



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
POSGRADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

**CLONACIÓN Y EXPRESIÓN EN *Escherichia coli* DEL GEN
MMAA DE HUMANO Y SU PAPEL EN LA REACTIVACIÓN
DE LA METILMALONIL-CoA MUTASA**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS
P R E S E N T A :
TÓSHIKO TAKAHASHI IÑIGUEZ

Tutor: DRA. MARÍA ELENA FLORES CARRASCO



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.

CLONACIÓN Y EXPRESIÓN EN *Escherichia coli* DEL GEN *MMAA* DE HUMANO Y SU PAPEL EN LA REACTIVACIÓN DE LA METILMALONIL CoA MUTASA

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis doctoral se realizó bajo la dirección de la Dra. María Elena Flores Carrasco en el Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Se reconoce al comité tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis, el cual estuvo constituido por:

Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval	Instituto de Investigaciones Biomédicas
Dr. Armando Tovar Palacio	Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán
Dra. María Elena Flores Carrasco	Instituto de Investigaciones Biomédicas

Se reconoce al jurado de examen doctoral por la revisión y comentarios a este trabajo, el cual estuvo constituido por:

Presidente	Dr. Luis Servín González	Instituto de Investigaciones Biomédicas
Vocal	Dra. Bertha González Pedrajo	Instituto de Fisiología Celular
Vocal	Dr. Diego González Halphen	Instituto de Fisiología Celular
Vocal	Dra. Lorena Sofía Orozco Orozco	Instituto Nacional de Medicina Genómica
Secretario	Dra. María Elena Flores	Instituto de Investigaciones Biomédicas

Este proyecto fue apoyado por PAPIIT-UNAM (No. 200403). Durante la realización de los estudios doctorales recibí una beca de CONACyT.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Humberto García Arellano por su asesoría y colaboración técnica durante la realización de este trabajo.

Al Dr. Mauricio A. Trujillo Roldán por su asesoría y colaboración técnica durante la realización de este trabajo.

Al Dr. Luis Servín González por su asesoría durante la realización de este trabajo.

A la M. en C. Gabriela González Cerón por su asesoría técnica durante la realización de este trabajo.

Al Biol. Rafael Cervantes Roldán por su asesoría técnica durante la realización de este trabajo.

A la Dra. Gloria Soberón Chávez por facilitarme el equipo de HPLC para realizar los experimentos.

INDICE

1 RESUMEN	1
ABSTRACT	2
2 ABREVIATURAS	3
3 ANTECEDENTES	4
3.1 EL COFACTOR ADENOSILCOBALAMINA	4
3.1.1 HISTORIA	4
3.1.2 CARACTERÍSTICAS Y DERIVADOS DE COBALAMINA	4
3.2 ENZIMAS DEPENDIENTES DE VITAMINA B₁₂	6
3.2.1 CLASIFICACIÓN DE ENZIMAS DEPENDIENTES DE AdoCbl	6
3.3 CATÁLISIS ENZIMÁTICA MEDIADA POR RADICALES	8
3.4 DISTRIBUCIÓN DE LA PROTEÍNA MCM EN LOS ORGANISMOS	9
3.4.1 FUNCIÓN DE MCM EN BACTERIAS	9
3.4.2 FUNCIÓN DE MCM EN MAMÍFEROS	10
3.5 MECANISMOS CONTRA INACTIVACIÓN EN ENZIMAS	
DEPENDIENTES DE AdoCbl	12
3.5.1 AMINOÁCIDOS INVOLUCRADOS EN PROTECCIÓN CONTRA	
INACTIVACIÓN	13
3.5.2 FACTORES REACTIVANTES	14
3.5.3 METALOCHAPERONAS INVOLUCRADAS EN PROTECCIÓN	16
4 JUSTIFICACIÓN	20
5 HIPÓTESIS	21
6 OBJETIVO GENERAL	22
6.1 OBJETIVOS PARTICULARES	22
7 MATERIALES Y MÉTODOS	23
7.1 CEPAS UTILIZADAS	23
7.2 MEDIOS DE CULTIVO	23
7.3 CLONACIÓN DEL cDNA CORRESPONDIENTE AL GEN MMAA EN EL	
VECTOR DE EXPRESIÓN pRSETA	24
7.3.1 AISLAMIENTO DE RNA A PARTIR DE LEUCOCITOS.....	24

7.3.2 DISEÑO DE INICIADORES.....	24
7.3.3 OBTENCIÓN DEL cDNA DE <i>MMAA</i> POR RT-PCR	25
7.3.4 CLONACIÓN DEL cDNA DE <i>MMAA</i> CON SECUENCIA LÍDER EN EL PLÁSMIDO DE PROPAGACIÓN pBlueScript SK ⁺	25
7.3.4.1 DIGESTIONES CON LAS ENZIMAS <i>Bam</i> HI Y <i>Eco</i> RI.....	25
7.3.4.2 LIGACIÓN DEL PLÁSMIDO pBlueScript SK ⁺ CON <i>MMAA</i>	25
7.3.4.3 TRANSFORMACIÓN DE LA MEZCLA DE LIGACIÓN pBlueScript SK ⁺ - <i>MMAA</i> EN LA CEPA DE PROPAGACIÓN <i>E. coli</i> TOP10F'	26
7.3.4.4 PURIFICACIÓN DE LOS PLÁSMIDOS RECOMBINANTES A PARTIR DE <i>E. coli</i> TOP10F'	26
7.3.5 SUB-CLONACIÓN DE <i>MMAA</i> SIN SECUENCIA LÍDER EN EL PLÁSMIDO DE EXPRESIÓN pRSETA.....	26
7.3.5.1 OBTENCIÓN DE <i>MMAA</i> SIN SECUENCIA LÍDER MITOCONDRIAL POR AMPLIFICACIÓN	26
7.3.5.2 DIGESTIONES CON LAS ENZIMAS <i>Bam</i> HI Y <i>Eco</i> RI.....	26
7.3.5.3 LIGACIÓN DEL PLÁSMIDO pRSETA CON <i>MMAA</i> SIN LÍDER.....	27
7.3.5.4 TRANSFORMACIÓN DE LA MEZCLA DE LIGACIÓN pRSETA- <i>MMAA</i> SIN LÍDER EN LA CEPA DE PROPAGACIÓN <i>E. coli</i> TOP10F'	27
7.3.5.5 PURIFICACIÓN DE LOS PLÁSMIDOS RECOMBINANTES A PARTIR DE <i>E. coli</i> TOP10F'	27
7.3.5.6 SECUENCIACIÓN DEL PLÁSMIDO pMMAAw1-1	27
7.4 CLONACIÓN DEL cDNA CORRESPONDIENTE AL GEN <i>MUT</i> EN EL VECTOR DE EXPRESIÓN pRSETA.....	28
7.4.1 DISEÑO DE INICIADORES.....	28
7.4.2 SUB-CLONACIÓN DE <i>MUT</i> SIN SECUENCIA LÍDER EN EL PLÁSMIDO DE EXPRESIÓN pRSETA.....	28
7.4.2.1 OBTENCIÓN DE <i>MUT</i> SIN SECUENCIA LÍDER MITOCONDRIAL POR AMPLIFICACIÓN	28
7.4.2.2 DIGESTIONES CON LAS ENZIMAS <i>Sac</i> I Y <i>Nco</i> I.....	29
7.4.2.3 LIGACIÓN DEL PLÁSMIDO pRSETA CON <i>MUT</i> SIN LÍDER.....	29
7.4.2.4 TRANSFORMACIÓN DE LA MEZCLA DE LIGACIÓN pRSETA- <i>MUT</i> SIN LÍDER EN LA CEPA DE PROPAGACIÓN <i>E. coli</i> TOP10F'	29
7.4.2.5 PURIFICACIÓN DE LOS PLÁSMIDOS RECOMBINANTES A PARTIR DE <i>E. coli</i> TOP10F'	30

7.4.2.6 SECUENCIACIÓN DEL PLÁSMIDO pMCM-2.....	30
7.5 EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA MMAA	30
7.5.1 TRANSFORMACIÓN DEL PLÁSMIDO pMMAA _{wl-1} EN CEPAS DE EXPRESIÓN	30
7.5.2 ALMACENAMIENTO DE CLONAS DE EXPRESIÓN	30
7.5.3 PRUEBAS PILOTO DE EXPRESIÓN DE MMAA	31
7.5.4 EXPRESIÓN DE MMAA	31
7.5.5 PURIFICACIÓN DE MMAA	31
7.5.6 RECONOCIMIENTO DE MMAA POR WESTERN BLOT	32
7.6 EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA MCM	32
7.6.1 TRANSFORMACIÓN DEL PLÁSMIDO pMCM-2 EN CEPAS DE EXPRESIÓN	32
7.6.2 ALMACENAMIENTO DE CLONAS DE EXPRESIÓN	33
7.6.3 PRUEBAS PILOTO DE EXPRESIÓN DE MCM	33
7.6.4 EXPRESIÓN DE MCM	33
7.6.5 PURIFICACIÓN DE MCM	34
7.6.6 DIÁLISIS Y CONCENTRACIÓN DE MCM	34
7.6.7 RECONOCIMIENTO DE MCM POR WESTERN BLOT	35
7.7 MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE GTPasa DE LA PROTEÍNA PURA MMAA.....	35
7.7.1 ESTANDARIZACIÓN DE CONDICIONES	35
7.7.2 MEDICIÓN DE ACTIVIDAD.....	36
7.8 MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE ISOMERASA DE LA PROTEÍNA PURA MCM.....	36
7.8.1 TIEMPOS CORTOS DE INCUBACIÓN.....	36
7.8.2 TIEMPOS PROLONGADOS DE INCUBACIÓN	37
7.9 ENSAYO DE DOBLE HÍBRIDO EN LEVADURA	37
7.9.1 DISEÑO DE INICIADORES.....	37
7.9.2 AMPLIFICACIÓN Y CLONACIÓN DE <i>MMAA</i> Y <i>MUT</i> EN LOS PLÁSMIDOS DEL SISTEMA MATCHMAKER GOLD YEAST TWO-HYBRID SYSTEM	38
7.9.2.1 AMPLIFICACIÓN DE LOS GENES <i>MMAA</i> Y <i>MUT</i>	38
7.9.2.2 RESTRICCIÓN DE LOS AMPLICONES CORRESPONDIENTES A <i>MMAA</i> Y <i>MUT</i>	38

7.9.2.3 LIGACIONES	39
7.9.2.4 TRANSFORMACIÓN DE LAS MEZCLAS DE LIGACIÓN pGBKT7- MUT Y pGADT7-MMAA EN LA CEPA DE PROPAGACIÓN <i>E. coli</i> TOP10F'	39
7.9.2.5 PURIFICACIÓN DE LOS PLÁSMIDOS RECOMBINANTES A PARTIR DE <i>E. coli</i> TOP10F'	39
7.9.3 TRANSFECCIÓN DE PLÁSMIDOS EN LEVADURA.....	39
7.9.4 ESCRUTINIO PARA LA INTERACCIÓN ENTRE MCM Y MMAA EN LEVADURA	40
8 RESULTADOS	41
8.1 OBTENCIÓN Y CLONACIÓN DEL cDNA CORRESPONDIENTE AL GEN MMAA EN EL VECTOR DE EXPRESIÓN pRSETA.....	41
8.1.1 EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL	41
8.1.2 RT-PCR Y CLONACIÓN DEL cDNA DE MMAA EN pBlueScript SK ⁺	42
8.1.3 AMPLIFICACIÓN Y CLONACIÓN EN pRSETA	44
8.2 CLONACIÓN DEL cDNA CORRESPONDIENTE AL GEN MUT EN EL VECTOR DE EXPRESIÓN pRSETA.....	45
8.2.1 CLONACIÓN DE MUT EN EL VECTOR DE EXPRESIÓN pRSETA.....	45
8.3 EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA MMAA	47
8.3.1 PRUEBAS PILOTO DE EXPRESIÓN.....	47
8.3.2 PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA MMAA.....	50
8.4 RECONOCIMIENTO DE MMAA POR WESTERN BLOT	51
8.5 EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA MCM	52
8.5.1 PRUEBAS PILOTO DE EXPRESIÓN.....	52
8.6 RECONOCIMIENTO DE MCM POR WESTERN BLOT	55
8.7 ACTIVIDAD DE GTPasa DE LA PROTEÍNA PURA MMAA	55
8.7.1 ESTANDARIZACIONES REALIZADAS.....	55
8.7.2 MEDICIÓN DE ACTIVIDAD DE GTPasa DE MMAA	56
8.8 ACTIVIDAD DE ISOMERASA DE MCM PURA	57
8.8.1 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA Y EFECTO DE MMAA A TIEMPOS CORTOS DE INCUBACIÓN	57
8.8.2 ACTIVIDAD DE MCM A TIEMPOS PROLONGADOS DE INCUBACIÓN	58

8.9 INTERACCIÓN ENTRE LAS PROTEÍNAS MMAA Y MCM POR ENSAYO DE DOBLE HÍBRIDO	60
8.9.1 CLONACIÓN DE <i>MMAA</i> EN EL VECTOR pGADT7-AD	60
8.9.2 CLONACIÓN DE <i>MUT</i> EN EL VECTOR pGBKT7	61
8.9.3 INTERACCIÓN MMAA-MCM A TRAVÉS DEL ENSAYO DE DOBLE HÍBRIDO EN LEVADURA	63
9 DISCUSIÓN	66
10 CONCLUSIONES	71
11 BIBLIOGRAFÍA	72
12 ANEXOS	78
12.1 ANEXO 1.....	79
12.1.1 CONDICIONES EMPLEADAS EN EL RT-PCR DEL GEN <i>MMAA</i>	79
12.1.2 CONDICIONES EMPLEADAS EN EL PCR DEL GEN <i>MMAA</i>	79
12.1.3 CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN PARA EL GEN <i>MUT</i>	79
12.1.4 CONDICIONES EMPLEADAS DURANTE LA AMPLIFICACIÓN DEL GEN <i>MMAA</i> A PARTIR DEL PLÁSMIDO p-MMAAw1-1	80
12.1.5 CONDICIONES EMPLEADAS DURANTE LA AMPLIFICACIÓN DEL GEN <i>MUT</i> A PARTIR DEL PLÁSMIDO pMCM-2	80
12.2 ANEXO 2.....	81
12.3 ANEXO 3.....	82

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

FIGURAS

Fig. 1 Fórmula estructural de la AdoCbl.....	5
Fig. 2 Tipos de unión entre la enzima y el cofactor AdoCbl.....	7
Fig. 3 Clasificación general de las enzimas dependientes de AdoCbl.....	7
Fig. 4 Ruleta de radicales.....	8
Fig. 5 Mecanismo de reactivación.....	15
Fig. 6 Alineamiento entre las proteínas MMAA de humano y MeaB de la bacteria <i>M. extorquens</i>	18
Fig. 7 Purificación de RNA total a partir de leucocitos.....	41
Fig. 8 Productos obtenidos por RT-PCR del gen <i>MMAA</i>	42
Fig. 9 Digestión de pBlueScriptSK ⁺ y del amplicón <i>MMAA</i> con las enzimas <i>Bam</i> HI/ <i>Eco</i> RI.....	43
Fig. 10 Purificación de los plásmidos pSK-MMAA-1 a 4 y digestión con las enzimas <i>Bam</i> HI/ <i>Eco</i> RI.....	43
Fig. 11 Amplificación de <i>MMAA</i> por PCR y digestión del amplicón con las enzimas <i>Bam</i> HI/ <i>Eco</i> RI.....	44
Fig. 12 Purificación de los plásmidos p-MMAAw1-1 a 4 y digestión con las enzimas <i>Bam</i> HI/ <i>Eco</i> RI.....	45
Fig. 13 Amplificación del gen <i>MUT</i> y digestión del amplicón y del plásmido pRSETA con las enzimas <i>Sac</i> I/ <i>Nco</i> I.....	46
Fig. 14 Purificación de los plásmidos pMCM-1 a 3 y digestión con las enzimas <i>Sac</i> I/ <i>Nco</i> I.....	46
Fig. 15 Expresión de la proteína MMAA en las fracciones solubles e insolubles de lisados obtenidos a partir de células de <i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS.....	47
Fig. 16 Expresión de la proteína MMAA en las fracciones solubles e insolubles de lisados obtenidos a partir de células de <i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS.....	48
Fig. 17 Expresión de la proteína MMAA en las fracciones solubles e insolubles de lisados obtenidos a partir de células de <i>E. coli</i> BL21(DE3)Rosetta y <i>E. coli</i>	

BL21-CodonPlus(DE)3-RIL.....	49
Fig. 18 Expresión de la proteína MMAA en las fracciones solubles de lisados obtenidos a partir de células de <i>E. coli</i> BL21(DE3)Rosetta.....	50
Fig. 19 Purificación de la proteína MMAA a partir de la expresión en 1 L de cultivo.....	51
Fig. 20 Western blot de la proteína MMAA.....	52
Fig. 21 Expresión de la proteína MCM en las fracciones solubles e insolubles de lisados obtenidos a partir de células de <i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS.....	53
Fig. 22 Purificación de la proteína MCM a partir de la expresión en fermentador de 2 L de cultivo.....	54
Fig. 23 Western blot de la proteína MCM.....	55
Fig. 24 Determinación de la actividad de GTPasa de la proteína MMAA.....	56
Fig. 25. Determinación de la actividad de GTPasa de MMAA en presencia de MCM.....	57
Fig. 26 Efecto de MMAA en la actividad de MCM pura a tiempos cortos de reacción.....	58
Fig. 27 Efecto de la adición de MMAA en la actividad de MCM en tiempos prolongados de incubación.....	59
Fig. 28 Amplificación del gen <i>MMAA</i> y digestión del amplicón y del plásmido pGADT7-AD con las enzimas <i>EcoRI/XhoI</i>	60
Fig. 29 Purificación de los plásmidos pGAD-MMAA 1 y 2 y digestión con las enzimas <i>EcoRI/XhoI</i>	61
Fig. 30 Amplificación del gen <i>MUT</i> y digestión del amplicón y del plásmido pGBKT7 con las enzimas <i>NcoI/PstI</i>	62
Fig. 31 Purificación de los plásmidos pGBKT7-MCM-1 y 2 y digestión con las enzimas <i>NcoI/PstI</i>	62
Fig. 32 Principio del ensayo de doble híbrido.....	63
Fig. 33 Interacción de las proteínas MMAA y MCM por ensayo de doble híbrido en levadura.....	65

TABLAS

Tabla 1. Iniciadores utilizados para la clonación del cDNA del gen <i>MMAA</i>	24
Tabla 2. Iniciadores utilizados para la clonación del cDNA del gen <i>MUT</i>	28
Tabla 3. Condiciones probadas para la expresión de <i>MMAA</i>	31
Tabla 4. Condiciones probadas para la expresión de <i>MCM</i>	33
Tabla 5. Condiciones probadas para la separación de GTP y GDP por TLC.....	35
Tabla 6. Iniciadores utilizados para amplificar y sub-clonar los genes <i>MMAA</i> y <i>MUT</i>	37
Tabla 7. Fenotipos esperados y medios selectivos empleados en el escrutinio de los experimentos de doble híbrido.....	65

1 RESUMEN

Estudios previos han reportado que algunas enzimas dependientes de adenosilcobalamina sufren inactivación durante la catálisis debido a la oxidación de la cobalamina. Además, la protección o reactivación de sus actividades catalíticas por proteínas llamadas “protectasas” o reactivasas ha sido descrita en bacterias. En este estudio, determinamos la influencia de la proteína humana MMAA en la cinética de la reacción catalizada por la enzima metilmalonil-CoA mutasa (MCM) mediante un ensayo *in vitro* utilizando ambas proteínas recombinantes purificadas. Nuestros resultados mostraron que MMAA juega un papel dual en la actividad de MCM. Cuando la proteína MMAA se agrega al inicio de la reacción, previene la inactivación protegiendo a MCM. Después de 60 minutos de reacción, cuando MCM es inactiva, la adición de MMAA incrementa la actividad enzimática mediante la hidrólisis de GTP, sugiriendo la reactivación de MCM por intercambio del cofactor dañado. La interacción entre MCM y MMAA *in vitro* se confirmó *in vivo* por ensayo de doble híbrido en levadura.

ABSTRACT

Previous studies have reported that some adenosylcobalamin-dependent enzymes suffer inactivation during catalysis due to the oxidation of cobalamin. In addition, the protection or reactivation of their catalytic activities by proteins called “protectases” or reactivases is well known in bacteria. In this study, we examined the influence of human MMAA protein on the kinetics of the reaction catalyzed by methylmalonyl-CoA mutase (MCM) by testing both purified recombinant proteins *in vitro*. Our results showed that MMAA plays dual roles in MCM activity. When it was added at the beginning of the reaction, it prevents inactivation by guarding MCM. After 60 min of reaction, when MCM is inactive, the addition of MMAA increases the enzymatic activity through GTP hydrolysis, indicating reactivation of MCM by exchange of the damaged cofactor. The interaction between MCM and MMAA observed *in vitro* was confirmed *in vivo* by yeast two-hybrid system.

2 ABREVIATURAS

Ab	Aureobasidina A
AdoCbl	Adenosilcobalamina
AdoH	5'-desoxiadenosina
AMM	Acidemia metilmalónica
Amp	Ampicilina
Cm	Cloranfenicol
Co-C	Enlace Cobalto-Carbono
CoA	Coenzima A
Dmb	Dimetilbenzimidazol
DOC	Concentración de oxígeno disuelto
FR	Factor Reactivante
GMPPNP	Análogo no hidrolizable de GTP
GVPKS	Motivo formado por los aminoácidos Glicina, Valina, Prolina, Lisina y Serina
IMAC	Cromatografía de afinidad por inmovilización de metales
IPTG	Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido
MCM	Metilmalonil-CoA mutasa
MeCbl	Metilcobalamina
MMAA	Proteína cuyas mutaciones ocasionan acidemia metilmalónica ligada al grupo de complementación <i>cbIA</i>
ND-PAGE	Electroforesis no desnaturizante en gel de poliacrilamida
NKAD	Motivo formado por los aminoácidos Asparagina, Lisina, Alanina y Aspártico
OHCbl	Hidroxicobalamina
SDS-PAGE	Electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida
TLC	Cromatografía en capa fina
Vis	Visible

3 ANTECEDENTES

3.1 EL COFACTOR ADENOSILCOBALAMINA

3.1.1 HISTORIA

La importancia del estudio de la vitamina B₁₂ se hace evidente a partir de 1824 cuando aparecieron los primeros casos de anemia megaloblástica. Años más tarde, alrededor de 1860, Flint hace la primera relación entre esta enfermedad y deficiencias digestivas. En 1849, Thomas Addison describe por primera vez las características clínico-patológicas de la enfermedad y fue en 1872 cuando Anton Biermer nombró a esta enfermedad como “anemia perniciosa”, la cual era incurable y progresiva con daño a nivel hematológico, digestivo e incluso a nivel de sistema nervioso en etapas avanzadas. Después, en 1925, Whipple describe por primera vez el factor anti-anemia perniciosa realizando sus estudios en perros y posteriormente George Minot y William Murphy en 1926 realizan un estudio en el cual someten a 45 pacientes a dieta suplementada con hígado y carne, los cuales después de 1 a 6 meses bajo este régimen alimenticio revierten la enfermedad. En 1957, Hodking y cols. obtuvieron la estructura cristalográfica de la vitamina B₁₂ evidenciando su naturaleza organometálica y describiendo la naturaleza del ligando de corrina [1-3]. En 1958, un año después de la cristalización, Barker y su grupo de trabajo describieron la necesidad de la presencia de un compuesto derivado de la vitamina B₁₂, la adenosilcobalamina (AdoCbl), para la actividad de la enzima glutamato mutasa, evidencia que revela su papel como cofactor enzimático [4]. Cuatro años más tarde en 1962, Guest y cols. descubren otro derivado de la vitamina B₁₂, la metilcobalamina, que funciona como cofactor de la enzima metionina sintasa [5]. Ambos cofactores enzimáticos son las dos formas biológicamente activas de la vitamina B₁₂.

3.1.2 CARACTERÍSTICAS Y DERIVADOS DE COBALAMINA

La cobalamina está formada por 4 anillos pirrólicos (tetrapirrol) coordinados ecuatorialmente a un cobalto central mediante ligandos con nitrógenos donados por los pirroles formando un anillo de corrina (Fig. 1, en rojo). El sustituyente unido al cobalto en la parte superior del anillo de corrina se denomina ligando axial superior ó ligando β-axial. Por la parte de abajo del anillo de corrina se encuentra el ligando axial inferior ó ligando α-axial. Existe diversidad en las moléculas que pueden ocupar estos ligandos; a esto se debe la existencia de los derivados de cobalaminas, presentándose la mayor

diversidad en el ligando axial superior. Cuando en la posición del ligando β -axial se encuentra un grupo ciano entonces el corrinóide recibe el nombre de cianocobalamina ó vitamina B₁₂, la cual es relativamente inerte y no tiene ninguna participación como cofactor. La AdoCbl o coenzima B₁₂ tiene una molécula de 5'-desoxi-5'-adenosina (Fig. 1 en azul) como ligando β -axial mientras que, otro derivado es la MeCbl la cual tiene un grupo metilo en este lugar. En cuanto al ligando axial inferior generalmente se encuentra en esta posición una molécula de 5,6-dimetilbenzimidazol (Dmb) como base nucleotídica (Fig. 1, en color verde) [6].

En condiciones fisiológicas, los derivados de la vitamina B₁₂ se encuentran en tres estados de oxidación: Co(III), Co(II) ó Co(I). Los procesos de reducción-oxidación de estos derivados son de importancia clave en las reacciones enzimáticas en las que participan como cofactores. Como regla, el número de ligandos axiales decrece en paralelo con el estado de oxidación del cobalto, es decir, si el centro de cobalto es Co(III) entonces dos ligandos axiales están unidos a éste; si es Co(II) entonces sólo un ligando axial está unido y si es Co(I) ambos ligandos axiales están ausentes [7].

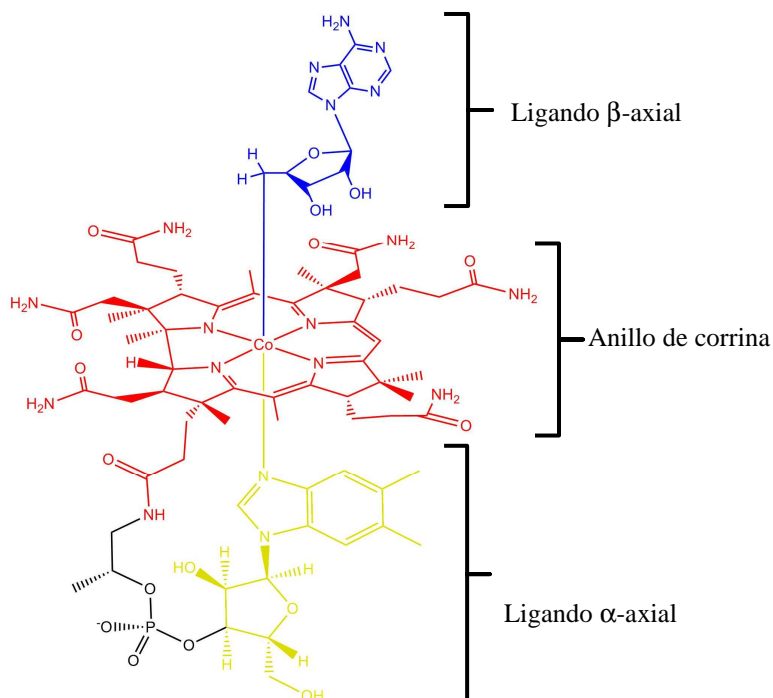


Fig. 1 Fórmula estructural de la AdoCbl, modificado de Marsh, 2001 [60].

3.2 ENZIMAS DEPENDIENTES DE VITAMINA B₁₂

3.2.1 CLASIFICACIÓN DE ENZIMAS DEPENDIENTES DE AdoCbl

Los derivados de la vitamina B₁₂ participan como cofactores de una gran variedad de enzimas, por lo que todas ellas integran la familia de enzimas dependientes de vitamina B₁₂.

Esta familia se divide en 3 subfamilias:

- 1) la subfamilia de isomerasas dependientes de AdoCbl
- 2) la subfamilia de metiltransferasas dependientes de MeCbl
- 3) la subfamilia de deshalogenasas reductoras

La subfamilia de isomerasas dependientes de AdoCbl se divide a su vez en tres clases:

- a) Clase 1: formada por aquellas que catalizan rearrreglos de esqueletos de carbono. A esta clase pertenecen las enzimas glutamato mutasa, 2-metileneglutarato mutasa, metilmalonil-CoA mutasa e isobutiril-CoA mutasa.
- b) Clase 2: pertenecen a este grupo enzimas que llevan a cabo reacciones de eliminación de heteroátomos tales como diol deshidratasa, glicerol deshidratasa, etanolamino amonio liasa y ribonucleótido reductasa.
- c) Clase 3: conformada por enzimas que catalizan migraciones intramoleculares de grupos amino. A esta clase pertenecen la lisina 5,6-aminomutasa y D-ornitina 4,5-aminomutasa.

Existe otra clasificación de la subfamilia de isomerasas en relación a su modo de unión al cofactor, específicamente a la posición del ligando axial inferior ó Dmb (Fig. 2). En la clase I, llamada Dmb-off/His-on, el cofactor ocupa su sitio en el dominio enzimático y el ligando Dmb es desplazado por un grupo imidazol donado por una histidina del sitio activo. A esta clase pertenecen las enzimas que llevan a cabo rearrreglos de carbono. En la clase II, llamada Dmb-on/His-off, el ligando permanece coordinado al núcleo metálico, a esta clase pertenecen aquellas que llevan a cabo rearrreglo de heteroátomos [8].

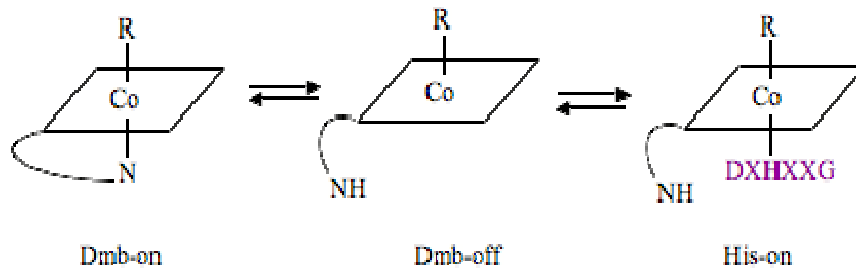


Fig. 2 Tipos de unión entre la enzima y el cofactor AdoCbl, modificado de Banerjee, 2003 [59].

En la figura 3 se muestra un resumen de la clasificación de las enzimas descritas previamente.

