

UCH-FC
MAG- Microbiología
I 587
C.1



**Estudio de la Especificidad por tRNA de la GluRS de
Acidithiobacillus Ferrooxidans en la Formación del
Gin-tRNA^{Gin} por la Vía Indirecta**

TESIS
ENTREGADA A LA
UNIVERSIDAD DE CHILE
EN CUMPLIMIENTO PARCIAL DE LOS REQUISITOS
PARA OPTAR AL GRADO DE
MAGISTER EN CIENCIAS BIOLÓGICAS CON MENCIÓN
EN MICROBIOLOGIA

FACULTAD DE CIENCIAS

CAROLINA MARIA INOSTROZA SILVA

ENERO 2011

Director de Tesis: Dr. Omar Orellana
Profesor Patrocinante: Dr. Marcelo Baeza



FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACIÓN

TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magíster presentada por la candidata:

CAROLINA MARIA INOSTROZA SILVA

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas con Mención en Microbiología en el examen de Defensa Privada de Tesis, rendido el día 13 de Enero de 2011.

Director de Tesis

Dr. Omar Orellana

Profesor Patrocinante

Dr. Marcelo Baeza

Comisión Evaluadora de la Tesis

Dr. Miguel Allende

Dr. Francisco Chávez





A MI PEQUEÑA GRAN FAMILIA

Agradecimientos



A mi pequeña gran familia.

Índice general



	Pág.
Dedicatoria.	ii
Resumen biográfico.	iii
Agradecimientos.	iv
<i>Índice de materias.</i>	v
Lista de tablas.	vii
Lista de figuras.	viii
Lista de esquemas.	x
Lista de Símbolos, abreviaturas o nomenclatura	xi
Resumen en español.	I
Resumen en inglés.	IV

Introducción.	VII
Materiales y métodos.	XVI
Resultados.	XXXV
Discusión.	LV
Conclusiones.	LXII
Referencias.	LXIII



Lista de tablas



	Pág.
Tabla 1. Cepas	XVIII
Tabla 2. Plásmidos y construcciones génicas.	XXI
Tabla 3. Lista de oligonucleótidos.	XXV
Tabla 4. Cantidad de enzima y tRNA usadas para los experimentos de aminoacilacion de tRNA.	XXXII.

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1. Vias de formacion de Glu-tRNA ^{Glu} y Gln-tRNA ^{Gln} .	VIII
Figura 2. Estructura secundaria del tRNA.	IX
Figura 3. Modelo experimental de mutagenesis sitio dirigida por PCR.	XXV
Figura 4. Alineamiento de Secuencias aminoacídicas de GluRSs.	XXXVI
Figura 5. Modelos estructurales de la GluRS1 silvestre R351 y GluRS1 mutante R351Q.	XXXVII.
Figura 6. Sobre posición de los carbonos α de la GluRS1 y la GluRS1-R351Q.	XXXIX
Figura 7. Modelo estructural de la GluRS2 con los tRNA Glu y tRNA Gln.	XL
Figura 8. Electroforesis en geles de agarosa de los fragmentos obtenidos por mutagénesis sitio dirigida por PCR.	XLI

	Pág.
Figura 9. Formación de Glu-tRNA^{Glu} <i>in vivo</i> en <i>Escherichia coli</i> JP1449.	XLII
Figura 10. Formación de Glu-tRNA^{Gln} <i>in vivo</i> en <i>Escherichia coli</i> KS463.	XLIV
Figura 11. Esquema del tRNA^{Gln}.	XLV
Figura 12. Cinéticas de aminoacilación de los tRNA^{Gln3} y sus variantes por las GluRS1 y GluRS2.	XLVII
Figura 13. Alineamientos de GluRSs.	L
Figura 14. Expresión de la proteína de fusión LexA- GluQRS en levadura L40.LI	
Figura 15. . Selección de colonias de L40 doblemente transformadas en medio SD-trp-leu.	LII
Figura 16. Selección de colonias de L40 en medio SD-trp-leu-his y producción de B-galactosidasa.	LIII
Figura 17. Resumen los resultados obtenidos de interacción con GluQRS.	LIV

Lista de esquemas.

	Pág.
Esquema 1. Vectores usados como anzuelo pAB151 y la presa pACT2.	XXXIV

Lista de Símbolos, abreviaturas o nomenclatura

Abreviatura	Descripción
aaRS	Aminoacil tRNA sintetasa
AdT	Amido transferasa
ALA	Acido δ -aminolevulinico
AMP	Adenosin monofosfato
ATP	Adenosin trifosfato
BSA	Albumina de suero bovino
CTP	Citidin trifosfato
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Acido etilen diamino tetra acetico
Gln	Glutamina
GlnRS	Glutaminil tRNA sintetasa
Glu	Glutamato
GluQRS	Glutamil Queosine tRNA-sintetasa
GluRS	Glutamil tRNA sintetasa
GluRS(D)	GluRS discriminante
GluRS(ND)	GluRS no discriminante
GluTR	Glutamil-tRNA reductasa
GST	Glutation-S-transferasa
GTP	Guanosin trifosfato
HEPES	Acido 4-(2-hidroxietil) piperasin-1-etanosulfonico
His	Histidina
Leu	Leucina
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
MOPS	acido 3-(N-morfolino)propanosulfonico
N	asparragina

PCR	reacción en cadena de la polimerasa.
PMSF	Fluoruro de metil sulfonil fenol
POPOP	1,4-bis(5-fenil-2-oxazolil) benceno
PPO	2,5-difeniloxazol
R	arginina
RMSD	root mean square deviation
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SeRS	seril-tRNA sintetasa
TCA	Acido tricloroacetico
TNB- 2	nitro-5-tiobenzoato
tRNA	Acido ribonucleico de transferencia
UTP	Uridin trifosfato
YPD	yeast peptone dextrose medio de cultivo

RESUMEN

La aminoacilación específica de los tRNA es catalizada por las aminoacil-tRNA sintetasas (AARSs), las cuales deben discriminar y distinguir entre múltiples aminoácidos y tRNAs sustratos. Existen dos vías en la formación de Gln-tRNA^{Gln}. La vía directa, presente en eucariontes y en algunas bacterias que involucra la participación de una GlnRS que forma el Gln-tRNA^{Gln} y la vía indirecta, presente en arqueas y en la mayoría de las bacterias. En la vía indirecta una GluRS-ND forma Glu-tRNA^{Glu} y Glu-tRNA^{Gln}. Este último que es un aminoacil-tRNA “mal acilado” se transforma en Gln-tRNA^{Gln} por la acción de una amidotransferasa dependiente de tRNA. En esta tesis surgió la pregunta ¿cuáles son los determinantes moleculares involucrados en la interacción entre los tRNAs sustratos y las enzimas en la vía indirecta?, que se abordó mediante la identificación de los residuos aminoácidos en la AFGluRS1 y AFGluRS2 de *A. ferrooxidans* que interaccionan con los tRNAs (Glu y Gln). Con el modelamiento por homología, se predijeron las estructuras de ambas GluRSs. Se identificó una R351 en la AFGluRS1 y se construyó un modelo de la mutante de la AFGluRS1 (R351Q) con el tRNA^{Glu} de brazo D largo. El análisis bioinformático reveló que no se observan cambios importantes a nivel de los dominios catalíticos de la GluRS. Sin embargo, el rearrreglo estructural relevante ocurre en los dominios de interacción con el anticodón del tRNA. El mayor cambio es de 7Å en la G337. Para identificar diferencias y similitudes entre la AFGluRS1 y la AFGluRS2, se construyeron los modelos de la AFGluRS2 con los tRNA^{Glu}

(Brazo D largo) y tRNA^{Gln} (Brazo D corto). De acuerdo a los resultados obtenidos, una de las variantes de la AFGluRS1 que adquiriría las propiedades de la AFGluRS2 es la mutante R351Q. Mediante mutagénesis sitio dirigida por PCR se construyó la mutante R351Q. Mediante experimentos de complementación *in vivo* en *E. coli*, se evaluó la formación de GlutRNA^{Glu} y GlutRNA^{Gln}, en ambos casos la mutante R351Q se comportó como una AFGluRS2 capaz de complementar las mutaciones, una mutación única fue capaz de cambiar la especificidad de interacción funcional *in vivo* de una GluRS.

Para identificar los determinantes de identidad en los tRNA^{Gln} que interactúan con las GluRS, se construyeron variantes de tRNA^{Gln}₃, sustrato único de la AFGluRS2. El tRNA^{Gln}₃ de brazo D corto, se transformó en uno de brazo largo, tRNA^{Gln}_{3bc-bl}. Además, se construyó una mutante (C32-U) en el loop del anticodón, tRNA^{Gln3u-c}. Ensayos de aminoacilación *in vitro* en curvas de progreso se evaluó la capacidad de la AFGluRS1 y AFGluRS2 de aminoacilar estos tRNAs. Este resultado sugiere que tRNA^{Gln} de brazo D largo no es sustrato de la GluRS2, por lo tanto el largo del brazo sería determinante en la discriminación de las enzimas por un sustrato específico. Además, U32 pareciera ser un determinante de identidad ya que el tRNA^{Gln3u-c} deja de ser sustrato de la GluRS2.

Interacción entre las GluRSs de *A. ferrooxidans* y otras proteínas que involucran el Glu-tRNA.

Para estudiar una posible interacción entre proteínas de *A. ferrooxidans* que involucran el Glu-tRNA: AFGluTR (Glutamil-tRNA reductasa) y la AFGluQRS, parólogo trunco de la GluRS se utilizó la técnica de doble híbrido implementada en el Laboratorio de la Dra. Weygand-Durasevic. Se realizó el ensayo de interacción entre la AFGluTR que actúa como “anzuelo” y AFGluQRS que es la “presa”. El gen completo de la GluTR fue clonado en el vector pACT2 y se construyó la proteína de fusión LexA-AFGluQRS. La levadura reportera usada fue la *S. cerevisiae* L40, preparada para una doble transformación con los vectores anteriores. Para identificar si hay interacción entre las proteínas se evaluó la actividad de la B-galactosidasa de la L40 transformada. No hubo expresión de B-galactosidasa, GluQRS no interactúa con GluTR, además en el ensayo de interacción entre GluQRS y GluQRS tampoco hubo interacción, lo que sugiere que GluQRS sería un monómero ya que no interactúa consigo misma.

7

RESUMEN EN INGLES

The specific aminoacylation of tRNA is catalyzed by the aminoacyl-tRNA synthetases (AARSs), which discriminate and distinguish between multiple amino acids and tRNAs substrates. There are two ways in the formation of Gln-tRNAGln. The direct pathway, present in eukaryotes and some bacteria that involves the participation of a GlnRS forming Gln-tRNAGln and the indirect pathway, present in archaea and most bacteria. In the indirect route a GluRS-ND forms a Glu- -Glu- tRNA^{Glu} and a Glu-tRNA^{Gln}. The latter is an aminoacyl-tRNA "misacylated", transformed into Gln-tRNA^{Gln} by the action of a tRNA-dependent amidotransferase. In this thesis, the question is what are the molecular determinants involved in the interaction between the substrate tRNAs and the enzymes in the indirect pathway? It was addressed by identifying the amino acid residues and AFGluRS2 AFGluRS1 from *A. ferrooxidans* that interact with tRNAs (Glu and Gln). With the modeling by homology were predicted structures of both GluRSs. R351 was identified in the AFGluRS1 and a model of AFGluRS1 mutant (R351Q) was constructed with a long D arm tRNA^{Glu}. Bioinformatic analysis revealed no significant changes at the catalytic domains of GluRS. However, significant structural rearrangement occurs in the domains of interaction with the anticodon of tRNA. The biggest change was 7A ° in a G337. To identify differences and similarities between the AFGluRS1 and AFGluRS2, we constructed models with tRNAGlu AFGluRS2 (long D arm) and tRNAGln (short D arm). According to this results, a variant of the AFGluRS1 mutant R351Q would acquire the properties of the AFGluRS2. By site-directed mutagenesis by PCR was built the R351Q mutant. Using *in vivo* complementation experiments in *E. coli*, was evaluated the formation of GlutRNA^{Gln} and GlutRNA^{Glu}, in both cases the mutant

R351Q behaved as a AFGluRS2 capable of complementing mutations, a single mutation was able to change the specificity of functional interaction *in vivo* of a GluRS.

To identify the identity determinants of a tRNA^{Gln} that interact with GluRS, tRNA^{Gln3} variants were built, AFGluRS2 unique substrate. The short D arm tRNA^{Gln3} turned into a long arm, tRNA^{Gln3bc-bl}. In addition, a mutant construct (C32-U) in the anticodon loop, tRNA^{Gln3u-c}. Aminoacylation assays *in vitro* in progress curves assessed the ability of aminoacyl AFGluRS2 AFGluRS1 and these tRNAs. This result suggests that D tRNA^{Gln} long arm is not GluRS2 substrate, so the long arm would be decisive in the discrimination of the enzymes by a specific substrate. Furthermore, U32 appears to be a determinant of identity as the-c tRNA^{Gln3u} longer GluRS2 substrate.

Interaction between A. GluRSs ferroxidans and other proteins that involve the Glu-tRNA.

To study a possible interaction between *A. ferrooxidans* proteins involving the Glu-tRNA as: AFGluTR (Glutamyl-tRNA reductase) and AFGluQRS, truncated paralogue of GluRS, was used double-hybrid technique, implemented in the laboratory of Dr. Weygand -Durasevic. We performed the test for interaction between AFGluTR serving as "bait" and AFGluQRS which is the "prey". The complete gene of GluTR was cloned in pACT2 vector and was constructed as a fusion protein LexA-AFGluQRS. The yeast *S. cerevisiae* reporter used was L40, prepared for a double transformation with the vectors above. To identify whether is the interaction between the proteins, the activity of the B-galactosidase of the L40 transformed was assessed. There was no expression of B-galactosidase, so GluQRS does not interact with GluTR as well as in the

test of interaction between GluQRS and GluQRS , suggesting that GluQRS would be a monomer that does not interact with itself.

INTRODUCCION

Aminoacil tRNA sintetasas.

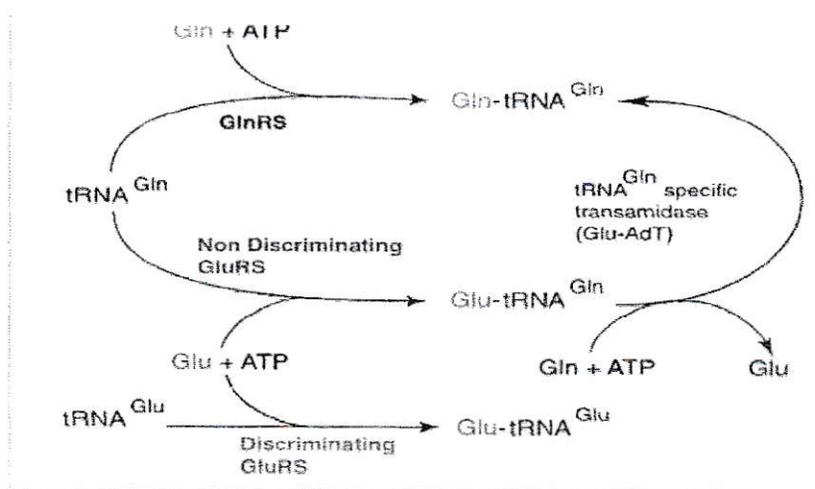
La traducción es el proceso mediante el cual la información génica, en el mRNA, se descodifica para sintetizar las proteínas. La especificidad de la inserción de un aminoácido en una posición particular en un polipéptido naciente está determinado por una adecuada interacción codón - anticodón y por la correcta unión entre un aminoácido específico con su correspondiente tRNA, proceso denominado aminoacilación del tRNA. La aminoacilación es catalizada por las aminoacil-tRNA sintetasas (AARSs), las cuales deben discriminar y distinguir entre múltiples aminoácidos y tRNAs sustratos (Ibba, 2000; Ibba y Soll, 2000).

