



XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería



Relación entre contexto genómico y sub-funcionalización de una $(\beta\alpha)_8$ isomerasa presente en la biosíntesis de Triptófano e Histidina.

Ana Lilia Juárez Vázquez, Francisco Barona-Gómez. Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad. LANGEBIO-CINVESTAV. Evolución de la diversidad metabólica Km. 9.6 Libramiento Norte Carr. Irapuato-León 36821 Irapuato Gto. México. ajuarez@ira.cinvestav.mx.

Palabras clave: *Actinomyces*, sub-funcionalización, bi-substrato

Introducción. La Fosforribosil Isomerasa A (PriA), presente en la mayoría de las Actinobacterias, participa en la biosíntesis de Triptófano e Histidina, presenta actividad N'-(5'-fosforribosil) antranilato -PRA- isomerasa (trpF) y actividad N'-[(5'-fosforribosil) formimino]-5-aminoimidazol-4-carboxamida -ProFAR- isomerasa (HisA) (1); por lo que es un modelo interesante para explorar hipótesis evolutivas relacionadas con la especificidad de sustrato. La disponibilidad de más de 150 genomas de Actinobacterias, nos ha permitido hacer estudios de genómica comparativa para los clusters de genes que codifican las vías de biosíntesis de Triptófano e Histidina. En base a estos estudios, encontramos que algunas especies del género *Actinomyces* (*A. sp. oral taxón* y *A. odontolyticus*) han perdido los genes necesarios para la biosíntesis de Histidina y el gen trpF necesario para la biosíntesis de Triptófano; e interesantemente aún conservan los otros genes involucrados en la biosíntesis de Triptófano (trpD, trpEG, trpC, trpBA) y el homólogo de PriA. Lo anterior sugiere que en estas especies el gen PriA ha pasado por un proceso de sub-funcionalización enzimática que restringe su bi-especificidad hacia el reconocimiento de PRA como único sustrato. Dado que en ciertas especies del género *Actinomyces*, por ejemplo, *A. urogenitalis*, encontramos completo el cluster de histidina, incluyendo una PriA bi-específica, este episodio de sub-funcionalización es la consecuencia de mutaciones puntuales relativamente recientes. Es probable que estas mutaciones se deban a la relajación de la selección positiva asociada a un deterioro genómico. El objetivo de este trabajo es caracterizar *in vivo* e *in vitro* a los homólogos de PriA en *Actinomyces*.

Metodología.

Los tres genes homólogos de PriA (sub-trpFs de *A. odontolyticus*, *A. sp. oral taxón* y PriA *A. urogenitalis*) fueron sintetizados por GENEART.

La caracterización *in vivo* se llevó a cabo mediante ensayos de complementación con los homólogos de PriA (2).

Para la caracterización *in vitro* se realizaron ensayos acoplados de cinética enzimática para las actividades PRA y ProFAR con cada homólogo de PriA (3).

Resultados.

El análisis de los contextos genómicos de la biosíntesis de histidina y triptófano, nos permitió identificar procesos de sub-funcionalización enzimática (Fig. 1), los cuales fueron evaluados por ensayos de complementación *in vivo* e *in vitro* (Tabla 1). El análisis filogenómico incluyendo entre homólogos de PriA en *Actinomyces* nos indica una divergencia alta, entre las sub-trpFs y las PriAs, lo cual sostiene nuestra hipótesis del relajamiento de la selección positiva sobre las sub-trpFs.

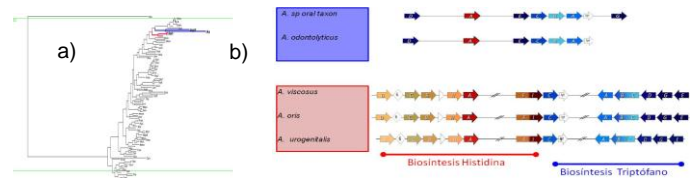


Fig. 1. Filogenómica de PriA en Actinobacteria. a) Árbol de homólogos de PriA, en azul se marcan los episodios de sub-funcionalización hacia la actividad PRA y en rojo aquellas enzimas que mantienen su bi-especificidad. b) Reconstrucción de los contextos genómicos para la biosíntesis de histidina y triptófano en el género *Actinomyces*.

Tabla 1. Caracterización funcional de homólogos de PriA.

Enzima (organismo)	Actividad <i>in vivo</i>		Actividad <i>in vitro</i>					
	ProFAR (complementación)	PRA	K_M (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_M ($\mu M^{-1} s^{-1}$)	K_M (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_M ($\mu M^{-1} s^{-1}$)
<i>S. coelicolor</i> ²	+	+	3.6 ± 0.7	1.3 ± 0.2	0.4	5.0 ± 0.08	3.4 ± 0.09	0.7
<i>A. urogenitalis</i>	+	+	PD	PD	PD	PD	PD	PD
<i>A. odontolyticus</i>	-	+	ND	ND	ND	8.5 ± 0.9	0.15 ± 0.06	0.02
<i>A. sp. oral taxón</i>	-	+	PD	PD	PD	PD	PD	PD

ND= Actividad no detectada
PD= Actividad por definir

Conclusiones. La pérdida de los genes necesarios para la biosíntesis de Histidina en algunos genomas del género *Actinomyces* resulta en el aumento de la especificidad de sustrato por PRA, y la pérdida de la selectividad hacia ProFAR.

Agradecimiento. Dr. Francisco Barona-Gómez y a todo su equipo de trabajo, al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACYT, por la beca otorgada.

Bibliografía.

Barona-Gómez, F y Hodgson D. (2003). *EMBO. Rep.* (4) 296-300.
Wright H, y cols. (2008). *Biochemical and Biophysical Research Communications.* (365) 16-21.
Noda-García L, y cols. (2010). *Protein Science.*(19) 535-543.