

UCH-FC
DOC - Microbiología
D978
C.4

**“Estudio de la dimerización y de la unión de hemo a la
Glutamil-tRNA Reductasa de *Acidithiobacillus ferrooxidans*”**

**Tesis
entregada a la
Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al Grado de**

DOCTOR EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN MICROBIOLOGÍA

Facultad de Ciencias



Por

MERLY DE ARMAS RICARD

Enero, 2010

Director de Tesis

DR. OMAR ORELLANA ORELLANA

**FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE**

INFORME DE APROBACIÓN

TESIS DE DOCTORADO

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

MERLY DE ARMAS RICARD

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Microbiología en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 25 de Noviembre de 2009.

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Omar Orellana Orellana

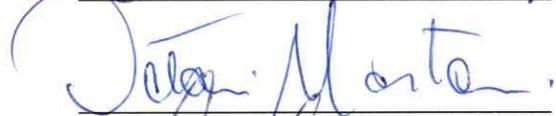


COMISIÓN DE EVALUACIÓN DE TESIS:

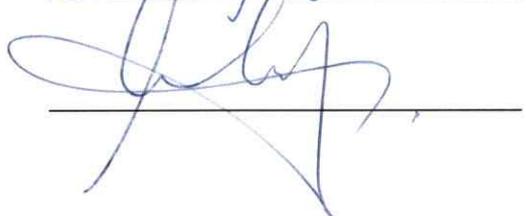
Dr. Oscar León Decap



Dr. Octavio Monasterio Opazo



Dr. Víctor Cifuentes Guzmán





A MI FAMILIA

GRACIAS



RESUMEN BIOGRÁFICO

Nací en La Habana, Cuba, el 31 de Enero de 1975. Cursé mi enseñanza media en el Instituto Pre-Universitario de Ciencias Exactas "Vladimir Ilich Lenin". Posteriormente estudié Bioquímica en la Facultad de Biología de la Universidad de la Habana. Realicé mi Tesis de Pregrado en el Centro de Inmunología Molecular de La Habana, bajo la dirección del Dr. Lobvi E. Matamoros, en la búsqueda de nuevos protocolos para la purificación de anticuerpos monoclonales de tipo IgM. A partir de Septiembre de 1997 comencé a trabajar en la Facultad de Química de la Universidad de La Habana, donde inicié mi formación como docente e investigador. Durante 7 años formé parte del Departamento de Química Orgánica y obtuve mi categoría docente como Profesor Asistente de dicho departamento. Además desarrollé mis investigaciones en la síntesis enzimática de nuevas 1,4-dihidropiridinas con actividad antagonista del calcio. Con el ánimo de adquirir nuevos conocimientos en el área de Biología Molecular y el trabajo con proteínas obtuve una beca DAAD para realizar un Doctorado en Microbiología en la Universidad de Chile, donde me incorporé a partir de Marzo de 2004 al Laboratorio de Biología Molecular Bacteriana de la Facultad de Medicina. Esta tesis fue supervisada por el Dr. Omar Orellana. Durante el desarrollo de este trabajo realicé una Estadía de Investigación en el Institut für Mikrobiologie, Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig, Braunschweig Alemania, coordinada por los Drs. Dieter Jahn y Jürgen Moser.

AGRADECIMIENTOS



A mi mamá por ser una fuente inagotable de fuerza, optimismo y amor para con mis proyectos profesionales y personales. Por estar siempre a mi lado a pesar de la distancia e impulsarme en cada instante a seguir adelante. A mi papá (El Gordito) por estar siempre para mí, por su confianza y por lograr mantener ese equilibrio necesario para que la vida familiar siga su curso.

A mi esposo, por ser además mi compañero, mi amigo y tener esa fuerza gigante para levantarme e impulsarme nuevamente cada vez que las situaciones me abrumen. Por compartir no sólo un gran proyecto personal, que espero por fin podamos emprender al finalizar esta difícil etapa en Chile, sino por todas sus críticas y aportes profesionales invaluable para con este trabajo, con las que siempre he contado y me han ayudado tanto.

A mis abuelos (Ata y Aba) por el inmenso amor que siempre me brindaron y por acompañarme siempre, aún cuando es difícil de explicar. A mis abuelas mimi y mamá, por todo su cariño.

A mis primos, Betty, Alejandro y Grettel, por creer en mí, apoyarme en la realización de este viaje y quererme tal cual soy.

A Tere y a Nena, por acogerme como una hija y nieta más, ser siempre tan optimistas para con nuestro futuro, brindarme todo su cariño y apoyo durante este viaje.

A Eisler, Gaby, Albe y Humbe, por todos los buenos momentos que siempre hemos compartido y por su cariño.

A Elvira, por su cariño, amistad y su continuo apoyo desde la distancia.

A Oscar y a Nahomi, por brindarme su apoyo y cariño.

A Rosario y a Nelson, por su amistad inmensa en tiempos turbulentos.

A mis profesores de la Universidad de La Habana, por sentar las bases de mi desarrollo profesional.

A Iriux, Neisy, Gustavo y sus familias, por mantener vivas nuestras raíces y hacer de cada encuentro un lugar especial para contrarrestar nuestra nostalgia.

A mis compañeros del doctorado, Julieta, Claudio, Erika, Lina, Mario, Mauricio, Carla, Miguel, Jessica y Pablo, por vivir juntos esta experiencia y haber logrado superarla. En especial a Julieta

por su amistad invaluable en todas las circunstancias y las incontables madrugadas de papers con mate. A Claudio por compartir tantos buenos momentos y abrirnos las puertas de su casa.

Al Dr. Omar Orellana por permitirme realizar esta tesis en su laboratorio, por sus valiosos aportes a la realización de este trabajo, su confianza en mí y por su gran esfuerzo para financiar la última etapa de este trabajo.

A todos mis compañeros del laboratorio de Biología Molecular Bacteriana, Claudia, Assaf, Vivi, Caro, Pame, Paula, Carolina F., Héctor O, Héctor D, David, Pato por todos los momentos compartidos. A Claudia por sus consejos prácticos de biología molecular y a Assaf por compartir tantas buenas discusiones profesionales a lo largo de estos años. A la Dra. Eugenia por sus consejos para el desarrollo de este trabajo.

A los profesores del Programa de Doctorado en Microbiología. En especial a los Drs. Margarita Carú y Víctor Cifuentes por su calidez. Al Dr. Octavio Monasterio por su interés en este trabajo, sus aportes tan relevantes para el desarrollo del mismo y por permitirme realizar los experimentos de difracción circular en su laboratorio. Al Dr. Oscar León por sus valiosas sugerencias y por permitirme realizar los experimentos de filtración en gel en su laboratorio.

A Daniel y a Felipe por su ayuda con las cromatografías de filtración en gel y con los experimentos de difracción circular. Al Dr. Mario Pavani por permitirme utilizar el espectrofotómetro de doble haz.

A Marisol, por su paciencia, comprensión y su valiosa ayuda en todos los trámites administrativos.

A Ady y Kareen por su amistad.

A los Drs Dieter Jahn y Jürgen Moser, por permitirme trabajar durante seis meses en su laboratorio. En especial al Dr. Moser por sus buenos consejos para el desarrollo de este trabajo.

Al Servicio Alemán de Intercambio Académico (DAAD) por el financiamiento para la realización de mi doctorado. Al proyecto FONDECYT 1070437; por el apoyo económico para la realización de esta Tesis.

"CAMINANTE, SON TUS HUELLAS EL CAMINO Y NADA MÁS; CAMINANTE, NO HAY CAMINO, SE HACE AMINO AL ANDAR. AL ANDAR SE HACE CAMINO Y AL VOLVER LA VISTA ATRÁS SE VE LA SENDA QUE NUNCA SE HA DE VOLVER A PISAR" J. M. SERRAT.



ÍNDICE DE MATERIAS



ÍNDICE DE TABLAS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
RESUMEN	xii
SUMMARY	xv
INTRODUCCIÓN	1
1.1. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS	3
<i>1.1.1 El grupo hemo: características generales</i>	3
<i>1.1.2 Relación estructura-función de las hemoproteínas</i>	4
<i>1.1.3 Biosíntesis del grupo hemo</i>	7
<i>1.1.3.1 Biosíntesis de ALA</i>	7
<i>1.1.3.2 Características de la GluTR, la primera enzima de la vía C₅</i>	9
<i>1.1.3.3 El papel de la GluTR en la regulación de la biosíntesis de hemo</i>	11
<i>1.1.4. Características generales de Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	13
HIPÓTESIS Y OBJETIVO GENERAL	15
MATERIALES Y MÉTODOS	16
2.1 MATERIALES	16
<i>2.1.1 Cepas y plásmidos</i>	16
<i>2.1.2 Medios de cultivo</i>	17
<i>2.1.3 Reactivos</i>	18
<i>2.1.4 Oligonucleótidos</i>	19
2.2 MÉTODOS	19
<i>2.2.1 Condiciones de Cultivo</i>	19
<i>2.2.2 Preparación de DNA plasmidial</i>	20
<i>2.2.3 Preparación de DNA genómico de A. ferrooxidans</i>	20
<i>2.2.4 Preparación y transformación de células de E. coli quimiocompetentes</i>	20



2.2.5 Estrategia de clonación para obtener las mutantes truncas del gen <i>hemA</i>	21
2.2.6 Sobreexpresión de los genes <i>gltx1</i> , <i>hemA</i> silvestre y mutantes truncas	24
2.2.7 Purificación de GST-GluRS1	24
2.2.8 Purificación de His ₆ -GluTR	25
2.2.9 Cromatografía de filtración en gel	26
2.2.10 Cuantificación de proteínas	26
2.2.11 Cuantificación de hemo	27
2.2.12 Espectros de absorción UV-Visible	27
2.2.13 Espectros de dicroísmo circular (DC)	27
2.2.14 Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)	28
2.2.15 Inmunodetección de proteínas	29
2.2.16 Reacción de entrecruzamiento de proteínas	29
2.2.17 Espectrometría de Masas (MALDI-TOF)	30
2.2.18 Preparación y purificación de tRNA ₃ ^{Glu}	30
2.2.19 Ensayo de Actividad Enzimática para la GluTR	31
2.2.20 Recursos bioinformáticos	33
RESULTADOS	34
3.1 Características de la GluTR recombinante de <i>A. ferrooxidans</i>	34
3.1.1 Sobreexpresión del gen <i>hemA</i> de <i>A. ferrooxidans</i>	34
3.1.2 Purificación de la GluTR recombinante	34
3.1.3 Actividad enzimática de la GluTR	36
3.1.4 Características espectroscópicas de la GluTR	38
3.1.5 Determinación de la masa molecular nativa de la GluTR	40
3.2 Efecto de los primeros 21 aminoácidos de la GluTR en la unión de hemo y en la actividad	43
3.3 Efectos del hemo en la estructura y la actividad de la GluTR	48
3.3.1 Obtención de preparaciones de GluTR con diferente contenido de hemo	48
3.3.2 Efecto del hemo sobre el estado de oligomerización de la GluTR	50

3.3.3 Efecto del hemo sobre el contenido de estructura secundaria de la GluTR	52
3.3.4 Efecto del hemo sobre la actividad de la GluTR	54
3.4 Determinación del dominio de unión de hemo de la GluTR	60
3.5 Efecto del dominio de dimerización sobre la actividad y la unión de hemo	66
DISCUSIÓN	69
4.1 Características de la GluTR recombinante de <i>A. ferrooxidans</i>	69
4.2 Efecto de los primeros 21 aminoácidos de la GluTR en la unión de hemo y en la actividad	72
4.3 Efectos del hemo en la estructura y la actividad de la GuTR	73
4.4 Determinación del dominio de unión de hemo de la GluTR	75
4.5 Efecto del dominio de dimerización sobre la actividad y la unión de hemo	77
4.6 El papel de la GluTR de <i>A. ferrooxidans</i> en la biosíntesis de hemo	78
CONCLUSIONES	80
PROYECCIONES	81
BIBLIOGRAFÍA	82
ANEXOS	



ÍNDICE DE TABLAS



Tabla 1. Cepas de <i>E. coli</i> y <i>A. ferrooxidans</i>	16
Tabla 2. Plásmidos	16
Tabla 3. Listado de oligonucleótidos	19
Tabla 4. Recursos bioinformáticos	33
Tabla 5. Máximos de absorción (nm) de diferentes preparaciones de la GluTR	40
Tabla 6. Masas moleculares relativas de diferentes preparaciones de GluTR	42
Tabla 7. Relación hemo:proteína de diferentes preparaciones de GluTR	50
Tabla 8. Masas moleculares relativas de GluTRs con diferente contenido de hemo	51
Tabla 9. Parámetros cinéticos aparentes de GluTRs con diferente contenido de hemo.	55
Tabla 10. Masas moleculares relativas de las mutantes truncas de la GluTR	62
Tabla 11. Características espectroscópicas y relación hemo:proteína de las mutantes truncas de la GluTR	64

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de los grupos hemo <i>b</i> y <i>c</i>	3
Figura 2. Esquema de la Vía C ₅ de biosíntesis de ALA	8
Figura 3. Modelos estructurales de la GluTR	10
Figura 4. Representación esquemática de los dominios de la GluTR	22
Figura 5. Electroforesis de diferentes preparaciones de GluTR	35
Figura 6. Células de <i>E. coli</i> transformadas con el plásmido pGtrA β ET	37
Figura 7. Ensayos de actividad enzimática de diferentes preparaciones de GluTR	38
Figura 8. Espectros de absorción en la región visible del hemo unido a la GluTR	39
Figura 9. Masa molecular relativa de la GluTR en estado nativo	41
Figura 10. Reacción de entrecruzamiento de la GluTR	42
Figura 11. Alineamiento múltiple de las secuencias aminoacídicas de GluTRs de diferentes microorganismos	44
Figura 12. Producto de PCR que codifica para la mutante $\Delta 21\text{NH}_2\text{GluTR}$	45
Figura 13. Reacción de entrecruzamiento de $\Delta 21\text{NH}_2\text{GluTR-His}_6$	46
Figura 14. Ensayo de actividad enzimática de $\Delta 21\text{NH}_2\text{GluTR-His}_6$	47
Figura 15. Efecto del ALA y de la ortofenatrolina sobre el crecimiento de <i>E. coli</i> BL21(DE3)	49
Figura 16. Reacción de entrecruzamiento de preparaciones de GluTR con diferente contenido de hemo	51
Figura 17. Espectros de dicroísmo circular de preparaciones de GluTR con diferente contenido de hemo	52
Figura 18. Comparación de los espectros de dicroísmo circular de preparaciones de GluTR con diferente contenido de hemo	53
Figura 19. Ensayos de actividad enzimática de GluTRs con diferente contenido de hemo	54
Figura 20. Gráfico de Dixon	57

Figura 21. Gráfico de K_m^{ap} vs $[GluTR]_{activa}$	59
Figura 22. Productos de PCR que codifican para las mutantes truncas de la GluTR	60
Figura 23. Geles de poliacrilamida con las mutantes truncas de la GluTR	61
Figura 24. Masa molecular relativa de las mutantes truncas de la GluTR	62
Figura 25. Reacción de entrecruzamiento de las mutantes truncas de la GluTR	63
Figura 26. Ensayos de actividad enzimática de las mutantes truncas His ₆ - GluTR357 e His ₆ -GluTR357m	65
Figura 27. Perfil cromatográfico de la GluTR392	68
Figura 28. Ensayos de actividad enzimática de las mutantes truncas GluTR392 y 426	68

LISTA DE ABREVIATURAS

ALA	ácido δ -aminolevulínico
Amp	Ampicilina
BCIP	5-Bromo-4-Cloro-3'-Indolilfosfato de <i>p</i> -toluidinio
β -gal	β -galactosidasa
BSA	Bovine serum albumin (Albúmina de suero bovino)
CIAP	Fosfatasa alcalina de intestino bovino
DTT	1,4 Ditiotreitól
EDTA	ácido etilén diaminotetraacético
GST	Glutation S- transferasa
Hepes	ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfónico
IPTG	Isopropil β -D-tiogalactopiranosido
LB	Medio Luria Bertani
MeOH	Metanol
MOPS	ácido morfolino sulfónico
NADPH	dinucleótido de adenina y nicotinamida fosforilado reducido
NBT	Nitro-Blue Tetrazolium Chloride
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)
PMSF	Polimetilsulfonilfluoruro
POPOP	1,4-bis(5-fenil-2-oxazolil)benceno
PPO	2,5-difeniloxazol
ROS	Reactive Oxygen Species (Especies reactivas del oxígeno)
SDS	Dodecilsulfato de sodio
TBS	solución salina amortiguada con fosfato
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indol β -D-tioglucopironósido

RESUMEN

El grupo hemo, que participa en diversos procesos del metabolismo oxidativo de las células, es una molécula potencialmente tóxica, debido a su capacidad de generar ROS, hecho que se encuentra estrechamente ligado a la presencia del hierro en su estructura, así como a las reacciones fotoquímicas que pueden experimentar los intermediarios de su ruta de biosíntesis. En general, las bacterias poseen diferentes estrategias para evitar los efectos nocivos del hemo al regular la biosíntesis de este cofactor y la eliminación de las ROS. La regulación de estos mecanismos en conjunto es esencial para el funcionamiento normal de las células y contribuye a su adaptación a diferentes cambios ambientales.

La biosíntesis de hemo comienza con la formación del ácido δ -aminolevulínico (ALA), conocido como el precursor universal de todos los tetrapirroles. En la mayoría de las bacterias, arqueas y plantas el ALA se obtiene mediante la Vía C₅, que consta de dos reacciones. En la primera reacción se produce la reducción dependiente de NADPH del glutamato esterificado al tRNA^{Glu} para obtener glutamato-semialdehído (GSA), catalizada por la glutamil-tRNA reductasa (GluTR). Posteriormente el GSA se transforma en ALA en una reacción de transaminación catalizada por la glutamato-semialdehído aminomutasa (GSAM). Uno de los puntos de regulación de la biosíntesis de hemo es la GluTR. Existe poca información en la literatura sobre las propiedades esta enzima, porque generalmente al sobreexpresarla en sistemas heterólogos es insoluble y el sustrato para medir su actividad (Glu-tRNA^{Glu}) es muy lábil y costoso de obtener.

Hasta la fecha se ha caracterizado una sola GluTR bacteriana que une hemo, la de *C. vibrioforme*, para la cual se ha descrito que la unión del cofactor disminuye la actividad de la enzima. El sitio de unión del cofactor no se ha sido caracterizado ni se ha reportado el dominio de la enzima involucrado en la interacción hemo-proteína.

Acidithiobacillus ferrooxidans es una γ -proteobacteria acidófila, mesófila, aerobia facultativa que puede utilizar Fe^{2+} o compuestos reducidos del azufre como fuentes de electrones y energía para la fijación de CO_2 y N_2 . Este microorganismo posee concentraciones de hemo elevadas en comparación con otras bacterias y además, al cultivarse en un medio con Fe^{2+} y ALA, el contenido de hemo se incrementa 1,5 veces en comparación con células crecidas sólo en Fe^{2+} . En estas condiciones hemos observado una disminución de los niveles de la GluTR sin cambios aparentes en los niveles del RNAm correspondiente, lo que sugiere una posible regulación de la biosíntesis de hemo a nivel de esta enzima. Tomando en consideración que para *A. ferrooxidans* no existen herramientas genéticas que permitan el estudio detallado de sus genes y productos, nos propusimos abordar la regulación de la biosíntesis de hemo mediante el estudio de la GluTR sobreexpresada en un sistema heterólogo.

Según los resultados obtenidos en esta tesis la GluTR recombinante de *A. ferrooxidans*, aislada desde *Escherichia coli*, es una proteína soluble, dimerica y que une hemo, en particular hemo *b*. La GluTR une hemo en función de los niveles intracelulares del cofactor y dicha unión no afecta el estado de oligomerización de la proteína, sin embargo, disminuye la actividad enzimática.

El análisis de la secuencia aminoacídica de la GluTR, deducida de la secuencia de DNA, revela la existencia en el extremo amino terminal de un péptido de 21 residuos, que no se encuentra en otras GluTRs. Dentro de este fragmento extra pudimos identificar un posible sitio HRM de unión para hemo. El análisis de una mutante trunca en dicho fragmento sugiere que el sitio HRM no participa en la unión de hemo y que la ausencia de estos 21 aminoácidos no afecta la actividad de la enzima, por lo que inferimos que puede deberse a un error en la anotación del genoma.

Nuestros resultados sugieren que el dominio carboxilo terminal, que es el dominio de dimerización, es relevante en la unión de hemo, porque una proteína mutante (GluTR357), que carece parcialmente de éste, es mayoritariamente monomérica y no alcanza los niveles del cofactor presentes en la GluTR silvestre. Sólo se logran restaurar estos niveles en una proteína mutante dimérica que incluye prácticamente todo el dominio carboxilo terminal (GluTR426). Ninguna de estas proteínas truncas en el dominio de dimerización es activa, por tanto, es imprescindible la presencia del mismo intacto para la actividad de la enzima. En conjunto estos resultados indican que la GluTR de *A. ferrooxidans* puede estar regulada por los niveles de hemo y que para dicha interacción es importante el dominio carboxilo terminal, lo cual sugiere una nueva función no reportada en la literatura para dicho dominio.

SUMMARY

Heme is an essential molecule for most archaea, bacteria and eukaryotes. It is an important cofactor of proteins involved in multiple electron transport chains, sensor molecules and protective systems like catalases and peroxidases.

Biosynthesis of heme begins with formation of δ -aminolevulinic acid (ALA), the universal precursor of tetrapyrroles. In archaea, plants and most bacteria, ALA is formed by C₅-pathway. The enzyme glutamyl-tRNA reductase (GluTR), encoded by *hemaA* gene, catalyzes the NADPH-dependent reduction of tRNA-bound glutamate to produce glutamate-1-semialdehyde (GSA), the first committed step in this pathway. Subsequent transamination by glutamate semialdehyde aminomutase (GSAM) produces ALA. The stability of *Salmonella typhimurium* GluTR as well as the activity of *C. vibrioforme* GluTR are known to be affected by heme. There are few scientific reports about this enzyme because it is insoluble when it is overexpressed in heterologous systems and its substrate (Glu-tRNA^{Glu}) is very expensive and difficult to obtain.

Acidithiobacillus ferrooxidans, an acidophilic bacterium that participates in bioleaching of minerals, uses ferrous ions or reduced sulphur compounds as electron donors. *A. ferrooxidans* requires high heme levels due its metabolism, in comparison with other bacteria. Depending on the culture conditions, variable amounts of intracellular heme are produced. The heme levels increase 1.5 times if the culture medium is supplemented with ALA in comparison when the culture medium has ferrous

ion only. When cellular content of heme is high, the level of GluTR is substantially reduced, without changes in mRNA levels. This fact suggests a possible regulation of heme biosynthesis by this enzyme in *A. ferrooxidans*.

In order to know the effects of heme on *A. ferrooxidans* GluTR we analyzed the molecular and catalytic properties of recombinant GluTR expressed in *E. coli* containing different levels of intracellular heme. Our results show that *A. ferrooxidans* GluTR is soluble dimeric protein that binds heme *b*. The amount of heme bound to GluTR depends on the intracellular levels of the cofactor. Binding of heme does not affect the enzyme oligomerization state, although it inhibits activity of enzyme.

Bioinformatics analysis shows 21 aminoacids in *A. ferrooxidans* GluTR *N*-terminal extreme. They are not found in other bacterial GluTRs. We identified one HRM site for heme binding in this fragment. The studies in a truncated mutant suggest that heme does not bind to this HRM site and truncated enzyme is active; therefore, these 21 aminoacids are not essential for enzyme activity and for heme binding.

In order to study the dimerization domain role in heme binding, we obtained GluTR357, GluTR392 and GluTR426; three truncated proteins in *C*-terminal domain. GluTR357 is mainly in monomeric form and it does not have the heme levels present in wild type GluTR. The heme levels are restored in a dimeric mutant with practically *C*-terminal domain complete (GluTR426). Neither one of truncated proteins was active; therefore, the complete *C*-terminal domain is essential for the enzyme activity. All these results suggest that dimer formation facilitates the binding of heme to GluTR contributing to the regulation of the enzymatic activity.

INTRODUCCIÓN

Los tetrapirroles constituyen una familia de compuestos muy diversa y ampliamente distribuida entre bacterias, archeas y eucariontes. Sus miembros más representativos son el hemo, responsable del color rojo de la sangre, y la clorofila, que brinda el color verde a las hojas de las plantas. Para facilitar su estudio se dividen en dos grandes grupos, tetrapirroles cíclicos y lineales. Los tetrapirroles cíclicos son el grupo con mayor diversidad en cuanto a estructura y función dentro de las células. Se caracterizan por unir diferentes tipos de iones metálicos como el Fe^{2+} , Mg^{2+} , Ni^{2+} y Co^{2+} , dando lugar al hemo, la clorofila, la coenzima F_{430} y la vitamina B_{12} , respectivamente. El crecimiento de las bacterias y las plantas se sustenta sobre la correcta formación de los tetrapirroles, por esta razón el estudio de sus respectivas rutas biosintéticas ha sido a lo largo de los años un blanco atractivo para el desarrollo de nuevos tratamientos antibacterianos y herbicidas (Frankenberg, y col., 2003; Heinemann, y col., 2008).

La capacidad de los microorganismos de responder a un gran número de señales ambientales e integrarlas para desarrollar respuestas adaptativas constituye una estrategia exitosa que les permite habitar en diversos ambientes. Los microorganismos extremófilos constituyen un claro ejemplo de ello, porque son capaces de adaptarse, no sólo a valores de pH y temperaturas extremos, sino que toleran en muchos casos la desecación, la falta de nutrientes, altas dosis de radiación ultravioleta y altas concentraciones de metales pesados. Actualmente existe un interés creciente por comprender los mecanismos moleculares que permiten el crecimiento de

microorganismos en ambientes extremos, y esto ha impulsado el estudio de todas aquellas rutas metabólicas involucradas, entre las que se encuentra la biosíntesis de tetrapirroles.

Acidithiobacillus ferrooxidans es una bacteria acidófila, y quimiolitótrofa, aislada por primera vez de aguas provenientes de relaves mineros. Por ser la primera bacteria descrita capaz de solubilizar metales (Colmer y Hinkel, 1947), aun cuando no es ni la más abundante ni la más importante en el proceso de biolixiviación, se ha convertido en el microorganismo modelo en biominería. Por esta razón se han realizado varios esfuerzos por comprender el metabolismo energético de dicho microorganismo. Hasta la fecha, una parte de las investigaciones en este tema se han concentrado en entender el funcionamiento de sus cadenas de transporte de electrones (Quatrini, y col., 2006), compuestas fundamentalmente por citocromos (Yarzabal, y col., 2002), y los mecanismos para mantener la homeostasis del hierro (Quatrini, y col., 2005); pero no se ha abordado aún la biosíntesis de hemo, cofactor estrechamente relacionado con los procesos antes mencionados. Con el desarrollo de esta tesis nos propusimos abordar la biosíntesis de hemo en *A. ferrooxidans* mediante el estudio de la glutamil-tRNA reductasa (GluTR), enzima que cataliza la primera reacción de la biosíntesis de hemo y que es considerada el punto de regulación más importante de esta ruta.

Existen varios tipos de grupo hemo, los cuales difieren en los sustituyentes del macrociclo de protoporfirina. El hemo *b* posee cuatro grupos metilo, dos propionatos y dos grupos vinilo (Figura 1A) mientras que en el hemo *c* (Figura 1B) los grupos vinilo cambian por etilo y el átomo de carbono 1 de cada uno de ellos se encuentra formando un enlace tioéter con el azufre de la cadena lateral de una cisteína aportada por la proteína. A pesar de estas diferencias estructurales, debido a la presencia del anillo de protoporfirina altamente conjugado, todos los grupos hemo absorben en la región visible del espectro, destacándose la banda γ (Soret) ubicada entre 410-430 nm y las bandas Q que se encuentran entre 520-560 nm (Mahler y Cordes, 1961).

1.1.2 Relación estructura-función de las hemoproteínas

El hemo es una molécula esencial para la mayoría de las arqueas, bacterias y eucariontes ya que es el cofactor de proteínas que poseen diversas funciones celulares. Entre ellas se destacan transportadores de oxígeno, como la hemoglobina, componentes de las cadenas de transporte de electrones, como los citocromos *c*, detectores de gases diatómicos que intervienen en procesos de transducción de señales, como la guanilato ciclasa, y enzimas, como las catalasas y peroxidasas, que participan en la eliminación de compuestos tóxicos para las células (Rodgers, 1999; Dawson, 1998; Haser, y col., 1979).

En los ejemplos anteriores el hemo forma un complejo estable con las proteínas y la remoción del mismo implica una pérdida de la actividad de éstas. Sin embargo, recientemente se ha propuesto que existen proteínas que pueden unir hemo reversiblemente, como es el caso de HasA, un transportador de hemo encontrado en bacterias patógenas (Ghigo, y col., 1997). De esta forma surge la idea de que el hemo

puede tener además un papel regulador dentro de las células y actualmente se han descrito algunos ejemplos que corroboran esta afirmación. Entre ellos se encuentra el factor transcripcional Hap1 de levaduras, el cual en ausencia de hemo está formando complejos con otras proteínas y no se une al ADN. La unión de hemo a Hap1 promueve la liberación de éste del complejo y la formación de dímeros. La forma dimérica del factor transcripcional se une con gran afinidad al ADN activando genes que codifican para proteínas que intervienen en la respiración celular (Zhang y Hach, 1999). Para algunas de las proteínas que son reguladas por hemo, como es el caso de Hap1, se sugiere que la unión de éste ocurre a través de un sitio llamado HRM (Heme Regulatory Motifs) que posee la siguiente secuencia aminoacídica: Lys/Arg-Cys-Pro-Val/Ile-Asp-His, en la que el dipéptido Cys-Pro se encuentra absolutamente conservado (Guarente y Zhang, 1995).

