

**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular Universitat de València**

**Programa de doctorado en Biotecnología**



VNIVERSITAT  
E VALÈNCIA

**Caracterización bioquímica y funcional de MnmC, una proteína  
modificadora de tRNA de *Escherichia coli***

**Memoria presentada por María José Garzón Garzón, Licenciada en Bioquímica, para  
optar al grado de Doctor por la Universitat de València**

**Valencia, 2014**





VNIVERSITAT  
DE VALÈNCIA



PRINCIPE FELIPE  
CENTRO DE INVESTIGACION

**La Dra. María-Eugenia Armengod González, doctora en ciencias biológicas e investigadora principal del laboratorio de MODIFICACIÓN DEL RNA Y ENFERMEDADES MITOCONDRIALES del Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF), y el Dr. Ismail Moukadiri, doctor en ciencias biológicas e investigador del laboratorio indicado**

#### CERTIFICAN QUE

Dña. María José Garzón Garzón, licenciada en Bioquímica, ha realizado bajo su dirección, en el Centro de Investigación Príncipe Felipe, el trabajo titulado: “**Caracterización bioquímica y funcional de MnmC, una proteína modificadora de tRNA de *Escherichia coli***”, y consideran que reúne las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor.

Valencia, de de 2014.

Fdo. Directora

M<sup>a</sup> Eugenia Armengod González

Fdo. Co-director

Ismail Moukadiri

Doctorando

María José Garzón Garzón



## Agradecimientos

A estas alturas son muchas las personas a quienes les tengo que agradecer alguna coma, punto o espacio de esta tesis.

Para empezar, toda mi gratitud a aquellos que hicieron posible mi existencia, que me cuidaron y dejaron que pudiera estudiar mientras pasaban los años y su salud por delante de sus ojos: mamá y papá. A mi Estrella y Katy.

A mis amigos por aguantar tantas veces mis enfados, preocupaciones y poco tiempo cuando “algo en el labo no me sale..., este finde curro,...”. A mis sobrinos: no sabéis cuántas veces me habéis hecho olvidar mis problemas con sólo un gesto vuestro. A mis tíos Amparo y Julio, y otros familiares por preocuparse por mí, porque al principio de la tesis, siempre que me veían me preguntaban: ¿qué es eso de la tesis?, ¿luego prepararás oposiciones?, pero ¿cuándo dejarás de estudiar?... A mis niñas de biología (Crisu, Marta L., Marta P., Marisa, Rocio, Lidia, Noe, Elena, Patri y Steph). A mi amiga Meuri por preocuparse por mí, a mi amigo Pau por saber escuchar y entenderme incluso antes de empezar la tesis en este laboratorio. A mis amigas Olga y Paola por ayudarme siempre, y a Jairo por hacerme reír y olvidarme de todo cuando más lo necesitaba.

Por supuesto, a los chic@s del I-08 del CIPF y a nuestros vecinos (los del I-11): juntos hemos pasado momentos felices y otros oscuros, la mayoría aprendimos unidos lo que significaba el acrónimo ERE: Inma, Mara, Eva, Félix, Juan, Asun, Jose, Alí, Rita, Rajaa, Carmen A., Nuria, Marcos, Erwin, Carmen N., Elvira, Mac (¡¡cuánto te admiro!!), Alfons, Rodri, Menxu, Ana, Rafa, Sil (¡muchas gracias! Me llevo una gran amiga) y Natalia (¡cuántos ratos hemos pasado juntas!). A todas las personas que me crucé durante estos cinco años por el centro de investigación (sois tantos...). A mi directora de tesis, M<sup>a</sup> Eugenia, gracias por haberme permitido entrar en este apasionante mundo de la ciencia y a mi codirector, Ismañl, gracias por las grandes tardes de discusiones y preguntas. Este trabajo ha ganado mucho contigo.

Nada, absolutamente nada, hubiera sido posible sin la financiación que apoyó esta tesis (Ministerio de ciencia e innovación de España, BES-2008-005896). Los últimos años han sido muy duros debido a la crisis económica acontecida y por la pésima administración de los recursos en los años de vacas gordas. Si las autoridades públicas no son conscientes de la apuesta de futuro que supone la investigación, seremos una especie en extinción con consecuencias predecibles.

Dedicado a mis abuelas Teresa y María



# Índice





<b>Introducción</b> .....	13
<b>1. Modificaciones post-transcripcionales de los tRNAs</b> .....	15
1.1 Generalidades .....	15
1.2 Tipos de modificaciones post-transcripcionales y funciones .....	16
<b>2. Rutas de modificación de la U34 de tRNAs que leen codones NNA/NNG de cajas mixtas en <i>Escherichia coli</i></b> .....	22
2.1 Ruta dependiente de IscS-MnmA .....	23
2.2 Ruta Trml .....	24
2.3 Ruta MnmEG-MnmC .....	25
<b>3. Funcionamiento de la ruta MnmEG-MnmC</b> .....	32
<b>Objetivos</b> .....	35
<b>Metodología</b> .....	39

## A. MATERIALES

<b>1. Material biológico y medios de cultivo</b> .....	41
1.1 Cepas y construcciones .....	41
1.2 Medios de cultivo .....	43
<b>2. Material químico y bioquímico</b> .....	43
2.1 Electroforesis .....	43
2.2 Extracción y purificación de DNA .....	43
2.3 PCR .....	43
2.4 Enzimas de restricción y otras .....	45
2.5 Transferencia e inmunodetección .....	46
2.6 Purificación de proteínas .....	46
<b>3. Aparatos</b> .....	46
<b>4. Programas informáticos</b> .....	47

## B. MÉTODOS

<b>1. Técnicas microbiológicas</b> .....	47
--	----

1.1 Crecimiento y mantenimiento de las cepas bacterianas .....	47
1.2 Preparación de células competentes y transformación de una cepa bacteriana .....	48
1.3 Obtención de cepas mediante transducción con el fago P1 .....	49
1.4 Ensayos de complementación <i>in vivo</i> .....	50
1.5 Determinación de los tiempos de doblaje de una cepa bacteriana .....	51
1.6 Ensayos de competición microbiana .....	51
<b>2. Técnicas de ingeniería genética y bioquímica de proteínas .....</b>	<b>52</b>
2.1 Aislamiento, purificación y electroforesis de DNA .....	52
2.2 PCR, mutagénesis y verificación de mutaciones .....	53
2.3 Sobreexpresión y purificación de proteínas .....	54
2.4 Cuantificación de proteínas y electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes y nativos .....	55
2.5 Transferencia de proteínas a un soporte sólido .....	56
2.6 Inmunodetección de proteínas sobre soporte sólido .....	56
<b>3. Técnicas de ARN .....</b>	<b>57</b>
3.1 Purificación del tRNA total.....	57
3.2 Obtención de tRNAs transcritos <i>in vitro</i> .....	57
3.3 Purificación de tRNAs nativos y sobreexpresados .....	58
3.4 Medida del estado de modificación de la U34 .....	60
<b>4. Otras técnicas.....</b>	<b>60</b>
4.1 Separación proteica por FPLC .....	60
4.3 Vida media de las proteínas recombinantes .....	61
4.4 Reacción de modificación de tRNA .....	61
4.5 Cinéticas enzimáticas determinadas por HPLC .....	62
4.6 Determinación de interacciones moleculares por SPR-Biacore.....	64
4.7 Interacción tRNA-proteína: Fluorescencia intrínseca de Triptófanos.....	66
<b>Resultados .....</b>	<b>67</b>
1. Purificación y caracterización preliminar de las proteínas MnmC .....	69
2. Interacción de los dominios MnmC(o) y MnmC(m), y de MnmC con MnmE o MnmG.....	71
3. Actividad modificadora de tRNA de los dominios MnmC.....	73
3.1 Estudios <i>in vitro</i> .....	76
3.2 Estudios <i>in vivo</i> .....	76
4. Estudio cinético de las actividades modificadoras de MnmEG y MnmC.....	78

4.1 Cinética de los dominios de MnmC y MnmEG, y acoplamiento cinético de las reacciones catalizadas <i>in vivo</i> .....	78
4.2 Determinación de la afinidad de tRNA por las proteínas MnmC .....	82
5. Análisis mutacional de los dominios MnmC(o) y MnmC(m).....	85
5.1 Dominio MnmC(o).....	88
5.2 Dominio MnmC(m).....	91
6. Determinación de la especificidad de MnmC(o) y MnmC(m) por los tRNAs sustrato .....	93
6.1 Estudios <i>in vivo</i> .....	94
6.2 Estudios <i>in vitro</i> .....	97
7. La síntesis de nm <sup>5</sup> U y cmnm <sup>5</sup> U en <i>E. coli</i> está determinada por las condiciones de crecimiento y la especie de tRNA .....	100
8. Coste biológico de las mutaciones <i>mnmC</i> .....	104
8.1 Estudio del efecto de las mutaciones <i>mnmC(o)</i> y <i>mnmC(m)</i> sobre el crecimiento de <i>E. coli</i> en fase exponencial: tiempos de doblaje .....	104
8.2 Análisis del papel de MnmC(o) y MnmC(m) de <i>E. coli</i> en la fase estacionaria: ensayos de competición .....	106
<b>Discusión</b> .....	109
1. Los dominios de MnmC son funcionalmente independientes .....	111
2. Las rutas MnmEG-MnmC están reguladas cinéticamente.....	113
3. Análisis mutacional de los dominios de MnmC.....	115
4. El uso de las rutas controladas por MnmEG y MnmC depende de las condiciones de crecimiento y del tRNA sustrato .....	117
5. La ausencia de MnmC tiene un coste biológico en <i>E. coli</i> . .....	120
<b>Conclusiones generales</b> .....	123
<b>Abreviaturas</b> .....	127
<b>Bibliografía</b> .....	131



# Introducción





# 1. Modificaciones post-transcripcionales de los tRNAs

## 1.1 Generalidades

La traducción de la información genética a proteínas debe ser eficiente y exacta. Ya en los años 60, Francis Crick con su hipótesis del tambaleo (*wobble*) propuso que algunos anticodones de distintos tRNAs experimentaban apareamientos no estrictamente complementarios para acomodarse a la unión con el codón correspondiente del mRNA en el ribosoma (Crick, 1966). Ahora sabemos que estos apareamientos están optimizados por las modificaciones post-transcripcionales de los tRNAs que especialmente acontecen en el lazo anticodón (Agris, 2008; Westhof *et al.*, 2014).

