



**“¿DISCRIMINAN LOS FACTORES DE ELONGACIÓN EF-Tu DE
Acidithiobacillus ferrooxidans Y DE *Escherichia coli* El Glu-tRNA^{Gln}?”**

Memoria de Título entregada a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

PATRICIO ADOLFO VALENZUELA AGUILERA

Director de Memoria de Título
Dr. Omar Orellana Orellana

Firma manuscrita en tinta negra del Dr. Omar Orellana Orellana, sobre una línea horizontal.

Comisión de Evaluación de la Memoria de Título

Dr. Carlos Jerez Guevara
Presidente Comisión

Firma manuscrita en tinta negra del Dr. Carlos Jerez Guevara, sobre una línea horizontal.

Dr. Marcelo Baeza Cancino

Firma manuscrita en tinta azul del Dr. Marcelo Baeza Cancino, sobre una línea horizontal.

Santiago de Chile, Mayo 2005



UCH-FC
Biotecnología
V152

Universidad de Chile
Facultad de Ciencias



**¿DISCRIMINAN LOS FACTORES DE ELONGACIÓN EF-Tu DE
Acidithiobacillus ferrooxidans Y DE *Escherichia coli* EL Glu-tRNA^{Gln}?**

PATRICIO ADOLFO VALENZUELA AGUILERA



Director de Tesis: Dr. Omar Orellana Orellana

Santiago – Chile
2005

*A mis Padres,
Mi mamita aquí, mi papo en todo lugar...*



AGRADECIMIENTOS

Agradezco a todos los que me ayudaron a salir adelante en esta etapa de mi vida, comenzando por mi familia: mi mamá, mi papá, mi hermano, mi cuñada, mi sobrinita Fernandita y tíos y primos, quienes nunca dejaron de creer en mi y me brindaron un apoyo incondicional.

Al laboratorio, mi segunda casa: al Dr. Omar Orellana, que confió en mi y me dio su apoyo cuando lo necesité, a la Dra. Eugenia Jedlicki, por sus sugerencias siempre constructivas, a Gloria, mi guía y consejera, a Claudia, que siempre me brindó su ayuda y una sonrisa que me hacía seguir, a Carolina, que me entregaba la calma que siempre necesito, a Assaf, compañero de largas e ingeniosas jornadas en el laboratorio, a Mariella, Marlen, Raquel, Harold, Hector, Mario y Giovanna, quienes hicieron más gratas las horas de trabajo y con quienes compartí momentos inolvidables.

De otros laboratorios: al Dr. Marcelo Antonelli, que me enseñó muchos de los secretos de la biología molecular y al Dr. Germán Hermosilla, quien siempre me ayuda cuando lo necesito.

Quizás olvide mencionar a alguien... mis agradecimientos a ellos también.

A todos les doy las gracias porque de una u otra forma colaboraron para llegar a buen término esta tesis.



ÍNDICE



ÍNDICE DE CONTENIDO	ii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE TABLAS	v
LISTA DE ABREVIATURAS	vi
RESUMEN	viii
ABSTRACT	x
INTRODUCCIÓN	1
MATERIALES Y MÉTODOS	14
I. MATERIALES	14
1. Bacterias	14
2. Vectores y Plásmidos	14
3. Reactivos	15
4. Medios de cultivo	16
II. MÉTODOS	17
1. PREPARACIÓN Y ANÁLISIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS	17
1.1. Preparación del DNA plasmidial.	17
1.2. Purificación de los fragmentos de DNA desde geles de agarosa.	17
1.3. Sobreexpresión y purificación de los tRNAs.	17
2. CLONAMIENTOS	19
2.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	19
2.2. Clonamiento en pCR [®] 2.1-TOPO.	20
2.3. Subclonamiento en pGEX-2T.	21
3. TRANSFORMACIÓN DE <i>E. coli</i>	22
3.1. Preparación de células electrocompetentes.	22
3.2. Electroporación.	22
4. SOBREENPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	23
4.1. Inducción de la expresión de proteínas de fusión GST•EF-Tu.	23
4.2. Purificación de GST y proteínas de fusión GST•GluRS1 y GST•GluRS2.	23
4.3. Extracción de proteínas totales desde <i>E. coli</i> .	25

5. ACTIVIDAD <i>in vitro</i> DE PROTEÍNAS	26
5.1. Aminoacilación de tRNAs.	26
5.2. Formación del complejo ternario.	27
5.3. Transamidación.	28
RESULTADOS	30
I. CLONAMIENTO Y EXPRESIÓN DE EF-Tu	30
1.1 Amplificación por PCR de los genes <i>tuf</i> de <i>A. ferrooxidans</i> y del gen <i>tufB</i> de <i>E. coli</i> .	30
1.2 Clonamiento de los genes <i>tuf</i> .	31
1.3 Sobreexpresión y purificación de la proteína de fusión GST•EF-Tu.	32
II EXPRESIÓN Y OBTENCIÓN DE aa-tRNA ^{aa} s.	33
II.1 Purificación de GluRS1 y GluRS2.	33
II.2 Obtención de GlnRS de <i>E. coli</i> .	33
II.3 Aminoacil-tRNAs sintetizados.	34
III UNION DE [¹⁴ C]aa-tRNA ^{aa} a GST•EF-Tu	35
III.1 Reacciones de formación del complejo ternario utilizando el EF-Tu de <i>A. ferrooxidans</i> y Glu-tRNA ^{Glu} ₁ .	35
III.2 Reacciones de formación del complejo ternario utilizando el EF-Tu de <i>A. ferrooxidans</i> o de <i>E. coli</i> .	39
IV TRANSFORMACIÓN DE Glu-tRNA ^{Gln} EN Gln-tRNA ^{Gln}	43
IV.1 Reacción de amidotransferencia utilizando la AdT de <i>A. ferrooxidans</i> .	43
IV.2 Ensayo de competencia entre Glu-tRNA ^{Gln} 2 y Gln-tRNA ^{Gln} 2 en la formación del complejo ternario.	46
DISCUSIÓN	48
CONCLUSIONES	54
BIBLIOGRAFÍA	55



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama del tRNA en forma de hoja de trebol.	2
Figura 2. Esquema de la estructura tridimensional del tRNA.	2
Figura 3. Organización de los genes <i>tuf</i> en el genoma de a) <i>E. coli</i> y b) <i>A. ferrooxidans</i> .	7
Figura 4. Modelo del complejo ternario EF-Tu·GDPNP·Cys-tRNA ^{Cys} .	8
Figura 5. Alteraciones estructurales del EF-Tu ocurridas a través de su ciclo funcional.	9
Figura 6. Función del EF-Tu.	10
Figura 7. Amplificación por PCR de los genes <i>tuf</i> .	30
Figura 8. Representación esquemática del subclonamiento en el vector de expresión pGEX-2T.	31
Figura 9. Sobreexpresión y purificación de los EF-Tu.	32
Figura 10. Representación esquemática de los tRNAs de <i>A. ferrooxidans</i> .	34
Figura 11. Metodología para determinar la unión de los aa-tRNA ^{aa} al EF-Tu.	36
Figura 12. Especificidad en la unión de aa-tRNA ^{aa} al EF-Tu.	38
Figura 13. Efecto de la activación del EF-Tu en la formación del complejo ternario.	39
Figura 14. Formación del complejo ternario con distintos aa-tRNA ^{aa} y el EF-Tu de <i>A. ferrooxidans</i> .	40
Figura 15. Formación del complejo ternario con distintos aa-tRNA ^{aa} de <i>A. ferrooxidans</i> y el EF-Tu de <i>E. coli</i> .	42
Figura 16. Separación por cromatografía en placa fina de [¹⁴ C]glutamato y [¹⁴ C]glutamina recuperados del ensayo de transamidación.	44
Figura 17. Actividad AdT, empleando Glu-tRNA ^{Gln} ₃ como sustrato.	45
Figura 18. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de los factores EF-Tu de diferentes microorganismos.	51



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados.	20
Tabla 2. [¹⁴ C]aminoacil-tRNA ^{aa} s sintetizados en reacciones de aminoacilación.	35
Tabla 3. Unión de Glu-tRNA y Gln-tRNA al EF-Tu de <i>A. ferrooxidans</i> .	41
Tabla 4. Unión de Glu-tRNA y Gln-tRNA al EF-Tu de <i>E. coli</i> .	43
Tabla 5. Ensayo de competencia entre Gln-tRNAGln y Glu-tRNAGln para formar el complejo ternario con el EF-Tu de <i>A. ferrooxidans</i> .	47



LISTA DE ABREVIATURAS

aaRS	: Aminoacil tRNA sintetasa
aa-tRNA ^{aa}	: Acido ribonucleico de transferencia aminoacilado
A ₂₆₀	: Absorbancia a 260 nm.
ATP	: Adenosina 5'-trifosfato
CIAP	: Fosfatasa alcalina de hígado de ternera
DNA	: Acido desoxirribonucleico
DTT	: Ditioneitol
DNTPs	: Desoxirribonucleósidos trifosfato
D.O.	: Densidad Optica
EDTA	: Acido etilendiaminotetraacético
EF-G	: Factor de elongación G
EF-Tu	: Factor de elongación Tu
EF-Ts	: Factor de elongación Ts
GDP	: Guanosina 5'-difosfato
GluRS ND	: Glutamil-tRNA sintetasa no discriminante
GTP	: Guanosina 5'-trifosfato
GST	: Glutación-S-Transferasa
IPTG	: Isopropil-β-D-tiogalactopiranósido
kb	: Kilobase
LB	: Luria-Bertani broth
LBA	: LB suplementado con ampicilina
mRNA	: Acido ribonucleico mensajero
pb	: Par de bases
PCR	: Reacción en cadena de la polimerasa
pmol	: Picomol (10 ⁻¹² moles)
PMSF	: Fluoruro de fenilmetil sulfonilo
POPOP	: 1,4-bis (2(5-feniloxazolil)) benceno
PPO	: 2,5-difeniloxazol
SDS	: Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	: Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS
RNA	: Acido ribonucleico



TCA : Acido tricloroacético
Tris : Tris-(hidroximetil)-aminoetano
tRNA : Acido ribonucleico de transferencia



RESUMEN

A partir del análisis de genomas se ha determinado que la mayoría de las bacterias carecen de la glutaminil-tRNA sintetasa, incluyendo a *Acidithiobacillus ferrooxidans*, bacteria en estudio en nuestro laboratorio. Como parte de la vía de síntesis de Gln-tRNA^{Gln}, estas bacterias sintetizan un producto intermediario, Glu-tRNA^{Gln}, que es transformado a su forma final por una amidotransferasa dependiente de tRNA. Esta vía de síntesis de aa-tRNA^{aa} se conoce como vía indirecta o de transamidación. Surge la incógnita sobre el destino del producto intermediario Glu-tRNA^{Gln}, que resulta tóxico para la célula si es transportado al ribosoma por el EF-Tu y se incorpora a las cadenas polipeptídicas nacientes.

La existencia de la vía de transamidación en *A. ferrooxidans* y la importancia funcional del EF-Tu en la biosíntesis de proteínas, llevó a que en esta tesis se abordara la hipótesis que si en *A. ferrooxidans* se utiliza la vía indirecta de síntesis de Gln-tRNA^{Gln}, su EF-Tu discrimina el producto intermediario Glu-tRNA^{Gln}, mientras que en *E. coli*, un microorganismo que no utiliza esta vía, su EF-Tu no discrimina el Glu-tRNA^{Gln}.

Para probar la hipótesis se formó el complejo ternario con el EF-Tu de *A. ferrooxidans* o de *E. coli*, GTP y los siguientes aa-tRNA^{aa}: Glu-tRNA^{Gln}, Glu-tRNA^{Glu} y Gln-tRNA^{Gln}. Luego de la formación del complejo ternario, se observó que tanto el EF-Tu de *A. ferrooxidans* y de *E. coli*, se unen más a un aa-tRNA^{aa} correctamente aminoacilado (hasta quince y ocho veces, respectivamente) en comparación a un aa-tRNA^{aa} incorrectamente aminoacilado. También se observó que al formar el complejo ternario con distintas mezclas de Glu-tRNA^{Gln} y Gln-tRNA^{Gln}, el EF-Tu de *A. ferrooxidans* une preferencialmente el Gln-tRNA^{Gln} correctamente aminoacilado.

Los resultados obtenidos indican que los EF-Tu de ambos microorganismos discriminan los Glu-tRNA^{Gln}. Estos antecedentes y el carácter altamente conservado de la estructura primaria de los EF-Tu, sugieren que la propiedad discriminatoria de esta proteína es una capacidad inherente a ella, y no una consecuencia de la presión selectiva impuesta por la vía indirecta de síntesis de Gln-tRNA^{Gln}.

ABSTRACT

Genomic analysis has shown that most bacteria lack glutamyl-tRNA synthetases, including our model bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans*. As part of the pathway of Gln-tRNA^{Gln} synthesis, this bacterium synthesizes an intermediary product, Glu-tRNA^{Gln}, that is transformed to its final form by a tRNA-dependent amidotransferase. This pathway of aa-tRNA^{aa} synthesis is known as the indirect or the transamidation pathway. However, given that the intermediary product Glu-tRNA^{Gln} is toxic for the cell when incorporated to the growing polypeptide chains through EF-Tu transport, the destination of this intermediary is a matter of concern.

The existence of the transamidation pathway in *A. ferrooxidans* and the functional importance of EF-Tu in protein biosynthesis, raised the hypothesis of whether *A. ferrooxidans* EF-Tu discriminates the intermediary product Glu-tRNA^{Gln}. In contrast, *E. coli* does not use this pathway and its EF-Tu does not discriminate the Glu-tRNA^{Gln}.

In order to test this hypothesis, a ternary complex was formed with *E. coli* or *A. ferrooxidans* EF-Tu, GTP and the following aa-tRNA^{aa}: Glu-tRNA^{Gln}, Glu-tRNA^{Glu} and Gln-tRNA^{Gln}. After formation of the ternary complex, we observed that both *A. ferrooxidans* and *E. coli* EF-Tu were able to bind a correctly aminoacylated aa-tRNA^{aa} more efficiently (fifteen and eight times, respectively) than an incorrectly aminoacylated aa-tRNA^{aa}. Furthermore, *A. ferrooxidans* EF-Tu preferentially bound the correctly aminoacylated Gln-tRNA^{Gln} in a ternary complex mixture of Glu-tRNA^{Gln} and Gln-tRNA^{Gln}.

The results obtained indicate that both *A. ferrooxidans* and *E. coli* EF-Tu discriminate the Glu-tRNA^{Gln}. These data and the highly conserved primary structure of EF-Tu suggest that the discriminatory property of this protein is an inherent feature and

it is not the consequence of an adaptative pressure imposed by the indirect pathway of Gln-RNA^{Gln} synthesis.

INTRODUCCIÓN

Generalidades sobre la síntesis de proteínas.

La síntesis de proteínas requiere de la interacción coordinada de un gran número de macromoléculas, entre las que se encuentran el mRNA, los distintos tRNAs, las aminoacil-tRNA sintetetasas y diversos factores proteicos, además de los ribosomas (Stryer, 1995). Comienza con la activación de los aminoácidos mediante las aminoacil-tRNA sintetetasas, que unen el grupo carboxilo de un aminoácido al grupo 2' o 3'-hidroxilo de un tRNA, con consumo de ATP (Arnez y Moras, 1997). Existe al menos una sintetetasa específica para cada aminoácido, las que reconocen estructuras denominadas anticodón y tallo aceptor en sus correspondientes tRNAs. Los tRNAs de diferente especificidad tienen un diseño estructural común. Son cadenas sencillas de RNA de alrededor de ochenta nucleótidos, algunos de los cuales se modifican después de la transcripción.

Todos los tRNAs conocidos se pueden representar como una estructura secundaria en forma de hoja de trébol, en la que aproximadamente la mitad de los nucleótidos tiene sus bases apareadas (Figura 1). Los estudios cristalográficos por rayos X indican que la molécula de tRNA tiene forma de L. El punto de unión del aminoácido en el extremo CCA-3' queda localizado en uno de los extremos de la L, y el anticodón en el otro (Stryer, 1995) (Figura 2).

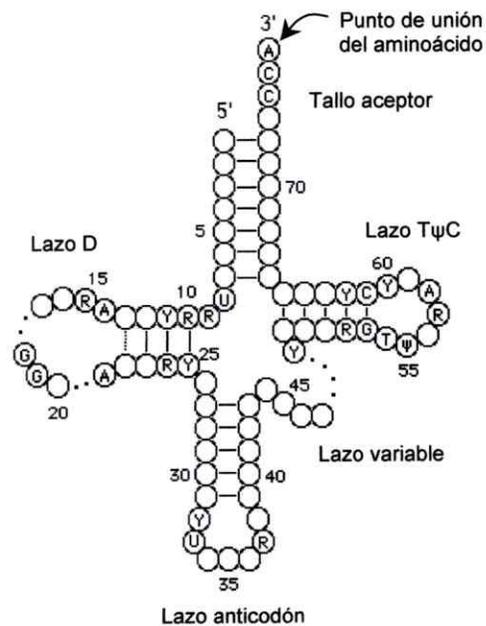


Figura 1. Diagrama del tRNA en forma de hoja de trebol. Características comunes de los tRNAs. En *A. ferrooxidans* el largo del brazo D no solo es distinto entre tRNAs que codifican para distintos aminoácidos, sino también entre tRNAs que codifican para un mismo aminoácido, como es el caso para los tRNAs de glutamato y glutamina, en que el brazo D está formado por tres o cuatro pares de bases.

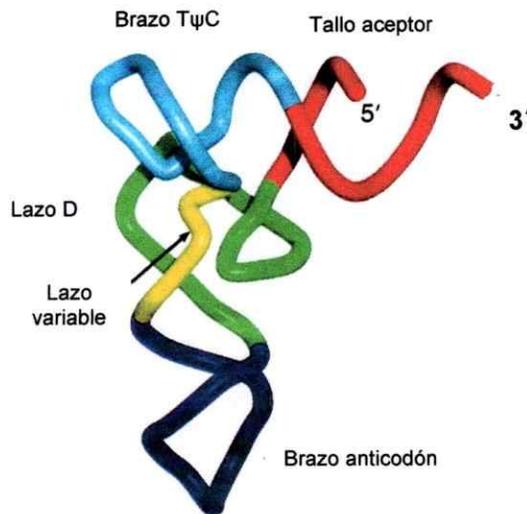


Figura 2. Esquema de la estructura tridimensional del tRNA. El lugar de unión del aminoácido es el grupo 2' ó 3' hidroxilo del residuo de adenosina en el extremo 3' de la molécula, mostrado en rojo.

