



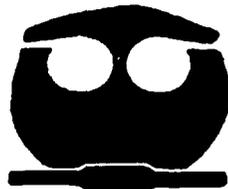
**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**CLONACIÓN Y SECUENCIA PARCIAL DE LOS GENES QUE
CODIFICAN PARA LA METILMALONIL-CoA MUTASA DE
Saccharopolyspora erythraea CA340**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
PRESENTA:
AGUSTÍN LUZ MADRIGAL**



MÉXICO, D.F.



**EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA**

2002

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado:

Presidente
Vocal
Secretario
1er sup.
2do sup.

Dra. Irma Lugo Bernal
QFB Alicia Cervantes Peredo
Dra .Ma. Elena Flores Carrasco
Dra. Maricarmen Quirasco Baruch
MC Alberto Gómez Gutiérrez

Tema desarrollado en laboratorio de la Dra. Ma Elena Flores Carrasco del departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Asesor:

Dra. Ma. Elena Flores Carrasco



Ma. Elena Flores Carrasco

Supervisor Técnico:

Dr. Pavel Petrosyan



Pavel Petrosyan

Sustentante:

Agustín Luz Madrigal



Agustín Luz Madrigal

Agradecimientos:

A la Dra. Ma. Elena Flores Carrasco, por su confianza, apoyo y cariño que siempre me ha dado.

Al Dr. Pavel Petrosyan, quien ha sido como un hermano mayor para mí y me ha enseñado el valor del pensamiento y el trabajo.

A los miembros del jurado, por sus comentarios y sugerencias.

Al Dr. Alejandro Baeza, Dra. Irma Lugo Bernal; Dr. Andrés A. Gutiérrez López; Dr. Karlen Gazarian, M en C, Diana González Espinosa, y a los profesores de la Facultad de Química quienes he admirado y de alguna manera contribuyeron para instruirme en el campo de la investigación.

Al Dr. Sergio Sánchez Esquivel y los miembros de su laboratorio, Erika, Enrique, Bety, Lalo, Luz, Ely y la Dra. Elizabeth Langley, gracias por su apoyo.

A la QA. Gabriela Maldonado Robledo, "Gabrielita" con cariño. Por los momentos que compartimos juntos. Por enseñarme que la ley de Seese se aplica durante toda la vida, solo hay que pensar y confiar en uno mismo.

A la pequeña M en C. Silvia Guzmán Beltrán, "Silvanovita". Gracias por enseñarme tantas cosas. Te quiero mucho y estoy orgulloso de ti.

A mi amigo Alejandro Díaz, "Alex". A pesar de que ya no estas aquí siempre te llevaré conmigo. Te quiero amigo.

A mis amigos de siempre, Fabian, Elisa, Alejandra, Toño, Chucho, Rafa, Pancho, Martha, Wilson, Yumei, Moni, Cecilia, Caro, Arturo y Juan, por todos los momentos tan divertidos que hemos pasado juntos.

Al Instituto de Investigaciones Biomédicas, mi segunda casa.

A mi papá Lic. en C. Agustín Luz Morales:

Gracias por tu apoyo, cariño y responsabilidad de siempre, me siento orgulloso de tener una padre como tu. Así siempre será. Te quiero.

A mi mamá, Isaura ("Nani"):

Gracias por enseñarme la responsabilidad y el trabajo. A enfrentar las cosas con valor y a confiar en mi. Te quiero mucho.

A mi hermana Lic. en P. Guadalupe Luz Madrigal ("Lupita"):

Siempre has sido un gran ejemplo a seguir. Gracias por tu paciencia, cariño, ayuda y comprensión. Me siento orgulloso de que seas mi hermana. Te quiero tontita.

A mi hermano. Leonel ("Leo"):

Además de mi hermano "mi amigo". Gracias por tus comentarios acerca de mi, siempre tan atinados.

A mi hermano Erick ("Arlequín")

Eres algo distinto, pero he de aceptar que eres bastante bueno. Me siento orgulloso de ti y te quiero mucho.

Indice general

	Pág.
Indice de figuras	1
Abreviaturas	2
I. Resumen	3
II. Introducción	4
III. Antecedentes	
III.1 Eritromicina A	7
III.2 Actividad biológica de ErA y su importancia clínica	10
III.3 Mecanismo de acción de la ErA	11
III.4 Biosíntesis de ErA	11
III.5 Formación de 6-DEB	16
III.6 Estructura y función de la PKS de ErA	17
III.7 Genes que codifican para la PKS de ErA	18
III.8 Rutas de formación de P-CoA y MM-CoA	22
III.9 Metilmalonil-CoA mutasa	27
IV. Hipótesis	30
V. Objetivo	31
VI. Materiales y métodos	
VI.1 Cepas o condiciones de cultivo	32
VI.2 Purificación del DNA genómico de <i>S. erythraea</i> CA340	32
VI.3 Amplificación de la secuencia parcial del gen <i>mutB</i>	33
VI.4 Purificación, clonación y secuencia del fragmento amplificado	34
VI.5 Purificación y marca de la sonda	35
VI.6 Hibridación Southern	36
VI.7 Producción de una biblioteca genómica parcial en pUC18	37
VI.8 Experimentos de hibridación de colonias	37
VII. Resultados y discusión	
VII.1 Purificación del DNA genómico de <i>S. erythraea</i> CA340	39
VII.2 Amplificación de la secuencia parcial de <i>mutB</i> mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	40
VII.3 Análisis de la secuencia del fragmento amplificado	43
VII.4 Hibridación Southern	43
VII.5 Construcción de una sub-biblioteca genómica de <i>S. erythraea</i> CA340	44
VII.6 Diseño de subclonación y análisis de la secuencia de los genes de la MCM	47
VII.7 Identificación de los posibles sitios de unión al sustrato y de la coenzima B ₁₂	53
VIII. Conclusiones	59
IX. Bibliografía	60

Indice de figuras

	Pág.
Fig. 1: Estructura química de ErA y sus análogos	8
Fig. 2: Antibióticos de segunda generación derivados de la eritromicina	9
Fig. 3: Mecanismo de acción de la ErA	12
Fig. 4: Biosíntesis de ErA por <i>Saccharopolyspora erythraea</i>	13
Fig. 5: Compuestos intermediarios en la elaboración periférica de la eritromicina	15
Fig. 6: Unidades precursoras de la formación del DEB	16
Fig. 7: Modelo lineal "cabeza cola" para la sintetasa de ácidos grasos (FAS)	18
Fig. 8: Organización genómica de las regiones que contienen los genes asociados con las etapas tardías en la biosíntesis de ErA	19
Fig. 9: Organización modular de las tres proteínas codificadas por los genes <i>eryA</i>	21
Fig. 10: Rutas de formación del P-CoA y MM-CoA en actinomicetos	26
Fig. 11: Reacción catalizada por la MCM y estructura de la adenosilcobalamina	27
Fig. 12: Organización genómica y mapa de restricción de la región que codifica para la MCM de <i>S. cinnamonensis</i>	29
Fig. 13: Electroforesis en gel de agarosa del DNA genómico de <i>S. erythraea</i> CA340	39
Fig. 14: Alineamiento múltiple de la secuencia parcial de MutB	40
Fig. 15: Amplificación de la secuencia parcial de <i>mutB</i> de <i>S. erythraea</i> CA340	41
Fig. 16: Mapa de restricción y secuencia del fragmento clonado en pMOSBlue	42
Fig. 17: Análisis de hibridación Southern del DNA genómico de <i>S. erythraea</i> CA340	44
Fig. 18: Análisis mediante hibridación en placa de bacterias transformadas con pUC18 llevando fragmentos de 11 a 20 Kb <i>Bam</i> HI	45
Fig. 19: Análisis mediante PCR usando los oligonucleótidos <i>mut1</i> y <i>mut2</i> de las clonas positivas provenientes de la sub-biblioteca genómica de <i>S. erythraea</i> CA340 en pUC18	46
Fig. 20: Diseño de subclonación y análisis para la búsqueda de ORFs del fragmento de 5.5Kb	48
Fig. 21: Secuencia de nucleótidos de un fragmento clonado de 4,055 pb del DNA genómico de <i>S. erythraea</i> CA340	50
Fig. 22: Alineamiento múltiple de la subunidad mayor de MCM de <i>S. erythraea</i> CA340 y otras MCM y MCM relacionadas de diferentes organismos	56

Abreviaturas

ACP	Proteína acarreadora de acilo
AdCbl	Adenosilcobalamina
CoA	Coenzima A
6-DEB	6-desoxieritronólido B
DEBS	Desoxieritronolido B sintetasa
DH	Dehidratasa
DMSO	Dimetilsulfoxido
ER	Enoilreductasa
ErA	Eritromicina A
FAS	Ácido graso sintetasa
GC	Guanina, Citosita
ICM	Isobutiril-CoA
KR	Cetoreductasa
KS	β -cetoacil sintasa
MAT	Malonilacetiltransferasa
MCM	Metilmalonil-CoA mutasa
MIC	Concentración mínima inhibitoria
MM-CoA	Metilmalonil-CoA
MMT	Metilmalonil transcarboxilasa
NCBI	Centro Nacional de Información Biotecnológica
ORF	Marco de lectura abierto
PCC	Propionil-CoA carboxilasa
P-CoA	Propionil-CoA
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PKS	Policetido sintetasa
RNA_m	RNA mensajero
TE	Tioesterasa

I. Resumen

El antibiótico eritromicina A (ErA) es producido por el microorganismo Gram positivo *Saccharopolyspora erythraea* CA340. Dicho microorganismo ha sido sujeto a estudios genéticos y bioquímicos con la finalidad de incrementar la producción del antibiótico.

Uno de los compuestos más importantes para la biosíntesis del antibiótico ErA es el metilmalonil-CoA (MM-CoA), el cual se origina por la reacción catalizada por la metilmalonil-CoA mutasa (MCM), una enzima heterodimérica dependiente de la coenzima B₁₂. En este trabajo, se llevo a cabo la clonación y secuencia parcial de los genes que codifican para la MCM a partir de una sub-biblioteca del genoma de *S. erythraea* CA340. La clona de *Escherichia coli* que contenía los genes que codifican para la MCM fue encontrada con ayuda de una sonda obtenida mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), usando oligonucleótidos provenientes de secuencias altamente conservadas de la subunidad mayor de MCM. Un fragmento de 5,500 pb contenido en un fragmento mayor de 16,000 pb *Bam*HI del genoma de *S. erythraea* CA340, fue analizado con el programa FramePlot para la búsqueda de marcos de lectura abiertos (ORF) de microorganismos con un alto contenido de GC (>70%) en su genoma. Dicho fragmento mostró contener 3 posibles ORF (ORF2, ORF3 y ORF4) completos aunque parcialmente secuenciados.

El análisis mediante la comparación de la secuencia traducida en la base de datos (NCBI) utilizando el programa BLASTX demostró contener los ORF (ORF1 y ORF2) que codifican para la subunidad menor MutA de 64.5 KDa y la subunidad mayor MutB de 81.2 KDa de la MCM, mientras que el ORF4 inmediatamente río abajo de estos genes mostró un alto porcentaje de identidad con el ORF5 encontrado inmediatamente río abajo de los genes que codifican para la MCM de *Amycolatopsis mediterranei* U32 y de *Mycobacterium tuberculosis* respectivamente. Los genes *mutA* y *mutB* se superponen por un nucleótido lo que puede permitir un acoplamiento traduccional y por tanto la producción de cantidades estequiométricas de los respectivos polipéptidos. La subunidad menor de MCM mostró un 23% de identidad con su propia subunidad mayor, sugiriendo que el gen *mutA* podría ser el resultado de un evento de duplicación. La gran identidad entre los residuos de la subunidad mayor de MCM de *S. erythraea* CA340 y la subunidad α de *Propionibacterium shermanii* que participan en la unión con el sustrato así como de la coenzima B₁₂ y que además se encuentran en una gran variedad de otras enzimas dependientes de coenzima B₁₂, puede reflejar un mecanismo catalítico muy similar. Por otro lado, el análisis de la secuencia de aminoácidos de la subunidad mayor de MCM y de otras MCMs previamente reportadas sugiere que la MCM se encuentra altamente conservada durante la evolución.

II. Introducción

La eritromicina A (ErA) es un antibiótico macrólido (antibióticos que contienen un anillo de lactona, al cual se unen una o más moléculas de dosoxiazúcares) utilizado extensamente en el tratamiento de enfermedades infecciosas causadas por bacterias tanto Gram positivas como negativas. Este antibiótico representa una alternativa clínica para pacientes que presentan alergia a las penicilinas, además del interés constante que existe en sus derivados semisintéticos de segunda y tercera generación ya que han demostrado contener una gran eficacia terapéutica y seguridad en su uso [Agouridas *et al.*, 1998].

Una de las cepas productoras de ErA es la bacteria Gram positiva *Saccharopolyspora erythraea* CA340, la cual ha sido sujeto de estudios genéticos y bioquímicos encaminados a identificar y caracterizar a las enzimas y los genes involucrados en la biosíntesis del antibiótico, con la finalidad de incrementar su producción. La biosíntesis de eritromicina se divide en dos etapas. En la primera etapa, la policétido sintetasa (PKS) cataliza la condensación de una unidad de propionil-CoA (P-CoA) y seis unidades de metilmalonil-CoA (MM-CoA) para dar 6-desoxieritronólido B (6-DEB), el intermediario más importante de la vía. En la segunda etapa, el 6-DEB es modificado por una serie de reacciones catalizadas por enzimas hidroxilasas, glucosiltransferasas y metiltransferasas lo que proporciona la actividad biológica a la molécula. Desde el punto de vista biosintético, la clave de la biosíntesis se encuentra enfocada en las reacciones realizadas por la PKS, particularmente en la suficiente disponibilidad de precursores tales como P-CoA y MM-CoA.

Tanto el P-CoA como el MM-CoA tienen distintos orígenes metabólicos. En actinomicetos el P-CoA puede generarse a partir de la descarboxilación del *R*-metilmalonil-CoA a través de una reacción catalizada por la enzima metilmalonil-CoA descarboxilasa, la cual previamente a sido purificada a partir de *S. erythraea* [Hunaiti y Kolattukudy, 1984b].

Otras rutas para la formación de P-CoA descritas en actinomicetos incluyen el catabolismo de aminoácidos tales como: la valina, la isoleucina, la metionina y la treonina; además de las rutas de degradación de ácidos grasos de número impar o de cadena ramificada [Vancura *et al.*, 1988; Tang *et al.*, 1994].

Por otro lado, existen tres rutas principales que dan origen al MM-CoA, la primera es por isomerización de succinil-CoA catalizada por la metilmalonil-CoA mutasa (MCM), una enzima dependiente de la coenzima B₁₂; la segunda por carboxilación de P-CoA, catalizada ya sea por la propionil-CoA carboxilasa (PCC) o por la metilmalonil-CoA transcarboxilasa (MMT); y finalmente la tercera es una oxidación de isobutiril-CoA [Huinati y Kolattukudy 1982; Hunaiti y Kolattukudy 1984a; Liu y Reynolds, 2001]. Tanto la MMT como la derivación de MM-CoA a partir de isobutiril-CoA no han sido demostradas en *S. erythraea* CA340.

Estudios anteriores donde se llevó a cabo una interrupción génica de la subunidad β de PCC han demostrado que en *S. erythraea* CA340, la síntesis del MM-CoA procede principalmente de la reacción catalizada por la MCM [Donadio *et al.*, 1996]. Por otro lado, la sobre expresión génica de MCM en *Streptomyces cinnamonensis* un productor de monensina A, resultó en un incremento de la producción del 32% comparado con la cepa silvestre [Zhang *et al.*, 1999]. Finalmente, el análisis metabólico de la producción de rifampicina en *Amycolatopsis mediterranei* U32, demostró que la MCM es la principal enzima responsable de la formación de MM-CoA [Zhang *et al.*, 1999].

A la fecha no se han reportado los genes que codifican para la MCM de *Saccharopolyspora erythraea* CA340 y por tanto el objetivo de este trabajo es llevar a cabo la clonación de dichos genes mediante la construcción de una biblioteca genómica de *S. erythraea* CA340. Nuestra hipótesis radica en que la clona que contenga el gen de MCM será identificada con una sonda obtenida mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando oligonucleótidos de sitios altamente conservados de la subunidad mayor de MCMs previamente reportadas. Los resultados obtenidos permitirán llevar a

cabo manipulaciones genéticas en un futuro, lo que podría incrementar la producción de ErA.

III. Antecedentes

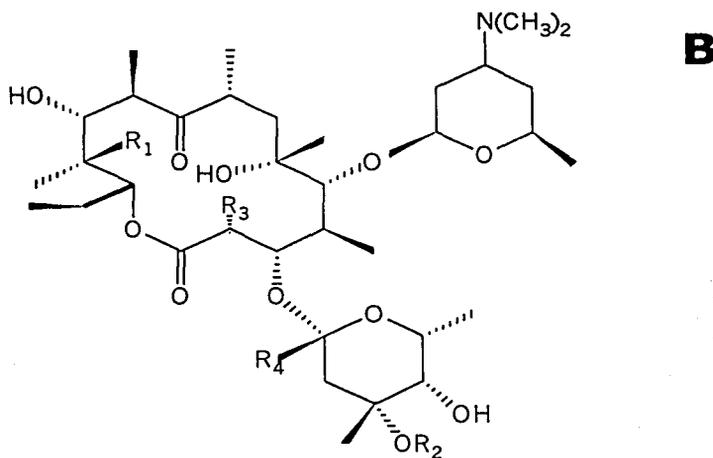
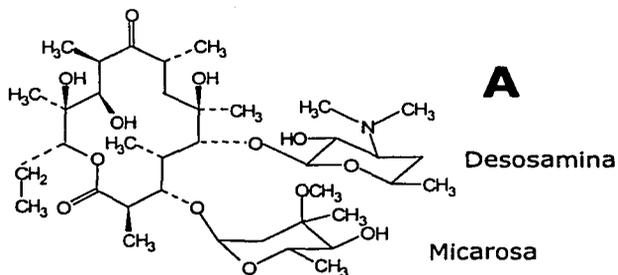
III.1 Eritromicina A

La eritromicina A (ErA) es un antibiótico macrólido no poliénico clasificado dentro de un grupo numeroso de compuestos que contienen un anillo lactónico de 12 a 16 átomos de carbono. Este antibiótico fue aislado por primera vez en 1952 por McGuire y col. a partir de cultivos de *Saccharopolyspora erythraea* (antes *Streptomyces erythreus*) [McGuire *et al.*, 1952; Labeda, 1987]. Además, su estructura fue identificada en 1957 y el análisis estereoquímico fue realizado por cristalografía de rayos X en 1965.

La estructura química de la eritromicina consiste de un anillo lactónico macrocíclico constituido por 13 átomos de carbono, al cual se unen dos moléculas de carbohidratos mediante uniones glicosídicas [Wolfgang, 1994]. *S. erythraea* CA340 además de sintetizar ErA, produce una serie de análogos (B,C,D,E y F) cuya diferencia estructural radica en los sustituyentes del anillo lactónico y en los azúcares unidos a éste (figura 1). A pesar de las similitudes estructurales de dichos análogos su actividad biológica como antibiótico difiere. Sin embargo, la ErA resulta ser la más importante desde el punto de vista comercial y clínico [Staunton y Wilkinson, 1997].

La ErA tiene gran importancia ya que se utiliza en el tratamiento de enfermedades causadas por bacterias tanto Gram positivas como negativas, de infecciones pulmonares tales legionelosis causada por *Legionella pneumoniae*, las cual presenta síntomas tales como fiebre y neumonia, por otro lado la ErA representa una alternativa clínica para pacientes que presentan alergia a las penicilinas.

Fig. 1: Estructura química de la eritromicina A y sus análogos. A: Eritromicina A. Sus características estructurales incluyen un anillo lactónico macrocíclico constituido por 13 átomos de carbono, al cual se encuentran unidas dos moléculas de monosacáridos (C-3) micarosa y (C-5) desosamina. **B:** Análogos de eritromicina A. [Hlgashide, 1984; Neuzil y Hostalek, 1986].



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

S. erythraea CA340 es un actinomiceto Gram positivo con un alto contenido de G y C en su genoma (>70%), este microorganismo es el principal productor de ErA y por tanto ha recibido una considerable atención como modelo de estudio para la biosíntesis de policétidos [Donadio *et al.*, 1991; Donadio y Katz, 1992]. Los estudios moleculares y manipulaciones genéticas de *S. erythraea* han permitido el entendimiento de sistemas enzimáticos complejos que permiten la formación de numerosos compuestos macrólidos [Hershberger, 1996; Katz y Donadio, 1993]. El uso industrial de *S. erythraea* para la producción fermentativa de ErA se ha incrementado en los años recientes, ésto último debido al aumento en la demanda para la producción semisintética de una variedad de moléculas de eritromicina de segunda generación entre las que se incluyen: claritromicina, azitromicina, roxitromicina y diritromicina (figura 2) [Agouridas *et al.*, 1998].