La modificación post-transcripcional de nucleósidos ocurre en la mayoría de RNAs: mRNA, rRNAs, tRNAs, snoRNAs, tmRNAs, etc. Los tRNAs de todos los organismos están modificados post-transcripcionalmente en diversas posiciones por enzimas específicas: entre un 6 y un 25 % de nucleótidos de un tRNA, según el grupo taxonómico y tipo de tRNA (citosólico, mitocondrial, bacteriano, etc), pueden estar modificados (Motorin, 2011). Hay numerosas evidencias que indican que la ausencia de algunas de estas modificaciones en los tRNAs, en particular las que afectan al lazo anticodón, se asocia frecuentemente a rasgos fenotípicos que probablemente reflejan una traducción deficiente de determinados transcritos. En bacterias se puede encontrar un fenotipo pleiotrópico: desde defectos en la lectura de determinados codones o empeoramiento de la eficiencia de tRNAs supresores (Elseviers *et al.*, 1984 y Sullivan *et al.*, 1985) hasta la disminución de la virulencia y patogenicidad de la cepa (Shippy *et al.*, 2011), reducción de la resistencia al pH ácido (Gong *et al.*, 2004) y enlentecimiento del crecimiento bacteriano (Yim *et al.*, 2006). En humanos, la hipomodificación de la posición 34 en algunos tRNAs mitocondriales se ha asociado a un defecto en la fosforilación oxidativa y en la síntesis de ATP (Villarroya *et al.*, 2008; Umeda *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2009) y a enfermedades como fallo hepático infantil agudo asociado a mutaciones TRMU (Zeharia *et al.*, 2009; Gaignard *et al.*, 2013), cardiomiopatía hipertrófica infantil asociada a mutaciones MTO1 (Ghezzi *et al.*, 2012; Baruffini *et al.*, 2013) y síndromes MERRF

(*Myoclonic Epilepsy with Ragged Red Fibers*) y MELAS (*Mitochondrial Encephalomyopathy, Lactic Acidosis, and Stroke-like episodes*) (Yasukawa *et al.*, 2005; Kirino *et al.*, 2005).

Esta falta de modificación (hipomodificación) puede deberse a defectos en la actividad de las enzimas modificadoras o a mutaciones de los tRNAs que impiden su reconocimiento por las enzimas modificadoras. Se cree que los fenotipos asociados resultan de defectos en la síntesis de proteínas ya que la ausencia de las modificaciones en tRNAs altera la fidelidad de la traducción y promueve cambios en la pauta de lectura del mRNA en los ribosomas (Elserviers *et al.*, 1984; Brégeon *et al.*, 2001; Urbonavicius *et al.*, 2001). Sin embargo, no se puede descartar que la hipomodificación de tRNAs genere señales que están aún por identificar y que alteren procesos de señalización celular (Zinshteyn and Gilbert, 2013). De hecho, el efecto sobre la traducción mitocondrial que se observa en las enfermedades mencionadas no parece ser suficiente para explicar el grave fenotipo (Meseguer *et al.*; 2014).

Hasta la fecha, se han identificado más de 90 modificaciones en el tRNA (Hori *et al.*, 2014). En *Escherichia coli*, por ejemplo, se han encontrado más de 30 modificaciones en el tRNA (Björk and Hagervall, 2005) y más de 45 enzimas implicadas. Esto significa que la bacteria dedica un 1% de su genoma a la síntesis de enzimas modificadores del tRNA, más que el porcentaje dedicado a la propia síntesis de tRNAs y da cuenta de la importancia del proceso de modificación. En tRNAs bacterianos, aproximadamente, un 10-15% de los nucleótidos están modificados. En los tRNAs citosólicos de organismos superiores, el porcentaje de modificación puede alcanzar el 25% (Björk and Hagervall, 2005) y entre un 6-10% en los tRNAs mitocondriales.

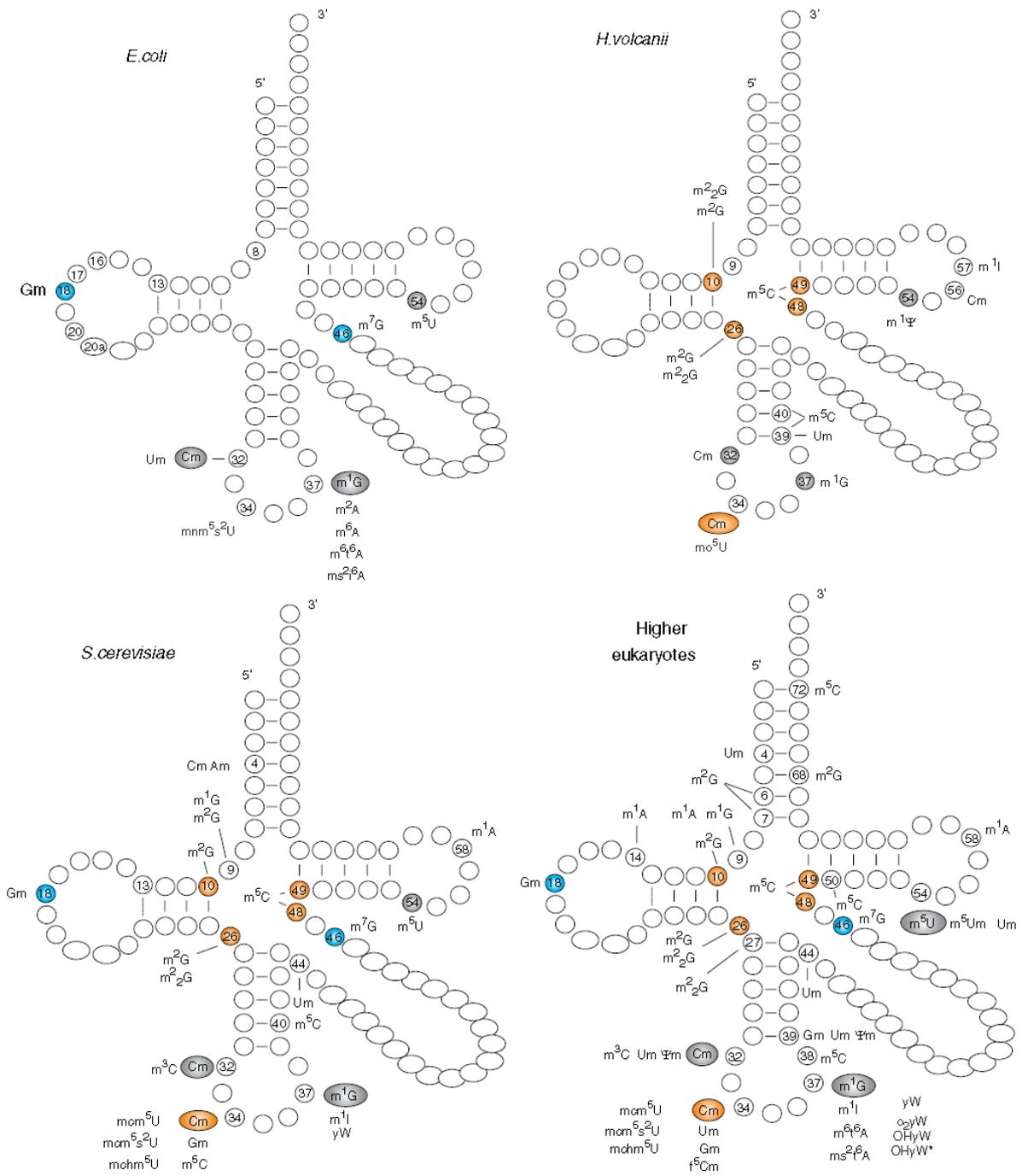
## 1.2 Tipos de modificaciones post-transcripcionales y funciones

Las modificaciones en los tRNAs abarcan una gran variedad, pudiendo ser sencillas (por ejemplo, metilaciones, pseudouridinas) o complejas, implicando la adición de un aminoácido (glicina, taurina, treonina, etc) y, con frecuencia, la intervención de varias

enzimas. En las figuras 1 y 2 se muestra un esquema con todas las modificaciones encontradas en los tRNAs. Estos grupos químicos se añaden a la base de los nucleósidos o a la ribosa. Los grupos químicos añadidos pueden ser, como he dicho, muy variados si bien la modificación más frecuente es la metilación que puede implicar la sola incorporación de un metilo a la base o al azúcar de un nucleósido, ir acompañada de otras modificaciones en la misma posición (cmnm<sup>5</sup>Um) o acontecer sobre un nucleósido previamente modificado, resultando en una hipermodificación (por ejemplo, mnm<sup>5</sup>U), como veremos más adelante. En la figura 2 se muestran los nucleótidos metilados en los tRNAs de organismos representativos de los tres reinos (Motorin, 2011).

La falta de muchas modificaciones en el tRNA no tiene efecto deletéreo para el crecimiento celular o tiene un efecto mínimo (Björk and Hagervall, 2005) y su función no está bien comprendida. Algunas modulan la arquitectura del lazo anticodón y estabilizan la estructura tridimensional en forma de L. Por ejemplo, el tRNA<sup>Lys</sup> mitocondrial humano adopta una estructura no canónica en horquilla cuando falta la metilación en la adenina en posición 9 (m<sup>1</sup>A<sub>9</sub>) porque en tal caso, la adenina puede aparearse con U<sub>64</sub>. La metilación de la A<sub>9</sub> o la mutación A9C favorecen que el tRNA tenga la estructura en forma de trébol (Motorin and Helm, 2010). En general, las modificaciones del tRNA contribuyen a la unión de Mg<sup>2+</sup>, al reconocimiento por proteínas (por ejemplo, las aminoacilsintetasas), al reconocimiento del codón y a mantener la fidelidad traduccional. En concreto, las modificaciones en posiciones del dominio anticodón permiten ordenar la estructura tridimensional de cada tRNA para así ubicarse en el ribosoma de forma adecuada, sin que tenga que ser el ribosoma el que se ajuste a cada tRNA para interactuar correctamente (Agris, 2008). De esta manera, las modificaciones en el dominio anticodón ayudan a la correcta descodificación del mRNA, fundamentalmente las de las posiciones 34 y 37, en las que precisamente es donde se encuentra la mayor variación de modificaciones (Figuras 1-2).





**Figura 2. Nucleótidos metilados en el tRNA de organismos representativos:** en bacterias (*Escherichia coli*), arqueas (*Halobacterium volcanii*), y tRNAs citosólicos de eucariotas (*Saccharomyces cerevisiae* y todas las encontradas en eucariotas superiores). Las metilaciones conservadas universalmente están coloreadas en gris, las conservadas entre arqueas y eucariotas en naranja y entre bacterias y eucariotas en azul (Figura tomada de Motorin, 2011).

La hipótesis del tambaleo (*wobble hypothesis*) planteó que la posición 34 en el tRNA confería ambigüedad en el reconocimiento del codón (Crick, 1966). Por ejemplo, la U34 podría interactuar con A (apareamiento clásico de Watson-Crick) o con G (unión de tipo *wobble*) pero no con U ni C. Posteriormente, se comprobó que el número de apareamientos posibles de tipo *wobble* era más amplio debido en gran parte a la presencia de modificaciones en las posiciones 34 y 37 (Agris *et al.*, 2007). La modificación del nucleótido de la posición de tambaleo permite restringir o ampliar el número de apareamientos posibles, optimizando la decodificación del mRNA (Tabla 1).

