

56

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ANCESTRÍA COMÚN ENTRE LOS DOMINIOS DE UNIÓN A COFACTORES DE LAS ENZIMAS DEL CICLO DE KREBS (De succinato a oxaloacetato) Y LOS DE LAS ENZIMAS DE LA BETA-OXIDACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS (De acil-CoA a 3-cetoacil-CoA).

300179

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A :

JUAN JAVIER DÍAZ MEJÍA

DIRECTOR DE TESIS:

DR. ANTONIO EUSEBIO LAZCANO-ARAUJO REYES

MÉXICO, D.F.

2001.

FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA

Jefa de la División de Estudios Profesionales de la

Facultad de Ciencias

Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito: "Ancestría común entre los dominios de unión a cofactores de las enzimas del ciclo de Krebs (de succinato a oxaloacetato) y los de las enzimas de la beta-oxidación de ácidos grasos (de acil-CoA a 3-cetoacil-CoA)";

realizado por Juan Javier Díaz Mejía

con número de cuenta 9335037-6, quién cubrió los créditos de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario Dr. Antonio Eusebio Lazcano-Araujo
Reyes

Propietario Dr. Arturo Carlos II Becerra Bracho

Propietario Dr. Ernesto Pérez Rueda
Ernesto Pérez Rueda

Suplente Dr. Víctor Manuel Valdés López
C. Víctor Valdés

Suplente Biol. Sara Ernestina Islas Graciano
Sara Islas G.

FACULTAD DE CIENCIAS
U.N.A.M.

Consejo Departamental de Biología

Dra. Patricia Ramos Morales



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

RESUMEN

La evolución enzimática es esencial para comprender el origen de las rutas metabólicas. La presión de selección que ejerció el oxígeno en rutas bioquímicamente anaerobias fue un factor decisivo para el cambio en las estrategias metabólicas de muchas especies. El ciclo de Krebs y la β -oxidación son dos de las rutas metabólicas más representativas de la estrategia heterótrofa aerobia para la obtención de energía en forma de ATP y nucleósidos difosfato con poder reductor, a partir de la degradación de ácidos tricarbóxicos y acil-CoA ésteres, respectivamente. Pero para ello, ambas rutas deben conectarse con la fosforilación oxidativa, una ruta completamente dependiente de oxígeno, lo que sugiere que si las enzimas que catalizan el ciclo de Krebs y la β -oxidación estuvieron presentes en sistemas bioquímicamente anaerobios debieron haber sido como parte de rutas no dependientes de oxígeno. Para el caso de las enzimas del ciclo de Krebs se ha propuesto que las rutas de fijación de carbono, del glioxalato, o de la síntesis de aminoácidos pudieran ser las rutas ancestrales, pero hasta donde sabemos para el caso de las de la β -oxidación poco se ha propuesto sobre su posible origen.

Dado que el ciclo de Krebs y la β -oxidación comparten una serie de cuatro reacciones químicamente similares, en este trabajo se analizan las enzimas que catalizan estas rutas para saber si pueden tener un origen común. Se presentan evidencias de que a nivel de estructura secundaria y terciaria se puede detectar la homología de algunos de los dominios de unión a los cofactores de estas enzimas, aunque no se ha encontrado que esa homología sea detectable a lo largo de toda la enzima, por lo métodos aquí empleados. De hecho, las inserciones de elementos estructurales que distinguen a los dominios homólogos de estas enzimas parecieran ser la fuente de variación para el origen de actividades químicamente similares, sobre distintos sustratos. También hemos encontrado que en estas rutas las enzimas que catalizan reacciones termodinámicamente poco favorables son las que presentan sitios conservados, probablemente porque la evolución tipo patchwork en este tipo de enzimas pudiera ser un proceso más común que la convergencia funcional, contrario a lo encontrado para las enzimas que catalizan reacciones termodinámicamente favorables.

También hemos analizado otras rutas del metabolismo de acil-CoA ésteres para proponer el posible origen de las enzimas de la β -oxidación, y creemos que pudieran ser las de la síntesis tipo I de ácidos grasos. Debido a la relación que estas dos rutas metabólicas guardan con la síntesis de fosfolípidos y su incorporación a las membranas biológicas, y a que las enzimas que las catalizan son homólogas, creemos que los ácidos grasos pudieron tener, en condiciones bioquímicamente anaerobias, un papel exclusivamente estructural como formadores de membranas, y que no fue sino hasta el advenimiento de las condiciones aerobias cuando estas rutas metabólicas y los ácidos grasos adquirieron su papel energético por medio de las enzimas de la β -oxidación.

RESUMEN

La evolución enzimática es esencial para comprender el origen de las rutas metabólicas. La presión de selección que ejerció el oxígeno en rutas bioquímicamente anaerobias fue un factor decisivo para el cambio en las estrategias metabólicas de muchas especies. El ciclo de Krebs y la β -oxidación son dos de las rutas metabólicas más representativas de la estrategia heterótrofa aerobia para la obtención de energía en forma de ATP y nucleósidos difosfato con poder reductor, a partir de la degradación de ácidos tricarbóxicos y acil-CoA ésteres, respectivamente. Pero para ello, ambas rutas deben conectarse con la fosforilación oxidativa, una ruta completamente dependiente de oxígeno, lo que sugiere que si las enzimas que catalizan el ciclo de Krebs y la β -oxidación estuvieron presentes en sistemas bioquímicamente anaerobios debieron haber sido como parte de rutas no dependientes de oxígeno. Para el caso de las enzimas del ciclo de Krebs se ha propuesto que las rutas de fijación de carbono, del glioxalato, o de la síntesis de aminoácidos pudieran ser las rutas ancestrales, pero hasta donde sabemos para el caso de las de la β -oxidación poco se ha propuesto sobre su posible origen.

Dado que el ciclo de Krebs y la β -oxidación comparten una serie de cuatro reacciones químicamente similares, en este trabajo se analizan las enzimas que catalizan estas rutas para saber si pueden tener un origen común. Se presentan evidencias de que a nivel de estructura secundaria y terciaria se puede detectar la homología de algunos de los dominios de unión a los cofactores de estas enzimas, aunque no se ha encontrado que esa homología sea detectable a lo largo de toda la enzima, por los métodos aquí empleados. De hecho, las inserciones de elementos estructurales que distinguen a los dominios homólogos de estas enzimas parecieran ser la fuente de variación para el origen de actividades químicamente similares, sobre distintos sustratos. También hemos encontrado que en estas rutas las enzimas que catalizan reacciones termodinámicamente poco favorables son las que presentan sitios conservados, probablemente porque la evolución tipo patchwork en este tipo de enzimas pudiera ser un proceso más común que la convergencia funcional, contrario a lo encontrado para las enzimas que catalizan reacciones termodinámicamente favorables.

También hemos analizado otras rutas del metabolismo de acil-CoA ésteres para proponer el posible origen de las enzimas de la β -oxidación, y creemos que pudieran ser las de la síntesis tipo I de ácidos grasos. Debido a la relación que estas dos rutas metabólicas guardan con la síntesis de fosfolípidos y su incorporación a las membranas biológicas, y a que las enzimas que las catalizan son homólogas, creemos que los ácidos grasos pudieron tener, en condiciones bioquímicamente anaerobias, un papel exclusivamente estructural como formadores de membranas, y que no fue sino hasta el advenimiento de las condiciones aerobias cuando estas rutas metabólicas y los ácidos grasos adquirieron su papel energético por medio de las enzimas de la β -oxidación.

INTRODUCCIÓN

Dos de las principales presiones de selección que las especies han tenido que enfrentar a lo largo de la historia evolutiva estriban en satisfacer sus requerimientos estructurales y energéticos. Los primeros se derivan de la síntesis de componentes de membranas, DNA, RNA y proteínas, y los segundos de la degradación y síntesis de catabolitos, y la producción de los componentes celulares necesarios para la asimilación de fuentes externas de materia y energía. Ambos han llevado a la elaboración y conjunción de redes de rutas de síntesis y degradación de biomoléculas, conocidas como metabolismo intermediario.

Las variantes en el metabolismo intermediario dependen de las condiciones ambientales y el nivel biológico al que se realicen, es decir, el dominio celular (Archaea, Bacteria o Eucarya), el estadio del organismo en su ciclo de vida, y en el caso de los organismos pluricelulares, la función específica de la célula, linaje celular u órgano, e inclusive el organelo en el que se realice el proceso. Independientemente de ello, el mapa de rutas metabólicas (Nicholson, 1997) es una expresión de la universalidad y el consenso del metabolismo intermediario, y refleja la selección y adaptación de rutas metabólicas desde el periodo preenzimático hasta nuestros días (Morowitz *et al*, 2000).

El surgimiento de las células, y las endosimbiosis que han generado a las mitocondrias (Margulis, 1993; y Gray *et al*, 1999), cloroplastos (Margulis, 1993; y Martin *et al*, 1998) y probablemente peroxisomas (Latruffe y Vamecq, 2000), han permitido que al interior de una célula haya regiones especializadas en el metabolismo de cierto tipo de sustratos, como ocurre con el ciclo de Krebs, confinado en los eucariontes a las mitocondrias, o la degradación de los ácidos grasos, que en hongos se realiza casi exclusivamente en peroxisomas, mientras que en animales se da también en mitocondrias. Además, algunos tipos de sustratos, como los ácidos grasos de cadena larga, pueden ser metabolizados únicamente por eucariontes, y sólo dentro de los organelos antes mencionados. Esto ha permitido el origen y especialización de rutas metabólicas de algunos tipos celulares y dentro de sus compartimentos.

A nivel molecular, el origen, la evolución y la distribución biológica de diversas proteínas han sido una fuente clave para el origen y la modificación de rutas metabólicas. A continuación explicamos algunos procesos importantes en la evolución molecular, específicamente de evolución enzimática, y los modelos de evolución metabólica que los relacionan con las rutas biosintéticas.

La evolución enzimática, y el origen y modificación de las rutas metabólicas.

Uno de los eventos más importantes para originar nuevas funciones enzimáticas en el esquema de la universalidad del metabolismo intermediario es la **paralogía** (Gerlt y Babbitt, 2001). Las enzimas parálogas se generan por la duplicación génica de una enzima ortóloga, derivado de ello, una de las copias puede continuar realizando la (s) catálisis de la enzima original y la otra especializarse en un tipo específico de sustratos e incluso adquirir la capacidad de realizar una nueva función (Gerlt y Babbitt, 2001), lo cual podría ser poco probable en enzimas ortólogas, por tener la presión de selección de seguir realizando las catálisis originales. Por otro lado, la convergencia funcional, que también puede contribuir al origen de rutas metabólicas, podría estar confinada a las catálisis favorecidas termodinámicamente. La transferencia horizontal es un proceso que también pudiera contribuir a la generación de novedades evolutivas en el linaje receptor, aunque en la mayoría de los casos ello no se refleje en el mapa general de rutas metabólicas, como en los eventos de transferencia

horizontal de genes de resistencia a estrés por antibióticos, metales, etc., donde la catálisis existía antes del evento de transferencia, solo cambió de dueño. Se considera que dos genes, y por lo tanto, las enzimas que codifican, son parálogos si en una población ocurre una duplicación génica independientemente de un proceso de especiación y las copias se heredan de manera que en cada una de las nuevas especies se encuentren dos o más enzimas con una gran similitud a nivel de secuencia y muy probablemente con actividades bioquímicas similares. Por otro lado, si la divergencia se da al tiempo de la especiación, se tendrá un solo tipo enzimático en cada especie, y se le considerará ortólogo. Como sea, las enzimas originadas por este proceso pueden ser clasificadas como una familia.

En un árbol filogenético pueden ser incluidas tanto enzimas parálogas como ortólogas porque tienen un ancestro común, pero tenemos que distinguirlas para no confundir eventos de paralogía con eventos de especiación, sobre todo si con ese árbol tratamos de reconstruir historias evolutivas a nivel de especie o si queremos reconocer los eventos de paralogía que han generado la gama de enzimas parálogas que se están analizando. Una forma de lograrlo es hacer un árbol universal usando como marcador las enzimas en cuestión, y catalogar como ortólogas a aquellas de diferentes especies que forman un clado, y como parálogas a aquellas de la misma especie que se agrupan en un solo clado.

A pesar de que generalmente las duplicaciones que generan paralogía ocurren en todo el gen y no en regiones, la evolución de cada dominio funcional de una enzima (unión a cofactores, sitio activo, región de multimerización, etc.), es semi-independiente, al tener cada uno sus propias presiones de selección. Es decir, **a nivel de evolución enzimática, la unidad evolutiva son los dominios y no las enzimas como tal**, aunque la evolución de algunos dominios puede verse influenciada por su relación con otros dominios, en especial en el caso de enzimas con estructura cuaternaria y de enzimas con dominios catalíticos dependientes de dominios reguladores, y viceversa.

Además, el intercambio de dominios entre genes ("shuffling") puede provocar que los miembros de una familia diverjan más en algunas regiones de su estructura que en otras (**evolución modular**). De ello que al comparar enzimas con mecanismos catalíticos similares que actúan sobre sustratos distintos, o viceversa, o sea con mecanismos distintos sobre sustratos similares, se detecten algunos de sus dominios homólogos y otros polifiléticos a nivel de estructura primaria, secundaria y terciaria. De ahí la necesidad de formar una categoría de clasificación superior, llamada superfamilia, cuyos miembros también se consideran homólogos, pero para detectar que enzimas pertenecen a ella, los análisis deben hacerse a nivel de estructura secundaria, terciaria y de la conservación de los mecanismos químicos, porque a nivel de estructura primaria los valores de similitud e identidad pueden ser menores a 30 y 20 %, respectivamente, lo cual no permite establecer juicios sobre las relaciones filogenéticas, ni sobre si su origen es homólogo o polifilético. Por ello, hay que ser cuidadosos, puesto que la similitud en mecanismos químicos e incluso en plegamientos estructurales puede ser el resultado de convergencias y no de origen común. Así pues, una superfamilia de enzimas puede albergar proteínas con dominios homólogos al resto de la superfamilia, pero también con dominios polifiléticos, los cuales se suponen adquiridos como parte de la evolución divergente de un tipo enzimático particular y que por ello no comparte con el resto de su superfamilia.

Un ejemplo de una superfamilia, es la que agrupa a las enzimas con plegamiento tipo Rossmann. El tipo más sencillo de este plegamiento consta seis hojas β con dos o tres hélices α paralelas a cada lado, aunque dependiendo de la enzima puede haber inserciones o pérdidas de fragmentos estructurales. Entre uno de los dos grupos de hélices α y la lámina de hojas β , se puede alojar una molécula de algún dinucleósido (FAD y NAD, NADPH, etc.), por lo que el plegamiento Rossmann es común en las deshidrogenasas que utilizan como cofactor dinucleótidos. Estudios de biología molecular comparada de las enzimas con plegamiento tipo Rossmann, la conformación de los cofactores, la distancia atómica entre sus

carbonos α ("root mean squared distance" R.M.S.D), y los mecanismos de acción, sugieren que el plegamiento tipo Rossmann es de origen parafilético (Carugo y Argos, 1997 A y B), por lo que se trata de una **convergencia estructural**, pero que algunos de sus tipos se pueden distinguir como homólogos (Carugo y Argos, 1997 A y B; Vallon, 2000). Solo los que tienen un ancestro común pueden considerarse como miembros de la superfamilia. El resto se agrupa en las bases de datos de clasificaciones de estructuras de dominios de proteínas SCOP (Murzin *et al*, 1995) y CATH (Orengo *et al*, 1997) en una categoría aún superior, llamada plegamiento, en la que la homología no ha podido ser demostrada o rechazada.

Evolución enzimática, origen y desarrollo de rutas metabólicas

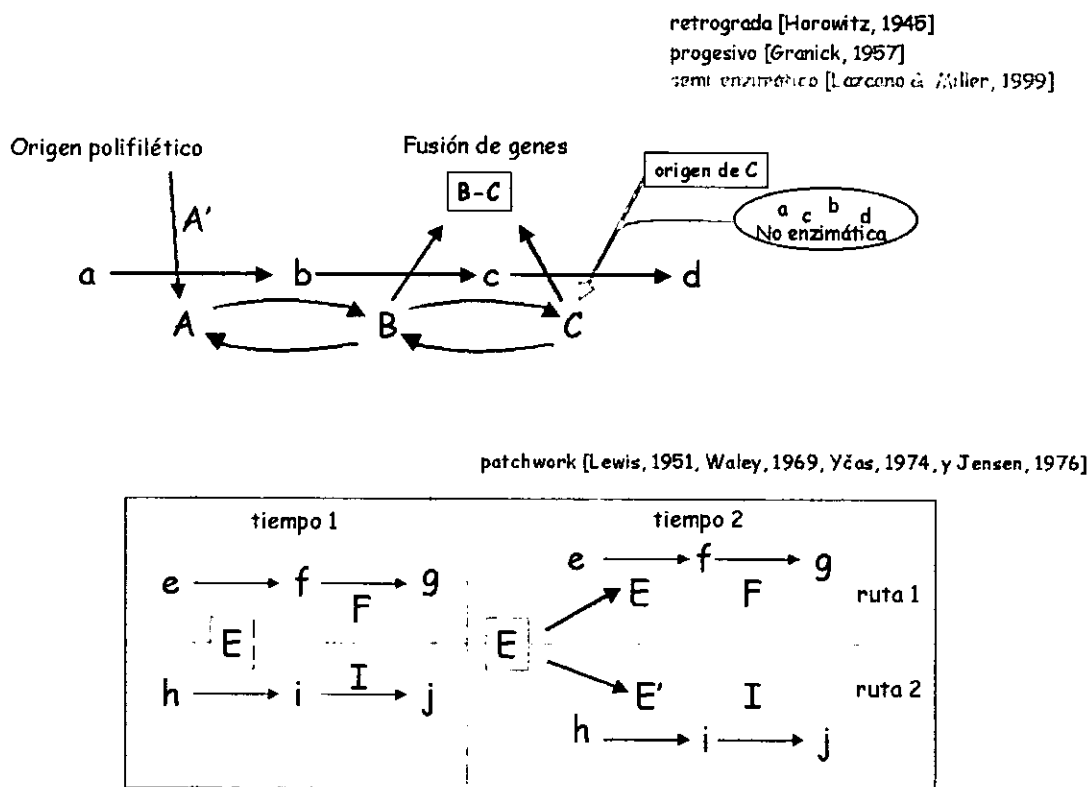


Figura 1. Evolución enzimática y el origen de rutas metabólicas. Las letras mayúsculas se refieren a enzimas, mientras que las minúsculas a sustratos y productos y las flechas en negro al sentido de la reacción. Los colores del resto de flechas y líneas representan el sentido de la ancestría descendencia en los modelos de evolución: "Hacia adelante" (azul), "Hacia atrás" (rojo), "Patchwork" (verde), Semienzimático (amarillo), Sustitución de una enzima por otra no-homóloga (café), Fusión de genes (lila). Para más detalles ver texto.

La **fusión de genes** se refiere a un fenómeno en que el *genB* y el *genC* (Figura 1) que codifican para las enzimas monofuncionales B y C por separado, se unen químicamente, dando lugar a una enzima bifuncional BC. Si la fusión es precedida de una duplicación de uno o ambos genes monofuncionales, muy probablemente las enzimas monofuncionales se especialicen en un tipo de sustrato similar, pero no idéntico al de la enzima bifuncional; o bien, si hay duplicación previa pero no especialización, se entabla una competencia entre las enzimas monofuncionales y la multifuncional por la catálisis del paso en común, y en caso de no haber duplicación previa, los genes de las monofuncionales simplemente son los que forman a la

multifuncional. La fusión de genes ha sido reconocida con más frecuencia en eucariontes (Enright *et al*, 1999), probablemente ligado con el hecho de que brinda una regulación más estrecha comparada con la de enzimas monofuncionales. Sin embargo, son necesarios más estudios en genomas completamente secuenciados para determinar la relevancia de la fusión de genes en la evolución de las proteínas y las rutas metabólicas en las que interaccionan (Enright *et al*, 1999). Se han propuesto casos en los que la fusión ha sido de genes parálogos, pudiendo generar enzimas monofuncionales como HisA (Fani *et al*, 1997) o multifuncionales como las tipo II de la oxidación de ácidos grasos (Qin *et al*, 1999).