El estudio de la síntesis de proteínas se ha dividido en tres etapas: iniciación, elongación y término. En la iniciación, el mRNA, el formilmetionil-tRNA^{fMet} iniciador y la subunidad 30S del ribosoma se asocian para formar el complejo de iniciación 30S. La señal de iniciación en el mRNA es AUG (o GUG) precedido de una secuencia rica en purinas que puede aparearse con el rRNA 16S. A continuación, la subunidad 50S del ribosoma se une al complejo 30S para formar el complejo de iniciación 70S, en el que el fMet-tRNA^{fMet} ocupa el sitio P (de peptidil-tRNA) del ribosoma. El EF-Tu coloca el aa-tRNA^{aa} apropiado en el sitio A (de aminoacil-tRNA) del ribosoma para comenzar la etapa de elongación. Se forma un enlace peptídico entre el grupo carboxilo activado del polipéptido en crecimiento y el grupo amino del aminoácido en el aa-tRNA^{aa}. Los tRNAs se desplazan hacia los sitios en el ribosoma denominados P y E (de salida), proceso de translocación inducido por el EF-G. El tRNA desacilado se desplaza del sitio P al sitio E, el nuevo peptidil-tRNA se mueve del sitio A al sitio P y el mRNA se desplaza una distancia de tres nucleótidos, repitiéndose el ciclo con todos los codones del mRNA. La síntesis de proteínas se termina por medio de los factores de liberación, que reconocen los codones de terminación UAA, UGA y UAG y provocan la hidrólisis del enlace entre el polipéptido y el tRNA (Brock y Madigan, 1993, Stryer, 1995, Lewin, 1997).

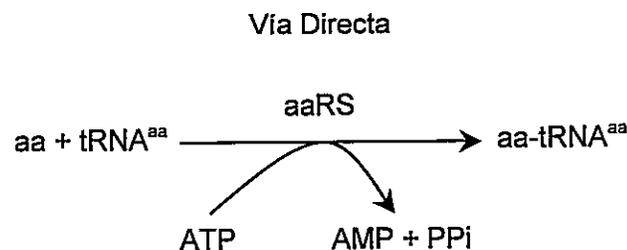
Aminoacilación de los tRNAs.

Los aa-tRNA^{aa} se forman por la esterificación del grupo carboxilo de un aminoácido al extremo 3'-OH del tRNA, en una reacción altamente específica catalizada por las aminoacil-tRNA sintetetasas (aaRS). Las aaRS utilizan diversos mecanismos para asegurar la especificidad. Por ejemplo, los aminoácidos que son suficientemente diferentes unos con otros son reconocidos por su correspondiente

aaRS. En cambio una discriminación precisa entre dos aminoácidos similares (por ejemplo, Ile y Val) requiere mecanismos de edición para evitar la aminoacilación errónea del tRNA. Este mecanismo de discriminación ocurre después que el aminoácido se ha ligado covalentemente al AMP. En la edición, el aminoácido se hidroliza del AMP (o del tRNA si ya se hubiera formado el enlace éster) y se libera de la enzima (Alberts y col., 2002). Del mismo modo, el reconocimiento preciso de los tRNA es igual de importante para conseguir una elevada fidelidad en la síntesis de proteínas. Además del anticodón, otras bases juegan un papel importante en la especificidad de la interacción, siendo el brazo aceptor y algunos pares de bases en los brazos TΨC y D los principales puntos de contacto con las aaRS (Arnez y Moras, 1997) (Figura 2).

Formación de Glu-tRNA^{Gln}.

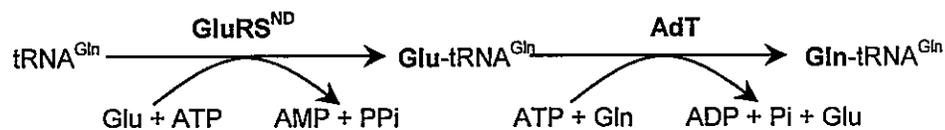
En la era pre-genómica se consideraba un hecho la hipótesis del adaptador propuesta por Crick en 1958, que postulaba que cada célula debía contener veinte aaRS, cada una responsable de la síntesis de cada uno de los veinte aa-tRNA^{aa}. Muchos organismos, incluyendo a *E. coli*, poseen las veinte aaRS, cada una capaz de aminoacilar el tRNA correspondiente con el aminoácido correcto (Ibba y Söll, 2000). De este modo, todos los aa-tRNA^{aa} son sintetizados en forma directa, según la siguiente ecuación:



Sin embargo, en la secuencia de los genomas de dos arqueas metanogénicas, no se encontraron genes ortólogos para las aaRS responsables de la síntesis de Glutaminil-tRNA (Gln-tRNA^{Gln}), Asparraginil-tRNA (Asn-tRNA^{Asn}), Cisteinil-tRNA (Cys-tRNA^{Cys}) y Lisil-tRNA (Lys-tRNA^{Lys}) (Stathopoulos y col., 2001). Surgió la interrogante: ¿Cómo se sintetizan estos aa-tRNA^{aa} en estos organismos?

Estudios previos demostraron la existencia de una vía indirecta en la formación de Gln-tRNA^{Gln} en *B. subtilis*. Esta vía indirecta está ampliamente distribuida en el reino viviente. La poseen: arqueas (Tumbula y col., 2000), bacterias (Gagnon y col., 1996), mitocondrias y cloroplastos (Schön y col., 1988). La vía indirecta de aminoacilación o de transamidación se describe en la siguiente ecuación:

Vía Indirecta



En esta vía, una GluRS no discriminante (GluRSND) puede aminoacilar tRNA^{Glu} originando Glu-tRNA^{Glu}, y tRNA^{Gln} originando Glu-tRNA^{Gln} (Tumbula y col., 2000; Salazar y col., 2001). A continuación, una amidotransferasa dependiente de tRNA (AdT), en presencia de un donante de grupo amida (por ejemplo: Gln, Asn), convierte los Glu-tRNA^{Gln} en Gln-tRNA^{Gln} (Raczniak y col., 2001; Salazar y col., 2001).

El factor de elongación EF-Tu en la síntesis de proteínas.

Durante la fase de elongación, el factor de elongación EF-Tu tiene una función clave en la traducción ya que es la proteína encargada de transportar los aa-tRNA^{aa} al

sitio A del ribosoma, donde se encuentra la información codificada por el mRNA, de modo que el aminoácido sea ubicado en la posición correcta durante su incorporación a la cadena polipeptídica.

El EF-Tu es codificado por los genes *tuf*, los que están presentes en un número de copias variables por genoma dependiendo de la especie bacteriana. En la mayoría de las bacterias gram-positivas estudiadas hasta ahora se ha encontrado sólo una copia del gen *tuf*, mientras que la mayoría de las bacterias gram-negativas estudiadas poseen dos copias del gen (Ke y col., 2000).

E. coli posee dos copias del gen *tuf* ubicados en distintas zonas de su genoma. Ambas copias se diferencian en 13 nucleótidos, con un solo cambio a nivel aminoacídico: el codón C-terminal de *tufA* codifica para Gly mientras que en *tufB* codifica para Ser (Hershey, 1987). El gen *tufA* se encuentra en el operon *str* junto a tres genes que codifican para el factor de elongación EF-G (*fusA*), y las proteínas ribosomales S12 (*rpsL*) y S7 (*rpsG*), los cuales son cotranscritos en la dirección *rpsL*, *rpsG*, *fusA* y *tufA* (Figura 3a1) (Sylvänen y col., 1996). Los cuatro genes se encuentran bajo el control de un promotor común, sin embargo el EF-G y las proteínas ribosomales S7 y S12 se expresan en cantidades equimolares mientras que el EF-Tu se expresa 3,5 veces más. Esto sugiere que algún tipo de señal localizada entre el gen *tufA* y *fusA*, o dentro de este último, es responsable de su mayor expresión (Grunberg-Manago, 1987). El gen *tufB* se ubica en el operón *tufB*, junto a cuatro genes de tRNA (Figura 3a2) que codifican el tRNA^{Thr4} (*thrU*), el tRNA^{Tyr2} (*tyrU*), el tRNA^{Gly2} (*glyT*) y el tRNA^{Thr3} (*thrT*) seguido por el gen que codifica para *tufB*, los que se cotranscriben en el mismo orden en una única unidad transcripcional (Grunberg-Manago, 1987; Sylvänen y col., 1996).

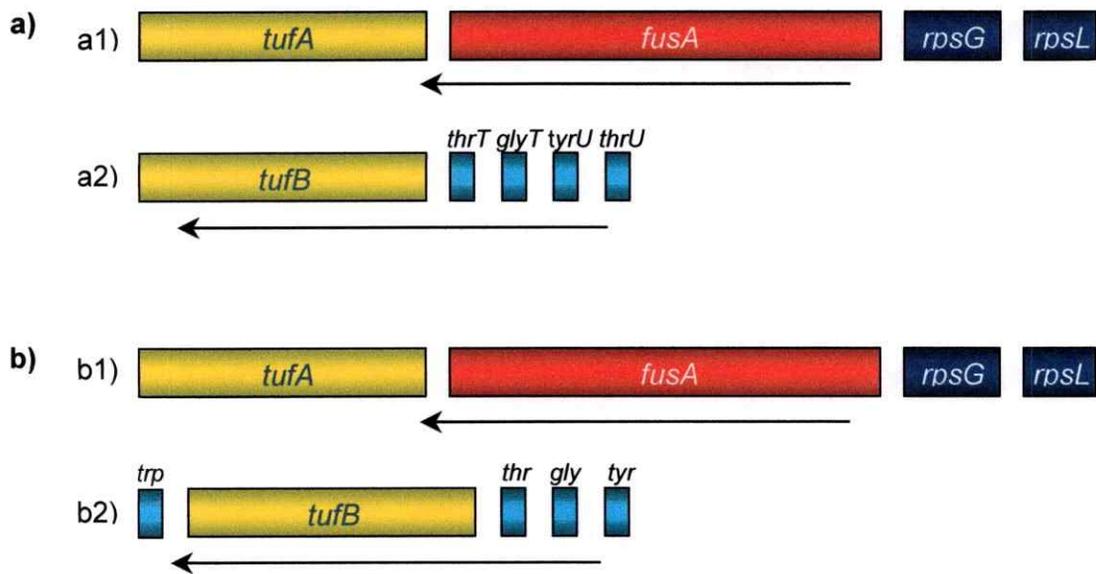


Figura 3. Organización de los genes *tuf* en el genoma de a) *E. coli* y b) *A. ferrooxidans*. a1) Operon *tufA*. a2) Operón *tufB*. La anotación del genoma de *A. ferrooxidans* indica una disposición idéntica a *E. coli* para *tufA* (b1)), y similar para *tufB* (b2)). La dirección de la flecha indica el sentido de la transcripción.

El EF-Tu es una proteína monomérica que pertenece a la superfamilia de las proteínas G (Sprang, 1997), tiene un peso molecular de 43 kDa y está formada por tres dominios. La determinación de la estructura cristalográfica del complejo ternario EF-Tu-GDPNP·Cys-tRNA^{Cys} (Figura 4) formado entre el EF-Tu de *T. aquaticus*, el Cys-tRNA^{Cys} de *E. coli* y el análogo no hidrolizable de GTP, GDPNP (Nissen y col., 1999), mostró que el EF-Tu interactúa con el Cys-tRNA^{Cys} principalmente en tres sitios: el extremo CCA-3'-Cys, el extremo fosfato 5' (ambos del brazo aceptor) y el brazo T. Los tres dominios del EF-Tu están involucrados en estas interacciones: el dominio I (aminoácidos 1 al 199)* corresponde al dominio G de unión a nucleótidos de guanina GDP y GTP (Hunter y Spremulli, 2004); el dominio II (aminoácidos 209 al 299)* junto al dominio I forman el sitio de unión al aminoácido y al extremo 3' del aa-tRNA^{aa} (Pedersen y col., 1998; Hunter y Spremulli, 2004) y; el dominio III (aminoácidos 300 al

393)* interacciona con el brazo TΨC del aa-tRNA^{aa} y junto al dominio I interactúan con el factor de elongación Ts (EF-Ts) (Hunter y Spremulli, 2004).

* Referido a los aminoácidos en el EF-Tu de *E. coli*.

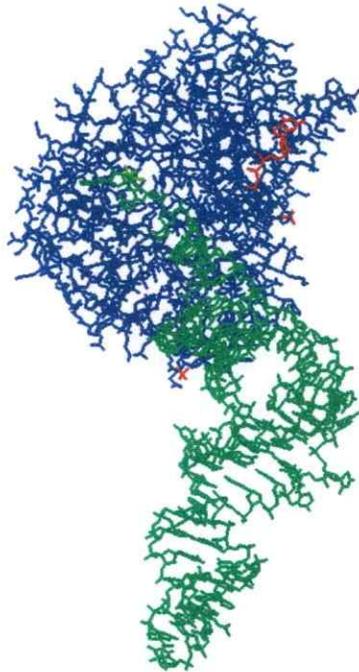


Figura 4. Modelo del complejo ternario EF-Tu·GDPNP·Cys-tRNA^{Cys}. El complejo ternario formado por el EF-Tu de *T. aquaticus*, GDPNP y Cys-tRNA^{Cys} de *E. coli* fue resuelto a 2,6 Å de resolución por Nissen y col. (1999). En azul se observa el EF-Tu en su conformación activa, unido a GDPNP (en rojo). En verde se observa el Cys-tRNA^{Cys} (Codigo PDB 1b23).

El EF-Tu cambia drásticamente su estructura terciaria al formar un complejo binario con GTP. Un reordenamiento de los dominios II y III con respecto al dominio G al tener unido GTP, permite formar un complejo ternario estable junto al aa-tRNA^{aa} (Figura 5) (Sprang, 1997).

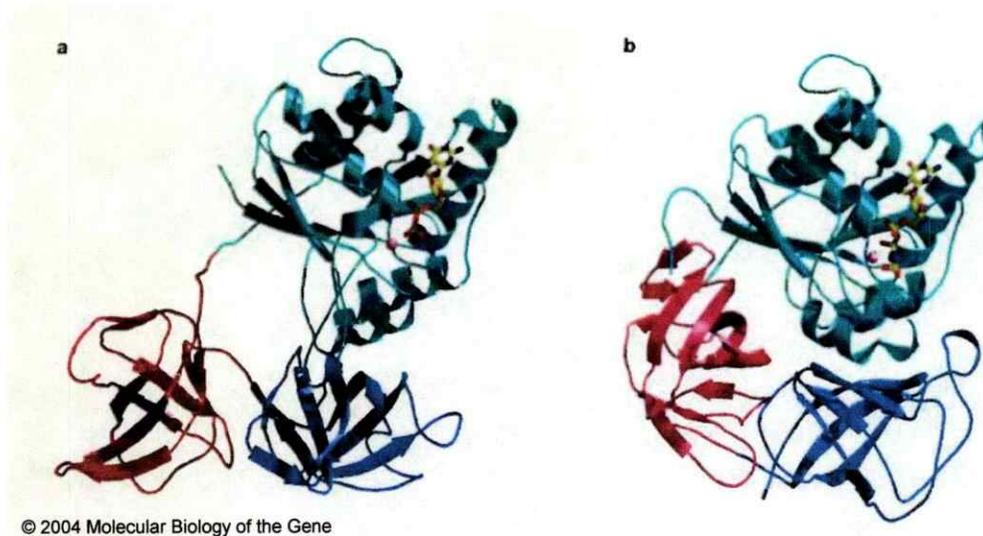


Figura 5. Alteraciones estructurales del EF-Tu ocurridas a través de su ciclo funcional. En todos los modelos el dominio 1 está en la parte superior, el dominio 2 está abajo a la izquierda y el dominio 3 está abajo a la derecha. Los nucleótidos se muestran en modelo de esferas y varillas. **a)** Estructura del EF-Tu·GDP de *T. aquaticus*. **b)** Estructura del EF-Tu·GDPNP de *T. aquaticus*. El GDPNP es un análogo no hidrolizable del GTP.

La unión inicial del complejo ternario al ribosoma, que es independiente del codón (Rodnina y col., 1996), se sigue de la interacción entre el anticodón del aa-tRNA^{aa} y el codón del mRNA en el sitio A del ribosoma. El apareamiento correcto codón-anticodón induce un cambio conformacional en el sitio descodificador, resultando en la estabilización del complejo ternario en el ribosoma (Eccleston y col., 1985). Además, el correcto apareamiento codón-anticodón provee una señal de activación que es transmitida al dominio G del EF-Tu que provoca rápidamente la hidrólisis de GTP (Rodnina y col., 1995). El EF-Tu unido a GDP cambia su conformación a una forma con menor afinidad por el aa-tRNA^{aa}. El aa-tRNA^{aa} se libera del EF-Tu·GDP, se acomoda en el sitio A y toma parte en la formación del enlace peptídico, liberándose el EF-Tu·GDP del ribosoma (Figura 6) (Kothe y col., 2004).