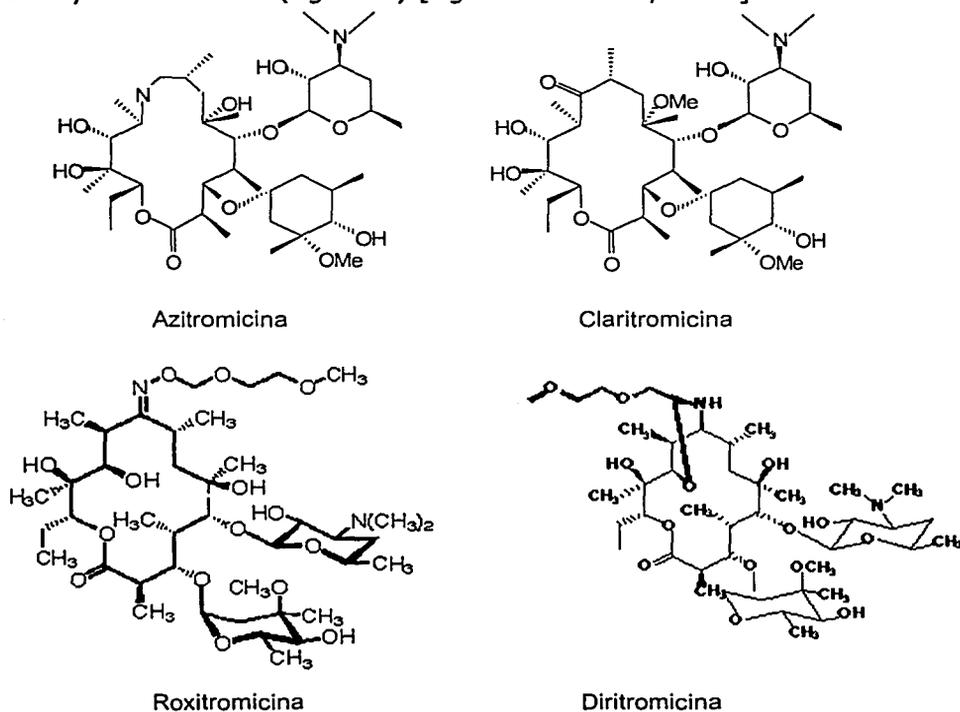


Fig. 2: Antibióticos de segunda generación derivados de la eritromicina.

III.2 Actividad biológica de ErA y su importancia clínica

La ErA tiene un espectro de acción que abarca cocos y bacilos, tanto Gram positivos como negativos, aunque su actividad parece ser bacteriostática posee capacidad bactericida a concentraciones altas contra microorganismos muy sensibles. Experimentos *in vitro* muestran que la concentración mínima inhibitoria (MIC) sobre cepas sensibles de *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus pneumoniae* poseen límites de 0.015 a 1.0 mg/ml. Los estreptococos del grupo *viridans* son inhibidos a concentraciones de 0.06 a 3.1 mg/ml. Los bacilos Gram positivos también son sensibles a eritromicina y los valores de MIC son de 1 µg/ml para *Clostridium perfringens*, de 0.2 a 3 µg/ml para *Corynebacterium diphtheriae*, y de 0.25 a 4 µg/ml para *Listeria monocytogenes* [Steigbigel, 1995].

También la ErA presenta actividad contra bacilos Gram negativos que incluyen a *Haemophilus influenzae* (MIC, 1 a 32 µg/ml) y *Neisseria meningitidis* (MIC, 0.4 a 1.6 µg/ml), y una excelente actividad contra casi todas las cepas de *Neisseria gonorrhoeae* (MIC, 0.12 a 2.0 µg/ml). Se observa también acción antibacteriana contra especies de *Borrelia* y *Bordetella pertussis*. La ErA presenta también actividad contra *Campylobacter jejuni* (MIC, 0.5 a 4 µg /ml) y dicho antibiótico es eficaz contra *Mycobacterium pneumoniae* (MIC, 0.004 a 0.02 µg/ml) [Gregory, 1997].

En los últimos 10 años ha existido un considerable interés en la interacción entre los antibióticos macrólidos y el sistema inmune, particularmente en la acción anti-inflamatoria de eritromicina y sus derivados, además del tratamiento de sinusitis crónica [Cervin, 2001; Rubin y Tamaoki, 2000]. Existen numerosos estudios que muestran una acción inhibitoria de la ErA sobre la expresión génica de la interleucina 6 e interleucina 8 y también una inhibición de la expresión de moléculas de adhesión intracelular esenciales para el reclutamiento de células involucradas en el mecanismo de inflamación [Cervin, 2001; Rubin y Tamaoki, 2000]. Existe también evidencia de estudios *in vitro* así como casos clínicos, que muestran que los macrólidos reducen la virulencia y daño al tejido causado por una colonización bacteriana crónica sin

erradicación de los agentes causales. Los mecanismos involucrados en la respuesta anti-inflamatoria de ErA no se encuentran del todo estudiados, sin embargo podría estar involucrada una desregulación en la producción de citocinas por fagocitos y otros blancos como factores de virulencia bacterianos [Labro y Abdelghaffar, 2001].

III.3 Mecanismo de acción de la ErA

El mecanismo de acción de la ErA consiste en inhibir la síntesis de proteínas al ligarse en forma reversible a subunidades ribosómicas 50 S de los microorganismos sensibles (figura 3) [Brisson-Noël *et al.*, 1988]. Se ha demostrado que la ErA interfiere en la unión del cloranfenicol que también actúa en dicho sitio. Además, se piensa que la resistencia que presentan algunos microorganismos es debida a cambios mutacionales en dicha subunidad ribosómica [Corcoran, 1981]. Se ha postulado que la ErA no inhibe de manera directa la formación de los enlaces peptídicos, si no más bien bloquea la fase de translocación, y con ello la cadena de péptido recién formada, que temporalmente se encuentra en el sitio A de la reacción de transferasa, no se desplaza al sitio P o sitio donador. Otra posibilidad de acción es que pueda unirse al ribosoma y generar un cambio conformacional que termine la síntesis de proteína al interferir de modo indirecto en la transpeptidación y translocación [Weisblum, 1995].

III.4 Biosíntesis de ErA

La biosíntesis de ErA puede ser dividida en dos etapas. En la primera etapa la policétido sintasa (PKS) cataliza la condensación de una unidad de propionil-CoA (P-CoA) (**1**) y seis unidades de metilmalonil-CoA (MM-CoA) (**2**) para dar 6-desoxieritronólido B (6-DEB) (**3**), el intermediario más importante de la ruta biosintética (figura 4) [Staunton y Wilkinson, 1997].

En la segunda etapa, el 6-DEB es modificado por una serie de reacciones catalizadas por hidroxilasas, glucosil transferasas y metil transferasas. Desde el punto de vista biosintético la clave de la biosíntesis se encuentra enfocada

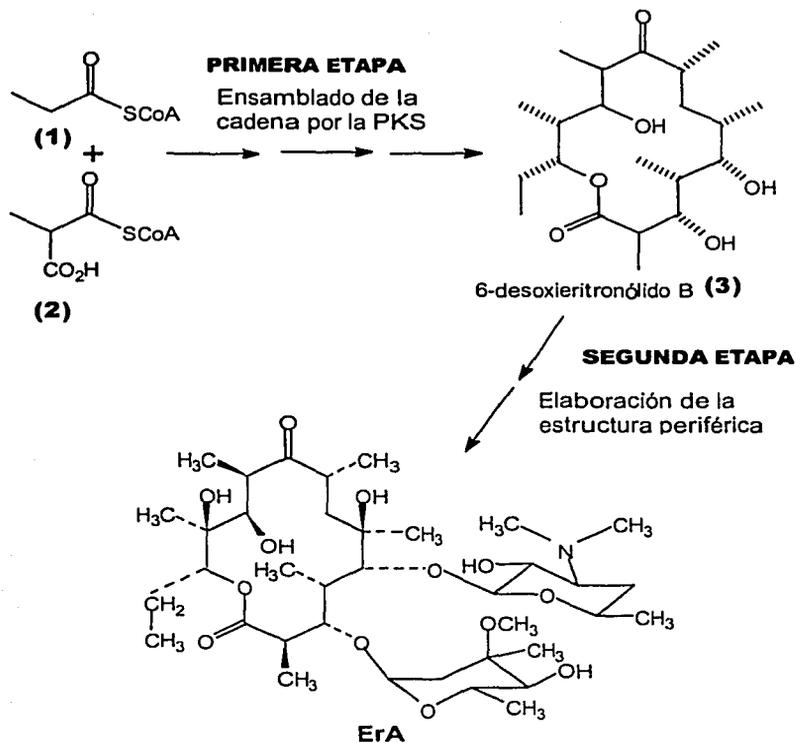


Fig. 4: Biosíntesis de eritromicina A por *Saccharopolyspora erythraea*.

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

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

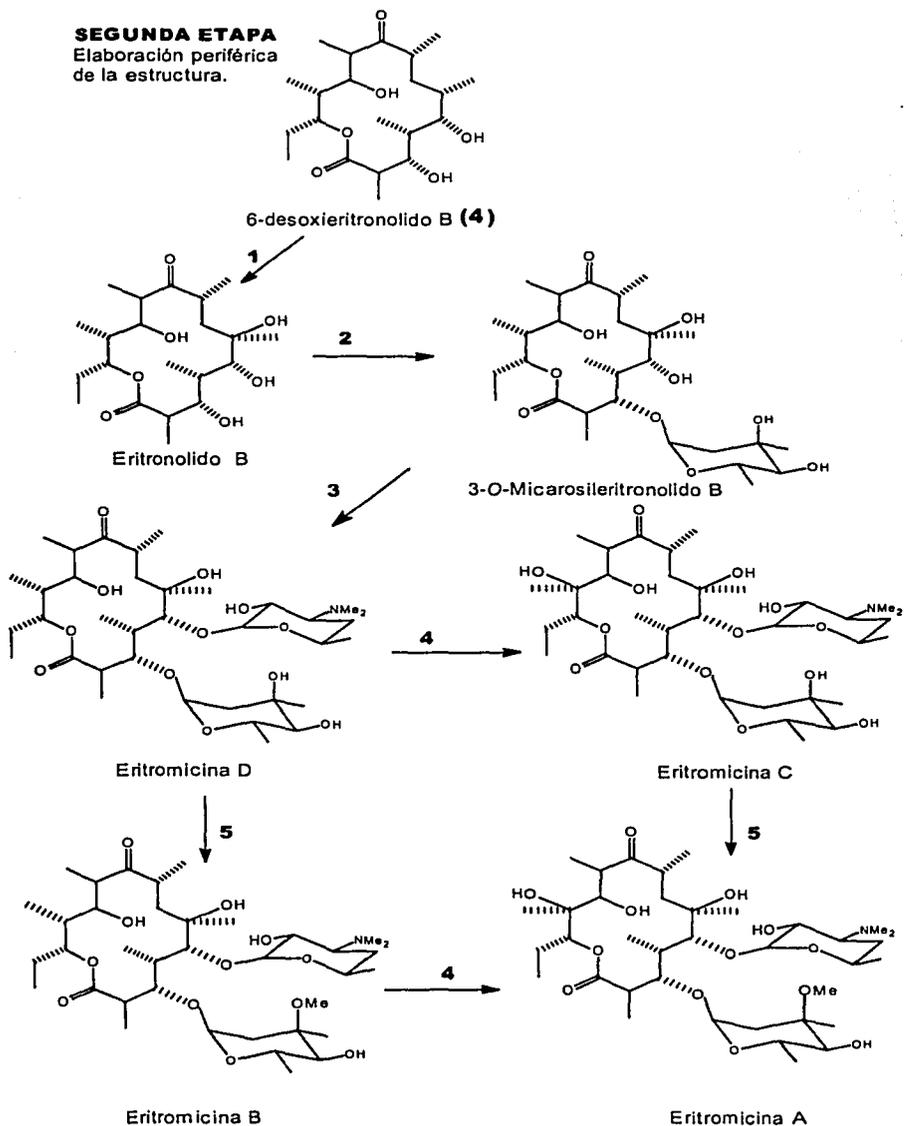
Muchas de las investigaciones llevadas a cabo en las etapas posteriores a la formación del 6-DEB han sido realizadas utilizando mutantes, las cuales son incapaces de producir una de las enzimas que catalizan la conversión de

los intermediarios de la ruta biosintética [Weber *et al.*, 1985]. Esto permitió la acumulación de tales compuestos en cantidades suficientes para ser aislados e identificados (figura 5).

La hidroxilación en C-6 de 6-DEB se lleva a cabo con retención de la configuración. La enzima responsable EryF, es una citocromo P450 hidroxilasa la cual ha sido sobreproducida en *Escherichia coli* [Andersen y Hutchinson, 1992]. En la siguiente etapa el monosacárido L-micarosa se une al grupo hidroxilo del C-3 mediante una TDP-micarosa glicosiltransferasa. El aminosacárido D-desosamina es adicionado al grupo hidroxilo de C-5 mediante la enzima TDP-desosamina glicosiltransferasa [Vara *et al.*, 1989]. El intermediario resultante, ErD es el primero en mostrar una actividad antimicrobiana. La etapa siguiente puede continuar ya sea por una hidroxilación en C-12 con retención de la configuración para producir ErC, o una O-metilación en el hidroxilo de C-3'' de la micarosa, catalizada por la O-metiltransferasa para producir ErB. Finalmente la ErA puede ser generada ya sea mediante una O-metilación de ErC, catalizada por O-metiltransferasa o una hidroxilación de C-12 por una hidroxilasa sobre la ErB [Satassi *et al.*, 1993]. El análisis posterior sobre la actividad de hidroxilación en C-12 por EryK mostraron que existe una afinidad de 1200 a 1900 veces mayor sobre ErD en comparación al sustrato alternativo ErB, tales resultados indicaron que la ErA se deriva principalmente de ErD [Lambalot *et al.*, 1995].

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

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



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

III.5 Formación del 6-DEB

Estudios utilizando mutantes en la formación del 6-DEB revelaron que no existen intermediarios que antecedan a la formación de dicho compuesto y por tanto tales compuestos se encontraban unidos a una enzima. En otros estudios adicionando precursores marcados a un cultivo de *S. erythraea* con la finalidad de detectar su incorporación en el 6-DEB, dieron la primera evidencia de que el esqueleto lactónico de la eritromicina se encuentra constituido a partir de siete unidades de tres carbonos. A la fecha se sabe que tales unidades son derivadas de una unidad de P-CoA y seis unidades de MM-CoA [Katz y Donadio, 1993] (figura 6).

Estudios posteriores alimentando a *S. erythraea* con [^{18}O]propionato, revelaron que todos los oxígenos unidos a carbonos derivados de carboxilo en el macrólido fueron retenidos a partir del precursor propionato y no fueron derivados de oxígeno molecular o agua. Estos resultados son consistentes con un mecanismo en el cual cada condensación de metilmalonil es seguida por una reducción para dar el estado de oxidación y estequiometría adecuados antes de la adición de la siguiente unidad.

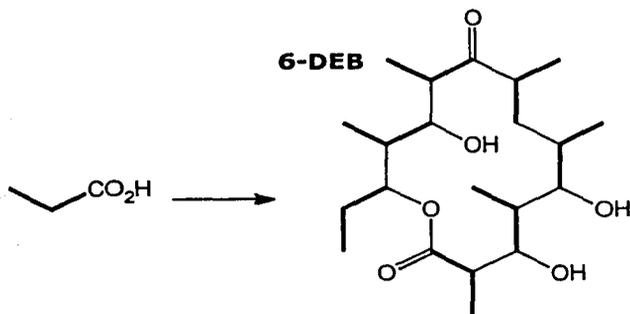


Fig. 6: Unidades precursoras de la formación del DEB. El 6-DEB es un anillo lactónico macrocíclico al cual se unen dos azúcares, L-micarosa y D-desosamina en el C-3 y C-5 respectivamente. La molécula de 6-DEB se deriva de seis condensaciones sucesivas de una unidad de P-CoA (unidad iniciadora) y seis unidades de (2S)-MM-CoA (unidad extendidora). El 6-DEB representa el intermediario limitante de la vía de formación de ErA.

III.6 Estructura y función de la PKS de ErA

Después de 1990 se realizaron muchos intentos encaminados a purificar la PKS a partir de extractos libres celulares de *S. erythraea*. Sin embargo, tales estudios no tuvieron éxito. No obstante, se reconoció que existe una considerable similitud de la biosíntesis del 6-DEB con la ruta biosintética de ácidos grasos, la cual ha sido extensamente estudiada y que sirvió como modelo de estudio para la PKS [Hopwood y Sherman, 1990]. En la síntesis de ácidos grasos (FAS) forma éstos a través de una serie de reacciones, las cuales comienzan con la condensación de una unidad iniciadora (acetato) con una unidad extendidora (malonato). El β -ceto éster resultante es entonces totalmente procesado (reducido, rehidratado y reducido una vez más) para dar una cadena de ácido graso saturada y elongada. Para llevar a cabo tales operaciones, FAS requiere de un grupo de actividades catalíticas, donde cada actividad llega a ser responsable de una etapa en un ciclo de reacciones. Por tanto, malonilacetiltransferasa (MAT) lleva a cabo la transferencia tanto de la unidad iniciadora (acetil) así como de las unidades extensión de la cadena (malonil), de sus respectivos derivados de coenzima A a tioles específicos de la sintasa; β -cetoacil sintasa (KS) y la proteína acarreadora de acilo (ACP) para la elongación de la cadena; β -cetoreductasa, deshidratasa (DH), y enoil reductasa (ER) para el procesamiento reductivo de grupo β -ceto; y tioesterasa (TE) para la liberación de la cadena total.

Las proteínas que constituyen FAS se encuentran organizadas de diferentes maneras, dependiendo del organismo. En un extremo de su complejidad, encontrada en bacterias, las actividades individuales denominadas dominios pueden ser libremente disociadas y aisladas de forma separada. Por el otro extremo, en animales o levaduras, los dominios se encuentran unidos estrechamente por pequeños péptidos lo cual forma proteínas multidominios no disociables.

Las sintasas disociables son designadas "tipo II" y las proteínas multidominio son designadas "tipo I", tal nomenclatura utilizada en las FAS ha sido adoptada en la actualidad para las PKS.

La secuencia de dominios del extremo amino al carboxilo terminal de FAS (tipo I) es KS, MAT, DH, ER, KR, ACP y TE. Existe también una serie de aminoácidos entre los dominios DH y ER, los cuales no parecen tener una actividad catalítica específica y por tanto sólo se les ha designado un papel estructural (figura 7) [Stauton y Wilklnson, 1997].

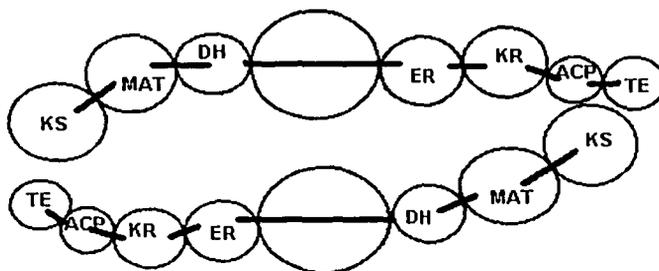


Fig. 7: Modelo lineal "cabeza cola" para la sintetasa de ácidos grasos (FAS). KS, cetoacil sintasa; MAT, malonil acetil transferasa; DH, deshidratasa; ER, enoil reductasa; KR, ceto reductasa; ACP, proteína acarreadora de acilo; TE, tioesterasa. Entre los dominios DH y ER existen una cantidad de aminoácidos los cuales parecen no tener una actividad catalítica y por tanto proporcionan las características estructurales, topológicas y de cooperación al complejo multienzimático [Stauton y Wilklnson, 1997].

III.7 Genes que codifican para la PKS de ErA

Los primeros estudios para determinar la estructura de la PKS comenzaron a partir de la secuencia de los genes correspondientes por medio de la interrupción de los mismos. Esta estrategia fue primeramente descrita por Hopwood y col, 1997; quienes localizaron y secuenciaron los genes responsables de la PKS para la formación del antibiótico actinorodina. Esta misma tecnología fue adoptada por muchos grupos interesados en el estudio de las PKS. De esta manera, los genes que codifican para la ruta biosintética

de la ErA fueron localizados muy cerca del gen que codifica para la resistencia a la misma, *ermE* (figura 8) [Bibb *et al.*, 1985; Caffrey *et al.* 1992; Bibb *et al.*, 1995]. A cada lado de *ermE* existen regiones de DNA que contienen marcos de lectura abierta (ORFs) que codifican para proteínas no PKS, responsables de la segunda etapa de la biosíntesis [Gaisser *et al.*, 1997] (figura 4). Tales genes han sido confirmados mediante interrupción genética obteniendo mutantes que generan sólo los compuestos intermediarios (figura 5).