Conjuntamente con la descripción de nuevas funciones para el grupo hemo se han realizado numerosos estudios estructurales para aclarar los mecanismos implicados en éstas, y obtener información que permita predecir sus sitios de unión. Como resultado se han descrito una gran variedad de plegamientos presentes en las hemoproteínas, los cuales reflejan las múltiples soluciones estructurales que han surgido durante el proceso evolutivo para unir la misma especie química (Paoli, y col., 2002).

Actualmente se ha desechado la afirmación de que los enlaces de coordinación entre el hierro hemínico y las cadenas laterales de aminoácidos aportados por la proteína, constituyen la interacción más importante que mantiene el hemo *b* unido a éstas. Experimentos con mutantes puntuales de citocromos y globinas, en las cuales la histidina proximal es sustituida por glicina, muestran que dichas proteínas aún pueden

incorporar hemo. Estos datos sugieren que la estructura aportada por la proteína proporciona además las interacciones no covalentes suficientes para la unión del hemo en una región específica (Barrick, 1994; McRee, y col., 1994).

En el caso particular de los citocromos *c* se ha descrito la secuencia –CXXCH– como una señal en la estructura primaria para la unión del hemo *c*, el cual está enlazado covalentemente a la proteína a través de las dos cisteínas presentes en dicha secuencia (Moore y Pettigrew, 1990). Sin embargo, para las proteínas que unen hemo *b* no se ha descrito una secuencia señal, un dominio o un patrón de plegamiento único que permita predecir el sitio de unión para este tipo de hemo. Hasta la fecha se han encontrado más de 20 plegamientos diferentes en proteínas que unen hemo *b* y que abarcan una gran variedad de funciones (Schneider, y col., 2007; Perutz, y col., 1960; 1999).

Análisis estructurales comparativos de varias hemoproteínas, que poseen algunos de estos 20 plegamientos, sugieren que existen patrones conservados para ciertos puntos de contacto entre el hemo y la zona de unión en la proteína (Schneider, y col., 2007). Dichos contactos se dividen en tres categorías dependiendo de la parte del hemo implicada en la interacción; de esta forma, se describen aminoácidos que interactúan con los grupos propionato, con el plano y con la periferia del anillo de protoporfirina. Se plantea que aminoácidos como la arginina y la lisina son importantes para la interacción con los grupos propionato, mientras que la leucina y la isoleucina son muy frecuentes en posiciones que permiten interacciones de van der Waals con el plano del anillo de protoporfirina (Schneider, y col., 2007).

1.1.3 Biosíntesis del grupo hemo

La biosíntesis de todos los tetrapirroles comienza con la formación del ácido δ -aminolevulínico (ALA), conocido como el precursor universal de estos compuestos. Esta pequeña molécula proporciona todos los átomos de carbono y nitrógeno requeridos para la síntesis del macrociclo tetrapirrólico (Heinemann, y col., 2008). Una vez obtenido el ALA, y a partir de 3 reacciones catalizadas que son comunes para la biosíntesis de todos los tetrapirroles, se obtiene el uroporfirinógeno III, el primer intermediario cíclico de la ruta. Después de la formación de este macrociclo ocurre una ramificación de la vía metabólica, donde las reacciones de síntesis de tetrapirroles, como la vitamina B₁₂ y el sirohemo, se separan de la síntesis de hemo. Para la formación de este último se requiere de cuatro reacciones enzimáticas que conforman una ruta altamente conservada en eucariontes y procariontes (Heinemann, y col., 2008).

1.1.3.1 Biosíntesis de ALA

Existen dos rutas conocidas para la obtención del ALA, la primera descrita fue la Vía Shemin, en la cual se obtiene el ALA por una reacción de condensación entre la glicina y el succinil-CoA, con una consecuente liberación de dióxido de carbono, catalizada por la ALA sintasa. Esta ruta se encuentra en eucariontes no fotosintéticos y en las α -proteobacterias (Neuberger y Scott, 1953; Shemin y Russel, 1953). La segunda vía de obtención de ALA es la ruta C₅, que consta de dos reacciones, y se encuentra en la mayoría de las bacterias, arqueas y plantas (Beale y Castelfranco 1973; Avissar, 1989). En este caso se utiliza como sustrato el glutamato esterificado al tRNA^{Glu} (Glu-

tRNA^{Glu}), el cual también es usado para la síntesis de proteínas (Figura 2) (Jahn, y col., 1992).

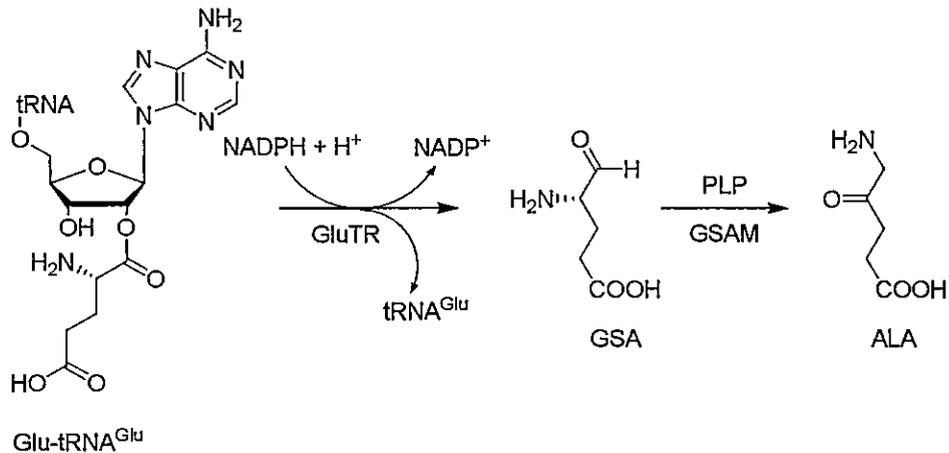


Figura 2. Esquema de la Vía C₅ de biosíntesis de ALA. En el esquema aparecen los dos pasos requeridos para la síntesis de ALA, la primera reacción catalizada por la glutamil-tRNA reductasa (GluTR) y la segunda catalizada por la glutamato semialdehído aminomutasa (GSAM).

Como se muestra en la Figura 2, en la primera reacción de la vía C₅ se produce la reducción dependiente de NADPH del glutamato esterificado al tRNA^{Glu} para obtener glutamato-semialdehído (GSA), un intermediario inestable a pH fisiológico (Chen y col., 1990). Esta etapa es catalizada por la glutamil-tRNA reductasa (GluTR), codificada por el gen *hemA* (Jahn, y col., 1991; Verkamp, y col., 1992; Moser, y col., 1999). Posteriormente el GSA se transforma en ALA en una reacción de transaminación dependiente de fosfato de piridoxal (PLP) catalizada por la glutamato-semialdehído aminomutasa (GSAM) (Ilag, y col., 1991; Ilag y Jahn, 1992).

1.1.3.2 Características de la GluTR, la primera enzima de la vía C₅

Durante varios años la GluTR, proveniente de diferentes fuentes, ha sido estudiada con el objetivo de determinar su estructura y mecanismo enzimático. Sin embargo, aparecen pocos trabajos publicados con relación a dicha proteína, debido fundamentalmente a que se encuentra en pequeñas cantidades en las células y a que de forma general, al emplear sistemas heterólogos para su producción, genera cuerpos de inclusión. La determinación de la actividad de la enzima no se encuentra exenta de dificultades ya que en primer lugar la obtención del sustrato (Glu-tRNA^{Glu}) es un proceso engorroso y costoso y en segundo lugar no es posible cuantificar el producto de la reacción (GSA) debido a su inestabilidad a pH fisiológico (Chen, y col., 1990).

Actualmente se cuenta con un modelo propuesto para la estructura tridimensional de la GluTR de *Methanopyrus kandleri*, sobre la base de datos cristalográficos. En dicho trabajo se sugiere que la proteína es un dímero con una inusual estructura en forma de V. El dímero está compuesto por dos monómeros idénticos y en cada uno de ellos es posible distinguir tres dominios diferentes, uno catalítico, otro de unión al NADPH y un tercero de dimerización (Moser, y col., 2001) (Figura 3A).

La formación de dímeros de la GluTR se ha comprobado experimentalmente para la enzimas recombinantes de *M. kandleri*, *E. coli* y *Chlorobium vibrioforme* (Moser, y col., 1999; Schauer, y col., 2002; Srivastava y Beale, 2005), las cuales además son proteínas activas *in vitro*. Con relación al estudio de la forma monomérica de esta enzima sólo se ha obtenido una mutante de la GluTR de *E. coli*, que al carecer del dominio carboxilo terminal, no forma dímeros y posee un 5% de actividad remanente en comparación con la proteína silvestre (Lüer, y col., 2005). Esto sugiere que es importante la presencia del

dominio de dimerización para la actividad, pero no se ha descrito si está implicado directamente en la catálisis o en la formación del complejo con el sustrato.

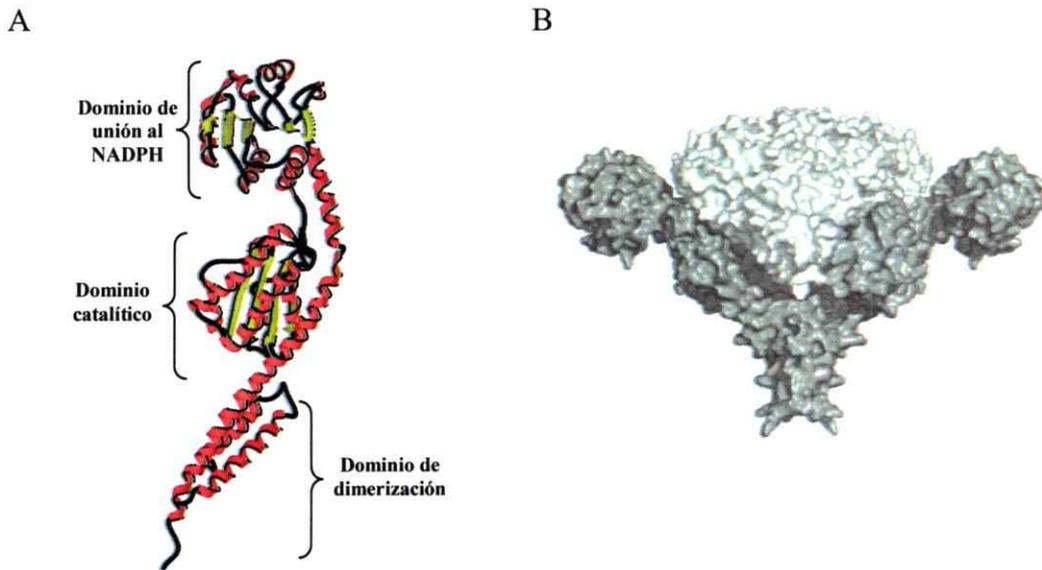


Figura 3. Modelos estructurales de la GluTR. A, modelo de la estructura propuesta para el monómero de la GluTR de *M.kandleri* (Moser, y col., 2001). B, modelo propuesto para el complejo GluTR (gris oscuro)-GSAM (gris claro) de *E. coli* (Lüer, y col., 2005).

Al reportarse la inusual estructura en forma de V para la GluTR dimérica, y teniendo en cuenta la inestabilidad del GSA formado en la reacción catalizada por esta enzima, se postuló la formación de un complejo entre la GluTR y la GSAM. Se propuso un modelo para el complejo entre estas dos proteínas sobre la base de las estructuras obtenidas mediante cristalografía de la GluTR de *M. kandleri* y la GSAM de la cianobacteria *Synechococcus* sp. 6301 (Moser, y col., 2001) (Figura 3B). En dicho modelo se sugiere que el sitio activo de cada monómero de GSAM se ubica en la cara opuesta del sitio activo de la GluTR, lo cual constituye la base para plantear un proceso de canalización del sustrato entre ambas proteínas. Posteriormente se demostró la

existencia de dicho complejo *in vivo* en *E. coli* (Lüer, y col., 2005).y en *Chlamidomonas reinhardtii* (Nogal y Beale, 2005).

Se ha descrito que el mecanismo enzimático de la GluTR de *M. kandleri* involucra primeramente un ataque nucleofílico del grupo sulfidrilo de la Cys48 de la enzima, un residuo altamente conservado en todas las GluTR, al grupo carboxilo del glutamato esterificado con la ribosa del nucleótido de adenina del extremo 3' del tRNA^{Glu} formándose un tioéster. En una segunda reacción se reduce el tioéster por transferencia de un hidruro desde el NADPH obteniéndose el GSA (Moser, y col., 1999; Schauer, y col., 2002). Con relación a los determinantes del tRNA^{Glu} requeridos para la interacción con la GluTR se ha descrito que ni el anticodón ni el brazo aceptor son importantes en el reconocimiento del sustrato por la enzima, a diferencia de lo reportado para las aminoacil-tRNA sintetasas (Randau, y col., 2004). La especificidad de la interacción entre el Glu-tRNA^{Glu} y la GluTR estaría determinada, según trabajos posteriores, por la unión del glutamato al sitio activo de la enzima, siendo el enlace éster existente entre el glutamato y el tRNA^{Glu} un determinante crucial para el reconocimiento específico del sustrato (Lüer, y col., 2007).

1.1.3.3 El Papel de la GluTR en la regulación de la biosíntesis de hemo

El hemo, además del importante papel que desempeña en la mayoría de los organismos, es considerado una molécula potencialmente tóxica. Esto último se debe a su capacidad de generar especies reactivas del oxígeno (ROS), hecho que se encuentra estrechamente ligado a la presencia del hierro en su estructura, así como a las reacciones fotoquímicas que pueden experimentar los intermediarios de su ruta de biosíntesis (Aft y Mueller,

1984; Monteiro, y col., 1991; Imaly, 2003). Por esta razón la biosíntesis de hemo es una vía metabólica que se encuentra sujeta a un estricto control. En bacterias se han descrito diferentes estrategias para dicha regulación en dependencia de los niveles de oxígeno, hierro y hemo (O'Brian y Thöny-Meyer, 2002; Schobert y Jahn, 2001).

Con relación a la regulación que ejerce el propio hemo sobre su síntesis se ha reportado que en *Bradyrhizobium japonicum* la proteína Irr, un represor transcripcional, coordina la homeostasis del hierro con la biosíntesis de hemo. Cuando hay disponibilidad de hierro para la síntesis de hemo, Irr se une a la ferroquelatasa, enzima que cataliza la incorporación de hierro al macrociclo de portoporfirina, y posteriormente Irr experimenta una degradación dependiente de hemo. Sin embargo, la limitación de hierro promueve la disociación de las dos proteínas y de esta forma Irr puede ejercer su función como represor e inhibir la transcripción del gen *hemB*, que codifica para la ALA deshidratasa (Hamza, y col., 1998).

Además del ejemplo anterior existen varios trabajos que proponen que el hemo regula su propia síntesis a nivel de la GluTR (Wang, y col., 1997; 1999a; 1999b). En estos se reporta que en *Salmonella typhimurium* la estabilidad de la GluTR está condicionada por el nivel de hemo intracelular, al aumentar éste se verifica una disminución en los niveles de la proteína, sin que se aprecien cambios en la transcripción del gen *hemA*. Adicionalmente se propone que la disminución de los niveles de la GluTR se debe a la activación de un mecanismo de degradación proteolítica. En dicho proceso están involucrados los sistemas de proteasas celulares ClpAP y Lon que reconocen una señal de degradación presente en los primeros 18 aminoácidos de la GluTR (Wang, y col., 1999a; 1999b). Uno de los modelos propuestos para explicar esta

regulación plantea que, como consecuencia de la unión de hemo a la GluTR, se produce un cambio conformacional en la proteína que expone la secuencia de reconocimiento para las proteasas (Wang, y col., 1999a). Hasta el momento no se han encontrado evidencias de que es el propio hemo el que transmite la señal para la degradación de la GluTR o si existen otros intermediarios de la biosíntesis del hemo u otras proteínas involucradas, pero sí se ha reportado que algunas GluTR unen hemo (Srivastava y Beale, 2005; Vothknecht, y col., 1986).

Hasta la fecha se conocen dos GluTR recombinantes de origen bacteriano que unen hemo, la de *C. vibrioforme* (Srivastava y Beale, 2005) y la de *Mycobacterium tuberculosis* (Paravisi, y col., 2009). Según se plantea en el primero de estos trabajos, la enzima de *C. vibrioforme* une un mol de hemo por cada mol de polipéptido y su actividad no se afecta al ser tratada con hemina. Sin embargo, las preparaciones de esta proteína obtenidas desde células tratadas con un inhibidor de la ALA deshidratasa poseen un menor contenido de hemo, son más activas y susceptibles a la inhibición por hemina (Srivastava y Beale, 2005). Con relación a la GluTR recombinante de *M. tuberculosis* se ha reportado que mayoritariamente se encuentra en cuerpos de inclusión, que puede formar complejos con la GluRS de esta bacteria y que posee una relación hemo/proteína de 1:16 (Paravisi, y col., 2009).

1.1.4. Características generales de Acidithiobacillus ferrooxidans

Acidithiobacillus ferrooxidans es una γ -proteobacteria acidófila, mesófila, aerobia facultativa que puede utilizar Fe^{2+} o compuestos reducidos del azufre como fuentes de

electrones y energía para la fijación de CO₂ y N₂ (Rawlings y Silver, 1995). Esta bacteria forma parte de las comunidades microbianas involucradas en la biolixiviación (Rawlings, y col., 1999) y aunque no es la más abundante ni la más importante en dicho proceso, se ha convertido en un modelo de estudio para la biominería. Actualmente se dispone de la secuencia de su genoma (J. Craig Venter Institute) y esto ha impulsado el desarrollo de múltiples investigaciones para obtener una mejor comprensión acerca de su metabolismo, tomándola como modelo de estudio de estas comunidades biolixiviantes.

A. ferrooxidans habita en ambientes donde las concentraciones de Fe²⁺ son muy altas, oxida grandes cantidades de este metal y debido a esto posee un elevado consumo de oxígeno. Se ha reportado que la tasa respiratoria de este microorganismo es aproximadamente diez veces superior a la estimada en las mitocondrias de cardiomiocitos bovinos (Ingledey y Cobbley, 1980). Para alcanzar estas altas tasas oxidativas *A. ferrooxidans* posee niveles elevados de los componentes redox involucrados en las cadenas transportadoras de electrones, entre ellos se destacan los citocromos (Ingledey, 1982; Yarzabal, y col., 2002). Este elevado nivel de hemoproteínas implica que la bacteria debe tener una gran disponibilidad de hemo para satisfacer esta demanda. De hecho, según datos de nuestro laboratorio, el contenido de hemo de *A. ferrooxidans* crecido en un medio con Fe²⁺ es 7 veces mayor que el de *E. coli*. Además, al cultivar el microorganismo en un medio con Fe²⁺ y ALA, el contenido de hemo se incrementa 1,5 veces en comparación con células crecidas sólo en Fe²⁺. En presencia de ALA hemos observado una disminución de los niveles de la GluTR sin cambios aparentes en los niveles del ARNm correspondiente, lo que sugiere una posible regulación de la biosíntesis de hemo a nivel de esta enzima (Levicán, y col., 2007).

Teniendo en cuenta que un exceso de hemo puede provocar daños oxidativos en las células, y que por esta razón su biosíntesis está estrictamente regulada; que *A. ferrooxidans* puede modular el contenido de citocromos en función de las condiciones de cultivo, para lo que requiere de cambios en los niveles de hemo, consideramos que este microorganismo es un modelo atractivo para el estudio de la regulación de la biosíntesis de hemo.

Tomando en consideración que, a diferencia de otras bacterias, para *A. ferrooxidans* no existen herramientas genéticas que faciliten el estudio detallado de sus genes y productos, y que además, la cantidad de biomasa que se obtiene por cada litro de cultivo no es suficiente para obtener extractos de proteínas concentrados, nos propusimos abordar la regulación de la biosíntesis de hemo mediante el estudio de su GluTR recombinante.

Por los antecedentes anteriormente expuestos se propone la siguiente **HIPÓTESIS**: La GluTR de *A. ferrooxidans* podría unir hemo y éste regularía su actividad, lo cual reflejaría una de las estrategias empleadas por la bacteria para mantener los niveles de hemo en función de los requerimientos celulares.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto de la unión de hemo sobre las propiedades catalíticas y moleculares de la GluTR recombinante de *A. ferrooxidans* y determinar el dominio al cual se une el cofactor.

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. MATERIALES

2.1.1 Cepas y plásmidos

Las cepas de *E. coli* y *A. ferrooxidans* que se emplearon en esta tesis se describen en la Tabla 1. La cepa de *E. coli* DH5 α se utilizó para la propagación y almacenamiento de plásmidos y la cepa BL21 (DE3) para la sobreexpresión de genes y la obtención de proteínas de fusión. Los plásmidos empleados para el desarrollo de esta tesis se describen en la Tabla 2.

Tabla 1. Cepas de *E. coli* y *A. ferrooxidans*.

Cepas	Genotipo/Descripción	Fuente
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 α	<i>SupE44 ΔlacU169 (Φ80lacZΔM15) <i>hsdR17</i> <i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>.</i>	Novagen
BL21(DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm</i> (DE3)	Novagen
<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>		
ATCC2327	Silvestre	ATCC

Tabla 2. Plásmidos.

Plásmidos	Descripción	Fuente
pGEMT-Easy	Plásmido de 3820 pb utilizado para clonar productos de PCR, Amp.	Promega
pET-15b	Plásmido de 5708 pb utilizado para clonar el gen <i>hemA</i> silvestre y mutantes truncas de dicho gen, Amp. Las proteínas de fusión obtenidas por la expresión de los genes clonados en este plásmido poseen un hexapéptido de His en el extremo amino terminal y un sitio de reconocimiento para Trombina.	Invitrogene

pET-21b	Plásmido de 5443 pb utilizado para clonar el gen <i>hemA</i> , Amp. Las proteínas de fusión obtenidas por la expresión de los genes clonados en este plásmido poseen un hexapéptido de His en el extremo carboxilo terminal.	Invitrogene
pAFglfX1	Plásmido que contiene el gen <i>glfX1</i> de <i>A. ferrooxidans</i> en el sitio <i>EcoRI</i> del plásmido pGEX-2T, Amp.	Salazar, y col., 2003
pGtrAET	Plásmido derivado de pET-15b que contiene el gen <i>hemA</i> de <i>A. ferrooxidans</i> en el sitio <i>XhoI</i> , Amp.	Levicán, y col., 2006
pUC18/Glu3	Plásmido derivado de pUC18 que contiene el gen del tRNA _{3^{Glu}} de <i>A. ferrooxidans</i> , Amp.	Levicán, y col., 2006
GluTR/pET-21b	Plásmido derivado de pET-21b que contiene el gen <i>hemA</i> de <i>A. ferrooxidans</i> clonado entre los sitios <i>NheI</i> y <i>XhoI</i> , Amp.	Dato no publicado
GluTR357/pET-15b	Plásmido derivado de pET-15b que contiene en el sitio <i>XhoI</i> una variante trunca del gen <i>hemA</i> de <i>A. ferrooxidans</i> que codifica para la mutante GluTR357, Amp.	Esta tesis
GluTR357 _m /pET-15b	Plásmido derivado de pET-15b que contiene en el sitio <i>XhoI</i> una variante trunca del gen <i>hemA</i> de <i>A. ferrooxidans</i> que codifica para la mutante GluTR357 con mutaciones puntuales, Amp.	Esta tesis
GluTR392/pET-15b	Plásmido derivado de pET-15b que contiene en el sitio <i>XhoI</i> una variante trunca del gen <i>hemA</i> de <i>A. ferrooxidans</i> que codifica para la mutante GluTR392, Amp.	Esta tesis
GluTR426/pET-15b	Plásmido derivado de pET-15b que contiene en el sitio <i>XhoI</i> una variante trunca del gen <i>hemA</i> de <i>A. ferrooxidans</i> que codifica para la mutante GluTR426, Amp.	Esta tesis
Δ21NH ₂ GluTR/pET-21b	Plásmido derivado de pET-21b que contiene entre los sitios <i>NdeI</i> y <i>XhoI</i> la variante trunca del gen <i>hemA</i> de <i>A. ferrooxidans</i> que codifica para una GluTR que carece de los primeros 21 aminoácidos, Amp.	Esta tesis

2.1.2 Medios de cultivo

Medio LB: 1% (p/v) Triptona, 1% (p/v) NaCl y 0,5% (p/v) extracto de levadura. Se esterilizó en autoclave por 20 min a 15 atm. Para el medio LB sólido se agregó 1,5% (p/v) agar. En aquellos casos requeridos los medios se suplementaron con ampicilina a

una concentración final de 100 µg/ml. Para la selección de transformantes de *E. coli* por expresión del gen de la β-galactosidasa se suplementó el medio con 20 mM IPTG y 80 µg/ml de X-gal.

Medio 9K-Fe²⁺: 0,04 g/L K₂HPO₄; 0,04 g/L MgSO₄ y 0,1 g/L (NH₄)₂SO₄. Se ajustó el pH a 1,6 con H₂SO₄ concentrado y se esterilizó en autoclave durante 15 min a 15 atm. En el momento de usar se adicionó una solución de sulfato de hierro (II), previamente esterilizada por filtración, hasta una concentración final de 33,3 g/L.

2.1.3 Reactivos

Los siguientes reactivos se adquirieron en Sigma Chemical Co. (USA): lisozima, BSA, ampicilina, TEMED, PMSF, persulfato de amonio, bromuro de etidio, ATP, CTP, GTP, UTP, citocromo-*c* de caballo, mioglobina, glutamato, glutatión reducido, resina de glutatión agarosa, PPO, POPOP. El SDS se obtuvo en United States Biochemicals Co. (USA) y el reactivo de Bradford en BioRad. Todas las endonucleasas de restricción, la CIAP, los desoxiribonucleótidos, la mezcla High Fidelity PCR Enzyme (*Taq* y *Pfu* DNA polimerasas), los marcadores de peso molecular para DNA (100 pb y 1 kb) y los marcadores de peso molecular para proteínas proceden de Fermentas. La T4 DNA ligasa se obtuvo en New England Biolabs. Todas las sales, ácidos, bases y compuestos orgánicos de grado analítico proceden de Merck, Fluka o JT Baker. Los reactivos para medios de cultivo: triptona, extracto de levadura y agar, se adquirieron en Mo Bio Laboratories, Inc. Las resinas de Ni²⁺-sefarsa y Superdex 200HR se adquirieron en GE Healthcare.

2.1.4 Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados en esta tesis se adquirieron en Fermelo y se describen en la Tabla 3. Las secuencias reconocidas por enzimas de restricción aparecen subrayadas y se hace referencia a la enzima correspondiente en el nombre del oligonucleótido. En los oligonucleótidos inversos que se diseñaron para obtener las mutantes truncas del gen *hemA* aparece sombreada la secuencia del codón de parada que se utilizó.

Tabla 3. Listado de oligonucleótidos.

Oligonucleótidos	Secuencia nucleotídica (5'-3')	Temp. de asociación (°C)
$\Delta 21\text{NH}_2\text{GluTRAF-pET21b/NheI-fd}^a$	<u>CATATGACCACCATTTTCTGCTTCGG</u>	61,4
$\Delta 21\text{NH}_2\text{GluTRAF-pET21b/XhoI-Rv}^b$	<u>CTCGAGTCCTTCGGCGTCACTG</u>	60,7
$\text{GluTR357Af-pET15b/XhoI-fd}^a$	<u>CTCGAGTTGCAATCCTGTCCGGCAT</u>	63,1
$\text{GluTR357Af-pET15b/XhoI-Rv}^b$	<u>CTCGAGTTACTCCCGCCATTGCTG</u>	61,6
$\text{GluTR392Af-pET15b/XhoI-Rv}^b$	<u>CTCGAGTTAGTCCTGCCCTGATCC</u>	62,2
$\text{GluTR426Af-pET15b/XhoI-Rv}^b$	<u>CTCGAGTTAATTCGTTGGTCGCGTCC</u>	62,3

fd^a: oligonucleótidos directos; Rv^b: oligonucleótidos inversos.

2.2. MÉTODOS

2.2.1 Condiciones de Cultivo

Los cultivos de *A. ferrooxidans* se crecieron a 30 °C con agitación (150 rpm) en medio 9K. El crecimiento de *A. ferrooxidans* se evaluó por recuento directo de células en cámara Petroff-Hausser. Las bacterias se colectaron en la fase tardía del crecimiento exponencial mediante centrifugación a 8000 rpm por 10 min, a 4 °C. Las células se lavaron en medio 9K hasta obtenerlas libres de partículas.

Las distintas cepas de *E. coli* se cultivaron en medio LB o en medio LBA suplementado con ampicilina (100 µg/ml, concentración final) a 37 °C con agitación

(200 rpm) El crecimiento bacteriano se controló midiendo la absorbancia a 600 nm. Las bacterias se colectaron por centrifugación a 6000 rpm por 10 min a 4 °C.

2.2.2 Preparación de DNA plasmidial

Para la purificación del DNA plasmidial de *E. coli* se utilizó el Plasmid Mini Kit (Qiagen). Las células de *E. coli* se cultivaron con agitación toda la noche a 37 °C y se colectaron por centrifugación a 14000 rpm por 1 min. La extracción del DNA plasmidial se realizó mediante lisis alcalina y se purificó por cromatografía de intercambio iónico según las indicaciones del proveedor. La calidad de la preparación de DNA plasmidial se verificó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%.

2.2.3 Preparación de DNA genómico de *A. ferrooxidans*

La extracción del DNA genómico de *A. ferrooxidans* se efectuó a partir de cultivos crecidos a 30 °C hasta alcanzar la fase exponencial tardía en medio 9K-Fe²⁺ según describen Yates y Holmes (1987).