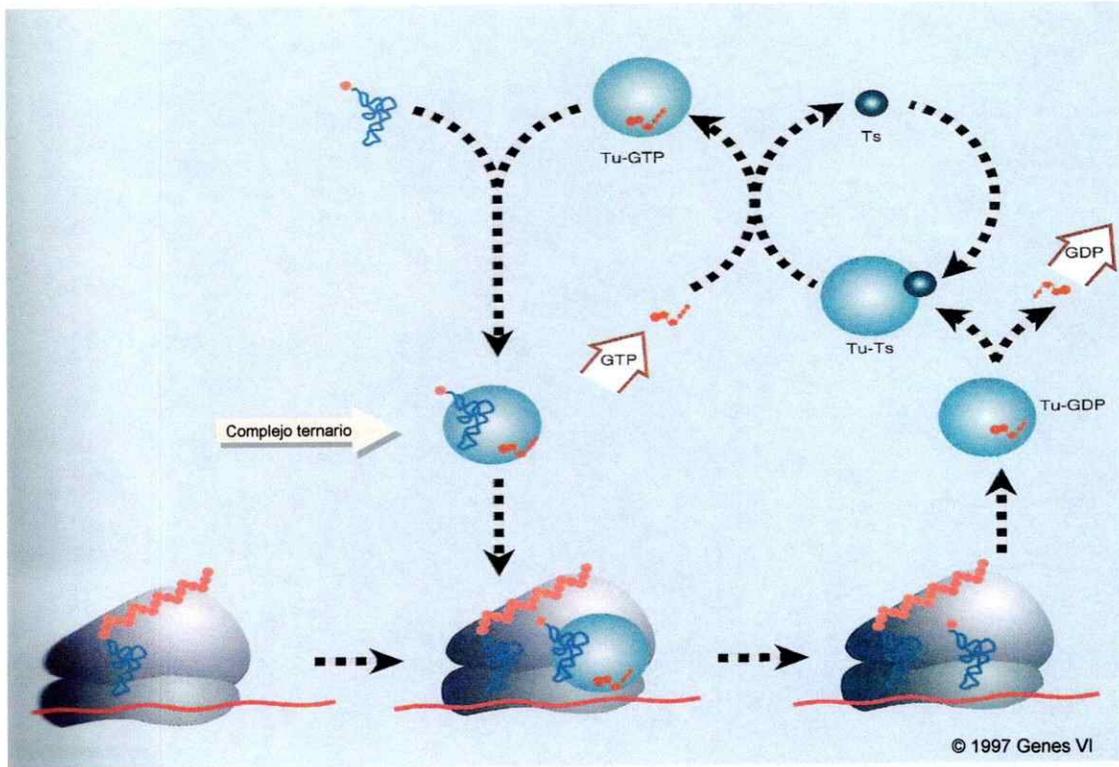


Figura 6. Función del EF-Tu. El EF-Tu·GTP ubica al aa-tRNA^{aa} en el ribosoma y luego es liberado como EF-Tu·GDP. Se requiere el EF-Ts para el intercambio de GDP por GTP. La reacción consume GTP y libera GDP.

El complejo binario EF-Tu·GTP se regenera mediante el intercambio del GDP por GTP, reacción catalizada por el EF-Ts, que actúa como factor de intercambio de nucleótidos de guanina (GEF) (Sprang, 1997).

El EF-Tu es una de las proteínas más abundantes tanto en las células procarióticas como eucarióticas y se estima que hay aproximadamente 70000 moléculas de EF-Tu por bacteria (aproximadamente un 5% de la proteína total) y un número similar de moléculas de aa-tRNA^{aa}, lo que implica que la mayoría de los aa-tRNA^{aa} estarían presentes en forma del complejo ternario EF-Tu·GTP·aa-tRNA^{aa} (Lewin, 1997).

El EF-Tu aparentemente comprueba la correspondencia entre el aminoácido y el tRNA y rechaza a aquellos que estén erróneamente aminoacilados, al exhibir una afinidad diferencial tanto por el cuerpo del tRNA como por el aminoácido en el aa-tRNA^{aa} (Becker y Kern, 1998). Esta diferencia en afinidad no fue apreciada previamente porque la contribución del aminoácido y del tRNA a la afinidad total por EF-Tu está dispuesta de una manera compensatoria, de tal forma que todos los aa-tRNA^{aa} bien aminoacilados presentan una afinidad por EF-Tu entre parámetros estrechos, con valores de constantes de disociación (K_d) que van de los 50 a 100 nM (Asahara y Uhlenbeck, 2002). Un tRNA aminoacilado incorrectamente puede presentar una afinidad por EF-Tu débil, con valores de K_d de hasta 400 nM (LaRiviere y col., 2001) o una afinidad por EF-Tu muy fuerte, con valores de K_d de hasta 0,05 nM (Asahara y Uhlenbeck, 2002). Una interacción fuerte del aa-tRNA^{aa} con el EF-Tu, podría significar una liberación más lenta del aa-tRNA^{aa} desde el EF-Tu luego de la hidrólisis del GTP, impidiendo una acomodación eficiente del aa-tRNA^{aa} en el sitio A del ribosoma. Por otra parte, una interacción débil podría significar un abandono prematuro del aa-tRNA^{aa} desde el EF-Tu (LaRiviere y col., 2001).

Consecuentemente, se ha demostrado en cloroplastos de espinaca que el EF-Tu no interactúa con el producto intermediario Glu-tRNA^{Gln}, pero si lo hace con Gln-tRNA^{Gln} (Stanzel y col., 1994). Algo similar ocurre en *T. thermophilus*, microorganismo que utiliza la vía indirecta para la síntesis de Asn-tRNA^{Asn}, en donde el EF-Tu no se une al producto intermediario Asp-tRNA^{Asn}, mientras que si lo hace a Asn-tRNA^{Asn} (Becker y Kern, 1998).

En el laboratorio se encuentra en estudio la bacteria gram-negativa *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Esta es una bacteria quimiolitotrófica, autotrófica y acidófila del género *Thiobacilli* y de la familia *Thiobacteraceae*, que junto a otros

microorganismos forma parte de la comunidad biológica que participa en la biolixiviación de metales desde los minerales que los contienen.

El genoma de *A. ferrooxidans* ha sido secuenciado completamente por The Institute for Genomic Research (TIGR), y se comprobó por análisis bioinformáticos de su genoma y por estudios bioquímicos que no existe el gen para GlnRS (*glnS*) y que utiliza la vía indirecta de síntesis de Gln-tRNA^{Gln} (Salazar y col., 2001), por lo tanto se forma Glu-tRNA^{Gln}. ¿Cual es el paso siguiente luego de la acción de la GluRSND en este organismo?. Glu-tRNA^{Gln} podría estar disponible en el citoplasma e ir a la síntesis de proteínas, lo que se traduciría en la frecuente formación de proteínas incorrectas, o bien Glu-tRNA^{Gln} podría ser captado inmediatamente por la AdT luego de la acción de la GluRSND, en un sistema tipo "canal de sustratos" (Stanzel y col., 1994), o bien Glu-tRNA^{Gln} podría también ser discriminado por el EF-Tu de este microorganismo, como ocurre en *T. thermophilus*. Por otra parte en *E. coli*, un microorganismo que no utiliza la vía indirecta ya que cuenta con la Glutaminil-tRNA sintetasa correspondiente, su EF-Tu no enfrenta al producto intermediario Glu-tRNA^{Gln} *in vivo*, y de esta forma podría interactuar indistintamente con el "mal aminoacilado" Glu-tRNA^{Gln} en comparación a los correctamente aminoacilados Glu-tRNA^{Glu} y Gln-tRNA^{Gln}.

A. ferrooxidans posee dos copias idénticas del gen *tuf* ubicados en distintas zonas de su genoma. La anotación del genoma de *A. ferrooxidans* (Holmes, 2002) indica que el contexto genético del gen *tufA* es similar al del *tufA* de *E. coli* (Figura 3b1), mientras que junto a *tufB* se ubica el gen del tRNA^{Trp} hacia 3' y los genes del tRNA^{Thr}, el tRNA^{Gly} y el tRNA^{Tyr} hacia 5' (Figura 3b2).

La existencia de la vía de transamidación en *A. ferrooxidans* y la importancia funcional del EF-Tu en la biosíntesis de proteínas, llevó a que en esta tesis se estudiara si el EF-Tu de *A. ferrooxidans* está involucrado en el reconocimiento del

producto intermediario Glu-tRNA^{Gln}. Del mismo modo, se estudió la unión de los Glu-tRNA^{Gln} incorrectamente aminoacilados al EF-Tu de *E. coli*, un microorganismo que utiliza la vía directa de síntesis de Gln-tRNA^{Gln}.

Hipótesis.

El EF-Tu de *A. ferrooxidans* discrimina el producto intermediario Glu-tRNA^{Gln} perteneciente a la vía indirecta de síntesis de Gln-tRNA^{Gln}, en tanto que el EF-Tu de *E. coli*, un microorganismo que no utiliza esta vía ya que posee la GlnRS correspondiente, no lo discrimina.

Objetivos.

1) Determinar si el EF-Tu de *A. ferrooxidans* discrimina al Glu-tRNA^{Gln} perteneciente a la vía indirecta de síntesis de Gln-tRNA^{Gln}.

Del mismo modo, siendo el EF-Tu una de las proteínas claves en el traspaso correcto de la información contenida en el genoma, desde el DNA hasta las proteínas, se propuso como segundo objetivo:

2) Comparar las propiedades de unión del EF-Tu de *A. ferrooxidans* y de *E. coli* con el Glu-tRNA^{Gln} perteneciente a la vía indirecta.

MATERIALES Y MÉTODOS

I. MATERIALES

1. Bacterias.

Para los experimentos de transformación, extracción de plásmidos e inducción de proteínas se utilizaron las cepas de *E. coli* DH5 α (*supE44* Δ *lacU169* (Φ 80*lacZ* Δ M15) *hsdR17* *recA1* *endA1* *gyrA96* *thi-1* *relA1*) y BL-21 DE3 (*hsdS* *gal*(λ *clts857* *ind1* *Sam7* *nin5* *lacUV5-T7* *gene1*)). Ambas se cultivaron y mantuvieron en medio Luria-Bertani (LB) a 37 °C, excepto cuando se indique otra condición.

2. Vectores y Plásmidos.

pCR[®]2.1-TOPO (Invitrogen): Este vector de 3931 pb codifica para un gen que confiere resistencia a ampicilina y se utilizó para el clonamiento de los productos de PCR. Los plásmidos generados se denominaron pTEFTuAtf para los genes *tuf* de *A. ferrooxidans* y pTEFTuEc para el gen *tufB* de *E. coli*.

pGEX-2T (Amersham Pharmacia Biotech): Este vector de 4948 pb permite la expresión de genes fusionados a la glutation-S-transferasa (GST) y se utilizó para la sobreexpresión y purificación de proteínas. Posee un promotor *tac* inducible por IPTG, un gen que confiere resistencia a ampicilina y un sitio de reconocimiento para trombina entre la GST y la proteína en estudio, que permite su separación por digestión proteolítica desde el producto de fusión. Los plásmidos generados al clonar en este vector se denominaron pGEFA_{atf} o pGEFE_{ec} según correspondiera al gen *tuf* de *A. ferrooxidans* o de *E. coli*, respectivamente.

pKK223-3 (Pharmacia Biotech): En este plásmido de 4584 pb se encuentran clonados los tRNAs utilizados en este estudio en los sitios *EcoRI* y *HindIII*. El plásmido

pAFEUUC1 contiene el tRNA^{Glu}₁, el plásmido pAFEUUC4 contiene el tRNA^{Glu}₄, el plásmido pAFQCUG2 contiene el tRNA^{Gln}₂ y el plásmido pAFQUUG3 contiene el tRNA^{Gln}₃ (Salazar y col., 2003; Katz, A., 2005).

pT7Blue3-3 (Novagen): En este vector de clonamiento de productos de PCR, de 3821 pb, se encuentra clonado el gen *gatCAB* que codifica para la enzima amidotransferasa (AdT) de *A. ferrooxidans*, plásmido denominado pAAF (Salazar y col., 2001).

pCBS2: En este plásmido se encuentra clonado el gen *glnS*, que codifica para la enzima glutaminil-tRNA sintetasa (GlnRS) de *E. coli*, en los sitios *NdeI* y *XbaI*. Este plásmido denominado pCBS*glnS* fue cedido por B. Ruan (Li y col., 1999).

3. Reactivos.

El glutamato, aceite mineral, ampicilina, borato de sodio, glutamina, glutatión reducido, resina de glutatión agarosa, TEMED, persulfato de amonio, SDS, PPO, POPOP, DEPC, bromuro de etidio, PMSF, acrilamida, bisacrilamida, azul de Coomasie, ATP, GTP, GDP, fosfoenolpiruvato, piruvato quinasa y lisozima se adquirieron en Sigma Chemical Co. (USA).

El L-[U-¹⁴C] glutamato (238 mCi/ mol) se adquirió en Amersham Biosciences y la L-[U-¹⁴C] glutamina (273,3 mCi/ mol) se adquirió en PerkinElmer Life Sciences, Inc.

El 2-mercaptoetanol, etanol, metanol, cloroformo, alcohol isoamílico, amoníaco y las placas para la cromatografía en capa fina se adquirieron en Merck.

Las enzimas *EcoRI*, DNA ligasa, *Taq* DNA polimerasa, Mix Elongasa y los nucleótidos dATP, dTTP, dGTP, dCTP se adquirieron en Invitrogen.

La fosfatasa alcalina intestinal de ternera (CIAP) se adquirió en Promega Corp.

Los marcadores de tamaño de DNA: 100 pb y 1 kb "DNA ladder" se adquirieron en MBI Fermentas. El marcador 1 kb "DNA ladder" utilizado para cuantificar las muestras de DNA se adquirió en New England Biolabs.

El marcador de tamaño de proteínas BroadRange se adquirió en Bio-Rad.

Los oligonucleótidos utilizados en las reacciones de amplificación por PCR se adquirieron en Invitrogen.

Los reactivos para medios de cultivo; triptona, extracto de levadura y agar se adquirieron en Mo Bio Laboratories, Inc.

4. Medios de cultivo.

Medio Luria Bertani (LB): Triptona 1% (p/v), NaCl 1% (p/v) y extracto de levadura 0,5% (p/v). Se esterilizó en autoclave por 20 min a 121 °C. Para el medio LB sólido se agregó además agar 1,5% (p/v). Para el medio LB selectivo se agregó ampicilina (LBA) a concentración final de 100 µg/ml luego de esterilizar y enfriar a aproximadamente 50 °C.

Medio SOC: Triptona 2% (p/v), extracto de levadura 0,5% (p/v), NaCl 10 mM y KCl 2,5 mM. Se esterilizó en autoclave por 20 min a 121 °C. Al momento de usar se agregó Mg^{2+} 2 M (1 M en $MgCl_2$ y 1 M en $MgSO_4$) y glucosa 2 M esterilizados por filtración, a una concentración final de 10 mM cada uno.

II MÉTODOS

1. PREPARACIÓN Y ANÁLISIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS.

1.1. Preparación de DNA plasmidial.

Para purificar el DNA plasmidial se inocularon 10 ml de LBA con una colonia de *E. coli* portadora del plasmidio de interés proveniente de una placa de cultivo. El cultivo se incubó toda la noche a 37 °C con agitación. Las bacterias se colectaron por centrifugación a 12000 x g por 1 min. Para la extracción se utilizó el Plasmid Mini Kit (Qiagen) siguiendo las indicaciones del proveedor.

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

Para purificar los fragmentos del DNA producto de amplificaciones por PCR, digestiones con enzimas de restricción o desfosforilaciones se utilizó el QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). La muestra de DNA se sometió a electroforesis en gel de agarosa, se cortó el trozo de gel que contenía la banda de DNA a purificar y se siguió el protocolo del kit.

Para cuantificar las muestras se utilizó el marcador de DNA de 1 kb de New England Biolabs. Se realizaron diluciones de la muestra de DNA a cuantificar y se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa junto al marcador. Se comparó visualmente la intensidad de la banda del DNA con una de tamaño similar del marcador. Las muestras de DNA plasmidial se linearizaron por digestión con una enzima de restricción para su cuantificación.

1.3. Sobreexpresión y purificación de tRNAs.

Para sobreexpresar y purificar los tRNAs se incubó toda la noche un preinóculo de las células de *E. coli* DH5 α , previamente transformadas con el plásmido pKK223-3

recombinante que contiene el tRNA de interés, en medio LBA a 37 °C con agitación. Al día siguiente se inocularon al 5% 1 ó 2 L de LBA con las células del preinóculo y se incubaron a 37 °C con agitación hasta que el cultivo alcanzó una D.O.₆₀₀ de 0,4-0,5. Se agregó IPTG a una concentración final de 0,5 mM para inducir la expresión del tRNA y las células se siguieron incubando toda la noche. Terminado este período, las células se centrifugaron a 4000 x g por 15 min.

Las células centrifugadas se resuspendieron en 12,5 ml de tampón A (20 mM Tris·Cl, pH 7,4; 20 mM MgCl₂; 10 mM 2-mercaptoetanol), se agregó un volumen igual de fenol saturado ácido a pH 4,5 y se incubó 20 min con agitación a temperatura ambiente. Para separar la fase acuosa de la orgánica se centrifugó a 4000 x g por 10 min y se conservó la fase acuosa. A la fase fenólica se le agregó 12,5 ml de tampón A y se repitió el procedimiento. Se mezclaron las fases acuosas y se realizó una nueva extracción con un volumen igual de fenol. A la fase acuosa se le agregó 2-propanol 20% (v/v) para precipitar el DNA y se centrifugó a 4000 x g por 15 min. Al sobrenadante se le ajustó al 60% (v/v) la cantidad de 2-propanol y se centrifugó a 4000 x g por 30 min para recuperar el tRNA. El precipitado se resuspendió en 5 ml de 200 mM Tris·Acetato, pH 8,5 y se incubó por 1 h a 37 °C para desacilar el tRNA. El tRNA se precipitó con 0,1 volumen de 3 M acetato de sodio, pH 4,5 y 2 volúmenes de etanol 100% por toda la noche a -20 °C. Se centrifugó a 12000 x g por 30 min y se lavó con etanol al 70%, resuspendiéndolo finalmente en 5 ml de tampón I (20 mM Tris·HCl, pH 7,0).

El tRNA obtenido se purificó de la preparación de ácidos nucleicos utilizando una resina de intercambio aniónico DE52 (Whatman) preparada según las recomendaciones del proveedor.

La muestra se aplicó a la columna previamente equilibrada con 10 volúmenes de tampón I, y se lavó con 2 volúmenes del mismo tampón. Posteriormente la columna se lavó con 5 volúmenes de tampón II (20 mM Tris·Cl, pH 7,0; 200 mM NaCl) para finalmente eluir el tRNA con 5 volúmenes de tampón III (20 mM Tris·Cl, pH 7,0; 1 M NaCl) colectando fracciones de 0,5 ml. A estas fracciones se les midió la absorbancia a 260 nm, y se precipitaron aquellas que contenían una alta concentración de tRNA. La precipitación se realizó agregando 2 volúmenes de etanol al 100% y dejándolo toda la noche a -20 °C, centrifugando a 12000 x g por 30 min y lavando el precipitado tres veces con etanol al 70%.

