

11261



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA DIVISION DE ESTUDIOS  
DE POSGRADO E INVESTIGACION**

**SUBCLONACION Y EXPRESION DE LOS GENES QUE  
CODIFICAN A LA METILMALONIL-CoA MUTASA  
DE *Saccharopolyspora erythraea* CA340**

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRA EN CIENCIAS BIOMEDICAS  
P R E S E N T A :  
CECILIA MARTINEZ CASTILLO

TUTOR ACADEMICO: DRA. MARIA ELENA FLORES CARRASCO



ur 349416

MEXICO,

2005



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

« *Le Savoir est le patrimoine de l'humanité* »

**Louis Pasteur**

„Die Erkenntnis von der Unfreiheit des Willens schützt mich davor, mich selbst und die Mitmenschen als handelnde und urteilende Individuen allzu ernst zu nehmen und den guten Humor zu verlieren“

**Albert Einstein**

*“Live is an act and we are his actors”*

**William Shakespeare**

*„Nuori, ole rohkea ja utelias kaikessa mitä teet. On niin paljon olemassa, on niin paljon sinussa. Olet osa koko ihmiskunnan historiaa”*

**Rakenna sitä.**

*“De fysicus en de chemicus houden zich niet bezig met het doel van de verschijnselen die ze onderzoeken, maar de bioloog moet hieraan wel aandacht besteden”*

**Nikolaas Tinbergen**

*“Det är egentligen bara dåliga böcker som äro i behov av förord”*

**Vilhelm Moberg**

**Este trabajo fue apoyado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, DGAPA, UNAM a través del proyecto IN200403-3.**

**Este trabajo fue realizado en el departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, bajo la dirección de la Dra. María Elena Flores Carrasco.**

## **AGRADECIMIENTOS**

**Al Dr. Pavel Petrosyan por su asesoría técnica durante la realización de este trabajo**

**A la QFB Patricia de la Torre por su colaboración en la secuenciación del DNA.**

**A LA DRA. MARIA ELENA FLORES CARRASCO**

**Por su trabajo constante e incansable durante la realización del trabajo,  
por sus enseñanzas, generosidad y amistad**

**Al Matemático, Ramón Adán Paredes Pérez y al Ing. Raymundo Jiménez Galán.**

**Al Arq. Héctor Herrera León y Vélez, Lic. E. David Torres Nava y a la Biol. Ma. Dolores Valle**

**Pon su valioso apoyo para la realización de este trabajo**

**A mis compañeros del laboratorio :Alfredo, Mónica, Sara, Fermín, Paulina, Tóshiko.**

**Al Sr. Eduardo y Sra. Guillermina**

**Beatriz y Esther**

**Por su ayuda siempre oportuna**

**A Evita por todos estos años de apoyo en el posgrado.**



## **DEDICATORIA**

**A mis adorados hijos**

**Alberto y Sergio con todo mi amor**

**A mi madre Cecilia y a mi tía Guadalupe con inmenso cariño**

**A Silvia, Jaime, Gerardo, Gustavo y Gustavo Jr., Fernando y Fernando Jr., Adrián, Balbina, César, Maribel, Jaime Jr, Sandra, Miriam y Juan Diego, y a mi Tía Elvira**

**Con afecto**

**A Laura Escalante, Gregorio Montoya, George Seiliakus y Nicky Snoek; Gema Ramírez, Paula Aranda, e Hilda Villegas. Alejandro Jiménez, Egbert Sánchez, Gilberto Velasco, Leticia Ruíz, Alicia Barnard., Irma y Cuahutemoc Corella; Irma y Cristina Altamirano, Hans Eichert, Mateo Vázquez, Reinhard Stolle, Patricia y Ari Pousi, Humberto Salinas y Yolanda Sotelo, María Elena Monroy Y Jorge Shizuru.**

**Por el tiempo compartido**

## INDICE GENERAL

---

	Página
Indice de figuras	1
Abreviaturas utilizadas en el texto	2
I. Resumen	3
II. Introducción	4
III. Antecedentes	
III.1 Eritromicina A	
III.2 Actividad biológica de ErA y su importancia clínica	10
III.3 Mecanismo de acción de la ErA	11
III.4 Biosíntesis de ErA	11
III.5 Rutas de formación de P-CoA y MM-CoA	15
III.6 Metilmalonil-CoA mutasa	17
III.7 Expresión de proteínas de actinomicetos	25
IV. Justificación	27
V. Hipótesis	27
VI. Objetivos	27
VII. Material y métodos	
VII.1 Medios de cultivo y microorganismos	29
VII.2. Oligonucleótidos	29
VII.3. Plásmidos	29
VII.4. Amplificación del gen <i>mutA</i> que codifica para la probable subunidad de 66 kDa de metilmalonil-CoA mutasa de <i>S. erythraea</i>	29
VII.5. Amplificación del gen <i>mutB</i> que codifica para la probable subunidad de 82.7 kDa de metilmalonil-CoA mutasa de <i>S. erythraea</i>	30
VII.6. Purificación de los productos de PCR	30
VII.7. Subclonación de los genes <i>mutA</i> y <i>mutB</i> en pRSET A	30
VII.8. Secuenciación	31
VII.9. Expresión de los genes <i>mutA</i> y <i>mutB</i> en <i>E. coli</i>	31
VII.10. Preparación de extractos libres de células de los cultivos inducidos para la expresión de las proteínas MutA y MutB	32
VII.11. Purificación de las proteínas MutA y MutB expresadas por las transformantes	32
VII.12. SDS-PAGE	33
VII.13. Determinación de la actividad de la MCM	33
VII.14. HPLC	33
VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
VIII. 1. Amplificación del gen <i>mutA</i>	34
VIII. 2. Amplificación del gen <i>mutB</i>	36
VIII. 3. Expresión y purificación de las proteínas MutA y MutB	39

---

## INDICE GENERAL

---

VIII.4. Formación del heterodímero	44
VIII.5. Determinación de la actividad de mutasa	44
<b>IX. Conclusiones</b>	<b>48</b>
<b>X. Perspectivas</b>	<b>49</b>
<b>XI. Bibliografía</b>	<b>50</b>
<b>XII. Anexo de secuencias</b>	
XII. 1. <i>Gen mutA</i> CON EL PRIMER CEC-2	59
XII. 2. <i>Gen mutB</i> CON EL PRIMER B/XMA	60
XII. 3. <i>Gen mutB</i> CON PRIMER Mut1	61
XII. 4. <i>Gen mutB</i> CON PRIMER VNE	62
XII. 5. <i>Gen mutB</i> CON PRIMER CS1	63
XII. 6. <i>Gen mutB</i> CON PRIMER XKB1	64
XII. 7. <i>Gen mutB</i> CON PRIMER 170T7B	65
XII. 8. <i>Gen mutA</i> CON AH	66
XII. 9. <i>Gen mutA</i> CON T7XX430	67
XII. 10. <i>Gen mutA</i> CON PRIMER ACH460	68
XII. 11. <i>Gen mutA</i> CON PRIMER A/STP	69
XII. 12. <i>Gen mutB</i> CON PRIMER B/ATG	70
XII. 13. <i>Gen mutB</i> CON PRIMER Ci2	71

## INDICE DE FIGURAS

---

	Página
<b>Fig. 1</b> Estructura química de la eritromicina A y sus análogos.	8
<b>Fig. 2</b> Antibióticos de segunda generación derivados de la eritromicina.	9
<b>Fig. 3</b> Mecanismo de acción de la eritromicina A.	12
<b>Fig. 4</b> Biosíntesis de eritromicina A por <i>Saccharopolyspora erythraea</i> .	13
<b>Fig. 5</b> Compuestos intermediarios en la elaboración periférica de la eritromicina.	14
<b>Fig. 6</b> Reacción catalizada por la MCM y estructura de la adenosilcobalamina.	18
<b>Fig. 7</b> Organización genómica y mapa de restricción de la región que codifica para la MCM de <i>S. erythraea</i> CA340.	21
<b>Fig. 8</b> Secuencias de nucleótidos y aminoácidos.	23
<b>Fig. 9</b> Alineamiento múltiple.	25
<b>Fig. 10</b> Representación del plásmido pRSET A utilizado para la expresión de proteínas en <i>E. coli</i> .	26
<b>Fig. 11</b> Electroforesis en gel de agarosa del producto de PCR correspondiente al gen <i>mutA</i> y del plásmido pRSET A digeridos.	35
<b>Fig. 12</b> Electroforesis de los productos de la digestión del plásmido pRSET A <i>mutA</i> :: <i>Bam</i> HI/ <i>Eco</i> RI.	36
<b>Fig. 13</b> Electroforesis en gel de agarosa de los productos de amplificación del gen <i>mutB</i> .	37
<b>Fig. 14</b> Electroforesis en gel de agarosa del fragmento que contiene el gen <i>mutB</i> purificado.	37
<b>Fig. 15</b> Electroforesis en gel de agarosa del fragmento <i>mutB</i> y del plásmido pRSET A digeridos.	38
<b>Fig. 16</b> Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la digestión del plásmido pRSET A:: <i>mutB</i> completo.	39
<b>Fig. 17</b> Expresión de las proteínas MutA y MutB en BL2/DE3 a 37°C.	40
<b>Fig. 18</b> SDS-PAGE ELC y fracción insoluble.	40
<b>Fig. 19</b> Purificación de MutA por IMAC.	41
<b>Fig. 20</b> Purificación de MutB por IMAC.	42
<b>Fig. 21</b> Formación del heterodímero.	44
<b>Fig. 22</b> Cromatograma de la mezcla de reacción de metilmalonil-CoA.	45
<b>Fig. 23</b> Cromatograma de la mezcla de reacción de la MCM rec.	46
<b>Fig. 24.</b> Cromatograma de la mezcla de reacción tiempo cero.	46
<b>Fig. 25.</b> Cromatograma de la mezcla de reacción con ELC <i>E. coli</i> .	47
<b>Fig. 26.</b> Cromatograma de la mezcla de reacción con ELC <i>E. coli</i> tiempo cero.	48
<b>Tabla 1.</b> Actividad de la Metilmalonil-CoA Mutasa	45

## ABREVIATURAS

---

<b>CoA</b>	Coenzima A
<b>CMI</b>	Concentración mínima inhibitoria
<b>DO</b>	Densidad óptica
<b>6-DEB</b>	6-Desoxieritronólido B
<b>DEBS</b>	Desoxieritronólido B sintetasa
<b>DH</b>	Dehidratasa
<b>ErA</b>	Eritromicina A
<b>FAS</b>	Ácido graso sintetasa
<b>HPLC</b>	Cromatografía líquida de alta resolución
<b>IPTG</b>	Isopropiltiogalactósido
<b>IMAC</b>	Cromatografía de afinidad de iones metálicos
<b>Kb</b>	Kilobases
<b>kDa</b>	Kilodaltones
<b>KR</b>	Cetoreductasa
<b>KS</b>	$\beta$ -cetoacil sintasa
<b>MAT</b>	Malonilacetiltransferasa
<b>MCM</b>	Metilmalonil-CoA mutasa
<b>MIC</b>	Concentración mínima inhibitoria
<b>MM-CoA</b>	Metilmalonil-CoA
<b>MMT</b>	Metilmalonil transcarboxilasa
<b>NCBI</b>	Centro Nacional de Información Biotecnológica
<b>ORF</b>	Marco de lectura abierto
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PCC</b>	Propionil-CoA carboxilasa
<b>P-CoA</b>	Propionil-CoA
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PKS</b>	Policétido sintasa
<b>PM</b>	Peso molecular aparente
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sodio

## I. RESUMEN

---

La metilmalonil-CoA mutasa (MCM) es una enzima que participa en la conversión del succinil-CoA a metilmalonil-CoA (MM-CoA) el cual es un precursor de la eritromicina, antibiótico producido por el actinomiceto *Saccharopolyspora erythraea*. Se ha encontrado que la MCM puede ser una enzima homodimérica en mamíferos y algunas bacterias ó heterodimérica en la mayoría de las bacterias, incluyendo los actinomicetos. Las dos subunidades de las MCM están codificadas por dos genes (*mutA* y *mutB*) que generalmente se encuentran adyacentes y que se transcriben como un operón. La MCM de *Propionibacterium freudenreichii* es la única que se ha cristalizado y se ha encontrado que ambas subunidades consisten de dos dominios principales: un barril ( $\alpha/\beta$ )<sub>8</sub> en donde se encuentra el dominio de unión al sustrato y un dominio de unión a la cobalamina en el extremo amino terminal. El primer dominio está precedido por un segmento que contiene aminoácidos pequeños, hidrofílicos, de cadena lateral corta, principalmente serinas y treoninas, que crean una cavidad, a través del cual el sustrato-coenzimaA puede atravesar para llegar al sitio activo. Los residuos importantes para la unión del sustrato son la His<sup>244</sup>, Arg<sup>207</sup> y Tir<sup>89</sup>.

En nuestro laboratorio se ha clonado un fragmento de DNA de *Saccharopolyspora erythraea* que contiene dos marcos de lectura (ORFs, No. de acceso en el GenBank AY117133) que se están traslapados en sus codones de término e inicio y cuyos productos presentaron 73, 71 y 60% de identidad con las proteínas MutA y MutB de *Amycolatopsis mediterranei*, *Mycobacterium tuberculosis* y con el gen *sbm* de *Escherichia coli*, respectivamente. El gen *mutA* presenta un porcentaje de G+C de 74.9% y codifica para una proteína de 613 aminoácidos con un peso molecular de 64.5 kDa. El de *mutB* presenta un contenido de G+C de 71.1% y codifica para una proteína de 748 aminoácidos con un peso molecular de 81.2 kDa. Estos dos ORFs se amplificaron y clonaron por separado en el plásmido pRSET para su expresión y posterior purificación de las proteínas a través de la cola de histidinas que se incluye en el plásmido. Después de la transformación de *E. coli* BL21(DE3)pLysS con las construcciones pRSET A::*mutA* y pRSET A::*mutB* se logró la expresión de los dos polipéptidos, los cuales posteriormente se purificaron por cromatografía de afinidad de metal inmovilizado con la resina ProBond. Las proteínas MutA y MutB eluyeron con una solución de imidazol 150 mM y 100 mM, respectivamente, lográndose una purificación de 100%. Con estas dos proteínas se reconstituyó el heterodímero, el cual presentó actividad de mutasa.

## II. INTRODUCCIÓN

---

Los antibióticos son un grupo de compuestos producidos por organismos como bacterias, hongos, plantas e insectos y poseen diferentes actividades biológicas como toxinas, antibacterianos, fungicidas, antitumorales, antiparasíticos, etc. [Katz y Donadio, 1993]. Desde el punto de vista antropocéntrico, los antibióticos más importantes son los que poseen actividad farmacológica. Más del 60 % de éstos son producidos por un grupo de bacterias conocidas como actinomicetos (o actinobacterias) lo cual puede dar una idea de la importancia de estos microorganismos.

Los antibióticos se han clasificado de acuerdo a su estructura química y un grupo importante son los policétidos que tienen un esqueleto de carbono formado a partir de ácidos carboxílicos simples. Los policétidos representan una fuente rica en compuestos activos con un amplio rango de aplicaciones además de su uso como antibióticos [Reynolds, 1998]. Actualmente se estudia su capacidad citotóxica, inmunosupresora, antitumoral, su utilización en el tratamiento de enfermedades como la diabetes tipo II y otras actividades biológicas [Huang, *et al.*, 2004; Tang, *et al.*, 2004; Liaw, *et al.*, 2003; Varoglu, *et al.*, 1995]. Uno de estos antibióticos comercialmente importante es la eritromicina A.

Este antibiótico se utiliza ampliamente en el tratamiento de enfermedades infecciosas causadas por bacterias Gram positivas y Gram negativas. Este antibiótico representa una alternativa clínica para pacientes que presentan alergia a las penicilinas, además del interés constante que existe en sus derivados semisintéticos de segunda y tercera generación ya que han demostrado tener una gran eficacia terapéutica y seguridad en su uso [Agouridas *et al.*, 1998].

*Saccharopolyspora erythraea* CA340 es una de las principales cepas de actinomicetos productoras de eritromicina A, la cual ha sido objeto de estudios genéticos y bioquímicos dirigidos a identificar y caracterizar a las enzimas y los genes involucrados en la biosíntesis del antibiótico, con la finalidad de incrementar su producción. La biosíntesis de eritromicina se divide en dos etapas.

Se ha reportado que el metilmalonil-CoA se puede generar por la isomerización del succinil-CoA a través de la metilmalonil-CoA mutasa (EC5.4.99.2; MCM) en diversos microorganismos. Otra ruta de formación del metilmalonil-CoA es por la carboxilación del propionil-CoA a través de la acción de la propionil-CoA carboxilasa, la cual se ha purificado a partir de *S. erythraea* previamente [Hunaiti y Kolattukudy, 1984b].

Desde el punto de vista biosintético, la clave de la producción se encuentra en las reacciones realizadas por la PKS, sin embargo, ha recibido poca atención la síntesis de estos dos precursores, principalmente el metilmalonil-Coenzima A.

Existen tres rutas principales que dan origen al MM-CoA, la primera por isomerización de succinil-CoA catalizada por la metilmalonil-CoA mutasa (MCM), enzima dependiente de la coenzima B<sub>12</sub>; la segunda por carboxilación de P-CoA, catalizada ya sea por la propionil-CoA carboxilasa (PCC) o por la metilmalonil-CoA transcarboxilasa (MMT); y la tercera por oxidación de isobutiril-CoA [Hunaiti y Kolattukudy, 1982; Hunaiti y Kolattukudy 1984a; Liu y Reynolds, 2001]. Tanto la actividad de MMT como la síntesis de MM-CoA a partir de isobutiril-CoA no han sido demostradas en *S. erythraea* CA340.

En relación a la propionil-CoA carboxilasa se ha reportado la clonación e interrupción del gen que codifica para esta enzima y los resultados indican que no es indispensable para la síntesis de metilmalonil-CoA, por lo que tampoco lo sería para la síntesis de eritromicina [Donadio *et al.*, 1996]. En este sentido, la ruta más probable de formación del metilmalonil-CoA es a través de la metilmalonil-CoA mutasa. Por otro lado, la sobreexpresión génica de MCM en *Streptomyces cinnamonensis* un productor de monensina A, resultó en un incremento de la producción del 32% comparado con la cepa silvestre [Zhang *et al.*, 1999].

Finalmente, el análisis metabólico de la producción de rifampicina, otro antibiótico macrólido de *Amycolatopsis mediterraneii* U32, demostró que la MCM es la principal enzima responsable de la formación de MM-CoA [Zhang *et al.*, 1999].

La metilmalonil-CoA mutasa es una enzima dependiente de adenosilcobalamina y se ha clonado de diversos organismos, incluyendo el humano [Jansen *et al.*, 1989; Roy y Leadley, 1992; Marsh *et al.*, 1989].



El análisis de la secuencia de aminoácidos de las enzimas metilmalonil-Coa mutasas han mostrado una similitud notable entre los diferentes organismos, aunque en mamíferos y en algunos microorganismos es un homodímero de aproximadamente 80 kDa y es codificada por un solo gen y en muchos otros como, *Streptomyces cinnamonensis*, la metilmalonil-CoA mutasa es heterodimérica formada por dos polipéptidos diferentes [Birch *et al.*, 1993].

En el laboratorio de la Dra. Flores se clonó un fragmento de DNA de *S. erythraea* CA340 que contiene 2 marcos de lectura, cuyos productos presentan identidad con las dos subunidades de la MCM de varios microorganismos [Luz-Madrigal, 2002], sin embargo es indispensable demostrar que estas dos proteínas llevan a cabo la isomerización del metilmalonilCoA a succinilCoA, por lo que el objetivo de este trabajo fue la clonación y expresión en *Escherichia coli* de los dos genes, así como la purificación de los dos polipéptidos para formar el heterodímero con actividad de mutasa.

### III. ANTECEDENTES

---

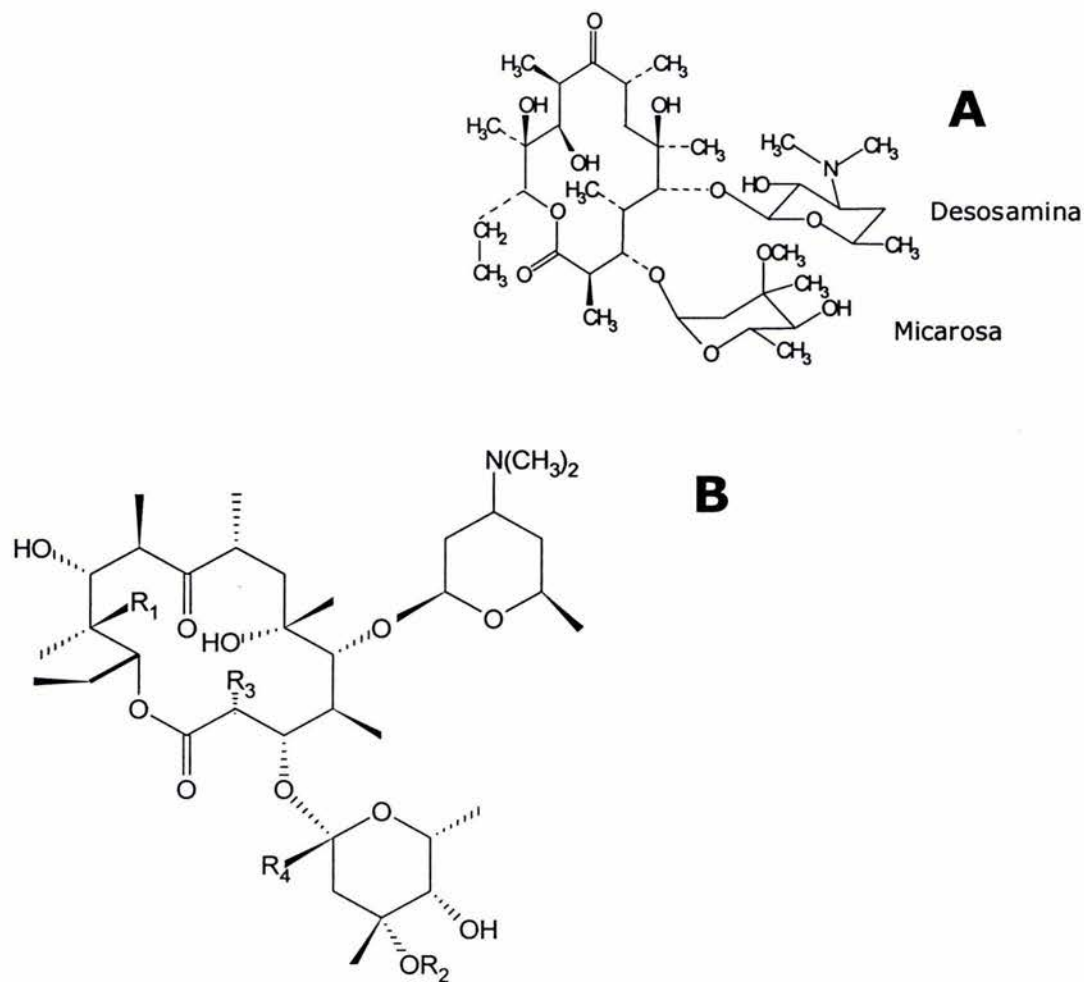
#### III. 1 Eritromicina A

La eritromicina A (ErA) es un antibiótico policétido macrólido no poliénico producido por *Saccharopolyspora erythraea* [Labeda, 1987], microorganismo aislado originalmente de una muestra de suelo (antes *Streptomyces erythreus*). Este compuesto se descubrió en 1952 y su estructura se identificó en 1957 y el análisis estereoquímico se realizó por cristalografía de rayos X en 1965 [McGuire *et al.*, 1952; Sakakibara y Omura, 1984].

La estructura química de la eritromicina consiste de un anillo lactónico macrocíclico constituido por 13 átomos de carbono, al cual se unen dos moléculas de desoxiazúcares mediante enlaces glicosídicos [Wolfgang, 1994]. *S. erythraea* CA340 además de sintetizar eritromicina A, produce una serie de análogos (B, C, D, E y F) cuya diferencia estructural radica en los sustituyentes de la molécula (Fig. 1). A pesar de las similitudes estructurales de dichos análogos, su actividad biológica como antibiótico difiere, siendo la eritromicina A la más importante desde el punto de vista comercial y clínico [Staunton y Wilkinson, 1997]. La actividad biológica de este antibiótico policétido depende de la presencia y tipo de residuos de desoxiazúcares enlazados al anillo macrolactónico [Gaisser *et al.*, 2000].