Previo a la identificación experimental de los componentes individuales de la síntesis de proteínas, Crick en su hipótesis del adaptador postuló la existencia de tRNA adaptadores (Crick, 1958). Según esta hipótesis se requería que la formación de los 20 aminoacil-tRNA sea catalizada por una enzima específica, por lo tanto se esperaba que en cada célula y organelo se encuentren veinte de estas enzimas. Posteriormente esta teoría se confirmó en *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae* por estudios bioquímicos, genéticos y por biología molecular (Forster, 2003).

Vía alternativa en la formación de Gln-tRNA^{Gln}

Recientemente, mediante la secuenciación completa del genoma de dos arqueas metanogénicas, se determinó que en estos organismos existen sólo dieciséis

genes ortólogos que codifican para AARSs. No se encontraron genes que codifiquen para Asparraginil, Cisteinil, Lisil y Glutaminil-tRNA sintetetas (Stathopoulos, 2000). En esta tesis realizamos estudios relacionados con la vía de formación de Gln-tRNA^{Gln}. En eucariontes y algunas bacterias la formación de Gln-tRNA^{Gln} ocurre por la acción de la Glutamyl-tRNA sintetasa, GluRS (vía directa) (Stathopoulos, 2000). En cambio en la mayoría de las bacterias, en arqueas, en cloroplastos y probablemente en mitocondrias, en los que no existe una glutaminil-tRNA sintetasa (GlnRS), existe una vía alternativa en la formación de Gln-tRNA^{Gln} (Arnez, 1997). Esta vía consta de dos pasos, en una primera etapa el tRNA^{Gln} es aminoacilado con glutamato por una glutamil-tRNA sintetasa no discriminante (GluRS-ND) enzima capaz de aminoacilar tRNA^{Glu} y tRNA^{Gln} para generar Glu-tRNA^{Gln}. El producto de esta aminoacilación “errónea” es transformado a Gln-tRNA^{Gln} por la glutamil-tRNA^{Gln} amidotransferasa (AdT) (Wilcox, 1968) (**Figura 1, Vias de formacion de Glu-tRNA^{Glu} y Gln-tRNA^{Gln}**)



(Francklyn, 2001)

Glutamil tRNA sintetasas (GluRSs)

En los organismos que usan la vía directa de formación de Gln-tRNA^{Gln}, la GluRS es de carácter discriminante (GluRS-D), es decir, aminoacila el tRNA^{Glu} pero no el tRNA^{Gln} (Brown y Doolittle, 1999).

En estudios en la GluRS de *E. coli*, que es del tipo discriminante, se han identificado los determinantes de identidad en el tRNA^{Glu}, que corresponden a aquellos nucleótidos importantes en la interacción funcional con la enzima. La mayor parte de los elementos de identidad se encontraron en el brazo D, en el anticodón y en el brazo aceptor (Sekine, 1996; Sekine, 2001) (**Figura 2**).

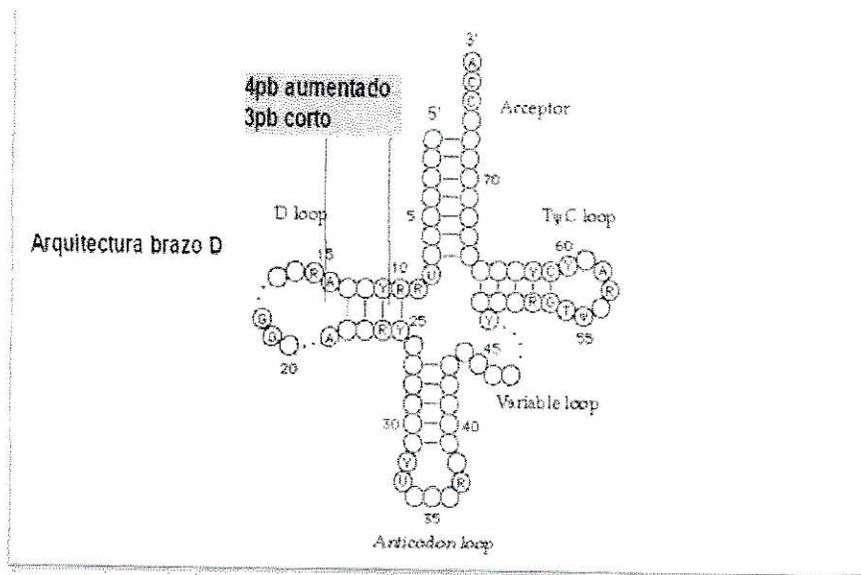


Figura 2: Estructura secundaria del tRNA. Se destaca la estructura variable del brazo D, denominado aumentado de 4pares de bases (4pb) y corto de 3 pb.

Años atrás, se determinó la estructura cristalográfica del complejo GluRS-tRNA^{Glu} de *Thermus thermophilus* (Nureki, 1995; Sekine, 2001 y Sekine, 2003). De acuerdo con este modelo, la arginina 358 (conservada en algunas GluRS) interacciona con la C36 del anticodón del tRNA^{Glu}_{CUC} (Siatecka, 1998). En la mutante de la GluRS de *T. thermophilus* que presenta un cambio en la arginina 358 por una glutamina (R358Q), se analizó la capacidad de esta enzima de aminoacilar un tRNA^{Glu} silvestre y un tRNA^{Glu} mutante C36G (mutación que transforma el anticodón de glutamato en el de glutamina). El cambio R358Q en la GluRS de *T. thermophilus* permitió a esta enzima reconocer el anticodón de glutamina. Este experimento confirma que la arginina 358 interacciona con el nucleótido C36 del anticodón y sugiere que puede ser esencial para que la GluRS pueda diferenciar entre el tRNA^{Glu} y el tRNA^{Gln} (Sekine, 2003).

En bacterias Gram positivas del género *Bacillus* y *Clostridium*, las cuales sintetizan Gln-tRNA^{Gln} por medio de la vía indirecta, presentan en las GluRS un residuo de glutamina en una posición equivalente a la arginina 358 de *T. thermophilus* (Siatecka, 1998).

In vitro la GluRS de *B. subtilis* aminoacila con glutámico el tRNA^{Gln} de *E. coli* (brazo D corto, es decir de tres pares de bases) y los tRNA^{Glu} y tRNA^{Gln} de *Bacillus subtilis* (ambos de brazo D corto, Figura 2) (Pelchat, 1998 y Lapointe, 1986).

La mutante (Q373R) de la GluRS-ND de *B. subtilis* en una posición equivalente a la R358 de la GluRS de *T. thermophilus*, fue capaz de complementar una mutación

termosensible en el gen *gltX* de *E. coli*. Este resultado implica que *in vivo* la GluRS mutante aminoacila con glutámico el tRNA^{Glu} de *E. coli* (brazo D aumentado, Figura 2). De acuerdo con la información disponible hasta el momento, esta mutación provoca un cambio en la especificidad por el anticodón y/o el largo del brazo D del tRNA (Núñez, 2004).

Enzimas que involucran el Glu-tRNA en *Acidithiobacillus ferrooxidans*

Mediante análisis en genomas completos se ha observado que varios organismos contienen más de un gen para GluRS. El papel de la duplicación de estas enzimas no es clara. En *Helicobacter pylori* se demostró que la GluRS1 genera sólo Glu-tRNA^{Glu} mientras que la GluRS2 genera Glu-tRNA^{Gln} (Skouloubris, 2003 y Salazar, 2003).

En el genoma de *A. ferrooxidans*, existen los genes denominados *gltx1*, *gltx2*, *hemA*, y *gluqrs* que codifican para las correspondientes enzimas: GluRS1 y 2, GluTR (Glutamil-tRNA reductasa, involucrada en la síntesis de tetrapirroles) y la GluQRS, parálogo trunco de la GluRS cuya función biológica se desconoce. (Levicán, 2007)(Salazar, 2004). Además, en la vía indirecta de formación de Gln-tRNA^{Gln}, la enzima clave es la glutamil-tRNA amidotransferasa (AdT) codificada por los genes *gatCAB* (Salazar, 2001).

A. ferrooxidans posee un complejo sistema para la síntesis de Glu-tRNA^{Glu}, sustrato necesario para producir hemo y proteínas. Las GluRS1 y GluRS2, encargadas de aminoacilar con glutamato a cuatro tRNA^{Glu} y cuatro tRNA^{Gln}. Se ha evaluado la

actividad *in vitro* de estas enzimas con los siguientes sustratos: tres tRNA^{Glu} y dos tRNA^{Gln}. Mediante ensayos *in vitro*, se observó que la GluRS1 aminoacila preferentemente a tRNA^{Glu} y tRNA^{Gln} (ambos de brazo D largo) en cambio la GluRS2 aminoacila tRNA^{Gln} de brazo D corto (Salazar, 2003) (Levicán., 2005). Ensayos *in vivo* en *E. coli* confirmaron la especificidad de las GluRS por el largo del brazo D de los tRNAs sustrato (Núñez, 2004). Estos antecedentes, sugieren que la interacción de un tRNA sustrato con las GluRSs depende del anticodón y/o del largo del brazo D del tRNA y de los aminoácidos presentes en la zona de interacción con el anticodón y de otros aminoácidos que estabilizan la interacción específica. Brevemente, con respecto a la GluTR y la GluQRS, nuestro laboratorio ha investigado la regulación de la actividad de las GluRSs y de GluTR en respuesta a cambios en la biosíntesis de hemo (Levicán, 2007). La GluQRs es un parálogo trunco de las GluRS muy conservado en las bacterias. Esta proteína ha sido estudiada en *E. coli*. Es una aminoacil-transferasa capaz de transferir Glu a la queosina 34 del tRNA^{Asp} (Salazar, 2004). Sin embargo, la función biológica de esta modificación se desconoce.

Interacción de Aminoacil-tRNA sintetasas

En procariontes, las AARS suelen funcionar como monómeros u homo-dímeros, a diferencia de los eucariontes superiores, donde han sido identificadas nueve AARS, incluidos MetRS y GluRS, asociadas para formar un multi-complejos enzimáticos.

En *E.coli*, se ha investigado un sistema para la canalización de sustratos. La inusual estructura de la GluTR en forma de "V" sugiere que esta enzima es capaz de formar múltiples interacciones no sólo con su sustrato natural el glutamil-tRNA, sino, también simultáneamente con la enzima que sigue en la biosíntesis de tetrapirroles, Glutamato-1-semialdehído 2,1-aminomutasa GSAM (Moser, 2001). En *Saccharomyces cerevisiae*, se ha demostrado que tanto sintetetas así como los tRNAs pueden formar parte de complejos (Galani, 2005). Un ejemplo en levaduras es la interacción de la Seryl-tRNA sintetasa (SerRS) con peroxina Pex21p una proteína de la membrana peroximal, involucrada en la biogénesis e importe de proteínas de la matriz del peroxisoma, que actúa como un activador de la SerRS por estimular la unión al tRNA sustrato. La interacción entre SerRS y PexP21 fue identificado en un sistema de doble híbrido usando SerRS como cebo y una genoteca de cDNA como presa (Rocak, 2002).

Amidotransferasas

En la vía indirecta de formación de Gln-tRNA^{Gln}, la enzima clave es la glutamil-tRNA amidotransferasa (AdT). Se han descrito dos tipos de AdT especie específica. La primera corresponde a una enzima heterotrimérica con tres subunidades denominadas CAB respectivamente. La actividad de esta enzima ha sido probada *in vitro* en algunas bacterias, dentro de las cuales se cuentan *B. subtilis*, *T. thermophilus*, *C. trachomatis*, *D. radiodurans* y *A. ferrooxidans* (Curnow, 1998; Becker, 2000; Raczniak, 2001 y Salazar, 2001). Esta enzima puede formar Gln-tRNA^{Gln} a partir del sustrato mal acilado (Glu-

tRNA^{Gln}). La segunda clase de AdT, es un heterodímero (D y E) que se ha encontrado sólo en arqueas. Análisis bioquímicos y genómicos en *A. ferrooxidans* revelaron que así como en *B. subtilis* los genes que codifican para la AdT están organizados en un operón (*gatCAB*). Esta enzima es capaz de amidar tanto Glu-tRNA^{Gln} como Asp-tRNA^{Asn}, siendo la única fuente de formación de esos aminoacil-tRNAs en este organismo (Salazar, 2001).

Recientemente, se publicó la estructura cristalina del complejo amidotransferasa de *Staphylococcus aureus* con Glutamina y un análogo de ATP (Nakamura, 2006). Se describe que los nucleótidos del brazo aceptor y del "loop" del brazo D del tRNA^{Gln} son los elementos de identidad esenciales para la discriminación en la AdT.

Hipótesis

El conjunto de estos antecedentes, muestran que algunos de los determinantes de identidad entre el tRNA y la GluRS corresponderían a aminoácidos que se encuentran en la zona de interacción con el anti codón, pero los antecedentes sugieren que no serían los únicos que participan en la estabilización de la interacción específica, por lo tanto la hipótesis que planteo es que la especificidad de la interacción de las GluRS2 de *A. ferrooxidans* con el tRNAGln está determinada por elementos de identidad de la proteína (zona de interacción con el anticodón) y por el largo del brazo D del tRNA sustrato.

Objetivo General

Identificar los nucleótidos en el tRNAGln y los residuos y/o segmentos aminoacídicos en las GluRSs que determinan la interacción funcional específica.

Objetivos Específicos

- 1.-Identificar los residuos aminoacídicos en la GluRS1 y GluRS2 que determinan una interacción funcional específica por su tRNA sustrato.
- 2.-Identificar los nucleótidos en el tRNAGln que determinan la interacción específica con las GluRSs.
- 3.-Estudiar la interacción entre las GluRSs y otras proteínas que involucran el Glu-tRNA: la Glutamil-tRNA reductasa y la GluQRS de *A. ferrooxidans*.

MATERIALES Y METODOS

Métodos Bioinformáticos

Búsqueda bioinformática de secuencias de tRNA, GluRS, GluQRS y AdT.

Para la búsqueda de los distintos genes de *A. ferrooxidans*, se utilizó el genoma secuenciado por ERGO y TIGR (<http://ergo.integratedgenomics.com/>, www.tigr.org) y cuyas secuencias se encuentran disponibles en la red. La búsqueda de las proteínas presentes en los genomas de los organismos seleccionados, se realizó utilizando el programa Blastp en el servidor del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). A una de las secuencias encontradas se consideró homóloga trunca de las GluRS denominado GluQRS (~300 aminoácidos) resultado que se confirmó con alineamientos de proteínas usando como referencia la GluQRS de *E. coli* en el programa Clustal W (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) (Salazar, 2004) (Blaise, 2004). Para la búsqueda de los tRNA, la secuencia parcial del genoma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 se analizó con el programa tRNAscan-SE (<http://www.genetics.wustl.edu/eddy/tRNAscan-SE/>) en su modo "Cove only" para buscar los tRNA presentes en cada fragmento.

Modelamiento de la GluRS1.

Los modelos de las GluRSs son de gran utilidad en la predicción de interacciones enzima sustrato y serán de utilidad para interpretar los resultados obtenidos en esta

tesis. En base a alineamientos de 21 secuencias proteicas, (programa Modeller, <http://www-01.ibm.com/software/awdtools/modeler/swmodeler/>) la construcción de los modelos estructurales de la GluRS1 y GluRS2 se realizó por homología estructural con otras GluRS cristalizadas usando la base de datos PDB donde se encuentran disponibles las estructuras de las GluRS de *Thermus thermophilus*, *Thermotoga maritima*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Thermosynechococcus elongatus*. Entre éstas, la secuencia de la GluRS de *T. thermophilus* es la que posee mayor identidad con la de *A. ferrooxidans* (36%). Estos modelos fueron construidos sobre la base de la enzima nativa. Para generar los complejos con tRNA, se uso como referencia el complejo GluRS-tRNA^{Glu} de *T. thermophilus*, se superpuso el complejo de *A. ferrooxidans* y se eliminó la estructura de referencia (Salas, 2005).