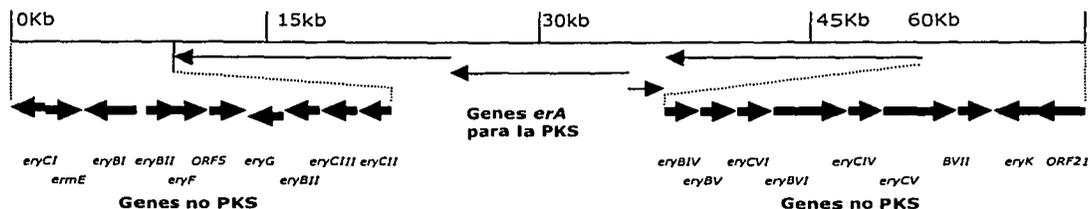


Fig. 8: Organización genómica de las regiones que contienen los genes asociados con las etapas tardías en la biosíntesis de ErA. Los genes *eryA* que codifican para PKS del tipo I responsable de la formación del anillo macrólido, el gen *ermE* que codifica para la determinante de resistencia Er, el gen *eryG* que codifica para EryG, la micarosil 3" -O-metiltransferasa [Paulus *et al.*, 1990], *eryF* y *eryK* que codifican para P-450 hidroxilasas (EryF y EryK) [Andersen y Hutchinson, 1992; Gaisser *et al.*, 1997; Lambalot *et al.*, 1995; Satassi *et al.*, 1993] las cuales actúan en las posiciones de C-6 y C-12 del anillo macrólido respectivamente. También se encuentran en este grupo los genes *eryB* responsables de la síntesis y unión de L-micarosa y D-desosamina [Martín y Liras, 1989; Summers *et al.*, 1997; Gaisser *et al.*, 1998].

El análisis de las secuencias río arriba de *ermE* reveló tres grandes ORFs (*eryAI*, *eryAII* y *eryAIII*) de los cuales cada uno codifica para una proteína multifuncional de un gran tamaño (>3000 aminoácidos). Estos ORFs fueron denominados DEBS 1, DEBS 2 y DEBS 3, respectivamente y codifican para la PKS de eritromicina [Cortés *et al.*, 1990; Donadio *et al.*, 1990; Katz y Donadio., 1993; Tuan *et al.*, 1990; Donadio y Katz, 1992].

En representaciones lineales de la secuencia primaria de las proteínas, se ha observado mediante un análisis por homología que existen dominios con actividades catalíticas específicas. Tales dominios se encuentran unidos por cadenas cortas de aminoácidos, los cuales proporcionan las características estructurales, topológicas y de cooperación al complejo multienzimático (figura 7). Tomando las tres proteínas juntas, el número de dominios de cetosintasas (KS) es seis, lo cual permite una KS independiente para cada ciclo de

extensión de la cadena. A continuación de cada KS existe un grupo de dominios adicionales para un ciclo de extensión de la cadena, tal grupo se encuentra constituido por dos dominios esenciales, aciltransferasa (AT) y proteína acarreadora de acilo (ACP) , además de un grupo de dominios opcionales, ceto-reductasa (KR), deshidratasa (DH) y enoil-reductasa (ER), para la modificación de un nuevo grupo ceto. Se ha observado que las actividades se encuentran organizadas en seis "módulos" (dos por proteína), cada uno de los cuales es capaz de llevar a cabo una etapa de condensación utilizando tres dominios esenciales seguido de una apropiada modificación del grupo ceto en el ceto éster recién formado. El último módulo (DEBS 3) se encuentra seguido por una actividad tioesterasa la cual cataliza la lactonización de la cadena de policétido y libera el macrólido de la enzima. Al inicio de la primera proteína, DEBS 1, existe un módulo de carga constituido por los dominios aciltransferasa (AT-L) y proteína acarreadora de acilo (ACP-L) para la unidad iniciadora (propionato). Utilizando tecnología de DNA recombinante se construyeron varias mutantes de *S. erythraea* deficientes en la actividad de AT-L, ACP-L o ambas. Las cepas resultantes fueron capaces de producir eritromicina, aunque en niveles mucho más bajos que la cepa silvestre. Estos hallazgos indicaron que ni el dominio inicial AT-L ni el dominio ACP-L son requeridos para iniciar la biosíntesis de eritromicina; sin embargo en ausencia de estos dominios la eficiencia de la biosíntesis disminuye significativamente [Pereda *et al.*, 1998].

El módulo 4, contiene el grupo completo de dominios reductivos requeridos para formar un grupo metileno. De acuerdo al análisis modular, cada proteína cataliza dos ciclos de extensión de la cadena. El término "cassette" ha sido propuesto para proteínas gigantes, de tal manera que los tres cassettes presentes en la producción de eritromicina son bimodulares, sin embargo, en otros sistemas, tales como las PKS's de rifampicina y tilosina, el tamaño del cassette puede variar de uno a seis módulos de extensión de la cadena. Los tres cassettes cooperan de alguna manera formando una línea de ensamblado molecular extraordinariamente complejo (figura 9).

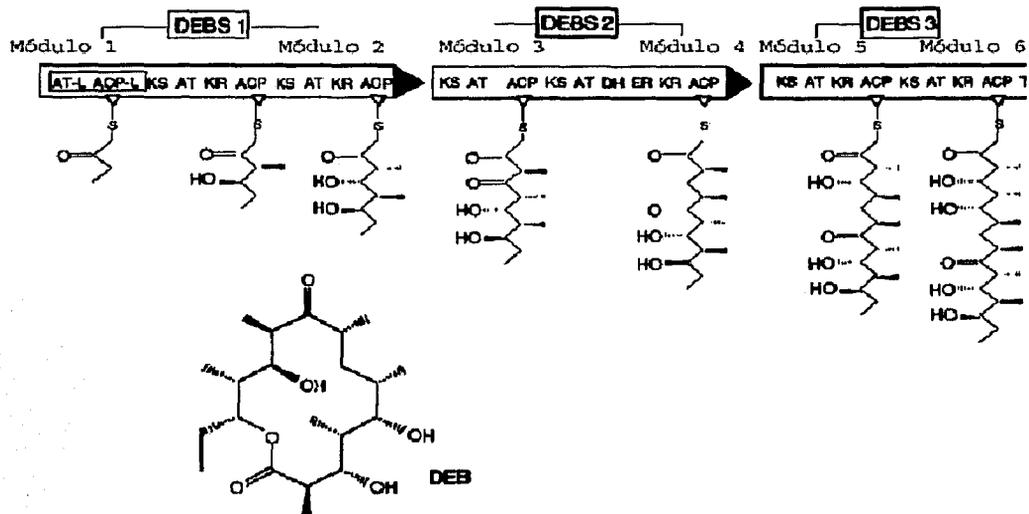


Fig. 9: Organización modular de las tres proteínas codificadas por los genes *eryA*. Cada módulo contiene las funciones enzimáticas, como dominios separados, para cada uno de los ciclos de elongación requeridos en la formación del 6-DEB. Estos incluyen el dominio β -cetoacil-ACP sintasa (KS), el dominio aciltransferasa (AT) y el dominio de la proteína acarreadora de acil (ACP). También se pueden encontrar β -cetoreductasa (KR), deshidratasa (DH) y los dominios enoil reductasa (ER), responsables de los diferentes grados de reducción de los grupos β -carbonilo, formados después de cada etapa de condensación. En suma, los DEBS comprenden 28 actividades enzimáticas, cada una dedicada a un único evento catalítico [Donadio *et al.*, 1990; Donadio y Katz, 1992]

III.8 Rutas de formación de P-CoA y MM-CoA

El metabolismo primario de los microorganismos involucra reacciones catabólicas y anabólicas lo que resulta en un incremento de la biomasa; es decir, las reacciones que permiten la producción de energía y poder reductor, necesario para sintetizar los bloques de construcción de proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y polisacáridos estructurales, además de materiales de almacenamiento. El metabolismo secundario por otro lado, resulta en la síntesis de metabolitos que parecen tener una función posterior en el metabolismo. Debido a ésto los actinomicetos han sido extensamente estudiados principalmente por la importancia biotecnológica de sus productos de metabolismo secundario.

Existe mucha información disponible en el estudio de la acción de PKS [Staunton y Wilkinson, 1997; Hopwood, 1997], sin embargo no se ha logrado aumentar la producción del antibiótico llevando a cabo una manipulación de genes individuales. Estudios anteriores han demostrado que la formación del anillo lactónico de la ErA se encuentra limitada por la disponibilidad de los precursores provenientes del metabolismo primario tales como MM-CoA y P-CoA, a pesar de ésto, los procesos que operan durante la transición de metabolismo primario al metabolismo secundario no han sido del todo descritos. En actinomicetos, el P-CoA y el MM-CoA tienen diversos orígenes metabólicos como son: el catabolismo de ácidos grasos de número impar, el rearrreglo del succinil-CoA y el catabolismo de los aminoácidos metionina, treonina o valina [Tang *et al.*, 1994; Vrijbloed *et al.*, 1999; Wallace *et al.*, 1995] (figura 10).

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

carboxilasa (PCC), [Hunaiti y Kolattukudy, 1984a; Hunaiti y Kolattukudy, 1982, Donadio *et al.*, 1996].

Otros estudios han demostrado que solamente el enantiómero (2-S) de MM-CoA es reconocido por la PKS que interviene en la formación de la eritromicina [Marsden *et al.*, 1994]. Además, varias rutas han sido establecidas para la producción de MM-CoA, por ejemplo, el enantiómero (2-R) es un producto del catabolismo de valina, o puede ser derivado de succinil-CoA, mientras que el enantiómero (2-S) puede resultar de la carboxilación del P-CoA lo cual apoyaría la formación de MM-CoA a través de la acción de la propionil-CoA carboxilasa (figura 10). Sin embargo, se ha observado la incorporación de acetato y piruvato a través de succinil-CoA en MM-CoA y finalmente dentro de la eritromicina. También la incorporación directa de succinato ha sido demostrada [Fiedman *et al.*, 1964].

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

El estudio de otras rutas metabólicas que permiten la formación del MM-CoA y etilmalonil-CoA en actinomicetos han demostrado que el catabolismo de valina y el metabolismo del butirato juegan un papel importante en proveer los precursores para la biosíntesis de antibióticos policétidos [Liu y Reynolds, 1999; Tang *et al.*, 1994; Vrijbloed *et al.*, 1999].

El catabolismo de valina en mamíferos procede a través de isobutiril-CoA, ácido β -hidroxibutírico y ácido semialdehído metilmalónico para después ser convertido en MM-CoA por medio de la propionil-CoA carboxilasa (Ruta A en la figura 10) que previamente ha sido demostrada en *S. erythraea* [Kamoun, 1992, Donadio *et al.*, 1996]. En actinomicetos la operación de esta

ruta se ha sugerido debido a la clonación reciente del gen (*msdA*) que codifica para la ácido semialdehído metilmalónico deshidrogenasa de *Streptomyces coelicolor* [Zhang *et al.*, 1996], sin embargo no existen reportes de la presencia o ausencia de dicho gen en otras especies de microorganismos productores de antibióticos incluyendo *S. erythraea*.

El etilmalonil-CoA, el cual es utilizado como una unidad de extensión para la biosíntesis de antibióticos policétidos tales como monensina A y tilosina, parece ser derivado únicamente de la carboxilación del butiril-CoA [Liu y Reynolds, 1999; Vrijbloed *et al.*, 1999]. Al menos dos rutas han sido encontradas en actinomicetos que permiten la formación del butiril-CoA y por tanto de etilmalonil-CoA. Una ruta involucra la isomerización del catabolito de valina, isobutiril-CoA, en butiril-CoA por una reacción catalizada por la isobutiril-CoA mutasa (ICM) [Ratnatilleke *et al.*, 1999]. La segunda ruta inicia con la condensación de dos unidades de acetato para producir el crotonil-CoA que después es transformado en butiril-CoA por medio de una reacción catalizada por la crotonil-CoA reductasa [Liu y Reynolds, 1999]. La interconversión de butiril-CoA e isobutiril-CoA se cree que juega un papel clave en conectar el catabolismo de valina con el metabolismo de butirato y que por tanto derivado de ambas rutas se puede generar el MM-CoA mediante una ruta semejante a la encontrada en mamíferos (figura 10).

Recientemente se clonó el gen (*ccr*) que codifica para la crotonil-CoA reductasa (CCR) a partir de *Streptomyces cinnamonensis*, un productor de monensina A [Liu y Reynolds, 1999]. El papel de CCR en proveer etilmalonil-CoA un precursor para la biosíntesis de monensina A, fué establecido mediante el análisis de una mutante interrumpida en el gen *ccr*, dicha mutante mostró que el catabolismo de valina es más significativo en proveer de butiril-CoA que el papel de la crotonil-CoA reductasa.

La CCR fue inicialmente purificada de *S. collinus* y el gen correspondiente fue encontrado dentro de un grupo de genes implicados en la asimilación de acetato. Un grupo similar de genes ha sido recientemente identificado en *S. cinnamonensis* y *S. coelicolor* [Liu y Reynolds, 1999; Redenbach *et al.*, 1996]. Sin embargo, experimentos de hibridación tipo

Southern encaminados a encontrar el gen *ccr* en *S. erythraea* no mostrarón la presencia de dicho gen, lo que sugiere que el MM-CoA no se genera a partir de unidades de acetato vía CCR [Stassi *et al.*, 1998].

Por otro lado, experimentos de incorporación de ¹³C-acetato de la cepa de *S. cinnamonensis* interrumpida en el gen de *ccr*, indicaron la presencia de una enzima adicional dependiente de vitamina B₁₂ que codifica para una nueva mutasa [Liu y Reynolds, 2001]. Mas tarde, el gen *meaA* de *S. cinnamonensis* fue clonado y se encontró que codifica para una mutasa dependiente de vitamina B₁₂ de 74KDa con un 40% de homología a la MCM del mismo microorganismo [Zhang y Reynolds, 2001]. Hasta la fecha se desconoce si dicha enzima se encuentra presente en *S. erythraea*.

Estudios experimentales en *S. erythraea* han demostrado que la producción de eritromicina se afecta tanto por parámetros fisiológicos como nutricionales, tales como la fuente de carbono, nitrógeno, fosfatos y la temperatura [Bermúdez *et al.*, 1998; Flores y Sánchez, 1985]. A pesar de que ha existido un rápido incremento en el conocimiento de la genética molecular del metabolismo secundario, incluyendo muchos sistemas y la caracterización de genes regulatorios y sus productos, poco se ha investigado acerca de la disponibilidad de precursores suficientes para producir el antibiótico. En este sentido, se sabe que los iones amonio disminuyen la biosíntesis de tilosín y de espiramicina, por interferencia con el catabolismo de aminoácidos tales como valina, treonina, leucina e isoleucina [Vu-Trong y Gray, 1987; Shapiro y Vining, 1983; Untrau, *et al.*, 1994]. Bajo estas condiciones estos aminoácidos no producen suficientes precursores tales como acetato, propionato e isobutirato para ser utilizados en la formación del anillo aglicona. Por otro lado, estudios previos en *S. erythraea* CA340 mostraron que no se utilizan la valina, la metionina ni el triptofano, como fuentes de nitrógeno para crecimiento y por lo tanto el P-CoA no puede generarse a partir de valina o metionina, comprobando así que la descarboxilación de MM-CoA es la única vía de formación de P-CoA [Bermudez *et. al* 1998].

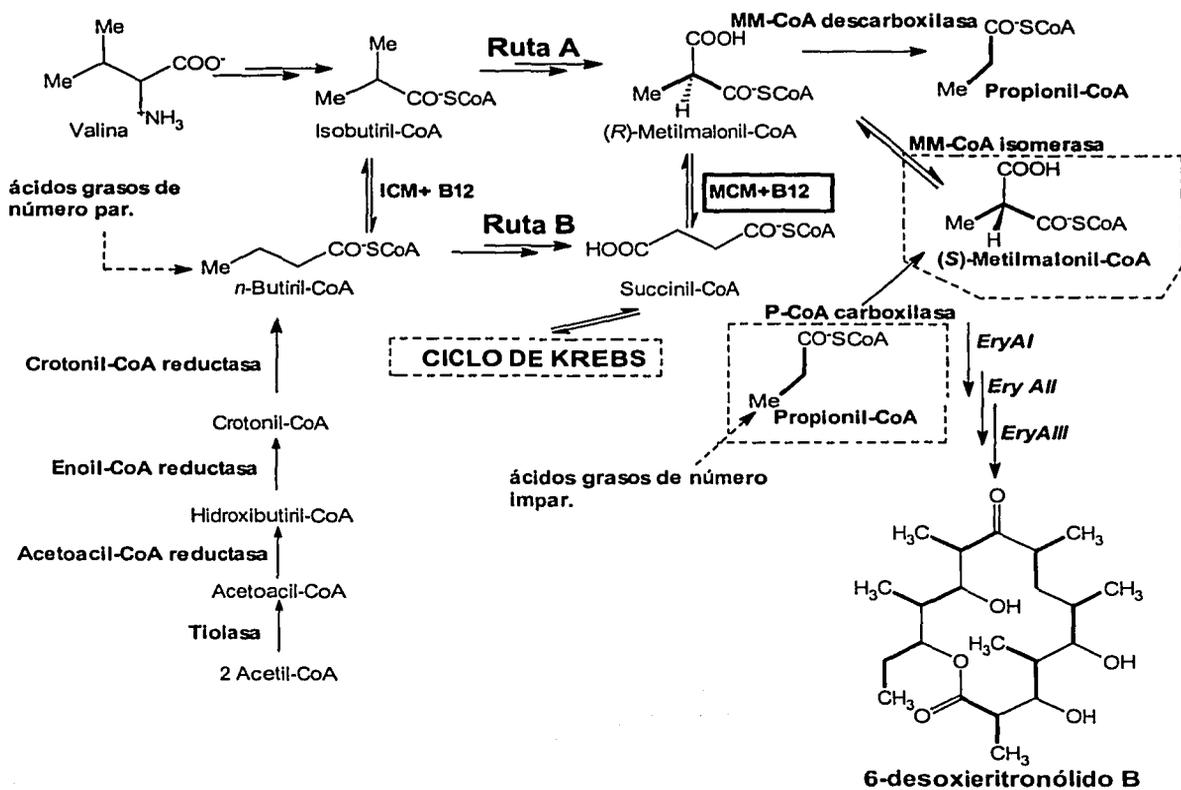


Fig. 10: Rutas de formación del P-CoA y MM-CoA en actinomicetos. Las rutas involucradas son: catabolismo de valina, catabolismo de los ácidos grasos de número par e impar, formación de butyryl-CoA a partir de dos unidades de acetato y rearreglo del succinil-CoA proveniente del ciclo de Krebs. El *n*-butyryl-CoA puede ser isomerizado a isobutyryl-CoA por una reacción catalizada por la enzima dependiente de vitamina B₁₂, isobutyryl-CoA mutasa (ICM). Una posibilidad consistente con el marcaje con ¹³C, es la oxidación directa de isobutyryl-CoA en varias etapas enzimáticas (**RUTA A**) para dar MM-CoA. Otra posibilidad es que el *n*-butyryl-CoA pueda ser oxidado en C4 (oxidación ω) después de varias etapas sin fragmentación para dar succinil-CoA, el cual entonces puede ser convertido en MM-CoA por la metilmalonyl-CoA mutasa (MCM) (**RUTA B**). Las rutas conocidas para formar MM-CoA incluyen la carboxilación de P-CoA, catalizada por la propionil-CoA carboxilasa (P-CoA carboxilasa) y la isomerización de succinil-CoA a MM-CoA por la MCM. A su vez el P-CoA puede ser obtenido del catabolismo de los ácidos grasos de número impar o por descarboxilación del MM-CoA por medio de la enzima MM-CoA descarboxilasa. Finalmente el 6-DEB es obtenido a partir de la condensación de 6 unidades de MM-CoA y una unidad de P-CoA mediante el complejo PKS codificado por el grupo de genes *eryAI*, *eryAII* y *eryAIII*.

III.9 Metilmalonil-CoA mutasa

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

La conversión de succinil-CoA a 2(*R*)-MM-CoA es catalizada por una enzima dependiente de adenosilcobalamina (AdoCbl) denominada metilmalonil-CoA mutasa (MCM, EC 5.4.99.2) (figura 11).