*Saccharopolyspora erythraea* CA340 es un actinomiceto con un alto contenido de G y C en su genoma (>70%). Este microorganismo es el principal productor de eritromicina A lo que ha permitido utilizarla como modelo de estudio para la biosíntesis de policétidos [Donadio *et al.*, 1991; Donadio y Katz, 1992]. Los estudios moleculares y manipulaciones genéticas de *S. erythraea* han permitido el entendimiento de sistemas enzimáticos complejos que permiten la formación de numerosos compuestos macrólidos [Hershberger, 1996; Katz y Donadio, 1993].

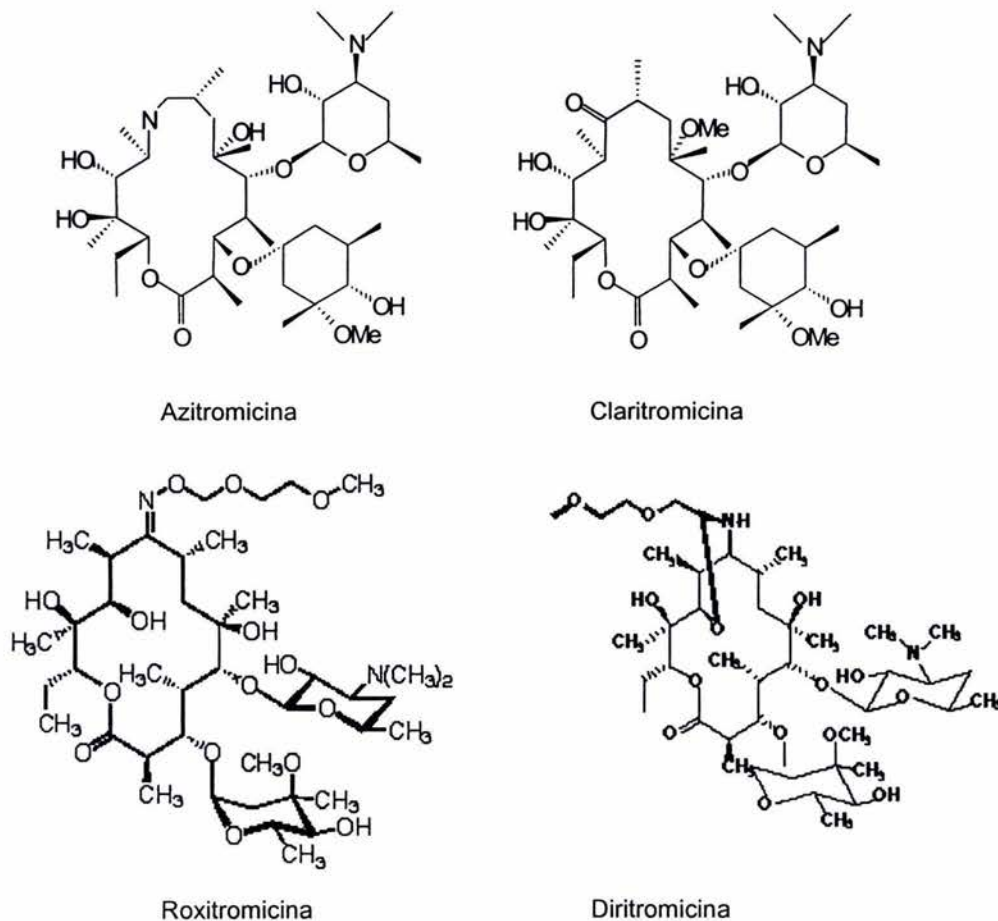
**Fig. 1. Estructura química de la eritromicina A y sus análogos.**  
**A: Eritromicina A. B: Análogos de eritromicina A.** [Higashide, 1984; Neuzil y Hostalek, 1986].



MOLÉCULA	SUBSTITUYENTES			
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
Eritromicina B	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H
Eritromicina C	OH	H	CH <sub>3</sub>	H
Eritromicina D	H	H	CH <sub>3</sub>	H
Eritromicina E	OH	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	-O
Eritromicina F	OH	CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> OH	H

El uso industrial de *S. erythraea* para la producción fermentativa de eritromicina A se ha incrementado en los años recientes, debido al aumento en la demanda para la producción semisintética de una variedad de moléculas de eritromicina de segunda generación entre las que se incluyen: claritromicina, azitromicina, roxitromicina y diritromicina (Fig. 2) [Agouridas *et al.*, 1998].

Las modificaciones de estos derivados semisintéticos mejoran la estabilidad ácida en el estómago, la absorción en el tracto digestivo y en el tejido de penetración; así como un espectro antibacteriano más amplio [Cervin, 2001].



**Fig. 2. Antibióticos de segunda generación derivados de la eritromicina.**

### III.2 Actividad biológica de ErA y su importancia clínica

La ErA tiene un espectro de acción que abarca cocos y bacilos, tanto Gram positivos como negativos, aunque su actividad parece ser bacteriostática posee capacidad bactericida a concentraciones altas contra microorganismos muy sensibles. Experimentos *in vitro* muestran que la concentración mínima inhibitoria (MIC) sobre cepas sensibles de *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus pneumoniae* es de 0.015 a 1.0 mg/ml.

Los estreptococos del grupo *viridans* se inhiben a concentraciones de 0.06 a 3.1 mg/ml. Los bacilos Gram positivos también son sensibles a eritromicina y los valores de MIC son de 1 µg/ml para *Clostridium perfringens*, de 0.2 a 3 µg/ml para *Corynebacterium diphtheriae* y de 0.25 a 4 µg/ml para *Listeria monocytogenes*. También la ErA presenta actividad contra bacilos Gram negativos que incluyen a *Haemophilus influenzae* (MIC, 1 a 32 µg/ml) y *Neisseria meningitidis* (MIC, 0.4 a 1.6 µg/ml) y una excelente actividad contra casi todas las cepas de *Neisseria gonorrhoeae* (MIC, 0.12 a 2.0 µg/ml). Se observa también acción antibacteriana contra especies de *Borrelia*, *Bordetella pertussis*, *Campylobacter jejuni* y *Mycobacterium pneumoniae* [Steigbigel, 1995].

En los últimos años ha existido un considerable interés en la interacción entre los antibióticos macrólidos y el sistema inmune, particularmente en la acción antiinflamatoria de la eritromicina y sus derivados [Cervin, 2001; Rubin y Tamaoki, 2000; Schultz *et al.*, 2001; Zohnhofer *et al.*, 2004].

Evidencias de los estudios *in vitro* así como en casos clínicos, muestran que los macrólidos reducen la virulencia y daño al tejido causado por una colonización bacteriana crónica sin erradicación de los agentes causales [Labro y Abdelghaffar, 2001]. La actividad inmunorreguladora de la ErA y otros macrólidos es una respuesta dependiente de la dosis, que favorece la liberación o inhibición de la producción de interleucinas 10, 8, 6, interferón-gamma, factor transformador del crecimiento tumoral beta y factor de necrosis tumoral alfa. Se manifiesta también una inhibición de la expresión de moléculas de adhesión intracelular esenciales para el reclutamiento de células involucradas en el mecanismo de inflamación [Cervin, 2001; Rubin y Tamaoki, 2000]. Por otra parte, la regulación

de los genes involucrados en la expresión de mediadores involucrados esta dirigida por el factor de transcripción nuclear. La ErA participa en la activación transcripcional de este factor en células T humanas activadas [Zohlhofer *et al.*, 2004]. El efecto antiinflamatorio de los antibióticos macrólidos está dirigido directamente sobre la expresión del factor de transformación del crecimiento beta y es la clave de la actividad proinflamatoria del factor de transcripción nuclear kappa B [Wallwork *et al.*, 2004].

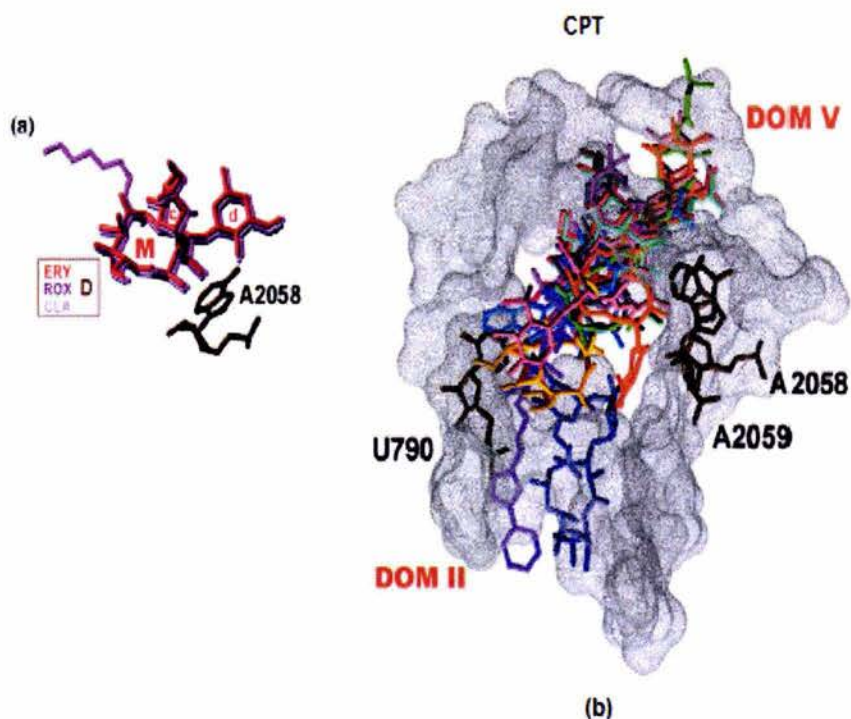
### **III. 3 Mecanismo de acción de la ErA**

El mecanismo de acción de la ErA consiste en inhibir la síntesis de proteínas al ligarse en forma reversible a las subunidades ribosómicas 50 S de los microorganismos sensibles (Fig. 3) [Brisson-Noël *et al.*, 1988]. Se ha demostrado que la ErA interfiere en la unión del cloranfenicol que también actúa en dicho sitio. Además, la resistencia que presentan algunos microorganismos es debida a mutaciones en el gen que codifica dicha subunidad ribosómica [Corcoran, 1981].

Se ha postulado que la ErA no inhibe de manera directa la formación de los enlaces peptídicos, si no más bien bloquea la fase de translocación y con ello la cadena de péptido recién formada, que temporalmente se encuentra en el sitio A de la reacción de transferasa y que no se desplaza al sitio P o sitio donador. Otra posibilidad de acción es que pueda unirse al ribosoma y generar un cambio conformacional que termine la síntesis de proteína al interferir de modo indirecto en la transpeptidación y translocación [Weisblum, 1995].

### **III.4 Biosíntesis de ErA**

Como ya se mencionó, la biosíntesis de ErA se lleva a cabo en dos etapas. En la primera etapa la policétido sintasa (PKS) cataliza la condensación de una unidad de propionil-CoA (P-CoA) (1) y seis unidades de metilmalonil-CoA (MM-CoA) (2) para dar 6-desoxieritronólido B (6-DEB) (3), el intermediario más importante de la ruta biosintética (Fig. 4) [Staunton y Wilkinson, 1997].

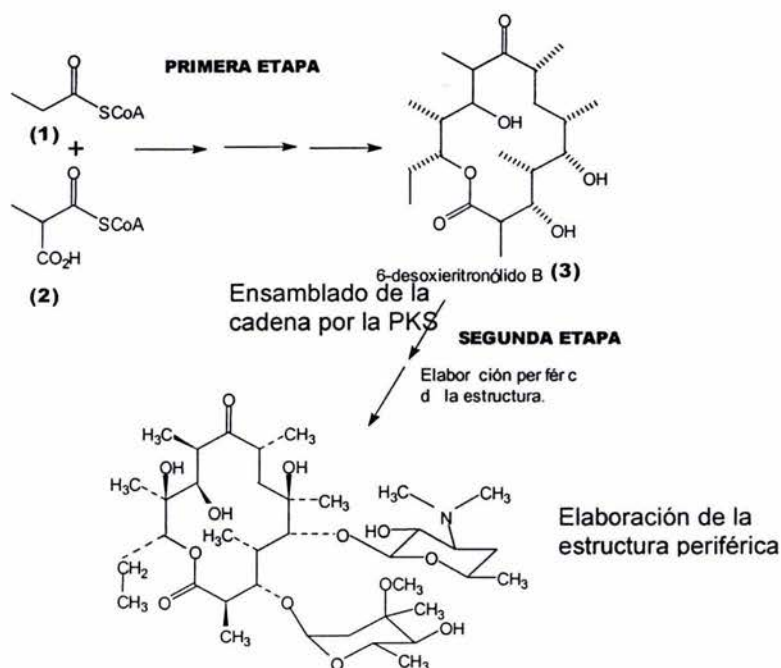


**Fig. 3. Sitio de unión de los antibióticos macrólidos a la subunidad 50S del ribosoma de *Deinococcus radiodurans*.** (a) Sobreposición de la estructura química de la eritromicina, roxitromicina, claritromicina y localización del nucleótido A2058, clave para la unión, selectividad y resistencia a los antibióticos (M= anillo lactónico, d= desosamina, c= cladinosa). (b) Localización de los antibióticos en una sección del túnel del ribosoma (gris). Las posiciones de los nucleótidos claves para la unión de los macrólidos en los dominios V (Dom V) y II (Dom II) están señalados. Para orientación, la posición aproximada del centro peptidil transferasa (CPT) está arriba (Auerbach *et al.*, 2004).

En la segunda etapa, el 6-DEB se modifica en una serie de reacciones catalizadas por hidroxilasas, glucosil transferasas y metil transferasas. Desde el punto de vista biosintético la clave de la biosíntesis se encuentra enfocada en las operaciones realizadas por la PKS en la primera etapa y por la disponibilidad de precursores provenientes del metabolismo primario. Sin embargo, las reacciones posteriores en la segunda etapa resultan importantes para proporcionar la actividad antimicrobiana a la molécula (Fig. 5).

Muchas de las investigaciones llevadas a cabo en las etapas posteriores a la formación del 6-DEB se han realizado utilizando mutantes, las cuales son incapaces de producir una de las enzimas que catalizan la conversión de los intermediarios de la ruta biosintética [Weber *et al.*, 1985]. Esto permitió la acumulación de tales compuestos en cantidades suficientes para ser aislados e identificados (Fig. 5).

La hidroxilación en C-6 de 6-DEB se lleva a cabo con retención de la configuración. La enzima responsable EryF, es un citocromo P450 hidroxilasa la cual ha sido sobreproducida en *Escherichia coli* [Andersen y Hutchinson, 1992].



**Fig. 4. Biosíntesis de eritromicina A por *Saccharopolyspora erythraea*.**

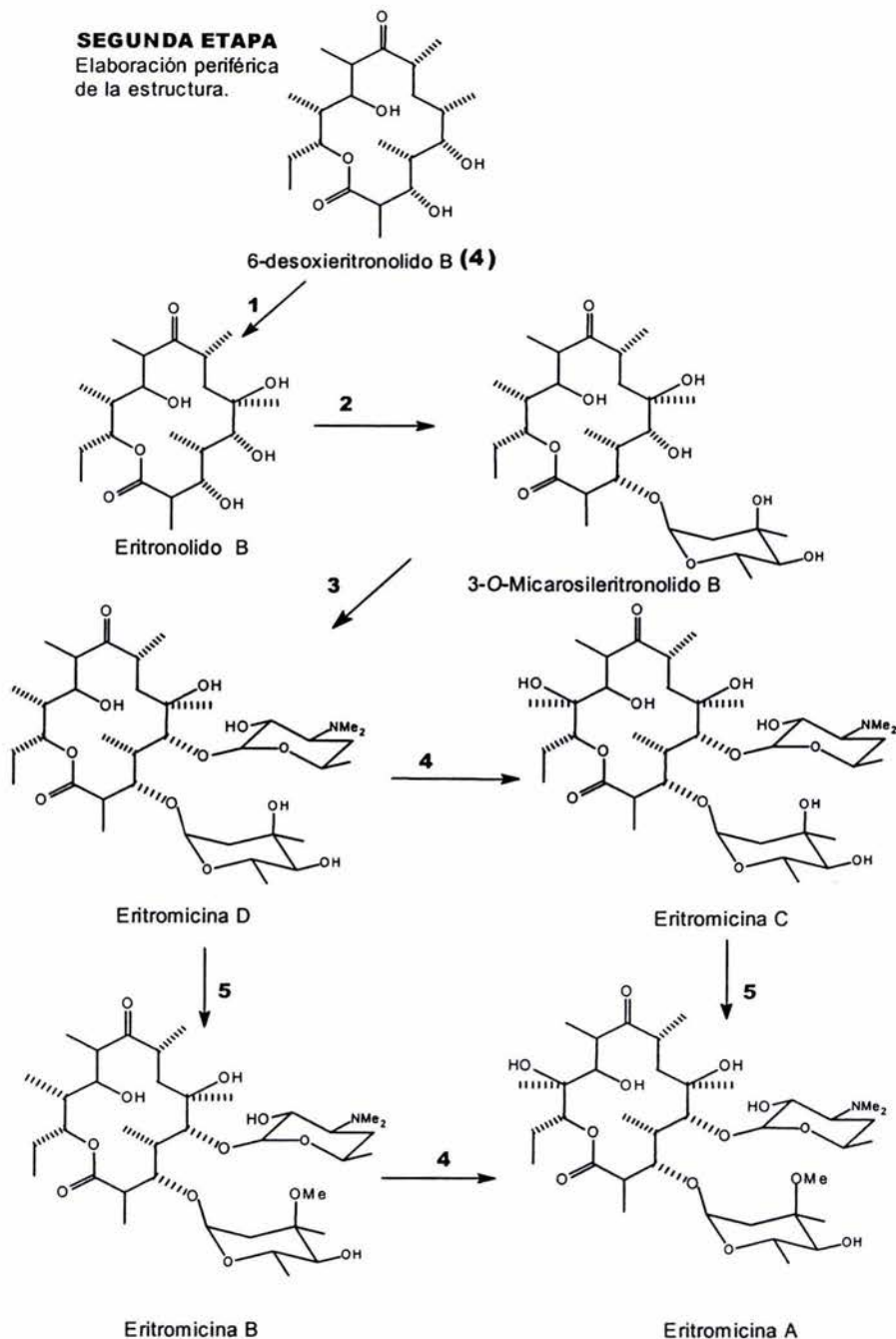
**Primera etapa:** la síntesis del anillo macrólido de 14 átomos de carbono (6-DEB) (3), ocurre mediante una secuencia de reacciones de condensación de una unidad de P-CoA (1) y seis unidades de MM-CoA (2).

**Segunda etapa:** el 6-DEB es modificado mediante enzimas hidroxilasas, glucosiltransferasas, metilasas, etc. para proporcionar ErA como el producto bioactivo de mayor importancia [Staunton y Wilkinson, 1997].



**SEGUNDA ETAPA**

Elaboración periférica de la estructura.



**Fig. 5. Compuestos intermediarios en la elaboración periférica de la eritromicina. 1, C-6 eritronólido hidroxilasa; 2, TDP-micarosa glicosiltransferasa; 3, TDP-desosamina glicosiltransferasa 4, C-12 hidroxilasa; 5, (O)-metiltransferasa. [Staunton y Wilkinson, 1997].**

En la siguiente etapa el monosacárido L-micarosa se une al grupo hidroxilo del C-3 mediante una TDP-micarosa glicosiltransferasa. El aminosacárido D-desosamina se adiciona al grupo hidroxilo de C-5 mediante la enzima TDP-desosamina glicosiltransferasa [Vara *et al.*, 1989]. El intermediario resultante, ErD es el primero en mostrar una actividad antimicrobiana.

La fase siguiente puede continuar ya sea por una hidroxilación en C-12 con retención de la configuración para producir ErC o una O-metilación en el hidroxilo de C-3'' de la micarosa, catalizada por la O-metiltransferasa para producir ErB. Finalmente la ErA puede generarse ya sea mediante una O-metilación de ErC, catalizada por O-metiltransferasa o una hidroxilación de C-12 por una hidroxilasa sobre la ErB [Stassi *et al.*, 1993]. El análisis posterior sobre la actividad de hidroxilación en C-12 por EryK mostró que existe una afinidad de 1200 a 1900 veces mayor sobre ErD en comparación al sustrato alternativo ErB, tales resultados indicaron que la ErA se deriva principalmente de ErD [Lambalot *et al.*, 1995].

A la fecha se han identificado una O-metiltransferasa y una citocromo P450 hidroxilasa implicadas en la ruta [Paulus *et al.*, 1990; Andersen y Hutchinson, 1992].

Los azúcares timidina difosfo-L-micarosa y timidina difosfo-D-desosamina se sintetizan a partir de difosfo-D-glucosa y unidos enseguida al 6-DEB. La enzima timidina difosfo-D-glucosa 4,6 dehidratasa se ha purificado y la epimerización de timidina difosfo-4-ceto-6-desoxi-D-glucosa se asume por analogía con las otras L-hexosas [Summers *et al.*, 1997].

### **III. 5 Rutas de formación de P-CoA y MM-CoA**

El metabolismo primario de los microorganismos involucra reacciones catabólicas y anabólicas lo que resulta en un incremento de la biomasa; es decir, las reacciones que permiten la producción de energía y poder reductor necesario para sintetizar los bloques de construcción de proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y polisacáridos estructurales, además de materiales de almacenamiento.

Los metabolitos que se generan en el metabolismo tienen una función ulterior y algunos de ellos pueden ser útiles biotecnológicamente. El metabolismo secundario, por otro lado, resulta en la síntesis de compuestos importantes como los antibióticos que son producidos principalmente por los actinomicetos por lo que estos microorganismos se han estudiado ampliamente.

Existe mucha información disponible en el estudio de la acción de PKS [Staunton y Wilkinson, 1997; Hopwood, 1997], sin embargo no se ha logrado aumentar la producción del antibiótico llevando a cabo una manipulación de genes individuales. Estudios anteriores han demostrado que la formación del anillo lactónico de la ErA se encuentra limitada por la disponibilidad de los precursores provenientes del metabolismo primario tales como MM-CoA y P-CoA, a pesar de ésto, los procesos que operan durante la transición de metabolismo primario al metabolismo secundario no han sido del todo descritos. En actinomicetos, el P-CoA y el MM-CoA tienen diversos orígenes metabólicos como son: el catabolismo de ácidos grasos de número impar, el rearreglo del succinil-CoA y el catabolismo de los aminoácidos metionina, treonina o valina [Tang *et al.*, 1994; Vrijbloed *et al.*, 1999; Wallace *et al.*, 1995].

En *S. erythraea*, las evidencias indican que la principal forma de generar P-CoA es mediante la descarboxilación de MM-CoA mediante una reacción catalizada por la enzima metilmalonil-CoA descarboxilasa [Hunaiti y Kolattukudy, 1984b]. Por otro lado, el MM-CoA puede ser obtenido ya sea, mediante isomerización de succinil-CoA, un intermediario del ciclo de Krebs, por medio de una enzima dependiente de adenosilcobalamina, la metilmalonil-CoA mutasa (MCM) o por carboxilación de P-CoA por medio de la propionil-CoA carboxilasa (PCC), [Hunaiti y Kolattukudy, 1984a; Hunaiti y Kolattukudy, 1982, Donadio *et al.*, 1996].

