimas junto con otras glutaminoamidotransferasas tipo-G, involucradas con la formación de GMP sintasa, triptófano y otras moléculas junto con el gen *hisH* esta bien establecida (Ziakin 1985).
- b) La homología entre las enzimas: dihidropirimidinasa (EC 3.5.2.2), dihidrooratasas de dos Archaeas (EC 3.5.2.3). Se ha encontrado también que la enzima alantoinasa (EC 3.5.2.5) es homóloga también a las dihidrooratasas, (Holom et. al, 1996).
- c) Las enzimas: nucleósido trifosfato adenilato cinasa (EC 2.7.4.10), citidilato cinasa (EC 2.7.4.14), timidilato cinasa (EC 2.7.4.9) y nucleósido fosfato cinasa (EC 2.7.4.4), que comparten un sitio conservado de unión a ATP o GTP el cual forma parte de un sitio conocido como Walker A en las enzimas transportadoras ABC.

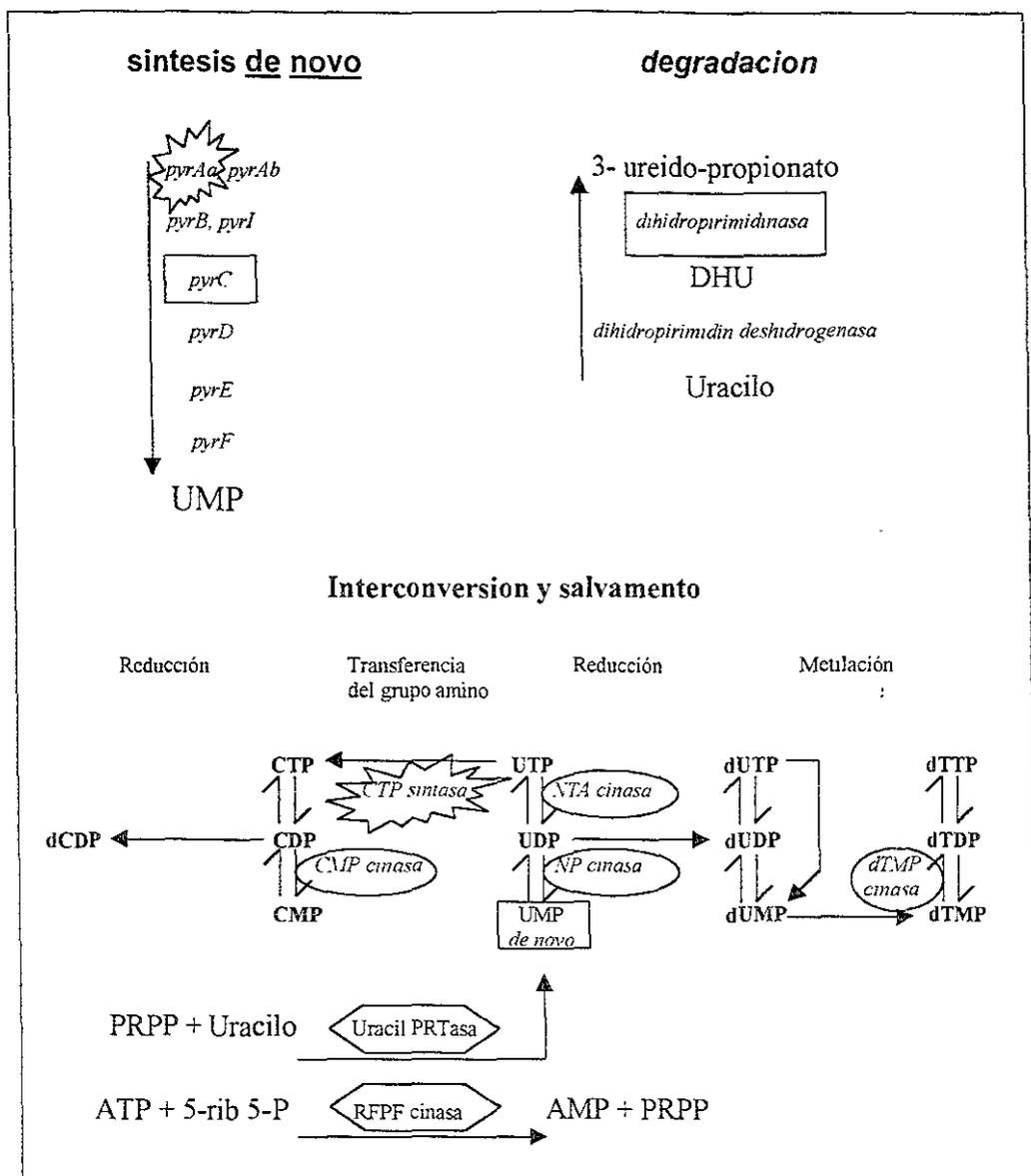


Figura 27. Muestra los grupos de enzimas homólogos encontrados en el metabolismo de pirimidinas. Los genes encerrados bajo la misma forma son homólogos. Abreviaciones: RFPF cinasa (ribosa fosfato piro-fosfo cinasa); NTA cinasa (nucleósido trifosfato adenilato cinasa); NP cinasa (nucleósido fosfato cinasa).

d) El grupo monofilético formado por la: uracil fosfo-ribosil-transferasa (EC 2.4.2.9), orotato fosfo-ribosil-transferasa (EC 2.4.2.10) y ribosa fosfato-pirofosfocinasa (EC 2.7.6.1) los cuales comparten un sitio de unión a fosfo-ribosil-pirofosfato (PRPP).

Las regiones de homología encontradas entre las distintas secuencias son, principalmente los sitios de unión al sustrato (Tabla 5) esto se puede entender ya que son los sitios con mayor presión de selección.