Otro punto importante en la evolución de las rutas metabólicas se da cuando una enzima B que cataliza la conversión del sustrato "b" al producto "c" y otra no-homóloga B' compiten por la catálisis de la misma reacción (Figura 1). En este caso, o bien una enzima desplaza a la otra, como en el caso de las 2-enoil-CoA hidratatas de la β -oxidación (Hiltunen y Qin, 2000), o bien coexisten y se regula su actividad dependiendo de las necesidades de la célula, como en el caso de las 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasas de la misma ruta (Hiltunen y Qin, 2000). Este proceso está muy relacionado con el fenómeno de que una enzima con un sitio activo que cataliza el paso del sustrato "b" al producto "c" adquiere la capacidad de llevar a cabo otra catálisis, que puede o no parecerse químicamente a la original, inclusive catalizando dos pasos metabólicos en el mismo sitio activo. Como ocurre con las hidratatas/isomeratas de la β -oxidación, (S)-2-enoil-CoA hidratata/ Δ^3 - Δ^2 -enoil-CoA isomerasa (Palosaari *et al*, 1991), y de la síntesis tipo I de ácidos grasos, 3-hidroxicetoadil-[ACP] deshidrataza/2-decenoil-ACP isomerasa (Leesong *et al*, 1996), las cuales realizan sus dos funciones catalíticas en el mismo sitio activo.

Modelos de evolución enzimática, origen y modificación de rutas metabólicas.

El primer modelo de evolución de rutas metabólicas en función de las enzimas que las catalizan, fue el de Horowitz, (1945), llamado de "Evolución retrógrada", basado en la hipótesis heterotrófica del origen de la vida de Oparin, (1938) y la correspondencia uno a uno entre genes y enzimas propuesta por Beadle y Tatum, (1941). En este modelo se asume la duplicación de un *genC* que codifica para una enzima C (Figura 1), generando un gen parálogo *genB*, cuya enzima se especializa en catalizar el paso inmediato anterior de la ruta metabólica.

Poco después, Lewis, (1951), seguido de Waley, (1969), Y[•]as, (1974), y Jensen, (1976), plantearon un esquema diferente para la evolución de las rutas metabólicas, basado en dos características de la evolución enzimática. La primera es que ciertas enzimas (Figura 1, enzima C) pueden catalizar procesos en más de una ruta metabólica, y la segunda es que tras una duplicación del *genC* se genera una enzima paróloga C', asentando las bases para que cada una de las enzimas C y C' se especialicen en una de las rutas metabólicas que inicialmente catalizaba C por si sola. Este modelo, llamado de "Evolución por "patchwork", ubica a la enzima C en una ruta metabólica y a C' en otra distinta, a diferencia del modelo de evolución retrógrada, que también ubica a las dos en pasos distintos pero de la misma ruta.

Granick, (1957), propuso un modelo evolutivo muy parecido al de la evolución retrógrada de Horowitz, pero en lugar de ser el *genC* quien genera al *genB* y este a su vez al *genA* (Figura 1), ocurre a la inversa, es decir, el *genA* genera al *genB* y éste al *genC*. Ello se conoce como el modelo de "Evolución progresiva", y asume a las enzimas que catalizan los pasos metabólicos más complejos como derivadas, a diferencia del modelo de Horowitz que las asume como ancestrales.

Un modelo más reciente, es el del "Origen semienzimático de las rutas metabólicas" de Lazcano y Miller, (1999), el cual asume un paso metabólico que ocurrió u ocurre de manera espontánea por ser termodinámicamente favorable y que por ende no requiere catálisis enzimática (Figura 1), pero que al originarse una enzima poco específica que lo catalice, "la adopta" y en lo sucesivo el paso metabólico puede ser o no catalizado por la enzima. Este modelo es especialmente útil para explicar estadios de evolución temprana del periodo preenzimático.

Los modelos de Horowitz y Granick son mutuamente excluyentes, aunque en ambos la presión de selección dominante es la conservación de la especificidad por el sustrato, mientras que en el modelos de Lewis, Waley, Y•as y Jensen, y el de Lazcano y Miller, la presión imperante es la conservación del mecanismo químico. De hecho, la baja especificidad por el sustrato es lo que permite la incorporación de la enzima preexistente a nuevas rutas metabólicas. Éstos últimos modelos pueden ser complementarios entre sí, ejemplos de cada uno de ellos los revisan Gerlt y Babbitt, (2001), Lazcano y Miller, (1999), y Peretó *et al.* (1997), en éstos dos últimos trabajos, se manifiestan las imposibilidades del modelo de Horowitz, y creemos que también del de Granick, para explicar la evolución de rutas metabólicas con intermediarios químicamente inestables en ausencia de enzimas, o bien, difíciles de ser introducidos a través de la membranas biológicas en ausencia de transportadores especializados. También se explica que el modelo de Horowitz asume, como el de Granick, que la sucesión de pasos químicamente similares en las rutas metabólicas es una generalidad, pero en realidad es poco común, y sobretodo que hay pocos ejemplos de que las enzimas que catalizan pasos sucesivos de una ruta sean homólogas, en comparación con los casos que pueden ser explicados por patchwork, en que las enzimas que catalizan pasos sucesivos son polifiléticas y parecieran haber sido reclutadas de rutas metabólicas distintas.

Aparición del oxígeno en las rutas metabólicas y su repercusión en la heterotrofia.

Las especies han participado en la evolución biológica de manera adaptativa en función de las condiciones de su medio, pero también, al modificar sus rutas metabólicas, influyendo en la evolución de las características geoquímicas del planeta. Tal vez el caso extremo sea la influencia que tuvieron los antiguos organismos fotosintéticos en su atmósfera primitiva y en el metabolismo intermediario. Es decir, el paso de una atmósfera reductora o anóxica en la que las principales estrategias heterótrofas para la obtención de energía fueron las fermentaciones, la quimiosíntesis y la fotosíntesis anoxigénica, a una oxidante en la que los principales actores son la respiración aerobia, la fosforilación oxidativa y las rutas metabólicas que concatenan, como el ciclo de Krebs y la espiral de la oxidación de ácidos grasos. Se ha propuesto que el metabolismo anaerobio sulfurado representa el precursor evolutivo de los otros sistemas de respiración anaerobia (basados en sulfatos y nitratos reductores) y finalmente, de la respiración aerobia (Castresana y Moreira, 1999; y Hederstedt, 1999).

El cambio de una atmósfera reductora a una oxidante constituyó una fuerte presión de selección negativa para las especies anaerobias a nivel biológico, y permitió la aparición desarrollo de las rutas metabólicas basadas en la bioquímica oxigenada, un buen ejemplo de ello son las rutas del metabolismo intermediario energético basado en especies oxigenadas reactivas, como el ciclo de Krebs, la degradación de aminoácidos, el metabolismo de ácidos grasos, etc. La combinación de estudios de secuenciación y análisis de genomas completos, junto con los avances en las geociencias, en especial referentes a estudios de atmósferas primitivas han puesto en manifiesto lo anterior (Banfield y Marshall, 2000).

Las similitudes químicas entre el ciclo de Krebs y la espiral de la oxidación de los ácidos grasos (β -oxidación).

Dos de los principales procesos que brindan energía a los organismos heterótrofos aerobios para mantener su metabolismo intermediario son el ciclo de Krebs y la degradación u oxidación de ácidos grasos, también llamada β -oxidación.

El ciclo de los ácidos tricarboxílicos o ciclo de Krebs (Figura 2) fue propuesto por Hans Krebs en 1937, este ciclo está compuesto de nueve reacciones químicas, cada una catalizada por un tipo enzimático, y que a excepción de la primera pueden ser reversibles. El ciclo de Krebs es una de las rutas más representativas de la estrategia heterótrofa de metabolismo aerobio por su conexión con la fosforilación oxidativa. Sin embargo, dado que este proceso requiere de la participación de oxígeno, nos obliga a suponer que como tal, el ciclo de Krebs (de acetato a oxaloacetato) no puede ser anterior al surgimiento de la atmósfera oxidante. Existen evidencias de que el sentido original de este ciclo o al menos parte de él fue invertido (Gest, 1981; Huynen *et al*, 1999; Morowitz *et al*, 2000; Romano y Conway, 1996). En los organismos actuales, las enzimas e intermediarios que actúan en el ciclo de Krebs son también empleados en sentido inverso, de oxaloacetato a succinil-CoA, para fijar carbono en forma de CO_2 , en organismos situados en clados basales de árboles filogenéticos, y algunos otros intermediarios se utilizan para complementar rutas alternas como la del ciclo del glioxilato, una ruta descubierta por Krebs y Konberg (1933) en la que se forma glucosa a partir de acetil-CoA. Se presume que algunas de las enzimas del ciclo de Krebs provienen por un mecanismo de patchwork de las rutas de síntesis de algunos aminoácidos (Irvin y Bhattacharjee, 1998; y Meléndez-Hevia *et al*, 1996). Una revisión sobre la evolución de las enzimas del ciclo de Krebs es la de Huynen *et al*, (1999), en ella se manifiestan las relaciones filogenéticas de las enzimas de este ciclo, así como su distribución biológica en los genomas completamente secuenciados, y en base a ello los posibles ancestros de esta ruta, las enzimas que las catalizan y su papel inicial.

Por otra parte, los ácidos grasos son ésteres unidos a una molécula de coenzima A (CoA) (Figura 3), por lo que forman parte de una amplia gama de moléculas llamadas en conjunto acil-CoA ésteres, otros acil-CoA ésteres son los intermediarios del metabolismo del butanoato, propanoato, β -alanina, aminoácidos ramificados, etc. Los ácidos grasos tienen una cadena de carbonos metilados, cuya longitud depende del tipo celular y de su función metabólica, endócrina, o estructural. Hay ácidos grasos de cadena corta ($C_n < 10$), mediana ($10 < C_n < 20$), larga ($20 < C_n < 24$) y muy larga ($C_n > 26$), y hay enzimas que actúan preferencialmente sobre los ácidos grasos con cada uno de estos tipos de cadenas. Los ácidos grasos tienen un doble papel biológico: por un lado, son los únicos componentes universales de las membranas biológicas al formar la parte hidrofóbica de los fosfolípidos, y por otro actúan como reservorios de energía química. En algunos organismos como las esporas de hongos, los animales hibernantes y los migratorios pueden ser incluso las principales fuentes energéticas al obtener energía en forma de ATP y poder reductor en forma de dinucleótidos derivados de deshidrogenaciones de acil grasos-CoA por medio de la β -oxidación.

La β -oxidación (Figura 3) fue propuesta por Franz Knoop en 1904 como un proceso a manera de espiral. En ella los ácidos grasos con cadena par de carbonos saturada de metilos son degradados, eliminando dos carbonos metilados en forma de CoA por cada vuelta de la espiral. Este proceso se realiza en cuatro pasos catalizados enzimáticamente de manera sucesiva (Srere y Sumegi, 1994), y al igual que en el ciclo de Krebs, a excepción del primero, pueden ser

reversibles: 1) deshidrogenasas, u oxidasas (en peroxisomas); 2) hidratasas (las tipo I actúan sobre (S)-acil grasos-CoA, y las tipo II sobre (R)-acil grasos-CoA); 3) deshidrogenasas (las tipo I actúan sobre (S)-acil grasos-CoA, y las tipo II sobre (R)-acil grasos-CoA); y 4) tiolasas. Existe un quinto tipo enzimático que cataliza un paso previo llamado de activación, en el que se une la CoA al éster (Figura 3). Este paso es dependiente de una molécula de ATP, que sirve de sustrato para el ataque nucleofílico del grupo tiol de la CoA, y a diferencia de los otros cuatro pasos que en eucariontes se realizan en mitocondrias, glioxisomas y peroxisomas, la activación se lleva a cabo en el citoplasma, por lo que los ácidos grasos en eucariontes requieren proteínas acarreadoras que los introducen a los organelos. Existen dos tipos de enzimas multifuncionales (MFE) de la β -oxidación. Las de tipo I catalizan los pasos dos, tres y cuatro de la ruta, y actúan sobre (S)-acil grasos-CoA, mientras que las de tipo II, también catalizan los pasos dos y tres, pero actúan sobre (R)-acil grasos-CoA (Fig. 3), además de otros pasos de rutas metabólicas de esteroides y esterol. La degradación de los ácidos grasos poliinsaturados (con cadenas con mas de un enlace C=C) requiere de un conjunto de tres enzimas accesorias para su introducción a la β -oxidación al nivel de enoil-CoA (figura 3). La degradación de ácidos grasos con cadenas impares por β -oxidación requiere de la acción previa de otras rutas como la α -oxidación que eliminen un carbono metilado de la cadena (Figura 3). Para que los ácidos grasos con radicales metilo en posición (R) puedan ser degradados por completo por la β -oxidación requieren ser convertidos al tipo (S) por medio de racemasas o epimerasas y ser incorporados a nivel de 3-hidroxiacil-CoA (Figura 3).

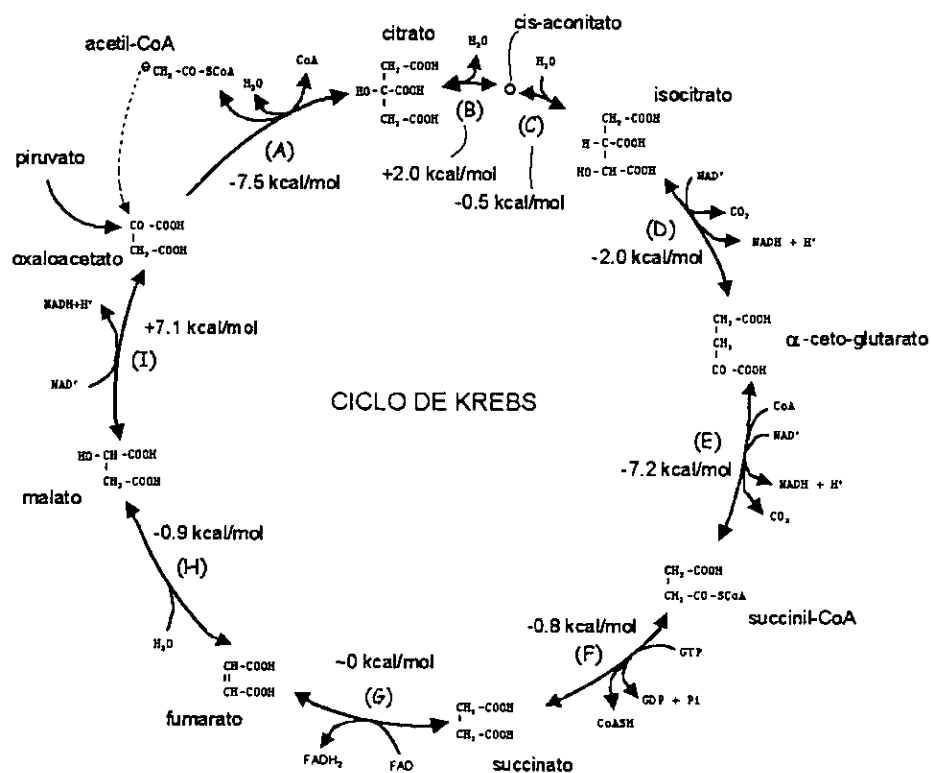


Figura 2. Ciclo de Krebs. Las letras minúsculas enmarcadas representan los intermediarios: a) citrato, b) cis-aconitato, c) isocitrato, d) α -ceto-glutarato, e) succinil-CoA, f) succinato, g) fumarato, h) malato, i) oxaloacetato, p) piruvato, y q) acetil-CoA. Los DG₀ de cambio de las reacciones tomados de Stryer (1988) son: (A) catalizada por la citrato sintasa, -7.5 kcal/mol, (B), catalizada por la primer aconitasa, +2.0 kcal/mol (C), catalizada por la segunda aconitasa, -0.5 kcal/mol, (D) catalizada por la isocitrato deshidrogenasa, -2.0 kcal/mol, (E) catalizada por la α -cetoglutarato deshidrogenasa, -7.2 kcal/mol, (F) catalizada por la succinil-CoA ligasa, -0.8 kcal/mol, (G) catalizada por la succinato deshidrogenasa o por la fumarato reductasa, ~0 kcal/mol, (H) catalizada por alguna fumarato hidratasa, -0.9 kcal/mol, (I) catalizada por alguna malato deshidrogenasa, +7.1 kcal/mol.

La β -oxidación ayuda a la producción de una alta cantidad de moléculas de ATP. Así, la degradación de cada molécula de ácido graso con una cadena de 16 carbonos metilados sin enlaces dobles (16:0) ayuda por medio de la β -oxidación a producir 131 equivalentes de ATP, en comparación con los 38 que puede brindar la degradación de una molécula de glucosa por la vía del ciclo de Krebs. El acetil-CoA liberado en la espiral de la β -oxidación puede ser incorporado al ciclo de Krebs. Además, las reacciones de deshidrogenación de la β -oxidación permiten la conversión de una molécula de FAD a FADH₂ y otra de NAD⁺ a NADH₂H⁺ por cada vuelta de la espiral. Así, un ácido graso 16:0 puede participar en la síntesis de 7 moléculas de cada uno de estos dinucleótidos con poder reductor, que se acoplan por su lado a la cadena respiratoria.

Al igual que el ciclo de Krebs, la β -oxidación como tal, no pudo estar presente en organismos anaerobios antiguos. Por una parte, por su relación con la fosforilación oxidativa que requiere de oxígeno, y por la otra porque a nivel bioquímico el segundo paso de la β -oxidación (hidratación de enoil-CoA), al igual que el octavo paso del ciclo de Krebs (hidratación de fumarato), involucran la unión de un radical hidroxilo al tercer carbono de los intermediarios respectivos, que hubiera sido letal para los antiguos organismos anaerobios obligados a nivel biológico y bioquímico.

En la actualidad organismos anaerobios obligados como los clostridia pueden realizar la β -oxidación por medio de las enzimas arriba mencionadas porque son anaerobios a nivel ecológico, pero no a nivel bioquímico. Se supone que al ser bacterias gram-positivas, su carácter de anaerobio ha sido adquirido recientemente, y no como en el caso de las arqueobacterias metanogénicas que como linaje evolutivo son anaerobias desde tiempos remotos. La comparación entre los marcos de lectura abiertos "ORF" de los genomas completamente secuenciados de las bacterias metanogénicas y de su grupo hermano los *Pyrococcus* spp. (Woese *et al*, 1990), y las secuencias de las enzimas de la β -oxidación, no han mostrado posibles representantes de las enzimas encargadas de esta ruta en otras especies, incluyendo *Archaeoglobus fulgidus* (Doolittle, 1999). Por lo que suponemos que si la β -oxidación estuvo presente en organismos anaerobios a nivel bioquímico del linaje de las arqueobacterias metanogénicas por medio de las enzimas que realizan actualmente este proceso en otros sistemas, las enzimas debieron divergir a tal grado que ya no podemos distinguirlas por análisis de secuencias, o bien, que las perdieron, o más aún, que nunca las tuvieron. Aunque cabe señalar que la búsqueda de dominios podría permitir encontrar homólogos a nivel de dominios de estas enzimas.

Hiltunen y Qin, (2000), a la par de una revisión de la nomenclatura de las enzimas de la β -oxidación, y citan que los procesos evolutivos más comunes en estos grupos de enzimas son: paralogía, reclutamiento de enzimas auxiliares homólogas y no homólogas, adaptación de sitios activos preexistentes para nuevas catálisis, y cooperatividad con otras rutas metabólicas como la α -oxidación de ácidos grasos, aunque discuten la necesidad de estudios al respecto. Por lo que consideramos que es necesario el estudio de la β -oxidación desde una perspectiva evolutiva, porque los estudios de esta ruta se han cifrado en aspectos bioquímicos (Hiltunen y Qin, 2000; y Wanders *et al*, 2001).