**Tabla 1. Efecto de las modificaciones en el dominio anticodón del tRNA sobre el apareamiento codón:anticodón.**

Hipótesis del tambaleo		Hipótesis modificada		Hipótesis extendida	
Anticodón N <sub>34</sub>	Codón N <sub>3</sub>	Anticodón N <sub>34</sub>	Codón N <sub>3</sub>	Posición 37	32•38, 39
G	C, U	G	C, U	t <sup>6</sup> A	C <sub>32</sub> •A <sub>38</sub>
C	G	C	G	m <sup>6</sup> A	ψ <sub>39</sub>
I	U, C, A	I	U, C, A	m <sup>1</sup> G	
U	A, G	xm <sup>5</sup> U*	G	wye	
U		s <sup>2</sup> U**	A, G		
U		xo <sup>5</sup> U***	A, G, U (C)		

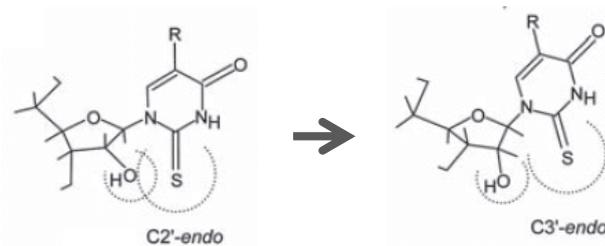
Se muestran los apareamientos posibles según la hipótesis del tambaleo y sus modificaciones posteriores (tomada de Agris *et al.*, 2007). \*Todos los derivados de 5-metiluridina excepto 2-tio. \*\* Todos los derivados de 2-tiouridinas. \*\*\*Todos los derivados 5-oxiuridina.

Las modificaciones en la U34 se clasifican en dos grupos de acuerdo con la estructura química que presentan: los derivados de 5-hidroxiuridina (xo<sup>5</sup>U), los cuales tienen un átomo de oxígeno unido directamente al átomo C5 de la base de uracilo; y los derivados de 5-metiluridina (xm<sup>5</sup>U), que tienen un grupo metileno unido directamente al átomo C5. Las modificaciones de tipo xo<sup>5</sup>U están presentes en los tRNAs de las cajas únicas (ver figura 4) y expanden el reconocimiento de tres o cuatro codones de la caja (Nasvall *et al.*, 2004; Nasvall *et al.*, 2007). Las modificaciones del tipo xm<sup>5</sup>U se suelen encontrar en tRNAs que decodifican para los codones acabados en A o G de las familias

de codones degenerados dos veces (cajas de codones mixtas). Estos nucleósidos pueden llevar adicionalmente un grupo 2-tio ( $xm^5s^2U$ ) o un grupo 2'-O-metilo ( $xm^5Um$ ). Las propiedades decodificantes de estos derivados  $xm^5U$  están todavía en debate. Los nucleósidos modificados en  $xm^5s^2U$  parece que restringen la capacidad de tambaleo de la uridina permitiendo el apareamiento preferencial con purinas previniendo así del fallo de lectura (*misreading*) de codones cercanos afines acabados en pirimidinas (*near cognate codons*): la ribosa de la base deja de adoptar una conformación C2'-endo (Figura 3) para formar la C3'-endo (Yokoyama and Nishimura, 1995). No obstante, esta función se atribuye sobre todo al grupo tiol, estando más debatida la función del grupo  $xm^5$ . Este grupo parece que estabiliza un cambio tautomérico que facilita el apareamiento entre la U34 y la G situada en la tercera posición del codón, dotándole de una geometría tipo Watson-Crick, mientras que la otra conformación dificultaría el apareamiento U34-A estándar Watson-Crick (Westhof *et al.*, 2014). La consecuencia es que el codón terminado en G se leería a una velocidad próxima a la de su pareja (en la caja mixta) terminado en A. Al igualarse la velocidad de lectura a la considerada media, se optimiza la traducción (Hagervall *et al.*, 1998; Murphy *et al.*, 2004; Westhof *et al.*, 2014; Bjork *et al.*, 2007; Johansson *et al.*, 2008; Kruger *et al.*, 1998).

Por otro lado, las posiciones más relevantes, además de la 34, son la 32 y la 37. La posición 32 casi siempre se encuentra modificada y contiene siempre una pirimidina (U o C) confiriendo estabilidad estructural en el lazo del anticodón por formación de puentes de hidrógeno con el nucleótido de la posición 38 (Baumann *et al.*, 1985). En *E. coli*, se pueden encontrar cuatro modificaciones diferentes en la posición 32 (Figura 1B). Una de ellas, la modificación  $s^2C$ , está implicada en la fidelidad traduccional previniendo el *frameshifting* o desplazamiento de la pauta de lectura ribosomal (Baumann *et al.*, 1985). La posición 37, aunque está fuera del anticodón, es muy importante debido a que las modificaciones que pueda llevar también previenen del cambio de pauta (Urbonavicius *et al.*, 2003). Es decir, que las modificaciones en la posición 37 crean (junto con las de la posición 34) un entorno único químico y estructural. Las modificaciones en la purina de la posición 37 impiden el apareamiento dentro del lazo del anticodón. Además, contribuyen a ordenar la estructura del lazo mejorando el apilamiento de la base 39 y estabilizando el apareamiento codón:anticodón en la primera posición del codon (con la

base situada en la posición 36 del anticodon) (Bjork and Hagervall, 2005; Agris *et al.*, 2007; Agris *et al.*, 2008; Benitez-Paez *et al.*, 2012a). En *E. coli*, la G37 siempre se modifica como m1G37 mientras que A37 puede o no estar modificada. Una interacción débil A-U en la primera posición del codón generalmente requiere una modificación cargada o hidrofóbica compleja (del tipo i<sup>6</sup>A o t<sup>6</sup>A) en la posición 37, mientras que una interacción G-G más estable admite una modificación hidrofóbica más simple del tipo m<sup>1</sup>G, m<sup>2</sup>A, m<sup>6</sup>A o incluso una A37 no modificada (Agris *et al.*, 1996; Bjork and Hagervall 2005; Benitez-Paez *et al.*, 2012a).



**Figura 3. Conformaciones de xm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U con la forma C2'-endo y C3'-endo de la ribosa.** Los radios del grupo 2-tio (semicírculo grande) causan una repulsión estérica con el grupo 2'-OH (semicírculo pequeño). El nucleósido modificado xm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U aparece preferentemente con purinas (A o G) y previene de la incorrecta lectura (*misreading*) de codones cercanos afines (*near cognate codons*) acabados en pirimidinas debido a la rigidez conformacional proporcionada. Figura modificada de Grosjean, 2009.

## 2. Rutas de modificación de la U34 de tRNAs que leen codones NNA/NNG de cajas mixtas en *Escherichia coli*

Las modificaciones de la uridina situada en la posición de tambaleo (U<sub>34</sub>) de tRNAs que descodifican codones NNA/NNG de cajas mixtas (Figura 4) son complejas y requieren la participación de tres rutas: IscS-MnmA, TrmL (YibK) y MnmEG-MnmC. La ruta dependiente de IscS-MnmA y la ruta MnmEG-MnmC actúan sobre la posición 2 y 5 del anillo de pirimidina, respectivamente. En cambio, TrmL actúa sobre el grupo 2'-hidroxilo de la ribosa. Las tres rutas no comparten todos los tRNAs sustratos, siendo la modificación final en la U34 distinta entre las distintas especies de tRNA:

tRNA<sup>Lys</sup><sub>mnm5s2UUU</sub>, tRNA<sup>Glu</sup><sub>mnm5s2UUC</sub>, tRNA<sup>Gln</sup><sub>cmnm5s2UUG</sub>, tRNA<sup>Leu</sup><sub>cmnm5UmAA</sub>,  
tRNA<sup>Arg</sup><sub>mnm5UCU</sub> y tRNA<sup>Gly</sup><sub>mnm5UCC</sub> (tRNA<sup>Gly</sup> pertenece a una caja familiar).

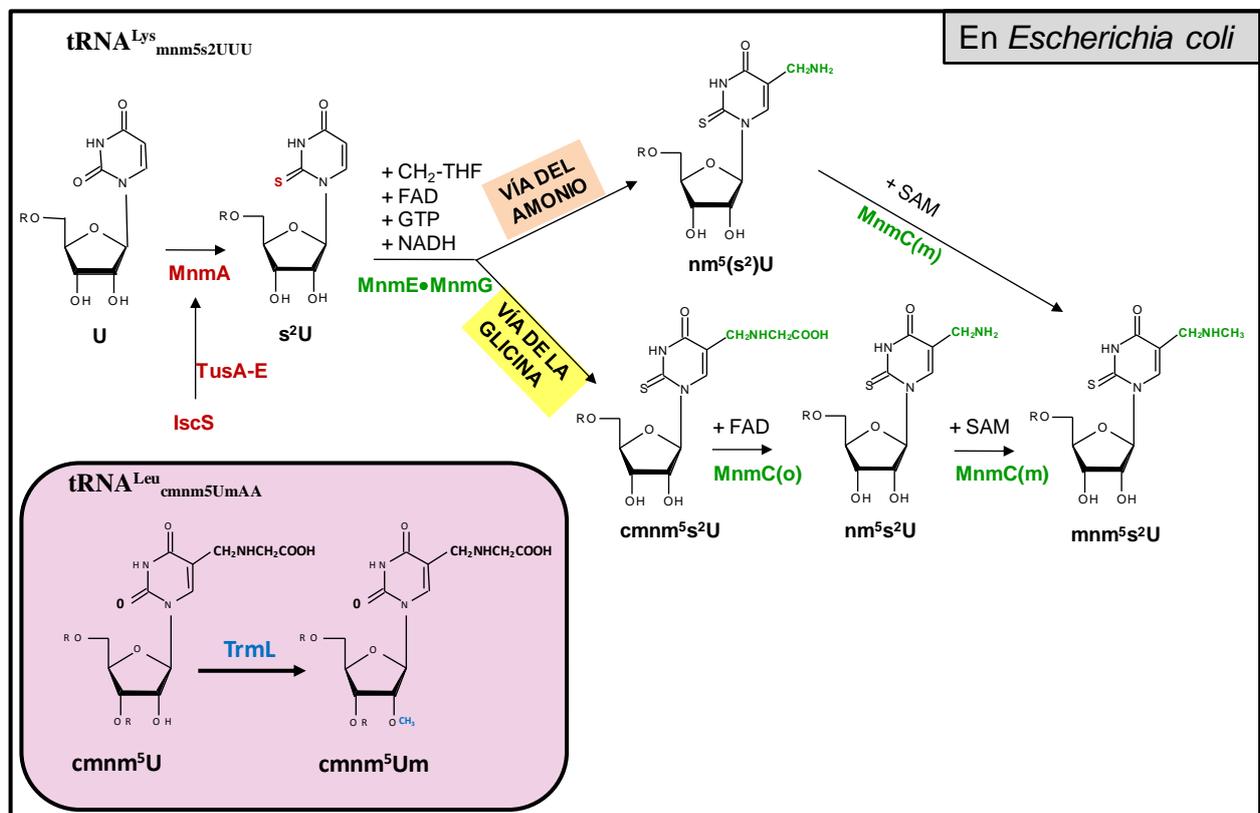
		U C A G			
U	UUU   Phe	UCU   Ser	UAU   Tyr	UGU   Cys	
	UUC   Leu	UCC   Ser	UAC   Tyr	UGC   Cys	
	UUA   Leu	UCA   Ser	UAA   Stop	UGA   Stop	
	UUG   Leu	UCG   Ser	UAG   Stop	UGG   Trp	
C	CUU   Leu	CCU   Pro	CAU   His	CGU   Arg	
	CUC   Leu	CCC   Pro	CAC   His	CGC   Arg	
	CUA   Leu	CCA   Pro	CAA   Gln	CGA   Arg	
	CUG   Leu	CCG   Pro	CAG   Gln	CGG   Arg	
A	AUU   Ile	ACU   Thr	AAU   Asn	AGU   Ser	
	AUC   Ile	ACC   Thr	AAC   Asn	AGC   Ser	
	AUA   Met	ACA   Thr	AAA   Lys	AGA   Arg	
	AUG   Met	ACG   Thr	AAG   Lys	AGG   Arg	
G	GUU   Val	GCU   Ala	GAU   Asp	GGU   Gly	
	GUC   Val	GCC   Ala	GAC   Asp	GGC   Gly	
	GUA   Val	GCA   Ala	GAA   Glu	GGA   Gly	
	GUG   Val	GCG   Ala	GAG   Glu	GGG   Gly	

**Figura 4. Código genético.** Basándose en la identidad del primer y segundo nucleótido del codón, el código genético se organiza en 16 cajas de codones (Agris, 2004). Algunas cajas codifican un solo aminoácido y se llaman cajas familiares (o cajas degeneradas cuatro veces, en color lila). Algunas cajas se dividen en dos mitades y codifican dos aminoácidos (cajas partidas, *split boxes* o cajas de codones degenerados dos veces, en color amarillo). Un aminoácido (Ile) está degenerado tres veces mientras que otros (Met y Trp) no están degenerados y sólo están codificados por un codón (en verde). Por último, hay codones que codifican la señal de paro (*Stop*, en rojo).