Métodos experimentales

Cepas

En este trabajo se utilizó la cepa de *A. ferrooxidans* ATCC23270, secuenciada por ERGO y TIGR, y cuyas secuencias se encuentran disponibles en la red.

JP1449 de *E. coli*: El uso de esta la cepa mutante en el gen *gltX* de *E. coli* JP1449 termosensible permitirá realizar las pruebas de funcionalidad de los genes heterólogos. Este ensayo permitirá determinar la formación Glu-tRNA^{Glu} *in vivo* (Núñez, 2004).

Pruebas de funcionalidad de los genes *gltX* de *B. subtilis* y *A. ferrooxidans* en la cepa KS463 de *E. coli*. La cepa KS463 posee una mutación que impide su crecimiento, solo crece si es aportado triptófano al medio y con la formación *in vivo* de Glu-tRNA^{Gln} se corregirá la mutación que impide el crecimiento de la cepa KS463. Así la incorporación de genes que complementan la mutación será necesaria para permitir el crecimiento. (Núñez, 2004)

En la siguiente tabla se describen las cepas utilizadas en esta tesis.

Cepa	Genotipo	Fuente ó Referencia
<i>E. coli</i>		
DH5 α	ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrAB</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> (<i>r_K</i> ⁻ , <i>m_K</i> ⁺), <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>deoR</i> , Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169, <i>phoA</i>	Maniatis, T., Fritsch, E. F, Sambrook, J. 1982. Molecular cloning : a laboratory manual.
BL21	BL21(DE3) <i>F</i> ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdS_B</i> (<i>r_B</i> ⁻ , <i>m_B</i> ⁻), <i>dcm</i> , <i>gal</i> , λ (DE3)	Maniatis, T., Fritsch, E. F, Sambrook, J. 1982. Molecular Cloning : A laboratory manual.
JP1449	Hfr(PO12), <i>thr-1</i> , <i>leuB6</i> (Am), <i>lacZ4</i> , <i>glnV44</i> (AS), LAM ⁻ , <i>gltX351</i> (ts)	Lapointe J., Delcuve G. 1975. Thermosensitive mutants of Escherichia coli K-12 altered in

		the catalytic Subunit and in a <i>Regulatory factor of the glutamy-transfer ribonucleic acid synthetase. J. Bac. 122(2): 352–358.</i>
KS463	F, LAM, trpA33, IN(rrnDrrnE)1, rha7	Fehlner-gardiner C., Roshick C., Carlson J., Hughes S., Belland R., Caldwell H, and Mcclarty G. 2002. Molecular basis defining human <i>chlamydia trachomatis</i> tissue tropism a possible role for <i>tryptophan synthase. The journal of biological chemistry</i> 277 (30) 26893–26903.
<i>Sacharomyces cerevisiae</i>		
L40	<i>MATa his320, trp1-901, leu2-3112,</i>	Laboratorio Dra. Ivana

	<i>ade2</i> <i>LYS2::(4lexAop-HIS3)</i> <i>URA3::</i> Weygand-Durasevic <i>(8lexAop-lacZ)GAL4</i>	
--	--	--

Tabla 1. Cepas

Medios de cultivo.

Medio de cultivo Luria-Bertani (LB): Este medio contenía triptona 1%, NaCl 1% y extracto de levadura 0,5%. Para obtener medio sólido se agregó 1,5% de agar. El medio se esterilizó en autoclave a 121° C por 20 min. Cuando fue necesario se agregó 100 µg/ml ampicilina antes del uso.

Medio de cultivo YEPD: 0,5% extracto de levadura, 1% bactopectona 2% glucosa.

Medio SD mínimo: 0,67% de bases nitrogenadas sin aminoácidos, 2% glucosa. En placas se agregó agar M9 al 3%. Al suplementar con aminoácidos se agregaron a 0,003% p/v por cada uno.

Condiciones de cultivo

Los cultivos de las cepas de *E. coli* se incubaron a 37° C con agitación constante 150 RPM en caldo Luria Bertani (LB). En los casos que se requirió, se adicionó ampicilina (100mg/ml). La cepa L40 se creció en medio YEPD o SD suplementado con aminoácidos a 30°C a 350 RPM por 2 días.

Plásmidos y construcciones génicas.

Los plásmidos comerciales y las construcciones generadas en este trabajo se resumen en la **Tabla 2**.

Plásmido	Genotipo	Origen
pGEX-2T	Vector de expresión de proteínas bacterianas	Pharmacia Biotech
pGEX-2T- GluRS1	Vector pGEX-2T y gen GluRS1 de <i>A. ferrooxidans</i>	Disponible en el laboratorio
pGEX-2T- GluRS2	Vector pGEX-2T y gen GluRS2 de <i>A. ferrooxidans</i>	Disponible en el laboratorio
pGEX-2T- GluRS1* R351Q	Vector pGEX-2T y gen GluRS1*mutante R351Q de <i>A. ferrooxidans</i>	Esta tesis
pGEX-2T- GltX	Vector pGEX-2T y gen GluRS de <i>E. coli</i>	Disponible en el laboratorio
pAB151	Vector de clonamiento doble híbrido	Ivana Weygand-Durasevic
pACT2	Vector de clonamiento doble híbrido	Clontech

pAB151- SerRSs	Vector pAB151 y gen SerRS de <i>S. cerevisiae</i>	Ivana Weygand- Durasevic
pACT2- Pex21p	Vector pACT2 y gen Pex21p de <i>S. cerevisiae</i>	Ivana Weygand- Durasevic
pAB151- GluQRS	Vector pAB151 y gen GluQRS de <i>A. ferrooxidans</i>	Esta tesis
pACT2- GluQRS	Vector pACT2 y gen GluQRS de <i>A. ferrooxidans</i>	Esta tesis
pACT2- GluTR	Vector pACT2 y gen GluTR de <i>A. ferrooxidans</i>	Esta tesis
pUC18	Vector de clonamiento	Life technologies
puc18-tRNA Gln3* U-C	Vector pUC18 y gen tRNA Gln3 mutante de <i>A. ferrooxidans</i> cambio U32-C	Esta tesis
puc18-tRNA Gln3* bc-bl	Vector pUC18 y gen tRNA Gln3 mutante de <i>A. ferrooxidans</i> cambio brazo D corto- largo	Esta tesis
pkk223-	Vector pkk223-3 y gen tRNA Gln3 WT de <i>A.</i>	Disponible en el

tRNAGln3	<i>ferrooxidans</i>	laboratorio
WT		
pkk223-	Vector pkk223-3 y gen tRNA Gln2 WT de <i>A.</i>	Disponible en el
tRNAGln2	<i>ferrooxidans</i>	laboratorio
WT		

Tabla 2. Plásmidos y construcciones génicas.

Preparación de células electrocompetentes y transformación de *E. coli* mediante electroporación.

Se preparó un preinóculo de la cepa receptora que fue incubado por 12 a 16 hr a 37° C en medio LB con agitación. Al día siguiente se inoculó 500 ml de medio de cultivo LB al 1% con las células del preinóculo y se incubó a 37° C con agitación hasta que el cultivo alcanzó una D.O.₆₀₀ de 0,8. Luego se centrifugó a 1500xg por 15 min a 4° C. Se eliminó el sobrenadante y las células se lavaron dos veces con 30 ml de glicerol 10% estéril y frío. Las células se resuspendieron en 2 ml de glicerol 10% se alicuotaron y guardaron a -80° C para su uso posterior.

Para realizar la transformación se mezclaron 20 µl de células electrocompetentes con 1 µl de muestra de DNA (~10 ng/µl). La mezcla se depositó entre los electrodos de la cubeta de electroporación que luego se colocó en la cámara de electroporación previamente enfriada. Se aplicó un pulso de 400 Volt y se transfirió la muestra en

forma estéril a un tubo que contenía 1 ml de medio SOC. Se incubó una hr a 37° C y luego de este período de recuperación, se plaquearon 50 a 200 µl de células en agar LB con ampicilina. Luego se incubó toda la noche a 37° C.

Las electroporaciones se realizaron en un equipo Cell-porator (Gibco BRL Life Technologies, INC).

Generación de la mutante R351Q de la GluRS1 de *A. ferrooxidans*.

Hay 3 reacciones de PCR para obtener el producto final con la mutación. Según el esquema, los productos de las reacciones PCR1 y PCR2 se mezclan para ser templados para la reacción PCR3. Se necesitan 4 oligonucleótidos (A, B, C, D). A y D flanquean al gen en el extremo 5' y 3'. (Los oligonucleótidos A y D se han diseñado con sitios de restricción para la facilidad en el clonamiento en el vector de expresión pGEX-2T). B y C se han diseñado para incorporar el cambio de interés (R351Q).

El gen *gltx1* es de 1500 pb de longitud, y quería añadir un par de en la base N° 1050. A continuación, se mezclan los dos productos en el mismo tubo y sirven de molde para la última reacción, PCR 3, donde se obtiene el producto final de 1500pb con la mutación incorporada.

Se diseñaron partidores específicos A: AF-351Q-1, B: AF351Q-2, 5': AFGI-F y 3':AFGI-TR, sus secuencias se adjuntan en la lista de partidores usados en esta tesis (**Tabla 3**).

El modelo experimental se muestra en el siguiente esquema .

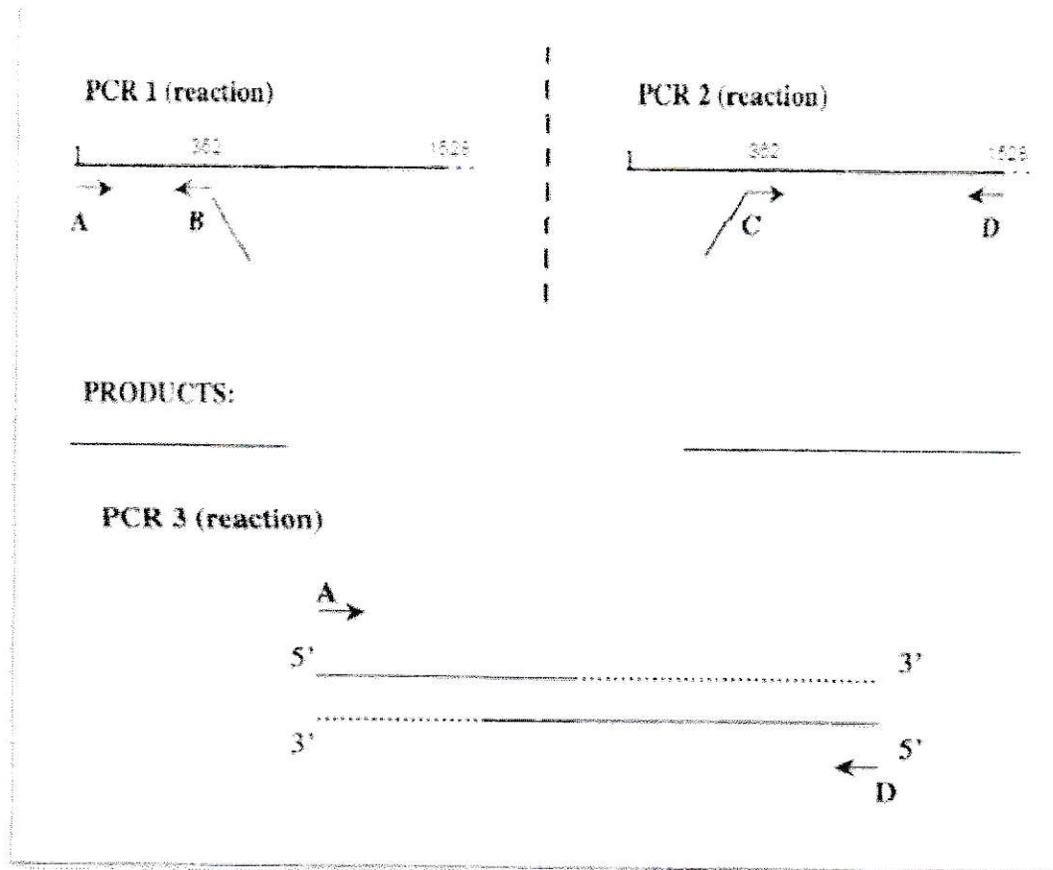


Figura 3. Modelo experimental de mutagénesis sitio dirigida por PCR.

Oligonucleótidos	secuencia
tRNA-gln3*dir U-C	5`agctttaatacgaactcactatagggggcgtagccaagcggttaaggcaccggacttt gattccggattcccagggttcgatccctggcgcccagccatgcatg3`

tRNA-gln3*dir bc-bl	5`agctttaatacgaactcactatagggggcgtagtctagcggtaggacaccggattttg attccggcattcccagggttcgatccctggcgccccagccatgcatg3`
tRNA-gln3*inv U-C	5`aattcatgcatggctggggcgccagggatcgaacctgggaatgccggaatcaaagt ccggtgccttaccgcttggctacgccccctatagtgagtcgtattaa3`
tRNA-gln3*inv bc-bl	5`aattcatgcatggctggggcgccagggatcgaacctgggaatgccggaatcaaaa tccggtgtccctaccgctagactacgccctatagtgagtcgtattaa3`
AFGI-F	5`gaattctgccttccgtcaaacgatgttcg3`
AFGI-TR	5`gaattcctagatccaggcggccgccc3`
AFR351Q-1	5`tgcaggaacaatccaagacc3`
AFR351Q-2	5`ggtcttgattgttctctgc3`

Tabla 3. Lista de oligonucleótidos.

Clonamiento del tRNA^{Gln3(bc-bl)} y el tRNA^{Gln3(u32-c32)} en pUC18.

Para el clonamiento en pUC18 se debe preparar el inserto de DNA, para lo cual se adquirieron los oligonucleótidos del tRNA-gln3 (bc-bl) y del tRNA-gln3 (u32-c32) (Tabla 3), los que contienen respectivamente la secuencia del gen mutado y las secuencias de los sitios de restricción para las enzimas *EcoRI* y *HindIII*. Los oligonucleótidos fueron fosforilados por separado utilizando la PNK del fago T4 según las recomendaciones del proveedor. Los oligonucleótidos complementarios fueron hibridados en una mezcla que contenía 5 mM de cada uno y buffer 1X para la T4 DNA

ligasa. La muestra fue hervida por 5 min en presencia de aceite mineral y luego se dejó enfriar lentamente.

El plasmidio pUC18 se purificó a partir de *E. coli* DH5 α /pUC18 utilizando el Plasmid Mini Kit de Qiagen según las instrucciones del fabricante. Luego fue digerido utilizando en forma simultánea las enzimas *EcoRI* y *HindIII* en buffer de reacción 2 según las instrucciones del fabricante. El plasmidio digerido se separó electroforéticamente en un gel de agarosa al 1%, se cortó la banda que contenía el fragmento de interés (~2800 pb) y se extrajo el DNA del gel utilizando el QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) según las recomendaciones del fabricante. El plasmidio digerido purificado fue desfosforilado en una mezcla de 55 μ L que contenía 0,36 U/ μ L de CIAP. La mezcla se incubó por 30 min a 37 $^{\circ}$ C y luego se inactivó la enzima a 65 $^{\circ}$ C por 30 min. Luego se realizó una extracción fenólica con fenol básico:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y una segunda extracción con cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). El DNA desfosforilado fue precipitado por 2 hr a -20 $^{\circ}$ C utilizando dos volúmenes de etanol y un décimo de volumen de acetato de sodio 3 M pH 5,2.