Por otro lado, el hecho de que la PRPP sintasa y la orotato fosfo-ribosil-transferasa o la uracil fosfo-ribosil-transferasa sean homólogas y catalicen pasos secuenciales no implica necesariamente que sea un caso de la hipótesis de Horowitz. Dos enzimas homólogas que catalicen pasos metabólicos secuenciales pueden ser igualmente explicado por la hipótesis de *patchwork* si suponemos que antiguamente existía una enzima poco eficiente y poco específica que catalizara ambas reacciones (Becerra *et al*, 1997b). Si bien el orden de los genes en los operones, no puede ser usado para refutar la hipótesis de Horowitz debido a la gran labilidad de estas estructuras a lo largo de grandes distancias evolutivas (Islas *es al*, 1998), el operon para la biosíntesis de pirimidinas de *B. subtilis* no representa un apoyo a la hipótesis retrógrada ya que los genes que lo comprenden no son homólogos entre sí.

Otro evento de duplicación génica que tuvo lugar en la evolución del metabolismo de pirimidinas es la evolución de la carbamoil-fosfato sintasa (CPS) la cual parece haber surgido por un evento de duplicación seguido por un evento de fusión para dar origen a la subunidad grande de esta enzima (Hoff 1995) la cual se unió después con la subunidad pequeña. Sin embargo, este es el único caso de evolución por duplicación interna detectado en el metabolismo de pirimidinas. El análisis de "dotplot" con las enzimas que participan en este metabolismo no mostró más evidencias de este proceso. Ello sugiere que o bien este mecanismo

no fue importante en la evolución de estas enzimas, o que las duplicaciones internas ya no pueden ser reconocidas con el método utilizado.

Existe evidencia que sugiere que el RNA evolucionó primero que el DNA (Lazcano *et. al*, 1988). Por lo tanto, se puede proponer que la biosíntesis de dNTP evolucionó gracias a la adición de un paso metabólico por el surgimiento de la ribonucleótido reductasa, a un metabolismo ya existente de NTP. Así, al menos en parte la estructura de esta porción de la ruta parece reflejar su historia evolutiva tal como lo propone la hipótesis de Granick (1957). Por otro lado, la hipótesis de Granick no puede explicar el origen de la síntesis *de novo* ya que esta requiere que cada paso metabólico que se agregue a una ruta tenga una ventaja adaptativa para ser seleccionado a favor. Sin embargo, en la actualidad ninguna de las moléculas intermedias de la síntesis *de novo* tienen otra función que la de sintetizar uracilo.

Tiempos de evolución.

Es importante resaltar que las caracterizaciones que podamos hacer con este método no pueden ir más allá de una época en donde ya había síntesis de proteínas mediada por ribosomas.

Las diferentes partes del metabolismo de pirimidinas (*novo*, salvamento e interconversión y degradación) debieron haber surgido en distintas épocas y bajo distintas presiones de selección. Probablemente la síntesis *de novo* sea posterior a la síntesis de salvamento e interconversión ya que no tiene sentido que se seleccione una síntesis *de novo* para la cual el producto final no tiene una función previamente establecida en el mecanismo celular. Si suponemos que los primeros seres vivos eran heterótrofos, probablemente la síntesis *de novo* surgió como una adaptación para suplir las necesidades de pirimidinas celulares cuando la fuente de pirimidinas sintetizadas abióticamente se volvió escasa. Como ya fue mencionado más arriba, un número creciente de evidencias sugiere que los genomas de DNA fueron anteceditos por genomas de RNA, por lo que el

metabolismo de desoxirribonucleótidos es posterior al metabolismo de ribonucleótidos. Estas dos polaridades en el tiempo, de las distintas partes del metabolismo de pirimidinas, pueden ser usadas como criterios para enraizar las filogenias de genes parálogos en donde uno de los genes participe en una ruta más antigua.

Habilidades metabólicas del cenancestro.

¿Genoma de DNA?

Las caracterizaciones hechas a partir del análisis de la distribución filogenética de enzimas pueden verse obstaculizadas por pérdidas polifiléticas secundarias, transferencias horizontales y redundancias funcionales, y por el uso de organismos modelo (Becerra *et al.*, 1997a), por ello, las inferencias que podamos hacer sobre las rutas biosintéticas en LCA pueden estar equivocadas, sin embargo existen más datos que apoyan la idea de que el cenancestro era un organismo complejo no muy distinto de los procariontes que existen hoy en día (Becerra *et al.* en prensa). El análisis de la distribución filogenética de los genes para la biosíntesis de pirimidinas sugiere que el cenancestro probablemente tenía las habilidades metabólicas que le permitían sintetizar dTTP lo que apoya la idea de que el LCA tenía un genoma de DNA.

¿Operones de pirimidinas en el cenancestro?

Al parecer, salvo en excepciones puntuales (Seifert J. *et al.* 1997), el orden de los genes en los genomas bacterianos no se encuentra conservado a lo largo de grandes distancias evolutivas (Mushegian y Koonin 1996). Los genes de la biosíntesis de pirimidinas en los genomas completos analizados aquí no son la excepción. Únicamente en los genomas de los micoplasmas se encuentra una distribución de los genes muy similar, lo que se puede explicar dada la proximidad filogenética entre estos organismos. Sin embargo, en *B. subtilis* que es su pariente cercano, este orden no se conserva.

El acomodo de los genes *pyrA* y *pyrB* en los distintos genomas sugiere que estos se encontraban contiguos en el cenacestro. Sin embargo existen diferencias importantes entre el gen de la carbamoil-fosfato sintasa de las especies procariontes estudiadas aquí y la levadura. En los procariontes los genes *pyrA* y *pyrB* forman un operon mientras que en la levadura estos dos genes están fusionados a un gen de dihidrooratasa no funcional y al gen *pyrB* formando de esta manera una proteína multifuncional.