Por otro lado, el aislamiento de mutantes en el gen *pccB* que codifica para la cadena  $\beta$  de la propionilCoA carboxilasa demostraron que ésta no fue requerida para la producción de eritromicina en un medio complejo [Donadio *et al.*, 1996]; mientras que se observó una inhibición de la síntesis de eritromicina por la interrupción del gen *eryM* que codifica para metilmalonil-CoA descarboxilasa [Hsieh y Kolattukudy, 1994]. Tales resultados sugieren que la metilmalonil-CoA mutasa y metilmalonil-CoA descarboxilasa parecen ser las

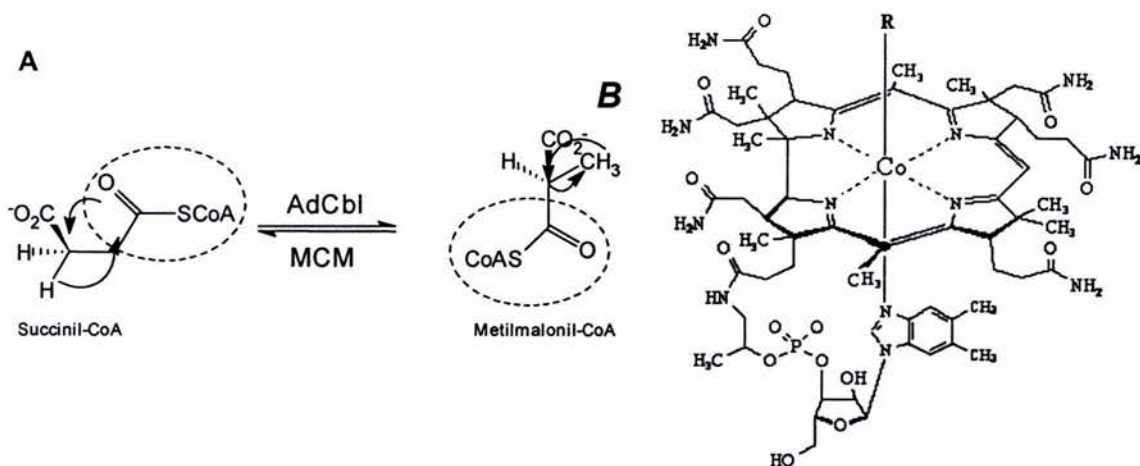
enzimas clave para la producción de los precursores para la biosíntesis del antibiótico eritromicina.

Estudios experimentales en *S. erythraea* han demostrado que la producción de eritromicina se afecta tanto por parámetros fisiológicos como nutricionales, tales como la fuente de carbono, nitrógeno, fosfatos y la temperatura [Bermúdez *et al.*, 1998; Flores y Sánchez, 1985]. A pesar de que ha existido un rápido incremento en el conocimiento de la genética molecular del metabolismo secundario, incluyendo muchos sistemas y la caracterización de genes regulatorios y sus productos, poco se ha investigado acerca de la disponibilidad de precursores suficientes para producir el antibiótico. En este sentido, se sabe que los iones amonio disminuyen la biosíntesis de tilosina y de espiramicina, por interferencia con el catabolismo de aminoácidos tales como valina, treonina, leucina e isoleucina [Vu-Trong y Gray, 1987; Shapiro y Vining, 1983]. Bajo estas condiciones estos aminoácidos no producen suficientes precursores tales como acetato, propionato e isobutirato para ser utilizados en la formación del anillo aglicona. Por otro lado, estudios previos en *S. erythraea* CA340 mostraron que no se utilizan la valina, la metionina ni el triptofano, como fuentes de nitrógeno para crecimiento y por lo tanto el P-CoA no puede generarse a partir de valina o metionina, comprobando así que la descarboxilación de MM-CoA es la única vía de formación de P-CoA [Bermúdez *et al.*, 1998 ].

### **III. 6 Metilmalonil-CoA mutasa**

Uno de los principales bloques de construcción utilizados con más frecuencia por las PKS tipo I es el MM-CoA, cuya incorporación permite la formación del 6-DEB en la ruta biosintética de eritromicina (Figs. 4, 5 y 11). Debido a que varias moléculas de MM-CoA son necesarias para la construcción de una sola molécula de eritromicina, la producción de MM-CoA parece representar un elemento clave del metabolismo intermediario para la producción del antibiótico [Hunaiti y Kolattukudy, 1984a].

La conversión de succinil-CoA a 2(R)-MM-CoA la cataliza una enzima dependiente de adenosilcobalamina (AdoCbl) denominada metilmalonil-CoA mutasa (MCM, EC 5.4.99.2) (Fig. 6).



**Fig. 6. A. Reacción catalizada por la MCM y B. Estructura de la adenosilcobalamina [Ludwig y Matthews, 1997].**

La MCM es un miembro de una familia de enzimas que usan adenosilcobalamina y es el único ejemplo de esta familia que está presente en mamíferos y bacterias. La enzima bacteriana es un heterodímero  $\alpha\beta$  de peso molecular aproximado de 150 kDa (79-85 para la cadena grande y 67-70 para la cadena pequeña) con un sitio activo localizado en la cadena mayor [Francalanci *et al.*, 1986; Miyamoto *et al.*, 2002]. En contraste, la enzima de mamíferos es un homodímero con dos sitios activos (72-78 kDa por subunidad) [Fenton *et al.*, 1982] y presenta una alta identidad con la cadena mayor de las bacterias (aproximadamente 60% de identidad en la secuencia) [Mancia y Evans, 1998]. Una excepción son las enzimas provenientes de *Escherichia coli* [Haller *et al.*, 2000], *Agrobacterium tumefaciens*, *Brucella melitensis*, *Brucella suis* [Miyamoto *et al.*, 2003] y de *Sinorhizobium meliloti* [Charles y Aneja, 1999], las cuales son proteínas de un solo polipéptido, aunque hay poca información disponible acerca de sus propiedades enzimáticas.

Los genes que codifican para la MCM de *Propionibacterium shermanii* [Marsh y Leadlay, 1989], de humanos [Jansen *et al.*, 1989], de ratón [Wilkemeyer *et al.*, 1990], de *Escherichia coli* [Roy y Leadlay, 1992], de *Porphyromonas gingivalis* W50 [Jackson *et al.*, 1995], de *Euglena gracilis* Z [Watanabe *et al.*, 1996], de *Methylobacterium extorquens* [Miyamoto *et al.*, 2002] y de *Sinorhizobium meliloti* [Trevor y Punita, 1999] se han clonado y secuenciado. Sin embargo, los únicos genes que codifican para la MCM de microorganismos productores de antibióticos reportados son los de *S. cinnamomensis*, productor de monensina A [Birch *et al.*, 1993] y de *Amycolatopsis mediterranei* U32 un productor de rifamicina [Zhang *et al.*, 1999].

Por otro lado se ha encontrado que los genes que codifican para las dos subunidades de la MCM se encuentran adyacentes en *Propionibacterium freudenreichii* (*P. shermanii*) [Marsch *et al.*, 1989], en *Porphyromonas gingivalis* [Jackson *et al.*, 1995], en *Streptomyces coelicolor* [GenBank AL939129], en *Streptomyces avermitilis* [GenBank NC003155], en *Mycobacterium tuberculosis* [Cole *et al.*, 1998], en *Mycobacterium leprae* [AL583923], en *Mycobacterium bovis* [GenBank NC002945], en *Corynebacterium glutamicum* [AP005278], en *Amycolatopsis mediterranei* [Zhang *et al.*, 1999] y en *Streptomyces cinnamomensis* [Birch *et al.*, 1993]. En los dos últimos microorganismos, los dos genes (*mutA* y *mutB*) se sobreponen en el codón de término e inicio, lo que sugiere un acoplamiento traduccional para obtener cantidades estequiométricas de ambos polipéptidos para la formación del heterodímero. El análisis de la secuencia de las dos subunidades ha mostrado que existe similitud entre éstas y además la alta similitud entre las subunidades mayores de fuentes tanto bacterianas como eucarióticas sugieren que la MCM se ha conservado durante la evolución [Zhang *et al.*, 1999].

La MCM de *P. freudenreichii* es la única que se ha cristalizado y por lo tanto ha servido de modelo para las demás debido a la alta identidad entre las mutasas reportadas [Mancia *et al.*, 1996]. En esta proteína se han identificado varias regiones que se encuentran conservadas; una en el extremo amino terminal, entre los aminoácidos 90 y 393 donde se encuentra el dominio de unión al sustrato.

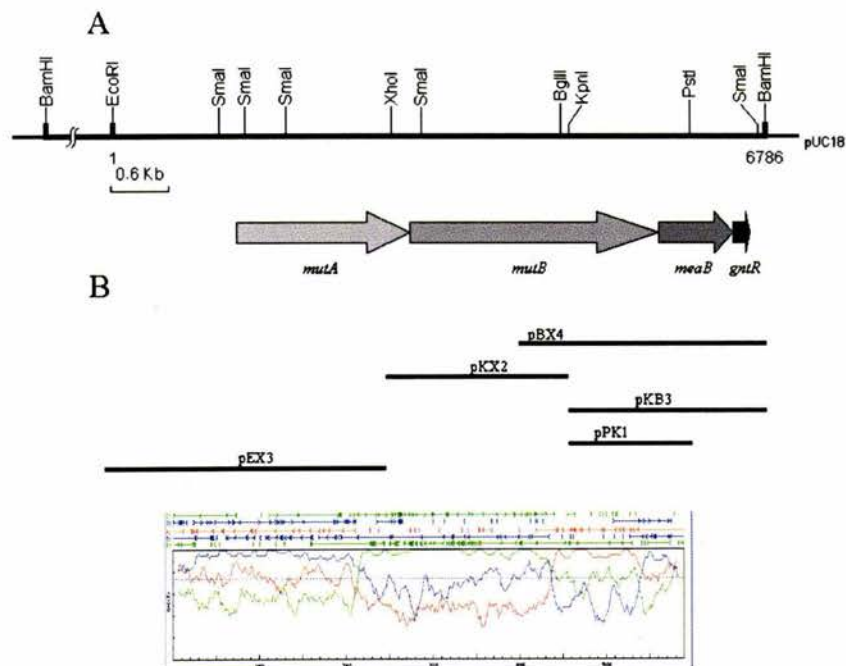
Esta es una región con estructura de barril ( $\alpha/\beta$ )<sub>8</sub>, el cual es precedido por un segmento extendido que envuelve a la subunidad pequeña. Este segmento contiene aminoácidos pequeños, hidrofílicos, de cadena lateral corta, principalmente serinas y treoninas, que crean una cavidad, a través del cual la coenzima A puede atravesar para llegar al sitio activo. Se ha reportado que en la enzima de *P. freudenreichii*, los residuos His<sup>244</sup>, Arg<sup>207</sup> y Tir<sup>89</sup> son importantes para la unión del sustrato [Mancia *et al.*, 1999]. Esta región está seguida por una larga región linker (de cerca de 160 residuos) que encierra el dominio barril y conecta el dominio C-terminal.

En el dominio C-terminal se ha localizado otra región conservada, la cual es un motivo de unión a vitamina B<sub>12</sub> (D-X-H-X-X-G, GG y G) [Drennan *et al.*, 1994; Ludwig *et al.*, 1996; Ludwig y Matthews, 1997). Existe otra secuencia altamente conservada (RIARNT) que se ha identificado en todas las mutasas secuenciadas, sin embargo no se conoce hasta la fecha su función.

Por lo que respecta a la MCM de *S. erythraea*, Hunaiti y Kolattukudy (1984a) reportaron la purificación parcial de la enzima a partir de extractos libres de células de este microorganismo y mostró una banda principal con un peso molecular de 63 KDa en geles de poliacrilamida con SDS, lo que sugiere que la enzima esta formada por un solo polipéptido, lo que no concuerda con los datos reportados para otras mutasas de actinomicetos.

Para comprobar estos datos en el laboratorio de la Dra. Flores se clonó un fragmento del cromosoma de *S. erythraea* de 16.5 kb (Fig. 7) que contiene dos ORFs que podrían ser los genes *mutA* y *mutB* correspondientes a las dos subunidades de la MCM, ya que los productos obtenidos por traducción *in silico* de las secuencias nucleotídicas (Fig. 8), presentan elevada identidad con los dos polipéptidos de otras mutasas (Fig. 9; GenBank AY117133). El análisis de las secuencias mostró que la que codifica para la subunidad menor de MCM (*mutA*) presenta un codón de término de la transcripción en el nucleótido 1810, tiene un porcentaje de G/C de 75% y codifica para una proteína de 603 aminoácidos, con un peso molecular de 66 kDa. El gene *mutB* se encuentra precedido de un sitio de unión a ribosoma típico de *Streptomyces* e inicia en el nucleótido 1809; codifica para una proteína de 748 aa con una masa molecular de 82 kDa.

Estos dos ORFs se superponen en sus codones de inicio y término, lo que sugiere un acoplamiento traduccional y por lo tanto la producción estequiométrica de los respectivos polipéptidos, tal como se encontró en *A. mediterranei* y *S. cinnamomensis* (Zhang *et al.* 1999; Birch *et al.*, 1993). La probable subunidad menor de la MCM de *S. erythraea* mostró un 23% de similitud con su propia subunidad mayor, principalmente en las regiones medias de cada una. Así mismo, como ya se mencionó la secuencia de aminoácidos de la subunidad mayor mostró un alto porcentaje de identidad con las subunidades grandes de *S. cinnamomensis*, de *A. mediterranei*, de *P. freudenreichii*, de *Mycobacterium tuberculosis* y de *Streptomyces coelicolor* entre otros (Fig. 9). En esta probable subunidad grande de la MCM de *S. erythraea* se han localizado las regiones correspondientes a los dominios de unión al sustrato y a la vitamina B<sub>12</sub> [Luz-Madrigal, 2002]. Estos resultados sugieren que la metilmalonil-CoA mutasa de *S. erythraea* está formada por dos subunidades, lo que no concuerda con los datos reportados por Hunaiti y Kolattukudy [1984<sup>a</sup>].



**Fig. 7.** Mapa de restricción de la región *mutA-gntR* de *S. erythraea* (A), la estrategia de subclonación (B) y el orden y la orientación de los cuatro ORFs identificados de la secuencia de nucleótidos (C).



Río abajo de los dos genes *mutA* y *mutB* se encontraron otros dos ORFs, el primero de los cuales está separado de *mutB* únicamente por dos pares de bases y además se encuentran traslapados en un nucleótido. El ORF3 consiste 987 nucleótidos y la secuencia de aminoácidos deducida mostró 73, 71 y 60% de identidad con el ORF5 de *A. mediterranei* [Zhang *et al.*, 1999], con el ORF5 de *Mycobacterium tuberculosis* [Cole *et al.*, 1998] y con un ORF localizado a 0.8 kb río abajo del gen *sbm* (metilmalonil-CoA mutasa) de *E. coli*, respectivamente [Roy y Leadlay, 1998]. Mostró también 90% de identidad con ArgK de *Corynebacterium glutamicum* y de *Mycobacterium leprae* y 82% con la proteína MeaB de *Methylobacterium extorquens* [Korotkova *et al.*, 2002]. La proteína ArgK presenta actividad de GTP/ATPasa [Haller *et al.*, 2000].

El último ORF consiste de 359 nucleótidos y la secuencia de aminoácidos mostró identidad con reguladores transcripcionales de la familia GntR [Rigali *et al.*, 2002]. Por otro lado, Charles y Aneja [1999] también reportaron la existencia de un gen *bhbA*, cuyo producto también presenta identidad con los reguladores de la familia GntR, inmediatamente río abajo del gen MCM de *Sinorhizobium meliloti*. Este ORF de *S. erythraea* está precedido por una potencial secuencia de unión a ribosomas de estreptomicetos, GGAG, en los nucleótidos 5385-5388. Después se encuentran dos estructuras de horquilla, probables señales de terminación de la transcripción (nt 5751-5781 y 5834-5852).

```

1      GGTCTCGGAGTCGGCGGTCCCGGTGCGGTGACGGCGGCTGCGCAAGGCGCACCGGCTGCCGGGCGCGGGACCGACGAGCTGACACTGGTGGGTGGTC
100     F S E S A V P V R C R R L R O G A P A A G R G T D E L T L V G G R
      GTTCGGTGCACCTCGCGGTGCGGGACGTCCCGCGCGGCGTGTCTCGGGATCGCCTGGGACTGGGACTGAggcgcccgggcggcgtctgcccctgtccggc
199     S V H L A V R D V P R G V L G I A W D W D
      tgcgacaagcgtcacacgatccccgggcccgggcccaccgctaccatcctgttcATGGTGGCGCACTCGACGACGAGCCAGGCGCGGAGCTGCCCC

                                     ORF1 mutA --> M V A H S T T S D G P E L P L
298     TGGCGGCCGAGTTCGCCGAGCCCGCCCGGCGAGCAGTGGCGCAACAGGTGGAGAAGTCTTGCACAGGTCGGGTCTGCTGCCGAGGGGCAGGCCCGCGC
      A A E F P E P A R O O W R O O V E K V L R R S T G L L P E G R P A P
397     CGGAGCCGGTTCGAGGACGTGCTCGCCAGCGCCACTACGACGGCATCACCGTGCACCCGCTCTACACCGAGGGTCCCGCATCCAGCGGCGTCCCGGGCC
      E P V E D V L A S A T Y D E I T V H P L Y T E G P A S S G V P G L
496     TGGCGCCCTACGTGCGCGGCGCCGGGCGCGGGCTCGCTCAGCGAGGGCTGGGACGTCGCCAGCACCCCGCCACCCCGACGCTCGGAGACCAACC
      A P Y V R G S R A O G C V S E G W D V R O H H A H P D A S E T N R
595     GCGAGATCCTGGCCGACCTTACAAACGCAAGACCTCGCTGTGGCTGGAGCTCGGGCCGACCGGGCTGCGGGTGGACTCGCTGGCCGACGCCCTCGAAG
      E I L A D L Y N G T T S L W L E L G P T G L P D S L A D A L E G
694     GCGTCCACCTGGACATGATCGGCGTCTGCTCGACGCGGTTGACGAGGGCGGGCCGCGTGGCTGGCTGGAGTTCGGCGGGAGGAGGGGGTGC
      V H L D M I G V V L D A G D E A A R A A S A L L E L A R E O G G V R
793     GGCCAGCGCGTGGCGCCAACCTGGCGCGGACCCGCTGAGCACCTGGGCTCGCACCGGGCAGGACCGACCTGGGCCCTCGCCGCGGAGGCTCGGCTCGCA
      P S A L R A N L G A D P L S T W A R T G O E R D L G L A A E V A A
892     CGCACTGCGCGTGCACCCGGGCTGCGCGCGATCACCGTGCAGGGCTGCCCTACACAGGGCGGGCGGCTCCGACCGAGGAGCTCGGCTGCTCGA
      H C A S H P G L R A I T V D G L P Y H E A G G S D A E E L G C S I
991     TCGCCGCGGGGCTCACCTACCTGCGGGTGTGGCGGTGAGTTCGGTGGCGGAGGCGGGGCTGCTGGAGTCCGCTACGCCGACCCGCGGAGG
      A A G V T A Y L L A G E L G A E A A S G L L E F R Y A A T A D Q
1090    AGTTCCTGACCTCGCAAGTTCGCGCGGCGGCGAGGCTGCGGAGGGGAGTGCAGCGGGGAGATCGGCGTCCGCGAGCGCGGAGCTCGCAGCAGCGG
      F L T T I A K L R R A A R R L W E R V T R E I G V A E R A O L O H A V
1189    TCACCTCTCGCGGATGCTGACGCGCGCGACCCGCGGCTGAACATGCTGCGCACACGATCGCCACGTTCCGCGCAGGCGTGGCGGCGCGGCTCGG
      T S S A M L T R R D P W V N M L R G T T I A T F A A G V A R S V
1288    TCACCTGCGCCGTTCCGACGCGCGATCGGCGGACCCCTTCCCGGCTCGCCGCAACACCCAGTCTGCTGGAGGAGTGCACCC
      T V R P F F D A A I G L P D P I A R N T O S L L L E E S H L
1387    TGGCGAGGTTCGACCCGGGCGGTTCTCGTTCGTCGAGACCTGACCGACGAACTGGCGCACAGGGCTGGGAGTGGTTCGGCGGCTCGGAGG
      A O V I D P P A G C S W Y V E T I T D E L A H K A W E W F R R I E A
1486    CCGAGGCGGGGCTGCCGCGCGCTGCTGGTCTGGTGGCGGACCGGCTCGCGAGACTGGCAGCGCGGGACCGGCTCGCCACCCACCG
      E G G L P A A L R S G L V A D R L A E T W Q R R R D A V A H R T D

```



Kunan MLRAKI-----QLPILLSPHYLQKINPESR-----NRLLLQOOLMKNPENAALAKKQKQKIN-----PEDLIWNTFPGISIKPLYRYRINDLF-----E-----ELPGVYKPTFGYPTMYTFRPN  
Houze MLRAKI-----QLPILLSPHYLQKINPESR-----NRLLLQOOLMKNPENAALAKKQKQKIN-----PEDLIWNTFPGISIKPLYRYRINDLF-----E-----ELPGVYKPTFGYPTMYTFRPN  
S.c -----MIIPEFDEIIEIGAGG-----FSSASQNRRAVKESSVGS-----ESDILMETPBGIAVKPLYTGADVGLDPLS-----TYGVAFYLRGYPYMYVWQPN  
A.n -----MTIRFAGLDELTPS-----RGRDAGARAVEMTQK-----PCALAMETPBGIVKPKYTAADLSTVDVFG-----TYGIAFFLRGYPYMYVWQPN  
H.t HTTYTP-----VIGSFAQVPLHSEEA-----AQSPTEAAVHTVRAAAGAAHTYFQVWHTPBGIDVTPVYIAADRASAEABGYPLHSPFQGFPPVYPTMYVWQPN  
P.s -----HSTLRPDSVYDGIAP-----VADAARPEELAAKAGTG-----BAWETABQIPVGTPIHEDVYKDEWLD-----TYAGIPFPVNGYPTMYVWQPN  
P.g -----HKNYRDIIDIKSAGP-----VADATPQABEIGVAD-----WRTPEIMVYKPLYTDLQEGHELD-----TYSGLFFLRGYPYMYVWQPN  
E.c -----HSTVWQOQLAKIKELS-----R-----REKTVDS-----LWQITABGIAIKPLYTEADLNLLEVTG-----TLQGLFPVYRGRPTMYVWQPN  
S.e HTAREH-----EPIPSFAGVLEGEFA-----FAPAGENIDALLTQKE-----ADALWWEAFBQYKPLYTEADTGLDFLR-----TYGIAFFLRGYPYMYVWQPN  
S.c.c -----MLSGR-----HHTMTR-----ESESGLPIEYFVGEALADWEAERK-----LQSPGYKPTFGYPTMYVWQPN  
C.g -----MHS-----LHNSDIPLTAETR-----AS-----ESHVVDAG-----KYWNTFSGIDVRYVFTQADEDEAQAAGMFDVLDQCKPFRMGYPYMYVWQPN  
C.c -----MSTFDPTKIAFAB-----VF-----AFAAPRG-----BAWNTFSGVAVAFDASVAGLDFPTG-----QFQVAFVYRGRPTMYVWQPN  
H.1 MTRVYVQOQDRETTFFVQSPADIPLSRVR-----VWPPSEAAVEMKVFVSAASANGYTVQQLWHTPBGIDVTPVYIAADRASAEABGYPLHSPFQGFPPVYPTMYVWQPN  
H.e -----NSAQASVAVKRRD-----KPN