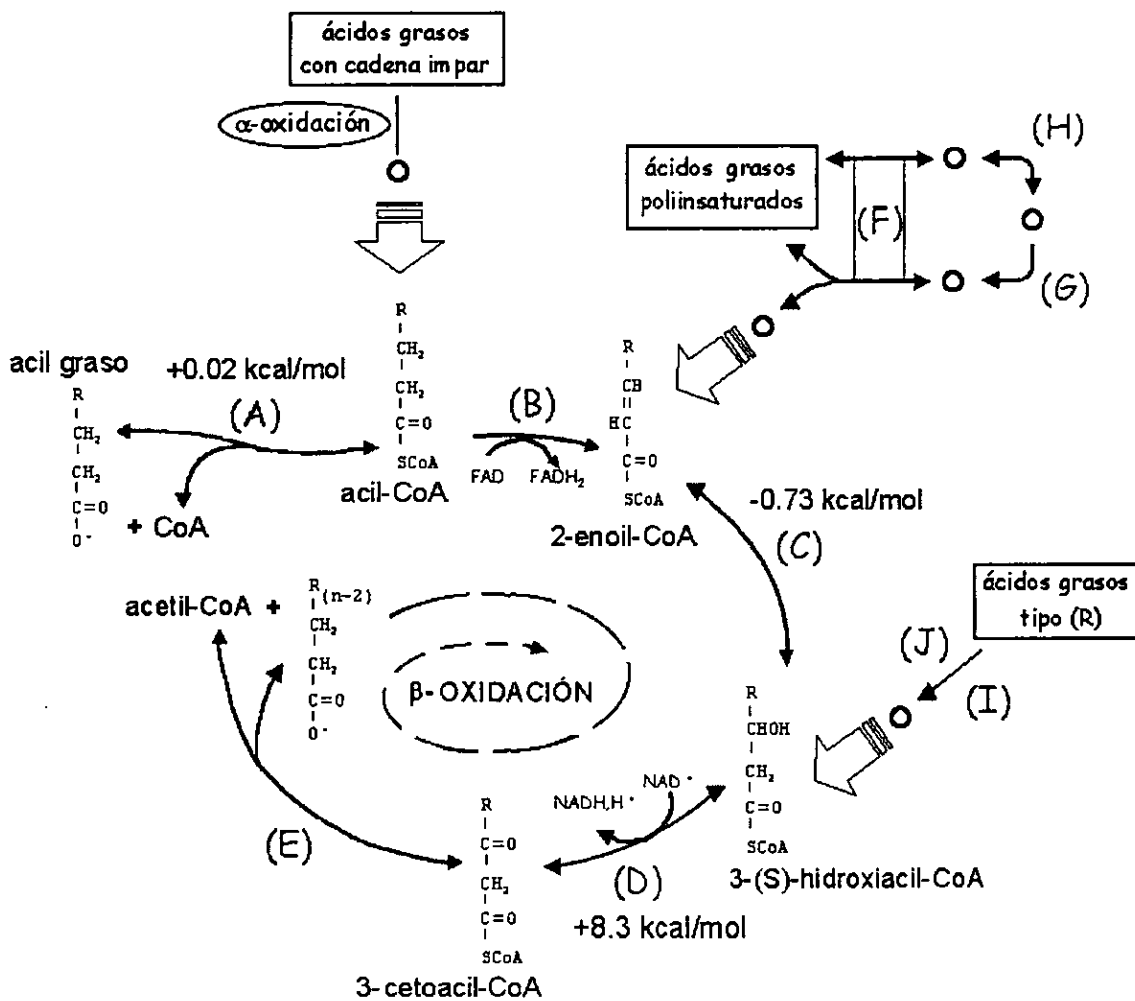


Figura 3. Espiral de la oxidación de ácidos grasos (β-oxidación). Las letras minúsculas enmarcadas representan los intermediarios: a) acil-graso, b) acil-CoA, c) 2-enoil-CoA, d) 3-(S)-hidroxiacil-CoA, e) 3-cetoacil-CoA, f) acil-CoA (C n-2). Los ΔG° de cambio de las reacciones son: (A) catalizada por las acil-graso-CoA ligasas (acil-CoA sintetasa), +0.02 kcal/mol (Lehninger et al, 1993), (B), catalizada por alguna acil-CoA deshidrogenasa kcal/mol (C), catalizada por la (S)-2-enoil-CoA hidratasa (crotonasa) -0.73 kcal/mol (Stern, 1961), (D) catalizada por la (S)-3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa, +8.3 kcal/mol (Lynen and Wieland 1955), (E) catalizada por las acetil-CoA C-acetiltransferasa (tiolasas) kcal/mol. Las reacciones F, G y H son necesarias para la incorporación de ácidos grasos poliinsaturados a la β-oxidación. Cada vuelta de ésta espiral elimina dos carbonos metilados de la cadena del ácido-graso. La degradación completa de un ácido-graso con una cadena de 16 carbonos metilados (palmitato) requiere por ende siete vueltas de la espiral. Los productos de ello derivados ayudan a la síntesis de 129 moléculas de ATP, al acoplar las moléculas de CoA y dinucleótidos trifosfatados generados al ciclo de Krebs y la cadena respiratoria, respectivamente.

Los últimos tres pasos del ciclo de Krebs (succinato a oxaloacetato), en cuanto a mecanismo químico son muy parecidos a los tres primeros (de acil-CoA a 3-cetoacil-CoA de la β-oxidación) (Lehninger et al, 1993; y Horton et al, 1995). Más aún, si tomamos en cuenta que los pasos previos en ambas rutas son reversibles, podemos extender la similitud a cuatro pasos metabólicos, de succinil-CoA a oxaloacetato en el ciclo de Krebs, y de acil-graso + CoA a 3-cetoacil-CoA de la β-oxidación (Figura 4). Esto sugiere la posibilidad de que los últimos cuatro pasos del ciclo de Krebs y los últimos cuatro de la β-oxidación, y la sucesión que guardan entre sí, tengan un origen común.

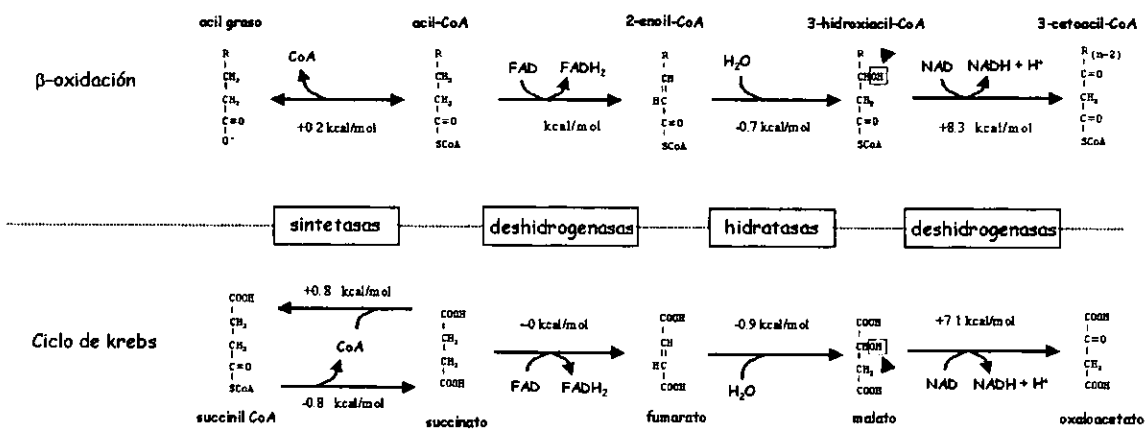


Figura 4. Similitudes en el mecanismo químico de los últimos cuatro pasos del ciclo de Krebs y los cuatro primeros de la β-oxidación. Las puntas de flecha en rojo indican el radical hidroxilo reactivo al liberarse de la molécula de agua e incorporarse al fumarato en el ciclo de Krebs y al 2-enoil-CoA en la β-oxidación por la acción de las respectivas hidratatas. La liberación de este radical nos obliga a suponer que estas reacciones y la sucesión de pasos de las rutas que las albergan, no pudieron existir en las antiguas vías metabólicas y por ende los primeros organismos, que se presumen como anaerobios a nivel bioquímico.

ANÁLISIS PARTE I

COMPARACIÓN DE LAS ENZIMAS DEL CICLO DE KREBS Y LAS DE LA β -OXIDACIÓN CON MECANISMOS QUÍMICOS SIMILARES

HIPÓTESIS INICIALES

Nuestra **primera hipótesis** de éste trabajo ha sido que la similitud química entre los cuatro pasos del ciclo de Krebs y los de la β -oxidación puede ser el reflejo de un origen común, es decir, de un proceso evolutivo en el que un conjunto ancestral de enzimas, o algunos de sus dominios funcionales, haya catalizado procesos de oxidación de ácidos o ésteres unidos a CoA de manera similar a estos pasos, y que por "patchwork" no solo a nivel de enzimas, sino de la secuencia que guardan entre sí, se originaran las enzimas que catalizan el ciclo de Krebs por un lado y por el otro las de la β -oxidación. Para ello, la conservación de los mecanismos químicos sería la característica bioquímica seleccionada.

La **hipótesis alternativa** ha sido que los pares de enzimas comparadas sean convergentes y que tanto la reacción como la sucesión de los pasos en esos dos grupos de enzimas se haya ensamblado por separado.

Existe la posibilidad de que la homología sea detectada solo en dominios y no en las enzimas completas, lo cual, de cualquier forma apuntaría hacia una conservación en los mecanismos químicos como la principal presión de selección pero únicamente a nivel de dominios y no necesariamente, un origen común, para el resto de la enzima. O bien, que los dominios similares sean resultado de convergencia estructural, por lo que las enzimas serían enteramente análogas, y la hipótesis inicial se rechazaría.

Como se describe a continuación, para el análisis de estas hipótesis nos hemos valido de estrategias de genómica y biología estructural comparada, como a continuación se describe

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Colecta de secuencias.

Las bases de datos de secuencias de proteínas derivadas de los genomas completamente secuenciados, como la del "Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)" (Kanehisa y Goto 2000), <http://www.genome.ad.jp/kegg/>, o la del "National Center for Biotechnology Information (NCBI)", <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, generalmente presentan confusiones en la nomenclatura de enzimas parálogas. Esto es especialmente importante en este trabajo por la alta proporción de paralogía entre las enzimas que estamos analizando. Una base de datos no tan amplia, comparada con las dos antes mencionadas, pero que provee una colección de secuencias mayoritariamente derivada de estudios directamente con las propiedades bioquímicas de las proteínas y no generada por comparación de los genomas completos, es la del "SWISS-PROT" (Apweiler *et al*, 1997), <http://www.expasy.ch/>, la cual por estas características reduce en gran medida los posibles errores de nomenclatura para enzimas parálogas.

Por lo anterior, se han colectado de la base de datos del SWISS-PROT, por número enzimático de la *Enzyme Commission* (E.C. Number), las secuencias y los nombres oficiales de las enzimas que catalizan los últimos cuatro pasos del ciclo de Krebs y el total de las que catalizan la β -oxidación. La base de datos de rutas metabólicas del KEGG (Goto *et al*, 1996), que presenta datos derivados de estudios bioquímicos, a diferencia de la de secuencias que no necesariamente tiene esa fuente, se ha utilizado para poder reunir los números de todos los tipos enzimáticos que se sabe pueden catalizar los pasos en cuestión, y no sólo aquellas que catalizan en las rutas consenso y que son las que generalmente se muestran en los mapas de rutas metabólicas (Nicholson, 1997). Para corroborar la nomenclatura y el total de las enzimas de la β -oxidación y el ciclo de Krebs nos hemos valido de las revisiones de Hiltunen y Qin, (2000); y Huynen *et al*, (1999), respectivamente. Las secuencias de cada tipo enzimático han sido comparadas por FASTA 3.0 (Pearson y Lipman, 1988), y BLAST (Altschul *et al*, 1997), para determinar si todas las secuencias con un mismo número enzimático poseen un valor de identidad mayor a 25 % y un valor de E (probabilidad de que dos secuencias sean similares por azar) igual o menor a 0.01, y de esta forma establecer posibles familias homólogas dentro de los tipos enzimáticos. Es importante subrayar que la similitud y el valor de E no son criterios suficientes para determinar homología (Salzberg *et al*, 2001; y Stanhope *et al*, 2001), sino se requiere de análisis relativos a la biología de las enzimas, como conservación de dominios y sitios funcionales (unión de sustratos, cofactores, etc.), y análisis de comparación de estructuras secundaria y terciaria, etc. Como se describe a continuación, éstos también fueron realizados.

Las secuencias problema de las enzimas ortólogas y parálogas colectadas del SWISS-PROT se han buscado por FASTA 3.0 y BLAST en la base de datos de los genomas completos del KEGG y en las de los genomas casi completos de *Homo sapiens* en el NCBI, de *Dictyostelium discoideum* en <http://dictybase.org/> y de *Plasmodium falciparum* en la base de datos ESTs de no-vertebrados del NCBI, dado que ahí se han encontrado secuencias que ayudan a rechazar hipótesis de transferencia horizontal de bacterias a vertebrados (Roelofs y Van Haasetert, 2001; y Stanhope *et al*, 2001). Se incluyeron en análisis posteriores las secuencias con un porcentaje de identidad mayor a 20 y un valor de E menor o igual a 0.01 y que mostraran al menos una región conservada relacionada con los dominios reportados en las referencias de estructura terciaria.

2. Distinción de enzimas ortólogas y parálogas, detección de dominios, y análisis filogenéticos en base a secuencias de aminoácidos.

Para hacer la distinción entre enzimas parálogas y ortólogas, hemos realizado un análisis de secuencias alineándolas con CLUSTALX 1.81 (Jeanmougin *et al*, 1998), y eliminando de los alineamientos las regiones no compartidas con sus respectivos dominios Pfam (Bateman *et al*, 2000) empleando BIOEDIT 5.0.9 (Hall, 1999). Los dominios Pfam se identificaron con "Reverse Position Specific BLAST" (RPS-BLAST) (Altschul *et al*, 1997), un algoritmo de búsqueda de caracteres idénticos y similares entre dos secuencias, basado en comparación de la base de datos de dominios conservados de Pfam contra una secuencia problema. Tomando como matriz de caracteres este alineamiento, se realizaron análisis con algoritmos filogenéticos desde dos perspectivas: la cladista con los programas SEQBOOT, PROTPARS y CONSENSE, y la fenética con PROTDIST y NEIGHBOR, estos últimos cinco programas del paquete PHYLIP 3.6 (Felsenstein, 1993). Las secuencias de diferentes especies que quedaron agrupadas en los árboles de distancia y parsimonia formando un clado sustentado por un valor de bootstrap (consistencia estadística de los datos, donde uno es el valor más bajo y cien el más alto) mayor a 70, se consideraron como ortólogas, y como parálogas a dos o más secuencias de una especie agrupadas en el mismo clado. La ubicación de las secuencias problema del SWISS-PROT en los clados de enzimas ortólogas, nos permitió determinar la posible actividad bioquímica de las enzimas de cada clado.

Este mismo análisis nos permitió determinar la distribución biológica de cada tipo enzimático, lo cual fue empleado como un criterio de antigüedad de las mismas, con el supuesto de que las enzimas ortólogas presentes en los tres dominios celulares, Achaea, Bacteria y Eucarya, propuestos por Woese *et al*, (1990), son las más antiguas en comparación con las que solo se encuentren en uno o dos dominios, porque implica que las encontradas en los tres, estuvieron presentes en el último ancestro común de los tres dominios y las otras, o bien se perdieron en los linajes que no las presentan, o bien nunca las tuvieron y por ende son derivadas de las que si estuvieron. Con base en esto, las enzimas resultantes como más antiguas se usaron como grupo externo en los métodos cladistas.

Para proponer o corroborar familias homólogas y distinguir arreglos genéticos en los distintos tipos de enzimas analizadas, en especial en las multifuncionales del la β -oxidación, se ha usado

3. Comparación de las enzimas del ciclo de Krebs con las de la β -oxidación.

Una vez establecidas las familias homólogas y separados los representantes parálogos y ortólogos, hemos comparado los pares ortólogos de las enzimas del ciclo de Krebs y de la β -oxidación con mecanismos químicos similares (Figura 4), a nivel de estructura primaria, secundaria y terciaria, con la finalidad de determinar si los pares de enzimas o algunos de sus dominios son homólogos o polifiléticos. Este análisis tuvo tres fases:

Fase 1: Estructura primaria.- La búsqueda inicial de motivos similares se hizo por FASTA 3.0 y BLAST. Los motivos similares se compararon a nivel de estructura secundaria. Cuando los valores de identidad y E de los motivos encontrados fueron menores a 20 % y mayores a 0.01. Y se realizó un segundo análisis por Gibbs sampler (Lawrence *et al*, 1993), un algoritmo de búsqueda aleatoria de identidades y similitudes entre dos o mas secuencias de aminoácidos o nucleótidos, con MACAW 3.1 (Schuler *et al*, 1991),. Se compararon por FASTA 3.0 y BLAST los dominios Pfam encontrados por RPS-BLAST entre las enzimas correspondientes a cada par, para determinar si tienen porcentajes de identidad y similitud >20%, estadísticamente

significativos ($E < 0.01$). En cualquier caso, cuando los motivos o bloques similares no se reflejaron como patrones similares de estructura secundaria, se pasó a la siguiente fase.

Fase 2: Estructura secundaria.- se buscaron manualmente patrones similares de estructura secundaria, es decir, sucesión de elementos estructurales (hojas β , hélices α y conectores) similares, que se reflejaran como plegamientos o dominios estructurales similares, y se pasó a la fase tres. Para el caso de las ácido graso-CoA ligasas (E. C. 6.2.1.3) de la β -oxidación, que no tienen a la fecha estructura terciaria reportada, la predicción de la estructura secundaria se hizo con PSI-PRED 2.0 (Jones, 1999).

Fase 3: Estructura terciaria.- para la superposición de las estructuras tridimensionales se usaron tres programas: CE (Shindyalov y Bourne, 1998), SWISS PDB VIEWER 3.7b1 (opción *Magic Fit*) (Guex y Peitsch, 1997), y VAST (Madej *et al*, 1995). Para el cálculo de las distancias atómicas entre los carbonos α (RMSD) de las estructuras superpuestas se empleó CE. La preparación de figuras de estructuras terciarias se hizo con SWISS PDB VIEWER 3.7b1 y RASMOL 2.7.1. (Sayle y Milner-White, 1995). Las regiones estructurales superpuestas se analizaron manualmente para determinar si representan motivos conservados con alguna función en común o algún residuo catalítico, estructural o de unión compartido. En el caso de las ácido graso-CoA ligasas, que catalizan el paso de activación previo a la β -oxidación, que no tienen estructura terciaria reportada a la fecha, se usaron las estructuras de las enzima homólogas fotón-luciferina 4-monooxigenasa (ATP-hidrolisante) o luciferasa (E.C. 1.3.12.7) de *Photinus pyralis* código de acceso en el "Protein data bank" (PDB) (Berman *et al*, 2000), 1LCI, y gramicidina sintetasa (E.C. 5.1.1.11) de *Bacillus brevis*, 1AMU. Las bases de datos de estructuras terciarias del SCOP y el CATH se emplearon para comparar nuestros hallazgos con las superfamilias homólogas ahí establecidas.

RESULTADOS

Comparación de las enzimas del ciclo de Krebs y la β -oxidación.

Los datos bioquímicos de las enzimas del ciclo de Krebs y la β -oxidación analizadas en esta primera parte de la tesis se resumen en la tabla 1, a saber: números enzimáticos, nombre oficial, rutas metabólicas en las que participan, pasos catalizados y números de acceso a las estructuras resueltas tridimensionalmente. Las enzimas están ordenadas acorde a los dominios Pfam conservados identificados usando RPS-BLAST, es decir, por familias de enzimas homólogas. Los datos de estas familias muestran que no existen dominios Pfam compartidos entre los pares de enzimas de la β -oxidación y el ciclo de Krebs (Tabla 1). Esto se comprobó al alinear las secuencias de los pares de enzimas con FASTA 3.0, dado que las regiones alineadas con mayor porcentaje de identidad y similitud (20-25 y 30%, respectivamente), no presentan similitud en sus patrones de estructura secundaria o terciaria, ni residuos catalíticos o de unión a cofactores conservados, lo cual sugiere que son artefactos del alineamiento con FASTA 3.0 y no reflejan una historia evolutiva de homología. Lo mismo ocurrió con los bloques encontrados por "gibbs sampler" con MACAW. Tampoco se encontraron regiones similares significativas que pudieran ser alineadas usando BLAST ($E < 0.1$). La comparación de los patrones de estructura secundaria a lo largo de toda la secuencia de los pares de enzimas tampoco mostró regiones similares (Tabla 1).

La superposición con CE y SWISS PDB VIEWER de las estructuras terciarias de las enzimas comparadas del **primer par** mostró que el plegamiento tipo Rossmann de la región amino terminal de la subunidad α de las succinil-CoA sintetasas (E.C. 6.2.1.4 en mamíferos, y 6.2.1.5 en otros organismos) puede ser superpuesto con el que se encuentra en la región central de las gramidina sintetasas y de las luciferasas (enzimas homólogas a las ácido graso-CoA ligasas de la β -oxidación), con un valor de RMSDA = 1.9 Å. El patrón de estructura secundaria de estos plegamientos es similar (Figura 5 A y B).