2.2.4 Preparación y transformación de células de *E. coli* quimiocompetentes

La preparación y transformación de células quimiocompetentes se realizó siguiendo los protocolos descritos por Sambrook y col., 1989. Células de *E. coli* cultivadas durante toda la noche a 37 °C y con agitación constante se utilizaron para inocular 100 ml de LB al 1% (v/v). El cultivo se incubó a 37 °C y con agitación constante hasta que alcanzó una absorbancia a 600 nm de 0,4-0,5. Posteriormente se centrifugó a 3000 rpm por 20 min a 4 °C, se eliminó el sobrenadante y las células se lavaron dos veces con 50 ml de una solución

de CaCl₂ fría (10 mM Hepes-NaOH pH 7, 15% glicerol, 60 mM CaCl₂), centrifugando cada vez a 3000 rpm por 20 min a 4 °C. Después del último lavado, las células se resuspendieron en 5 ml de la solución de CaCl₂ anterior y se guardaron en alícuotas de 100 µl a -80 °C hasta su utilización.

Para la transformación de las células quimiocompetentes se tomó una alícuota de 100 µl de éstas se mezcló con 1-5 µl (0,1-100 ng) de la preparación de DNA plasmidial y se incubó en hielo durante 30 min. Posteriormente la mezcla se incubó durante 45 s a 42 °C y luego en hielo durante 2 min. Se agregaron 0,9 ml de medio LB y se incubaron las células a 37 °C con agitación durante 1 hora. Por último se sembraron 50-100 µl de la suspensión de células en placas de LBA/agar, las cuales se mantuvieron durante toda la noche a 37 °C.

2.2.5 Estrategia de clonación para obtener las mutantes truncas del gen *hemA*

Para obtener las cuatro mutantes truncas del gen *hemA* (Figura 4) se amplificaron los fragmentos requeridos mediante PCR a partir del DNA genómico de *A. ferrooxidans* utilizando los oligonucleótidos descritos en la Tabla 3 y la mezcla de DNA polimerasas High Fidelity PCR Enzyme. Para obtener las mutantes truncas GluTR357; 392 y 426 se adicionó el codón de parada (5'-TTA-3') en la secuencia de los oligonucleótidos inversos (Rv).

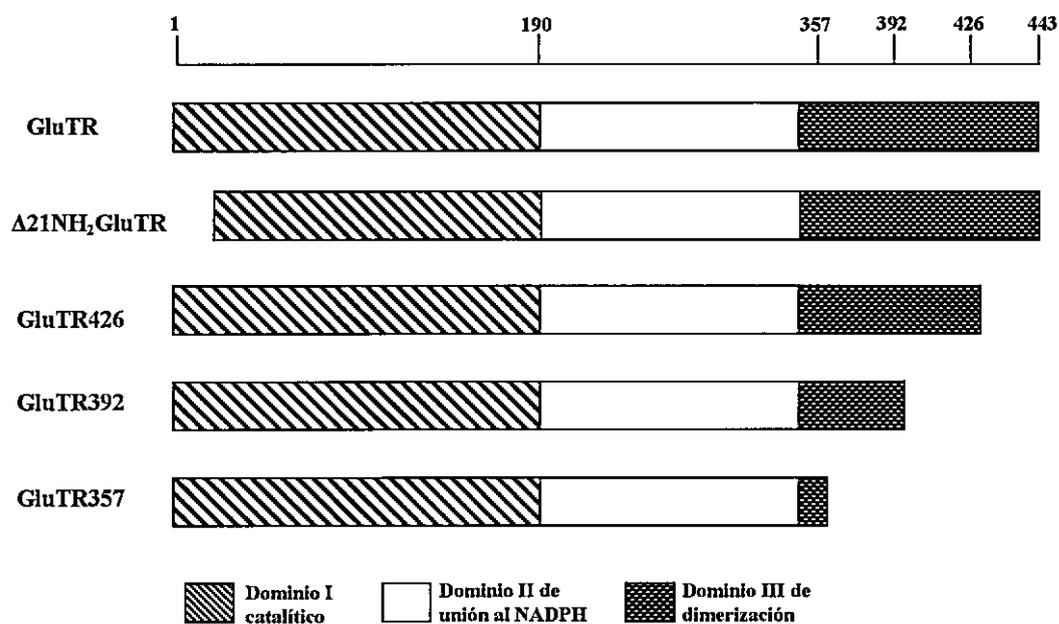


Figura 4. Representación esquemática de los dominios de la GluTR. Se muestra un esquema de los dominios presentes en las mutantes truncas de la GluTR de *A. ferrooxidans*.

En general, se emplearon las siguientes condiciones para las reacciones de PCR: una primera etapa de desnaturalización a 94 °C por 2 min, seguida de 28 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 30 s, alineamiento de los oligonucleótidos durante 30 s a 60 °C y extensión del fragmento con High Fidelity PCR Enzyme Mix a 72 °C durante un tiempo aproximado de 1 min por kb de DNA a sintetizar. Finalmente se realizó una extensión a 72 °C durante 10 min. En todos los casos los productos de amplificación se observaron por electroforesis en geles de agarosa al 1%, realizadas a 100 V durante 45 min en amortiguador TAE (40 mM Tris-acetato y 1 mM EDTA). Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y se visualizaron los productos de amplificación al exponer el gel a la luz ultravioleta.

Posteriormente los productos de PCR obtenidos se ligaron independientemente al pGEMT-Easy. Las mezclas de reacción se incubaron durante toda la noche a 4 °C empleando los reactivos proporcionados por el proveedor y utilizando en todos los casos una relación plásmido:inserto de 1:3. Las mezclas de ligación se utilizaron para transformar células quimiocompetentes de *E. coli*. De todas las transformantes obtenidas se seleccionaron las colonias blancas que crecieron en medio LBA/agar/X-gal, y se verificó la presencia del inserto mediante PCR de colonias.

Se purificaron los plásmidos y se liberaron los insertos mediante reacciones de digestión con las endonucleasas correspondientes, según los sitios de reconocimiento incorporados en los oligonucleótidos (Tabla 3). De forma general las digestiones se realizaron durante toda la noche a 37 °C, tomando en cuenta las indicaciones del proveedor de las enzimas de restricción. Los fragmentos obtenidos por digestión se purificaron desde geles de agarosa al 1% usando el kit HiYield Gel/PCR DNA Fragment Extraction (RBC, Bioscience) y se ligaron a los plásmidos de expresión (pET-15b o pET21-b) previamente digeridos con las endonucleasas correspondientes y desfosforilados con CIAP. La reacción de ligación se realizó con la T4 DNA ligasa empleándose una relación plásmido:inserto 1:3, se incubó la mezcla durante toda la noche a 16 °C y con ésta se transformaron células de *E. coli* quimiocompetentes. Se utilizó LBA como medio de selección, se purificaron los plásmidos que contenían los insertos deseados y se corroboró la identidad de los fragmentos clonados por secuenciación.

2.2.6 Sobreexpresión de los genes *gltx1*, *hemA* silvestre y mutantes truncas

La cepa BL21(DE3) de *E. coli* transformada con los diferentes plásmidos recombinantes descritos en la Tabla 2 se cultivó toda la noche a 37 °C en LBA (50 ml). Dicho cultivo se utilizó para inocular 1L de medio LBA al 5%. Las células se cultivaron a 37 °C con agitación hasta alcanzar una absorbancia a 600 nm entre 0,6 y 0,8, en este momento se adicionó IPTG a una concentración final de 500 µM y se incubaron las células a 37 °C por 3 horas más. Se centrifugaron las células a 6000 rpm por 10 min a 4 °C. Se lavaron con 50 mM Tris-HCl pH 8 y se guardaron a -20 °C para su posterior utilización.

Cuando fue requerido aumentar el contenido de hemo de las células de *E. coli*, éstas se cultivaron en las condiciones anteriormente descritas. Las células se crecieron hasta alcanzar una absorbancia a 600 nm de 0,6 y luego se añadió ALA para obtener una concentración final de 500 µM en el medio de cultivo (O'Brian y Gao, 2007). Cuando el cultivo alcanzó una absorbancia a 600 nm de 0,8 se adicionó el IPTG y se incubó durante 3 horas adicionales. Para disminuir el contenido de hemo de las células de *E. coli* se desarrolló una estrategia similar a la anteriormente descrita, pero añadiendo ortofenantrolina a una concentración final en el medio de cultivo de 100 µM (Saunders, y col., 2008).

2.2.7 Purificación de *GST-GluRS1*

Las células obtenidas después de la inducción con IPTG del gen *gltx1* se resuspendieron en 100 ml de una solución A (50 mM Tris-HCl pH 8; 2 mM EDTA; 20 mM 2-mercaptoetanol; 0,1% Tritón X-100; 150 mM NaCl), se agregaron inhibidores de proteasas (2 mM PMSF; 0,1% aprotinina; 2 µg/ml pepstatina A y 2 µg/ml leupeptina) y

posteriormente se sonicó la mezcla, aplicando 7 pulsos de 10 s cada uno a 50 watt alternando cada pulso con 1 min de incubación en hielo. El extracto total de proteínas obtenido se centrifugó a 20000xg por 45 min a 4 °C y se aplicó el sobrenadante a una columna de glutatión agarosa previamente equilibrada con solución A. Posteriormente se lavó con 5 volúmenes de solución B (50 mM Tris-HCl pH 8; 150 mM NaCl) y se realizó la elusión de la GST-GluRS1 con 20 mM glutatión reducido en solución B. Las fracciones colectadas se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) y las que poseían la mayor cantidad de proteína de fusión se unieron y se dializaron en una solución de almacenamiento (20 mM HEPES-KOH pH 7,2; 50 mM KCl, 10 mM MgCl₂; 50% glicerol; 1 mM DTT) conservándose posteriormente a -80 °C.

2.2.8 Purificación de His₆GluTR.

Las proteínas de fusión con cola de histidinas se purificaron todas mediante el siguiente protocolo. Las células previamente obtenidas a partir de 1L de cultivo se resuspendieron en 100 ml de una solución A (50 mM Tris-HCl pH 8; 500 mM NaCl; 5 mM imidazol) y se sonicó la mezcla, aplicando 7 pulsos de 10 s cada uno a 50 W alternando cada pulso con 1 min de incubación en hielo. El extracto total de proteínas obtenido se centrifugó a 20000xg por 45 min a 4 °C y se aplicó el sobrenadante a una columna de Ni²⁺-sefárosa previamente equilibrada con solución A. Posteriormente se lavó con 5 volúmenes de solución B (50 mM Tris-HCl pH 8; 500 mM NaCl; 20 mM imidazol) y la elusión de las proteínas de fusión se realizó con una solución C (50 mM Tris-HCl pH 8; 500 mM NaCl; 200 mM imidazol). Las fracciones colectadas se analizaron mediante SDS-PAGE y las que poseían la mayor cantidad de proteína de fusión se unieron y se dializaron en

una solución de almacenamiento (30 mM Hepes-NaOH pH 7,5; 200 mM NaCl; 20% glicerol; 1 mM DTT) conservándose posteriormente a -80 °C.

En los casos que fue requerido se digirió la proteína de fusión con trombina para eliminar el hexapéptido de His. Para ello se añadió trombina (1u/ μ l) y 2,5 mM de CaCl₂ a la fracción obtenida de la columna de Ni²⁺-sefrosa y se incubó durante toda la noche a 4 °C. Posteriormente se dializó y se recromatografio la proteína digerida, comprobándose la presencia de la GluTR mediante SDS-PAGE.

2.2.9 Cromatografía de filtración en gel

Esta cromatografía se realizó con una columna de Superdex 200 HR de 30 ml, con una velocidad de flujo de 0,5 ml/min y usando como fase móvil 50 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM NaCl. El seguimiento de las corridas cromatográficas se realizó midiendo la absorbancia a 280 nm y a 420 nm, empleando un detector Jasco acoplado a un computador. Previamente se calibró la columna con las siguientes proteínas patrones: β -amilasa (200 kDa), alcohol deshidrogenasa (150 kDa), BSA (66 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa) y citocromo-c (12,4 kDa). Para determinar el volumen de exclusión se utilizó azul dextrano (2000 kDa).

2.2.10 Cuantificación de proteínas

La concentración de proteínas se determinó utilizando el método de Bradford (1976). Para la curva de calibración se utilizó BSA y se midió la absorbancia a 595 nm.

2.2.11 Cuantificación de hemo

El contenido de hemo de las diferentes preparaciones de GluTR recombinantes se determinó usando el coeficiente de extinción de hemocromo piridina $\epsilon_{419}=1,915 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ (Srivastava y Beale, 2005). Se hicieron reaccionar las proteínas con una solución de 25% piridina y 100 mM NaOH, posteriormente se adicionó ditionito de sodio a una concentración final de 5 mM y se midió la absorbancia a 419 nm.

2.2.12 Espectros de absorción UV-visible

Los espectros de absorción UV-visible se registraron en un espectrofotómetro de doble haz Jasco (V-550) a temperatura ambiente, usando una cubeta de cuarzo de 1cm de paso óptico. Las mediciones se realizaron en intervalos de 1 nm entre 260-600 nm, registrándose al menos 3 espectros para cada muestra. Las proteínas se diluyeron previamente en solución tampón 50 mM Tris-HCl pH 8, a una concentración final de 50 μM . Para obtener los espectros del grupo hemo en condiciones reducidas se utilizó 1 mM de ditionito de sodio y para oxidarlo 1 mM ferricianuro de potasio.

2.2.13 Espectros de dicroísmo circular (DC)

Los espectros DC se registraron en un espectropolarímetro Jasco (J-600), usando una cubeta de cuarzo de 1 mM de paso óptico. Las mediciones fueron realizadas en intervalos de 1 nm entre 260 y 190 nm, con una amplitud de banda de 2 nm, una velocidad de barrido de 50 nm/min, obteniéndose el promedio de 5 espectros. Para estos experimentos las proteínas se diluyeron en 20 mM de fosfato de sodio pH 8 a una concentración final de 2,5 μM y se incubaron durante 1 hora antes de registrar el espectro.

Para el análisis de los espectros primeramente se restó el espectro del blanco y posteriormente la elipticidad observada fue convertida en elipticidad residuo promedio aplicando la ecuación 1. Para esto último se tuvo en cuenta la concentración de proteína de las muestras recuperadas de la cubeta y el número de aminoácidos de la cadena polipeptídica. Para calcular el contenido de estructura secundaria se utilizó el método de análisis CDSSTR (Compton, y Jhonson, 1986) disponible en la web www.dichroweb.cryst.bbk.ac.uk (Whitmore, y Wallace, 2004).

$$[\theta] = \frac{\theta}{10 \times n \times Cp \times l}$$

Ecuación 1

Donde:

(θ) : Elipticidad residuo promedio (grado $\text{cm}^2 \text{decimol}^{-1}$).

θ : Elipticidad observada (mgrado)

n : número de aminoácidos de la proteína

Cp : Concentración molar (mol/L).

l : paso óptico de la cubeta (cm).

2.2.14 Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Las electroforesis en geles de poliacrilamida para proteínas se realizaron según el sistema descrito por Laemmli (Laemmli, 1970), usando Tris-glicina como solución amortiguadora de corrida. Las muestras de proteínas se mezclaron previamente con solución amortiguadora de carga (25 mM Tris-HCl pH 8; 50% glicerol; 0,1% SDS y 5% β -mercaptoetanol) y se emplearon geles separadores al 12% y al 8%. Para la detección de las proteínas se utilizó azul de Coomassie R-250 según se describe en Current Protocols (Sasse y Gallagher, 2003).

2.2.15 Inmunodetección de proteínas

La inmunodetección de GluTR se realizó siguiendo el protocolo descrito en Current protocols (Sasse y Gallagher, 2003). Después de la electroforesis el gel se incubó durante 30 min en solución de transferencia (25 mM Tris-HCl pH 8,4; 150 mM glicina; 1% SDS (p/v) y 10% MeOH (v/v)), posteriormente se realizó la transferencia a 350 mA durante una hora y media, y se dejó incubando la membrana de PVDF toda la noche a 4 °C con solución de bloqueo (5% leche (p/v); 0,1% Tween-20 (v/v) y 10% TBS). Al día siguiente se lavó tres veces la membrana con TBS y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo primario, posteriormente se repitieron los tres lavados con TBS y se incubó con el anticuerpo secundario durante 1 hora. Por último se lavó nuevamente la membrana con TBS y se incubó la misma con los sustratos cromogénicos requeridos para la detección de la actividad enzimática conjugada al anticuerpo secundario. Se emplearon anticuerpos primarios policlonales anti-GluTR generados en conejo y anticuerpos secundarios anti-IgG de conejo conjugados con fosfatasa alcalina. Para detectar las proteínas de fusión con el hexapéptido de His se emplearon monoclonales anti-(His)₆ generados en ratón y anticuerpos secundarios anti-IgG de ratón conjugados con fosfatasa alcalina. En ambos casos se utilizaron los sustratos cromogénicos BCIP/NBT descritos para detectar la actividad de la fosfatasa alcalina (Sasse y Gallagher, 2003).

2.2.16 Reacción de entrecruzamiento de proteínas

Para determinar el estado de oligomerización de la GluTR en sus diferentes preparaciones se realizaron reacciones de entrecruzamiento con glutaraldehído

(Willmund, y col., 2007; Kar, y col., 2008). Las proteínas (0,5 mg/ml) se incubaron, a temperatura ambiente, en 20 mM fosfato de sodio pH 7 durante 30 min y 1 hora. Posteriormente se añadió glutaraldehído a diferentes concentraciones (0,05-1% v/v) continuando la incubación durante 30 min. El entrecruzamiento se detuvo al adicionar amortiguador de carga para SDS-PAGE que contenía 400 mM de glicina y la mezcla se aplicó en un gel al 8%. La detección de las proteínas se realizó con azul de Coomassie.

2.2.17 Espectrometría de Masas (MALDI-TOF)

Se utilizó el servicio de la Unidad de Espectrometría de Masas de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile. Los espectros de masa se registraron en un equipo Microflex (MALDI-TOF, Bruker Daltonics), el cual se calibró previamente con una mezcla de proteínas estándares de masas entre 20000-70000 Da y se usó una matriz de ácido sinapínico (10 g/ml) en 0,1% acetonitrilo/ácido fórmico (v/v).

2.2.18 Preparación y purificación de tRNA₃^{Glu}

El tRNA₃^{Glu} (UUC) se obtuvo mediante una reacción completa de transcripción *in vitro* (Sampson y Uhlenbeck, 1988; Randau, y col., 2004). El fragmento de ADN con el gen del tRNA₃^{Glu} de *A. ferrooxidans*, incluyendo el promotor para la T7 RNA polimerasa, se obtuvo mediante PCR utilizando como molde el plásmido pUC18/Glu3 (Levicán, y col., 2006). Para generar el extremo 3'-CCA en el transcripto se incluyó esta secuencia en el partidor inverso usado para la amplificación por PCR. La reacción de transcripción se realizó a 37 °C durante 4 horas en una solución tampón que contenía 40 mM Tris-HCl

pH 8,1; 22 mM MgCl₂; 2 mM espermidina; 5 mM DTT; 0,05 mg/ml BSA; 4 mM de cada uno de los 4 ribonucleótidos trifosfato (ATP, UTP, GTP, CTP); 20 mM GMP; 0,15U de pirofosfatasa; ADN amplificado por PCR (6,28 ng/μl) y 34,3 μg/μl de T7 RNA polimerasa. Posteriormente el producto de la reacción de transcripción se purificó mediante cromatografía de intercambio iónico Mono-Q (Midi tip 100, Qiagen) (Jahn y col., 2001). El producto anterior se diluyó en solución A (0,05% MOPS; 15% isopropanol; 1% tritón X-100 y 0,4 M NaCl) y se aplicó a la columna en estas condiciones. Se lavó con solución B (0,05% MOPS; 15% isopropanol y 0,4 M NaCl) y se colectaron fracciones de 0,5 ml con solución C (0,05% MOPS; 15% isopropanol y 1 M NaCl). Dichas fracciones se precipitaron con 0,1 vol. de 3 M acetato de sodio pH 5,2 y 2 vol. de 100% etanol, recuperándose los precipitado por centrifugación a 12000 rpm, 30 min, 4 °C. Se resuspendieron en agua destilada estéril y se mezclaron todas las fracciones donde se observó precipitado. Se verificó la homogeneidad de la preparación mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con urea. Por último se cuantificó el tRNA₃^{Glu} obtenido midiendo la absorbancia a 260 nm (una solución de RNAss de 40 μg/ml posee una absorbancia de 1 a 260 nm).

2.2.19 Ensayo de Actividad Enzimática para la GluTR

Aminoacilación de tRNA₃^{Glu}: Primeramente se calentó la preparación de tRNA₃^{Glu} a 90 °C durante 3 min y se dejó enfriar lentamente hasta 42 °C, para facilitar el plegamiento, en este momento se agregó solución de cloruro de magnesio hasta una concentración final de 2 mM y se continuó enfriando hasta 37 °C (Randau y col., 2004). La reacción de aminoacilación se llevó a cabo a 37 °C por 30 min en una solución tampón compuesta

por 30 mM Hepes-KOH pH 7,2; 3,8 mM KCl; 1,5 mM MgCl₂; 40µM glutamato radiactivo (actividad específica 238mCi/mmol); 5 mM ATP; 2 mM DTT; 0,2 µg/µl tRNA₃^{Glu} y 25 nM GST-GluRS1. Al finalizar la reacción se adicionó a la mezcla 0,1 vol. de 3 M acetato de sodio pH 5,2 y se realizó una extracción con fenol/cloroformo. El [¹⁴C-Glu]-tRNA₃^{Glu} se recuperó por precipitación con etanol y se conservó a -80 °C hasta el momento de su utilización (Moser y col., 1999).

Para estimar la concentración de [¹⁴C-Glu]-tRNA₃^{Glu} se resuspendió el precipitado en 10 mM de acetato de sodio pH 5 y se colocaron 10 µl en un papel de filtro, el cual se lavó tres veces con 5% TCA durante 5 min y luego con 95% etanol por 2 min. Los filtros se secaron durante 30 min a 65 °C y se suspendieron en 3 ml de una solución de centelleo que contenía 3,92 g/L de PPO y 0,08 g/L de POPOP disueltos en tolueno. La radioactividad de los filtros se cuantificó en un contador de centelleo líquido Delta 300 (Searle Analytical Inc.).

Desacilación de [¹⁴C-Glu]-tRNA₃^{Glu}: La reacción de desacilación se llevó a cabo a 30 °C en 100µl de una solución tampón que contenía 30 mM Hepes-KOH pH 7,2; 4 mM KCl; 1,5 mM MgCl₂; 2 mM DTT y 0,1 mg/ml BSA. Se añadió la GluTR (200 nM) a la mezcla anterior y se inició la reacción adicionando el [¹⁴C-Glu]-tRNA₃^{Glu}. Se utilizó el sustrato en un rango de concentraciones entre 1-4 µM. Se tomaron alícuotas de 8µl de la reacción cada 1 min durante 10 min, se colocaron en papel de filtro y se cuantificaron como se describió anteriormente (Moser y col., 1999).

A partir de las curvas de progreso obtenidas para cada concentración de sustrato, se determinaron las velocidades de la reacción, la pendiente de la zona lineal. Para determinar los parámetros cinéticos K_m y V_{max} se utilizó el gráfico de Cornish-Bowden

(Eisenthal, y Cornish-Bowden, 1974), en el mismo se ubican las concentraciones de sustratos en el eje "x" (negativo) y las velocidades correspondientes en el eje "y" (positivo). Se unen los pares de valores (s; v) por una recta, la cual se extiende hacia el cuadrante positivo de ambos ejes. Para estimar los valores de V_{max} (eje "y") y K_m (eje "x") se determinaron las intersecciones de las rectas utilizando un sistema de ecuaciones y se calculó la mediana de cada serie. Para calcular la V_{max} de la GluTR sin hemo se utilizó el gráfico de Dixon (Dixon, 1953).

2.2.20 Recursos bioinformáticos

Los alineamientos de secuencias aminoacídicas de GluTR de diferentes microorganismos se realizaron utilizando los recursos disponibles en la red, descritos en la Tabla 4.

Tabla4. Recursos bioinformáticos.

Aplicación	Dirección http
Bases de datos	
NCBI	www.ncbi.nlm.nih.gov
TIGR	www.tigr.org
KEGG	www.genome.ad.jp/kegg/kegg2.html
Alineamiento de secuencias aminoacídicas	www.ebi.ac.uk/ClustalW

RESULTADOS

3.1 Características de la GluTR recombinante de *A. ferrooxidans*

3.1.1 Sobreexpresión del gen *hemA* de *A. ferrooxidans*

Teniendo en cuenta la importancia de la GluTR como un punto de regulación de la biosíntesis de hemo (Schobert y Jahn, 2001) y basándonos en los resultados obtenidos previamente en el laboratorio, que sugieren que la GluTR de *A. ferrooxidans* se regula en función de los niveles de hemo (Levicán, y col., 2007), nos propusimos estudiar la GluTR recombinante de esta bacteria. Con este objetivo se transformaron células de *E. coli* BL21 (DE3) con el plásmido pGtrAfET (Levicán, y col., 2006), que contiene el gen *hemA* clonado inmediatamente después de una secuencia que codifica para un hexapéptido de histidina. Toda la construcción está bajo el control de un promotor reconocido por la T7 RNA polimerasa que posee sitios operadores para el represor *lacI*. La inducción se realizó a 30 °C durante 3 horas después de adicionar IPTG al medio de cultivo a una concentración final de 500 µM. En la Figura 5A (carriles 2 y 3) se muestra el resultado de la inducción, se puede apreciar que se obtuvo una proteína cuya masa molecular relativa se corresponde con la esperada para la proteína de fusión (51 kDa).

3.1.2 Purificación de la GluTR recombinante

La GluTR recombinante se obtuvo en forma soluble, a diferencia de las GluTRs recombinantes de *E. coli* (Schauer, y col., 2002) y *M. tuberculosis* (Paravisi, y col.,

2009), que según se describe en la literatura se encuentran mayoritariamente en cuerpos de inclusión, lo cual ha complicado el estudio de estas proteínas.

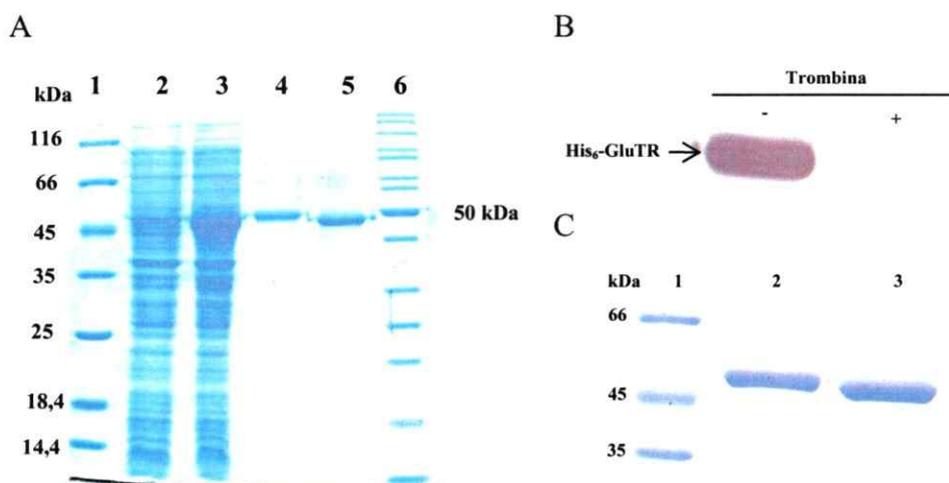


Figura 5. Electroforesis de diferentes preparaciones de GluTR. A y C, Geles de poliacrilamida al 12% teñidos con azul de Coomassie. A, 1 y 6, marcadores de masa molecular; 2 y 3, extractos de proteínas de *E.coli* BL21(DE3) transformadas con pGtrAfET antes y después de la adición de IPTG, respectivamente; 4, His₆-GluTR obtenida de la columna de Ni²⁺-Sefarosa; 5, GluTR obtenida después de la digestión con trombina. B, membrana de PVDF después de la transferencia e inmunodetección con anticuerpo primario anti-(His)₆. C, 1, marcador de masa molecular; 2, GluTR-His₆; 3, Δ21NH₂GluTR-His₆.

La proteína de fusión (His₆-GluTR) se purificó mediante cromatografía de afinidad, obteniéndose preparaciones homogéneas según el análisis mediante SDS-PAGE (Figura 5A, carril 4). La concentración de proteína de las preparaciones varió entre 5 y 6 mg/ml por cada litro de cultivo. La masa molecular calculada para la cadena polipeptídica de His₆-GluTR a partir de la secuencia nucleotídica se corroboró mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF), obteniéndose 50.489 ± 10 Da.

Para eliminar el hexapéptido de histidina se realizó una digestión de la proteína de fusión con trombina durante toda la noche a 4 °C y posteriormente se recromatografió para eliminar cualquier remanente de proteína sin digerir y los hexapéptidos de histidina. Como resultado se obtuvo una preparación de GluTR, cuya masa molecular relativa (48 kDa) coincidió con la esperada para este caso (Figura 5A, carril 5). Se verificó el procedimiento mediante inmunodetección con anticuerpos anti-(His)₆, detectándose sólo una pequeña cantidad de la proteína de fusión remanente en la preparación (Figura 5B).

Adicionalmente se obtuvo una proteína de fusión con el hexapéptido de His en el extremo carboxilo terminal (GluTR-His₆) como resultado del clonamiento del gen *hemA* en los sitios NheI y XhoI del plásmido pET-21b. Se realizó el procedimiento de inducción y purificación descrito anteriormente y se obtuvieron preparaciones solubles y homogéneas de GluTR-His₆, según refleja el análisis por SDS-PAGE (Figura 5C, carril 2).

3.1.3 Actividad enzimática de la GluTR

Se ha reportado en la literatura que como consecuencia de la sobreexpresión del gen *hemA* aumenta el contenido de hemo en las células de *E.coli* y éstas adquieren un color pardo-rojizo (Wang y col., 1997; Paravisi y col. 2009). Esta característica se ha empleado para obtener hemoproteínas recombinantes en su forma holoproteica al cotransformar en la cepa de *E. coli* un plásmido auxiliar con el gen *hemA* (Harnastai y col., 2006). Teniendo en cuenta esto podemos considerar que el color rojo, que adquieren las células de *E.coli* al sobreexpresar el gen que codifica para la GluTR, es un primer indicio de que la enzima es activa *in vivo*. En la Figura 6 se muestra que al

inducir la GluTR de *A. ferrooxidans* se obtiene un resultado similar al descrito, lo que corrobora la identidad del gen sobreexpresado.