Kunan TIROYAGFSVTEBSNFKYKINI KAGQGLSVAPDLATHRGYSDNRPVGDVGMAGVADTVEDTKI LFDGIPLEKMSVSMTHNGAVIPLANLAVTGBEGQVFKKLTGTI QNDILKEF  
Houze TIROYAGFSVTEBSNFKYKINI KAGQGLSVAPDLATHRGYSDNRPVGDVGMAGVADTVEDTKI LFDGIPLEKMSVSMTHNGAVIPLANLAVTGBEGQVFKKLTGTI QNDILKEF  
S.c TIROYAGFSVTEBSNFKYKINI KAGQGLSVAPDLATHRGYSDNRPVGDVGMAGVADTVEDTKI LFDGIPLEKMSVSMTHNGAVIPLANLAVTGBEGQVFKKLTGTI QNDILKEF  
A.n TIROYAGFSVTEBSNFKYKINI KAGQGLSVAPDLATHRGYSDNRPVGDVGMAGVADTVEDTKI LFDGIPLEKMSVSMTHNGAVIPLANLAVTGBEGQVFKKLTGTI QNDILKEF  
H.t TIROYAGFSVTEBSNFKYKINI KAGQGLSVAPDLATHRGYSDNRPVGDVGMAGVADTVEDTKI LFDGIPLEKMSVSMTHNGAVIPLANLAVTGBEGQVFKKLTGTI QNDILKEF  
P.s TIROYAGFSVTEBSNFKYKINI KAGQGLSVAPDLATHRGYSDNRPVGDVGMAGVADTVEDTKI LFDGIPLEKMSVSMTHNGAVIPLANLAVTGBEGQVFKKLTGTI QNDILKEF  
P.g TIROYAGFSVTEBSNFKYKINI KAGQGLSVAPDLATHRGYSDNRPVGDVGMAGVADTVEDTKI LFDGIPLEKMSVSMTHNGAVIPLANLAVTGBEGQVFKKLTGTI QNDILKEF  
E.c TVROYAGFSVTEBSNFKYKINI KAGQGLSVAPDLATHRGYSDNRPVGDVGMAGVADTVEDTKI LFDGIPLEKMSVSMTHNGAVIPLANLAVTGBEGQVFKKLTGTI QNDILKEF  
S.e TIROYAGFSVTEBSNFKYKINI KAGQGLSVAPDLATHRGYSDNRPVGDVGMAGVADTVEDTKI LFDGIPLEKMSVSMTHNGAVIPLANLAVTGBEGQVFKKLTGTI QNDILKEF  
S.c.c TIROYAGFSVTEBSNFKYKINI KAGQGLSVAPDLATHRGYSDNRPVGDVGMAGVADTVEDTKI LFDGIPLEKMSVSMTHNGAVIPLANLAVTGBEGQVFKKLTGTI QNDILKEF  
C.g TIROYAGFSVTEBSNFKYKINI KAGQGLSVAPDLATHRGYSDNRPVGDVGMAGVADTVEDTKI LFDGIPLEKMSVSMTHNGAVIPLANLAVTGBEGQVFKKLTGTI QNDILKEF  
C.c TIROYAGFSVTEBSNFKYKINI KAGQGLSVAPDLATHRGYSDNRPVGDVGMAGVADTVEDTKI LFDGIPLEKMSVSMTHNGAVIPLANLAVTGBEGQVFKKLTGTI QNDILKEF  
H.1 TIROYAGFSVTEBSNFKYKINI KAGQGLSVAPDLATHRGYSDNRPVGDVGMAGVADTVEDTKI LFDGIPLEKMSVSMTHNGAVIPLANLAVTGBEGQVFKKLTGTI QNDILKEF  
H.e IIRTYAGMSVTEBSNFKYKINI KAGQGLSVAPDLATHRGYSDNRPVGDVGMAGVADTVEDTKI LFDGIPLEKMSVSMTHNGAVIPLANLAVTGBEGQVFKKLTGTI QNDILKEF

Kunan MVRNTIYVPPKSMRIIADI FEYTAOMPKFNSI SI GYHMQBAGATADILBLAYTLADGLVYSRGTQAG-----LTIDEFAPRLSFFWIGIOMNFYMEIARMBRGRLLNAHLIEMFPQPN  
Houze MVRNTIYVPPKSMRIIADI FEYTAOMPKFNSI SI GYHMQBAGATADILBLAYTLADGLVYSRGTQAG-----LTIDEFAPRLSFFWIGIOMNFYMEIARMBRGRLLNAHLIEMFPQPN  
S.c MVRNTIYVPPKSMRIIADI FEYTAOMPKFNSI SI GYHMQBAGATADILBLAYTLADGLVYSRGTQAG-----LTIDEFAPRLSFFWIGIOMNFYMEIARMBRGRLLNAHLIEMFPQPN  
A.n MVRNTIYVPPKSMRIIADI FEYTAOMPKFNSI SI GYHMQBAGATADILBLAYTLADGLVYSRGTQAG-----LTIDEFAPRLSFFWIGIOMNFYMEIARMBRGRLLNAHLIEMFPQPN  
H.t MVRNTIYVPPKSMRIIADI FEYTAOMPKFNSI SI GYHMQBAGATADILBLAYTLADGLVYSRGTQAG-----LTIDEFAPRLSFFWIGIOMNFYMEIARMBRGRLLNAHLIEMFPQPN  
P.s MVRNTIYVPPKSMRIIADI FEYTAOMPKFNSI SI GYHMQBAGATADILBLAYTLADGLVYSRGTQAG-----LTIDEFAPRLSFFWIGIOMNFYMEIARMBRGRLLNAHLIEMFPQPN  
P.g MVRNTIYVPPKSMRIIADI FEYTAOMPKFNSI SI GYHMQBAGATADILBLAYTLADGLVYSRGTQAG-----LTIDEFAPRLSFFWIGIOMNFYMEIARMBRGRLLNAHLIEMFPQPN  
E.c LCRNTIYVPPKSMRIIADI LAWCSQMPFNTI SI GYHMQBAGATADILBLAYTLADGLVYSRGTQAG-----LTIDEFAPRLSFFWIGIOMNFYMEIARMBRGRLLNAHLIEMFPQPN  
S.e MVRNTIYVPPKSMRIIADI FEYTAOMPKFNSI SI GYHMQBAGATADILBLAYTLADGLVYSRGTQAG-----LTIDEFAPRLSFFWIGIOMNFYMEIARMBRGRLLNAHLIEMFPQPN  
S.c.c IARGTIFPPKSMRIIADI FEYTAOMPKFNTI SI GYHMQBAGATADILBLAYTLADGLVYSRGTQAG-----LTIDEFAPRLSFFWIGIOMNFYMEIARMBRGRLLNAHLIEMFPQPN  
C.g MVRNTIYVPPKSMRIIADI FEYTAOMPKFNSI SI GYHMQBAGATADILBLAYTLADGLVYSRGTQAG-----LTIDEFAPRLSFFWIGIOMNFYMEIARMBRGRLLNAHLIEMFPQPN  
C.c MVRNTIYVPPKSMRIIADI FEYTAOMPKFNSI SI GYHMQBAGATADILBLAYTLADGLVYSRGTQAG-----LTIDEFAPRLSFFWIGIOMNFYMEIARMBRGRLLNAHLIEMFPQPN  
H.1 MVRNTIYVPPKSMRIIADI FEYTAOMPKFNSI SI GYHMQBAGATADILBLAYTLADGLVYSRGTQAG-----LTIDEFAPRLSFFWIGIOMNFYMEIARMBRGRLLNAHLIEMFPQPN  
H.e LERGTVVPPKSMRIIADI FEYTAOMPKFNSI SI GYHMQBAGATADILBLAYTLADGLVYSRGTQAG-----LTIDEFAPRLSFFWIGIOMNFYMEIARMBRGRLLNAHLIEMFPQPN

Kunan SKSLLLRHCOTSGMSLTDQFVYHIVRTAIBAMAATVQ-----GTQSLHNSPDEALGLPTVKSAR IARNTQII IQBESGIPKVA DFWGGSYHMSCLTNDVYDAAALKINEI EBNQGHAKA  
Houze SKSLLLRHCOTSGMSLTDQFVYHIVRTAIBAMAATVQ-----GTQSLHNSPDEALGLPTVKSAR IARNTQII IQBESGIPKVA DFWGGSYHMSCLTNDVYDAAALKINEI EBNQGHAKA  
S.c AKSLSLRTHSCTS GMSLTDQFVYHIVRTAIBAMAATVQ-----HTQSLHNLALDEALALPTDFSA IARNTQII IQBESGIPKVA DFWGGSYHMSCLTNDVYDAAALKINEI EBNQGHAKA  
A.n SKSLSLRTHSCTS GMSLTDQFVYHIVRTAIBAMAATVQ-----HTQSLHNLALDEALALPTDFSA IARNTQII IQBESGIPKVA DFWGGSYHMSCLTNDVYDAAALKINEI EBNQGHAKA  
H.t AKSLSLRTHSCTS GMSLTDQFVYHIVRTAIBAMAATVQ-----HTQSLHNLALDEALALPTDFSA IARNTQII IQBESGIPKVA DFWGGSYHMSCLTNDVYDAAALKINEI EBNQGHAKA  
P.s PKSMELRTHSCTS GMSLTDQFVYHIVRTAIBAMAATVQ-----HTQSLHNLALDEALALPTDFSA IARNTQII IQBESGIPKVA DFWGGSYHMSCLTNDVYDAAALKINEI EBNQGHAKA  
P.g PKSLALRTHSCTS GMSLTDQFVYHIVRTAIBAMAATVQ-----HTQSLHNLALDEALALPTDFSA IARNTQII IQBESGIPKVA DFWGGSYHMSCLTNDVYDAAALKINEI EBNQGHAKA  
E.c PKSLALRTHSCTS GMSLTDQFVYHIVRTAIBAMAATVQ-----HTQSLHNLALDEALALPTDFSA IARNTQII IQBESGIPKVA DFWGGSYHMSCLTNDVYDAAALKINEI EBNQGHAKA  
S.e PKSLALRTHSCTS GMSLTDQFVYHIVRTAIBAMAATVQ-----HTQSLHNLALDEALALPTDFSA IARNTQII IQBESGIPKVA DFWGGSYHMSCLTNDVYDAAALKINEI EBNQGHAKA  
S.c.c PKSLMLRPHYTAGVLTQAGVYHIVRTAIBAMAATVQ-----GTQSLHNSPDEALGLPTVKSAR IARNTQII IQBESGIPKVA DFWGGSYHMSCLTNDVYDAAALKINEI EBNQGHAKA  
C.g AKSLSLRTHSCTS GMSLTDQFVYHIVRTAIBAMAATVQ-----HTQSLHNLALDEALALPTDFSA IARNTQII IQBESGIPKVA DFWGGSYHMSCLTNDVYDAAALKINEI EBNQGHAKA  
C.c AKSLSLRTHSCTS GMSLTDQFVYHIVRTAIBAMAATVQ-----HTQSLHNLALDEALALPTDFSA IARNTQII IQBESGIPKVA DFWGGSYHMSCLTNDVYDAAALKINEI EBNQGHAKA  
H.1 PKSLSLRTHSCTS GMSLTDQFVYHIVRTAIBAMAATVQ-----HTQSLHNLALDEALALPTDFSA IARNTQII IQBESGIPKVA DFWGGSYHMSCLTNDVYDAAALKINEI EBNQGHAKA  
H.e ADRIPRYGVQVMSLGLTQFVYHIVRTAIBAMAATVQ-----HTQSLHNLALDEALALPTDFSA IARNTQII IQBESGIPKVA DFWGGSYHMSCLTNDVYDAAALKINEI EBNQGHAKA

RIARNT

Kunan VAEQIPKLRIBESAAARTQARIDSQSEVI VGVNKYQLEKEDAVE-----LAI DNTSVNRQIKELKIKI KSSRDQALAEHCLAALTECAASG-----QNILALAVDASRRCTVGBI  
Houze VAEQIPKLRIBESAAARTQARIDSQSEVI VGVNKYQLEKEDAVE-----LAI DNTSVNRQIKELKIKI KSSRDQALAEHCLAALTECAASG-----QNILALAVDASRRCTVGBI  
S.c IDAGIPKLRIBESAAARTQARIDSQSEVI VGVNKYQLEKEDAVE-----LAI DNTSVNRQIKELKIKI KSSRDQALAEHCLAALTECAASG-----QNILALAVDASRRCTVGBI  
A.n IDAGIPKLRIBESAAARTQARIDSQSEVI VGVNKYQLEKEDAVE-----LAI DNTSVNRQIKELKIKI KSSRDQALAEHCLAALTECAASG-----QNILALAVDASRRCTVGBI  
H.t IDAGIPKLRIBESAAARTQARIDSQSEVI VGVNKYQLEKEDAVE-----LAI DNTSVNRQIKELKIKI KSSRDQALAEHCLAALTECAASG-----QNILALAVDASRRCTVGBI  
P.s IEYQIPKLRIBESAAARTQARIDSQSEVI VGVNKYQLEKEDAVE-----LAI DNTSVNRQIKELKIKI KSSRDQALAEHCLAALTECAASG-----QNILALAVDASRRCTVGBI  
P.g IETGLPKLRIBESAAARTQARIDSQSEVI VGVNKYQLEKEDAVE-----LAI DNTSVNRQIKELKIKI KSSRDQALAEHCLAALTECAASG-----QNILALAVDASRRCTVGBI  
E.c IETGLPKLRIBESAAARTQARIDSQSEVI VGVNKYQLEKEDAVE-----LAI DNTSVNRQIKELKIKI KSSRDQALAEHCLAALTECAASG-----QNILALAVDASRRCTVGBI  
S.c IEHGFQKEIEBESRYIAQETDSQSEVI VGVNKYQLEKEDAVE-----LAI DNTSVNRQIKELKIKI KSSRDQALAEHCLAALTECAASG-----QNILALAVDASRRCTVGBI  
C.g TAQIPKLRIBESAAARTQARIDSQSEVI VGVNKYQLEKEDAVE-----LAI DNTSVNRQIKELKIKI KSSRDQALAEHCLAALTECAASG-----QNILALAVDASRRCTVGBI  
C.c IETGLPKLRIBESAAARTQARIDSQSEVI VGVNKYQLEKEDAVE-----LAI DNTSVNRQIKELKIKI KSSRDQALAEHCLAALTECAASG-----QNILALAVDASRRCTVGBI  
H.1 IETGIPKLRIBESAAARTQARIDSQSEVI VGVNKYQLEKEDAVE-----LAI DNTSVNRQIKELKIKI KSSRDQALAEHCLAALTECAASG-----QNILALAVDASRRCTVGBI  
H.e VEAGELKALVESNAREISAIEKQSEVI VGVNKYQLEKEDAVE-----LAI DNTSVNRQIKELKIKI KSSRDQALAEHCLAALTECAASG-----QNILALAVDASRRCTVGBI

Kunan TDALKVGEHKAENDRMVSGAYRQ-----EPGSEKETSIAIKRVKFMERBGRRLPILVAJMQDQDHRGQKVIATQFADLGFVDVIGPLPQTFPEVARQA VADVHAGVYVSTHLAGHKL  
Houze TDALKVGEHKAENDRMVSGAYRQ-----EPGSEKETSIAIKRVKFMERBGRRLPILVAJMQDQDHRGQKVIATQFADLGFVDVIGPLPQTFPEVARQA VADVHAGVYVSTHLAGHKL  
S.c SDALSVYGRHAGQRIITISGVYR-----EAGQDSFVTEPALVDAPEABGRPRPILVAJMQDQDHRGQKVIATQFADLGFVDVIGPLPQTFPEVARQA VADVHAGVYVSTHLAGHKL  
A.n SDALSVYGRHAGQRIITISGVYR-----EAGQDSFVTEPALVDAPEABGRPRPILVAJMQDQDHRGQKVIATQFADLGFVDVIGPLPQTFPEVARQA VADVHAGVYVSTHLAGHKL  
H.t SDALSVYGRHAGQRIITISGVYR-----EAGQDSFVTEPALVDAPEABGRPRPILVAJMQDQDHRGQKVIATQFADLGFVDVIGPLPQTFPEVARQA VADVHAGVYVSTHLAGHKL  
P.s SDALSVYGRHAGQRIITISGVYR-----EAGQDSFVTEPALVDAPEABGRPRPILVAJMQDQDHRGQKVIATQFADLGFVDVIGPLPQTFPEVARQA VADVHAGVYVSTHLAGHKL  
P.g SDALSVYGRHAGQRIITISGVYR-----EAGQDSFVTEPALVDAPEABGRPRPILVAJMQDQDHRGQKVIATQFADLGFVDVIGPLPQTFPEVARQA VADVHAGVYVSTHLAGHKL  
E.c SDALSVYGRHAGQRIITISGVYR-----EAGQDSFVTEPALVDAPEABGRPRPILVAJMQDQDHRGQKVIATQFADLGFVDVIGPLPQTFPEVARQA VADVHAGVYVSTHLAGHKL  
S.e SDALSVYGRHAGQRIITISGVYR-----EAGQDSFVTEPALVDAPEABGRPRPILVAJMQDQDHRGQKVIATQFADLGFVDVIGPLPQTFPEVARQA VADVHAGVYVSTHLAGHKL  
S.c.c CHLREYVQ-----TYVF-----SCAF  
C.g SDALSVYGRHAGQRIITISGVYR-----EAGQDSFVTEPALVDAPEABGRPRPILVAJMQDQDHRGQKVIATQFADLGFVDVIGPLPQTFPEVARQA VADVHAGVYVSTHLAGHKL  
C.c SYALERVGRHAGQRIITISGVYR-----EAGQDSFVTEPALVDAPEABGRPRPILVAJMQDQDHRGQKVIATQFADLGFVDVIGPLPQTFPEVARQA VADVHAGVYVSTHLAGHKL  
H.1 SDALERVYGRHAGQRIITISGVYR-----EAGQDSFVTEPALVDAPEABGRPRPILVAJMQDQDHRGQKVIATQFADLGFVDVIGPLPQTFPEVARQA VADVHAGVYVSTHLAGHKL  
H.e GQRLEVPGEYRQ-----TQVTLQ-----T-VTSGAABDARLLIADLGERIGETPFLVGNFGLDHSNAGC IALRARPVGFVDVIGPLPQTFPEVARQA VADVHAGVYVSTHLAGHKL

DxHxG

SxL

```

Human VFELIKELIKLGRPDILVMGGVIPPQDYEPLEEVGVNIVRFGG-TRIPKAAVQVLEEDIKKLEKQKQSV
Mouse VFELIKELIKLGRPDILVMGGVIPPQDYEPLEEVGVNIVRFGG-TRIPKAAVQVLEEDIKKLEKQKQSV
S.c. VFALRHELAAGRDIMIVVGGVIPPQDYEPLEEVGVNIVRFGG-TVIPKAAHDLVKRLAALDGHSL
A.m. VFALRHELAAGRDIMIVVGGVIPPQDYEPLEEVGVNIVRFGG-TVADAAIDLLKLSNGES
M.t. VFALRHELAAGRDIMIVVGGVIPPQDYEPLEEVGVNIVRFGG-TVADAAIDLLKLSNGES
P.s. VFALRHELAAGRDIMIVVGGVIPPQDYEPLEEVGVNIVRFGG-TVIPKAAHDLVKRLAALDGHSL
P.g. IPQVIAELIKLGRPDILVTAGGVIPQDYEPLEEVGVNIVRFGG-TVVAYSAKVVLEILLES
E.c. IPFLVGLKAGWRDITVAVGGVIPPQDYEPLEEVGVNIVRFGG-TMPLDSVREVLNLSQHHH
S.e. VFALRHELAAGRDIMIVVGGVIPPQDYEPLEEVGVNIVRFGG-TVADAAIDLLKLSNGES
C.g. IPELKKELAAALGRDILIVVGGVIPPQDYEPLEEVGVNIVRFGG-TVVAYSAIDLITRLAHLGFTLEVDVNE
C.c. APELKAELAKGRDILIVVGGVIPPQDYEPLEEVGVNIVRFGG-TVVAYSAIDLITRLAHLGFTLEVDVNE
M.I. VFALRHELAAGRDIMIVVGGVIPPQDYEPLEEVGVNIVRFGG-TVVAYSAIDLITRLAHLGFTLEVDVNE
M.e. VPEVKAELRAGLHIVVGGVIPPQDYEPLEEVGVNIVRFGG-TVVAYSAIDLITRLAHLGFTLEVDVNE
gg g

```

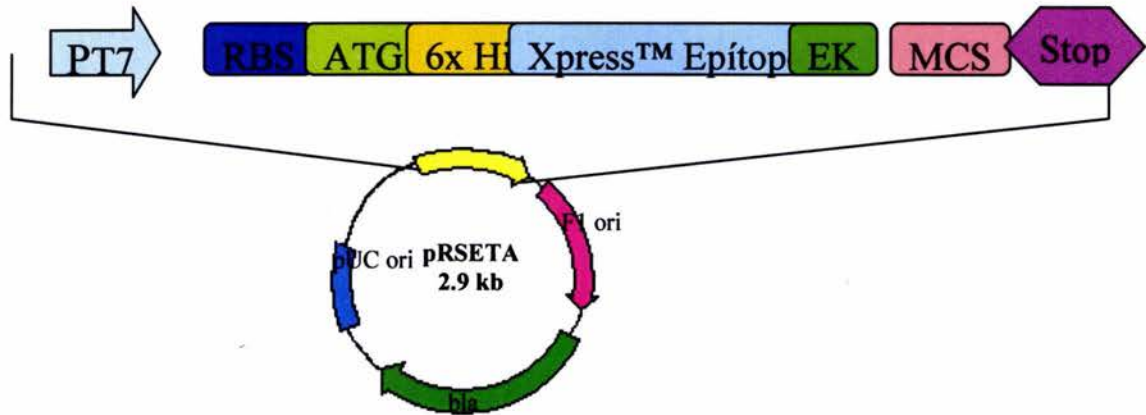
**Fig. 9. Alineamiento múltiple de la subunidad mayor de la MCM de *S. erythraea* CA340 con otras proteínas conocidas.** El alineamiento fue generado usando el programa ClustaW. Los aminoácidos conservados en las proteínas se encuentran en color amarillo y en negrita se muestran algunas regiones importantes detalladas en el texto. Humana, (GenBank accession No. M65131); ratón, (X51941); S.c, *S. cinnamomensis* (L10064); A.m, *A. mediterranei* (AF117980); M.t, *M. tuberculosis* (Z79701); P.s, *P. shermanii* (X14965); P.g, *P. gingivalis* (L30136); E.c, *E. coli sbm* gene (X66836); S.e, *S. erythraea* CA340 (AY117133); S.co, *Streptomyces coelicolor* (AL939129); C.g, *C. glutamicum* (AP005278); C.c, *Caulobacter crescentus* (AE005906); M.I, *M. leprae* (AL583923); M.e, *M. extorquens* (U28335).

### III. 7 Expresión de proteínas de actinomicetos.

Los actinomicetos son bacterias Gram-positivas con un alto contenido de G+C en su genoma. Las bacterias en este grupo tienen un rango de características morfológicas, desde especies que se dividen por división binaria, tales como *Corynebacterium* ssp., a especies con paredes celulares inusuales y algo de ramificación, como *Mycobacterium* y *Nocardia* ssp., hasta especies filamentosas que presentan una alta ramificación como los *Streptomyces*. Estas características los hacen ser microorganismos muy particulares, ya que presentan señales de transcripción y traducción que no pueden ser compartidas por otras especies. Más aún, las diferencias en el uso de codones puede interferir con una expresión exitosa [Connell, 2001]. Es por estas razones que cuando se desea expresar genes de estos microorganismos es indispensable clonarlos bajo un promotor conocido de la especie en donde se va a llevar a cabo la síntesis de la(s) proteína(s) de interés.

En este sentido se han reportado una serie de plásmidos que están contruados con las características indispensables para la expresión y purificación de proteínas heterológicas, principalmente usando *Escherichia coli* como hospedero. Muchos de estos plásmidos se pueden obtener ahora a través de distintas compañías, pero en general contienen un promotor, un sitio de unión a ribosomas, una secuencia para incluir la cola de histidinas que posteriormente es

útil para la purificación y un sitio para una enterocinasa para dejar a la proteína heteróloga limpia. Tal es el caso de los vectores pRSET (Invitrogen, USA) que es un vector derivado del plásmido pUC diseñados para la alta expresión y purificación de proteínas de genes clonados en *E. coli* (Fig. 8).



**Fig. 10. Representación del plásmido pRSETA (Invitrogen) utilizado para la expresión de proteínas en *E. coli*.**

## IV. JUSTIFICACIÓN

---

El metilmalonil-CoA es uno de los principales precursores utilizados en la biosíntesis de eritromicina, sin embargo no se ha estudiado su síntesis. Como ya se mencionó en actinomicetos existen varias rutas y en *S. erythraea* se han descartado algunas, por lo que la más probable es la síntesis a través de la reacción catalizada por la metilmalonil-CoA mutasa. En reportes previos se ha observado que la síntesis de monensina por *S. cinnamonensis* se incrementó cuando se aumentó la dosis de genes correspondientes a las dos subunidades de la enzima [Zhang *et al.*, 1999]. En nuestro laboratorio se clonó un fragmento de DNA que contiene los probables genes para las dos subunidades de mutasa de *S. erythraea*, por lo que es importante establecer que realmente esta secuencia corresponde a estos genes para posteriormente aumentar la dosis de genes en este microorganismo y observar si hay un aumento en la producción de metilmalonil-CoA y por lo tanto de eritromicina.