La A_{260} se mide antes de pasar por la columna y luego en cada paso de la purificación del tRNA. Con este procedimiento se obtiene el tRNA total de las células con una mayor proporción del tRNA de *A. ferrooxidans* de interés.

2. CLONAMIENTOS.

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

La preparación de DNA genómico utilizado para las reacciones de PCR provenía de la cepa ATCC 23270 de *A. ferrooxidans* o de la cepa DH5 α de *E. coli*. Los partidores que se muestran en la tabla 1 se diseñaron para permitir un primer clonamiento en el vector pCR[®]2.1-TOPO con el producto amplificado de la reacción de PCR y para un posterior subclonamiento en el vector pGEX-2T con el producto de la digestión por restricción del vector pCR[®]2.1-TOPO recombinante, permitiendo quedar en el marco de lectura de la GST.

La mezcla de reacción para amplificar un gen de interés contenía Taq DNA polimerasa (0,4 U para 25 μ l), tampón 1x (20 mM Tris·Cl, pH 8,4; 50 mM KCl), MgCl₂ 1,5 mM, dATP, dTTP, dGTP, dCTP 0,2 mM cada uno y partidores cada uno a una

concentración de 1 μ M. La mezcla de reacción para obtener un fragmento para ser purificado y utilizado en clonamientos contenía Mix Elongasa (mezcla de Taq DNA polimerasa y DNA polimerasa de *Pyrococcus sp.* GB-D), tampón A 1x (60 mM Tris-SO₄, pH 9,1; 18 mM (NH₄)₂SO₄; 1 mM MgSO₄), tampón B 1x (60 mM Tris-SO₄, pH 9,1; 18 mM (NH₄)₂SO₄; 2 mM MgSO₄), dATP, dTTP, dGTP, dCTP 0,4 mM cada uno y partidores cada uno a una concentración de 0,4 μ M.

Tabla 1
Oligonucleótidos utilizados

Nombre (^a)	Secuencia 5'→3'	Largo (pb)	Tm (°C)
F1EFTuAtf	TGTCCAAAGGGAAATTTGAGCGG	23	68
R1EFTuAtf	TTATTCGACCACCTTGGAGACGA	23	68
FtufBEc	TGTCTAAAGAAAAGTTTGAACGTA	24	62
RtufBEc	TTAGCTCAGAACTTTTGCTACAAC	24	66

^a Partidores diseñados para la amplificación de los genes *tuf* desde DNA genómico de la cepa ATCC 23270 de *A. ferrooxidans* y de la cepa DH5 α de *E. coli*. El F1EFTuAtf y R1EFTuAtf corresponden a los partidores utilizados para la amplificación de los genes *tuf* de *A. ferrooxidans* y FtufBEc y RtufBEc a los utilizados en la amplificación del *tufB* de *E. coli*.

Sobre la mezcla de reacción se agregó una gota de aceite mineral para evitar la evaporación de las muestras y las reacciones se realizaron en termocicladores MJ Research, Inc. Los productos se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1%.

2.2. Clonamiento en pCR[®]2.1-TOPO.

El producto de PCR de la reacción con Elongasa Mix se sometió a adenilación para un óptimo clonamiento en el vector pCR[®]2.1-TOPO. La adenilación consiste en

agregar un nucleótido de adenina al extremo 3' de la hebra de DNA producto del PCR con la enzima Taq DNA polimerasa. Este método se basa en que esta enzima al amplificar un DNA molde agrega normalmente un nucleótido, que generalmente es de adenina. La reacción se realizó en un volumen de 100 µl bajo las siguientes condiciones: tampón 1x (20 mM Tris·Cl, pH 8,4; 50 mM KCl), 1,5 mM MgCl₂, 4 U Taq DNA polimerasa, 0,8 mM dATP y una cantidad de DNA mayor que 500 ng. Se incubó 10 min a 72 °C y se purificó el DNA desde el gel de agarosa utilizando el QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen).

La mezcla de reacción del clonamiento en pCR[®]2.1-TOPO contenía los elementos indicados por el proveedor: 10 ng del vector, solución salina (50 mM NaCl; 2,5 mM MgCl₂), H₂O estéril y 0,5 a 4 µl del producto de PCR.

Los plásmidos obtenidos se denominaron pTEFTuAtf o pTEFTuEc, según correspondiera a los genes *tuf* de *A. ferrooxidans* o al gen *tufB* de *E. coli*. Para verificar la ausencia de mutaciones que pudieran afectar los resultados de análisis posteriores los vectores recombinantes se enviaron a secuenciar a centros automatizados de secuenciación (*tuf A. ferrooxidans*: Centro de Análisis y Síntesis de Biomoléculas (Facultad de Medicina, Universidad de Chile); *tufB E. coli*: Centro de Biotecnología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile).

2.3 Subclonamiento en pGEX-2T.

El vector pGEX-2T se digirió con la enzima *EcoRI*, obteniéndose un fragmento lineal de aproximadamente 5000 pb. Para evitar su religación, el vector lineal se sometió a desfosforilación de sus extremos con la enzima CIAP según las recomendaciones del proveedor. El vector digerido y desfosforilado se purificó desde geles de agarosa y se conservó a -20 °C hasta el momento de su utilización.

Los plásmidos pTEFTuAtf o pTEFTuEc recombinantes se digirieron con la enzima de restricción *EcoRI*, liberando el DNA clonado del sitio de clonamiento múltiple, el cual se purificó desde gel de agarosa.

El producto de la digestión correspondiente al gen de interés se ligó a pGEX-2T, digerido y desfosforilado, mediante la enzima T4 DNA ligasa en mezcla de reacción durante toda la noche a 16 °C generando los plásmidos pGEFAtf o pGEFEc, según corresponda a los genes *tuf* de *A. ferrooxidans* o al gen *tufB* de *E. coli*, respectivamente.

3. TRANSFORMACIÓN DE *E. coli*.

3.1. Preparación de células electrocompetentes.

Se incubó toda la noche un preinóculo de la célula receptora 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 D.O.₆₀₀ de 0,8. Se centrifugó a 1500 x g por 15 min a 4 °C, se eliminó el sobrenadante y se lavaron las células dos veces en 30 ml de glicerol al 10% estéril y frío centrifugando cada vez a 1500 x g por 15 min a 4 °C. Finalmente, las células se resuspendieron en aproximadamente 500 µl de glicerol al 10%, se tomó una alícuota de 5 µl de células, se diluyeron con 995 µl de H₂O y se midió la D.O.₆₀₀, ajustando a una D.O.₆₀₀ final de entre 100 y 200, se alicuotaron y conservaron a -80 °C.

3.2. Electroporación.

Se utilizaron 20 µl de células electrocompetentes por cada ensayo de electroporación, las que se colocaron en tubos eppendorf de 500 µl, agregando 1 µl de muestra de DNA con una concentración de 10 ng/µl. La mezcla se depositó entre los

electrodos de la cubeta y éstas se colocaron en la cámara de electroporación previamente enfriada. Se aplicó un pulso de corriente a cada cubeta y se transfirieron las muestras en forma estéril a un tubo eppendorf que contenía 1 ml de medio SOC. Se incubaron 1 h a 37 °C y luego de este período de recuperación, 50-200 µl de células se plaquearon e incubaron toda la noche a 37 °C.

Las electroporaciones se realizaron en un equipo Cell-porator (Gibco BRL Life Technologies, INC), aplicando un pulso de 400 Volts.

4. SOBREEXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.

4.1. Inducción de la expresión de proteínas de fusión GST-EF-Tu.

Para el análisis de los clones y verificación de la expresión se cultivó toda la noche un preinóculo de *E. coli* DH5α transformada con el plásmido recombinante a 37 °C. Se inocularon 2 ml de LBA con 100 µl de este preinóculo y se incubó hasta una D.O.₆₀₀ de 0,8 a 37 °C. Para inducir la expresión de la proteína de fusión se adicionó IPTG a una concentración final de 1 mM y se incubó por 3 h a 37 °C. Se centrifugaron las células y se resuspendieron en 200 µl de tampón de carga 1x para realizar la electroforesis en geles de poliacrilamida. Las muestras se calentaron por 5 min a 90-100 °C, se centrifugaron por 20 segundos y se cargaron 5 µl del sobrenadante en un gel SDS-PAGE al 12% preparado como se describe en Sambrook y col, 1989. La electroforesis se realizó en tampón 25 mM Tris; 0,25 M glicina; 0,1% SDS a 150 V durante 60-80 min y luego se visualizó el gel por tinción con azul de Coomassie.

4.2. Purificación de GST y proteínas de fusión GST•EF-Tu, GST•GluRS1 y GST•GluRS2.

Para la purificación de GST y las proteínas de fusión GST•GluRS1 y GST•EF-Tu se cultivó toda la noche un preinóculo de *E. coli* DH5 α transformada con el plásmido recombinante a 25 °C. Con éste se inocularon 500 a 2000 ml de LBA al 5%. Se cultivaron a 25 °C hasta una D.O.₆₀₀ de 0,8 y se adicionó IPTG a una concentración final de 1 mM, incubándolo a 25 °C por 3 h más. Para la purificación de la proteína de fusión GST•GluRS2 se cultivó toda la noche un preinóculo de *E. coli* BL21 transformada con el plasmidio recombinante a 25 °C. Con éste se inocularon 2 L de LBA al 5% y se cultivó a 25 °C hasta una D.O.₆₀₀ de 0,4-0,5. Se adicionó IPTG a una concentración final de 0,4 mM y se incubó toda la noche a 15 °C.

Se centrifugaron las células a 4000 x g por 10 min a 4 °C y se guardaron a -20 °C.

Las células inducidas con IPTG se resuspendieron en 150 ml de solución de lisis (50 mM Tris•Cl, pH 8,0; 2 mM EDTA; 20 mM 2-mercaptoetanol; 0,1% Tritón X-100; 150 mM NaCl), se agregó el cóctel A de inhibidores de proteasas (2 mM PMSF; 0,1% aprotinina; 2 μ g/ml pepstatina A; 2 μ g/ml leupeptina) y lisozima (100 μ g/ml). Luego de mezclar bien, se incubó 30-45 min en hielo y se trató con ultrasonido con 7 pulsos de 10 s cada uno a 50 watt alternando cada pulso con 1 min de incubación en hielo. Este extracto total de proteínas se centrifugó a 4000 x g por 15 min a 4 °C para separar la porción soluble de los cuerpos de inclusión. Se aplicó el sobrenadante a 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 tampón 1 (50 mM Tris•Cl, pH 8,0; 150 mM NaCl). La proteína GST y las proteínas de fusión GST•EF-Tu, GST•GluRS1 y GST•GluRS2 se eluyeron con 20 mM glutatión reducido en tampón

1. Las fracciones colectadas se analizaron por electroforesis en geles SDS-PAGE y las que poseían la mayor cantidad de proteína de fusión se reunieron y dializaron en una solución de almacenamiento, conservándose a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

La solución de almacenamiento para GST-GluRS 1 y 2 contenía 20 mM Hepes-KOH, pH 7,2; 10 mM MgCl_2 ; 50 mM KCl; 1 mM DTT; 50% glicerol en tanto que para GST y GST-EF-Tu contenía 50 mM Hepes-KOH, pH 7,5; 10 mM MgCl_2 ; 20 μM GDP; 1 mM DTT.

La cuantificación de proteína se realizó por la metódica de Bradford.

4.3. Extracción de proteínas totales desde *E. coli*.

Para la extracción de proteínas totales se cultivó toda la noche a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ un preinóculo de *E. coli* BL21 transformada ya sea con el plásmido recombinante pCBS*glnS*, para la enzima GlnRS, o pAAF, para la enzima AdT.

Para la preparación de GlnRS se inocularon 50 ml de LBA al 1% y se cultivó a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta una D.O.₆₀₀ de 0,4. Se centrifugaron las células a 4000 x g por 10 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, se lavaron en 1 ml de tampón (50 mM Tris-Cl, pH 8,0; 20 mM 2-mercaptoetanol) y se centrifugaron a 3000 x g por 5 min. Se resuspendieron en 5 ml de tampón de lisis (50 mM Tris-Cl, pH 8,0; 20 mM 2-mercaptoetanol; 0,2% tritón X-100), se agregó el cóctel A de inhibidores de proteasas y lisozima (100 $\mu\text{g/ml}$). Luego de mezclar bien, se incubó 30-45 min en hielo y se trató con ultrasonido. Este extracto total de proteínas se centrifugó a 12000 x g por 30 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y el sobrenadante se ultracentrifugó a 200000 x g (Ultracentrifuga Sorvall, rotor T-875) por 1 h. El sobrenadante se dializó contra tampón 20 mM Hepes-KOH, pH 7,2; 10 mM MgCl_2 ; 50 mM KCl; 1 mM DTT; 50% glicerol y se conservó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Para la preparación de AdT se inocularon 750 ml de LBA al 2% y se cultivó a 37 °C hasta una D.O.₆₀₀ de 0,4. Se adicionó IPTG a una concentración final de 1 mM incubándolo a 37 °C por 2 h más. Se centrifugó a 4000 x g por 10 min y las células se resuspendieron en 5 ml de tampón para el tratamiento con ultrasonido (50 mM Tris·Cl, pH 8,0; 500 mM NaCl; 5 mM 2-mercaptoetanol; 5 mM MgCl₂; 10% glicerol) más el cóctel A de inhibidores de proteasas y lisozima (100 µg/ml). Luego de mezclar bien, se incubó 30-45 min en hielo y se trató con ultrasonido. Este extracto total de proteínas se centrifugó a 12000 x g por 30 min a 4 °C y el sobrenadante se ultracentrifugó a 200000 x g por 1 h. El sobrenadante se dializó contra tampón 25 mM Hepes·KOH, pH 7,5; 1 mM DTT; 0,1 mM EDTA; 0,1 mM benzamidina; 10% glicerol y se conservó a -20 °C.

5. ACTIVIDAD *in vitro* DE PROTEÍNAS.

5.1. Aminoacilación de tRNAs.

La reacción de aminoacilación se llevó a cabo a 37 °C por 30-45 min en tampón 12,6 mM Hepes·KOH, pH 7,2; 3,8 mM KCl; 1,5 mM MgCl₂; 10 µM glutamato (5 µM glutamato frío y 5 µM glutamato radiactivo (actividad específica 238 mCi/mmol)) o 10 µM glutamina (5 µM glutamina fría y 5 µM glutamina radiactiva (actividad específica 273,3 mCi/mmol)), o 100 µM glutamato (75 µM glutamato frío y 25 µM glutamato radiactivo (actividad específica 238 mCi/mmol)) para la reacción con GluRSII; 5 mM ATP; 2 mM DTT; 0,2 µg/µl tRNA; 1 U de pirofosfatasa más la aminoacil-tRNA sintetasa adecuada a una concentración de: 25 ηM GST·GluRS1; 200 ηM GST·GluRS2; 0,1 µg/µl GlnRS. Al finalizar la reacción se realizó una extracción con un volumen de fenol ácido seguido por una extracción con cloroformo. Se precipitó con 1/10 volumen de 3 M acetato de sodio, pH 4,5 y 3 volúmenes de etanol al 100%, se lavó una vez con

etanol al 70% y luego de secar se conservó a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento de su utilización.

Para estimar la actividad enzimática se tomaron 20 μl de la solución de reacción, se depositaron en un filtro de papel (Whatman 3MM, 15 mm de lado) previamente saturado con 0,75 mM de glutamato o glutamina y se introdujo en TCA 5% frío, se lavó con TCA 5% frío dos veces por 30 min y luego con etanol 100% por 5 min. Los filtros se secaron 15 min a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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 en los filtros se cuantificó en un contador de centelleo líquido Delta 300 (Searle Analytical Inc.).

5.2 Formación del complejo ternario.

La formación del complejo ternario EF-Tu-GTP- $[^{14}\text{C}]$ aa-tRNA^{aa} y la posterior contabilización del $[^{14}\text{C}]$ aa-tRNA^{aa} se basó en el procedimiento para purificar aa-tRNA^{aa} (Ribeiro y col., 1995), y se modificó para realizarlo mediante un ensayo "GST-pulldown". En el ensayo, se une la proteína de fusión GST-EF-Tu a las perlas de glutatión agarosa, el EF-Tu se activa transformando todo el GDP en GTP con fosfoenolpiruvato y piruvato quinasa. Se agrega el $[^{14}\text{C}]$ aa-tRNA^{aa} y luego de dos lavados, el $[^{14}\text{C}]$ aa-tRNA^{aa} se eluye desde el EF-Tu y se cuenta la radiactividad.

En un tubo eppendorf se mezclaron 5,7 μg de la proteína de fusión GST-EF-Tu con 30 μl de perlas de glutatión agarosa preparadas según las indicaciones del proveedor, en 100 μl de tampón A (50 mM Tris-Cl, pH 7,4; 50 mM KCl; 50 mM NH_4Cl ; 10 mM MgCl_2 ; 1 mM GTP; 1 mM DTT) y se incubó por 45 min a 1 h a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ con agitación suave, se centrifugó por 1 min a $12000 \times g$ y se descartó el sobrenadante. El pellet se lavó para descartar el EF-Tu no unido, con 100 μl de tampón A incubando por

cinco min con agitación suave, se centrifugó 1 min a 12000 x g y se descartó el sobrenadante. El EF-Tu se activó con piruvato quinasa y fosfoenolpiruvato en 100 µl de tampón B (50 mM Tris-Cl, pH 7,4; 50 mM KCl; 50 mM NH₄Cl; 10 mM MgCl₂; 1 mM GTP; 1 mM DTT; 5 mM PEP; 100 µg/ml PK) por 15 min a 37 °C, se centrifugó por 1 min a 12000 x g y se descartó el sobrenadante. El pellet se mezcló con 100 µl del [¹⁴C]aa-tRNA^{aa} resuspendido en tampón A por 15 min a 4 °C con agitación suave, se centrifugó por 1 min a 12000 x g y se tomó 80 µl del sobrenadante para cuantificarlo en contador de centelleo descartando el resto. El pellet se lavó con 100 µl de tampón A por 5 min con agitación, se centrifugó por 1 min a 12000 x g y se tomó 80 µl del sobrenadante para cuantificarlo en contador de centelleo descartando el resto. El pellet se lavó con 100 µl de tampón C (50 mM Hepes, pH 7,5; 150 mM NaCl; 50 mM NH₄Cl; 10 mM MgCl₂; 50 µM GTP; 1 mM DTT) por 5 min con agitación suave, se centrifugó por 1 min a 12000 x g y se tomó 80 µl del sobrenadante para cuantificarlo en contador de centelleo descartando el resto. Se eluyó el [¹⁴C]aa-tRNA^{aa} desde el EF-Tu con 100 µl de tampón D (100 mM borato de sodio, pH 7,5; 1 M NaCl; 10 mM MgCl₂; 50 µM GTP; 1 mM DTT) por 5 min con agitación suave, se centrifugó por 1 min a 12000 x g y se tomó 80 µl del sobrenadante para cuantificarlo en contador de centelleo, descartando el resto.