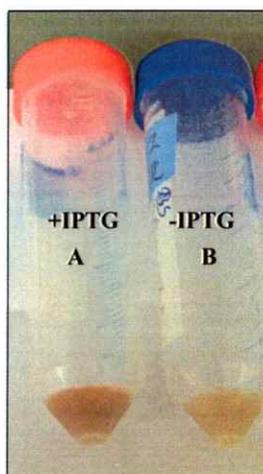


Figura 6. Células de *E. coli* transformadas con el plásmido pGtrAfET. A, células colectadas después de tres horas de inducción con IPTG. B, células colectadas sin adicionar IPTG.

La actividad enzimática *in vitro* de la GluTR se determinó mediante el ensayo de desacilación del $[^{14}\text{C-Glu}]\text{-tRNA}_3^{\text{Glu}}$ descrito por Moser, y col. (1999). Para esto se obtuvo el $\text{tRNA}_3^{\text{Glu}}$ por transcripción *in vitro* y posteriormente se aminoaciló con glutamato radiactivo $[^{14}\text{C-Glu}]$, en una reacción catalizada por la GluRS1. Se separó el producto de la reacción de la mezcla mediante precipitación con etanol, el precipitado se suspendió en 10 mM de acetato de sodio pH 5 y se cuantificó el $[^{14}\text{C-Glu}]\text{-tRNA}_3^{\text{Glu}}$ usando un contador de centelleo. La reacción de desacilación se llevó a cabo con 1,7 μM de sustrato y 200 nM de enzima. En todos los experimentos se hizo un control sin la proteína, debido a la hidrólisis química del $\text{Glu-tRNA}_3^{\text{Glu}}$.

Las curvas de progreso obtenidas en los ensayos de desacilación se muestran en la Figura 7. Se observa que las tres preparaciones de GluTR son activas, lo cual nos permitió continuar trabajando con las proteínas de fusión. Se aprecia que la hidrólisis del sustrato sin enzima es mucho más lenta que la reacción catalizada, obteniéndose una disminución del 10% en la concentración de $[^{14}\text{C-Glu}]\text{-tRNA}_3^{\text{Glu}}$ después de 15 min.

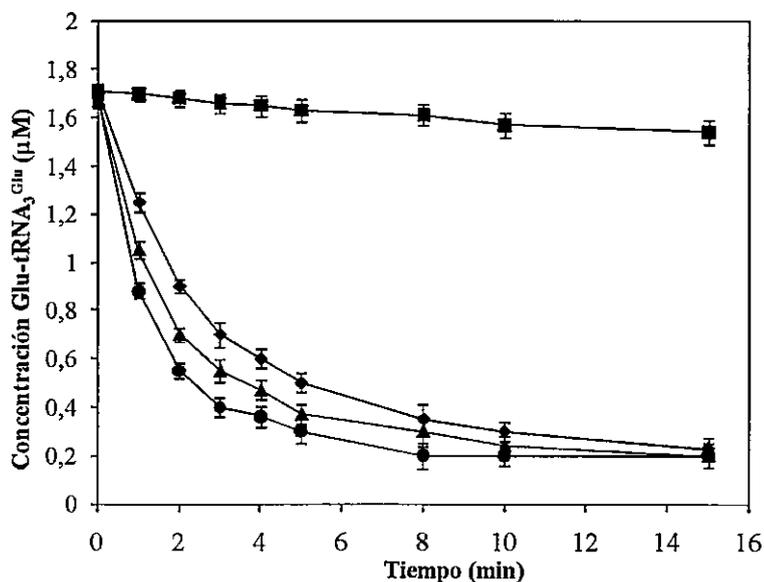


Figura 7. Ensayos de actividad enzimática de diferentes preparaciones de GluTR. Curvas de progreso de los ensayos de desacilación de $[^{14}\text{C-Glu}]\text{-tRNA}_3^{\text{Glu}}$ ($1,7 \mu\text{M}$) catalizados por GluTR (◆), His₆-GluTR (●) y GluTR-His₆ (▲) y en los tres casos se empleó 200 nM de enzima. Reacción sin enzima (■). En los gráficos cada punto representado es el promedio de tres experimentos independientes y la desviación estándar.

3.1.4 Características espectroscópicas de la GluTR

Al purificar las proteínas de fusión apreciamos que éstas son de color pardo-rojizo, color que se mantiene después de la digestión con trombina. Teniendo en cuenta que existen antecedentes de dos GluTRs de bacterias que unen hemo (Srivastava y Beale, 2005;

Paravisi, y col., 2009), se registraron los espectros de absorción UV-visible. En la Figura 8A se muestran los espectros de absorción en la región visible de las formas oxidada y reducida del hemo de la His₆-GluTR. La forma oxidada posee un máximo en 422 nm (banda γ o Soret) y una banda ancha en 540 nm. La reducción del hemo con ditionito de sodio provoca un leve corrimiento de la banda γ hacia 424 nm y un aumento en la intensidad de la misma, resultados que se corresponden con los descritos en la literatura para otras hemoproteínas (Mahler y Cordes, 1961). Además se pueden apreciar dos bandas de menor intensidad en 529 y 558 nm conocidas como bandas β y α respectivamente. Según se describe en la literatura este patrón de señales es característico de complejos de hemo hexacoordinados de bajo espín (Igarashi, y col. 2008). Este mismo patrón de señales se obtuvo para las formas oxidada y reducida del hemo de la GluTR y la GluTR-His₆ (Tabla 5).

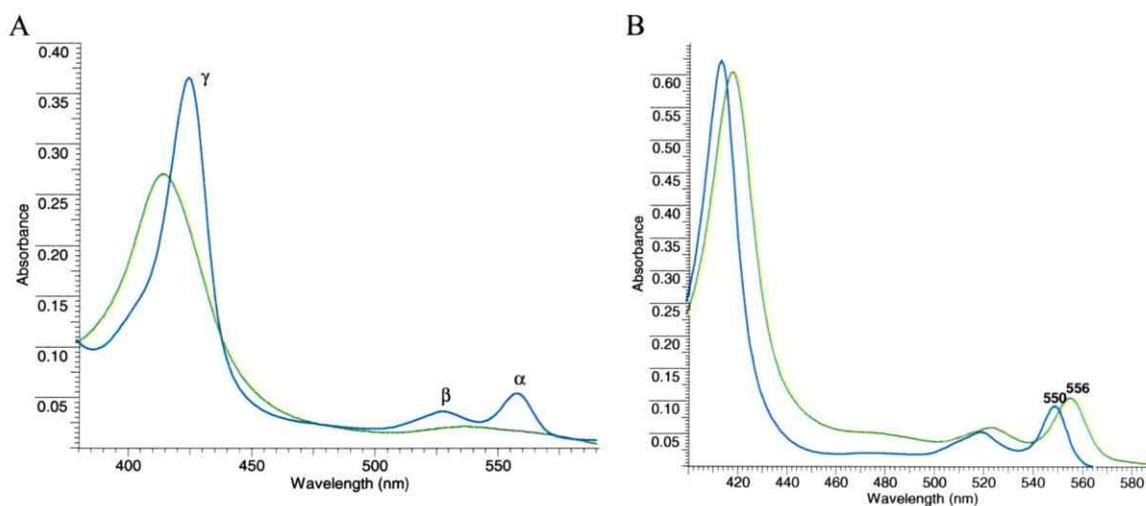


Figura 8. Espectros de absorción en la región visible del hemo unido a la GluTR. A, espectros de las formas oxidada (línea verde) y reducida (línea azul) del hemo. B, espectros de la forma reducida de los derivados de piridina de His₆-GluTR (línea verde) y citocromo-*c* (línea azul), en ambos casos el número sobre el gráfico señala la longitud de onda de la banda α . Para la reducción del hemo se empleó ditionito de sodio.

Tabla 5. Máximos de absorción (nm) de diferentes preparaciones de la GluTR.

Proteínas	Fe ³⁺		Fe ²⁺		
	Soret	α/β	Soret	β	α
His ₆ -GluTR	422	540	424	529	558
GluTR-His ₆	420	539	425	528	558
GluTR	423	539	424	529	557
$\Delta 21\text{NH}_2/\text{GluTR-His}_6$	421	540	425	529	558

Para determinar el tipo de hemo unido a la GluTR se obtuvieron los derivados de piridina en medio alcalino de las diferentes preparaciones de la proteína y se registraron los espectros de los mismos en la zona visible. Según se reporta en la literatura la posición de la banda α de dichos derivados indica el tipo de hemo que se encuentra unido a la proteína. Para el hemo *c* dicha banda aparece en los 550 nm y para el *b* en 556 nm (Berry y Trumpower, 1987). En la Figura 8B se muestran los espectros de los derivados de piridina reducidos de la His₆-GluTR y del citocromo-*c*, usado como control. La banda α en 556 nm de la GluTR indica que el hemo unido es de tipo *b*, el cual no se encuentra enlazado covalentemente a la proteína. Este mismo experimento se realizó con todas las preparaciones de GluTR obteniéndose resultados similares.

3.1.5 Determinación de la masa molecular nativa de la GluTR

Con el objetivo de determinar la masa molecular nativa de la GluTR se realizaron experimentos de filtración en gel, usando una columna de Superdex 200HR previamente calibrada con patrones de masa molecular conocida. El volumen de exclusión (9 ml) se determinó con azul dextrano. Los cromatogramas obtenidos se adjuntan en el Anexo 1, en ellos se puede apreciar que coincide la forma de los perfiles al medir la absorbancia a

420 nm y a 280 nm, lo cual nos sugiere que la unión del hemo a la GluTR es estable en estas condiciones.

En la Figura 9 y la Tabla 6 se muestran las masas moleculares relativas de cada una de las preparaciones de GluTR. Estos datos, en conjunto con la masa molecular relativa de la GluTR obtenida por SDS-PAGE y ESM, sugieren que la enzima estaría compuesta por la asociación de tres cadenas polipeptídicas. Mediante el análisis por SDS-PAGE de las fracciones obtenidas después de la cromatografía en gel se verificó que en todos los casos el oligómero está formado solamente por GluTR.

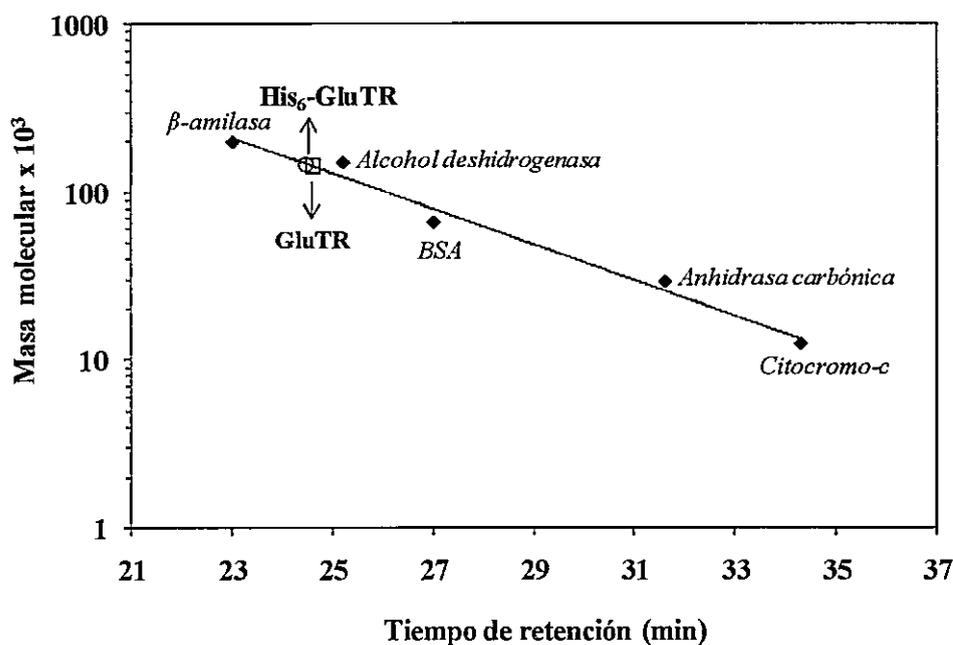


Figura 9. Masa molecular relativa de la GluTR en estado nativo. Se muestra la curva de calibración de la columna de Superdex 200HR, obtenida con los patrones de masa molecular señalados, y la ubicación en la misma de His₆-GluTR (○) y GluTR (□). En el gráfico los puntos son el promedio de dos experimentos independientes y la curva se construyó mediante regresión lineal ($R^2=0,9822$).

Tabla 6. Masas moleculares relativas de diferentes preparaciones de GluTR.

Proteínas	Masa molecular relativa nativa \pm d.e (kDa)	Masa molecular relativa \pm d.e (kDa) (SDS-PAGE)
His ₆ -GluTR	148 \pm 1	51 \pm 2
GluTR	140 \pm 1	49 \pm 2
GluTR-His ₆	140 \pm 1	49 \pm 2
Δ 21NH ₂ /GluTR-His ₆	131 \pm 1	47 \pm 2

d.e: desviación estándar

Con el objetivo de determinar el estado de oligomerización de la GluTR se realizaron experimentos de entrecruzamiento con glutaraldehído de la His₆-GluTR. En la Figura 10 se muestran los resultados obtenidos. Se aprecia que al aumentar la concentración de glutaraldehído en la reacción, aumenta la forma dimérica (104 kDa) de la GluTR y disminuye la forma monomérica (51 kDa).

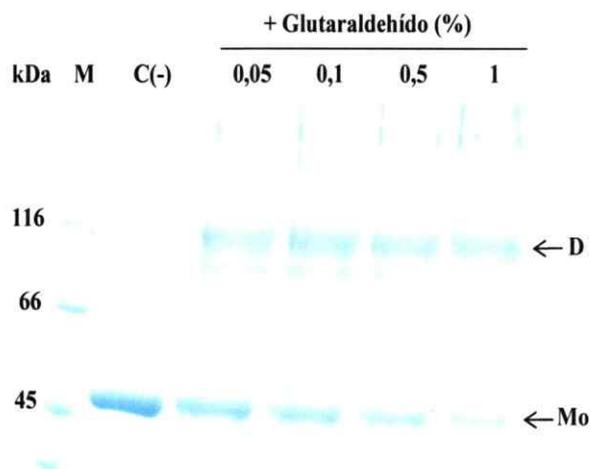


Figura 10. Reacción de entrecruzamiento de la GluTR. Gel de poliacrilamida al 8% (SDS-PAGE), teñido con azul de Coomassie, donde se muestran los resultados de las reacciones de entrecruzamiento con diferentes concentraciones de glutaraldehído de la His₆-GluTR. M, marcador de masa molecular; C(-), control sin agente entrecruzante. Se señalan el dímero (D) y el monómero (Mo).

Teniendo en cuenta los resultados de los experimentos de entrecruzamiento que sugieren que la GluTR es un dímero, se puede argumentar que las características hidrodinámicas de la enzima hacen que el tiempo de retención en la columna de filtración en gel no coincida con el esperado para dicha forma. Estos resultados se corresponden con los reportados para las enzimas de *E. coli* y *M. kandleri* (Moser, y col, 1999).

3.2 Efecto de los primeros 21 aminoácidos de la GluTR en la unión de hemo y en la actividad

Al hacer un análisis bioinformático de comparación de la secuencia de aminoácidos de la GluTR de *A. ferrooxidans*, deducida de la secuencia de DNA, con la de otros microorganismos de las que existen reportes experimentales (Figura 11), una de las diferencias más notables es que la proteína de *A. ferrooxidans* posee 21 aminoácidos en su extremo amino terminal que no se encuentran presentes en la estructura primaria de las otras enzimas. Actualmente no conocemos si la proteína *in vivo* posee este fragmento adicional. Dentro de este péptido se encuentra un posible sitio de unión de hemo del tipo HRM, donde se destaca el dipéptido Cys-Pro, que es la secuencia más conservada de éste, según se describe en la literatura (Guarente y Zhang, 1995). Se puede apreciar además que la mayor proporción de aminoácidos conservados entre las GluTRs se encuentra en el extremo amino terminal, región en la cual están el dominio catalítico y el de unión al NADPH, según se ha descrito para la proteína de *M. kandleri*; mientras que en el extremo carboxilo terminal está el dominio de dimerización (Moser, y col., 1999).

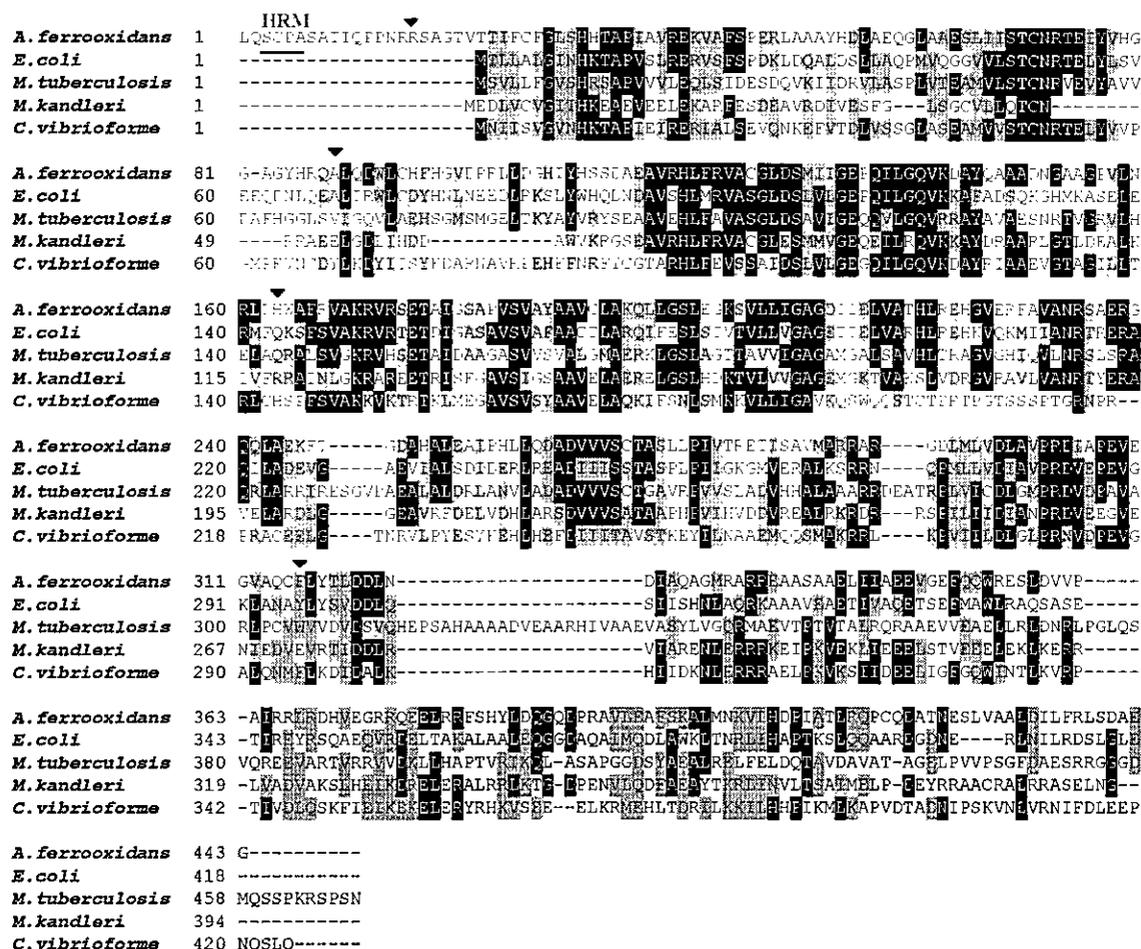


Figura 11. Alineamiento múltiple de las secuencias aminoacídicas de GluTRs de diferentes microorganismos. El alineamiento se realizó utilizando ClustalW, se adquirieron las secuencias desde las bases de datos NCBI y KEGG y se utilizó BioEdit para generar el gráfico. Se destacan en negro los aminoácidos idénticos y en gris los similares. Se encuentra subrayado el posible sitio HRM de unión para hemo y con triángulos las mutaciones de la GluTR357M.

Con el objetivo de determinar la importancia de los 21 aminoácidos iniciales de la GluTR de *A. ferrooxidans* para la unión de hemo y para la actividad de la enzima se clonó en el plásmido pET-21b una variante trunca del gen *hemA*, que carecía de la secuencia nucleotídica codificante para el péptido. Para esto se amplificó mediante PCR

el fragmento de 1278pb que codifica para dicha mutante trunca, utilizando un partididor directo que se alineó a partir del nucleótido 64 de la secuencia anotada para el gen *hemA*. En la Figura 12 se muestra el producto de PCR obtenido que coincide con el tamaño esperado. Al finalizar el proceso de clonación se corroboró la identidad de la mutante mediante la secuenciación del plásmido $\Delta 21\text{NH}_2\text{GluTR}/\text{pET-21b}$.

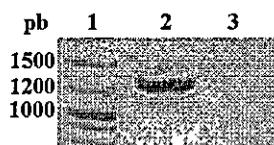


Figura 12. Producto de PCR que codifica para la mutante $\Delta 21\text{NH}_2\text{GluTR}$. Electroforesis en gel de agarosa al 1% para analizar el producto de PCR que contiene el gen que codifica para la mutante trunca $\Delta 21\text{NH}_2\text{GluTR}$. 1, marcador de masa molecular (100 pb); 2, producto de amplificación; 3, control negativo de la reacción de PCR.

Para obtener la proteína mutante $\Delta 21\text{NH}_2\text{GluTR-His}_6$ se realizaron los mismos procedimientos de inducción y purificación descritos anteriormente, obteniéndose una preparación soluble y homogénea, según refleja el análisis por SDS-PAGE (Figura 5C carril 2). La proteína $\Delta 21\text{NH}_2\text{GluTR-His}_6$ posee un comportamiento en los experimentos de filtración en gel similar a la proteína silvestre, ya que según los datos mostrados en la Figura 9 y en la Tabla 6, su masa molecular en estado nativo se corresponde con la esperada para un trímero. Sin embargo, el entrecruzamiento con glutaraldehído sugiere la presencia de una proteína dimérica de 95 kDa (Figura 13).

Las preparaciones de $\Delta 21\text{NH}_2\text{GluTR-His}_6$ mantuvieron el color pardo-rojizo característico de la GluTR, comprobándose la presencia de hemo al realizar los espectros de absorción UV-visible (Tabla 5). No se detectaron cambios en las posiciones de los

máximos de absorción en la región visible, lo que sugiere que en esta mutante el hemo se mantiene unido a la proteína a través del mismo tipo de ligandos que en la GluTR silvestre. Se obtuvieron los derivados de piridina reducidos de esta preparación y la posición de la banda α coincidió con la descrita para el hemo *b*. En conjunto estos datos sugieren que en la GluTR el hemo no está unido al sitio HRM encontrado dentro de los 21 aminoácidos iniciales.

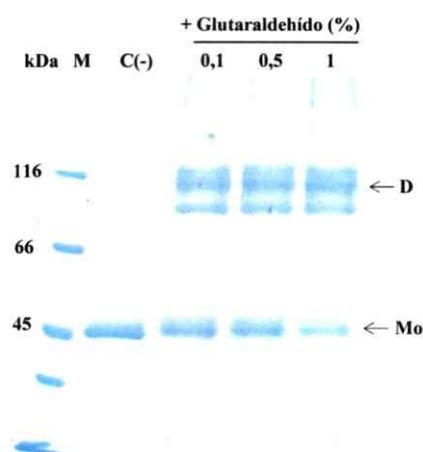


Figura 13. Reacción de entrecruzamiento de $\Delta 21\text{NH}_2\text{GluTR-His}_6$. Gel de poliacrilamida al 8% (SDS-PAGE), teñido con azul de Coomassie. Se muestran los resultados de las reacciones de entrecruzamiento con diferentes concentraciones de glutaraldehído de $\Delta 21\text{NH}_2\text{GluTR-His}_6$. M, marcador de masa molecular; C(-), control sin agente entrecruzante. Se señalan el dímero (D) y el monómero (Mo).

Para analizar el efecto del péptido inicial sobre el contenido de hemo de la GluTR, se determinó la relación hemo:proteína. Para esto se cuantificaron las proteínas mediante el método de Bradford (Bradford, 1976) y se expresaron las concentraciones teniendo en cuenta la masa molecular relativa de la cadena polipeptídica de la GluTR. El hemo se cuantificó empleando el coeficiente de extinción descrito para la banda en 419 nm de los

derivados de piridina reducidos (Srivastava y Beale, 2005) y se estableció la relación entre ambas concentraciones. Los resultados muestran la misma relación hemo:proteína de 1:4 para la His₆-GluTR, GluTR, GluTR-His₆ y $\Delta 21\text{NH}_2\text{GluTR-His}_6$, lo que sugiere que el cambio en la posición del hexapéptido de His en la proteína de fusión, la remoción del mismo y la ausencia de los 21 primeros aminoácidos de la GluTR, no ejercen ningún efecto sobre el contenido de hemo de la enzima. En conjunto estos datos indican que el hemo se une de una manera estable a la GluTR, sin que para dicha unión sea imprescindible la presencia de alguno de los elementos anteriores. La actividad enzimática de la mutante $\Delta 21\text{NH}_2\text{GluTR-His}_6$ tampoco se ve afectada por la ausencia de este péptido, según lo refleja la cinética de desacilación mostrada en la Figura 14.

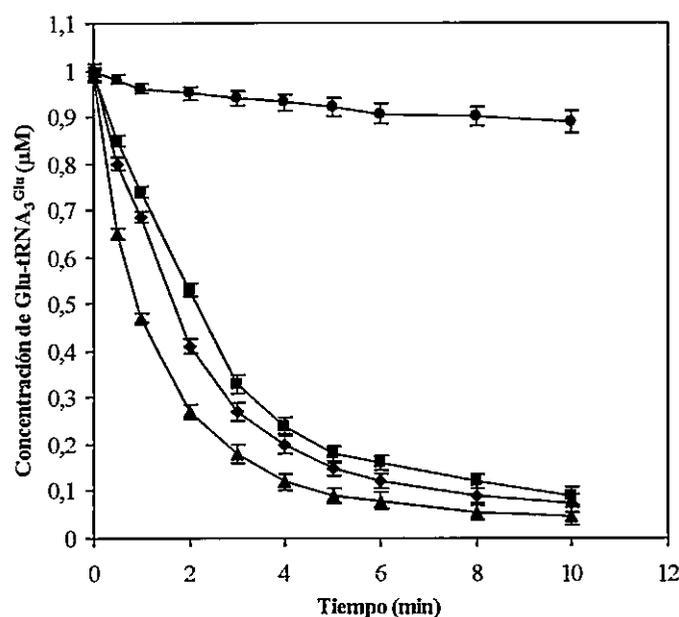


Figura 14. Ensayo de actividad enzimática de $\Delta 21\text{NH}_2\text{GluTR-His}_6$. Curvas de progreso de los ensayos de desacilación de $[^{14}\text{C-Glu}]\text{-tRNA}_3^{\text{Glu}}$ ($1 \mu\text{M}$) catalizados por His₆-GluTR (▼), $\Delta 21\text{NH}_2\text{GluTR-His}_6$ (■) y $\Delta 21\text{NH}_2\text{GluTR-His}_6$ (▲, +ortofenantrolina), en los tres casos se empleó 200 nM de enzima. Reacción sin enzima (●). En los gráficos cada punto representado es el promedio de tres experimentos independientes y la desviación estándar.

3.3 Efectos del hemo en la estructura y la actividad de la GluTR

3.3.1 Obtención de preparaciones de GluTR con diferente contenido de hemo

Con el objetivo de evaluar el efecto del hemo sobre la actividad de la GluTR se obtuvieron preparaciones de la enzima con diferente contenido de este cofactor. Para aumentar la concentración de hemo intracelular se suplementó con ALA (O'Brian y Gao, 2007), previo a la adición de IPTG, el medio de cultivo de las células de *E. coli* que contenían el plásmido pGtrAfET. Para disminuir los niveles intracelulares de hemo se siguió una metodología similar a la descrita anteriormente, pero en este caso se suplementó el medio de cultivo con ortofenantrolina. Este compuesto es un agente quelante de hierro que se usa fundamentalmente para obtener la forma apoproteica de proteínas con centros Fe-S (Saunders, y col., 2008). En este trabajo se empleó con el objetivo de disminuir los niveles de hierro disponibles para la síntesis de hemo y de esta forma disminuir el contenido de hemo de las células.

En la Figura 15 se muestran las curvas de crecimiento de las células de *E. coli* que se sometieron a los tratamientos anteriores; además se muestra un control sin aditivos. El crecimiento de las células suplementadas con ALA no exhibe diferencias con relación a las células control. Sin embargo, al adicionar ortofenantrolina al medio, se aprecia un ligero retardo en el crecimiento, hecho esperado debido a la importancia del hierro para el metabolismo aeróbico de la bacteria. Otra observación interesante es que las células crecidas con ALA se tornaron más rojas, mientras que las células crecidas con ortofenantrolina adquirieron una coloración mucho más clara que el control, lo cual fue un indicador importante de que estos compuestos ejercían el efecto requerido para el experimento.