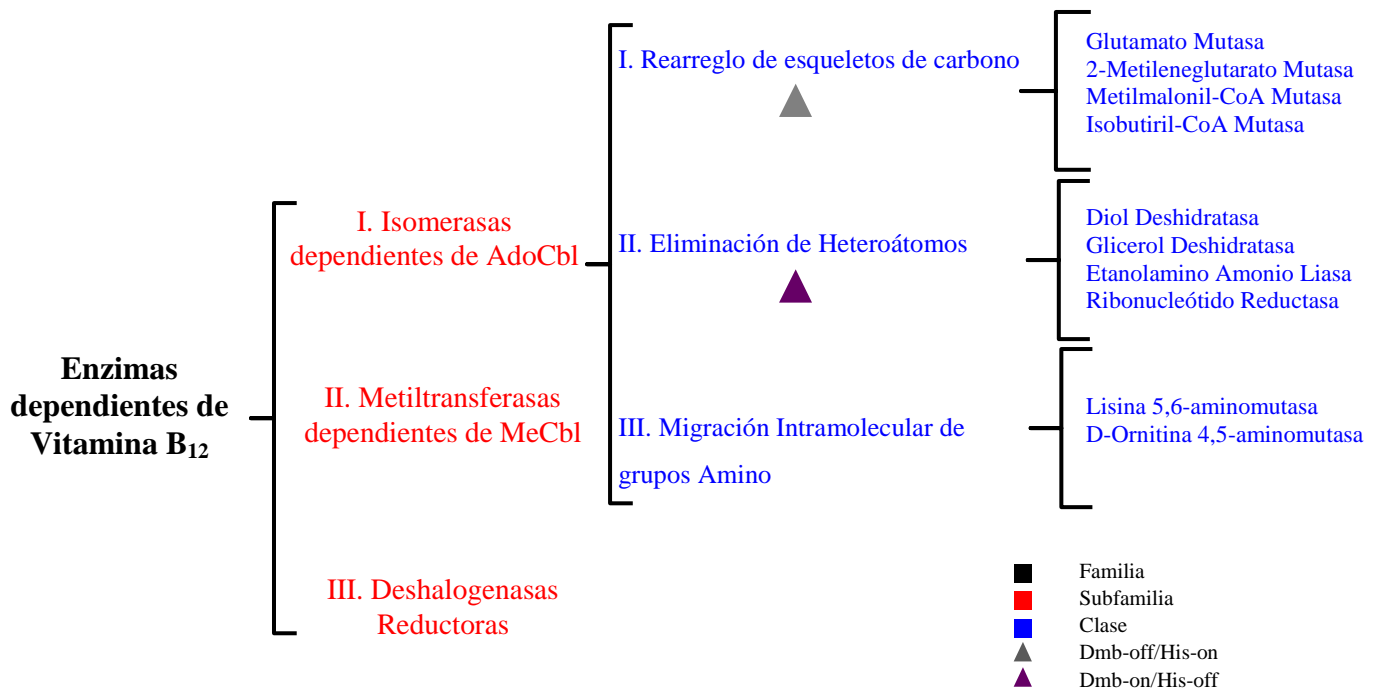


Fig. 3 Clasificación general de las enzimas dependientes de AdoCbl.

3.3 CATÁLISIS ENZIMÁTICA MEDIADA POR RADICALES

Las isomerasas dependientes de AdoCbl utilizan la alta reactividad de radicales libres para catalizar sus reacciones. Los radicales catalíticos pueden originarse de los cofactores o de proteínas. Las reacciones catalizadas mediante radicales tienen una característica en común: los sustratos de estas enzimas no están activados por un mecanismo ácido-base. En este caso los sustratos se convierten en activos a través de la sustracción de un átomo de hidrógeno por alguna especie radical en el sitio activo. Podemos definir que la *catálisis enzimática mediada por radicales* es el mecanismo mediante el cual las enzimas realizan reacciones químicamente difíciles utilizando la alta reactividad de radicales libres. Lo que hace complicadas a estas reacciones es la energía extremadamente alta del estado de transición [9, 10].

Las enzimas de esta subfamilia hacen re-arreglos dependientes de AdoCbl los cuales involucran la migración de un átomo de hidrógeno de un carbono del sustrato a un átomo de carbón adyacente intercambiando por un grupo X que se mueve en la dirección opuesta. Al mecanismo general de reacción se le denomina *ruleta de radicales* (Fig. 4). Estas reacciones son iniciadas por la sustracción de un átomo de hidrógeno del sustrato con un radical adenosilo que es formado en el sitio activo a través del rompimiento homolítico del enlace cobalto-carbono (Co-C) de la coenzima. La homólisis de este enlace es considerada un paso clave y común en todas las reacciones enzimáticas dependientes de AdoCbl [11].

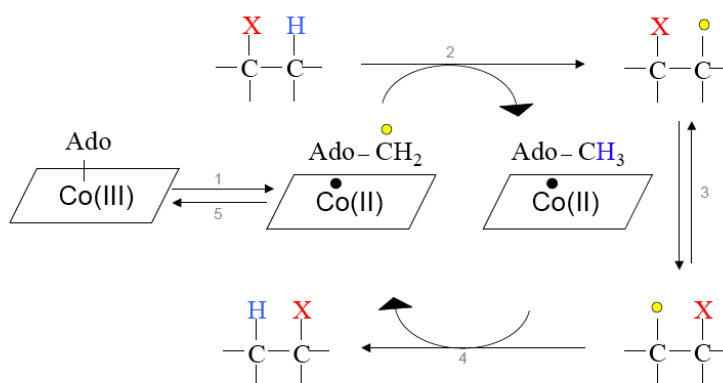


Fig. 4 Ruleta de radicales, modificado de Banerjee, 2003 [59].

3.4 DISTRIBUCIÓN DE LA PROTEÍNA MCM EN LOS ORGANISMOS

La enzima metilmalonil-CoA mutasa (MCM) lleva a cabo la reacción de isomerización reversible entre metilmalonil-CoA y succinil-CoA. Requiere de AdoCbl para poder llevar a cabo su función participando en rutas metabólicas esenciales en distintos organismos. Es una proteína ampliamente distribuida en los tres dominios de la vida, presentándose en arqueas, bacterias y eucariontes. Ha sido empleada como modelo de estudio de enzimas dependientes de AdoCbl y la comparación de su secuencia de aminoácidos entre diferentes organismos ha mostrado una alta conservación entre dominios.

3.4.1 FUNCIÓN DE MCM EN BACTERIAS

Los primeros estudios de la proteína MCM en bacterias fueron desarrollados en *Propionibacterium freudenreichii* var. *shermanii*. La purificación de la proteína MCM de *P. freudenreichii* permitió determinar su estructura, la cual es un heterodímero α/β con una masa molecular de 150 KDa, 80 KDa de la cadena α y 70 KDa de la cadena β [12]. La clonación y el análisis de la secuencia de DNA de los genes estructurales que codifican para ambas subunidades en este mismo organismo reveló el arreglo operónico de los genes *mutA* y *mutB* siendo pioneros en reportar la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos de una enzima dependiente de B₁₂ [13]. La cristalización de la enzima generó grandes avances en el estudio de su estructura y mecanismo de reacción. Derivado de esta cristalización se determinaron dos dominios principales presentes en la subunidad α : un dominio amino terminal de 8 hebras β/α en forma de barril (TIM-barrel), que corresponde al dominio de unión a sustrato y un dominio carboxilo terminal α/β con 5 hebras β -plegadas ó dominio de unión al cofactor. Precediendo al dominio amino se encuentra una región que envuelve a la otra subunidad y ambos dominios se encuentran unidos por una región a la que denominaron “linker”. En cuanto a la subunidad β , ésta es menos ordenada que la anterior y en ella se han perdido residuos importantes tanto para la unión del cofactor como para la unión a sustrato, por lo que se considera inactiva y sin ninguna función obvia [14].

Se ha realizado un intenso estudio de la enzima MCM en la bacteria Gram positiva *Saccharopolyspora erythraea* debido a su importante papel a nivel biotecnológico debido a que la actividad de MCM está involucrada en la producción del intermediario metilmalonil-CoA para la elaboración del antibiótico eritromicina en el

metabolismo fermentativo a partir de compuestos de carbono [15]. Al igual que en *P. freudenreichii*, la enzima MCM es un heterodímero formado por una subunidad mayor (α) y una subunidad menor (β). Reeves y colaboradores estudiaron cómo una mutación (polar knockout) en los genes que codifican para la MCM afectan la producción de eritromicina y como se asocia la producción con la composición del medio de cultivo, ya sea basado en aceite o en carbohidratos, la cual afecta la dirección en la reacción efectuada por MCM [16].

Estudios en *E. coli* mostraron la presencia de MCM dentro de un operón de 4 genes cuyas proteínas no tenían asignado ningún papel *in vivo* debido a la carencia de un promotor funcional [17, 18]. Sin embargo, estudios más recientes demostraron la expresión endógena de esta enzima manifestando su papel en la conversión de succinato a propionato en presencia de AdoCbl suplementada en el medio de cultivo [17], pero esta función ha sido considerada de baja importancia pues la sobrevivencia de la bacteria no depende de su función aunado a su imposibilidad de sintetizar *de novo* al cofactor.

Contrario a lo encontrado en *E. coli* es el caso de la bacteria *Methylobacterium extorquens*, metilótrofo facultativo en el cual la enzima MCM participa en el ciclo de regeneración de glioxalato, elemento esencial en el metabolismo metilotrófico [19].

3.4.2 FUNCIÓN DE MCM EN MAMÍFEROS

En mamíferos se conocen sólo dos enzimas dependientes de vitamina B₁₂, la metionina sintasa, una enzima citoplásmica que cataliza la transferencia de un grupo metilo a la homocisteína a partir de metiltetrahidrofolato para la formación de metionina, y la MCM, la cual es una enzima de matriz mitocondrial que participa en el catabolismo de los aminoácidos metionina, treonina, valina e isoleucina, de ácidos grasos de cadena impar y de la cadena lateral del colesterol, permitiendo finalmente su incorporación como un intermediario del ciclo de los ácidos tricarbóxicos [20].

Los primeros estudios sobre la ruta de carboxilación del propionil-CoA a metilmalonil-CoA fueron realizados en tejidos de corazón de cerdo, riñón de ovejas y en hígados de rata entre los años 50's y 60's [21, 22].

Posteriormente a partir de extractos de hígado de oveja, lograron purificar la enzima a homogeneidad e hicieron una estimación de su masa molecular aproximada y la determinación de algunos parámetros cinéticos como K_m , V_{max} , actividad específica y pH óptimo de actividad [23].

Uno de los primeros reportes del estudio de MCM en humanos fue realizado por el grupo de Kolhouse y colaboradores quienes lograron purificar y describir las propiedades de la enzima obtenida a partir de placenta humana [24]. Posteriormente Fenton y sus colaboradores realizaron un estudio más detallado a partir de la enzima purificada de hígado humano, confirmando su masa molecular (77.5 KDa), el espectro de absorción del cofactor AdoCbl, ensayos de estabilidad de la enzima a diferentes valores de pH (entre 6.5 y 8) describiendo también parámetros cinéticos como K_m por metilmalonil-CoA (1.5 mM) y actividad específica (12-14 $\mu\text{mol SucCoA}/\text{min}/\text{mg}$) [25]. Este mismo grupo demostró que la enzima es sintetizada como péptido inmaduro e inactivo, teniendo una secuencia líder de aproximadamente 3 KDa que le permite ser translocada a matriz mitocondrial en donde es procesada para dar lugar a la enzima madura activa [26].

Las investigaciones en la MCM humana continuaron con la clonación del gen a partir de una biblioteca de cDNAs [27] y su posterior secuenciación a partir de la cual se predijo la secuencia de 750 aminoácidos con una región líder mitocondrial de 32 aminoácidos característica de enzimas de matriz mitocondrial [28]. Mediante técnicas de hibridación se logró determinar que la enzima está codificada por un gen único denominado *MUT* el cual está localizado en el cromosoma 6p12p-21.2 y conformado por 13 exones contenidos en una región de 35 Kb [29]. La enzima MCM humana fue producida heterológamente tanto en *Saccharomyces cerevisiae* [30] como en *E. coli* de la cual se llevó a cabo la expresión y purificación para re-definir los parámetros cinéticos de K_m y V_{max} .

3.4.2.1 ACIDEMIA METILMALÓNICA

Una de las principales razones por las que el estudio de la enzima MCM cobró gran importancia es debido a que mutaciones en el gen *MUT*, que codifica para esta proteína generan una enfermedad metabólica autosómica recesiva denominada acidemia metilmalónica (AMM).

Los primeros individuos reportados con padecimientos que involucran el metabolismo de propionato datan de 1967 [31]. Debido a la inconsistencia y heterogeneidad de los datos clínicos y bioquímicos de los pacientes con padecimientos relacionados con la ruta de la vitamina B₁₂ fue necesaria su clasificación en grupos genéticamente definidos. Cuestiones como la severidad de la enfermedad o si los pacientes responden o no al tratamiento con vitamina B₁₂ son explicadas por mutaciones en diferentes genes que, mediante un abordaje por análisis de complementación, pueden

ser identificados. Actualmente existen 8 grupos de complementación, *mut* y *cblA-cblG* los cuales tienen bloqueada la producción y utilización de MeCbl y/o AdoCbl [32].

Los pacientes que pertenecen al grupo de complementación *mut* presentan mutaciones en este gen provocándoles AMM aislada. Pacientes con esta enfermedad usualmente requieren de atención médica en el primer año de vida presentando altos niveles de ácido metilmalónico en suero y orina el cual puede llegar a ser 50 y hasta 1000 veces mayor al normal, letargia, retraso en el desarrollo, deterioro en el intelecto, hipotonía, vómitos constantes y deshidratación. En algunos casos pueden padecer crisis por acidosis metabólica debido a cambios en la dieta o enfermedades infecciosas que ponen en riesgo la vida del paciente.

El desorden *mut* ha sido subdividido en dos grupos: *mut*⁰, cuya actividad enzimática no es detectable ni es estimulada por la adición de OHCbl al cultivo de fibroblastos, y *mut*⁻ con proteína inmunológicamente reactiva y cuya actividad se incrementa en cultivo de fibroblastos suplementados con OHCbl. Los pacientes con acidemia de tipo *mut*⁰ generalmente están afectados de manera más severa que los pacientes tipo *mut*⁻ y son más susceptibles a la muerte [33].

La verdadera incidencia de esta enfermedad ha sido difícil de establecer debido a la dificultad de diagnosticar a los pacientes a tiempo. Algunos estudios mencionan una incidencia de aproximadamente 1:140,000 en Australia [34], 1:115,000 en Italia y 1:169,000 en Alemania [35].

3.5 MECANISMOS CONTRA INACTIVACIÓN EN ENZIMAS DEPENDIENTES DE AdoCbl

Anteriormente hemos mencionado el mecanismo mediante el cual las enzimas dependientes de AdoCbl llevan a cabo sus reacciones. El cofactor juega un papel fundamental durante la reacción ya que, sin la formación de las especies radicales en el sitio activo de la enzima, ésta no podría ser efectuada. La presencia de dichos radicales provenientes del cofactor hacen que las enzimas que emplean este mecanismo sean susceptibles a inactivación debido a que los radicales pueden ser interceptados por oxígeno u otros nucleófilos presentes en el medio circundante.

En algunos miembros de esta subfamilia se han descrito distintas estrategias que permiten minimizar y controlar reacciones colaterales inadvertidas que podrían generar inactivación enzimática. A continuación se describen los mecanismos mediante los cuales puede prevenirse la inactivación controlando los radicales generados durante la

catálisis, ya sea por diseño estructural de la proteína ó mediante metalochaperonas que confieren protección y reactivación, permitiendo recuperar su actividad.

3.5.1 AMINOÁCIDOS INVOLUCRADOS EN PROTECCIÓN CONTRA INACTIVACIÓN

Mediante el estudio de la estructura cristalográfica de la enzima MCM de la bacteria *P. freudenreichii* se ha determinado el papel que juega la estructura de la proteína en la protección contra el ataque externo de los radicales intermediarios. Estas investigaciones han mostrado como tienen lugar los re-arreglos de radicales en el sitio activo, el cual está formado por las asas en el extremo carboxilo de las hebras β del dominio en forma de barril $(\beta/\alpha)_8$, completamente inaccesible al solvente, excepto a lo largo del eje del barril, en cuya cavidad se une el sustrato. De esta manera, el sitio activo que se encuentra profundamente enterrado protege a los radicales intermediarios altamente reactivos de reacciones colaterales no deseadas, de manera similar a lo observado en otras enzimas que usan radicales [36, 37].

El papel que juegan ciertos aminoácidos para la protección de la enzima ha sido abordado mediante el estudio de mutaciones específicas en ciertos aminoácidos de la enzima. Una mutación hecha en el aminoácido tirosina en la posición 89 de la MCM de *P. freudenreichii* (mutante Y89F) mostró que este aminoácido juega un papel importante en la homólisis del enlace Co-C ya que interactúa con el carboxilato del sustrato. Una pérdida en esta interacción, como es el caso de la mutante estudiada, afecta la estabilidad de los radicales intermediarios reflejada en una disminución en la velocidad de la interconversión del sustrato a producto radical [38].

Se ha demostrado que la histidina en posición 244 es importante ya que su grupo imidazol obstruye el paso de oxígeno en el sitio activo. La mutante en este aminoácido (H244A) tiene una acumulación del intermediario inactivo hidroxicobalamina [39].

Un estudio de espectroscopía UV-Visible realizado en la mutante R207Q demostró que la enzima es inactiva debido a la acumulación del cofactor OHCB1 ejemplificando el importante papel que puede jugar un solo residuo, pues pequeñas modificaciones en aminoácidos con múltiples interacciones en un entorno altamente regulado pueden generar reacciones colaterales no deseadas favoreciendo catálisis negativas [40].

3.5.2 FACTORES REACTIVANTES

Debido a que las enzimas que llevan a cabo catálisis mediada por radicales tienden a sufrir inactivación por extinción de sus radicales intermediarios, el estudio de cómo éstas impiden su inactivación ha cobrado gran importancia. Además de la protección intrínseca debido a su estructura, existe un mecanismo denominado “reactivación” que consiste en devolver la actividad a la enzima por remoción del cofactor inactivo generado por el rompimiento irreversible de su enlace Co-C.

El mecanismo de reactivación ha sido descrito y ampliamente estudiado en las enzimas dependientes de AdoCbl, diol deshidratasa, glicerol deshidratasa y etanolamino amonio liasa, las cuales sufren inactivación durante su catálisis. Asimismo, para cada una de ellas se ha descrito el mecanismo de reactivación efectuado por las proteínas denominadas “factores reactivantes” ó “reactivasas”.

El fenómeno de reactivación fue descrito por primera vez para la enzima diol deshidratasa por Toraya y sus colaboradores mediante ensayos *in situ* en células permeabilizadas con tolueno utilizando una cepa de *E. coli* que contenía en un plásmido los genes que codifican para la enzima diol deshidratasa junto con sus regiones flanqueantes [41]. Dichas células con la holoenzima inactiva sufren rápida reactivación en presencia de AdoCbl, ATP y Mg^{2+} . Por el contrario, las células que contenían sólo los genes de diol deshidratasa sin sus regiones flanqueantes no eran susceptibles de reactivación. Este tipo de ensayos permitió identificar los genes responsables de la reactivación enzimática y fueron nombrados como *ddrAB* (por sus siglas en inglés diol deshidratase reactivating factor). Estudios similares permitieron la identificación de los genes que codifican para los factores reactivantes de glicerol deshidratasa (*gdrAB*) y de etanolamino amonio liasa (*eutA*) [41-44].

Cuando la holoenzima sufre inactivación durante la catálisis o por O_2 en ausencia de sustrato, la coenzima unida a la enzima pierde la molécula de adenina de su ligando axial superior por un rompimiento irreversible del enlace Co-C. Los factores reactivantes median el intercambio del cofactor dañado por cofactor intacto. Este intercambio involucra la degradación de ATP que juega un papel dual durante la reacción (Fig. 5).

3.5.3 METALOCHAPERONAS INVOLUCRADAS EN PROTECCIÓN

Tanto procariontes como eucariontes metabolizan propionil-CoA mediante una ruta dependiente de B₁₂, estando presente en ambos casos la MCM como parte de esta vía metabólica. Este hecho ha permitido extrapolar estudios realizados en bacterias a humanos, principalmente enfocados al descubrimiento de genes blanco de mutaciones que puedan generar AMM o cualquier otro desorden genético del metabolismo de la vitamina B₁₂. En este sentido, una de las formas de abordar el tema fue mediante el análisis de arreglos de genes procariontes basados en la premisa de que genes agrupados o que forman parte de un operón tienen una función relacionada. De esta manera, el conocimiento de la función de alguno de los genes pertenecientes al arreglo permitiría inferir que el resto participan en el mismo proceso metabólico. Es así como, utilizando por primera vez este tipo de aproximación, determinan la participación de la enzima metilmalonil-CoA racemasa y descubren la existencia de un gen cercano a los genes de MCM de función desconocida e infieren su participación como proteína accesoria necesaria para su actividad [46].

Investigaciones en la bacteria *M. extorquens* confirman la participación de este gen en la ruta de propionil-CoA, dándole el nombre de *meaB*. También demuestran cómo las mutantes en este gen pierden la capacidad de convertir metilmalonil-CoA en succinil-CoA. Referenciando el modelo de reactivación descrito para otros miembros de esta subfamilia, especulan sobre su posible participación en la reactivación de MCM ya que la proteína tiene un dominio de GTP/ATPasa, pero no logran definir su función [19].

Con el objetivo de revelar el papel de *meaB*, este mismo grupo logró clonar el gen para expresar y purificar la proteína, demostrando *in vitro* que ésta tiene actividad de GTPasa y que es capaz de unirse a MCM formando un complejo que puede ser detectado en ND-PAGE. Además demuestran que la enzima MCM aumenta su actividad de 1.4 a 3.9 U/mg en presencia de MeaB, GTP y Mg²⁺. Una de las características de los factores reactivantes (FR) es la formación del complejo FR-enzima inactiva en presencia de ADP y la disociación de éste en presencia de ATP. La asociación de MeaB con MCM no se vio favorecida en presencia de GTP ó GDP ni tampoco hubo una liberación de cofactor inactivo en las condiciones probadas. Por otro lado, Marsh y cols. demuestran que la enzima MCM de *P. Freudenreichii* se disocia progresivamente en sus dos subunidades estableciendo un equilibrio monómero-dímero [47]; esta disociación expone al cofactor unido el cual puede ser atacado por O₂ o por

agua generando la forma inactiva de la enzima. En este sentido, los autores proponen que la proteína MeaB podría estar involucrada en la estabilización del dímero de MCM o podría unirse a ella para protegerla de la inactivación por la oxidación del cofactor durante la catálisis [48].

La familia G3E de GTPasas P-loop está formada por UreG, HypB, CooC y MeaB y se ha descrito que actúan como chaperonas en el ensamblaje de metaloenzimas blanco, sin embargo el mecanismo mediante el cual actúan aún se desconoce [49].

Experimentos de espectrofotometría UV-Vis de la proteína MCM de la bacteria *M. extorquens* permitieron monitorear la acumulación del cofactor inactivo OHCbl a partir de Cob(II)alamina en el dominio de unión a cofactor de la proteína MCM ocasionando la pérdida gradual de su actividad. La presencia de MeaB con GTP, GDP ó GMPPNP (análogo no hidrolizable) confiere un efecto protector evitando la oxidación del cofactor de manera independiente de la hidrólisis de nucleótido y debido principalmente a un efecto conformacional [50].

La cristalización de la metalochaperona MeaB de *M. extorquens* proporcionó datos importantes a nivel estructural cuyos motivos confirman su pertenencia a la familia G3E, las cuales típicamente actúan como switches moleculares con regiones que sufren cambios conformacionales durante la hidrólisis de GTP para comunicar una señal. Los miembros de esta familia se caracterizan por presentar baja actividad de GTPasa y cuatro motivos conservados característicos: el motivo P-loop en la forma GVPGVGKS (motivo Walker A), que coordina la molécula de fosfato del nucleótido de guanina, el motivo asa de especificidad de base NKAD (para guanina), las regiones switch I y II (Walker B) que interactúan con el nucleótido y el Mg^{2+} en el sitio activo. Esta proteína es un homodímero y cada monómero que la conforma está compuesto de 3 regiones principales: un G-dominio central formado por 7 hebras β plegadas paralelas que albergan el sitio activo de GTPasa y extensiones α -hélice en ambos extremos N y C terminal que la diferencian de otras metalochaperonas de la familia. Particularmente la extensión C terminal de ~70 aminoácidos, juega un papel importante en la formación de homodímeros independientes de nucleótido como contraparte de lo observado en los otros miembros que carecen de extensiones pero dimerizan de manera dependiente de nucleótido. La extensión N terminal de ~50 aminoácidos, aparentemente participa en la interacción con MCM [51].

Utilizando la técnica de análisis de arreglos de genes procariontes previamente descrita, Dobson y sus colaboradores obtienen al gen *meaB* y buscan su homólogo en el genoma humano. Como producto de su búsqueda, obtienen un gen al que denominaron *MMAA* (cuyo nombre en inglés denota **methylmalonic acidemia linked to the *cblA* complementation group**). Al secuenciar este gen en los pacientes con AMM del grupo *cblA* demuestran que la enfermedad es ocasionada por mutaciones en este gen. Determinan que el gen *MMAA* está codificado en el cromosoma 4, tiene un mRNA de 1,437 pb que codifica para una secuencia de 418 aminoácidos predicha a partir de su secuencia de nucleótidos y utilizando un programa de predicción denotan una secuencia líder mitocondrial de 65 aminoácidos, quedando una proteína madura de 39 KDa aproximadamente [52]. Esta proteína tiene una identidad de 47% con MeaB de bacterias y 67% de similitud (Fig. 6).

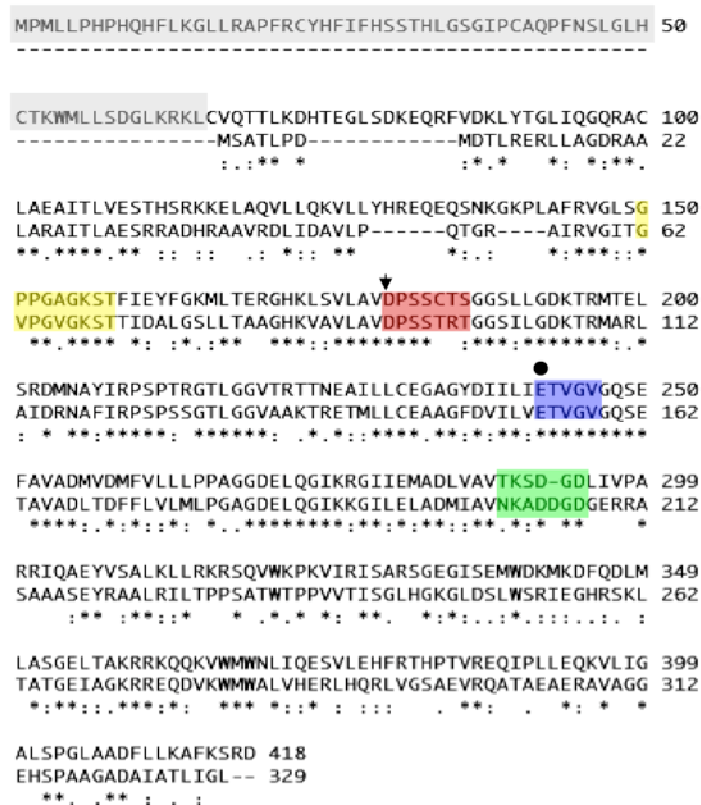


Fig. 6 Alineamiento entre las proteínas MMAA de humano y MeaB de la bacteria *M. extorquens*. MMAA y MeaB tiene 46 % de identidad (asteriscos) y 67% de similitud (:). Sombreado en gris se muestra la probable secuencia líder mitocondrial de MMAA, sombreado en color se muestran los motivos de la familia G3E de GTPasas P-loop; amarillo: P-loop (Walker A); rojo: Switch I (▼ posicionamiento de molécula de agua para ataque nucleofílico); azul: Switch II (Walker B, ● interacción con Mg²⁺).

Inicialmente, se especulaba que su papel podría ser como proteína transportadora del cofactor al interior de la mitocondria [52] y por extrapolación de los estudios realizados en su homólogo en bacterias se planteaba su papel como reactivasa o en la protección de MCM, sin embargo el papel de la proteína MMAA aún no ha sido revelado.

4 JUSTIFICACIÓN

Existe una familia de proteínas que utilizan AdoCbl como cofactor para llevar a cabo reacciones químicamente complicadas. El cofactor es empleado como un generador de radicales creados por la hidrólisis del enlace Co-C en el sitio activo. La regeneración de este enlace después de cada ciclo catalítico es un punto crítico para mantener la actividad de la enzima, sin embargo puede verse afectada debido a la intercepción de estos radicales por oxígeno presente en el medio, generando la inactivación de la enzima.

MCM es una isomerasa dependiente de AdoCbl y ha sido estudiada ampliamente en bacterias en las que se ha demostrado que sufre inactivación por oxidación del cofactor. Estudios en *M. extorquens* demostraron que la proteína MeaB forma un complejo con MCM probablemente para ejercer un mecanismo de protección contra una posible inactivación, sin embargo la función exacta de esta proteína accesoria aún no ha sido dilucidada. Para algunas proteínas AdoCbl-dependientes que sufren inactivación se ha descrito otro tipo de mecanismo que involucra la participación de chaperonas que pueden restaurar la actividad enzimática perdida durante la catálisis intercambiando el cofactor inactivo por cofactor intacto de manera dependiente de la hidrólisis de ATP.

En humanos se han descrito varios genes involucrados en la ruta metabólica intracelular de la vitamina B₁₂ cuyas mutaciones se asocian a una enfermedad metabólica llamada acidemia metilmalónica (AMM), sin embargo a la mayoría de estos genes no se les ha asignado una función definida. La MCM humana está codificada por el gen *MUT* y su función es importante para la degradación de aminoácidos y ácidos grasos de cadena impar. Mutaciones en este gen provocan AMM.

Por otro lado, se han descrito mutaciones en otro gen llamado *MMAA* las cuales también generan AMM, pero el papel que juega en esta ruta metabólica aún se desconoce. Análisis bioinformáticos han revelado que la proteína MMAA tiene identidad con MeaB de bacterias.

Aún no se ha comprobado que la proteína MCM de humano sufra inactivación suicida ni se ha demostrado su asociación con chaperonas que lleven a cabo mecanismos de protección o reactivación enzimática.

5 HIPÓTESIS

La proteína humana MMAA está involucrada en un mecanismo de protección o reactivación de la enzima MCM.