Orden de genes.

Al estudiar la distribución espacial de los genes para la biosíntesis de pirimidinas, y los genes contiguos a estos, se encontró que existen distribuciones similares entre las especies filogenéticamente cercanas. Los micoplasmas compartieron la misma estructura en el acomodo de sus genes prácticamente en todos los casos, después *E. coli* y *H. influenzae* y por último *M. jannaschii* y *M. thermoautotrophicum*. Estos datos probablemente nos están reflejando las distancias evolutivas entre los distintos organismos. Aunque la información disponible es aun fragmentaria, tanto la similitud que existe en la organización de genes a lo largo de todo el genoma entre los dos micoplasmas, como las similitudes encontradas entre los operones de los organismos antes mencionados sugiere que en principio es posible inferir datos sobre la evolución de la distribución espacial de los genes con este tipo de información.

Debido a que a partir del estudio de la distribución y el orden de los genes alrededor del genoma solo se reconoció cercanía evolutiva entre los micoplasmas, y que a partir del estudio del orden de los genes para la biosíntesis de pirimidinas junto con los genes contiguos a estos se reconocieron similitudes entre los organismos evolutivamente menos alejados, la pérdida de información filogenética en el orden de los genes parece seguir la dirección:

pérdida del orden de los genes
a lo largo de todo el genoma \longrightarrow pérdida de la estructura
de los operones

Filogenias.

Las filogenias presentadas aquí, creadas a partir de las secuencias de las enzimas ortólogas disponibles pertenecientes a los tres dominios no son definitivas, y pueden ser alteradas con la adición de nuevas secuencias. Además, un estudio más preciso requeriría un número mayor de repeticiones *bootstrap*, y el uso de una mayor variedad de métodos tales como el de máxima parsimonia y máximo "likelihood" (Brown y Doolittle 1997). A pesar de estas limitaciones, los árboles generados parecen estar de acuerdo con la observación de que las proteínas que participan en roles metabólicos generan filogenias en donde las relaciones entre los dominios se hacen menos claras (Brown y Doolittle 1997), como se observa con la enzima la dihidroorotasa, la dihidroorotato oxidasa, la orotato fosfo-ribosil-transferasa, la timidilato cinasa. Ello es menos frecuente en las proteínas que participan en roles informativos, en donde la agrupación de los Archaeas con los eucariontes parece estar favorecida.

La síntesis *de novo* es la misma en todos los organismos en los que se presenta, lo que sugiere que tiene un origen monofilético. Sin embargo, no es claro porqué las filogenias de las distintas enzimas de esta biosíntesis son tan diferentes en su topología. Un estudio más detallado puede ayudar a entender la evolución temprana de estos genes.

Química prebiótica.

La mayoría de los intermediarios que participan en la síntesis *de novo* del orotato son compuestos que probablemente se hayan encontrado en la Tierra prebiótica. Así mismo, se ha reportado una síntesis prebiótica semiparalela a la síntesis *de novo* de pirimidinas (Yamagata, *et al*, 1990). Estos dos hechos parecen sugerir que el metabolismo de pirimidinas evolucionó en parte debido a un mecanismo de tipo Horowitz en su formulación clásica. Sin embargo, la ausencia de homología entre las distintas enzimas que participan en los pasos secuenciales de la síntesis *de novo* no concuerda con el modelo de evolución retrógrada.

Probablemente el uracilo se pudo haber formado a partir de un número de reacciones distintas en la Tierra primitiva, sin embargo la síntesis prebiótica más eficiente reportada hasta el momento (Robertson *et al.* 1995) sugiere que estas se formaron principalmente en charcas evaporantes donde había altas concentraciones de urea y cianoacetaldehído. La eficiencia de esta reacción (30-50%) es mucho más alta que la de la reacción prebiótica semiparalela a la biosíntesis (2%) (Yamagata *et al.* 1990). El porqué la naturaleza “escogió” una síntesis de pirimidinas tan poco eficiente es una pregunta abierta. Sin embargo, el dato anterior junto con el hecho de que en la síntesis *de novo* de pirimidinas primero se forma el anillo del orotato y después se une a una ribosa fosfato para formar el nucleótido, a diferencia de la síntesis de purinas en la que primero se ensambla el anillo sobre una ribosa fosforilada, iniciando con la adición de un grupo amino, proveniente de la glutamina, al fosfo-ribosil pirofosfato, y pasando por una serie de intermediarios químicos, hasta finalizar con la formación de la inosina 5'-fosfato a partir de cual se forman los demás nucleótidos de purina, sugiere que la evolución de la síntesis *de novo* de pirimidinas es un evento histórico y que por lo tanto podría ser de otra forma en la actualidad. Debido a la dificultad para la síntesis prebiótica de la ribosa, es probable que eventos muy diferentes hayan tenido lugar en la evolución temprana de estos metabolismos.

Finalmente.

En los estudios de evolución temprana de la vida existe un importante salto conceptual entre la etapa de síntesis prebiótica y lo que se denomina como el mundo del RNA (Gilbert, 1986) en donde ya existen sistemas autorreplicativos que son capaces de evolucionar a través de selección natural (Fig. 28). Los fenómenos de evolución metabólica a través de los procesos presentados aquí, no pueden ser anteriores a etapas en donde ya existía una síntesis de proteínas mediada por ribosomas. Esta etapa se encuentra cualitativamente lejos del origen de la vida.