5.3 Transamidación.

La reacción se llevó a cabo en tampón de transamidación 2x que contenía 20 mM Hepes·KOH, pH 7,2; 10 mM KCl; 2 mM DTT; 3 mM MgCl₂; 2 mM ATP; 2 mM glutamina el cual se utilizó para resuspender el [¹⁴C]aa-tRNA^{aa}. Se agregó un volumen igual de AdT (40 µg de extracto proteico) en 25 mM Hepes·KOH, pH 7,2; 1 mM DTT; 0,1 mM EDTA; 0,1 mM benzamidina; 10% glicerol y la mezcla se incubó a 37 °C por un

tiempo máximo de 1 h. La reacción se detuvo agregando 1 volumen de 0,6 M acetato de sodio, pH 5,2 seguido por una extracción con 1 volumen de fenol saturado ácido a pH 4,5 y una extracción con 1 volumen de cloroformo. La fase acuosa con el aa-tRNA^{aa} se removió y precipitó con 3 volúmenes de etanol 100%. El sedimento seco se resuspendió en 50 µl de 25 mM KOH y se incubó a 65 °C por 15 min para desacilar el [¹⁴C]aa-tRNA^{aa}. La mezcla se neutralizó agregando 1,3 µl de 100 mM HCl y luego se secó al vacío. Las muestras se resuspendieron en 6 µl de H₂O bidestilada y una alícuota de 1-2 µl se cargó en placas de cromatografía en capa fina (cromatofolios plásticos de celulosa, espesor de capa 0,1 mm). Después de la cromatografía en amoníaco:agua:cloroformo:metanol (2:1:6:6) la placa se secó a 65 °C y se expuso en una pantalla tipo k de detección de radioisótopos por 48-72 h. Los [¹⁴C]aminoácidos se detectaron explorando la pantalla en un Personal Molecular Imager FX de Bio-Rad y se analizó con el programa QuantityOne de Bio-Rad.

RESULTADOS

I CLONAMIENTO Y EXPRESIÓN DE EF-Tu

1. Amplificación por PCR de los genes *tuf* de *A. ferrooxidans* y del gen *tufB* de *E. coli*.

En el genoma de *A. ferrooxidans* existen dos copias del gen *tuf*. Las secuencias nucleotídicas de ambas son idénticas (1188 pb), por lo que el producto amplificado por la reacción de PCR estará conformado por la amplificación de ambos genes. En *E. coli* en tanto, las secuencias nucleotídicas (ambas de 1182 pb) son distintas. Los partidores se diseñaron según la secuencia de *tufB*.

Los genes *tuf* se amplificaron por PCR desde el DNA genómico de las cepas ATCC 23270 de *A. ferrooxidans* y DH5 α de *E. coli* (Figura 7) utilizando el Mix Elongasa de Invitrogen (Ver Materiales y Métodos).

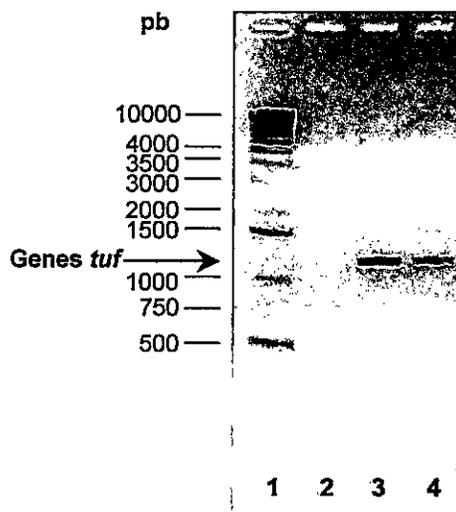


Figura 7. Amplificación por PCR de los genes *tuf*. Fotografía de un gel de agarosa al 1% de los productos de PCR. 1) marcador de tamaños de DNA 1 kb "DNA ladder" MBI Fermentas, 2) control negativo de amplificación de PCR, 3) amplificación desde el DNA genómico de *A. ferrooxidans* ATCC 23270, 4) amplificación desde el DNA genómico de *E. coli* DH5 α .

2. Clonamiento de los genes *tuf*.

Luego de la amplificación, el producto de PCR se separó por electroforesis en geles de agarosa, purificando desde los geles la banda correspondiente a los genes *tuf*. Se clonó en pCR[®]2.1-TOPO, dando origen a los vectores pTEFTuAtf o pTEFTuEc según correspondiera al gen de *A. ferrooxidans* o de *E. coli*, respectivamente. La secuencia de los genes se confirmó por secuenciación del DNA.

Los plásmidos recombinantes pTEFTuAtf y pTEFTuEc se digirieron con la enzima de restricción *EcoRI* liberando un fragmento de aproximadamente 1200 pb correspondiente a los genes *tuf*. Estos genes se subclonaron en el vector pGEX-2T previamente digerido con la enzima de restricción *EcoRI*, generando los plásmidos recombinantes pGEFAtf o pGEFEc según correspondiera al gen de *A. ferrooxidans* o de *E. coli*, respectivamente (Figura 8).

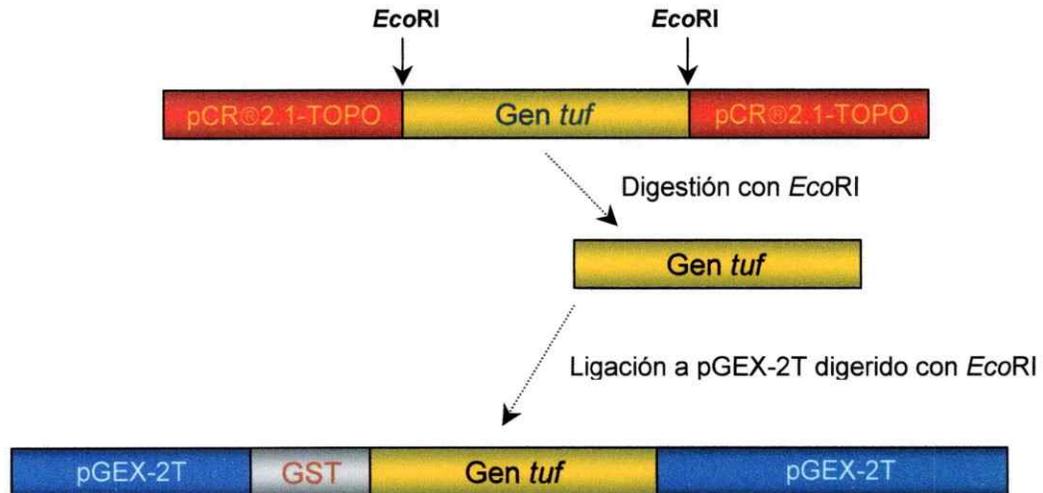


Figura 8. Representación esquemática del subclonamiento en el vector de expresión pGEX-2T. La digestión con la enzima *EcoRI* de los vectores pTEFTuAtf o pTEFTuEc libera los genes *tuf*, los que se ligaron al vector pGEX-2T previamente digerido con la misma enzima, generándose los vectores pGEFAtf para *A. ferrooxidans* o pGEFEc para *E. coli*.

La amplificación de los genes *tuf* se diseñó de tal modo de permitir el clonamiento en el marco de lectura de la glutatión-S-transferasa, por lo que los productos de expresión, las proteínas de fusión GST•EF-Tu, se pueden purificar por columnas de glutatión agarosa.

3. Sobreexpresión y purificación de la proteína de fusión GST•EF-Tu.

Para sobreexpresar y purificar las proteínas de fusión GST•EF-Tu se transformó *E. coli* DH5 α con los plásmidos pGEFAtf o pGEFEc. Las células transformadas se cultivaron en medio LBA líquido con IPTG 1 mM y se verificó por electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS la aparición de una proteína de 70 kDa, correspondiente al tamaño estimado para el producto de fusión de EF-Tu con GST (Figura 9).

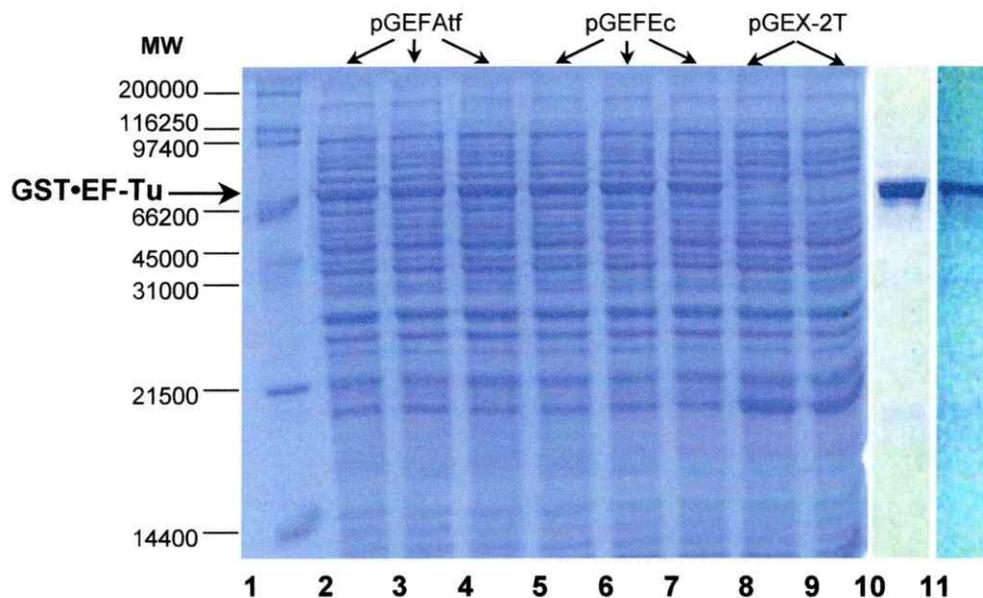


Figura 9. Sobreexpresión y purificación de los EF-Tu. Fotografía de un gel de poliacrilamida al 12% donde se separó el extracto total de proteínas de *E. coli* DH5 α cultivadas a 30°C: 1) Marcador de tamaño de proteínas Broad Range de Bio-Rad, 2) y 5) Inducción con 0,1 mM IPTG, 3) y 6) Inducción con 0,5 mM IPTG, 4) y 7) Inducción con 1 mM IPTG, 8) y 9) Células transformadas con pGEX-2T, 2), 3) y 4) Células transformadas con pGEFAtf, 5), 6) y 7) Células transformadas con pGEFEc, 10), 11) GST•EF-Tu de *A. ferrooxidans* y de *E. coli* respectivamente, purificadas en columnas de glutatión agarosa.

La purificación de los EF-Tu de *A. ferrooxidans* y de *E. coli* se realizó a partir de un extracto de células cultivadas en LBA líquido con IPTG 1 mM por cromatografía de afinidad en columnas de glutatión agarosa. Las fracciones que contenían la proteína más concentrada se colectaron y se dializaron (Ver Materiales y Métodos). Se cuantificaron por la metódica de Bradford obteniéndose el EF-Tu de *A. ferrooxidans* a una concentración de 53 μM y el EF-Tu de *E. coli* a una concentración de 25 μM .

II EXPRESIÓN Y OBTENCIÓN DE aa-tRNA^{aa}

1. Purificación de GluRS1 y GluRS2.

Los genes de las aminoacil-tRNA sintetasas GluRS1 y GluRS2 de *A. ferrooxidans* utilizadas en esta tesis ya habían sido clonados como productos de fusión con GST en el vector pGEX-2T, dando origen a los plásmidos recombinantes pAFglX1 (GluRS1) y pAFglX2 (GluRS2) (Salazar y col., 2003). Estas proteínas se sobreexpresaron en células de *E. coli* como se describió en Materiales y Métodos.

Las proteínas se purificaron por cromatografía de afinidad en columnas de glutatión-agarosa a partir de un extracto de células cultivadas en LBA líquido con IPTG 1mM. GluRS1 se obtuvo a una concentración de 9,2 μM . GluRS2 tuvo que ser purificada frecuentemente y por lo tanto se obtuvo a concentraciones variables.

2. Obtención de GlnRS de *E. coli*.

Se obtuvo la Glutaminil-tRNA sintetasa preparando un extracto de proteínas totales desde una cepa de *E. coli* BL21 transformada con el plásmido pCBSglnS (Li y col., 1999).

3. Obtención de [^{14}C]aminoacil-tRNAs.

Los tRNAs utilizados fueron: tRNA^{Glu}₁, tRNA^{Glu}₄, tRNA^{Gln}₂ y tRNA^{Gln}₃. Como se aprecia en la Figura 10, los tRNA^{Glu}₁, tRNA^{Glu}₄ y tRNA^{Gln}₂ poseen un brazo D largo, es decir, poseen cuatro nucleótidos en el tallo D, mientras que el tRNA^{Gln}₃ posee un brazo D corto, de solo tres nucleótidos. Esta diferencia estructural implica la utilización de las diferentes aaRS para formar los distintos aa-tRNA^{aa} (Salazar y col., 2003).

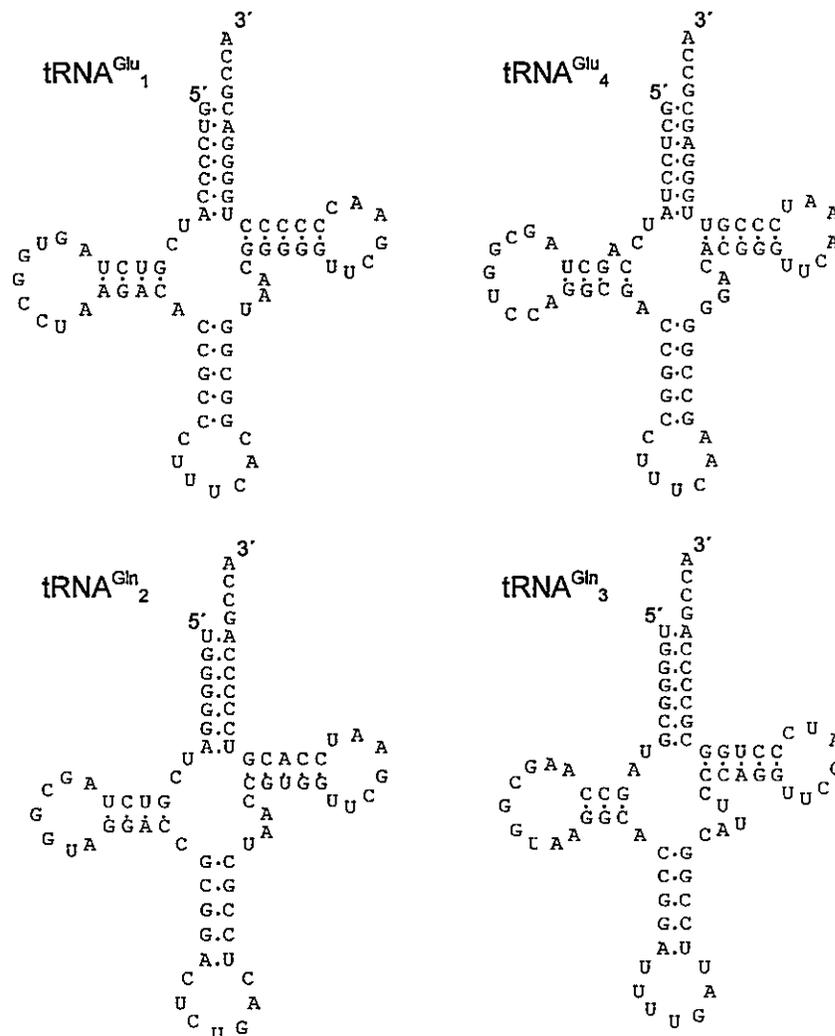


Figura 10. Representación esquemática de los tRNAs de *A. ferrooxidans*. Estructura secundaria según el programa tRNAscan-SE (Lowe y Eddy, 1997) de los tRNAs utilizados en las reacciones de aminoacilación.

Los distintos [^{14}C]aa-tRNA^{aa} sintetizados con las enzimas GluRS1 y GluRS2 de *A. ferrooxidans* y GlnRS de *E. coli* (Tabla 2) se utilizaron posteriormente en el análisis de la formación de los complejos ternarios EF-Tu·GTP·[^{14}C]aa-tRNA^{aa}.

Tabla 2
[^{14}C]aminoacil-tRNA^{aa}s sintetizados en reacciones de aminoacilación

(^a) aaRS utilizada	GluRS1			GluRS2	GlnRS
(^b) aa-tRNA ^{aa} sintetizado	Glu-tRNA ^{Glu} ₁	Glu-tRNA ^{Gln} ₂	Glu-tRNA ^{Glu} ₄	Glu-tRNA ^{Gln} ₃	Gln-tRNA ^{Gln} ₃

^a Las aaRS se utilizaron a una concentración de 25 nM GluRS1, 200 nM GluRS2 y 0,1 µg/µl GlnRS.

^b Una vez sintetizados, los aa-tRNA^{aa} se conservaron a -80°C hasta su utilización.

III UNION DE [^{14}C]aa-tRNA^{aa} a GST•EF-Tu

1. Reacciones de formación del complejo ternario utilizando el EF-Tu de *At. ferrooxidans* y Glu-tRNA^{Glu}₁.

La formación del complejo ternario GST•EF-Tu·GTP·[^{14}C]aa-tRNA^{aa} se realizó en tubo eppendorf mediante un ensayo "GST-pulldown" como se describe en la Figura 11 y en Materiales y Métodos. Este método se llevó a cabo a 4°C para evitar la desnaturación de la proteína y la degradación del aa-tRNA^{aa} (Louie y col., 1984).