6 OBJETIVO GENERAL

Demostrar que la proteína MMAA humana interactúa con la enzima MCM para ejercer un efecto protector o reactivador sobre la actividad de ésta durante la reacción de isomerización.

6.1 OBJETIVOS PARTICULARES

Expresión de genes.

- Clonación del cDNA correspondiente al gen *MMAA* de humano en un vector de expresión.
- Clonación del cDNA correspondiente al gen *MUT* de humano en un vector de expresión.
- Expresión de ambos genes en *E. coli*.

Purificación de las proteínas MMAA y MCM.

- Medición de la actividad de GTPasa de la proteína MMAA.
- Medición de la actividad de isomerasa de la proteína MCM.

Interacción entre las proteínas MMAA y MCM.

- *In vitro*: Medición de la Actividad de MCM en presencia y ausencia de MMAA.
- *In vivo*: Interacción entre ambas proteínas mediante un ensayo de doble híbrido en levadura.

7 MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 CEPAS UTILIZADAS

Para la propagación y purificación de los plásmidos pBlueScript SK⁺, pRSETA y construcciones realizadas en éstos:

- *Escherichia coli* TOP10F' (F' {*lacI*^q, Tn10(Tet^R)} *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *recA1* *deoR* *araD* 139 Δ (*ara-leu*)7697 *galU galK* *rpsL* (Str^R) *endA1* *nupG*; Invitrogen).

Para la expresión de las proteínas MMAA y MCM:

- *E. coli* BL21(DE3)pLysS (F', *ompT* *hsdS_B* (*r_B⁻* *m_B⁻*) *gal* *dcm* (DE3) pLysS (Cam^R); Invitrogen).
- *E. coli* BL21(DE3)Rosetta (F', *ompT* *hsdS_B* (*r_B⁻* *m_B⁻*) *gal* *dcm* (DE3) pRARE (Cam^R); Novagen).
- *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL (F', *ompT* *hsdS_B* (*r_B⁻* *m_B⁻*) *dcm*⁺ Tet^R *gal* λ (DE3) *endA* *Hte* (*argU* *ileY* *leuW* (Cam^R); Stratagen).

Para el ensayo de Doble Híbrido:

- *Saccharomyces cerevisiae* Y2HGGold (*MATa*, *trp1-901*, *leu2-3*, 112, *ura3-52*, *his3-200*, *gal4* Δ , *gal80* Δ , *LYS2::GAL1_{UAS}-Gal1_{TATA}-His3*, *GAL2_{UAS}-Gal2_{TATA}-Ade2*, *URA3::MEL1_{UAS}-Mel1_{TATA}*, *AUR1-C*, *MEL1*; Clontech)

7.2 MEDIOS DE CULTIVO

Para la conservación de cepas de *E. coli* a -70°C se empleó LB con glicerol (triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 10 g/L y glicerol 200 mL/L).

Para la propagación y purificación de plásmidos transformados en la cepa *E. coli* TOP10F' se utilizó el medio LB. Cuando se requirió se adicionaron 100 µg/mL de ampicilina (Amp).

Para la estandarización de condiciones de expresión, se probaron las cepas de expresión de *E. coli* en medio LB y en SOB (triptona 20g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 0.5 g/L, KCl 186 mg/L y MgCl₂ 2.03 g/L). Cuando se requirió, se les adicionó ampicilina (Amp, 100 µg/mL) y cloranfenicol (Cm, 35 µg/mL ó 50 µg/mL, de acuerdo a la cepa empleada).

Las cepas de levadura utilizadas y derivadas del ensayo de doble híbrido se almacenaron y propagaron en los medios de cultivo incluidos y sugeridos en el sistema

Matchmaker Gold Yeast Two-Hybrid System (Clontech) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

7.3 CLONACIÓN DEL cDNA CORRESPONDIENTE AL GEN *MMAA* EN EL VECTOR DE EXPRESIÓN pRSETA

7.3.1 AISLAMIENTO DE RNA A PARTIR DE LEUCOCITOS

La extracción de leucocitos se llevó a cabo a partir de 10 mL de sangre fresca de individuos sanos mediante un gradiente de lymphoprep (Axis-Shield).

La pastilla de leucocitos obtenida a partir de 10 mL de sangre se resuspendió en 5 mL de *RNAprotect Bacteria Reagent* (QIAGEN) para mantener la integridad del RNA. A partir de la suspensión de leucocitos se extrajo el RNA total con el sistema *RNeasy mini kit* (QIAGEN) utilizando el protocolo para la extracción a partir de células animales descrito por el fabricante.

7.3.2 DISEÑO DE INICIADORES

En la tabla 1 se muestra el nombre, la secuencia y la descripción de cada uno de los iniciadores utilizados para hacer el cDNA y amplificar el gen *MMAA*.

Nombre	Secuencia (5'-3')	Descripción
MMAAcom-For	aataaaggatccatgcccatgctgctacca	Diseñado para insertar el sitio de restricción <i>Bam</i> HI al inicio del gen <i>MMAA</i> con secuencia líder mitocondrial. (Las bases subrayadas indican el sitio de restricción).
MMAAwl-For	cttaaagagaggatcctgtgtacaaaca	Diseñado para insertar el sitio de restricción <i>Bam</i> HI al inicio del gen <i>MMAA</i> y eliminar la secuencia líder mitocondrial.
MMAA-Rev	tatacaggatgaggaattcttagtctctgct	Diseñado para insertar el sitio de restricción <i>Eco</i> RI al final del gen <i>MMAA</i> .
MMAAint-For	agcccaggtgctgttcaga	Iniciador sentido interno del gen <i>MMAA</i> diseñado para secuenciar a partir del nucleótido 439 de la secuencia referencia (NM_172250).
MMAAint-Rev	tgcactcacatattccgcttg	Iniciador antisentido interno del gen <i>MMAA</i> diseñado para secuenciar a partir del nucleótido 1011 en dirección antisentido de la secuencia referencia (NM_172250).

Tabla 1. Iniciadores utilizados para la clonación del cDNA del gen *MMAA*.

7.3.3 OBTENCIÓN DEL cDNA DE MMAA POR RT-PCR

El cDNA correspondiente al gen *MMAA* y su amplificación por PCR se realizó utilizando el sistema *One Step RT-PCR* (OmniScript).

Para determinar la temperatura de alineamiento de los iniciadores, se llevó a cabo una curva de temperaturas que abarcó un rango entre 48 y 65°C utilizando los iniciadores MMAAcom-For y MMAA-Rev diseñados para obtener la secuencia correspondiente al gen *MMAA* completo, el cual tiene un tamaño esperado de 1,257 pb. Una vez determinada la temperatura de alineamiento (51°C) se repitió el procedimiento con los mismos iniciadores empleando las condiciones descritas en el anexo 1 (sección 12.1.1).

El producto obtenido a partir del RT-PCR se sometió a electroforesis en gel de agarosa 0.8% (w/v) en amortiguador TAE (0.4 M de Tris-acetato y 1 mM de EDTA, pH 8.3) corriendo a 100 volts constante y tiñendo con bromuro de etidio (1 µg/mL). El amplicón del tamaño esperado se purificó del gel utilizando el sistema *Gel purification mini Kit* (QIAGEN). La purificación del amplicón se verificó por electroforesis en un gel de agarosa en las mismas condiciones.

7.3.4 CLONACIÓN DEL cDNA DE MMAA CON SECUENCIA LÍDER EN EL PLÁSMIDO DE PROPAGACIÓN pBlueScript SK⁺

7.3.4.1 DIGESTIONES CON LAS ENZIMAS *Bam*HI Y *Eco*RI

Una vez obtenido el amplicón completo purificado correspondiente al gen *MMAA*, se llevó a cabo una doble digestión con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Eco*RI (Invitrogen) según las especificaciones del fabricante. Asimismo, se llevó a cabo la digestión del plásmido de propagación pBlueScript SK⁺ con las mismas enzimas de restricción.

Ambos digeridos se sometieron a electroforesis en gel de agarosa bajo las condiciones descritas previamente. Los insertos digeridos obtenidos se recortaron y purificaron del gel utilizando el sistema *Gel purification mini Kit* (QIAGEN).

7.3.4.2 LIGACIÓN DEL PLÁSMIDO pBlueScript SK⁺ CON MMAA

La ligación se llevó a cabo mezclando 12 ng de plásmido pBlueScript SK⁺ digerido con las enzimas *Bam*HI y *Eco*RI, 6 ng del amplicón correspondiente a *MMAA* digerido con las mismas enzimas y 1U de ligasa T4 (Invitrogen), de acuerdo con las especificaciones del fabricante.

7.3.4.3 TRANSFORMACIÓN DE LA MEZCLA DE LIGACIÓN pBlueScript SK⁺-MMAA EN LA CEPA DE PROPAGACIÓN *E. coli* TOP10F'

Se obtuvieron células competentes de *E. coli* TOP10F' mediante el método de cloruro de rubidio [53], las cuales se transformaron por el método de choque térmico con la mezcla de ligación descrita en la sección 7.3.4.2. siguiendo el protocolo de Invitrogen. La selección de clonas positivas se llevó a cabo en cajas de LB con Amp (100 µg/mL), IPTG (140 µM) y X-gal (120 µg/mL).

7.3.4.4 PURIFICACIÓN DE LOS PLÁSMIDOS RECOMBINANTES A PARTIR DE *E. coli* TOP10F'

Se llevó a cabo la purificación de plásmido de 4 colonias positivas utilizando el sistema de purificación *DNA isolation kit* (Promega). A estos plásmidos se les nombró como pSK-MMAA-1 a 4 y se les sometió a una doble digestión con las enzimas *Bam*HI y *Eco*RI para verificar la liberación del inserto del tamaño esperado, las cuales se sometieron a electroforesis en gel de agarosa 0.8% como previamente se describió.

7.3.5 SUB-CLONACIÓN DE MMAA SIN SECUENCIA LÍDER EN EL PLÁSMIDO DE EXPRESIÓN pRSETA

7.3.5.1 OBTENCIÓN DE MMAA SIN SECUENCIA LÍDER MITOCONDRIAL POR AMPLIFICACIÓN

Para obtener la secuencia de *MMAA* sin la probable región líder mitocondrial se llevó a cabo la amplificación por PCR utilizando como templado el plásmido pSK-MMAA-1 con los iniciadores MMAA_{wl}-For y MMAA-Rev (Tabla 1) empleando la enzima *Platinum PCR SuperMix High Fidelity* (Invitrogen) utilizando las condiciones descritas en el anexo 1 (sección 12.1.2).

El producto de reacción se sometió a electroforesis en gel de agarosa bajo las condiciones descritas previamente. El amplicón obtenido que tiene el tamaño esperado para el gen sin secuencia líder (1,062 pb) se recortó y purificó del gel utilizando el sistema *Gel purification mini Kit* (QIAGEN).

7.3.5.2 DIGESTIONES CON LAS ENZIMAS *Bam*HI Y *Eco*RI

Una vez obtenido el amplicón sin secuencia líder mitocondrial purificado correspondiente al gen *MMAA*, se llevó a cabo una doble digestión con las enzimas de

restricción *Bam*HI y *Eco*RI (Invitrogen) según las especificaciones del fabricante. Se realizó también la digestión del plásmido de expresión pRSETA (Invitrogen) con las mismas enzimas de restricción.

Ambos digeridos se sometieron a electroforesis en gel de agarosa como previamente se describió. Los insertos digeridos obtenidos se recortaron y purificaron del gel utilizando el sistema *Gel purification mini Kit* (QIAGEN).

7.3.5.3 LIGACIÓN DEL PLÁSMIDO pRSETA CON MMAA SIN LÍDER

La ligación se llevó a cabo mezclando 50 ng de plásmido pRSETA digerido con las enzimas *Bam*HI y *Eco*RI, 15 ng del amplicón correspondiente a MMAA sin secuencia líder digerido con las mismas enzimas y 1U de ligasa T4 (Invitrogen), de acuerdo con las especificaciones del fabricante.

7.3.5.4 TRANSFORMACIÓN DE LA MEZCLA DE LIGACIÓN pRSETA-MMAA SIN LÍDER EN LA CEPA DE PROPAGACIÓN *E. coli* TOP10F'

Se obtuvieron células competentes de *E. coli* TOP10F' mediante el método de cloruro de rubidio [53] las cuales se transformaron por el método de choque térmico con la mezcla de ligación de la sección 7.3.5.3 siguiendo el protocolo descrito por Invitrogen. La selección de clonas positivas se llevó a cabo en cajas de LB con Amp (100 µg/mL).

7.3.5.5 PURIFICACIÓN DE LOS PLÁSMIDOS RECOMBINANTES A PARTIR DE *E. coli* TOP10F'

Se llevó a cabo la purificación de plásmido de 4 colonias positivas utilizando el sistema de purificación *DNA isolation kit* (Promega). A estos plásmidos se les nombró como pMMAAw1-1 a 4 y se les sometió a una doble digestión con las enzimas *Bam*HI y *Eco*RI para verificar la liberación del inserto del tamaño esperado. Estas se sometieron a electroforesis en gel de agarosa 0.8% como se ha descrito previamente.

7.3.5.6 SECUENCIACIÓN DEL PLÁSMIDO pMMAAw1-1

Para verificar que la secuencia clonada no tuviera cambios con respecto a la secuencia referencia reportada en la base de datos del GenBank (NM_172250), se hizo la secuenciación completa del inserto clonado en pMMAAw1-1 utilizando los iniciadores universales *T7 promoter primer* y *T7 Reverse primer* junto con los iniciadores internos indicados en la tabla 1. Se empleó el sistema *Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction* versión 3.1 (Applied Biosystems) utilizando un

secuenciador automático ABI-PRISM 310 (Perkin Elmer) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.

7.4 CLONACIÓN DEL cDNA CORRESPONDIENTE AL GEN *MUT* EN EL VECTOR DE EXPRESIÓN pRSETA

7.4.1 DISEÑO DE INICIADORES

En la tabla 2 se muestra el nombre, la secuencia y la descripción de cada uno de los iniciadores utilizados para obtener el cDNA y amplificar el gen *MUT*.

Nombre	Secuencia (5'-3')	Descripción
Mutwl-For	tacagcaacgagctcctacaccag	Diseñado para insertar el sitio de restricción <i>SacI</i> al inicio del gen <i>MUT</i> y eliminar la secuencia líder mitocondrial. (Las bases subrayadas indican el sitio de restricción).
Mut-Rev	ccatggttatacagattgctgctct	Diseñado para insertar el sitio de restricción <i>NcoI</i> al final del gen <i>MUT</i> .
Mutint-579	ggaccatccgccagtatgct	Iniciador sentido interno del gen <i>MUT</i> diseñado para secuenciar a partir del nucleótido 579 de la secuencia referencia (NM_000255).
Mutint-966	ctccagaacctcatga	Iniciador sentido interno del gen <i>MUT</i> diseñado para secuenciar a partir del nucleótido 966 de la secuencia referencia (NM_000255).
Mutint-1335	cacttactgagcaggatcccta	Iniciador sentido interno del gen <i>MUT</i> diseñado para secuenciar a partir del nucleótido 1335 de la secuencia referencia (NM_000255).
Mutint-1784	aatacttcagtgcgaacaggc	Iniciador sentido interno del gen <i>MUT</i> diseñado para secuenciar a partir del nucleótido 1784 de la secuencia referencia (NM_000255).

Tabla 2. Iniciadores utilizados para la clonación del cDNA del gen *MUT*.

7.4.2 SUB-CLONACIÓN DE *MUT* SIN SECUENCIA LÍDER EN EL PLÁSMIDO DE EXPRESIÓN pRSETA

7.4.2.1 OBTENCIÓN DE *MUT* SIN SECUENCIA LÍDER MITOCONDRIAL POR AMPLIFICACIÓN

Para obtener la región del gen *MUT* sin la región líder mitocondrial se llevó a cabo la amplificación por PCR utilizando como templado el plásmido pmMUT (donado amablemente por el Dr. W. Fenton [54]), el cual contiene el cDNA correspondiente al

gen completo. La determinación de la temperatura de alineamiento de los iniciadores, se obtuvo mediante la elaboración de una curva de temperaturas que abarcó un rango entre 50 y 61°C, utilizando los iniciadores Mutwl-For y Mut-Rev (Tabla 2). Una vez determinada la temperatura de alineamiento (52°C) se repitió el procedimiento con los mismos iniciadores para obtener el amplicón correspondiente al gen *MUT* sin secuencia líder mitocondrial, el cual tiene un tamaño aproximado de 2,154 pb, empleando *Platinum PCR SuperMix High Fidelity* (Invitrogen) y siguiendo las condiciones descritas en el anexo 1 (sección 12.1.3).

El producto de la reacción se sometió a electroforesis en gel de agarosa en condiciones descritas previamente. El amplicón obtenido con el tamaño esperado, se recortó y purificó del gel utilizando el sistema *Gel purification mini Kit* (QIAGEN).

7.4.2.2 DIGESTIONES CON LAS ENZIMAS *SacI* Y *NcoI*

Una vez obtenido el amplicón purificado correspondiente al gen *MUT* sin secuencia líder mitocondrial, se llevó a cabo una doble digestión con las enzimas de restricción *SacI* y *NcoI* (Invitrogen) según las especificaciones del fabricante. Asimismo, se llevó a cabo la digestión del plásmido de expresión pRSETA (Invitrogen) con las mismas enzimas de restricción.

Ambos elementos digeridos se sometieron a electroforesis en gel de agarosa bajo las condiciones descritas previamente. El inserto y el plásmido se recortaron y purificaron del gel utilizando el sistema *Gel purification mini Kit* (QIAGEN).

7.4.2.3 LIGACIÓN DEL PLÁSMIDO pRSETA CON *MUT* SIN LÍDER

La ligación se llevó a cabo mezclando 150 ng de plásmido pRSETA digerido con las enzimas *SacI* y *NcoI*, 300 ng del amplicón correspondiente a *MUT* sin secuencia líder digerido con las mismas enzimas y 1 U de ligasa T4 (Invitrogen), de acuerdo con las especificaciones del fabricante.

7.4.2.4 TRANSFORMACIÓN DE LA MEZCLA DE LIGACIÓN pRSETA-*MUT* SIN LÍDER EN LA CEPA DE PROPAGACIÓN *E. coli* TOP10F'

Mediante el método de cloruro de rubidio [53] se obtuvieron células competentes de *E. coli* TOP10F' las cuales se transformaron por el método de choque térmico con la mezcla de ligación de la sección 7.4.2.3 siguiendo el protocolo descrito por Invitrogen. La selección de clonas positivas se llevó a cabo en cajas de LB con Amp (100 µg/mL).

7.4.2.5 PURIFICACIÓN DE LOS PLÁSMIDOS RECOMBINANTES A PARTIR DE *E. coli* TOP10F'

Se llevó a cabo la purificación de plásmido de 4 colonias positivas utilizando el sistema de purificación *DNA isolation kit* (Promega). A estos plásmidos se les nombró como pMCM-1 a 4 y se les sometió a una doble digestión con las enzimas *SacI* y *NcoI* para verificar la liberación del inserto del tamaño esperado (2,154 pb). Las digestiones se sometieron a electroforesis en gel de agarosa 0.8% como se describió previamente.

7.4.2.6 SECUENCIACIÓN DEL PLÁSMIDO pMCM-2

Para corroborar que la secuencia clonada no tenía cambios con la secuencia referencia reportada en la base de datos del GenBank (NM_000255), se hizo la secuenciación completa del inserto clonado en pMCM-2 utilizando los iniciadores universales *T7 promoter primer* y *T7 Reverse primer* junto con los iniciadores internos indicados en la tabla 2. Se utilizó el sistema *Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction* versión 3.1 (Applied Biosystems) utilizando un secuenciador automático ABI-PRISM 310 (Perkin Elmer) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.

7.5 EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA MMAA

7.5.1 TRANSFORMACIÓN DEL PLÁSMIDO pMMAAw1-1 EN CEPAS DE EXPRESIÓN

Utilizando el método de cloruro de rubidio [53] se obtuvieron células competentes de las cepas de expresión *E. coli* BL21(DE3)pLysS, *E. coli* BL21(DE3)Rosetta y *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL, las cuales se transformaron por choque térmico con el plásmido pMMAAw1-1 siguiendo el protocolo descrito por Invitrogen.

7.5.2 ALMACENAMIENTO DE CLONAS DE EXPRESIÓN

Una vez que la cepa de *E. coli* BL21(DE3)Rosetta se transformó con el plásmido pMMAAw1-1, la mezcla de transformantes se inoculó en 100 mL de LB con Amp (100 µg/mL) y Cm (50 µg/mL). El cultivo se incubó a 37°C con agitación a 200 rpm hasta alcanzar una D.O.₆₀₀ entre 0.5-0.7. Una vez alcanzada dicha densidad se hicieron alícuotas con glicerol a un concentración final de 20%. Las alícuotas se mantuvieron a -70°C hasta su uso.

7.5.3 PRUEBAS PILOTO DE EXPRESIÓN DE MMAA

Se hicieron las pruebas piloto de expresión sugeridas en el manual de Invitrogen y, debido a una baja expresión, se probaron otras condiciones (Tabla 3).

Condición	Prueba
Medio de cultivo	LB
	SOB
Concentración de Inductor (IPTG)	0.5 mM
	1 mM
Densidad Óptica del medio para la inducción	0.5 y 0.8
Tiempo de incubación post-inducción	2h, 4h, 6h, 8h, 12h, 18h y 24h
Temperatura	37°C, 30°C y 22°C
Cepa de expresión	<i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS
	<i>E. coli</i> BL21(DE3)Rosetta
	<i>E. coli</i> BL21-CodonPlus(DE3)-RIL

Tabla 3. Condiciones probadas para la expresión de MMAA.

7.5.4 EXPRESIÓN DE MMAA

Un mL de la cepa *E. coli* BL21(DE3)Rosetta transformada con el plásmido pMMAAw1-1 y almacenada en glicerol se utilizó para inocular 400 mL de LB con Amp (100 µg/mL) y Cm (35 µg/mL). El cultivo se incubó a 37°C y 225 rpm hasta alcanzar una D.O.₆₀₀ entre 0.5-0.7, momento en el cual la temperatura se disminuyó gradualmente hasta 22°C. Una vez alcanzada dicha temperatura, el cultivo se indujo con IPTG (0.5 mM) y se incubó durante 14 horas con agitación a 250 rpm. Después de este tiempo, las células se colectaron por centrifugación a 10,000 rpm durante 15 minutos a 4°C. El paquete de células se almacenó a -70°C hasta su uso.

7.5.5 PURIFICACIÓN DE MMAA

La purificación de la proteína MMAA se llevó a cabo siguiendo el protocolo del manual *ProBond Purification System* (Invitrogen) en condiciones nativas con algunas modificaciones. Para la obtención del lisado, se utilizó un paquete celular de aproximadamente 3 g peso húmedo, el cual se resuspendió en 16 mL de amortiguador de purificación nativo 1X (50 mM NaH₂PO₄, 0.5 mM NaCl, pH 8). Después de tratar las células con lisozima (1 mg/mL), éstas se separaron en dos tubos (cada uno con 8 mL de lisado) para ser sonicadas y obtener las fracciones solubles e insolubles como lo indica el protocolo. La unión de la proteína a la resina se realizó en lote, colocando 4

mL de resina previamente equilibrada en amortiguador de purificación nativo con lisado diluido (1:2) en un vaso de precipitados con agitación gentil en hielo durante 1 hora. Posteriormente, la mezcla de lisado-resina se repartió en dos columnas *ProBond Purification*. Después se llevaron a cabo 4 lavados con amortiguador de purificación nativo 1X conteniendo 20 mM de imidazol y un lavado con amortiguador de purificación nativo 1X con 50 mM de imidazol para eliminar proteínas inespecíficas en cada columna. La proteína se eluyó con 8 mL de amortiguador de elución 2X (100 mM NaH₂PO₄, 1M NaCl, 200 mM Imidazol, pH 8) y cada fracción de 1 mL se colectó en un tubo de 1.5 mL. Por último a cada fracción obtenida se le agregó glicerol a una concentración final de 20%. La concentración de proteína se cuantificó por el método de Bradford (BioRad) utilizando BSA como estándar. Las fracciones más concentradas se almacenaron a -70°C hasta su uso.

7.5.6 RECONOCIMIENTO DE MMAA POR WESTERN BLOT

Para determinar si la proteína purificada corresponde a MMAA se llevó a cabo un ensayo de reconocimiento por Western blot. Las fracciones obtenidas durante el proceso de purificación se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida (10%) en condiciones desnaturalizantes siguiendo el protocolo descrito por Bollag, Rozycki y Edelstein [55]. Una vez concluida la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Millipore) utilizando como amortiguador de transferencia Tris base (3 g/L), glicina (14.4 g/L), SDS (1 g/L) y metanol (200 mL/L). El reconocimiento de la proteína se realizó utilizando el anticuerpo anti-HisG-AP (Invitrogen) y la detección utilizando el sistema de sustratos *BCIP/NBT* (Invitrogen), siguiendo las especificaciones del fabricante.

7.6 EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA MCM

7.6.1 TRANSFORMACIÓN DEL PLÁSMIDO pMCM-2 EN CEPAS DE EXPRESIÓN

Utilizando el método de cloruro de rubidio [53] se obtuvieron células competentes de las cepas de expresión *E. coli* BL21(DE3)pLysS, *E. coli* BL21(DE3)Rosetta y *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL las cuales se transformaron por choque térmico con el plásmido pMCM-2 siguiendo el protocolo descrito por Invitrogen.

7.6.2 ALMACENAMIENTO DE CLONAS DE EXPRESIÓN

Después de transformar la cepa de expresión *E. coli* BL21(DE3)pLysS con el plásmido pMCM-2, la mezcla de transformantes se utilizó para inocular 100 mL de LB con Amp (100 µg/mL) y Cm (35 µg/mL). El cultivo se incubó a 37°C con agitación a 200 rpm hasta alcanzar una D.O.₆₀₀ entre 0.5-0.7. Una vez alcanzada dicha densidad se hicieron alícuotas agregando glicerol a una concentración final de 20%. Las alícuotas se mantuvieron a -70°C hasta su uso.

7.6.3 PRUEBAS PILOTO DE EXPRESIÓN DE MCM

Se llevaron a cabo las pruebas piloto de expresión sugeridas en el manual de Invitrogen y, debido a una baja expresión de la proteína, se probaron diferentes condiciones de expresión (Tabla 4).

Condición	Prueba
Medio de cultivo	LB
	SOB
Concentración de Inductor (IPTG)	0.5 mM
	1 mM
Densidad Óptica del medio para la inducción	0.5 y 0.8
Tiempo de incubación post-inducción	2h, 4h, 6h, 8h, 12h, 18h y 24h
Temperatura	37°C, 30°C y 22°C
Cepa de expresión	<i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS
	<i>E. coli</i> BL21(DE3)Rosetta
	<i>E. coli</i> BL21-CodonPlus(DE3)-RIL

Tabla 4. Condiciones probadas para la expresión de MCM.

7.6.4 EXPRESIÓN DE MCM

Un mL de la cepa *E. coli* BL21(DE3)pLysS transformada con el plásmido pMCM-2 y almacenada en glicerol se utilizó para inocular 100 mL de LB con Amp (100 µg/mL) y Cm (35 µg/mL). El cultivo se incubó toda la noche a 37°C con agitación a 200 rpm. Este cultivo se utilizó como inóculo de un reactor de 1.5 L que contenía 1 L de LB suplementado con glucosa (2 g/L), Amp (100 µg/mL) y Cm (35 µg/mL). La temperatura del reactor se ajustó a 22°C y se agitó a 234 rpm para mantener una concentración de oxígeno disuelto (DOC) del 38%, hasta alcanzar una D.O.₆₀₀ de 0.8 momento en el cual la temperatura se disminuyó a 12°C. Una vez alcanzada dicha temperatura, el cultivo se indujo con IPTG (1 mM), se inició la alimentación con

glucosa (100 g/L) a un flujo de 1 mL/h y se incubó durante 41 horas con agitación a 350 rpm. Después de este tiempo, las células se colectaron por centrifugación a 10,000 rpm durante 15 minutos a 4°C. El paquete de células se almacenó a -70°C hasta su uso [manuscrito en preparación].

7.6.5 PURIFICACIÓN DE MCM

La purificación de la proteína MCM se llevó a cabo siguiendo el protocolo del manual *ProBond Purification System* (Invitrogen) en condiciones nativas con algunas modificaciones. Todos los pasos se realizaron en presencia de luz roja. Para la obtención del lisado, se utilizó un paquete celular de aproximadamente 4 g peso húmedo, el cual se resuspendió en 30 mL de amortiguador de purificación nativo 1X (50 mM NaH₂PO₄, 0.5 mM NaCl, pH 8 y 5 µM de AdoCbl). Después de tratar las células con lisozima (1 mg/mL), el lisado se repartió en 5 tubos cada uno con 6 mL para ser sonicadas y obtener las fracciones solubles e insolubles como lo indica el protocolo. El lisado se diluyó (1:2) con el mismo amortiguador y se agregó a la columna *ProBond Purification* para permitir la unión de la proteína a la resina manteniendo un flujo máximo de 1 mL/min. Posteriormente se llevaron a cabo 4 lavados con amortiguador de purificación nativo 1X el cual contenía 5 µM de AdoCbl y 20 mM de imidazol. Para eliminar las proteínas inespecíficas se realizó un lavado de 8 mL con amortiguador de purificación nativo 1X con 5 µM de AdoCbl y 100 mM de imidazol. La proteína se eluyó con 12 mL de amortiguador de elución 1X (50 mM NaH₂PO₄, 0.5 mM NaCl, 150 mM imidazol, pH 8 y 5 µM AdoCbl).

7.6.6 DIÁLISIS Y CONCENTRACIÓN DE MCM

Para aumentar la concentración de la enzima e intercambiar el amortiguador de elución por amortiguador de almacenamiento (Tris-HCl 100 mM, AdoCbl 5 µM, pH 7.5) se emplearon membranas de filtración. Para los lavados de mayor volumen se emplearon membranas con capacidad de 15 mL y corte de 50 KDa (Corning) y se efectuaron 3 lavados de 14 mL cada uno. Para la concentración de proteína se empleó un cono de filtración con capacidad de 2 mL y corte de 30 KDa (Sartorius). A la fracción final se le agregó glicerol al 20%. Posteriormente se efectuó la cuantificación de proteína empleando el método de Bradford (BioRad) utilizando ASB como estándar. La proteína se almacenó a 4°C durante 5 días.