## 2.1 Ruta dependiente de IscS-MnmA

La ruta dependiente de IscS-MnmA incorpora un grupo tiol en la posición 2 del anillo pirimidínico de la Uridina 34 (Figura 5). MnmA, perteneciente a la familia ATP-pirofosfatasa, recibe el sulfuro de IscS a través de una cadena de transportadores formada por las proteínas TusA, B, C, D y es la encargada de la reacción final de tiouridilación de los tRNA<sup>Lys</sup><sub>mnm5s2UUU</sub>, tRNA<sup>Glu</sup><sub>mnm5s2UUC</sub> y tRNA<sup>Gln</sup><sub>cmnm5s2UUG</sub> (Kambampati and Lauhon, 2003; Shi *et al.*, 2010). En humanos, la proteína TRMU es la homóloga de MnmA y tiola los tRNAs sustrato en posición dos (Figura 7). En cambio, no se han encontrado

homólogos de las proteínas TusA-D. Se ha demostrado que la falta de la modificación  $s^2U$  aumenta el tiempo de doblaje bacteriano, es decir, que la falta de la modificación  $s^2U$  afecta al crecimiento celular (Kruger *et al.*, 1998; Nilsson *et al.*, 2002). En *Saccharomyces cerevisiae* se ha demostrado que el defecto en la proteína homóloga de MnmA afecta a la síntesis mitocondrial de proteínas (Umeda *et al.*, 2005). Parece que la modificación  $s^2U$  es importante ya que permite que la ribosa de la U34 adopte la conformación C3'endo (Figura 3) facilitando el apareamiento de tipo Watson-Crick con purinas (A o G) durante la descodificación del mRNA; además, el grupo  $s^2U$  es un elemento de identidad importante para la aminoacilación de tRNAs (Yokoyama *et al.*, 1985; Björk and Hagervall, 2005).



**Figura 5. Ruta de modificación de la U34 en *E. coli*.** Ruta propuesta para el tRNA<sup>Lys</sup><sub>mnm5s2UUU</sub> y tRNA<sup>Leu</sup><sub>cmnm5UmAA</sub> (Ruta TrmL) a partir de datos obtenidos con tRNA total purificado de *E. coli* y tRNA<sup>Lys</sup><sub>UUU</sub> purificado *in vitro* y reaccionado con MnmEG (Moukadiri *et al.*, 2009). El complejo MnmEG está implicado en la síntesis del nm<sup>5</sup> y cmnm<sup>5</sup> en dos reacciones dependientes de FAD, NADH, GTP, metileno-tetrahidrofolato (CH<sub>2</sub>-THF), glicina (cmnm<sup>5</sup>) y amonio (nm<sup>5</sup>). Las dos actividades de MnmC llevan a la modificación final mnm<sup>5</sup>. MnmA introduce la tiolación en posición 2 de la ribosa independientemente de MnmEG (Para revisión ver: Armengod *et al.*, 2012; Armengod *et al.*, 2014).

## 2.2 Ruta TrmL

En *E. coli*, la ruta TrmL añade un metilo al grupo 2'-hidroxil de la ribosa de la Uridina 34 en el tRNA<sup>Leu</sup><sub>cmnm5UmAA</sub> y tRNA<sup>Leu</sup><sub>CAA</sub> por mediación de la proteína TrmL en un único paso enzimático (Figura 5, panel lila), si bien el tRNA<sup>Leu</sup><sub>CAA</sub> no es sustrato de MnmEG. TrmL requiere de la modificación introducida en la posición 37 por MiaA-MiaB, ms<sup>2</sup>i<sup>6</sup>A<sub>37</sub>, como determinante positivo de identidad (Benítez-Paez *et al.*, 2010) por lo que se ha propuesto que TrmL actuaría tardíamente durante el proceso de maduración de sus tRNAs sustratos. La enzima TrmL es una proteína pequeña (17.7 kDa) metiltransferasa de tipo SPOUT que usa SAM. Recientemente, se ha estudiado el mecanismo de reconocimiento de TrmL por el tRNA, identificándose el posible sitio de unión a tRNA (Liu *et al.*, 2013). Los tRNAs sustratos de TrmL no tienen la modificación s<sup>2</sup> realizada por MnmA. Se piensa que la metilación del grupo 2'-hidroxil favorece la conformación C3'-endo en la ribosa de la base al igual que la modificación s<sup>2</sup> (Kawai *et al.*, 1992).

## 2.3 Ruta MnmEG-MnmC

### 2.3.1 El complejo MnmEG

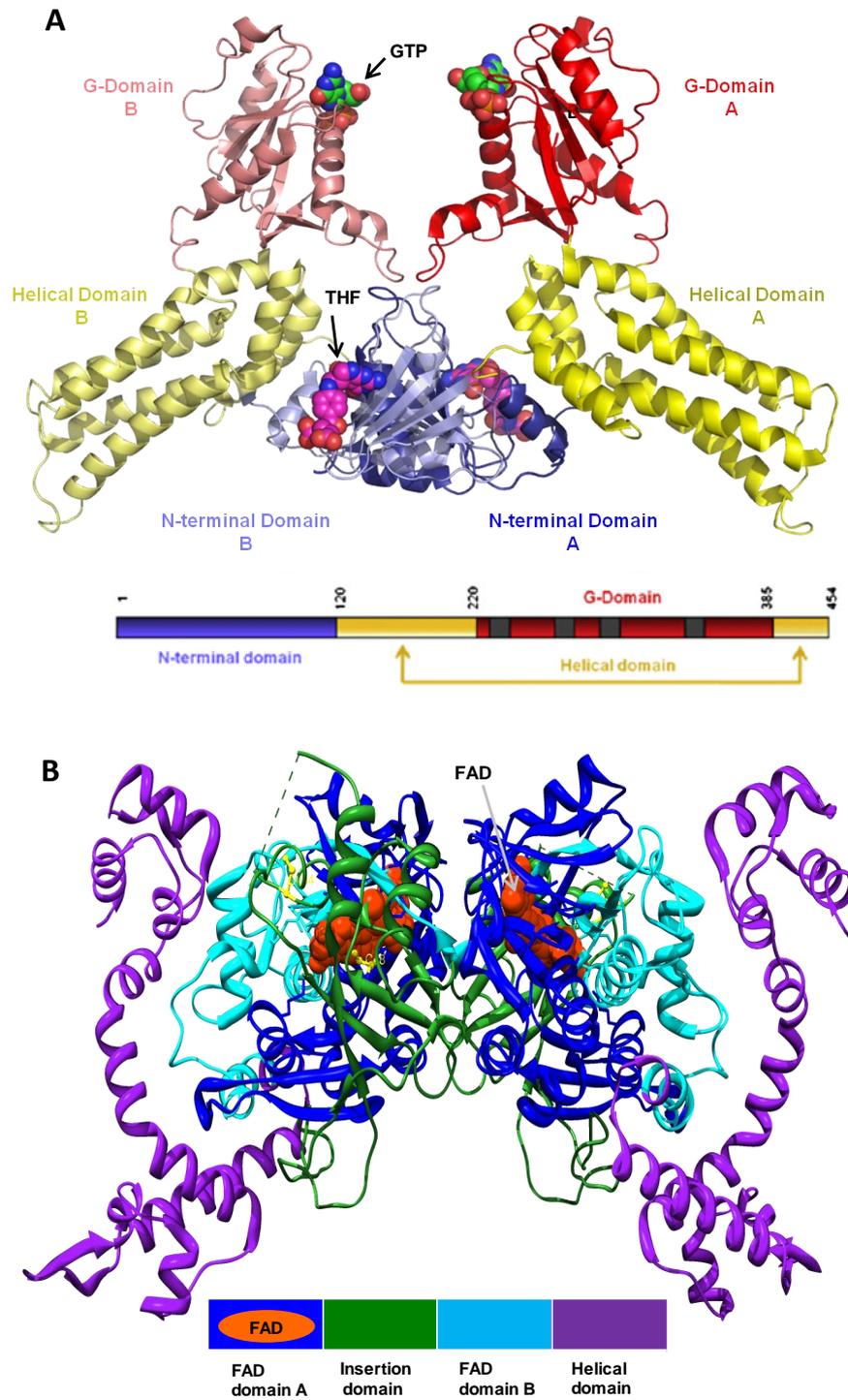
En la ruta MnmEG participan tres enzimas: MnmE, MnmG (GidA) y MnmC. MnmE y MnmG forman un complejo funcional llamado MnmEG que cataliza la incorporación de los grupos carboximetil-aminometil o aminometil de la Uridina 34 utilizando metileno-tetrahidrofolato (CH<sub>2</sub>-THF) y glicina o amonio como sustratos (Figura 5). El metileno-tetrahidrofolato sirve de donador del grupo metileno el cual se une directamente al átomo C5 del anillo pirimidínico de la U34. Si el complejo utiliza glicina como sustrato, la modificación resultante es carboximetil-aminometiluridina (cmnm<sup>5</sup>U, vía de la glicina). En cambio, si usa amonio como sustrato, la modificación es aminometiluridina (nm<sup>5</sup>U) y se habla de la vía del amonio (Moukadiri *et al.*, 2009). La existencia de la vía del amonio fue descubierta por nuestro grupo aunque el mecanismo

propuesto para la reacción básica, común a las dos vías, no se ha demostrado experimentalmente (Moukadiri *et al.*, 2009; Armengod *et al.*, 2012).

