

Universidad de Chile
Facultad de Ciencias

**ESTUDIOS FUNCIONALES Y
ESTRUCTURALES DE LA TRIPTOFANIL
tRNA SINTETASA DE *Acidithiobacillus
ferrooxidans*.**

por

Roberto Aquiles Zúñiga Olate

octubre, 2002

Director de tesis: Dr. Omar Orellana Orellana

LISTA DE ABREVIATURAS. . .	1
RESUMEN. . .	3
SUMMARY. . .	5
INTRODUCCIÓN .	7
I. LAS AMINOACIL tRNA SINTETASAS. .	7
1. Las aminoacil tRNA sintetasas y su importancia en la biosíntesis de proteínas. .	7
2. Clasificación de las aminoacil-tRNA sintetasas. .	8
3. Especificidad de las aaRS. .	9
4. Péptidos conectores I y II. .	11
5. La Triptofanil tRNA sintetasa. .	11
II. OBJETIVO DE LA TESIS. .	13
1. Objetivo general. .	13
2. Objetivos específicos. . .	13
MATERIALES Y MÉTODOS .	15
I. MATERIALES. . .	15
1. Bacterias. .	15
2. Vectores. . .	15
3. Reactivos. . .	16
4. Medios de cultivo. .	16
II. MÉTODOS. . .	17
1. PREPARACIÓN y ANÁLISIS DE DNA. .	17
2. TRANSFORMACION DE <i>E. coli</i> . .	18
3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). . .	19
4. Deleción de gen <i>trpS</i> de <i>At. ferrooxidans</i> . .	19
5. Secuenciación del gen <i>trpS</i> . . .	21
6. Sobreexpresión y purificación de la TrpRS de <i>At. ferrooxidans</i> . .	21

7. Ensayos de complementación. . .	22
8. Actividad <i>in vitro</i> de la triptofanil tRNA sintetasa. . .	23
9. Titulación de sitio activo. . .	24
10. Modelaje de la TrpRS de <i>At. ferrooxidans</i> . . .	24
RESULTADOS . .	29
1. Identificación del gen de la TrpRS de <i>At. ferrooxidans</i> . . .	29
2. Estudio de la funcionalidad del PC2 en la TrpRS de <i>At. ferrooxidans</i> . . .	31
2.1. Clonamiento de los genes <i>trpS</i> de <i>At. ferrooxidans</i> y de <i>E. coli</i> . . .	31
2.3. Delección del PC2 de la TrpRS de <i>At. ferrooxidans</i> . . .	32
2.4. Expresión en <i>E. coli</i> y purificación de la TrpRS de <i>At. ferrooxidans</i> . . .	33
2.5. Purificación de las enzimas. . .	33
2.6. Análisis funcional de las TrpRS. . .	35
3. Modelaje de la TrpRSd65 de <i>At. ferrooxidans</i> . . .	40
3.1. Alineamiento de secuencias y asignación de coordenadas atómicas. . .	41
3.2. Optimización de la geometría del modelo para la TrpRSd65. . .	41
3.3. Evaluación del modelo TrpRSd65. . .	41
4. Identificación de secuencias similares a los PC2 de la TrpRS. . .	46
4.1. Secuencias homólogas al PC2 de la TrpRS de <i>At. ferrooxidans</i> . . .	46
4.2. Similitud de los PC2 de las TrpRS de arqueas. . .	48
DISCUSIÓN .	49
Identificación de la TrpRS de <i>At. ferrooxidans</i> . . .	49
El modelaje de la TrpRS de <i>At. ferrooxidans</i> . . .	50
Posible estructura del PC2. . .	50
Función del PC2 de la TrpRS de <i>At. ferrooxidans</i> . . .	51
El PC2 de la TrpRS participa en la unión al tRNA ^{trp} . . .	52
Origen del PC2 en la TrpRS. . .	53
CONCLUSIONES . .	55
BIBLIOGRAFIA . .	57

LISTA DE ABREVIATURAS.

aaRS : aminoacil tRNA sintetasa

aa-tRNA : aminoacil tRNA

amp : ampicilina

ATP : Adenosina 5' trifosfato

BSA : Albúmina sérica de bovino

cpm : cuentas por minutos

D.O. : densidad óptica

EDTA : etilén diaminotetracético

GST : Glutación-S-Transferasa

h : hora

IPTG : Isopropil-b-D-tiogalactopiranosido

kb : kilobase

pb : pares de bases

PCR : Reacción en cadena de la polimerasa

pmol : picomol

PMSF : Fenilmetilsulfonilfluorido

SDS : dodecil sulfato de sodio

TCA : ácido tricloroacético

Tris : Tris (hidroximetil) aminometano

tRNA : RNA de transferencia

Trp : triptofano

RESUMEN.

Las aminoacil tRNA sintetasas (aaRS) son enzimas claves para asegurar la fiel traducción del código genético. Estas enzimas unen el aminoácido al extremo 3' del tRNA correspondiente. La aminoacilación del tRNA por las sintetasas ocurre en una reacción de dos etapas, la activación del aminoácido con ATP y la transferencia del aminoácido activado al extremo 3' del tRNA. Las aaRS tienen dos dominios principales, el dominio de activación o dominio catalítico y el dominio de unión al anticodón. En base a la estructura común del dominio de activación, las aaRS han sido divididas en dos clases, clase I y clase II, en las cuales el sitio activo de estas enzimas está formado por un dominio de hojas β paralelas, separadas por hélices α (plegamiento de Rossmann) y un dominio de hojas β antiparalelas respectivamente. Dentro de estos dominios, cada clase presenta secuencias características (HIGH y KMSKS para la clase I y los segmentos 1, 2 y 3 para la clase II).

Sobre la base de estas secuencias características y la estructura del plegamiento de Rossmann, el dominio de activación de las aaRS de clase I se encuentra separado en dos mitades por la presencia de dos secuencias idiosincráticas denominadas péptido conector 1 y péptido conector 2. Se ha mostrado que el péptido conector 1 (PC1) está involucrado en la edición de aminoácidos erróneamente cargados en la IleRS, así como en la unión específica del tRNA^{tyr} en TyrRS de eucariontes y bacterias, aunque el PC1 es dispensable para la actividad de la IleRS. Recientemente se ha demostrado que la PC1 de la MetRS de levadura citoplásmica contiene un subdominio de dedo de zinc, donde la unión del zinc es esencial para la función de la MetRS citoplásmica.

Hasta el momento, no se le ha asignado ninguna función al PC2 de las aaRS de clase I. En este trabajo se reporta la secuencia y el análisis funcional de la Triptofanil tRNA sintetasa de la bacteria acidófila *Acidithiobacillus ferrooxidans*. En el dominio de activación de las TrpRS de arqueas y bacterias casi no se reconoce el PC2. En caso de *At. ferrooxidans*, la proteína deducida a partir del gen *trpS* contiene un PC2 inusualmente largo. Un PC2 similar fue encontrado en las TrpRS de algunas arqueas de la familia Euriarchaeota. Para probar la función del PC2 de la TrpRS de *At. ferrooxidans*, se realizó la delección de un segmento del gen *trpS* que codifica 65 residuos del PC2 y la función de la enzima recombinante se analizó tanto *in vivo* como *in vitro* en *E. coli*. Aunque la TrpRS delecionada fue tan activa como la silvestre en la activación del aminoácido, la afinidad por el tRNA específico se redujo, implicando una posible función en la unión del tRNA. Se realizó el modelamiento de la estructura terciaria de la TrpRS, el que sugiere que el PC2 no causa distorsiones de la estructura evolutivamente más conservada.

SUMMARY.

Aminoacyl tRNA synthetases are the key enzymes to ensure the faithful translation of the genetic information. These enzymes bind each amino acid at the 3' end of the cognate tRNA. The aminoacylation of tRNA by the synthetases occurs in a two step reaction, the first being the activation of the amino acid with ATP and the second, the transfer of the activated residue to the 3' end of tRNA. The aaRS has two principal domains, the activation or catalytic one and the anticodon binding domains. Based on the common structure of the activation domain, aaRS are divided in two classes, class I and class II in which a parallel β sheet limited by a helices at both ends (Rossmann fold) and an antiparallel β sheet conform the active sites respectively. Within these domains, signature sequences are present for each class (HIGH and KMSKS for class I and motifs 1, 2 and 3 for class II).

Besides the conserved signature motifs and structure of the Rossmann fold, the activation domain of aaRS is generally separated into two halves by the presence in many cases of two idiosyncratic sequences, named connective peptides 1 and 2. It has been shown that connective peptide 1 is involved in editing of the mischarged amino acids in IleRS as well as in tRNA binding specificity among eukaryal and bacterial TyrRS. In spite of the functions described for CP1, this from IleRS is dispensable for the activity of the enzyme. Recently, it was demonstrated that CP1 from yeast cytoplasmic MetRS contains a zinc-finger subdomain that binds one zinc ion and this binding is essential for the function of cytoplasmic MetRS.

To date, no function has been assigned to CP 2 of class I aaRS. In this work, a sequence and functional analysis of tryptophanyl tRNA synthetase from the acidophilic bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans* is reported. The activation domain of bacterial and eukaryal TrpRS contains an almost non-recognizable CP2. In the case of *A. ferrooxidans*, the predicted protein encoded by the *trpS* gen contains an unusually long CP 2. A similar or even longer CP2 is also found in TrpRS from several archaeas of the family euryarchaeota. To test for the function of CP2 in *At. ferrooxidans* TrpRS, the nucleotide sequence encoding 65 residues of CP2 was deleted and the function of the resulting recombinant enzyme was analyzed either in *E. coli* *in vivo* or *in vitro*. Although the deleted TrpRS was fully active in the activation of tryptophan, the affinity of the cognate tRNA was reduced implying a possible function of CP 2 in the binding of tRNA. Modelling of the tertiary structure of TrpRS suggested that CP 2 causes no distortion of the evolutionary more conserved structure of TrpRS.

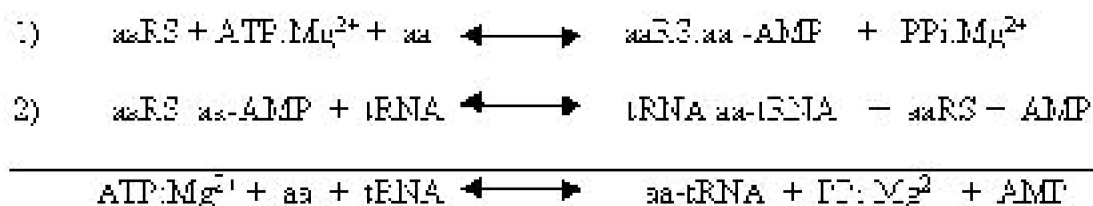
INTRODUCCIÓN

I. LAS AMINOACIL tRNA SINTETASAS.

1. Las aminoacil tRNA sintetasas y su importancia en la biosíntesis de proteínas.

Las aminoacil tRNA sintetasas son enzimas que juegan un papel fundamental en la biosíntesis de proteínas ya que catalizan la síntesis del aminoacil-tRNA, el que será utilizado como sustrato para la traducción del mRNA en proteínas.

La aminoacilación del tRNA es un proceso que se puede dividir en dos etapas. La primera consiste en la activación del aminoácido, con la formación del intermediario aminoacil-AMP y de pirofosfato inorgánico (PPi). En esta etapa el intermediario aminoacil-AMP se mantiene formando un complejo estable con la enzima. En la segunda etapa ocurre la transferencia del aminoácido al tRNA, con la formación del aminoacil-tRNA y AMP como productos finales, según la siguiente ecuación:



donde, aaRS aminoacil-tRNA sintetasa, aa aminoácido, aaRS:aa-AMP complejo enzima-aminoacil-AMP, PPi pirofosfato inorgánico, aa-tRNA aminoacil-tRNA.

2. Clasificación de las aminoacil-tRNA sintetetasas.

Sobre la base de sus estructuras tridimensionales y por la presencia de secuencias aminoacídicas específicas, las aaRS se han sido dividido en dos clases (clase I y II), que reúnen a diez enzimas cada una. Si bien las enzimas de ambas clases catalizan la misma reacción, se ha propuesto que ellas evolucionaron a partir de ancestros independientes (Eriani y cols., 1990).

Las enzimas de clase I tienen en común la presencia de dos secuencias de aminoácidos altamente conservadas, que corresponden a las secuencias HIGH, localizada en la región amino terminal de la proteína y la secuencia KMSKS localizada en la región media de la proteína. Por análisis cinético de mutantes de las MetRS y TyrRS, se ha demostrado que estas secuencias son importantes para la activación del aminoácido y forman parte del sitio activo (Brunie y cols., 1990, Leatherbarrow y cols., 1985). En particular, la secuencia KMSKS forma parte del brazo móvil que permite la estabilización del complejo de transición en la etapa de activación del aminoácido (Carter, 1993; Ibbá y Soll, 2000) y está involucrada en la aminoacilación del tRNA^{trp} (Chang y Koeppé, 1995; Sever y col., 1996). Estas secuencias se encuentran incluidas en un patrón típico de plegamiento a/b conocido como plegamiento de Rossmann (Fig. 1a), que también se encuentra presente en enzimas que unen nucleótidos tales como quinasas y deshidrogenasas (Rossmann y cols., 1974).

Las aminoacil tRNA sintetetasas de clase II poseen secuencias conservadas diferentes a las existentes en las sintetetasas de clase I, denominadas "segmento 1" (en la

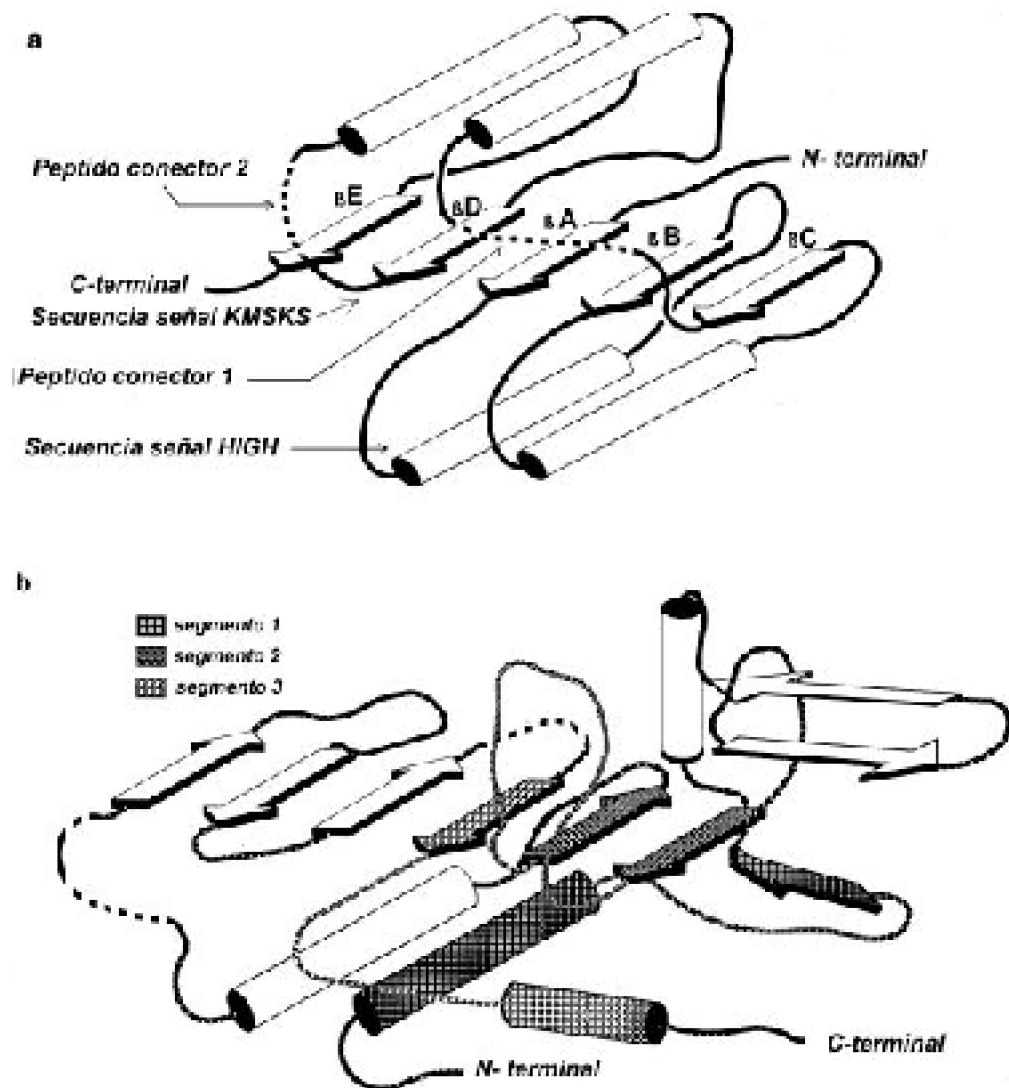


Figura 1. Esquema de la estructura terciaria de las aaRS de la clase 1 y 2. A) aaRS de clase 1, se indican las secuencias señales HIGH y KMSKS, los péptidos conectores 1 y 2, los extremos N- y C-terminales y las estructuras hojas β plegadas de la A a la E. b) aaRS de clase 2, indican las regiones de secuencias conservadas denominadas segmentos 1, 2 y 3, y los extremos N- y C-terminales.

región amino terminal de la proteína), “segmento 2” (en la región central), “segmento 3” (en la región carboxilo terminal). Cada segmento contiene un núcleo central conservado con al menos un residuo de aminoácido que no varía (Eriani y cols., 1990). El sitio activo de estas enzimas está constituido por hojas β plegadas antiparalelas (Cusack y cols., 1990)(Fig. 1b), en donde los segmentos 2 y 3 forman parte del sitio activo. En la Tabla I se muestra un resumen de las principales características de las aaRS .