Con el SWISS PDB VIEWER se detectó que las enzimas del **segundo par** presentan un barril de hojas β . Este barril se ubica en la región amino terminal de las subunidades α (flavoproteína) de las fumarato reductasas y succinato deshidrogenasas (ambas E.C. 1.3.99.1) del ciclo de Krebs alternado con hélices α , y de forma continua (sin hélices α s) en la región central de las acil-CoA deshidrogenasas (Figura 5 C y D).

Usando CE, SWISS PDB VIEWER y VAST para superponer las estructuras de las enzimas del **tercer par**, fumarato hidratasas y enoil-CoA hidratasas, del ciclo de Krebs y de la β -oxidación, respectivamente, no hemos encontrado similitudes estructurales. Con CE hemos determinado que el valor de RMSD para este par de enzimas es de 7.1 Å.

Empleando VAST para alinear las estructuras terciarias de las enzimas del **cuarto par** de enzimas comparadas encontramos que las regiones amino terminal de las malato deshidrogenasas (E.C. 1.1.1.37) del ciclo de Krebs y de las 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasas tipo I (E.C. 1.1.1.35) de la β -oxidación presentan un plegamiento tipo Rossmann conservado, que une en ambos casos al NAD y ayuda a la unión de los respectivos sustratos. Este hallazgo se hizo extensivo al usar CE y SWISS PDB VIEWER. Los plegamientos alineados presentan una RMSD = 1.9 Å, y un patrón similar de estructura secundaria (Figura 5 E y F).

Tabla 1. Datos de las familias enzimáticas del ciclo de Krebs y la β -oxidación, en base a dominios Pfam

Ciclo de Krebs

Pfam	E.C. Number	PDB	Nombre	Ruta Metab. (s)	Sustrato (s)	Sentido	Producto (S)
02222	6.2.1.4	1EUD	Succinate-CoA ligase (GDP-forming)	Krebs	Succinyl-CoA	↔	Succinate
02629				Pro-(DeBi)	Succinyl-CoA	↔	Succinate
+	6.2.1.5	1SCU	Succinate-CoA ligase (ADP-forming)	Krebs	Succinyl-CoA	↔	Succinate
00549				CO ₂ fix	Succinate	→	Succinyl-CoA
				Pro-(DeBi)	Succinyl-CoA	↔	Succinate
00890	1.3.99.1	1OLA	Succinate dehydrogenase	Krebs	Succinate	↔	Fumarate
+		1FUM	Fumarate reductase	Oxid. Phosph.	Succinate	→	Fumarate
02910				CO ₂ fix	Fumarate	→	Succinate
				But-(DeBi)	Succinate	↔	Fumarate
00208	4.2.1.2-TI	1FUQ	Fumarate hydratase (iron-fe dependent)	Krebs	Fumarate	↔	Malate
	4.2.1.2-TII	-	Fumarate hydratase (iron-fe independent)	CO ₂ fix	Malate	→	Fumarate
00058	1.1.1.37-TI	SMDH	Malate dehydrogenase	Krebs	Malate	↔	Oxaloacetate
+		02866		CO ₂ fix	Oxaloacetate	→	Malate
02615	1.1.1.37-TII	-	Malate dehydrogenase Metanogen-Pyrococcus-like	Krebs	Malate	↔	Oxaloacetate
				CO ₂ fix	Oxaloacetate	→	Malate

β -oxidación

Pfam	E.C. Number	# PDB	Nombre	Ruta Metab. (s)	Sustrato (s)	Sentido	Producto (S)
00501	6.2.1.3	-	Long-chain fatty acid-CoA ligase	FAO	Hexadecanoate	↔	Hexadecanoyl-CoA
	6.2.1.20	-	Long-chain fatty acid-acyl ligase	FAO	Long-chain-fatty acid and acp	↔	Long-chain-acyl-[acp]
	1.3.3.6	-	Acyl-CoA oxidase	FAO	Hexadecanoyl-CoA and (CH ₂) _{n-2}	→	trans-Hexa-dec-2-enoyl-CoA and (CH ₂) _{n-2}
	1.3.3.10	-	Pristanoyl-CoA oxidase	FAO	Acyl-CoA	→	trans-2,3-dehydroacyl-CoA
	1.3.99.2	1BUC	Butyryl-CoA dehydrogenase	FAO	Hexanoyl-CoA and (CH ₂) _{n-2}	→	trans-Hex-2-enoyl-CoA and (CH ₂) _{n-2}
				But-(DeBi)	Butanoyl-CoA	↔	Crotonoyl-CoA
				Ile-De	2-Methylbutanoyl-CoA	↔	trans-2-Methylbut-2-enoyl-CoA
				Val-De	Isobutyryl-CoA	↔	Methacrylyl-CoA
02771				FAO	Hexadecanoyl-CoA and (CH ₂) _{n-2}	→	trans-Hexa-dec-2-enoyl-CoA and (CH ₂) _{n-2}
+	1.3.99.3	3MDE	Acyl-CoA dehydrogenase	FAO	Hexadecanoyl-CoA and (CH ₂) _{n-2}	→	trans-Hexa-dec-2-enoyl-CoA and (CH ₂) _{n-2}
02770				β -Ala-Me	Propionyl-CoA	↔	Acrylyl-CoA
+				Ile-De	2-Methylbutanoyl-CoA	↔	trans-2-Methylbut-2-enoyl-CoA
00441				Leu-De	3-Methylbutanoyl-CoA	↔	3-Methylbut-2-enoyl-CoA
01756				Pro-(DeBi)	Propionyl-CoA	↔	Acrylyl-CoA
				Val-De	Isobutyryl-CoA	↔	Methacrylyl-CoA
	1.3.99.7	-	Glutaryl-CoA dehydrogenase	FAO	Glutaryl-CoA	→	trans-But-2-enoyl-CoA
				Lys-De	Glutaryl-CoA	→	Crotonyl-CoA
				Try-De	Glutaryl-CoA	→	Crotonyl-CoA
	1.3.99.13	-	Long-chain acyl-CoA dehydrogenase	FAO	Hexadecanoyl-CoA and (CH ₂) _{n-2}	→	trans-Hexa-dec-2-enoyl-CoA and (CH ₂) _{n-2}
	1.3.99.VL	-	Vary-long-chain acyl-CoA dehydrogenase	FAO	Acyl-CoA	→	2,3-dehydroacyl-CoA
	4.2.1.17 (T1)	1DUB	Enoyl-CoA hydratase (Type I)	FAO	(S) trans-2-enoyl-CoA and (CH ₂) _{n-2}	↔	(S)-3-Hydroxyhexadecanoyl-CoA and (CH ₂) _{n-2}
				β -Ala-Me	Acrylyl-CoA	↔	3-Hydroxypropanoyl-CoA
				But-(DeBi)	Crotonoyl-CoA	↔	(S)-3-Hydroxybutanoyl-CoA
				FAB-2	Crotonoyl-CoA and (CH ₂) _{n-2}	↔	(S)-3-Hydroxybutanoyl-CoA and (CH ₂) _{n-2}
				Ile-De	trans-2-Methylbut-2-enoyl-CoA	↔	(S)-3-Hydroxy-2-methylbutyryl-CoA
				Leu-De	3-Methylbut-2-enoyl-CoA	↔	3-Hydroxyisopentyl-CoA
				Lys-De	Crotonoyl-CoA	↔	(S)-3-Hydroxybutanoyl-CoA
				Pro-(DeBi)	Acrylyl-CoA	↔	3-Hydroxypropionyl-CoA
				Try-De	Crotonoyl-CoA	→	(S)-3-Hydroxybutanoyl-CoA
				Val-De	Methacrylyl-CoA	→	(S)-3-Hydroxyisobutyryl-CoA
	5.3.3.8	-	Dodecanoyl-CoA delta isomerase	FAO	2,5-dienoyl-CoA	↔	3,5-dienoyl-CoA
	5.3.3.D1	1DCI	Delta 3,5-delta 2,4-dienoyl-CoA isomerase	FAO	3,5-dienoyl-CoA	↔	2,4-dienoyl-CoA
01575	4.2.1.17 (T2)	-	Enoyl-CoA hydratase (Type II)	FAO	(R) trans-2-enoyl-CoA	→	(R)-3-hydroxyacyl-CoA
	1.1.1.35 (T1)	3HAD	Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (Type I)	FAO	(S)-3-hydroxyhexadecanoyl-CoA and (CH ₂) _{n-2}	↔	3-Oxo-hexadecanoyl-CoA and (CH ₂) _{n-2}
02737				But-(DeBi)	(S)-3-Hydroxybutanoyl-CoA	↔	Acetoacetyl-CoA
+				FAB-2	(S)-3-Hydroxybutanoyl-CoA and (CH ₂) _{n-2}	↔	Acetoacetyl-CoA and (CH ₂) _{n-2}
00725				Ile-De	(S)-3-Hydroxy-2-methylbutyryl-CoA	↔	2-Methylacetoacetyl-CoA
				Lys-De	(S)-3-Hydroxybutanoyl-CoA	→	Acetoacetyl-CoA
				Try-De	(S)-3-Hydroxybutanoyl-CoA	→	Acetoacetyl-CoA
				Val-De	(S)-3-Hydroxyisobutyrate	↔	(S)-Methylmalonate semialdehyde
00106	1.3.1.34	-	2,4-dienoyl-CoA reductase	FAO	2,4-dienoyl-CoA	→	3-enoyl-CoA
+	1.1.1.35 (T2)	-	Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (Type II)	FAO	(R)-3-hydroxyacyl-CoA	→	3-Oxoanoyl-CoA
00678	1.1.1.35 (T3)	-	Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (Type III)	FAO	(S)-3-hydroxyacyl-CoA	→	3-Oxoanoyl-CoA
	2.3.1.9	1DLV	Acetyl-CoA C-acyltransferase	FAO	Acetoacetyl-CoA and (CH ₂) _{n-2}	↔	Acetyl-CoA and (CH ₂) _{n-2}
00108				But-(DeBi)	Butanoyl-P	↔	Butanoyl-CoA
00109				FAB-2	Acetyl-CoA	→	Acetoacetyl-CoA
01154				Lys-De	Acetoacetyl-CoA	→	Acetyl-CoA
+				Pro-(DeBi)	Acetoacetyl-CoA	↔	Acetyl-CoA
02803				Try-De	Acetoacetyl-CoA	→	Acetyl-CoA
02801	2.3.1.16	IPXT	Acetyl-CoA C-acyltransferase	FAO	Acetoacetyl-CoA and (CH ₂) _{n-2}	↔	Acetyl-CoA and (CH ₂) _{n-2}
				FAB-2	Butanoyl-CoA (CH ₂) _{n-2}	→	3-Oxo-octanoyl-CoA (CH ₂) _{n-2}
				Ile-De	2-Methylacetoacetyl-CoA	→	Acetyl-CoA

La primera columna refiere los dominios Pfam encontrados en cada una de las familias de las enzimas analizadas.

La segunda columna denota el número enzimático de la Enzyme Commission, seguido del tipo (Tn), si hay varios tipos. * Las actividades de 4.2.1.17 (T1) y 5.3.3.D1, pueden ser realizadas en el mismo sitio activo.

La tercera columna refiere el código de acceso a las estructuras terciarias de las enzimas reportadas en el PDB.

La cuarta columna presenta el nombre oficial de la enzima, tomado del Expasy enzyme nomenclature database.

La quinta columna se refiere a la (s) vías metabólicas en las que participan las enzimas, a parte del ciclo de Krebs y la β -oxidación, como sigue:

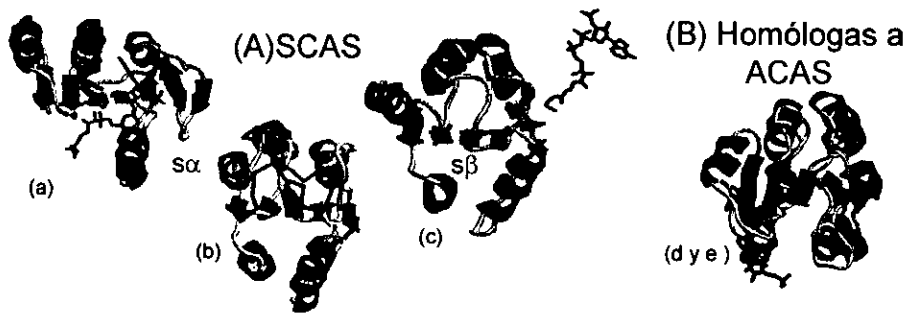
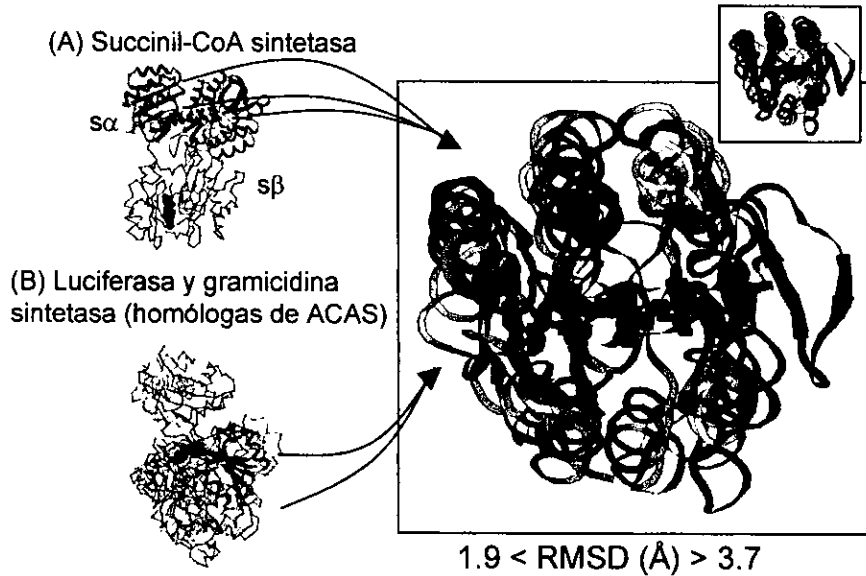
Krebs: ciclo de Krebs, **CO₂ fix:** fijación de CO₂, **Oxid Phosph:** Fosforilación oxidativa, **Pro(DeBi):** degradación y síntesis de propanoato, **FAO:** β -oxidación,

But(DeBi): degradación y síntesis de butanoato, **FAS:** síntesis de ácidos grasos, **β -Ala-Me:** metabolismo de β -alanina, **Ile-De:** degradación de isoleucina,

Leu-De: degradación de leucina, **Val-De:** degradación de valina, **Lys-De:** degradación de lisina, **Try-De:** degradación de triptófano.

La sexta, séptima y octava columna mencionan el sustrato (s), sentido (s) y producto (s) de la reacción, respectivamente.

Par uno: presentan conservados plegamientos tipo Rossmann, los cuales unen a los cofactores (NAD, NDP, PO₄ y CoA)



50 100

(a) EEEE HHHHHHHHHHHH EEEE EEE EEEE HHHHHHHH EEEEE HHHHHHHHHH EEEEE HHHHHHHHHH EEE
 ICQGF TGSQGT FHSEQAIAYGTKVMGVVTPGKSGTTHLGLPVENTVREAVAATGA-TASVIVVPAPFCKDSILEAIDAGIKLIITITEGIPT-----LDMLTVKVKLDEAGVRMIGPN

(b) EEEEE HHHHHHHHHHHH EEE HHHHHHHHHH EEEEEEE HHHHHHHHHH EEEEEEE HHHHHHHHHH EEE HHHHH
 GIVRSSTLTLYEAVKQTTDYGFGQSTCVGIGGDP I PGN-----FIDILEMFEKDPQTEALVMI GEIGGSAEEEAAY I KEHVTKPVVGYIAGVTAPKGRMGHAGAI IAGGKSTADEKFAALEAAGVKT VRSGLADIGEALKT V

(c) EEE HHHHHHHHHHHH HHHHHHHHHHHH EEEEEEE HHHHHHHHHHHH EEEEEEE HHHHHHHHHH EEEEE HHHHHHHHHH
 GCMVNGAGLAMGTMDIVKLGGEPAFLDVGGAT-----KERVTEAFKIIISDDKVKAVLVNI PGGIVRCDLIADGII GAVAEVGVVNPVVRLEGNN-----AELGAKKLADSGLNI IAAKGLTDAQQVVAAV

(d) EEEEE HHHHHHHHHHHH EEEEE HHHHHHHHHHHH EEEEE HHHHHHHHHH EEEEE HHHHHHHHHH EEEEE HHHHHHHHHH
 HRIVVCSENSLQFFMPVLGALFIGVAVAPANDIYNE---RELLNSMNI SQPT---VVFVSKKGLQK---ILNVQKPLPI IQKIIIMDSKTDYQGFQSHYT-----FVTSHLPPGFNEYDFVPESFORDKTIALIMNS

(e) EEEEE HHHHHHHHHH EEEEE HHHHHHHH EEEEE HHHHHH EEEEE HHHHHH EEEEE HHHHHH EEEEE
 DRIGQFASISFDASVWEMFMALLTGASLYIILKOTIND---FVKFEQYINQKEITVITLP-----PTVVHLDPERILS IQTLITAGSATS-----PSLVNKWKEKVTYINAY

Figura 5 (cont).

Figura 5. Comparación de la estructura primaria, secundaria y terciaria de los tres pares de enzimas del ciclo de Krebs y de la β -oxidación con mecanismos químicos y plegamientos estructurales similares. Arriba, superposición de estructuras terciarias. Abajo, respectivas estructuras primaria y secundaria. Las letras entre paréntesis se refieren a: (A) Plegamiento tipo Rossmann de la succinil-CoA sintetasa (a) y (b) (subunidad α), y (c) (subunidad β), con ADP, CoA y pirofosfato del ciclo de Krebs de *Sus scrofa*. (B) Plegamiento tipo Rossmann de la fotón-luciferina 4-monooxigenasa (ATP-hidrolisante) (luciferasa) de *Photinus pyralis* (d), y de la gramicidina sintetasa con AMP de *Bacillus brevis* (e), estas dos últimas enzimas son homólogas a las ácido graso-CoA ligasas de la β -oxidación. (C) Barril de hojas β , con FAD, de la fumarato reductasa (subunidad de flavoproteína) del ciclo de Krebs de *Escherichia coli*. (D) Barril de hojas β , con FAD y CoA, de la acil-CoA deshidrogenasa de la β -oxidación de *S. scrofa*. (E) Plegamiento tipo Rossmann de la malato deshidrogenasa con NAD y α -cetomalonato, del ciclo de Krebs de *S. scrofa*. (F) Plegamiento tipo Rossmann de la (S)-3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa tipo I con NAD y 3-hidroxi butiril-CoA, de la β -oxidación de *Homo sapiens*. Para más detalles de cada enzima, ver Tabla 1.

Los resultados de los análisis filogenéticos de las familias de enzimas con base en los dominios Pfam que presentan conservados (Tabla 1) se muestran a la par de sus arreglos genéticos predichos con RPS-BLAST para las enzimas del ciclo de Krebs (Figura 6) y para las de la β -oxidación (Figura 7).

Aspectos particulares de las enzimas del ciclo de Krebs

Las succinil-CoA sintetasas, que catalizan el paso cinco del ciclo de Krebs, en mamíferos son un heterodímero $\alpha\beta$ (E.C. 6.2.1.4), mientras que en el resto de los organismos son un heterotetrámero $(\alpha\beta)_2$ (E.C. 6.2.1.5) de subunidades homólogas a las de las 6.2.1.4. Hemos encontrado que a nivel de estructura primaria y terciaria los plegamientos tipo Rossmann de las regiones carboxilo de ambas subunidades son más parecidos entre sí que con el de la región amino terminal de la subunidad α , ya que sólo en los plegamientos de los extremos carboxilos está conservado el dominio Pfam 00549 (Figura 6 A), y que el de la región amino de la subunidad α presenta una inserción de dos hojas β entre la primer hoja β y la primer hélice α , que no se encuentra en el resto de plegamientos tipo Rossmann aquí analizados, incluyendo los de las deshidrogenasas del tercer par de enzimas (Figura 5).