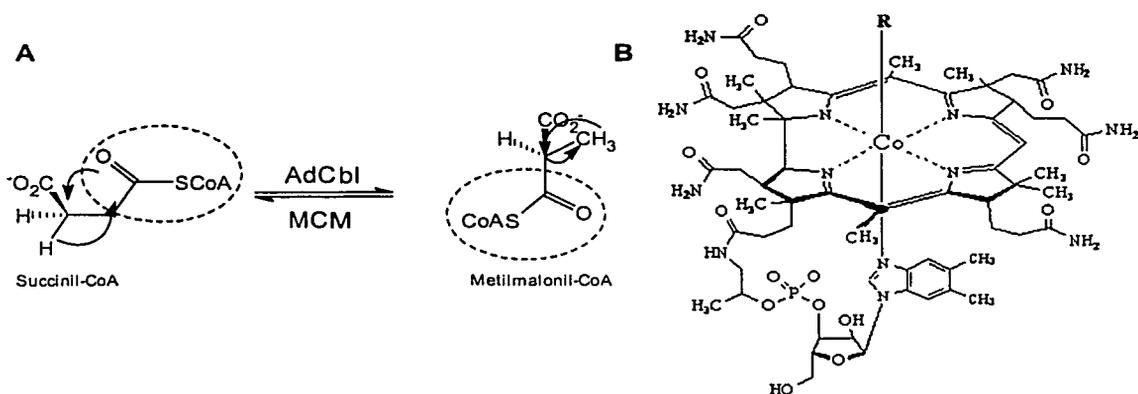


Fig. 11: Reacción catalizada por la MCM y estructura de la adenosilcobalamina. A. El rearrreglo involucra un cambio en las posiciones del hidrógeno así como al grupo -CSCoA. El carbono del carbonilo migra al pro-(*S*) grupo metilo y es reemplazado por un átomo de hidrógeno reteniéndose la configuración durante la reacción. **B.** Estructura del cofactor vitamina B₁₂ o adenosilcobalamina (AdCbl). El átomo de cobalto se encuentra coordinado en forma planar con cuatro átomos de nitrógeno provenientes de una estructura en forma de anillo de tetrapirrol reducido; este macrociclo se encuentra ramificado por grupos metilo y con grupos laterales acetamida (arriba) y grupos laterales propionamida (abajo) [Ludwing y Matthews, 1997].

Los genes que codifican para MCM de *Propionibacterium shermanii* [Marsh y Leadlay, 1989], de humanos [Jansen *et al.*, 1989], de ratón [Wilkemeyer *et al.*, 1990], de *Escherichia coli* [Roy y Ladlay, 1992], de *Porphyromonas gingivalis* W50 [Jackson *et al.*, 1995], *Nocardia corallina* [Valentin y Dennis, 1996], *Euglena gracilis* Z [Watanabe *et al.*, 1996] y *Sinorhizobium meliloti* [Trevor y Punita, 1999] se han clonado y secuenciado. Sin embargo, a la fecha los únicos genes que codifican para la MCM de microorganismos productores de antibióticos que han sido clonados son de *S. cinnamomensis*, un productor de monensina A [Birch *et al.*, 1993] y de *Amycolaptosis mediterranei* U32 un productor de rifampicina [Weiwen *et al.*, 1999].

El análisis de la secuencia los aminoácidos de las MCMs muestra una considerable similitud entre diferentes organismos. En mamíferos, la MCM se encuentra formada por un homodímero de aproximadamente 80KDa codificado por un único gen. En *S. cinnamomensis*, la MCM es una proteína heterodimérica formada por una subunidad menor de 616 aminoácidos y 65 KDa y una subunidad mayor de 733 aminoácidos y 79 KDa. Tales subunidades son codificadas por los genes *mutA* y *mutB* respectivamente. En este mismo microorganismo, adyacentes a los genes *mutA* y *mutB* se encontraron dos ORF's incompletos, (ORFC y ORFD), en donde el ORFC inmediatamente río abajo del gen *mutB*, mostró una secuencia típica de unión a ribosoma, sin embargo la secuencia no presentó una similitud consistente con alguna proteína en el banco genético de datos (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Mas tarde, la secuencia de un gen de 0.8Kb en *E. coli* designado *orf2*, adyacente al gen *sbm* que codifica para la MCM, mostró un 75% de similitud en aminoácidos al ORFC encontrado en *S. cinnamomensis*. [Roy y Ladlay, 1992] (figura 12).

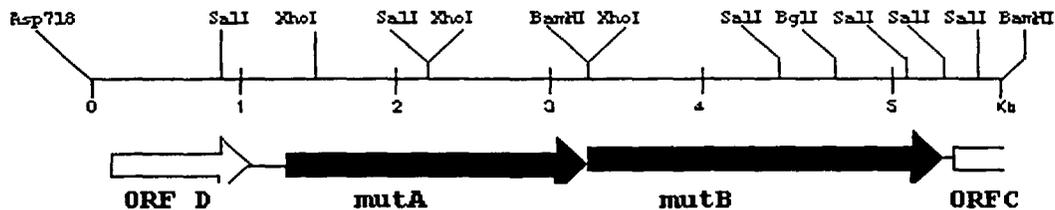


Fig. 12: Organización genómica y mapa de restricción de la región que codifica para la MCM de *S. cinnamonensis*. Se muestran las posiciones y orientaciones de los cuatro ORFs identificados a partir de la secuencia de nucleótidos [Birch *et al.*, 1993].

La MCM de *S. erythraea* ha sido parcialmente purificada a partir de extractos libres celulares de este microorganismo y mostró una banda principal con un peso molecular de 63 KDa en geles de poliacrilamida y dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE), sin embargo no se describió la composición de subunidades debido a su inestabilidad [Hunaiti *et al.*, 1984a]. Actualmente no se encuentra reportada la secuencia del gen o los genes que codifican para MCM de *S. erythraea* CA340. Por tanto, la clonación y secuencia de tales genes permitiría llevar a cabo estudios posteriores de inactivación génica mediante inserción y de sobreexpresión con la finalidad de determinar la influencia de MCM en proveer de los precursores suficientes para la biosíntesis del antibiótico eritromicina A.

IV. Hipótesis

Debido a que existen secuencias altamente conservadas en los genes que codifican para la metilmalonil-CoA mutasa (MCM) de diferentes organismos, es posible obtener una sonda genómica de *S. erythraea* CA340 mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), usando oligonucleótidos para la subunidad mayor (*mutB*). Esta sonda nos permitirá llevar a cabo la búsqueda e identificación de los genes de la MCM en una biblioteca parcial del genoma de *S. erythraea* en *Escherichia coli* JM109.

V. Objetivo

Clonar, secuenciar y caracterizar los genes que codifican para la metilmalonil-CoA mutasa de *Saccharopolyspora erythraea* CA340, así como comparar la secuencia de aminoácidos deducida con las secuencias previamente reportadas de otros organismos.

VI. Materiales y métodos

VI.1 Cepas y condiciones de cultivo

Las cepas utilizadas en este trabajo fueron: *Saccharopolyspora erythraea* CA340, la cual fue obtenida de los laboratorios Abbott y fue mantenida en cajas con agar YEMES que contenían por litro: 4g de extracto de levadura, 10g de extracto de malta, 4g de sacarosa y 15g de agar. *Escherichia coli* JM109 (*recA1 endA1 girA96 thi hsdR17(rK⁻ mK⁺) supE44 Δ(lac-proAB) relA1 [F' traD36 proAB⁺ lacIqZΔM15] λ⁻*) y *E. coli* DH5α (*F⁻ ΔlacU169 (ϕ80/lacZΔM15) endA1 hsdR17 deoR supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ⁻*) ambas cepas fueron mantenidas en medio LB y agar LB y fueron utilizadas para los experimentos de clonación y propagación de los plásmidos de acuerdo a los protocolos estándar [Sambrook *et al.*, 1989].

VI.2 Purificación del DNA genómico de *S. erythraea* CA340

Para aislar y purificar el DNA genómico se preparó un matraz con 100 ml de medio YEMEG que contenía por litro: 4g de extracto de levadura, 10g de extracto de malta y 4g de glucosa. Posteriormente se le adicionó glicina al 0.5% y se inoculó con esporas de *S. erythraea* CA340. El medio inoculado se incubó a 29°C con agitación a 200 rpm durante 48h [Hopwood *et al.*, 1995]. El cultivo fue recuperado por centrifugación a 10000 rpm durante 10 min a 4°C en una centrifuga Sorvall RC5B y un rotor SS34. El micelio se lavó dos veces con 25 ml de sacarosa al 10.3% estéril y se resuspendió en 10 ml de amortiguador TE (Tris-HCl 10mM pH 8.0, EDTA 1mM) con lisozima (1mg/ml). Se incubó durante 1h a 30°C y finalmente se añadió 1ml de SDS (dodecilsulfato de sodio) al 20%. La solución anterior se agitó suavemente e inmediatamente se realizaron dos extracciones con 10 ml de fenol saturado con TE y dos más con cloroformo. A la fase acuosa se le añadió un volumen equivalente de isopropanol y se recuperó el DNA de la interfase con ayuda de una pipeta pasteur estéril.

El DNA se disolvió en un volumen mínimo de TE y se trató con RNAasa A libre de DNAasa a una concentración final de 20 µg/ml durante 1h a 30°C, al final de este tiempo se añadió proteinasa K a una concentración 100 µg/ml y se incubó durante 1h a 37°C. Posteriormente se realizaron dos extracciones con fenol saturado de TE y dos más con cloroformo y el DNA se precipitó con 2.5 volúmenes de etanol absoluto y 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3M. El DNA se disolvió en un volumen mínimo de TE y se determinó su pureza y cantidad mediante la relación de lecturas de absorbancia a 260 y 280nm, utilizando un espectrofotómetro Shimadzu UV 1201. La solución de DNA genómico se almacenó a 4°C. Los procedimientos de electroforesis del DNA en agarosa fueron realizados de acuerdo a los protocolos estándar usando TAE 1X como amortiguador de corrida [Sambrook *et al.*,1989]. La lisozima, proteinasa K y RNAasa A fueron obtenidas de Roche Molecular Biochemicals. El isopropanol, fenol saturado de TE y cloroformo fueron obtenidos de Sigma Chemical Co.

VI.3 Amplificación de la secuencia parcial del gen *mutB*

Para obtener la sonda, parte del gen de la subunidad mayor de MCM (*mutB*) fue amplificado mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando el DNA genómico previamente purificado de *S. erythraea* CA340 como templado. La amplificación se realizó durante 30 ciclos en un termociclador MJ Research Inc. PTC-100, usando los oligonucleótidos (*mut1* y *mut2*), previamente reportados para amplificar el gen *mutB* de *Nocardia corallina* que corresponden a las secuencias altamente conservadas en diferentes bacterias. [Valentin y Dennis, 1996].

mut1: 5'-gagtccaacgccttctacgc-3'

mut2: 5'-acgagcttcgcccagagc-3'

Los oligonucleótidos fueron obtenidos de GIBCO BRL. Los ciclos de amplificación consistieron de: 1 min a 95°C para la desnaturalización, 2 min a 55°C para el alineamiento y 3 minutos a 72 °C para extensión. Las mezclas de

reacción fueron preparadas usando un kit de PCR para secuencias con alto contenido en GC (GC-RICH PCR System®, Roche Molecular Biochemicals) de acuerdo a las condiciones siguientes: dNTP's, 200 μ M; oligonucleótido mut 1, 200 nM; oligonucleótido mut 2, 200 nM; DNA genómico, 500 ng; solución de resolución GC-RICH, 1M; amortiguador de PCR 5X / DMSO, 10 μ l; mezcla de enzimas, 1 μ l, (2 Unidades) y H₂O grado PCR para completar 50 μ l de la mezcla de reacción total. Una vez que finalizaron los ciclos, se tomó una alícuota de 10 μ l y se realizó un análisis por electroforesis en gel de agarosa al 0.7%, incluyendo el marcador de peso molecular XVII de 500 pb (Roche Molecular Biochemicals).

VI.4 Purificación, clonación y secuencia del fragmento amplificado

El fragmento amplificado por PCR fue analizado mediante electroforesis y posteriormente éste se purificó a partir de un gel de agarosa al 0.75% en amortiguador TAE, usando un kit de purificación de fragmentos de PCR (QIAquick Gel Extraction Kit, QIAGEN Inc., Chatsword. Calif.). Aproximadamente 100 ng del fragmento purificado fue clonado en el plásmido pMOSBlue, (Amersham Biotech), previamente digerido con *EcoRV* de acuerdo al protocolo proporcionado por esta compañía. Finalmente se transformaron *E. coli* JM109 competentes de con 10 μ l de la mezcla de ligación, la cual contenía: 20 ng del fragmento previamente tratado con el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I, 50 ng de vector pMOSBlue y 4 unidades de ligasa de T4. Las *E. coli* transformadas de fueron plaqueadas en agar LB que contenía: ampicilina, 150 μ g/ml; IPTG (isopropil β -D-tiogalactopiranosido), 10 mM; y X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indol- β -galactosido), 20 μ g/ml. Las cajas se incubaron a 37°C durante 16h. Se seleccionaron al azar cinco clonas positivas y se inoculó cada una de ellas en 5ml de medio LB con ampicilina (150 μ g/ml). Los plásmidos recombinantes correspondientes a cada clona se purificaron usando un kit de purificación de DNA plasmídico (QIAGEN. Mini plasmid purification kit) y posteriormente se realizó un análisis de restricción de estos plásmidos con las enzimas *NdeI* y *BamHI*.

El fragmento de DNA clonado en pMOS*Blue* para generar pMUT2 fue secuenciado en ambas direcciones por el método de dideoxiterminación de la cadena [Sanger *et al.*, 1977] usando los oligonucleótidos: T7-promoter (5' - ctaatacgaactcactataggg-3') y U-20 (5' -gttttcccagtcacgacggtt-3'), provenientes de las secuencias que flanquean el sitio múltiple de clonación (MCS) de pMOS*Blue*. La secuencia se realizó en un secuenciador ABI PRISM 310 (Perkin Elmer, Branchburg, NJ) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.

El análisis de la secuencia obtenida se realizó con ayuda del software de la base de datos del Centro de Información Biotecnológica (NCBI World Wide Web) disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> [Altschul *et al.*, 1997].

VI.5 Purificación y marca de la sonda

El plásmido pMUT2 fue digerido con las enzimas *Nde*I y *Bam*HI para liberar un fragmento de aproximadamente 640pb, el cual se purificó a partir de un gel de agarosa al 0.75% de acuerdo al procedimiento antes descrito. Aproximadamente 50 ng del fragmento *Nde*I-*Bam*HI fueron marcados utilizando un módulo de marcaje, *Gene images* random prime labelling module (Amersham Biotech.) con dUTP conjugado con fluoresceína. El DNA fue desnaturalizado durante 5 minutos a 100°C y puesto inmediatamente en hielo. La mezcla de reacción y las condiciones de incubación se llevaron a cabo de acuerdo al protocolo de manufactura proporcionado por el fabricante. Posteriormente la reacción se detuvo por la adición de EDTA con una concentración final de 20 mM. Finalmente la sonda marcada fue almacenada a -20°C protegida de la luz hasta que se utilizó en los experimentos de hibridación.

VI.6 Hibridación Southern

El DNA genómico de *S. erythraea* CA340 fue sujeto a digestión con las enzimas: *Bam*HI, *Hind*III, *Sac*I, *Eco*RI y *Bgl*II, todas ellas obtenidas de Roche Molecular Biochemicals y GIBCO BRL. Las mezclas de restricción consistieron de DNA genómico, 5 µg; amortiguador de restricción 10X de la enzima correspondiente, 2 µl; Enzima 5 U y H₂O desionizada estéril para dar un volumen final de 20 µl. Todas las reacciones se llevaron a cabo a 37°C durante 1h.

Las restricciones fueron analizadas mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.7% utilizando TAE 1X como amortiguador de corrida. Antes de llevar a cabo la transferencia, el gel fue procesado como sigue: 10 min, en HCl 250mM; 25 min, en NaCl 1.5M/NaOH 0.5M y 30 min en NaCl 1.5M/Tris-HCl 0.5M, pH 7.5. La transferencia se realizó por capilaridad a membranas de nylon Hybond-N+ (Amersham Biotech.) durante toda la noche usando 10xSSC como amortiguador de transferencia (1X SSC consiste de citrato de sodio 0.015M y NaCl 0.15M) [Sambrook *et al.*, 1989]. Al final de la transferencia el DNA fue fijado en las membranas usando un entrecruzador de DNA, UV Stratalinker 1800 (Stratagene) en modo automático a 1200 joules.

La hibridación se realizó durante toda la noche a 65°C, utilizando 50 ng de la sonda previamente marcada. La solución de pre-hibridación y de hibridación consistió de amortiguador de fosfatos 0.25M pH 7.2 y los lavados de astringencia consistieron de: 2 veces por 5min a temperatura ambiente con 2XSSC/1% SDS, 2 veces por 15min a 65°C con 2XSSC/0.1%SDS y 2 veces a temperatura ambiente con 1XSSC. Las bandas fueron reveladas con ayuda de un módulo de detección *Gene Images CDP-Star* (Amersham Biotech.) de acuerdo al protocolo de manufactura proporcionado, con la diferencia de que se utilizó 3% de albúmina sérica bovina en lugar del reactivo bloqueante.

VI.7 Producción de una biblioteca genómica parcial en pUC18

Los fragmentos de restricción de entre 11 y 20 Kb provenientes de la digestión del DNA genómico con *Bam*HI fueron seleccionados y purificados a partir de un gel de agarosa al 0.75%. Estos fragmentos fueron clonados en el plásmido pUC18 digerido y desfosforilado (Amersham Biotech, Núm. Acceso L09136) [Yanisch-Perron *et al.*, 1985; Veira y Messing, 1982]. Las reacciones de ligación contenían: fragmentos de DNA de 11 a 20 Kb, 50 ng; plásmido pUC18 digerido con *Bam*HI y desfosforilado, 0.7 ng; amortiguador de ligación 5X, 4 μ l; ligasa de T4, 2 U y H₂O desionizada estéril para dar un volumen final de 20 μ l. Todas las reacciones de ligación se llevaron a cabo durante 16 horas a 16°C. Posteriormente, *E. coli* JM109 competentes fueron transformadas con 10 μ l de la mezcla de ligación y fueron plaqueadas en agar LB que contenía: ampicilina, 150 μ g/ml; IPTG, 10 mM y X-gal, 20 μ g/ml. Finalmente las placas fueron incubadas durante toda la noche a 37°C.

VI.8 Experimentos de hibridación de colonias

La transferencia y la lisis de las colonias obtenidas de la sub-biblioteca genómica de *S. erythraea* CA340 fueron llevadas a cabo por los métodos estándar [Sambrook *et al.*, 1989]. Dicha transferencia se realizó a membranas de nylon Hybond-N+ (Amersham Biotech) y posteriormente la hibridación se realizó durante toda la noche a 65°C, utilizando 50 ng de la sonda previamente marcada. La solución de pre-hibridación y de hibridación fué amortiguador de fosfatos 0.25M pH 7.2 y los lavados de astringencia consistieron de: 2 veces por 15min a temperatura ambiente con 0.5SSC/0.1%SDS, 2 veces por 15min a 65°C con 2XSSC/0.1%SDS y 2 veces a temperatura ambiente con 1XSSC. Las clonas positivas fueron reveladas con ayuda de un módulo de detección *Gene Images* CDP-*Star* (Amersham Biotech.), de acuerdo al protocolo de manufactura proporcionado, con la diferencia de que se utilizó 3% de albúmina sérica bovina en lugar del reactivo bloqueante.

VII. Resultados y discusión

Los actinomicetos producen una gran cantidad de antibióticos de interés médico con características estructurales muy diversas, tales antibióticos son construídos mediante la condensación de unidades repetidas de manera similar a la condensación de los ácidos grasos. En la síntesis de eritromicina, uno de los principales bloques de construcción utilizados por la poliketido sintetasa (PKS) es el metilmalonil-CoA (MMCoA), cuya incorporación permite la formación del compuesto intermediario 6-desoxieritronólido B (6-DEB), el intermediario más importante de la ruta biosintética. En este sentido, el estudio sobre la disponibilidad de suficientes precursores (i.e MMCoA) para la construcción de dicho compuesto puede representar un punto clave para la síntesis y sobreproducción de eritromicina.

La conversión de succinil-CoA en MMCoA es catalizada por la enzima dependiente de adenosilcobalamina (AdCbl) metilmalonil CoA mutasa (MCM). Estudios previos de análisis metabólico realizados en el laboratorio de la Dra. Ma. Elena Flores del Instituto de Investigaciones Biomédicas, mostraron que en *S. erythraea* CA340 la formación de MMCoA procede principalmente a través de la acción de la MCM y por acción de la propionil-CoA carboxilasa en etapas tardías de crecimiento [Bermúdez *et al.*, 1998].

A la fecha no se encuentran reportadas las secuencias de los genes que codifican para la MCM de *S. erythraea* CA340 y por tanto poco se sabe sobre su regulación a nivel transcripcional. Es por eso que el objetivo principal de este trabajo fue clonar y secuenciar los genes que codifican para la MCM además de comparar la secuencia de aminoácidos deducida con la de otras metilmalonil-CoA mutasas previamente reportadas tanto de procariontes como de eucariontes y de esta manera discutir las implicaciones de estos hallazgos

VII.1 Purificación del DNA genómico de *S. erythraea* CA340

La primera etapa del desarrollo experimental de este trabajo fue obtener puro e íntegro el DNA genómico de *S. erythraea* CA340 y determinar su concentración y pureza. La integridad del DNA genómico se observó mediante electroforesis en gel de agarosa indicando que no hubo degradación del mismo en el proceso de purificación (figura 13). La pureza del DNA obtenido fue buena ya que la relación de absorbancias 260/280 fue de 1.8, lo que indica una baja cantidad de proteínas.