El plasmidio digerido y desfosforilado se ligó a los óligos fosforilados durante 12 a 16 hr a 16 $^{\circ}$ C en una mezcla que contenía 30 ng del vector, 180 ng del inserto, 1U de T4 DNA ligasa y buffer de ligación en un volumen final de 20 μ L. Para finalizar la reacción, se precipitó el DNA por dos hr a -20 $^{\circ}$ C en dos volúmenes de etanol, un décimo de volumen de acetato de sodio 3 M pH 5,2. El DNA ligado se recuperó por

centrifugación a 4°C (15 min a 14000 rpm) y se lavó con etanol 70%. Luego se secó la pella y se resuspendió en 4 µL de agua bidestilada estéril. Finalmente, se transformó células competentes de *E. coli* BL21 con el plasmidio.

Sobreexpresión de un tRNA de *A. ferrooxidans* en *E. coli* y purificación de tRNA total de *E. coli* enriquecido en un tRNA de *A. ferrooxidans*.

Se preparó en medio de cultivo LB con ampicilina un preinóculo de *E. coli* BL21 transformada con el plásmido que contiene el tRNA de interés. Este cultivo se usó para inocular al 5% 1 litro de LB con ampicilina que fueron incubados con agitación a 37°C. Cuando el cultivo alcanzó una D.O.₆₀₀ de 0,4-0,5 unidades de absorbancia se agregó IPTG a una concentración final de 0,5 mM para inducir la expresión del tRNA. Se siguió incubando el cultivo durante toda la noche en las mismas condiciones. Terminado este período se colectaron las células por centrifugación a 4000xg por 15 min. La pella se resuspendió en 12,5 ml de tampón A (20 mM Tris·Cl pH 7,4; 20 mM MgCl₂; 10 mM 2-mercaptoetanol) y se le agregó un volumen igual de fenol saturado ácido pH 4. Esta mezcla se incubó 20 min con agitación a temperatura ambiente. Luego se separó la fase acuosa de la orgánica mediante una centrifugación a 4000xg por 10 min. La fase acuosa se guardó en hielo mientras que se le realizó una segunda extracción a la fase fenólica con 12,5 ml de tampón A. Luego se juntaron ambas fases acuosas y se les realizó una re-extracción con un volumen de fenol ácido. El DNA se precipitó agregando 2-propanol (20% de concentración final) y centrifugando a 4000xg por 15 min. Luego se

ajustó la concentración del sobrenadante a 60% de 2-propanol y se centrifugó a 4000xg por 30 min para recuperar el tRNA. El precipitado fue resuspendido en 5 ml de 200 mM Tris-Acetato pH 8,5 para deacilar el tRNA. La mezcla se incubó durante 1 hr a 37° C y luego se precipitó el tRNA con 0,1 volúmenes de acetato de sodio 3 M pH 4,5 y 2 volúmenes de etanol 100%. Esta mezcla se dejó precipitando a -20° C por toda la noche y luego se recuperó el RNA por centrifugación a 12000xg por 30 min. El RNA se lavó con etanol 70% y luego se resuspendió en 5 ml de agua estéril.

Para purificar el tRNA se utilizó una resina de intercambio aniónico DE52 (Whatman) preparada según las recomendaciones del proveedor. La muestra se cargó en la columna (1ml) previamente equilibrada con 10 volúmenes de tampón I y se lavó con 2 volúmenes del mismo tampón. Luego se lavó con 5 volúmenes de tampón II (20 mM Tris-HCl pH 7,0; 200 mM NaCl) y finalmente se eluyó el tRNA con tampón III (20 mM Tris-HCl pH 7,0; 1 M NaCl) colectando fracciones de 0,5 ml. Se midió la absorbancia a 260 nm de cada fracción y se seleccionaron aquellas que contuvieran una alta concentración de tRNA. A estas fracciones se les agregó 2 volúmenes de etanol 100% y un décimo de volumen de acetato de sodio 3 M pH 4,5. Se dejó precipitando a -20° C por toda la noche y después se centrifugó a 12000xg por 30 min. El RNA precipitado se lavó tres veces con etanol 70% y luego se disolvió en agua bidestilada estéril. La concentración del tRNA se determinó espectrofotométricamente a 260 nm (una unidad de absorbancia a 260 nm corresponde a 40 µg/ml de tRNA).

Purificación de GST-GluRS1 y GST-GluRS2.

Para purificar GST-GluRS1 se cultivó a 25° C durante toda la noche un preinóculo de *E. coli* BL21-DE3 transformada con el plasmidio recombinante pGEX-2T-GluRS1. Al día siguiente se inocularon al 5% 1Lt de medio LB con ampicilina. Se incubó con agitación a 25° C hasta una D.O.₆₀₀ de aproximadamente 0,8. Se adicionó IPTG a una concentración final de 1mM y se continuó incubando en las mismas condiciones. Después de tres horas, se colectaron las células por centrifugación a 4000xg por 10 min a 4° C. Las proteínas se guardaron a -20° C.

Las células se resuspendieron en 150 ml de solución de lisis (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 2 mM EDTA; 20 mM 2-mercaptoetanol; 0,1% Tritón X-100 y 150 mM NaCl) por cada L de medio de cultivo. Luego se agregaron los inhibidores de proteasas (2 mM PMSF; 0,1% aprotinina; 2 µg/ml pepstatina A; 2 µg/ml leupeptina) y la lisozima (100 µg/ml). La mezcla se incubó 30 a 45 min en hielo. Luego se sonicó 7 veces con pulsos de 10seg a 50watt alternando cada pulso con un minuto de incubación en hielo. La muestra se centrifugó a 15000xg por 15 min a 4° C y se filtró para separar posibles restos celulares. Se cargó la muestra en una columna de glutatión agarosa previamente equilibrada con solución de lisis. Se lavó con 10 volúmenes de la misma solución y se equilibró con 5 volúmenes de una solución 50 mM Tris-Cl pH 8,0; 150 mM NaCl para luego eluir con 20 mM glutatión reducido en 50 mM Tris-Cl pH 8,0; 150 mM NaCl. Se colectaron fracciones de 0,5 mL que fueron analizadas por SDS-PAGE en un gel al 10%.

Las fracciones con mayor cantidad de proteína de fusión fueron colectadas y dializadas contra la solución de almacenamiento (20 mM HEPES-KOH pH 7,2; 10 mM MgCl₂; 50 mM KCl; 1 mM DTT y 50% glicerol). La proteína fue cuantificada utilizando el método de Bradford y luego se la almacenó a -20° C.

La sobreexpresión de la proteína de fusión GST•GluRS2 produce cuerpos de inclusión, por lo que se tuvo que incluir ciertas modificaciones al protocolo utilizado para purificar la GST-GluRS1. Se cultivó un preinóculo de *E. coli* BL21-DE3 transformada con el plasmidio recombinante pGX-2T-GluRS2. Este, se inoculó al 5% 2 Lts de medio LB con ampicilina que se incubó a 25° C. Cuando el cultivo alcanzó una D.O.₆₀₀ de 0,4 a 0,5 se le agregó IPTG para una concentración final de 0,4 mM. El cultivo con IPTG se incubó toda la noche a 15° C. Después de esto, se siguió un protocolo similar al utilizado para purificar GST-GluRS1.

Reacción de aminoacilación con GluRS1 y GluRS2.

La mezcla para las reacciones de aminoacilación contenía 100 mM de HEPES KOH pH 7,2; 30 mM de KCl; 12 mM de MgCl₂; 5 mM de ATP; 2 mM de DTT; 75 μM de glutamato y 25 μM de ¹⁴C-glutamato. Las cantidades de enzima y tRNA variaron según el experimento. Se mezclaron todas las sales, el ATP, el DTT, el glutamato, el ¹⁴C-glutamato y la enzima. Esta mezcla se incubó a 37° C por tiempos variables: Tiempo 0 sin tRNA, 20, 40 y 60 minutos agregando el tRNA. Se extrajeron alícuotas de 20 μL a

distintos tiempos. Estas alícuotas fueron depositadas en papeles filtro de 1,5 X 1,5 cm. saturados en glutamato 0,75 mM. Los papeles se lavaron dos veces en TCA 5% a 4° C por 30 min y luego una vez en etanol técnico por 5 min. Se secaron a 80° C y se cuantificó el C¹⁴-Glu-tRNA en un contador de centelleo Delta 300 (Searle Analytic Inc.) en tres ml de solución de centelleo.

tRNA (Total E. coli, Gln3 wt, Gln3* u-c, Gln3*bc-bl) (ug)	GluRS1 nM	GluRS2 nM
0,2	50	200

Tabla 4. Cantidades de enzima y tRNA usadas para los experimentos de aminoacilación de tRNA.

Construcción de proteínas de fusión para realizar experimentos de doble híbrido en levaduras

La primera aproximación fue clonar el gen completo de GluQRS en el vector denominado pAB151, pAB151-GluQRS, que codifica para la proteína de fusión LexA-GluQRS que actúa como “anzuelo” y la “presa” se mantiene en el vector pACT de expresión en levaduras (Clontech) para la fusión con el dominio de activación Gal4 (**Figura 10**). El fragmento de PCR que corresponde al gen completo de *gluQRS* de *A. ferrooxidans* fue clonado en el vector comercial pGEMT-easy. Posteriormente mediante

el uso de enzimas de restricción *gluQRS* fue subclonado en pAB151 en los sitios de multiconamiento NcoI-BamHI en marco de lectura con el gen de la proteína LexA.

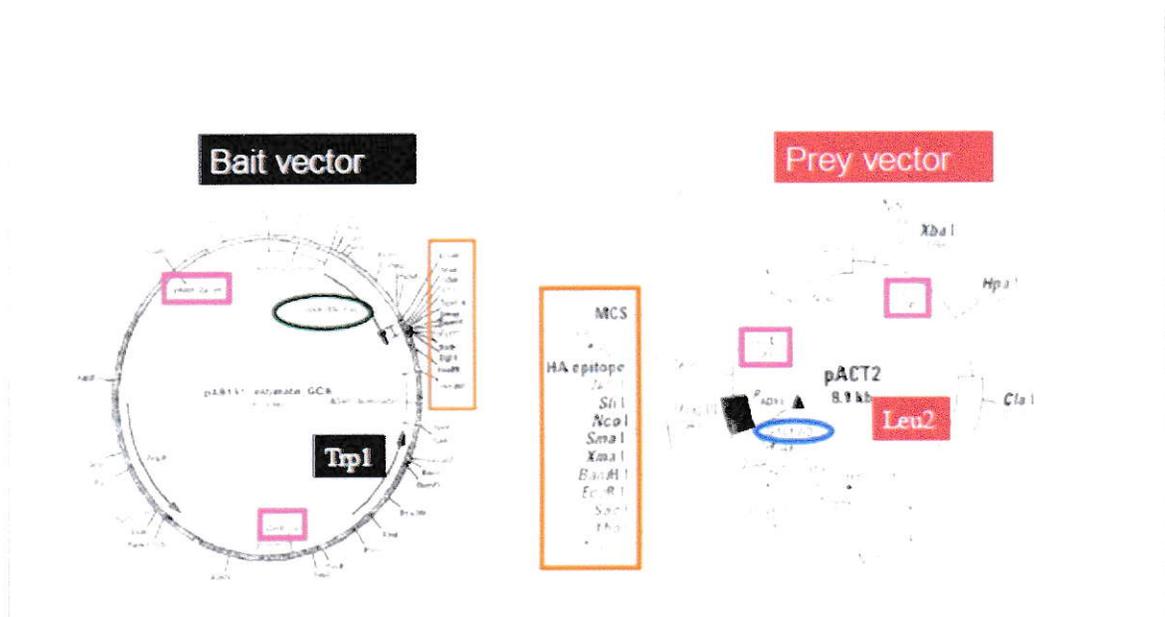
Western Blot.

Los Western Blot, así como otros experimentos de biología molecular se realizaron utilizando metodologías establecidas para ello (Ausubel., 1999). El anticuerpo usado fue anti-LexA (Invitrogen TM).

Sistema de doble híbrido en levaduras

El sistema del doble híbrido permite *in vivo* identificar una interacción proteína-proteína, mediante la reconstitución de un activador transcripcional. El método, se basa en las propiedades de la proteína GAL4 de *S. cerevisiae*, y consiste en la separación del dominio responsable de la unión al ADN y de la actividad transcripcional, los que funcionan de manera independiente y pueden por lo tanto ser separados. Este sistema consiste en el rastreo con un anzuelo de una genoteca codificante. Dos tipos de vectores se construyen y cada uno codifica para proteínas híbridas. La genoteca se construye fusionando los genes codificantes con el gen que contiene el dominio activador de GAL4. El vector usado como cebo contiene el gen que codifica para el dominio GAL4 de unión al ADN fusionado al gen de la proteína X. La cepa de levadura es cotransformada con los vectores. La interacción entre proteínas conduce a la reconstitución de una proteína GAL4 funcional y por tanto a la activación

de la transcripción del gen reportero que contiene un sitio de unión a GAL4. La identificación de las proteínas que interaccionan se realiza por mediciones de actividad B-galactosidasa (B-gal) y posterior secuenciación del clon de la genoteca que resulto positivo para la actividad B-gal (<http://www.clontech.com/>).



Esquema 1: Vectores usados como anzuelo (pAB151) y la presa (pACT2). Se destaca el ori de replicación 2μ y ColE1 (para levaduras y *E. coli*), las proteínas LexA y Gal4 y el sitio de policonamiento (MCS).

RESULTADOS

Objetivo 1

1.-Para identificar los residuos y/o segmentos aminoacídicos en la GluRS1 y GluRS2 que determinan una interacción funcional específica por su tRNA sustrato. Se realizó una aproximación bioinformática que consistió básicamente en la construcción de los modelos estructurales de la GluRS1-tRNAGlu Brazo D largo y la GluRS2-tRNAGln brazo D corto.

Generación y análisis de los modelos estructurales de los complejos GluRS-tRNA de *A. ferrooxidans*

Se alinearon secuencias de GluRSs de distintos organismos bacterianos con el fin de realizar una comparación de dominios. Para construir los modelos por homología estructural, se compararon las secuencias aminoacídicas de las GluRS 1 y 2 de *A. ferrooxidans* y las secuencias de las GluRSs de *Thermus thermophilus* y *Thermus elongatus* (enzimas que se encuentran cristalizadas, códigos pdb: 1G59 y 2CFO respectivamente) (**Figura 4**). La similitud e identidad entre las GluRS1 y la GluRS de *T. thermophilus* resulto ser de 49% y 39% respectivamente. Para la GluRS2 en comparación a la GluRS de *T. thermophilus* resulto ser de 45% de similitud y 36% de identidad. Estos porcentajes están por sobre el mínimo exigido para realizar un modelamiento por homología, por lo tanto, se predijeron las estructuras de ambas GluRSs usando como molde estructural la GluRS de *T. thermophilus*.

Se identificó una arginina (R351) en la GluRS1 en una posición equivalente a la R358 de *T. thermophilus*. Cabe destacar que las GluRSs de carácter no discriminante en bacterias, poseen una Glutamina en esta posición. Con estos antecedentes, se construyó un modelo estructural de la mutante de la GluRS1 (R351Q) con el tRNA Glu de brazo D largo. El residuo Q al ser más corto que la R, implica que la distancia entre la C36 y el residuo R debería ser mayor. **(Figura 5)**. Para identificar si este residuo es importante en la interacción específica GluRS-tRNA, y si la mutación provoca un desplazamiento estructural en la proteína, se superpusieron los carbonos alfa de ambas estructuras y se compararon.