Las fumarato reductasas (FRD) y succinato deshidrogenasas (SDH) (ambas E.C. 1.3.99.1) catalizan el paso seis. Los representantes caracterizados bioquímicamente y reportados en el SWISS-PROT se separaron en grupos ortólogos, a excepción de la SDH de *Bacillus subtilis*, que por los métodos aquí empleados se ubica dentro del clado de las FRD (Figura 6 B, y anexo 1).

Las fumarato hidratasas del tipo I (FumA y FumB) y del tipo II (FumC), que tienen como función catalizar el paso siete, presentan conservado el dominio de lyase_1 (Pfam 00206), encontrado por RPS-BLAST y corroborado por alineamientos múltiples (Figura 6 D, y anexo 1).

Con base en su distribución biológica en los genomas completamente secuenciados y al porcentaje de identidad y similitud entre sus secuencias, las malato deshidrogenasas, que catalizan el paso ocho, han sido agrupadas en dos tipos no homólogos (Huynen *et al*, 2000). Hemos encontrado que el tipo I se encuentra caracterizado bioquímicamente en los organelos de eucariontes (mitocondrias, peroxisomas y glioxisomas, en estos dos últimos casos codificada en el núcleo), un gran número de bacterias y dos arqueas (*Haloarcula marismortui* y *Archaeoglobus fulgidus*), aunque también hemos encontrado ORFs con valores de similitud $>25\%$ y $E <0.01$, en el resto de arqueas (Tabla 3). Las enzimas de este tipo conservan los dominios ldh, plegamiento tipo Rossmann de lactato y malato deshidrogenasas (Pfam 00056) y ldh_C, región carboxilo terminal de las mismas enzimas (Pfam 02866) (Figura 6 C y anexo 1). Mientras que el tipo II se ha caracterizado bioquímicamente en algunas arqueas metanogénicas y *Sulfolobus tokodaii*, algunas bacterias (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* y *Haemophilus influenzae*). Las malato deshidrogenasa tipo II presentan conservado en dominio ldh_2 (Pfam 02615), y hemos encontrado ORFs con valores de similitud $>25\%$ y $E <0.01$, en los genomas de *Pyrococcus* spp, bacterias gram-positivas, proteobacterias- α , *Drosophila melanogaster* y *Caenorhabditis elegans*. (Figura 6 C y Tabla 3).

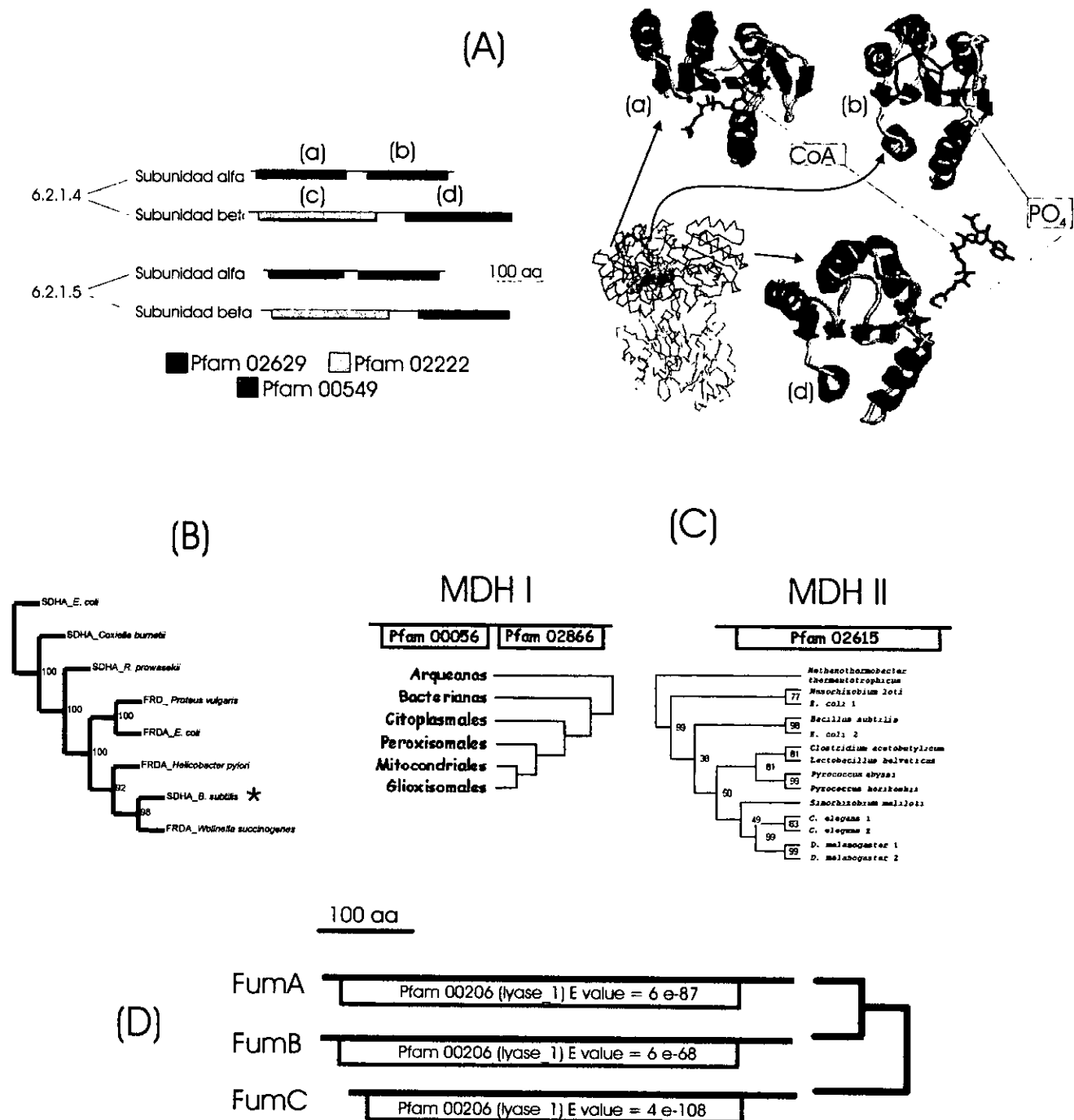


Figura 6. Relaciones filogenéticas y arreglos genéticos de las enzimas del ciclo de Krebs analizadas. (A) se muestran los arreglos genéticos de las subunidades alfa y beta de las succinil-CoA sintetetas (E. C. 6.2.1.4 de mamíferos y 6.2.1.5 del resto de organismos), tanto a nivel de secuencia y de dominios Pfam conservados (panel izquierdo), como de las similitudes estructurales entre las subunidades alfa y beta de éstas enzimas (se muestra la estructura de la enzima de *S. scrofa*) (panel derecho), el dominio Pfam 00549 (ligase_{CoA}) está representado en los plegamientos tipo Rossmann de la región carboxilo terminal de las dos subunidades (b) y (d). (B) Cladograma de las succinato deshidrogenasas (SDH) y fumarato reductasas (FRD) caracterizadas bioquímicamente (E. C. 1.3.99.1), reportadas en el SWISS-PROT, nótese que la SDH de *B. subtilis* *, aparece más relacionada con las FRDs que con el resto de SDHs, a pesar de tener propiedades bioquímicas características de éstas últimas (ver discusión). (C) Cladogramas de las malato deshidrogenasas (MDH) (E. C. 1.1.1.37, ver tabla 1). El de las tipo I (MDH I) muestra a las MDH de mitocondrias y glioxisomas en un clado, y a las de peroxisomas y citoplasma en el clado hermano, las de origen procarionte se agrupan en la base. El cladograma de las MDH II muestra que la filogenia de las enzimas no es acorde a la de las especies que las contienen. (D) Se muestra la ubicación del dominio Pfam 00206 (lyase₁) en los dos tipos de fumarato hidratasas (E. C. 4.2.1.2, tipo I FumA y FumB, y tipo II FumC de *E. coli*), junto con los valores de E de la alineación de este dominio con cada enzima. La conservación de este dominio nos permite proponerlas como homólogas y construir un árbol filogenético en base a ello (ver discusión).

Aspectos particulares de las enzimas de la espiral de la β -oxidación

El único tipo enzimático que no fue localizado en el SWISS-PROT por número enzimático, incluyendo los del ciclo de Krebs, fue la ácido-graso-de-cadena-larga-[ACP] ligasa (E. C. 6.2.1.20), por lo que se recurrió a su referencia en la revisión de Hiltunen y Qin, (2000), y se encontró por BLAST en la base de datos del ExPASy, esta base de datos reúne a las del SWISS-PROT y EMBNET. Usando este mismo método y la comparación de estructura secundaria predicha con PSIPRED, se encontró que la 6.2.1.20 es homóloga a la enzima comúnmente usada para la activación de los ácidos grasos, la ácido graso de cadena larga-CoA ligasa (E.C. 6.2.1.3).

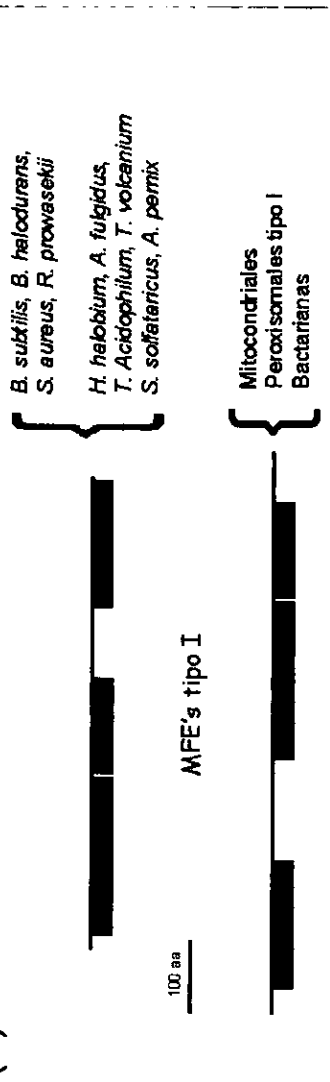
Usando BLAST y FASTA 3.0 para analizar cada uno de los genomas celulares completamente secuenciados, no hemos encontrado las enzimas de la β -oxidación en los genomas de algunos grupos de bacterias (*Mycoplasma* spp. y *Chlamydia* spp.), y al igual que Doolittle, (1999), tampoco en los de las arqueas metanógenas (*Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Methanococcus jannaschii*), ni en los de *Pyrococcus* spp. (Tabla 3). En cambio, en los genomas de α -proteobacterias (en especial *Mesorhizobium loti*), *Archaeoglobus fulgidus*, *Homo sapiens* y *Arabidopsis thaliana* hemos encontrado más genes parálogos de las enzimas de la β -oxidación en comparación con las que encontramos en sus especies hermanas.

Las deshidrogenasas que catalizan el primer paso de la β -oxidación en procariontes y mitocondrias presentan conservados los dominios de Pfam 02771, 02770, y 00441 ó 01756 ó ambos, en sus regiones amino terminal, central y carboxilo terminal, respectivamente. Los tres primeros son característicos de acil-CoA deshidrogenasas y el cuarto de acil-CoA oxidasas (Figura 7 B). Por su distribución biológica, podemos ver que las más representadas son las deshidrogenasas (Tabla 2), en especial las 1.3.99.2, y al utilizarlas como el grupo externo en los análisis filogenéticos, las enzimas de peroxisomas aparecen como derivadas de las mitocondriales (Figura 7 B). Los representantes de las isovaleril-CoA deshidrogenasas (E.C. 1.3.99.10) y las acil-CoA deshidrogenasas de cadena muy larga (E.C. 1.3.99.-, llamada aquí 1.3.99.VL) han sido encontradas únicamente en los genomas de α -proteobacterias y en los de eucariontes como enzimas mitocondriales (Tabla 2).

Comparando las secuencias y patrones de estructura secundaria de los dos tipos de enoil-CoA hidratasas, que catalizan el segundo paso de la β -oxidación, no hemos encontrado regiones, ni dominios conservados con base en Pfam; de hecho, las enoil-CoA hidratasas tipo I presentan conservado el dominio Pfam 00378 común a la superfamilia isomerasa/hidratasa, y las tipo II el 01575 común a las monoamino oxidasas. Las dos isomerasas, dodecenoil-CoA delta isomerasa (E.C. 5.3.3.8) y delta 3,5-delta 2,4- dienoil-CoA isomerasa (E.C. 5.3.3.- llamada aquí 5.3.3.DI) del conjunto de tres enzimas auxiliares para la degradación de ácidos grasos poliinsaturados, provienen de la familia de la enoil-CoA hidratasa tipo I, y por ende también presentan el dominio Pfam 00378 (Figura 7 C).

Las hidroxiaxil-CoA deshidrogenasas tipo I presentan un plegamiento tipo Rossmann en la región amino terminal (Barycki *et al*, 1999) que una al NAD. Las hidroxiaxil-CoA deshidrogenasas catalizan el tercer paso de la β -oxidación y las hay de tres tipos. Las tipo II y III han sido reconocidas como homólogas a nivel de secuencia al presentar conservados los dominios amino y carboxilo terminal (Pfam 02737 y 00725 respectivamente). La tercer enzima auxiliar de la degradación de ácidos grasos poliinsaturados, 2,4-dienoil-CoA reductasa (NADPH) es homóloga a las hidroxiaxil-CoA deshidrogenasas tipo II y tipo III y también presenta los dominios Pfam 02737 y 00725 conservados (Figura 7 D). Usando MACAW hemos

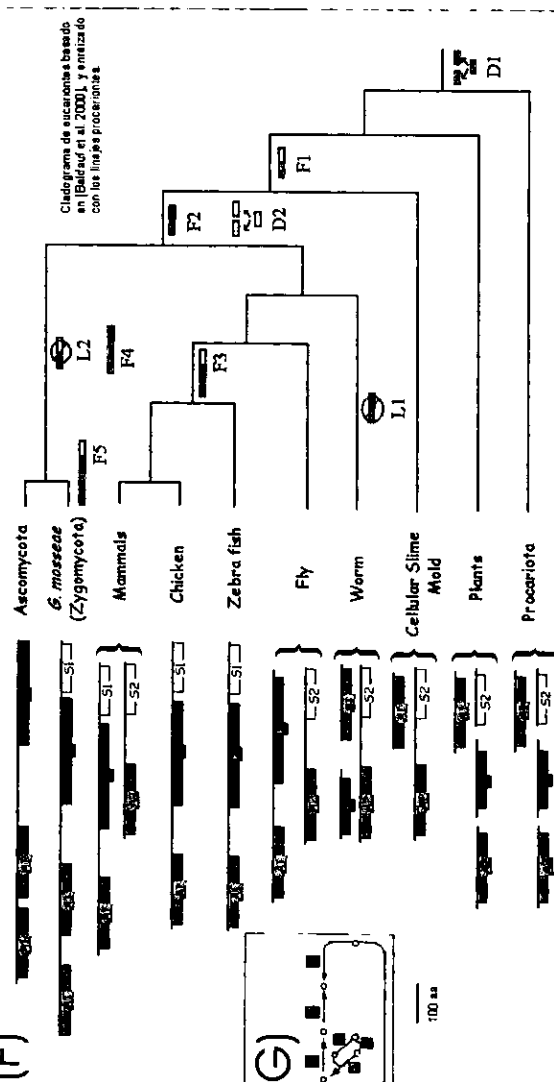
(E)



MFE's tipo I

Mitocondriales
Peroxisomales tipo I
Bacterianas

(F)

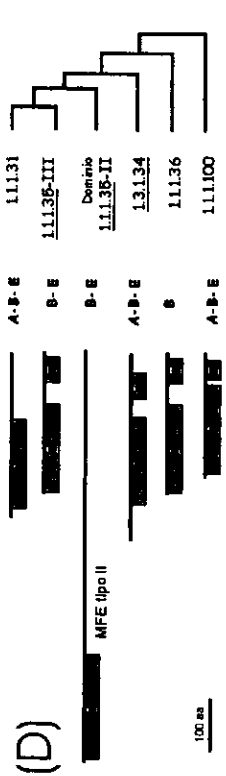


Cladograma de eucariotas basado en [Baldwin et al. 2000], y enlazado con las líneas procariontas.

(G)

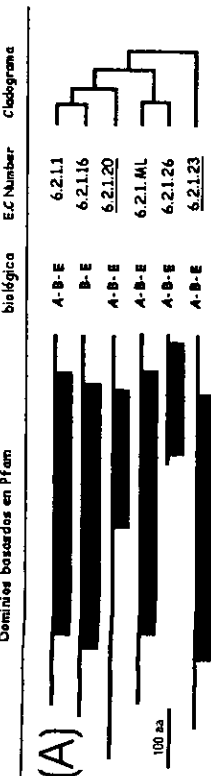


(D)

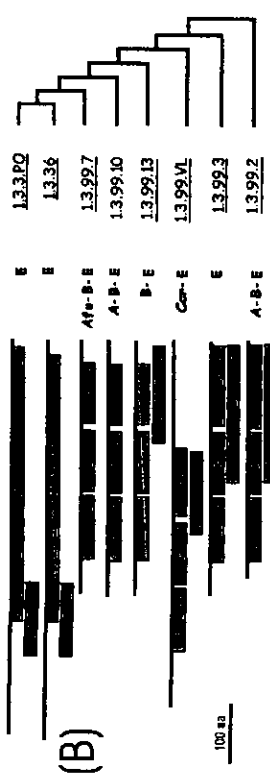


MFE tipo II

(A)



(B)



(C)

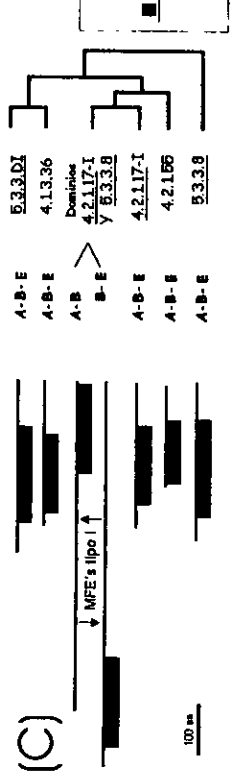


Figura 7. Arreglos genéticos, filogenia y distribución a nivel de tres dominios de las enzimas de la β -oxidación. (A) familia Pfam 02771 +02770+00441/01756; (B) familia Pfam 00378; (D) familia Pfam 02737+00725; (E) enzimas multifuncionales tipo I, dominio de (S)-deshidrogenasa (rojo) y dominio de (S)-hidratasa (verde); (F) enzimas multifuncionales tipo II, dominio de (R)-deshidrogenasa (naranja, A1), dominio de (R)-hidratasa/isomerasa (negro, E), dominio de proteína acarreadora de esterol [SCP] (blanco, S1); enzima multifuncional paróloga a los de la MFE-II, dominio de la superfamilia de alcohol deshidrogenasas (adh) (naranja A2), dominio de la superfamilia de [SCP] (blanco S2). Los eventos evolutivos que proponemos para la evolución de las MFE-II y enzima multifuncional paróloga son: D1) duplicación de un dominio de la superfamilia de alcohol deshidrogenasas, generando a las enzimas parálogas A1 y A2; F1) fusión de la enzima A2 y con otra de la superfamilia [SCP], generando la enzima multifuncional A2-S2; D2) duplicaciones del dominio [SCP] ancestral generando S1 y enzimas parálogas; F2) fusión de la enzima A1 y la E, generando la primer MFE-II de la β -oxidación con dominios A1-E; L1) pérdida en *C. elegans* de la MFE-II con dominios A1-E; F3) fusión de la enzima A1-E con la S1, generando la MFE-II con dominios A1-E-S1; L2) pérdida de la enzima con dominios A1-E-S1; F4) fusión de la MFE-II con dominios A1-E-S1; F5) fusión de la MFE-II con dominios A1-E-S1 con una segunda enzima de la superfamilia de adh's, generando una elongación en la MFE-II de tongos; F5) fusión de la MFE-II originada en el evento F4 con la enzima S1 (en el linaje de *Glomus mosseae*), de manera independiente a la fusión del evento F3 (en vertebrados). (G) esquema simplificado de la β -oxidación, ver figura 9, los colores corresponden a las representaciones de los dominios Pfam de ésta figura.

encontrado que hay similitudes entre el plegamiento tipo Rossmann de las hidroxiacil-CoA deshidrogenasas tipo I y la región propuesta de unión a nucleótidos de las tipo II y III (Qin *et al*, 1999), esto fue corroborado con alineamientos múltiples de secuencias y comparación de la estructura secundaria.