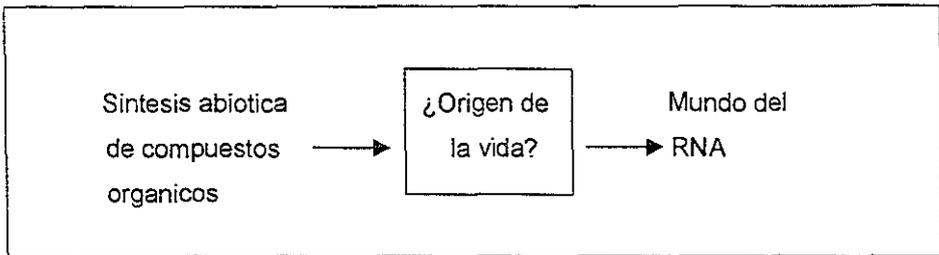


Fig. 28. Muestra tres etapas conceptualmente distintas en el origen y evolución temprana de la vida.

Si el fenómeno de *patchwork* fue el más importante en la conformación temprana de los metabolismos, un mejor entendimiento de la evolución temprana del metabolismo de pirimidinas se puede obtener al conocer, a que familia de proteínas pertenece cada una de las enzimas que participan en la biosíntesis de pirimidinas.

5. Referencias.

- Becerra-Bracho, A., Silva, E., Velasco, A.M. and Lazcano, A. Molecular Biology and the Reconstruction of Microbial Phylogenies: des Liasons Dangereuses?. In Physics of the Origin of Life. Editado por V. Stefan, de. Interdisciplinary Physics Series, American Institute of Physics Press, La Jolla CA. (en prensa).
- Becerra, A. Islas, S., Leguina, J.I., Silva, E., Lazcano, A. : 1997a, *J. Mol. Evol.* **45**, 115-118
- Becerra, A. y Lazcano, A. 1997b, *Origin of Life and the Evolution of the Biosphere*, (en prensa).
- Belfaiza, J. Parstol, C., Martel, A., Bouthier, de la Tour, C., Margarita, D., Cohen. G.N. and Saint-Girons, I.: 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 867
- Berens, R. L., Krug, E. C., and Marr, J.J.: 1995, Marr, J.J. and Müller, M. (eds). *Biochemistry and Molecular Biology of Parasites*, (Academic Press, London), 89-117
- Brandes, J. A., Boctor, N.Z., Cody, D.G., Cooper, B.A., Hazen, M.R. and Yoder JR. H.S.:1998, *Nature* **395**, 365-367
- Brown, J.R. y Doolittle, W. F.: 1995, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **92**, 2441-2446
- Brown, J. R., Doolittle, W. F.: 1997, *Microbiol. and Mol. Biol. Rev.* **61**, 456-502
- Brook, P.: 1992, *Curr. Op. Struct. Biol.* **2**, 413-421
- Burke, D.H., Hearst, J.E., and Sidow, A : 1993, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **90**, 7134-7138 867
- Chittenden, G. J. F. and Schwartz. A. W.: 1976, *Nature* **263**, 350-351
- Decottignies, A. and Goffeau, A. 1997. *Nature Genetics* **15**, 137-145
- Fani, R., Lio, P., and Lazcano, A. : 1995: *J. Mol. Evol.* **41**, 760-774
- Ferris, J.P. Sanchez, R.A , and Orgel, L.E.: 1968, *J. Mol. Biol.* **33**, 693-704
- Ferris, J.P., Zamek, O.S., Altbuch, A.M., and Freiman, H.:1974, *J. Mol. Evol.* **3**, 301-309
- Ferris, J.P. and Joshi, P.C.: 1978, *Science* **201**, 361-362

- Felsenstein, J. :1989. *Cladistics* **5**, 164-166.
- Fitch, W. M. And Upper, K.:1987, *Quant. Biol.* **52**, 759-767
- Garnier, O., and Robson,:1978 *J Mol Biol* **120**, 97-120
- Geourjon, C. and Deleage, G.1994, *Protein Engineering*, **7**, 157-164
- Geourjon, C. and Deleage, G. 1995, *Comput. Applic. Biosci.*, **11**, 681-684
- Gilbert, W. :1986, *Nature*, **319**, 618
- Granick, S.: 1957, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **69**, 292-308
- Gogarten, J.P., H. Kibak, P. Dittrich, L. Taiz, E.J. Bowman, B.J. Bowman, N.F.
- Manolson, R.J. Poole, T. Date, T. Oshima, J. Konishi, K. Denda, and M.
- Yoshida,:1989 *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **86**, 6661-6665
- Higgins.D.G. and Sharp,P.M.:1989. *CABIOS* **5**, 151-153.
- Holm, L., and Sander, C.: 1996, *Proteins* (in press)
- Horowitz, N. H.: 1945, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **31**, 153-157
- Islas, S., Becerra, A., Leguina, J.I. and Lazcano, A. Early Metabolic Evolution: insights from comparative celular genomics. Chela-flores, J. and Raulin, F. (Eds.). (1988) Exobiology: Matter, Energy and Information in the Origin and Evolution of Life in the Universe. (Proc of the Fifth trieste Conference on Chemical Evolution, Trieste, Italy. 22-26 Septiembre, 1997. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands. (To be published).
- Iwabe, N , K.-I. Kuma, M. Hasegawa, S. Osawa, and T. Miyata : 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 9355-9359
- Jensen, R.A.: 1976, *Annu. Rev. Microbiol.* **30**, 409-425
- Kornberg. A.. and Baker, T.:1992, *DNA Replication*, W. H.. Freeman and Company, New York
- Lawson, F. S., R.L. Charlebois, and J.-A. R. Dillon: 1996, *Mol. Biol. Evol.* **13**, 970-977
- Lazcano. A. and Miller, S L., 1998, *J. Mol. Evol.* (en prensa)