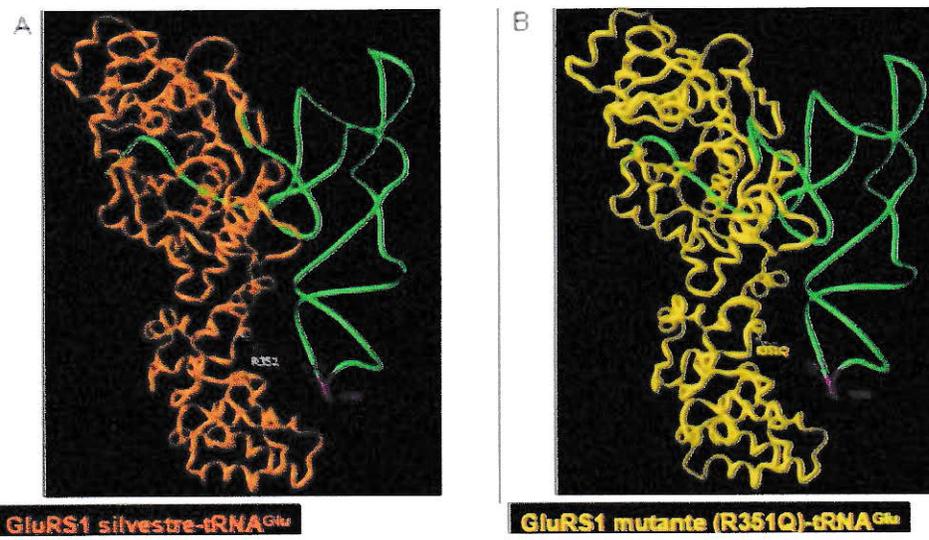


Figura 5. Modelos estructurales de la GluRS1 silvestre R351 (A, izquierda, color naranja) y GluRS1 mutante R351Q (B, derecha, color amarillo) ambas acomplejadas con el tRNA^{Glu} brazo D aumentado (color verde). Residuo en color gris corresponde a la arginina R351 y en amarillo la Q351. Se destaca en morado el nucleótido C36 del anti codón CUC en el tRNA^{Glu}. (Salas, 2005)

Para cuantificar este desplazamiento, se consideraron las coordenadas x, y, z de cada carbono α de ambas enzimas y se obtuvo el RMSD (Root Mean Square Deviation). Los valores de RMSD se calcularon por sobre posición de las estructuras provenientes de dinámica molecular (Salas, 2005). El RMSD global fue de 0,9A^o y no se observan cambios importantes a nivel de los dominios 1,2 y 3. Sin embargo, el rearrreglo estructural relevante ocurre en los dominios 4 y 5 que son los de interacción con el anti codón. El mayor cambio es en el dominio 4 el que supera los 7A^o, a nivel local corresponde a la G337. (Salas, 2005). **(Figura 6)**

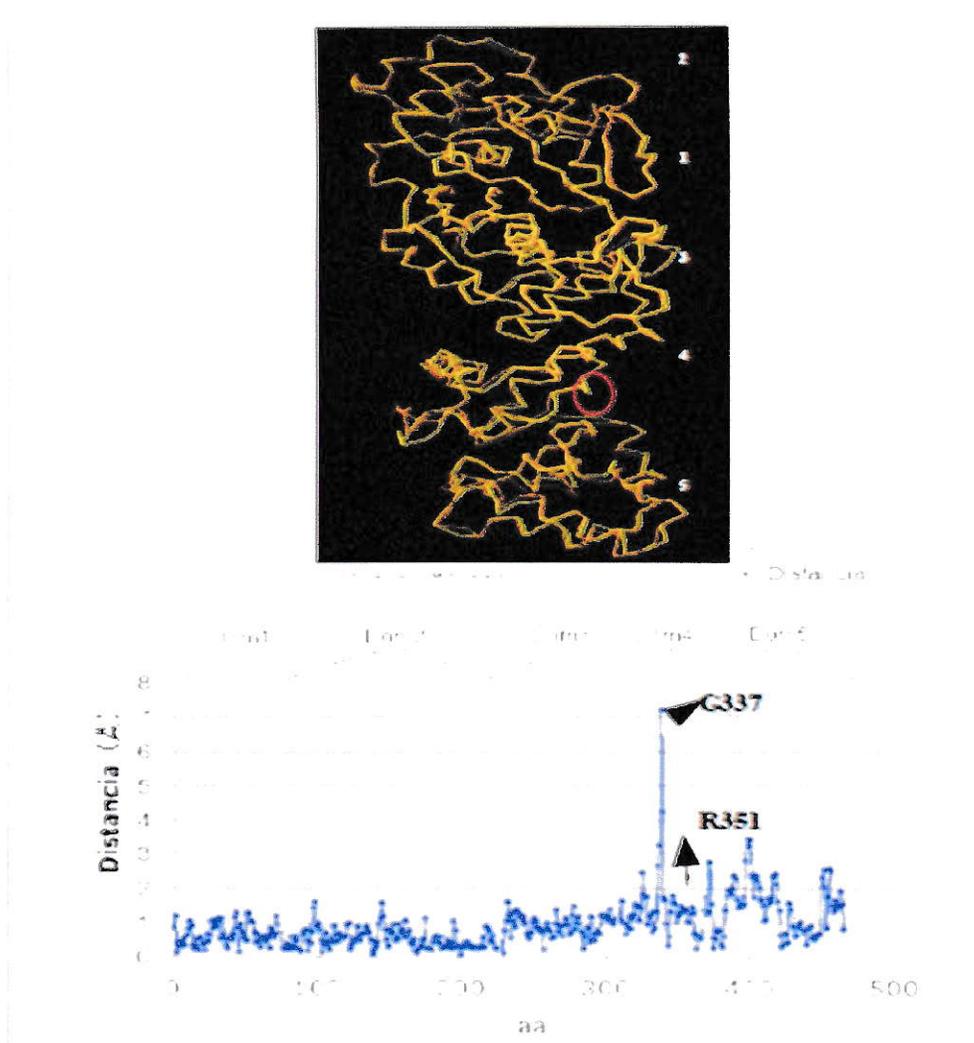


Figura 6. Sobre posición de los carbonos α de la GluRS1 en color naranja y la GluRS1-R351Q en amarillo. Los dominios se indican del 1 al 5. En el círculo rojo se muestra la ubicación de la R351. En el gráfico de distancia \AA v/s aa muestra el RMSD de los carbonos α de la GluRS1 y la mutante R, se destaca la ubicación de R351 y la glicina 337 (G337). (Salas, 20005)

Para identificar las diferencias y similitudes entre la GluRS1 y la GluRS2, se construyeron los modelos estructurales de la GluRS2 con los tRNA^{Glu} (Brazo D largo) y

tRNA^{Gln} (Brazo D corto). En la posición equivalente a la R351 de la GluRS1, en la GluRS2 se encuentra la N459 frente a la citosina 36. Cabe destacar que una región de 9 aminoácidos (treonina 331-glutamico 340) zona del carboxilo terminal en la GluRS1 está ausente en la GluRS2, por esta razón se observa un estiramiento en el modelo estructural. (Figura 7).

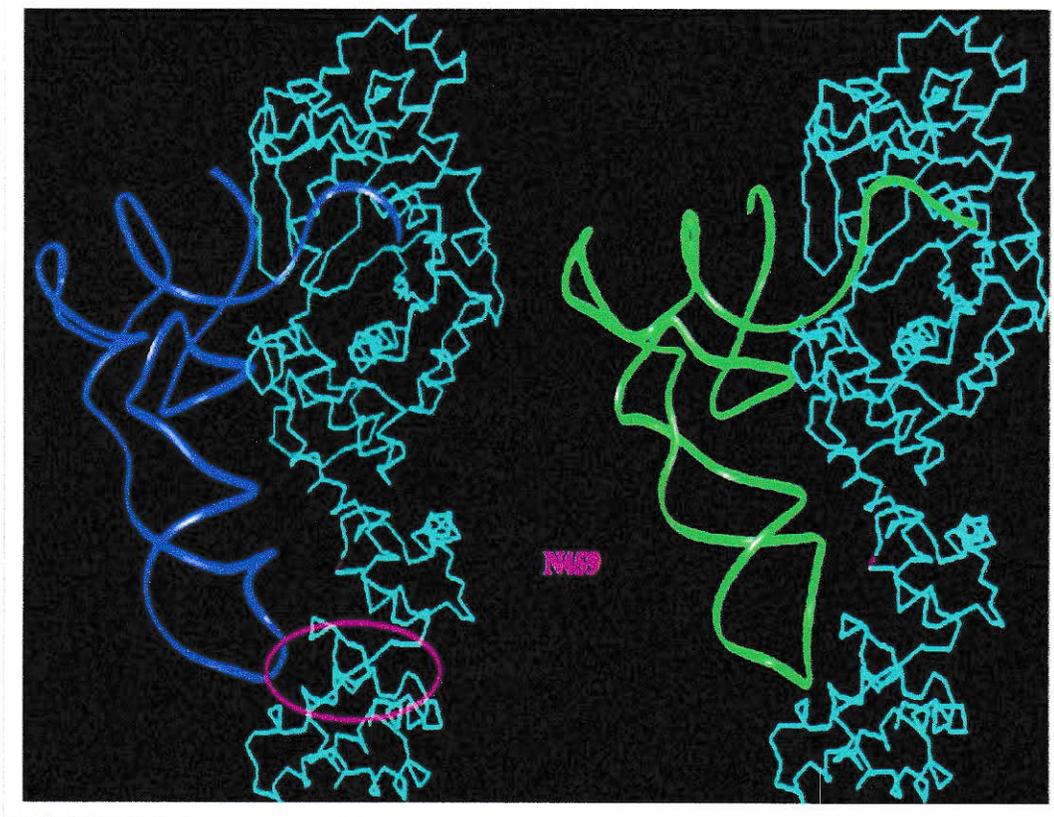


Figura 7. Modelo estructural de la GluRS2 con los tRNAs Glu brazo D aumentado (derecha) y Gln brazo D corto (izquierda) Residuo de color morado corresponde a la asparragina N459 (ubicación equivalente a la R351 de GluRS1). La zona de 9 aa que se encuentra ausente en la GluRS2 se destaca en círculo morado.

Transformación de la GluRS1 en GluRS2.

De acuerdo a los resultados obtenidos en las predicciones bioinformáticas la GluRS1 mutante que se construyó mediante mutagénesis sitio dirigida fue la R351Q. En la **Figura 8** se observan los fragmentos obtenidos del PCR para generar la mutación R351Q. El fragmento de 1500pb corresponde al producto final de amplificación con extremos como que fue clonado en el vector de expresión de proteínas de fusión a GST, pGEX-2t según la metodología descrita en esta tesis y en otras tesis del laboratorio.

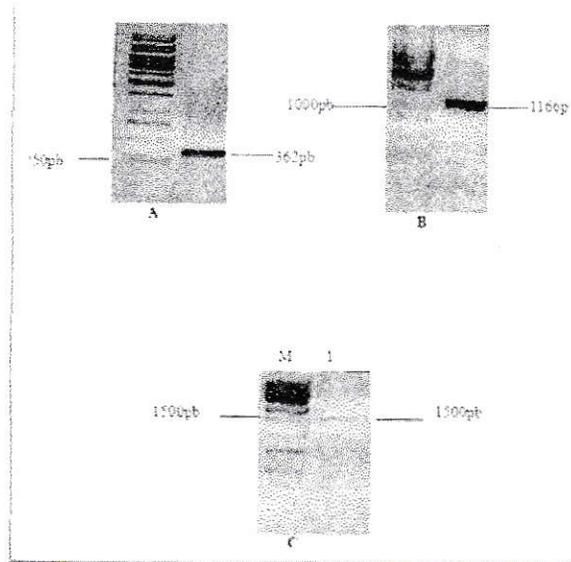


Figura 8. Electroforesis en geles de agarosa de los fragmentos obtenidos por mutagénesis sitio dirigida por PCR, generados para formar el inserto de 1500pb que lleva la mutación para la GluRS1 mutación R351Q. M: marcador de peso molecular, 1: carril con los fragmentos de PCR. En **A**, primer producto de PCR obtenido con los partidores AF351Q-1 y AFG1-TR de 362pb; **B**, segundo producto obtenido de PCR con los partidores AF351Q-2 y AFG1-F de 1166pb; **C** producto final del PCR de 1500pb.

Formación de Glu-tRNA^{Glu} *in vivo* en la cepa de *E. coli* JP1449.

Mediante el uso de la *E. coli* JP1449 se puede evaluar la formación de Glu-tRNA^{Glu}. La JP1449 posee el gen *gltx* con una mutación que es termosensible, a 42°C expresa una GluRS inactiva (a 30°C es capaz de sobrevivir). Al complementar esta cepa con un plasmidio que codifique para una GluRS activa, es capaz de formar Glu-tRNA^{Glu} y la cepa sobrevivirá a 42°C. Los resultados de la complementación se observan en la **Figura 9**. A 30°C crecieron todas las GluRSs, de *E. coli* y las de *A. ferrooxidans*. A 42°C solo crecieron las complementaciones con la GluRS de *E. coli* y la GluRS 1 de *A. ferrooxidans*. Estos resultados sugieren que la mutante R351Q se comportó como una GluRS2 incapaz de complementar la mutación termosensible.

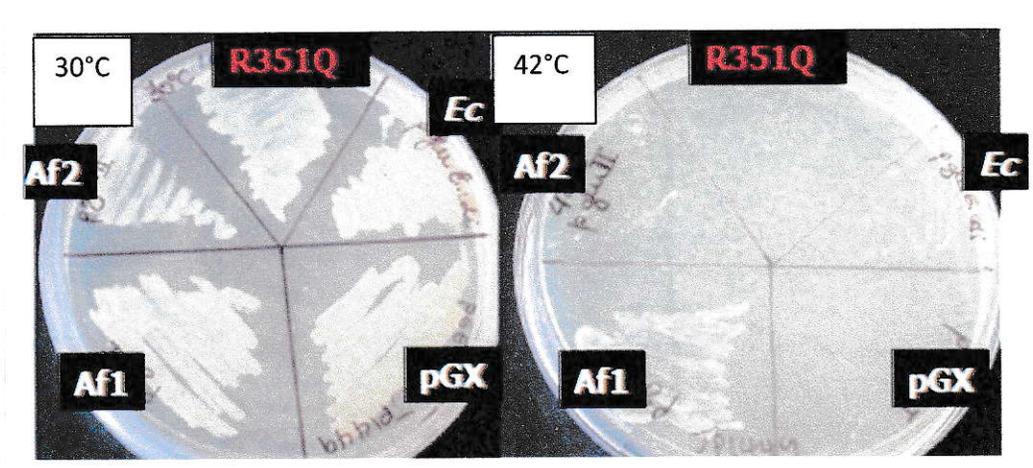


Figura 9. Formación de Glu-tRNA^{Glu} *in vivo* en *Escherichia coli* JP1449. Rescate de una mutación termosensible en el gen *gltx* de *E. coli* por GluRSs heterólogas. R351Q (GluRS1 mutante cambio R351Q), Af1y Af2 corresponden a GluRS1 y GluRS2 silvestres. Ec y pGX corresponden a la GluRS de *E. coli* y al plasmidio control pGEX-2T.

Formación de Glu-tRNA^{Gln} *in vivo* en *E. coli* KS463

Mediante el uso de la cepa de *E. coli* KS463 se puede evaluar la formación *in vivo* de Glu-tRNA^{Gln}. Esta cepa posee una mutación en el gen que codifica para la triptófano sintetasa que inactiva a la enzima y la bacteria no crece si no se suplementa triptófano al medio. La modificación consiste en el cambio del codón de glutamato por el de glutamina en la posición 49 de la subunidad α de la enzima (TrpA). Al complementar esta cepa con un plasmidio que contenga un gen codificante para una GluRS activa capaz de formar Glu-tRNA^{Gln}, la cepa sobrevivirá sin triptófano. Este ensayo fue realizado mediante la co transformación de la cepa KS463 con el plasmidio portador de la mutante del gen *trpA* (*trpA* -49-CAA) y con el plasmidio que contiene las GluRSs a probar. Los resultados de la complementación se observan en la **Figura 10**. En medio carente en triptófano crecieron la cepa de *E. coli* transformada con la GluRS de *E. coli*, con la GluRS2 y con la mutante de la GluRS1-R351Q de *A. ferrooxidans*. A diferencia de la transformada con la GluRS1 que no creció en estas condiciones. La mutante R351Q se comporto como una GluRS2 capaz de complementar la mutación mediante la formación de Glu-tRNA^{Gln} *in vivo*.