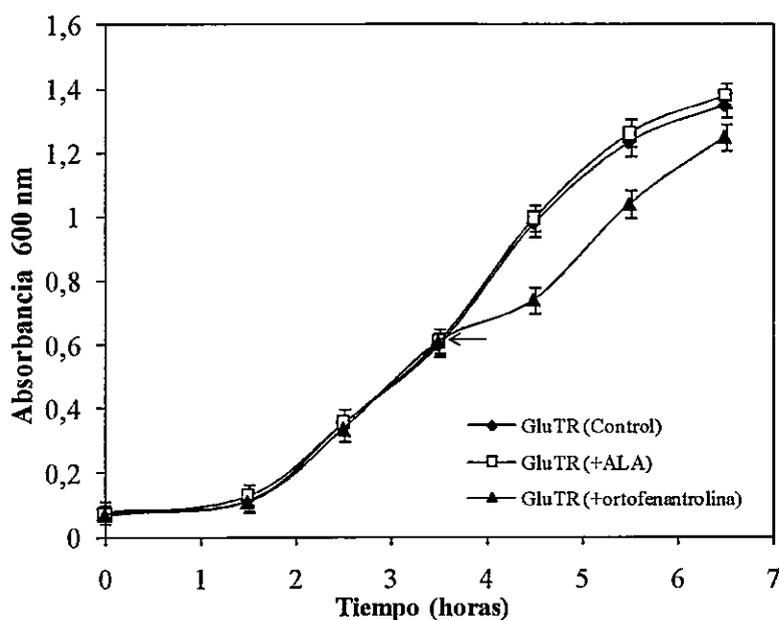


Figura 15. Efecto del ALA y de la ortofenantrolina sobre el crecimiento de *E. coli* BL21(DE3). Se muestran las curvas de crecimiento de células de *E. coli* BL21(DE3) transformadas con el plásmido pGtrAfET y suplementadas con ALA u ortofenantrolina. Se señala con una flecha el momento de adición de ALA u ortofenantrolina. En los gráficos cada punto representa el promedio de tres réplicas del experimento y la desviación estándar.

Las proteínas de fusión obtenidas desde cada uno de estos cultivos se purificaron siguiendo el protocolo descrito con anterioridad y se determinó la relación hemo:proteína. Los resultados se muestran en la Tabla 7 e indican que el contenido de hemo de la GluTR está determinado por los niveles del propio cofactor en las células. El mismo tipo de experimento, pero solamente usando ortofenantrolina, se realizó con la mutante $\Delta 21\text{NH}_2\text{GluTR-His}_6$, obteniéndose resultados similares a los de la GluTR silvestre. De esta forma, en presencia de ortofenantrolina se obtuvo una relación hemo:GluTR de 1:12; en cambio, al agregar ALA al medio, se obtiene una relación 1:2.

Teniendo en cuenta que las relaciones anteriores están expresadas en función de la masa molecular de una cadena polipeptídica de GluTR, estos datos sugieren que en la preparación obtenida desde células crecidas en presencia de ALA hay una molécula de hemo por cada dímero de GluTR.

Tabla 7. Relación hemo:proteína de diferentes preparaciones de GluTR.

GluTR (aditivo del medio de cultivo)	Relación hemo:GluTR*
His ₆ -GluTR (+ortofenantrolina)	1:12
His ₆ -GluTR	1:4
His ₆ -GluTR (+ALA)	1:2
Δ 21NH ₂ GluTR-His ₆ (+ortofenantrolina)	1:12
Δ 21NH ₂ GluTR-His ₆	1:4

*relaciones expresadas en función de la masa molecular de la GluTR monomérica

3.3.2 Efecto del hemo sobre el estado de oligomerización de la GluTR

Con el objetivo de determinar el efecto del hemo sobre el estado de oligomerización de la GluTR se realizaron experimentos de filtración en gel, usando una columna de Superdex 200HR previamente calibrada con patrones de masa molecular conocida. Los perfiles cromatográficos obtenidos se adjuntan en el Anexo 1, y en la Tabla 8 se muestran las masas moleculares relativas de cada una de las preparaciones de GluTR con diferente contenido de hemo. La GluTR con menor contenido de hemo (1:12) tiene una masa molecular relativa de 151,5 kDa mientras que la proteína con más hemo (1:2) posee 140 kDa.

Tabla 8. Masas moleculares relativas de GluTRs con diferente contenido de hemo.

GluTR (relación hemo:proteína)	Masa molecular relativa nativa \pm d.e (kDa)
His ₆ -GluTR (1:12)	151,5 \pm 1
His ₆ -GluTR (1:4)	148 \pm 1
His ₆ -GluTR (1:2)	140 \pm 1

Para corroborar los datos anteriores se realizaron experimentos de entrecruzamiento con glutaraldehído de las GluTRs obtenidas en presencia de ortofenantrolina y de ALA (Figura 16). En ambos casos se observa la forma dimérica de la GluTR, lo cual nos sugiere que la unión de hemo no cambia el estado de oligomerización de la proteína.

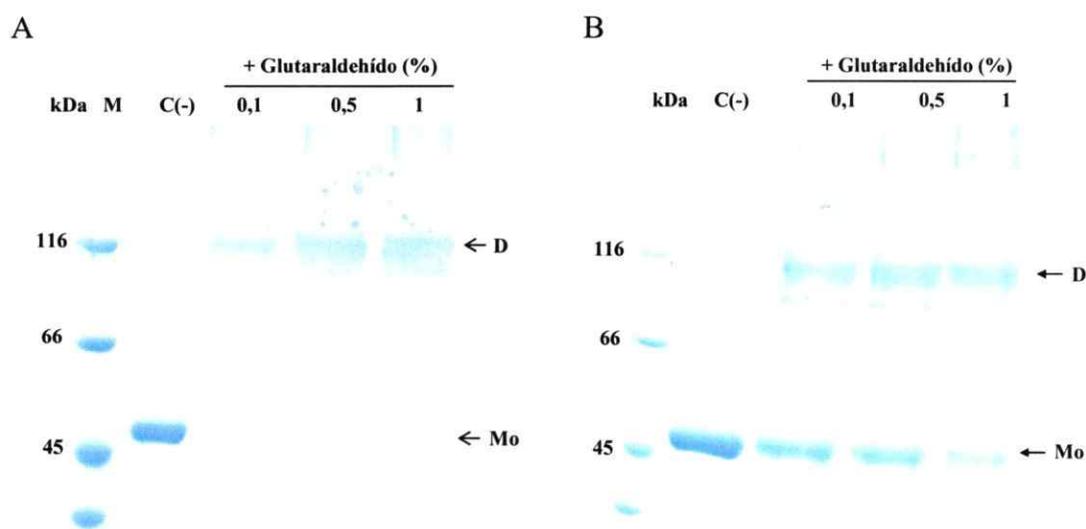


Figura 16. Reacción de entrecruzamiento de preparaciones de GluTR con diferente contenido de hemo. Se muestran 2 geles de poliacrilamida al 8% (SDS-PAGE), teñidos con azul de Coomassie, con los resultados de las reacciones de entrecruzamiento con diferentes concentraciones de glutaraldehído de dos preparaciones de GluTR. A, His₆-GluTR(+ortofenantrolina) y B, His₆-GluTR(+ALA). M, marcador de masa molecular; C(-), control sin agente entrecruzante.

3.3.3 Efecto del hemo sobre el contenido de estructura secundaria de la GluTR

Para determinar el efecto del hemo sobre la estructura secundaria de la GluTR se registraron los espectros de dicroísmo circular de las preparaciones de GluTR con una relación hemo:proteína 1:12 y 1:2. En ambos casos se diluyeron las proteínas en 20 mM de fosfato de sodio pH 8 para obtener una concentración final de $2,5 \mu\text{M}$ y se registraron los espectros después de 1 y 2 horas de incubación a temperatura ambiente. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 17.

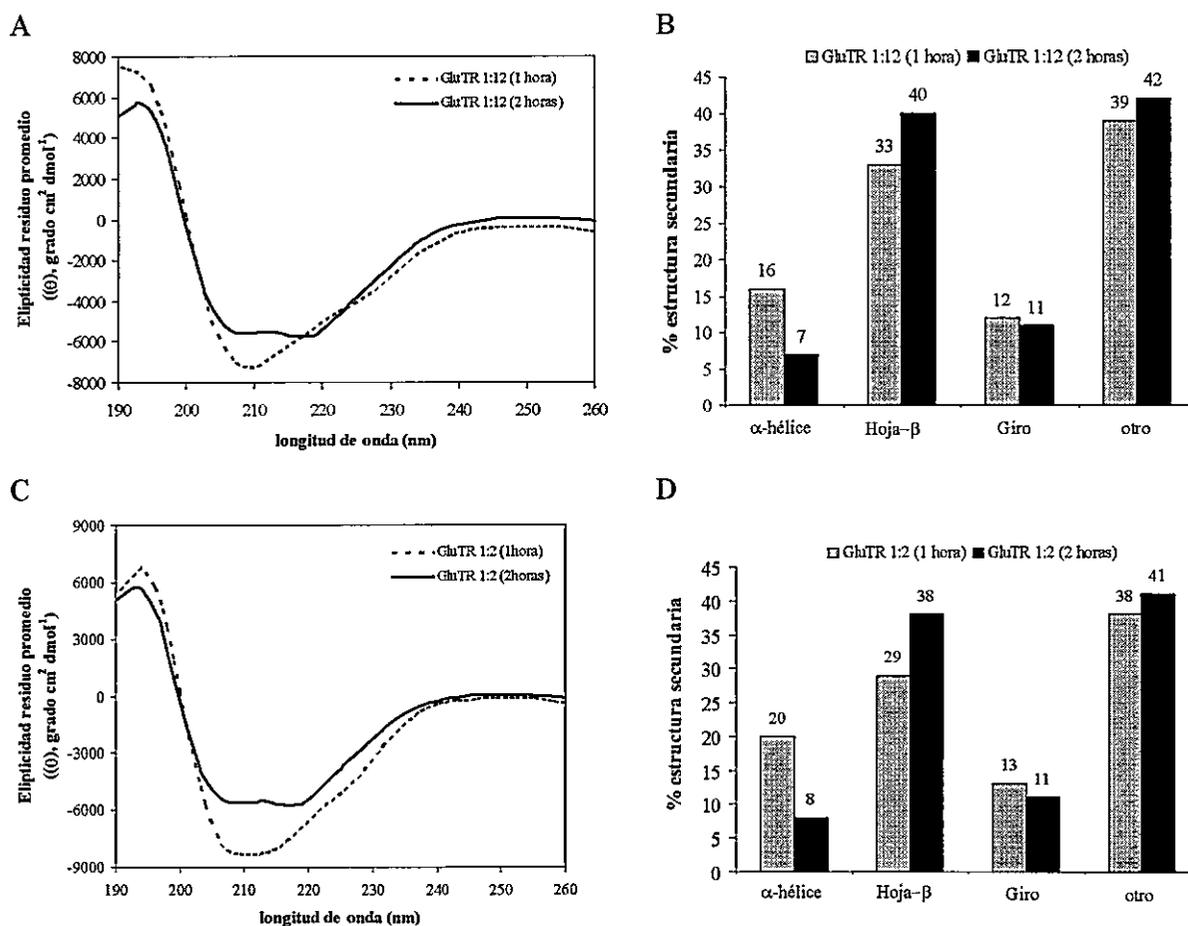


Figura 17: Espectros de dicroísmo circular de preparaciones de GluTR con diferente contenido de hemo. A, espectros de dicroísmo circular de GluTR ($2,5 \mu\text{M}$) 1:12 incubada 1 y 2 horas. B, cuantificación de estructura secundaria de GluTR 1:12. C, espectros de dicroísmo circular de GluTR ($2,5 \mu\text{M}$) 1:2 incubada 1 y 2 horas. D, cuantificación de estructura secundaria de GluTR 1:2.

Para ambas proteínas se puede apreciar que hay un efecto del tiempo de incubación en el contenido de estructura secundaria. A las dos horas hay una disminución del contenido de α -hélice y un aumento del contenido de hoja- β y de estructuras al azar. Estos cambios pueden deberse a que el sistema aún no ha alcanzado el equilibrio o a que las proteínas están perdiendo su estructura. Para analizar con mayor profundidad esto sería necesario realizar experimentos aumentando el tiempo de incubación.

El análisis de los datos de cuantificación de estructura secundaria para ambas proteínas indica que el aumento del hemo unido a la GluTR provoca un pequeño aumento del contenido de α -hélice, que se correlaciona con una disminución en igual proporción del contenido de hoja- β (Figura 18). Estos resultados sugieren que la unión de hemo provoca pequeños cambios en el contenido de estructura secundaria de la GluTR, lo cual se podría correlacionar con las pequeñas diferencias observadas en las masas moleculares relativas de las proteínas nativas, obtenidas en los experimentos de filtración en gel.

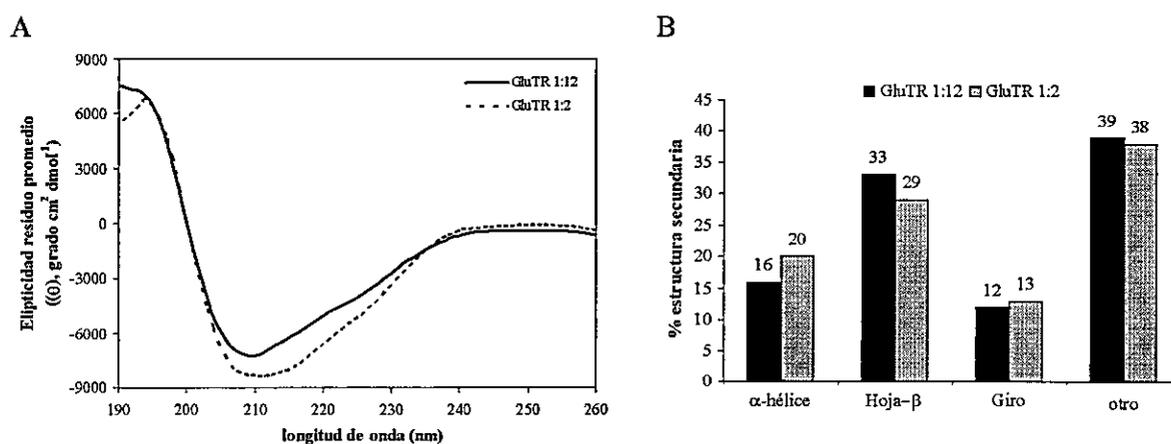


Figura 18: Comparación de los espectros de dicroísmo circular de preparaciones de GluTR con diferente contenido de hemo. A, espectros de dicroísmo circular de GluTR (2,5 μ M) 1:12 y GluTR (2,5 μ M) 1:2, ambas incubadas 1 hora. B, cuantificación de estructura secundaria de GluTR 1:2 y GluTR 1:12.

3.3.4 Efecto del hemo sobre la actividad de la GluTR

En la Figura 19 se muestran las cinéticas de los ensayos de desacilación catalizados por las tres preparaciones de GluTR que difieren en su contenido de hemo.

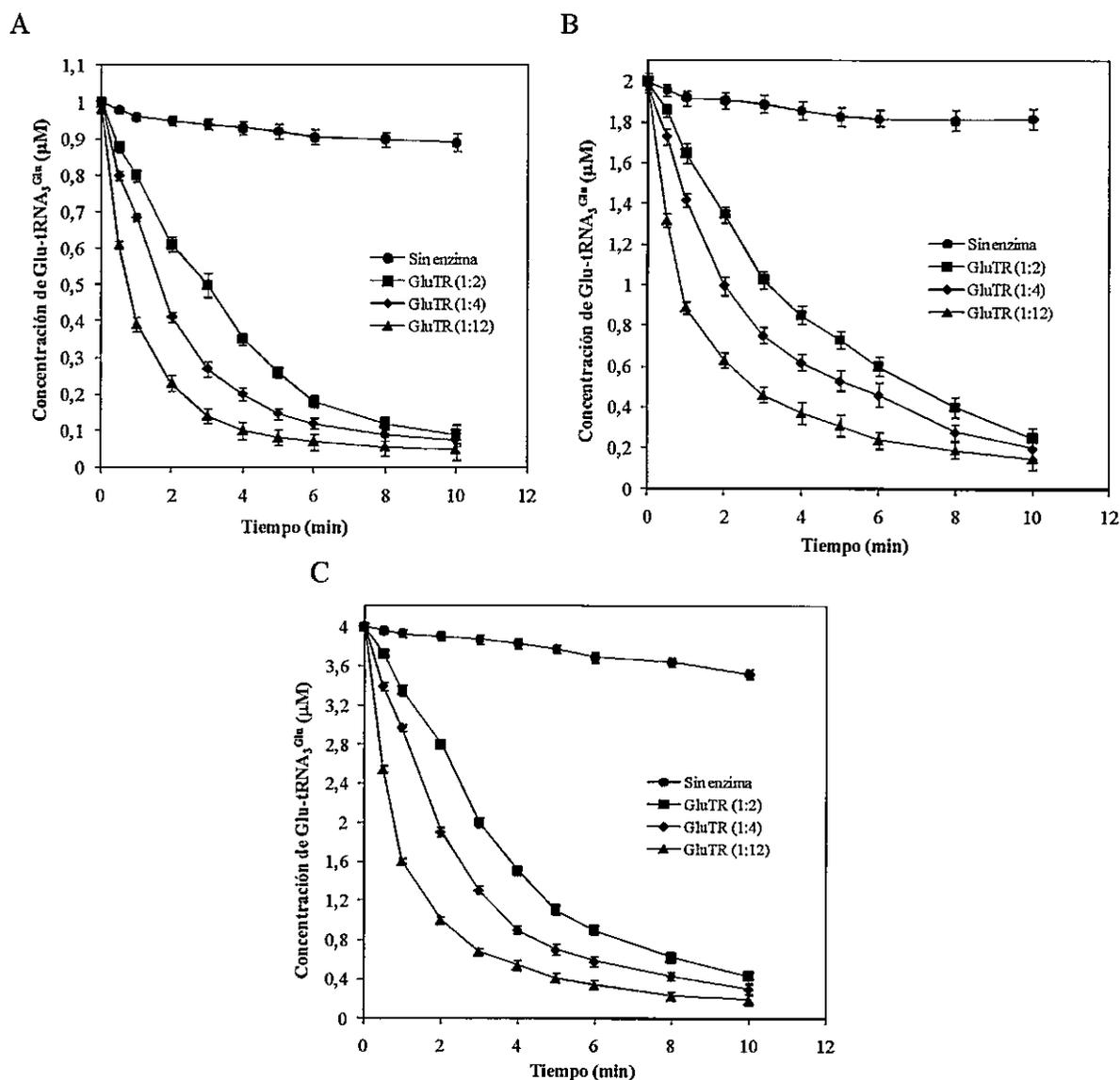


Figura 19. Ensayos de actividad enzimática de GluTRs con diferente contenido de hemo. Se muestran las cinéticas de desacilación de [¹⁴C-Glu]-tRNA₃^{Glu} catalizadas por His₆-GluTR(1:2, ■), His₆-GluTR (1:4, ◆) y His₆-GluTR (1:12, ▲). A, [¹⁴C-Glu]-tRNA₃^{Glu} (1 µM); B, [¹⁴C-Glu]-tRNA₃^{Glu} (2 µM); C, [¹⁴C-Glu]-tRNA₃^{Glu} (4 µM). En todos los casos se utilizó una concentración de proteína de 200 nM. Se realizó un control sin enzima (●) y cada punto del gráfico refleja el promedio de tres experimentos independientes y la desviación estándar.

Las curvas de progreso se realizaron empleando tres concentraciones de [^{14}C -Glu]-tRNA $_3^{\text{Glu}}$ (1; 2 y 4 μM) y 200 nM de cada enzima. Debido a las dificultades inherentes a la obtención del [^{14}C -Glu]-tRNA $_3^{\text{Glu}}$ sólo se pudieron utilizar las concentraciones antes mencionadas para estos experimentos. A partir de los datos de las curvas de progreso se determinó la velocidad de la reacción, la pendiente de la zona lineal de los gráficos, para cada concentración de sustrato.

En la Tabla 9 se muestran los valores, en porcentaje, de la actividad enzimática de cada una de las preparaciones de GluTR con diferente contenido de hemo. Considerando la actividad de la enzima con menos hemo unido (GluTR, 1:12) como el 100%, se puede apreciar que el aumento del hemo provoca una pérdida del 49% de la actividad enzimática en la GluTR con una relación hemo/proteína de 1:4 y del 69% en la GluTR con una relación 1:2.

Tabla 9. Parámetros cinéticos aparentes de GluTRs con diferente contenido de hemo.

GluTR (relación hemo/proteína)	% de actividad enzimática	Glu-tRNA $^{\text{Glu}}$	
		$K_m^{\text{ap}} \pm \text{d.e}$ (μM)	$V_{\text{max}}^{\text{ap}} \pm \text{d.e}$ ($\mu\text{M min}^{-1}$)
GluTR (1:12)	100	$17,2 \pm 0,9$	$10,8 \pm 0,4$
GluTR (1:4)	51	$12,8 \pm 1,2$	$4,4 \pm 0,3$
GluTR (1:2)	31	$11 \pm 1,3$	$2,4 \pm 0,3$

d.e: desviación estándar

Con el objetivo de determinar el efecto del hemo sobre los parámetros cinéticos K_m y V_{max} se utilizaron los valores de velocidad obtenidos para cada concentración de sustrato para construir el gráfico de Cornish-Bowden (Eisenthal, y Cornish-Bowden, 1974) (Anexo 2). En esta representación gráfica K_m y V_{max} se corresponden con la

mediana de las intersecciones de las rectas obtenidas para cada par de valores de concentración de sustrato y velocidad. Los parámetros K_m y V_{max} aparentes (K_m^{ap} y V_{max}^{ap}) de las preparaciones de GluTR con diferente contenido de hemo se reportan como el promedio de los valores calculados para cada una de las tres determinaciones experimentales realizadas. Como se puede apreciar en la Tabla 9, la V_{max}^{ap} de la preparación de GluTR con menor contenido de hemo (1:12) es 4,5 veces mayor que la V_{max}^{ap} de la enzima con mayor contenido de hemo (1:2), lo cual sugiere que en la preparación de GluTR con mayor contenido de hemo hay una menor cantidad de enzima activa para catalizar la transformación del sustrato en producto.

Con el objetivo de estimar la V_{max} de la GluTR sin hemo se contruyó el gráfico de Dixon (Dixon, 1953), $1/V_{max}$ vs concentración de hemo (Figura 20). En esta representación la intersección de la recta obtenida con el eje "y" se corresponde con el inverso de la V_{max} . Según este análisis el valor de V_{max} calculado para la GluTR sin hemo es $57 \mu\text{M min}^{-1}$ y k_{cat} es $4,75 \text{ s}^{-1}$. La enzima de *E. coli* es hasta la fecha la única GluTR para la cual se han determinado los parámetros cinéticos, reportándose una k_{cat} para el Glu-tRNA^{Glu} de $0,13 \text{ s}^{-1}$ (Schauer, y col., 2002). En conjunto estos datos sugieren que la enzima de *A. ferrooxidans* tiene una mayor eficiencia catalítica que la de *E. coli*.

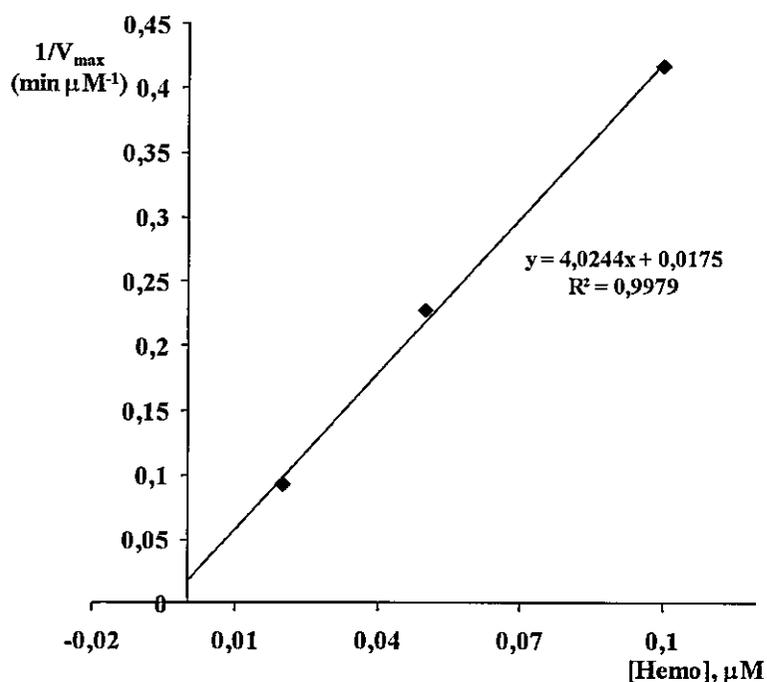


Figura 20. Gráfico de Dixon. Se muestra el gráfico de $1/V_{\max}$ vs concentración de hemo. La intersección de la recta con el eje "y", se corresponde con el inverso del valor de V_{\max} para la GluTR sin hemo.

Los datos mostrados en la Tabla 9 indican además que la unión de hemo a la GluTR provoca una disminución de la K_m . Una posible explicación para estos resultados es que al utilizar una concentración de enzima ($0,2 \mu\text{M}$) muy cercana a la concentración de sustrato ($4 \mu\text{M}$) en la expresión de la velocidad de la reacción la K_m está afectada por la concentración de enzima activa (e_0) (Ecuación 2) (Eisenthal, y Cornish-Bowden, 1974). Teniendo en cuenta que la unión de hemo disminuye la cantidad de enzima activa disponible para la catálisis, es de esperar que al aumentar el hemo unido a la GluTR disminuya la K_m^{ap} .

$$v = \frac{V(S_0 - p)}{(K_m + e_0) + (S_0 - p)}$$

Ecuación 2

Donde:

v : velocidad de la reacción	K_m : constante de Michaelis-Menten
S_0 : concentración inicial de sustrato	e_0 : concentración de enzima activa
p : concentración de producto	$K_m^{ap} = K_m + e_0$

Con el objetivo de estimar la K_m de la GluTR se construyó un gráfico de K_m^{ap} vs concentración de GluTR activa (e_0) corrigiéndose los valores de K_m^{ap} por la concentración de sustrato (Glu-tRNA^{Glu}) real que se combina con la enzima activa. Para calcular la concentración de enzima activa se emplearon las razones hemo/proteína de cada una de las preparaciones de GluTR y la concentración de enzima total utilizada en la reacción. En la Figura 21A se muestra el gráfico obtenido, en el mismo se aprecia que a medida que aumenta la concentración de enzima activa es mayor el efecto de ésta sobre la K_m , lo cual se refleja en la pérdida de la linealidad del gráfico en el punto correspondiente a la GluTR que tiene menor contenido de hemo (1:12). En la Figura 21B se muestra la recta que relaciona los valores de K_m^{ap} y $[GluTR]_{activa}$ para las preparaciones de GluTR 1:4 y 1:2, la cual se utilizó para calcular la K_m de la GluTR. Al realizar este análisis el valor de K_m calculado para la GluTR de *A. ferrooxidans* es 6,4 μ M. Este valor es 4 veces menor que el reportado para la GluTR de *E. coli*, lo que sugiere que la enzima de *A. ferrooxidans* posee una mayor afinidad por el Glu-tRNA^{Glu} que la de *E. coli*.

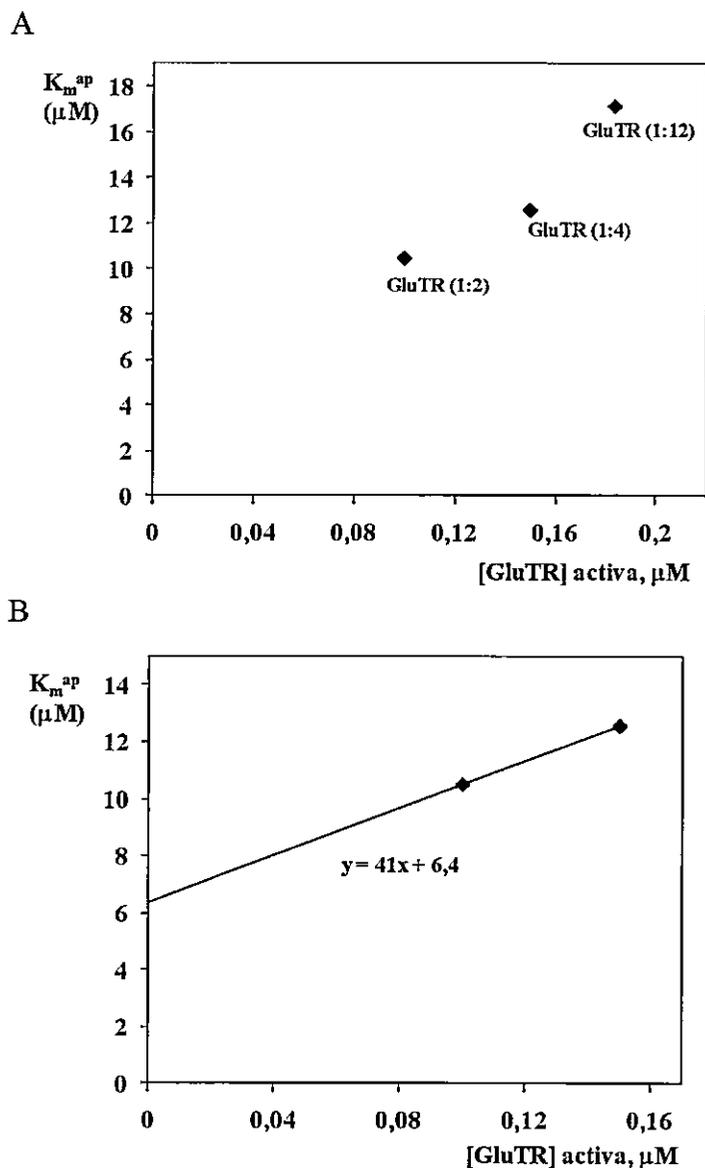


Figura 21. Gráfico de K_m^{ap} vs $[\text{GluTR}]_{\text{activa}}$. A, se muestra el gráfico de K_m^{ap} vs $[\text{GluTR}]_{\text{activa}}$ para las tres preparaciones de GluTR con diferente contenido de hemo. B, se muestra la recta que relaciona los valores de K_m^{ap} y $[\text{GluTR}]_{\text{activa}}$ de las preparaciones de GluTR con mayor contenido de hemo. La ecuación de la recta mostrada se corresponde con $K_m^{ap} = 41[\text{GluTR}]_{\text{activa}} + 6,4$, donde la intersección con el eje "y" es el valor de K_m .