Las acetyl-CoA C-acetiltransferasas (E.C. 2.3.1.9) y acetyl-CoA C-aciltransferasas (E.C. 2.3.1.16), que catalizan el cuarto paso de la β -oxidación, presentan conservados sus extremos amino (Pfam 00108) y carboxilo terminal (pfam 02803) (Figura 7 E).

Hemos agrupado a las enzimas multifuncionales (MFE) de la β -oxidación en dos tipos. El tipo I (MFE-I) se encuentra en todos los sistemas de los tres dominios celulares que realizan la β -oxidación (procariontes, mitocondrias y peroxisomas) aunque el análisis vía RPS-BLAST demuestra que en algunos grupos de bacterias (Ver figura 7 F) y arqueas el dominio de deshidrogenasa se ubica hacia el extremo amino y el de hidratasa hacia el carboxilo, mientras que en el resto de los sistemas (mitocondrias, peroxisomas y algunas bacterias) el arreglo de los dominios está invertido (Figura 7 F).

Nuestros resultados muestran que existen dos tipos de enzimas multifuncionales con un arreglo tipo MFE-II (Figura 7 G), una con actividades de deshidrogenasa + hidratasa/isomerasa + proteína acarreadora de esteroides (SCP), (Figura 7 G dominios A1, E y S1, dominios Pfam 00106, 01575 y 02036, respectivamente) que es la MFE-II propiamente dicha, y otra con actividades de deshidrogenasa + SCP carente de actividad de hidratasa/isomerasa (Figura 7 G dominios A2 y S2, dominios Pfam 00106 y 02036, respectivamente). Basándonos en los arreglos genéticos y las relaciones de ancestría-descendencia de los dominios de las MFE-II hemos construido una hipótesis filogenética acerca del origen y evolución de las MFE-II (completas), que se muestra en la figura 7 G.

DISCUSIÓN

De la comparación del ciclo de Krebs y la β -oxidación

El que las enzimas comparadas del **primer par**, succinil-CoA sintetetas del ciclo de Krebs y las homólogas a las acil-CoA ligasas de la β -oxidación, presenten plegamientos tipo Rossmann estructuralmente similares (RMSD = 1.9 Å), y que ello se refleje en patrones similares de estructura secundaria (Fig. 5), permite sugerir que pueden tener un ancestro común, aunque ello no significaría que las enzimas completas lo tengan, sino solo los plegamientos tipo Rossmann. Ahora bien, esos plegamientos tienen funciones muy parecidas. En las succinil-CoA sintetetas (SCAS) se han detectado dos dominios catalíticos (Fraser *et al*, 2000); el primero es el que presenta los tres dominios tipo Rossmann y cataliza la unión del succinato con la CoA y el pirofosfato, por lo que tiene sitios de unión a cada uno de estos intermediarios, y el segundo cataliza la unión del pirofosfato con algún nucleósido difosfatado (NDP), ADP o GDP. Por otro lado, en las enzimas homólogas a las ácido graso-CoA ligasas (ACAL) (y probablemente estas últimas) el plegamiento tipo Rossmann sirve para la unión del ATP necesario para las catálisis que realizan. Creemos que los plegamientos tipo Rossmann que proponemos de carácter homólogo pueden unir moléculas distintas (CoA y ATP) porque estas últimas tienen gran similitud química (Figura 8). Los ΔG de cambio de las reacciones que catalizan este par de enzimas es positivo (+0.8 kcal/mol para la reacción que catalizan las SCAS y +0.02 kcal/mol para la que catalizan las ACAL), lo cual apoya nuestra propuesta de que estas reacciones y los dominios que las catalizan, al ser termodinámicamente costosas, pueden haberse reclutado por "patchwork" en lugar de haberse originado por separado. Es decir, especializado en el reconocimiento de succinato como SCAS (en el ciclo de Krebs) por un lado, y por el otro en el reconocimiento de acil grasos como ACAL (en la β -oxidación), pero que han conservado los plegamientos tipo Rossmann como dominios de unión a moléculas muy parecidas (CoA y nucleósidos di- y trifosfatados).

Las enzimas del **segundo par**, fumarato reductasas (FRD) y succinil-CoA deshidrogenasas (SDH) del ciclo de Krebs, y las acil-CoA deshidrogenasas (ACAD) de la β -oxidación, presentan un barril de hojas β albergado en sus regiones carboxilo terminal, de aproximadamente 200 y 130 residuos de aminoácido, respectivamente, pero con diferencias en el patrón correspondiente de estructura secundaria (ver figura 5) y con un valor de RMSD = 7.1 Å. En ambos casos el barril de hojas β participa en la unión del FAD, aunque la conformación del mismo es ligeramente distinta (Figura 5 B). El ΔG de cambio de las reacciones que catalizan es alrededor de 0 kcal/mol. Todo ello apuntaría hacia un origen independiente de los barriles de hojas β de las enzimas de éste par. Sin embargo, Vallon (2000) ha propuesto que en base a los motivos conservados a nivel de secuencia, el origen de las flavoproteínas, incluyendo las de este par, se puede explicar desde una perspectiva de ancestría común. Por ello es difícil establecer un juicio sobre si los dominios de unión a FAD de las FRD/SDH y el de las ACAD pueden ser homólogos o son una convergencia estructural. En caso de ser homólogos, pueden haber divergido por la inserción de residuos que forman hélices α entre los que conforman el barril de hojas β de las FRD/SDH derivada de los requerimientos de la estructura cuaternaria de los octámeros de las FRD/SDH al unir sus subunidades α (de unión a flavo proteína) con las β (de unión a hierro-sulfuro), lo cual no es necesario en los dímeros de las ACAD.

Nuestros resultados muestran que las enzimas del **tercer par**, fumarato hidratatas del ciclo de Krebs y enoil-CoA hidratatas de la β -oxidación, no presentan regiones conservadas a nivel de estructura primaria, secundaria, ni terciaria, por lo que podemos suponer que tiene un origen independiente. El ΔG de cambio de las reacciones que catalizan es termodinámicamente favorable (-0.7 kcal/mol para la reacción catalizada por la enoil-CoA hidratasa y -0.9 kcal/mol para la

catalizada por las fumarato hidratatas), lo cual apoya nuestra idea de que estas catálisis, termodinámicamente favorables, y las enzimas que las realizan pudieron haberse originado por separado. De hecho, los dos tipo de enoíl-CoA hidratatas son las únicas enzimas que catalizan el mismo paso metabólico que consideramos originadas de manera independiente a lo largo de toda la enzima, porque no se encontró ningún motivo que presentaran en común.

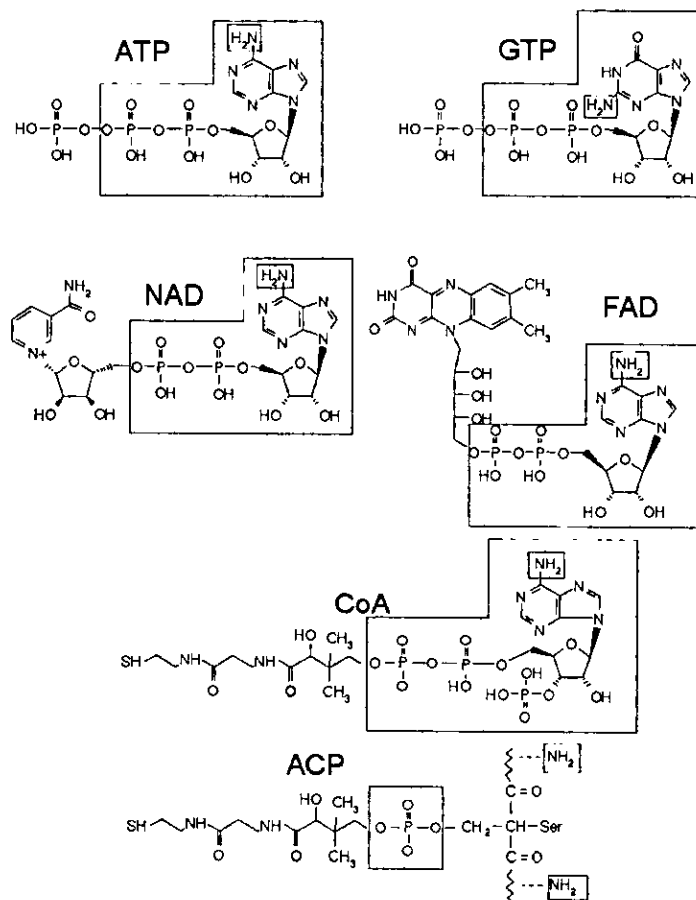


Figura 8. Similitud química entre los cofactores que son unidos por plegamientos tipo Rossmann. La estructura de los cofactores que son unidos por las enzimas del ciclo de Krebs y las de la β -oxidación analizadas en este estudio. (ATP, adenisina 5'-trifosfato; GTP, guanosisina 5'-trifosfato; así como ADP y GDP; NAD, nicotinamida adenina dinucleótido; FAD, flavin adenin dinucleótido; CoA, coenzima A; ACP, proteína acarreadora de acilos) tienen en común los dinucleósidos difosfato (marcos rojos), lo cual puede permitir que las enzimas de estas rutas tengan una evolución de tipo modular, conservando algunos dominios similares, en este caso los de unión a cofactores, pero con diferencias estructurales en el resto de la enzima. Esto conlleva a catálisis químicamente similares, con la intervención de los mismos cofactores u otros muy parecidos, sobre sustratos diferentes. En el caso de la ACP, no existe el dinucleótido, pero sí radicales aminos, que al igual que en los dinucleósidos (marcos azules) son reconocidos por los plegamientos tipo Rossmann.

Las enzimas del **cuarto par**, malato deshidrogenasas (MDH) y 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasas tipo I (HCAD) del ciclo de Krebs y la β -oxidación, respectivamente, comparten los únicos plegamientos tipo Rossmann aquí analizados que pudieron alinearse con CN3D, lo cual fue corroborado con CE (RMSD = 1.9 Å), y con SWISS PROT VIEWER, estos plegamientos muestran un patrón de estructura secundaria similar entre sí y con los de las enzimas del primer par (Figuras 5 y 8). La homología de los plegamientos tipo Rossmann de las MDH y los de las HCAD, ambos de unión a NAD, ha sido puesta en manifiesto por el CATH (Orengo *et al*, 1997), al clasificarlos en la misma superfamilia homóloga (3.40.50.720). Aquí se

ha encontrado que dos de las diferencias esenciales entre estas enzimas para la especialización en sus respectivos sustratos estriban en las hélices α , en especial los residuos Arg151 y Arg158 de las MDH (Hall *et al*, 1992; y Chapman *et al*, 1999), y Lys68 e His158 de las y HCAD (Barycki *et al*, 1999; y Barycki *et al*, 2000), puesto que éstos residuos permiten la unión de sus respectivos sustratos (figura 5 D y E). La estructura cuaternaria de las HCAD también juega un papel relevante porque hay una cooperatividad entre los homodímeros de la misma para unir al sustrato y realizar la catálisis, hasta donde tenemos conocimiento, esta cooperatividad no ha sido reportada en las MDH.

Podemos resumir lo anterior afirmando que dado que los plegamientos tipo Rossmann aquí encontrados en las enzimas del primer y tercer par son homólogos y que pueden unir diferentes sustratos debido a la similitud que estos últimos guardan a nivel químico, y que los plegamientos tipo Rossmann de las enzimas del primer par (en especial los de las regiones carboxilo terminal) y los de las homólogas a las ácido graso-CoA ligasas son más parecidos entre sí, que con los de las enzimas del cuarto par, y viceversa. De ello, suponemos que la evolución de estos plegamientos tipo Rossmann, al igual que el de los del primer par, se pueden explicar desde una perspectiva de ancestría común, como lo ha sugerido Vallon, (2000), basado en los motivos conservados a nivel de secuencia de aminoácidos de los plegamientos tipo Rossmann, y que la especialización por un tipo determinado de sustrato ha sido producto de la evolución divergente de cada tipo enzimático, y en ello ha intervenido no solo el plegamiento tipo Rossmann sino el resto de la enzima. Sin embargo al ser los cofactores (que invariablemente se unen en los plegamientos tipo Rossmann) las moléculas en común, es que podemos observar compartidos solo estos plegamientos y no el resto de las enzimas.

Dado que dos de los cuatro pares de enzimas comparadas, el de las sintetasas, que cataliza reacciones termodinámicamente poco favorables, y el de las deshidrogenasas dependientes de NAD, que catalizan las reacciones con el ΔG de cambio más alto de las aquí analizadas, conservan plegamientos de unión a cofactores tipo Rossmann homólogos, y que las deshidrogenasas dependientes de FAD, que catalizan reacciones con un $\Delta G \sim 0$ kcal/mol, presentan un barril de hojas β que pudiera tener un ancestro común (Vallon, 2000), podemos suponer que las reacciones, la secuencia de las mismas, y los dominios de unión a cofactores de estos tres pares de enzimas pudieran tener un origen común. En cambio, puesto que las hidratatasas, que catalizan las reacciones termodinámicamente más favorables de las aquí analizadas, y que hasta donde sabemos no requieren de cofactores para realizar las catálisis, parecieran ser enzimas que adquirieron de manera independiente la capacidad de abstraer un protón del agua y unir el radical hidroxilo, de ello derivado, a sus respectivos sustratos, un proceso que requiere de un sistema aerobio a nivel bioquímico, por lo que el origen de la actividad de hidratasa de éstas enzimas pudiera ser posterior al advenimiento de las rutas metabólicas bioquímicamente aerobias, y por ende haberse incorporado de manera independiente en el ciclo de Krebs y en la β -oxidación (o sus precursores).

Es decir, nuestros resultados permiten proponer que pudo existir una conjunto de enzimas con plegamientos tipo Rossmann que actuarían por medio de estos plegamientos sobre intermediarios del tipo de los ácidos carboxílicos o acil-CoA, o ambos, en presencia de cofactores del tipo de la CoA, NTPs, NAD o FAD, y que algunas de ellas se especializarían en emplear FAD, y que por la inserción de elementos estructurales sustituyeran en su plegamiento un grupo de hélices α por hojas β , dando lugar a los barriles de las actuales deshidrogenasas del segundo par, como lo propone Vallon, (2000). Por otro lado, que los dominios tipo Rossmann de otro grupo se especializarían en la unión y catálisis de reacciones mediadas por CoA y NTPs y dieran lugar a los plegamientos tipo Rossmann de las actuales sintetasas del primer par (Fig. 9). Y finalmente, que un tercer grupo (el de las enzimas más parecidas de los tres pares) se especializaría en la unión de NAD y diera lugar a los dominios tipo Rossmann del cuarto par (Fig 9). Todo esto pudo ocurrir antes del origen de las rutas metabólicas aerobias a nivel bioquímico, y con la divergencia de cada tipo enzimático y consecuente especialización por un tipo de sustrato, se

podrían conformar dos rutas metabólicas en las que finalmente se introdujo de manera independiente, pero en ambos casos posterior a las rutas metabólicas bioquímicamente aerobias, un paso de hidratación, constituyendo los ancestros de los pasos de succinato a oxaloacetato del ciclo de Krebs por un lado y por el otro los de acil graso + CoA a cetoacil-CoA de la β -oxidación.

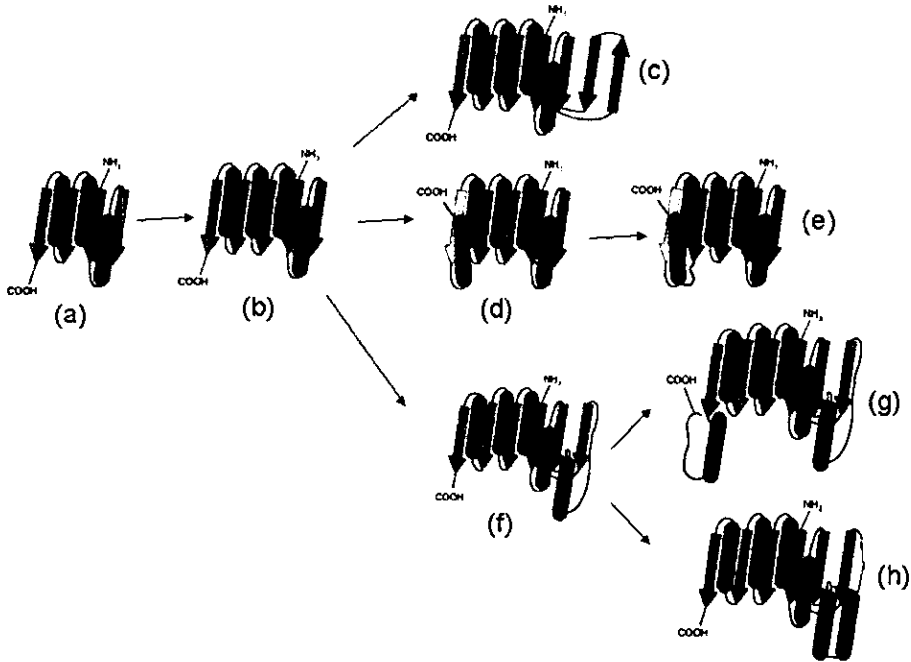


Figura 9. Hipótesis filogenética propuesta acerca del origen y evolución de los plegamientos tipo Rossmann de las enzimas del ciclo de Krebs y las de la β -oxidación aquí analizadas. (a) plegamiento tipo Rossmann ancestral, existente en algunas deshidrogenasas de la familia de las alcohol deshidrogenasas; (b) Inserción de una hélice α y una hoja β en la región carboxilo terminal del plegamiento tipo Rossmann (a), existe en la luciferasa y la gramicidina sintetasa, enzimas homólogas de las acil-CoA ligasas; (c) Inserción de dos hojas β entre los primeros dos elementos estructurales de la región amino terminal y el resto del plegamiento tipo Rossmann (b), existe en la región amino terminal de la subunidad α de las succinil-CoA sintetetas; (d) Inserción de una hélice α en la región carboxilo terminal del plegamiento tipo Rossmann (b), existe en las regiones carboxilo terminal de las subunidades α y β de las succinil-CoA sintetetas; (e) elongación del conector de la cuarta hoja β y la cuarta hélice α del plegamiento tipo Rossmann (d), éste conector presenta el residuo catalítico de la reacción de unión de CoA al succinato en las succinil-CoA sintetetas; (f) inserción de una hélice α y una hoja β entre los primeros tres elementos estructurales y el resto del plegamiento tipo Rossmann (b), éste es un plegamiento hipotético; (g) inserción de una hélice α en la región carboxilo terminal del plegamiento tipo Rossmann (f), existe en las malato deshidrogenasas tipo 1; (h) inserción de una hélice α entre la segunda hélice α y la tercer hoja β del plegamiento tipo Rossmann (f), existe en las 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasas tipo 1.

De las enzimas del ciclo de Krebs

La similitud a nivel de estructura primaria, secundaria y terciaria entre las subunidades α y β de las succinil-CoA sintetetas, y la similitud química entre la CoA y el ATP y el GTP (figura 8), sugiere que pueden tener un ancestro común, el cual pudo ser un homodímero, y que tras la duplicación del gen ancestral, una copia se especializó en la unión por el sustrato (CoA), y en la actualidad la podemos observar como la subunidad α , y la otra copia por la molécula de nucleósido trifosfato que actualmente es la subunidad β (Figura 6).

Las succinato deshidrogenasas (SDH) y fumarato reductasas (FRD) (ambas E.C. 1.3.99.1) que actúan preferentemente en el sexto paso del ciclo de Krebs y en la cadena respiratoria, de manera aerobia y anaerobia a nivel ecológico,

respectivamente, se mezclan en clados dentro del mismo árbol (Figura 6 B), lo cual puede deberse a su alto grado de identidad (>50%). De hecho, la secuencia de *Bacillus subtilis* reportada por el grupo de Guest (Phylips *et al*, 1987), como SDH, aparece según nuestros análisis filogenéticos dentro del clado de las FRD, pero tiene la capacidad de actuar en contra de un gradiente de protones y usar preferentemente menaquinona sobre ubiquinona, características de deshidrogenasa (SDH) y no de reductasa (FRD), (Guest, J. 2001 comunicación Personal). Ello sugiere que a pesar de que tanto las SDH como las FRD se encuentran en los tres dominios celulares y que por ende el proceso de paralogía que las originó pudiera ser anterior al último ancestro común de los tres dominios, su divergencia ha sido muy lenta. Lo cual explica el que, si bien, enzimas como la SDH de *Bacillus subtilis*, que por secuencia han sido clasificadas y aparecen en árboles filogenéticos dentro del grupo de las FRD, no presenten características bioquímicas de FRD, sino de SDH. Un fenómeno similar se ha propuesto para la enzima de *Tricomonas vaginalis* caracterizada bioquímicamente como lactato deshidrogenasa (LDH), pero que en base a análisis de secuencias se relaciona más con de las malato deshidrogenasas tipo I que con otras LDHs (Wu *et al*, 1999).