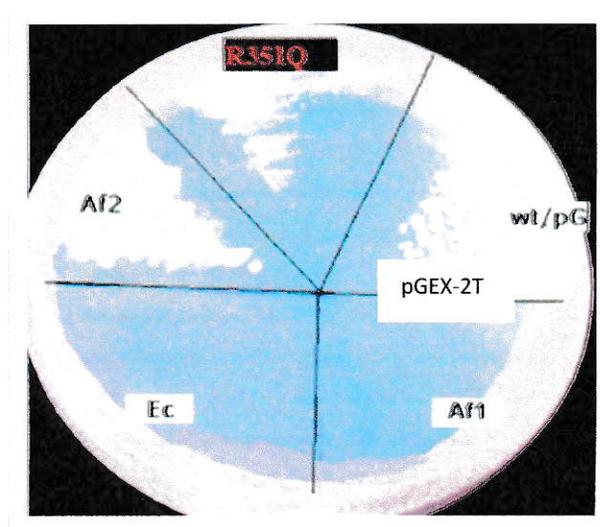


Figura 10. Formación de Glu-tRNA^{Gln} *in vivo* en *Escherichia coli* KS463. Rescate de una mutación en la posición 49 de la subunidad α de la enzima (TrpA) por GluRSs heterólogas. R351Q (GluRS1 mutante cambio R351Q), Af1y Af2 corresponden a GluRS1 y GluRS2 silvestres. Ec y pGX corresponden a la GluRS de *E. coli* y al plasmidio control pGEX-2T.

Objetivo 2

2.-Para identificar los nucleótidos en los tRNAs que determinan la interacción específica con las GluRS1 y el tRNA^{Gln}. Se diseñaron variantes del tRNA^{Gln}.

tRNAs en *A. ferrooxidans*.

En el genoma de *A. ferrooxidans* existen genes que codifican para cuatro potenciales tRNA^{Glu} y tRNA^{Gln}. Un análisis genómico comparativo en bacterias y arqueas revela que esta organización es única. Siete de los tRNAs poseen un brazo D largo (cuatro tRNA^{Glu} y tres tRNA^{Gln}) y el denominado tRNA^{Gln3} que posee un brazo D corto.

Variantes de los tRNAs.

Para identificar los determinantes de identidad en los tRNA^{Gln} que interaccionan con las GluRS, se construyeron variantes de tRNA^{Gln3}, sustrato único de la GluRS2. El tRNA^{Gln3} de brazo D corto, lo transformé en uno de brazo largo. Además, se construyó una mutante (C-U) en el loop del anticodón en que la C 32 está presente sólo en el tRNA^{Gln3} silvestre y por lo tanto podría ser un determinante de identidad en la interacción con la GluRS2. Con experimentos de aminoacilación *in vitro* se evaluó la capacidad de la GluRS1 y GluRS2 de aminoacilar estos tRNAs, y se estimó la importancia del largo del brazo D y de los nucleótidos que lo componen en la especificidad de la interacción (**Figura 11**).

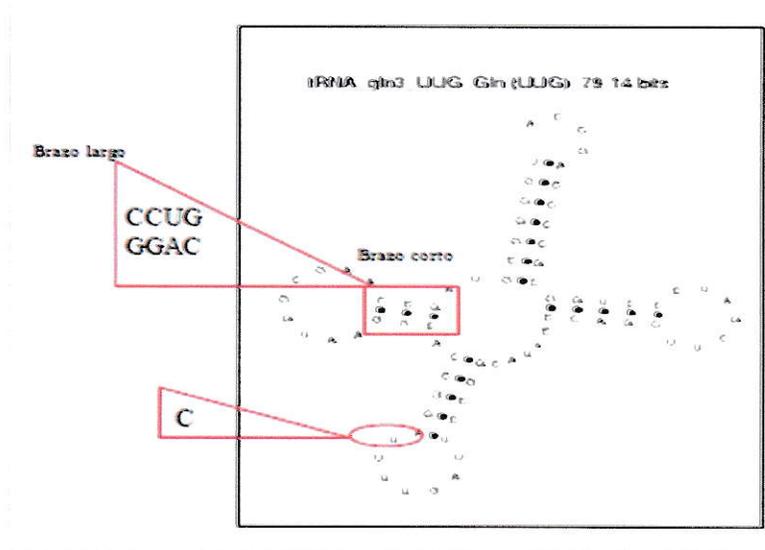


Figura 11. Esquema del tRNA^{Gln} en el que se destacan en rojo los nucleótidos del brazo D y del loop del anticodón que fueron mutados.

Especificidad de la GluRS1 y la GluRS2 de *A. ferrooxidans*.

En el laboratorio se encuentra montado el sistema de purificación de la GluRS1 recombinante fusionada a GST. Así mismo, se tiene montado un sistema para purificar tRNA de *E. coli* enriquecido con los tRNA de *A. ferrooxidans*. También se encuentra montado el sistema para medir el progreso de la reacción de aminoacilación mediante la incorporación del aminoácido radioactivo al tRNA en cinéticas cortas.

Se purificaron la GST-GluRS1 y la GST-GluRS2 a partir *E. coli* BL21-DE3 transformada con los plasmidios pAFgtX1 y pAFgtX2 respectivamente (Salazar, 2003). Los genes del tRNA^{Gln3} y sus variantes fueron clonados en el vector pUC18 (Salazar, 2003). Los plasmidios que contienen los genes de los tRNA se transformaron en *E. coli* BL21 y se indujo la expresión. De esta manera se obtuvo preparaciones de tRNA total que se encuentran enriquecidas en cada tRNA. Estas preparaciones de tRNA se utilizaron en los experimentos de aminoacilación. Debido a que la GluRS2 aminoacila preferentemente a los tRNA de brazo D corto, se uso el tRNA^{Gln3} como control positivo de las reacciones de aminoacilación de esta enzima. Para la GluRS1 se uso como sustrato otro tRNA denominado Gln2 que tiene brazo D largo. Para determinar experimentalmente si los tRNAs variantes de Gln3 dejan de ser sustratos de la GluRS2, se realizaron experimentos de aminoacilación *in vitro* con éstos. De este modo, se realizaron experimentos con el tRNA^{Gln2} (brazo D largo), el tRNA^{Gln3} (brazo D corto), el

tRNA^{Gln3 bc-bl} (brazo D largo) y el tRNA^{Gln3 u-c} (U32-C32). Los resultados se muestran en la

Figura 12.

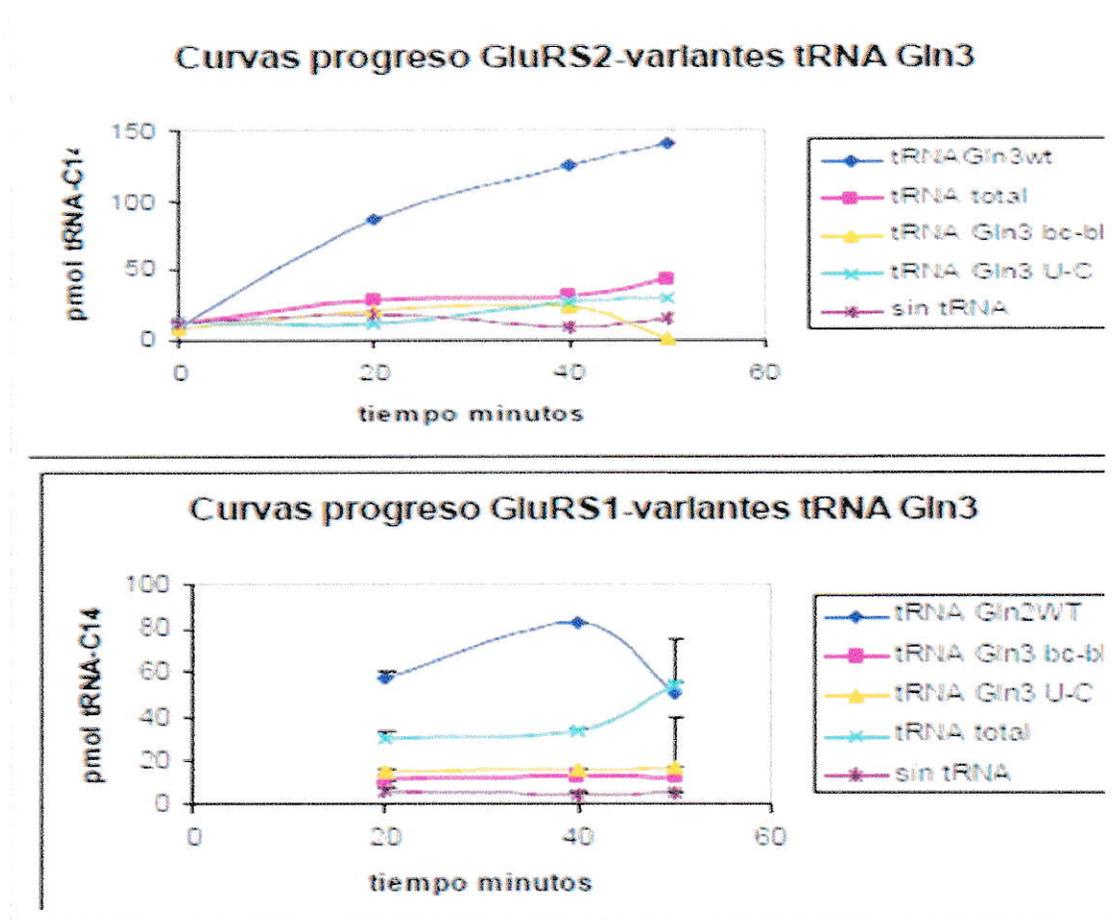


Figura 12. Cinéticas de aminoacilación de los tRNA^{Gln3} y sus variantes por las GluRS1 y GluRS2. Reacción de aminoacilación con ¹⁴C-glutamato catalizada por las enzimas GST-GluRS1 o GST-GluRS2. La desviación estándar en barra corresponde al promedio de dos experimentos independientes.

Los estudios de aminoacilación muestran que el tRNA^{Gln}₃ es sustrato de la enzima GluRS2 en tanto que las variantes tRNA^{Gln3 bc-bl} y tRNA^{Gln3 u-c} dejarían de ser sustratos de la GluRS2. Estos resultados reafirman que tRNA^{Gln} de brazo D largo no son sustrato de la GluRS2 ya que esta enzima aminoacila el tRNA^{Gln}₃ de brazo D corto (Salazar, 2003). Además, el U en la posición 32 pareciera ser un determinante de identidad ya que al ser mutado por C, provoca que el tRNA^{Gln} deje de ser sustrato de la GluRS2. Cabe destacar, que estos resultados no descartan la posibilidad de que los tRNAs variantes en Gln3 sean inactivos o que los cambios en su secuencia hayan afectado alguna modificación posterior que los imposibilite de ser reconocidos como sustrato de la enzimas en *E. coli*.

Objetivo 3

3.-Estudiar la interacción entre GluRSs y proteínas que involucran el Glu-tRNA como: la Glutamil-tRNA reductasa y la GluQRS de *A. ferrooxidans*.

La fidelidad del proceso de aminoacilación del tRNA sustrato es un prerrequisito para la apropiada traducción del código genético. En general las Aminoacil-tRNA sintetasas (AARSs) no requieren de cofactores proteicos para el reconocimiento en la especificidad del sustrato, sin embargo, dominios específicos de las enzimas son los encargados de reconocer y discriminar entre los que son sustratos de los que no lo son. En eucariontes, las AARSs participan en la formación de complejos con otras sintetasas y con enzimas no sintetasas. Los dominios de interacción de esas enzimas y la topología

de los complejos ha sido estudiado por análisis del sistema de doble híbrido en levaduras. Mediante el uso de esta técnica el grupo liderado por la Dra. Ivana Weygand-Đurašević identificó a la peroxina Pex21p que interacciona específicamente con la seril-tRNA sintetasa de levadura (Rocak, 2003).

Las enzimas que involucran el Glu-tRNA son la Glutamil-tRNA sintetasa (GluRS), Glutamil-tRNA reductasa (GluTR) y la Glutamil Queosine sintetasa (GluQRS). GluQRS es un parálogo de las GluRS, el gen *gluqrs* codifica para una GluRS trunca en sus dominios de interacción con los tRNA. GluQRS es capaz de transferir Glutamato a la queousine 34 del tRNA^{Asp} (Salazar, 2005). Para dilucidar si existe interacción entre proteínas que involucran un mismo sustrato la técnica de doble híbrido resulta muy útil. Una manera de conocer en que ruta metabólica participa GluQRS es evaluando qué proteínas de *A. ferrooxidans* interactúan con ella.

Para abordar esta interrogante, primeramente se realizó un alineamiento entre distintas GluRSs (**Figura 13**) y GluQRS de *E. coli* (única GluQRS estudiada funcionalmente) y la GluQRS de *A. ferrooxidans*. Del resultado de estos alineamientos se destaca que la GluQRS de *A. ferrooxidans* comparte un 42% de identidad y 54% de similitud con la GluQRS de *E. coli* y las demás GluRSs.

```

GluRS1_A.ferroo   DRYREVLAQMLAAGTAYHCYCSREEVEAMREDQRQGEKFRYDGRCRERTTVP-----E 165
Glu2_A.ferroo    -----EIYAYACYCSADDLAAERAVQRSAGKAPRYGGRCRHLDAARAEREA 131
yadB_A.ferro.    AIYQEALTALQTRGIAYPCACTRREIRGFGE-----RYPGVCRQG-----LAS 126
YadB_E.coli      DAYREALAWLHEQGLSYYCTCTRARIQSIGG-----IYDGHCRV-----LHH 134
                  :* . : : * * .*
GluRS1_A.ferroo   GVAP-VIRFRSPDDGETVVEDLIHGTVRFQNSEMDLI IARSDGTPTYNFCVVDDWDMG 224
Glu2_A.ferroo    GLLP-TLRFVDPDQGTLTVPDLVWGERHYALADLGFVIRSDGSPAFFANAVDDALME 190
GluRS_T.therm    RGEFHVIRLKVPRPGTTEVKDELRGVVVDNQEIPDVVLLKSDGYPTYHLANVDDHLMG 199
yadB_A.ferro.    GRRARSWRLWVPETLPLWEDRFHG--WQDT PAPQGDPI LLRADGYFAYILACVDDGEQG 184
YadB_E.coli      GPDNAAVRIRQQHPVTQFTDQLRGI IHADEKLAREDFI IHRDGLFAYNLAVVDDHFQG 194
                  *: * :: : ** :: : .***
GluRS1_A.ferroo   ITHVIRGDDHLNNTPRQMQLQALGARVPVYAHVPMILGPKQKLSKRHGAVSVLEYREQ 284
Glu2_A.ferroo    VNLVLRGEDHLTNTPRQILILQALGLPVPAYGHLPLLLGADGQPLSKRYGAASLRDLRKD 250
yadB_A.ferro.    ISEVIRGGDLRALTGTQRYLQSVLELPYPQYGHLP LLCNADGRKLSKSLGPTWA-GEPS 243
YadB_E.coli      VTEIVRGADLIEPTVRQISLYQLFGWKVPDYIHLPLALNPQGAKLSKQNHAPALPKGDPR 254
                  :. :*: : * : : : * :*:: . : :** :

```

Figura 13. Alineamientos de GluRSs. Secuencias parciales de las GluRS1 y 2 de *A. ferrooxidans* (*GluRSx_A.ferroo*) las GluRS de *E. coli* y *T. thermophilus* (*Gltx_E.coli* y *GluRST.Therm*) y las GluQRS de *A. ferrooxidans* y *E. coli* (*YadB_A.ferro* y *YadB_E.coli*). (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>).