3.4 Determinación del dominio de unión de hemo de la GluTR

Para determinar el dominio de unión de hemo se diseñó la mutante trunca GluTR357 que, tomando como referencia la estructura propuesta por Moser y col. (2001) para la GluTR de *M. kandleri*, comprende los dominios catalíticos y de unión al NADPH, así como una parte de la α -hélice que conecta estos dominios con el extremo carboxilo terminal, (Figuras 3A y 4). Para obtener dicha mutante se amplificó mediante PCR el fragmento de 1083 pb correspondiente, incluyéndose en la secuencia del oligonucleótido inverso un codón de parada (Figura 22). Al finalizar el proceso de clonación, se corroboró la identidad de la mutante mediante la secuenciación del plásmido GluTR357/pET-15b.

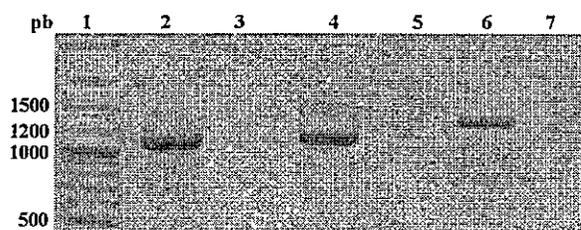


Figura 22. Productos de PCR que codifican para las mutantes truncas de la GluTR. Electroforesis en gel de agarosa al 1% para analizar los productos de PCR que contienen los genes que codifican para las mutantes truncas de la GluTR. 1, marcador de masa molecular (100 pb); 2, GluTR357; 4, GluTR392; 6, GluTR426; 3, 5 y 7, controles negativos de las reacciones de PCR.

Como resultado de la secuenciación del plásmido GluTR357/pET-15b se identificó, además de la construcción esperada, un segundo plásmido con 4 mutaciones puntuales (GluTR357-R16H/A88T/H163D/F316C/pET-15b). Con el objetivo de abordar el efecto de estas cuatro mutaciones puntuales sobre la unión de hemo y la actividad de la GluTR

se realizaron experimentos en paralelo usando ambos plásmidos. Se obtuvieron las proteínas de fusión His₆-GluTR357 e His₆-GluTR357-R16H/A88/H163D/F316C (His₆-GluTR357m) siguiendo los mismos procedimientos de inducción y purificación descritos anteriormente. Las preparaciones resultantes de ambas proteínas fueron solubles y homogéneas, según refleja el análisis por SDS-PAGE (Figura 23A y B, carril 2).

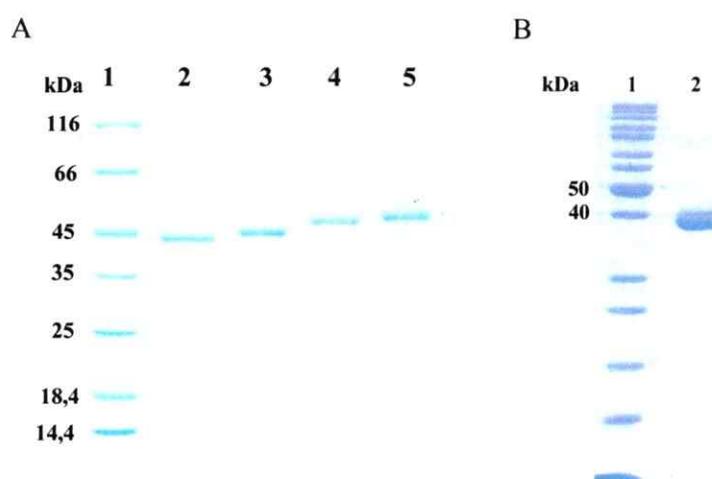


Figura 23. Geles de poliacrilamida con las mutantes truncas de la GluTR. Se muestran dos geles de poliacrilamida al 12% (SDS-PAGE) teñidos con azul de Coomassie. A, 1, marcador de masa molecular; 2, His₆-GluTR357; 3, His₆-GluTR392; 4, His₆-GluTR426; 5, His₆-GluTR. B, 1, marcador de masa molecular y 2, His₆-GluTR357m.

Las masas moleculares relativas obtenidas mediante filtración en gel indican que ambas mutantes se encuentran mayoritariamente en su forma monomérica, resultado esperado al no abarcar esta construcción el dominio de dimerización (Figura 24, Tabla 10).

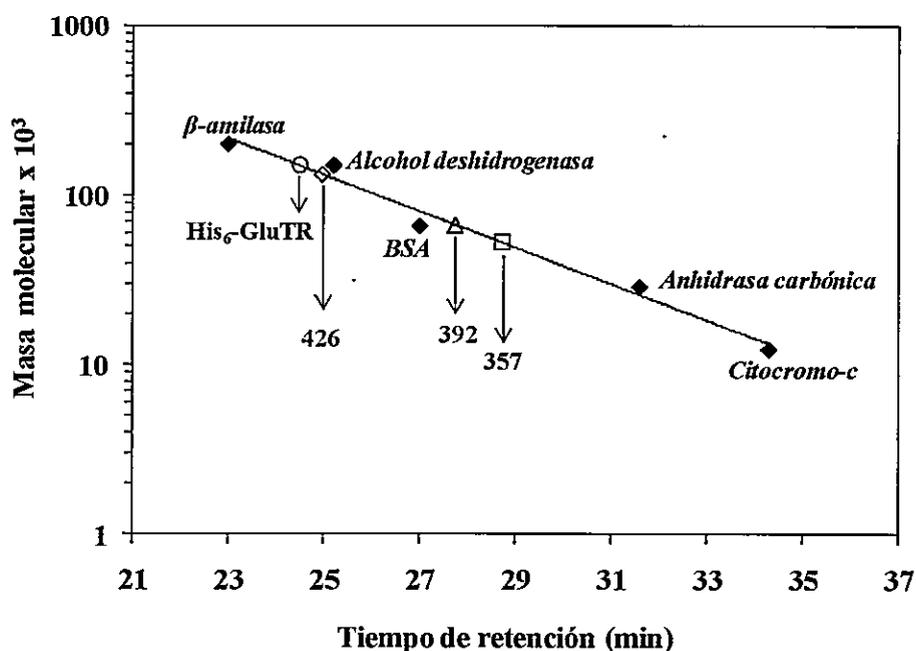


Figura 24. Masa molecular relativa de las mutantes truncas de la GluTR. Se muestra la curva de calibración de la columna de Superdex 200HR obtenida con los patrones de masa molecular señalados y la ubicación en la misma de la His₆-GluTR (○), His₆-GluTR426 (◇), His₆-GluTR392 (△) e His₆-GluTR357 (□). En el gráfico los puntos son el promedio de dos experimentos independientes y la curva se construyó mediante regresión lineal ($R^2=0,9822$).

Tabla 10. Masas moleculares relativas de las mutantes truncas de la GluTR.

Mutantes truncas de la GluTR	Masa molecular relativa nativa \pm d.e (kDa)	Masa molecular relativa \pm d.e (SDS-PAGE) (kDa)
His ₆ -GluTR37	52 \pm 1	42 \pm 2
His ₆ -GluTR357m	56 \pm 1	42 \pm 2
His ₆ -GluTR392	66 \pm 1	45 \pm 2
His ₆ -GluTR426	131 \pm 1	48 \pm 2

d.e: desviación estándar

La reacción de entrecruzamiento con glutaraldehído de la mutante 357 corrobora los resultados anteriores, ya que como se muestra en la Figura 25A no se aprecian cambios en la relación monómero:dímero al aumentar las concentraciones de glutaraldehído. Sin

embargo, aparecen agregados de alta masa molecular, lo cual coincide con lo observado en el perfil cromatográfico de la misma (Anexo 1) y además se aprecia una pequeña cantidad de dímero. Esto último puede deberse a que dentro de los 357 residuos que comprende esta mutante trunca hay un pequeño fragmento del dominio de dimerización.

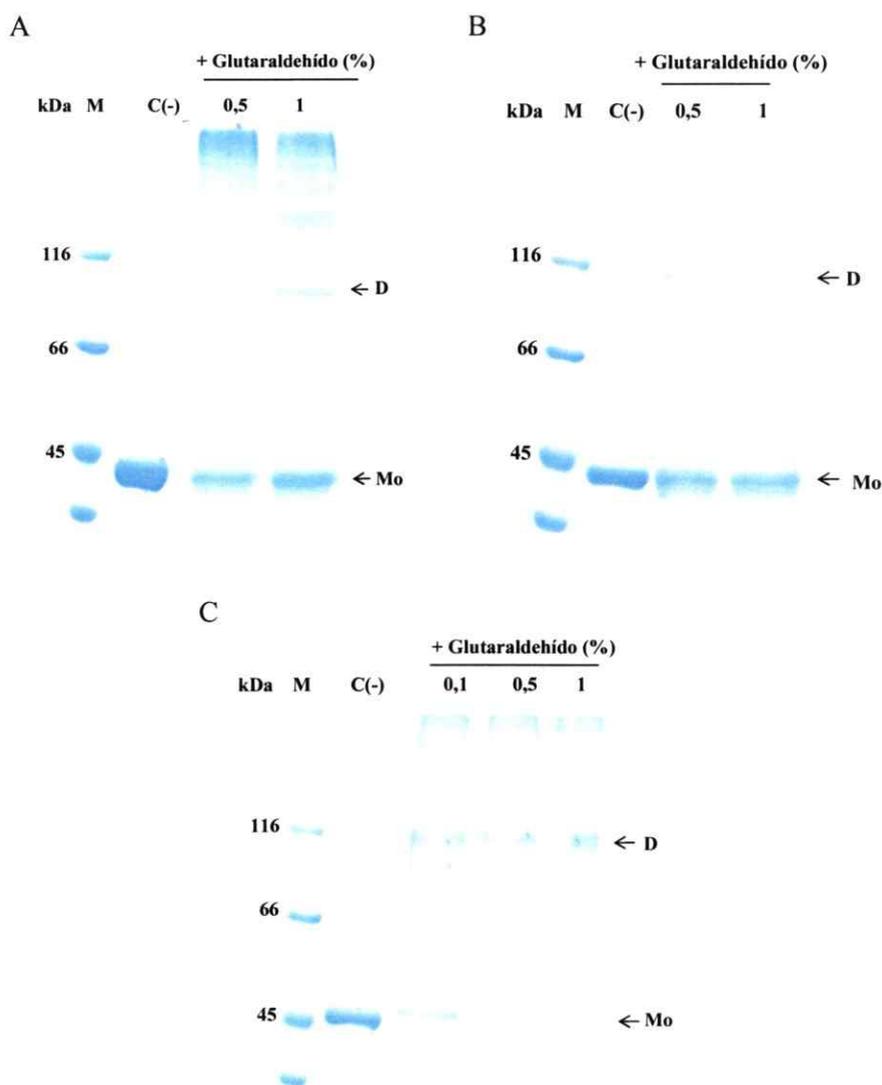


Figura 25. Reacción de entrecruzamiento de las mutantes truncas de la GluTR. Se muestran 3 geles de poliacrilamida al 8% (SDS-PAGE), teñidos con azul de Coomassie, con los resultados de las reacciones de entrecruzamiento con diferentes concentraciones de glutaraldehído de tres mutantes truncas de la GluTR. A, His₆-GluTR357; B, His₆-GluTR392; C, His₆-GluTR426. M, marcador de masa molecular; C(-), control sin agente entrecruzante.

Para detectar la presencia de hemo unido a la GluTR357 se realizaron los espectros UV-visible. Según los resultados mostrados en la Tabla 11, se obtuvieron las señales características del hemo. Sin embargo, en el espectro de la forma oxidada se evidencia un corrimiento de los máximos de absorción hacia menores longitudes de onda en comparación con los máximos obtenidos para la forma oxidada del hemo unido a la GluTR silvestre. Estos resultados podrían sugerir que hay un cambio en los ligandos implicados en la formación del complejo entre el hemo oxidado y la GluTR357. Como resultado de la reducción con ditionito de sodio se obtuvo un espectro del hemo unido a la GluTR357 cuyas señales se encuentran en las mismas posiciones que las de la GluTR silvestre, lo cual sugiere que con la reducción del hierro hemínico se produce la restauración de los ligandos del hemo.

Tabla 11. Características espectroscópicas y relación hemo:proteína de las mutantes truncas de la GluTR.

Mutantes truncas de la GluTR	Fe ³⁺		Fe ²⁺			Relación hemo:proteína
	Soret	α/β	Soret	β	α	
His ₆ -GluTR357	410	529	423	528	557	1:10
His ₆ -GluTR357m	410	530	422	528	558	1:24
His ₆ -GluTR392	423	539	423	530	557	1:6
His ₆ -GluTR426	420	540	423	529	558	1:4

Los espectros UV-Visible de la mutante His₆-GluTR357m indican que también une hemo pero se diferencia de la His₆-GluTR357 en la proporción en que une dicho cofactor. El contenido de hemo de ambas mutantes aparece en la Tabla 11 y las diferencias entre ellas pueden deberse al efecto de las mutaciones de la His₆-GluTR357m sobre la estructura secundaria y/o terciaria de la proteína. Ambas mutantes

unen hemo, lo que sugiere que dentro de estos 357 aminoácidos hay un sitio de unión para el cofactor. Sin embargo, el contenido de hemo de ambas es menor que el de la GluTR silvestre (1:4), lo que indica que el dominio carboxilo terminal está ejerciendo algún efecto en la unión del hemo, ya sea proporcionando una mayor estabilidad para el complejo o creando un nuevo sitio con diferente afinidad.

En la Figura 26 se muestran las cinéticas de desacilación catalizadas por cada una de las mutantes GluTR357; como se observa, ninguna de las dos variantes es activa. Se realizaron además cinéticas aumentando la concentración de enzima y se obtuvieron los mismos resultados. Esto sugiere que la presencia del dominio de dimerización es relevante para la actividad de la enzima.

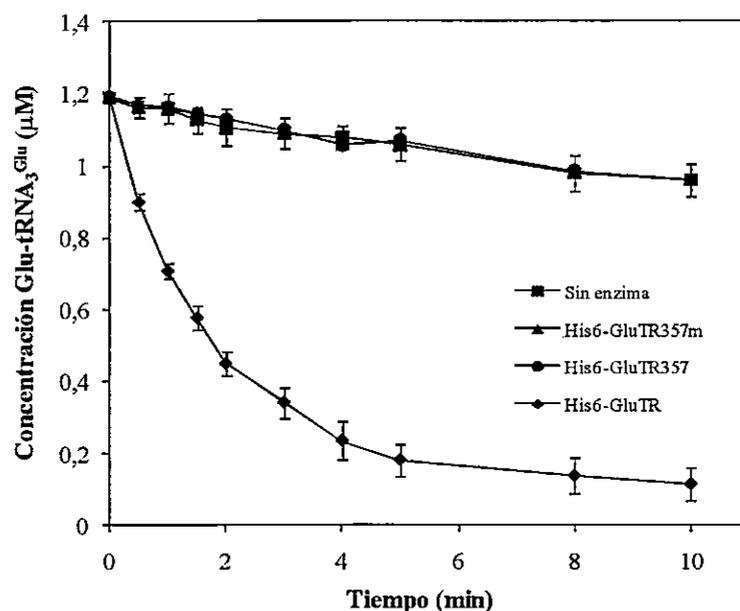


Figura 26. Ensayos de actividad enzimática de las mutantes trucas His₆-GluTR357 e His₆-GluTR357m. Se muestran las cinéticas de desacilación de [¹⁴C-Glu]-tRNA₃^{Glu} (1,2 µM) catalizadas por His₆-GluTR357(●), His₆-GluTR357m (▲) e His₆-GluTR (◆). En todos los casos se utilizó una concentración de proteína de 200 nM. Se realizó un control sin enzima (■) y cada punto del gráfico refleja el promedio de tres experimentos independientes y la desviación estándar.

3.5 Efecto del dominio de dimerización sobre la actividad y la unión de hemo

Con el objetivo de determinar el efecto del dominio de dimerización sobre la actividad y la unión de hemo se diseñaron las mutantes truncas 392 y 426, que incluyen respectivamente un 50% y un 80% de dicho dominio (Figura 4). Para obtener estas mutantes se amplificaron mediante PCR los fragmentos de 1188 pb y 1290 pb correspondientes, incluyéndose en la secuencia de los oligonucleótidos inversos un codón de parada (Figura 22). Al finalizar el proceso de clonación se corroboró la identidad de las mutantes mediante la secuenciación de los plásmidos GluTR392/pET-15b y GluTR426/pET-15b. Se obtuvieron las proteínas de fusión His₆-GluTR392 e His₆-GluTR426 siguiendo los mismos procedimientos de inducción y purificación descritos anteriormente, obteniéndose preparaciones solubles y homogéneas de ambas proteínas, según refleja el análisis por SDS-PAGE (Figura 23, carriles 3 y 4).

En la Tabla 11 se muestran los máximos de absorción obtenidos de los espectros UV-visible para las mutantes 392 y 426, los cuales coinciden con los obtenidos para la proteína silvestre. Estos datos sugieren que los ligandos involucrados en la formación del complejo del hemo con las proteínas mutantes 392 y 426 tienen la misma naturaleza química que los que participan en la formación del complejo del hemo con la GluTR silvestre. La relación hemo:proteína obtenida para ambas mutantes se muestra en la Tabla 11. Según estos datos la GluTR392 une hemo en mayor proporción (1:6) que la mutante 357 (1:10) y la GluTR426 alcanza la misma relación (1:4) que la GluTR silvestre. En conjunto estos resultados sugieren que el fragmento del dominio carboxilo terminal, comprendido entre los aminoácidos 357 y 426, es relevante para la unión de hemo.

La masa molecular relativa de la mutante GluTR426, obtenida mediante filtración en gel fue 131 ± 1 kDa (Figura 24 y Tabla 10). Estos datos indican que para la formación completa del dímero no se requieren los 27 aminoácidos finales de la proteína. En los experimentos de entrecruzamiento con glutaraldehído de la mutante 426, que se muestran en la Figura 25C, se observa que al añadir glutaraldehído aparece una señal que se corresponde con la forma dimérica de la proteína.

Los resultados de los experimentos de entrecruzamiento de la mutante 392 (Figura 25B) y el análisis del perfil cromatográfico (Figura 27), indican que la misma se encuentra mayoritariamente en forma monomérica. La señal para hemo obtenida del perfil cromatográfico registrado a 420 nm coincide con la fracción de la proteína mutante que se encuentra en forma dimérica. Estos resultados indican que el hemo se une preferentemente al dímero, ya sea porque en esta forma existe un sitio de unión de mayor afinidad, o porque es la interacción entre ambos monómeros lo que genera el sitio de unión.

En la Figura 28 se muestran los ensayos de actividad de la GluTR392 y la GluTR426. En ambos casos se observa que estas mutantes truncas no son activas, independientemente de la concentración de proteína utilizada. Estos datos sugieren que aunque para la unión de hemo es suficiente con la presencia de un 50% del dominio de dimerización, para que la proteína sea activa, se requiere del dominio carboxilo terminal íntegro.

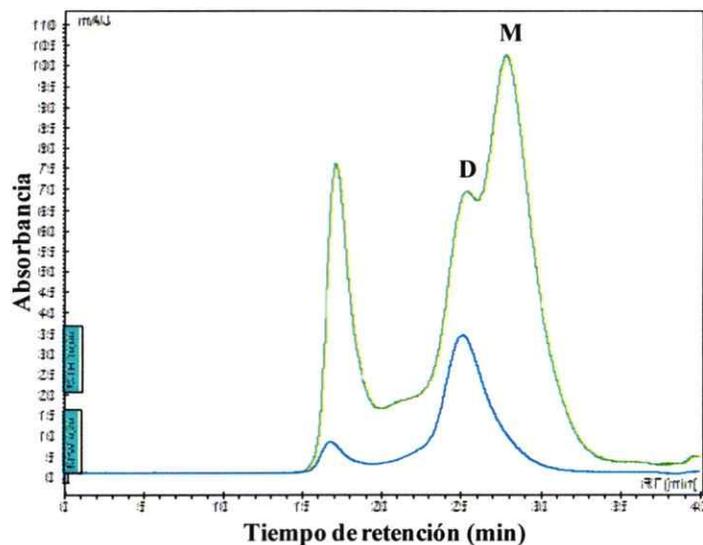


Figura 27. Perfil cromatográfico de la GluTR392. Se muestran los perfiles cromatográficos de la mutante trunca GluTR392, medidos a 280 nm (línea verde) y a 420 nm (línea azul), obtenidos de una columna de Superdex 200HR.

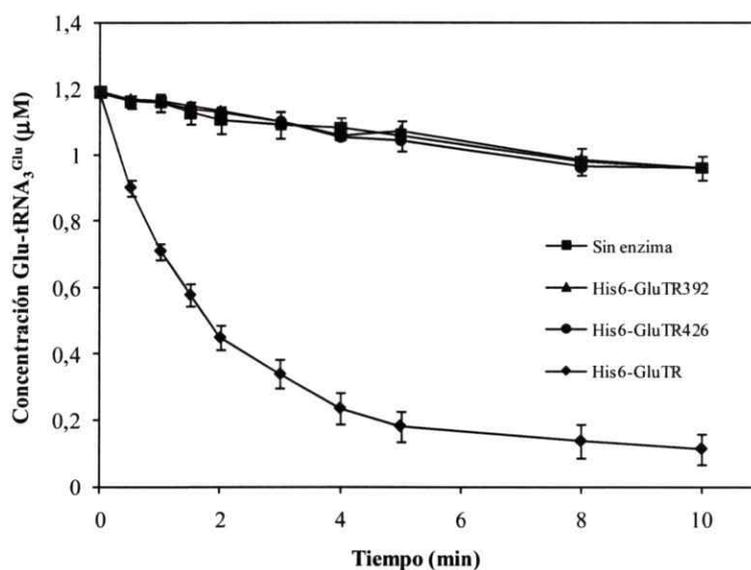


Figura 28. Ensayos de actividad enzimática de las mutantes trunca GluTR392 y 426. Se muestran las cinéticas de desacilación de $[^{14}\text{C-Glu}]\text{-tRNA}_3^{\text{Glu}}$ ($1,2 \mu\text{M}$) catalizadas por His₆-GluTR392 (\blacktriangle), His₆-GluTR426 (\bullet) e His₆-GluTR (\blacklozenge). En ambos los casos se utilizó una concentración de proteína de 200 nM. Se realizó un control sin enzima (\blacksquare) y cada punto del gráfico refleja el promedio de tres experimentos independientes y la desviación estándar.

DISCUSIÓN

4.1 Características de la GluTR recombinante de *A. ferrooxidans*

La GluTR, al ser un punto de regulación de la biosíntesis de hemo, ha sido objeto de varias investigaciones (Chen, y col.1990; Jahn, y col. 1991; Srivastava y Beale, 2005; Moser, y col., 1999; Läufer, y col., 2002). Hasta la fecha se han reportado dos GluTRs de bacterias que unen hemo, de las cuales solamente la enzima de *C. vibrioforme* es soluble, lo cual permitió su caracterización bioquímica (Srivastava y Beale, 2005). La GluTR de *M. tuberculosis* es muy poco soluble y el único dato reportado es que une hemo en una relación 1:16 (Parsivi, y col., 2009).

A. ferrooxidans es un microorganismo que regula su contenido de hemo en función de las condiciones de cultivo. Según resultados obtenidos en nuestro laboratorio, al aumentar los niveles de hemo disminuye el contenido de GluTR de las células de *A. ferrooxidans* (Levicán, y col., 2007). Al sobreexpresar el gen *hemA* de *A. ferrooxidans* en *E.coli* las células se tornan rojas, lo cual se debe al aumento del contenido de hemo como consecuencia de la actividad de la enzima. La GluTR recombinante de *A. ferrooxidans* se obtiene en forma soluble, a diferencia de las GluTRs de *E. coli* y *M. tuberculosis*, en alta concentración y es una enzima activa según los ensayos de desacilación del Glu-tRNA₃^{Glu}. Estas características hacen de esta proteína un sistema atractivo para abordar futuros estudios que complementen la información existente acerca del mecanismo enzimático y de la unión de hemo.

En 1999, Moser y col. (1999), sugirieron que la GluTR de *M. kandleri* era un tetrámero y posteriormente se propuso una estructura dimérica sobre la base de análisis cristalográficos (Moser, y col., 2001). Actualmente se plantea que las GluTRs de *E. coli* (Schauer, y col., 2002) y de *M. kandleri* (Moser, y col., 2002) son dímeros, cuyas características hidrodinámicas provocan que los tiempos de retención en columnas de filtración en gel no coincidan con los esperados para esta forma. En nuestro trabajo obtuvimos resultados muy similares para el comportamiento de la GluTR de *A. ferrooxidans* en experimentos de filtración en gel, aunque en lugar de un tetrámero la masa molecular relativa determinada mediante estos ensayos sugería que la proteína era un trímero. Al realizar experimentos de entrecruzamiento pudimos corroborar que la enzima es un dímero. Según Srivastava y Beale (2005) la enzima de *C. vibrioforme* es un monómero que dimeriza en presencia de glicerol, lo cual constituye una característica bien particular de esta GluTR. Para la GluTR de *M. tuberculosis* no se ha reportado el estado de oligomerización.

El color pardo-rojizo de las fracciones de GluTR obtenidas después de la cromatografía de afinidad nos llevó a realizar los espectros de absorción en la región visible, encontrando las bandas Soret y Q, típicas del hemo (Mahler y Cordes, 1961). Los espectros obtenidos reflejan la presencia de un complejo de hemo hexacoordinado de bajo espín, cuyas señales son muy similares a las obtenidas cuando los ligandos axiales son His/His o Cys/His (Igarashi, y col., 2008; Sasakura, y col. 2002). Teniendo en cuenta estos datos, y que en la literatura aparecen opiniones divergentes en cuanto al uso de los hexapéptidos de histidina para la producción de hemoproteínas recombinantes (Arnesano, y col., 2002; Ferguson, y col., 2003), evaluamos el efecto de estos en

nuestro sistema. Según los datos mostrados en esta tesis el hexapéptido de histidina no afecta la unión de hemo ni el contenido del mismo en la GluTR, lo cual hace más factible el trabajo con las proteínas de fusión.

La interacción entre el hemo y la GluTR es estable, al menos en las condiciones de trabajo descritas en esta tesis, ya que pudimos constatar que no hay pérdida del hemo al dializar las fracciones obtenidas después de la cromatografía de afinidad ni durante los experimentos de filtración en gel. Estos resultados son similares a los descritos para la GluTR de *C. vibrioforme* (Srivastava y Beale, 2005).

Al realizar un análisis de la secuencia aminoacídica de la GluTR no se encontró la señal -CXXHC-, característica para la unión covalente del hemo *c*, lo cual nos sugirió que éste no es el tipo de hemo presente en la GluTR recombinante de *A. ferrooxidans*. La posición de la banda α en 556 nm de los derivados de piridina de la GluTR confirmó lo anterior, indicando la presencia de hemo *b*. Para ninguna de las dos GluTRs bacterianas que unen hemo se ha reportado el tipo ni el sitio de unión para el mismo, aunque analizando la secuencia de aminoácidos de ambas proteínas no se encuentra la señal ya indicada para la unión de hemo *c*.

Según los trabajos de Moser y col. (1999) y Schauer y col. (2002), las enzimas de *E. coli* y *M. kandleri* no unen hemo, lo cual es un hecho llamativo teniendo en cuenta que comparten entre un 30 y un 40% de identidad entre sus secuencias aminoacídicas y la de las GluTRs que sí unen hemo. La explicación que sugieren Srivastava y Beale (2005) para el caso de la enzima de *M. kandleri* es que este microorganismo no sintetiza hemo. Actualmente existen varias interrogantes con relación a la biosíntesis de hemo en arqueas. Una de ellas es que aún no se han identificado los genes que codifican para las

enzimas que catalizan las últimas etapas de la biosíntesis de hemo (Panek y O'Brian, 2002). Los genomas secuenciados disponibles de estos microorganismos carecen de los genes homólogos que codifican para las enzimas que catalizan los pasos involucrados en la transformación del uroporfirinógeno III en hemo (Heinemann, y col., 2008). Según se ha reportado las archeas emplean otros tetrapirroles como la vitamina B₁₂ y la coenzima F₄₃₀ en rutas metabólicas esenciales como la metanogénesis (Ferry y Kestead, 2007). Para la ausencia de hemo en la GluTR de *E. coli* no se ha planteado ninguna explicación plausible, quizás en este caso sea importante tener en cuenta que dicha proteína es insoluble y que su caracterización bioquímica se pudo realizar empleando métodos de renaturalización y utilizando plásmidos que contienen genes que codifican para chaperonas, lo cual explica la no obtención de preparaciones con hemo (Schauer, y col., 2002).

Estos resultados; en conjunto con los trabajos que proponen un papel regulador para el hemo, no sólo con relación a su propia biosíntesis, sino dentro de un contexto metabólico más general en las células; nos impulsaron a profundizar en el efecto de esta unión sobre las propiedades de la enzima y en la búsqueda del dominio de unión.

4.2 Efecto de los primeros 21 aminoácidos de la GluTR en la unión de hemo y en la actividad de la enzima

La comparación de la secuencia aminoacídica de la GluTR de *A. ferrooxidans*, predicha de la secuencia del DNA, con la de otras GluTRs (Figura 11) indica que existen 21 aminoácidos adicionales en el extremo amino terminal de la misma. Debido a que no sabemos si la proteína *in vivo* posee este segmento extra, y teniendo en cuenta que

dentro del mismo identificamos un posible sitio de unión para hemo (HRM), evaluamos la unión de hemo y la actividad de una mutante que carece de dicho fragmento ($\Delta 21\text{NH}_2\text{GluTR-His}_6$). Los resultados obtenidos indican que el sitio HRM no está involucrado en la unión del cofactor, porque en los espectros de absorción se obtienen las mismas señales que para la proteína silvestre y no se aprecian cambios en el contenido de hemo. Además la proteína mutante $\Delta 21\text{NH}_2\text{GluTR-His}_6$ comparte características similares en cuanto a solubilidad y actividad con la GluTR silvestre. Teniendo en cuenta estos datos podemos plantear que el segmento adicional de 21 aminoácidos podría deberse a un error en la anotación del genoma de *A. ferrooxidans*, o si se encuentra en la proteína *in vivo*, pudiera ser un sitio HRM que cumple otra función, quizás es un sitio de unión adicional para hemo que se activa ante determinadas señales celulares. Se analizaron además las secuencias aminoacídicas de las enzimas de *C. vibrioforme* y *M. tuberculosis* sin que encontrásemos elementos HRM en ninguna de ellas. Estos resultados sugieren, hasta el momento, que la unión de hemo a las GluTRs podría ocurrir en un sitio diferente a los HRM, lo cual genera nuevas interrogantes, fundamentalmente en cuanto a la estructura del mismo.