- Lazcano, A., E. Diaz-Villagómez, T. Mills and J. Oró : 1995, *Adv. Space. Res.* **15** 345-356
- Lazcano, A., Guerrero, R., Margulis. L. and Oró, J.: 1988, *J. Mol. Evol.* **27**, 283-290
- M. J. B. van den Hoff, Jonker, A., Beintema, J. J., Lamers, W. H.: 1995, *J. Mol. Evol.* **41**, 813-832
- Michaelis, S., Berkower, 1995, *C. Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **60**, 291-307
- Mushegian, A.R. and Koonin, E.V.: 1996, *TIGS* **12**, 289-290
- Oparin, A.I.: 1938, *The Origin of Life*, Macmillan, New York
- Pearson, W.R. and Lipman, D.J.: 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 2444-2448
- Pearson, W.R.: 1990, *Methods in Enzymol.* **183**, 63-98
- Peretó, J., Fani, R., Leguina, J.L. and Lazcano, A. Enzyme evolution and the development of metabolic pathways. In Cornish-Bowden, A. (Eds), 1997, *New Beer in an Old Bottle: Eduard Buchner and the Growth of the Biochemical Knowledge* (Universitat de Valencia, Valencia Spain).
- Seifert, J. L. Martin, K.A., Abdi, F., Wagner, W.R., and Fox G.E.: 1997, *J. Mol. Evol.* **45**, 467-472
- Rauschel, F.M., Anderson, P.M. and Villafranca J.J.: 1978, *Biochemistry.* **17**, 5587-5591
- Raley, M. and Labedan, B. .1996 *Escherichia coli gene products: physiological functions and common ancestries*, in F.C. Neidhardt (de.), *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology*, AMS Press, Washington, D.C., pp. 2118-2202.
- Riera, J., Robb, F.T., Weiss, R , Fontecave, M.:1997, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94** (2), 475-478.
- Robertson, M. P. and Miller, S. L.:1995, *Nature* **375**, 772-773
- Rost, B. and Sander, C.:1993 *Pro. Nat. Acad. Sci. USA* **90**, 7558-7562
- Rost, B. and Sander, C.:1993 *J. Mol. Biol.*: 1993 , **232** (2), 584-599
- Rost, B. and Sander, C.:1994 *Proteins* **19** (1), 55-72
- Sanchez, R.A., Ferris, J.P. and Orgel, L.E.: 1966, *Science.* **154**, 784-785
- Schuler, G.D., Altschul, S.F., and Lipman, D.J.: 1991, *Proteins Struct. Funct. Genet.* **9**:180-190

Tauer, A. and Benner, S. A.: 1997, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**, 53-58

Waley, S.G.: 1969, *Comp. Biochem. Physiol.* **30**, 1-7

Wose, C.R.: 1987, *Microbiol. Rev.* **51**, 221-227

Yamagata, Y., Sasaki, K., Takaoka, O., Sano, S., Inomata, K., Kanemitsu, K.,
Inoue, Y., Matsumoto, I.: 1990, *Orig. of Life and Evol. of the Biosph.* **20**, 389-399

Ycas, M.: 1974, *J. Theoret. Biol.* **44**, 145-160

Zalkin, H.: 1985, *Methods Enzymol.* **113**, 263-264

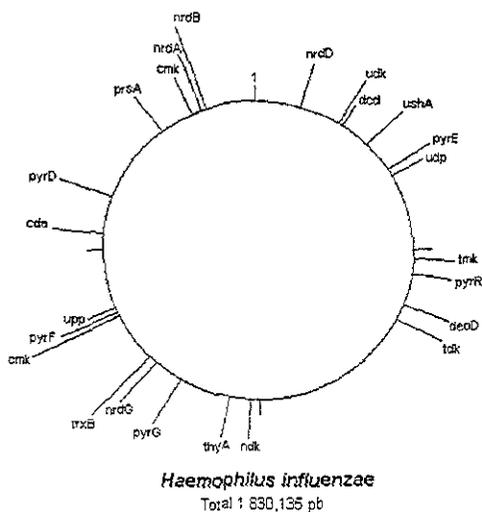


Figura 25. Mapa del genoma completo de *H. influenzae* mostrando las posiciones aproximadas de los genes de pirimidinas: *nrdD* (EC 1.17.4.2), *udk* (EC 2.7.1.48), *dcd* (EC 3.5.4.13), *ushA* (EC 3.1.3.5), *pyrE* (EC 2.4.2.10), *udp* (EC 2.4.2.3), *tmk* (EC 2.7.4.9), *pyrR* (EC 2.4.2.9), *deoD* (EC 2.4.2.1), *tdk* (EC 2.7.1.21), *ndk* (EC 2.7.4.6), *thyA* (EC 2.1.1.45), *pyrG* (EC 6.3.4.2), *nrdG* (1.17.4.2) proteína activadora, *trxB* (EC 1.6.4.5), *cmk* (EC2.7.4.14), *pyrF* (EC 4.1.1.23), *upp* (EC 2.4.2.9), *dca* (EC 3.5.4.5), *pyrD* (EC 1.3.3.1), *prsA* (EC 2.7.6.1), *cmk* (EC 2.7.4.14), *nrdA* (EC 1.17.4.1 α), *nrdB* (EC 1.17.4.1 β).