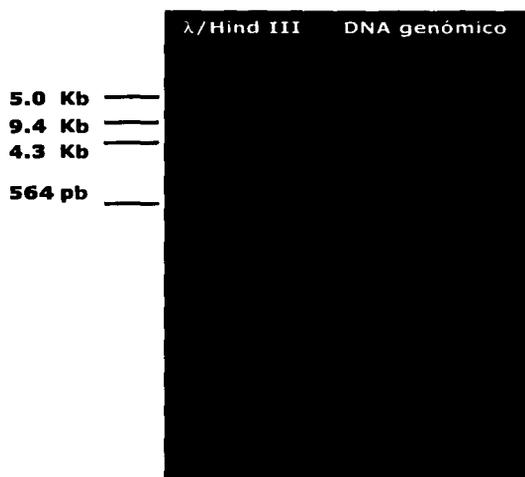


Fig. 13: Electroforesis en gel de agarosa del DNA genómico de *S. erythraea* CA340.

VII.2 Amplificación de la secuencia parcial de *mutB* mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para amplificar un fragmento del gen de la subunidad mayor de MCM de *S. erythraea* y obtener una sonda para la búsqueda de los genes de MCM en una sub-biblioteca genómica, se utilizaron los oligonucleótidos que previamente fueron utilizados para amplificar parte de la secuencia de *mutB* de *Nocardia corallina* [Valentin y Dennis, 1996]. Dichos oligonucleótidos designados mut 1 y mut 2 (ver materiales y métodos) se encuentran flanqueando una región altamente conservada de aminoácidos entre las subunidades mayores de las MCMs de diferentes organismos y comprenden un fragmento de 648 pb, dentro del gen *mutB* de *S. cinnamonensis* entre los nucleótidos 3,464 y 4,111 (Número de acceso en el GenBank L10064) [Birch *et al.*, 1993] (figura 14).

	111		130		331		350
Hum.	WTIRQYAGFS		TVEESNKFYK		KMRAGRRLWA		HLIEKMFQPK
Ratón	WTIRQYAGFS		TVEESNKFYK		KMRAGRRLWA		HLIEKMFQPK
S.c.	WTIRQYAGFS		TAEESNAFYR		KLRAARLLWA		KL.V.KQFDPK
A.m	WTIRQYAGFS		TAEESNAFYR		KLRAARLLWA		KL.V.KGFDPK
M.t	WTIRQYAGFS		TAADSNAFYR		KLRAARLLWS		ELV.AQFAPK
P.s.	WTIRQYAGFS		TAKESNAFYR		KLRAARMLWA		KL.V.HQFGPK
P.g	WTIRQYAGFS		TAEESNAFYR		KMRAARLLWA		KIV.KSFGAK
E.c	WTIRQYAGFS		TAKESNAFYR		MLRAARYLWS		EAV.SGFGAQ
M.e	WTIRQYAGHS		TAEESNKLYR		KMRAFAELWD		EIAQERYGIT

Fig. 14: Alineamiento múltiple de la secuencia parcial de MutB. Se muestran las secuencias de las regiones altamente conservadas (marcadas con recuadros y los aminoácidos numerados en la parte superior) de MCM de varios microorganismos y de MCM de humano y ratón. S.c, *S. cinnamonensis* (No. de acceso en GenBank L10064); A.m, *Amycolatopsis mediterranei* U32 (AF117980), M.t, *Mycobacterium tuberculosis* (Z79701); P.s, *Propionibacterium shermanii* (X14965); P.g, *Porphyromonas gingivalis* W50 (L30136); E.c, *Escherichia coli* gen *sbm* (X66836); M.e, *Methylobacterium extorquens* (U28335). Los secuencia traducida de los oligonucleótidos utilizados para amplificar parte de la secuencia del gen *mutB* de *S. erythraea* se encuentran subrayados.

La amplificación de la secuencia parcial del gen *mutB* se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando el DNA genómico de *S. erythraea* CA340 como templado. Los resultados proporcionaron un fragmento principal de aproximadamente 640 pb de acuerdo a lo esperado (figura 15). Dicho fragmento fue purificado a partir de un gel agarosa y posteriormente tratado con el fragmento Klenow de la DNA polimerasa para generar extremos rasos. Finalmente fue ligado en un sitio *EcoRV* del plásmido pMOS*Blue* para generar el plásmido recombinante designado como pMUT2, que fue usado para transformar *E. coli* DH5 α competentes.

Se seleccionaron al azar 5 clonas positivas y se purificaron los plásmidos para realizar un análisis mediante restricción utilizando los sitios adyacentes *NdeI* y *BamHI*, los cuales liberan el fragmento clonado dentro del sitio *EcoRV* de pMUT2 y de la misma manera limitar parte de la secuencia proveniente del vector, así mismo se realizó la amplificación del fragmento en pMUT2 utilizando los oligonucleótidos mut 1 y mut 2 con la finalidad de confirmar la existencia del fragmento en el plásmido recombinante. Todas las clonas seleccionadas resultaron positivas al contener el plásmido pMUT2 así como el fragmento clonado en éste (datos no mostrados).

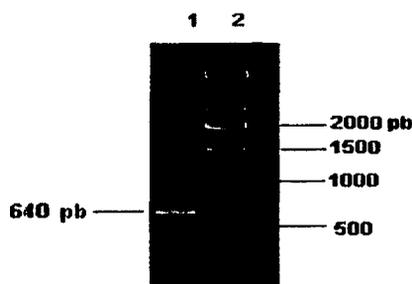


Fig. 15: Amplificación de la secuencia parcial de *mutB* de *S. erythraea* CA340. Electroforesis en gel de agarosa al 0.75% **1:** fragmento de 640 pb que resultó de la amplificación del DNA genómico utilizando los oligonucleótidos mut 1 y mut 2, **2:** Marcador de peso molecular de 500 pb (XVII) de Roche Molecular Bichemicals

Para asegurar que el fragmento de 640pb dentro de pMUT2 efectivamente formara parte de la secuencia de *mutB* y pudiera ser utilizado como sonda para la búsqueda de los genes de la MCM en una sub-biblioteca genómica, éste fue secuenciado en su totalidad y analizado con ayuda de un software de la base de datos del Centro de Información Biotecnológica (NCBI world wide web) disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> [Altschul *et al.*, 1997] así mismo se realizó un análisis de la secuencia para la búsqueda de sitios de restricción utilizando el programa Webcutter disponible en <http://www.firstmarket.com/cutter>.

La secuencia se llevó a cabo mediante el método de dideoxiterminación de la cadena [Sanger *et al.*, 1977] en ambas direcciones, utilizando los oligonucleótidos que flanquean el sitio múltiple de clonación de pMOS*Blue* además de cuatro oligonucleótidos obtenidos de la secuencia interna del fragmento (Ci1, Ci2, Cs1 y Cs2) con la finalidad de confirmar la secuencia de los oligonucleótidos mut 1 y mut 2.

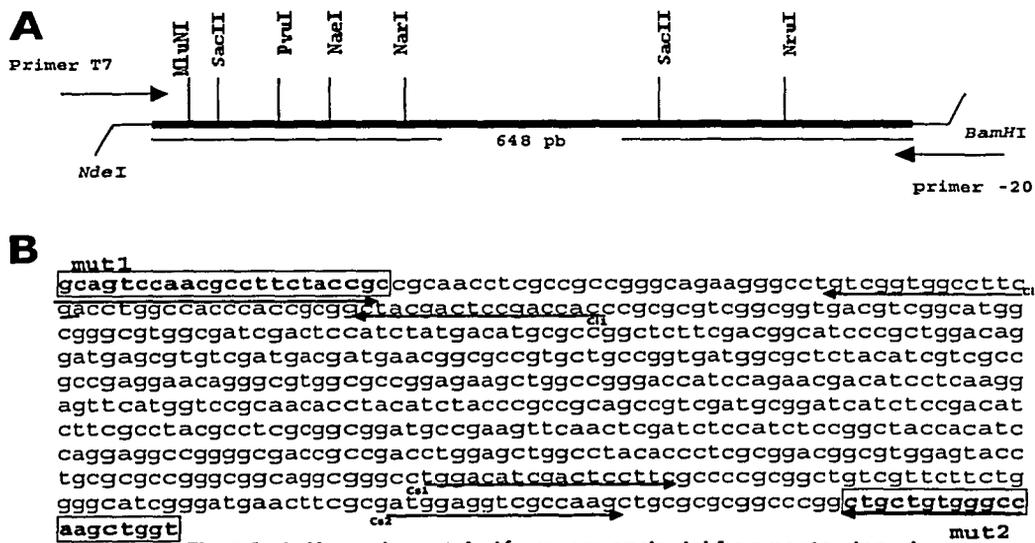


Fig. 16: A. Mapa de restricción y secuencia del fragmento clonado en pMOS*Blue* (i.e pMUT2) **B.** El fragmento de 648 pb fue secuenciado en su totalidad en ambos sentidos utilizando los oligonucleótidos que flanquean el sitio múltiple de clonación de pMOS*Blue*. En la secuencia se muestran los oligonucleótidos mut 1 y mut 2 utilizados en la amplificación (marcados en recuadros).

VII.3 Análisis de la secuencia del fragmento amplificado

El análisis de la secuencia de nucleótidos del fragmento amplificado mostró un contenido de G/C del 74%, lo cuál es típico para las secuencias de nucleótidos de *S. erythraea* CA340 previamente reportadas [Bibb *et al.*, 1984]. La secuencia de aminoácidos mostró un 88% de identidad con la subunidad mayor MutB de *S. cinnamonesis* [Birch *et al.*, 1993], 87% con MutB de *Mycobacterium tuberculosis* H37RV [Cole *et al.*, 1998] y 82 % con MutB de *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* [Marsh y Leadlay, 1989], por tanto estos resultados demostraron que el fragmento de 648 pb clonado en pMUT2 efectivamente forma parte de la secuencia de la subunidad mayor de MCM de *S. erythraea* CA340 y que puede ser utilizado como sonda para la búsqueda de los genes que codifican para la MCM en una sub-biblioteca genómica

VII.4. Hibridación tipo Southern

Para estimar el número de genes de MCM presentes *S. erythraea* CA340, así como para identificar los fragmentos necesarios para construir una sub-biblioteca genómica, el DNA fue cortado con varias enzimas de restricción y sujeto a un análisis por hibridación tipo Southern. El fragmento *NdeI/BamHI* de 648 pb proveniente de pMUT2 fue marcado con dUTP conjugado con fluoresceína y fue utilizado para los experimentos de hibridación, el revelado se llevó a cabo como lo describe materiales y métodos. La hibridación con los fragmentos de restricción generados con *BamHI*, *HindIII*, *SacI*, *EcoRI* y *BglII* proporcionaron una sola banda positiva entre 16 y 23 Kb, lo que sugieren la existencia de una copia del gen *mutB* en *S. erythraea* CA340 Por otro lado, los fragmentos de restricción con *BamHI* entre 11 y 20 Kb fueron seleccionados para construir una sub-biblioteca genómica en pUC18 (figura 17).

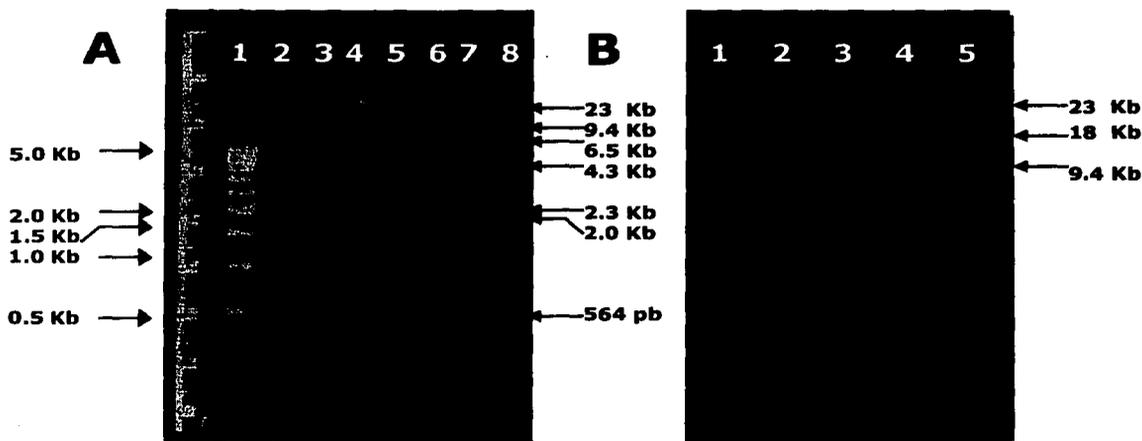


Fig. 17: Análisis por hibridación tipo Southern del DNA genómico de *S. erythraea* CA340. (A) 1, marcador XVII (ROCHE); 2, *Bam*HI; 3, *Bgl*II; 4, *Eco*RI; 5, *Hind*III; 6, *Sal*I; 7, DNA sin cortar; 8, marcador II (ROCHE). (B) Hibridación tipo Southern, 1, *Bam*HI; 2, *Bgl*II; 3, *Eco*RI; 4, *Hind*III y 5, *Sal*I.

VII.5. Construcción de una sub-biblioteca genómica de *S. erythraea* CA340

Para construir una sub-biblioteca genómica para la búsqueda de los genes que codifican para la MCM de *S. erythraea* CA340, se seleccionaron los fragmentos de restricción *Bam*HI (11 a 20 Kb) que dieron hibridación positiva para *mutB*. Tales fragmentos fueron purificados y ligados en un sitio *Bam*HI del plásmido pUC18 previamente digerido y desfosforilado (Amersham Biotech, Núm. Acceso L09136) [Yanisch-Perron *et al.*, 1985]. Los plásmidos recombinantes obtenidos se utilizaron para transformar bacterias competentes de la cepa *E. coli* JM109 de acuerdo a los protocolos estándar [Sambrook *et al.*, 1989]. De aproximadamente 1000 clonas obtenidas sólo 4 dieron una señal fuerte de hibridación usando como sonda el fragmento *Bam*HI/*Nde*I proveniente de pMUT2 (figura 18).

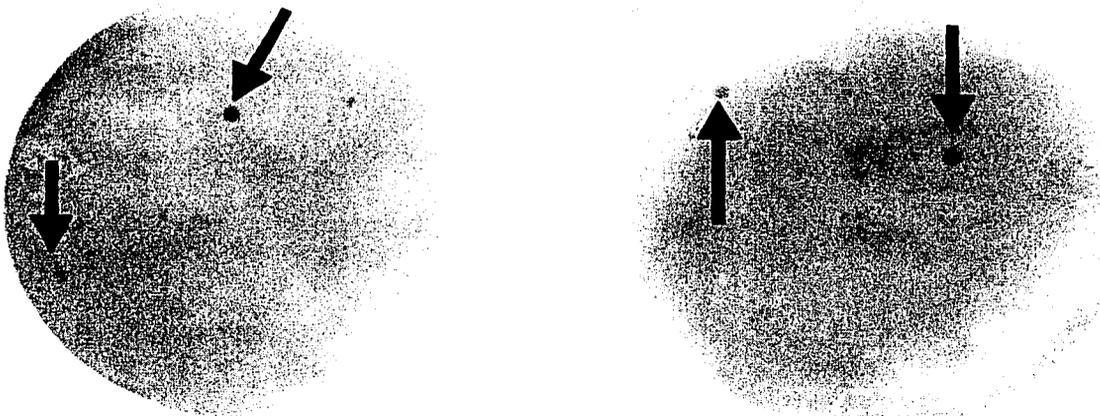
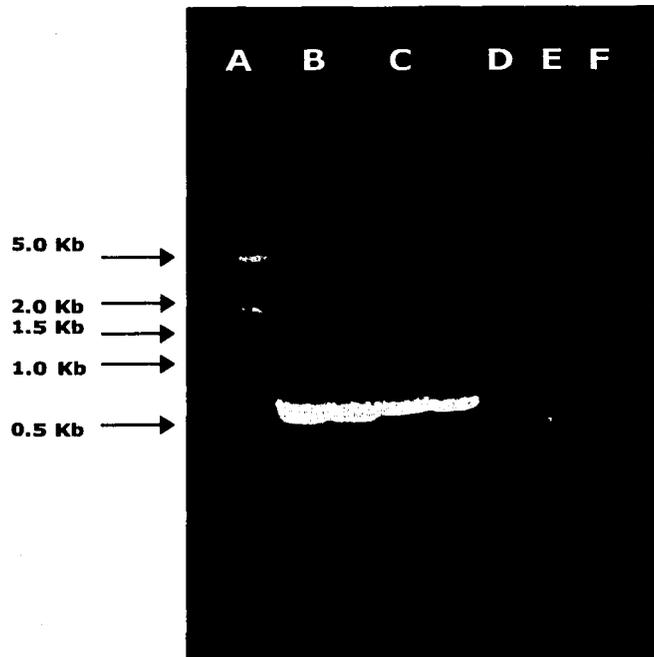


Fig. 18. Análisis mediante hibridación en placa de bacterias transformadas con pUC18 llevando fragmentos de 11 a 20 Kb *Bam*HI. El análisis se realizó usando como sonda un fragmento *Bam*HI/*Nde*I proveniente de pMUT2 que previamente fue utilizado en el análisis por hibridación tipo Southern.

Las clonas que dieron señal positiva de hibridación fueron seleccionadas y los plásmidos correspondientes fueron purificados y sujetos a un análisis mediante PCR usando los oligonucleótidos mut 1 y mut 2, que fueron previamente usados para amplificar parte de la secuencia del gen *mutB*, esto último con la finalidad de confirmar la existencia de los genes que codifican para la MCM dentro de los plásmidos. Las clonas que dieron una fuerte banda de amplificación de 648pb fueron designadas pMCM3⁺ y pMCM8⁺ (figura 19). Estos mismos plásmidos fueron analizados mediante restricción para examinar la existencia del mismo fragmento *Bam*HI en ambas clonas. Las enzimas utilizadas para llevar a cabo el análisis fueron: *Bam*HI, *Pst*I, *Xho*I y *Xma*I. El análisis de restricción usando *Bam*HI proporcionó un fragmento común para ambas clonas de aproximadamente 16.5 Kb. Estas mismas clonas presentaron

patrones de restricción iguales por lo que se concluyó que se trataba del mismo fragmento *Bam*HI clonado en ambos plásmidos. Posteriormente se llevó a cabo la secuencia de ambos extremos del fragmento usando los oligonucleótidos que flanquean el sitio múltiple de clonación de pUC18 (T7 gtaaaacgacggccagt y reverso gtcctttgtcgcgatactg). Una vez obtenida la secuencia de nucleótidos se realizó un análisis de la secuencia de aminoácidos en el banco de datos, lo que mostró la existencia de un posible ORF incompleto con un 45% de identidad a un regulador trascricional de la familia gntR de *S. coelicolor* A3 (2) [Redenbach *et al.*, 1996] (Núm. acceso CAB50943) adyacente al oligonucleótido reverso. Por otro lado, la secuencia de aminoácidos adyacente al oligonucleótido T7, no mostró ninguna similitud con las secuencias disponibles en la base de datos. Tales resultados sugirieron que el fragmento de 16.5 Kb clonado en pUC18 (i.e. pMCM8⁺) contenía en la parte interna los genes que codifican para la MCM.

Fig. 19: Análisis mediante PCR usando los oligonucleótidos mut1 y mut2 de las clonas positivas provenientes de la sub-biblioteca genómica de *S. erythraea* CA340 en pUC18. A, marcador de peso molecular XVII (ROCHE); B, MCM8⁺; C, MCM3⁺; D, clona 3; E, clona 6 y F, DNA genómico.



VII.6. Diseño de sub-clonación y análisis de la secuencia de los genes de MCM

Para localizar los genes que codifican para la MCM, se realizaron sub-clonaciones del fragmento de 16.5Kb contenido en pMCM8⁺. Las sub-clonaciones se llevaron a cabo en el plásmido pBluescript SK⁺ (Num. acceso 52325 [SK+]) para generar los plásmidos pBK2, pXX11, pBX4, pKX2, pKB3 y pPK1 (figura 20). Los fragmentos de DNA subclonados en estos plásmidos fueron secuenciados y el análisis por comparación de la secuencia obtenida con la base de datos, mostró contener al menos cuatro ORF. El ORF1 aproximadamente 8.5 Kb río arriba del ORF2, el cual se transcribe en dirección opuesta al ORF2, ORF3 y ORF4 mostró un 68% de identidad a una helicasa de *S. coelicolor* A3(2) [Redenbach *et al.*, 1996]. Un fragmento de aproximadamente 5.5Kb fue analizado utilizando el programa FramePlot disponible en <http://www.nih.go.jp/~jun/research/frameplot> para la búsqueda de ORFs provenientes de bacterias con un alto contenido de G/C en su genoma y un uso de codones con preferencia de G o C en la tercera posición, tales como *Streptomyces* [Ishikawa y Hotta, 1999]. Dicho fragmento mostró contener 3 posibles ORFs completos aunque parcialmente secuenciados (ORF1, ORF2 y ORF3) (figura 20). Los ORFs revelaron un contenido total de G/C del 74.9% y un uso de G/C en la tercera posición de los codones del 94.7%, lo cual es típico para *S. erythraea* CA340 [Bibb *et al.*, 1984]. La comparación de la secuencia de aminoácidos del ORF1 y ORF2 con la base de datos del Centro de Información Biotecnológica (NCBI) demostró contener los genes *mutA* y *mutB*, mientras que el ORF4 inmediatamente río abajo de éstos, mostró un porcentaje de identidad del 73% con el ORF5 de *Amycolatopsis mediterranei* U32, una cepa productora de rifampicina [Zhang *et al.*, 1999], 71% con el ORF5 de *Mycobacterium tuberculosis* [Cole *et al.*, 1998] y 60% con el ORF2 de 0.8Kb río abajo del gen *sbm* que codifica para la MCM de *E. coli* [Roy y Ladlay, 1992]. El orden conservado de los genes (*mutAB* más el ORF de 0.9Kb), además de la secuencia de las proteínas puede reflejar una función bioquímica de los productos de tales genes y por tanto en el metabolismo del MM-CoA en

los microorganismos antes mencionados. Por tanto, será necesario realizar experimentos posteriores con el objeto de determinar si *mutAB* y el ORF4 se encuentran organizados en un operón.