Cuando se purifica EF-Tu, éste posee GDP unido y se encuentra en su conformación inactiva, por lo tanto es necesario activarla intercambiando el GDP por GTP, lo que se realizó inmediatamente antes de cada ensayo incorporando al tampón de reacción piruvato quinasa y fosfoenolpiruvato con el objetivo de convertir todo el GDP presente en GTP (Gromadski y col., 2002).

Se consideró además el hecho de activar el EF-Tu antes o después de unirla a la resina de glutatión agarosa ya que al unir el GTP, el EF-Tu cambia considerablemente su conformación, pudiendo afectar la unión a la resina.

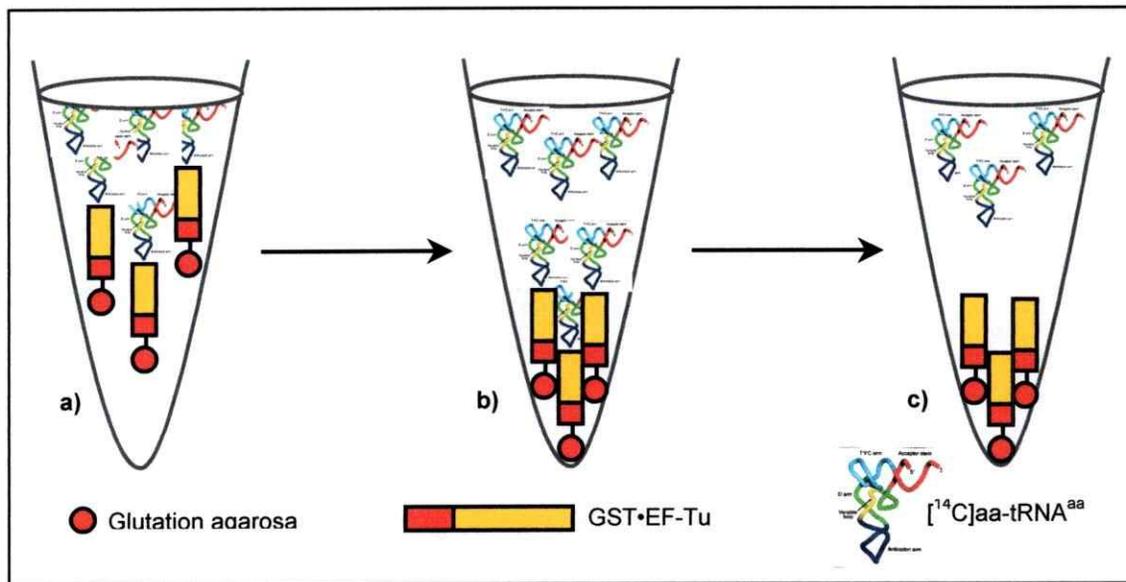


Figura 11. Metodología para determinar la unión de los aa-tRNA^{aa} al EF-Tu. a) Se incubó el [¹⁴C]aa-tRNA^{aa} con la proteína de fusión GST•EF-Tu ya activada, formando el complejo ternario EF-Tu•GTP•[¹⁴C]aa-tRNA^{aa}. b) Se centrifuga y el pellet se lava dos veces. c) Finalmente se eluye el [¹⁴C]aa-tRNA^{aa} desde el EF-Tu y el sobrenadante con el [¹⁴C]aa-tRNA^{aa} se contabiliza en contador de centelleo.

Para esto se realizó el ensayo en ambas condiciones siguiendo el procedimiento general pero además, liberando la proteína de fusión desde la resina por competencia con 40 mM glutatión reducido como último paso. La medición por Bradford de estos eluidos arrojó como resultado que al unir EF-Tu a la resina y luego activarlo, se logró un porcentaje mayor de unión de la proteína de fusión a la resina. Mientras que al activarla y luego mezclarla con la resina la unión fue menor.

Una vez que se unió el EF-Tu a la resina y se activó, se incorporó el [¹⁴C]aa-tRNA^{aa} a la reacción. Se escogió [¹⁴C]Glu-tRNA^{Glu}₁ para realizar los primeros ensayos control ya que con éste se estandarizaron las reacciones de aminoacilación. Su validez se probó utilizando como control negativo GST y GST•EF-Tu sin activar, los resultados se muestran en las Figuras 12 y 13.

El ensayo "GST-pulldown" utilizado para la formación del complejo ternario permite seguir su curso en diferentes etapas, como se muestra en la Figura 11 y siguientes:

- T1: Recuento de [^{14}C]aa-tRNA^{aa} no unido a EF-Tu.
- T2: Lavado 1, recuento de [^{14}C]aa-tRNA^{aa} unido inespecíficamente.
- T3: Lavado 2, recuento de [^{14}C]aa-tRNA^{aa} unido inespecíficamente.
- T4 elu: Recuento de aa-tRNA^{aa} unido y eluido desde el EF-Tu. El [^{14}C]aa-tRNA^{aa} se eluye desde el EF-Tu con 1M NaCl.

En la Figura 12 se muestra el resultado del ensayo de formación del complejo ternario utilizando la proteína GST purificada como control negativo. Paralelamente se utilizó [^{14}C]Glu-tRNA^{Glu}₁ y GST•EF-Tu como control positivo. Luego de la formación del complejo ternario utilizando el GST•EF-Tu de *A. ferrooxidans* y la proteína control GST, se contabiliza por medio de contador de centelleo la radiactividad del [^{14}C]aa-tRNA^{aa} en el sobrenadante inicial (T1), en los lavados (T2 y T3) y en la elución desde el EF-Tu (T4 elu). Se observa que la razón en la unión del [^{14}C]Glu-tRNA^{Glu}₁ al GST•EF-Tu con respecto a GST es de 37 veces.

La reacción de formación del complejo ternario con la proteína GST•EF-Tu se realizó a una concentración de [^{14}C]Glu-tRNA^{Glu}₁ de 639 ηM , alcanzando una unión de 18,7 pmoles al EF-Tu (Barra T4 elu). En la reacción control, la formación del complejo ternario con GST, se realizó a una concentración de [^{14}C]Glu-tRNA^{Glu}₁ de 675 ηM , recuperándose 0,5 pmoles del aa-tRNA^{aa} (Barra T4 elu).

El alto número de pmoles de $[^{14}\text{C}]\text{Glu-tRNA}^{\text{Glu}}_1$ registrado en T1, en comparación a T4 elu, probablemente se debe al exceso de $[^{14}\text{C}]\text{Glu-tRNA}^{\text{Glu}}_1$ utilizado en este ensayo, situación que se considera en los ensayos posteriores.

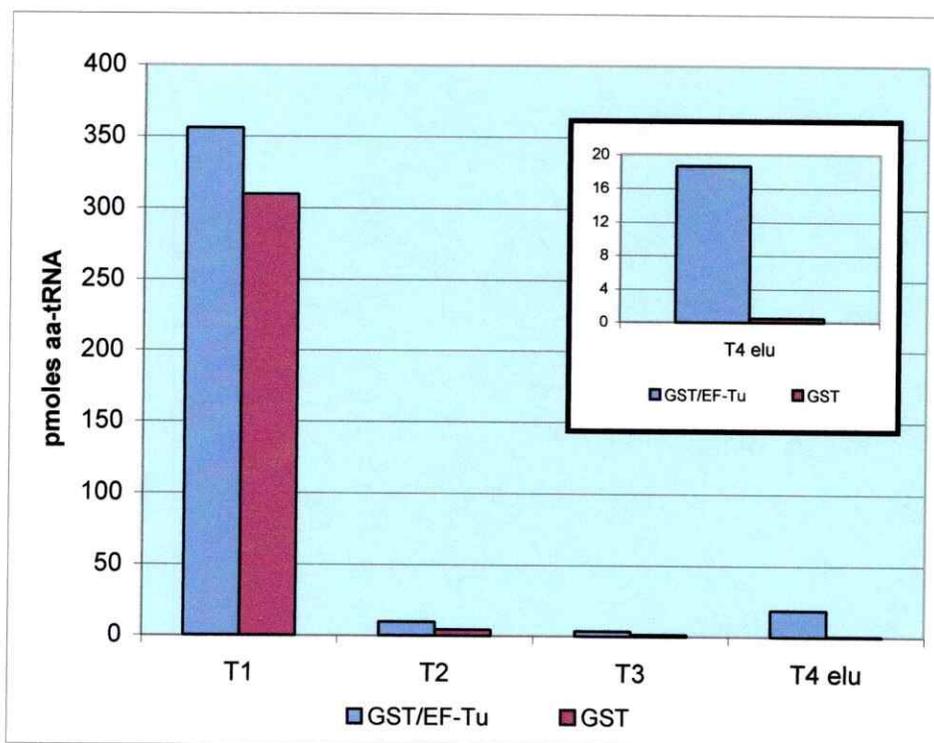


Figura 12. Especificidad en la unión de aa-tRNA^{aa} al EF-Tu. Pmoles de $[^{14}\text{C}]\text{Glu-tRNA}^{\text{Glu}}_1$ obtenidos a través de ensayos de formación del complejo ternario utilizando la proteína GST como control negativo y la proteína de fusión GST•EF-Tu como control positivo. En el recuadro se muestra una ampliación de las barras correspondientes a T4 elu.

En la Figura 13 se muestra el resultado del ensayo de formación del complejo ternario EF-Tu•GTP• $[^{14}\text{C}]\text{Glu-tRNA}^{\text{Glu}}_1$ a partir de los complejos binarios EF-Tu•GTP y EF-Tu•GDP. La concentración de $[^{14}\text{C}]\text{Glu-tRNA}^{\text{Glu}}_1$ fue de 139 ηM , con el fin de estar más cerca de los valores de K_d registrados por Asahara y col., que rondan los 50-100 ηM (Asahara y Uhlenbeck, 2002). En T4 elu el $[^{14}\text{C}]\text{Glu-tRNA}^{\text{Glu}}_1$ recuperado desde el EF-Tu activado es de 7,6 pmoles mientras que del EF-Tu sin activar es de 2,8 pmoles, indicando que sí se logra la conversión del GDP por GTP unido al EF-Tu y que el EF-

Tu unido a GDP se une más débilmente al aa-tRNA^{aa} (Dell y col., 1990, Kothe y col., 2004).

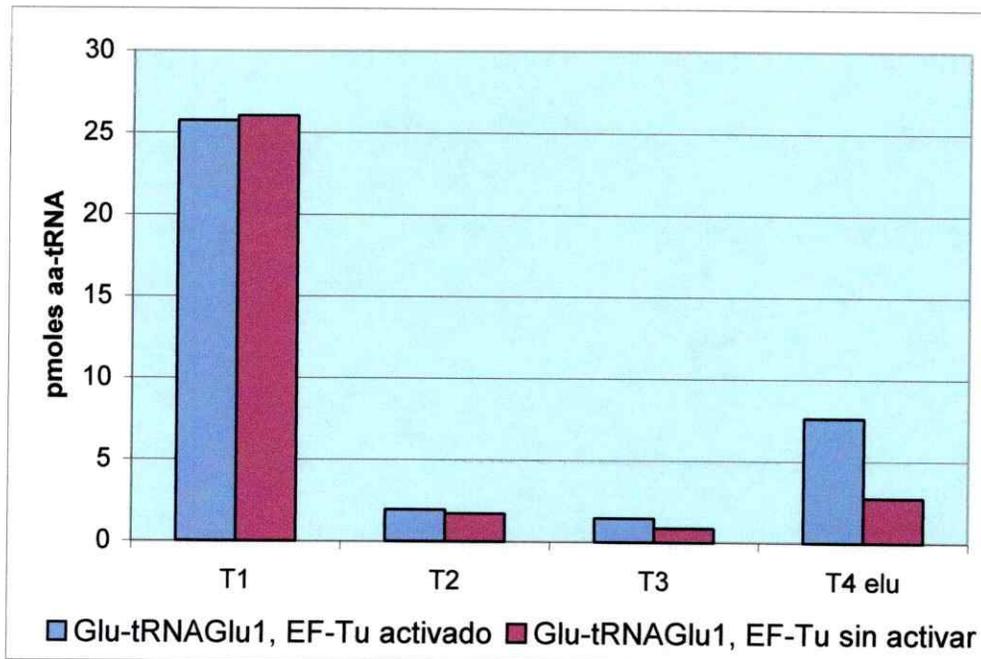


Figura 13. Efecto de la activación del EF-Tu en la formación del complejo ternario. Pmoles de [¹⁴C]Glu-tRNA^{Glu}₁ obtenidos a través del ensayo de formación del complejo ternario utilizando el EF-Tu sin activar como control negativo y el EF-Tu activado como control positivo.

2. Reacciones de formación del complejo ternario utilizando el EF-Tu de *A. ferrooxidans* o de *E. coli*.

Glu-tRNA^{Glu}₁, Glu-tRNA^{Glu}₄ y Gln-tRNA^{Gln}₃ corresponden a aa-tRNA^{aa} correctamente aminoacilados y por lo tanto debieran tener una mayor afinidad por el EF-Tu, por sobre los aa-tRNA^{aa} "incorrectamente aminoacilados" Glu-tRNA^{Gln}₂ y Glu-tRNA^{Gln}₃.

Antecedentes previos indicaban que la K_d de los EF-Tu por cualquiera de los aa-tRNA^{aa} con los que había sido estudiado mostraban valores similares, entre 50 y 100 nM (Asahara y Uhlenbeck, 2002). Por este motivo las concentraciones de aa-

tRNA^{aa} a las que se llevaron a cabo las reacciones de formación del complejo ternario fueron en promedio de 74 η M, correspondiendo a un valor cercano a lo descrito (Asahara y Uhlenbeck, 2002) y así estar más cerca de la K_d probable.

En la Figura 14 se muestran las gráficas de los datos obtenidos en la formación de los complejos ternarios con el EF-Tu y los distintos [¹⁴C]aa-tRNA^{aa} de *A. ferrooxidans*.

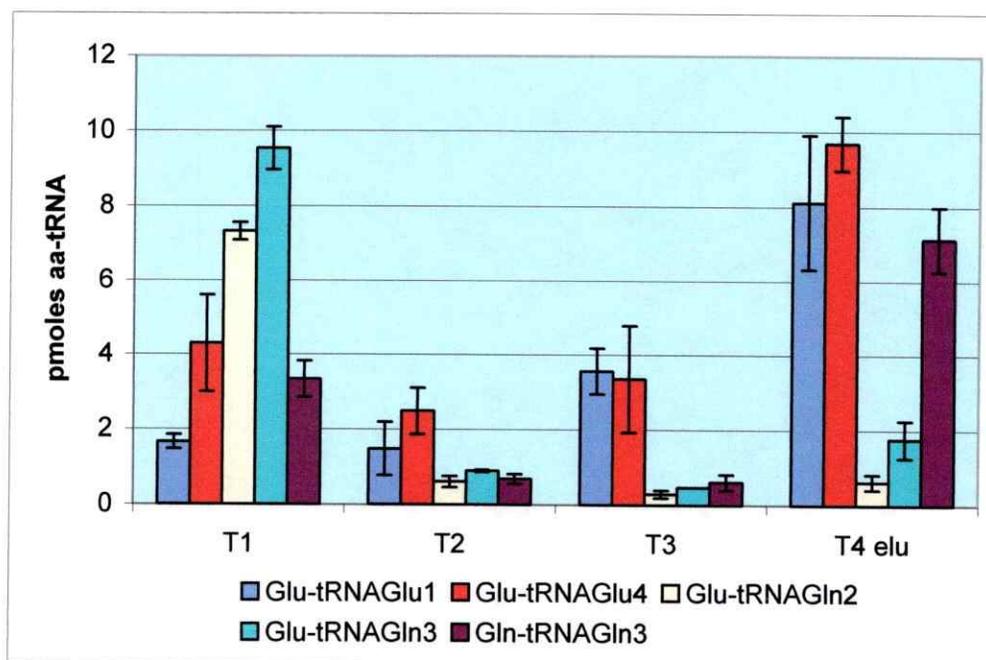


Figura 14. Formación del complejo ternario con distintos aa-tRNA^{aa} y el EF-Tu de *A. ferrooxidans*. El complejo ternario se formó con [¹⁴C]aminoacil-tRNA^{aa}s correctamente aminoacilados (Glu-tRNA^{Glu1}, Glu-tRNA^{Glu4} y Gln-tRNA^{Gln3}) e incorrectamente aminoacilados (Glu-tRNA^{Gln2} y Glu-tRNA^{Gln3}). Cada barra en el gráfico representa el promedio de dos experimentos independientes.

La concentración de los [¹⁴C]Glu-tRNA^{Glu1}, [¹⁴C]Glu-tRNA^{Glu4} y [¹⁴C]Gln-tRNA^{Gln3} en el ensayo mostrado en la Figura 14 fue 86, 74 y 81 η M respectivamente. La concentración de [¹⁴C]Glu-tRNA^{Gln2} y [¹⁴C]Glu-tRNA^{Gln3} en el ensayo fue de 81 y 76 η M respectivamente.

Al igual que el EF-Tu de *T. thermophilus*, el EF-Tu de *A. ferrooxidans* presenta una clara diferencia entre aa-tRNA^{aa} acilados correctamente (Glu-tRNA^{Glu}, Gln-tRNA^{Gln}) en comparación a los Glu-tRNA^{Gln} intermediarios de la vía indirecta. La diferencia en la unión al EF-Tu entre aa-tRNA^{aa} acilados correctamente comparados con los Glu-tRNA^{Gln} es de hasta 13 veces (Tabla 3).

Tabla 3
Unión de Glu-tRNA y Gln-tRNA al EF-Tu de *A. ferrooxidans*

	Glu-tRNA ^{Glu} ₁ (86) ^a	Glu-tRNA ^{Glu} ₄ (74)	Glu-tRNA ^{Gln} ₂ (76)	Glu-tRNA ^{Gln} ₃ (81)	Gln-tRNA ^{Gln} ₃ (81)
Glu ó Gln-tRNA unido (pmoles) ^b	8.11 ± 1.79	9.68 ± 0.72	0.63 ± 0.20	1.76 ± 0.75	7.12 ± 0.49

^a Concentración (en nM) de [¹⁴C]aa-tRNA^{aa} en la mezcla de reacción.