3. Especificidad de las aaRS.

Las aaRS se caracterizan por una alta especificidad de unión por el aminoácido y por el

tRNA. Esta especificidad es crucial para la viabilidad de la célula, debido a que el apareamiento específico del anticodón del tRNA al codón de mRNA ocurre en forma independiente de la naturaleza del aminoácido que está unido al tRNA. Por lo tanto, la aminoacilación del tRNA con un aminoácido incorrecto necesariamente resultará en la incorporación de un aminoácido erróneo en la proteína.

3.1. Especificidad por el aminoácido.

Los distintos aminoácidos presentan gran similitud química y sólo difieren en su cadena lateral. Estas enzimas son capaces de discriminar el aminoácido específico por la afinidad por sus cadenas laterales. Datos cristalográficos de la MetRS de *E. coli* (Brunie y cols., 1990) y estudios de mutantes de esta enzima han permitido localizar en la región

	Clase I	Clase II
Sitio Activo	plegamiento de hojas β paralelas	plegamiento de hojas β antiparalelas
Secuencias característica	HGH KMKK	Segmentos 1, 2 y 3
Sitio de Aminoacilación del tRNA	2' OH	3' OH
Estructura cuaternaria	monómero u homodímero	homodímero heterodímero o heterotetrámero

Tabla I. Resumen de las principales características de las aminoacil-tRNA sintetetas de clase I y clase II.

amino terminal de la enzima un bolsillo cerca del sitio activo, que está involucrado en la unión al aminoácido (Ghosh y cols., 1990). En este bolsillo se encuentran residuos que participan en la unión de la cadena lateral según lo visto en la estructura del complejo TyrRS:tirosil-AMP de *B. stearothermophilus* (Brick y cols., 1989).

3.2. Especificidad por el tRNA.

Para el caso de la discriminación del tRNA, si bien la estructura terciaria de la enzima es fundamental para el reconocimiento, las aaRS reconocen como principales determinantes de identidad algunas bases específicas del tRNA. La cristalización de la GlnRS de *E. coli*

con el tRNA^{Gln} ha determinado que existe una aproximación entre la enzima y el extremo aceptor del tRNA cerca del sitio activo (Rould y cols., 1989). Por otro lado, en la MetRS de *E. coli* se demostró que la región carboxilo terminal participa en la interacción con el brazo del anticodón del tRNA (Ghosh y cols., 1990; Gale y Shimmel, 1995). En la TrpRS, por otro lado, se determinó que los principales determinantes de identidad en el tRNA^{trp} son el anticodón y la base G₇₃ del brazo aceptor y en menor grado el par A₁-U₇₂.

4. Péptidos conectores I y II.

Si bien las aaRS de ambas clases presentan secuencias y dominios estructurales muy conservados, estas enzimas presentan gran variación en tamaño (Carter, 1993). Estas variaciones pueden ser de gran importancia para la especificidad de las aaRS. Dentro del pliegue de Rossmann en las aaRS de clase I, existen dos regiones variables en tamaño denominadas péptidos conectores 1 y 2 (PC1 y PC2) (Hou y cols., 1991) (Fig.2).

El PC1 se ubica entre las hojas b plegadas C y D que conecta las dos mitades del bolsillo de Rossmann (Fig. 1a). Se ha descrito que en algunas enzimas el PC1 está involucrado en la especificidad por sus sustratos. En la TyrRS y GlnRS el PC1 interacciona con el brazo aceptor de los tRNA^{tyr} y tRNA^{gln} respectivamente (Wakasugi y col., 1998; Rould y cols., 1989). Se ha sugerido que en la LeuRS el PC1 puede ser responsable de la mantención de la conformación necesaria para la actividad de aminoacilación del tRNA (Li y cols., 1999). En el PC1 de la IleRS se encuentra un segundo sitio de unión a aminoácidos responsable de la edición de los aminoacil-adenilatos incorrectamente formados (Nureki y cols., 1998). Si bien el PC1 de la IleRS cumple un papel en la función de esta enzima, gran parte de este péptido conector es prescindible para la actividad de aminoacilación del tRNA^{ile} (Starzyk y cols., 1987).

El PC2 se ubica a continuación del PC1 separado por la hoja b plegada D del pliegue de Rossmann. El PC2 también es de tamaño variable dentro de las aaRS de clase I (Fig 2a) y hasta el momento no se ha determinado el papel que cumple este péptido en la actividad de estas enzimas.

5. La Triptofanil tRNA sintetasa.

La TrpRS es una enzima de clase I, que en *E. coli* es dimérica (Hall y cols., 1982). Se ha determinado la estructura terciaria de la TrpRS unida al triptofanil-AMP de *B. sterothermophilus* (Doublé y cols., 1995). La comparación de la estructura terciaria

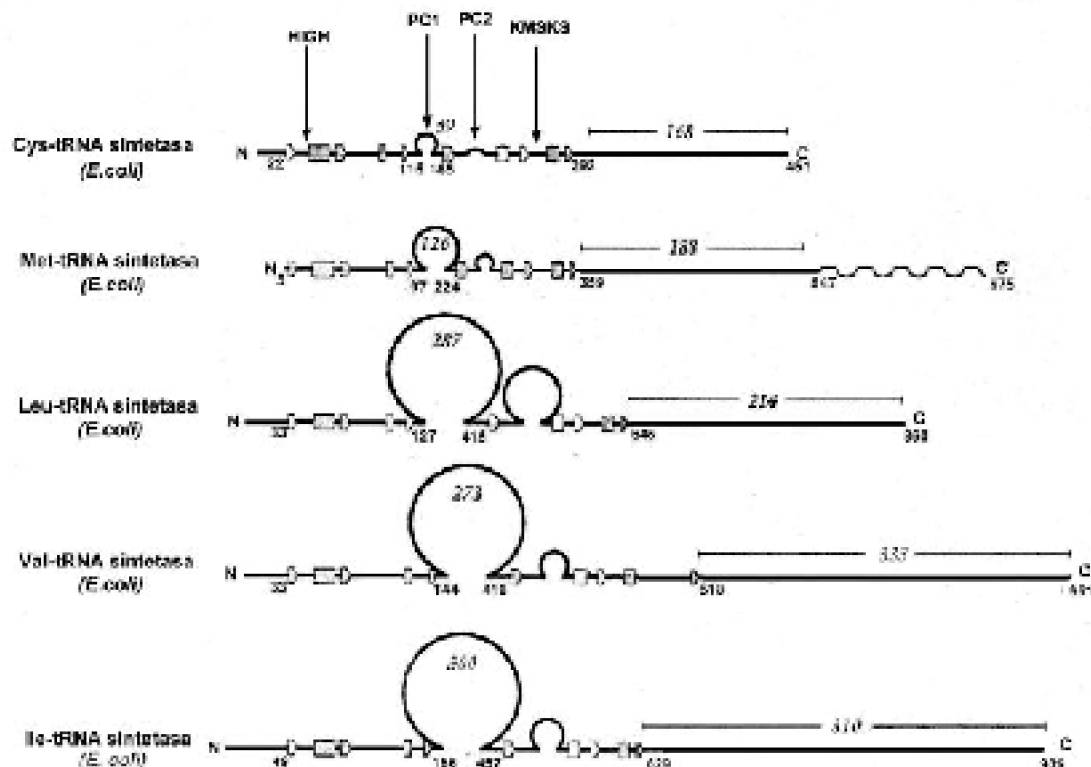


Figura 2. Organización estructural de las Cisteil-, Metionil-, Leucil-, Valil- e Isoleucil-tRNA sintetasas. Las vueltas indican los péptidos conectores (PC1 y PC2). Los rectángulos indican las hélices y los pentágonos indican las láminas b (Adaptado de Huo y cols. 1991).

con la de TyrRS de *B. stearotherophilus* (Brick y cols., 1989), ha permitido determinar que ambas enzimas comparten la mayoría de los residuos involucrados en la interacción con el intermediario aminoacil-AMP. La estructura de la TrpRS de *B. i stearotherophilus* libre de ligando (Ilyin y cols., 2000), ha permitido observar que el sitio activo de la enzima experimenta cambios en su estructura durante la activación del aminoácido, como el movimiento del segmento que contiene la secuencia señal KMSKS en el estado de transición para la formación del intermediario triptofanil-AMP.

Las comparaciones estructurales entre las TrpRS y TyrRS (Doublíe y cols., 1995) y los estudios filogenéticos (Brown y cols., 1997; Ribas de Pouplana y cols., 1996) han permitido postular que estas enzimas divergieron desde un ancestro común relativamente cercano a la división de los dominios arqueas, eucariontes y bacterias. La TrpRS, junto a

la TyrRS, son unas de las aaRS más pequeñas de esta clase (Burbaum y Shimmel, 1991) y una característica de ambas enzimas es que no contienen el PC2 descrito en las aaRS de clase I.

II. OBJETIVO DE LA TESIS.

1. Objetivo general.

En nuestro laboratorio se ha estudiado algunos componentes moleculares del sistema de la síntesis de proteínas de la bacteria gram negativa *Acidithiobacillus ferrooxidans*, una bacteria quimiolitotrófica, autotrófica y acidófila del género *Thiobacilli*, de la familia Thiobacteriaceae, que junto a otros organismos forma parte de la comunidad biológica que participa en la biolixiviación de metales desde minerales. Previamente se publicó la secuencia de la tirosil-tRNA sintetasa de *At. ferrooxidans* predicha a partir de la secuencia del gen *tyrZ* (Salazar y cols., 1994) y se caracterizó la interacción con el tRNA^{tyr} de *E. coli* (Salazar y cols., 2000).

Recientemente hemos identificado el gen *trpS* de *At. ferrooxidans* y deducido la secuencia de aminoácidos de la TrpRS codificada. Comparaciones preliminares de la secuencia de la TrpRS de *At. ferrooxidans* con otras TrpRS, han revelado que la enzima de *At. ferrooxidans* presenta un segmento de 70 aminoácidos ubicado en la región media de la proteína, entre los residuos 171 y 241, que no se encuentra presente en las TrpRS de otras bacterias. La comparación de las secuencias de la TrpRS de *At. ferrooxidans* con la TrpRS de *B. stearothermophilus*, ha permitido observar que este segmento se ubica en la posición del PC2. Sin considerar el PC2, ambas enzimas presentan un 34% de identidad de aminoácidos y un 52% de aminoácidos funcionalmente similares.

La triptofanil tRNA sintetasa de *At. ferrooxidans* contiene un péptido conector 2 (PC2) más largo que la mayoría de las TrpRS conocidas. En esta tesis se propone que el péptido conector 2 es prescindible para la actividad de aminoacilación del tRNA. Basado en esta hipótesis, me he propuesto estudiar la función del péptido conector 2 en la actividad de la TrpRS de *At. ferrooxidans*

2. Objetivos específicos.

1. Análisis computacional de la secuencia de aminoácidos de la TrpRS de *At. ferrooxidans*.
2. Clonamiento de la TrpRS de *At. ferrooxidans* y de *E. coli*.
3. Delección del PC2 de la TrpRS de *At. ferrooxidans*.
4. Expresión de las TrpRS y purificación de las enzimas recombinantes.
5. Determinación de la funcionalidad *in vivo* de las TrpRS de *At. ferrooxidans*

silvestre y delecionada.

6. Comparación de los parámetros cinéticos de las TrpRS silvestre y delecionada.

7. Predicción de la estructura terciaria de la TrpRS de *At. ferrooxidans*.

MATERIALES Y MÉTODOS

I. MATERIALES.

1. Bacterias.

Para los experimentos de transformación, extracción de plasmidios, e inducción de proteínas se utilizaron las cepas de *E. coli* JM109 (*recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thiD(lac-proAB)*) y DH5a (*supE44 DlacU169 (f80 lacZDM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*). La cepa de *E. coli* JM105 [*D (lacpro) thi stA sbc B15 hsd R4 F' tra D36, proAB, lac I^q, ZDM15*], se usó para los experimentos de inducción y purificación de proteínas.

La cepa de *E. coli trp42c*, que posee una mutación termosensible en el gen *trpS* (Bohman y Isaksson, 1978), se utilizó para los experimentos de complementación.

Las cepas JM109 y DH5a se cultivó y mantuvo en medio Luria-Bertani (LB) a 37°C, o en medio mínimo. La cepa *trp42c* se cultivó a 30°C en LB.

2. Vectores.

El vector pGEM-T (Promega Corp.), se utilizó para el clonamiento directo de productos de PCR. Este vector, de 3000 pb y que codifica un gen que confiere resistencia a ampicilina, contiene los promotores para la RNA polimerasa T7 y SP6 rodeando la región de clonamiento múltiple, que se encuentra inserta en la región codificante del péptido a de la enzima b-galactosidasa. Cuando se inserta un fragmento de DNA se produce la inactivación del a-péptido por lo que los clones recombinantes no tienen coloración azul producto de la hidrólisis de X-gal por la b-galactosidasa.

El vector pGEX-2T (Amershan Pharmacia Biotech), se utilizó para la sobreexpresión y purificación de TrpRS. Este vector posee un tamaño aproximado de 4900 pb y codifica para un gen que confiere resistencia a ampicilina. Contiene, aledaña a la región de clonamiento múltiple, la secuencia que codifica para la glutatión-S-transferasa (GST) lo que permite fusionar ésta a la secuencia de DNA en estudio. Posee un promotor *tac* químicamente inducible que permite obtener altos niveles de expresión de la proteína de fusión resultante entre la GST y la codificada por la secuencia de DNA ligada al vector. Posee además un sitio de reconocimiento por trombina entre la GST y el sitio de clonamiento múltiple que permite la separación por digestión proteolítica, de la proteína en estudio desde el producto de fusión.

3. Reactivos.

Los siguientes reactivos se obtuvieron de Sigma Co (USA): lisozima, ampicilina, glutatión reducido, resina de glutatión agarosa, TEMED, persulfato de amonio, SDS, PPO, POPOP, bromuro de etidio, ATP, triptofano y 5-fluor-triptofano.

La pirofosfatasa y RNasa A eran de Boehringer Mannheim. La T₄ DNA ligasa se obtuvo de New England Biolabs. Las enzimas de restricción utilizadas, la enzima fosfatasa alcalina intestinal de ternera (CIAP), la Taq DNA Polimerasa, Elongasa (mezcla de Taq DNA polimerasa y DNA polimerasa de *Pyrococcus sp. GB-D*) y los nucleótidos dATP, dCTP, dTTP y dGTP procedían de Gibco BRL.

Como marcadores de tamaño de DNA se utilizaron el DNA del fago I digerido con *Hind III* que genera fragmentos de 23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027 y 564 pb, y *fx174 RF DNA/Hae III* (genera fragmentos de 1353, 1078, 872, 603, 310, 271-281, 234,194, 118 y de 72 pb), ambos de Gibco BRL. Se utilizó el marcador de tamaño de proteínas 10kDa que posee 12 proteínas de tamaños que varían de 10 en 10 kDa (desde 10 a 120 kDa) y una banda adicional de 200 kDa, de Gibco BRL.

Todos los oligonucleótidos utilizados en esta tesis se obtuvieron del Centro de Análisis y Síntesis de Biomoléculas (Universidad de Chile.) y se muestran en la Tabla II.

Todas las sales, ácidos, bases y compuestos orgánicos fueron de grado analítico y procedían de Sigma Co. o de Merck.

Los reactivos para medios de cultivo, triptona, extracto de levadura y agar, procedían de Difco Laboratories.

4. Medios de cultivo.

-Medio Luria Bertani (LB): Contení Triptona 1% (P/V), NaCl 1% (P/V) y extracto de levadura 0.5% (P/V). Se esterilizaba en autoclave por 20 min. a 15 atm. Para medio LB sólido se agregaba además agar a concentración 1,5% (P/V). Para el medio LB selectivo se agregaba ampicilina a concentración de 100 mg/ml luego de esterilizar y enfriar a 50°C. Para la selección por expresión del gen *lac* se suplementaba con 0,5 mM de IPTG y 80 mg/ml X-gal.