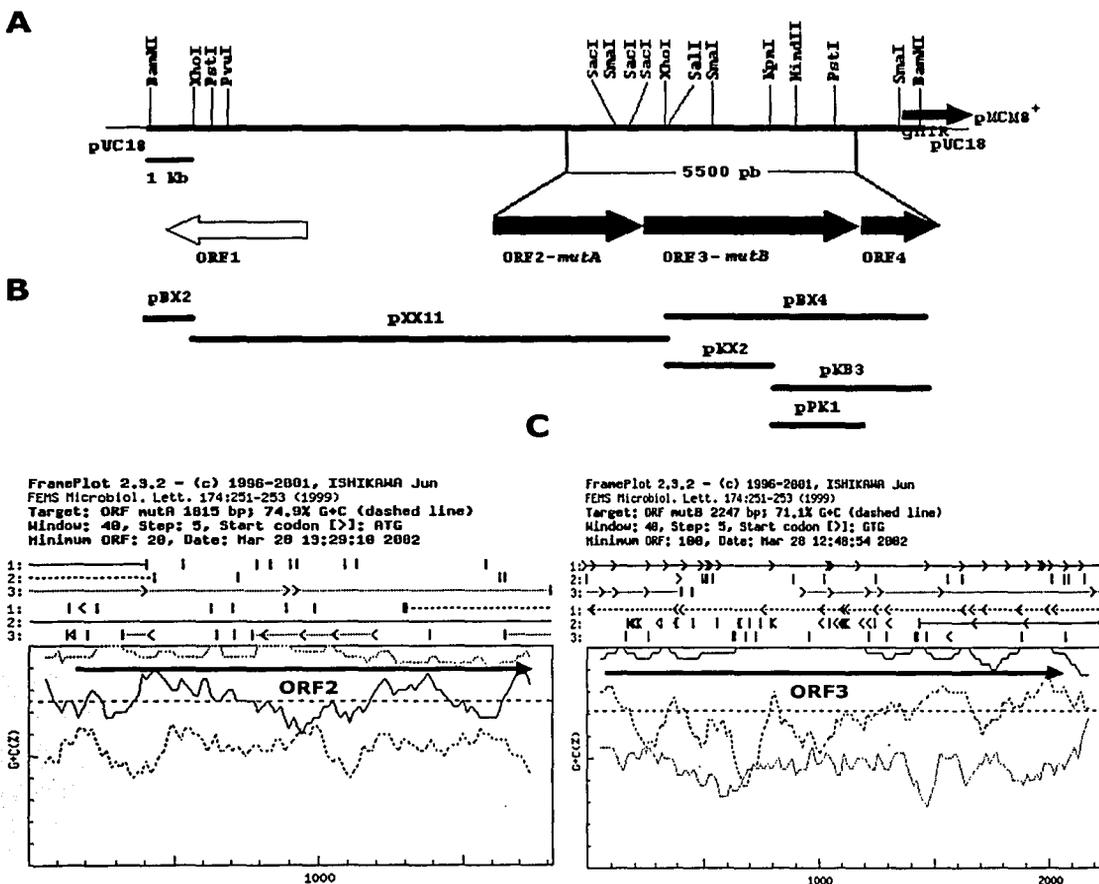


Fig. 20: Diseño de subclonación y análisis para la búsqueda de ORFs del fragmento de 5.5Kb **A:** Mapa de la región del DNA genómico clonado de *S. erythraea* CA340. El ORF1 representa una posible helicasa. El ORF2 y ORF3 dentro de un fragmento de 5.5Kb representan los genes *mutA* y *mutB* analizados con el programa Frameplot, río abajo de estos genes se encuentra el ORF4 y un ORF que codifica para un posible regulador transcripcional de la familia gnTR. **B:** Plásmidos generados de la sub-clonación del fragmento de 16.5Kb en pBluescript SK. **C:** Análisis de ORFs utilizando el software FramePlot [Ishikawa y Hotta, 1999]. El análisis mostró un porcentaje de G/C contra A/T del 94.7% en la tercera posición de los codones para todos los frames. El ORF2 representa *mutA* y el ORF3 representa *mutB* y su dirección de transcripción es indicada con las flechas.

El análisis de la secuencia del fragmento de 5.5 Kb mostró contener a *mutA* y *mutB*, ORF2 y ORF3 respectivamente (figura 21). La secuencia que codifica para el gen *mutA* muestra un codón de término de la transcripción (TGA) en el nucleótido 1810, dicha secuencia contiene un porcentaje de G/C del 74.9% y codifica para la subunidad menor de MCM de aproximadamente 603 aminoácidos con peso molecular de 64.5 KDa, es posible que tal secuencia sea extendida hasta 613 aminoácidos a partir de un análisis de predicción comparando las secuencias previamente reportadas para MutA. El gen *mutB* comienza en el nucleótido 1809 (GTG), pero su codón de terminación hasta este momento no ha sido secuenciado. Dicha secuencia contiene un porcentaje de G/C del 71.1% y codifica para la subunidad mayor de MCM de aproximadamente 748 aminoácidos con un peso molecular de 81.2 Kda. Tal secuencia de aminoácidos podría extenderse hasta 751 al completar la secuencia de nucleótidos. Estos dos ORFs se sobreponen por sus codones de término y de inicio en los nucleótidos 1809-1810 (GTGA), esto permite un acoplamiento traduccional y por tanto la producción de cantidades estequiométricas de los respectivos polipéptidos, tal como se encontró en *mutAB* de *A. mediterranei* y *S. cinnamonensis* [Zhang *et al.*, 1999; Birch *et al.*, 1993]. La subunidad menor de MCM de *S. erythraea* CA340 mostró 23.0% de similitud con su propia subunidad mayor principalmente en las regiones medias de cada una, esto sugiere que tales genes podrían ser el resultado de un evento de duplicación, lo cual ha sido previamente sugerido para las MCMs heterodiméricas de *P. shermanii* y *S. cinnamonensis* [Marsh *et al.*, 1989; Birch *et al.*, 1993].

El gen *mutB* se encuentra precedido por un sitio de unión a ribosoma (RBS) típico de *Streptomyces* (GGAG) en los nucleótidos 1797-1801 con base a la secuencia complementaria 3' terminal del RNAr 16S [Bibb y Cohen, 1982].

1 gccgagttccccgagcccggccgagcagtgggcggaacaggtggagaaggtcctgcgc
A E F P E P A R Q Q W R Q Q V E K V L R
61 aggtcgggtctgctgcccgagggcaggcccgcgaggcggtcgaggacgtgctcgcc
R S G L L P E G R P A P E P V E D V L A
121 agcggcctacgacggcatcccgatcccgctctacaccgaggggtcccgcatccagc
S A T Y D G I T V H P L Y T E G P A S S
181 ggcgtcccgggctggcgccctacgtgcgcgggcagccggggcgaggggtgctgagcag
G V P G L A P Y V R G S R A Q G C V S E
241 ggctgggacgtccgaccagcaccgcccaccccgacgctcggagaccaaccgagatc
G W D V R Q H H A H P D A S E T N R E I
301 ctggccgacctctacaacggcaccgacctcgctggtgggagctcgggcccaccgggctg
L A D L Y N G T T S L W L E L G P T G L
361 ccggtggactcggccgagccctcgaggcgctccacctggacatgatcggcgtgctg
P V D S L A D A L E G V H L D M I G V V
421 ctcgacgcccggtagcagagggcgccgcccggctcggcggtgctggagctcgcgaggag
L D A G D E A A R A A S A L L E L A R E
481 cagggggagcggcccgagcgcgctcggcccaacctggggcgaccgcccagcactgg
Q G V R P S A L R A N L G A D P L S T W
541 gctcgcaccgggaggaacgagcactgggctcggccgaggtcggccgacactgcccg
A R T G Q E R D L G L A A E V A A H C A
601 tcgaccgggctcggcgcgatcacctcgcagcggcctgcctaccacgagggcgggc
S H P G L R A I T V D G L P Y H E A G G
661 tccgacgcccaggagctcggctgctcgatcggcgggcgctcacctacctgcccgggtgctg
S D A E E L G C S I A A G V T Y L R V L
721 gccggtgagctcggtagccgagggcgagcgggctgctggagttccgctacgcccacc
A G E L G A E A A S G L L E F R Y A A T
781 gccgaccagttcctgaccatcgccaagctgcgcgggcccgcaggctgtgggagcgggtg
A D Q F L T I A K L R A A R R L W E R V
841 acgcgggagctcggctcggcagcgcgagctccagcagcgggtcacctcctcctcggc
T R E I G V A E R A Q L Q H A V T S S A
901 atgctgacgcccgcgaccggtgggtgaacatgctgcgccaccacgatcgccacgttcgcc
M L T R R D P W V N M L R T T I A T F A
961 gcaggtggggcgggcgggctcggctcggcggcgttcgacgcccgcgatcgggctg
A G V G G A R S V T V R P F D A A I G L
1021 ccggacccttctcccggcgcatcgcccgaacaccagtcgctgctgctggaggagtcg
P D P F S R R I A R N T Q S L L L E E S
1081 cacctggcgaggtgatcgaccggcgggcggttctcgggtacgtcgagacgctgaccgac
H L A Q V I D P A G G S W Y V E T L T D

Fig. 21: Secuencia de nucleótidos de un fragmento clonado de 4,055 pb del DNA genómico de *S. erythraea* CA340. Dos posibles ORFs (ORF1 y ORF2) fueron identificados con ayuda del programa FramePlot además su secuencia de aminoácidos deducida a partir de su secuencia de nucleótidos (en la parte de abajo). La secuencia parcial del ORF1 representa *mutA* y contiene un codón de terminación (TGA, subrayado) en el nucleótido 1810. El ORF2 contiene un posible sitio de unión a ribosoma (RBS) en los nucleótidos 1797-1801, además de un codón de inicio (GTG) en el nucleótido 1809. Estos dos ORFs se superponen por sus codones de término y de inicio en los nucleótidos 1809-1810 (GTGA). Los oligonucleótidos mut1 y mut2 utilizados para amplificar parte de la secuencia de *mutB* son indicados por las flechas.

1141 gaactggcgcacaaaggcgtgggagtggttccggcgcatcgaggccgagggcggggctgccc
 E L A H K A W E W F R R I E A E G G L P
 1201 gccgcgctgcgctcgggtctgggtggccgacccggctcgccgagacctggcagcgggcgccgg
 A A L R S G L V A D R L A E T W Q R R R
 1261 gacgcccgtcccaccgaccgaccgatcaccggcgtcaccgagttcccgaacctcgaa
 D A V A H R T D P I T G V T E F P N L E
 1321 gaacccgcgctgcgacgcgacccccgcgcccagccgctgtcgggcgccctgccccgccac
 E P A L R R D P A P E P L S G G L P R H
 1381 cgctacgcccaggacttcgagcggtgcgcgacgcctccgacgcccacctcgccgaacc
 R Y A E D F E R L R D A S D A H L A E T
 1441 ggtgcgccccgaaggtcttcctcgccacgctcgggttcgctcgccgagcacaacgccccg
 G A R P K V F L A T L G S L A E H N A R
 1501 gcgtcgttcgcccgaacctcttcggcgcgggcgggctggaaaaccgagcgcggggccc
 A S F A R N L F G A G G L E T P D A G P
 1561 acggagtccacagaggacgtgggtgaaggcgttcgcccggctcgggcagcgcggtggcctg
 T E S T E D V V K A F A G S G T P V A C
 1621 ctgtgctgggtgacggatctacggtgagcagcgggaggaaccgcccggcgctcccgg
 L C S G D R I Y G E H A E E T A R A L R
 1681 gaggcgggggccgaccaggtgctgctggccggctcgctcgaggtgcccggcgctcgacggc
 E A G A D Q V L L A G S L E V P G V D G
 1741 cgggtggttcggcggggcaaccgcccctgaagtcttgaggacgtccaccgaggtggga^{RBS}
 R V F G G C N A L E V L Q D V H R R L G
 1801 gtgcagca
 mutB V → O
 1809 gtgaccgcccacgagcagcaaccgatccccagcttcgcccggcgtggagctggggcgagccc
 V T A H E H E P I P S F A G V E L G E P
 1869 gccccgcgctgcccggggcgtggaacgacgcgctgctggccgagaccggcaaggaggcc
 A P A P A G R W N D A L L A E T G K E A
 1929 gacgcccgtgtggggagggcgcccagggcgtcggcgcaagccgctctacaccgaggcc
 D A L V W E A P E G I G V K P L Y T E A
 1989 gacaccgcccggctggacttcctgcgacacctaccgggaatcgcgccgcttcctgcgcgcc
 D T R G L D F L R T Y P G I A P F L R G
 2049 ccgtaccgacgatgtatgtcaaccagccggtggacgggtgcgccagtacgggggttctcc
 P Y P T M V V N Q P W T V R Q Y A G F S
 2109 accgcccgagcagtc^{mut1}caaccgcttctaccgcccgaacctcgcccggggcagaagggcctg
 T A E Q S N A F Y R R N L A A G Q K G L
 2169 tcgggtggccttcgacctggccaccgcccggctacgactccgaccaccgcccggctggcc
 S V A F D L A T H R G Y D S D H P R V G
 2229 ggtgacgtcggcatggcggggcgtggcgatcgactccatctatgacatgcccggctcttc
 G D V G M A G V A I D S I Y D M R R L F
 2289 gacggcatcccgcgtggacaggatgagcgtgctgatgacgatgaacggcgccgctgctgccc
 D G I P L D R M S V S M T M N G A V L P
 2349 gtgatggcgctctacatcgctcgcccggaggaacagggcggtggcgccggagaagctggcc
 V M A L Y I V A A E E Q G V A P E K L A
 2409 gggaccatccagaacgacatcctcaaggagttcatgggtccgcaacacctacatctaccgg
 G T I Q N D I L K E F M V R N T Y I Y P
 2469 ccgcagccgctcgatgcccgatcatctccgacatcttcgcctacgcctcgccggcggatgccg
 P Q P S M R I I S D I F A Y A S R R M P
 2529 aagttcaactcgatctccatctccggctaccacatccaggaggccggggcgaccgcccac
 K F N S I S I S G Y H I Q E A G A T A D
 2589 ctggagctggcctacaccctcgccggacggcggtggagtacctgcccggggcgccaggcg
 L E L A Y T L A D G V E Y L R A G R Q A

Fig. 21

2649 ggcctggacatcgactccttcgccccgcggtgtcgcttcttctggggcatcgggatgaac
 G L D I D S F A P R L S F F ^W G I G M N
 2709 ttcgcatggaggtcgccaagctgcgcgcgccccgggtcactatcgccaagctggtcaag
 F A M E V A K L R A A R L L W A K L V K
 2769 cgcttcgagccgtcggaccgaagtcgctgctgctgcgccaccctcgcagacctcggc
 R F E P S D P K S L S L R T H S Q T S G G
 2829 tggctcgctgaccgcccaggacgtctacaacaacgtcgtgcgccacgtgctgggaggcgatg
 W S L T A Q D V Y N N V V R T C V E A M
 2889 gccgccaccaggggccacaccagtcgctgcacaccaacgcctggacgagggcgctggcg
 A A T Q G H T Q S L H T N A L D E A L A
 2949 ctgccgaccgacttctccgcgcgcatcgcccgaacaccagctgggtgctccagcaggag
 L P T D F S A R I A R N T Q L V L Q Q E
 3009 tccggcaccaccgctcatcgaccctggggcggtcgcactacatcgagggcggtgacc
 S G T T R V I D P W G G S H Y I E R L T
 3069 caggacctcgcgaacgcgctggggccacatcaccgaggtcgaggacgcccggcgcatg
 Q D L A E R A W A H I T E V E D A G G M
 3129 gccaccaccatcgagccggtatcccgaagatgcgcatcgaggaggccgcgcgaggagc
 A Q A I D A G I P K M R I E E A A A R T
 3189 caggcgcgcatcgactccggccgcccagccgctcatcgggcgtcaacaagtaccgctacgac
 Q A R I D S G R Q P L I G V N K Y R Y D
 3249 ggcgacgagcagatcgaggtcctcaaggtcgacaacgcggcgctgcccggcccagcagcgtg
 G D E Q I E V L K V D N A G V R A Q Q L
 3309 gacaagctcggcggtgctgcgcgaggaaacgcgactccgaggcgtgagagaccgactcgcg
 D K L R R L R E E R D S E A C E T A L R
 3369 aggctgaccgcccggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
 R L T G A A E A A L E D N R P D D L A H
 3429 aacctgctgagcgtggccggtggacgcccggcgggcacaaggccaccgctcggcgagatctcc
 N L L T L A V D A A R H K A T V G E I S
 3489 gacgctggagaaggtccttcggccgccaactccggccagatccgtacgatttcggcgctg
 D A L E K V F G R H S G Q I R T I S G V
 3549 taccgggaggagtcgggtacctcggagtcgctggagcgcgcccggccaaggtcgaggag
 Y R E E S G T S E S L E R A R R K V E E
 3609 ttcgacgagcagagggcaggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
 F D E A E G R R P R I L V A K M G Q D G
 3669 cacgaccgcccggcagaaggtcatcgccaccgcttcgcccacatcggttcgacgtcgac
 H D R G Q K V I A T A F A D I G F D V D
 3729 gtgggcccgtgttccagaccccggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
 V G P L F Q T P A E V A R Q A V E S D V
 3789 cacgtcgtcgggggtgctgctgctggccggggccacctgacgctgggtgcccggcgtgccc
 H V V G V S S L A A G H L T L V P A L R
 3849 gacgagctggccgggctcggccgctccgacatcatgatcgttgtcggggcggtgatcccg
 D E L A G L G R S D I M I V V G G V I P
 3909 cccgcccacttcgacgctgcccaggcggagccagcgcgatcttcccggcgggaacc
 P A D F D A L R Q G G A S A I F P P G T
 3969 gtgatccccgacgcccgctcggactgctcgaccaagcttcggcgcggtgctcgaccacc
 V I P D A L G L L D Q A S A R C S T T
 4029 ccgcccggcgaagcctgcccggcgag 4055
 P R P A K P A G E

Fig. 21

Las secuencias de aminoácidos para la subunidad mayor de MCMs disponibles en la base de datos fueron comparadas con la secuencia de aminoácidos de la subunidad mayor de MCM de *S. erythraea* CA340. El análisis mostró un alto porcentaje de identidad con la subunidad mayor de *S. cinnamomensis*, 84%; *A. mediterranei*, 85%; subunidad α de *P. freuderechii* subsp. *shermanii*, 79%; subunidad α de *M. tuberculosis*, 78%; *Caulobacter crescentus*, 77%; *Mesorhizobium loti*, 79%; *Bacillus halodurands*, 77%; ratón, 74%; humano, 74%; *P. gingivalis*, 74%; *Caenorhabditis elegans*, 73% *E. coli*, 72%; *S. coliecolor*, 62%. La gran identidad de la subunidad mayor de MCM tanto de eucariontes como de procariontes sugiere que MCM se ha conservado eficientemente durante la evolución.