Para verificar la expresión de la proteína de fusión LexA-GluQRS (60 Kda) se realizó un Western Blott usando el anticuerpo anti LexA (**Figura 14**). El vector pAB151-GluQRS se uso como anzuelo. Como presa se quería usar una genoteca de DNA genómico en el vector de expresión pACT2. Después de varios intentos para clonar el DNA genómico en el vector pACT2, se decidió hacer el ensayo de interacción entre proteínas involucran el GlutRNA: la GluTR y GluQRS. Para lo cual, el gen completo de la GluTR fue clonado en el vector pACT2. A partir del vector pET15B- GluTR, disponible en el laboratorio, la GluTR de *A. ferrooxidans* fue subclonada en pACT2 en los sitios de clonamiento Sfil-Xhol.

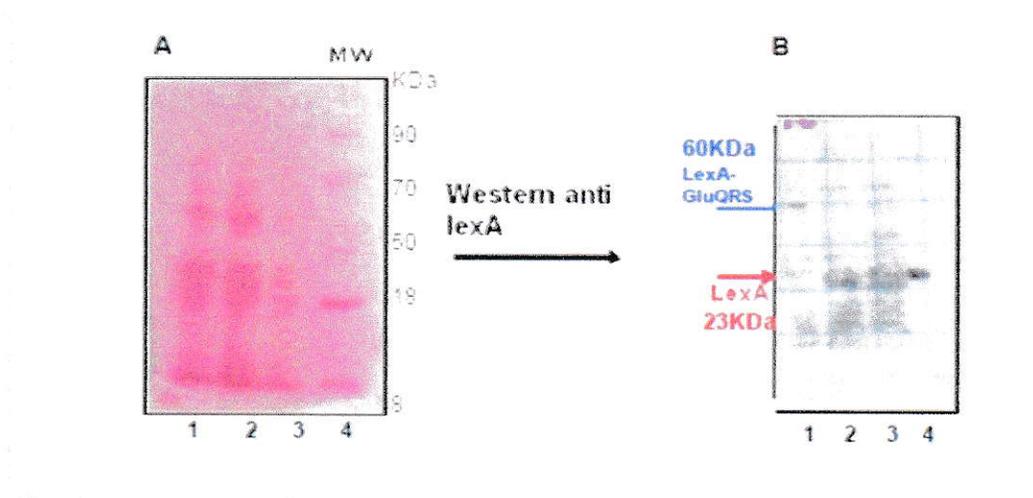


Figura 14. Expresión de la proteína de fusión LexA- GluQRS en levadura L40. En el panel A se observa la membrana de nitrocelulosa y las proteínas teñidas con Rojo Ponceau. En B se observa el resultado del Western-Biot de las proteínas en los carriles 1 ,2 ,3 y 4 que corresponden a proteínas totales de L40 transformadas con: pAB151, pAB151-GluQRS, pAB151-SerRS y el marcador de peso molecular (MW). LexA de 23 Kda y LexA-GluQRS de 60KDa.

La cepa reportera usada fue la *S. cerevisiae* L40, la cual es preparada para una doble transformación con los vectores pAB151-GluQRS y pACT2-GluTR. Para la identificación de la interacción entre proteínas se evaluó la actividad de la B-galactosidasa de la cepa reportera. Para testear que la doble transformación del plasmidio pAB151-GluQRS y pACT2 no produce expresión de B-galactosidasa y que no recupera la autotrofia para el aminoácido histidina, se seleccionan las colonias de L40 en medio selectivo SD sin trp, leu e his. En la **Figura 15** se observa que el control positivo L40 transformada con pAB151-SerRS y pACT2-pex21 crece en medio SD-trp-leu-his y además hay producción de B-galactosidasa (colonias azules).

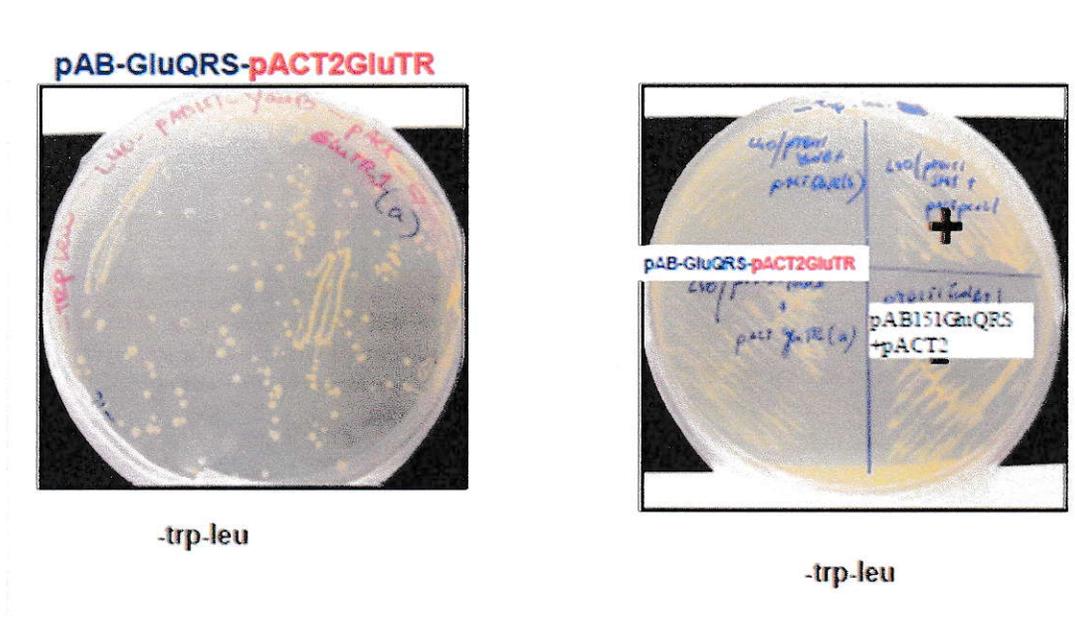


Figura 15. Selección de colonias de L40 doblemente transformadas en medio SD-trp-leu. La transformación de L40 fue con: pAB151-SerRS y pACT2-pex21 control positivo, pAB151-GluQRS y pACT2 y pAB151-GluQRS y pACT2-GluTR.

El ensayo de doble híbrido para GluQRS y GluTR, se realizó mediante la doble transformación de los plasmidios: pAB151-GluQRS y pACT2-GluTR y se seleccionaron las colonias en medio SD sin trp, leu, his. Además se reporto la expresión de la proteína B-galactosidasa. En la **Figura 16** se observa el resultado de este ensayo, GluQRS no interactúa con GluTR. También se realizó el ensayo de interacción entre GluQRS y GluQRS (plasmidios pAB151-GluQRS y pACT2-GluQRS) cuyo resultado fue que GluQRS sería un monómero ya que no interactúa consigo misma (resultados no mostrados). Así mismo la GluQRS de *E. coli* también es un monómero (Blaise, 2004).

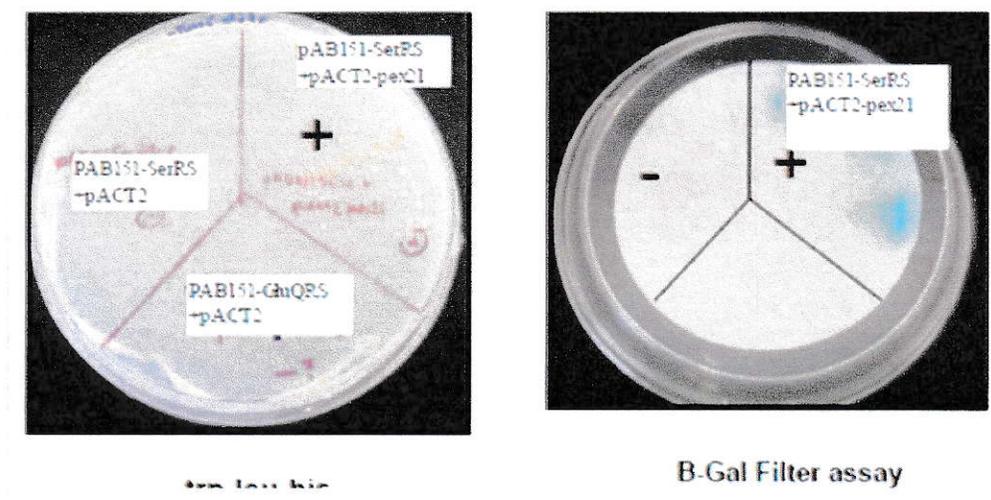
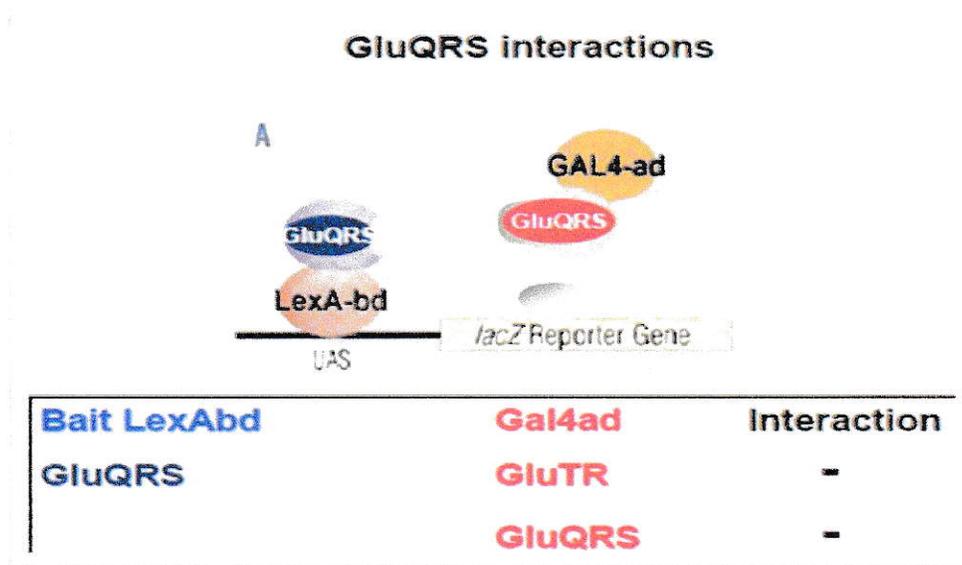


Figura 16. Selección de colonias de L40 en medio SD-trp-leu-his y producción de B-galactosidasa (colonias azules). La transformación de L40 fue con: pAB151-SerRS y pACT2-pex21 control positivo, pAB151-SerRS y pACT2 control negativo y pAB151-GluQRS y pACT2.

En la **Figura 17** se resumen los resultados obtenidos de interacción con GluQRS mediante el experimento de Doble híbrido en levaduras.



DISCUSION

Especificidad de la GluRS1 y la GluRS2 de *A. ferrooxidans*.

La función de las aminoacil tRNA sintetasas consiste en catalizar la unión de su tRNA específico con el aminoácido correspondiente, por lo tanto deben discriminar y distinguir entre los diferentes tRNAs. Existen dos tipos de GluRS: las discriminantes (D) son aquellas enzimas que forman específicamente Glu-tRNA^{Glu} y las No Discriminantes (ND) reconocen ambos tRNA^{Glu} y tRNA^{Gln} y sintetizan Glu-tRNA^{Gln}, un intermediario requerido en la síntesis de proteínas para la formación de Gln-tRNA^{Gln} en organismos carentes de GlnRS. *A. ferrooxidans* posee un complejo sistema de aminoacilación de los tRNA^{Glu} y tRNA^{Gln}. Existen 2 genes para *gltx* que codifican para GluRS1 y GluRS2 y además un gen que codifica para un paralogo trunco GluQRS. Posee 4 tRNA^{Glu} y 4tRNA^{Gln}, cuatro de los cuales se encuentran en una isla genómica recientemente descrita en el genoma de *A. ferrooxidans* (Levicán, 2009). Esta diversidad es poco común en las bacterias. Las GluRSs de *A. ferrooxidans* tienen especificidades distintas. La GluRS2 aminoacila eficientemente sólo al tRNA^{Gln}₃, de brazo D corto, a diferencia de la GluRS1 que carga los tRNA^{Glu} y tRNA^{Gln} ambos de brazo D largo. La Tth-GluRS es del tipo discriminante que reconoce la base pirimidina de la C36 a través de R358, a diferencia de la Tel-GluRS ND, esta R es reemplazada por glicina (Gly366) que permite aceptar a ambas citosinas y a la base purica G36 del tRNA^{Gln} (Schulze, 2006). Al comparar los modelos estructurales generados de la GluRS1 y GluRS2 (**Figuras 5 y 7**)

revelaron diferencias y similitudes, dentro de las cuales cabe destacar un residuo de arginina en la posición 351 en la GluRS1 mientras que en la GluRS2 se encontró una asparragina (N) en la posición 459, además se detecto un segmento de 12 aminoácidos ausente en la GluRS2 en la zona de interacción con el tRNA. La R351 se encontraría en posición equivalente a la arginina R358 de la GluRS de Tth que interacciona con la C36 del anti codón del tRNA^{Glu}. En las GluRSs del genero Bacillus se encuentra una glutamina Q en esta posición equivalente, en base a esta antecedente, la mutante R358Q de Tth-GluRS *in vitro* cargo el tRNA^{Glu} de *E. coli* que tiene el anti codón para glutamina (CUG). *B. subtilis* posee una ND-GluRS que *in vitro* aminoacila al tRNA^{Glu} y el tRNA^{Gln}_{UUG} de *E. coli*. La mutante de la GluRS de *B. subtilis* Q373R *in vivo* en *E. coli* así como la AF-GluRS1 forman Glu-tRNA^{Glu} (Núñez, 2004), por lo tanto un cambio único en esta GluRS fue capaz de cambiar la especificidad de la enzima. En esta tesis se evaluó *in vivo* en *E. coli* la formación de Glu-tRNA^{Glu} y Glu-tRNA^{Gln} de AF-GluRS1 R351Q, esta mutante pierde las propiedades de la GluRS1 (formación de Glu-tRNA^{Glu}). La mutante R351Q se comporto como una GluRS2 y adquiere las propiedades de la GluRS2 capaz de complementar la mutación mediante la formación de Glu-tRNA^{Gln} *in vivo*, (**Figuras 9 y 10**) lo que sugiere que una mutación única en las GluRSs puede cambiar la especificidad por el tRNA sustrato.

Análisis cristalográficos de la estructura de la ND-GluRS de *Methanothermobacter thermautotrophicus* (Mth) Nureki, 2010) revelan que la estructura global de las ND-

GluRS es altamente similar a la de la GlnRS de *E. coli*, aunque la ND-GluRS está desprovista de dos módulos estructurales que podrían participar en la discriminación entre el tRNA^{Glu} y tRNA^{Gln}. La superposición del complejo *E. coli* GlnRS-tRNA^{Gln} con la estructura de la ND-GluRS de MTh revela que los aminoácidos (arginina) que reconocen las primeras dos bases del anti codón son conservados. La gran diferencia está a nivel de la zona de reconocimiento de la base 36, los anticodones de tRNA^{Glu} (34YUC36) y tRNA^{Gln} (34YUG36) difieren en la base 36. En las GlnRS una arginina, glicina y lisina (N, K, Q) específicamente reconocen la G36. En las ND-GluRS, esta triada de aminoácidos está ausente lo que permitiría a la GluRS1 reconocer ambos tRNA^{Glu} y tRNA^{Gln} (Figura 4).

Elementos de identidad de los tRNA.