NOMBRE	SECUENCIA 5' → 3'
WSTF1	GAATTC TGAGAGAGATCATCGTTTC
WSTF2	GAATC CGACGCGCCGGATTC
WSTF3	AGGATTT CATCGGCGTCGCG
WSTF4	AGCCCGATGAAAT TCCTTCGCGAA
WSEC2	TATATAG GATC CTTAACGCTTC
WSEC3	GAATTC GACTAAGCCCATCG

TABLA II. Secuencia de Oligonucleótidos utilizados en la tesis. Para clonar el gen *trpS* de *At. ferrooxidans* se utilizaron los oligonucleótidos WSTF1, WSTF2, en los que señala en rojo la secuencia de nucleótidos reconocida por la enzima de restricción *EcoRI*. Para clonar el gen *trpS* de *E. coli* se utilizaron los oligonucleótidos WSEC2 y WSEC3, en los que se señala en rojo las secuencia de nucleótidos de reconocimiento para las enzimas de restricción *EcoRI* y *BamHI* respectivamente. Para realizar la delección del gen *trpS*, se utilizaron los oligonucleótidos WSTF3 y WSTF4, en los que se señala en azul las secuencias nucleótidos complementaria entre ellos.

-Medio SOB: Contení triptona 2% (P/V), extracto de levadura 0,5 % (P/V), 10 mM NaCl y 2,5 mM KCl. Se ajustaba a pH 7,0 con NaOH, se completaba a un volumen de 1l y esterilizaba por autoclave 20 min a 15 atm.

-Medio SOC: Se agregaba 1 ml de solución 2 M de Mg^{2+} (1 M en $MgCl_2$ y 1 M en $MgSO_4$) y 1 ml de glucosa 2M a 98 ml de medio SOB resultando 20 mM en Mg^{2+} y 20 mM en glucosa.

II. MÉTODOS.

1. PREPARACIÓN y ANÁLISIS DE DNA.

1.1. Preparación de DNA plasmidial en pequeña escala.

El DNA plasmidial de los clones recombinantes se purificó por el método de lisis alcalina (Sambrook y cols, 1989). Se inocularon 2 ml de LB/amp 100 mg/ml con una colonia de *E. coli* transformada con el plásmido de cultivo. Se incubó el cultivo toda la noche a 37°C con agitación y se colectó por centrifugación a 12000 g por 1 min. El sedimento bacteriano se resuspendió en 100 ml de una solución de Tris-HCl 20 mM (pH 8,0), glucosa 50mM, EDTA 10 mM (pH 8,0) (solución I) y se agregó 200 ml de una solución de NaOH 0,2iN, SDS 1% (solución II). Se mezclaron por inversión, agregando 200 ml de una solución fría con acetato de potasio 3 M y ácido acético 0,2 M, y se dejandolos en hielo 5 min. La mezcla se centrifugó a 12000 g por 10 min. Al sobrenadante que contiene los ácidos nucleicos, se le agregó una mezcla de fenol/cloroformo 1:1 para eliminar las proteínas de la preparación. Se separó la fase acuosa por centrifugación a 12000g por 3 min, se realizó una extracción final con un volumen de cloroformo. Los ácidos nucleicos se precipitaron al agregar dos volúmenes de etanol absoluto frío. La mezcla se incubó en hielo por 10 min y luego se centrifugó a 12000g por 10 min. El sedimento se lavó con etanol 70% frío para eliminar las sales. Se secó a temperatura ambiente por 10 min y se resuspendió en TE (pH 8,0).

Para las secuenciaciones, el DNA plasmidial se purificó por el kit Wizard Mini Preps DNA Purification Systems (Promega Corp), que se basa en separar el DNA de un extracto de células por cromatografía de intercambio iónico.

1.2. Purificación de fragmentos de DNA desde geles de agarosa.

Para purificar productos de amplificaciones por PCR, digestiones con enzimas de restricción o defosforilaciones, se utilizó el kit Wizard PCR Preps DNA Purification Systems (Promega Corp). La muestra de DNA se sometió a electroforesis en un gel de agarosa de bajo punto de fusión. Se cortó el trozo de gel que contenía la banda de DNA a purificar, y se fundieron a 65°C en un tubo eppendorf. Se agregó la resina y se purificó por cromatografía en mini-columnas como lo especifican los fabricantes. El DNA se eluyó con TE (pH 7,4) o agua.

2. TRANSFORMACION DE *E. coli*.

2.1. Preparación de células electrocompetentes.

Un preinóculo de las bacterias receptora se incubaron toda la noche a 37°C en medio LB con agitación. Al día siguiente se inocularon 500 ml de LB al 1% con las células del preinóculo y se incubaron a 37°C con agitación hasta que el cultivo alcanzó una DO de 0,8 a 550 nm. Se dejó el cultivo en hielo 15 min y se centrifugó a 4000g en centrífuga Sorvall, por 10 min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se lavaron las células dos veces en 500 ml de agua destilada, estéril y fría, centrifugando cada vez a 4000 por g 10 min a 4°C. Las células se resuspendieron en un total de 2 ml de glicerol al 10% y se conservaron a -80°C.

2.2. Electroporación.

Las electroporaciones se realizaron en un equipo Cell-Porator (Gibco BRL Life Technologies, INC), aplicando un pulso 2400 Volts.

Se utilizaban 20 ml de células electrocompetentes por cada ensayo de electroporación, las que se colocaban en tubos eppendorf de 500 ul, se agregaba 1 ml de muestra de DNA para dar 50 pg/ml. Esta mezcla era depositada entre los electrodos de la cubeta para realizar la electroporación. Las cubetas eran colocadas en la cámara de electroporación enfriada previamente. Luego de aplicar el pulso eléctrico, se transferían las muestras de cada cubeta en forma estéril a un tubo de cultivo que contenía 1 ml de medio SOC y se incubaban por 1 h a 37°C. Luego de este período de recuperación, 50-200 ml de células se sembraron en placas de petri con LB-agar en presencia de antibiótico y se incubaban toda la noche a la temperatura deseada.

3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La reacción de amplificación se realizaba en un volumen de 25 ml. La mezcla de reacción contenía tampón Tris-HCl 54 mM (pH 9,1), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 18 mM, MgCl_2 1,6 mM, dATP, dTTP, dGTP, dCTP 0,2 mM cada uno y 0,5 U de la enzima *Elongasa*. Los oligonucleótidos se utilizaron siempre en concentración 1 pmol/ml y sus secuencias se muestran en la Tabla II. Se agregaban 2 gotas de aceite mineral para evitar la evaporación. Las reacciones se realizaron en un termociclador MJresearch PTC 100. Los productos generados se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa.

Para el clonamiento de los productos de PCR, realizados con *Elongasa*, en el vector pGEM-T, se les agregaba un nucleótidos de adenina en el extremo 3' de los amplificados mediante la Taq DNA polimerasa. Este método se basa en que la Taq DNA polimerasa luego de amplificar un DNA molde, normalmente agrega en el extremo 3' un nucleótido extra, que generalmente es A. La reacción se realizó en 100 ml bajo las siguientes condiciones: TrisHCl 20 mM (pH 8,4), KCl 50 mM, MgCl_2 3 mM, dATP 1 mM, 1U de Taq DNA polimerasa y una cantidad de DNA mayor a 500 ng. Se incubó 2 h a 72°C y el DNA se purificó desde geles de agarosa.

Para la amplificación del gen *trpS* de *At. ferrooxidans* se utilizó el siguiente programa: dos ciclos de 2 min a 94°C, 1 min a 40°C y 1 min a 68°C; 30 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 53°C y 30 s a 68°C; y 10 min finales a 68°C. Para la amplificación del gen *trpS* de *E. coli* se utilizó el siguiente programa: dos ciclos de 2 min a 94°C, 1 min a 40°C y 1 min a 68°C, 30 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 53°C y 30 s a 68°C; y 10 min finales a 68°C.

4. Delección de gen *trpS* de *At. ferrooxidans*.

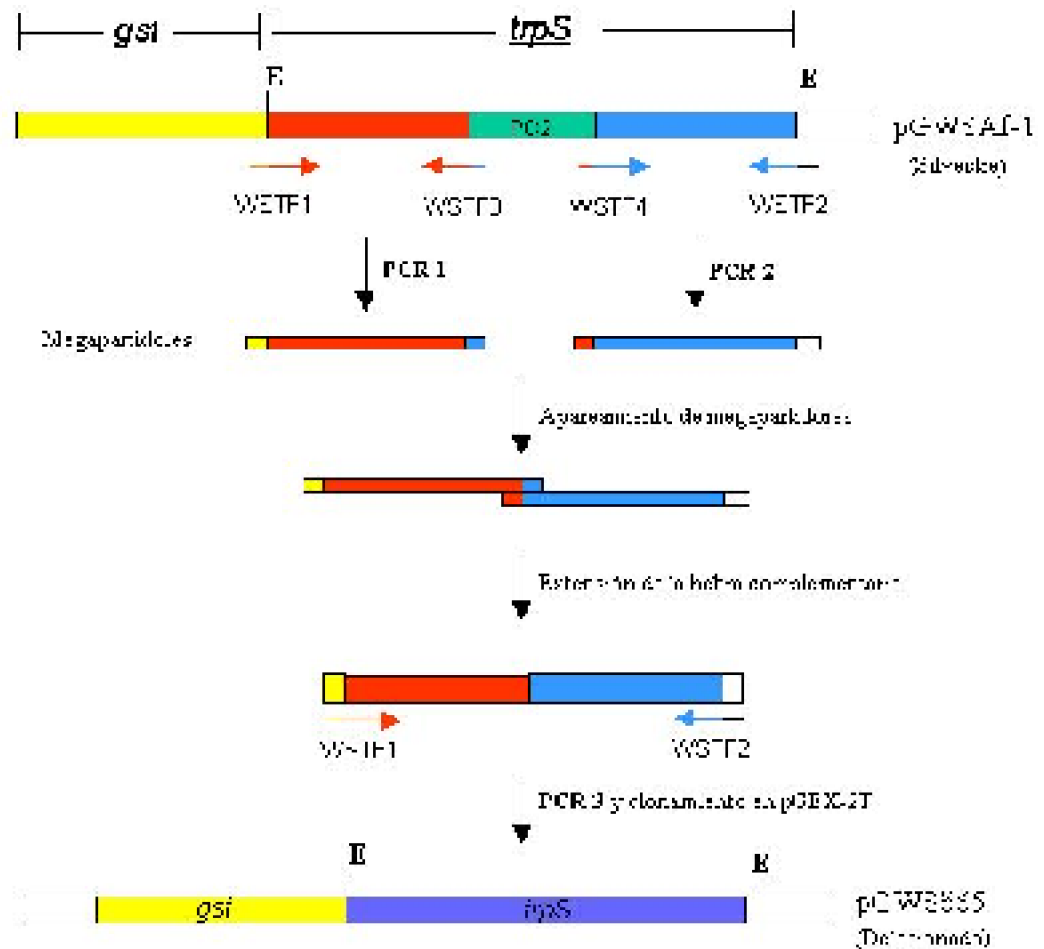
La generación de la delección en el gen *trpS* de *At. ferrooxidans* se realizó por PCR por la adaptación de la metódica del "megapartidor" para la generación de mutaciones sitio dirigidas, como se describe en la literatura (Aiyar y cols., 1993; Higuchi, 1992) y se esquematiza en la Figura 3.

Se diseñaron dos partidores para PCR, uno en cada extremo del gen, denominados WSTF1 y WSTF2 y los oligonucleótidos mutagénicos, dos para la delección (uno en cada

orientación) denominados WSTF3 y WSTF4 (Tabla II).

En una primera ronda de PCR se construyeron dos amplificados de las regiones aledañas al PC2 del gen *trpS* de *At. ferrooxidans*. El primer amplificado se generó con los partidores WSTF1 y WSTF3 y el segundo con los partidores WSTF4 y WSTF2. Los partidores WSTF3 WSTF4 contienen en sus extremos 5' una secuencia de 16 bases que son complementarias entre ambos partidores. De esta manera los amplificados 1 y 2 se aparean por esta región de 16 bases funcionando como partidores. En ambas amplificaciones se utilizó el siguiente programa: 1 ciclo de 2 min a 94°C; 30 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 50°C y 1 min a 68°C; y un ciclo de 10 min a 68°C. Los megapartidores se purificaron por geles de agarosa para eliminar completamente el DNA molde y evitar la interferencia en las amplificación posteriores. Se generó el híbrido entre los dos megapartidores utilizando cantidades molares equivalentes y se extendió sus extremos 3' usando Elongasa (Fig. 3). De esta manera se generó el gen con la delección. Posteriormente el gen delecionado fue amplificado utilizando los dos partidores externos WSTF1 y WSTF2.

Figura 3. Estrategia de delección del gen *trpS* de *At. ferrooxidans*. En el esquema se muestra el gen *trpS* de *At. ferrooxidans* clonado en el vector pGX2T y los pasos para la delección de este gen. La caja verde señala la región codificante para el PC2, las cajas roja y celeste señalan las regiones de gen *trpS* aledañas al PC2, la caja en amarillo se señala la región codificante para la GST. WSTF1 y WSTF2 son los partidores externos, WSTF3 y WSTF4 son los partidores mutagénicos. Con la letra E se señala el sitio de reconocimiento de la enzima EcoRI. PCR 1 y PCR 2, son las amplificaciones de las regiones aledañas al PC2. A estos amplificados se los denominó megapartidores 1 y 2. PCR 3 es la amplificación del gen delecionado producido por el apareamiento de los megapartidores 1 y 2 y la posterior extensión de sus extremos 3'. La caja de color morado señala el gen *trpS* delecionado.



5. Secuenciación del gen *trpS*.

La secuenciación del gen *trpS* de *At. ferrooxidans* se realizó en el centro de Análisis y Biosíntesis de Biomoléculas (Universidad de Chile). Para esta secuenciación se utilizaron los partidores WSTF1 y WSTF2.

6. Sobreexpresión y purificación de la TrpRS de *At. ferrooxidans*.

6.1. Inducción de la expresión de la proteína de fusión GST-TrpRS

Para verificar que la cepa de *E. coli* JM105 transformada con los plasmidios recombinantes expresaban la proteína de fusión GST-TrpRS, se inocularon 2 ml de LBA con 200 ml de un preinóculo y se incubaban 3 h a 37°C. Para inducir la expresión de la

proteína de fusión se adicionó IPTG 0,1 mM final y se incubó nuevamente 3 h a 37°C. Se centrifugaron las células y se resuspendieron en 200 ml de tampón de carga para la electroforesis en geles de poliacrilamida. Las muestras se calentaron por 10 min a 90-100°C, se centrifugaron unos segundos y se sembraron entre 3 y 5 ml del sobrenadante en un gel SDS-PAGE al 10% como se describe en *Sambrook y cols, 1989*. La electroforesis se realizó en una solución de Tris-HCl 25 mM, glicina 0,25 mM, SDS 0,1% a 150 V durante 40-60 min y luego se visualizaron las proteínas en geles de poliacrilamida al 10% por tinción con Azul de Coomassie.

Para la purificación de las proteínas de fusión GST-TrpRS se cultivó un preinóculo de la cepa de *E. coli* transformada con el plasmidio recombinante del mismo modo señalado anteriormente y con éste se inocularon entre 200 y 2000 ml de LB-amp al 2-5 % según la cantidad de enzima a purificar. Se cultivaron a 25°C con agitación hasta alcanzar la fase logarítmica (D.O._{600nm} =0,8-1,0). Se adicionó IPTG a una concentración final de 0,1 mM y se incubó a 25°C por 2,5 h o más. Se centrifugaron las células a 5000g por 10 min a 4°C. Se lavaron tres veces con una solución de Tris-HCl 50 mM (pH 8,0) frío y se guardaron a -20°C.

6.2. Purificación de GST-TrpRS.

Las células inducidas con IPTG se resuspendieron en 30 ml de una solución de lisis (Tris-HCl 50 mM (pH 8,0), EDTA 2 mM, b-mercaptoetanol 20 mM, Tritón X-100 0,1 % v/v) y se agregaron inhibidores de proteasas (PMSF 2 mM, aprotinina 0,1 %, peptatina A 2 mg/ml, leupeptina 2 mg/ml) y lisozima (100 mg/ml). Se incubó 30-45 min en hielo y se sonicó con 5 pulsos de 30 s c/u a 50 watt alternando cada pulso con un min. de incubación en hielo. Este extracto total de proteínas se centrifugó a 12000g por 10 min a 4°C para separar la porción soluble y los cuerpos de inclusión. Se aplicó el sobrenadante en una columna de glutatión agarosa previamente equilibrada con solución de lisis y luego se lavó con 10 volúmenes de esta misma solución. Se equilibró con 5 volúmenes de una solución Tris-HCl 50 mM (pH 8,0) y NaCl 150 mM. La proteína de fusión GST-TrpRS se eluyó con glutatión reducido 20 mM en Tris-HCl 50 mM (pH 8,0), NaCl 150 mM. Las fracciones colectadas se analizaron por electroforesis en geles SDS-PAGE. Las fracciones que poseían mayor cantidad de proteína de fusión se juntaron, se cuantificaron por la metodología de Bradford y se guardaron a -20°C en una solución de almacenamiento (glicerol 45%, Tris-HCl 50 mM (pH 8,0), NaCl 150 mM).

7. Ensayos de complementación.

Se analizó la capacidad de los productos del gen *trpS* de *At. ferrooxidans* silvestre y delecionado de complementar la mutación termosensible en el gen *trpS* de la cepa *trps42c* de *E. coli*.