El séptimo paso del ciclo de Krebs puede ser catalizado por cualquiera de las tres fumarato hidratasas (FumA, FumB o FumC), pero FumA y FumB requieren de hierro para su activación y son sintetizadas preferentemente bajo condiciones aerobias y anaerobias respectivamente; mientras que FumC no requiere de hierro y se propone que se sintetiza como un sustituto de FumA cuando las células se someten a condiciones oxidativas de ausencia de hierro (Park y Gunsalus, 1995; y Fuentes *et al*, 2001). Aunque las FumA y FumB se agrupan por sus características bioquímicas y secuencia de aminoácidos como tipo I, y las FumC como tipo II; y los dos tipos se han propuesto como originadas polifiléticamente (Park y Gunsalus, 1995), nuestros análisis con RPS-BLAST, muestran que ambos tipos conservan el dominio Pfam 00206, y por ello proponemos que ambos tipos son homólogos, a pesar de que la FumC no requiera de hierro y que las FumA y FumB guarden un porcentaje de identidad mayor entre sí, que con FumC (Figura 6 D).

Las malato deshidrogenasas se pueden clasificar en dos grupos, el tipo I (bacterianas-eucariontes) y el tipo II (arqueanas) (Huynen *et al*, 1999), aunque hemos encontrado algunos representantes del tipo I en arqueas y del tipo II en bacterias (Tabla 2), la distribución de estos dos tipos de enzimas puede ser producto de la similitud de genes funcionales (energéticos) de Bacteria-Eucarya y su separación del linaje de Archaea (Figura 6 C), como consecuencia del origen endosimbiótico de las mitocondrias (Margulis, 1993), y la sustitución de los genes del hospedero por los del endosimbionte, que es un aspecto interesante si tomamos en cuenta que generalmente se habla de la contraparte, la similitud de genes estructurales (replicación, transcripción y traducción) de Archaea-Eucarya y su separación del linaje de Bacteria (Woese *et al*, 1990; y Brown *et al*, 2001).

De las enzimas de la espiral de la β -oxidación

La ausencia de las enzimas de la β -oxidación en los genomas de bacterias que son parásitos obligados se puede explicar por el hecho de que las especies con este estilo de vida pueden prescindir de muchas rutas metabólicas y metabolitos que toman de sus hospederos. Sin embargo, la historia es diferente en el caso de las arqueas metanógenas y los *Pyrococcus* spp. Doolittle, (1999) propuso que las enzimas de la β -oxidación nunca estuvieron en los ancestros de Archaea, y que *Archaeoglobus fulgidus*, (la única otra arquea completamente secuenciada y disponible hasta entonces, y en la que sí se pueden encontrar estas enzimas por BLAST), adquirió las enzimas de la β -oxidación de Bacteria por transferencia horizontal. La disponibilidad de los genomas completos de *Aeropyrum. pernix*, *Thermoplasma acidophilum*, y *Thermoplasma volcanium*,

todos representantes basales de Archaea, según estudios de árboles universales basados en grandes matrices combinadas de datos de secuencias de proteínas (Brown *et al*, 2001), y el de *Halobacterium halobium*, descendiente de las metanógenas, según filogenias basadas en el 16/18S rRNA (Woese *et al*, 1990), nos ha permitido distinguir que en realidad los únicos genomas arqueobacterianos completamente secuenciados y disponibles a la fecha en los que no se identifican las enzimas de la β -oxidación por lo métodos de Doolittle, (1999), y los aquí descritos, son los de las metanógenas y su grupo hermano *Pyrococcus* spp, por lo que podemos suponer que las enzimas de la β -oxidación estuvieron presentes en el ancestro de Archaea. Dado que los ancestros y descendientes de las metanógenas y *Pyrococcus* sp., presentan las enzimas de la β -oxidación, y que la posición de estos dos grupos en los árboles universales es en ramas de la punta de Archaea (Brown *et al*, 2001), creemos que las metanógenas y *Pyrococcus* spp. perdieron las enzimas de la β -oxidación. Esto explicaría que todas las bacterias metanógenas, que sabemos son organismos anaerobios estrictos, necesitan de otras bacterias protón-reductoras obligadas para obtener energía a partir de ácidos grasos (Mackie *et al*, 1991), de manera similar a lo propuesto en las hipótesis sintrófica (Moreira y López-García, 1998), y de hidrógeno (Martin y Müller, 1998), acerca del origen de los eucariontes.

Hay que tener presente que los genomas de las metanógenas y los *Pyrococcus* spp a la fecha disponibles tienen una alta proporción de secuencias sin función conocida o hipotética, porque tienen valores de similitud e identidad muy bajos al resto de la biodiversidad enzimática conocida. Las enzimas de la β -oxidación pudieran estar entre ellas. Por ello, son necesarios estudios a nivel bioquímico que corroboren o refuten la oxidación de los ácidos grasos en metanógenas y *Pyrococcus* sp. por medio de enzimas homólogas a las de la β -oxidación del resto de los organismos.

La presencia de enzimas parálogas a las la β -oxidación en los genomas de α -proteobacterias que forman simbiosis con plantas es superior a la del resto de bacterias, ello puede estar relacionado con el papel regulatorio de la β -oxidación en el proceso de infección y nodulación (Requena *et al*, 1999). En *Homo sapiens*, *Arabidopsis thaliana* y *Archaeoglobus fulgidus* el gran número de copias de estas enzimas, puede estar brindado una gama de posibilidades de degradación de ácidos grasos por encima de los que comúnmente se emplean, debido a una especialización de enzimas parálogas.

El hecho de que las isovaleril-CoA deshidrogenasas y las ácido graso-de-cadena-muy-larga-CoA deshidrogenasas estén únicamente en las α -proteobacterias y representantes mitocondriales eucariontes, podría ser un relicto de endosimbiosis, como ya se ha propuesto para la síntesis mitocondrial de ácidos grasos (Schneider *et al*, 1997). Ello apoya la hipótesis serial de Margulis, (1993), y de hidrógeno de Martin y Müller, (1998), de que las mitocondrias se originaron de las α -proteobacterias, y no la sintrófica de Moreira y López-García, (1998), que propone a las δ -proteobacterias como el ancestro.

En general las enzimas más representadas y que se han ubicado en la base de los árboles filogenéticos (Figura 7), son las que actúan sobre ácidos grasos de cadena corta y mediana (<16:0), lo cual correlaciona con el hecho de que en general estos sean los ácidos grasos preferidos por procariontes (Mackie *et al*, 1991), y que por ende lo hayan sido en los sistemas antiguos. Ello podría explicar porqué la degradación de ácidos grasos de cadena larga (>16:0) es una estrategia prominentemente de hongos, animales y plantas, y la de ácidos grasos de cadena muy larga (>20) exclusiva de mamíferos.

El que en las enzimas multifuncionales (MFEs) tipo I de arqueas tengan un arreglo genético deshidrogenasa/hidratasa, inverso al hidratasa/deshidrogenasa de la mayoría de las bacterias y eucariontes (Figura 7 F), sugiere que ha habido un rearrreglo en alguno de los linajes, el de Archaea o el de Bacteria-Eucarya. Existe una sola copia de MFE-I en cada sistema de β -oxidación, aunque los eucariontes tenemos dos, una mitocondrial y otra peroxisomal. La enzima de algunas bacterias gram-positivas y gram-negativas tienen un arreglo del tipo de las Archaea (Figura 7 F), aunque se ubican en las filogenias de los

dominios por separado junto a las del resto del tipo de las Bacteria, lo cual sugiere que el mismo arreglo ha ocurrido más de una vez en la evolución.

Breitling *et al*, (2001), propusieron una solución para la historia evolutiva de las MFE-II de la β -oxidación, en la cual, según nuestros resultados (Figura 7 G), han mezclado los miembros parálogos de dos familias convergentes en fusión de dominios, la que tiene dominios deshidrogenasa (A2) + proteína acarreadora de esteroides (S2), y la que tiene deshidrogenasa (A1) + hidrataza/isomerasa (E) + proteína acarreadora de esteroides (S1), y los presentan como una sola historia evolutiva, que excluye a los estadios intermedios de ambas enzimas multifuncionales (Figura 7 G). Creemos que su hipótesis asume dominios ortólogos que en realidad son parálogos (A1 parálogo de A2, y S1 parálogo de S2), puesto que no incluyen a todos los miembros de ninguna de las dos familias tipo MFE-II y consideran a los que incluyen como miembros de una sola. Por ende creemos que su solución es artificial.

Nuestros análisis nos permiten proponer que, con base a los datos actuales, para generar la diversidad de estos dos tipos enzimáticos (Figura 7 G) fue necesario un evento temprano de paralogía de la enzima monofuncional ancestral con dominio de deshidrogenasa (Pfam 00106) (Figura 7 G, evento D1), cinco eventos de fusión de dominios (Figura 7 G, eventos F1, F2, F3, F4 y F5), aunque el evento F5 puede ser una duplicación interna o una elongación génica, y dos pérdidas enzimáticas (Figura 7 G, eventos L1 y L2).

Dado que todas las MFE-II que encontramos presentan en la región carboxilo terminal el motivo [S/A/C]-K-[L/M] que se ha identificado como péptido señal para la dirección hacia los peroxisomas y translocación en la membrana de los mismos, las MFE-II podrían ser exclusivas de peroxisomas. Aunque ha sufrido varios arreglos y fusiones al lo largo de la evolución. (Figura 7 G). Sin embargo, es necesario incrementar la muestra de representantes de los linajes de eucariontes no vertebrados y en especial de Ascomycota, para poder corroborar la hipótesis aquí propuesta.

Acerca del método empleado

1) *Colecta de secuencias*: la búsqueda de secuencias de enzimas por "E.C. Number" en el SWISS-PROT, a la par de revisiones bibliográficas (Hiltunen y Qin, 2000; y Huynen *et al*, 1999), y la base de datos de rutas metabólicas del KEGG, nos ha permitido coleccionar todos los tipos enzimáticos que catalizan los pasos del ciclo de Krebs y de la β -oxidación analizados en esta tesis, a pesar de los problemas que se han descrito como derivados de usar los números enzimáticos como fuentes iniciales en el análisis de genomas completamente secuenciados (Galperin y Koonin, 1999; y Gerlt y Babbitt, 2001).

2) *Distinción de enzimas ortólogas y parálogas*: el análisis de secuencias homólogas usando FASTA 3.0, BLAST, y los análisis filogenéticos descritos en aquí nos ha permitido distinguir grupos de enzimas ortólogas y parálogas. En el principio de esta tesis, esto no pudo lograrse al asumir directamente la nomenclatura reportada en las bases de datos derivadas de genomas completos o en los artículos de revisión de arriba mencionados, por separado.

3) *Detección de dominios*: el uso de RPS-BLAST basado en el Pfam para la identificación de dominios conservados ha sido una estrategia rápida y eficiente para determinar cuándo dos o más tipos enzimáticos podrían ser homólogos y facilita la ubicación de una secuencia dentro de una familia u otra. También permite el reconocimiento de arreglos intragénicos, fusión de genes y multifuncionalidad, y es un auxiliar útil en la determinación de regiones compartidas (Figuras 6 y 7). Dado que Pfam está basado en regiones conservadas de importancia biológica, muchas de ellas respaldadas por estudios de biología

estructural, consideramos que esas regiones compartidas localizadas por RPS-BLAST, son un buen indicador de posible homología.

4) *Predicción de estructura secundaria*: creemos que el uso de PSI-PRED para la predicción de estructura secundarias de enzimas sin estructura tridimensional reportada, puede ser una herramienta fidedigna, dado que las secuencias de enzimas con estructura terciaria, y por ende con estructura secundaria conocida, que se emplearon como control, resultaron mejor predichas con PSI-PRED que con PREDATOR (Frishman y Argos, 1995) o con Jpred (Cuff *et al*, 1998).

5) *Superposición estructural*: es necesario tener presente que si bien la ausencia de regiones conservadas a nivel de secuencia de aminoácidos puede significar que esas enzimas no son homólogas, también puede ser el reflejo de una gran divergencia en la secuencia de enzimas homólogas pero que mantienen las distancias atómicas de sus carbonos α y con ello gran parte de sus características catalíticas o de unión, por lo que son necesarios los datos de estructura terciaria (Yang y Honig, 2000). Es el caso de los plegamientos tipo Rossmann aquí analizados, que no presentan dominios Pfam conservados, pero sí tienen un arreglo de estructura secundaria y terciaria muy similares (Figura 5). Por ello, creemos que para el análisis de enzimas homólogas con un alto grado de divergencia son necesarios los datos de estructura terciaria, así como la extensión de las familias homólogas de Pfam a nivel de superfamilias homólogas, similar a como se presentan en el SCOP y el CATH. Aunque la similitud estructural entre dos enzimas no necesariamente sea producto de un origen común, la comparación de estructuras terciarias puede ser una herramienta útil y un criterio más para el análisis de relaciones filogenéticas.

ROBBIE

ANÁLISIS PARTE II

ORIGEN DE LA β -OXIDACIÓN Y LAS ENZIMAS QUE LA CATALIZAN.

Una vez que en la primer parte de ésta tesis hemos encontrado que los pares de enzimas de la β -oxidación y las del ciclo de Krebs con mecanismos químicos similares y termodinámicamente poco favorables tienen conservado el plegamiento tipo Rossmann, y que las que tienen condiciones favorables pueden haberse originado e incorporado de manera independiente a estas rutas, posteriormente al advenimiento de las rutas con bioquímica basada en el oxígeno, hemos procedido a explorar el origen de la β -oxidación y las enzimas que la catalizan, de entre una gama de enzimas de rutas metabólicas con una sucesión de pasos similar a la β -oxidación, y en las cuales actúa al menos una de las enzimas de esta última ruta (ver Fig. 9 y Tabla 1), bajo la perspectiva de que la β -oxidación pudiera haber sido originada por patchwork, y que con las enzimas homólogas del resto de las rutas de acil-CoA ésteres no solo estará conservado el plegamiento tipo Rossmann, sino también algunos otros dominios de unión a sustratos, porque a diferencia de las enzimas del ciclo de Krebs, este segundo grupo de enzimas además de usar los mismos cofactores que las de la β -oxidación tienen afinidad por sustratos similares.

Como se mencionó al principio, la β -oxidación (Figura 3) consta de 1) una deshidrogenación, 2) una hidratación, 3) una segunda deshidrogenación y, 4) la liberación del grupo tiol y dos carbonos metilados de la cadena del ácido graso en forma de acetil-CoA. Todo ello está precedido de un paso de activación (unión del acil graso a la CoA). Este mismo patrón de reacciones ha sido encontrado por los métodos explicados en la primer parte en varias rutas metabólicas que involucran la degradación y síntesis de acil-CoA ésteres (Tabla 2), y es precisamente en estas rutas metabólicas que se procedió a buscar él o los posibles ancestros de la β -oxidación, por los mismos métodos de genómica y biología estructural comparada antes descritos.

Liedtke, (1997 A), ha propuesto la hipótesis de que inicialmente los ácidos grasos debieron tener un papel biológico diferente al de ser moléculas energéticas, por la conexión de la β -oxidación con la fosforilación oxidativa (un proceso enteramente dependiente de oxígeno y por ende ausente en los organismos anaerobios a nivel bioquímico), y menciona que el papel inicial de los ácidos grasos pudo ser el de formadores de membranas, únicamente. En esta segunda parte de la tesis, hemos tomado como base la hipótesis de Liedtke, (1997 A), y dado que el tercer paso de la β -oxidación y la síntesis tipo I de ácidos grasos, hidratación y deshidratación respectivamente, involucra un radical hidroxilo libre, se ha dado especial importancia a las características de aerobiosis o anaerobiosis a nivel bioquímico de las rutas analizadas, y se han empleado las mismas herramientas que en la parte uno.

Con la comparación de las características bioquímicas de las rutas metabólicas de los acil-CoA ésteres (Tabla 1), hemos determinado que la ruta metabólica que podría ser el ancestro de la β -oxidación es la de la síntesis tipo I de ácidos grasos, porque tienen la misma secuencia de reacciones, y porque las enzimas que catalizan los pasos similares en cuanto a mecanismo químico, pero en sentido inverso, son homólogas y reversibles, pero sobretodo porque la síntesis tipo de ácidos grasos es la única ruta del metabolismo de acil-CoA ésteres cuyas enzimas pueden actuar en condiciones bioquímicamente anaerobias (Figura 10). La homología entre las enzimas de la β -oxidación y las de otras rutas de acil-CoA ésteres, en especial las de la síntesis tipo I de ácidos grasos, se puede detectar a nivel de secuencia de aminoácidos, estructura secundaria y

Tabla 2. Enzimas del metabolismo de acil-CoA ésteres homólogas a las de la β -oxidación.

Metabolismo de acil-CoA ésteres

Pfam	E.C. Number	PDB	Via Metab. (s)	Sustrato (s)	Sentido	Producto (s)
	6.2.1.1	-	Acetate-CoA ligase *	Pro-(DeBi)		
00501	6.2.1.16	-	Acetoacetyl-CoA synthetase	But-(DeBi)	Acetoacetate	Propionyl adenylate \rightleftharpoons Propionyl-CoA
	6.2.1.26	-	O-succinylbenzoate-CoA ligase	Ubi-Bi	2-Succinylbenzoate	\rightarrow Acetoacetyl-CoA
	6.2.1.ML	-	Medium-chain acyl-CoA ligase	Pro-(DeBi)	3-Hydroxypropanoate	\rightarrow 2-Succinylbenzoyl-CoA
02771						\rightleftharpoons 3-Hydroxypropionyl-CoA
02770	1.3.99.10	1IVH	Isovaleryl-CoA dehydrogenase	Leu-De	3-Methylbutanoyl-CoA	\rightarrow 3-Methylbut-2-enoyl-CoA
00441						
01756						
00378	4.1.3.36	-	Naphthoate synthetase	Ubi-Bi	2-Succinylbenzoyl-CoA	\rightleftharpoons 1,4-Dihydroxy-2-naphthoate
	4.2.1.55	-	3-hydroxybutyryl-CoA dehydratase	But-(DeBi)	Crotonoyl-CoA	\rightleftharpoons (R)-3-Hydroxybutanoyl-CoA
	4.2.1.60	1MKK	3-hydroxydecanoyl-[ACP] dehydratase * 2-decanoyl-[ACP] isomerase	FAB-1	(R)-3-hydroxydecanoyl-[acp]	\rightleftharpoons (E)-2-decanoyl-[acp] \rightarrow (Z)-decanoyl-[acp]
02737						
00725	1.1.1.157	-	3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase	But-(DeBi)	(S)-3-Hydroxybutanoyl-CoA	\rightleftharpoons Acetoacetyl-CoA
00106	1.1.1.100	1101	3-oxoacyl-[ACP] reductase	FAB-1	(R)-3-Hydroxybutanoyl-[acp] and (CH ₂) _{n-2}	\rightleftharpoons Acetoacetyl-[acp] and (CH ₂) _{n-2}
	2.3.1.85	-	Fatty acid synthase (1.1.1.100 domain)	FAB-1	Acetyl [acp] and (CH ₂) _{n-2} [acp]	\rightleftharpoons Acetyl-CoA + acp and (CH ₂) _{n-2} [acp]
	2.3.1.86	-	Fatty acyl-CoA synthase (1.1.1.100 domain)	FAB-1	Acetyl [acp] and (CH ₂) _{n-2} [acp]	\rightleftharpoons Acetyl-CoA + acp and (CH ₂) _{n-2} [acp]
00678	1.1.1.36	-	Acetoacetyl-CoA reductase	But-(DeBi)	(R)-3-Hydroxybutanoyl-CoA	\rightleftharpoons Acetoacetyl-CoA
	1.1.1.31	-	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase	Val-De	(S)-3-Hydroxyisobutyrate	\rightleftharpoons (S)-Methylmalonate semialdehyde
00108	2.3.1.85	-	Fatty acid synthase (2.3.1.41 domain)	FAB-1	Acetyl [acp] and (CH ₂) _{n-2} [acp]	\rightleftharpoons Acetyl-CoA + acp and (CH ₂) _{n-2} [acp]
00109	2.3.1.86	-	Fatty acyl-CoA synthase (2.3.1.41 domain)	FAB-1	Acetyl [acp] and (CH ₂) _{n-2} [acp]	\rightleftharpoons Acetyl-CoA + acp and (CH ₂) _{n-2} [acp]
01154	2.3.1.41	1KAS	3-oxoacyl-[ACP] synthase *	FAB-1	Acetoacetyl [acp] and (CH ₂) _{n-2}	\rightleftharpoons Acetyl [acp] and (CH ₂) _{n-2} \rightleftharpoons Acetyl-CoA + acp and (CH ₂) _{n-2}
		1DD8				
02803		1EBL				
02801	4.1.3.5	-	Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase	Leu-De But-(DeBi)	(S)-3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA	\rightarrow Acetyl-CoA or Acetoacetyl-CoA \rightleftharpoons Acetyl-CoA or Acetoacetyl-CoA

Esta tabla presenta las enzimas del metabolismo de acil-CoA ésteres que no están involucradas en la β -oxidación, pero que son homólogas a las de esa ruta metabólica (ver dominios Pfam en Tabla 1), incluidas las de la síntesis tipo I de ácidos grasos. Las columnas tienen las mismas indicaciones que en la tabla 1. * Las enzimas E.C. 6.2.1.1, E.C. 2.3.1.41 y E.C. 4.2.1.60 pueden catalizar dos pasos metabólicos, ésta última en el mismo sitio activo.

terciaria, a lo largo de toda la enzima, incluyendo dominios de unión a cofactores y sustratos, tanto en enzimas monofuncionales, como en los dominios homólogos de las enzimas multifuncionales tipo I de la β -oxidación, y síntesis tipo I de ácidos grasos (Tabla 2 y Figuras 7, 10 y 11).