4.3 Efectos del hemo en la estructura y la actividad de la GluTR

La obtención de preparaciones de GluTR con diferente contenido de hemo nos permitió evaluar el efecto de éste en las propiedades catalíticas y estructurales de la proteína. Para lograr esto se le añadió a los medios de cultivo de *E. coli* ALA, para aumentar el contenido de hemo, y ortofenantrolina, para disminuirlo. Los resultados obtenidos sugieren que la GluTR de *A. ferrooxidans* puede unir hemo en función del contenido de

éste en las células. De esta forma, al suplementar con ALA el medio, obtuvimos preparaciones de GluTR con una relación hemo:proteína (1:2), mayor que la obtenida para las condiciones normales de cultivo (1:4). El empleo de ortofenantrolina permitió obtener la enzima con una relación hemo:proteína muy pequeña (1:12). A diferencia de lo descrito para la enzima de *C. vibrioforme*, que une 1 mol de hemo por monómero (Srivastava y Beale, 2005), para la GluTR de *A. ferrooxidans* lo máximo que obtuvimos fue una relación de 1 mol de hemo por dímero al suplementar el medio de cultivo con ALA. Estos datos sugieren que ambos monómeros podrían estar participando en la formación del sitio de unión para hemo.

El aumento del contenido de hemo de la GluTR no afecta la dimerización, según los resultados obtenidos de los experimentos de filtración en gel y entrecruzamiento. Sin embargo, sí observamos una pequeña disminución en el contenido de α -hélice que se correlaciona con un aumento en el contenido de hoja- β , según el análisis de los espectros de DC. Con relación a la actividad de la GluTR se observó que el aumento del hemo provoca una disminución en la misma, específicamente el efecto del hemo se ve reflejado en una disminución de la V_{\max}^{ap} . La GluTR con menor contenido de hemo (1:12) tiene un valor de V_{\max}^{ap} 4,5 veces mayor que la GluTR con mayor contenido de hemo (1:2). Estos datos sugieren que la unión de hemo a la GluTR de *A. ferrooxidans* disminuye la cantidad de enzima activa disponible para la catálisis. La k_{cat} calculada para la GluTR de *A. ferrooxidans* es mayor que la reportada para la enzima de *E. coli*, lo que indica que la GluTR de *A. ferrooxidans* posee una mayor eficiencia catalítica. Este dato podría explicar por qué la enzima de *A. ferrooxidans* es regulada por hemo y la de *E. coli* no. Con relación al efecto del hemo sobre la actividad de la GluTR, solamente se

ha reportado que una preparación de la enzima de *C. vibrioforme* con menos hemo es más activa que la proteína que une hemo en una relación 1:1, utilizando como sustrato Glu-tRNA^{Glu} de *E. coli* (Srivastava y Beale, 2005).

4.4 Determinación del dominio de unión de hemo de la GluTR

Teniendo en cuenta que el hemo unido a la GluTR es de tipo *b*, que la unión de hemo a la mutante $\Delta 21\text{NH}_2\text{GluTR}$ descarta la participación en dicha interacción del sitio HRM identificado y que no existe ningún trabajo publicado acerca del sitio de unión de hemo para las GluTRs, nos propusimos abordar este aspecto. Para ello se diseñó una mutante trunca de la proteína que abarca los primeros 357 aminoácidos, la cual comprende los dominios catalítico, de unión a NADPH y la mitad de la α -hélice que conecta a ambos con el dominio de dimerización (Figura 4), tomando como referencia la estructura propuesta por Moser y col. (2001) para la GluTR de *M. kandleri* (Figura 3A).

La GluTR357 es una proteína soluble que se encuentra mayoritariamente en su forma monomérica, según lo indican los resultados de los experimentos de filtración en gel y entrecruzamiento. Esta mutante no es activa y une hemo en menor proporción (1:10) que la GluTR silvestre (1:4). Estos datos sugieren que la ausencia del dominio de dimerización no impide la unión de hemo, pero que hay un efecto del mismo en la cantidad del cofactor que se une a la proteína mutante. Teniendo en cuenta estos resultados, el fragmento ausente en la proteína mutante puede actuar estabilizando el complejo hemo-proteína o proporcionando un sitio de unión de diferente afinidad en la proteína silvestre. Un resultado que pudiera reflejar este último punto, es que las señales del espectro del hemo en su forma oxidada en la GluTR357 poseen un ligero corrimiento

hacia menores longitudes de onda (Tabla 11) en comparación con las señales obtenidas para la proteína silvestre, lo cual puede deberse a un cambio en los ligandos del hierro hemínico.

Otro resultado que refleja la importancia del dominio carboxilo terminal para la GluTR, es la ausencia de actividad de la mutante GluTR357. Con relación al papel de dicho dominio en la función de la GluTR sólo existe un reporte experimental de una mutante trunca de GluTR de *E. coli*, que conserva un 5% de la actividad de la proteína silvestre (Läuter, y col., 2002).

Además se logró aislar una mutante GluTR357-R16H/A88/H163D/F316C (Figura 9), la cual une hemo en menor proporción (1:24) que la GluTR357 (1:10). La primera mutación R16H se encuentra entre los primeros 21 aminoácidos, cuyo efecto se evaluó mediante el estudio de la proteína mutante $\Delta 21\text{NH}_2\text{GluTR}$. En este caso se observó que la ausencia de dicho péptido no ejerce ningún efecto sobre la unión de hemo. Teniendo en cuenta el alineamiento de las secuencia aminoacídicas de las diferentes GluTRs (Figura 11), identificamos que las mutaciones A88T y H163D se encuentran en el dominio catalítico y la F316C en el dominio de unión a NADPH, en los tres casos las sustituciones implican un cambio drástico en cuanto a las características de los aminoácidos, lo cual puede provocar alteraciones en la estructura secundaria y/o terciaria de la proteína. Un hecho llamativo es que los aminoácidos H163 y F316 se encuentran conservados en la GluTR de *C. vibrioforme*. Tratamos de independizar estas mutaciones puntuales pero no tuvimos éxito, por lo que es difícil interpretar estos resultados ya que una de ellas o todas podrían estar contribuyendo a la disminución de la afinidad de la enzima por el hemo.

4.5 Efecto del dominio de dimerización sobre la unión de hemo y la actividad

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos con la mutante GluTR357, nos propusimos abordar el efecto del dominio de dimerización en la unión de hemo y la actividad de la GluTR, mediante el análisis de dos mutantes truncas, la GluTR392 y la 426 (Figura 4). Las construcciones que dieron lugar a estas proteínas mutantes contienen secuencias nucleotídicas que codifican para diferentes porciones del dominio de dimerización. A diferencia de la proteína mutante 357, la GluTR392 posee íntegro el segmento que conecta los dominios catalítico y de unión al NADPH con el dominio carboxilo terminal. La proteína mutante 426 incluye el segmento anterior y además un fragmento adicional de 34 residuos, que según la estructura propuesta por Moser, y col. (2001) para la GluTR de *M. kandleri*, se corresponde con una segunda hélice que conforma el dominio de dimerización (Figura 3A).

La proteína mutante 392 se obtuvo mayoritariamente en forma monomérica, pero el perfil cromatográfico muestra que el hemo en dicha preparación se une únicamente a la forma dimérica de la enzima. Este resultado sugiere que en presencia de ambas formas, el hemo se une preferentemente al dímero, lo cual soporta la idea de la importancia del dominio carboxilo terminal en la oligomerización y la unión del cofactor. La mutante 426 se obtuvo completamente en forma dimérica y con la misma cantidad de hemo que la proteína silvestre, lo cual indica que para estas funciones los 27 últimos aminoácidos de la enzima son prescindibles.

En cuanto a la actividad enzimática ninguna de las dos proteínas mutantes (GluTR392 y 426) es activas, lo cual indica, que aunque se formen dímeros, la GluTR requiere para ser activa la presencia del dominio carboxilo terminal intacto. Este hecho

podría relacionarse con el modelo propuesto por Moser y col. (2001) para la formación del complejo con el Glu-tRNA^{Glu}, en el cual el dominio de dimerización está en contacto con la región del anticodón del tRNA.

4.6 El papel de la GluTR de A. ferrooxidans en la regulación de la biosíntesis de hemo

Durante varios años en nuestro laboratorio se ha abordado mediante diferentes estrategias experimentales la regulación de la biosíntesis de hemo en *A. ferrooxidans*, y uno de los aspectos más relevantes del estudio de la GluTR en dicho proceso es que hayamos identificado, asociados a un mismo microorganismo, dos efectos del hemo sobre la regulación de su biosíntesis, descritos en la literatura de forma independiente para distintas bacterias. Este planteamiento se sustenta por una parte en los resultados de esta tesis, en la cual mostramos que la GluTR recombinante une hemo *b* en función de su disponibilidad dentro de las células, y que dicha unión provoca una disminución en la actividad de la enzima, lo cual podría considerarse una estrategia de la bacteria para contrarrestar el efecto de un pequeño aumento de los niveles de hemo. Por otra parte, ante un aumento mayor del contenido de hemo la respuesta celular podría ser una disminución de los niveles de la GluTR, como ha sido descrito por Levicán y col. (2007), lo cual sería un segundo nivel en la respuesta de la bacteria. Otra manera de ver el mecanismo es considerar que tanto la disminución de la actividad como la posterior degradación son dos etapas de una misma respuesta ante un aumento del hemo intracelular. Tomados en conjunto estos hechos podrían ser un indicio de que el hemo regula su propia biosíntesis en *A. ferrooxidans* al disminuir la actividad y los niveles de la GluTR. Otro aspecto a tener en cuenta para esta hipótesis es la posibilidad de que la

GluTR posea más de un sitio de unión para el hemo, con diferente afinidad, como aparentemente lo refleja el análisis de las mutantes truncas descritas en esta tesis.

Si en este contexto consideramos además el modelo de canalización de sustrato propuesto por Moser y col. (2001) para la GluTR y la GSAM, cuyos complejos se han aislado *in vivo* (Läuer, y col., 2005), podríamos especular acerca de una conexión entre ambas etapas regulatorias. Por ejemplo, ante un aumento en la concentración intracelular de hemo, éste se uniría a la GluTR, lo cual produciría un cambio conformacional en la enzima que provocaría una disminución de su actividad y además promovería la ruptura del complejo con GSAM. Este hecho por un lado, disminuiría la velocidad de síntesis de hemo, ya que aunque se forme GSA, éste no es estable. En segundo lugar, la ruptura del complejo GluTR-GSAM puede dejar expuesta alguna secuencia en la GluTR que sea reconocida por proteasas intracelulares. Para abordar esta hipótesis sería necesario primero demostrar la formación de complejos entre la GluTR y la GSAM de *A. ferrooxidans* y si se corrobora, entonces estudiar el efecto del hemo sobre dicha interacción, lo cual deja abierta una pregunta muy interesante para el grupo de trabajo. Con relación a la interacción de la GluTR con otras proteínas también se ha propuesto la formación de un complejo con la GluRS (Jahn, y col. 1992), tema en cual se trabaja actualmente en nuestro laboratorio. Si tenemos en cuenta esta propuesta, se podría estudiar el efecto del hemo sobre la interacción entre ambas proteínas, y además, empleando las mutantes obtenidas en esta tesis investigar el papel del dominio carboxilo terminal en dicha interacción.

CONCLUSIONES

- La GluTR recombinante de *A. ferrooxidans* es una proteína dimérica, soluble y activa que une hemo *b*.
- La unión del hemo requiere de la formación de dímeros, lo cual implica que el dominio carboxilo terminal es relevante en la unión del cofactor. No se observó participación del sitio HRM en la unión de hemo.
- La presencia del dominio carboxilo terminal íntegro es imprescindible para la actividad de la enzima.
- La GluTR une hemo en función del contenido intracelular de dicho cofactor.
- La unión de hemo no repercute en el estado de oligomerización de la proteína, sin embargo sí afecta la actividad enzimática, observándose una disminución en la velocidad máxima a medida que aumenta el hemo unido a la proteína.

PROYECCIONES

Sobre la base del trabajo desarrollado en esta tesis con relación a la biosíntesis de hemo consideramos que existen dos caminos relevantes en esta investigación. El primero de ellos involucra el papel de la GluTR en la regulación de esta ruta metabólica, y el segundo está vinculado al hecho de que la GluTR es un sistema interesante y factible para abordar estudios estructurales relacionados con la unión de hemo.

Como una proyección futura consideramos que sería interesante abordar el efecto del hemo unido a la GluTR en la interacción propuesta con la GSAM y la GluRS. Si el hemo afecta de manera diferencial la interacción con estas proteínas, se generaría una nueva arista en la investigación acerca del papel del hemo como elemento regulador de su propia síntesis. En otra dirección sería relevante identificar si existe alguna proteína mediando la unión entre la GluTR y el hemo, teniendo en cuenta que cada vez hay un mayor número de trabajos publicados sobre la asignación de nuevas funciones relacionadas con el transporte del hemo dentro de las células (Tong y Guo, 2009). Por último el hecho de que la GluTR recombinante de *A. ferrooxidans* sea una proteína soluble, activa y que se obtiene en alta concentración, abre la oportunidad de abordar estudios estructurales relacionados con el mecanismo y el sitio de unión para hemo. Con relación a esto último sería relevante determinar mediante mutagénesis sitio-dirigida los aminoácidos involucrados en la unión de hemo y/o estudios estructurales de la holoenzima. El papel del dominio carboxilo terminal en la interacción con hemo abre un nuevo camino en la investigación de otras funciones de dicho dominio, no descritas hasta la fecha.

BIBLIOGRAFÍA

- Aft, R.L. and Mueller, G.C. 1984. Hemin-mediated oxidative degradation of proteins. *J. Biol. Chem.* 259: 301-305.
- Arnesano, F., Banci, L., Barker, P. D., Bertini, I., Rosato, A., Su, X. C., and Viezzoli, M. S. 2002. Solution structure and characterization of the heme chaperone CcmE. *Biochemistry* 41: 13587-13594.
- Avissar, Y. J., Ormerod, J. G., and Beale, S. I. 1989. Distribution of delta-aminolevulinic acid biosynthetic pathways among phototrophic bacterial groups. *Arch. Microbiol.* 151: 513-519.
- Barrick, D. 1994. Replacement of the proximal ligand of sperm whale myoglobin with free imidazole in the mutant His93→Gly. *Biochemistry* 33: 6546-6554.
- Beale, S. I. and Castelfranco, P. A. 1973. ¹⁴C incorporation from exogenous compounds into δ-aminolevulinic acid by greening cucumber cotyledons. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 52: 143-149.
- Berry, E. A., and Trumpower, B.L. 1987. Simultaneous determination of hemes a, b, and c from pyridine hemochrome spectra. *Anal. Biochem.* 161: 1-15.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Chen, M.W., Jahns, D., O'Neill G.P. and Söll, D. 1990. Purification of the Glutamyl-tRNA Reductase from *Chlamydomonas reinhardtii* involved in δ-aminolevulinic acid formation during Chlorophyll Biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 265: 4058-4063.
- Colmer, A.R. and Hinkel, M.E. 1947. The role of microorganisms in acid mine drainage: a preliminary report. *Science.* 106: 253-256.
- Compton, L.A. and Jonson, W.C. Jr. (1986). Analysis of protein circular dichroism spectra for secondary structure using a simple matrix multiplication. *Anal. Biochem.* 155:155-167.
- Dawson, J.H. 1998. Probing structure-function relations in heme-containing oxygenases and peroxidases. *Science.* 240: 433-439.
- Dixon, M. 1953. The Determination of Enzyme Inhibitor Constants. *Biochem. J.* 55: 170-171.
- Eisenthal, R., and Cornish-Bowden, A. 1974. The direct linear plot. A new graphical procedure for estimating enzyme kinetic parameters. *Biochem. J.* 139: 715-720.

- Ferry, J.G. and Kstead, K.A. 2007. Methanogenesis. En Cavicchioli, R. (eds), *Archea, molecular and cellular biology*. pp 135-165. ASM Press, Washington.
- Frankenberg, J., Moser, J and Jahn, D. 2003. Bacterial heme biosynthesis and its biotechnological application. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63:115-117.
- Ghigo, J. M., Letoffe, S., and Wandersman, C. 1997. A new type of hemophore-dependent heme acquisition system of *Serratia marcescens* reconstituted in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 179: 3572-3579.
- Guarente, L., and Zhang, L. 1995. Heme binds to short sequence that serves a regulatory function in diverse proteins. *EMBO J.* 14: 313-320.
- Hamza, I., Chauhan, S., Hassert, R. and O'Brian, M.R. 1998. The bacterial Irr protein is required for coordination of heme biosynthesis with iron availability. *J. Biol. Chem.* 273: 21669-21674.
- Harnastai, I.N., Gilep, A.A. and Usanov, S.A. 2006. The development of an efficient system for heterologous expression of cytochrome P450s in *Escherichia coli* using hemA gene co-expression. *Prot. Express. Purif.* 46:47-55.
- Haser, P., Pierrot, M., Frey, M., Payant, F., Astier, J.P., Bruschi, M., and Legall, J. 1979. Structure and sequence of cytochrome c3, a multi-heme cytochrome. *Nature* 282: 806-810.
- Heinemann, I. U., Jahn, M. and Jahn, D. 2008. The biochemistry of heme biosynthesis. *Arch. Biochem. Biophys.* 474: 238-251.
- Igarashi, J., Satos, A., Kitagawa, T., Yoshimura, T., Yamauchi, I.S. and Shimizu, T. 2008. Activation of heme-regulated eukaryotic initiation factor 2 α kinase by nitric oxide is induced by the formation of a five-coordinate NO-heme complex. *J. Biol. Chem.* 279: 15752-15762.
- Ilag, L. L., and Jahn, D. 1992. Activity and spectroscopic properties of the *Escherichia coli* glutamate 1-semialdehyde aminotransferase and the putative active site mutant K265R. *Biochemistry* 31: 7143-7151.
- Ilag, L. L., Jahn, D., Eggertsson, G. and Söll, D. 1991. The *Escherichia coli* hemL gene encodes glutamate 1-semialdehyde aminotransferase. *J. Bacteriol.* 173: 3408-3413.
- Imaly, J.A. 2003. Pathways of Oxidative Damage. *Annu. Rev. Microbiol.* 57: 395-418.
- Ingledeu, W. J. 1982. *Thiobacillus ferrooxidans*. The bioenergetics of an acidophilic chemolithotroph. *Biochim. Biophys. Acta* 683: 89-117.
- Ingledeu, W. J. and Cobbley, J. G. 1980. A potentiometric and kinetic study on the respiratory chain of ferrous-iron-grown *Thiobacillus ferrooxidans*. *Biochim. Biophys. Acta* 590: 141-158.
- Jahn, D., Michelsen, U., and Söll, D. 1991. Two glutamyl-tRNA reductase activities in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 266: 2542-2548.

- Jahn, D., Verkamp, E., and Söll, D. 1992. Glutamyl-transfer RNA: a precursor of heme and chlorophyll biosynthesis. *Trends. Biochem. Sci.* 17: 215-218.
- Jahn, M. J., Jahn, D., Kumar, A. M., and Söll, D. 1991. Mono Q chromatography permits recycling of DNA template and purification of RNA transcripts after T7 RNA polymerase reaction. *Nucleic Acids Res.* 19: 2786.
- Kar, A.K., Díaz-Griffero, F., Li, Y., Li, X. and Sodoroski, J. 2008. Biochemical and biophysical characterization of a chimeric TRIM21-TRM5 α protein. *J. Virol.* 82:11669-11681.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Levicán, G., Katz, A., de Armas, M., Nuñez, H., and Orellana O. 2007. Regulation of a glutamyl-tRNA synthetase by the heme status. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104: 3135-3140.
- Levicán, G., Katz, A., Valenzuela, P., Söll, D., and Orellana, O. 2005. A tRNA^{Glu} that uncouples protein and tetrapyrrole biosynthesis. *FEBS Letters* 579: 6383-6387.
- Lüer, C., Schauer, S., Mobius, K., Schulze, J., Schubert, W. D., Heinz D. W., Jahn, D., and Moser, J. 2005. Complex Formation between Glutamyl-tRNA Reductase and Glutamate-1-semialdehyde 2,1-Aminomutase in *Escherichia coli* during the Initial Reactions of Porphyrin Biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 280: 18568-18572.
- Lüer, C., Schauer, S., Virus, S., Schubert, W.D., Heinz, D.W., Moser, J., and Jahn, D. 2007. Glutamate recognition and hydride transfer by *Escherichia coli* glutamyl-tRNA reductase. *FEBS J.* 274: 4609-4614.
- Mahler, H.R. and Cordes, E.H. 1961. Hemoproteins. En Mahler, H.R. and Cordes, E.H (eds.), *Biological Chemistry*. pp 583-594. Harper International Edition, New York.
- McRee, D. E., Jensen, G. M., Fitzgerald, M. M., Siegel, H. A., and Goodin, D. B. 1994. Construction of bisquo heme enzyme and binding by exogenous ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91: 12847-12851.
- Monteiro, H.P., Bechara, E.J.H. and Abdalla, D.S.P. 1991. Free radicals involvement in neurological porphyrias and lead poisoning. *Mol. Cell. Biochem.* 103: 73-83.
- Moore, G.R., and Pettigrew, G. W. 1990. En Moore, G.R., and Pettigrew, G. W. (eds.), *Cytochromes c: Evolutionary, Structural and Physicochemical Aspects*. pp309-362. Springer Berlin.
- Moser, J., Lorenz, S., Hubschwerlen, A., Rompf, D., and Jahn, D. 1999. *Methanopyrus kandleri* Glutamyl-tRNA Reductase. *J. Biol. Chem.* 274: 30679-30685.
- Moser, J., Schubert, W. D., Beier, V., Bringemeier, I., Jahn, D., and Heinz D. W. 2001. V-shaped structure of glutamyl-tRNA reductase, the first enzyme of tRNA-dependent tetrapyrrole biosynthesis. *EMBO J.* 20: 6583-6590.

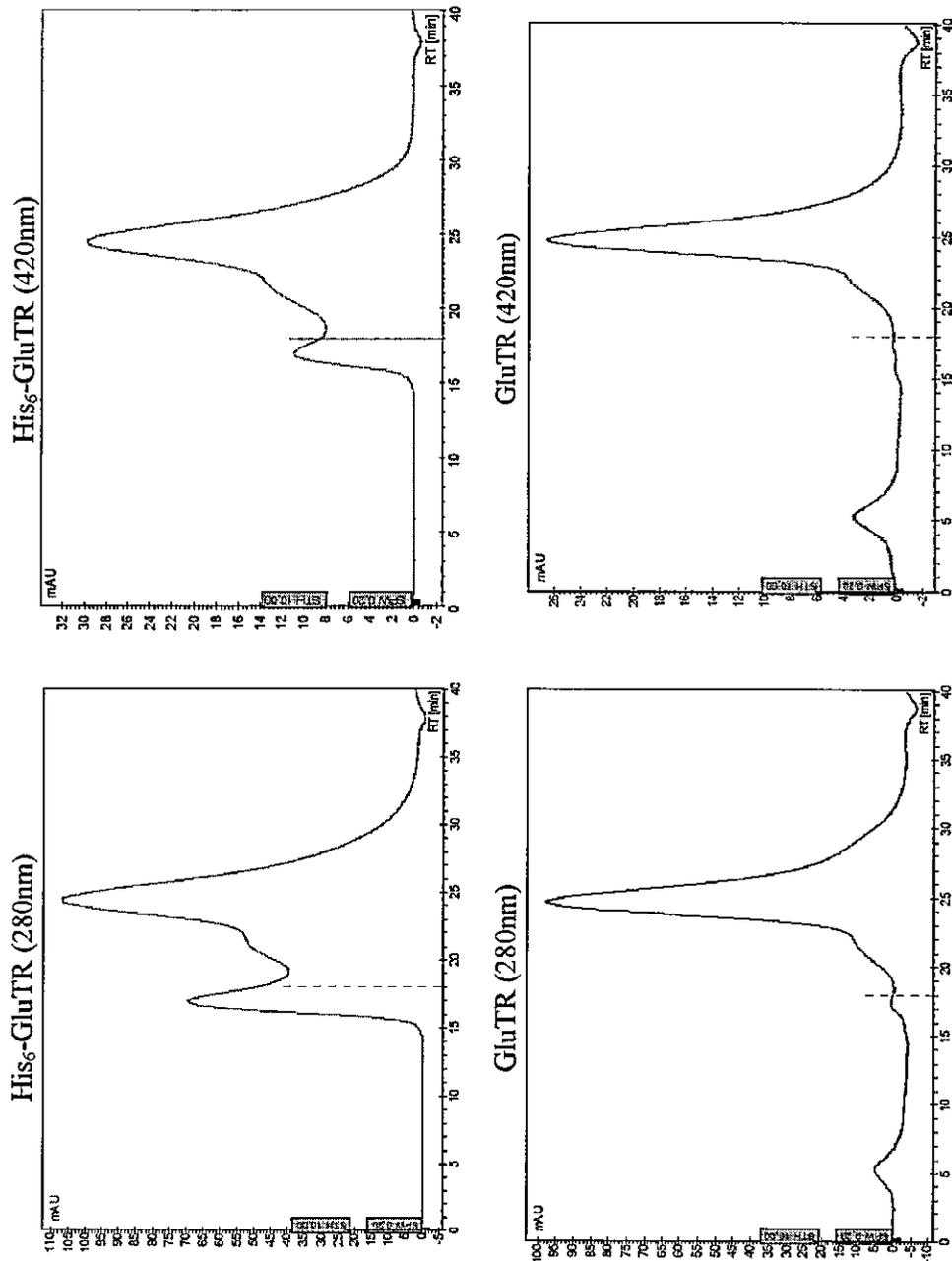
- Moser, J., Shubert, W.D., Heinz, D.W. and Jahn, D. 2002. Tetrapyrroles: Their life, birth and death. *Biochem. Soc. Trans.* 30, part 4.
- Neuberger, A., and Scott, J. J. 1953. Aminolevulinic acid and porphyrin biosynthesis. *Nature* 172: 1093-1094.
- Nogaj, L. A., and Beale, S. I. 2005. Physical and Kinetic Interactions between Glutamyl-tRNA Reductase and Glutamate-1-semialdehyde Aminotransferase of *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Biol. Chem.* 280: 24301-24307.
- O'Brian, M.R. and Thöny-Meyer, L. 2002. Biochemistry, regulation and genomics of Haem Biosynthesis in Prokaryotes. *Adv. Microb. Physiol.* 46: 258-318.
- O'Brian, M.R., and Gao, T. 2007. Control of Deg-P dependent degradation of c.type cytochrome by heme and cytochrome c maturation system in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 189: 6253-6259.
- Panek, H. and O'Brian, M. 2002. A whole genome view of prokaryotic haem biosynthesis. *Microbiology* 148:2273-2282.
- Paoli, M., Marles-Wright, J., and Smith, A. 2002. Structure-Function relationships in heme-protein. *DNA and Cell biology* 21: 271-280.
- Paravisi, S., Fumagalli, G., Riva, M., Morando, P., Morosi, R., Konarev, P.V., Petoukhov, M.V., Bernier, S., Chênevert, R., Svergun, D.I., Curti, B., and Vanoni, M.A. 2009. Kinetic and mechanistic characterization of *Mycobacterium tuberculosis* glutamyl-tRNA synthetase and determination of its oligomeric structure in solution. *FEBS J.* 276: 1398-1417.
- Perutz, M.F., Paoli, M., and Lesk, A. 1999. FixL, a haemoglobin that acts as an oxygen sensor: Signalling mechanism and structural basis of its homology with PAS domains. *Chem. Biol.* 6: 291-297.
- Perutz, M.F., Rossmann, M.G., Cullis, A.F., Muirhead, H., Will, G., and North, A.C.T. 1960. Structure of haemoglobin. *Nature* 185: 422-427.
- Quatrini, R., Appia-Ayme, C., Denis, Y., Ratouchniak, J., Veloso, F., Valdes, J., Lefimil, C., Silver, S., Roberto, F., Orellana, O., Denizot, F., Jedlicki, E., Holmes, D. and Bonnefoy, V. 2006. Insights into the iron and sulfur energetic metabolism of *Acidithiobacillus ferrooxidans* by microarray transcriptome profiling. *Hydrometallurgy* 83:263-272.
- Quatrini, R., Lefimil, C., Holmes, D. and Jedlicki, E. 2005. The ferric iron uptake (Fur) form the extreme acidophilic *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Microbiology* 151:2005-2015.
- Randau, L., Schauer, S., Ambrogelly, A., Salazar, J. C., Moser, J., Sekine, S., Yokoyama, S., Söll, D., and Jahn, D. 2004. tRNA Recognition by Glutamyl-tRNA Reductase. *J. Biol. Chem.* 279: 34931-34937.
- Rawlings, D.E., and Silver, S. 1995. Mining with microbes. *Nature Biotechnology.* 13: 773-778.