^b pmoles de [¹⁴C]aa-tRNA^{aa} eluido desde el EF-Tu. Cada número representa el promedio de dos experimentos independientes.

Para determinar si el EF-Tu de *E. coli* no discrimina los Glu-tRNA^{Gln}, se formaron los complejos ternarios con [¹⁴C]Glu-tRNA^{Glu}₁, [¹⁴C]Glu-tRNA^{Glu}₄, [¹⁴C]Gln-tRNA^{Gln}₃, [¹⁴C]Glu-tRNA^{Gln}₂ y [¹⁴C]Glu-tRNA^{Gln}₃ de *A. ferrooxidans* y el EF-Tu de *E. coli*. Los resultados se muestran en la Figura 15.

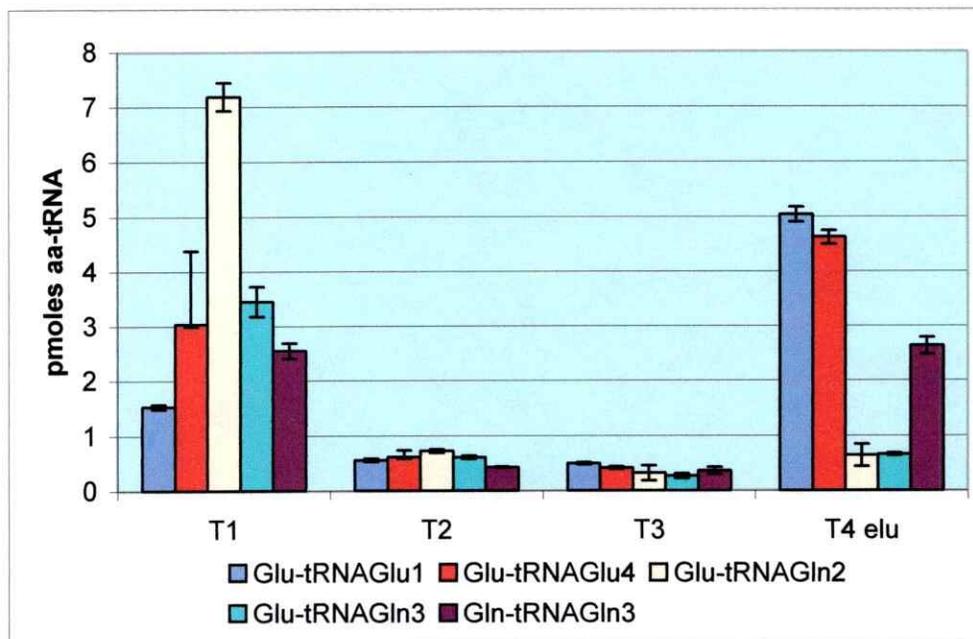


Figura 15. Formación del complejo ternario con distintos aa-tRNA^{aa} de *A. ferrooxidans* y el EF-Tu de *E. coli*. El complejo ternario se formó con [¹⁴C]aminoacil-tRNA^{aa}s correctamente aminoacilados (Glu-tRNA^{Glu}₁, Glu-tRNA^{Glu}₄ y Gln-tRNA^{Gln}₃) e incorrectamente aminoacilados (Glu-tRNA^{Gln}₂ y Glu-tRNA^{Gln}₃). Cada barra en el gráfico representa el promedio de dos experimentos independientes.

La concentración de los [¹⁴C]Glu-tRNA^{Glu}₁, [¹⁴C]Glu-tRNA^{Glu}₄ y [¹⁴C]Gln-tRNA^{Gln}₃ en el ensayo mostrado en la Figura 15 fue 75, 80 y 66 ηM respectivamente. La concentración de [¹⁴C]Glu-tRNA^{Gln}₂ y [¹⁴C]Glu-tRNA^{Gln}₃ en el ensayo fue de 76 y 42 ηM respectivamente.

Si bien *E. coli* es un organismo que posee las veinte aaRS, y por lo tanto no utiliza la vía indirecta de síntesis de Gln-tRNA^{Gln}, su EF-Tu también es capaz de discriminar los productos intermediarios Glu-tRNA^{Gln}, aunque la diferencia en la unión al EF-Tu entre aa-tRNA^{aa} acilados correctamente comparados con los Glu-tRNA^{Gln}, es menor que en *A. ferrooxidans*, se alcanza una diferencia de hasta 8 veces (Tabla 4).

Tabla 4
Unión de Glu-tRNA y Gln-tRNA al EF-Tu de *E.coli*

	Glu-tRNA ^{Glu} ₁ (75) ^a	Glu-tRNA ^{Glu} ₄ (80)	Glu-tRNA ^{Gln} ₂ (76)	Glu-tRNA ^{Gln} ₃ (42)	Gln-tRNA ^{Gln} ₃ (66)
Glu ó Gln-tRNA unido (pmoles) ^b	5.04±0.14	4.63±0.11	0.64±0.20	0.66±0.03	2.64±0.16

^a Concentración (en nM) de [¹⁴C]aa-tRNA en la mezcla de reacción.

^b pmoles de [¹⁴C]aa-tRNA eluido desde el EF-Tu. Cada número representa el promedio de dos experimentos independientes.

IV TRANSFORMACIÓN DE Glu-tRNA^{Gln} EN Gln-tRNA^{Gln}

1. Reacción de amidotransferencia utilizando la AdT de *A. ferrooxidans*.

En la sección III.2 se observó que tanto el EF-Tu de *A. ferrooxidans* como el de *E. coli* se unen más débilmente a Glu-tRNA^{Gln}₂ y Glu-tRNA^{Gln}₃. Esta unión más débil con el EF-Tu probablemente impide su ingreso a la síntesis de proteínas, evitando errores en la traducción. Si ambos Glu-tRNA^{Gln} participan en la síntesis de proteínas deben ser sustratos de la amidotransferasa dependiente de tRNA de *A. ferrooxidans*.

El gen *gatCAB* de *A. ferrooxidans*, que codifica para la amidotransferasa, se encuentra clonado en el plásmido pT7-blue3 (plásmido pAAF) (Salazar y col., 2001). Se preparó un extracto total de proteínas desde células de *E. coli* BL-21 DE3 transformadas con el plásmido pAAF y se preparó además, un extracto de proteínas de *E. coli* BL-21 DE3 sin transformar para utilizar como control negativo en la reacción de transamidación. La cantidad total de proteína se cuantificó con la metodología de Bradford utilizando para el ensayo 40 µg de proteína total. Como sustratos de la reacción se utilizaron los siguientes [¹⁴C]aa-tRNA^{aa}: Glu-tRNA^{Gln}₂, Glu-tRNA^{Gln}₃ y Glu-tRNA^{Glu}₄, este último como control negativo.

En primer lugar se realizó un seguimiento del avance de la reacción en el tiempo (Figura 16) determinándose que a los sesenta minutos de incubación se

obtenía una mayor proporción de glutamina (correspondiente al producto $\text{Gln-tRNA}^{\text{Gln}_2}$) comparado a glutamato (correspondiente al sustrato $\text{Glu-tRNA}^{\text{Gln}_2}$).

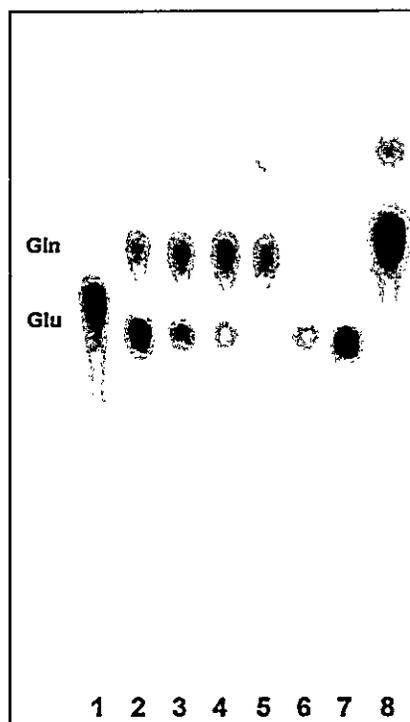


Figura 16. Separación por cromatografía en placa fina de $[^{14}\text{C}]$ glutamato y $[^{14}\text{C}]$ glutamina recuperados del ensayo de transamidación. El progreso de la acción de la AdT se siguió a lo largo de sesenta minutos. 1) $[^{14}\text{C}]$ glutamato, 2) 15 min, 3) 30 min, 4) 45 min y 5) 60 min de reacción, 6) control negativo, extracto de proteínas totales de la cepa BL-21 sin transformar, 7) control negativo, sin enzima, 8) $[^{14}\text{C}]$ glutamina.

Establecidos los parámetros de reacción se probó un nuevo sustrato de la AdT, $\text{Glu-tRNA}^{\text{Gln}_3}$ (Figura 17), un producto intermediario de la vía indirecta, que como se mostró anteriormente, interactúa débilmente con el EF-Tu.

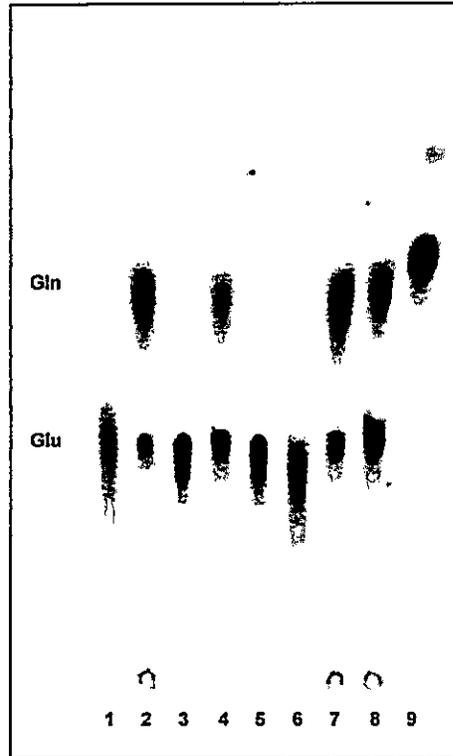


Figura 17. Actividad AdT, empleando Glu-tRNA^{Gln}₃ como sustrato. Separación por cromatografía en placa fina de [¹⁴C]glutamato y [¹⁴C]glutamina recuperados del ensayo de transamidación tras una hora de reacción. 1) [¹⁴C]glutamato, 2) reacción de Glu-tRNA^{Gln}₃, 3) reacción de Glu-tRNA^{Gln}₃ sin AdT, 4) reacción de Glu-tRNA^{Gln}₂, 5) reacción de Glu-tRNA^{Gln}₂ sin AdT, 6) reacción de Glu-tRNA^{Glu}₄ (control negativo), 7) reacción de Glu-tRNA^{Gln}₃ (duplicado), 8) reacción de Glu-tRNA^{Gln}₂ (duplicado), 9) [¹⁴C]glutamina.

De los resultados mostrados en la Figura 17, se desprende que Glu-tRNA^{Gln}₃ es sustrato de la AdT, al igual que Glu-tRNA^{Gln}₂. Si bien el ensayo se realizó durante una hora, tiempo óptimo de reacción según resultados de la Figura 16, no se alcanzó una total conversión de los Glu-tRNA^{Gln} en Gln-tRNA^{Gln}, quizás debido a pérdida de actividad de la enzima.

2. Ensayo de competencia entre Glu-tRNA^{Gln}₂ y Gln-tRNA^{Gln}₂ en la formación del complejo ternario.

En la sección III.2 se mostró la interacción del EF-Tu con Gln-tRNA^{Gln}₃. La síntesis de Gln-tRNA^{Gln} fue posible por el uso de la GlnRS de *E. coli*, que permite la aminoacilación del tRNA^{Gln}₃ con glutamina. El tRNA^{Gln}₂ sin embargo, no es sustrato de esta enzima y sólo con la utilización de la AdT se puede conseguir transformar el Glu-tRNA^{Gln}₂ en Gln-tRNA^{Gln}₂.

El [¹⁴C]Gln-tRNA^{Gln}₂ se obtuvo por la acción de la AdT sobre el producto intermediario [¹⁴C]Glu-tRNA^{Gln}₂, y si bien se obtenían como una mezcla ([¹⁴C]Gln-tRNA^{Gln}₂/[¹⁴C]Glu-tRNA^{Gln}₂), resultaba ser un sustrato interesante para la formación del complejo ternario con ambos aa-tRNA^{aa} a la vez, y observar la competencia entre ellos por el EF-Tu. De este modo se realizó la reacción de amidotransferencia de Glu-tRNA^{Gln}₂, y alícuotas del producto de la reacción se sometieron a una separación por cromatografía en placa fina de los [¹⁴C]aminoácidos glutamina y glutamato, estimándose la relación glutamina/glutamato (Gln-tRNA^{Gln}₂/Glu-tRNA^{Gln}₂) por medio de un programa computacional.

Conocida la relación Gln-tRNA^{Gln}₂/Glu-tRNA^{Gln}₂ obtenida de la reacción de amidotransferencia, se realizó el ensayo para la formación de complejo ternario con distintas proporciones de [¹⁴C]Gln-tRNA^{Gln}₂/[¹⁴C]Glu-tRNA^{Gln}₂. Finalizado el ensayo de formación del complejo ternario se desacilaron los Gln-tRNA^{Gln}₂ y los Glu-tRNA^{Gln}₂ eluidos desde el EF-Tu y los aminoácidos se aplicaron en una TLC, analizando la proporción de glutamina/glutamato por medio del programa QuantityOne de Bio-Rad. Esta proporción es la cantidad de Gln-tRNA^{Gln}₂ y Glu-tRNA^{Gln}₂ que se unió al EF-Tu (Tabla 5).

Los datos mostrados en la Tabla 5 indican que dentro de una mezcla de aa-tRNA^{aa}, correcta e incorrectamente acilados, el EF-Tu es capaz de discriminar y unirse en mayor proporción al Gln-tRNA^{Gln} aminoacilado correctamente, por sobre el Glu-tRNA^{Gln}, situación acorde al hecho que presente una mayor unión a Glu-tRNA^{Glu} o Gln-tRNA^{Gln} por sobre Glu-tRNA^{Gln}.

Tabla 5
Ensayo de competencia entre Gln-tRNA^{Gln} y Glu-tRNA^{Gln} para formar el complejo ternario con el EF-Tu de *A. ferrooxidans*

Carga (Gln/Glu) ^(a)	Elución desde el EF-Tu (Gln/Glu) ^(b)
2,4	5,1
0,5	1,6
0,2	1,3

^a Referida a la proporción Gln-tRNA^{Gln}₂/Glu-tRNA^{Gln}₂ utilizada para la formación del complejo ternario con el EF-Tu.

^b Referida a la proporción Gln-tRNA^{Gln}₂/Glu-tRNA^{Gln}₂ eluida desde el EF-Tu luego de la formación del complejo ternario. Es el equivalente a T4 elu de los gráficos.

DISCUSIÓN

El factor de elongación Tu cumple una importante función en la biosíntesis de proteínas, al reconocer y transportar los aa-tRNA^{aa} al ribosoma. La especificidad con la que el EF-Tu efectúe su función en la formación del complejo ternario, aumenta la fidelidad en el proceso de traducción.

Hasta hace poco, el EF-Tu se consideraba una proteína inespecífica por unirse a todos los aa-tRNA^{aa} con una afinidad similar, a pesar de la amplia diversidad de secuencia de los tRNAs y de las diferencias en el tamaño, carga e hidrofobicidad del aminoácido esterificado (Louie, 1984; 1985). Esta era una consideración plausible teniendo en cuenta que es solo una proteína la encargada de unir y transportar todos los aa-tRNA^{aa} sintetizados en la célula al sitio A del ribosoma, a excepción del fMet-tRNA^{fMet} iniciador.

En la actualidad, se sabe que si bien el EF-Tu se une a los aa-tRNA^{aa} correctamente aminoacilados con una afinidad similar, la afinidad por un aa-tRNA^{aa} incorrectamente aminoacilado puede ser muy fuerte o débil (LaRiviere y col., 2001, Asahara y Uhlenbeck, 2002). Esta diferencia en afinidad por los aa-tRNA^{aa} podría significar, en el caso de una interacción fuerte, una liberación más lenta del aa-tRNA^{aa} desde el EF-Tu luego de la hidrólisis del GTP, impidiendo una acomodación eficiente del aa-tRNA^{aa} en el sitio A del ribosoma o, por otra parte, una interacción débil podría significar un abandono prematuro del aa-tRNA^{aa} desde el EF-Tu (LaRiviere y col., 2001).

En esta tesis se abordó la hipótesis que el EF-Tu de *A. ferrooxidans* discrimina el producto intermediario Glu-tRNA^{Gln}, perteneciente a la vía indirecta de síntesis de Gln-tRNA^{Gln}, en tanto que el EF-Tu de *E. coli*, un microorganismo que no utiliza esta

vía ya que posee la GlnRS correspondiente, no lo discrimina. De producirse *in vivo*, el Glu-tRNA^{Gln} sería tóxico para la célula si ingresa a la síntesis de proteínas (Gagnon y col., 1996) y el EF-Tu de *A. ferrooxidans* lo discriminaría al momento de la formación del complejo ternario, mientras que el EF-Tu de *E. coli* formaría el complejo ternario, y el Glu-tRNA^{Gln} se incorporaría a las proteínas.

Para probar esta hipótesis se realizaron experimentos de formación de los complejos ternarios *in vitro* entre el EF-Tu de *A. ferrooxidans* y de *E. coli* con: Glu-tRNA^{Gln} (intermediario de la vía indirecta), Glu-tRNA^{Glu} y Gln-tRNA^{Gln}.

Los resultados de los experimentos de formación de los complejos ternarios con el EF-Tu de *A. ferrooxidans* permitieron confirmar que en un organismo que utiliza la vía indirecta en la síntesis de Gln-tRNA^{Gln}, el EF-Tu se une más débilmente al producto intermediario Glu-tRNA^{Gln} (Figura 14), como se había demostrado con el EF-Tu de cloroplastos de espinaca que discrimina el Glu-tRNA^{Gln} (Stanzel y col., 1994) y con el EF-Tu de *T. thermophilus* que discrimina el Asp-tRNA^{Asn} (Becker y Kern, 1998).