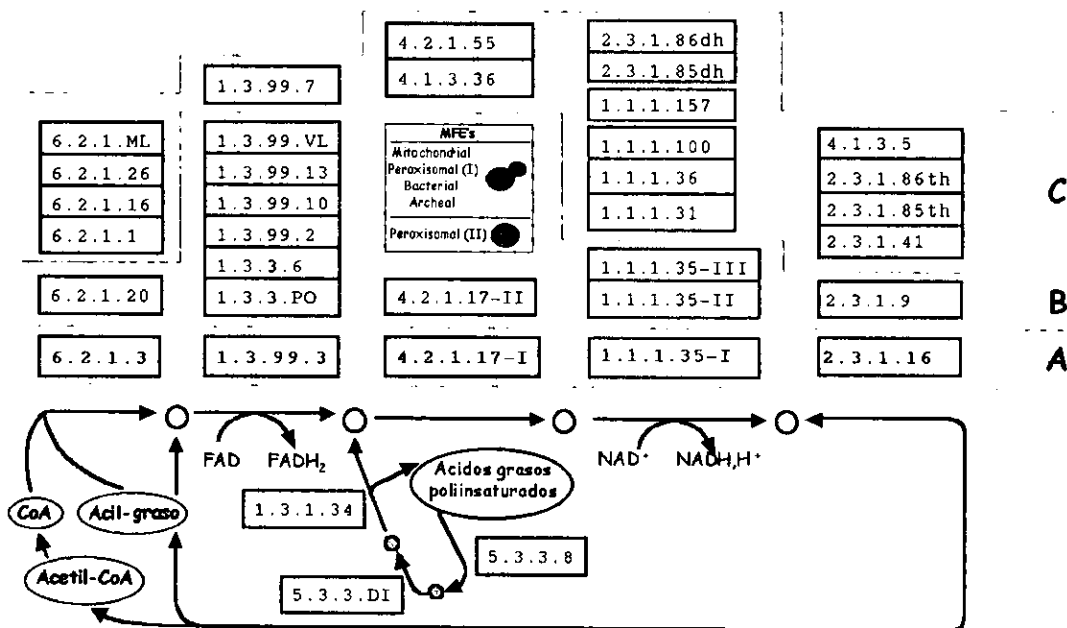


Figura 10. Familias homólogas de enzimas del metabolismo de acil-CoA ésteres. (A) enzimas comúnmente usadas en la β -oxidación, (B) empleadas solo en algunos sistemas de β -oxidación, y (C) otras rutas metabólicas de degradación de acil-CoA ésteres (metabolismo del propanoato, butanoato y β -alanina, síntesis tipo I y II de ácidos grasos, y ubiquinona, y degradación de valina, leucina, isoleucina, lisina, valina y triptofano) en estas últimas la procesividad corresponde con la existente en la β -oxidación, para más detalles ver la tabla 2. Los colores de los marcos representan: verde claro.- familia de sintetetas (CoA/ACP) ligasas, comparten el dominio Pfam 00501; [ila.- familia de deshidrogenasas dependientes de FAD, comparten los dominios Pfam 02771, 02770, 00441 y 01756; rojo.- familia de isomerasas/hidratasas, comparten el dominio Pfam 00378; naranja.- familia de deshidrogenasas dependientes de NAD, comparten el dominio Pfam 00106; verde oscuro.- familia de deshidrogenasas tipo II, dependientes de NAD, comparten los dominios Pfam 02737 y 00725; azul.- familia de tiasas, comparten los dominios Pfam 00108, 00109, 02603 y 02605. La cohil-CoA sintetasa tipo II, (E.C. 4.1.3.17), representada con marco negro, no tiene dominios Pfam caracterizados a la fecha y no presenta homología distinguible a nivel de estructura primaria o secundaria con algún otro tipo enzimático de los aquí analizados. Las enzimas multifuncionales son representadas por círculos de colores acorde a las familias a las que pertenecen sus dominios.

Existe una diferencia importante, entre la β -oxidación y la síntesis tipo I de ácidos grasos, y es que las enzimas de la síntesis tipo I de ácidos grasos usan a lo largo de toda la ruta la proteína acarreadora de acilos (ACP) como cofactor, y no coenzima A (CoA) como las de la β -oxidación, aunque dada la similitud estructural de las enzimas que utilizan CoA y las que emplean (ACP) esta diferencia pudiera no ser muy significativa a nivel estructural, sino meramente bioquímico (Figura 8). Esta diferencia nos permite involucrar a las de síntesis tipo I de ácidos grasos con estadios evolutivos previos al advenimiento del oxígeno molecular por cuatro razones:

1. La enzima que cataliza el primer paso de la síntesis tipo I de ácidos grasos, la 3-oxoacil-(ACP) sintasa (E.C. 2.3.1.41), según nuestros análisis filogenéticos, es homóloga a las acetil-CoA C-acetiltransferasas (E.C. 2.3.1.9) y acetil-CoA C-aciltransferasas (E.C. 2.3.1.16) que catalizan el paso cuatro de la β -oxidación (Figura 11 y Tabla 2). También cataliza la conversión de los acil-CoA ésteres a acil-[ACP] ésteres, un proceso que además de ser anaerobio

a nivel bioquímico, la convierte en una enzima angular en los dos tipos de síntesis de ácidos grasos y su degradación por la β -oxidación.

2. La 3-oxoacil-(ACP) reductasa (E.C. 1.1.1.100) que cataliza el paso dos, enzima homóloga a las 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasas (E.C. 1.1.1.35) tipo II y III del paso tres de la β -oxidación, actúa en condiciones enteramente anaerobias a nivel bioquímico, y es la enzima más distribuida de todas las aquí analizadas (apéndice 1), incluyendo las del ciclo de Krebs, lo que nos permite proponerla como muy antigua. Esta propuesta fue corroborada con análisis filogenéticos (Fig. 7).
3. El paso tres de la síntesis tipo I de ácidos grasos involucra la liberación de un radical hidroxilo y puede ser catalizado por la 3-hidroxiacil-(ACP) deshidratasa, pero esta misma enzima puede catalizar en el mismo sitio activo un proceso de isomerización que no involucra oxígeno o radicales oxigenados reactivos (Leesong *et al*, 1996; y Palosaari *et al*, 1991), (Tabla 2), de forma análoga a la hidratación del paso dos e isomerización que cataliza la (S)-enoil-CoA hidratasa en la β -oxidación (Figura 11 y Tabla 1). Esto sugiere que si bien las actividades que involucran oxígeno no pudieron ser anteriores al surgimiento de las rutas metabólicas bioquímicamente aerobias, la existencia de los sitios activos que las catalizan pudiera serlo, porque las reacciones de isomerización que también catalizan no involucran radicales oxidativos y por ende pudieron estar presentes en condiciones bioquímicamente anaerobias, y ser las isomerizaciones las actividades ancestrales de estas enzimas.
4. La enzima ácido graso de cadena larga-(ACP) ligasa (E.C. 6.2.1.20), la cual puede catalizar el paso de la activación de los ácidos grasos, previo a la β -oxidación, es homóloga a la ácido graso de cadena larga-CoA ligasa (E.C. 6.2.1.3) (Tabla 1), que es la que comúnmente realiza el proceso. Pero además la 6.2.1.20, puede incorporar a los ácidos grasos en la formación de fosfolípidos, o bien, reintroducirlos a la síntesis tipo I de ácidos grasos (Rock y Cronan, 1981; y Rock y Cronan, 1979). Esta versatilidad conecta evidentemente a la síntesis tipo I de ácidos grasos y la β -oxidación, al igual que la 3-oxoacil-(ACP) sintasa (E.C. 2.3.1.41), mencionada arriba, pero también conecta a estas rutas metabólicas directamente con la formación de fosfolípidos, y por ende con la formación de membranas biológicas y deja en manifiesto el papel dual evolutivo de los ácidos grasos, en procesos energéticos por medio de la β -oxidación en la síntesis de ATP y nucleósidos con poder reductor por un lado, y por el otro en procesos estructurales como formadores de membranas (Figura 11).

La segunda se basa en que la conversión de acil-CoA ésteres a acil-(ACP) ésteres por medio de la síntesis tipo I de ácidos grasos permite que los sustratos de la β -oxidación y otras rutas de degradación de acil-CoA ésteres (Tabla 2) sean sustratos para la síntesis tipo I de ácidos grasos, y promueve que puedan ser incorporados como fosfolípidos a las membranas biológicas; por ello, la hipótesis propuesta por Liedtke, (1997 A), de que los ácidos grasos pudieron tener un papel ancestral en la formación de membranas biológicas se hace más plausible.

La tercera, que tras la incorporación de la actividad de hidratación y deshidratación (dependientes de un radical hidroxilo), en la β -oxidación y síntesis tipo I de ácidos grasos, respectivamente, probablemente como una novedad catalítica a partir de funciones de isomerización (bioquímicamente anaerobias), una vez que se pudieron sostener actividades con oxígeno en las rutas metabólicas, se dio lugar al papel energético de los ácidos grasos, y a partir de ello a una amplia gama de intermediarios de las rutas metabólicas de acil-CoA ésteres, como lo sugieren nuestros resultados para las rutas del metabolismo de los aminoácidos ramificados (Keefe *et al*, 1995), del butanoato, del propanoato, de la β -alanina, y de la degradación de lisina, y de triptofano (Figura 10 y Tablas 1 y 2).

La cuarta, que las reacciones con mecanismos químicos similares, como las de abstracción de protones al agua, catalizadas por las enoil-CoA hidratasas (E.C. 4.2.1.17) de la β -oxidación, por la 3-hidroxicanoil-(ACP) deshidrasa (E.C. 4.2.1.60) de la síntesis tipo I de ácidos grasos, y por las fumarato hidratasas (E.C. 4.2.1.2) del ciclo de Krebs, al ser termodinámicamente favorables pudieran originarse de manera independiente más fácilmente que las que requieren de mayor energía libre y que por ende son más difíciles de catalizar. Es decir, que la incorporación de las reacciones termodinámicamente favorables a sus respectivas rutas metabólicas, catalizadas por estas enzimas, pudo darse de manera independiente y ello se refleja como el único conjunto de enzimas del ciclo de Krebs, de la β -oxidación, y de la síntesis tipo I de ácidos grasos que realizan catálisis químicamente similares en las que no se ha detectado homología.

Y la quinta, que la evolución modular ha jugado un papel importante en la diversificación de las rutas metabólicas de ácidos carboxílicos y acil-CoA ésteres. Ello se refleja en la similitud en los mecanismos químicos basados en la conservación de los dominios de unión a dinucleótidos. Seleccionando familias de enzimas que utilizan los mismos cofactores u otros muy parecidos, y que por ende conservan los dominios de unión a ellos, pero con diferencias en elementos estructurales producto de su evolución divergente y en la relación que guardan con el resto de la enzima, que han sido la fuente de variación para el origen de actividades catalíticas químicamente similares sobre sustratos diferentes.

CONCLUSIONES.

El ciclo de Krebs, la espiral de la β -oxidación y la síntesis tipo I de ácidos grasos comparten una serie de cuatro pasos metabólicos con una sucesión de reacciones y mecanismos químicamente muy parecidos. Los análisis de comparación de genomas y biología estructural aquí realizados han mostrado que parte de esa sucesión y algunos de los dominios de las enzimas que catalizan la unión de CoA a los intermediarios y deshidrogenaciones de los mismos, todas ellas reacciones termodinámicamente poco favorables, pueden tener un origen común, como lo enunciamos en nuestra hipótesis inicial, y que las enzimas que catalizan las hidrataciones, reacciones termodinámicamente favorables, pueden ser polifiléticas y haberse incorporado a sus respectivas rutas metabólicas de manera independiente, lo cual explicaría el que haya dos tipos de hidratatas no polifiléticas en la β -oxidación y dos en el ciclo de Krebs, y que en ambos casos, en algunos genomas completamente secuenciados se haya encontrado solo uno de los dos tipos, porque se incorporaron de manera independiente a sus rutas metabólicas respectivas.

Con el surgimiento de las condiciones aerobias a nivel bioquímico y ecológico, y la incorporación de las hidratatas en las rutas de la síntesis tipo I, de la degradación de ácidos grasos y del ciclo de Krebs, se abrió una amplia gama de rutas metabólicas energéticas basadas en la degradación de ácidos y ésteres carboxílicos, con la consecuente producción de ATP y dinucleósidos con poder reductor, y en el caso particular de la β -oxidación y rutas afines basadas en la biosíntesis y degradación de acil-CoA ésteres, la liberación de acetyl-CoA útil como materia prima del ciclo de Krebs.

Se tienen evidencias (Gest, 1981; Huynen *et al*, 1999; Morowitz *et al*, 2000; y Romano y Conway, 1996), de que el origen del ciclo de Krebs y las enzimas que lo catalizan está cifrado en las rutas y enzimas de la síntesis de algunos aminoácidos, probablemente en un inicio como parte de rutas de fijación de carbono.

Por otro lado, nuestros resultados permiten concluir que la β -oxidación y las enzimas que la catalizan, pudieron tener como ancestro a las enzimas de la síntesis tipo I de los ácidos grasos y que el papel inicial de estos acil-CoA ésteres, en condiciones bioquímicamente anaerobias, pudo ser el de formadores de membranas. Así, no fue sino hasta el surgimiento de la aerobiosis a nivel bioquímico y la incorporación de la actividad de la enoil-CoA hidratasa, que se originó su papel energético de los ácidos grasos por medio de la β -oxidación y otras rutas de la degradación de acil-CoA ésteres.

Alineamientos múltiples de las secuencias de las enzimas de la β-oxidación y otras rutas del metabolismo de acil-CoA ésteres utilizadas en los análisis filogenéticos de este trabajo.

Alineamiento de las secuencias de las enzimas que presentan el pFam 00501. E.C.Number/CÓDIGO: 6.2.1.1/AL, 6.2.1.1.3/FL, 6.2.1.1.16/AS, 6.2.1.1.20/FC, 6.2.1.1.26/OL, 6.2.1.1.ML/WL

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150	160	170
PL_Ase	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
FL_AeInv	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
FL_R04	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
FL_Hisa	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
FL_Mmu4	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
FL_Ha3	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
FL_Rn6	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
FL_Cel2	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
FL_Sce4	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
FL_Sce3	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
FL_Sce1	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
FL_Rn5	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
FL_Ha6	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
FL_Sce6	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
FL_Ha1	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
FL_Ha2	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
FL_Mmu2	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
FL_Sce2	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
FL_Tce	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
FL_Rn	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
FL_Syn	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
AL_Cj2	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
AL_Hjy	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
AL_Ae1	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
AL_Nch1	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
AL_Dra	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
AL_Dra	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
AL_Tnu	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
AL_Mcu	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
AL_Ha1	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
AL_Mmu	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
AL_Ha	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
AL_Eco	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
AL_Ha	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
AL_Vch1	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
AL_Pae	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
AL_Ho	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
AL_Cr	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
AL_Xr	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
AL_Ath	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
AL_Lma	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
AL_Cpa	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
AL_Sce2	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
AL_Sce1	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
AL_Ape	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
AL_Ta1	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
AL_Ta1	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
AL_Tv1	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
AL_Ome	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
AL_Bha	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
ASg_Rne	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
AS_R10	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
AS_Pch	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
AS_Rn3	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
AS_Mmu	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
AS_Ha	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
AS_Cel	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
AS_Ncr	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
AL_Ssu	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
AL_Bau	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
AL_Ta2	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
AL_Tv2	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
HL_Sau	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
HL_Mh2	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
HL_Hsa	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

DLTKAKPYEL YHVPLIFELG RKLKLYFKU YHR --- IDVGLXNLP KPFFIAHOS VLDATAFAAV LKREIAEHYI FLGDEYTPRN PNTSTFKCYI WNKGLKRESL OKTAYALMSG KVVVIFPEGA RTIRLEBMSG KQVAILARE LGVTVPVAI EGAAKTKHP

FL_R04 FL_R05 FL_R06 FL_R07 FL_R08 FL_R09 FL_R10 FL_R11 FL_R12 FL_R13 FL_R14 FL_R15 FL_R16 FL_R17 FL_R18 FL_R19 FL_R20 FL_R21 FL_R22 FL_R23 FL_R24 FL_R25 FL_R26 FL_R27 FL_R28 FL_R29 FL_R30 FL_R31 FL_R32 FL_R33 FL_R34 FL_R35 FL_R36 FL_R37 FL_R38 FL_R39 FL_R40 FL_R41 FL_R42 FL_R43 FL_R44 FL_R45 FL_R46 FL_R47 FL_R48 FL_R49 FL_R50 FL_R51 FL_R52 FL_R53 FL_R54 FL_R55 FL_R56 FL_R57 FL_R58 FL_R59 FL_R60 FL_R61 FL_R62 FL_R63 FL_R64 FL_R65 FL_R66 FL_R67 FL_R68 FL_R69 FL_R70 FL_R71 FL_R72 FL_R73 FL_R74 FL_R75 FL_R76 FL_R77 FL_R78 FL_R79 FL_R80 FL_R81 FL_R82 FL_R83 FL_R84 FL_R85 FL_R86 FL_R87 FL_R88 FL_R89 FL_R90 FL_R91 FL_R92 FL_R93 FL_R94 FL_R95 FL_R96 FL_R97 FL_R98 FL_R99 FL_R100

... 350 ... 360 ... 370 ... 380 ... 390 ... 400 ... 410 ... 420 ... 430 ... 440 ... 450 ... 460 ... 470 ... 480 ... 490 ... 500 ... 510 ... 520 ... 530 ... 540 ... 550 ... 560 ... 570 ... 580 ... 590 ... 600 ... 610 ... 620 ... 630 ... 640 ... 650 ... 660 ... 670 ... 680 ... 690 ... 700 ... 710 ... 720 ... 730 ... 740 ... 750 ... 760 ... 770 ... 780 ... 790 ... 800 ... 810 ... 820 ... 830 ... 840 ... 850 ... 860 ... 870 ... 880 ... 890 ... 900 ... 910 ... 920 ... 930 ... 940 ... 950 ... 960 ... 970 ... 980 ... 990 ... 1000

Table with multiple columns containing alphanumeric codes and symbols. The text is dense and repetitive, appearing to be a list of identifiers or a codebook. The columns are organized into vertical sections, with some larger, bolded text blocks interspersed, such as 'DELA' and 'NO SAK'. The overall layout is that of a structured data table.