La proteína MnmE, de 50 kDa (Figura 6A), es una GTPasa con características muy peculiares pues presenta una alta actividad GTPasa intrínseca y una baja afinidad por GTP y GDP (Cabedo *et al.*, 1999). Estas propiedades la diferencian de las GTPasas canónicas tipo Ras junto con el hecho de que la hidrólisis de GTP es requisito imprescindible para que MnmE sea funcional (Yim *et al.*, 2003; Martínez-Vicente *et al.*, 2005; Scrima *et al.*, 2005 y 2006). Su baja afinidad por GTP y GDP y su alta actividad GTPasa intrínseca son las propiedades que determinan que el ciclo GTPasa de MnmE *in vitro* proceda de forma eficiente sin factores auxiliares, como por ejemplo proteínas activadoras de tipo GAP o factores de recambio del nucleótido (Cabedo *et al.*, 1999; Scrima *et al.*, 2006). De acuerdo con modelos recientes, la hidrólisis de GTP por el dominio G de MnmE promueve cambios conformacionales en el complejo MnmEG que son esenciales para la modificación del tRNA (Prado *et al.*, 2013).

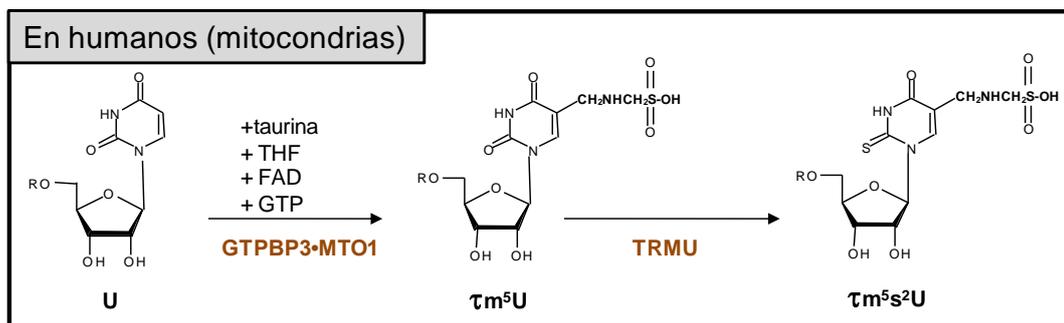
La proteína MnmG, de 69 kDa (Figura 6B), es una flavoproteína que une FAD no covalentemente y NADH. MnmG es capaz de dimerizar e interactuar físicamente con el dímero de MnmE formando un complejo funcional heterotetramérico de tipo  $\alpha 2\beta 2$  en el que las dos proteínas son interdependientes (Yim *et al.*, 2006;). Aunque existen datos cristalográficos de MnmE y MnmG, no hay datos estructurales de complejo MnmEG y los modelos propuestos se basan en gran parte en datos obtenidos de la reacción de modificación *in vitro* (Moukadiri *et al.*, 2009).

Hay datos que indican que las modificaciones introducidas por MnmA y MnmEG ocurren independientemente ya que el tRNA de mutantes *mnmA* lleva *mnm*<sup>5</sup> (en lugar de *mnm*<sup>5s2</sup>) y el de mutantes *mnmE* o *mnmG* lleva *s*<sup>2</sup>. Sin embargo, no hay información sobre si la presencia de una modificación favorece la formación de la otra (Armengod *et al.*, 2012).



**Figura 6. Representación de las proteínas MnmE (A) y MnmG (B).** Figuras tomadas de Armengod *et al.*, 2012. **A. Dímero de MnmE.** Modelo obtenido por superposición de MnmE de *Nostoc* (3G3H código PDB) y *Thermotoga marítima* (1XZQ código PDB). **B. Dímero de MnmG.** Representación de MnmG de *Aquifex aeolicus* (2ZXXI código PDB).

Por último, se sabe que las proteínas MnmE y MnmG están conservadas en eucariotas. En humanos, GTPBP3 es la homóloga de MnmE y MTO1 de MnmG (Figura 7) y están presentes en mitocondrias. Se cree que ambas proteínas usan taurina (en lugar de glicina) para formar taurinometiluridina ( $\tau m^5U$ , Suzuki *et al.*; 2002) aunque las homólogas en levadura (Mss1 y Mto1) y en *Caenorhabditis elegans* siguen usando glicina (Martin *et al.*, 1990; Watanabe, 2010). Se asume que la reacción de modificación en eucariotas es similar a la que ocurre en *E. coli* pero no se ha demostrado experimentalmente.

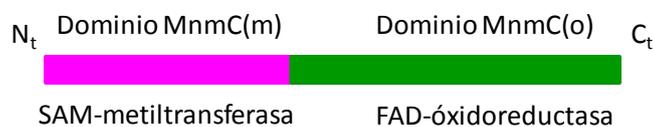


**Figura 7. Ruta GTPBP3-MTO1 en mitocondrias humanas.** La ruta GTPBP3-MTO1 es homóloga a MnmEG aunque la modificación introducida es taurina. Los tRNAs sustratos son Lys, Glu, Gln, Leu y Trp.

### 2.3.2 La proteína MnmC

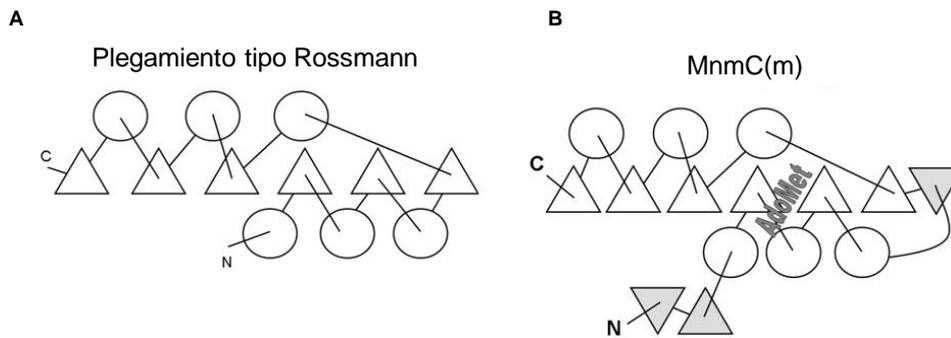
MnmC actúa sobre los productos de MnmEG para producir la modificación final  $mnm^5U$ . Esto significa que la bifurcación de la ruta dependiente de la actividad de MnmEG (Figura 5) determina la acción de MnmC ya que esta proteína es bifuncional; es decir, presenta dos actividades modificadoras de tRNA diferentes (Hagervall and Björk 1984a-b, Hagervall *et al.*, 1987 y Bujnicki *et al.*, 2004). Si la vía seguida es la de la glicina, el  $cmnm^5U$  se transformará primero en aminometiluridina ( $nm^5U$ ) por la actividad oxidoreductasa de MnmC (MnmC(o)) y, a continuación, en metilaminometiluridina ( $mnm^5U$ ) por acción de la actividad metiltransferasa de MnmC (MnmC(m)). Por otra parte, si la vía es la del amonio, el  $nm^5U$  producido por el complejo MnmEG es directamente modificado a  $mnm^5U$  por la actividad de MnmC(m) (Moukadiri *et al.*, 2009).

Las enzimas modificadoras de tRNA son de difícil clasificación debido a la gran diversidad de tipos de modificaciones que introducen y porque pertenecen a distintas familias de proteínas o están formadas por varios dominios con distinta función y/o origen. Por ejemplo, existen metiltransferasas, tiolasas, dihidrouridin sintasas, descarboxilasas, etc. En el caso de MnmC, la proteína tiene dos dominios con distinta función. La proteína MnmC está formada por 668 aminoácidos y está compuesta de un dominio amino-terminal o MnmC(m) (1-250 aa), con actividad metiltransferasa dependiente de SAM, y un dominio carboxi-terminal o MnmC(o) (250-668 aa), con actividad óxido-reductasa dependiente de FAD (Figura 8).



**Figura 8. Esquema de la proteína MnmC de *Escherichia coli*.**

El dominio MnmC(o) puede relacionarse con los dominios presentes en las oxidasas de D-aminoácidos (DAAO) y la sarcosina oxidasa (Roovers *et al.*, 2008; y Kitamura *et al.*, 2011), todas ellas pertenecientes a la familia GR<sub>2</sub> (glutación reductasa de tipo 2) de las proteínas que contienen FAD (Dym and Eisenberg., 2001). Esta familia se caracteriza por tener un motivo de secuencia consenso del tipo GxGxxG derivado del motivo de tipo Rossmann de unión a NAD(P) (Figura 9A). En cambio, el dominio MnmC(m) puede clasificarse como metiltransferasa (MTasa) de clase I según su plegamiento estructural para unir SAM (Schubert *et al.*, 2003; Roovers *et al.*, 2008; Hori, 2014). Este grupo de MTasas tienen en común el motivo GxGxG (o GxG), donde se une el SAM, y un residuo ácido que forma interacciones por puentes de hidrógeno con la ribosa del SAM. Se ha observado que esta estructura es muy similar al dominio de unión a NAD(P) de tipo Rossmann en el que se crea un bolsillo interno de unión a NAD(P) o en el caso de las MTasas de tipo I, de unión a SAM (Figura 9).