## V. HIPÓTESIS

---

Los genes *mutA* y *mutB* codifican para las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de la metilmalonil-CoA mutasa de *S. erythraea* ya que estos polipéptidos presentan una alta identidad con las metilmalonil-CoA mutasas de diversos sistemas.

## VI. OBJETIVOS

---

1. Demostrar que los genes clonados y secuenciados codifican para las dos subunidades de la MCM de *S. erythraea*.

2. Clonar los genes *mutA* y *mutB* de *Saccharopolyspora erythraea* CA340 independientemente para expresarlos en *Escherichia coli*.
3. Purificar las dos subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  a partir de extractos libres de células de *Escherichia coli*.
4. Formar el heterodímero con las proteínas puras.
5. Determinar la actividad de mutasa del heterodímero.

## VII. MATERIAL Y MÉTODOS

---

### VII.1 Medios de cultivo y microorganismos.

Para la propagación de plásmidos y clonación de los productos de PCR se utilizó la cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$  (F<sup>-</sup>  $\phi$ 80d*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ (*lacZYA*<sup>-</sup>*argF*) U169 *recA1 endA1 hsdR17*(r<sup>-</sup> m<sup>+</sup>) *phoA supE44*  $\lambda$ <sup>-</sup> *thi*<sup>-1</sup> *gyrA96 relA1*), la cual se creció en medio LB (10 g/l peptona, 5 g/l extracto de levadura, 10 g/l NaCl con 15 g/l agar en caso de medio sólido) adicionado con 200  $\mu$ g/ml ampicilina cuando se necesitó. Para la expresión de los genes *mutA* y *mutB* de *Saccharopolyspora erythraea* se utilizó *E. coli* BL21(DE3)pLysS [Invitrogen; F<sup>-</sup> *ompT hsdSB* (r<sup>-</sup> m<sup>-</sup>) *gal dcm* (DE3) pLysS (Cam<sup>R</sup>)]. *E. coli* BL21(DE3)pLysS se creció en medio SOB (20 g/l triptona, 5 g/l extracto de levadura, 0.5 g/l NaCl, 0.186 g/l KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, con 15 g/l agar en caso de medio sólido) adicionado con 35  $\mu$ g/ml de cloramfenicol y, cuando fue necesario, con 200  $\mu$ g/ml ampicilina.

### VII. 2 Oligonucleótidos.

Todos los oligonucleótidos utilizados en este trabajo se diseñaron en el laboratorio y se sintetizaron en Gibco (USA).

### VII. 3 Plásmidos.

La amplificación de los genes *mutA* y *mutB* (GenBank AY117133) se realizó en los plásmidos pEX3 y pBX4 previamente obtenidos en el laboratorio y que contienen partes del genoma de *S. erythraea* CA340 (Luz-Madrigal, 2002). pEX3 contiene los genes completos *mutA* y *mutB* y pBX4, tiene parte del gen *mutA* y el gen *mutB* completo. Para la expresión de los genes se usó el plásmido pRSET A (Invitrogen). Los plásmidos se purificaron usando el kit Wizard Plus SV miniprep (Promega) según el protocolo del fabricante.

### VII. 4 Amplificación del gen *mutA* que codifica para la probable subunidad de 66 kDa de metilmalonil-CoA mutasa de *S. erythraea*.



El gen *mutA* completo se amplificó por PCR usando los oligonucleótidos sentido CEC-1 (5'-cctaccatcggatccatggtgcgactcg-3') y anti-sentido A/STP (5'-tcgtgctcggaaattctcactgctgactc-3') diseñados en este trabajo, utilizando el plásmido pEX3 linearizado como templado. Los sitios *Bam*HI y codón de inicio y *Eco*RI y codón de término se muestran subrayados. Las condiciones de PCR fueron de 5 min a 95 °C seguidos por 25 ciclos de 1.5 min a 94 °C, 1.0 min a 62 °C y 2.5 min a 68 °C y una extensión final por 10 min a 68 °C. Se utilizó la enzima ADN polimerasa Platinum *Pfx* (Invitrogen, USA) con la solución de Enhancer a 1x, según las instrucciones de Invitrogen.

#### **VII. 5 Amplificación del gen *mutB* que codifica para la probable subunidad de 82.7 kDa de metilmalonil-CoA mutasa de *S. erythraea*.**

El gen *mutB* completo se amplificó por PCR usando los oligonucleótidos sentido B/ATG (5'-gggactggatccatgaccgcccacgagca-3') y anti-sentido B/STOP (5'-atctcgcggaattcgggtcagcccgcgctc-3') diseñados en este trabajo, utilizando el plásmido pBX4 linearizado como templado. Los oligonucleótidos muestran subrayados el sitio para *Bam*HI y el codón de inicio y el sitio para *Eco*RI y el codón de término, respectivamente. Las condiciones de PCR fueron las mismas que para la amplificación de *mutA*.

#### **VII. 6 Purificación de los productos de PCR.**

Los productos de PCR se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 0.8% (w/v) bajo condiciones estándar y se visualizaron por tinción con bromuro de etidio [Sambook *et al.*, 1989]. Las bandas de los tamaños esperados de 1.8 kb para el *mutA* y de 2.3 para el *mutB* se purificaron de los geles con el kit QIAquick gel extraction (QIAGEN, USA) según el protocolo del fabricante. Los productos purificados se secuenciaron completamente para comprobar su autenticidad.

#### **VII. 7 Subclonación de los genes *mutA* y *mutB* en pRSET A.**

Para la clonación de los genes *mutA* y *mutB* en pRSET A, los productos de PCR correspondientes a los genes, se digirieron con *Bam*HI y *Eco*RI

respectivamente, purificados nuevamente del gel de agarosa y ligados por separado con el plásmido pRSET A digerido con las dos enzimas. Las ligaciones se llevaron a cabo bajo condiciones estándar utilizando la ligasa T<sub>4</sub> (Invitrogen). Las mezclas de ligación se usaron (por separado) para transformar células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$  y las clonas que contienen las construcciones pRSET A-*mutA* y pRSET A-*mutB* se seleccionaron en el medio LB con ampicilina. Los plásmidos pRSET A-*mutA* y pRSET A-*mutB* se purificaron de las transformantes y se secuenciaron para comprobar la clonación en el marco de lectura correcto de los genes *mutA* y *mutB*, respectivamente.

### **VII. 8 Secuenciación.**

La secuenciación del producto de PCR para *mutA* y del plásmido pRSET A-*mutA* se llevó a cabo con los oligonucleótidos Cec-1 (5'-cctaccatcggatccatggtggcgactcg-3'), Cec-2 (5'-gagcgggtgcacgggatgccgtc-3'), ACH460 (5'-gcgagctccagcaacg-3'), AH (5'-ggtgcgagcatgttca-3'), T7XX430 (5'-ggttcttcgaggttcg-3'), 170/T7B (5'-ggttcttcgaggttcg-3') y A/STP descrito en un inciso anterior. Para el producto de PCR para *mutB* y del plásmido pRSET A-*mutB* se utilizaron los oligonucleótidos B/ATG descrito en un inciso anterior, B/XMA (5'-ggcgcgattcccggtaggtgcgaggaa-3'), Ci2 (5'-tgtcgggtggccttcg-3'), CS1 (5'-tggacatcgctcctt-3'), XKB1 (5'-ggcacaaggccaccgt-3'), B/VNE (5'-agtccgacgtgcacgtcgtcgggtgtcg-3'), BK360 (5'-tcggccgctccgaca-3') y B/STOP descrito en un inciso anterior.

La secuenciación se realizó con un secuenciador automático ABI PRISM 310 (Perkin Elmer/Applied Biosystems, USA) utilizando BigDye Terminator Cycle Sequencing kit v2.0 (Applied Biosystems, USA).

### **VII. 9 Expresión de los genes *mutA* y *mutB* en *E. coli*.**

Los plásmidos recombinantes pRSET A-*mutA* y pRSET A-*mutB* purificados se utilizaron para la transformación de *E. coli* BL21(DE3)pLysS. Las clonas recombinantes se seleccionaron en medio LB con 50  $\mu$ g/ml de ampicilina y 35  $\mu$ g/ml de cloramfenicol.

Para la expresión, cuatro clonas de cada transformación se incubaron en SOB con 50 µg/ml de ampicilina y 35 µg/ml de cloramfenicol toda la noche a 37 °C con agitación constante a 200 rpm. Los cultivos crecidos se resembraron cada uno por duplicado (generando 2 series de cultivos) en 200 ml de SOB sin antibióticos en una proporción 1:50, equivalente a aproximadamente DO<sub>600</sub> de 0.1 y se incubaron con agitación a 37 °C. Después que los cultivos alcanzaron la DO<sub>600</sub> de 0.4-0.6, la expresión se indujo con 0.7 mM de IPTG y los cultivos se incubaron a 25 °C una serie y otra serie a 37 °C. Se tomaron muestras a las 4 y 24 horas para observar la inducción de las proteínas MutA y MutB. Después de la inducción, los cultivos se recuperaron por centrifugación y las células se conservaron a -20 °C.

#### **VII. 10 Preparación de extractos libres de células de los cultivos inducidos para la expresión de las proteínas MutA y MutB.**

Los cultivos se descongelaron y el paquete celular se resuspendió en 8 ml de amortiguador Tris-HCl 20 mM, pH de 7.5. Se adicionó 1 mg/ml de lisozima y se incubaron 30 min en baño de hielo. Las bacterias se sonicaron en frío por 6 ciclos de 10 s y enseguida se centrifugaron 20 min a 4 °C a 5500 x g. Se recuperaron los sobrenadantes y los precipitados, los cuales se resuspendieron nuevamente en 8 ml del mismo amortiguador frío y se agregaron 320 µl de SDS al 10 % (w/v). Las suspensiones se sonicaron nuevamente 2 ciclos durante 10 s bajo las mismas condiciones y se aplicaron a la columna ProBond (Invitrogen) para la purificación de los péptidos MutA y MutB por separado.

#### **VII.11 Purificación de las proteínas MutA y MutB expresadas por las transformantes.**

Las columnas de ProBond (Invitrogen; USA) se prepararon de acuerdo a las instrucciones del fabricante y se equilibraron con amortiguador de unión (50 mM de amortiguador de fosfatos, pH 7.8, 250 mM NaCl, 0.4 % SDS).

Después de aplicar las suspensiones conteniendo MutA y MutB a las columnas por separado, éstas se lavaron dos veces con el mismo amortiguador. En seguida se lavaron 4 veces con el mismo amortiguador sin SDS. La elución de las proteínas se llevó a cabo en el amortiguador sin SDS con imidazol en concentraciones crecientes de 20, 50, 100, 150, 200 y 250 mM. Se recolectaron fracciones de 2 ml, las cuales se analizaron por SDS-PAGE al 10%.

#### **VII. 12 SDS-PAGE.**

Los geles de poliacrilamida al 10% se prepararon de acuerdo a la técnica reportada por Bollag *et al* (1996).

#### **VII.13 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA METILMALONIL-CoA MUTASA.**

La actividad se determinó midiendo el succinil-CoA formado por HPLC. La mezcla de reacción contenía 0.5 mM de metilmalonil-CoA, 1 mM ditioeritritol, 60  $\mu$ M de coenzima-B<sub>12</sub>, 100 mM de buffer Tris-HCl, pH 8.0 y la enzima en un volumen final de 0.5 ml. La reacción se inició con la adición del metilmalonil-CoA, incubando en la obscuridad por 30 min a 30°C. Después de este tiempo se adicionaron 20  $\mu$ l de ac. perclórico 6N y la proteína precipitada se removió por centrifugación a 12,000 X g. El sobrenadante se filtró a través de una membrana de nylon (0.22  $\mu$ m de tamaño de poro; Titan) y usado para el HPLC. La actividad se expresó en picomoles de succinil-CoA formado por min por mg de proteína [Bermúdez *et al.*, 1998].

#### **VII.14 HPLC.**

Las separaciones de metilmalonil-CoA y succinil-CoA se llevaron a cabo a temperatura ambiente en una columna Waters  $\mu$ Bondapak C<sub>18</sub> usando un gradiente de la fase móvil a un flujo de 1.2 ml h<sup>-1</sup>. Eluyente A fue un buffer de acetato de sodio, pH 5.0 y el eluyente B fue acetonitrilo. La detección se llevó a cabo a 254 nm. Se usaron estándares de ambos compuestos obtenidos de Sigma [Bermúdez *et al.*, 1998].

## VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

La metilmalonil Co-A mutasa es una enzima formada por dos subunidades codificadas por los genes *mutA* y *mutB* en algunos *Streptomyces* como *Streptomyces cinamonensis* (Birch *et al.*, 1993). En *Saccharopolyspora erythraea* CA340 se ha clonado un fragmento del ADN que contiene dos marcos de lectura cuyos productos de traducción *in silico* muestran un alto porcentaje de identidad con las proteínas MutA y MutB de diversos microorganismos (Luz-Madriral, 2002). Para demostrar que los ORFs que se tienen clonados codifican para estas dos subunidades de la MCM de *Saccharopolyspora erythraea* CA340 se requiere reconstituir el heterodímero y determinar la actividad de la enzima. Por lo que primero se llevó a cabo la amplificación de los genes *mutA* y *mutB* por PCR utilizando dos pares de oligonucleótidos diseñados para este fin, incluyendo los sitios de restricción adecuados para su posterior clonación en fase en el plásmido pRSET A.

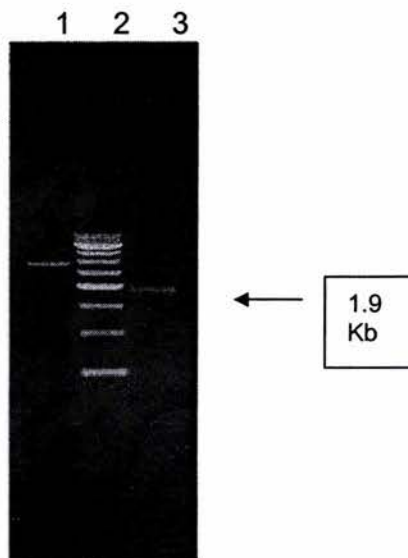
### VIII. 1 Amplificación y subclonación del gen *mutA* en pRSET A.

El gen *mutA* se amplificó utilizando el plásmido pEX-3 previamente obtenido en el laboratorio (Luz-Madriral, 2002) y los oligonucleótidos CEC-1 y A/STP, dando un producto de PCR de 1.9 Kb que era el tamaño esperado. El fragmento de PCR se secuenció completamente para confirmar que no tuviera errores (Secuencias en el anexo).

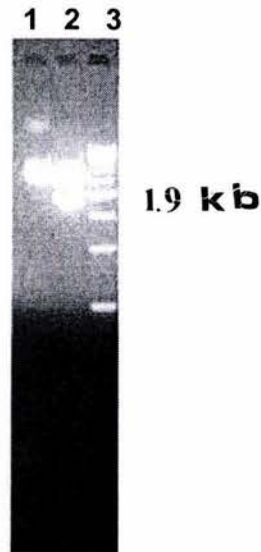
Los vectores pRSET son vectores de expresión derivados del plásmido pUC diseñados para un alto nivel de expresión y purificación de genes clonados en *E. coli*. Esto es posible por la presencia del promotor T7; además, los insertos de DNA son colocados río abajo y en fase con una secuencia que codifica un péptido de fusión en el amino terminal. Esta secuencia incluye un codón de iniciación de la traducción ATG, un sitio de unión a ribosomas funcional, una bandera de polihistidinas que funciona como un dominio de unión a metales en la proteína traducida, una secuencia del gen 10 del fago T7 estabilizador del transcrito, el epítipo Xpress<sup>TM</sup> para identificar a la proteína expresada utilizando

anticuerpos específicos dirigidos contra esta región y la secuencia de reconocimiento de ruptura por la enterocinasa.

Para la expresión del gen *mutA* en *E. coli* se seleccionó el plásmido pRSET A (Invitrogen), al cual se le ligó el fragmento de ADN amplificado por PCR que contiene el probable gen *mutA* digerido y purificado del gel (Fig. 11). Este plásmido pRSET A-*mutA* se purificó de *E. coli* DH5 $\alpha$  y se comprobó que tuviera el inserto de *mutA* por digestión con las enzimas *Bam*HI/*Eco*RI (Fig. 12).



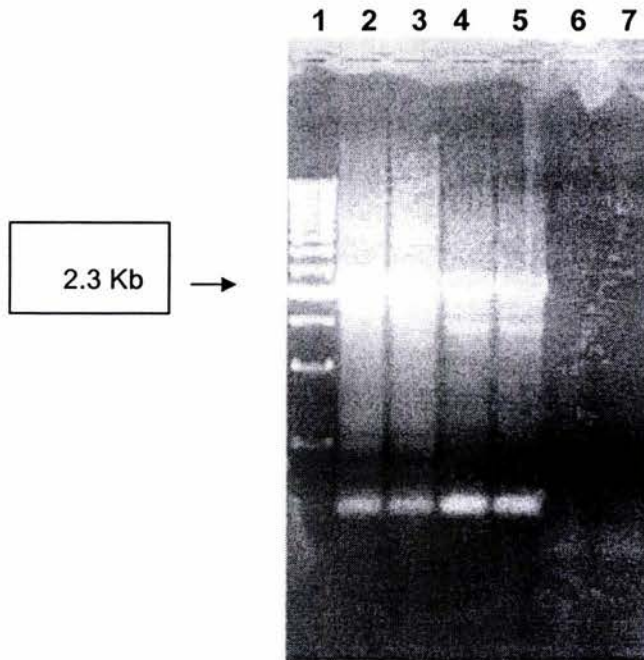
**Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa del fragmento de PCR correspondiente al gen *mutA* y del plásmido pRSET A digeridos.** Carril 1, pRSET A digerido con *Bam*HI /*Eco*RI purificado del gel. Carril 2 marcador de PM de 500 pb. Carril 3, gen *mutA* completo digerido con *Bam*HI /*Eco*RI purificado del gel.



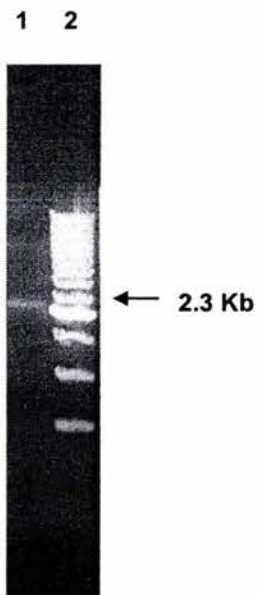
**Figura 12. Electroforesis de los productos de la digestión del plásmido pRSET A-*mutA* con *Bam*HI y *Eco*RI. Carril 1, pRSET A-*mutA* sin digerir. Carril 2, pRSET A-*mutA* digerido con *Bam*HI/*Eco*RI. Carril 3, Marcadores de peso molecular de 500 pb.**

### **VIII. 2 Amplificación del gen *mutB* en pRSET A.**

El gen *mutB* se amplificó usando como templado el plásmido pBX4 previamente obtenido en el laboratorio (Luz-Madrigal, 2002) y los primers B/ATG y B/STOP diseñados en este trabajo. El codón de inicio GTG original de *S. erythraea* se cambió por ATG que es el usado en *E. coli*. En principio se utilizó la polimerasa del Sistema Triple Master (Eppendorf, Alemania) pero no se obtuvieron productos, por lo que posteriormente se amplificó con la ADN polimerasa Pfx (Invitrogen). En la figura 13 se muestran los resultados donde se puede observar que aunque se obtiene un barrido, se ve claramente una banda de ADN del tamaño esperado (2.3 Kb) en el sistema con enhancer 1X.



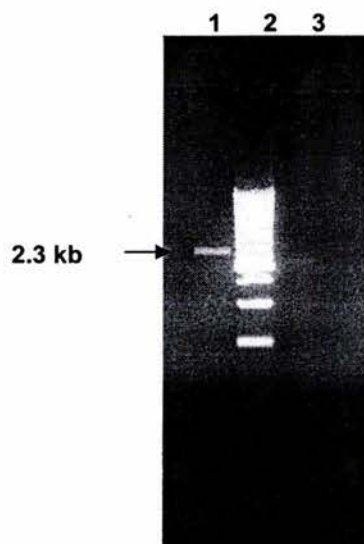
**Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de amplificación del gen *mutB*.** Carril 1, marcadores de peso molecular de 500 pb; carriles 2 y 3, productos de PCR con la ADN polimerasa Platinum *Pfx* (Invitrogen) con enhancer 1X, Carriles 4 y 5, productos de PCR con la enzima Platinum *Pfx* sin enhancer; Carriles 6 y 7, productos de PCR con Sistema Triple Master (Eppendorff).



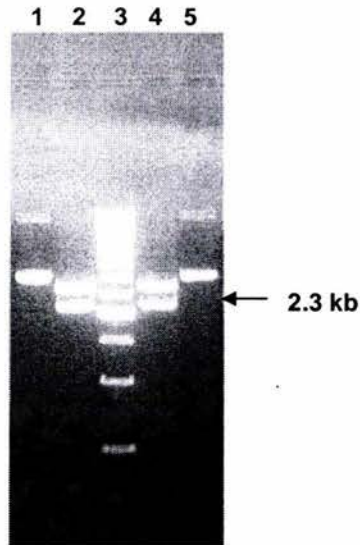
**Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa del fragmento que contiene el gen *mutB* purificado.** Carril 1, gen *mutB* completo purificado. Carril 2, Marcadores de peso molecular de 500 pb.



El fragmento de 2.3 Kb se purificó del gel (Fig. 14) y la secuencia demostró que no presentaba errores (Ver anexo de las secuencias). Posteriormente se digirió tanto el fragmento como el plásmido pRSET A con *Bam*HI y *Eco*RI (Fig. 15). Después de la ligación y la transformación, se seleccionaron 2 colonias al azar y se comprobó la construcción por digestión con las mismas enzimas de restricción (Fig. 16) y por secuencia (Ver anexo para secuencias).



**Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa del fragmento *mutB* y del plásmido pRSET A digeridos con *Bam*HI y *Eco*RI. Carril 1, plásmido pRSET A digerido con *Bam*HI/*Eco*RI y purificado. Carril 2, marcador de pesos moleculares de 500 pb. Carril 3, el gen *mutB* completo amplificado por PCR y digerido con *Bam*HI/ *Eco*RI purificado.**



**Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la digestión del plásmido pRSET A-*mutB* completo.** Carril 1, preparación 1 del plásmido pRSET A-*mutB* sin digerir. Carril 2, plásmido pRSET A-*mutB* digerido con *Bam*HI/ *Eco*RI. Carril 3, marcador de PM de 500 pb. Carril 4, preparación 2 del plásmido pRSET A-*mutB* completo digerido con *Bam*HI/ *Eco*RI. Carril 5, plásmido pRSET A-*mutB* sin digerir.

### VIII.3. Expresión y purificación de las proteínas MutA y MutB.

Teniendo las construcciones pRSET A-*mutA* y pRSET A-*mutB* se procedió a transformar a la cepa de *E. coli* BL21(DE3)pLysS para expresar tanto el gen *mutA* como el gen *mutB* de *Saccharopolyspora erythraea* CA340. Después de la transformación se seleccionaron 4 clonas al azar de cada uno de los plásmidos para llevar a cabo una cinética de la expresión de las probables proteínas MutA y MutB. En la figura 17 se presentan los resultados de la electroforesis en condiciones desnaturizantes de los lisados totales de *E. coli*, donde se puede observar que existen bandas de proteínas mucho más intensas que las demás que pueden corresponder a las proteínas MutA (69 kDa) y MutB (PM 85 kDa). También se puede observar que desde las 3 horas de incubación después de la inducción hay una buena cantidad sobre todo de la proteína MutA. Para establecer si las proteínas MutA y MutB se encontraban en forma soluble o en la fracción insoluble (cuerpos de inclusión), las muestras se centrifugaron después de haber sido sonicadas y se observó que la mayor parte se localiza en la fracción insoluble (Fig.18).