- Rawlings, D.E., Tributsch, H. and Hansford, G.S. 1999. Reasons why "Leptospirillum"-like species rather than *Thiobacillus ferrooxidans* are the dominant iron-oxidizing bacteria in many commercial processes for the biooxidation of pyrite and related ores. *Microbiology* 145: 5-13.
- Rodgers, K. R. 1999. Heme-based sensors in biological systems. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 3: 158-167.
- Salazar, J.C., Ahel, I., Orellana, O., Tumbula-Hansen, D., Krieger, R., Daniels, L. and Söll, D. 2003. Coevolution of an aminoacyl-tRNA synthetase with its tRNA substrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 100: 13863-13868.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: A laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sampson, J. R., and Uhlenbeck, O. C. 1988. Biochemical and physical characterization of an unmodified yeast phenylalanine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85: 1033-1037.
- Sasse, J., and Gallagher, S. R. 2003. Detection of proteins. Current Protocols in Molecular Biology 10.6.1-10.6.25. Copyright © 2003 by John Wiley & Sons, Inc.
- Saunders, A. H., Griffiths, A.E., Lee, K.H., Cicchillo, R.M., Tu, L., Stromberg, J.A., Krebs, C., and Booker, S.J. 2008. Characterization of Quinolate Synthases from *Escherichia coli*, *Mycobacterium tuberculosis*, and *Pyrococcus horikoshii* Indicates that [4Fe-4S] Clusters are Common Cofactors throughout This Class of Enzymes. *Biochemistry* 47: 10999-11012.
- Schauer, S., Chaturvedi, S., Randau, L., Moser, J., Kitabatake, M., Lorenz, S., Verkamp, E., Schubert, W. D., Nakayashiki, T., Murai, M., Wall, K., Thoman, H. U., Heinz D. W., Inokuchi, H., Söll, D., and Jahn, D. 2002. *Escherichia coli* Glutamyl-tRNA Reductase: trapping the thioester intermediate. *J. Biol. Chem.* 277: 48657-48663.
- Schneider, S., Marles-Wright, J., Sharp, K.H., and Paoli, M. 2007. Diversity and conservation of interactions for binding heme in *b*-type heme proteins. *Nat. Prod. Rep.* 24: 621-630.
- Schobert, M. and Jahn, D. 2001. Regulation of Heme Biosynthesis in Bacteria. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 4: 287-294.
- Shemin, D., and Russel, C. S. 1953. δ -aminolevulinic acid, its role in the biosynthesis of porphyrins and purines. *J. Am. Chem. Soc.* 75: 4873-4874.
- Srivastava, A., and Beale, S. 2005. Glutamyl-tRNA Reductase of *Chlorobium vibrioforme* is a dissociable homodimer that contains one tightly bound heme per subunit. *J. Bacteriol.* 187: 4444-4450.
- Stevens, J.M., Daltrop, O., Higham, C.W. and Ferguson, S.J. 2003. Interaction of Heme with Variants of the Heme Chaperone CcmE carrying Active Site Mutations and a Cleavable N-terminal His Tag. *J. Biol. Chem.* 278: 20500-20506.

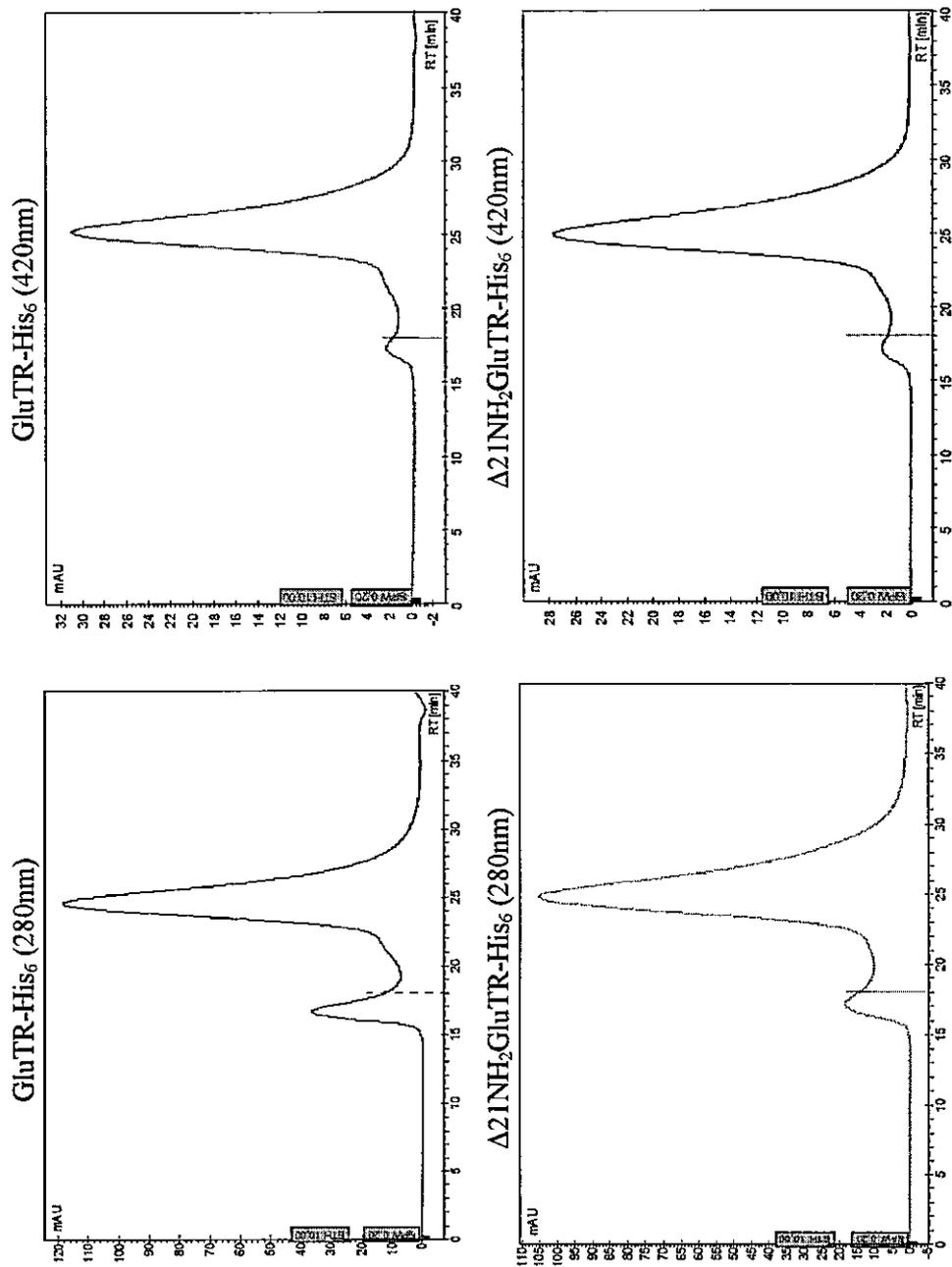
- Thomas, E. P., Ryan, D., and Levin, W. 1976. An Improved Staining Procedure for the Detection of the Peroxidase Activity of Cytochrome P-450 on Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gels. *Anal. Biochem.* 75: 168-176.
- Tong, Y. and Guo, M. 2009. Bacterial heme-transport proteins and their heme-coordination modes. *Arch. Biochem. Biophys.* 481:1-15.
- Verkamp, E., Jahn, M., Jahn, D., Kumar, A.M. and Söll, D. 1992 Glutamyl-tRNA reductase from *Escherichia coli* and *Synechocystis 6803*. Gene structure and expression. *J. Biol. Chem.* 267: 8275-8280.
- Vothknecht, U. C., Kannangara, C. G., and von Wettstein, D. 1986. Expression of catalytically active barley glutamyl tRNA^{Glu} reductase in *Escherichia coli* as a fusion protein with glutathione S-transferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93: 9287-9291.
- Wang, L., Brown, L., Elliott, M., and Elliott, T. 1997. Regulation of heme biosynthesis in *Salmonella typhimurium*: Activity of Glutamyl-tRNA Reductase (HemA) is greatly elevated during heme limitation by a mechanism which increases abundance of the protein. *J. Bacteriol.* 179: 2907-2914.
- Wang, L., Elliott, M., and Elliott, T. 1999a. Conditional stability of the HemA protein (Glutamyl-tRNA Reductase) regulates heme biosynthesis in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 181: 1211-1219.
- Wang, L., Elliott, M., and Elliott, T. 1999b. A mutant HemA protein with positive charge close to the N terminus is stabilized against heme-regulated proteolysis in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 181: 6033-6041.
- Whitmore, L. and Wallace, B.A. (2004). DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data. *Nucleic Acids Research*, 32:W668-673.
- Willmund, F., Mühlhaus, T., Wojciechowska, M. And Schroda M. 2007. The NH₂-terminal domain of the chloroplast GrpE homolog CGE is required for dimerization and cochaperone function in vivo. *J. Biol. Chem.* 282:11317-11328.
- Yarzabal A., Brausser G., Bonnefoy V. 2002. Cytochromes c of *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *FEMS Microbiol. Lett.* 209:189-195.
- Yates, J.R., and Holmes, D.S. 1987. Two families of repeated DNA sequences in *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Bacteriol.* 169: 1861-1870.
- Zhang, L., and Hach, A. 1999. Molecular mechanism of heme signalling in yeast: the transcriptional activator Hap1 serves as the key mediator. *Cell Mol. Life Sci.* 56: 415-426.

ANEXOS

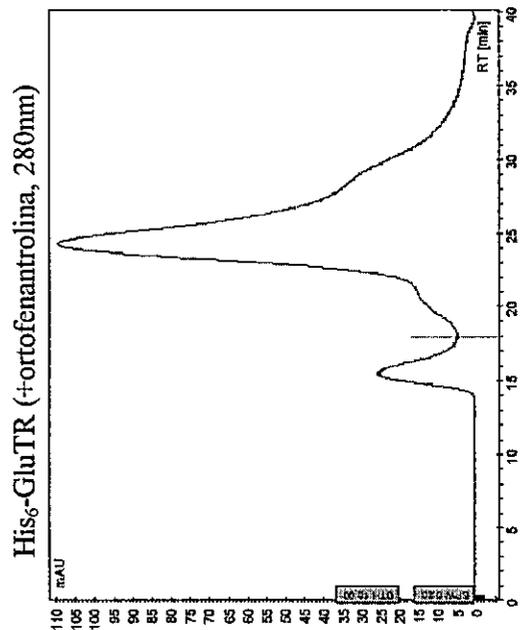
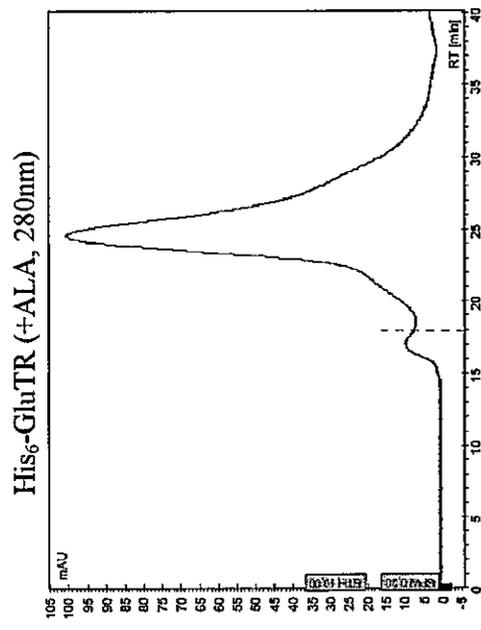
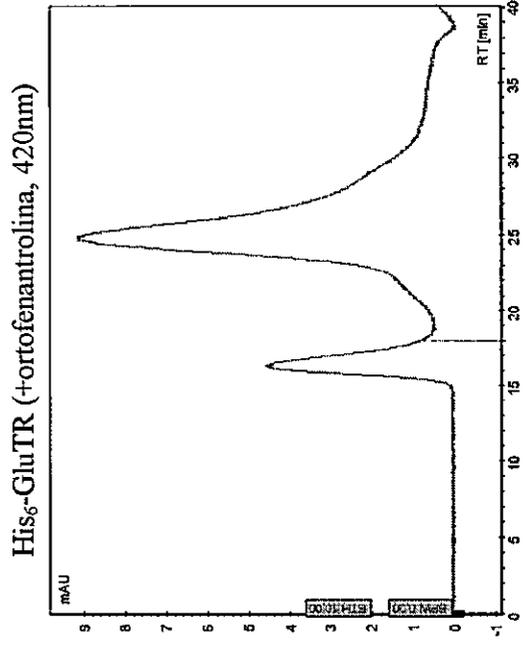
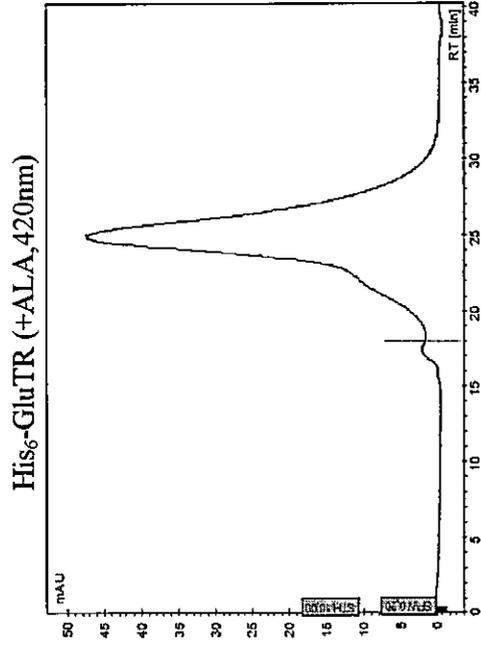
Anexo 1. Perfiles cromatográficos de diferentes preparaciones de GluTR y de mutantes truncas. Se muestran los perfiles obtenidos a 280nm y a 420nm. Se señala con una línea de puntos el tiempo de retención del azul dextrano, que se corresponde con el volumen de exclusión de la columna (9ml).



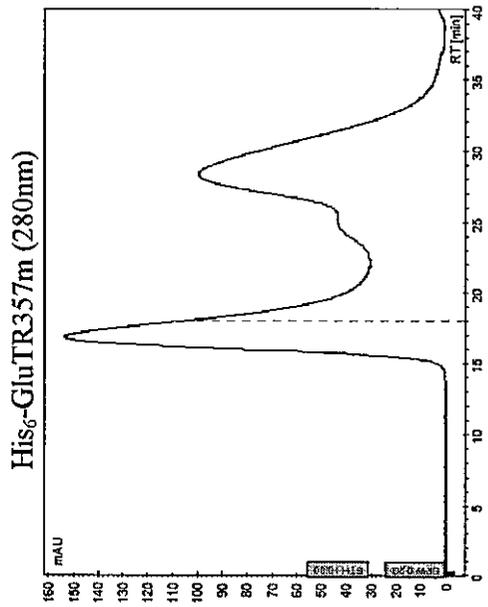
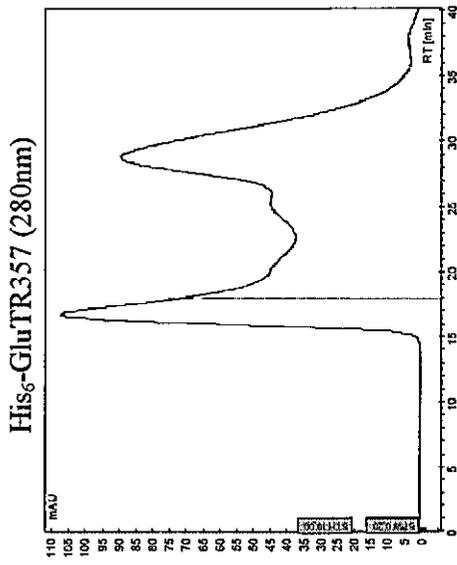
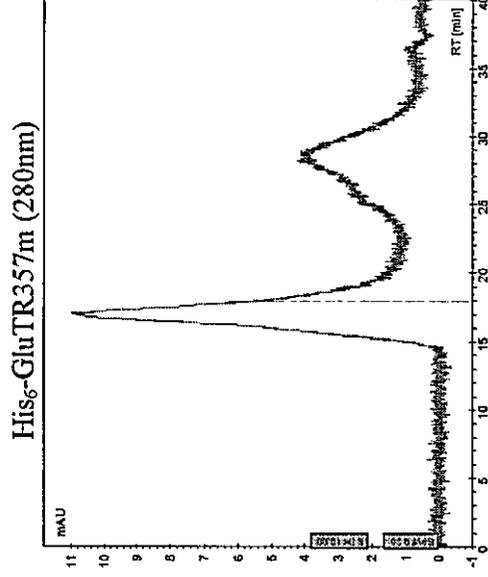
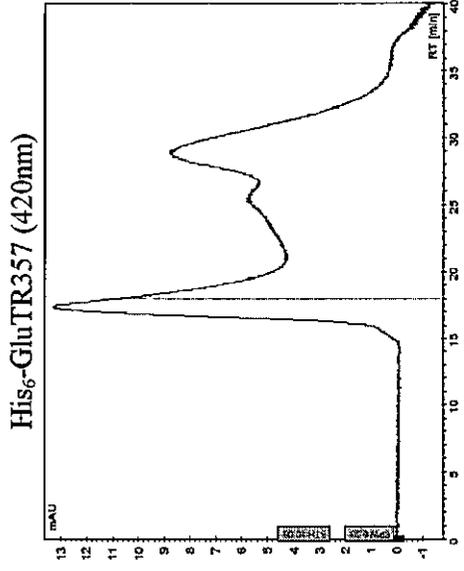
Anexo 1. Continuación.



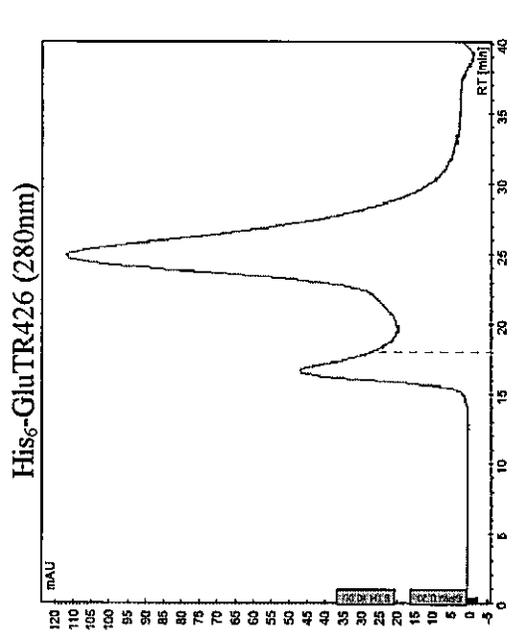
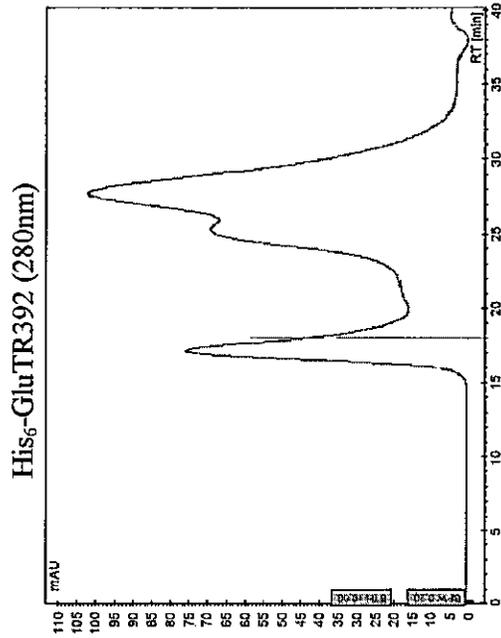
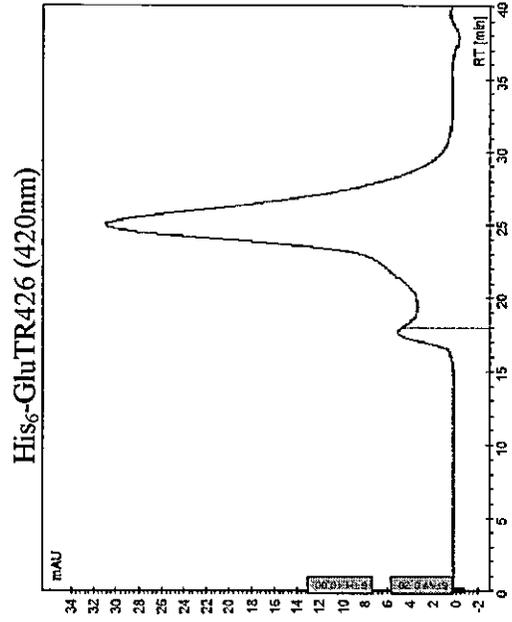
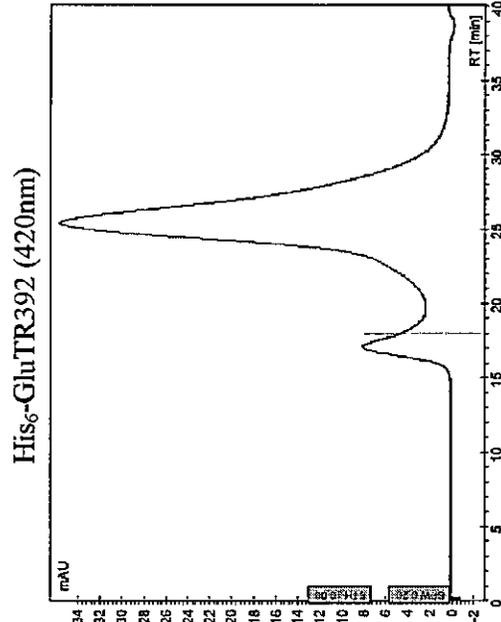
Anexo 1. Continuación.



Anexo I. Continuación.

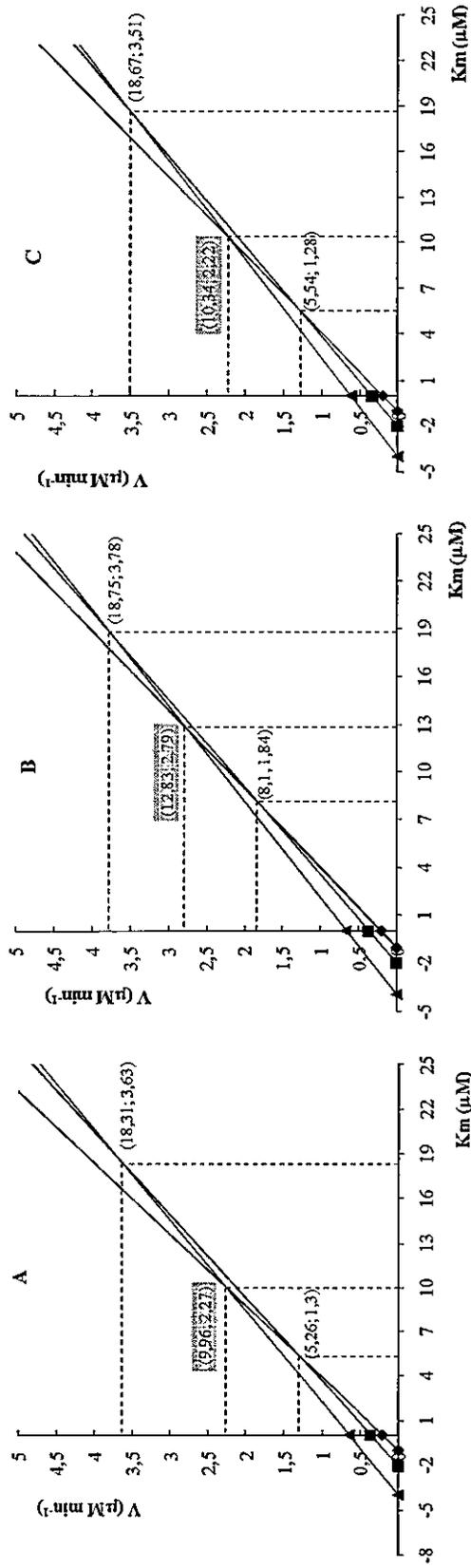


Anexo 1. Continuación.



Anexo 2. Gráficos de Cornish-Bowden de GluTRs con diferente contenido de hemo. Se muestran los gráficos de las tres réplicas experimentales (A, B y C) realizadas para cada enzima. Se señalan las intersecciones de las rectas. Los valores de K_m y V_{max} aparentes (K_m^{ap} y V_{max}^{ap}) que se encuentran sombreados se corresponden con la mediana de los valores de "x" y de "y", respectivamente, y se indican en cada gráfico. Los parámetros cinéticos para cada enzima se reportan como el promedio de los valores calculados para cada una de las tres determinaciones experimentales.

GluTR (1:2)

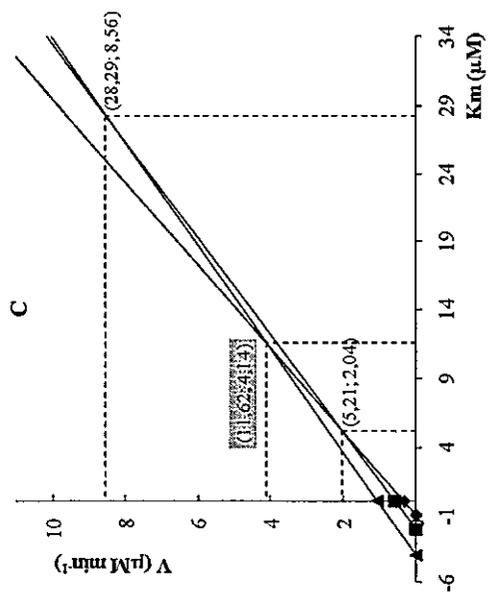
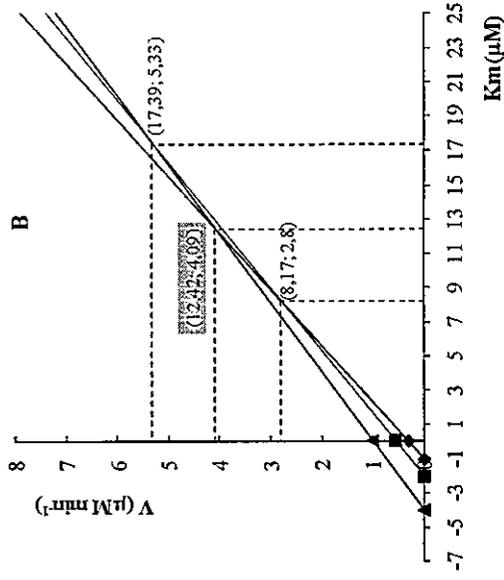
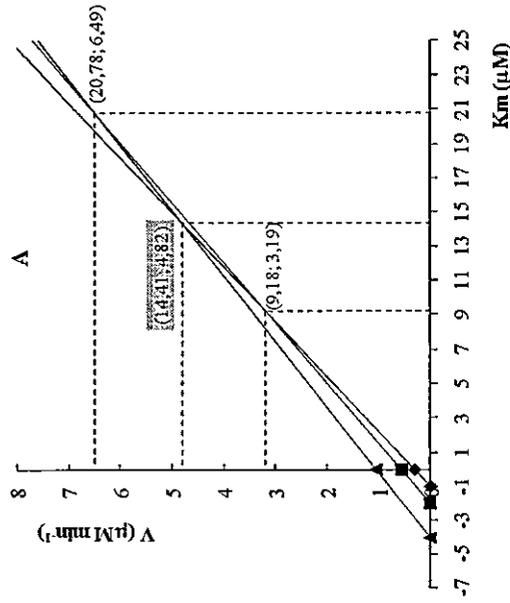


GluTR (1:2)	$K_m^{ap} \pm \text{d.e.} (\mu\text{M})$	$V_{max}^{ap} \pm \text{d.e.} (\mu\text{M min}^{-1})$
	$11 \pm 1,3$	$2,4 \pm 0,3$

d.e: desviación estándar

Anexo 2. Continuación.

GluTR (1:4)



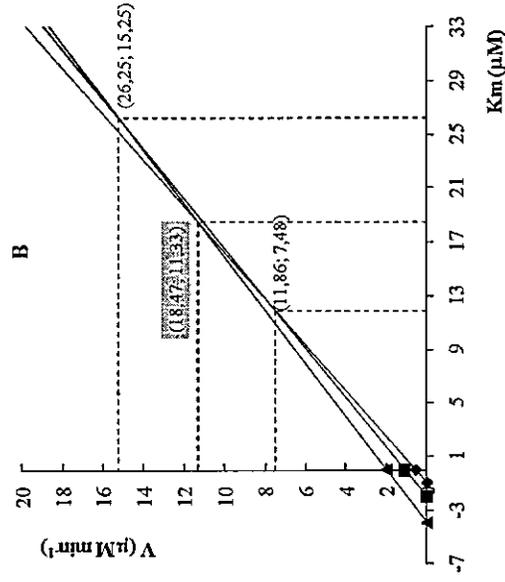
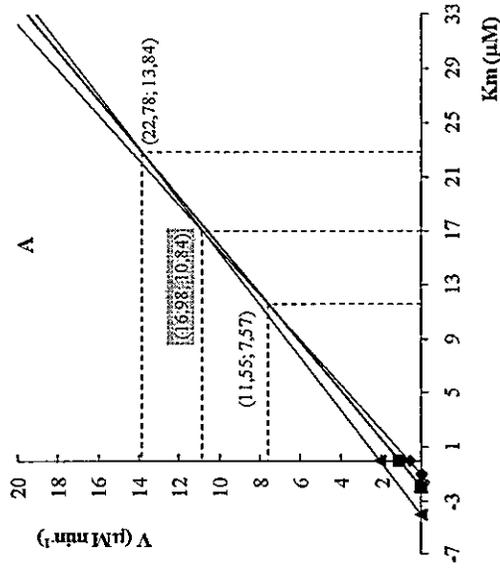
GluTR (1:4)

$K_m^{ap} \pm d.e$ (μM)	$V_{max}^{ap} \pm d.e$ ($\mu M \text{ min}^{-1}$)
$12,8 \pm 1,2$	$4,4 \pm 0,3$

d.e: desviación estándar

Anexo 2. Continuación.

GluTR (1:12)



GluTR (1:12)

$K_m^{ap} \pm d.e$ (μM)	$V_{max}^{ap} \pm d.e$ ($\mu\text{M min}^{-1}$)
$17,2 \pm 0,9$	$10,8 \pm 0,4$

d.e: desviación estándar