7.6.7 RECONOCIMIENTO DE MCM POR WESTERN BLOT

Para determinar si la proteína purificada corresponde a MCM, se llevó a cabo un ensayo de reconocimiento por Western blot. Las fracciones obtenidas durante el proceso de purificación se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida (10%) en condiciones desnaturalizantes siguiendo el protocolo descrito por Bollag, Rozycki y Edelstein [55]. Una vez concluida la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Millipore) utilizando como amortiguador de transferencia Tris base (3 g/L), glicina (14.4 g/L), SDS (1 g/L) y metanol (200 mL/L). El reconocimiento de la proteína se realizó utilizando el anticuerpo anti-HisG-AP (Invitrogen) y la detección utilizando el sistema de sustratos *BCIP/NBT* (Invitrogen), siguiendo las especificaciones del fabricante.

7.7 MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE GTPasa DE LA PROTEÍNA PURA MMAA

7.7.1 ESTANDARIZACIÓN DE CONDICIONES

Para la separación de los nucleótidos GTP y GDP se empleó la técnica de cromatografía en capa fina (TLC) utilizando placas de poli(etileno)imino)-celulosa (Merck). Las condiciones probadas para la mejor resolución de los nucleótidos se encuentran resumidas en la tabla 5. Para efectuar estas pruebas se emplearon estándares de GTP y GDP (Sigma) a una concentración de 50 mM. Las imágenes se obtuvieron en un transiluminador (Gel Logic 200 Image System) mediante la absorción de luz UV.

Condición	Prueba	
Fase móvil	Amortiguador Tb (Tris 0.75 M, HCl 0.45 M, LiCl 0.5 M) [56]	pH 8
	KH ₂ PO ₄ (1 M) [48]	pH 3
		pH 4
		pH 4.5
		pH 5
Tiempo de Corrimiento	2.5 h	
	5 h	
Cantidad de muestra cargada	1.75 µL	
	1 µL	
	0.75 µL	
	0.5 µL	
	0.25 µL	
Lavados con metanol	Sin lavado	
	1 lavado	
	2 lavados	

Tabla 5. Condiciones probadas para la separación de GTP y GDP por TLC.

7.7.2 MEDICIÓN DE ACTIVIDAD

La actividad de GTPasa de la proteína purificada MMAA se hizo con base en el protocolo descrito por Korotkova y colaboradores [48] con algunas modificaciones. El sistema de reacción contenía 20 µg de MMAA pura, 5 mM MgCl₂, 38.5 mM KCl, 10 µCi de [α^{32} -P]GTP y 50 mM fosfato de potasio, pH 7.5 en un volumen total de 25 µL. Cuando la reacción se realizó en presencia de la proteína MCM, ésta se agregó en una relación 1:1 con respecto a MMAA. La mezcla se incubó a 37°C durante 15, 30 y 60 minutos. Para detener la reacción se agregó etanol frío volumen a volumen y se centrifugó durante 5 minutos a 13,000 rpm para eliminar la proteína precipitada. Del sobrenadante se tomaron alícuotas de 1 µL las cuales se aplicaron en la placa con un capilar. La placa se colocó en un tanque que contenía amortiguador Tb (30 mL) y cuando el frente del amortiguador alcanzó el borde superior de la placa, ésta se retiró del tanque y se dejó secar. Después la placa se expuso a una película radiográfica JXA 2 (Juama) durante 12 horas. Por último, la película se reveló y fijó (Kodak).

7.8 MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE ISOMERASA DE LA PROTEÍNA PURA MCM

7.8.1 TIEMPOS CORTOS DE INCUBACIÓN

La actividad de isomerasa de la proteína MCM se midió por desaparición del sustrato metilmalonil-CoA (MMCoA, Sigma) separándolo del succinil-CoA por HPLC y posteriormente cuantificando por absorción a una λ de 254 nm. El sistema de reacción contenía 3.2 ng de la enzima MCM, 0.24 mM de MMCoA, 5 µM de AdoCbl, 200 mM Tris/100 mM de amortiguador fosfato, pH 7.5 en un volumen total de 50 µL. Para los ensayos en presencia de la proteína MMAA, se agregaron 6.2 ng al sistema. La mezcla de reacción se incubó a 37°C durante 30 segundos, 1 minuto y 2 minutos y se detuvo por congelación en hielo seco/etanol. 20 µL de cada muestra se inyectaron en un HPLC con una columna nucleosil 100-5 C₁₈ 150 x 4.6 mm (Macherey-Nagel) y se analizaron por espectrofotometría (Varian ProStar Mod. 210) utilizando un método isocrático cuya fase móvil estaba compuesta de 50 mM NaH₂PO₄ pH 4, 85% y 15% metanol. La detección y cuantificación de MMCoA y SucCoA se llevó a cabo utilizando el software Galaxie Chromatography Data System (versión 1.9.3.2).

Para calcular la actividad específica de la enzima, se llevó a cabo la construcción de una curva estándar de MMCoA por triplicado para interpolar los datos de unidades

de área obtenidos en la cinética de reacción. La actividad se reporta en $\mu\text{moles de succinil-CoA formados min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$.

7.8.2 TIEMPOS PROLONGADOS DE INCUBACIÓN

Para las cinéticas en tiempos prolongados de incubación, el sistema de reacción contenía 6.2 ng de la enzima MCM, 0.24 mM de MMCoA, 5 μM de AdoCbl, 200 mM Tris/100 mM de amortiguador fosfato, pH 7.5 en un volumen total de 50 μL . Para los ensayos en presencia de la proteína MMAA, se agregaron 12.5 ng al sistema en ausencia y presencia de GTP (1 mM) ó GMPPNP (1 mM) y MgCl_2 (1 mM). La reacción se incubó a 37°C durante 30, 60, 120 y 180 minutos. Se detuvo por congelación en hielo seco/etanol. 20 μL de cada muestra se inyectaron al HPLC. En el caso de la reacción diseñada para observar el efecto reactivador de la proteína MMAA, ésta se inició agregando la enzima MCM, se dejó incubando durante 60 minutos y posteriormente se agregó MMAA al sistema.

7.9 ENSAYO DE DOBLE HÍBRIDO EN LEVADURA

7.9.1 DISEÑO DE INICIADORES

En la tabla 6 se muestra el nombre, la secuencia y la descripción de cada uno de los iniciadores empleados en la amplificación de los genes *MMAA* y *MUT* en el ensayo de doble híbrido en levadura.

Nombre	Secuencia (5'-3')	Descripción
MutDH-F	gatcccatggagctacaccagcaacagcc	Diseñado para insertar el sitio de restricción <i>NcoI</i> al inicio del gen <i>MUT</i> sin secuencia líder mitocondrial para sub-clonarlo en el plásmido pGBKT7.
MutDH-R	cgaattctgcagttatacag	Diseñado para insertar el sitio de restricción <i>PstI</i> al final del gen <i>MUT</i> para sub-clonarlo en el plásmido pGBKT7.
MMAADH-F	gatcgatgggaattctgtgtacaacaacc	Diseñado para insertar el sitio de restricción <i>EcoRI</i> al inicio del gen <i>MMAA</i> sin secuencia líder mitocondrial para sub-clonarlo en el plásmido pGADT7.
MMAADH-Rev	caagcttcctcgagttagtctctctttta	Diseñado para insertar el sitio de restricción <i>XhoI</i> al inicio del gen <i>MMAA</i> sin secuencia líder mitocondrial para sub-clonarlo en el plásmido pGADT7.

Tabla 6. Iniciadores utilizados para amplificar y sub-clonar los genes *MMAA* y *MUT* (las bases subrayadas indican el sitio de restricción).

7.9.2 AMPLIFICACIÓN Y CLONACIÓN DE MMAA Y MUT EN LOS PLÁSMIDOS DEL SISTEMA MATCHMAKER GOLD YEAST TWO-HYBRID SYSTEM

7.9.2.1 AMPLIFICACIÓN DE LOS GENES MMAA Y MUT

Para poder clonar la secuencia del gen *MMAA* se llevó a cabo la amplificación por PCR utilizando como templado el plásmido pMMAAw1-1 previamente obtenido (7.3.5.5). La determinación de la temperatura de alineamiento de los iniciadores se obtuvo mediante la elaboración de una curva de temperaturas en un rango entre 50 y 60°C utilizando los iniciadores MMAADH-F y MMAADH-R (Tabla 6). Una vez determinada la temperatura de alineamiento (58°C) se repitió el procedimiento con los mismos iniciadores para obtener el amplicón correspondiente al gen *MMAA* sin secuencia líder mitocondrial (1,062 pb) empleando *Platinum PCR SuperMix High Fidelity* (Invitrogen) siguiendo las condiciones descritas en el anexo 1 (sección 12.1.4).

Para la clonación del gen *MUT* se llevó a cabo la amplificación por PCR utilizando como templado el plásmido pMCM-2 obtenido anteriormente (7.4.2.5). La determinación de la temperatura de alineamiento de los iniciadores MutDH-F y MutDH-R se obtuvo mediante una curva de temperaturas en un rango entre 50 y 60°C. Una vez obtenida la temperatura de alineamiento (50°C) el proceso se repitió para obtener el amplicón del gen *MUT* sin secuencia líder mitocondrial (2,154 pb). Para ello se utilizó *Platinum PCR SuperMix High Fidelity* (Invitrogen) empleando las condiciones descritas en el anexo 1 (sección 12.1.5).

Los productos de las reacciones de PCR se sometieron a electroforesis en gel de agarosa 0.8%. Los amplicones con el tamaño esperado se recortaron y purificaron del gel utilizando el sistema *Gel purification mini Kit* (QIAGEN).

7.9.2.2 RESTRICCIÓN DE LOS AMPLICONES CORRESPONDIENTES A MMAA Y MUT

Una vez obtenidos los amplicones purificados de cada gen, ambos sin secuencia líder mitocondrial, se sometieron a doble digestión. El amplicón correspondiente al gen *MUT* se digirió con las enzimas de restricción *NcoI* y *PstI* (Invitrogen), al igual que el plásmido pGBKT7. *MMAA* se digirió con las enzimas *EcoRI* y *XhoI* (Invitrogen) junto con el plásmido pGADT7, siguiendo las especificaciones del fabricante.

Ambos digeridos se sometieron a electroforesis en gel de agarosa bajo las condiciones descritas previamente. Los insertos digeridos obtenidos se recortaron y purificaron del gel utilizando el sistema *Gel purification mini Kit* (QIAGEN).

7.9.2.3 LIGACIONES

Las ligaciones se llevaron a cabo mezclando 50 ng de plásmido digerido (pGBKT7 ó pGADT7), 150 ng del amplicón digerido correspondiente (*MUT* ó *MMAA*) y 1 U de ligasa T4 (Invitrogen), de acuerdo con las especificaciones del fabricante.

7.9.2.4 TRANSFORMACIÓN DE LAS MEZCLAS DE LIGACIÓN pGBKT7-*MUT* Y pGADT7-*MMAA* EN LA CEPA DE PROPAGACIÓN *E. coli* TOP10F'

Mediante el método de cloruro de rubidio [53] se obtuvieron células competentes de *E. coli* TOP10F' las cuales se transformaron por el método de choque térmico con las mezclas de ligación de la sección 7.9.2.3 siguiendo el protocolo descrito por Invitrogen. Para la selección de clonas positivas de pGADT7-*MMAA* se resembró en cajas de LB con Amp (100 µg/mL). Para la selección de clonas positivas de pGBKT7-*MUT* se resembró en cajas de LB con kanamicina (Kan, 50 µg/mL).

7.9.2.5 PURIFICACIÓN DE LOS PLÁSMIDOS RECOMBINANTES A PARTIR DE *E. coli* TOP10F'

Se llevó a cabo la purificación de plásmido de 2 colonias positivas de cada caso, utilizando el sistema de purificación *DNA isolation kit* (Promega). Los plásmidos nombrados pGBKT7-Mut-1 y 2 se sometieron a una doble digestión con las enzimas *NcoI* y *PstI* para verificar la liberación del inserto del tamaño esperado (2,154 pb). Asimismo, los plásmidos pGADT7-MMAA-1 y 2 se sometieron a doble digestión con las enzimas *EcoRI* y *XhoI* para verificar la liberación del inserto (1,062 pb). Las restricciones se sometieron a electroforesis en gel de agarosa 0.8% como se ha descrito anteriormente.

7.9.3 TRANSFECCIÓN DE PLÁSMIDOS EN LEVADURA

Células competentes de la cepa de levadura Y2HGold se co-transfectaron con los plásmidos pGBKT7-Mut-1 y pGADT7-MMAA-1 utilizando el sistema *Yeastmaker Yeast Transformation System 2* (Clontech) siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. Este mismo sistema se empleó para co-transfectar la cepa Y2HGold con los plásmidos que sirvieron como controles (control positivo: pGADT7-T+pGBKT7-53,

control negativo: pGADT7-T+pGBKT7-Lam e interacciones inespecíficas: pGADT7+pGBKT7, pGADT7-MMAA+pGBKT7, pGADT7+pGBKT7-MCM).

7.9.4 ESCRUTINIO PARA LA INTERACCIÓN ENTRE MCM Y MMAA EN LEVADURA

Una vez realizada la transfección se hizo la selección de ambos plásmidos por crecimiento en medio DDO a 30°C durante 3-5 días. Para hacer el escrutinio, una colonia de cada caso se resembró en los medios selectivos DDO+X- α -Gal y QDO+X- α -Gal+Aureobasidina (Ab) siguiendo las especificaciones del fabricante.

8 RESULTADOS

La acidemia metilmalónica es una enfermedad ocasionada por mutaciones en el gen que codifica a la enzima MCM o a la proteína MMAA. Hasta la fecha no se conoce por qué mutaciones en el gen de la proteína MMAA causan AMM ni cuál es el papel que pudiera tener en relación a la actividad de la MCM. Una técnica ampliamente utilizada en la clínica es la medición de la actividad de la proteína MCM en extractos de leucocitos de sangre humana debido a su practicidad y relativa sencillez. Con base en estos antecedentes y en virtud de que nuestro objetivo es conocer la función de MMAA en relación con MCM, fue indispensable clonar el cDNA de ambos genes a partir del RNA total el cual se obtuvo de leucocitos humanos.

8.1 OBTENCIÓN Y CLONACIÓN DEL cDNA CORRESPONDIENTE AL GEN *MMAA* EN EL VECTOR DE EXPRESIÓN pRSETA

8.1.1 EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL

Para obtener el RNA total de humano se hizo la purificación de leucocitos a partir de una muestra de sangre fresca. En la figura 7 se muestra la integridad del RNA total. La concentración obtenida fue de $\sim 1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$. Este RNA se utilizó para la obtención del cDNA correspondiente al gen *MMAA*.

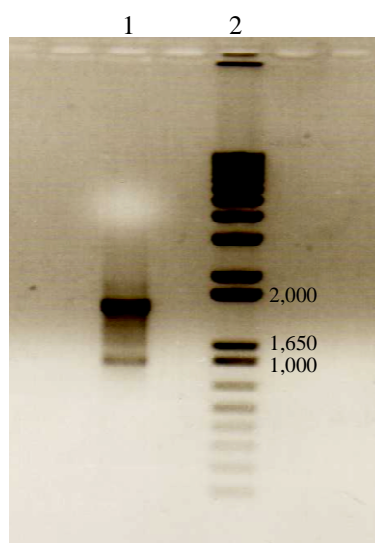


Fig. 7 Purificación de RNA total a partir de leucocitos.
Carril 1. 5 μg de RNA total; Carril 2. MPM 1 Kb (Plus DNA Ladder, Invitrogen).

8.1.2 RT-PCR Y CLONACIÓN DEL cDNA DE *MMAA* EN pBlueScript SK⁺

Los iniciadores MMAAcom-For y MMAA-Rev (Tabla 1) se emplearon para obtener el cDNA correspondiente al gen *MMAA*, el cual incluye la probable secuencia líder mitocondrial asignada por Dobson y Gravel [52]. El amplicón obtenido por RT-PCR tuvo el tamaño esperado de 1,257 pb como se puede observar en la figura 8A, de donde se purificó (Fig. 8B).

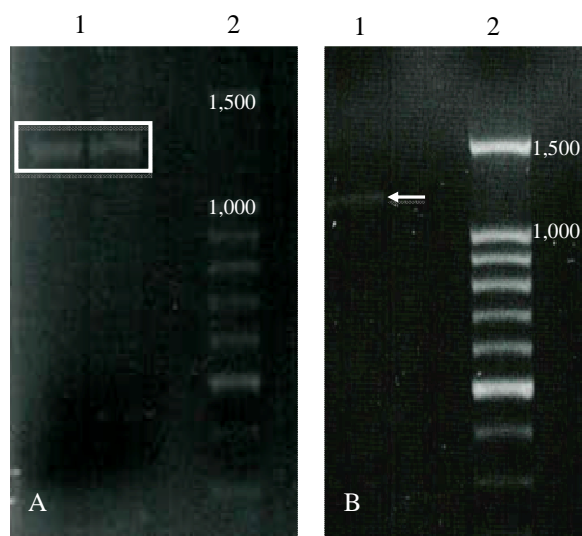


Fig. 8 Productos obtenidos por RT-PCR del gen *MMAA*.

- A. Carril 1. Amplicón correspondiente a *MMAA* (el rectángulo blanco muestra la sección purificada del gel); Carril 2. MPM 100 pb (Promega).
- B. Carril 1. Amplicón purificado del gel; Carril 2. MPM 100 pb (Promega).

Con el propósito de clonar el cDNA correspondiente al gen *MMAA* empleando pBlueScript SK⁺, se llevó a cabo la digestión del amplicón obtenido y del plásmido con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Eco*RI. Los fragmentos digeridos se purificaron del gel (Fig. 9) para después ser ligados.



Fig. 9 Digestión de pBlueScript SK⁺ y del amplicón *MMAA* con las enzimas *Bam*HI/*Eco*RI. Carril 1. pBlueScript SK⁺ sin digerir; Carril 2 y 3. pBlueScript SK⁺ digerido con *Bam*HI/*Eco*RI y purificado del gel; Carril 4. MPM λ -*Hind*III (Promega); Carril 5 y 6. Amplicón digerido con *Bam*HI/*Eco*RI y purificado del gel.

La mezcla de ligación obtenida se transformó en *E. coli* TOP10F'. Se purificaron los plásmidos a partir de 4 clonas positivas (amp^R y de color blanco), los cuales se nombraron como pSK-MMAA-1 a 4 y se sometieron a una doble digestión con las enzimas *Bam*HI y *Eco*RI con la finalidad de verificar la presencia del inserto del tamaño esperado (Fig. 10).

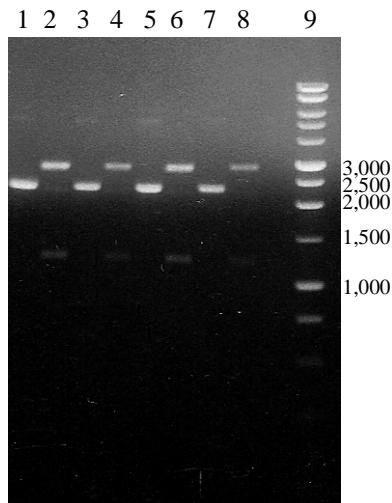


Fig. 10 Purificación de los plásmidos pSK-MMAA-1 a 4 y digestión con las enzimas *Bam*HI/*Eco*RI.

Carril 1. pSK-MMAA-1 sin digerir; Carril 2. pSK-MMAA-1 digerido con *Bam*HI/*Eco*RI; Carril 3. pSK-MMAA-2 sin digerir; Carril 4. pSK-MMAA-2 digerido con *Bam*HI/*Eco*RI; Carril 5. pSK-MMAA-3 sin digerir; Carril 6. pSK-MMAA-3 digerido con *Bam*HI/*Eco*RI; Carril 7. pSK-MMAA-4 sin digerir; Carril 8. pSK-MMAA-4 digerido con *Bam*HI/*Eco*RI; Carril 9. MPM 1 Kb (Promega).

8.1.3 AMPLIFICACIÓN Y CLONACIÓN EN pRSETA

El sistema de expresión de proteínas empleado en este trabajo utiliza a pRSETA como vector de expresión, el cual es multicopia y confiere resistencia a ampicilina (anexo 2). La transcripción de los genes clonados en este vector están bajo el control del promotor de la RNA polimerasa T7, la cual se transcribe a partir de una construcción cromosomal presente en las cepas de *E. coli* BL21(DE3), mediante la inducción de su expresión con IPTG. Para clonar el gen *MMAA* en este vector de expresión se utilizó el iniciador MMAAw1-For, el cual está diseñado para eliminar la secuencia líder mitocondrial, junto con MMAA-Rev (Tabla 1) empleando como templado el plásmido pSK-MMAA-1. El amplicón del tamaño esperado (1,062 pb) se purificó (Fig. 11A) y posteriormente se llevó a cabo la digestión con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Eco*RI tanto del amplicón purificado como del plásmido pRSETA, los cuales también se purificaron del gel (Fig. 11B) para ser ligados y transformados en *E. coli* TOP10F'.

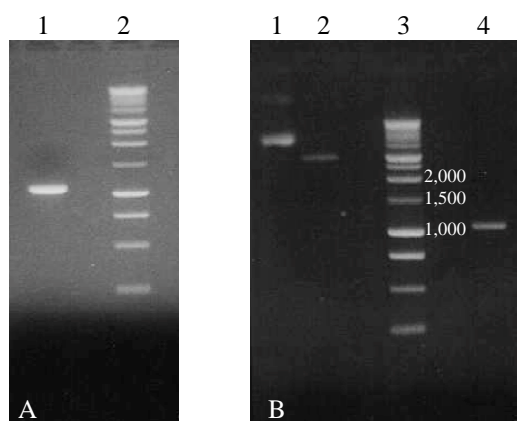


Fig. 11 Amplificación de *MMAA* por PCR y digestión del amplicón con las enzimas *Bam*HI/*Eco*RI.

- A. Carril 1. Amplicón purificado del gel (1,062 pb); Carril 2. MPM 1Kb (Promega).
- B. Carril 1. pRSETA sin digerir; Carril 2. pRSETA digerido con *Bam*HI/*Nco*RI; Carril 3. MPM 1Kb (Promega); Carril 4. Amplicón digerido con *Bam*HI/*Eco*RI.

Los plásmidos obtenidos de 4 clonas positivas se purificaron y se nombraron como p-MMAAw1-1 a 4. Para verificar la presencia del inserto del tamaño esperado se digirieron con las enzimas *Bam*HI/*Eco*RI (Fig. 12).

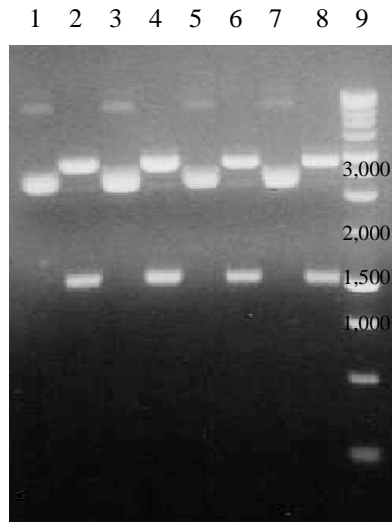


Fig. 12 Purificación de los plásmidos p-MMAAw1-1 a 4 y digestión con las enzimas *Bam*HI/*Eco*RI.

Carril 1. p-MMAAw1-1 sin digerir; Carril 2. p-MMAAw1-1 digerido con *Bam*HI/*Nco*RI; Carril 3. p-MMAAw1-2 sin digerir; Carril 4. p-MMAAw1-2 digerido con *Bam*HI/*Nco*RI; Carril 5. p-MMAAw1-3 sin digerir; Carril 6. p-MMAAw1-3 digerido con *Bam*HI/*Eco*RI; Carril 7. p-MMAAw1-4 sin digerir; Carril 8. p-MMAAw1-4 digerido con *Bam*HI/*Nco*RI; Carril 9. MPM 1 Kb (Promega).

El plásmido p-MMAAw1-1 se secuenció y el resultado obtenido se comparó con la referencia en la base de datos (NM_172250) verificando la ausencia de cambios en la secuencia de nucleótidos.

8.2 CLONACIÓN DEL cDNA CORRESPONDIENTE AL GEN *MUT* EN EL VECTOR DE EXPRESIÓN pRSETA

8.2.1 CLONACIÓN DE *MUT* EN EL VECTOR DE EXPRESIÓN pRSETA

Para realizar la clonación del gen *MUT* en el vector de expresión pRSETA fue necesario amplificarlo a partir del plásmido pmMUT (donado por el Dr. Fenton [54]), el cual contiene la secuencia del gen completo (2,250 pb) incluyendo la región líder mitocondrial. Los iniciadores diseñados para este fin fueron Mutw1-For y Mut-Rev, los cuales insertan los sitios de restricción para las enzimas *Sac*I y *Nco*I al inicio y final del gen respectivamente y eliminan la secuencia líder mitocondrial (Tabla 2). El producto de PCR con un tamaño de 2,154 pb se muestra en la figura 13A. Posteriormente el amplicón se digirió con las enzimas de restricción *Sac*I y *Nco*I, junto con el plásmido pRSETA (Fig. 13B y C) para ligarlos y transformar la cepa *E. coli* TOP10F'.

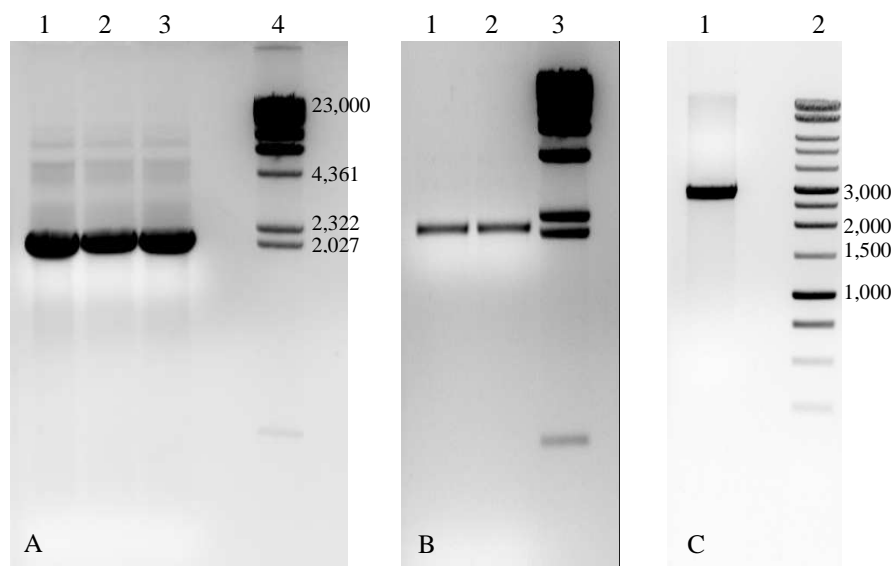


Fig. 13 Amplificación del gen *MUT* y digestión del amplicón y del plásmido pRSETA con las enzimas *SacI/NcoI*.

- A. Carril 1, 2 y 3. Producto de PCR correspondiente al gen *MUT*; Carril 4. MPM λ -*HindIII* (Promega).
- B. Carril 1 y 2. Doble digestión del amplicón *MUT* con *SacI/NcoI* purificado del gel; Carril 3. MPM λ -*HindIII* (Promega).
- C. Carril 1. Doble digestión del vector pRSETA con *SacI/NcoI* purificado del gel; Carril 2. MPM 1Kb (Promega).

Los plásmidos obtenidos de diferentes clonas y nombrados como pMCM-1 a 3, se digirieron con las enzimas *SacI* y *NcoI* para verificar la presencia del inserto de 2,154 pb correspondiente al gen *MUT* (Fig. 14), el cual estuvo presente en todos.

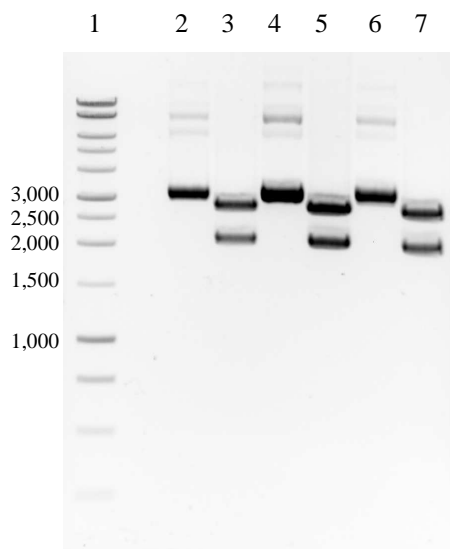


Fig. 14 Purificación de los plásmidos pMCM-1 a 3 y digestión con las enzimas *SacI/NcoI*. Carril 1. MPM 1 Kb (Promega); Carril 2. pMCM-1 sin digerir; Carril 3. pMCM-1 digerido con *SacI/NcoI*; Carril 4. pMCM-2 sin digerir; Carril 5. pMCM-2 digerido con *SacI/NcoI*; Carril 6. pMCM-3 sin digerir; Carril 7. pMCM-3 digerido con *SacI/NcoI*.

El plásmido p-MCM-2 se secuenció y se llevó a cabo la comparación con su referencia en el GenBank (NM_000255) confirmando que no hubo cambios en los nucleótidos y que se encontraba en el marco de lectura correcto.

8.3 EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA MMAA

8.3.1 PRUEBAS PILOTO DE EXPRESIÓN

Se llevó a cabo la cinética de expresión de la proteína MMAA sin secuencia líder la cual tiene una masa molecular esperada de 42 KDa considerando la bandera de histidinas. La expresión de la proteína se analizó en SDS-PAGE en los lisados obtenidos, tanto en fracción soluble como en insoluble. Como control positivo se utilizó la expresión de una proteína denominada MeaB de *Saccharopolyspora erythraea* CA 340 cuyo gen está clonado en el plásmido pRSETA y la proteína se expresa empleando el mismo sistema. Los resultados mostraron que la proteína MMAA, no se sobreexpresó claramente en estas condiciones (Fig. 15).