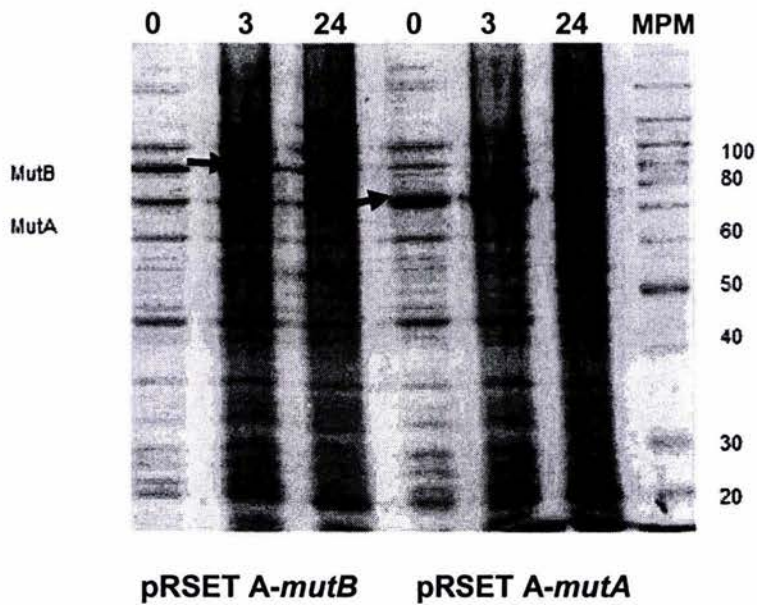


Figura 17. SDS-PAGE de los lisados totales de *E. coli* BL2(DE3) conteniendo los plásmidos pRSET A-*mutA* y PRSET A-*mutB* crecidas a 37°C e incubadas 0, 3 y 24 horas después de la adición de IPTG.

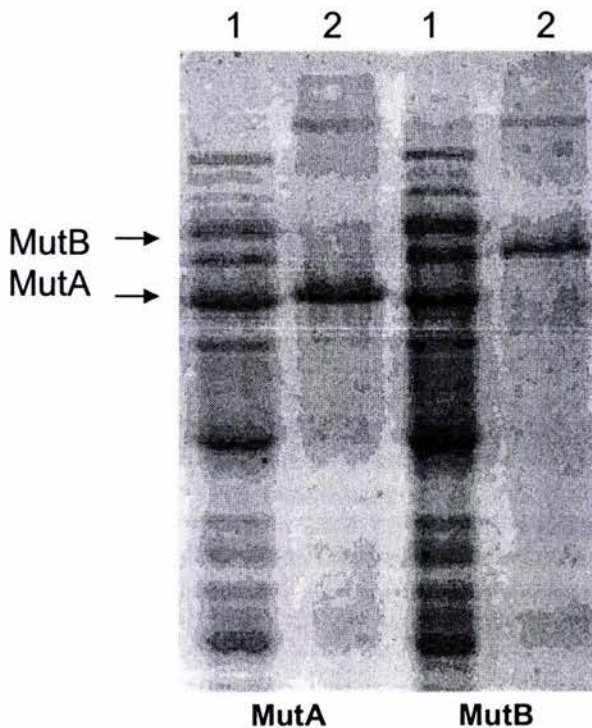
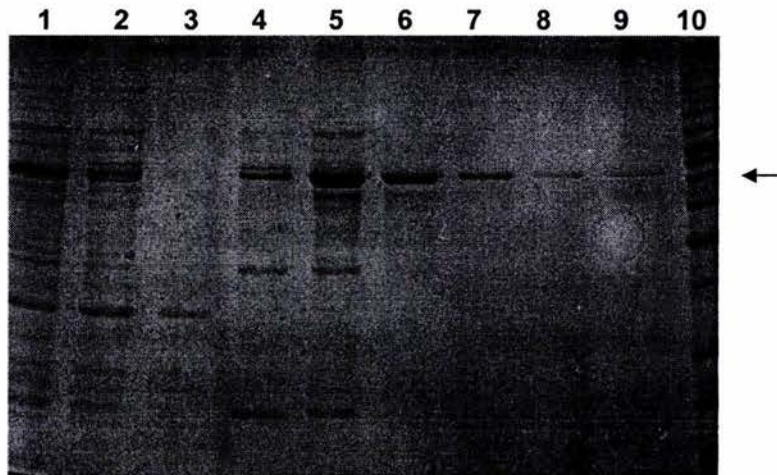


Figura 18. SDS-PAGE de los extractos libres de células (Carril 1) y de la fracción insoluble (Carril 2) de *E. coli* BL21(DE3) conteniendo el pRSET A-*mutA* y pRSET A-*mutB*.

Posteriormente se purificaron las dos proteínas a través de la bandera de histidinas que se incluye en la construcción en pRSET A. La proteína MutA se eluyó desde 50 mM de imidazol, lográndose una purificación de más del 90% con 150-250 mM de este compuesto (Fig. 19).

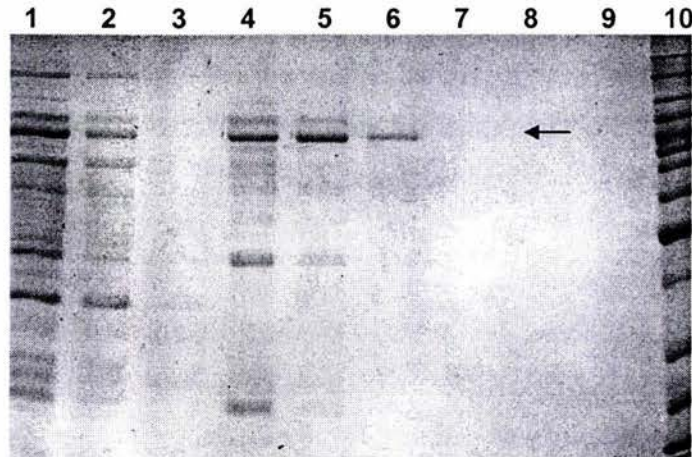
De igual manera se logró la purificación de MutB, la cual eluyó con 100 mM de imidazol (Fig. 20). Hay que mencionar que el peso molecular de las proteínas se incrementa en 3 kDa debido a la parte proteica que se agrega por la construcción en pRSET A.



**Figura 19. Purificación de la proteína MutA expresada en *E. coli* BL21(DE3) por Cromatografía de Afinidad de iones metálicos (IMAC).**

Carril 1, Extracto total libre de células de *E. coli* BL21(DE3) pRSET A-*mutA*. Carril 2, Material que no se pegó a la columna. Carril 3, Lavado de columna sin imidazol Carril 4, Elución con 20 mM de imidazol. Carril 5, Elución con 50 mM de imidazol. Carril 6, Elución con 100 mM de imidazol. Carril 7, Elución con 150 mM de imidazol. Carril 8, Elución con 200 mM de imidazol. Carril 9, Elución con 250 mM de imidazol. Carril 10, Marcadores de peso molecular (Benchmark Protein Ladder, Invitrogen).

La flecha señala la proteína MutA con una masa molecular aproximada de 69 kDa.



**Figura 20. Purificación de la proteína MutB expresada en *E. coli* BL21(DE3) por IMAC.**

Carril 1, Extracto total libre de células de *E. coli* BL21(DE3) pRESET A-*mutB*. Carril 2, Material que no se pegó a la columna. Carril 3, Lavado de columna sin imidazol. Carril 4, Elución con 20 mM de imidazol. Carril 5, Elución con 50 mM de imidazol. Carril 6, Elución con 100 mM de imidazol. Carril 7, Elución con 150 mM de imidazol. Carril 8, Elución con 200 mM de imidazol. Carril 9, Elución con 250 mM de imidazol. Carril 10, Marcadores de peso molecular (Benchmark Protein Ladder, Invitrogen).

La flecha señala la proteína MutB con una masa molecular aproximada de 85 kDa.

*E. coli* se escogió como organismo huésped en este trabajo ya que ofrece ciertas ventajas. La primera es que el contenido de cobalamina de este microorganismo es negligible bajo condiciones aeróbicas. En segundo lugar, las subunidades de la mutasa se pueden obtener libres de otra MCM ya que *E. coli* no sintetiza a esta enzima [McKie *et al.*, 1990]. Hay que mencionar que la mutasa de este organismo es monomérica y está codificada por el gene *sbm* (sleepy beauty mutase) nombrada así porque aparentemente no se expresa (Haller *et al.*, 2000).

En este trabajo se clonaron los genes de las dos subunidades de la MCM de *S. erythraea* sin región regulatoria para que quedaran bajo la influencia del promotor T7, lográndose una buena expresión de las dos proteínas, principalmente de MutA, aunque una buena parte de las proteínas MutA y MutB se encontraron en la fracción insoluble como cuerpos de inclusión, los cuales son difíciles de romper. Esta característica ya había sido observada en *E. coli* para un gran número de proteínas heterólogas [Leow *et al.*, 2004]; sin embargo, se ha reportado que modificando las condiciones de inducción o bajando la temperatura

de crecimiento de este organismo a 25°C se puede lograr una mayor producción de estas enzimas en forma soluble [Castellanos-González *et al.*, 2002].

Connell (2001) comenta que la expresión de proteínas de actinomicetos en otros microorganismos podría resultar difícil por las diferencias en la preferencia del uso de codones que existen entre estos organismos y los que usualmente se utilizan para este fin, sin embargo se encuentran en la literatura ejemplos de expresión y purificación de proteínas de actinomicetos, principalmente en *E. coli*. Tal es el caso de la proteína fosforibosil isomerasa (PriA) de *Streptomyces coelicolor* que fue expresada en *E. coli* utilizando el plásmido pET15b (Novagen) y posteriormente purificada y cristalizada exitosamente [Wright *et al.*, 2004]. También, Skinner *et al.* (1995) reportan la expresión de las subunidades de las subunidades de la  $\alpha$ -cetodeshidrogenasa de cadena ramificada de *Streptomyces avermitilis*. En todos estos casos mencionados se ha eliminado la región 5' no codificante para tener los genes que se van a expresar bajo la regulación de un promotor de *E. coli*.

Por lo que respecta a la expresión de la metilmalonil-CoA mutasa en *E. coli* se ha reportado una buena producción de esta enzima de *Porphyromonas gingivalis* [Jackson *et al.*, 1995], de *Propionibacterium shermanii* [McKie *et al.*, 1990] y de *Amycolatopsis mediterranei* [Zhang *et al.*, 1999]. Por otro lado, en el caso de la mutasa de *Streptomyces cinnamonensis* se expresó en *Streptomyces lividans* TK64 dando una actividad 5 a 10 veces mayor que la de la cepa original [Birch *et al.*, 1993].

En cuanto a la expresión de genes que codifican para proteínas de *Saccharopolyspora erythraea* en *E. coli* hay muy pocos ejemplos. Uno de ellos es la expresión del gene *rppA* que codifica para un pigmento difusible dándole una coloración roja a las clonas de *E. coli* que lo sintetizaron [Cortés *et al.*, 2002].

Otro es la expresión del gen *ermE* que codifica para una metiltransferasa que confiere resistencia a los antibióticos eritromicina, lincosamida y estreptogramina B. La expresión de este gene le confiere a *E. coli* la capacidad de crecer en presencia de eritromicina, correspondiendo el grado de expresión con el grado de resistencia [Vester y Douthwaite, 1994].

#### VIII.4. Formación del heterodímero.

Para demostrar que estas dos proteínas forman parte del heterodímero con actividad de MCM, se trató de reconstituir el complejo en presencia de adenosilcobalamina. En la fig. 21 se muestran los resultados de la electroforesis en condiciones no desnaturizantes y se puede observar una banda muy clara que corresponde al peso del heterodímero.

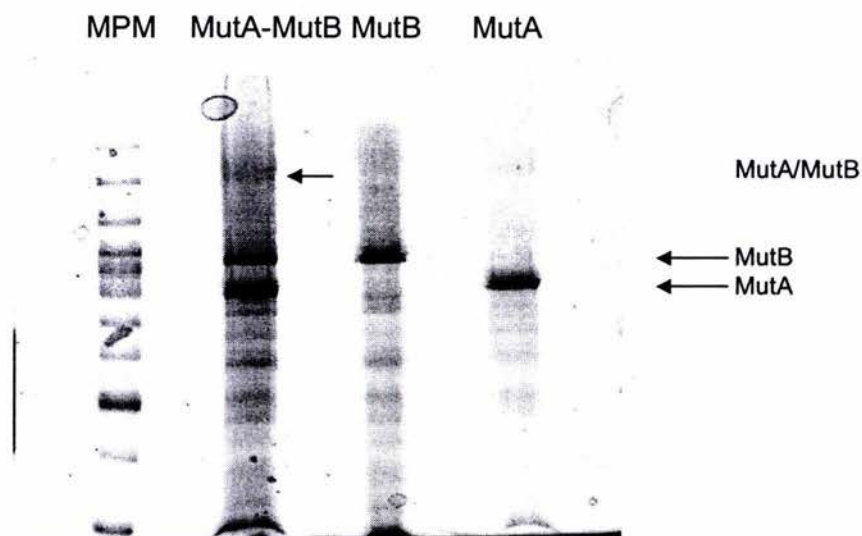


Fig. 21. Formación del heterodímero MutA-MutB analizada por ND-PAGE.

#### VIII.5. Determinación de la actividad de mutasa.

Posteriormente se determinó la actividad de MCM tanto en las proteínas purificadas solas (MutA y MutB) como en el heterodímero. Los resultados obtenidos mostraron una actividad de  $100 \text{ pmoles mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$  en la mezcla de reacción donde se adicionó la mutasa reconstituída a partir de las dos subunidades expresadas en *E. coli* y purificadas (Tabla 1). Esta actividad es 4 veces menor que la obtenida con los extractos libres de células de *S. erythraea*, lo que indica que la reconstitución se ha logrado parcialmente. Los cromatogramas obtenidos por HPLC se muestran en las figs. 22-26.

Tabla 1. Actividad de Metilmalonil-CoA Mutasa.

Muestra	Actividad Específica (pmoles succinil-CoA mg <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )
Enzima reconstituída	100
ELC <i>S. erythraea</i>	400
ELC <i>E. coli</i> pRSET A	9.3

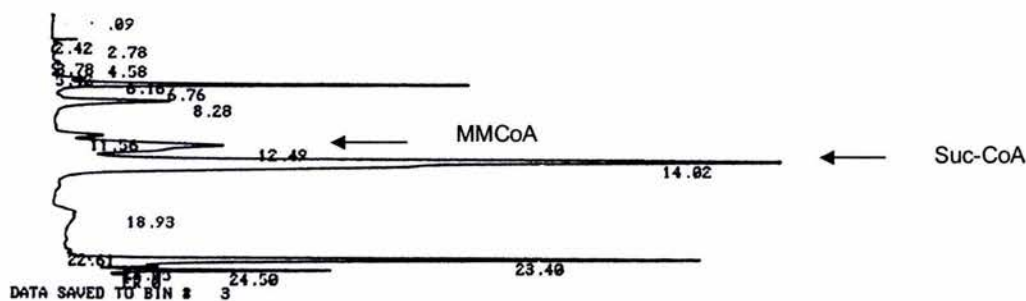


Fig. 22. Cromatograma de la mezcla de metilmalonil-CoA y succinil-CoA comerciales y separados por HPLC.



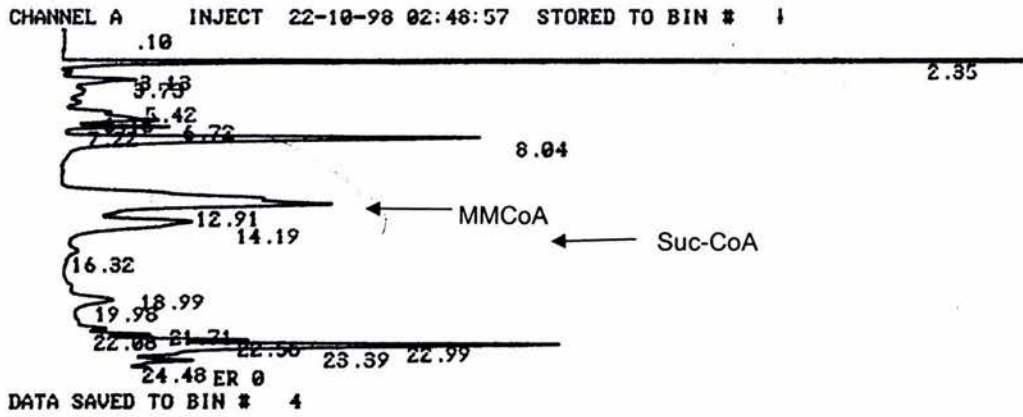


Fig. 23. Cromatograma de la mezcla de reacción de la MCM recombinante reconstituida e incubada una hora.

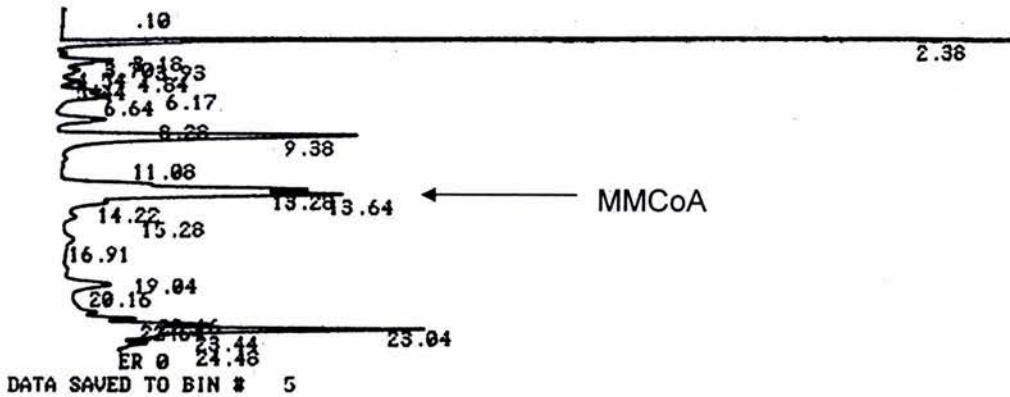


Fig. 24. Cromatograma de la mezcla de reacción con MCM recombinante reconstituida a tiempo cero.

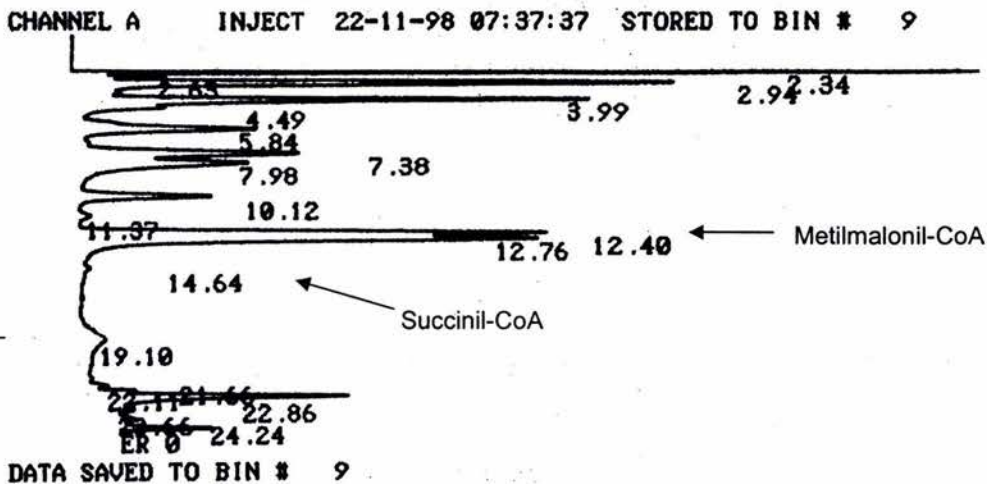


Fig. 25. Cromatograma de la mezcla de reacción con ELC de *E. coli* con el plásmido pRSET A sin inserto incubada una hora.

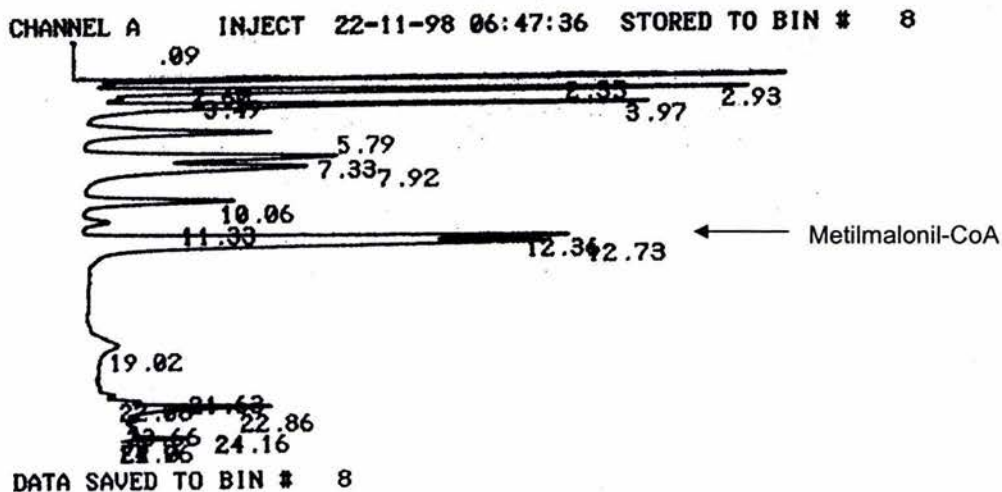


Fig. 26. Cromatograma de la mezcla de reacción con ELC de *E. coli* con el plásmido pRSETA sin inserto a tiempo cero.

## IX. CONCLUSIONES

---

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que que *E. coli* es capaz de expresar genes de actinomicetos sin problema, siempre y cuando, se encuentren bajo la influencia de promotores que sean de este microorganismo. Por otro lado, el uso de codones con alto contenido de G+C de los actinomicetos no pareciera ser una limitante ya que este microorganismo expresa bien y en altos niveles, las proteínas provenientes de estos organismos, indicando que contiene los RNAs de transferencia para cualquier codón, a diferencia de lo indicado por Connell (2001).

En conclusión:

- Los genes *mutA* y *mutB* codifican para las dos subunidades de la metilmalonil-CoA mutasa de *Saccharopolyspora erythraea* CA340.
- Se logró una buena expresión en *E. coli* de las 2 subunidades de la metilmalonil-CoA mutasa de *Saccharopolyspora erythraea* CA340.
- Que es posible reconstituir a la metilmalonil-CoA mutasa a partir de las dos subunidades expresadas y purificadas por separado.
- Que *Escherichia coli* es capaz de expresar genes de actinomicetos.

## X. PERSPECTIVAS

---

- 1.- Establecer si la proteína MeaB forma un complejo con la MCM.
- 2.- Determinar la actividad de mutasa del complejo MeaB-MCM.
- 3.- Interrumpir los genes *mutB* y *meaB* para determinar el papel de la MCM y de MeaB en el crecimiento de *Saccharopolyspora erythraea* y la producción de eritromicina.
- 4.- Aumentar la dosis de los genes *mutA* y *mutB* en *S. erythraea* para observar si hay incremento en la producción de eritromicina.

## XI. BIBLIOGRAFÍA

---

- **Agouridas C, Denis A, Auger JM, Benedetti Y, Bonnefoy A, Bretin F, Chantot JF, Dussarat A, Fromentin C, Dambrieres SG, Lachaud S, Laurin P, Lemartret O, Loyau V, Tessot N.** (1998) Synthesis and antibacterial activity of ketolides (6-O-methyl-3-oxoerythromycin derivatives) a new class of antibacterials highly potent against macrolide resistant and susceptible respiratory pathogens. *J Med Chem* 41: 4080-4100.
- **Andersen JF, Hutchinson CR.** (1992) Characterization of *Saccharopolyspora erythraea* cytochrome P-450 genes and enzymes, including 6-desoxyerythronolide B hydroxylase. *J Bacteriol* 174: 725-735.
- **Auerbach T, Bashan A, Yonath A.** (2004) Ribosomal antibiotics: structural basis for resistance, synergism and selectivity. *TRENDS Biotechnol* 22: 570-576.
- **Bermúdez O, Padilla P, Huitrón C, Flores ME.** (1998) Influence of carbon and nitrogen source on synthesis of NADP<sup>+</sup>-isocitrate dehydrogenase, methylmalonyl-coenzyme A mutase, and methylmalonyl-coenzyme A decarboxylase in *Saccharopolyspora erythraea* CA340. *FEMS Microbiol Lett* 164: 77-82.
- **Birch A, Leiser A, Robinson JA.** (1993) Cloning, sequencing, and expression of the gene encoding methylmalonyl-CoA mutase from *Streptomyces cinnamonensis*. *J Bacteriol* 175: 3511-3519.
- **Brisson-Noël A, Trieu-Cuot P, Courvalis P.** (1988) Mechanism of action of spiramycin and other macrolides. *J Antimicrob Chemother* 22: 13-23.
- **Bollag DM, Rozycki MD, Edelstein SJ.** (1996) Protein Methods. Wiley-Lyssa USA, 2<sup>nd</sup> Edition.
- **Castellanos-González A, Jiménez L, Landa A.** (2002) Cloning, production and characterisation of a recombinant Cu/Zn superoxide dismutase from *Taenia solium*. *Int J Parasitol* 32: 1175-1182.
- **Cervin A.** (2001) The anti-inflammatory effect of erythromycin and its derivatives, with special reference to nasal polyposis and chronic sinusitis. *Acta Otolaryngol* 121: 83-92.