Como el EF-Tu de *E. coli* no se ve enfrentado *in vivo* al Glu-tRNA^{Gln} de la vía indirecta, podía suponerse que se uniría indistintamente a Glu-tRNA^{Gln} y a los Glu-tRNA^{Glu} y Gln-tRNA^{Gln} aminoacilados correctamente. Los resultados de la formación del complejo ternario con los mismos aa-tRNA^{aa} de *A. ferrooxidans* y el EF-Tu de *E. coli*, indican que en un organismo que presenta las veinte aminoacil-tRNA sintetisas, y que por lo tanto no utiliza la vía indirecta de síntesis de Gln-tRNA^{Gln}, el EF-Tu también presenta una unión más débil con el Glu-tRNA^{Gln} (Figura 15).

La unión más débil del EF-Tu de *E. coli* con el Glu-tRNA^{Gln} no era el resultado esperado, pero considerando que todas las arqueas conocidas (Tumbula y col., 2000), los organelos eucarióticos (Schön y col., 1986) y la mayoría de las bacterias (Gagnon y col., 1996) carecen de la glutaminil-tRNA sintetasa, *E. coli* pudo haber adquirido la

GlnRS por transferencia génica horizontal desde un ancestro eucariótico (Lamour y col., 1994). Siendo así, probablemente previo a la transferencia génica, *E. coli* utilizaba la vía de la transamidación (Gagnon y col., 1996) y su EF-Tu se veía enfrentado al Glu-tRNA^{Gln}. El EF-Tu es una proteína altamente conservada en el reino procariótico, solo se encuentran unas pocas diferencias cuando se comparan las estructuras primarias de varias especies (Pedersen y col., 1998), por lo tanto, luego de la transferencia génica de GlnRS a *E. coli*, su EF-Tu pudo haber mantenido su capacidad discriminatoria.

En la Figura 18 se muestra un alineamiento múltiple entre los EF-Tu de *A. ferrooxidans*, *E. coli* y *T. thermophilus*. La identidad entre el EF-Tu de *A. ferrooxidans* y el de *E. coli* es de 71%, mientras que la similitud alcanza el 80%. Este porcentaje de identidad es similar cuando se compara el EF-Tu de *A. ferrooxidans* con el EF-Tu de *T. thermophilus*, que ha sido cristalizado (Berchtold y col., 1993), con el que alcanza un 67% de identidad y un 76% de similitud. Este alto porcentaje de identidad y similitud presumiblemente refleja la enorme fuerza contra la evolución divergente de los EF-Tu, resaltando su rol central en la traducción (Benner y col, 1989).

Las estructuras cristalográficas disponibles de los complejos ternarios EF-Tu·GDPNP·Phe-tRNA^{Phe} y EF-Tu·GDPNP·Cys-tRNA^{Cys} (Nissen y col., 1995; Nissen y col., 1999) muestran que las cadenas laterales de los aminoácidos esterificados en el tRNA se unen a un mismo bolsillo en la superficie del EF-Tu, entre el dominio I y II. Esto sugiere que cada uno de los veinte aminoácidos esterificados en el tRNA interactúan en este sitio con el EF-Tu, haciendo contactos diferentes con el bolsillo, lo que implica diferencias en las propiedades de unión del aminoácido por el EF-Tu. A esto deben agregarse las diferencias en secuencia del brazo T ψ C de los tRNA, el

una afinidad por EF-Tu entre parámetros estrechos (Ver Introducción) y serán los que participen en la síntesis de proteínas.

La esterificación de glutamato en el tRNA^{Gln} no lograría esta compensación, dando como resultado una unión más débil entre el EF-Tu y el Glu-tRNA^{Gln} de la vía indirecta, como se observa en los resultados de esta tesis entre los EF-Tu-GTP de *A. ferrooxidans* y *E. coli* con Glu-tRNA^{Gln}. Esta unión más débil podría significar *in vivo*, un abandono prematuro del Glu-tRNA^{Gln} desde el EF-Tu, evitando ser incorporado a la síntesis de proteínas. Además, dentro de un conjunto de aa-tRNA^{aa} correcta e incorrectamente aminoacilados, la diferencia en afinidad entre ellos por el EF-Tu permitiría a esta proteína unirse mayoritariamente a los correctamente aminoacilados, como se observó en el ensayo de competencia realizado entre Glu-tRNA^{Gln}₂ y Gln-tRNA^{Gln}₂. Probablemente algo similar ocurra *in vivo*, situación que no contradice el hecho de que una GluRS no discriminante en *E. coli* sea tóxica (Núñez y col., 2004), ya que según los resultados obtenidos en esta tesis, si bien el EF-Tu presenta una menor unión a Glu-tRNA^{Gln}, de todos modos una pequeña fracción puede formar el complejo ternario EF-Tu-GTP-Glu-tRNA^{Gln}, acorde al crecimiento observado por Núñez y col. en sus experimentos *in vivo* (Núñez y col., 2004).

Si el producto intermediario Glu-tRNA^{Gln} de la vía de la transamidación no es captado inmediatamente por la AdT, y por ende el glutamato mal aminoacilado en el tRNA^{Gln} no fuera convertido a glutamina antes que el Glu-tRNA^{Gln} interactúe con el EF-Tu, probablemente sea el mismo EF-Tu el encargado de evitar su incorporación a la síntesis de proteínas, lográndose el descodificación correcta de los codones de glutamina. Esta situación quizá se extienda a algún aa-tRNA^{aa} erróneamente aminoacilado que haya pasado el estricto control de las aaRS, considerando que el EF-Tu de *E. coli* también muestra una unión más débil con el Glu-tRNA^{Gln}, asegurando una

mayor fidelidad en el proceso de traducción. La necesidad de mantener fuera de la síntesis de proteínas a los aa-tRNA^{aa} erróneamente aminoacilados sería la presión selectiva para mantener un EF-Tu discriminante.

En otro resultado, en la Figura 17, carril 6, se observa que la AdT no reacciona con Glu-tRNA^{Glu}. En este contexto, sería interesante conocer como la AdT puede reconocer sólo el Glu-tRNA^{Gln}. Un sistema tipo "canal de sustratos" (Stanzel y col., 1994), en el que el Glu-tRNA^{Gln} pase directamente de la GluRS no discriminante a la AdT podría ser una respuesta a esa interrogante que aún espera ser descifrada, y que podría ser en conjunto al EF-Tu discriminante, un paso de control más para mantener al Glu-tRNA^{Gln} fuera de la síntesis de proteínas, asegurando así su fidelidad. Del mismo modo, identificar en detalle como el EF-Tu puede discriminar la interacción con el Glu-tRNA^{Gln} "incorrectamente aminoacilado" es una pregunta que aún espera ser contestada.

Por su relativamente baja tasa de divergencia en la secuencia (Gaucher y col., 2003), y considerando que los aminoácidos en el EF-Tu que forman el bolsillo de unión al aminoácido esterificado son altamente conservados (Dale y col., 2004), la capacidad discriminatoria del EF-Tu podría ser una capacidad inherente a ella, y no ser consecuencia de pertenecer o no, a un organismo que posee la vía indirecta de síntesis de Gln-tRNA^{Gln}. De esta forma el EF-Tu actuaría como un paso de control más en la fidelidad del traspaso de la información contenida en el DNA hasta las proteínas.

CONCLUSIONES

- El EF-Tu de *A. ferrooxidans* es capaz de discriminar los Glu-tRNA^{Gln} pertenecientes a la vía indirecta de síntesis de Gln-tRNA^{Gln}.
- El EF-Tu de *E. coli*, un microorganismo que no utiliza la vía indirecta, es capaz de discriminar los Glu-tRNA^{Gln} pertenecientes a la vía indirecta de síntesis de Gln-tRNA^{Gln}.
- Glu-tRNA^{Gln}₃ es sustrato de la amidotransferasa de *A. ferrooxidans*.
- En una mezcla de Glu-tRNA^{Gln} y Gln-tRNA^{Gln}, el EF-Tu de *A. ferrooxidans* forma el complejo ternario preferentemente con el Gln-tRNA^{Gln}, lo que favorecería el desplazamiento del aa-tRNA^{aa} incorrectamente aminoacilado de la síntesis de proteínas.

BIBLIOGRAFÍA

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Walter, P. 2002 Molecular Biology Of The Cell, Fourth Edition, Garland Science.

Arnez, J. G. y Moras D. 1997. Structural and functional considerations of the aminoacylation reaction. TIBS **22**, 211-216.

Asahara, H. y Uhlenbeck, O. 2002. The tRNA specificity of *Thermus thermophilus* EF-Tu. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **99**, 3499-3504.

Becker, H. y Kern, D. 1998. *Thermus thermophilus*: A link in evolution of the tRNA-dependent amino acid amidations pathways. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **95**, 12832-12837.

Benner, S., Ellington, A. y Tauer, A. 1989. Modern metabolism as a palimpsest of the RNA world. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **86**, 7054-7058.

Berchtold, H., Reshetnikova, L., Reiser, C., Schirmer, N., Sprinzl, M. y Hilgenfeld, R. 1993. Crystal structure of active elongation factor Tu reveals major domain rearrangements. Nature **365**, 126-132.

Brock, T. D. y Madigan, M. T. 1993. Microbiología, Sexta Edición, Editorial Prentice Hall.

Dale, T., Sanderson, L. y Uhlenbeck, O. 2004. The affinity of elongation factor Tu for an aminoacyl-tRNA is modulated by the esterified amino acid. Biochemistry **43**, 6159-6166.

Dell, V., Miller, D. y Johnson, A. 1990. Effects of nucleotide- and aurodox-induced changes in elongation factor Tu conformation upon its interactions with aminoacyl transfer RNA. A fluorescence study. Biochemistry **29**, 1757-1763.

Eccleston, J., Dix, D. y Thompson, R. 1985. The rate of cleavage of GTP on the binding of Phe-tRNA•elongation factor Tu•GTP to poly(U)-programmed ribosomes of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **260**, 16237-16241.

Gagnon, Y., Lacoste, L., Champagne, N. y Lapointe, J. Widespread use of the Glu-tRNA^{Gln} transamidation pathway among bacteria. 1996. *J. Biol. Chem.* **271**, 14856-14863.

Gauchrer, E., Thomson, J., Burgan, M. y Benner, S. 2003. Inferring the palaeoenvironment of ancient bacteria on the basis of resurrected proteins. *Nature* **425**, 285-288.

Gromadski, K., Wieden, H. y Rodnina, M. 2002. Kinetic mechanism of elongation factor Ts-catalyzed nucleotide exchange in elongation factor Tu. *Biochemistry* **41**, 162-169.

Grunberg-Manago, M. 1987. Regulation of the expression of aminoacyl-tRNA synthetases and translation factors. En Frederick C. Neidardt (editor in chief), *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, *Cellular and Molecular Biology*. pp 1386-1409. American Society for Microbiology, Washington, D. C.

Hershey, J. 1987. Protein synthesis. En Frederick C. Neidardt (editor in chief), *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, *Cellular and Molecular Biology*. pp 613-647. American Society for Microbiology, Washington, D. C.

Holmes, D. 2002. Comunicación personal.

Hunter, S. y Spremulli, L. 2004. Mutagenesis of glutamine 290 in *Escherichia coli* and mitochondrial elongation factor Tu affects interactions with mitochondrial aminoacyl-tRNAs and GTPase activity. *Biochemistry* **43**, 6917-6927.

Ibba, M. y Söll, D. 2000. Aminoacyl-tRNA synthesis. *Annu. Rev. Biochem.* **69**, 617-650.

Katz, A. 2005. Tesis para optar al Título de Bioquímico. En etapa de redacción.

Ke, D., Boissinot, M., Huletsky, A., Picard, F., Frenette, J., Ouellette, M., Roy, P. y Bergeron, M. 2000. Evidence for horizontal gene transfer in evolution of elongation factor Tu in enterococci. *J. of Bacteriology* **182**, 6913-6920.

Kothe, U., Wieden, H., Mohr, D. y Rodnina, M. 2004. Interaction of helix D of elongation factor Tu with helices 4 and 5 of protein L7/12 on the ribosome. *J. M. Biol.* **336**, 1011-1021.

Lamour, V., Quevillon, S., Diriong, S., N`Guyen, V., Lipinski, M. y Mirande, M. 1994. Evolution of the Glx-tRNA synthetase family: The glutaminyl enzyme as case of horizontal gene transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 8670-8674.

LaRiviere, F., Wolfson, A. y Uhlenbeck, O. 2001. Uniform binding of aminoacyl-tRNAs to elongation factor Tu by thermodynamic compensation. *Science* **294**, 165-168.

Lewin, B. 1997. *Genes VI*, Oxford University Press.

Li, T. Graham, D., Stathopoulos, C., Haney, P., Kim, H., Vothknecht, U., Kitabake, M., Hong, K., Eggertsson, G., Curnow, A., Lin, W., Celic, I., Whitman, W. y Söll, D. 1999. CysteinyI-tRNA Formation: The last puzzle of aminoacyl-tRNA synthesis. *FEBS Lett.* **462**, 302-306.

Louie, A., Ribeiro, S., Reid, B. y Jurnak, F. 1984. Relative affinities of all *Escherichia coli* aminoacyl-tRNAs for elongation factor Tu-GTP. *J. Biol. Chem.* **259**, 5010-5016.

Louie, A. y Jurnak, F. 1985. Kinetic studies of *Escherichia coli* elongation factor Tu-guanosine 5'-triphosphate-aminoacyl-tRNA complexes. *Biochemistry* **24**, 6433-6439.

Lowe, T. y Eddy, S. 1997. tRNAscan-SE: A program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence. *Nucleic Acids Research* **25**, 955-964.

Nissen, P., Kjeldgaard, M., Thirup, S., Polekhina, G., Reshetnikova, L., Clark, B. y Nyborg, J. 1995. Crystal structure of the ternary complex of Phe-tRNA(Phe), EF-Tu, and a GTP analogue. *Science* **270**, 1464-1472.

Nissen, P., Thirup, S., Kjeldgaard, M. y Nyborg, J. 1999. The crystal structure of Cys-tRNA(Cys)-EF-Tu-GDPNP reveals general and specific features in the ternary complex and in tRNA. *Structure* **7**, 143-156.

Núñez, H., Lefimil, C., Min, B., Söll, D. y Orellana, O. 2004. *In Vivo* formation of glutamyl-tRNA^{Gln} in *Escherichia coli* by heterogenous glutamyl-tRNA synthetases. *FEBS Lett.* **557**, 133-135.

Pedersen, G., Rattenborg, T., R.Knudsen, C. y F.C.Clark, B. 1998. The Role of Glu259 in *Escherichia coli* elongation factor Tu in ternary complex formation. *Protein Engineering* **11**, 101-108.

Racznik G., Becker, H., Min, B. y Söll, D. 2001. A single amidotransferase forms asparaginyl-tRNA and glutaminyl-tRNA in *Chlamydia trachomatis*. *J. Biol. Chem.* **276**, 45862-45867.

Ribeiro, S., Nock, S. y Sprinzl, M. 1995. Purification of aminoacyl-tRNA by affinity chromatography on immobilized *Thermus thermophilus* EF-Tu•GTP. *Analytical Biochemistry* **228**, 330-335.

Rodnina, M., Fricke, R., Kuhn, L. y Wintermeyer, W. 1995. Codon-dependent conformational change of elongation factor Tu preceding GTP hydrolysis on the ribosome. *EMBO J.* **14**, 2613-2619.

Rodnina, M., Pape, T., Fricke, R., Kuhn, L. y Wintermeyer, W. 1996. Initial binding of the elongation factor Tu•GTP•aminoacyl-tRNA complex preceding codon recognition on the ribosome. *J. Biol. Chem.* **271**, 646-652.

Salazar, J., Zúñiga, R., Racznik, G., Becker, H., Söll, D. y Orellana, O. 2001. A dual-specific Glu-tRNA^{Gln} and Asp-tRNA^{Asn} amidotransferase is involved in decoding glutamine and asparagine codons in *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *FEBS Lett.* **500**, 129-131.

Salazar, J., Abel, I., Orellana, O., Tumbula, D., Krieger, R., Daniels, L. y Söll, D. 2003. Coevolution of an aminoacyl-tRNA synthetase with its tRNA substrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 13863-13868.

- Sambrook, J., Fritsch, E. y Maniatis, T. Molecular cloning: A laboratory manual. 1989. 2nd Edition. Cold Spring Harbor laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
- Schön, A., Kannangara, C., Cough, S. y Söll, D. 1988. Protein biosynthesis in organelles requires misaminoacylation of tRNA. *Nature* **331**, 187-190.
- Sprang, S. 1997. G PROTEIN MECHANISMS: Insights from structural analysis. *Annu. Rev. Biochem.* **66**, 639-678.
- Stanzel, M., Schön, A. y Sprinzl, M. 1994. Discrimination Against Misacylated tRNA by Chloroplast Elongation Factor Tu. *Eur. J. Biochem.* **219**, 435-439.
- Stathopoulos, C., Ahel, I., Ali, K., Ambrogelly, A., Becker, H., Bunjun, S., Feng, L., Herring, S., Jacquin-Becker, H., Kobayashi, D., Korencic, D., Krett, B., Mejlhede, N., Min, B., Nakano, H., Namgoong, S., Polycarpo, C., Raczniak, G., Rinehart, J., Rosas-Sandoval, G., Ruan, B., Sabina, J., Sauerwald, A., Toogood, H., Tumbula-Hansen, D., Ibba, M. y Söll, D. 2001. Aminoacyl-tRNA synthesis: A postgenomic perspective. Cold Spring Harbor Laboratory Press **66**, 175-183.
- Stryer, L. 1995. Bioquímica, Tercera Edición, Editorial Reverté, S. A.
- Syvänen, A., Amiri, H., Jamal, A., Anderson, S. y Kurland, C. 1996. A chimeric disposition of the elongation factor genes in *Rickettsia prowazekii*. *J. of Bacteriology* **178**, 6192-6199.
- Tumbula, D., Becker, H., Chang, W. y Söll, D. 2000. Domain-specific recruitment of amide amino acids for protein synthesis. *Nature* **407**, 106-110.
- Watson, J., Baker, T., Bell, S., Gann, A., Levine, M. y Losick, R. 2004. Molecular biology of the gene, Fifth edition, CSHL press.