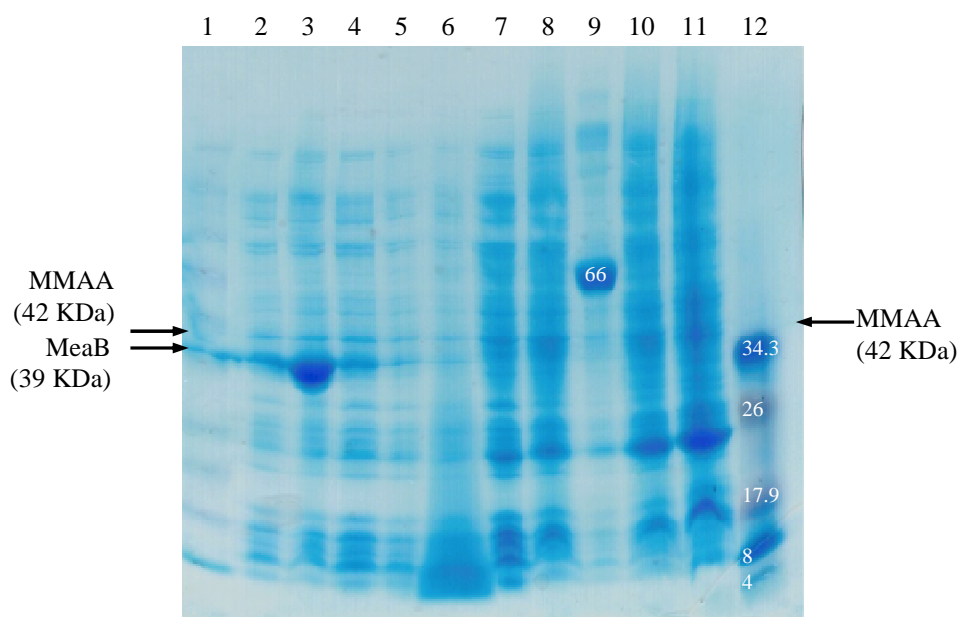


Fig. 15 Expresión de la proteína MMAA en las fracciones solubles e insolubles de lisados obtenidos a partir de células de *E. coli* BL21(DE3)pLysS. *E. coli* BL21(DE3)pLysS transformada con el plásmido p-MMAAw1-1 se creció en medio SOB inducido con 1 mM de IPTG durante 0, 2, 4 y 6 horas a 37°C. Se colocaron 10 µg de proteína de cada muestra en cada carril y los geles se tiñeron con Coomassie. Carril 1. MMAA soluble, To; Carril 2. Control soluble, 6 horas; Carril 3. Control MeaB, insoluble, 6 horas; Carril 4. MMAA soluble, 2 horas; Carril 5. MMAA soluble, 4 horas; Carril 6. MPM 10 KDa (MARCA); Carril 7. MMAA soluble, 6 horas; Carril 8. MMAA insoluble, 2 horas; Carril 9. MPM BSA 66 KDa; Carril 10. MMAA insoluble, 4 horas; Carril 11. MMAA insoluble, 6 horas; Carril 12. MPM Kaleidoscope Polypeptide Standards (BioRad).

Debido a la baja expresión de la proteína MMAA fue necesario modificar las condiciones de expresión. Inicialmente se cambió de medio de cultivo (de SOB a LB) dejando las demás condiciones iguales. Como puede observarse en las figuras 16A y 16B, no hubo una mayor expresión de MMAA.

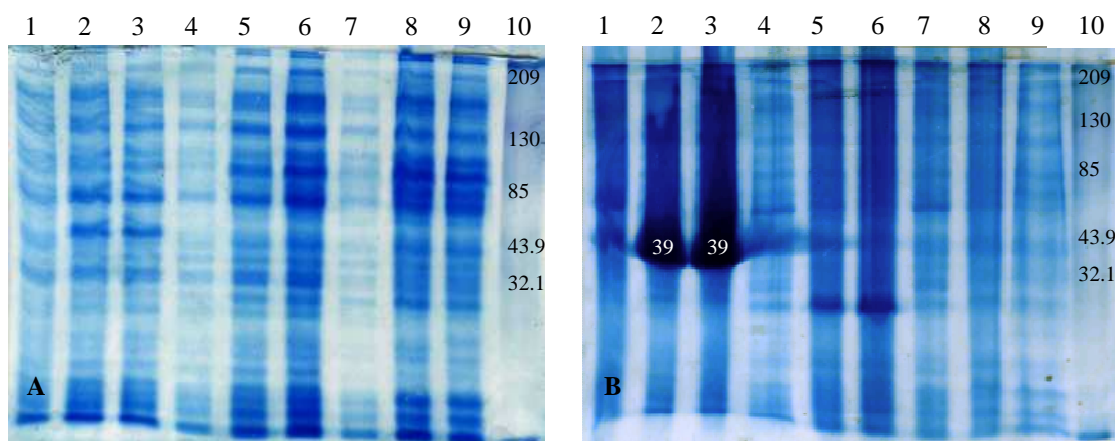


Fig. 16 Expresión de la proteína MMAA en las fracciones solubles e insolubles de lisados obtenidos a partir de células de *E. coli* BL21(DE3)pLysS.

Una sola colonia de *E. coli* BL21(DE3)pLysS transformada con el plásmido p-MMAAw1-1 se creció en medio SOB y LB los cuales se indujeron con 1 mM de IPTG durante 0, 4 y 6 horas a 37°C. 10 µg de proteína de cada muestra se cargaron en los carriles y los gels se tiñeron con Coomassie.

A. Fracciones Solubles: Carril 1. Control MeaB, To; Carril 2. Control MeaB, 4 horas; Carril 3. Control MeaB, 6 horas; Carril 4. MMAA, To (SOB); Carril 5. MMAA, 4 horas (SOB); Carril 6. MMAA, 6 horas (SOB); Carril 7. MMAA, To (LB); Carril 8. MMAA, 4 horas (LB); Carril 9. MMAA, 6 horas (LB); Carril 10. MPM Kaleidoscope Prestained Standards (BioRad).

B. Fracciones Insolubles: Carril 1. Control MeaB, To; Carril 2. Control MeaB, 4 horas; Carril 3. Control MeaB, 6 horas; Carril 4. MMAA, To (SOB); Carril 5. MMAA, 4 horas (SOB); Carril 6. MMAA, 6 horas (SOB); Carril 7. MMAA, To (LB); Carril 8. MMAA, 4 horas (LB); Carril 9. MMAA, 6 horas (LB); Carril 10. MPM Kaleidoscope Prestained Standards (BioRad).

Los resultados muestran que la mayor parte del control MeaB y una pequeña parte de MMAA se queda en la fracción insoluble (Fig. 15 y 16), por lo que se llevó a cabo una tercera prueba piloto de expresión disminuyendo la temperatura a 30°C y aumentando el tiempo de incubación después de la inducción a 8 horas (Fig. 17).

En los organismos se ha descrito una preferencia por el uso de codones para ciertos aminoácidos (clasificados como codones mayoritarios) para los cuales existe una poza de tRNAs mayor lo cual agiliza la traducción de proteínas. Por el contrario, existen codones poco utilizados denominados menores o raros [57]. Este uso de codones preferenciales puede representar un problema en la expresión de proteínas heterólogas, ya que el gen clonado e introducido en la cepa puede codificar para un mRNA que contenga codones raros para los cuales hay una poza de tRNAs escaso, provocando una

baja expresión de la proteína. Para sobrellevar esta situación en esta prueba piloto de expresión se emplearon dos cepas de expresión derivadas de BL21, *E. coli* BL21(DE3)Rosetta y *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL, las cuales contienen genes que codifican para tRNAs de baja frecuencia en bacterias.

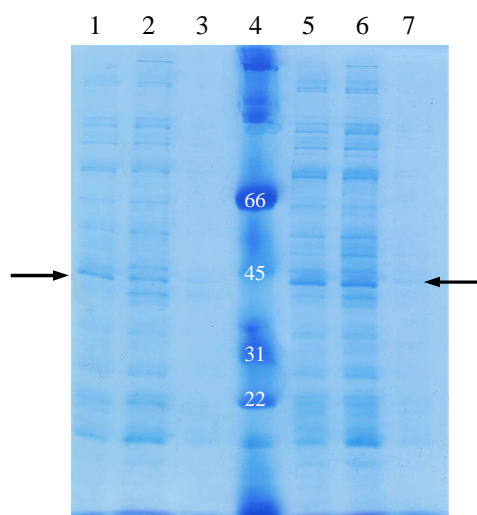


Fig. 17 Expresión de la proteína MMAA en las fracciones solubles e insolubles de lisados obtenidos a partir de células de *E. coli* BL21(DE3)Rosetta y *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL.

Ambas cepas de *E. coli* se transformaron con el plásmido p-MMAAw1-1 y se crecieron en medio LB el cual se indujo con 0.5 mM de IPTG durante 0 y 8 horas a 30°C. 10 µg de proteína de cada muestra se cargaron en los carriles. Carril 1. To, ELC_{total}, cepa *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL; Carril 2. T₁, fracción soluble, cepa *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL; Carril 3. T₁, fracción insoluble, cepa *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL; Carril 4. MPM Broad Range SDS (Bio-Rad); Carril 5. To, ELC_{total}, cepa *E. coli* BL21(DE3)Rosetta; Carril 6. T₁, fracción soluble, cepa *E. coli* BL21(DE3)Rosetta; Carril 7. T₁, fracción insoluble, cepa *E. coli* BL21(DE3)Rosetta.

Como puede observarse en la figura 17, no hubo una inducción clara de la proteína MMAA, sin embargo pudo detectarse un producto cuya masa corresponde a la esperada (señalado con una flecha), la cual está en mayor cantidad en los extractos provenientes de *E. coli* BL21(DE3)Rosetta por lo que esta cepa de expresión se utilizó para modificar las condiciones que nos permitieron explorar la posible degradación de la proteína durante la obtención del extracto por efecto de las proteasas propias de la bacteria. En el siguiente experimento se adicionaron dos inhibidores de proteasas (EDTA y PMSF) y una combinación de éstos durante la extracción de los lisados. Además, la temperatura después de la inducción se disminuyó a 22°C por lo que el cultivo se incubó por más tiempo (14 horas). Los resultados de estos cambios se muestran en la figura 18.

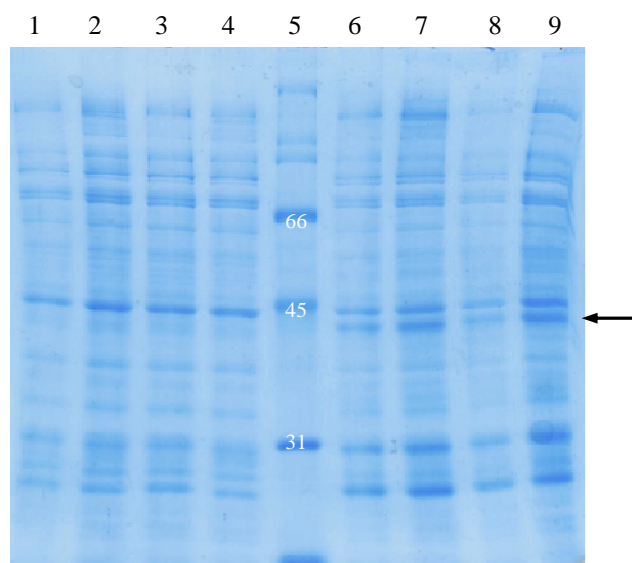


Fig. 18 Expresión de la proteína MMAA en las fracciones solubles de lisados obtenidos a partir de células de *E. coli* BL21(DE3)Rosetta.

La cepa *E. coli* BL21(DE3)Rosetta transformada con el plásmido p-MMAAw1-1 se creció en medio LB y se indujo con 0.5 mM de IPTG durante 0 y 14 horas a 22°C. Los extractos se obtuvieron en presencia de EDTA (1.5 mM), PMSF (1 mM) y EDTA+PMSF (1.5 mM y 1 mM respectivamente). 10 µg de proteína de cada muestra se cargaron en cada carril. Carril 1. To, fracción soluble, sin inhibidor; Carril 2. To, fracción soluble, EDTA; Carril 3. To, fracción soluble, PMSF; Carril 4. To, fracción soluble, EDTA+PMSF; Carril 5. MPM Broad Range SDS (Bio-Rad); Carril 6. T₁, fracción soluble, sin inhibidor; Carril 7. T₁, fracción soluble, EDTA; Carril 8. T₁, fracción soluble, PMSF; Carril 9. T₁, fracción soluble, EDTA+PMSF.

Por primera vez se observó la expresión de una proteína con el peso esperado que responde a la inducción con IPTG cuando se compara con el cultivo sin inducir y fue la más alta cotejando los resultados con los experimentos anteriores. Además, no existió diferencia en la cantidad de esta proteína en extractos obtenidos en ausencia y en presencia de los inhibidores de proteasas probados bajo estas condiciones.

8.3.2 PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA MMAA

Utilizando las condiciones establecidas anteriormente se llevó a cabo la expresión de la proteína MMAA a mayores volúmenes purificándola por IMAC. A lo largo del proceso de purificación se tomaron muestras y se sometieron a SDS-PAGE (Fig. 19).

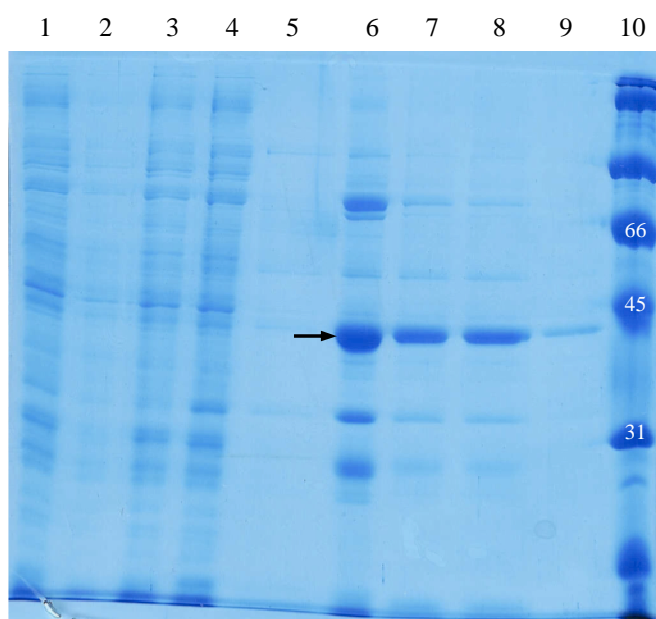


Fig. 19 Purificación de la proteína MMAA a partir de la expresión en 1 L de cultivo. La proteína de cada fracción se cuantificó y aproximadamente 10 μ g de cada una se cargó en los pozos del gel. Carril 1. Fracción soluble (lisado); Carril 2. Fracción insoluble (pastilla); Carril 3. Proteínas que no se unen a la columna (NB); Carril 4. Lavado 1 (amortiguador de lavado con 20 mM de imidazol); Carril 5. Lavado 5 (amortiguador de lavado con 50 mM de imidazol); Carril 6-8. Fracciones sucesivas de elución (con amortiguador 2X+200 mM imidazol); Carril 9. Lavado de la columna (250 mM imidazol); Carril 10. MPM Broad Range SDS (Bio-Rad).

Como podemos observar en la figura 19 (carriles 6-8) cuando se eluyó con 200 mM de imidazol se obtuvo una banda mayoritaria de aproximadamente 42 KDa que coincide con la masa molecular esperada para MMAA, aunque en esta fracción también están presentes algunas proteínas de mayor y menor peso.

8.4 RECONOCIMIENTO DE MMAA POR WESTERN BLOT

Para corroborar que la banda de 42 KDa obtenida corresponde a MMAA se llevó a cabo el reconocimiento de la proteína por Western blot utilizando un anticuerpo dirigido contra la bandera de histidinas (Fig. 20).

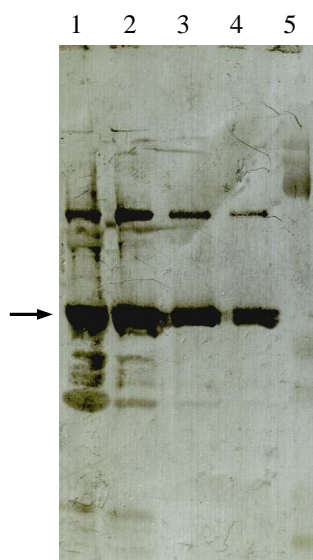


Fig. 20 Western blot de la proteína MMAA.
 El ensayo se realizó empleando el anticuerpo anti-HisG-AP el cual está dirigido contra la cola de histidinas de la proteína. La coloración se desarrolló utilizando el sistema de sustratos *BCIP/NBT*.
 Carril 1-4. Fracciones sucesivas de la elución; Carril 5. MPM Kaleidoscope Prestained (BioRad).

Los resultados confirmaron que la banda de 42 KDa corresponde a la proteína MMAA (Fig. 20 señalada con una flecha), sin embargo las proteínas que co-eluyen en estas fracciones también fueron reconocidas por el anticuerpo. A partir de estos resultados puede inferirse que probablemente las bandas de menor peso corresponden a la proteína degradada durante la purificación debido a su alta inestabilidad y las de mayor peso podrían ser aglomeraciones de la misma. Esto mismo ha sido observado durante la purificación de ortólogos bacterianos de la proteína MMAA, las cuales precipitan en extractos puros y semi-puros [17].

8.5 EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA MCM

8.5.1 PRUEBAS PILOTO DE EXPRESIÓN

La construcción pMCM-2 codifica para la proteína MCM sin región líder la cual es traducida con una bandera de 6 histidinas en el extremo amino terminal cuando ésta es transformada en cepas de expresión de *E. coli* BL21(DE3). De igual manera que con MMAA, se realizaron pruebas piloto de expresión para lograr la mayor producción de proteína posible. Para iniciar, se mantuvieron fijos los parámetros de tiempo de incubación (22 horas después de inducir) y LB como medio de cultivo; además se probaron diferentes concentraciones de IPTG y distintas temperaturas de incubación del cultivo inducido. La expresión de la proteína se analizó por SDS-PAGE en extractos libres de células, tanto en la fracción soluble como en la insoluble (Fig. 21).

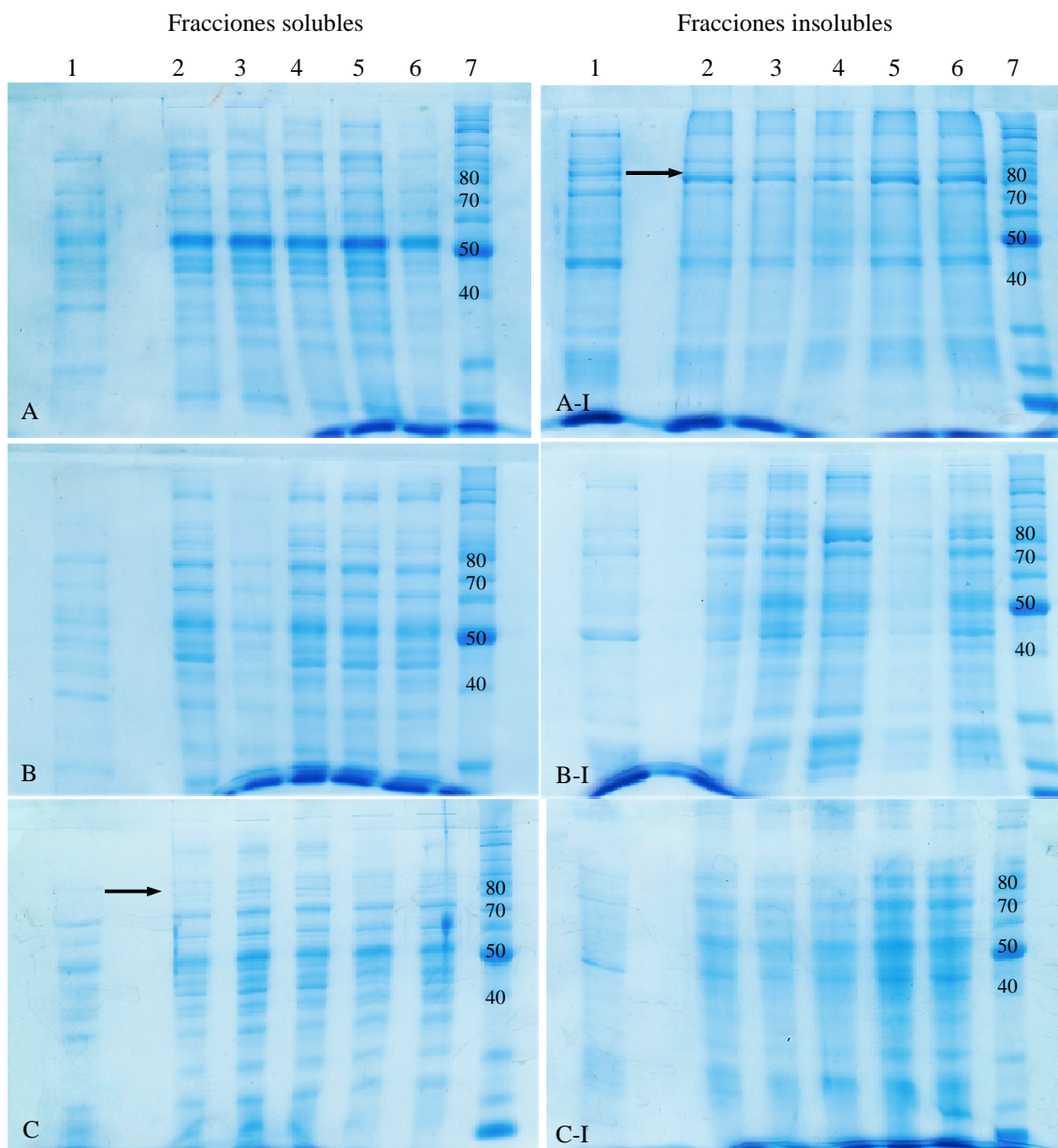


Fig. 21 Expresión de la proteína MCM en las fracciones solubles e insolubles de lisados obtenidos a partir de células de *E. coli* BL21(DE3)pLysS.

La cepa *E. coli* BL21(DE3)pLysS transformada con el plásmido pMCM-2 se creció en medio LB el cual se indujo con distintas concentraciones de IPTG durante 22 horas a diferentes temperaturas. 10 μ g de proteína se cargaron en cada carril.

- A. Incubación a 37°C, fracciones solubles: Carril 1. To; Carril 2. Inducido con 0.1 mM IPTG; Carril 3. Inducido con 0.25 mM IPTG; Carril 4. Inducido con 0.5 mM IPTG; Carril 5. Inducido con 0.75 mM IPTG; Carril 6. Inducido con 1 mM IPTG; Carril 7. MPM Benchmark (Invitrogen).
- A-I. Incubación a 37°C, fracciones insolubles, mismo orden que en panel A.
- B. Incubación a 22°C, fracciones solubles: Carril 1. To; Carril 2. Inducido con 0.1 mM IPTG; Carril 3. Inducido con 0.25 mM IPTG; Carril 4. Inducido con 0.5 mM IPTG; Carril 5. Inducido con 0.75 mM IPTG; Carril 6. Inducido con 1 mM IPTG; Carril 7. MPM Benchmark (Invitrogen).
- B-I. Incubación a 22°C, fracciones insolubles, mismo orden que en panel B.
- C. Incubación a 37°C, fracciones solubles: Carril 1. To; Carril 2. Inducido con 0.1 mM IPTG; Carril 3. Inducido con 0.25 mM IPTG; Carril 4. Inducido con 0.5 mM IPTG; Carril 5. Inducido con 0.75 mM IPTG; Carril 6. Inducido con 1 mM IPTG; Carril 7. MPM Benchmark (Invitrogen).
- C-I. Incubación a 19°C, fracciones insolubles, mismo orden que en panel C.

Los resultados mostraron que la mayor cantidad de proteína MCM se expresa a 37°C sin embargo, se encuentra en la fracción insoluble (Fig. 21A-I, señalada con una flecha). Se ha reportado que cuando las proteínas se van a cuerpos de inclusión o a la fracción insoluble, una estrategia para mejorar la solubilidad es disminuir la temperatura de incubación [54]. Cuando la temperatura de inducción se bajó a 19°C se obtuvo una mayor cantidad de MCM en la fracción soluble (Fig. 21C, señalada con una flecha). Por otro lado, no se encontraron diferencias en la expresión a distintas concentraciones de inductor, por lo que se mantuvo la empleada en otros casos (0.5 mM).

Además de las variables probadas, se llevó a cabo una prueba piloto de expresión utilizando las cepas *E. coli* BL21(DE3)Rosetta y *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL, pero los resultados mostraron que no hay diferencias notorias entre las cepas probadas por lo que se siguió utilizando *E. coli* BL21(DE3)pLysS (datos no mostrados).

Para obtener una mayor cantidad de proteína, se disminuyó aún más la temperatura (12°C) y se escaló el volumen de cultivo a 1 litro, empleando un reactor conectado a un enfriador. Las células cosechadas a partir de este cultivo se emplearon para purificar la proteína MCM por IMAC. En la figura 22 se muestra la electroforesis desnaturalizante de cada una de las fracciones de la purificación.

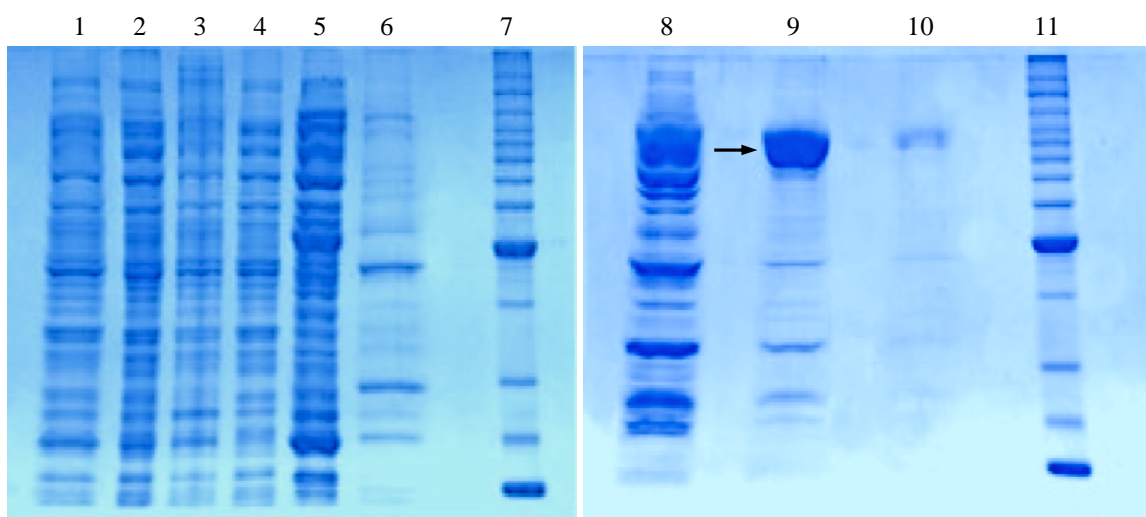


Fig. 22 Purificación de la proteína MCM a partir de la expresión en fermentador de 1 L de cultivo. 10 µg de proteína se cargaron en cada carril. Carril 1. To (ELC_{total} sin inducir); Carril 2. Fracción soluble (lisado); Carril 3. Fracción insoluble; Carril 4. Proteínas que no se unen a la columna (NB); Carril 5. Lavado 1 (amortiguador de lavado con 20 mM de imidazol); Carril 6. Lavado 4 (amortiguador de lavado con 20 mM de imidazol); Carril 7. MPM Benchmark (Invitrogen); Carril 8. Lavado 5 (amortiguador de lavado con 100 mM imidazol); Carril 9. Fracción de elución (150 mM imidazol); Carril 10. Lavado de la columna (250 mM imidazol); Carril 11. MPM Benchmark (Invitrogen).

8.6 RECONOCIMIENTO DE MCM POR WESTERN BLOT

Para confirmar que la proteína purificada de 82 KDa corresponde a la enzima MCM, una muestra de la elución obtenida con 150 mM de imidazol se sometió a Western blot utilizando un anticuerpo que reconoce la bandera de histidinas (Fig. 23).



Fig. 23 Western blot de la proteína MCM. El ensayo se realizó empleando el anticuerpo anti-HisG-AP el cual está dirigido contra la cola de histidinas de la proteína. La coloración se desarrolló utilizando el sistema de sustratos *BCIP/NBT*.

Los resultados corroboraron que tanto la banda principal de 82 KDa como las de menor peso corresponden a MCM y sus productos de degradación.

Una vez determinadas las condiciones de purificación y habiendo corroborado que la proteína obtenida es MCM, ésta se dializó y concentró a 2 mg/mL aproximadamente.

8.7 ACTIVIDAD DE GTPasa DE LA PROTEÍNA PURA MMAA

8.7.1 ESTANDARIZACIONES REALIZADAS

En la secuencia de aminoácidos de la proteína MMAA se han encontrado dominios que sugieren que tiene actividad de GTPasa [52]. Para demostrar dicha actividad fue necesario estandarizar el método de separación de GTP y GDP por TLC probando diferentes fases móviles y a diferentes pHs así como el número y el orden de los lavados de la placa con metanol. Los resultados mostraron que la mejor resolución de los compuestos se obtuvo empleando amortiguador Tb como fase móvil (0.75 M

Tris, 0.45 M HCl y 0.5 M LiCl) a pH 8, corriendo la placa de poli(etileno)imino)-celulosa durante 3 horas sin ningún lavado con metanol.

8.7.2 MEDICIÓN DE ACTIVIDAD DE GTPasa DE MMAA

Una vez obtenidas las condiciones de separación de GTP y GDP, se llevó a cabo la medición de la actividad empleando como sustrato [α - 32 P]GTP en presencia de MgCl₂. Como resultado de la actividad de GTPasa de la proteína MMAA se detectó un incremento en la concentración de GDP de manera dependiente del tiempo (Fig. 24).

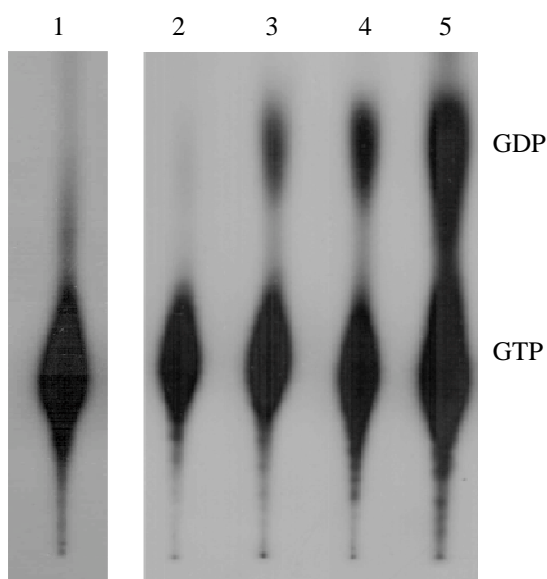


Fig. 24 Determinación de la actividad de GTPasa de la proteína MMAA. Carril 1. Control [α - 32 P]GTP incubado 60 min en ausencia de MMAA; Carril 2. Mezcla de reacción a los 0 min; Carril 3. Mezcla de reacción a los 15 min; Carril 4. Mezcla de reacción a los 30 min; Carril 5. Mezcla de reacción a los 60 min.

Banerjee y colaboradores reportaron que MeaB, una proteína homóloga a MMAA presente en *Methylobacterium extorquens* tiene actividad de GTPasa la cual aumenta casi 100 veces en presencia de la MCM bacteriana correspondiente [58]. Para explorar esta posibilidad, se llevó a cabo la medición de la actividad de MMAA en presencia de MCM humana en una proporción 1:1 a diferentes tiempos (Fig. 25A) y en presencia de MCM a distintas proporciones molares (Fig. 25B). Los resultados muestran que en las condiciones probadas no hay un incremento significativo en la actividad de GTPasa de MMAA inducido por la presencia de MCM.