- **Charles TC, Aneja P.** (1999) Methylmalonyl-CoA mutase encoding gene of *Sinorhizobium meliloti*. *Gene* 226: 121-127.
- **Cole, S.T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S.V., Eiglmeier, K., Gas, S., Barry III, C.E., Tekaiia, F., Badcock, K., Basham, D., Brown, D., Chillingworth, T., Connor, R., Davies, R., Devlin, K., Feltwell, T., Gentles, S., Hamlin, N., Holroyd, S., Hornsby, T., Jagels, K., Krogh, A., McLean, J., Moule, S., Murphy, L., Oliver, S., Osborne, J., Quail, M.A., Rajandream, M.A., Rogers, J., Rutter, S., Seeger, K., Skelton, S., Squares, S., Sqaers, R., Sulston, J.E., Taylor, K., Whitehead, S., Barrell, B.G.** 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 393 (6685), 537-544.
- **Connell ND.** (2001) Expression systems for use in actinomycetes and related organisms. *Curr Opin Biotechnol* 12: 446-449.
- **Corcoran JW.** (1981) Mode of action and resistance mechanism of macrolides. *Antibiotics* Vol. 4, Ed. Corcoran J. W., Springer-Verlag. N.Y. pp. 132-174.
- **Cortés J, Velasco J, Foster G, Blackaby AP, Rudd BAM, Wilkinson B.** (2002) Identification and cloning of a type III polyketide synthase required for diffusible pigment biosynthesis in *Saccharopolyspora erythraea*. *Mol Microbiol* 44: 1213-1224.
- **Donadio S, Staver MJ, Katz L.** (1996) Erythromycin production in *Saccharopolyspora erythraea* does not require a functional propionyl-CoA carboxylase. *Mol Microbiol* 19: 977-984.
- **Donadio S, Katz L.** (1992) Organization of the enzymatic domains in the multifunctional polyketide synthase involved in erythromycin formation in *Saccharopolyspora erythraea*. *Gene* 111: 51-60.
- **Donadio S, Shafiee A, Hutchinson CR.** (1990). Modular organization of genes required for complex polyketide biosynthesis. *Science* 252: 675-679.
- **Drennan CL, Matthews RG, Ludwig ML.** (1994) Cobalamin dependent methionine synthase: the structure of a methylcobalamin fragment and implications for the other B<sub>12</sub> dependent enzymes. *Curr Opin Struct Biol* 4: 919-929.

- **Fenton WA, Hack AM, Willard HF, Gertler A, Rosenberg LE.** (1982) Purification and properties of methylmalonyl coenzyme A mutase from human liver. *Arch Biochem Biophys* 214: 815-826.
- **Flores ME, Sánchez S.** (1985) Nitrogen regulation of erythromycin formation in *Streptomyces erythreus*. *FEMS Microbiol Lett* 26: 191-194.
- **Francalanci F, Davies NK, Fuller JQ, Murfitt D, Leadlay PF.** (1986) The subunit structure of methylmalonyl-CoA mutase from *Propionibacterium shermanii*. *Biochem J* 236: 489-494.
- **Gaisser S, Reather J, Wirtz G, Kellenberger L, Staunton J, Leadlay PF.** (2000) A defined system for hybrid macrolide biosynthesis in *Saccharopolyspora erythraea*. *Mol Microbiol.* 36: 391-401.
- **Haller T, Buckel T, Rétey J, Gerlt JA.** (2000) Discovering new enzymes and metabolic pathways: conversion of succinate to propionate by *Escherichia coli*. *Biochem* 39: 4622-4629.
- **Hershberger CL.** (1996) Metabolic engineering of polyketide biosynthesis. *Curr Opin Biotechnol* 7: 560-562.
- **Hopwood DA.** (1997) Genetic contributions to understanding polyketide synthases. *Chem Rev* 97: 2465-2497.
- **Hsieh YJ, Kolattukudy PE.** (1994) Inhibition of erythromycin synthesis by disruption of malonyl CoA decarboxylase gene *eryM* in *Saccharopolyspora erythraea*. *J Bacteriol* 176: 714-724.
- **Hunaiti AR, Kolattukudy PE.** (1982). Isolation and characterization of an acyl-coenzyme A carboxylase from an erythromycin producing *Streptomyces erythreus*. *Arch Biochem Biophys* 219: 362-371.
- **Hunaiti AR, Kolattukudy PE.** (1984a) Source of methylmalonyl-Coenzyme A for erythromycin synthesis: Methylmalonyl-coenzyme A mutase from *Streptomyces erythreus*. *Antimic Agents Chemother* 25: 173-178.
- **Hunaiti AR, Kolattukudi PE.** (1984b) Malonyl-CoA decarboxylase from *Streptomyces erythreus*: Purification, properties, and possible role in the production of erythromycin. *Arch Biochem Biophys* 229: 426-439.
- **Jackson CA, Kirszbaum L, Dashper S, Reynolds E C.** (1995) Cloning, expression and sequence analysis of the genes encoding the heterodimeric

methylmalonyl-CoA mutase of *Porphyromonas gingivalis* W50. *Gene* 167: 127-132.

- **Jansen R, Kalousek F, Fenton WA, Rosenberg LE, Ledley D.** (1989) Cloning of full length methylmalonyl-CoA mutase from cDNA library using the polymerase chain reaction. *Genomics* 4: 198-205.
- **Katz L, Donadio S.** (1993) Polyketide synthesis: prospects for hybrid antibiotics. *Annu Rev Microbiol* 47: 875-912.
- Korotkova, N., Chistoserdova, L., Kuska, V., Lindstrom, M.E., 2002. Glyoxalate regeneration pathway in the methylotroph *Methylobacterium extorquens* AM1. *J. Bacteriol.* 184, 1750-1758.
- **Labeda DP.** (1987) Transfer of the type strain of *Streptomyces erythreus* (Waksman 1923) Waksman and Henrici 1948 to the genus *Saccharopolyspora* Lancey and Goodfellow 1975 as *Saccharopolyspora erythraea* sp. nov., and designation of a neotype strain for *Streptomyces erythreus*. *Int J Syst Bacteriol* 37: 19-22.
- **Labro MT, Abdelghaffar H.** (2001). Immunomodulation by macrolide antibiotics. *J Chemother* 13: 3-8.
- **Lambalot RH, Cane DE, Aparicio JJ, Katz L.** (1995) Overproduction and characterization of the erythromycin C-12 hydroxylase, EryK. *Biochem* 34: 1858-1866.
- **Leow TC, Rahman RN, Basri M, Salleh AB.** (2004) High level expression of thermostable lipase from *Geobacillus* sp. Strain T1. *Biosci Biotechnol Biochem* 68: 96-103.
- **Liaw CC, Chang FR, Wu MJ, Wu YC.** (2003). A novel constituent from *Rollinia mucosa*, rollicosin, and a new approach to develop annonaceous acetogenins as potential antitumor agents. *J Nat Prod* 66: 279-281.
- **Liu H, Reynolds KA.** (2001) Precursor supply for polyketide biosynthesis: the role of crotonyl-CoA reductase. *Metab Eng* 3: 40-48.
- **Ludwig ML, Matthews RG.** (1997) Structure-based perspectives on B<sub>12</sub>-dependent enzymes. *Annu Rev Biochem* 66: 269-313.



- **Luz-Madriral A. (2002)** Clonación y secuencia parcial de los genes que codifican para la metilmalonil-CoA mutasa de *Saccharopolyspora erythraea* CA340. Tesis de Licenciatura, Fac. de Química, UNAM.
- **Mancia F, Smith GA, Evans PR. (1999)** Crystal structure of substrate complexes of methylmalonyl-CoA mutase. *Biochem* 38: 7999-8005.
- **Mancia F, Evans PR. (1998)** Conformational changes on substrate binding to methylmalonylCoA mutase and new insights into the free radical mechanism. *Structure* 6: 711-713.
- **Mancia F, Keep NH, Nakagawa A, Leadley PF, McSweeney S, Rasmussen B, Bosecker P, Diat O, Even PR. (1996)** How coenzyme B<sub>12</sub> radical are generated: The crystal structure of methylmalony-CoenzymeA mutase at 2 Å resolution. *Structure* 4: 339-350.
- **Marsh EN, McKie N, Davis NK, Leadlay PF. (1989)** Cloning and structural characterization of the genes coding for adenosylcobalamin-dependent methylmalonyl-CoA mutase from *Propionibacterium shermanii*. *Biochem J* 40: 42-54.
- **McGuire JM, Bunch RL, Anderson RC, Boaz HE, Flynn EH, Powel HM, Smith JM. (1952)** Ilotycin, a new antibiotic. *Antibiotic Chemother* 2: 281-283.
- **McKie N, Keep NH, Patchett ML, Leadlay PF. (1990)** Adenosylcobalamin-dependent methylmalonyl-CoA mutase from *Propionibacterium shermanii*. *Biochem J* 269: 293-298.
- **van der Meer JW. (2003)** Immunomodulation by antimicrobial drugs. *Neth J Med* 7: 233-234.
- **Miyamoto E, Watanabe F, Charles TC, Yamaji R, Inui H, Nakano Y.. (2003)** Purification and characterization of homodimeric methylmalonyl-CoA mutase from *Sinorhizobium meliloti*. *Arch Microbiol* 180: 151-154.
- **Miyamoto E, Watanabe F, Charles TC, Yamaji R, Inui H, Nakayo Y. (2002)** Purification and characterization of methylmalonyl-CoA mutase from methanol-utilizing bacterium, *Methylobacterium extorquens* NR-1. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 48: 242-246.

- **Paulus TJ, Tuan JS, Luebke VE, Maine GT, DeWitt JP, Katz L.** (1990) Mutation and cloning of *eryG*, the structural gene for erythromycin O-methyltransferase from *Sacharopolyspora erythraea*, and expression of *eryG* in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 172: 2541-2546.
- **Ratnatilleke A, Vrijbloed JW, Robinson JA.** (1999) Cloning and sequencing of coenzyme B<sub>12</sub>-binding domain of isobutyryl-CoA mutase from *Streptomyces cinnamonensis*, reconstitution of mutase activity, and characterization of the recombinant enzyme produced in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 274: 31679-31685.
- **Reynolds KA** (1998). Combinatorial biosynthesis: lesson learned from nature. *Proc Natl Acad Sci U S A.*;95(22):12744-12746.
- **Rigali S, Derouaux A, Giannotta F, Dusart J.** (2002). Subdivision of the helix-turn-helix GntR family of bacterial regulators in the FadR, HutC, MocR, and YtrA subfamilies. *J. Biol. Chem.* 277, 12507-12515.
- **Roy IY, Leadlay PF.** (1992) Physical map localization of the new *Escherichia coli* gene *sbm*. *J Bacteriol* 174: 5763-5764.
- **Rubin BK, Tamaoki J.** (2002) Macrolide antibiotics as biological response modifiers. *Curr Opin Investig Drugs* 1: 169-172.
- **Sakakibara H, Omura S.** (1984) Modification and structure-activity relationship. En: *Macrolide Antibiotics: Chemistry, Biology and Practice* (S. Omura, Ed.), pp. 85-126. Academic Press, N.Y.
- **Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T.** (1989) *Molecular Cloning: A laboratory manual*. 2<sup>nd</sup> edition. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- **Shapiro S, Vining LC.** (1983) Nitrogen metabolism and chloramphenicol production in *Streptomyces venezuelae*. *Can J Microbiol* 29: 1706-1714.
- **Schultz MJ.** (2004) Macrolide activities beyond their antimicrobial effects: macrolides in diffuse panbronchiolitis and cystic fibrosis *J Antimicrob Chemother* 54: 21-28.
- **Skinner DD, Morgenstern MR, Fedechko RW, Denoya CD.** (1995) Cloning and sequencing of a cluster of genes encoding branched-chain  $\alpha$ -keto acid dehydrogenase from *Streptomyces avermitilis* and the production

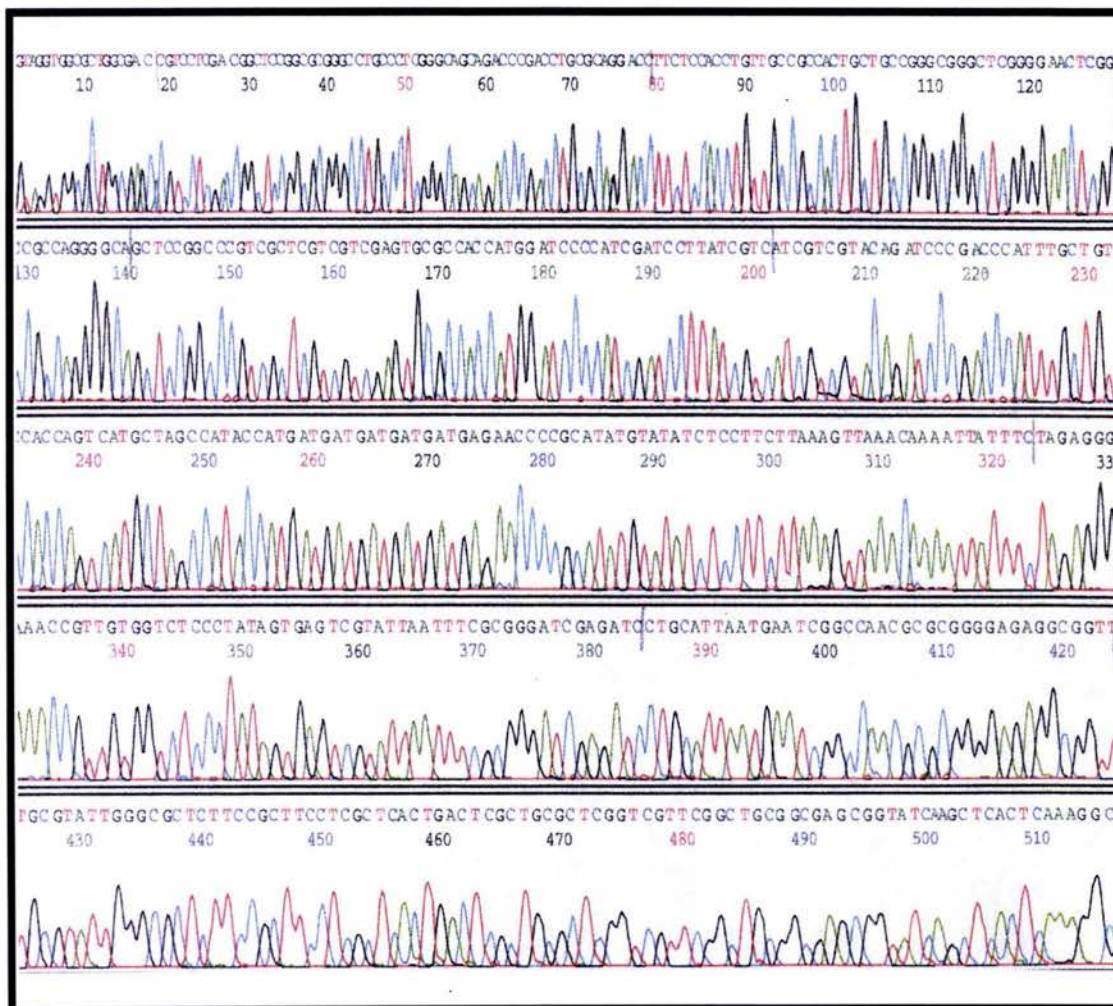
- of a functional E1[ $\alpha\beta$ ] component in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 177: 183-190.
- **Staunton J, Wilkinson B.** (1997) Biosynthesis of Erythromycin and Rimpamycin. *Chem. Rev* 97: 2611-2629.
  - **Summers RG, Donadio S, Staver M, Wendt-Pienkowski E, Hutchinson CR, Katz L.** (1997) Sequencing and mutagenesis of genes from the erythromycin biosynthetic gene cluster of *Saccharopolyspora erythraea* that are involved in L-mycarose and D-desosamine production. *Microbiology* 143: 3251-3262.
  - **Stassi D L, Kakavas SJ, Reynolds KA, Gunawardana G, Swanson S, Zeidner D, Jackson M, Lui H, Buko A, Katz L.** (1998) Ethyl-substituted erythromycin derivatives produced by directed metabolic engineering. *Proc Natl Acad Sci* 95: 7305-7309.
  - **Steigbigel NH.** 1995. Macrolides and clindamycin. In: Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, 4<sup>th</sup> Ed. (Mandell, G.L., Bennett, J.E., and Dolin., Eds.) Churchill Livingstone, New York, pp. 334-346.
  - **Tang Y, Lee TS, Khosla C.** (2004). Engineered biosynthesis of regioselectively modified aromatic polyketides using bimodular polyketide synthases. *PLoS Biol* 2: E31.
  - **Tang L, Zhang YZ, Hutchinson CR.** (1994) Amino acid catabolism and antibiotic synthesis: Valine is a source of precursors for macrolide biosynthesis in *Streptomyces ambofaciens* and *Streptomyces fradiae*. *J Bacteriol* 176:6107-6119.
  - **Trevor CC, Punita A.** (1999) Methylmalonyl-CoA mutase encoding gene of *Sinorhizobium meliloti*. *Gene* 226: 121-127.
  - **Vara J A, Lewandoska-Skarbek M, Wang Y G, Donadio S, Hutchinson CR.** (1989) Cloning of genes governing the deoxysugar portion of the erythromycin biosynthetic pathway in *Saccharopolyspora erythraea* (*Streptomyces erythraeus*). *J Bacteriol* 170: 5872-5881.
  - **Varoglu M, Peters BM, Crews P.** (1995). The structures and cytotoxic properties of polyketide peroxides from a Plakortis sponge. *J Nat Prod.* 58:27-36.

- **Vester B, Douthwaite S.** (1994) Domain V of 23S rRNA contains all the structural elements necessary for recognition by the ErmE methyltransferase. *J Bacteriol* 176: 6999-7004.
- **Vrijbloed JW, Burkhardt KZ, Ratnatilleke A, Leiser GA, Robinson AJ.** (1999) Insertional Inactivation of methylmalonyl-Coenzyme A (CoA) Mutase and isobutyryl-CoA mutase genes in *Streptomyces cinnamonensis*: Influence on polyketide antibiotic biosynthesis. *J Bacteriol* 181: 5600-5605.
- **Vu-Trong K, Gray PP.** (1987) Influence of ammonium on the biosynthesis of the macrolide antibiotic tylosin. *Enz Micro Technol* 9: 590-593.
- **Wallace KK, Bao ZY, Dai H, Digate R, Schuler G, Speedie KM.** (1995) Purification of crotonyl-CoA reductase from *Streptomyces collinus* and cloning, sequencing and expression of the corresponding gene in *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* 233: 954-962.
- **Wallwork B, Coman W, Mackay-Sim A, Cervin A.** (2004) Effect of clarithromycin on nuclear factor-kappa B and transforming growth factor-beta in chronic rhinosinusitis. *Laryngoscope* 114: 286-290.
- **Watanabe F, Katsuo A, Takamura Y, Nakano Y.** (1996) Adenosylcobalamin-dependent methylmalonyl-CoA mutase isozymes in the photosynthetic protozoon *Euglena gracilis* Z. *Microbiol* 142: 2631-2634.
- **Weber JM, Wierman CK, Hutchinson CR.** (1985) Genetic analysis of erythromycin production in *Streptomyces erythreus*. *J Bacteriol* 164: 425-433.
- **Weisblum B.** (1995) Insights into erythromycin action from studies of its activity as inducer of resistance. *Ant Agent Chemother* 39: 797-805.
- **Wilkemeyer MF, Crane AM, Ledley FD.** (1990) Primary structure of mouse methylmalonyl-CoA mutase. *J Biochem* 271: 449-455.
- **Wolfgang P.** (1994) Pathway engineering in secondary metabolite-producing actinomycetes. *Critical Rev Biotechnol* 14: 251-258.
- **Wright H, Barona-Gómez F, Hodgson DA, Fülöp V.** (2004) Expression, purification and preliminary crystallographic analysis of phosphoribosyl isomerase (PriA) from *Streptomyces coelicolor*. *Acta Cryst D60*: 534-536.

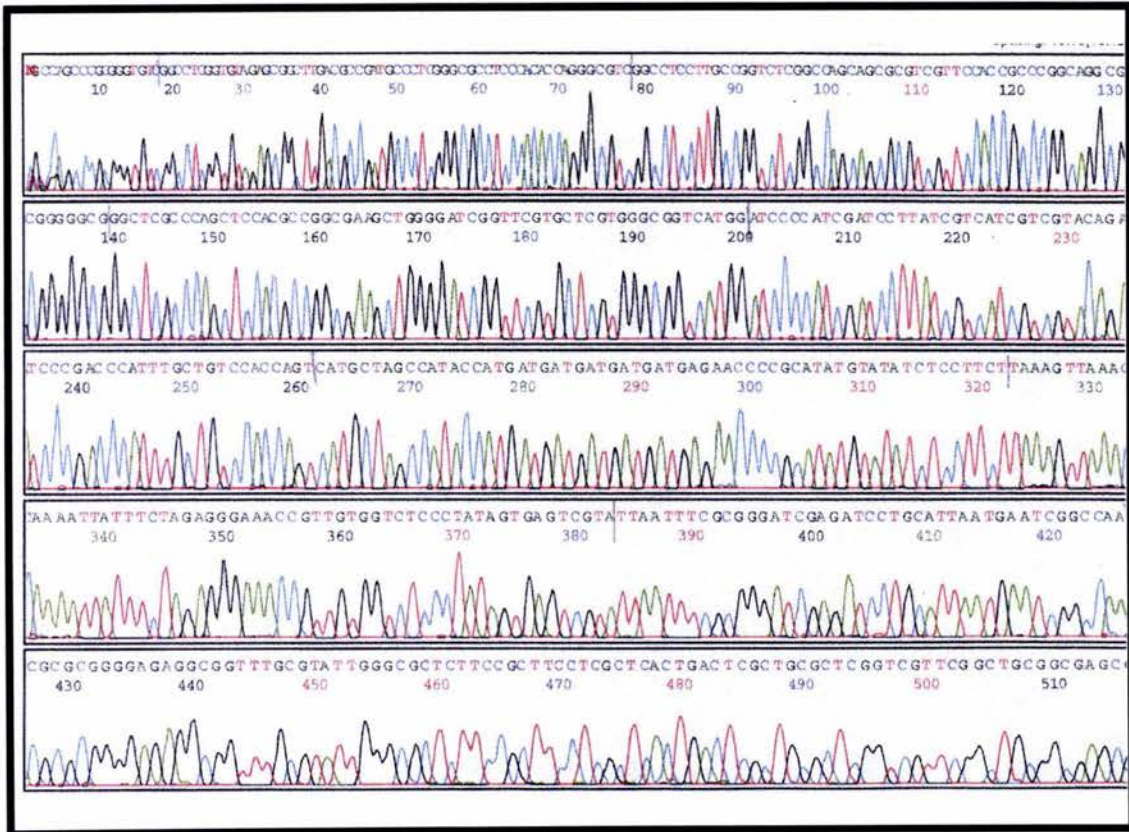
- **Zhang W**, Yang L, Jiang W, Zhao G, Yang Y, Chiao J. (1999) Molecular analysis and heterologous expression of the gene encoding methylmalonyl-coenzyme A mutase from rifamycin SV-producing strain *Amycolatopsis mediterranei* U32. *Appl Biochem Biotechnol* 82: 209-225.
- **Zohlhofer D, Nuhrenberg TG, Neumann FJ, Richter T, May AE, Schmidt R, Denker K, Clauss MA, Schomig A, Baeuerle PA.** (2004) Rapamycin effect transcriptional programs in smooth muscle cells controlling proliferative and inflammatory properties. *Mol Pharmacol* 65: 880-889.