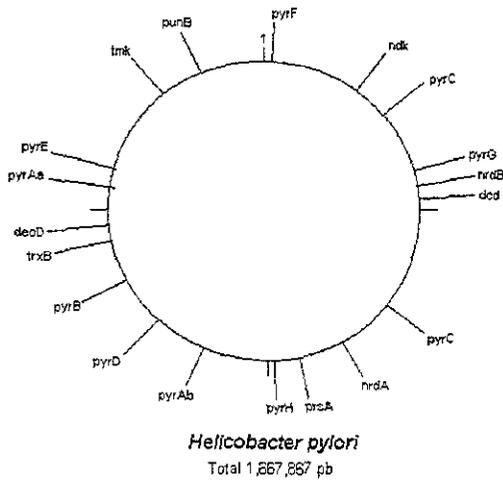


Figura 26. Mapa del genoma de *H. pylori* mostrando las posiciones aproximadas de los genes de pirimidinas: *pyrF* (EC 4.1.1.23), *ndk* (EC 2.7.4.6), *pyrC* (EC 3.5.2.3), *pyrG* (EC 6.3.4.2), *nrdB* (EC 1.17.4.1 β), *dcd* (EC 3.5.4.13), *pyrC* (EC 3.5.2.3), *nrdA* (EC 1.17.4.1 α), *prsA* (EC 2.7.6.1), *pyrH* (EC 2.7.4.-), *pyrAb* (6.3.5.5 glutamina), *pyrD* (EC 1.3.99.11), *pyrB* (EC 2.1.3.2), *trxB* (EC 1.6.4.5), *deoD* (2.4.2.1), *pyrAa* (6.3.5.5 amonio), *pyrE* (EC 2.4.2.10), *tmk* (EC 2.7.4.9), *punB* (EC 2.4.2.1).

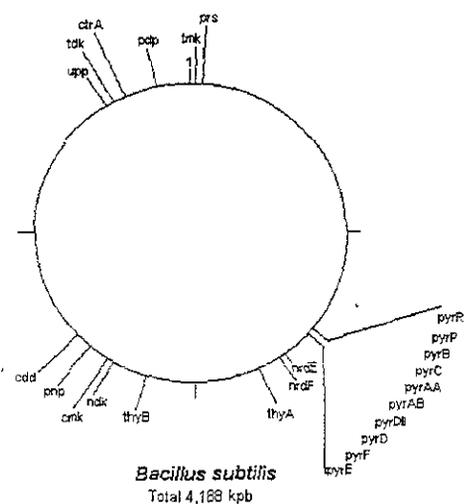


Figura 27. Mapa del genoma de *B. subtilis* mostrando las posiciones aproximadas de los genes para la biosíntesis de pirimidinas: *tmk* (EC 2.7.4.9), *prs* (EC 2.7.6.1), *pyrR* (proteína reguladora del operon de pirimidinas), *pyrP* (uracil permeasa), *pyrB* (EC 2.1.3.2), *pyrC* (EC 3.5.2.3), *pyrAA* (EC 6.3.5.5 pequeña), *pyrAB* (6.3.5.5. larga), *pyrDI* (probable subunidad de la dihidroorotato deshidrogenasa), *pyrD* (EC 1.3.3.1), *pyrE* (EC 4.1.1.23), *pyrF* (EC 2.4.2.10), *nrdE* (EC 1.17.4.1 α), *nrdF* (1.17.4.1 β), *thyA* (EC 2.1.1.45), *thyB* (EC 2.1.1.45 themolabile), *ndk* (EC 2.7.4.6), *cmk* (EC 2.7.4.14), *pnp* (EC 2.4.2.1), *cdd* (EC 3.5.4.5), *upp* (EC 2.4.2.9), *tdk* (EC 2.7.1.21), *ctrA* (EC 6.3.4.2) *pdp* (EC 2.4.2.2).

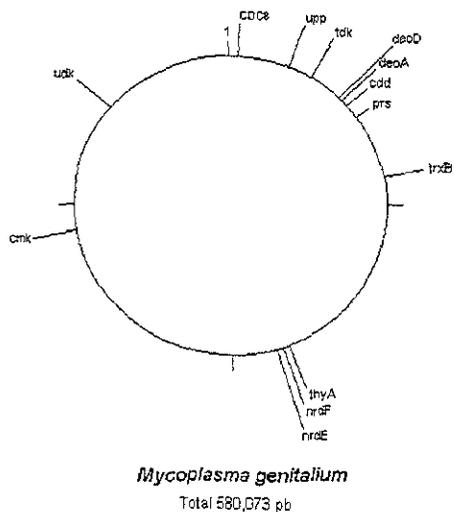


Figura 28. Mapa del genoma de *M. genitalium* mostrando las posiciones aproximadas de los genes para la biosíntesis de pirimidinas: *CDC8* (EC 2.7.4.9), *upp* (EC 2.4.2.9), *tdk* (2.7.1.21), *deoD* (EC 2.4.2.1), *deoA* (EC 2.4.2.4), *cdd* (EC 3.5.4.5), *prs* (EC 2.7.6.1), *trxB* (1.6.4.5), *thyA* (EC 2.1.1.45), *nrdF* (EC 1.17.4.1β), *nrdE* (EC 1.17.4.1α), *cmk* (EC 2.7.4.14), *udk* (EC 2.7.1.48).

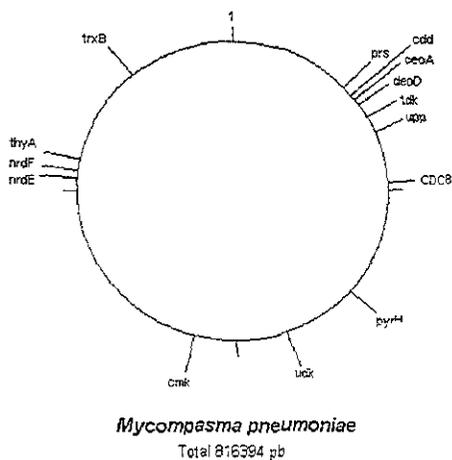


Figura 29. Mapa del genoma de *M. pneumoniae* mostrando las posiciones aproximadas de los genes para la biosíntesis de pirimidinas: *prs* (EC 2.7.6.1), *cdd* (EC 3.5.4.5), *deoA* (EC 2.4.2.4), *deoD* (EC 2.4.2.1), *tdk* (EC 2.7.1.21), *upp* (EC 2.4.2.9), *CDC8* (EC 2.7.4.9), *pyrH* (EC 2.7.4.-), *udk* (EC 2.7.1.48), *cmk* (EC 2.7.4.14), *nrdE* (EC 1.17.4.1 α), *nrdF* (EC 1.17.4.1 β), *thyA* (EC 2.1.1.45), *trxB* (EC 1.6.4.5).