La cepa mutante se transformó con los plasmidios pGWSAf-1 y pGWSd65 que contienen el gen *trpS* con la deleción de 65 aminoácidos. Como controles positivos y negativos de complementación se utilizaron los plasmidios pTRS (contiene el gen *trpS* nativo de *E. coli*) y con el vector pGEX2T respectivamente. Se seleccionaron colonias de

bacterias transformadas con los distintos plasmidios por cultivo en placas de LB- agar suplementado con ampicilina e incubadas a 30°C durante toda la noche.

Con las colonias seleccionadas se inoculó 1 ml de LB/amp y se cultivaron toda la noche a 30°C. Estos preinóculos se utilizaron para inocular 10 ml de medio LB/amp dejándolos a una D.O._{600 nm} de aproximadamente 0,1. Los cultivos se incubaron a 40°C con agitación y se analizó la proliferación bacteriana por medición de la D.O._{600 nm} cada 30 min durante 6 a 9 h.

8. Actividad *in vitro* de la triptofanil tRNA sintetasa.

8.2. Activación del aminoácido.

Se realizó este ensayo por el método de intercambio de pirofosfato como se describe en Calendar y cols., 1966 que se basa en la capacidad de analizar la primera etapa de la reacción que catalizan las aaRS, es decir, la formación del aminoaciladenilato independiente de la unión al tRNA.

Se incubaron 0,1 a 10 mg de la enzima a analizar (silvestre o mutante) a 37°C en Tris-HCl 50 mM (pH 8,0), KCl 30 mM, MgCl₂ 10mM, KF 2 mM, ATP, triptofano (o el análogo de triptofano 5-fluor-triptofano) en concentraciones variables y [³²P] pirofosfato (actividad específica 1 mCi/pmol), 1 mM final. A diferentes tiempos se tomaron alícuotas de 40 ml y se agregaron a un tubo que poseía 200 ml de solución 0.4 M NaPPi, 15% v/v ácido perclórico, 1% w/v carbón activado. Sobre esta mezcla se agregaba aproximadamente 2 ml de agua destilada y se agitó vigorosamente en vortex. Una vez tomadas todas las alícuotas se procedió a filtrar en filtro de fibra de vidrio (*Whatman*) aplicando presión muy suave. Se lavaron los filtros con 20 ml de H₂O destilada y luego con 7 ml de etanol. Se secaron a 65°C por 15 min y se cuantificó la radiactividad en un contador de centelleo líquido Delta 300.

Para la determinación de Km de la enzima se utilizaron concentraciones variables de triptofano y de ATP. Los parámetros cinéticos se obtuvieron ajustando los datos experimentales a la Ecuación de Michaelis-Menten y analizando la regresión no lineal de esta ecuación teórica usando el software Kaleida Graph 3.0.4. (Abelbeck Software).

8.3. Aminoacilación de tRNA.

Se midió la capacidad de la TrpRS silvestre y delecionada de aminoacilar con triptofano el tRNA^{Trp} de *At. ferrooxidans* sobreexpresado en *E. coli*.

La reacción se llevó a cabo en un tampón que contenía Tris-HCl 50 mM (pH 8,0), MgCl₂ 10 mM, ATP 10 mM, DTT 5 mM, [³H] triptofano (actividad específica 100 mCi/mmol) 100 mM y tRNA^{Trp} de *At. ferrooxidans* entre 0,5 a 40 mM. Se preincubó por un min a 37°C, y se agregó entre 0,1-10 mg de la enzima TrpRS silvestre o delecionada.

A diferentes tiempos se tomaron 40 ml de solución de reacción, se depositaron en un filtro de papel (*Whatman* 3MM, 2,4 cm de diámetro) previamente saturado con triptofano 0,5 mM y se introdujo en TCA al 5 % frío para detener la reacción. Se lavaron con TCA

frío por 30 min, se lavaron con etanol 100%, se secaron 15 min a 65°C y se suspendieron en 3 ml de una solución de centelleo que contenía 3.92 g/l de PPO y 0.08 g/l de POPOP disueltos en tolueno.

La radiactividad de los filtros se cuantificó en un contador de centelleo Delta 300 Liquid Scintillator Counter (Searle Analytical Inc.).

9. Titulación de sitio activo.

Este ensayo se basa en la formación de un complejo entre el intermediario Trp-AMP y la enzima en cantidades estequiométricas (Trp-AMP-Enzima). Se desplaza la reacción hacia la formación del intermediario al agregar la enzima pirofosfatasa. Se cuantifican los picomoles de triptofanil-AMP formado, los que corresponden estequiométricamente a la cantidad de enzima activa (Wilkinson y cols., 1983).

La reacción se llevó a cabo en un tampón que contenía Tris-HCl 50 mM (pH 8,0), MgCl₂ 10 mM, ATP 2 mM, NaCl 150 mM, [³H] triptofano 0,169 mM y 1 U de pirofosfatasa. Se preincubó 1 min a 37°C y se agregó la enzima en cantidad final mayor que 10 mg. Se tomaron alícuotas de 40 µL a los 1, 5, 10 y 15 min y se depositaron rápidamente en un filtro de nitrocelulosa (schleicher & schuell, BA 85, 0,45 mm.) pre-humedecido con solución de lavado (Tris-HCl 10 mM (pH 8,0), MgCl₂ 2mM y NaCl 30 mM). Se lavó con 5µl de esta misma solución por 2 veces aplicando presión suave. Luego los filtros se depositaron en los viales para el conteo de radiactividad y se secaron por 30 min a 65°C. Se cuantificó la radiactividad con líquido de centelleo, en un contador Delta 300 Liquid Scintillator Counter (Searle Analytical Inc.)

10. Modelaje de la TrpRS de *At. ferrooxidans*.

10.1. Programas computacionales.

Los programas utilizados fueron;

- 1) Insight II / Homology, versión 2.3.0 de diciembre de 1993 de Biosym Technologies.
- 2) HiperChem 6.03 de Hypercube Inc
- 3) Kaleida Graph
- 4) Psi Blast.
- 5) Procheck
- 6) TOP. (<http://bioinfo1.mbfys.ln.se/TOP/>)

10.2. Obtención de las estructuras de referencias.

Para el modelaje de la TrpRSd65 de *At. ferrooxidans* se utilizó como referencia la estructura tridimensional de la TrpRS *B. stearotherophilus* libre de ligando obtenida por cristalografía de rayos X, con una resolución de 2,9 Å (Ilyin y cols., 2000). Obtenida desde las bases de datos de "Protein Data Bank" (código 1D2R) y se trabajó con la subunidad

A.

10.3. Modelaje manual de estructuras.

Para modelar la TrpRSd65 se utilizó el programa Insight II / Homology y se empleó una estrategia de modelaje manual. Esta estrategia consiste en asignar a los átomos de cada residuo de la proteína a modelar las coordenadas de los átomos de los residuos de la proteína de referencia.

Para la asignación de coordenadas, se realizó un alineamiento de la secuencia de aminoácidos entre la TrpRS de *B. stearothermophilus* y la TrpRSd65 de *At. ferrooxidans*, en el que se definieron dos tipos de regiones, 1) "regiones conservadas", que corresponde a las regiones que no presentan problemas para ser alineadas y 2) "regiones variables", las que corresponde a las regiones que no fueron posible de alinear por la presencia de "inserciones o deleciones" en la secuencias.

A los residuos de las regiones conservadas se les asignó directamente las coordenadas atómicas de los residuos equivalentes de la TrpRS de *B. stearothermophilus*, según el alineamiento. Sin embargo, para la asignación de coordenadas atómicas de las regiones variables, el programa Insight II / Homology propone distintas estructuras del tipo vuelta obtenidas desde las bases de datos "Protein Data Bank". De las estructuras propuestas se eligió la que presentó la menor desviación estructural con relación a la región variable de la estructura de referencia. Luego se asignó las coordenadas atómicas de cada estructura elegida a las correspondientes regiones variables de la TrpRSd65.

10.4. Optimización de la geometría del modelo.

Se realizó la optimización de la geometría estructural del modelo de la TrpRS de *At. ferrooxidans*. Esta optimización consiste en acomodar las distancias entre los átomos que forman un enlace y el ángulos que forman y las distancias entre átomos que establecen interacciones del tipo electrostáticas a sus valores de menor energía potencial. En cada paso de optimización se selecciona la estructura que genera la menor deformación con respecto a la estructura inicial, la que se utiliza para el paso siguiente.

Para la optimización se utilizó el programa "Hiper Chem 6.03". El programa calcula la energía potencial de la estructura inicial, este cálculo se realiza por la construcción del modelo asistida con refinamiento de energía, AMBER (Asisted Model Building with Energy Refinement). Se utilizó un campo de fuerza dieléctrico constante y para los cálculos de energía potencial se utilizó de algoritmo minimización de gradiente conjugado "Polak-Ribiere". El proceso de optimización se detenía al cumplirse la cantidad de ciclos predeterminadas o por la convergencia a un gradiente de energía de 0,1 Kcal / mol Å.

La optimización del modelo se realizó en dos etapas; en la primera se optimizó solo los enlaces correspondientes a la cadena principal de la proteína y luego en la segunda se optimizó la molécula completa.

Se creó un archivo de salida de datos (formato log) en el cual se registraron la energía potencial y su gradiente energético en cada ciclo de optimización. Estos datos

fueron graficados, para determinar en que rango de ciclos se alcanzan menores valores de energía y gradiente.

10.5. Evaluación del modelo TrpRSd65.

10.5.1. Variación estructural entre la TrpRS de *B.stearotermophilus* y la TrpRSd65.

Para comparar ambas estructuras se realizó la sobreposición espacial de estas. Se utilizó el programa Insight II / Homology o HyperChem 6.03 y se sobrepusieron sólo las regiones correspondientes a las cajas conservadas resultante del alineamiento de secuencias de aminoácidos.

Con esta sobreposición se determinó la variación en la posición de los átomos de ambas estructuras. Esta variación se expresó por la desviación de la raíz de los cuadrados medios (root mean square deviation, RMSD) de los átomos de la cadena principal de ambas cadenas peptídicas. La RMSD se calcula según la siguiente ecuación:

$$\text{RMSD} = \frac{1}{N-1} \sqrt{\sum (X_i^A - X_i^B)^2 + (Y_i^A - Y_i^B)^2 + (Z_i^A - Z_i^B)^2}$$

donde N, es número de átomos de la cadena principal (no se consideró los átomos de las cadenas laterales); A y B, son las moléculas sobrepuestas; i y j, son los átomos comparados de las moléculas A y B; X,Y y Z, son las coordenadas espaciales de los átomos i y j.

10.5.2. Análisis de la geometría de la estructura del modelo.

Para evaluar la geometría del modelo optimizado, se utilizó programa PROCHECK. Este programa permite evaluar la estequiometría de los enlaces del modelo.

El programa compara los ángulos dihedros phi y psi de cada residuo del modelo con los diagramas de Ramachandran típicos para cada residuo. De acuerdo a la posición de cada residuo del modelo en el diagrama de Ramachandran, estos son clasificados según su factibilidad para formar estructuras secundarias en regiones; a) favorables, b) adicionalmente permitidas c) generosamente permitidas o d) regiones no permitidas. El programa entrega el porcentaje de residuos presente en cada una de estas regiones.

El programa además determina la longitud y ángulos de enlaces y la desviación de los ángulos que forman los planos de algunos grupos, y los compara con los valores de referencia. De acuerdo a estos valores, se entrega el porcentaje de residuos del modelo que se encuentran fuera de los rangos típicos.

10.5.3- Comparación de la distribución de las estructuras secundarias entre el modelo y la estructura de referencia.

Este análisis fue realizado con el programa TOP. Este programa realiza una sobreposición espacial de ambas estructuras. Sobre la base de esta sobreposición se

seleccionan los elementos de estructura secundaria hélices a y hoja b. De estos elementos se comparan sus ángulos de desviación y sus distancias de separación, además se calcula la RMSD para cada par estructura comparada.

10.5.4. Análisis de residuos funcionales del modelo TrpRSd65.

Para evaluar si la estructura modelo tiene una conformación similar a una enzima funcional, se midió las distancias de separación entre residuos de la TrpRS de *B. stearothermophilus* que están involucrados directamente en la interacción con el intermediario triptofanil-AMP y se comparó con las distancias de separación de los residuos equivalentes en la estructura del modelo TrpRSd65. Estas distancias fueron determinadas con el programa HyperChem versión 3.06 y se midió las separación entre los carbonos α de los residuos elegidos para cada estructura.

RESULTADOS

1. Identificación del gen de la TrpRS de *At. ferrooxidans*.

La secuencia del gen *trpS* que codifica para la TrpRS de *At. ferrooxidans* se identificó en la base de datos computacionales "The Institute for Genetic Research" (www.tigr.org) que contiene la secuencia del genoma de *At. ferrooxidans* ATCC 23270. Para la identificación del gen *trpS* se utilizó el programa WU-BLAST 2.0, con el cual se realizó la búsqueda de secuencias de DNA cuyos marcos de lectura codificaban secuencias de aminoácidos similares a la secuencia de la TrpRS de *E. coli*. De esta búsqueda se identificó una secuencia de DNA que codifica para una proteína de 403 aminoácidos.

La secuencia de aminoácidos deducida se comparó con varias TrpRS mediante un alineamiento múltiple utilizando el programa Clustal W (Fig. 4). En este alineamiento se observó que la TrpRS de *At. ferrooxidans* tiene las secuencias HLGH y KMSKS características de las aaRS de clase I. Además se encontró la mayoría de los residuos que están involucrados en la interacción con el intermediario triptofanil-AMP descritos por Doublé y cols., 1995 para la TrpRS de *B. stearrowthermophilus*, lo cual indica que la secuencia de aminoácidos deducida probablemente corresponde a la secuencia de la TrpRS de *At. ferrooxidans*.

ESTUDIOS FUNCIONALES Y ESTRUCTURALES DE LA TRIPTOFANIL tRNA SINTETASA DE *Acidithiobacillus ferrooxidans*.

Un aspecto particular de la TrpRS de *At. ferrooxidans* observado a partir del alineamiento, fue la presencia de un segmento de 70 aminoácidos ubicado entre los residuos 171 y 241, el que no está presente en la mayoría de las TrpRS conocidas. Al

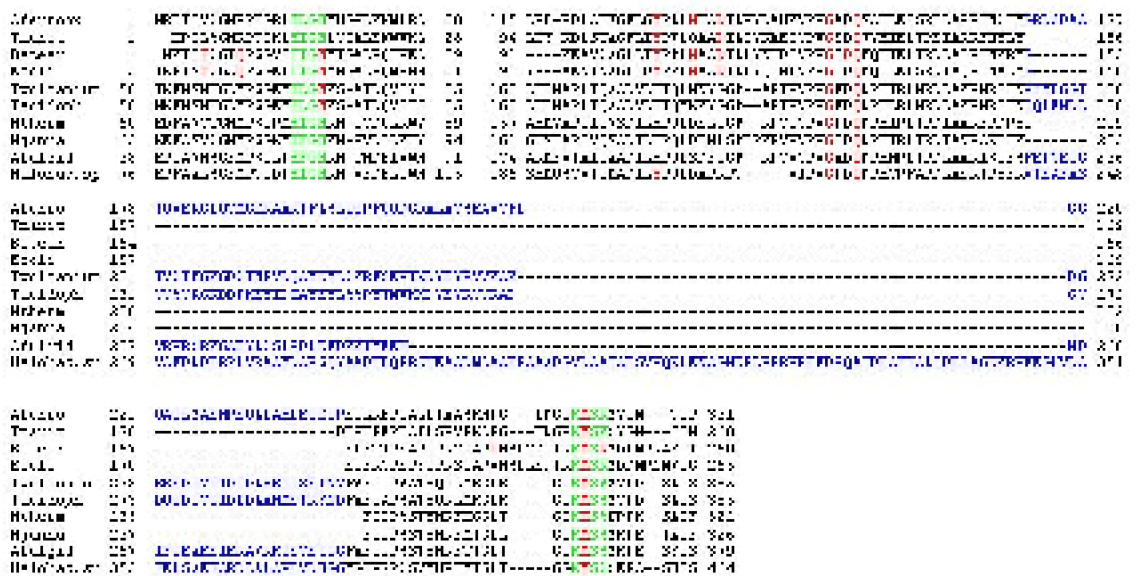


Figura 4. Alineamiento de secuencias de aminoácidos de TrpRS. Las secciones en azul corresponden a los posibles PC2 de las TrpRS, los residuos en verde corresponden a las secuencias señales HIGH y KMSKS, en rojo se destacan los residuos descritos en la TrpRS de B.stearothermophilus que interaccionan con el intermediario triptofanil-AMP (Doublíé y cols. 1995). Aferro, Acidithiobacillus ferrooxidans; Tmarit, Thermotoga maritima; Bstear, Bacillus stearothermophilus; Ecoli, Escherichia coli; Tvolcani, Thermoplasma volcanium; Tacidoph Thermoplasma acidophilum; Mtherm, Methanothermobacter thermoautotrophicus, Mjanna, Methanococcus jannashii; Afulgid, Archaeglobus fulgidans; Halobac.sp, Halobacterium sp.

comparar la secuencia de la rpRS de *A. ferrooxidans* con la secuencia TrpRS de *B. i stearothermophilus*, se observó que este segmento se ubica a continuación de la hoja b plegada D (ver Fig. 1a). La comparación de las secuencias de las aaRS de clase I

realizada por Hou y cols., 1991 señala que en esta posición se localiza el segundo péptido conector o PC2 (ver Fig 1 y 2), por lo cual, es posible que el segmento de 70 aminoácidos descrito en la TrpRS de *At. ferrooxidans* corresponda a este péptido conector.