VII.7. Identificación de los posibles sitios de unión al substrato y de la coenzima B₁₂

Con la finalidad de identificar aquellos residuos que juegan un papel funcional en la actividad de la MCM, se realizaron alineamientos múltiples con las secuencias de la subunidad mayor de las MCMs previamente reportadas y disponibles en la base de datos (figura 22). El análisis de los residuos conservados mostró una alta identidad particularmente en dos regiones, la primera entre los aminoácidos 91 al 393 y la segunda entre los aminoácidos 610 al 724. Previamente se ha identificado un motivo (D-X-H-X-X-G, S-X-L y GG) de unión a la coenzima B₁₂ con base a la similitud en la secuencia con otras enzimas dependientes de B₁₂ [Marsh y Holloway, 1992; Drennan *et al.*, 1994a,b; Ludwing *et al.*, 1996; Ludwing y Matthews, 1997; Neil y Marsh, 2000]. En la subunidad mayor de la MCM de *S. erythraea* CA340 este motivo se identificó en D⁶¹⁹GH⁶²¹DRG⁶²⁴, S⁶⁶⁵SL⁶⁶⁷ y G⁶⁹⁶G⁶⁹⁷ que se encuentra en la segunda región conservada. La carencia de este motivo en la subunidad menor de MCM de *S. erythraea* CA340 proporciona evidencia de la posibilidad de unir solamente 1 mol de coenzima B₁₂ por heterodímero tal como se encontró en la MCM de *A. mediterranei* U32 y el gen *bhb A* de *Sinorhizobium meliloti* [Zhang *et al.*, 1999; Trevor y Punita, 1999].

Existe otra secuencia altamente conservada (RIARNT) en todas las MCM secuenciadas a la fecha, sin embargo dicha secuencia no ha mostrado alguna relación con la actividad de la MCM [Bairoch *et al.*, 1997]. En la MCM de *S. erythraea* CA340 esta secuencia fue identificada entre los aminoácidos 388 y 393 de la primera región conservada.

Recientemente la estructura cristalina de la MCM de *P. freuderechii* subsp. *shermanii* ha sido publicada. Esta consiste de un dominio carboxilo terminal $(\beta/\alpha)_8$, en el cual se han identificado los residuos conservados D-X-H-X-X-G (donde X representa cualquier aminoácido); este motivo proporciona una estructura cerrada entre las cadenas α_1 hélice y β_2 plegada [Mancia *et al.*, 1999]. El residuo de histidina interacciona íntimamente con el átomo de cobalto proveniente de la coenzima B₁₂ a través del nitrógeno ϵ del anillo de imidazol, formando una red estabilizada por puentes de hidrógeno entre los residuos His⁶¹⁰-Asp⁶⁰⁸-Lis⁶⁰⁴. Estos mismos residuos fueron identificados en la isobutiril-CoA mutasa, una enzima dependiente de la coenzima B₁₂ de *S. cinnamonensis*, lo que sugirió que dichos residuos podrían ser responsables en la unión con la coenzima B₁₂ [Ratnatilleke, *et al.*, 1999] (figura 22). En la subunidad mayor de MCM de *P. shermanii* los residuos Tre⁸⁵, Ser¹¹⁴, Ser¹⁶², Ser¹⁶⁴, Tre¹⁶⁶, Tre¹⁹⁵, Ser²³⁹, Ser²⁸⁵ y Ser³⁶², crean un centro activo mediante el cual la CoA puede ser unida formando puentes de hidrógeno con el grupo amida de CoA. La His²⁴⁴ se encuentra en una posición que permite la unión al oxígeno del carbonilo en la reacción de rearreglo del succinil-CoA y posiblemente sea el principal residuo catalítico (figura 11). Todos estos aminoácidos se encuentran identificados en la primera región conservada de la subunidad mayor de MCM de *S. erythraea* CA340.

Un residuo, Tir⁸⁹ de la subunidad mayor de *P. shermanii* se encuentra altamente conservado en todas las secuencias de las subunidades mayores de MCMs y éste se encuentra localizado muy cerca del centro de unión con la coenzima B₁₂. Estudios recientes por cristalografía de rayos X y cinética enzimática demostraron que una mutante producida por el intercambio del residuo Tir⁸⁹ por el de fen⁸⁹ (Y89F) de MCM de *P. shermanii*, no afectó significativamente la K_m para succinil-CoA. Sin embargo, la K_{cat} de la mutante

fue 580 veces menor que la del tipo silvestre. Por tanto, se ha sugerido que la Tir⁸⁹ juega un papel clave en la reacción catalizada por la MCM [Thomas *et al.*, 1998]. En la secuencia de la subunidad mayor de MCM de *S. erythraea* CA340 la Tir⁹⁶ puede tener una función similar a la Tir⁸⁹ encontrada en la subunidad mayor de MCM de *P. shermanii*.

Recientemente la estructura cristalina de MCM de *P. shermanii* junto con el sustrato reveló una interacción entre la Arg²⁰⁷ y el grupo carboxilo del MM-CoA [Mancia *et al.*, 1999], dicho residuo se encuentra presente en Arg²¹⁴ de la subunidad mayor de la MCM de *S. erythraea* CA340. Es posible que los residuos altamente conservados entre las MCM puedan resultar en mecanismos catalíticos muy similares si no es que idénticos.

A la fecha no es claro si la subunidad menor encontrada en las enzimas heterodiméricas es requerida para la actividad de MCM, ya que no se han encontrado evidencias que indiquen que esta subunidad participa en la unión tanto del sustrato como de la coenzima B₁₂ [Mancia *et al.* 1996]. Se ha sugerido que la subunidad menor resultó de un evento de duplicación durante la evolución lo que dió lugar a las dos subunidades y que las enzimas monoméricas encontradas en bacterias son ejemplo de eventos de delección subsecuente [Jackson *et al.*, 1995]. Los estudios comparativos estructurales y genéticos de las MCMs heterodiméricas y homodiméricas podrían proporcionar evidencias que permitan determinar la relación funcional entre las subunidades de la enzima y finalmente esclarecer el origen de la subunidad menor.

```

S.ery 45 WEAPEGIGVKPLYT--EADTRGLDFLRT--YPGIAPFLRGPYPTMYVNPQWTVRQYAGFS 100
C.e 50 WNTPEGIPKPLYLR-SDRDCDAQ--RSVELPGQFPFTRGYPYPTMYTQRPWTVRQYAGFS 106
Humano 61 WHTPEGISIKPLYSK-RD---TMD--LPEELPGVKPFTRGYPYPTMYTFRPWTVRQYAGFS 114
P.g 33 WRTPEQIMVKPLYT--KDDLEGME--HLDYVSGLPFLRGPYSGMYPMRPWTVRQYAGFS 88
M.t 50 WHTPEGIDVTPVYIAADRAAAEAEGYPLHSFPGEPFVRGYPYPTMYVNPQWTVRQYAGFS 109
E.c 27 HQTAEGIAIKPLYT--EADLDNLE--VTGTLPLGLPYVVRGPRATMYTAQPWTVRQYAGFS 82
A.f 25 FKTSSGIVDRLYTP-EDVEIDYEN--KLGYPGVYPTFRGVYPTMYGRGLWTRMQYAGFG 81
Icm 27 FTTLSGDPVDPVYGP RP GD TY DGF E--RIGWEGEYPTFRGLYATGYRGRTWTVRQYAGFG 84
* *

S.ery 101 TAEQSNAFYRRNLAAGQKGLSVAFDLATHRGYDSDHPRVGGDVGMAQVAIDSIYDMRRLF 160
C.e 107 TVEESNKFYKENIKAGQQGLSVAFDLATHRGYDSDNPRVFGDVGMAQVAIDSVEDMRQLF 166
Humano 115 TVEESNKFYKDNIKAGQQGLSVAFDLATHRGYDSDNPRVRGDDVGMAQVAIDTVEEDTKILF 174
P.g 89 TAEESNAFYRRNLASGQKGLSVAFDLATHRGYDADHSRVVGGDVGKAGVSICSLEDMDKVL 148
M.t 110 TAADSNAFYRRNLAAGQKGLSVAFDLATHRGYDSDHPRVQGGDVGMAQVAIDSILD MRQLF 169
E.c 83 TAKESNAFYRRNLAAGQKGLSVAFDLATHRGYDSDNPRVAGDVGKAGVAIDTVEEDMKVLF 142
A.f 82 TAEETNRRYRYLLEQGQTGLSVAFDLPTQIGYDSDHPMALGEVGVKVAIDTIEDMEILF 141
Icm 85 NAEQTNERYKMILANGGGGLSVAFDMPTLMGRDSDDP RSLGEVGHCGVAIDSAADMEVLF 144
*

S.ery 161 DGIPLD RSMV SMTMNGAVLPVMALYIVAAEEQGVAPKLAGTIGNDILKEFMVRNTYIYP 220
C.e 167 DGINLEKMSV SMTMNGAVVPLAMYVVAEEAGVSRKLLAGTIGNDILKEFMVRNTYIYP 226
Humano 175 DGIPLEKMSV SMTMNGAVIPVLANFIVTGEEQGVPKKLTGTIGNDILKEFMVRNTYIFP 234
P.g 149 DGIPLSKMSV SMTMNGAVLPILAFYINAGLEQGA KLEEMAGTIGNDILKEFMVRNTYIYP 208
M.t 170 DGIDLSTVSV SMTMNGAVLPILALYVVAEEQGVAPKLAGTIGNDILKEFMVRNTYIYP 229
E.c 143 DQIPLDKMSV SMTMNGAVLPVLA FYIVAAEEQGVTPDKLTGTIGNDILKEYLCRNTYIYP 202
A.f 142 NGIPLGKVSMTINSTCAQILSMYVA AEKGVVERANLRGTIGNDILKEYIARGTYIFP 201
Icm 145 KDIPLDVTT SMTISGPAVVFVFCMYLVA AERQGVDPVAVLNGTIGNDILKEYIAQKEWLFQ 204
* * *

S.ery 221 P Q P S M R I I S D I F A Y A S R R M P K F N S I S I S G Y H I Q E A G A T A D L E L A Y T L A D G V E Y L R A G R Q A 280
C.e 227 P E P S M R I I G D I F A Y T S R E M P K F N S I S I S G Y H M Q E A G A D A V L E M A F T I A D G I Q Y C E T G L N A 286
Humano 235 P E P S M K I I A D I F E Y T A K H M P K F N S I S I S G Y H M Q E A G A D A I L E L A Y T L A D G L E Y S R T G L Q A 294
P.g 209 P E F S M R I I A D I F E Y T S Q N M P K F N S I S I S G Y H M Q E A G A T A D I E M A Y T L A D G M Q Y L K A G I D A 268
M.t 230 P K P S M R I I S D I F A Y T S A K M P K F N S I S I S G Y H I Q E A G A T A D L E L A Y T L A D G V D Y I R A G L N A 289
E.c 203 P K P S M R I I A D I I A W C S G N M P R F N T I S I S G Y H M G E A G A N C V Q Q V A F T L A D G I E Y I K A A I S A 262
A.f 202 P E P S L R L A T D I I M F C A K E M P K W N S I S I S G Y H M E E A G A T P V Q E V A F T L A D G I T Y V E K V I E R 261
Icm 205 P E P H L R L I G D L M E H C A R D I P A Y K P L S V S G Y H I R E A G A T A A Q E L A Y T L A D G F G Y V E L G L S R 264
*

```

Fig 22: Alineamiento múltiple de la subunidad mayor de MCM de *S. erythraea* CA340 y otras MCM y MCM relacionadas de diferentes organismos. El alineamiento fue generado con ayuda de un software disponible en el banco de datos del Centro de Información Biotecnológica (NCBI). Los aminoácidos conservados en todas las proteínas son marcados con negritas. Los sitios posibles de unión con el sustrato son marcados con asteriscos y los sitios posibles de unión a la coenzima B₁₂ son subrayados. La secuencia consenso R I A R N T encontrada en todas las MCMs se encuentra marcada con cruces. *S. ery*, *S. erythraea* CA340; *C.e*, *Caenorhabditis elegans* (No. de acceso Q23381); Humano, (P22033); *P.g*, *Porphyromonas gingivalis* (Q59677); *M.t*, *Mycobacterium tuberculosis* (P71774); *E.c*, gen *sbm* de *Escherichia coli* (P27253) *A.f*, subunidad α de *Archaeoglobus fulgidus* (AAB89037); *Icm*, isobutiril-CoA mutasa de *Streptomyces cinnamonensis* (AAC08713).

S.ery 281 GLDIDSFAPRLSFFWGIGMNFMEVAKLRAARLLWAKLVKR-FEPSPDKSLSLRTHSQTS 339
 C.e 287 GLTIDAFAPRLSFFWGISMNFYMEIAKMRARRLWANLIKERFSPKSDKSMMLRTHSQTS 346
 Humano 295 GLTIDEFAPRLSFFWGIGMNFYMEIAKMRAGRRLWAHLIEKMFQPKNSKSLLLRAHCQTS 354
 P.g 269 GIDVDAFAPRLSFFWAIGVNHFMETAKMRAARLLWAKIVKS-FGAKNPKSLALRTHSQTS 327
 M.t 290 GLDIDSFAPRLSFFWGIGMNFMEVAKLRAGRLLWSELVAQ-FAPKSAKSLSLRTHSQTS 348
 E.c 263 GLKIDDFAPRLSFFFGIGMDLFMNVAMLRARLYLWSEAVSG-FGAQDPKSLALRTHCQTS 321
 A.f 262 GMDVDSFAPRLSFFFAAGNNFLEEIAKFRAARRLWARIMKERFNAKNPRSMMLRFHVQTA 321
 Icm 265 GLDVDVFAPGLSFFFDAHVDFFEETAKFRAARRIWARWLRDEYGAKTEKAQWLRFHQTQA 324

S.ery 340 GWSLTAQDVYNNVVRTCEVMAAATQGHQTSLHTNALDEALALPTDFSARIAARNTQIQLVLQO 399
 C.e 347 GWSLTEQDPYNNIIRTIEAMASVFGGTQSLHTNSFDEALGLPTKFSARIAARNTQIIIQE 406
 Humano 355 GWSLTEQDPYNNIVRTAIEAMAAVFGGTQSLHTNSFDEALGLPTVKSARIAARNTQIIIQE 414
 P.g 328 GWSLTEQDPFNNGVGRTCIEAMAAALGHTQSLHTNALDEAIALPTDFSARIAARNTQIYIQE 387
 M.t 349 GWSLTAQDVFNNAVARTCEIEMAATQGHQTSLHTNALDEALALPTDFSARIAARNTQIQLVLQO 408
 E.c 322 GWSLTEQDPYNNVIRTIEALAAATLGGTQSLHTNVFDEALGLPTDFSARIAARNTQIIIQE 381
 A.f 322 GCTLTAQQPENNVIVRVALQALAAVLGGCQSLHTNSFDEALGLPTEKAVRIALRTOQIIAE 381
 Icm 325 GWSLTAQQPYNNVVRTAVEALAAAVLGGTNSLHTNALDETLALPSEQAEBIALRTOQVLM 384

+++++

S.ery 400 ESGTTRPIDPWGGSYHYIERLTQDLAERAWAHITEVEDAG-----GMAQA 443
 C.e 407 ESGICNVADPWGGSYMMESLTDEIYEKALAVIKEIDELG-----GMAKA 450
 Humano 415 ESGIPKVADPWGGSYMMECTNDVYDAALKLINEIEEMG-----GMAKA 458
 P.g 388 ETLVCKEIDPWGGSYYVESLTNELVHKAWTLIKEVQEMG-----GMAKA 431
 M.t 409 ESGTTRPIDPWGGSYYVEWLTHRLARRARAHIAEVAEHG-----GMAQA 452
 E.c 382 ESELCRTVDPLAGSYYIESLTDQIVKQARAI IQQIDEAG-----GMAKA 425
 A.f 382 ESGVADVVDPLGGSYYIEWLTDRIEEEAAMKYIEKIDEMG-----GMIKA 425
 Icm 385 ETGVANVADPLGGSWYIEQLTDRIEADAEKIFEQIRERGRACPDGQHPIGPITS GILRG 444

S.ery 444 IDAGIPKMRIIEEAAARTQARIDSGRQPLIGVNVKRYRDGDEQIEVLKVDNAGVRAQQLDKL 503
 C.e 451 VASGMTKLRIEEAAAKQARIDAGKDVIQVGNKYRLDHEQQVEVLKIDNAKVREEQCAKL 510
 Humano 459 VAEGIPKLRIEECAARROARIDSGSEVIVGNKYQLEKEDAVEVLAIDNTSVRNROIEKL 518
 P.g 432 IETGLPKLRIIEEAAARTQARIDSHQQVIVGNKYRLPKEDPIDILEIDNTAVRKQOIERL 491
 M.t 453 ISDCIPKLRIEEAAARTQARIDSGQPVVGNKYQVPEDHEIEVLKVENSRVRAEQLAKL 512
 E.c 426 IEAGLPKRMIEEASAREQSLIDQGRVIVGNKYKLDHEDETDLVEIDNVVMVRNEQIASL 485
 A.f 426 IESGVYQREIQKSAYEKQKAIDEGETTVVGNKYQIEEEIQIELLRVDKAVVE-KQIRRL 484
 Icm 445 IEDGWFTGEIAESAFQYQRSLEKGDKRVVGNCLEGSVTGDLEILRVSHEVER-EQVREL 503

S.ery 504 RRLREERDSEACETALRRLTGAAEAALEDNRPDDL-----AH----NLLTLAVDAARHKA 554
 C.e 511 NHIRATRDAEKAQKALDAITEGAR-----GNG---NLMELAIIEAARARC 551
 Humano 519 KKI KSSRDQALAEHC LAALTECAA-----S-----GDG---NILALAVDASRAR 560
 P.g 492 NDLRSHRDEKAVQEAL EAITKCV-----ETK-----EGNLLDLAVKAAGLRA 533
 M.t 513 QRLRAGRDEPAVRAALAELTRAAA-----EQGRAGADGLGNLLALALIDAARAQA 562
 E.c 486 ERIRATRDAAVTAALNALTHAAQ-----H-----NE---NLLAAAVNAARVRA 526
 A.f 485 QEFRKNRDAKKVEEALDRLRKAEE-----K-----EDE---NLMYPVLDVAVKARA 526
 Icm 504 AGRKGRRDARVRASLDAMLAAAR-----DGS---NMIAPMLEAVRAEA 544

Fig. 22

S.ery 555 TVGEISDALEKVFGRH----FRILVAKMGQDGHDRGQKVIATAFADIGFDVDVGPFLFQTPA 649
 C.e 552 TVGEISDAMEKVFNRH----PRIMVAKMGQDGHDRGAKVIATGFADLGFDDVDVGPFLFQTP 646
 Humano 561 TVGEITDALKKVFGEH----PRLLVAKMGQDGHDRGAKVIATGFADLGFDDVDIGPFLFQTPR 655
 P.g 534 SLGEISDACEKVVGRY----PRIMI AKMGQDGHDRGAKVVATGYADCGFDVDMGPFLFQTPE 628
 M.t 563 TVGEISEALEKVYGRH----PRILIAKMGQDGHDRGQKVIATAFADIGFDVDVGSLSFSTPE 657
 E.c 527 TLGEISDALEVAFDY----PRILIAKMGQDGHDRGAKVIASAYSDLGFDDVLSPMFSTPE 625
 A.f 527 TLGEMTDALRDVFGEF----IRVIVAKPGLDGHDRGAKVVARALRDAGFEVIYTGIRRTPE 642
 Icm 545 TLGEICGVL RDEWGVY 561

S.ery 649 EVARQAVESDVHVVGVSLSAAGHLTLVLPALRDEL AGLGRS---DIMIVVGGVIPPADFDA 707
 C.e 647 EAAQCAVDADVHVIGASSLAAGHLTLIPQLIGELKKLGRP---DILVVAGGVIPPQDYKE 707
 Humano 656 EVAQCAVDADVHAVGVSTLAAGHKTLVPELIKELNSLGRP---DILVMCGGVIPPQDYEF 716
 P.g 629 EAARQAVENDVHVMGVSSLAAGHKTLIPQVIAELEKLRP---DILVTAGGVIPAQDYDF 689
 M.t 658 EVARQAADNDVHVIGVSSLAAGHLTLVLPALRDALAQVGRP---DIMIVVGGVIPPQDFDE 718
 E.c 726 EIA RLAVENDVHVVGASSLAAGHKTLIPELVEALKKWGRE---DICVVAGGVIPPQDYAF 786
 A.f 643 EIAETALQEDADVVGLSIILSGAHLELTPMVIEELRKRGLEPNRDVLVIVGGIVPEEDVPK 703

S.ery 708 LRQGGASAIFFP-GTVIPDAALGLLDQASARCSTTPRPAKPAG.....
 C.e 708 LYDAGVALVFGP-GTRL PACANQILEKLEANLPEAPGKAASR.....
 Humano 717 LFEVGVSNVFGP-GTRIPKAAVQVLEDDIEKCLEKKQSV.....
 P.g 690 LYQAGVA AIFGP-GTPVAYSAAKVELEILLEE.....
 M.t 719 LYAAGATAIFFP-GTVIADAIDLHRLAERLGYTLD.....
 E.c 787 LQERGVA AIYGP-GTPMLDSVRDVLNLSQHHD.....
 A.f 704 LKEMGVAKVFGP-GTPLNEIIDF (2648305)

Fig. 22

VIII. Conclusiones

1. Los genes que codifican para la subunidad menor y mayor de MCM, *mutA* y *mutB* respectivamente han sido clonados a partir de una sub-biblioteca genómica de *S. erythraea* CA340.
2. El gen *mutA* se encuentra en fragmento de 1810 pb, el cual contiene un ORF que codifica para un polipéptido de 603 aminoácidos con una masa molecular de 64.5 KDa.
3. El gen *mutB* se encuentra en un fragmento de 2244 pb y contiene un ORF que codifica para un polipéptido de 748 aminoácidos con una masa molecular de 81.2 KDa.
4. Los ORF que codifican para *mutA* y *mutB* se traslapan por sus codones de término y de inicio de la transcripción respectivamente, lo que permite un acoplamiento traduccional y por tanto la producción de cantidades estequiométricas de los respectivos polipéptidos.
5. La secuencia RIARNT, la cual se encuentra altamente conservada en todas las MCM secuenciadas a la fecha fue indentificada dentro de la secuencia de aminoácidos de MutB.
6. El gen *mutB* que codifica para la subunidad mayor de la MCM mostró un alto porcentaje de identidad con las subunidades mayores de otras MCM encontradas tanto en procariontes como en eucariontes, lo que sugiere que la MCM se ha conservado eficientemente a lo largo de la evolución.