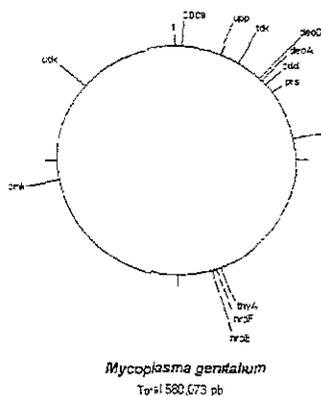
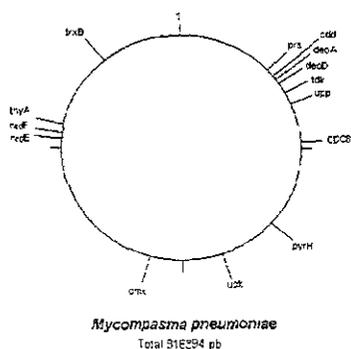


Figura 30. Mapa de los genomas de *M. pneumoniae* y *M. genitalium* mostrando las posiciones aproximadas de los genes para la biosíntesis de pirimidinas. Obsérvese que el orden de los genes en los dos genomas es el mismo, solo que en sentido inverso.

M. pneumoniae: *prs* (EC 2.7.6.1), *cdd* (EC 3.5.4.5), *deoA* (EC 2.4.2.4), *deoD* (EC 2.4.2.1), *tdk* (EC 2.7.1.21), *upp* (EC 2.4.2.9), *CDC8* (EC 2.7.4.9), *pyrH* (EC 2.7.4.-), *udk* (EC 2.7.1.48), *cmk* (EC 2.7.4.14), *nrdE* (EC 1.17.4.1 α), *nrdF* (EC 1.17.4.1 β), *thyA* (EC 2.1.1.45), *trxB* (EC 1.6.4.5).

M. genitalium: *CDC8* (EC 2.7.4.9), *upp* (EC 2.4.2.9), *tdk* (2.7.1.21), *deoD* (EC 2.4.2.1), *deoA* (EC 2.4.2.4), *cdd* (EC 3.5.4.5), *prs* (EC 2.7.6.1), *trxB* (1.6.4.5), *thyA* (EC 2.1.1.45), *nrdF* (EC 1.17.4.1 β), *nrdE* (EC 1.17.4.1 α), *cmk* (EC 2.7.4.14), *udk* (EC 2.7.1.48)

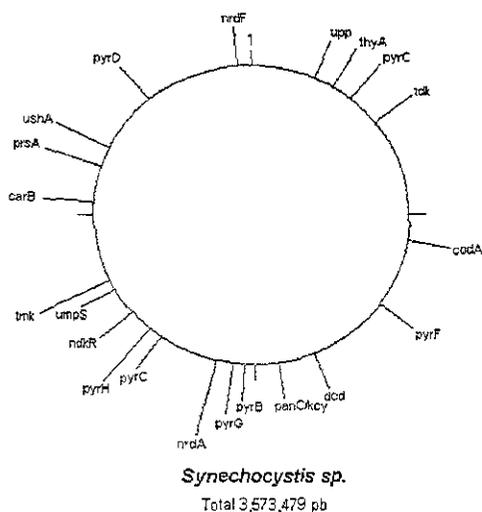


Figura 31. Mapa del genoma de *Synechocystis* sp. mostrando las posiciones aproximadas de los genes para la biosíntesis de pirimidinas: upp (EC 2.4.2.9), thyA (EC 2.1.1.45), pyrC (EC 3.5.2.3), tdk (EC 2.7.1.21), codA (EC 3.5.4.1), pyrF (EC 4.1.1.23), dcd (EC 3.5.4.13), panC/kcy (pantotenato sintasa/citidilato cinasa EC 2.7.4.14), pyrB (EC 2.1.3.2), pyrG (2.1.3.2), nrdA (EC 1.17.4.1α), pyrC (EC 3.5.2.3), pyrH (EC 2.7.4.-), ndkR (EC 2.7.4.6), umpS (EC 2.4.2.10, 2.7.1.48), tmk (EC 2.7.4.9), carB (EC 6.3.5.5 grande), prsA (EC 2.7.6.1), ushA (EC 3.1.3.5), pyrD (EC 1.3.3.1), nrdF (EC 1.17.4.1β).