La secuencia de la TrpRS de *At. ferrooxidans* tiene un 36% de identidad de aminoácidos, la que aumenta a un 52% de similitud funcional con la TrpRS de *Aquifex aeolicus*. Si en la comparación de secuencias se omite el segmento correspondiente al posible CP2 de la TrpRS de *At. ferrooxidans* los valores aumentan a 50% de identidad y 70% de similitud.

Si bien no se encontró un PC2 de similares características en otras TrpRS de bacterias, se observó la presencia de un segmento similar al PC2 en la TrpRS de cuatro arqueas (Fig. 4). Estos PC2 están localizados en la misma posición que el PC2 de la TrpRS de *At. ferrooxidans*, aunque su tamaño es variable. Debe destacarse que la presencia de estos posibles PC2 no es común a todas las TrpRS de arqueas y los ejemplos encontrados se restringen al subdominio de las Euriarchaeotas.

2. Estudio de la funcionalidad del PC2 en la TrpRS de *At. ferrooxidans*.

Para estudiar la posible función del PC2 de la TrpRS de *At. ferrooxidans*, se clonó el gen de la *trpS* de *At. ferrooxidans* y se realizó la delección del segmento que codifica para el PC2.

Se clonó además el gen *trpS* de *E. coli* para utilizar la TrpRS de este organismo como control experimental en los ensayos de actividad y de complementación de la mutante *trp42c*.

2.1. Clonamiento de los genes *trpS* de *At. ferrooxidans* y de *E. coli*.

Para el clonamiento se amplificaron por PCR los DNA codificantes para las *trpS* de *At. i ferrooxidans* y *E. coli*, utilizando como molde sus DNA genómicos. Los partidores utilizados para la amplificación se diseñaron a partir de las secuencias de DNA disponibles en las bases de datos computacionales. Los productos de amplificación fueron de aproximadamente 1200 y 1000 pb para el gen *trpS* de *At. ferrooxidans* y de *E. coli* respectivamente (Fig. 5). Los productos de amplificación se clonaron en el vector pGEM-T, generando los plasmidios pWSAf-1 y pWSEc-1 para los genes *trpS* de *At. ferrooxidans* y *E. i coli* respectivamente. La identidad del gen *trpS* de *At. i ferrooxidans* se comprobó por la secuenciación del inserto que contiene el gen en el plasmidio pWSAf-1. Los genes *trpS* de *At. ferrooxidans* y *E. coli* se clonaron en el sitio EcoRI del vector pGEX-2T, generando los plasmidios pGWSAf-1 y pGWSEc-2.

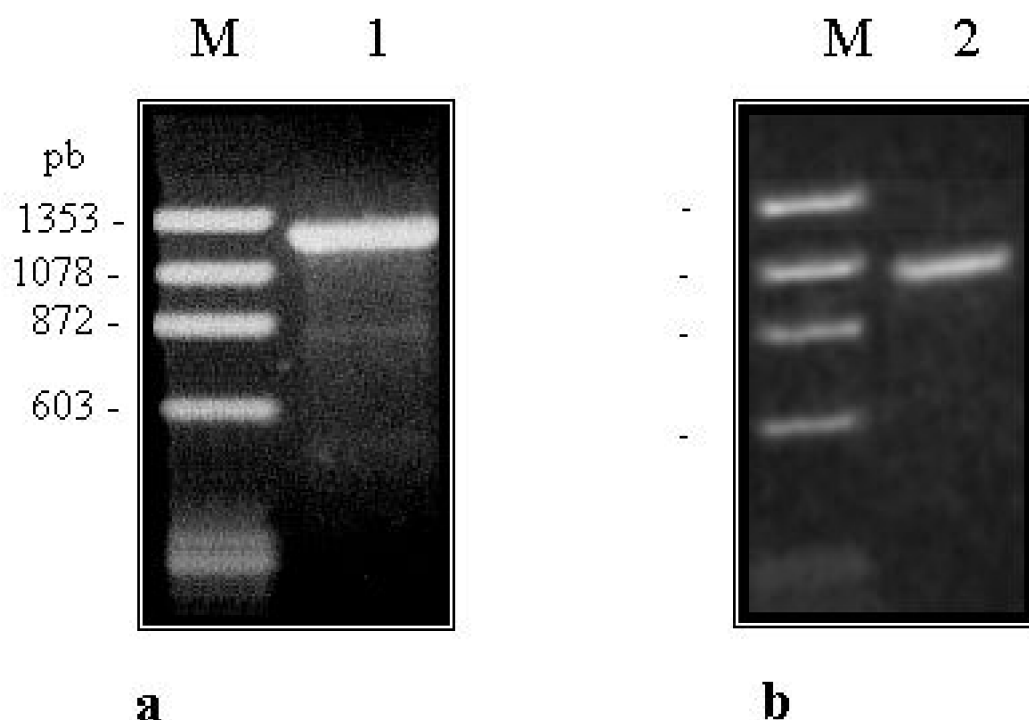


Figura 5. Amplificación de los genes *trpS* de *At. ferrooxidans* y *E. coli*. Los productos de amplificación se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1%, en presencia de bromuro de etidio. (a. carril 1) *trpS* de *At. ferrooxidans*, (b. carril 2) *trpS* de *E. coli* y (M) marcador de tamaño molecular.

2.3. Delección del PC2 de la TrpRS de *At. ferrooxidans*.

Para estudiar la posible funcionalidad del CP2 de la TrpRS de *At. ferrooxidans*, se realizó la delección de la región del gen *trpS* de *At. ferrooxidans* que codifica desde los residuos 176 al 241, con lo cual se eliminó 65 de los 70 aminoácidos que forman parte del PC2. La metodología utilizada se describe en Materiales y Métodos (Fig. 3). Se amplificó por separado las regiones del gen *trpS* que son aledañas a la región que codifica para el posible PC2, generando los megapartidos 1 y 2 (Fig. i6 carriles 1 y 2). Al mezclar ambos productos de amplificación, una fracción de los megapartidos forman un híbrido por el apareamiento producido entre los últimos 16 pb del extremo 3' del megapartido 1 y los primeros 16 pb del extremo 5' del megapartido 2. Luego se sintetizó las hebras complementarias de las regiones no apareadas desde los extremos 3' del híbrido utilizando *Elongasa*, obteniendo el gen delecionado. Por último este producto fue amplificado por PCR utilizando los partidores externos WSTF1 y WSTF2 (Fig. 6 carril 3). El producto de amplificación obtenido fue subclonado en el vector pGEX-2T siguiendo la misma estrategia utilizada para el gen *trpS* silvestre, generando de esta manera el plasmidio pGWSd65.

2.4. Expresión en *E. coli* y purificación de la TrpRS de *At. ferrooxidans*.

El clonamiento de los genes *trpS* en el vector pGEX-2T permite generar para cada construcción, una proteína de fusión entre la TrpRS y la Glutación S Transferasa (GST), que se une en el extremo ámino terminal de la TrpRS.

fig006.jpg

Se transformó la cepa de *E. coli* JM105 con los plasmidios pGWSAf-1, pGWSd65 y pGWSEc-1. Estas transformantes se cultivaron en medio LB y se indujeron con IPTG 0,1mM. Se analizó la expresión de las TrpRS en extractos de proteínas totales por electroforesis en geles de poliacrilamida. Con el pGWSAf-1 se sobreexpresó una proteína de aproximadamente 72 KDa, correspondiente a la masa predicha a partir de la secuencia del producto de fusión entre la TrpRS de *At. ferrooxidans* y la GST (45 y 27 KDa respectivamente, Fig. 7a). Con los plasmidos pGWSd65 y pGWSEc-2 se obtuvo proteínas de 60 KDa, correspondiente a los productos de fusión entre la GST (27 KDa) y las TrpRSd65 o la TrpRS de *E. coli* (38 KDa) (Fig. 7b y 7c respectivamente).

Se observó que más del 90% de las TrpRS y TrpRSd65 de *At. ferrooxidans* sobreexpresadas en *E. coli* eran insolubles. En cambio, la TrpRS de *E. coli* es soluble (en un 100%).

2.5. Purificación de las enzimas.

La purificación de las TrpRS fusionadas a la GST se realizó por cromatografía de afinidad en una columna de glutatión agarosa a partir de las fracciones solubles de los extractos celulares (Fig. i8).

Las TrpRS y TrpRSd65 de *At. ferrooxidans* se obtuvieron a partir de cultivos celulares incubados a 25°C. Cuando los cultivos se incubaban a mayor temperatura, junto con la proteína de fusión se obtenían otras proteínas que pueden corresponder a degradación de las TrpRS silvestre y delecionada. Debido a las condiciones de cultivo utilizadas, se obtuvieron bajos rendimientos de proteínas (0,028 mg por litro de cultivo

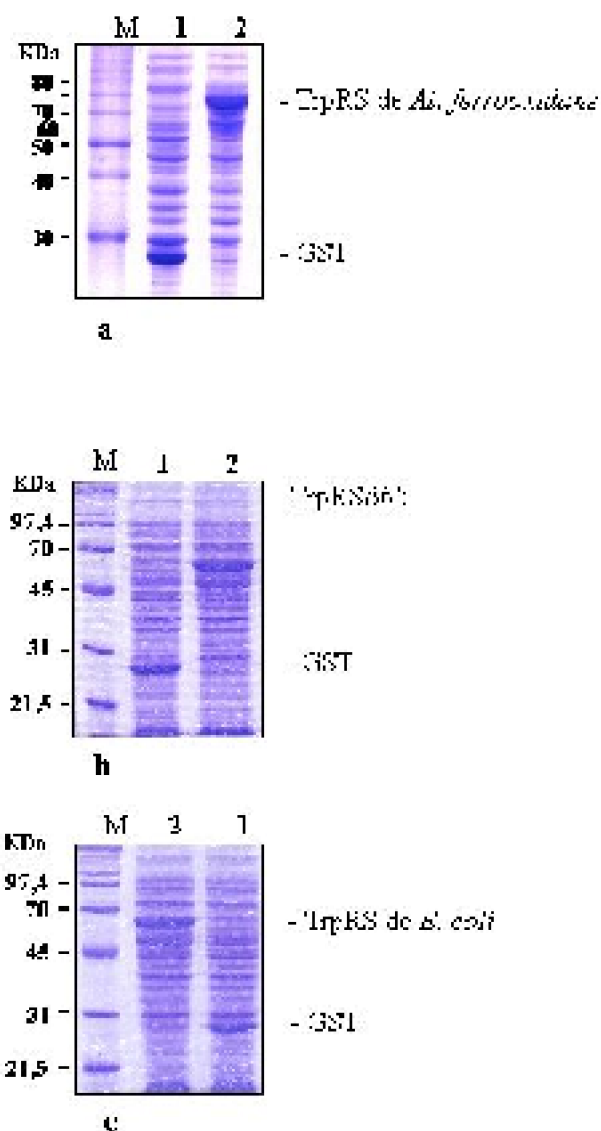
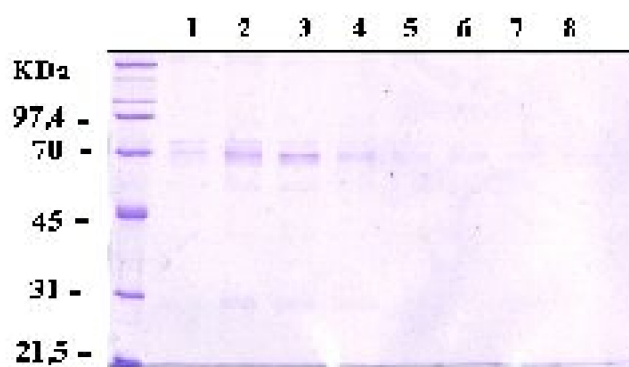
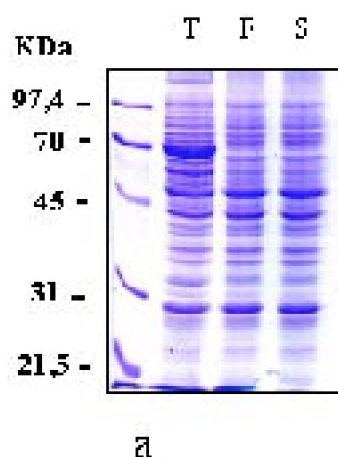


Figura 7. Sobreexpresión de las proteínas de fusión GST-TrpRS. Electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida al 10%. Se muestran extractos totales de las proteínas de *E. i coli* JM105 donde se sobreexpresó (a) la TrpRS de *At. ferrooxidans*, (b) TrpRS deletada y (c) la TrpRS de *E. coli*. Los carriles 1 son extractos de la cepa transformada con el plasmidio pGEX2T. Los carriles 2 son los extractos de la cepa transformadas con los genes recombinantes correspondientes y expresados como proteínas de fusión con la GST.



b

Figura 8. Purificación de la TrpRS de *At. ferrooxidans* (GWSAf). Electroforesis en gels de SDS-poliacrilamida al 10% en la que se muestra la purificación de la proteína GWSAf de *At. ferrooxidans* por cromatografía de afinidad en una columna de glutatión agarosa, proveniente de un cultivo incubado a 25°C en ausencia de IPTG. (a) carril T, fracción de proteínas totales, carril S, proteínas solubles que se cargaron en la columna, carril F fracción de proteínas que no se retuvo en la columna de glutatión agarosa. (b), 1 al 8, fracciones de la elución de la columna de GST- agarosa con glutatión 20 mM.

para la TrpRS silvestre y de 0,024 mg por litro de cultivo para la TrpRS delecionada). En cambio, para la TrpRS de *E. coli*, que se purificó a partir de cultivos de células crecidas a 37°C, el rendimiento obtenido fue de 7,6 mg de proteína por litro de cultivo, 300 veces mayor que para las proteínas de *At. ferrooxidans*.

2.6. Análisis funcional de las TrpRS.

2.6.1. Complementación de una cepa mutante de *E. coli* termosensible para el gen *trpS*.

Para determinar si los genes *trpS* silvestre y delecionado de *At. ferrooxidans* codifican proteínas funcionales, se analizó la capacidad de estos genes de complementar la cepa de *E. coli trp42c*, que posee una mutación termosensible en el gen *trpS*. Se transformó la cepa *trp42c* con los plasmidios pGWSAf-1, pGWSd65, pGTRP y pGEX-2T. Los dos últimos como control positivo y negativo respectivamente.

Luego de transformar las células se analizó la proliferación a la temperatura restrictiva. Se observó que los genes *trpS* silvestre y delecionado fueron capaces de restaurar la proliferación celular a la temperatura restrictiva, no así el pGEX-2T usado como control negativo (Fig. 9). Estos resultados indican que los genes *trpS* y *trpS d 65* codifican triptofanil-tRNA sintetosas funcionales *in vivo* en *E. coli*.

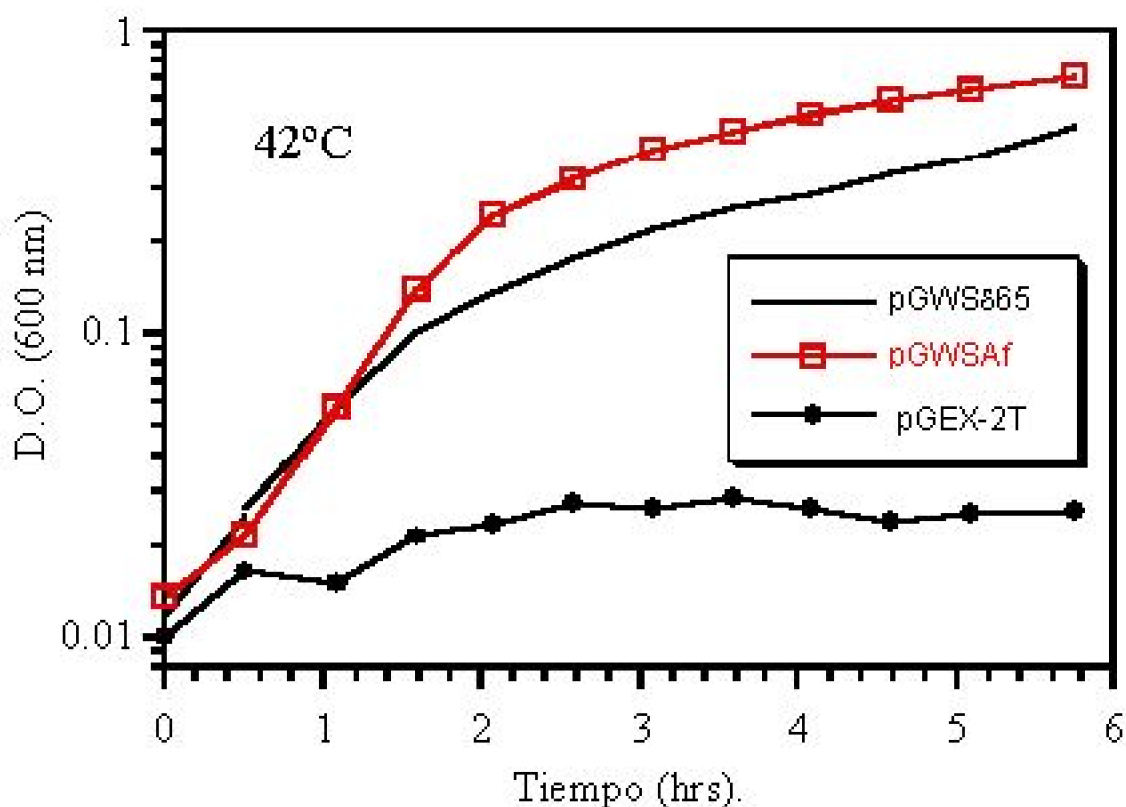


Figura 9. Complementación de una cepa termosensible de *E. coli* con los genes de *trpS* de *At. ferrooxidans*. En el gráfico se muestra la proliferación (densidad óptica v/s tiempo) a temperatura restrictiva de la cepa *trp42c* transformada con los plasmidios pGWSAf, contiene el gen *trpS* silvestre, el pGWSd65 el gen *trpS* delecionado, pGEX2T se utilizado como control negativo.