ESTA TESIS NO SALIR
DE LA BIBLIOTECA

IX. Bibliografía

1. **Agouridas C, Denis A, Auger JM, Benedetti Y, Bonnefoy A, Bretin F, Chantot JF, Dussarat A, Fromentin C, Dambrieres SG, Lachaud S, Laurin P, Lemartret O, Loyau V, Tessot N.** (1998) Synthesis and antibacterial activity of ketolides (6-O-methyl-3-oxoerythromycin derivatives) a new class of antibacterials highly potent against macrolide resistant and susceptible respiratory pathogens. *J Med Chem* 41:4080-4100.
2. **Altschul SF, Madden TL, Schäfler AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ.** (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25:3389-3402.
3. **Andersen JF, Hutchinson CR.** (1992) Characterization of *Saccharopolyspora erythraea* cytochrome P-450 genes and enzymes, including 6-deoxyerythronolide B hydroxylase. *J Bacteriol* 174:725-735.
4. **Bermúdez O, Padilla P, Huitrón C, Flores ME.** (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 Microbiology Letters* 164:77-82.
5. **Bibb MJ, Cohen SN.** (1982) The relationship between base composition and codon usage in bacterial genes and its use for simple and reliable identification of protein coding sequences. *Gene* 30:157-166.
6. **Bibb MJ, Findlay PR, Johnson MW.** (1984) The relationship between base composition and codon usage in bacterial genes and its use for the simple and reliable identification of protein-coding sequences. *Gene* 30:157-166.
7. **Bibb MJ, Janssen GR, Ward JM.** (1985) Cloning and analysis of the promoter region of the erythromycin resistance gene (*ermE*) of *Streptomyces erythraeus*. *Gene* 38:215-226.
8. **Bibb MJ, White JW, Janssen GR.** (1994) The mRNA for 23S rRNA methylase encoded by the *ermE* gene of *Saccharopolyspora erythraea* is translated in the absence of a conventional ribosome-binding site. *Mol Microbiol* 14:533-545.
9. **Birch A, Leiser A, Robinson JA.** (1993) cloning, sequencing, and expression of the gene encoding methylmalonyl-CoA mutase from *Streptomyces cinnamomensis*. *J Bacteriol* 175:3511-3519.

10. **Brisson-Noël A, Trieu-Cuot P, Courvalis P.** (1988) Mechanism of action of spiramycin and other macrolides. *J Antimicrob Chemoter* 22, Suppl B: 13-23.
11. **Caffrey P, Bevitt DJ, Staunton J, Leadlay PF.** (1992) Identification of DEBS1, DEBS2 and DEBS3, the multienzyme polypeptides of the erythromycin-producing poliketide synthase from *Saccharopolyspora erythraea*. *FEBS* 304:255-258.
12. **Cervin A.** (2001) The anti-inflammatory effect of erythromycin and its derivatives, with special reference to nasal polyposis and chronic sinusitis. *Acta Otolaryngol* 121:83-92.
13. **Cole ST, Brosh R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, Gordon SV, Eiglmeier K, Gas S, Barry CE, Takaia F, Badcock K, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Davies R, Devlin K, Feltwell T, Gentles S, Hamlin N, Holroyd S, Hornsby T, Jagels K, Krogh A, McLean J, Moule S, Murphy L, Oliver S, Osborne J, Quail MA, Rajandream MA, Rogers J, Rutter S, Seeger K, Skelton S, Squares S, Squares R, Sulston JE, Taylor K, Whitehead S, Barrell BG.** (1998) Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 393:537-544.
14. **Corcoran JW.** (1981) Mode of action and resistance mechanism of macrolides. antibiotics Vol. 4. Ed. Corcoran J. W. Springer-Verlag. N.Y. pp. 132-174.
15. **Cortes J, Haydock SF, Roberts GA, Bevitt DJ, Leadlay PF.** (1990) An unusually large multifunctional polypeptide in the erythromycin-producing poliketide synthase of *Sacharopolyspora erythraea*. *Nature* 348:176-178.
16. **Donadio S, Katz L.** (1992) Organization of the enzymatic domains in the multifunctional polyketide synthase involved in erythromycin formation in *Saccharopolyspora erythraea*. *Gene* 111:51-60.
17. **Donadio S, Shafiee A, Hutchinson CR.** (1990) Modular organization of genes required for complex polyketide biosynthesis. *Science* 252:675-679.
18. **Donadio S, Staver MJ, Katz L.** (1996) Erythromycin production in *Sacharopolyspora erythraea* does not require a functional propionyl-CoA carboxylase. *Mol Microbiol* 19:977-984.
19. **Drennan CL, Matthews RG, Ludwig ML.** (1994) Cobalamin dependent methionine synthase: the structure of a methylcobalamin fragment and implications for the other B₁₂ dependent enzymes. *Curr Opin Struct Biol* 4:919-929.

20. **Flores ME, Sánchez S.** (1985) Nitrogen regulation of erythromycin formation in *Streptomyces erythreus*. *FEMS Microbiol Lett* 26:191-194.
21. **Friedman SM, Kaneda TY, Corcoran JW.** (1964) Antibiotic glycosides. Comparison of 2-methylmalonate and propionate as precursors of the C₂₁ branched chain lactone in erythromycin. *J Biol Chem* 239:2386-2391.
22. **Gaisser S, Böhm GA, Doumith M, Raynal MC, Dhillon D, Cortés J, Leadlay PF.** (1998) Analysis of *eryBI*, *eryBIII* and *eryBVII* from the erythromycin biosynthetic gene cluster in *Saccharopolyspora erythraea*. *Mol Gen Genet* 258:78-88.
23. **Gaisser S, Böhm GA, Staunton J, Leadlay PF.** (1997) Analysis of seven genes from the *eryAI-eryK* region of the erythromycin biosynthetic gene cluster in *Saccharopolyspora erythraea*. *Mol Gen Genet* 256:239-251.
24. **Han L, Reynolds KA.** (1997) A novel alternate anaplerotic pathway to the glyoxylate cycle in Streptomycetes. *J Bacteriol* 179:5157-5164.
25. **Hershberger CL.** (1996) Metabolic engineering of polyketide biosynthesis. *Curr Opin Biotechnol* 7:560-562.
26. **Higashide E.** (1984) Macrolides: Properties, biosynthesis, and fermentation. in: *Biotechnology of industrial antibiotics*. Vol. 22. Cap. 15 Drug and the Pharmaceutical Sciences. Ed. Vandamme E.J. Dekker M. INC. USA. pp. 451-509.
27. **Hopwood DA, Bibb MJ, Chater KF, Keiser T, Bruton CJ, Keisser HM, Lydiate DJ, Smith CP, Ward JM, Scherempff H.** (1985) Genetic manipulation of *Streptomyces*. The John Innes Foundation, Norwich.
28. **Hopwood DA, Sherman DH.** (1990) Molecular genetics of polyketides and its comparison to fatty acid biosynthesis. *Annu Rev Genet* 24:37-66.
29. **Hopwood DA.** (1997) Genetic contributions to Understanding Polycetide Synthases. *Chem Rev* 97:2465-2497.
30. **Hsieh YJ, Kolattukudy PE.** (1994) Inhibition of erythromycin synthesis by disruption synthesis by disruption of malonyl CoA decarboxylase gene *eryM* in *Saccharopolyspora erythraea*. *J Bacteriol* 176:714-724.
31. **Hunaiti AR, Kolattukudy PE.** (1984b) Malonyl-CoA decarboxylase from *Streptomyces erythreus*: Purification, properties, and possible role in the production of erythromycin. *Arch Biochem Biophys* 229:426-439.
32. **Hunaiti AR, Kolattukudy PE.** (1982) Isolation and characterization of an acyl-coenzyme A carboxylase from an erythromycin-producing *Streptomyces erythreus*. *Arch Biochem Biophys* 219:362-371.

33. **Huniati AR, KolattuKudy PE.** (1984a) Source of Methylmalonyl-Coenzyme A for Erythromycin Synthesis: Methylmalonyl-Coenzyme A mutase from *Streptomyces erythreus*. *Antimic Agents Chemother* 25:173-178.
34. **Ishikawa J, Hotta K.** (1999) FramePlot: a new implementation of the frame analysis for predicting protein-coding regions in bacterial DNA with a high G+C content. *FEMS Microbiol Lett* 174:251-253.
35. **Jackson CA, Kirszbaum L, Dashper S, Reynolds EC.** (1995) Cloning, expresion and sequence of the genes encoding the heterodimeric methylmalonyl-CoA mutase of *Porphyromonas gingivalis* W50. *Gene* 167:127-132.
36. **Jansen R, Kalousek F, Fenton WA, Rosenberg LE, Ledley D.** (1989) Cloning of full length methylmalonyl-CoA mutase from cDNA library using the polymerase chain reaction. *Genomics* 4:198-205.
37. **Katz L, Donadio S.** (1993) Polyketide synthesis: prospects for hybrid antibiotics. *Annu Rev Microbiol* 47:875-912.
38. **Labro MT, Abdelghaffar H.** (2001) Inmunomodulation by macrolide antibiotics. *J Chemoter* 13:3-8.
39. **Lambalot RH, Cane DE, Aparicio JJ, Katz L.** (1995) Overproduction and characterization of the erythromycin C-12 hydroxylase, EryK. *Biochem* 34:1858-1866.
40. **Labeda DP.** (1987) Transfer of the type strain of *Streptomyces erythreus* (Waksman 1923) Waksman and Henrici 1948 to the genus *Saccharopolyspora* Lancey and Goodfellow 1975 as *Saccharopolyspora erythraea* sp. nov., and designation of a neotype strain for *Streptomyces erythreus*. *Int J Syst Bacteriol* 37:19-22.
41. **Liu H, Reynolds KA.** (1999) Role of crotonyl coenzyme A reductase in determining the ratio of poliketides monensin A and monensin B produced by *Streptomyces cinnamonensis*. *J. Bacteriol* 181:6806-6813.
42. **Liu H, Reynolds KA.** (2001) Precursor supply for polyketide biosynthesis: the role of crotonyl-CoA reductase. *Metab Eng* 3:40-8.
43. **Ludwing ML, Drennan CL, Matthews RG.** (1996) The reactivity of B₁₂ cofactors: the proteins make a difference. *Structure* 4:505-512.
44. **Ludwing ML, Matthews RG.** (1997) Structure-based perspectives on B₁₂-dependent enzymes. *Annu Rev Biochem* 66:269-313.

45. **Mancia F, Smith GA, Evans PR.** (1999) Crystal structure of substrate complexes of Methylmalonyl-CoA mutase. *Biochem* 38:7999-8005.
46. **Marsden AF, Caffrey P, Aparicio JF, Loughran MS, Staunton J, Leadlay PF.** (1994) Stereospecific acyl transfers on the erythromycin-producing polyketide synthase. *Science* 263:378-380.
47. **Marsh EN, McKie N, Davis NK, Leadlay PF.** (1989) Cloning and structural characterization of the genes coding for adenosylcobalamin-dependent methylmalonyl-CoA mutase from *Propionibacterium shermanii*. *Biochem J* 40:42-54.
48. **Martín JF, Liras P.** (1989) Organization and expression of genes involved in the biosynthesis of antibiotics and other secondary metabolites. *Annu Rev Microbiol* 43:173-206.
49. **McGuire JM, Bunch RL, Anderson RC, Boaz HE, Flynn EH, Powell HM, Smith JM.** (1952) Ilotycin, a new antibiotic. *Antibiot Chemother*, 2:281-283.
50. **Neil E, Marsh G.** (2000) Coenzyme B₁₂ dependent glutamate mutase. *Bioorganic Chem* 28:176-189.
51. **Neuzil J, Hostalek Z.** (1986) Enzymes of secondary metabolism and the biosynthesis of macrolide antibiotics. *Folia Microbiol* 31:402-421.
52. **Paulus TJ, Tuan JS, Luebke VE, Maine GT, DeWitt JP, Katz L.** (1990) Mutation y cloning of *eryG*, the structural gene for erythromycin O-methyltransferase from *Saccharopolyspora erythraea*, and expression of *eryG* in *Escherichia coli*, *J Bacteriol* 172:2541-2546.
53. **Pereda A, Summers RG, Stassi DL, Ruad X, Katz L.** (1998) The loading domain is not essential for erythromycin biosynthesis in *Saccharopolyspora erythraea*. *Microbiology* 144:543-553.
54. **Ratnatilleke A, Vrijbloed JW, Robinson JA.** (1999) Cloning and sequencing of coenzyme B₁₂-binding domain of isobutyryl-CoA mutase from *Streptomyces cinnamonensis*, reconstitution of mutase activity, and characterization of the recombinant enzyme produced in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 274:31679-31685.
55. **Redenbach, Kiesser HM, Denapaite D, Eichner A, Cullum J, Kinashi H, Hopwood DA.** (1996) A set of ordered cosmids and a detailed genetic and physical map for the 8 Mb *Streptomyces coelicolor* A3 (2) chromosome. *J Mol Microbiol* 21:77-96.
56. **Reeves AR, Post DA, Vanden Boom TJ.** (1998) Physical genetic map of the erythromycin producing organism *Saccharopolyspora erythraea*. *Microbiology* 144:2151-2159.

57. **Roy IY, Leadlay PF.** (1992) Physical Map Localization of the New *Escherichia coli* Gene *sbm*. *J Bacteriol* 174:5763-5764.
58. **Rubin BK, Tamaoki J.** (2000) Macrolide antibiotics as biological response modifiers. *Curr Opin Investig Drugs* 1:169-172
59. **Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T.** (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
60. **Sanger F, Nicklen S, Coulson AR.** (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci* 74:5463-5467.
61. **Shapiro S, Vining LC.** (1983) Nitrogen metabolism and choranthenicol production in *Streptomyces venezuelae*. *Can J Microbiol* 29:1706-1714.
62. **Smith LM, Meijer WG, Dijkhuizen L, Goodwin PM.** (1996) A protein having similarity with methylmalonyl-CoA mutase is required for the assimilation of methanol and ethanol by *Methylobacterium extorquens* AM1. *Microbiol* 142:675-684.
63. **Stassi DL, Donadio S, Staver M, Katz L.** (1993) Identification of a *Saccharopolyspora erythraea* gene required for the final hydroxylation step in erythromycin biosynthesis. *J Bacteriol* 175:182-189.
64. **Stassi DL, Kakavas SJ, Reynolds KA, Gunawardana G, Swanson S, Zeidner D, Jackson M, Lui H, Buko A, Katz L.** (1998) Ethyl-substituted erythromycin derivatives produced by directed metabolic engineering . *Proc Natl Acad Sci* 95:7305-7309.
65. **Staunton J, Wilkinson B.** (1997) Biosynthesis of Erytromycin and Ripamycin. *Chem Rev* 97:2611-2629.
66. **Steigbigel NH.** Macrolides and clindamycin. In Mandelln Douglas, and Bennett's Principles and Practice of infectious Diseases, 4th Ed. (Mandell, G.L., Bennett, J.E., and Dolin., Eds.) Churchill Livingstone, New York, pp. 334-346.
67. **Summers RG, Donadio S, Staver M, Wendt-Pienkowski E, Hutchinson CR, Katz L.** (1997) Sequencing and mutagenesis of genes from the erythromycin biosynthetic gene cluster of *Saccharopolyspora erythraea* that are involved in L-mycarose and D-desosamine production. *Microbiology* 143:3251-3262.

68. **Tang L, Zhang YZ, Hutchinson CR.** (1994) Amino acid catabolism and antibiotic synthesis: Valine is a source of precursors for macrolide biosynthesis in *Streptomyces ambofaciens* and *Streptomyces fradiae*. *J Bacteriol* 176:6107-6119.
69. **Thomä NH, Meier TW, Evans PR, Leadlay PF.** (1998) Stabilization of radical intermediates by an active-site tyrosine residue in methylmalonyl-CoA mutase. *Biochemistry* 37:14386-14393.
70. **Trevor CC, Punita A.** (1999) Methylmalonyl-CoA mutase encoding gene of *Sinorhizobium meliloti*. *Gene* 226:121-127.
71. **Tuan JS, Weber JM, Staver MJ, Leung JO, Donadio S, Katz L.** (1990) Cloning of genes involved in erythromycin biosynthesis from *Saccharopolyspora erythraea* using a novel actinomycete-*Escherichia coli* cosmid. *Gene* 90:21-29.
72. **Valentin HE, Dennis D.** (1996) Methabolic Pathway(3-hydroxybutirato-co-Hydroxyvalerato) Formation in *Nocardia corallina*: Inactivation of *mutB* by Chromosomal Integration of Kanamicin Resistance gen. *Appl Environ Microbiol* 62:372-379.
73. **Vancura A, Resanka T, Maršálek J, Melzoch K, Basarova G, Kristan V.** (1988) Metabolism of L-threonine and fatty acids and tylosin biosynthesis in *Streptomyces fradiae*. *FEMS Microbiol Letters* 49:411-415.
74. **Vara JA, Lewandoska-Skarbek M, Wang YG, Donadio S, Hutchinson CR.** (1989) Cloning of genes governing the deoxysugar portion of the erythromycin biosynthetic pathway in *Saccharopolyspora erythraea* (*Streptomyces erythreus*). *J Bacteriol* 170: 5872-5881.
75. **Veira J, Messing J.** (1982) The puC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* 19:259-268.
76. **Vrijbloed JW, Burkhardt KZ, Ratnatilleke A, Leiser GA, Robinson AJ.** (1999) Insertional Inactivation of Methylmalonyl-Coenzyme A (CoA) Mutase and Isobutyryl-CoA Mutase Genes in *Streptomyces cinnamonensis*: Influence on Polyketide Antibiotic Biosynthesis. *J Bacteriol* 181:5600-5605.
77. **Vu-Tromg K, Gray PP.** (1987) Influence of ammonium on the biosynthesis of the macrolide antibiotic tylosin. *Enzyme Microbiol Technol* 9:590-593.
78. **Wallace KK, Bao ZY, Dai H, Digate R, Schuler G, Speedie KM.** (1995) Purification of crotonyl-CoA reductase from *Streptomyces collinus* and cloning, sequencing and expression of the corresponding gene in *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* 233:954-962.

79. **Watanabe F, Katsuo A, Takamura Y, Nakano Y.** (1996) Adenosylcobalamin-dependent methylmalonyl-CoA mutase isozymes in the photosynthetic protozoon *Euglena gracilis* Z. *Microbiol* 142:2631-2634.
80. **Weber JM, Wierman CK, Hutchinson CR.** (1985) Genetic analysis of erythromycin production in *Streptomyces erythreus*. *J Bacteriol* 164:425-433.
81. **Weisblum B.** (1995) Insights into erythromycin action from studies of its activity as inducer of resistance. *Ant. Agent. Chemoter* 39:797-805.
82. **Wilkemeyer, M.F., A.M. Crane, and F.D. Ledley.** (1990) Primary structure of mouse methylmalonyl-CoA mutase. *J Biochem* 271:449-455.
83. **Wolfgang P.** (1997) Pathway engineering in secondary metabolite-producing actinomycetes. *Critical Rev. Biotech* 14:251-285.
84. **Wright F, Bibb MJ.** (1992) Codon usage in the G+C rich *Streptomyces* genome. *Gene* 113: 55-65.
85. **Zhang W, Reynolds KA.** (2001) MeaA, a putative coenzyme B12-dependent mutase, provides methylmalonyl coenzyme A for monensin biosynthesis in *Streptomyces cinnamonensis*. *J Bacteriol* 183:2071-80
86. **Zhang W, Yang L, Jiang W, Zhao G, Yang Y, Chiao J.** (1999) Molecular analysis and heterologous expression of the gene encoding methylmalonyl-CoA mutase from rifamycin producing Strain *Amycolatopsis mediterranei* U32. *Appl Biochem Biotech* 82:209-225.
87. **Zhang YX, Tang L, Hutchinson CR.** (1996) Cloning and characterization of a gene (*msdA*) encoding methylmalonic acid semialdehyde dehydrogenase from *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol* 178:490-495.