Las ND-GluRS reconocen ambos tRNA^{Glu} y tRNA^{Gln}, mientras las D-GluRS y GlnRS son altamente específicas, en esta tesis me intereso estudiar la especificidad de la AF-GluRS2. Los estudios de aminoacilación muestran que el tRNA^{Gln}₃ es sustrato de la enzima GluRS2 en tanto que el tRNA^{Glu}₁, el tRNA^{Gln}₂ y el tRNA^{Glu}₄ son sustrato de la GluRS1 (Salazar, 2003), la GluRS1 aminoacila los tRNA de brazo D largo y la GluRS2 aminoacila el tRNA^{Gln}₃ de brazo D corto [Salazar, 2003]. Los resultados muestran que el tRNA^{Glu}₄ se comporta como los tRNA de brazo D largo y que por lo tanto ambos tRNA^{Glu}_{UUC} son sustratos preferentes de la GluRS1. Aún así, estos resultados no

descartan la posibilidad de que el sistema de dos GluRS y múltiples tRNA responda a las condiciones de cultivo.

Debido a que la GluRS2 aminoacila preferentemente a los tRNA de brazo D corto, se uso el tRNA^{Gln3} como control positivo de las reacciones de aminoacilación de esta enzima. Para la GluRS1 se uso como sustrato un tRNA^{Gln} denominado Gln2 que tiene brazo D largo. Para determinar experimentalmente si los tRNAs variantes de Gln3 dejan de ser sustratos de la GluRS2, se realizaron experimentos de aminoacilación *in vitro* con éstos. De este modo, se realizaron experimentos con el tRNA^{Gln}₂ (brazo D largo), el tRNA^{Gln}₃ (brazo D corto), el tRNA^{Gln3 bc-bl} (brazo D largo) y el tRNA^{Gln3 u-c} (U32-C32). **(Figura 12)**. Los ensayos de aminoacilación muestran que el tRNA^{Gln}₃ es sustrato de la enzima GluRS2 en tanto que las variantes tRNA^{Gln3 bc-bl} y tRNA^{Gln3 u-c} dejarían de ser sustratos de la GluRS2. Estos resultados reafirman que tRNAGln de brazo D largo no son sustratos de la GluRS2 ya que esta enzima aminoacila el tRNA^{Gln}₃ de brazo D corto (Salazar, 2003). Además, el U en la posición 32 pareciera ser un determinante de identidad ya que al ser mutado por C, provoca que el tRNA^{Gln} deje de ser sustrato de la GluRS2. Cabe destacar, que estos resultados no descartan la posibilidad de que los tRNAs variantes en Gln3 sean inactivos o que los cambios en su secuencia hayan afectado alguna modificación posterior que los imposibilite de ser reconocidos como sustrato de la enzimas en *E. coli*.

En *A. ferrooxidans* la clasificación de las AF-GluRSs no cae dentro de los grupos discriminantes o no discriminantes ya que esta clasificación no incluye la especificidad por el largo del brazo D del tRNA sustrato. Resultados preliminares de esta tesis junto a otros estudios del laboratorio sugiere al largo del brazo D como determinante en la especificidad del tRNA sustrato, este factor podría ser considerado en una reclasificación de este tipo de enzimas.

Duplicación de GluRS.

Se ha postulado que la duplicación de las GluRS está relacionada con la necesidad de un sistema específico para la síntesis de Glu-tRNA^{Glu} y otro sistema específico para la síntesis de Gln-tRNA^{Gln}. Este es el caso de organismos como *Helicobacter pylori* donde una GluRS aminoacila específicamente a los tRNA^{Glu} y la otra GluRS aminoacila específicamente a los tRNA^{Gln} (Salazar, 2003) (Skouloubris, 2003). Sin embargo, éste es el caso de *A. ferrooxidans*, ya que la GluRS1 aminoacila a todos los tRNA^{Glu} y parte de los tRNA^{Gln} y la GluRS2 aminoacila a uno de los tRNA^{Gln} y en menor grado a algunos tRNA^{Glu} y tRNA^{Gln}. La GluRS2 aminoacila preferentemente a los tRNA de brazo D corto, podría aminoacilar suficientes tRNA para traducir los codones de glutamato y glutamina, lo que apoyaría la idea de la existencia de dos sistemas independientes de aminoacilación de los tRNA^{Glu} y tRNA^{Gln} en *A. ferrooxidans*.

La presencia de 2 GluRS parece estar relacionada más bien con la modulación de la síntesis de hemo que es altamente requerido por *A. ferrooxidans*. Cuando la bacteria se cultiva en un medio con Fe^{+2} posee un contenido de hemo mayor al de un cultivo en un medio con S^0 . En estas mismas condiciones se ha observado un aumento en el mRNA de la GluRS1 (Levicán, 2005). Además, existen datos experimentales que muestran un aumento en los niveles de la GluTR (primera enzima en la vía de síntesis del precursor de hemo ALA) en cultivo con Fe^{+2} (Levicán, 2005). En condiciones de alto requerimiento de hemo se observan altos niveles de expresión de GluRS y GluTR, pero cuando hay un exceso de hemo intracelular las células responden con una disminución de la actividad de GluRS junto a bajos niveles de GluTR. Resultados experimentales sugieren que el rol primordial de las GluRS es en regular el nivel celular de hemo (Levicán, 2007).

Proteínas que involucran el Glu-tRNA: la Glutamil-tRNA reductasa y la GluQRS de *A. ferrooxidans*.

En *A. ferrooxidans* hay varias proteínas que involucran el Glu-tRNA (Glutamil-tRNA sintetasa (GluRS), Glutamil-tRNA reductasa (GluTR)) y la GluQRS. GluQRS es un paralogo de las GluRS, el gen *gluqrs* codifica para una GluRS trunca en sus dominios de interacción con los tRNA. GluQRS es capaz de transferir glutamato a la queousine 34 del tRNA^{Asp} (Salazar, 2005). Debido a los altos requerimientos celulares de hemo en *A. ferrooxidans*, pensamos que aquellas proteínas que forman GluRNA como las GluRSs,

GluTR y GluQRS podrían interactuar optimizando la canalización de sustratos. Para enfrentar este problema la técnica de doble híbrido resulta muy útil. Mediante estos experimentos probamos que la GluTR y la GluQRS no interactúan por lo tanto descarta algún rol de GluQRS en la canalización de sustrato en la síntesis de hemo (**Figuras 15, 16 y 17**).

La GluQRS de *A. ferrooxidans* comparte un 42% de identidad y 54% de similitud con la GluQRS de *E. coli*, mediante el ensayo de doble híbrido mostramos que la AF-GluQRS sería un monómero al igual que la GluQRS de *E.coli*. (**Figura 14**)

CONCLUSIONES

- *A. ferrooxidans* posee un sistema de aminoacilación de los tRNA^{Glu} y tRNA^{Gln} que está compuesto por dos GluRS, una GluQRS y cuatro tRNA^{Gln} y cuatro tRNA^{Glu}.
- La GluRS1 aminoacila específicamente a tRNA^{Glu} y tRNA^{Gln} de brazo D largo y el tRNA^{Gln3 bc-bl} (brazo D largo) y el tRNA^{Gln3 u-c} (U32-C32) los que dejarían de ser sustratos de la GluRS2.
- La GluRS2 aminoacila a tRNA^{Gln} de brazo D corto. Existe una correlación entre el largo del brazo D de los tRNA y la especificidad de las GluRS.
- El nucleótido U32 del loop del anti codón del tRNA^{Gln} sería un determinante de identidad en la discriminación por la GluRS2.
- AF-GluTR y la AF-GluQRS no interactúan por lo tanto se descarta algún rol de GluQRS en la canalización de sustrato en la síntesis de hemo.

REFERENCIAS

- Arnez, J.G., y Moras, D. (1997). Structural and functional considerations of the aminoacylation reaction. *TIBS* 22(6): 211-216.
- Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R., Moore, D. (1999) Short Protocols in Molecular Biology : A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology ISBN: 047132938X 4th edition.
- Becker, H.D., B. Min, C. Jacobi, G., Raczniak, J. Pelaschier, H. Roy, S. Klein, D. Kern, and D. Söll. 2000. The heterotrimeric *Thermus thermophilus* Asp-tRNA^{Asn} amidotransferase can also generate Gln-tRNA^{Gln} *FEBS Lett.* 476, 140-144.
- Blaise, M., Becker, H.D., Keith, G., Cambillau, C., Lapointe, J., Giege, R. y Kern, D. (2004). A minimalist glutamyl-tRNA synthetase dedicated to aminoacylation of the tRNA^{Asp} QUC anticodon. *Nucleic Acids Res.* 32(9):2768-75.
- Brown JR, Doolittle WF. Gene descent, duplication, and horizontal transfer in the evolution of glutamyl- and glutaminyl-tRNA synthetases. *J. Mol. Evol.* 1999; 49: 485–495.
- Curnow AW, Tumbula DL, Pelaschier JT, Min B, Söll D. Glutamyl-tRNA^{Gln} amidotransferase in *Deinococcus radiodurans* may be confined to asparagine biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998;95:12838–12843
- Fehlner-gardiner C., Roshick C., Carlson J., Hughes S., Belland R., Caldwell H, and McClarty G. 2002. Molecular basis defining human *chlamydia trachomatis* tissue tropism a possible role for tryptophan synthase. *The journal of biological chemistry* 277 (30) 26893–26903.
- Forster, Zhongping ‡, Madhavi N. L. Nalam, Hening , Hui Q., Cornish‡, and C. Blacklow- (2003). Programming peptidomimetic syntheses by translating genetic codes designed de novo. *PNAS* 100:6353-57.
- Francklyn, C. 2001. Charging two for the price of one. *Nat Struct Biol*, **8**: 189-91.

- Galani, K., Hurt, E., and Simos, G. 2005. The tRNA aminoacylation co-factor Arc1p is excluded from the nucleus by an Xpo1p-dependent mechanism. *FEBS Lett*, 579: 969-75.
- Ibba, M., Becker, H.D., Stathopoulos, C., Tumbula, D.L. y Söll, D. (2000). The adaptor hypothesis revisited. *TIBS* 25(7):311-316.
 - Ibba M, Söll D. Aminoacyl-tRNA synthesis. *Annu Rev Biochem*. 2000;69: 617–650.
 - Lapointe, J., L. Duplain, and M. Proulx. 1986. A single glutamyl-tRNA synthetase aminoacylates tRNA^{Glu} and tRNA^{Gln} in *Bacillus subtilis* and efficiently misacylates *Escherichia coli* tRNA^{1 Gln} in vitro. *J. Bacteriol.* 165, 88-93.
 - Levicán, G., Katz, A., Valenzuela, P., Söll, D., Orellana, O. (2005). A tRNA^{Glu} that uncouples protein and tetrapyrrole biosynthesis. *FEBS Letters*, 579:
 - Levicán, G., Nuñez, H., de Armas, M. y Orellana, O. (2005). Datos no publicados. Laboratorio de Genética Molecular Bacteriana, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.
 - Levicán, G., Katz, A., de Armas, M., Nuñez, H. y Orellana, O. (2007). Regulation of a glutamyl-tRNA synthetase by the heme status. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 104 (9): 3135-3140.
 - Levicán, G., J. Valdés, A. Katz, R. Quatrini, D. S. Holmes y O. Orellana. (2009). A 300 kb genome segment, including a complete set of tRNA genes, is dispensable for *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Adv. Material Res.* 71-73: 187-190.
 - Lapointe J., Delcuve G. 1975. Thermosensitive mutants of *Escherichia coli* K-12 altered in the catalytic subunit and in a regulatory factor of the glutamyl-transfer ribonucleic acid synthetase. *J. Bac.* 122(2): 352–358.
 - Maniatis, T., Fritsch, E., Sambrook, J. 1982 *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, N.Y. Cold Spring Harbor Laboratory.
 - Moser, J., Schubert, W., Beier, V., Bringemeier, I., Jahn, D. and Heinz DW. (2001). V-shaped structure of glutamyl-tRNA reductase, the first enzyme of tRNA-dependent tetrapyrrole biosynthesis. *EMBO J.* 20: 6583-90.

- Nuñez, H., Lefimil, C., Min, B., Söll, D. y Orellana, O. (2004). In vivo formation of glutamyl-tRNA^{Gln} in *Escherichia coli* by heterologous glutamyl-tRNA synthetases. *FEBS Lett.* 557(1-3):133-5.
- Nureki O, O'Donoghue P, Watanabe N, Ohmori A, Oshikane H, Araiso Y, Sheppard K, Söll D, Ishitani R.(2010). Structure of an archaeal non-discriminating glutamyl-tRNA synthetase: a missing link in the evolution of Gln-tRNA^{Gln} formation. *Nucleic Acids Res.* 38(20):7286-7297.
- Pelchat, M., L. Lacoste, F. Yang, and J. Lapointe. 1998. Overproduction of the *Bacillus subtilis* glutamyl-tRNA synthetase in its host and its toxicity to *Escherichia coli*. *Can. J. Microbiol.* 44,378-381.
- Raczniak, G., Becker, H.D., Min, B. y Söll, D. (2001). A single amidotransferase forms asparaginylyl-tRNA and glutaminylyl-tRNA in *Chlamydia trachomatis*. *J. Biol. Chem.* 276(49):45862-45867.
- Rocak S, Landeka I, and Weygand-Durasevic I. 2002. Identifying Pex21p as a protein that specifically interacts with yeast seryl-tRNA synthetase. *FEMS Microbiol Lett.* 214: 101-6.
- Salas, B., Inostroza, C. y Orellana, O. (2005). Tesis para optar al título de Bioquímico. Universidad de Santiago de Chile.
- Salazar, J.C., Zúñiga, R., Raczniak, G., Becker, H., Söll, D. y Orellana, O., (2001). A dual-specific Glu-tRNA^{Gln} and Asp-tRNA^{Asn} amidotransferase is involved in decoding glutamine and asparagine codons in *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *FEBS Lett.* 500(3):129-131.
- Salazar, J.C., Ahel, I., Orellana, O., Tumbula-Hansen, D., Krieger, R., Daniels, L. y Söll, D. (2003). Coevolution of an aminoacyl-tRNA synthetase with its tRNA substrates. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 100(24):13863-13868.

- Salazar, J.C., Ambrogelly, A., Crain, P.F., McCloskey, J.A. y Söll, D. (2004). A truncated aminoacyl-tRNA synthetase modifies RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(20):7536-7541.
- Sekine, S., Nureki, O., Sakamoto, K., Niimi, T., Tateno, M., Go, M., Kohno, T., Brinsson, A., Lapointe, J. y Yokoyama, S. (1996). Major identity determinants in the "augmented D helix" of tRNA^{Glu} from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 256(4):685-700.
- Sekine, S., Nureki, O., Niimi, T., Tateno M. y Yokoyama, S. (1999). The identity determinants required for the discrimination between tRNA^{Glu} and tRNA^{Asp} by glutamyl-tRNA synthetase from *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* 261(2):354-60.
- Sekine, S.I., Nureki, O., Shimada, A., Vassilyev, D.G. y Yokoyama, Sh. (2001). Structural basis for anticodon recognition by discriminating glutamyl tRNA synthetase. *Nat. Struct. Biol.* 8(3):203-206.
- Siatecka M., Rozek M., Barciszewski J. 1998. Modular evolution of the Glx-tRNA synthetase family. Rooting of the evolutionary tree between the bacteria and archaea/eukarya branches. *Eur. J. Biochem.* 256: 80-87.
- Skouloubris, S., Ribas de Pouplana, L., de Reuse, H. y Hendrickson, T. (2003). A noncognate aminoacyl-tRNA synthetase that may resolve a missing link in protein evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100(20):11297-11302.
- Schulze, J. O., Schubert, W.-D., Moser, J., Jahn, D. & Heinz, D. W. (2006). Evolutionary relationship between initial enzymes of tetrapyrrole biosynthesis. *J. Mol. Biol.* 358, 1212-1220
- Stathopoulos C., Li T., Longman R., Vothknecht U.C., Becker H. D., Ibba M., Söll D. 2000. One polypeptide with two aminoacyl-tRNA synthetase activities. *Science.* 287: 479-82.
- Wilcox M., Nirenberg M. 1968. Transfer RNA as a cofactor coupling amino acid synthesis with that of protein. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 61: 229-236.