2.6.2. Determinación de los parámetros cinéticos de las TrpRS.

2.6.2.1. Activación del triptofano.

Se determinó los valores de K_m para triptofano y ATP para las TrpRS y TrpRSd65 de *At. ferrooxidans* y para la TrpRS de *E. coli*. En las figuras 10 a y b se muestra como ejemplo la determinación de K_m para triptofano de la TrpRS de *At. ferrooxidans*. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla III.

En estos resultados se observó que las TrpRS y TrpRSd65 de *At. ferrooxidans* tienen valores de K_m para triptofano similares entre sí. El valor de K_m para ATP para la TrpRSd65 es el doble que para la silvestre. Por otro lado, no hay diferencias significativas en los valores de k_{cat} de ambas enzimas.

Como no se encontró diferencias significativas en los parámetros cinéticos de activación del triptofano entre las TrpRS silvestre y delecionada, se puede concluir que el CP2 de la TrpRS de *At. ferrooxidans* no está involucrado en la unión del triptofano y la deleción de este segmento no altera la conformación del sitio activo.

Para la enzima TrpRS de *E. coli*, utilizada como control experimental, se obtuvo una K_m similar a la descrita (Sever y cols., 1996), lo cual sugiere que la GST fusionada a la enzima no está alterando este parámetro enzimático.

2.6.2.2. Activación del 5-fluor-triptofano.

Con el objeto de determinar si existen diferencias en la especificidad de las TrpRS y TrpRSd65, se analizó la activación del 5-fluor-triptofano (5-F-Trp) un análogo de triptofano (Xu y cols., 1989).

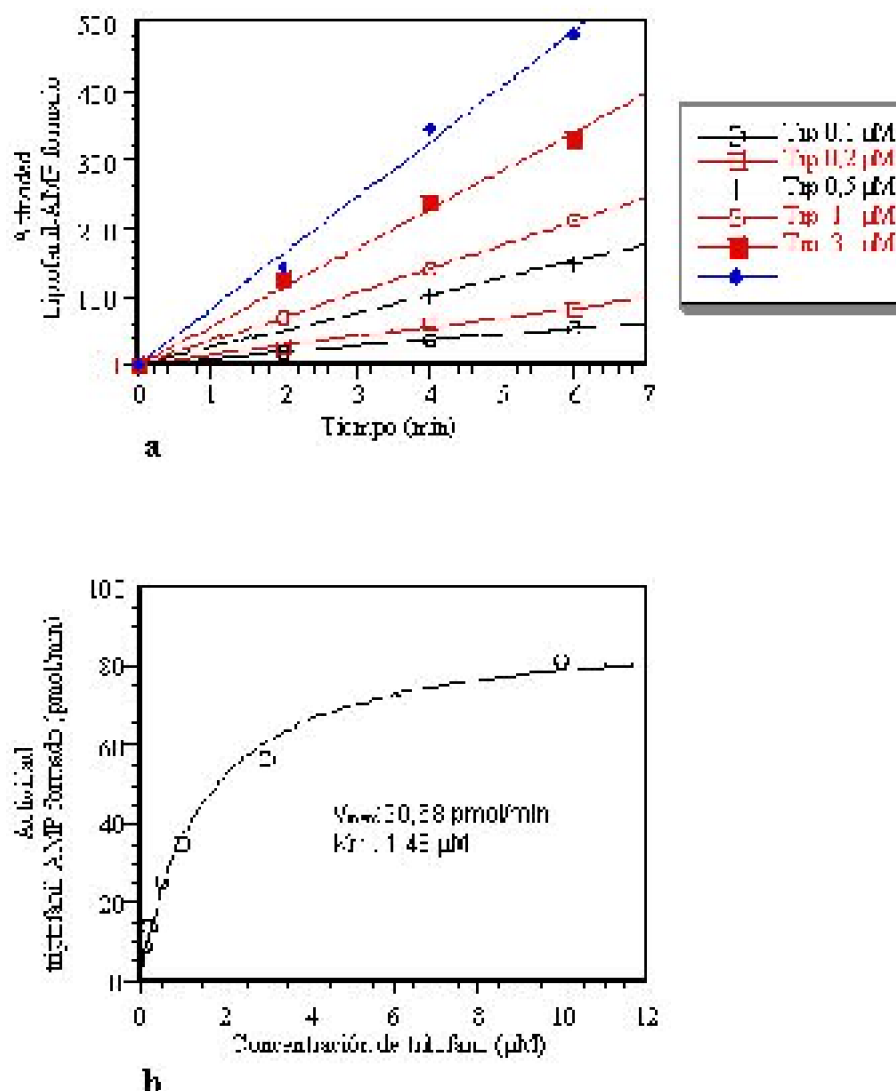


Figura 10. Determinación de la K_m para triptofano de la TrpRS de *At. ferrooxidans*. a) curvas de progreso de la enzima TrpRS con distintas concentraciones de triptofano. b) curva de saturación, se muestra la curva obtenida para la determinación de K_m para triptofano.

Enzima	K_m Trp (μM)	K_m A'LP (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat} / K_m Trp ($s^{-1} \mu M^{-1}$)
TrpRS	1,45	124,8	24,5	16,9
TrpRSd65	1,87	252,8	13,6	7,3
TrpRS Ec	16,81	—	150,6	9,0

Tabla III. Propiedades Cinéticas de las TrpRS para la Activación de Triptofano. Se muestran los valores de las constantes cinéticas de la TrpRS Af (silvestre) y TrpRSd65 (delecionada) de *At. ferrooxidans* y TrpRS Ec de *E.coli* en la activación del triptofano.

Se ha determinado que este análogo es más hidrofóbico que el triptofano (Xu y cols., 1989). Además se determinó que el 5-F-Trp es activado por la TrpRS de *B. subtilis* con una K_m 16 veces mayor a la de triptofano y con una eficiencia catalítica 74 veces menor que para la activación del triptofano. Estos autores proponen que la baja eficiencia de activación del análogo se relaciona con la mayor hidrofobicidad con respecto al triptofano.

Se utilizó la relación de eficiencia catalíticas entre la activación del triptofano y del 5-F-Trp como medida de la especificidad de la enzima por el aminoácido. Se compararon los valores obtenidos entre la TrpRS y la TrpRSd65 de *At. ferrooxidans*, los que se resumen en la Tabla IV.

De los resultados obtenidos se observa que las K_m de las TrpRS y TrpRSd65 para el 5-F-Trp son similares, al igual que las k_{cat} , para la activación de este análogo. Estos resultados indican que la relación entre las eficiencias catalíticas de activación del triptofano y del análogo son similares entre las TrpRS y TrpRSd65.

De estos resultados se concluye que el PC2 de la TrpRS de *At. ferrooxidans* no está participando en la discriminación entre el triptofano y el análogo. Además sugieren que el PC2 no está involucrado en la formación del sitio activo.

2.6.2.3. Aminoacilación del tRNA^{trp}.

Para las determinaciones de K_m para tRNA^{trp} de las TrpRS y TrpRSd65 de *At. i ferrooxidans*, se utilizó como sustrato una preparación de tRNA total de *E. coli*, en que se había sobreexpresado el tRNA^{trp} de *At. ferrooxidans*. La concentración del

Enzima	K_m 5F-Trp (μ M)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat} / K_m 5F Trp ($s^{-1} \mu M^{-1}$)	$\frac{k_{cat} / K_m_{5F-Trp}}{k_{cat} / K_m_{Trp}}$
TrpRS Af	22,71	17,66	0,77	14,61
TrpRSd65	13,47	15,15	1,12	6,04
TrpRS Ec	423,20	78,63	0,18	34,27

Tabla IV. Propiedades Cinéticas de las TrpRS para la Activación del 5-fluoro-triptofano. Se muestran los valores de las constantes cinéticas de la TrpRS Af (silvestre) y TrpRSd65 (delecionada) de *At. ferrooxidans* y TrpRS Ec de *E.coli* en la activación del análogo 5-fluoro-triptofano (5F-Trp). Se determinó las K_m para triptofano, la constante catalítica (k_{cat}). Se calculó la eficiencia catalítica (k_{cat} / K_m) para la activación del análogo y se comparó y se comparó con la eficiencia catalítica para la activación del triptofano por el cociente entre ambas eficiencias catalíticas (última columna).

$tRNA^{trp}$ en el extracto era de 1,8 mM, determinada por la cuantificación de triptofanil-tRNA^{Trp} radiactivo formado en una reacción de aminoacilación (al utilizar [³H] Trp), en concentraciones limitantes de $tRNA^{trp}$ y saturantes de triptofano. Los valores obtenidos se resumen en la Tabla V.

De estos resultados se observa que la K_m para $tRNA^{trp}$ de la TrpRSd65 es siete veces mayor que la determinada para la TrpRS de *At. ferrooxidans*, sin embargo, no se encontró diferencias en las k_{cat} para la aminoacilación del $tRNA^{trp}$ entre ambas enzimas.

De estos resultados se concluye que el PC2 de la TrpRS de *At. ferrooxidans* está involucrado en la unión del $tRNA^{trp}$ a la enzima, sin embargo, no está involucrado en la catálisis de la reacción de aminoacilación del $tRNA^{trp}$.

3. Modelaje de la TrpRSd65 de *At. ferrooxidans*.

Para este modelaje se utilizó la secuencia de la TrpRSd65 y se utilizó como referencia la estructura de la TrpRS de *B. stearothermophilus*, determinada por cristalografía de rayos X con una resolución de 2,9 Å (Ilyin y cols., 2000). Se utilizó una estrategia de modelaje manual y se trabajó con el programa Insight II / Homology.

3.1. Alineamiento de secuencias y asignación de coordenadas atómicas.

Del alineamiento de secuencias de la TrpRSd65 y la TrpRS de *B. i stearothermophilus* se observó que estas enzimas tienen un 50% de identidad de aminoácidos y un 70% similitud de aminoácidos funcionalmente conservados. Sobre la base de este alineamiento se definieron nueve regiones conservadas y ocho regiones

Enzima	K_m (tRNA ^{trp}) (μ M)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat} / K_m (tRNA ^{trp}) (μ M ⁻¹ s ⁻¹)
TrpRS Af	0,31	3,17	10,2
TrpRSd65	2,12	2,22	1,1
TrpRSEc	0,62	13,9	22,4

Tabla V. Propiedades cinéticas de las TrpRS para la aminoacilación del tRNA^{trp}. Se muestran los valores de las constantes cinéticas para la TrpRS Af (silvestre) y TrpRSd65 (delecionada) de *At. ferrooxidans* y TrpRSEc de *E.coli* en la aminoacilación del tRNA^{trp}.

variables, las cuales se muestran en la Fig. 11. A las regiones conservadas de la TrpRSd65 se les asignó las coordenadas atómicas de la estructura de la TrpRS de *B. stearothermophilus*. A las regiones variables se les asignó las coordenadas atómicas de estructuras tipo vuelta presentes en las bases de datos de estructura, según lo descrito en Materiales y Métodos.

3.2. Optimización de la geometría del modelo para la TrpRSd65.

Antes de comenzar la optimización del modelo de la TrpRSd65, se calculó que el modelo tenía una energía potencial inicial de $1,0 \times 10^{11}$ kcal/mol Å y una gradiente energética de $2,8 \times 10^{10}$. En el proceso de optimización de la enzima se realizaron 15 ciclos para los enlaces de la cadena principal y se prosiguió con 60 ciclos para la estructura completa, según los parámetros indicados en Materiales y Métodos. Luego de la optimización se llegó a una energía potencial de 323 kcal/mol Å y una gradiente de 3,6. La estructura obtenida luego de la optimización se muestra en la figura 12.

3.3. Evaluación del modelo TrpRSd65.

Para determinar la validez del modelo estructural de la TrpRSd65 se realizaron diversos análisis de la estructura obtenida.

3.3.1. Desviación estructural del modelo con respecto a la estructura de referencia.

La RMSD del modelo TrpRSd65 luego de la optimización con respecto a la estructura de la TrpRS de *B. stearothermophilus* fue de 0,517 Å. Esto indica que la estructura del modelo optimizado tiene una estructura similar a la TrpRS de referencia.



Figura 11. Alineamiento de secuencia de aminoácidos de las TrpRS de *B. stearothermophilus* (D2R_A) y TrpRSd65 de *At. ferrooxidans*. La figura muestra el alineamiento de secuencias utilizado para la asignación de coordenadas del modelo TrpRSd65. Las regiones C1 a la C9, representan las cajas conservadas; V1 a V8, representan las regiones variables.

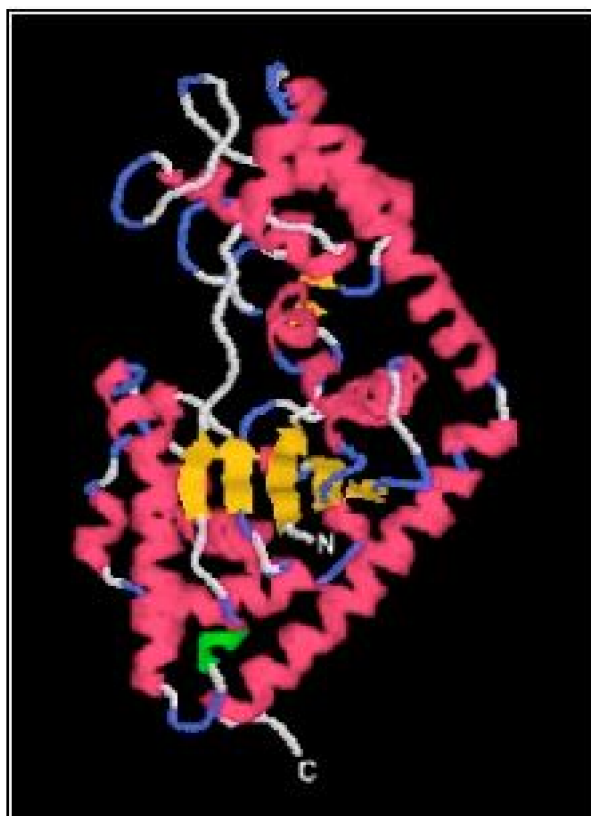


Figura 12. Modelo de la estructura de la TrpRSd65. En color verde se señalan los residuos 175 y 176, que corresponden a la posición del PC2E.

3.3.2. Evaluación de la geometría estructural del modelo TrpRSd65.

El análisis de la estructura del modelo optimizado se realizó con el programa PROCHECK y se obtuvieron los siguientes resultados:

A. Los ángulos phi y psi de los residuos del modelo fueron clasificados porcentualmente en las siguientes regiones según su capacidad de formar estructuras secundarias (Fig 13). El porcentaje de residuos que están en regiones favorables para la formación de estructuras secundarias es cercano al 90% esperado para un buen modelo.

B. Porcentaje de residuos que presenta distorsiones con respecto a los valores promedios en:

- Grupos planares 18,12%
- Ángulos de enlaces 7,25%
- Longitud de enlaces 9,66%

3.3.3. Sobreposición de estructuras secundarias.

Se evaluó la similitud estructural de la estructura del modelo TrpRSd65 con respecto a la estructura de la TrpRS de *B. stearrowthermophilus*, se comparó la desviación espacial que

Para evaluar si el modelo de la TrpRSd65 tiene una conformación similar a una enzima funcional, se evaluó la distancia entre algunos residuos del modelo que tendrían un papel funcional.

Para este análisis, se midió las distancias de separación entre residuos de la TrpRS de *B. stearothermophilus* que están involucrados directamente en la interacción con el intermediario triptofanil-AMP y se comparó con las distancias de separación de los residuos equivalentes en la estructura del modelo TrpRSd65. Para ello se utilizó el programa HyperChem versión 3.06, con el que se midió las distancias entre los carbonos

a de cada par de residuos elegidos. Los residuos elegidos y las distancias determinadas se muestran en la Tabla VII.