## XII. ANEXO DE SECUENCIAS

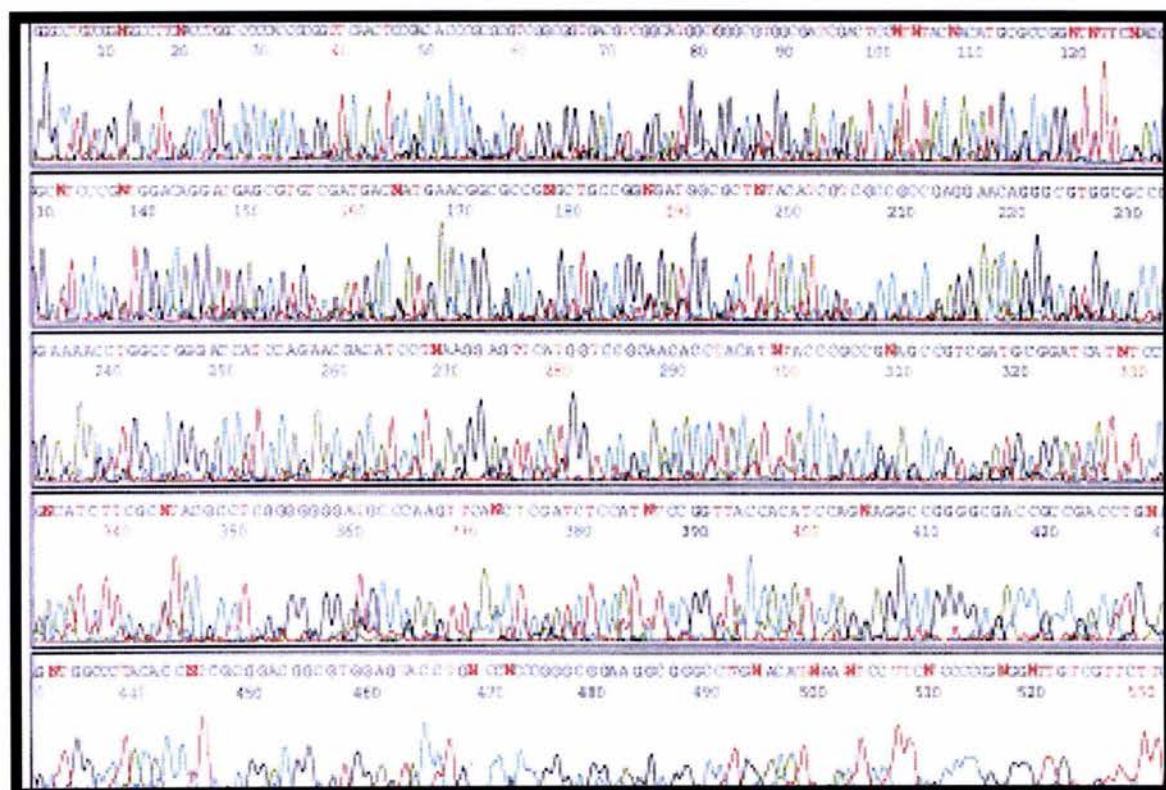
### XII.1 Gen *mutA* CON EL PRIMER CEC-2.



## XII.2 Gen *mutB* CON EL PRIMER B/XMA.

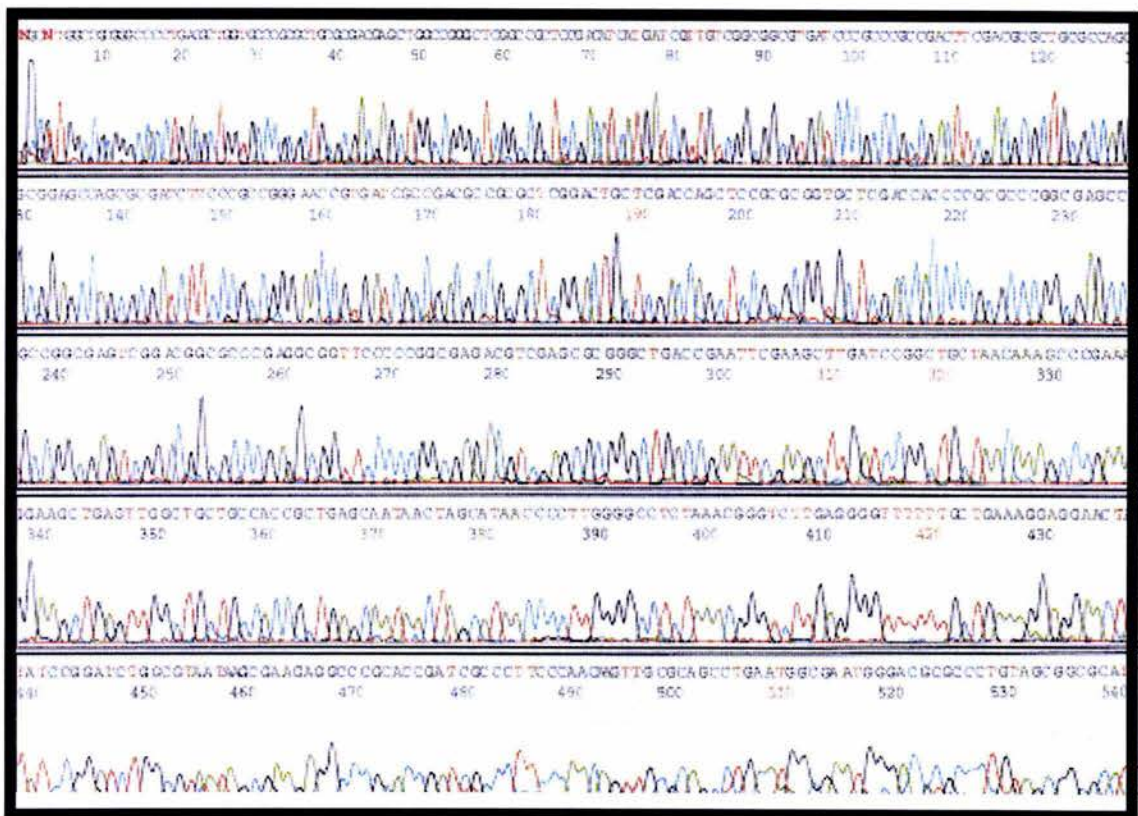


### XII.3 Gen *mutB* CON PRIMER Mut1.



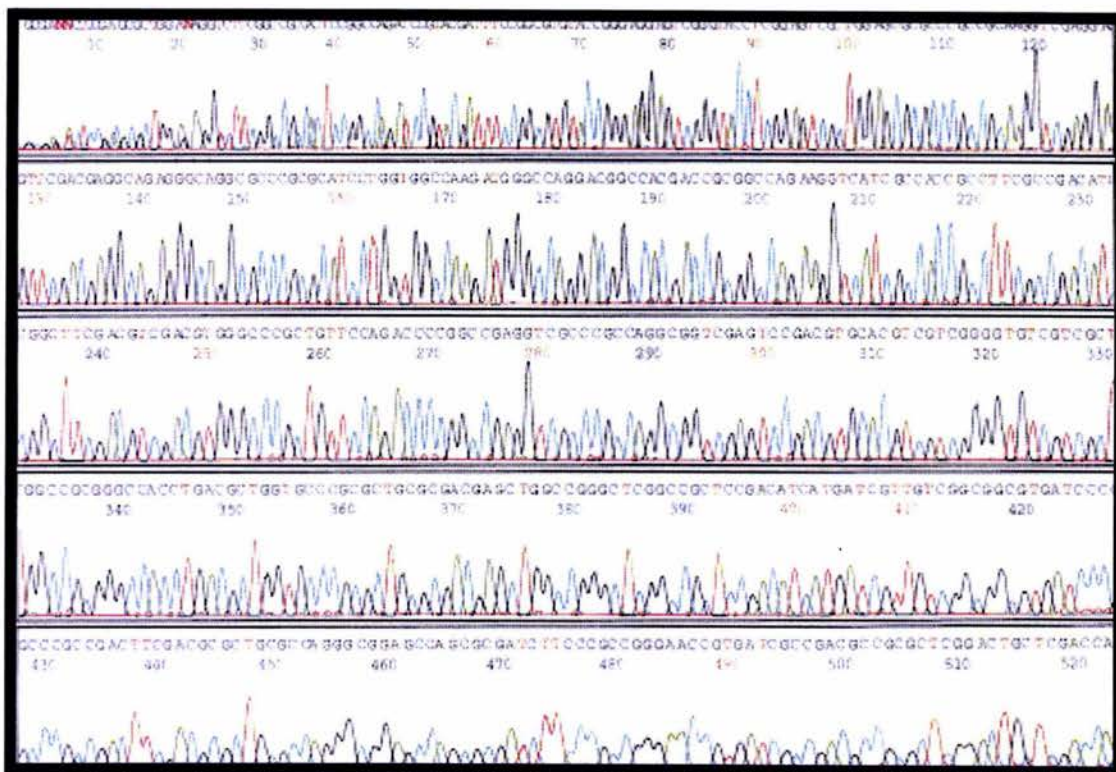


## XII.4 Gen *mutB* CON PRIMER VNE.

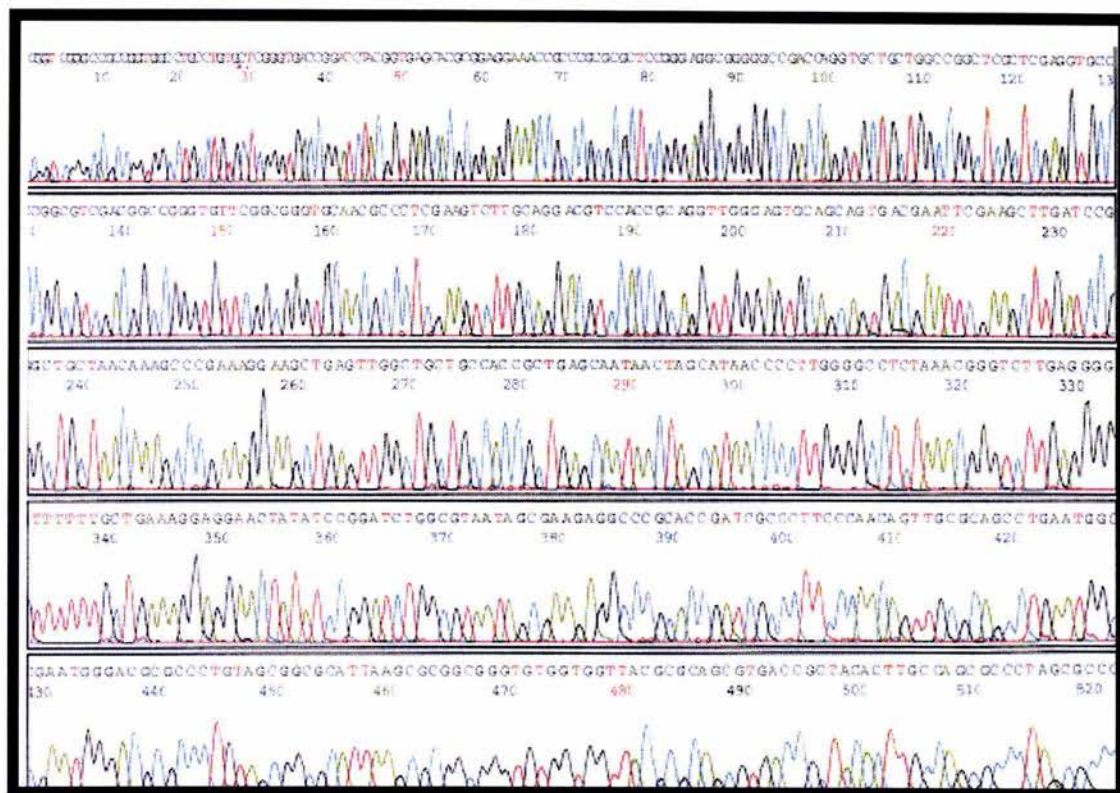




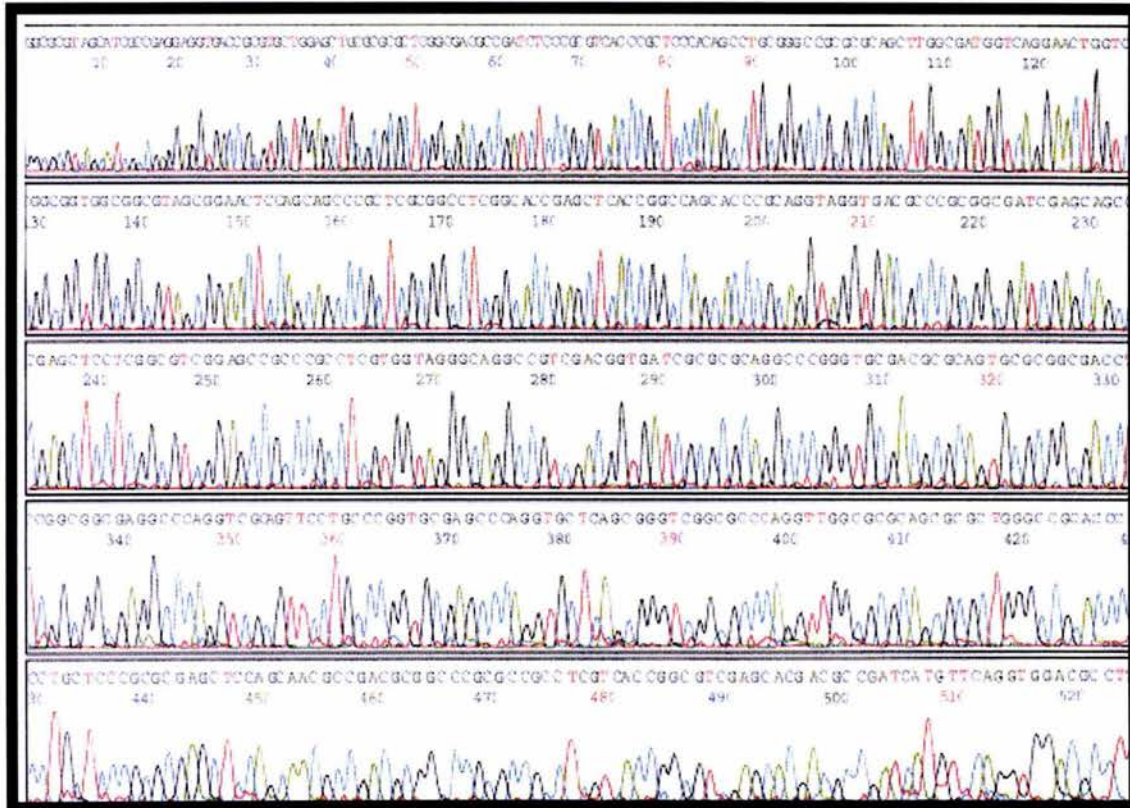
## XII.6 Gen *mutB* CON PRIMER XKB1.



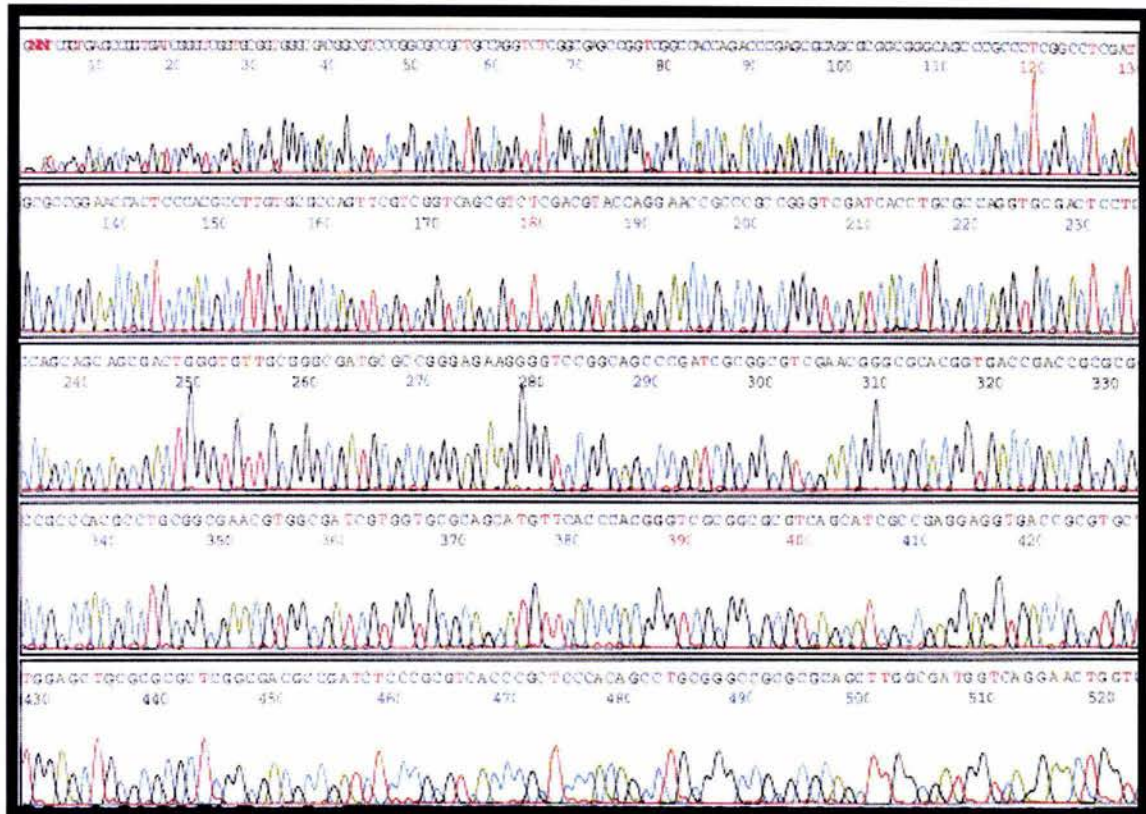
## XII.7 Gen *mutB* CON PRIMER 170T7B.



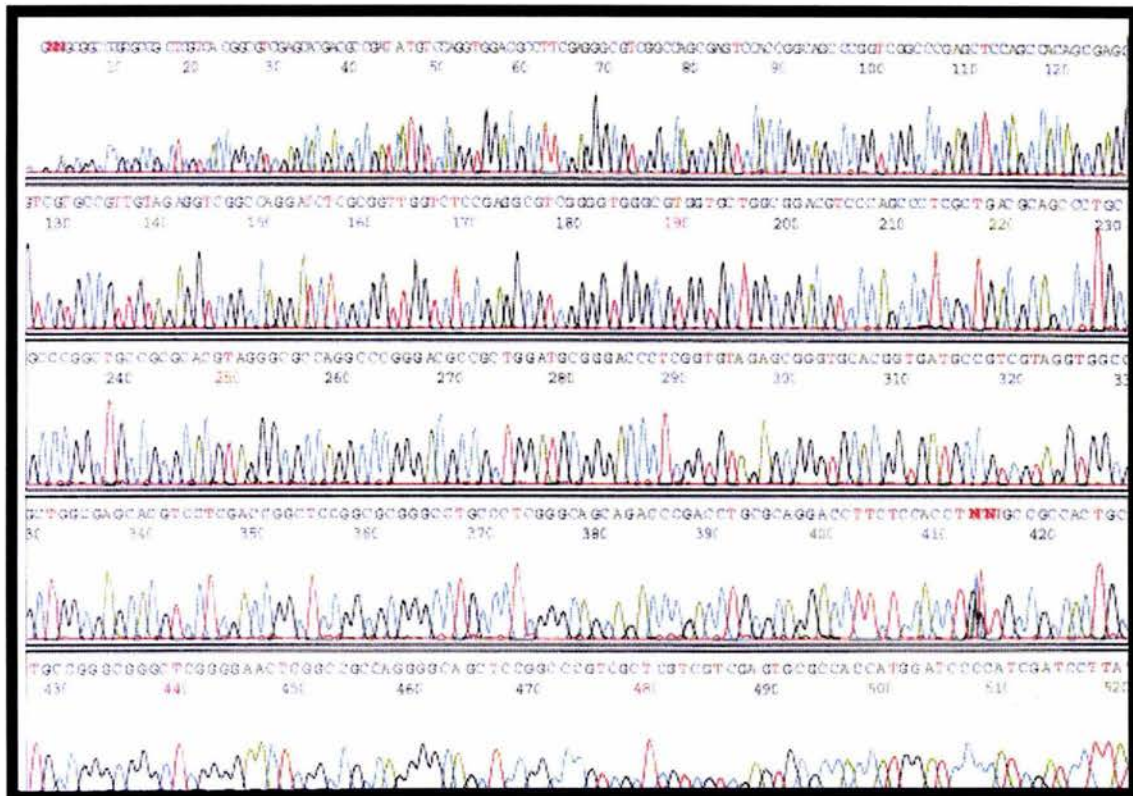
## XII.8 Gen *mutA* CON AH.



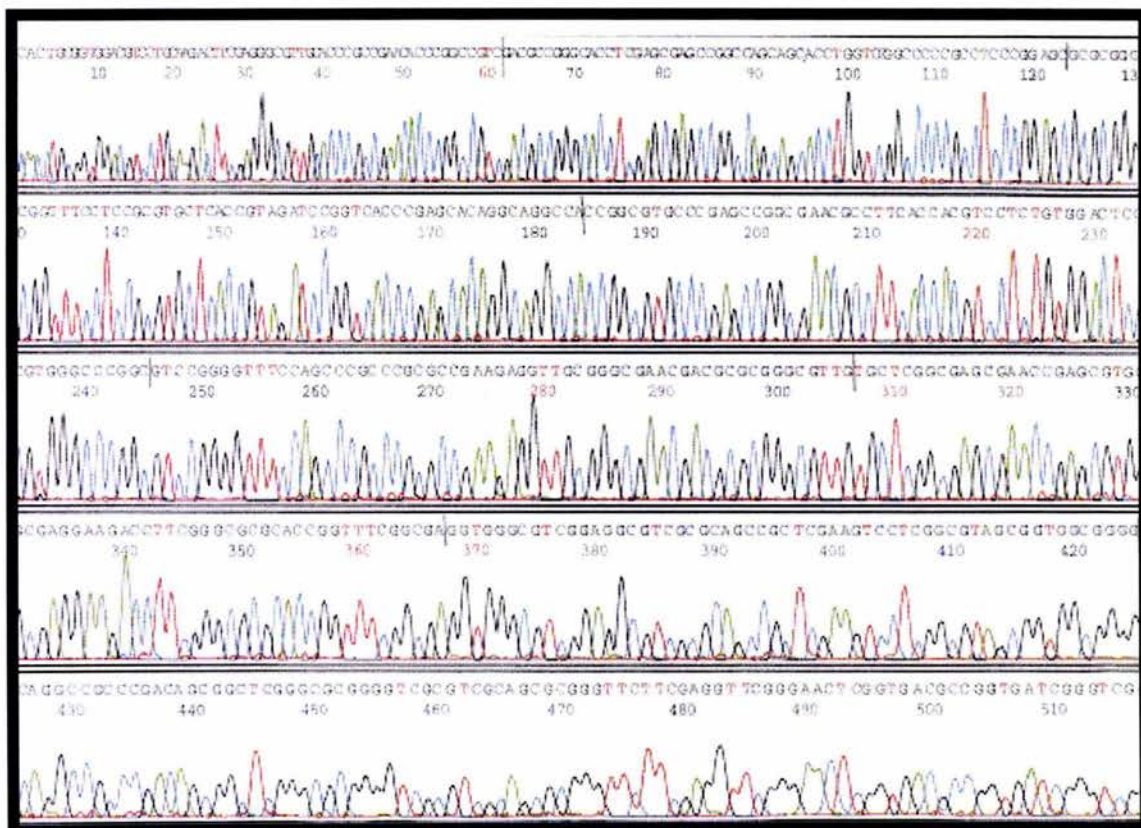
## XII.9 Gen *mutA* CON T7XX430.



## XII.10 Gen *mutA* CON PRIMER ACH460.



## XII.11 Gen *mutA* CON PRIMER A/STP.



ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA