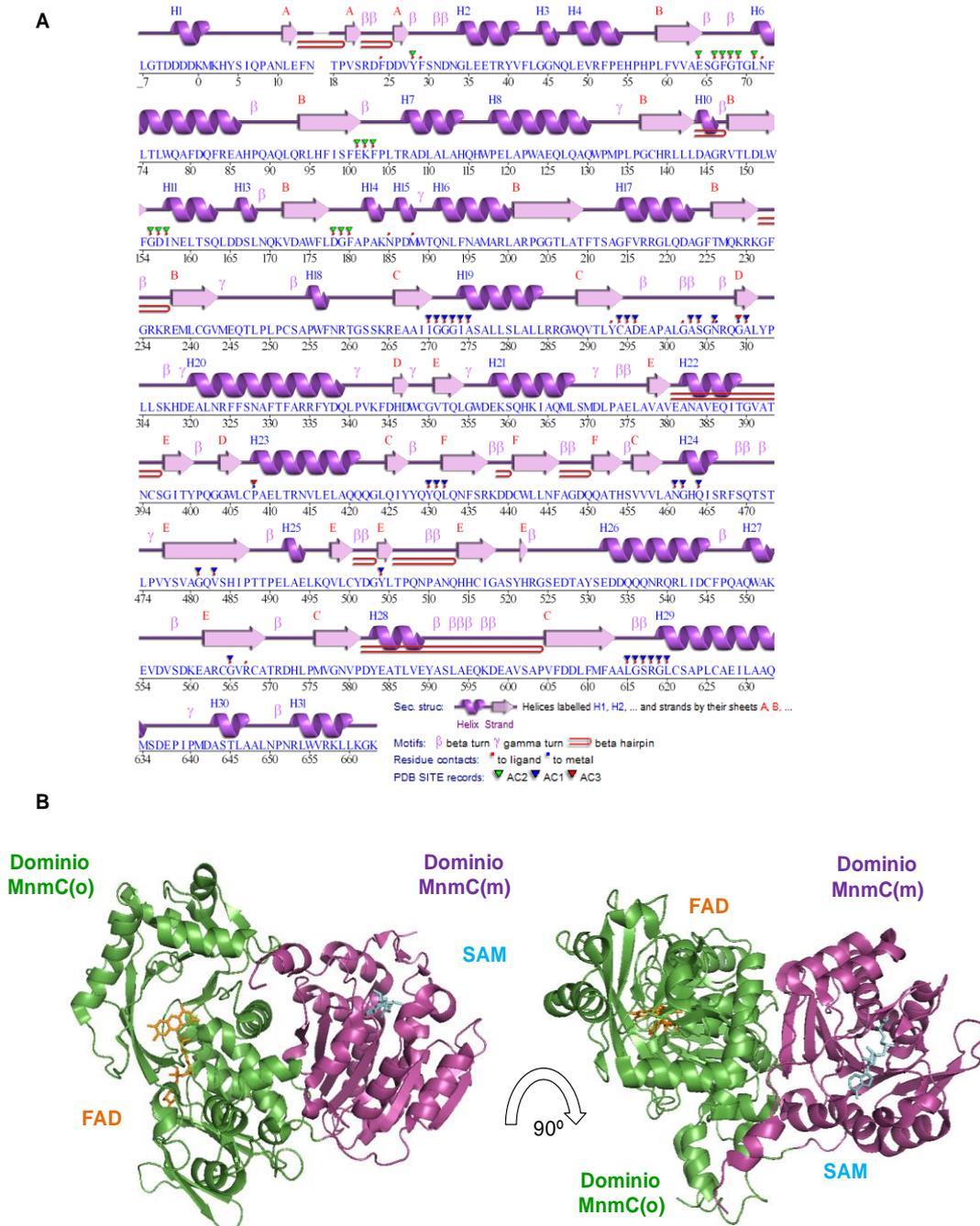


**Figura 9. Esquemas de plegamiento estructural de tipo Rossmann (A) y el del dominio MnmC(m) (B).**

Las primeras referencias bibliográficas que existen de la actividad MnmC son de los años 70 (Taya and Nishimura, 1973; Marinus *et al.*, 1975; y Björk and Kjellin-Straby, 1978). Es en esa época cuando se identifica por primera vez la actividad enzimática MnmC en un extracto celular de *E. coli* (Taya and Nishimura, 1973). Fue más tarde cuando los datos apuntaron que la proteína podría tener dos actividades distintas que darían como resultado la modificación final  $mnm^5s^2U$  (Björk and Kjellin-Straby, 1978; Hagervall and Björk, 1984a-b y Hagervall *et al.*, 1987; Leung *et al.*, 1998).

Mediante análisis bioinformáticos se consiguieron modelos de unión con SAM y FAD de la proteína MnmC (Bujnicki *et al.*, 2004), siendo en los últimos años cuando se han depositado los datos cristalográficos de dos estructuras de MnmC de *E. coli*. Una de ellas (Figura 10) muestra los cofactores FAD y SAM unidos a cada dominio (Kim and Almo, 2013; PDB id 3PS9), mientras que la otra sólo tiene unida la molécula de FAD a la proteína (Kitamura *et al.*, 2011; PDB id 3AWI). La estructura de MnmC, a partir de los datos cristalográficos, muestra dos dominios globulares que interaccionan entre sí. Cada dominio posee un centro catalítico propio. En las estructuras depositadas, los dos centros activos quedan orientados hacia lados opuestos lo que sugiere que los dominios pueden actuar de forma independiente (Kitamura *et al.*, 2011; Kim and Almo, 2013). De hecho, cuando se construyen mutantes puntuales de MnmC en los que se inactiva independientemente cada uno de los dominios y se mezclan, se recupera parcialmente la síntesis de  $mnm^5s^2U$ , sugiriendo que los dos dominios pueden actuar independientemente (Roovers *et al.*, 2008). Sin embargo, no se puede excluir que debido a la naturaleza hidrofílica de la interfaz existente entre ambos dominios, puedan producirse cambios

conformacionales que promuevan una interacción funcional entre los dos centros activos (Roovers et al., 2008). En un intento de esclarecer este punto, los dominios de MnmC se clonaron separadamente pero sólo MnmC(m) fue soluble (Roovers et al., 2008). Debido a la insolubilidad de MnmC(o), los autores propusieron que la presencia de MnmC(o) era necesaria para que MnmC(m) adquiriera una conformación estable y soluble; es decir que MnmC(o) actuaba como una especie de chaperona de MnmC(m).



**Figura 10. Estructura primaria y secundaria de MnmC.** **A.** Estructura depositada con el código PDB 3PS9 (Kim and Almo, 2013). **B.** Representación de la estructura 3D de MnmC con el programa PyMol. En azul se representa la molécula SAM y en naranja el cofactor FAD.

### 3. Funcionamiento de la ruta MnmEG-MnmC

La ruta de modificación de la U34 se hace más compleja debido a que no se encuentra la modificación final mnm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U en todos los tRNAs sustratos de MnmEG. Es decir, que hay una heterogeneidad de la modificación presente en la U34 dependiente del tipo de tRNA considerado. Así, el esquema presentado de la ruta MnmEG (Figura 5) está basado en datos obtenidos con tRNA total en *E. coli* y se ha demostrado para el tRNA<sup>Lys</sup> (Moukadiri *et al.*, 2009). A modo de resumen en la tabla 2, se muestran las modificaciones presentes en los tRNAs sustratos de la ruta MnmEG en *E. coli* y en mitocondrias humanas. Como se puede ver en esta tabla, la proteína MnmA de *E. coli* tiola algunos de los tRNAs modificados por MnmEG (tRNA<sup>Lys</sup><sub>mnm5s2UUU</sub>, tRNA<sup>Glu</sup><sub>mnm5s2UUC</sub> y tRNA<sup>Gln</sup><sub>cmnm5s2UUG</sub>) quedando otros sin la tiolación (tRNA<sup>Leu</sup><sub>cmnm5UmAA</sub>, tRNA<sup>Arg</sup><sub>mnm5UCU</sub> y tRNA<sup>Gly</sup><sub>mnm5UCC</sub>). La proteína TrmL sólo metila el tRNA<sup>Leu</sup><sub>cmnm5UmAA</sub>. tRNA-Leu y tRNA-Gln llevan el grupo cmnm, introducido por MnmEG, en la posición 5.

**Tabla 2. Modificaciones en la posición 34 del tRNA en *E. coli* y mitocondrias humanas.**

tRNA	Anticodón en <i>E. coli</i>	Modificación U34 en <i>E. coli</i>	Modificación U34 en mitocondrias humanas
tRNA <sup>Lys</sup>	UUU	mnm <sup>5</sup> s <sup>2</sup> U	τm <sup>5</sup> s <sup>2</sup> U
tRNA <sup>Glu</sup>	UUC	mnm <sup>5</sup> s <sup>2</sup> U	τm <sup>5</sup> s <sup>2</sup> U
tRNA <sup>Arg</sup>	UCU	mnm <sup>5</sup> U	-
tRNA <sup>Gln</sup>	UUG	cmnm <sup>5</sup> s <sup>2</sup> U	τm <sup>5</sup> s <sup>2</sup> U
tRNA <sup>Leu</sup>	UAA	cmnm <sup>5</sup> Um	τm <sup>5</sup> U
tRNA <sup>Gly</sup>	UCC	mnm <sup>5</sup> U	-

Información recopilada de: Steinberg *et al.*, 1993; Yokoyama and Nishimura, 1995; Sakamoto *et al.*, 1993; Suzuki *et al.*, 2002; Moukadiri *et al.*, 2009; Watanabe *et al.*, 2010; and MODOMICS Database.

Poco se sabe de cómo están organizadas y reguladas las actividades de las enzimas MnmEG y MnmC. Específicamente, no se ha explorado si MnmEG utiliza

preferentemente una de sus dos vías, amonio o glicina, según las circunstancias o según el tRNA. Existen datos indicativos de que el nivel de algunas modificaciones del tRNA varían según las condiciones de estrés (Persson, 1993; Yi and Pan, 2011; Chan, *et al.*, 2012., El Yacoubi and Crécy-Lagard, 2012; Preston *et al.*, 2013) pero poco se sabe sobre la influencia de las condiciones de crecimiento sobre las modificaciones introducidas por MnmEG y MnmA. De hecho, hasta donde sabemos, solo un trabajo menciona que la modificación  $\text{mnm}^5\text{s}^2\text{U}$  presente en  $\text{tRNA}^{\text{Glu}}$  de *E. coli* es invariable con la tasa de crecimiento (Emilsson *et al.*, 1992). Por lo tanto, uno de los objetivos de esta tesis fue averiguar el uso que hace MnmEG de las vías de amonio y glicina bajo diferentes condiciones de crecimiento, tanto en lo que se refiere al tRNA total como a las diferentes especies de tRNAs que son sustrato de MnmEG.

El hecho de que sólo  $\text{cmnm}^5$  pero no  $\text{nm}^5$  o  $\text{mnm}^5$ , haya sido detectado hasta ahora en la posición 5 de la U34 en  $\text{tRNA}^{\text{Gln}}_{\text{cmnm}^5\text{s}^2\text{UUUG}}$  y  $\text{tRNA}^{\text{Leu}}_{\text{cmnm}^5\text{UmAA}}$  sugiere que ambos tRNAs no usan la vía del amonio y no son sustratos de MnmC(o). Además, en el tRNA de *E. coli* no se ha observado acumulación de  $\text{nm}^5\text{s}^2\text{U}$  (Hagervall *et al.*, 1987) lo que sugiere que la síntesis del  $\text{mnm}^5\text{s}^2$  presente en los  $\text{tRNA}^{\text{Lys}}$  y  $\text{tRNA}^{\text{Glu}}$  parece estar organizada de forma que se evita la acumulación de  $\text{nm}^5\text{s}^2\text{U}$  como intermediario. Sin embargo, dado que en el tRNA total sí que se observa  $\text{cmnm}^5\text{s}^2\text{U}$ , no se puede saber si este nucleósido procede del  $\text{tRNA}^{\text{Gln}}$  o es un intermediario que se acumula en la modificación de  $\text{tRNA}^{\text{Lys}}$  y  $\text{tRNA}^{\text{Glu}}$ .

La coordinación de las actividades enzimáticas implicadas en la formación del  $\text{mnm}^5\text{s}^2\text{U}$  para evitar la acumulación de intermediarios podría ser cinética, mediante reacciones secuenciales que son realizadas con velocidades cada vez mayores, o basada en la degradación selectiva de tRNAs parcialmente modificados. Un estudio cinético previo de las actividades de MnmC indicó que la reacción dependiente de MnmC(m) ( $\text{nm}^5 \rightarrow \text{mnm}^5$ ) es más rápida que la dependiente de MnmC(o) ( $\text{cmnm}^5 \rightarrow \text{nm}^5$ ) o, al menos, parecida, a concentraciones altas de tRNA (Pearson and Carell, 2011). Sin embargo, este estudio no tuvo en cuenta la eficacia de las reacciones catalizadas por MnmEG, lo que es un punto crucial para entender la organización del proceso biosintético del  $\text{mnm}^5\text{s}^2\text{U}$ .

Como se ha dicho anteriormente, las modificaciones localizadas dentro de o adyacentes al anticodón son importantes para la estabilización del apareamiento codón:anticodón y para restringir la dinámica del dominio anticodón y darle forma. De hecho, la inactivación funcional de MnmEG produce fenotipos que pueden ser muy graves según las circunstancias. Considerando el entramado de rutas que da lugar a  $mnm^5s^2U$  y la participación de MnmC, queda por determinar si mutaciones que afectan a las actividades de MnmC (MnmC(o) o MmC(m)) tienen distintas consecuencias biológicas y hasta qué punto una acumulación de intermediarios (debida a la falta de alguna actividad MnmC) afecta a la biología bacteriana. Por ello, el estudio funcional de MnmC y sus dominios puede ayudar a conocer mejor la ruta de modificación de la U34 aportando más conocimiento sobre la biología del tRNA, una molécula imprescindible para la vida.

# Objetivos





**El objetivo general de este trabajo fue estudiar, bioquímica y funcionalmente, la proteína modificadora de tRNA MnmC de *Escherichia coli* y comprender cómo sus actividades modulan las rutas de modificación iniciadas por MnmEG.**

Los objetivos concretos fueron:

1. Caracterizar bioquímica, estructural y funcionalmente los dos dominios de MnmC. Esto comprende el aislamiento de los dos dominios de MnmC y el estudio de las dos actividades por separado, tanto *in vitro* como *in vivo*: conocer cuál es su función modificadora, la interrelación funcional entre dominios y la identificación de sus tRNAs sustratos y el papel desempeñado por residuos aminoacídicos concretos en la actividad modificadora (Apartados 1-6 de Resultados).
2. Determinar el funcionamiento de las rutas MnmEG-MnmC según las condiciones de crecimiento y la especie de tRNA (Apartado 7 de Resultados).
3. Estudiar las consecuencias biológicas de las actividades de MnmC (Apartado 8 de Resultados).



# Metodología





## A. MATERIALES

### 1. Material biológico y medios de cultivo

#### 1.1 Cepas y construcciones

**Tabla 3. Relación de cepas usadas en este trabajo.**

Cepa	Descripción	Origen y/o referencia
<b>DEV16 (IC4385)<sup>1</sup></b>	<i>thi-1 rel-1 spoT1 lacZ105<sub>UAG</sub> val<sup>R</sup>mmnE-Q192X</i>	Elseviers <i>et al.</i> 1984; Cabedo <i>et al.</i> , 1999
<b>BW25113(IC5136)<sup>1</sup></b>	<i>lacI<sup>q</sup> rrnB<sub>T14</sub> ΔlacZ<sub>WJ16</sub> hsdR514 ΔaraBAD<sub>AH33</sub> ΔrhaBAD<sub>LD78</sub></i>	Datsenko and Wanner. 2000
<b>TH178 (IC5255)<sup>1</sup></b>	<i>mmnA1 fadR::Tn10 [Tet<sup>R</sup>]</i>	Nilsson <i>et al.</i> , 2002
<b>MG1655 (IC5356)<sup>1</sup></b>	<i>F<sup>-</sup></i>	D. Touati
<b>TH48 (IC6017)<sup>1</sup></b>	<i>ara, Δ(lac-proB), nalA, argE<sub>am</sub>, rif, thi, fadL::Tn10</i>	Hagervall <i>et al.</i> , 1987
<b>TH49 (IC6018)<sup>1</sup></b>	TH48 <i>mmnC(m)</i> -G68D	Hagervall <i>et al.</i> , 1987
<b>TH69 (IC6019)<sup>1</sup></b>	TH48 <i>mmnC</i> -W131stop	Hagervall <i>et al.</i> , 1987
<b>IC4639</b>	DEV16 <i>mmnE<sup>+</sup> bgl (Sal<sup>+</sup>)</i>	Yim <i>et al.</i> , 2006
<b>IC5241</b>	MG1655 <i>mmnG::Tn10 [Tet<sup>R</sup>]</i>	Yim <i>et al.</i> , 2006
<b>IC5358</b>	MG1655 <i>mmnE::kan</i>	Martinez-Vicente <i>et al.</i> , 2005
<b>IC5397</b>	P1 (IC5255) x IC4639 [IC4639 <i>mmnA</i> -Q233stop]	M. Villarroya
<b>IC5827</b>	BW25113 <i>mmnE::kan</i>	NBRP-Japan
<b>IC5854</b>	BW25113 <i>trmL::kan</i>	Benítez-Páez <i>et al.</i> , 2010
<b>IC5937</b>	IC4639 <i>mmnA::kan</i>	Benítez-Páez <i>et al.</i> , 2012a
<b>IC5975</b>	BL21-DE3 <i>mmnG::kan</i>	Shi <i>et al.</i> , 2009
<b>IC6010</b>	BW25113 <i>mmnC::Kan</i>	Moukadiri <i>et al.</i> , 2009
<b>IC6023</b>	IC6010 con pIC1253	Este trabajo
<b>IC6029</b>	TH69 con pIC1339	Este trabajo
<b>IC6030</b>	TH49 con pIC1340	Este trabajo
<b>IC6166</b>	IC5975 con pIC1446	Shi <i>et al.</i> , 2009
<b>IC6222</b>	P1 (IC6010) x IC4639	Este trabajo
<b>IC6374</b>	IC4639 <i>trmL::kan</i>	Benítez-Páez <i>et al.</i> , 2010
<b>IC6411</b>	P1 (IC5241) x IC6374 ( <i>trmL::kan</i> )	Benítez-Páez <i>et al.</i> , 2010
<b>IC6424</b>	IC5358 con pIC684	Cabedo <i>et al.</i> , 1999
<b>IC6587</b>	P1 (TH49) x IC4639	Este trabajo
<b>IC6588</b>	P1 (TH49) x IC5937	Este trabajo
<b>IC6589</b>	P1 (IC6010) x IC5397	Este trabajo
<b>IC6628</b>	IC6010 con pIC1677	Este trabajo
<b>IC6629</b>	BW25113 <i>MmnC(o)::cat</i>	Este trabajo
<b>IC6725</b>	P1 (IC6629) x IC5937	Este trabajo

<sup>1</sup> Entre paréntesis se muestra el número en la colección del laboratorio de la Dra. Armengod.

**Tabla 4. Relación de plásmidos utilizados en este trabajo.**

Plásmidos	Descripción	Origen y/o referencia
<b>Proteínas recombinantes</b>		
pIC684	GST-MnmE	Cabedo <i>et al.</i> , 1999
pIC1253	Flag-MnmC clonado en pBAD-TOPO	Moukadiri <i>et al.</i> , 2009
pIC 1340	Flag-MnmC(m) clonado en pBAD-TOPO	Este trabajo
pIC1341	Mutante G68D en pBAD-TOPO	Este trabajo
pIC1446	His-mnmG clonada en pET15b	Shi <i>et al.</i> , 2009
pIC1521	Mutante Y28A en pIC1340	Este trabajo
pIC1522	Mutante E37A en pIC1340	Este trabajo
pIC1523	Mutante E64A en pIC1340	Este trabajo
pIC1524	Mutante E101A en pIC1340	Este trabajo
pIC1525	Mutante D156A en pIC1340	Este trabajo
pIC1526	Mutante D178A en pIC1340	Este trabajo
pIC1527	Mutante F180A en pIC1340	Este trabajo
pIC1528	Mutante F210A en pIC1340	Este trabajo
pIC1529	Mutante K236A en pIC1340	Este trabajo
pIC1530	Mutante R237A en pIC1340	Este trabajo
pIC1532	Flag-MnmC(o) clonado en pBAD-TOPO	Este trabajo
pIC1677	His-MnmC(m) clonado en pBAD-TOPO	Este trabajo
pIC1680	Mutante G271A en pIC1532	Este trabajo
pIC1681	Mutante G273A en pIC1532	Este trabajo
pIC1682	Mutante Y501A en pIC1532	Este trabajo
pIC1683	Mutante H573A en pIC1532	Este trabajo
pIC1684	Mutante S617A en pIC1532	Este trabajo
pIC1685	Mutante R653A en pIC1532	Este trabajo
<b>tRNAs recombinantes</b>		
pIC1083	pUC19 con tRNA <sup>Lys</sup> <i>E. coli</i>	Tamura <i>et al.</i> , 1992
pIC1401	pUC19 con tRNA <sup>Lys</sup> <i>E. coli</i> (poliA)	Lab. Dra. Armengod
pIC1402	pUC19 con tRNA <sup>Cys</sup> <i>E. coli</i> (poliA)	Lab. Dra. Armengod
pIC1535	pUC19 con tRNA <sup>Gln</sup> <i>E. coli</i>	Este trabajo
pIC1550	pUC19 con tRNA <sup>Leu</sup> <i>E. coli</i>	Este trabajo
pIC1577	pBSKrna (scaffold Lys citosólico humano)	Ponchon <i>et al.</i> , 2009
pIC1617	pBSKrna-Lys <sup>UUU</sup> <i>E. coli</i> (scaffold)/EcoRV	Este trabajo
pIC1664	pBSK-Lys <sup>UUU</sup> <i>E. coli</i> /EcoRI-PstI	Este trabajo
pIC1665	pBSK-Leu <sup>UAA</sup> <i>E. coli</i> /EcoRI-PstI	Este trabajo
pIC1666	pBSK-Cys <sup>GCA</sup> <i>E. coli</i> /EcoRI-PstI	Este trabajo
pIC1714	pBSK-Gln <sup>UUG</sup> <i>E. coli</i> /EcoRI-PstI	Este trabajo

En la tabla 3 se muestran las cepas usadas en esta tesis. Es de destacar que la cepa mutante *mnmC*-W131stop (IC6019), proveniente de la cepa TH48, tiene un codón de *stop* al principio del dominio MnmC(m) y por tanto, no tiene ninguna de las actividades. En cambio, la cepa mutante *mnmC*(m)-G68D (IC6018), construida a partir de la cepa TH48, tiene una mutación puntual en G68D (impide la catálisis del SAM) lo que hace no funcional sólo al dominio MnmC(m). En la tabla 4 se muestran las construcciones usadas en este trabajo.

## 1.2 Medios de cultivo

Los productos empleados para elaborar los medios de cultivo fueron de las marcas comerciales Difco y Pronadisa. Los antibióticos fueron de las casas Roche y Sigma.

## 2. Material químico y bioquímico

### 2.1 Electroforesis

Las agarosas utilizadas para preparar los geles electroforéticos de DNA fueron de Pronadisa. Los geles de poliacrilamida para SDS-PAGE se prepararon con una mezcla de acrilamida y N',N' metilen-bis-acrilamida en proporción 29:1 al 40% siendo ambas de Amresco. Estos se realizaron a temperatura ambiente y con 30 mA constantes de Intensidad (SDS-PAGE) y 80 V para geles de agarosa. Los marcadores de masa molecular de DNA fueron de MBI Fermentas mientras que los de proteínas fueron de Oncogene.

### 2.2 Extracción y purificación de DNA

Para la extracción de DNA genómico bacteriano se empleó el “High Pure PCR Template Preparation Kit” de Roche. Para la purificación de plásmidos a pequeña y mediana escala se emplearon los reactivos “High Pure Plasmid Isolation kit” y “Genopure Plasmid Midi kit” ambos de Roche. Para la purificación de fragmentos de PCR tras la reacción de amplificación se empleó el “High Pure PCR Product Purification Kit” de Roche.