Las mediciones realizadas indican que los residuos analizados en la TrpRSd65 tienen distancias de separación muy parecidas a las presentes en la TrpRS de *B. i stearothermophilus*. Esto sugiere que el sitio activo del modelo tiene una

Nº.E	TrpRSd65	TrpRS <i>B. st</i>	Comparación		
	Inicio - fin	Inicio - fin	ángulo	dist.	RMSD
	(°)	(Å)	(Å)		
1-3a	7 - 9	8 - 9	8.0	0.2	0.4
2-6a	17 - 22	16 - 21	1.5	0.1	0.2
11-6a	44 - 51	20 - 22	11.7	1.1	4.1
13-3a	35 - 40	34 - 39	0.3	0.1	0.4
3-6a	53 - 63	51 - 68	1.0	0.0	0.9
5-7a	70 - 81	76 - 79	2.2	0.0	0.4
7-6a	87 - 93	85 - 94	2.6	0.2	2.3
8-6a	101 - 105	99 - 103	1.5	0.1	0.7
9-6a	109 - 115	107 - 111	16.0	1.0	1.7
10-6a	126 - 139	121 - 134	33.2	0.2	11.8
11-6a	131 - 139	121 - 134	8.3	0.2	5.3
12-3a	114 - 117	140 - 142	1.1	0.3	0.3
13-6a	153 - 162	148 - 165	1.9	0.2	1.0
14-7a	182 - 184	173 - 175	1.8	0.1	0.3
15-6a	213 - 222	210 - 219	1.5	0.0	0.1
16-6a	241 - 254	236 - 249	1.0	0.1	0.4
17-6a	270 - 274	250 - 259	1.1	0.0	0.0
18-6a	277 - 286	265 - 291	1.4	1.1	1.8
20-6a	304 - 323	295 - 322	2.1	0.6	3.3

Tabla VI. Alineamiento de estructuras secundarias del modelo de la TrpRSd65 y la TrpRS

de *B.stearothermophilus* (*B.st*). *TrpRSd65*, modelo de la *TrpRSd65*, *TrpRSB.st*, *TrpRS* de *B.stearothermophilus*; *Nr.E*, estructuras secundaria sobrepuestas; *a*, hélices *a*; *b*, sábana *b*, inicio-fin, residuos inicial y final de cada par de estructuras sobrepuestas, ángulo, ángulo de desviación entre las estructuras sobrepuestas, *dist*, distancia de separación entre las estructuras sobrepuestas, *RMSD*, desviación de la raíz de los cuadrados medios de los átomos de la cadena principal entre las estructuras sobrepuestas.

<i>TrpRS B.stearothermophilus</i>		<i>TrpRS65</i>	
Residuos	distancia (Å)	Residuos	distancia (Å)
Lis 195 - Met 129	21,10	Lis 201 - Met 134	21,07
Asp 132 - Asn 18	21,67	Asp 137 - His 13	21,70
Tyr 125 - Asn 18	24,77	Tyr 130 - His 13	24,77
Lis 195 - Asn 18	8,69	Lis 201 - His 13	8,99

Tabla VII. Comparación de la separación de residuos que están involucrados en la interacción con el aminoacil-AMP entre la *TrpRS* de *B.stearothermophilus* y la *TrpRSd65*. En la tabla se muestran los pares de residuos y la separación entre sus carbonos α . Los residuos Lis 195, Met 129, Asp 132, Asn 18 y Tyr 125 de la *TrpRS* de *B.stearothermophilus* interaccionan directamente con el intermediario triptofanil-AMP. Mediante un alineamiento de secuencias se identificaron los residuos equivalentes en la *TrpRSd65* y se comparó la distancia de separación de estos residuos en ambas estructuras.

conformación similar al de enzima de *B. stearothermophilus*. Por lo que la estructura del modelo *TrpRSd65* posiblemente corresponde a la estructura de la enzima activa.

4. Identificación de secuencias similares a los PC2 de la *TrpRS*.

4.1. Secuencias homólogas al PC2 de la *TrpRS* de *At. ferrooxidans*.

Con el objeto de predecir la estructura terciaria del PC2 de la *TrpRS* de *At. i ferrooxidans*, se identificó estructuras de proteínas que presenten similitud de secuencia con este segmento de la *TrpRS*. Para esta búsqueda se utilizó el programa Psi-Blast. Este programa está basado en Blast 2.0, el que permite mejorar la matriz de puntuación de los alineamientos de secuencias luego de cada búsqueda. De esta manera aumenta la sensibilidad de la búsqueda, identificando secuencias que tienen menor similitud con la secuencia usada como molde. Se utilizó la matriz de puntuación Blosum 45.

En una primera de búsqueda, se encontró una secuencia homologa de 66

aminoácidos presente en la cadena b de la deshidrogenasa E1 (deshidrogenasa de la cadena de ácidos cetónicos) de *Streptomyces coelicolor*. El alineamiento tenían un

valor de expectación (probabilidad que se parezcan por azar) de 3×10^{-18} , una identidad de 33% (22/66), una similitud de 54% (36/66) y un 3% de inserciones y deleciones (2/66) (Fig. 14a). El valor de expectación y el porcentaje de identidad entre ambas secuencias sugieren que existe homología entre ambas secuencias. Sin embargo, no se conoce la estructura terciaria de esta enzima.

```

At.ferr : 174 ADAPTLDGKFLVNIHSAAK--TFRSLLEKQLDLDLQVSGGCFMHHJAHGAKYFL 211
          ADAP + + I+V+ - - F - L ++ + C CA VILG A ++A + F+
S.coel : 222 ADADLHGRLEVVDLRSLSPTDITTCASVEKTFRLIVVHEAPVFLGSGAELARITF 261

At.ferr : 232 LLKLE 237
          HLE
S.coel : 282 LKVEF 330
    
```

Valor de expectación = 3×10^{-18} , Identidad = 22/66 (33%), similitud = 36/66 (54%), inserciones y deleciones (gaps) = 2/66 (3%)

a)

```

At.ferr : 77 AAHQVREILVYRRAA KFRSLHJHQLDLDLQVSGGCFMHHJAHGAKYFL 113
          AA I+V I+ I - I I I I + G G A H I I I E
D.put : 237 AAEKSGVDAEVIDLRSLVPLDLDLTVESVDTTGRVWVHEATKCGFGAELFSLVQEHF 295

At.ferr : 204 HLE 205
          HLE
D.put : 229 HLE 230
    
```

Valor de expectación = 3×10^{-6} , Identidad = 15/64 (23%), Similitud = 22/64 (34%), inserciones y deleciones (gaps) = 2/64 (3%)

b)

Figura 14. Alineamiento del PC2 de la TrpRS de *At. ferrooxidans* con deshidrogenasas. (a) alineamientos con la Deshidrogenasa E1 de *Streptomyces coelicolor*. (b) alineamiento con la Deshidrogenasa E1 de *Pseudomonas putida*.

Con la nueva matriz de puntuación se encontró similitud con una gran cantidad de deshidrogenasas. De las proteínas encontradas se conoce la estructura tridimensional de la deshidrogenasa E1 de *Pseudomonas putida* (código pdb 1QS0). Estas secuencias tenían un valor de expectación de 3×10^{-6} , una identidad de 23% (15/64), una similitud de

43% (28/64) y un 3% de inserciones y deleciones (2/64) (Fig. 14b).

La estructura del segmento de la deshidrogenasa E1 que es homólogo al PC2, presenta dos hojas b plegadas paralelas que están separadas por hélices a (Fig. 15). Este par de hojas b plegadas se encuentra inserta en un dominio estructural similar al plegamiento de Rossmann.

La similitud encontrada entre el PC2 y la deshidrogenasa E1 de *S. coelicolor*, sugiere que existe homología entre ambas enzimas. Esto podría significar que las porciones homólogas de ambas enzimas podrían tener conformaciones similares. Sin embargo, la baja similitud encontrada entre el PC2 y la deshidrogenasa E1 de *P. putida* no es suficientemente alta para construir un modelo confiable del PC2 de la TrpRS de *At. ferrooxidans*.

4.2. Similitud de los PC2 de las TrpRS de arqueas.

Al buscar secuencias homologas a los PC2 de las TrpRS de arqueas, se encontró que el PC2 de la TrpRS de *Halobacterium sp*, tiene similitud con una deshidrogenasa de la acetil-CoA de *Mycobacterium tuberculosis*, con un 27% de identidad y 44% de similitud. Por lo que se podría suponer que existe homología con el PC2 de la TrpRS de *At. ferrooxidans*, que también tiene similitud con una deshidrogenasa. Sin embargo, el valor de expectación para este alineamiento fue de 0,53, lo que indican que existe mucha probabilidad que el parecido de ambas secuencias son producto del azar.



Figura 15. Posible estructura del PC2 de la TrpRS de At. ferrooxidans. En la figura se muestra la estructura del segmento de la deshidrogenasa E1 de S. coelicolor que es homólogo al PC2 de la TrpRS de At. ferrooxidans.

DISCUSIÓN

Identificación de la TrpRS de *At. ferrooxidans*.

En este trabajo se identificó el gen que codifica para la triptofanil tRNA sintetasa de *At. ferrooxidans*. La secuencia de aminoácidos codificada por este gen es similar a las TrpRS de bacterias, sin embargo, se diferencia en que esta enzima presenta un segmento interno de 70 aminoácidos que no está presente en la mayoría de las TrpRS conocidas.

Se conoce la estructura terciaria de la TrpRS de *B. stearrowthermophilus* (Ilyin y cols., 2000). La comparación de las secuencias de las TrpRS de *At. ferrooxidans* y *B. i stearrowthermophilus* sugiere que el segmento de 70 aminoácidos forma parte del péptido conector 2 (PC2). El PC2 corresponde a una región de las aaRS de clase I, cuya secuencia es de tamaño variable, de la que se desconoce su función. Este péptido conector no ha sido descrito en otras TrpRS de bacterias. No obstante lo anterior, se encontró que las TrpRS de algunas arqueas pertenecientes al subdominio de las Euriarchaeotas también tienen un PC2, el que no ha sido encontrado en las TrpRS de otros subdominios de arqueas. El tamaño de estos PC2 es variable en estas últimas enzimas, los que van de los 57 aminoácidos, en el caso de *Archaeoglobus fulgidus*, hasta los 130 aminoácidos, en el caso de *Halobacterium sp.*

El modelaje de la TrpRS de *At. ferrooxidans*.

La similitud de las secuencias de la TrpRS de *B. stearrowthermophilus* y la TrpRSd65 permitió realizar la construcción un modelo de la estructura tridimensional de la TrpRS de *At. ferrooxidans*.

El análisis del modelo obtenido indica que su estructura es similar a la estructura de la TrpRS de *B. stearrowthermophilus* libre de ligando. Los residuos que presentan ángulos phi y psi favorables para la formación de estructuras secundarias, ya sea estructuras tipo hélices a, hojas b o vuelta alcanza al 83%, que es cercano al 90% esperado para un buen modelo. Además, la estructura no presenta grandes desviaciones con respecto a la estructura de la TrpRS de *B. stearrowthermophilus*, obteniendo una desviación de RMSD para los átomos de la cadena principal de solo 0,58 Å. Por otro lado, el modelo tiene un sitio activo similar al de la TrpRS de *B. stearrowthermophilus*, donde las distancias de separación entre residuos del modelo que posiblemente están involucrados en la interacción con el intermediario triptofanil-AMP, son similares a los de la estructura de referencia.

Las principales diferencias entre el modelo y la estructura de referencia se encontraron en la región correspondiente al PC1 de la TrpRS de *At. ferrooxidans*. En esta región los elementos de estructura secundaria (hélices a y hojas b) adoptan orientaciones levemente distintas a las determinadas para la TrpRS de *B. stearrowthermophilus*. Junto con lo anterior, la región ubicada entre el punto de delección del PC2 y la secuencia señal KMSKS, comprende una región que concentra una gran proporción de los residuos cuyos ángulos de enlace phi y psi son desfavorables para la formación de estructuras secundarias. Posiblemente esto se debe a que la estructura de esta región de la TrpRS de *At. ferrooxidans* está determinada por la presencia el PC2, el que no está presente en este modelo.

Posible estructura del PC2.

Se encontró que el PC2 de la TrpRS de *At. ferrooxidans* tiene similitud con una porción de la deshidrogenasa E1 de *Streptomyces coelicolor*, con un 33% de identidad de aminoácidos y 54% de similitud de aminoácidos funcionalmente conservados, de la que no se conoce su estructura terciaria. Sin embargo, se conoce la estructura de la deshidrogenasa E1 de *Pseudomonas putida*. La región de esta última deshidrogenasa que es similar al PC2, presenta dos hojas b paralelas que se insertan en el plegamiento de Rossmann de esta deshidrogenasa. La similitud de secuencias de aminoácidos del PC2 y la dehidrogenasa E1 de *P. putida* no es suficiente para realizar un buen modelo de su estructura tridimensional. No obstante, la similitud del PC2 con la deshidrogenasa E1 de *Streptomyces coelicolor* permiten suponer que este péptido conector tiene una

estructura similar a estas enzimas.

Función del PC2 de la TrpRS de *At. ferrooxidans*.

Para estudiar el papel del PC2 de la TrpRS de *At. ferrooxidans*, se eliminó la región que codifica para el PC2 en el gen *trpS*. Tanto el gen silvestre como el delecionado fueron expresados en *E. coli* como proteína de fusión con la GST para facilitar su purificación.

Los ensayos de complementación indicaron que el producto de los genes *trpS* de *At. i ferrooxidans* silvestre y delecionado son capaces de complementar la mutación termosensible del gen *trpS* de la cepa *trp42c* de *E. coli*. Estos resultados indicaron por un lado, que el producto del gen *trpS* de *At. ferrooxidans* es funcional *in vivo* al ser expresado en *E. coli*. Esto implica además, que el producto de este gen es capaz de utilizar el tRNA^{trp} de esta bacteria como sustrato. Junto con lo anterior, la complementación con el gen *trpS* delecionado indica que su producto también es funcional *in vivo*, por lo cual, la deleción realizada no inactiva la enzima, sugiriendo que el PC2 de la TrpRS de *At. ferrooxidans* no es esencial para su actividad enzimática.

No obstante lo anterior, los ensayos de complementación no permiten detectar posibles diferencias funcionales entre la TrpRS silvestre y la delecionada, ya que en este tipo de ensayos con muy poca actividad enzimática se puede lograr complementación. Para determinar si existen diferencias entre ambas enzimas, se estudió los parámetros cinéticos de activación de triptofano y de aminoacilación del tRNA^{trp}.

Para realizar los ensayos cinéticos se expresaron las TrpRS y TrpRSd65 de *At. i ferrooxidans* en *E. coli* como proteínas de fusión con la GST. Considerando que en los ensayos de complementación, las enzimas se expresaron como proteínas de fusión, se supuso que las enzimas funcionales *in vivo* correspondía a la enzima fusionada. Además, la Km obtenida para la TrpRS de *E. coli* fusionada a la GST para triptofano, fue similar a la descrita en literatura para la enzima no fusionada (Sever y cols., 1996), lo que sugiere que la presencia de la GST no altera los parámetros cinéticos de la TrpRS. En base a estos antecedentes, se decidió trabajar con estas enzimas sin eliminar la GST.

Una de las principales dificultades para la purificación de estas enzimas fue su tendencia a formar cuerpos de inclusión y a degradarse durante su purificación. Para disminuir estos efectos se trabajó a bajas temperaturas de cultivo y sin inducción de la expresión de estos genes. Sin embargo, en estas condiciones de cultivo se obtuvieron bajos rendimientos de proteínas purificada.

De los análisis cinéticos se determinó que la deleción del PC2 no altera la Km de la TrpRS de *At. ferrooxidans* para triptofano y ni para ATP durante la activación del aminoácido. Estos resultados indican que el PC2 no está involucrado en la unión del triptofano ni del ATP. Por otro lado, tampoco hubo diferencias entre las k_{cat} de ambas enzimas para la activación del triptofano, lo que indica que el PC2 no está involucrado en la catálisis de la reacción en esta etapa.

La TrpRS de *B. subtilis* es capaz de activar el 5-fluoro-triptofano. Sin embargo, esta

enzima es 74 veces más eficiente para la activación del triptofano que para el análogo (Xu y cols., 1995). La TrpRS de *At. ferrooxidans* es solo 14 veces más eficiente, por lo que sería una enzima menos específica para el aminoácido que la TrpRS de *B. subtilis*. Al comparar la activación del 5-fluoro-triptofano por las TrpRS silvete y delecionada de *At. ferrooxidans* se observó que ambas enzimas activan el análogo con la misma eficiencia, ya que no encontraron diferencias en las K_m para el 5-fluoro-triptofano, ni en las k_{cat} para su activación. Esto confirma que la deleción no altera la conformación del sitio activo de la enzima.