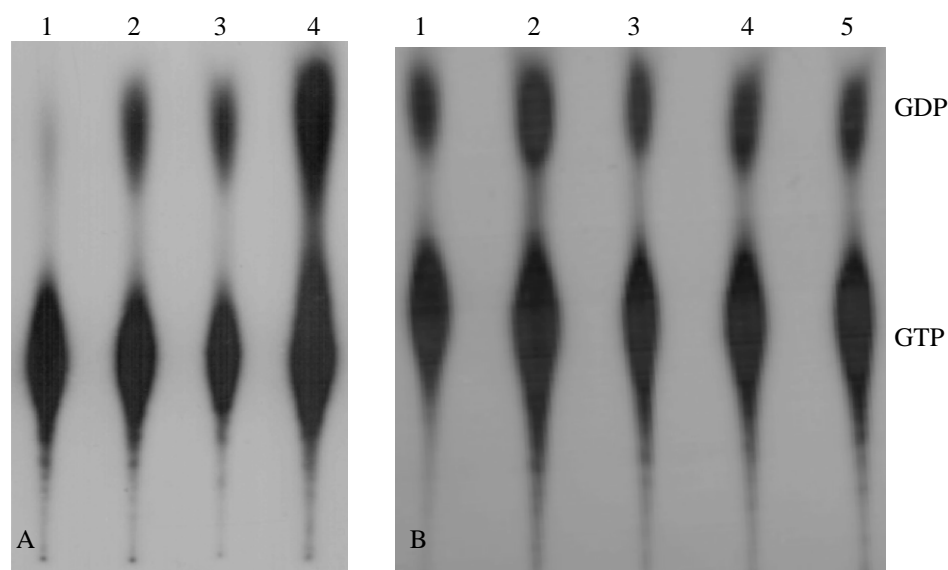


Fig. 25 Determinación de la actividad de GTPasa de MMAA en presencia de MCM.

- A. Cinética en presencia de MCM: Carril 1. Mezcla de reacción a los 0 min; Carril 2. Mezcla de reacción a los 15 min; Carril 3. Mezcla de reacción a los 30 min; Carril 4. Mezcla de reacción a los 60 min.
- B. A diferentes proporciones molares de MCM incubando durante 30 minutos: Carril 1. Solo MMAA; Carril 2. Radio molar 1:1 MMAA:MCM; Carril 3. Radio molar 1:2 MMAA:MCM; Carril 4. Radio molar 1:4 MMAA:MCM; Carril 5. Radio molar 1:8 MMAA:MCM.

8.8 ACTIVIDAD DE ISOMERASA DE MCM PURA

8.8.1 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA Y EFECTO DE MMAA A TIEMPOS CORTOS DE INCUBACIÓN

Con la finalidad de saber si la enzima MCM purificada tenía actividad, se llevó a cabo la medición de ésta cuantificando la disminución en la concentración del metilmalonil-CoA, debido a su conversión a succinil-CoA, después de la separación de ambos compuestos por HPLC. Los resultados mostraron que la proteína pura tuvo actividad de isomerización la cual aumentó rápidamente durante los primeros segundos y posteriormente declinó conforme aumentó el tiempo (Fig. 26). La actividad específica obtenida en estas condiciones fue de $21 \mu\text{moles mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ la cual es comparable con la reportada por Fenton y colaboradores [54] y mayor a las previamente reportadas en lisados de hígado y ELCs de fibroblastos de humanos [25 y 62].

Con la finalidad de ampliar la parte lineal de la gráfica por más tiempo, se realizaron mediciones de la actividad empleando concentraciones más bajas de proteína en la mezcla de reacción, sin embargo hubo un incremento en la desviación estándar de los valores por efecto de las diluciones, por lo que estos resultados no pudieron ser analizados confiablemente (datos no mostrados).

Para determinar si MMAA tiene un efecto en la actividad de MCM a tiempos cortos de reacción, se adicionó esta proteína a la mezcla de reacción (Fig. 26). Los resultados mostraron que no hay un efecto significativo de MMAA en la actividad de isomerización de MCM a tiempos cortos de reacción.

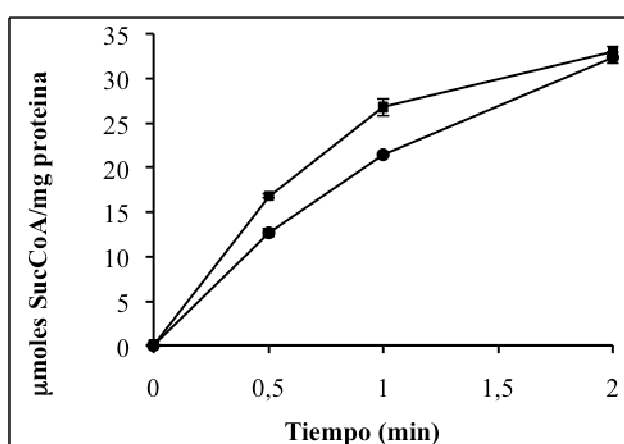


Fig. 26. Efecto de MMAA en la actividad de MCM pura a tiempos cortos de reacción. La reacción se llevó a cabo incubando a 37°C una mezcla que contenía 3.2 ng de MCM, 0.24 mM de MMCoA, 5 µM de AdoCbl en 200 mM Tris/100 mM de amortiguador fosfato pH 7.5, en un volumen total de 50 µL en ausencia (●) y presencia (■) de 6.4 ng de MMAA con GTP (1 mM) y MgCl₂ (1 mM).

8.8.2 ACTIVIDAD DE MCM A TIEMPOS PROLONGADOS DE INCUBACIÓN

En bacterias se ha demostrado que enzimas dependientes de vitamina B₁₂ sufren inactivación debido a formación de radicales altamente reactivos durante la catálisis, ya que el electrón no apareado es susceptible a oxidación, generándose un cofactor inactivo unido al dominio. En estos organismos se han identificado dos mecanismos por los cuales estas enzimas han resuelto este problema. Uno de ellos es la reactivación, efectuado por ATPasas denominadas factores reactivantes, las cuales logran eliminar el cofactor inactivo liberando el dominio y restaurando la actividad de la enzima [41-45]. El otro mecanismo descrito es preventivo es decir, impide o protege a la enzima de esta oxidación mediante la asociación de ésta con una GTPasa cuyo cambio estructural estabiliza a la enzima [48, 50].

En este sentido, para investigar la participación de MMAA como posible reactivasa o protectasa se adicionó a las mezclas de reacción en presencia de GTP ó GMPPNP, el cual es un análogo no hidrolizable usado para definir si la hidrólisis de GTP interviene en el efecto observado. Los resultados mostraron que en ausencia de MMAA la actividad de MCM disminuye progresivamente probablemente debido a su inactivación (Fig. 27A). Cuando MMAA-GTP es agregada desde un inicio en la mezcla se observó un incremento del 60% en la actividad de la enzima comparada con la actividad obtenida en ausencia de ésta. Este efecto también es observado en presencia de MMAA-GMPPNP, lo cual demuestra que para obtener este incremento en la actividad la hidrólisis de GTP no es indispensable (Fig. 27A). Cuando MMAA-GTP es agregada a los 60 minutos de reacción, una vez que la enzima MCM ha sido inactivada, se observó un efecto restaurador de la actividad la cual fue recuperada aproximándose incluso a los mismos valores que los obtenidos en la reacción en la cual MMAA-GTP es agregada desde un inicio. Este mismo ensayo se realizó con MMAA sola y con MMAA-GMPPNP sin embargo no se obtuvo la restauración de la actividad enzimática indicando que la hidrólisis de GTP es necesaria (Fig 27B).

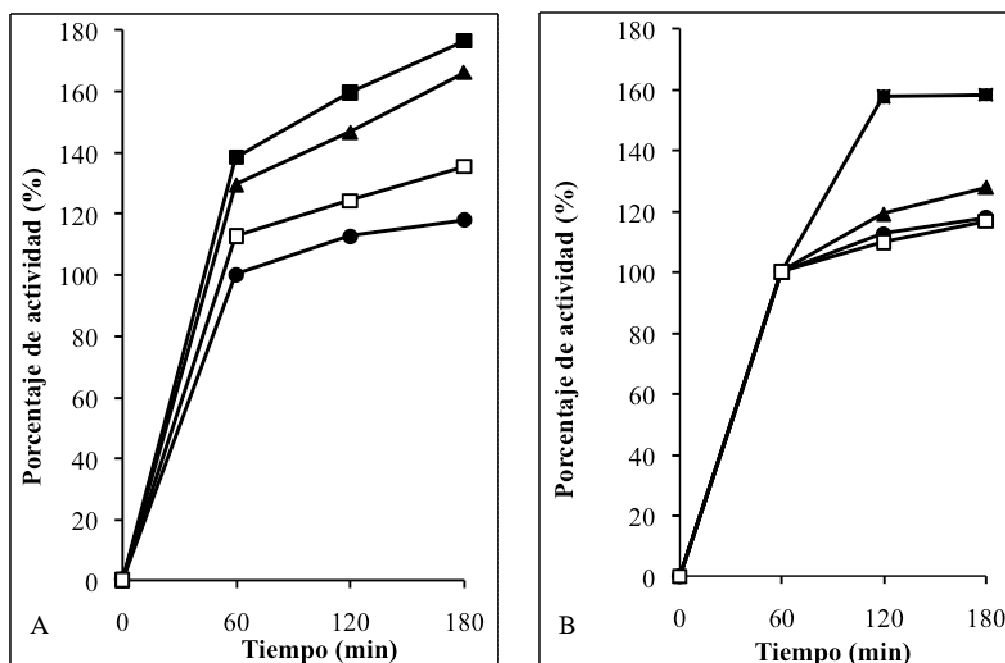


Fig. 27 Efecto de la adición de MMAA en la actividad de MCM en tiempos prolongados de incubación. Panel A: Una mezcla de reacción que contenía 6.2 ng de MCM, 0.24 mM MMCoA y 5 μ M de AdoCbl en 200 mM Tris/100 mM de amortiguador fosfato, pH 7.5 en un volumen total de 50 μ L fue incubada a 37°C en ausencia (●) y presencia de 12.5 ng de MMAA sola (□) o con GTP+MgCl₂ (■) o GMPPNP+MgCl₂ (▲) adicionada al inicio de la reacción. Panel B: El ensayo fue realizado de la misma manera que en panel A pero en ausencia (●) y presencia de MMAA sola (□) o con GTP+MgCl₂ (■) o GMPPNP+MgCl₂ (▲) adicionada a los 60 minutos de haber iniciado la reacción.

8.9 INTERACCIÓN ENTRE LAS PROTEÍNAS MMAA Y MCM POR ENSAYO DE DOBLE HÍBRIDO

Los resultados realizados *in vitro* mostraron que existe una influencia de MMAA sobre la actividad de MCM para la cual la interacción entre ambas proteínas es ineludible, sin embargo era fundamental comprobar que ésta realmente sucede en un contexto fisiológico. Una aproximación ampliamente utilizada para observar interacciones *in vivo* entre dos proteínas es mediante un ensayo de doble híbrido en levadura.

8.9.1 CLONACIÓN DE MMAA EN EL VECTOR pGADT7-AD

La clonación del gen *MMAA* se realizó por amplificación del cDNA a partir del plásmido p-MMAAw1-1, el cual contiene la secuencia sin región líder (1,062 pb). Los iniciadores utilizados para este fin fueron MMAADH-F y MMAADH-R que insertan los sitios de restricción *EcoRI* y *XhoI* al inicio y final del gen respectivamente (Tabla 6). El amplicón obtenido fue del tamaño esperado (Fig. 28A), el cual posteriormente se digirió con las enzimas *EcoRI* y *XhoI* junto con el plásmido pGADT7-AD (Fig. 28B).

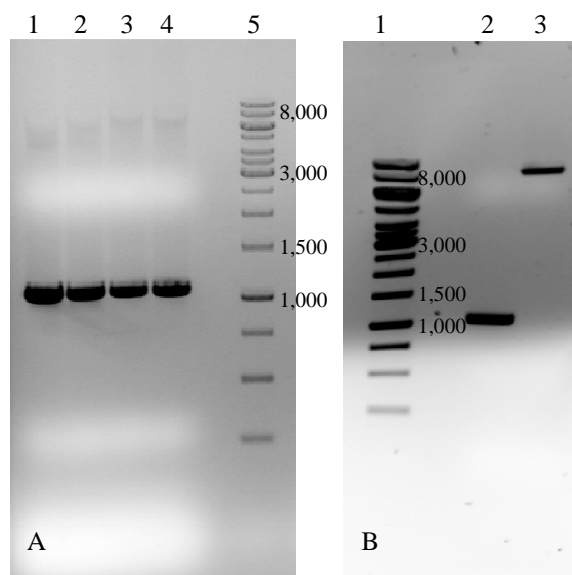


Fig. 28 Amplificación del gen *MMAA* y digestión del amplicón y del plásmido pGADT7-AD con las enzimas *EcoRI/XhoI*.

- A. Carril 1-4. Amplicón obtenido (1,062 pb); Carril 5. MPM 1Kb (O'GeneRuler Fermentas).
B. Carril 1. MPM 1Kb (O'GeneRuler Fermentas); Carril 2. Amplicón digerido con *EcoRI/XhoI*; Carril 3. pGADT7-AD digerido con *EcoRI/XhoI*.

Los fragmentos purificados se ligaron y los plásmidos de dos colonias positivas se purificaron y nombraron como pGAD-MMAA-1 y 2. En la figura 29 se muestran los resultados de la digestión con *EcoRI* y *XhoI* de cada plásmido para verificar la presencia del inserto.

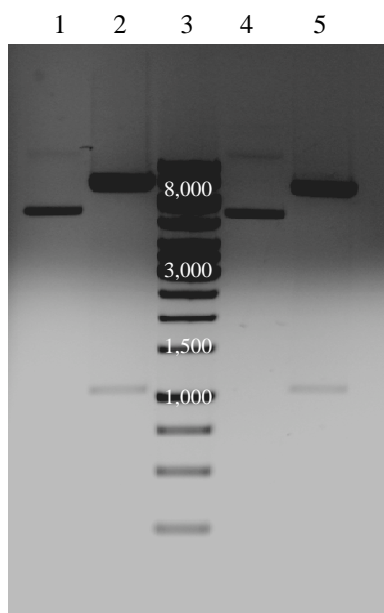


Fig. 29 Purificación de los plásmidos pGAD-MMAA 1 y 2 y digestión con las enzimas *EcoRI/XhoI*.

Carril 1. pGAD-MMAA-1 sin digerir; Carril 2. pGAD-MMAA-1 digerido con *EcoRI/XhoI*; Carril 3. MPM 1 Kb (O'GeneRuler Fermentas); Carril 4. pGAD-MMAA-2 sin digerir; Carril 5. pGAD-MMAA-2 digerido con *EcoRI/XhoI*.

8.9.2 CLONACIÓN DE *MUT* EN EL VECTOR pGBKT7

Para realizar la clonación del gen *MUT* fue necesario amplificarlo a partir del plásmido pMCM-2, el cual contiene el cDNA sin secuencia líder (2,154 pb). Los iniciadores diseñados para este fin fueron MutDH-For y MutDH-Rev que insertan los sitios de restricción para las enzimas *NcoI* y *PstI* al inicio y final del gen respectivamente y eliminan la secuencia líder mitocondrial (Tabla 6). En la figura 30A se muestra que el producto de PCR fue del tamaño esperado; posteriormente el amplicón se digirió con las enzimas de restricción *NcoI* y *PstI*, junto con el plásmido pGBKT7 para someterse a ligación (Fig. 30B).

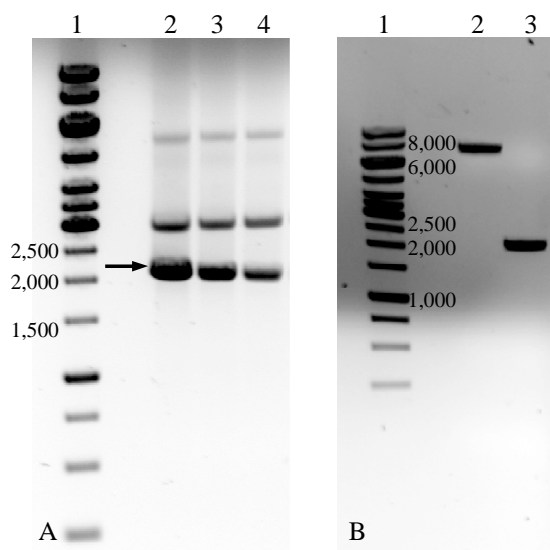


Fig. 30 Amplificación del gen *MUT* y digestión del amplicón y del plásmido pGBKT7 con las enzimas *NcoI/PstI*.

- A. Amplificación de *MUT*: Carril 1. MPM 1Kb (O'GeneRuler Fermentas); Carril 2-4. Amplicón obtenido (2,154 pb).
- B. Digestiones con *NcoI/PstI* purificadas del gel: Carril 1. MPM 1Kb (O'GeneRuler Fermentas); Carril 2. pGBKT7 digerido con *EcoRI/XhoI*; Carril 4. Amplicón digerido con *EcoRI/XhoI*.

La mezcla de ligación se utilizó para transformar células competentes de la cepa de propagación *E. coli* TOP10F'. Los plásmidos de 3 clonas positivas se purificaron, se nombraron como pGBKT7-MCM-1 y 2 y se digirieron con las enzimas *SacI* y *NcoI* para verificar la presencia del inserto de 2,154 pb correspondiente al gen *MUT* (Fig. 31).

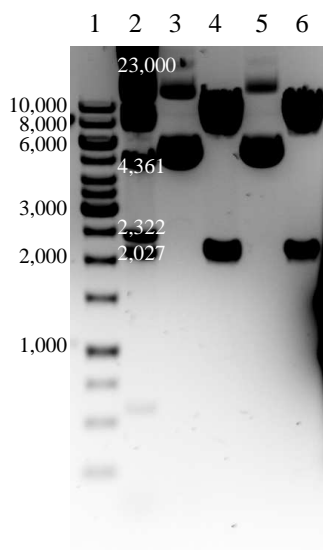


Fig. 31 Purificación de los plásmidos pGBKT7-MCM-1 y 2 y digestión con las enzimas *NcoI/PstI*.

- Carril 1. MPM 1 Kb (O'GeneRuler Fermentas); Carril 2. MPM λ -*HindIII* (Promega); Carril 3. pGBKT7-MCM-1 sin digerir; Carril 4. pGBKT7-MCM-1 digerido con *NcoI/PstI*; Carril 5. pGBKT7-MCM-2 sin digerir; Carril 6. pGBKT7-MCM-2 digerido con *NcoI/PstI*.

8.9.3 INTERACCIÓN MMAA-MCM A TRAVÉS DEL ENSAYO DE DOBLE HÍBRIDO EN LEVADURA

El ensayo de doble híbrido empleado es un sistema basado en la proteína GAL4. La proteína conocida como “anzuelo” es expresada como una fusión al dominio de unión a DNA (DNA-BD) de la proteína Gal4 a partir de un gen clonado en el plásmido pGBKT7. Por otro lado, la proteína conocida como “presa” es expresada como una fusión con el dominio de activación (AD) de Gal4 a partir de un gen clonado en el plásmido pGADT7. Cuando las proteínas fusionadas “anzuelo-presa” interactúan, el DNA-BD y AD son aproximados permitiendo la activación de la transcripción de cuatro genes reporteros independientes (Fig. 32)

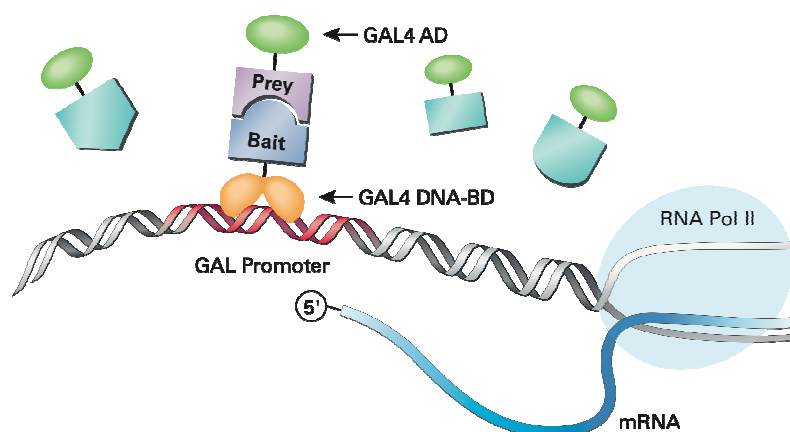


Fig. 32 Principio del ensayo de doble híbrido.

Las dos proteínas son expresadas separadamente, una (anzuelo) fusionada al dominio de unión a DNA de Gal4 (BD) y la otra (presa) al dominio activador (AD). En la cepa Y2HGold la activación de los genes reporteros solo ocurre en las células con proteínas que interactúan y se unen a los promotores respondedores a Gal4. Tomado del manual de usuario del sistema Matchmaker Gold Yeast Two-Hybrid (Clontech).

Los 4 genes reporteros confieren características distintas a las células:

- 1) *AUR1-C*: Al ser expresado otorga resistencia al antibiótico aureobasidina A.
- 2) *ADE2*: Permite el crecimiento de las células en medio mínimo en ausencia de adenina (SD/-Ade).
- 3) *HIS3*: Permite el crecimiento de las células en medio mínimo en ausencia de histidina (SD/-His).
- 4) *MEL1*: Codifica para la proteína α -galactosidasa la cual degrada el compuesto X- α -gal generando una coloración azul en colonias crecidas en presencia de este sustrato.

Una vez clonados los cDNAs correspondientes a *MMAA* y *MUT*, los plásmidos pGADT7-MMAA-1 y pGBKT7-MCM-1 se co-transformaron en la cepa de levadura Y2HGold del sistema de doble híbrido para verificar la interacción entre las proteínas. Para validar los resultados obtenidos, se realizaron los siguientes experimentos control:

1. Control positivo: Co-transformación de los plásmidos pGBKT7-53 y pGADT7-T, los cuales codifican para las proteínas p53 (epítipo) y antígeno-T cuya interacción ha sido demostrada.
2. Control negativo: Co-transformación del plásmido pGBKT7-Lam y pGADT7-T, los cuales codifican para lamina y antígeno-T respectivamente, de las cuales se sabe que no interactúan.
3. Control de auto-activación: Co-transformación de los plásmidos vacíos pGBKT7 y pGADT7 para corroborar que éstos no generen la activación de los reporteros del sistema.
4. Control de activación inespecífica debida a MMAA: Co-transformación de los plásmidos pGBKT7 (vacío) y pGADT7-MMAA-1 para corroborar que MMAA no active por si misma la transcripción de los genes reporteros.
5. Control de activación inespecífica debida a MCM: Co-transformación de los plásmidos pGBKT7-MCM-1 y pGADT7 (vacío) para corroborar que la presencia de MCM no active a los reporteros del sistema.

Los medios selectivos empleados en el escrutinio de cada uno de los experimentos realizados se encuentran resumidos en la tabla 7 junto con el fenotipo esperado en cada caso.

Los resultados muestran que las colonias que contenían los plásmidos pGBKT7-MCM-1 y pGADT7-MMAA-1 desarrollan una coloración azul intenso en el medio de selección SD-Trp-Leu+X- α -Gal debido a la interacción entre las proteínas MMAA y MCM (Fig. 33A, número 6).

En la misma figura puede observarse la presencia de un azul pálido en los controles cuyo fenotipo debería ser blanco (Fig. 33A número 2, 3 y 4); esta coloración es debida a una activación inespecífica del sistema, sin embargo cuando se resembró en condiciones más estrictas (medio SD -Trp-Leu-Ade-His + X- α -Gal + AbA) estos controles no crecieron (resultado esperado) mientras que la interacción MMAA-MCM se confirmó (Fig. 33B).

Experimento	Plásmido 1 (DNA-BD)	Plásmido 2 (AD)	Medio de selección inicial (SD)	Fenotipo (en medio SD-Trp-Leu+X- α -Gal)	Prueba en medio QDO/X/A - (No crece) + (Crece)
(1) Control positivo	pGBKT7-53	pGADT7-T	-Trp -Leu	Azul	+
(2) Control negativo	pGBKT7-Lam	pGADT7-T	-Trp -Leu	Blanca	-
(3) Control de auto-activación	pGBKT7	pGADT7	-Trp -Leu	Blanca	-
(4) Control de activación inespecífica debida a MMAA	pGBKT7	pGADT7-MMAA-1	-Trp -Leu	Blanca	-
(5) Control de activación inespecífica debida a MCM	pGBKT7-MCM-1	pGADT7	-Trp -Leu	Blanca	-
(6) Interacción MMAA-Mut	pGBKT7-MCM-1	pGADT7-MMAA-1	-Trp -Leu	Azul	+

Tabla 7. Fenotipos esperados y medios selectivos empleados en el escrutinio de los experimentos de doble híbrido.

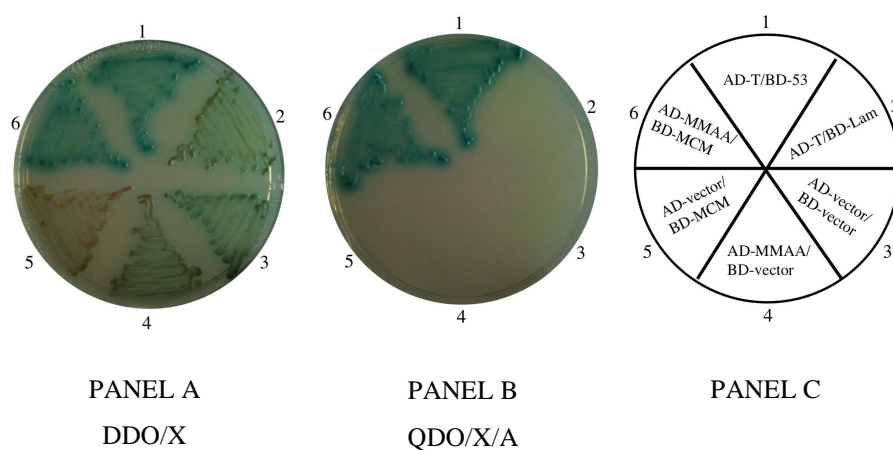


Fig. 33 Interacción de las proteínas MMAA y MCM por ensayo de doble híbrido en levadura.

Panel A. Crecimiento en SD-Trp-Leu + X- α -Gal, de cada uno de los experimentos elaborados (numerados del 1 al 6 de acuerdo al esquema del panel C). Panel B. Crecimiento en SD -Trp-Leu-Ade-His + X- α -Gal + AbA, de cada uno de los experimentos elaborados (numerados del 1 al 6). Panel C. Esquema del orden en el cual se realizó la resiembra de los experimentos.

9 DISCUSIÓN

El interés en el estudio de la proteína MCM y de otras enzimas involucradas en el metabolismo de vitamina B₁₂ aumentó drásticamente debido a la aparición de los primeros reportes de AMM en humanos. Las primeras investigaciones en las que se realizó la caracterización de la MCM empleó órganos como fuente de origen, tales como el corazón, riñón e hígado de animales [21, 22]. A partir de los homogenados de estos tejidos la enzima se purificaba mediante una serie de pasos exhaustivos que podrían incluso ser perjudiciales para los análisis posteriores debido al riesgo de pérdida de actividad de la enzima. En 1979 se realizó el primer estudio extensivo de MCM en extractos de fibroblastos humanos normales y de pacientes con AMM. La medición de la actividad de MCM se empleó para caracterizar la naturaleza bioquímica del padecimiento, permitiendo hacer una separación entre los fenotipos *mut⁻* y *mut⁰* [62]. En 1980 se purificó MCM a partir de 2.5 kg de placenta humana y se describió como un homodímero de 72 KDa por subunidad y 2 moles de AdoCbl por dímero [24], posteriormente se purificó también de hígado de humano [25]. La clonación del cDNA correspondiente al gen *MUT* se llevó a cabo por primera vez a partir de la construcción de una biblioteca de cDNAs de hígado de humano permitiendo la descripción de su secuencia de nucleótidos y aminoácidos [27, 28]. La realización de estudios detallados de la biología y la bioquímica de mutantes causantes de AMM estuvo detenida durante mucho tiempo debido a la carencia de un sistema de expresión eficiente, ya que la purificación a partir de fibroblastos o la expresión en sistemas de levadura resultaban muy complejos y de baja eficiencia. Fue hasta 1997 cuando Fenton y colaboradores reportaron la clonación y expresión de MCM en *E. coli*, utilizando como fuente el cDNA obtenido de hígado de humano [54].

Para cumplir con el objetivo de este trabajo fue necesario medir la actividad de la enzima MCM humana por lo que se expresó y purificó la proteína para lo cual se empleó un sistema de expresión heteróloga en *E. coli* basado en lo previamente reportado por Fenton. Uno de los principales inconvenientes al expresar proteínas heterólogas es el mal plegamiento que puede dar lugar a su precipitación en cuerpos de inclusión, este hecho se observó cuando MCM fue expresada a 37°C. Para sobrellevar este problema la temperatura se disminuyó a 12°C ya que se ha reportado que una

disminución de la temperatura permite el plegamiento apropiado de las proteínas [57, 64].

Después de una serie de estandarizaciones, una proteína de 82 KDa se purificó y los ensayos de Western blot confirmaron que era MCM. La actividad de ésta se midió empleando un método directo de cuantificación por HPLC, midiendo la desaparición de MMCoA debido a su conversión a SucCoA. Bajo las condiciones probadas la proteína MCM tiene una actividad de $21 \mu\text{moles mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$. Anteriormente se ha descrito la actividad específica de esta enzima en varios organismos encontrándose una amplia discrepancia entre los valores. Un ejemplo de ello es el valor obtenido de MCM de fuentes bacterianas, los cuales van desde $9\text{-}12 \mu\text{moles mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ reportada en *P. freudenreichii* [65] hasta $50 \text{ mmoles mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ reportada en *M. extorquens* [66]. En eucariontes esta inconsistencia en las actividades reportadas también es notoria, encontrando valores en el organismo marino *Schizochytrium limacinum* SR21 con una actividad de $76 \text{ mmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ el cual es muy elevado comparado con el reportado en bacterias [67]. En cuanto a la MCM humana, se ha medido actividad en extractos de fibroblastos y linfocitos [68], los cuales son valores relativamente bajos comparados con los obtenidos en este trabajo y se aproximan más a los obtenidos por Fenton quien empleó un sistema similar [54]. La actividad reportada de MCM en este trabajo es mayor a la obtenida en hígado de humano ($14 \mu\text{moles mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$) [25] pero mucho menor al compararlo con el valor obtenido de la expresión heteróloga en levadura ($67 \mu\text{moles mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$) [69]. Estas inconsistencias pueden ser debidas al empleo de diferentes métodos de detección de la actividad siendo el más utilizado pero menos preciso el radiométrico que involucra el marcaje radiactivo del sustrato, que al ser un método indirecto puede tener valores sobre o subestimados comparado con los obtenidos mediante un método directo como el de HPLC cuyos resultados son mucho más precisos.