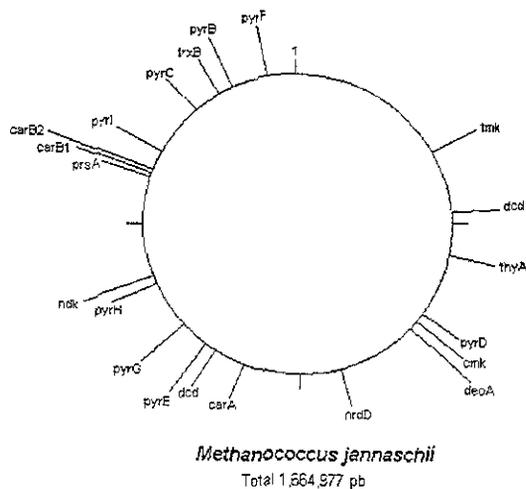


Figura 32. Mapa del genoma de *M. jannaschii* mostrando las posiciones aproximadas de los genes para la biosíntesis de pirimidinas: *tmk* (EC 2.7.4.9), *dcd* (EC 3.5.4.13), *thyA* (EC 2.1.1.45), *pyrD* (EC 1.3.3.1), *cmk* (EC 2.7.4.14), *deoA* (EC 2.4.2.4), *nrdD* (EC 1.17.4.2), *carA* (EC 6.3.5.5 pequeña), *dcd* (EC 3.5.4.13), *pyrE* (EC 2.4.2.10), *pyrG* (6.3.4.2), *pyrH* (EC 2.7.4.-), *ndk* (EC 2.7.4.6), *prsA* (EC 2.7.6.1), *crab1* (6.3.5.5 grande), *carB2* (EC 6.3.5.5 grande), *pyrI* (EC 2.1.3.2 regulatoria), *pyrC* (EC 3.5.2.3), *trxB* (EC 1.6.4.5), *pyrB* (EC 2.1.3.2 catalítico), *pyrF* (EC 4.1.1.23).

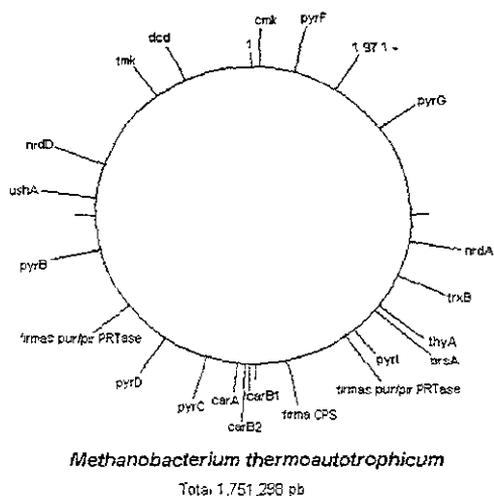


Figura 33. Mapa del genoma de *M. thermoautotrophicum* mostrando las posiciones aproximadas de los genes para la biosíntesis de pirimidinas: *cmk* (EC 2.7.4.14), *pyrF* (EC 4.1.1.23), *pyrG* (EC 6.3.4.2), *nrdA* (EC 1.17.4.1 grande), *trxB* (EC 1.6.4.5), *thyA* (EC 2.1.1.45), *prsA* (EC 2.7.6.1), *pyrI* (EC 2.1.3.2 regulatoria), *carB1* (EC 6.3.5.5 larga), *carB2* (EC 6.3.5.5 larga), *carA* (EC 6.3.5.5 pequeña), *pyrC* (EC 3.5.2.3), *pyrD* (EC 1.3.3.1), *pyrB* (EC 2.1.3.2), *ushA* (EC 3.1.3.5), *nrdD* (EC 1.17.4.2), *TMK* (EC 2.7.4.9), *DCD* (EC 3.5.4.13).

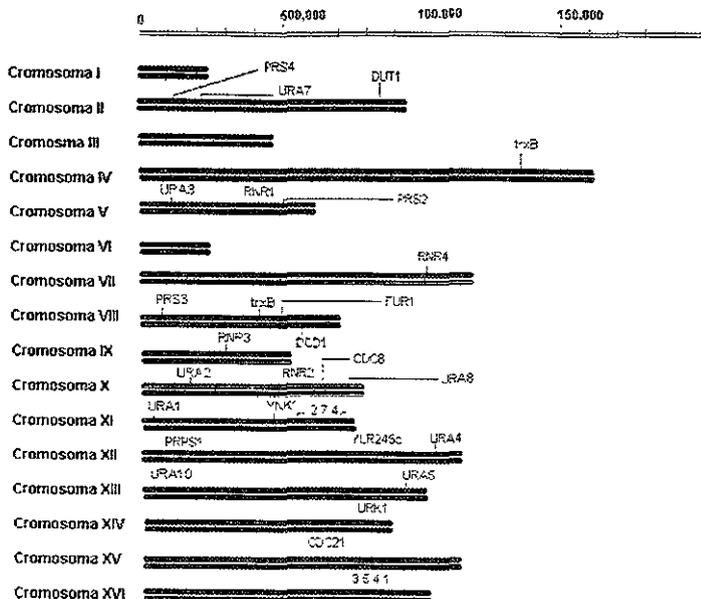


Figura 34. Mapa del genoma de *S. cerevisiae* mostrando las posiciones aproximadas de los genes para la biosíntesis de pirimidinas: *PRS4* (EC 2.7.6.1), *URA7* (EC 6.3.4.2), *DUT1* (EC 3.6.1.23), *trxB* (EC 1.6.4.5), *URA3* (EC 4.1.1.23), *RNR1* (EC 1.17.4.1), *PRS2* (EC2.7.6.1), *RNR4* (EC 1.17.4.1), *PRS3* (EC 2.7.6.1), *trxB* (EC 1.6.4.5), *FUR1* (EC 2.4.2.9), *DCD1* (EC 3.5.4.12), *RNR3* (EC 1.17.4.1), *URA2* (EC 6.3.5.5, 2.1.3.2), *RNR2* (EC 1.17.4.1 pequeña), *CDC8* (EC 2.7.4.9), *URA8* (EC 6.3.4.2), *URA1* (EC 1.3.3.1), *PRPS1* (EC 2.7.6.1), *YNK1* (EC 2.7.4.6), Uridilato cinasa (EC 2.7.4.-), *YUR245c* (EC 3.5.4.5), *URA4* (EC 3.5.2.3), *URA10* (EC 2.4.2.10), *URA5* (EC 2.4.2.10), *URK1* (EC 2.7.1.48), *CDC21* (EC 2.1.1.45), Citosina deaminasa (EC 3.5.4.1).