Recientemente, se obtuvo una cepa de *E. coli* auxotrófica para triptofano que es capaz de proliferar en presencia de 99,97% de 4-fluoro-triptofano (Bacher y cols., 2001). Se demostró que la TrpRS de esta cepa adquirió una mutación puntual que le otorgó un aumento en la especificidad por triptofano con respecto al análogo, ya que disminuye la K_m para triptofano y aumenta la K_m para el análogo. El residuo mutado en la TrpRS de *E. coli* (Q109 por P) se ubica muy cerca al sitio activo. La ubicación de esta mutación sugiere que la especificidad por el aminoácido radica en la interacción del aminoácido con el sitio activo. Estos antecedentes y los resultados obtenidos con la enzima delecionada, sugieren que el PC2 no está involucrado en la especificidad del TrpRS de *At. ferrooxidans* por el aminoácido.

El PC2 de la TrpRS participa en la unión al tRNA^{trp}.

Si bien la deleción del PC2 de la TrpRS de *At. ferrooxidans* no altera los parámetros para la activación del triptofano, se observó un aumento de siete veces de la K_m para el tRNA^{trp}, en la reacción de aminoacilación. Este aumento en la K_m sugiere que el PC2 de la TrpRS de *At. ferrooxidans* está participando en la unión del tRNA^{trp}. Junto con lo anterior, la deleción del PC2 no altera la k_{cat} para la aminoacilación del tRNA. Esto sugieren, al igual que los datos obtenidos para activación del aminoácido, que la deleción no altera la conformación del sitio activo de la enzima.

La participación del PC2 en la interacción de la enzima con el tRNA, se puede deber a una interacción directa del péptido conector con el tRNA. Sin embargo, también puede ocurrir el PC2 esté determinando cierta conformación de la enzima o bien, cierta distribución de cargas en su interior, que podrían favorecer la unión del tRNA^{trp}.

Los datos cinéticos indican que la deleción del PC2 no afecta al sitio activo de la enzima, lo que indica que el PC2 no forma parte del sitio activo. Sin embargo, el modelo de la TrpRS delecionada de *At. ferrooxidans* indica que el punto de deleción del péptido conector se ubica en el dominio de activación del aminoácido cercano al sitio activo. El brazo aceptor de los tRNA interacciona con este dominio de las sintetasas de clase I. Este brazo del tRNA contiene las bases discriminadoras adyacentes al CCA. Es posible que el PC2 interaccione con el brazo aceptor del tRNA^{trp}.

Si el PC2 posee la estructura propuesta de hojas β paralelas encontrada en la deshidrogenasa E1, podría formar parte del pliegue de Rossmann. No obstante, en la

estructura determinada para la IleRS de *Staphylococcus aureus* se puede observar que el PC2 adopta una conformación completamente independiente de este patrón de plegamiento (Sivian y cols., 1999). Por lo anterior, no es posible predecir la conformación que adopta el PC2 en las TrpRS de *At. ferrooxidans*.

Origen del PC2 en la TrpRS.

La escasa similitud de secuencias de aminoácidos entre los PC2 de las TrpRS de *At. ferrooxidans* y de arqueas, no permiten determinar si estos péptidos tienen el mismo origen filogenético. Sin embargo, es interesante la similitud que existe entre los PC2 de las TrpRS de *At. ferrooxidans* y *Halobacterium sp.* con deshidrogenasas, debido a que se ha descrito que la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de células de humano tiene una actividad de unión específica a tRNA (Nagy y cols., 1995). Esta unión es inhibida por la presencia de NAD, sugiriendo que el pliegue de Rossmann está involucrado en esta actividad. Dada la participación del PC2 de la TrpRS de *At. ferrooxidans* en la unión al tRNA^{trp}, cabe la posibilidad que el PC2 de las TrpRS sea un remanente de un enzima ancestral que unen nucleótidos. De esta manera, los PC2 encontrados en las TrpRS de *At. ferrooxidans* y arqueas pudieron estar presente en el ancestro común de las TrpRS.

Comparaciones estructurales y filogenéticas entre las TrpRS y TyrRS sugieren que ambas enzimas han divergido desde un ancestro común relativamente cercano. Si el PC2 de las TrpRS estaba presente en una TrpRS ancestral, también debió estar presente en el ancestro común de las TrpRS y TyrRS. El PC2 pudo estar relacionado con el reconocimiento de los tRNA de ambas enzimas para realizar la aminoacilación con su aminoácido específico. Esta función habría perdido importancia una vez ocurrida la divergencia entre TrpRS y TyrRS, ya que cada enzima habría adquirido determinantes propios para la unión de su tRNA específico, llevando a la progresiva eliminación del PC2.

Junto con lo anterior, las descripciones de la función del PC1 de algunas aaRS, en las que se ha visto que este péptido conector puede cumplir distintos papeles en el reconocimiento del aminoácidos (Nureki y cols., 1998) o del tRNA (Wakasugi y cols., 1998), abre la posibilidad de que el PC2 haya cumplido funciones similares en las aaRS de clase I ancestrales.

El modelaje de la TrpRS_{d65} sugiere que la ausencia del PC2 de *At. ferrooxidans*, no altera la estructura del resto de la enzima. Esta situación podría ser similar a lo descrito en la IleRS de *E. coli*, donde la eliminación de gran parte del PC1 no elimina la actividad de la enzima (Starzyk y cols., 1987). Por lo cual, a pesar de cumplir un papel en la discriminación del aminoácido, el PC1 no es esencial para la actividad de la enzima.

Una posibilidad distinta que pudiera explicar la presencia del PC2 en las TrpRS de *At. ferrooxidans* y de algunas arqueas, es que este segmento de la enzima sea el resultado de una inserción en el gen *trpS*. La conservación en la actividad de aminoacilación del tRNA luego de la delección del PC1 (IleRS de *E. coli*) o PC2 (TrpRS de *At. ferrooxidans*) sugiere que ambos péptidos conectores de las aaRS de clase I se ubican en regiones que podrían tolerar inserciones sin alterar la estructura básica de la

enzima. Donde la adquisición de alguna ventaja para la enzima, pudo determinar la conservación de los péptidos conectores incorporados.

El origen del PC2 de la TrpRS de *At. ferrooxidans* puede ser estudiado por el análisis más detallado de las relaciones filogenéticas entre los PC2 presentes en las TrpRS. Junto con ellos, se podría determinar su relación filogenética con los PC2 presentes en las demás aaRS de clase I.

CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en esta tesis se puede concluir lo siguiente:

El producto del gen *trpS* de *At. ferrooxidans* complementa una mutación termosensible en el gen *trpS* de *E. coli*, por lo que se concluye que el *trpS* de *At. ferrooxidans* codifica para una triptofanil tRNA sintetasa funcional.

El análisis del modelo de la TrpRS de *At. ferrooxidans* sugiere que la enzima delecionada tiene una estructura similar a la TrpRS de *B. stearothermophilus*. Esto sugiere que la ausencia del PC2 no altera la estructura de las regiones de la enzima que son más conservadas entre las TrpRS.

El producto del gen *trpS* delecionado, también es capaz de complementar la mutación termosensible en el gen *trpS* de *E. coli*, por lo cual la deleción del PC2 no inactiva la enzima.

El PC2 tiene similitud de secuencia de aminoácidos con una porción de la deshidrogenasa E1 que forma parte de plegamiento de Rossmann de esta enzima. La similitud entre ambas secuencias permite suponer que el PC2 de la TrpRS de *At. i ferrooxidans* tiene una estructura terciaria de hojas β paralelas, similar al de esta deshidrogenasa.

La deleción del PC2 de la TrpRS de *At. ferrooxidans* no altera la activación del triptofano, la del su análogo 5-fluoro-triptofano ni la k_{cat} para tRNA^{trp}. Esto indica que el PC2 no está involucrado en la unión del aminoácido y la deleción no altera el sitio activo de la enzima.

Los datos de complementación y cinéticos indican que el PC2 de la TrpRS de *At. i ferrooxidans* es prescindible para la aminoacilación del tRNA.

El aumento de la K_m para tRNA^{Trp} indican que la TrpRS delecionada tiene menor afinidad por este sustrato que a enzima silvestre. Sugiriendo que el PC2 de la TrpRS de *At. ferrooxidans* está involucrado en la unión al tRNA^{Trp}.

BIBLIOGRAFA

- Aiyar, A. y Leis, J. 1993. Modification of the megaprimer methods of PCR mutagenesis: improved amplification of the final product. *Biotechniques*. 14: 366-368.
- Bacher, J. y Ellington, A. 2001. Selection and characterization of *Escherichia coli* variants capable of growth on an otherwise toxic tryptophan analogue. *J. Bacteriol.* 183: 5414-5425.
- Bohman, K y Isaksson, L. 1978. Mutations in the tryptophanyl-transfer ribonucleic acid ligase of *E. coli* causing temperature-sensitivity for growth. *Molec. Gen. Genet.* 161: 285-289.
- Brick P., Bhat, T. y Blow, D. 1989. Structure of tyrosyl-tRNA Synthetase refined at 2.3 Å resolution, interaction of the enzyme with the tyrosyl adenylate intermediate. *J. Mol. Biol.* 208: 83-98.
- Brown J., Robb, F., Weiss, R. y Doolittle, F. 1997. Evidence for the early divergence of tryptophanyl- and tyrosyl-tRNA Synthetases. *J. Mol. Evol.* 45: 9-16.
- Brunie, S., Zelwer, C. y Risler, J. 1990. Crystallographic study at 2.5 Å resolution of the interaction of methionyl-tRNA synthetase from *Escherichia coli* with ATP. *J. Mol. Biol.* 216: 411-424.
- Burbaum, J. y Schimmel, P. 1991. Structural relationships and the classification of aminoacyl-tRNA synthetases. *J. Biol. Chem.* 266: 16965-16968.
- Calendar, R. y Berg, P. 1966. Purification and physical characterization of tyrosyl

- ribonucleic acid synthetases from *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Biochemistry*. 5:1681-1690.
- Carter, C. 1993. Cognition, mechanism, and evolutionary relationships in aminoacyl-tRNA synthetases. *Annu. Rev. Biochem.* 62: 715- 748.
- Chan, K. y Koeppe, R. 1995. Role of lysine-195 in the KMSKS sequence of *E. coli* tryptophanyl-tRNA synthetase. *FEBS Letters*. 363: 33-36.
- Cusack, S., Berthet-Colominas, C., Hartlein, M., Nassar, N. y Leberman, R. 1990. A second class of synthetase structure revealed by X-ray analysis of *Escherichia coli* seryl-tRNA synthetase at 2.5 Å. *Nature*. 347: 249-255.
- Delarue, M. y Moras, D. 1993. The aminoacyl-tRNA synthetase family: modules at work. *BioEssays*. 15: 675-687.
- Doublié, S., Bricogne, G., Gilmore, C. y Carter, C. 1995. Tryptophanyl-tRNA synthetase crystal structure reveals an unexpected homology to tyrosyl-tRNA synthetase. *Structure*. 3: 17-31.
- Eriani, G., Delarue, M., Poch, O., Gangloff, J. y Moras, D. 1990. Partition of tRNA synthetases into two classes based on mutually exclusive set of sequence motifs. *Nature*. 347: 203-206.
- Gale, A. y Shimmel, P. 1995. Isolated RNA binding domain of a class I synthetase. *Biochemistry*. 34: 8896-8903.
- Ghosh, G., Pelka, H. y Schulman, L. 1990. Identification of the tRNA anticodon recognition site of *Escherichia coli* methionyl-tRNA synthetase. *Biochemistry*. 29: 2220-2225.
- Hall, C., VanCleemput, M., Muench, K. y Yanofsky, C. 1982. The nucleotide sequence of the structural gene for *Escherichia coli* tryptophanyl-tRNA synthetase. *J. Biol. Chem.* 257: 6132-9136.
- Higuchi, R. 1989. Using PCR to engineer DNA. In: H. Erlich ed. *PCR Technology. Principles and applications for DNA amplification*.
- Himeo, H., Hasegawa, T., Asahara, H., Tamura, K. y Shimizu, M. 1991. Identity determinants of *E. coli* tryptophan tRNA. *Nucleic Acid Res.* 19: 6379-6382.
- Hou, Y., Shiba, K., Mottes, C. y Shimmel, P. 1991. Sequence determination and of structural motifs for the smallest monomeric aminoacyl-tRNA synthetase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 88: 976-980.
- Ibba, M., Sever, S., Prætorius-Ibba, M y Söll, D. 1999. Transfer RNA identity contribute to transition state stabilization during aminoacyl-tRNA synthesis. *Nucleic Acids Res.* 27: 3631-3637.
- Ibba, M. y Söll, D. 2000. Aminoacyl-tRNA synthesis. *Annu. Rev. Biochemistry*. 69: 617-650.
- Ilyin, V., Temple, B., Hu, M., Li, G., Yin, Y., Vachette, P. y Carter, C. 2000. 2.9 Å Crystal structure of ligand-free tryptophanyl-tRNA synthetase: domain movements fragment the adenine nucleotide binding site. *Protein Science*. 9: 218-231.
- Joseph, D. y Muench, K. 1971. Tryptophanyl transfer ribonucleic acid synthetase of *Escherichia coli*. *J Biol Chem*. 246: 7602-7609.

- Leatherbarrow, R., Fersht, A. y Winter, G. 1985. Transition-state stabilization in the mechanism of tyrosyl-tRNA synthetase revealed by protein engineering. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 82: 7840-7844.
- Li, T., Guo, N., Xia, X., Wang, E. y Wang, Y. 1999. The peptide bond between E292-A293 of *Escherichia coli* leucyl-tRNA synthetase is essential for its activity. *Biochemistry.* 38: 13063-13069.
- Mursinna, R., Lincecum, T. y Martinis, S. 2001. A Conserved Threonine within *Escherichia coli* Leucyl-tRNA Synthetase Prevents Hydrolytic Editing of Leucyl-tRNA^{Leu}. *Biochemistry.* 40: 5376-5381.
- Nureki, O., Vassilyev, D., Tateno, M., Shimada, A., Nakama, T., Fukai, S., Konno, M., Hendrickson, T., Schimmel, P. y Yokoyama, S. 1998. Enzyme structure with two catalytic sites for double-sieve selection of substrate. *Science.* 280: 578-82.
- Prætorius-Ibba, M., Stange-Thomann, N., Kitabatake, M., Ali, K., Söll, I., Carter, C., Ibba, M y Söll, D. 2000. Ancient adaptation of the active site of tryptophanyl-tRNA synthetase for tryptophan binding. *Biochemistry.* 39: 13136-13143.
- Ribas de Pouplana, L., Frugier, M., Quinn, C. y Schimmel, P. 1996. Evidence that two present-day components needed for the genetic code appeared after nucleated cell separated from eubacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 166-170.
- Rossmann, M., Moras, D. y Olsen, K. 1974. Chemical and biological evolution of a nucleotide-binding protein. *Nature.* 250: 194-199.
- Rogers, M., Adachi, T., Inakuchi, H. y Söll, D. Switching tRNA^{Gln} Identity from glutamine to tryptophan. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 3463-4367.
- Rould, M., Perona, J., Söll, D. y Steitz, T. 1989. Structure of *E. coli* glutamyl-tRNA synthetase complexed with tRNA^{Gln} and ATP at 2.8 Å resolution. *Science.* 246: 1135-1142.
- Salazar, J., Zúñiga, R., Lefimil, C., Söll, D. y Orellana, O. 2000. Conserved amino acids near the carboxy terminus of bacterial tyrosyl-tRNA synthetase are involved in tRNA and Tyr-AMP binding. *FEBS Letters.* 491: 257-260.
- Sambrook, J., Fritsch, E. y Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual.* 2nd Edition. Cold Spring Harbor laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
- Sever, S., Roger, K., Roger, J., Carter, C. y Söll, D. 1996. *Escherichia coli* tryptophanyl-tRNA synthetase mutants selected for tryptophan auxotrophy implicate the dimer interface in optimizing amino acid binding. *Biochemistry.* 35: 32-40.
- Shepard, A., Shiba, K. y Schimmel, P. 1992. RNA binding determinant in some class I tRNA synthetases identified by alignment-guided mutagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 9964-9968.
- Silvian, L., Wang, J. y Steitz, T. 1999. Insight into editing from an Ile-tRNA synthetase structure with tRNA^{Ile} and Mupirocin. *Science.* 285: 1074-1077.
- Starzyk, R., Webster, T. y Schimmel, P. 1987. Evidence for dispensable sequences inserted into a nucleotide fold. *Science* 237: 1614-1617.
- Wakasugi, K., Quinn, C., Tao, N. y Schimmel, P. 1998. Genetic code in evolution: switching species-specific aminoacylation with a peptide transplant. *EMBO J.* 17: 297-305.

Wilkinson, J., Fersht, A., Blow, D. y Winter, G. 1983. Site-directed mutagenesis as a probe of enzyme structure and catalysis: tyrosyl-tRNA synthetase cysteine-35 to glycine-35 mutation. *Biochemistry*. 22: 3581-3586.

Xu, Z., Love, L., Ma, L., Blum, M., Bronskill, P., Bernstein, J., Grey, A., Hofmann, T., Camerman, N. y Wong, J. 1989. Tryptophanyl-tRNA Synthetase from *Bacillus subtilis*, characterization and role of hydrophobicity in substrate recognition. *J. Biol. Chem.* 264: 4304-4311.