Hemos mencionado que el uso de radicales para efectuar las reacciones de isomerización puede llevar a la inactivación de la enzima debido a su alta reactividad. Este hecho ha sido demostrado en varios miembros de la subfamilia e incluso en la MCM bacteriana [50]. También se han descrito dos mecanismos principales mediante los cuales las enzimas que llevan a cabo catálisis enzimática empleando radicales pueden prevenir la inactivación por mecanismos de protección o recuperar su actividad por reactivación, en ambos casos involucrando la actividad de chaperonas. Nuestros

resultados demostraron que MCM humana sufre inactivación durante la catálisis, la cual se ve reflejada en una clara disminución en la actividad. Una vez demostrado que MCM humana sufre inactivación durante la catálisis, la presencia de un mecanismo de protección o reactivación realizado por una proteína accesoria era presumible. El que la presencia de mutaciones en el gen *MMAA* generen acidemia metilmalónica [52], indica que la proteína MMAA juega un papel importante en la conversión de metilmalonil-CoA a succinil-CoA. Además, se ha demostrado que su contraparte bacteriana, MeaB, se asocia con MCM participando como metalochaperona impidiendo la inactivación de la enzima durante la catálisis.

Para elucidar la función de MMAA en este aspecto, se llevó a cabo la clonación del cDNA de humano correspondiente al gen *MMAA* para posteriormente expresar y purificar la proteína. Después de una serie de estandarizaciones, MMAA pudo ser purificada a partir de extractos libres de células de la bacteria *E. coli* lo cual se confirmó mediante los ensayos de Western blot. La presencia de otras bandas que co-eluyen con la banda principal de MMAA revela la inestabilidad de esta proteína como ha sido observado en sus homólogos bacterianos MeaB y YgfD [48, 17]. MMAA fue clasificada como miembro de la familia G3E de GTPasas P-loop con una alta identidad en secuencia con sus ortólogos bacterianos conservando todos los motivos característicos, sin embargo nunca antes había sido purificada ni tampoco medida su actividad de GTPasa. Para demostrar el funcionamiento de MMAA como GTPasa se hicieron ensayos de TLC los cuales mostraron que la proteína recombinante (sin la probable secuencia líder) fue activa en presencia de GTP y Mg^{2+} , sin embargo la actividad se considera relativamente baja siendo ésta una de las características presentadas por los miembros de la familia y previamente descrita para UreG, HypB y CobW [58], y observado también en los ortólogos bacterianos MeaB y YgfD [17, 48]. Se ha descrito también que la proteína MeaB de *M. extorquens* tiene un aumento de actividad aproximadamente en 100 veces en presencia de MCM [58], sin embargo los ensayos realizados en presencia de MCM a diferentes proporciones molares y a distintos tiempos no mostraron un incremento en la actividad de GTPasa de la proteína MMAA bajo las condiciones probadas.

Para indagar sobre la posible participación de MMAA como factor reactivante o protector de la actividad de MCM se llevó a cabo la cuantificación de la actividad de MCM en ausencia y presencia de MMAA en diferentes condiciones. Para los ensayos de protección de la actividad se adicionó a la mezcla de reacción de MCM al tiempo

cero MMAA+GTP ó MMAA+GMPPNP, el cual es un análogo no hidrolizable que permitió evaluar si los efectos observados son dependientes de la hidrólisis de nucleótido. Los resultados muestran un incremento del 60% en la actividad comparada con la obtenida en ausencia de MMAA, en ambos casos, lo cual sugiere un mecanismo de protección debido a que es independiente de la hidrólisis de GTP. Estos resultados son similares a aquellos reportados por Korotkova y Lindstrom quienes encontraron que la adición de MeaB incrementa la actividad de MCM considerablemente la cual aparentemente no está involucrada en la liberación del cofactor [48].

También fueron llevados a cabo ensayos utilizando a la enzima MCM inactiva, dejando correr la reacción durante 60 minutos previo a la adición de MMAA. Los resultados mostraron que cuando la enzima MCM ha perdido su actividad y se agrega MMAA-GTP, la actividad es reestablecida. Por el contrario, cuando se agregó MMAA-GMPPNP el efecto positivo de MMAA en la actividad de MCM no se observó indicando que en estas circunstancias el efecto de re-establecimiento de la actividad si es dependiente de la hidrólisis. Estos datos concuerdan con aquellos obtenidos para las enzimas diol y glicerol deshidratasa quienes mostraron ser reactivadas por sus factores reactivantes a través del intercambio del cofactor dañado unido a la enzima de manera dependiente de hidrólisis de ATP [41-45].

El sistema de doble híbrido en levadura ha sido ampliamente utilizado para la demostración de asociaciones entre proteínas humanas siendo relativamente fácil de adaptar y de gran versatilidad ya que puede ser empleado tanto para el estudio de interactomas en organismos modelo y la búsqueda de interacciones novedosas mediante el escrutinio de bibliotecas genómicas [70, 71], como para demostrar interacción entre dos proteínas de las cuales se sospecha su asociación, asunto de este trabajo. A pesar de que la interacción entre las enzimas MMAA y MCM es inferida a partir de los datos enzimáticos obtenidos *in vitro*, fue necesaria la confirmación de la interacción en un contexto fisiológico. En este sentido se llevó a cabo un ensayo de doble híbrido en levadura el cual confirmó la interacción entre estas dos proteínas.

Los resultados obtenidos demuestran la formación de un complejo entre ambas proteínas y sugieren la implicación de MMAA en dos importantes papeles, como “protectasa” y como “reactivasa” de la enzima MCM. Hasta el momento se han descrito aproximadamente 30 mutaciones en el gen *MMAA*, las cuales generan principalmente codones de paro prematuros o cambios en el marco de lectura causando AMM. Los pacientes con estas mutaciones presentan crisis convulsivas por acidosis y, en algunos

casos, son respondedores al tratamiento con altas concentraciones de vitamina B₁₂ [32]. El papel de MMAA como “protectasa” o “reactivasa” de la enzima MCM explica parcialmente la existencia del fenotipo *cblA*, ya que las mutaciones en este gen probablemente abaten el mecanismo protector o reactivador de la enzima y en consecuencia podría generarse la acumulación de MCM inactiva, sin embargo aún es preciso ahondar en este aspecto para establecer la contribución de MMAA en esta dinámica de inactivación a nivel fisiológico, lo cual brindaría un panorama más completo contribuyendo al entendimiento de las inconsistencias y variaciones en la respuesta de los pacientes al tratamiento.

10 CONCLUSIONES

Se lograron obtener los cDNAs correspondientes a los genes *MUT* y *MMAA* a partir de muestras de RNA total de leucocitos de sangre humana.

A partir de los plásmidos que contenían los cDNAs de los genes *MUT* y *MMAA* se llevó a cabo la expresión de las proteínas humanas correspondientes empleando distintas cepas de expresión de la bacteria *E. coli*.

Utilizando extractos de las cepas de *E. coli* se lograron purificar las proteínas *MMAA* y *MCM* humanas las cuales se identificaron mediante ensayos de Western blot.

Se demostró la actividad de GTPasa de la proteína *MMAA* mediante ensayos de TLC y se midió la actividad de *MCM* utilizando un método directo detectando los productos de la isomerización por HPLC.

Los resultados de la actividad de *MCM* mostraron que sufre inactivación durante la catálisis. En presencia de *MMAA* la actividad de la proteína *MCM* es mantenida o recuperada de manera independiente y dependiente de la hidrólisis de GTP respectivamente por lo que se demostró que *MMAA* es una chaperona que protege y reactiva a la proteína *MCM*.

Se comprobó por primera vez la interacción entre *MCM* y *MMAA* humanas tanto *in vitro* como *in vivo*.

11 BIBLIOGRAFÍA

- [1] Sinclair, L. (2007) Recognising, treating and understanding pernicious anaemia. JLL Bulletin: Commentaries on the history of treatment evaluation (www.jameslindlibrary.org).
- [2] Minot, M. and Murphy, W. (1926) Treatment of pernicious anemia by a special diet. JAMA. 87: 470-418.
- [3] Hodgkin, D., Kramper, J., Mackay, M., Pickworth, J., Trueblood, K. and White, J. (1956) Structure of Vitamin B₁₂. Nature. 178: 64.
- [4] Barker, H., Weissbach, H. and Smyth, R. (1958) A coenzyme containing pseudovitamin B₁₂. Proc. Natl. Acad. Sci. 44: 1093-1097.
- [5] Guest, J., Friedman, S., Woods, D. and Smith, E. (1962) A methyl analogue of cobamide coenzyme in relation to methionine synthesis by bacteria. Nature. 195: 340-342.
- [6] Kräutler, B., Fieber, W., Ostermann, S., Fasching, M., Ongania, K., Gruber, K., Kratky, C. And Mikl, C. (2003) The cofactor of tetrachloroethene reductive dehalogenase of *Dehalospirillum multivorans* is norpseudob₁₂, a new type of a natural corrinoid. Helv. Chim. Acta. 86: 3698-3716.
- [7] Kräutler, B. (2005) Vitamin B₁₂: Chemistry and biochemistry. Bioch. Soc. Trans. 33: 806-810.
- [8] Mohamed, H., Zou, X., Banka, R., Brown, K. and Eldik, R. (2005) Kinetic and thermodynamic studies on ligand substitution reactions and base-on/base-off equilibria of cyanoimidazolylcobamide, a vitamin B₁₂ analog with an imidazole axial nucleoside. Dalton trans. 21: 782-787.
- [9] Toraya, T. (2000) Radical catalysis of B₁₂ enzymes: structure, mechanism, inactivation, and reactivation of diol and glycerol dehydratases. Cell. Mol. Life Sci. 57: 106-127.
- [10] Toraya, T. (2003) Radical catalysis in coenzyme B₁₂-dependent isomerization (eliminating) reactions. Chem. Rev. 103: 2095-2127.
- [11] Masuda, J., Shibata, N., Morimoto, Y., Toraya, T. and Yasuoka, N. (2000) How a protein generates a catalytic radical from coenzyme B₁₂: X-ray structure of a diol-dehydratase-adeninylpentylcobalamin complex. Structure. 8: 775-788.

- [12] Francalanci, F., Davis, N., Fuller, J., Murfitt, D. and Leadlay, F. (1986) The subunit structure of methylmalonyl-CoA mutase from *Propionibacterium shermanii*. *Biochem.* 236: 489-494.
- [13] Marsh, E., McKie, N., Davis, N. and Leadlay, F. (1989) Cloning and structural characterization of the genes coding for adenosylcobalamin-dependent methylmalonyl-CoA mutase from *Propionibacterium shermanii*. *Biochem.* 260: 345-352.
- [14] Mancina, F., Keep, N., Nakagawa, A., Leadley, P., McSweeney, S., Rasmussen, B., Bösecke, P., Diat, O. and Evans, P. (1996) How coenzyme B₁₂ radicals are generated: the crystal structure of methylmalonyl-coenzyme A mutase at 2 Å resolution. *Structure.* 4: 339-350.
- [15] Bermúdez, O., Padilla, P., Huitrón, C. and Flores, M. E. (1998) Influence of carbon and nitrogen source on synthesis of NADP⁺-isocitrate dehydrogenase, methylmalonyl-coenzyme A mutase, and methylmalonyl-coenzyme A decarboxylase in *Saccharopolyspora erythraea* CA340. *FEMS Microbiol. Letts.* 164: 77-82.
- [16] Reeves, A., Brikum, I., Cernota, W., Leach, B., González, M. and Weber, M. (2006) Effects of methylmalonyl-CoA mutase gene knockouts on erythromycin production in carbohydrate-based and oil-based fermentations of *Saccharopolyspora erythraea*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 33: 600-609.
- [17] Froese, D., Dobson, C., White, A., Wu, X., Padovani, D., Banerjee, R., Haller, T., Gerlt, J., Surette, M. and Gravel, R. (2009) Sleeping beauty mutase (sbm) is expressed and interacts with ygfD in *Escherichia coli*. *Microbiol. Res.* 164: 1-8.
- [18] Haller, T., Buckel, T., Rétey, J. and Gerlt, J. (2000) Discovering new enzymes and metabolic pathways: Conversion of succinate to propionate by *Escherichia coli*. *Biochem.* 39: 4622-4629.
- [19] Korotkova, N., Chistoserdova, L., Kuksa, V. and Lidstrom, M. (2002) Glyoxalate regeneration pathway in the methylotroph *Methylobacterium extorquens* AM1. *J. Bacteriol.* 184: 1750-1758.
- [20] Banerjee, R. (2006) B₁₂ trafficking in mammals: A for coenzyme escort service. *ACS Chem. Biol.* 25: 149-59.
- [21] Flavin, M., Castro-Mendoza, H. and Ochoa, S. (1957) Metabolism of propionic acid in animal tissues. *Nature.* 176: 823-826.
- [22] Katz, J. and Kornblatt, J. (1961) Propionate metabolism by slices of mammary gland and liver of lactating rat. *J. Biol. Chem.* 237: 2466-2473.

- [23] Cannata, B., Focesi, A., Mazumder, R., Warner, R. And Ochoa, S. (1965) Metabolism of propionic acid in animal tissues. *J. Biol. Chem.* 240: 3249-3257.
- [24] Kolhouse, J., Utlely, C. and Allen, R. (1980) Isolation and Characterization of methylmalonyl-CoA mutase from human placenta. *J. Biol. Chem.* 255: 2708-2712.
- [25] Fenton, W., Hack, A., Willard, H., Gertler, A. and Rosenberg, E. (1982) Purification and properties of methylmalonyl coenzyme A mutase from human liver. *Arch. Biochem. Biophys.* 214: 815-823.
- [26] Fenton, W., Hack, A., Helfgott, D. and Rosenberg, E. (1984) Biogenesis of the mitochondrial enzyme methylmalonyl coA mutase. *J. Biol. Chem.* 259: 6616-6621.
- [27] Ledley, F., Lumetta, M., Nguyen, N., Kolhouse, F. and Allen, R. (1988) Molecular cloning of L-methylmalonyl-CoA mutase: Gene transfer and analysis of *mut* cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85: 3518-3521.
- [28] Cansen, R., Kalousek, F., Fenton, W., Rosenberg, E. and Ledley, F. (1989) Cloning of full-length methylmalonyl CoA mutase from cDNA library using the polymerase Chain reaction. *Genomics.* 4: 198-205.
- [29] Nham, S., Wilkemeyer, M. and Ledley, F. (1990) Structure of the human methylmalonyl CoA mutase (MUT) locus. *Genomics.* 8: 710-716.
- [30] Andrews, E., Cansen, R., Crane, M., Cholin, S., McDonell, D. and Ledley, F. (1993) Expression of recombinant human methylmalonyl CoA mutase in primary *mut* fibroblast and *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Med. Metab. Biol.* 50: 135-144.
- [31] Rosenblatt, D. and Fenton, W. (2001) Inherited disorders of folate and cobalamin transport metabolism. In *The Metabolic and Molecular Basis Of Inherited Diseases* (Scriver C., Beaudet, A. L., Sly, W., Valle, D. Eds), 8^a ed., pp 3897-3923, Mc Graw Hill, New York.
- [32] Froese, S. and Gravel, R. (2010) Genetic disorders of vitamina B₁₂ metabolism: eight complementation groups – eight genes. *Expert Rev. Mol. Med.* 29: 12-37.
- [33] Watkins, D. and Rosenblatt, D. (2011) Inborn errors of cobalamin absorption and metabolism. *Am. J. Med. Genet. C. Semin. Med. Genet.* 157: 33-44.
- [34] Wilcken, B., Wiley, V., Hammond, J. and Carpenter, K. (2003) Screening newborns for inborn errors of metabolism by tandem mass spectrometry. *N. Engl. J. Med.* 348: 2304-2312.
- [35] Deodato, F., Boenzi, S., Santorelli, F. and Dionisi-Vici, C. (2006) Methylmalonic and propionic aciduria. *Am. J. Med. Genet. C. Semin. Med. Genet.* 142: 104-112.
- [36] Mancina, F. and Evans, P. (1998) Conformational changes on substrate binding to

methylmalonyl-CoA mutase and new insights into the free radical mechanism. *Structure*. 6: 711-720.

[37] Mancina, F., Smith, G. and Evans, P. (1999) Crystal structure of substrate complexes of methylmalonyl-CoA mutase. *Biochemistry*. 38: 7999-8005.

[38] Thöma, N., Meier, T., Evans, P. and Leadlay, P. (1998) Stabilization of radical intermediates by an active-site tyrosine residue in methylmalonyl-CoA mutase. *Biochemistry*. 37: 14386-14393.

[39] Thöma, N. Evans, P. and Leadlay, P. (2000) Protection of radical intermediates at the active site of adenosylcobalamin-dependent methylmalonyl-CoA mutase. *Biochemistry*. 39: 9213-9221.

[40] Vlasie M. and Banerjee, R. (2004) When a spectator turns killer: suicidal electron transfer from cobalamin in methylmalonyl-CoA mutase. *Biochemistry*. 43: 8410-8417.

[41] Honda, S., Toraya, T. and Fukui, S. (1980) In situ reactivation of glycerol-inactivated coenzyme B₁₂ dependent enzymes, glycerol dehydratase and diol dehydratase. *J. Bacteriol.* 143: 1458-1465.

[42] Tobimatsu, T., Kajiura, H., Yunoki, M., Azuma, M. and Toraya, T. (1999) Identification and expression of the genes encoding a reactivating factor for adenosylcobalamin-dependent glycerol dehydratase. *J. Bacteriol.* 181: 4110-4113.

[43] Kajiura, H., Mori, K., Tobimatsu, T and Toraya, T. (2001) Characterization and mechanism of action of a reactivating factor for adenosylcobalamin-dependent glycerol dehydratase. *J. Biol. Chem.* 276: 36514-36519.

[44] Mori, K., Bando, R., Heida, N and Toraya, T. (2004) Identification of reactivating factor for adenosylcobalamin-dependent ethanolamine ammonia lyase. *J. Bacteriol.* 186: 6845-6954.

[45] Toraya, T. (2003) Radical catalysis in coenzyme B₁₂-dependent isomerization (eliminating) reactions. *Chem. Rev.* 103: 2095-2127.

[46] Bobik, T. and Rasche, M. (2001) Identification of the human methylmalonyl-CoA racemase gene based on the analysis of prokaryotic gene arrangements. *J. Biol. Chem.* 276: 37194-37198.

[47] Marsh, E., Harding, S. E. and Leadlay, P. (1989) Subunit interactions in *Propionibacterium shermanii* methylmalonyl-CoA mutase studied by analytical ultracentrifugation. *Biochem. J.* 260: 353-358.

[48] Korotkova, N. and Lidstrom, M. (2004) MeaB is a component of the methylmalonyl-CoA mutase complex required for protection of the enzyme from

inactivation. *J. Biol. Chem.* 279: 13652-13658.

[49] Leipe, D., Wolf, Y., Koonin, E. and Aravind, L. (2002) Classification and evolution of P-loop GTPases and related ATPases. *J. Mol. Biol.* 317: 41-72.

[50] Padovani, D. and Banerjee, R. (2006) Assembly and protection of the radical enzyme, methylmalonyl-CoA mutase, by its chaperone. *Biochemistry.* 45: 9300-9306.

[51] Hubbard, P., Padovani, D., Labunska, T., Mahlstedt, S., Banerjee, R. and Drennan, C. (2007) Crystal structure and mutagenesis of the metallochaperone MeaB. Insight into the causes of methylmalonic aciduria. *J. Biol. Chem.* 282: 31308-31316

[52] Dobson, M., Wai, T., Leclerc, D., Wilson, A., Wu, X., Doré, C., Hudson, T., Rosenblatt, D. and Gravel, R. (2002) Identification of the gene responsible for the cblA complementation group of vitamin B₁₂ responsive methylmalonic acidemia based on analysis of prokaryotic gene arrangements. *PNAS.* 99: 15554-15559.

[53] Promega protocols and application guide. (1991) Promega corporation.

[54] Janata, J., Kogekar, N. and Fenton, W. (1997) Expresión and kinetic characterization of methylmalonyl CoA mutase from patients with the mut⁻ phenotype: evidence for naturally occurring interallelic complementation. *Hum. Mol. Gen.* 6: 1457-1464.

[55] Bollag, D. Rozycki, M. and Edelman, S. (1996) *Protein Methods*, 2^a ed., Wiley-Liss, New York.

[56] Bochner, B. and Ames, B. (1982) Complete analysis of cellular nucleotides by two-dimensional thin layer chromatography. *J. Biol. Chem.* 257: 9759-9769.

[57] Jana, S. and Deb, J. (2005) Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67: 289-298.

[58] Padovani, D., Labunska, T. and Banerjee, R. (2006) Energetics of interaction between the G-protein chaperone, meaB, and B₁₂-dependent methylmalonyl-CoA mutase, *J. Biol. Chem.* 281, 17838-17844.

[59] Banerjee, R. and Ragsdale, S. (2003) The many faces of vitamin B₁₂: catalysis by cobalamin-dependent enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* 72: 209-247.

[60] Marsh, N. and Drennan, C. (2001) Adenosylcobalamin-dependent isomerases: new insights into structure and mechanism. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5: 499-505.

[61] Banerjee, R. (2003) Radical carbon skeleton rearrangements: catalysis by coenzyme B₁₂-dependent mutases. *Chem. Rev.* 103: 2083-2094.

[62] Willard, F. and Rosenberg, E. (1980) Inherited methylmalonyl-CoA mutase apoenzyme deficiency in human fibroblasts. *J. Clin. Invest.* 65: 690-698.

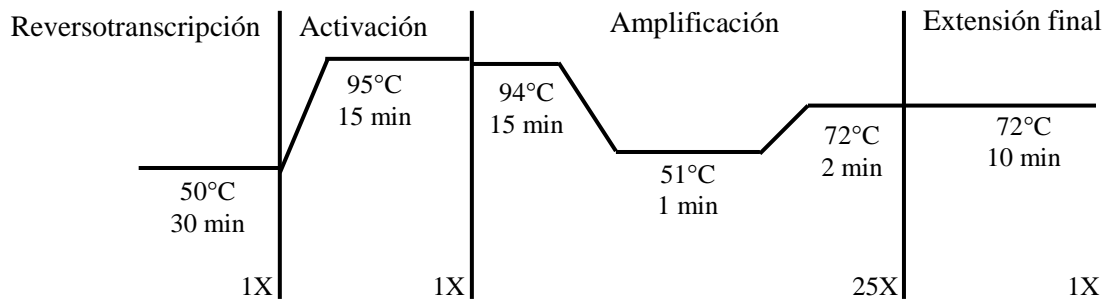
- [63] Matchmaker gold yeast two-hybrid system user manual. Clontech.
- [64] Baneyx, F. (1999) Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotech.* 10: 411-421.
- [65] Zagalak, B. and Rétey, J. (1974) Studies on methylmalonyl-CoA mutase from *Propionibacterium shermanii*. *Eur. J. Biochem.* 44: 529-535.
- [66] Miyamoto, E., Watanabe, F., Yamaji, R., Inui, H., Sato, K. and Nakano, Y. (2002) Purification and characterization of methylmalonyl-CoA mutase from a methanol-utilizing bacterium, *Methylobacterium extorquens* NR-1. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 48: 242-246.
- [67] Miyamoto, E., Tanioka, Y., Yukino, T., Hayashi, M., Watanabe, F. and Nakano, Y. (2007) Occurrence of 5'-deoxyadenosylcobalamin and its physiological function as the coenzyme of methylmalonyl-CoA mutase in a marine eukariotic microorganism. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 53: 471-475.
- [68] Kikuchi, M., Hanamizu, H., Narisawa, K. and Tada, K. (1989) Assay of methylmalonyl-CoA mutase with high-performance liquid chromatography. *Clin. Chim. Acta.* 184: 307-314.
- [69] Taoka, S., Padmakumar, R., Lai, M., Liu, H. and Banerjee, R. (1994) Inhibition of the human methylmalonyl-CoA mutase by various CoA-esters. *J. Biol. Chem.* 269: 31630-31634.
- [70] Swick, L. and Kapatos, G. (2006) A yeast 2-hybrid analysis of human GTP cyclohydrolase I protein interactions. *J. Neurochem.* 97: 1447-1455.
- [71] Rual, J., Venkatesan, K., Hao, T., *et al.* (2005) Towards a proteome-scale map of the human protein-protein interaction network. *Nature.* 437: 1173-1178.

12 ANEXOS

12.1 ANEXO 1

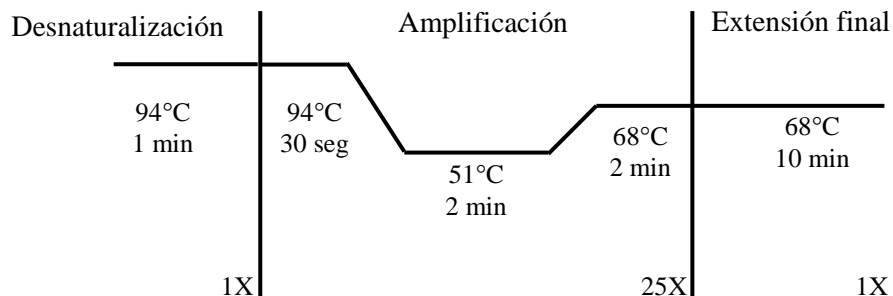
12.1.1 CONDICIONES EMPLEADAS EN EL RT-PCR DEL GEN *MMAA*

Para obtener el cDNA correspondiente al gen *MMAA* a partir de RNA total y su amplificación se emplearon las siguientes condiciones:



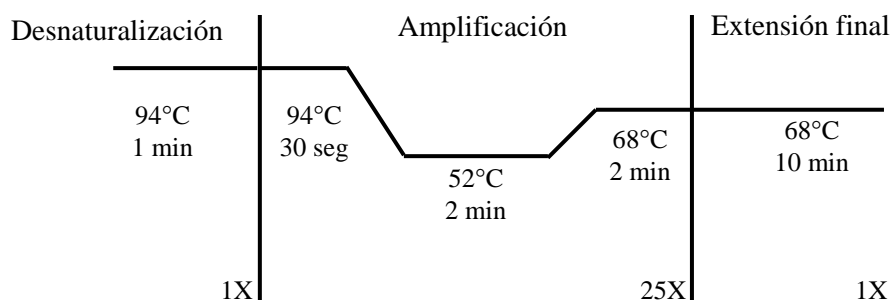
12.1.2 CONDICIONES EMPLEADAS EN EL PCR DEL GEN *MMAA*

Para sub-clonar el gen *MMAA* en el plásmido pRSETA se llevó a cabo la amplificación del gen con los iniciadores MMAAw1-For y MMAA-Rev utilizando el plásmido pSK-MMAA-1 como templado bajo las siguientes condiciones:



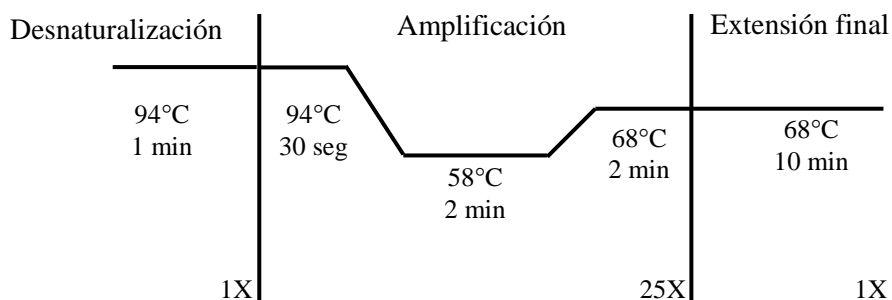
12.1.3 CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN PARA EL GEN *MUT*

Para la amplificación del gen *MUT* se utilizaron los iniciadores Mutw1-For y Mut-Rev y como templado el plásmido pmMUT empleando las siguientes condiciones:



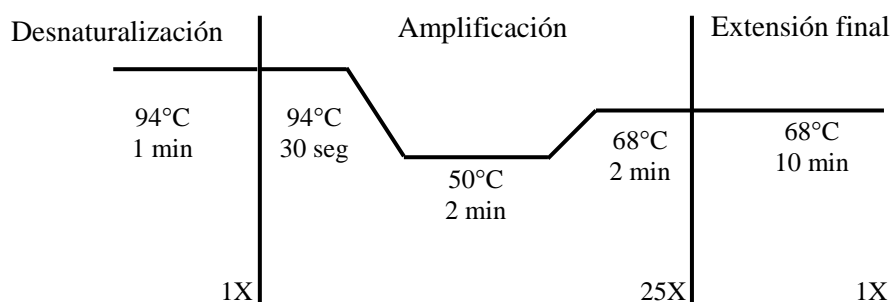
12.1.4 CONDICIONES EMPLEADAS DURANTE LA AMPLIFICACIÓN DEL GEN *MMAA* A PARTIR DEL PLÁSMIDO p-MMAAw1-1

Para llevar a cabo la clonación del cDNA correspondiente al gen *MMAA* se hizo la amplificación a partir del plásmido p-MMAAw1-1 con los iniciadores MMAADH-F y MMAADH-R utilizando las condiciones siguientes:



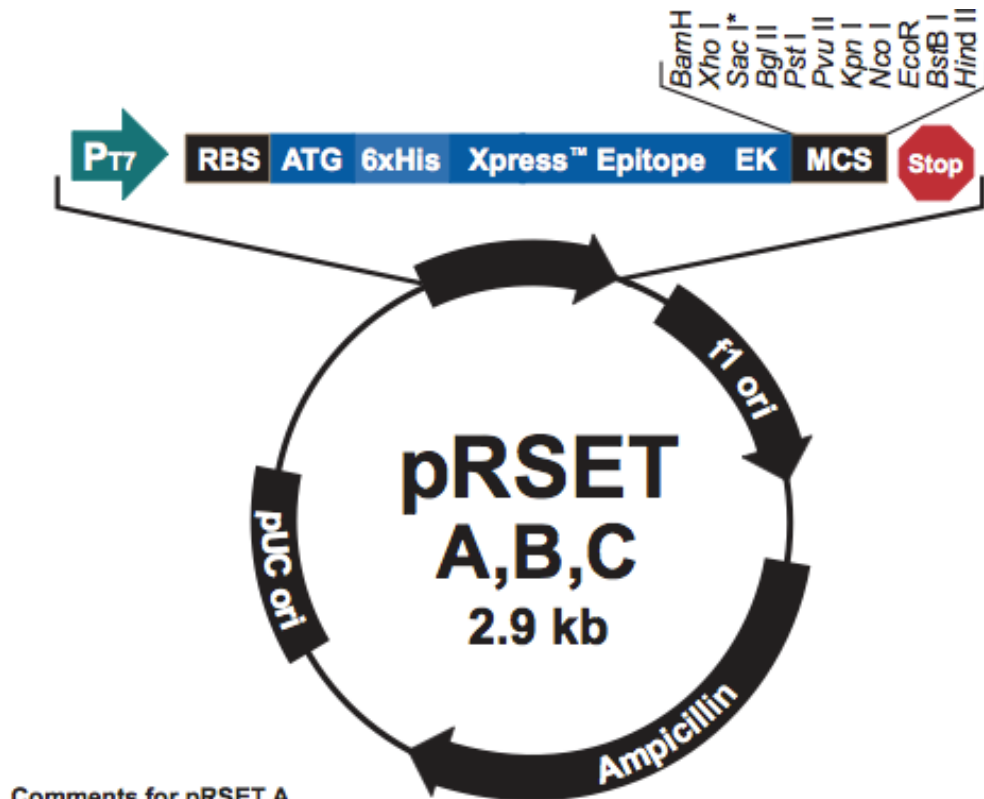
12.1.5 CONDICIONES EMPLEADAS DURANTE LA AMPLIFICACIÓN DEL GEN *MUT* A PARTIR DEL PLÁSMIDO pMCM-2

Para llevar a cabo la clonación del cDNA correspondiente al gen *MUT* se hizo la amplificación a partir del plásmido pMCM-2 con los iniciadores MutDH-F y MutDH-R utilizando las condiciones siguientes:



12.2 ANEXO 2

Mapa del plásmido pRSET en sus tres versiones (A, B y C). La versión A se empleó para la expresión de las proteínas MMAA y MCM.



Comments for pRSET A
2897 nucleotides

*Version C does not contain Sac I

T7 promoter: bases 20-39
 6xHis tag: bases 112-129
 T7 gene 10 leader: bases 133-162
 Xpress™ epitope: bases 169-192
 Multiple cloning site: bases 202-248
 T7 reverse priming site: bases 295-314
 T7 transcription terminator: bases 256-385
 f1 origin: bases 456-911
bla promoter: bases 943-1047
 Ampicillin (*bla*) resistance gene (ORF): bases 1042-1902
 pUC origin: bases 2047-2720 (C)

Imagen tomada del manual de instrucciones pRSETA, B y C (versión D, Invitrogen)

12.3 ANEXO 3



Contents lists available at ScienceDirect

Biochemical and Biophysical Research Communications

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ybbrc

Protection and reactivation of human methylmalonyl-CoA mutase by MMAA protein

Tóshiko Takahashi-Íñiguez^a, Humberto García-Arellano^{a,1}, Mauricio A. Trujillo-Roldán^b,
María Elena Flores^{a,*}

^aDepartamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. 04510, Mexico

^bDepartamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. 04510, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 November 2010
Available online 5 December 2010

Keywords:

Methylmalonyl-CoA mutase
Reactivation
Human MMAA
Enzyme inactivation
Methylmalonic acidemia

ABSTRACT

Previous studies have reported that some adenosylcobalamin-dependent enzymes suffer inactivation during catalysis due to the oxidation of cobalamin. In addition, the protection or reactivation of their catalytic activities by proteins called "protectases" or reactivases is well known in bacteria. In this study, we examined the influence of human MMAA protein on the kinetics of the reaction catalyzed by methylmalonyl-CoA mutase (MCM) by testing both purified recombinant proteins *in vitro*. Our results showed that MMAA plays dual roles in MCM activity. When it was added at the beginning of the reaction, it prevents inactivation by guarding MCM. After 60 min of reaction, when MCM is inactive, the addition of MMAA increases the enzymatic activity through GTP hydrolysis, indicating reactivation of MCM by exchange of the damaged cofactor. Interaction between MCM and MMAA observed *in vitro* was confirmed *in vivo* by yeast two-hybrid system.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Methylmalonyl-CoA mutase (MCM; EC 5.4.99.2) catalyzes the reversible isomerization of methylmalonyl-CoA to succinyl-CoA and requires adenosylcobalamin (AdoCbl) as a cofactor [1]. During the reaction catalyzed by MCM, AdoCbl is cleaved homolytically generating cob(II)alamin and a deoxyadenosyl radical, which generates a substrate-centered radical by abstraction of a hydrogen atom. After an intramolecular migration of the thioester moiety, the hydrogen atom is transferred back to generate the product. Finally, a reabstraction of the hydrogen atom from deoxyadenosine occurs, followed by recombination of the cob(II)alamin and deoxyadenosyl radical to regenerate AdoCbl [2]. During catalysis, the MCM cofactor has an unpaired electron state that is very reactive and susceptible to oxidative inactivation, which leads to the formation of OH₂Cbl and the irreversible accumulation of inactive MCM [3,4].

MCM has a broad distribution among living organisms and has been found in both bacterial and animal cells [5]. In higher animals, MCM is involved in the catabolism of the amino acids valine, isoleucine, methionine, and threonine, and it plays an essential role in the conversion of propionyl-CoA to succinyl-CoA, an intermediate of the tricarboxylic acid cycle [6]. Methylmalonic acidemia (MMA) is a rare human disorder caused by mutations in the *mut*

gene coding for mitochondrial MCM that decrease the activity and generate the accumulation of methylmalonic acid in the blood and urine of affected individuals. In 2002, Dobson et al., described mutations in another human gene, *MMAA*, which caused vitamin B₁₂-responsive methylmalonic aciduria [7].

Glycerol dehydratase and diol dehydratase, two other adenosylcobalamin-dependent enzymes, also undergo rapid inactivation by glycerol during catalysis although glycerol is a physiologic substrate for these enzymes and for bacterial growth [8]. The solution to this enigma was the discovery of reactivation systems, which are proteins whose respective genes are encoded next to the dehydratase genes in bacteria. The role of reactivating factors is to promote the release of the inactivated cofactor; the resulting apoenzyme can thus be reconstituted into a catalytically active enzyme in the presence of ATP and Mg²⁺ [9]. These enzymes have a low ATPase activity, which is necessary for their function.

To date, the *MMAA* gene has not been expressed, and the protein has not been purified. The protein sequence indicates the presence of motifs that have been associated with the G3E subfamily of P-loop GTPases that includes chaperones [10]. In 2004, studies in *Methylobacterium extorquens* revealed that MeaB, a bacterial ortholog of MMAA, forms a stable complex with MCM that can be seen in native polyacrylamide gels [11,12]. *In vitro* studies suggest that MeaB plays a role in both the assembly of the bacterial mutase and in its subsequent protection against inactivation [13].

In spite of the importance of MMAA protein in humans, nothing is known about the specific role of this protein. In this paper, we demonstrate that MMAA acts as a chaperone of human MCM protein.

* Corresponding author. Fax: +52 5556229182.

E-mail address: mflores@biomedicas.unam.mx (M.E. Flores).

¹ Present address: Departamento de Ingeniería Química y Bioquímica, Instituto Tecnológico de Veracruz, Veracruz, Mexico.

2. Material and methods

2.1. Strain

Yeast strain Y2HGold (*MAT a*, *trp1-901*, *leu2-3, 112*, *ura3-52*, *his3-200*, *gal4Δ*, *gal80Δ*, *LYS2::GAL1_{UAS}-Gal1_{TATA}-His3*, *GAL2_{UAS}-Gal2_{TATA}-Ade2*, *URA3::MEL1_{UAS}-Mel1_{TATA}*, *AUR1-C MEL1*) was obtained from Clontech. Y2HGold was grown in YPDA medium.

2.2. Cloning of the human *mut* gene

Full-length human *mut* cDNA from pmMUT (a kind gift from Dr. W. Fenton) [14] was the source of the human *mut* sequence. It was obtained by PCR using the Mut-for and Mut-rev primers (Table 1). The resulting 2154-bp amplicon, which lacked the mitochondrial leader sequence, was cloned into the *SacI* and *NcoI* sites of the pRS-ETA expression vector (Invitrogen) to obtain pmMCM-2.

2.3. Cloning of the human *MMAA* gene

Total mRNA was obtained from human leukocytes using the RNeasy Mini Kit (Qiagen). *MMAA* cDNA lacking a hypothetical mitochondrial leader sequence was obtained by RT-PCR using One Step RT-PCR (Qiagen) with the MMAA-wt-for and MMAA-wt-rev primers (Table 1). The resulting 1062-bp amplicon was cloned into the *BamHI* and *EcoRI* sites of the pRSETA vector (Invitrogen) to obtain pMMAAwL.

Both cloned genes were sequenced to confirm that no changes were introduced during PCR by comparison with GenBank sequences Nos. NM_000255 and NM_172250.

2.4. Expression and purification of human MCM and MMAA proteins

pmMCM-2 was transformed into the *Escherichia coli* strain BL21(DE3) pLysS and the transformation mixture was used to directly inoculate LB medium with ampicillin (100 μg mL⁻¹) and chloramphenicol (35 μg mL⁻¹). The bacteria were grown overnight at 37 °C. A 1.5 L fermentator containing 1 L of LB medium with ampicillin (100 μg mL⁻¹) was inoculated with this culture and incubated at 22 °C with shaking (200 rpm). When the culture reached an OD₆₀₀ ~ 1, the temperature was decreased to 12 °C, the shaking was increased (350 rpm), the culture was fed with 10% glucose (1 mL h⁻¹), and the protein expression was induced with 1 mM IPTG (Sigma) for 41 h (manuscript in preparation). p-MMAAwL was transformed into the *E. coli* strain Rosetta(DE3), and the transformation mixture was used to directly inoculate LB medium with ampicillin (100 μg mL⁻¹) and chloramphenicol (50 μg mL⁻¹). The bacteria were grown overnight at 37 °C. This culture was used to inoculate 400 mL of LB with ampicillin (100 μg mL⁻¹) and chloramphenicol (50 μg mL⁻¹), which was incubated at 37 °C. When the culture reached an OD₆₀₀ ~ 0.6, the temperature was decreased to 22 °C and protein expression was induced with 0.5 mM IPTG (Sigma) for 14 h.

The expressed proteins were purified by IMAC according to the manufacturer's instructions (Invitrogen); the buffers used to purify MCM contained 5 μM AdoCbl (Sigma). The protein purity was verified by SDS-PAGE and the concentrations were determined by the Bradford protein assay using BSA as a standard.

2.5. Western blot

His-tagged MCM and His-tagged MMAA were identified in western blots using the anti-HisG-AP antibody (Invitrogen) and detected with the BCIP/NBT substrate kit (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions.

2.6. GTPase activity

GTPase activity was measured according to the method reported by Korotkova and Lidstrom [11] with minor modifications.

2.7. MCM activity

Activity of the pure recombinant enzyme activity was determined in 50 μL reaction mixture containing 0.24 mM methylmalonyl-CoA (Sigma), 5 μM AdoCbl (Sigma) in 200 mM Tris/100 mM phosphate buffer pH 7.5, and 3.2–6.2 ng of purified recombinant protein. Activity was stopped with dry ice/ethanol, and 20 μL samples were analyzed by reversed-phase HPLC system as described by Kikuchi et al. [15], with minor modifications. Enzyme activity is expressed as micromole succinyl-CoA min⁻¹ mg⁻¹ of protein.

2.8. Yeast two-hybrid system plasmid construct

The full-length *mut* cDNA was subcloned into pGBKT7 (Clontech) containing a GAL4 DNA-binding domain to obtain pGBKT7-MCM. *MMAA* cDNA was subcloned into pGADT7 (Clontech) containing GAL4 activation domain to obtain pGADT7-MMAA. Both plasmids were transfected into the yeast strain Y2HGold by using Yeastmaker Yeast Transformation System 2 (Clontech).

2.9. Yeast two-hybrid system

Yeast two-hybrid assay was performed by using the Matchmaker Gold Yeast Two-hybrid system (Clontech) with pGBKT7-MCM as a bait plasmid to screen MMAA protein fused with GAL4 activation domain according to the manufacturer's instructions. Competent Y2HGold cells were co-transformed with both plasmids and mixture was plated on SD/-leu/-trp/X-α-Gal (40 μg mL⁻¹). Control experiments were performed at the same time by co-transformation of different control plasmids as indicated in the manual (positive, negative, and nonspecific interactions). After incubation at 30 °C for 3–5 days, positive colonies were re-streaked on SD/-leu/-trp/X-α-Gal and on SD/-leu/-trp/-his/-ade/X-α-Gal in the presence of aureobasidin A (125 ng mL⁻¹).

Table 1
Primers used in the study.

Designation	Sequence (5'-3')	Description
Mut-For	tacagcaac <u>gagc</u> ttctacaccag	Insertion of <i>SacI</i> restriction site at the beginning of the <i>mut</i> gene designed to eliminate the mitochondrial leader sequence
Mut-Rev	<u>ctcagc</u> ttatacagattgctctct	Insertion of <i>NcoI</i> restriction site at the end of the <i>mut</i> gene
MMAAwL-For	cttaagagag <u>gagc</u> ttctgtgtacaaca	Insertion of <i>BamHI</i> restriction site at the beginning of the <i>MMAA</i> gene designed to eliminate the probable mitochondrial leader sequence
MMAA-Rev	tatacaggatgag <u>aat</u> tttctctctct	Insertion of <i>EcoRI</i> at the end of the <i>MMAA</i> gene

Underlined bases indicate restriction sites.

3. Results

3.1. Cloning, expression, and purification of human MCM and MMAA

Both *mut* and *MMAA* cDNAs were cloned and overexpressed in *E. coli* BL21(DE3) cells. For MCM expression, lowering the temperature to 12 °C after induction was necessary to achieve solubility and reach yields of 2.5 mg of protein per L. A temperature of 22 °C was used for MMAA expression. For pure MCM protein a single band with an apparent Mr of 80 kDa was obtained by SDS-PAGE (Fig. 1A), which was also recognized in the western blot (Fig. 1B). MMAA was also purified. Several bands were visualized by SDS-PAGE, although a major band of 40 kDa was observed (Fig. 1C). In the western blot, all the bands were identified as proteins containing histidine tags. These bands were probably degradation products (Fig. 1D) due to the instability of MMAA, which was also reported for *E. coli* YgID, another MMAA ortholog. Likewise, MMAA precipitated in pure and semipure preparations [16]. The molecular weights for both proteins corresponded to the expected weights taking into account the lack of predicted mitochondrial leader sequences and the addition of His-tags.

3.2. MMAA enzymatic activity

As previously mentioned, amino acid sequence analysis of human MMAA has shown motifs suggesting GTPase activity. To confirm this activity, [α - 32 P]GTP was used as the substrate of MMAA in the presence of MgCl₂; a time-dependent increase in GDP concentration was detected as result of the GTPase activity of MMAA as shown in Fig. 2A. Banerjee et al., reported that the GTPase activity of *M. extorquens* MeaB was enhanced 100-fold in the presence of bacterial MCM [12]. In our case, the addition of human MCM did not increase the GTPase activity of MMAA (Fig. 2B).

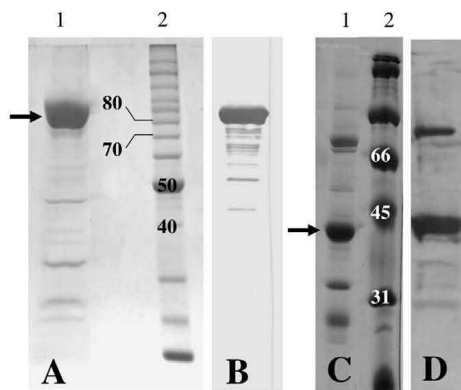


Fig. 1. Expression of human MCM and MMAA proteins. *E. coli* BL21(DE3)pLysS and *E. coli* Rosetta(DE3) cells transformed with pMCM-2 and pMMAAwt, respectively, were grown and induced as described in Section 2. The soluble fraction was prepared and separated on a 10% SDS-polyacrylamide gel, which was stained with Coomassie Brilliant Blue G-250. (A) Lane 1, MCM elution with 150 mM imidazol; lane 2, molecular weight marker. The migration position of MCM is indicated by an arrow. (B) Detection of His-tagged-MCM by western blot. Ten micrograms of enzyme purified by IMAC were electrophoresed, blotted and detected with anti-HisG-AP antibody (Invitrogen). (C) Lane 1, MMAA elution with 200 mM imidazol; lane 2, molecular weight marker. The migration position of MMAA is indicated by an arrow. (D) Detection of His-tagged-MMAA by western blot. Ten micrograms of pure enzyme were electrophoresed, blotted and detected with anti-HisG-AP antibody (Invitrogen).

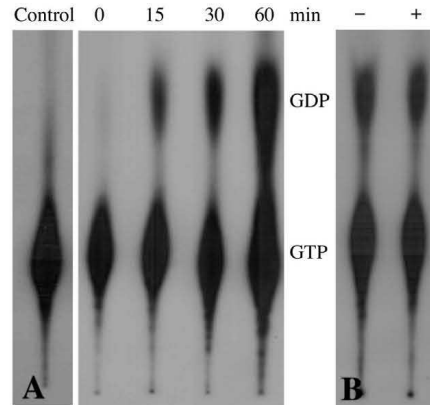


Fig. 2. TLC analysis of the products of GTP hydrolysis mediated by MMAA. (A) The reaction was performed at RT for the indicated periods of time in a reaction mixture containing (in a final volume of 25 μ L): 16.5 μ M MMAA, 10 μ M [α - 32 P]GTP, 5 mM MgCl₂, 38.5 mM KCl, and 50 mM potassium phosphate buffer pH 7.5. Aliquots were chromatographed on poly(ethyleneimine)-cellulose F plates (Merck) with 1 M KH₂PO₄ pH 4.5 as the solvent. (B) The reaction was performed for 30 min in the presence (+) or absence (-) of MCM (2:1) under the same conditions.

3.3. MCM activity and the effect of MMAA

To determine if the purified recombinant human MCM protein was active, enzymatic activity was determined by quantifying methylmalonyl-CoA after separation from succinyl-CoA by HPLC. The results shown in Fig. 3 (inset) demonstrated that MCM activity with adenosylcobalamin increased linearly during the first 3–4 min. The rate of increase then slows down, probably due to oxidative inactivation of the enzyme. A specific activity of 21 μ moles mg⁻¹ min⁻¹ was obtained for the recombinant human mutase.

In 2002, Dobson et al. [7], found that the gene responsible for the *cblA* defect, a disorder associated with B₁₂-responsive methylmalonic aciduria, was *MMAA*. However, the role of this protein was not determined. For this purpose, MCM activity was determined in the presence of MMAA protein and GTP or GMPPNP, a non-hydrolyzable analog of GTP, to observe whether MMAA could prevent the inactivation of human MCM.

The addition of MMAA/GTP at the beginning of the reaction had no effect when the activity was measured for short time intervals (Fig. 3A, inset). However, differences were found after 60 min of reaction with MCM activity increasing to 76% with respect to the control without MMAA protein, probably due to interference with oxidative inactivation. The hydrolysis of GTP does not appear to be necessary because the positive effect was also obtained when GMPPNP was used instead of GTP (Fig. 3A). In contrast, when MMAA/GTP was added after 60 min of reaction with a certain level of inactivated MCM, its activity rapidly increased to the identical level obtained when MMAA was supplemented at 0 min. Surprisingly, MMAA alone or MMAA/GMPPNP had no effect on this condition (Fig. 3B).

3.4. Yeast two-hybrid screening of MCM-MMAA interaction

To confirm MCM and MMAA *in vivo* interaction, the full-length *mut* and *MMAA* cDNAs were cloned as a translational fusion of a GAL4 DNA-binding domain and GAL4 activation domain respectively. pGBKT7-MCM and pGADT7-MMAA was con-transformed

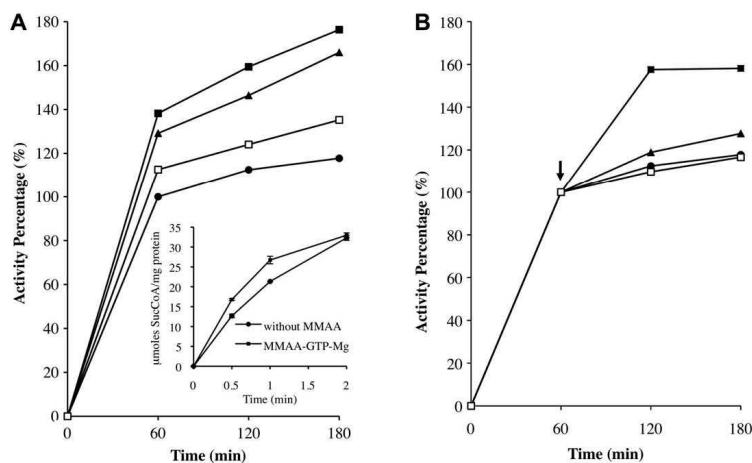


Fig. 3. Effect of addition of MMAA on MCM activity. MCM activity was recorded for long time periods of incubation of 6.5 ng of pure enzyme at 37 °C in a reaction mixture containing 0.24 mM methylmalonyl-CoA and 5 μM AdoCbl in 200 mM Tris/100 mM phosphate buffer pH 7.5 in the absence (●) and presence of 12.5 ng of pure MMAA alone (◼) or with GTP (■) or GMPPNP (▲) added at T_0 (Panel A) or T_{60} min (Panel B). Activity was stopped with dry ice/ethanol and 20 μL samples were analyzed by HPLC. Inset: MCM activity at short time intervals in the absence (●) and presence (■) of MMAA-GTP.

into yeast Y2HGold strain and allowed to grow in SD/-leu/-trp/X-α-Gal along with controls. The interaction between these two proteins was measured by the reconstitution of a functional transcriptional activator that triggers the expression of four independent reporter genes (*AUR1-C*, *ADE2*, *HIS3*, and *MEL1*). As can be seen in Fig. 4A, colonies were obtained in SD/-trp/-leu/X-α-Gal medium as a result of the presence of both plasmids. As a result of the activation of the reporter gene (*MEL1*) due to interaction between MMAA and MCM proteins, blue colonies were obtained in the presence of X-α-Gal. A very pale blue color yeasts were observed in some controls, however growth in highest stringent conditions by the presence of aureobasidin A and selecting for the four reporter genes (SD/-leu/-trp/X-α-gal/AbA) confirmed the interaction between human MCM and MMAA (Fig. 4B).

4. Discussion

Like other adenosylcobalamin-dependent enzymes, human methylmalonyl-CoA mutase undergoes suicide inactivation during catalysis and the presence of a molecular chaperone that participates in the reactivation of MCM cannot be ruled out. Methylmalonic aciduria can result from mutations in either the *mut* or *MMAA* gene [7], indicating that the MMAA protein also plays an important role in the conversion of methylmalonyl-CoA to succinyl-CoA. To elucidate the function of MMAA, both human *mut* and *MMAA* cDNAs were cloned and expressed in *E. coli* and it was demonstrated that the pure recombinant proteins were enzymatically active. MCM activity was determined by a direct method and was comparable to another reported activity [14].

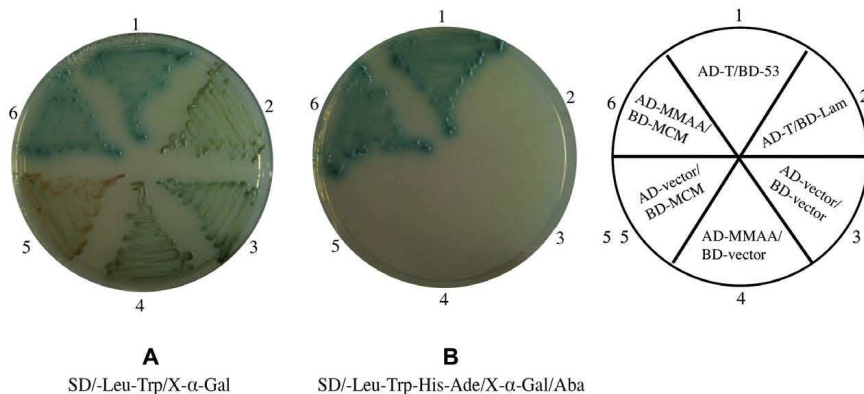


Fig. 4. *In vivo* association between human MCM and MMAA. The yeast strain Y2HGold was transformed with the indicated plasmids and grown on SD medium lacking Trp and Leu for 3–5 days at 30 °C. Each colony was re-streaked on SD medium lacking Trp, Leu, containing X-α-Gal (Panel A) and SD medium lacking Trp, Leu, Ade, His containing X-α-Gal and aureobasidin A (Panel B).

The performance of MMAA was established through GTPase activity; the recombinant protein lacking the leader sequence was active in the presence of GTP and Mg^{2+} . In contrast to the results obtained with *M. extorquens* MeaB, the addition of human MCM did not enhance MMAA activity.

The mutase activity-based data presented herein suggest that human MCM could suffer inactivation because the reaction velocity permanently slows like diol and glycerol dehydratases. Therefore, MMAA could act as a reactivating factor although no amino acid identity was found between this protein and DdR and GdR, the proteins that reactivate diol and glycerol dehydratases, respectively, in bacteria.

Results obtained from the addition of MMAA to the MCM reaction mixture at time zero or 60 min later showed a 70% of increase in activity, which could be due to the promotion of inactive cofactor exchange by MMAA and the restoration of MCM activity. However, MMAA did not require GTP hydrolysis when it was added at the beginning of the reaction, suggesting the protection of MCM instead reactivation. On the other hand, the positive effect of MMAA on mutase activity was not observed when GMPPNP was used and the inactivation was previously carried out. These results are similar to those reported by Korotkova and Lidstrom who found that the addition of MeaB considerably increased MCM activity and was not apparently involved in the release of the cofactor; GTP hydrolysis was not required for this activity [11].

On the contrary, inactivated diol and glycerol dehydratases were shown to be reactivated by their own reactivating factors through the ATP-dependent exchange of an enzyme-bound damaged cofactor for free AdoCbl. The addition of these reactivating factors led to an increase in dehydratase activity involving ATP hydrolysis [17,18], which is similar to the results obtained when MMAA was added at 60 min of the reaction. All these enzyme activity data strongly suggest stable complex formation between MCM and MMAA, however it was necessary the confirmation of the interaction in a physiological context. Using yeast two-hybrid system it was demonstrated interaction between these two proteins. Thus our data strongly suggest that MMAA interacted with MCM and plays two important roles as both the “protectase” and reactivase of MCM, which explains the existence of the *cbIA* phenotype when its gene contains mutations.

Acknowledgments

This work was supported in part by Grants from CONACYT, Mexico (No. 58060) and PAPIIT-UNAM (No. 200403). T. Takahashi-Íñiguez was the recipient of a scholarship from CONACYT for

PhD studies. We thank P. Padilla for her technical assistance, and Drs. L. Servín and P. Petrosyan for helpful discussions.

References

- [1] H. Peters, M. Nefedov, J. Sarsero, J. Pitt, K.J. Fowler, S. Gazeas, S.G. Kahler, P.A. Ioannou, A knock-out mouse model for methylmalonic aciduria resulting in neonatal lethality, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 52909–52913.
- [2] R. Banerjee, Radical carbon skeleton rearrangements: catalysis by coenzyme B₁₂-dependent mutases, *Chem. Rev.* 103 (2003) 2083–2094.
- [3] P. Hubbard, D. Padovani, T. Labunska, S. Nahstedt, R. Banerjee, C. Drenan, Crystal structure and mutagenesis of the metallochaperone MeaB, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 31308–31316.
- [4] A. Kambo, V.S. Sharma, D.E. Casteel, V.L. Woods, R.B. Pilz, G.R. Boss, Nitric oxide inhibits mammalian methylmalonyl-CoA mutase, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 10073–10082.
- [5] T. Bobik, M. Rasche, Identification of the human methylmalonyl-CoA racemase gene based on the analysis of prokaryotic gene arrangements, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 37194–37198.
- [6] L.E. Rosenberg, Disorders of propionate, methylmalonate and cobalamin metabolism, in: J.B. Stanbury, J.B. Wyngaarden, D.S. Fredrickson, J.L. Goldstein, M.S. Brown (Eds.), *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, McGraw-Hill, New York, 1983, pp. 474–497.
- [7] M. Dobson, T. Wai, D. Leclerc, A. Wilson, X. Wu, C. Doré, T. Hudson, D. Rosenblatt, R. Gravel, Identification of the gene responsible for the *cbIA* complementation group of vitamin B₁₂-responsive methylmalonic acidemia based on analysis of prokaryotic gene arrangements, *PNAS* 99 (2002) 15554–15559.
- [8] S. Honda, T. Toraya, S. Fukui, *In situ* reactivation of glycerol-inactivated coenzyme B₁₂-dependent enzymes, glycerol dehydratase and diol dehydratase, *J. Bacteriol.* 143 (1980) 1458–1465.
- [9] T. Toraya, Radical catalysis of coenzyme B₁₂-dependent isomerization (eliminating) reactions, *Chem. Rev.* 103 (2003) 2095–2127.
- [10] D. Leipe, Y. Wolf, E. Koonin, L. Aravind, Classification and evolution of P-loop GTPases and related ATPases, *J. Mol. Biol.* 317 (2002) 41–72.
- [11] N. Korotkova, M.E. Lidstrom, MeaB is a component of the methylmalonyl-CoA mutase complex required for protection of the enzyme from inactivation, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 13652–13658.
- [12] D. Padovani, T. Labunska, R. Banerjee, Energetics of interaction between the G-protein chaperone, MeaB and B₁₂-dependent methylmalonyl-CoA mutase, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 17838–17844.
- [13] D. Padovani, R. Banerjee, Assembly and protection of the radical enzyme, methylmalonyl-CoA mutase, by its chaperone, *Biochemistry* 45 (2006) 9300–9306.
- [14] J. Janata, N. Kogekar, W. Fenton, Expression and kinetic characterization of methylmalonyl-CoA mutase from patients with the *mut-* phenotype: evidence for naturally occurring interallelic complementation, *Hum. Mol. Genet.* 6 (1997) 1457–1464.
- [15] M. Kikuchi, H. Hanamizu, K. Narisawa, K. Tada, Assay of methylmalonyl-CoA mutase with high-performance liquid chromatography, *Clin. Chim. Acta* 184 (1989) 307–314.
- [16] D. Froese, M. Dobson, A. White, X. Wu, D. Padovani, R. Banerjee, T. Haller, J. Gerlt, M. Surette, R. Gravel, Sleeping beauty mutase (*sbm*) is expressed and interacts with *yggJ* in *Escherichia coli*, *Microbiol. Res.* 164 (2009) 1–8.
- [17] T. Toraya, T. Hara, T. Tobimatsu, A reactivating factor for coenzyme B₁₂-dependent diol dehydratase, *BioFactors* 11 (2000) 105–107.
- [18] H. Kajiura, K. Mori, T. Tobimatsu, T. Toraya, Characterization and mechanism of action of a reactivating factor for adenosylcobalamin-dependent glycerol dehydratase, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 36514–36519.