### 2.3 PCR

- Reacciones: Los oligonucleótidos para amplificar fragmentos de DNA mediante PCR fueron de Sigma. Los desoxinucleótidos (dNTPs) para las reacciones de PCR fueron de Invitrogen. Las DNA polimerasas usadas fueron de diferentes casas comerciales y con

distintas propiedades según el tamaño del fragmento a amplificar y su posterior uso (clonación, secuenciación, mutagénesis dirigida, etc...). Para las amplificaciones convencionales de fragmentos pequeños de DNA se empleó la DNA polimerasa Netzyme de Need. Cuando se requirió una alta fidelidad en la amplificación se utilizaron la “Taq Expand High Fidelity” de Roche o la Herculasa de Stratagene.

-Oligonucleótidos usados: para mutagénesis dirigida, secuenciación, clonación y purificación de tRNAs específicos están listados en la Tabla 5.

**Tabla 5. Relación de oligonucleótidos usados en este trabajo.**

Oligos	SECUENCIA DEL OLIGONUCLEÓTIDO (5'→3')
<b>Mutagénesis dirigida</b>	
Y28A_F	GAT <sub>4</sub> GACGATGTCGCAT <sub>4</sub> CCAACGATAAC
Y28A_R	GTTATCGTTGGA <sub>4</sub> TGCGACATCGTCA <sub>4</sub> TC
E37A_F	GGCTGGAAGCGACGCGTTATG
E37A_R	CATAACGCGTCGCTTCCAGCC
E64A_F	GTGGTAGCAGCGAGCGGCTTC
E64A_R	GAAGCCGCTCGTGCTACCAC
E101A_F	CATTAGTTTTGCGAAAATTTC
E101A_R	GGAAAATTCGCAAAACTAATG
D156A_F	GGTTTGGCGCTATTAACGAAC
D156A_R	GTTTCGTTAATAGCGCAAACC
D178A_F	GATGCCTGGTTTCTGGCCGGCTTTGCGCCAGCG
D178A_R	CGCTGGCGCAAAGCCGGCCAGAAACCAGGCATC
F180A_F	TGGTTTCTGGACGGCGCTGCGCCAGCGAAA
F180A_R	TTTCGCTGGCGCAGCGCCGTCAGAAACCA
F210A_F	GGCACGCTGGCGACAGCGACGTCTGCCGGTTTT
F210A_R	AAAACCGGCAGACGTCGCTGTGCGCCAGCGTGCC
K236A_F	TTGGGCGCGCACGGGAAATGC
K236A_R	GCATTTCCCGTGCGCGCCCAA
R237A_F	TTGGGCGCAAAGCGGAAATGC
R237A_R	GCATTTCCGCTTTGCGCCCAA
G271A_F	GATTATCGCCGGTGGTATTGC
G271A_R	GCAATACCACCGGCGATAATC
G273A_F	ATCGGCGGTGCTATTGCCAG
G273A_R	CTGGCAATAGCACCGCCGAT

---

<b>Y501A_F</b>	GTGCTGTGCGCTGACGGTTATC
<b>Y501A_R</b>	GATAACCGTCAGCGCACAGCAC
<b>H573A_F</b>	GCCACCCGCGATGCTCTGCCAATGGTA
<b>H573A_R</b>	TACCATTGGCAGAGCATCGCGGGTGGC
<b>S617A_F</b>	GCTTTAGGTGCTCGCGTTTG
<b>S617A_R</b>	CAAACCGCGAGCACCTAAAGC
<b>R653A_F</b>	AACCCGAATGCGTTATGGGTGC
<b>R653A_R</b>	GCACCCATAACGCATTCGGGTT

**Clonación**

---

<b>Flag-MnmC(o)F</b>	GACTATA <sub>3</sub> GACGACGACGACA <sub>3</sub> C <sub>3</sub> TGCTC <sub>2</sub> GCGC <sub>2</sub> GTG <sub>2</sub> T <sub>2</sub>
<b>Flag-MnmC(o)R</b>	TTAC <sub>4</sub> GCCTTAACCGCT <sub>3</sub> ACCCTTCAAC
<b>Flag-MnmC(m)F</b>	GACTATA <sub>3</sub> GACGACGACGACA <sub>6</sub> CACTACTC <sub>2</sub> ATACAACC
<b>Flag-MnmC(m)R</b>	TTAGAGCGGTAATGTCTGTTCATCACC
<b>His-MnmCF</b>	TTCCATATGGTGAAACACTACTCCATACAA
<b>His-MnmC(m)R</b>	(CAT) <sub>5</sub> CACA <sub>3</sub> CACTACTCCATACA <sub>2</sub> CCTGC <sub>2</sub>
<b>tRNA<sup>Lys</sup>EcoRI</b>	CCGGAATTCGGGTCGTTAGCTCAGTTGGTAGAG
<b>tRNA<sup>Lys</sup>PstI</b>	TGCACTGCAGTGGTGGGTCGTGCAGGATTCGAAC
<b>tRNA<sup>Leu</sup>EcoRI</b>	CCGGAATTCGCCGGATGGTGGAAATCGGTAG
<b>tRNA<sup>Leu</sup>PstI</b>	TGCACTGCAGTGGTACCCGGAGCGGGACTTGAAC
<b>tRNA<sup>Cys</sup>EcoRI</b>	CCGGAATTCGGCGCGTTAACAAGCGGTTATG
<b>tRNA<sup>Cys</sup>PstI</b>	TGCACTGCAGTGGAGGCGGTTCCGGAGTCGAAC
<b>tRNA<sup>Gln</sup>EcoRI</b>	CCGGAATTCTGGGGTATCGCCAAGCGGTAAGG
<b>tRNA<sup>Gln</sup>PstI</b>	TGCACTGCAGTGGCTGGGGTACCTGGATTCGAACCAGG

**Purificación de tRNAs específicos**

---

<b>Lys5biotina</b>	Bt-TGGTGGGTCGTGCAGGATTCGAACCTG
<b>Leu5biotina</b>	Bt-TGGTACCCGGAGCGGGACTTGAACCC
<b>Gln5biotina</b>	Bt-GAACCAGGGAATGCCGGTATCAAAAAC
<b>Lyscithum5biotina</b>	Bt-TGGCGCCCCGAACAGGGACTTGAACCC

---

## 2.4 Enzimas de restricción y otras

Las enzimas de restricción se obtuvieron de MBI Fermentas, Amersham Bioscience Roche, New Englands Biolabs y Promega. La T4 DNA ligasa de Roche. La nucleasa P1 y la fosfatasa alcalina fueron de Sigma.

## 2.5 Transferencia e inmunodetección

Los anticuerpos primarios anti-Flag (monoclonal) y anti-GroEL (policlonal) fueron suministrados por Sigma y Calbiochem. El anticuerpo policlonal secundario antimouse conjugado a peroxidasa fue de Sigma. Para las inmunotransferencias se emplearon membranas de nitrocelulosa Hybond de Amersham Biosciences. Para el revelado se utilizó el sistema ECL y ECL advanced Western blotting Detection Kit (Amersham).

## 2.6 Purificación de proteínas

Se utilizaron los siguientes reactivos:

- Paso de inducción: IPTG (isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside), empleado para la inducción de proteínas con el sistema pGEX y pET, fue de Apollo Scientific LTD. Para proteínas con el sistema pBAD, se empleó Arabinosa de Sigma.

- Paso de incubación: Para la purificación de proteínas recombinantes fusionadas a GST (sistema pGEX) se empleó glutation-agarosa de Sigma y para las proteínas recombinantes fusionadas a Flag (sistema pBAD) se utilizó resina antiFLAG de Sigma.

- Paso de elución: para la purificación de proteínas recombinantes fusionadas a GST se utilizó glutatión reducido de MERCK y para la purificación de proteínas recombinantes fusionadas a Flag se usó péptido FLAG de Genscript.

- Concentración de muestra: los centricones empleados fueron Amicon Ultra 4 (NMWL 10 y 50K) y Ultrafree-0.5 Biomax-10K de la casa comercial Millipore. Las columnas de exclusión molecular utilizadas fueron: Superdex 75 10/300 GL y Superdex 200 10/300 GL de Amersham Biosciences.

## 3. Aparatos

Centrífugas: Sorvall RC-58 con rotores GSA, Hereaus Biofuge 22R. Beckman Coulter Allegra 64R. Eppendorf 5415R y miniSpinplus. PCR: termocicladores PTC-100 y PTC-150 de MJ Research. Espectrofotómetros y espetrofluorímetros: Jasco FP-6500, Nanodrop ND-1000 y SpectraMax de Molecular Devices. Sonicador: Labsonic de Braun. FPLC: ÄKTA purifier de Amersham Bioscience. HPLC: VWR Hitachi. SPR: Biacore

2000. Otros aparatos como cubetas y fuentes de electroforesis, balanzas, centrífugas de mesa, incubadores, baños, estufas, pHmetro,... habituales en un laboratorio de biología molecular.

#### **4. Programas informáticos**

Los programas más usados para la realización de esta tesis fueron: Microsoft Office 2007/2010 para el tratamiento de textos y datos. ENDNote para realizar bases de datos bibliográficas. Irfanview para tratamiento de imagen. Staden Package 2.0 y Chrome para visualización de secuencias de DNA. EZCHROM elite para visualización y análisis de datos en HPLC. BiaEvaluation versión 3.2 para el tratamiento de datos en Biacore. GraphPad Prism 5.0 para el procesado de datos, realización de gráficas y estadística. UCSF Chimera1.6v y Pymol para la manipulación de estructuras de macromoléculas. Programas y Bases de datos *on-line*: Expasyweb, LALIGNserver y webcutter para el análisis y manipulación de secuencias de ácidos nucleicos y proteínas. Bases de datos: Pubmed para búsqueda bibliográfica, PDB (*protein data bank*) para obtener los datos de las estructuras moleculares usadas, MODOMICS para obtener información de las modificaciones publicadas y CGSC (*coli genetic stock center*) como base de información de cepas de *E. coli*.

## **B. MÉTODOS**

### **1. Técnicas microbiológicas**

#### **1.1 Crecimiento y mantenimiento de las cepas bacterianas**

Todas las cepas se crecieron en cultivos líquidos en medio LBT (Luria-Bertoni: 10 g/l NaCl, 10 g/l Bacto-Triptona, 5 g/l de extracto de levadura y con 0.04 mg/ml de Timina) a 37° C con agitación de 175-200 rpm. Para purificar proteínas se usó un medio variante del LBT denominado medio rico (10 g/l de Bacto-Triptona, 24 g/l de extracto de

levadura, 4 ml/l de glicerol y 2.3 g/l de fosfato potásico). Cuando se requirió, los medios se adicionaban de antibióticos a las concentraciones finales indicadas: ampicilina 100 µg/ml, cloramfenicol 20 µg/ml, kanamicina 80 µg/ml y tetraciclina 15 µg/ml para seleccionar aquellas cepas de interés (el plásmido o la cepa tienen esa resistencia). A veces, se usó el medio mínimo (MM) compuesto de:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  11 g/l,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3 g/l,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  1 g/l,  $\text{NaCl}$  5 g/l,  $\text{CaCl}_2$  0.1M,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1M y tiamina (vitamina B1) 10 mg/l; y suplementado con glucosa 0.04% final (fuente de carbono). Todos los cultivos líquidos se midieron mediante turbidometría determinando la absorbancia a 600 nm en un espectrofotómetro.

Los medios sólidos utilizados fueron: LAT (LBT con 20 g de Agar Difco por litro), LA10 (2.5 g de Agar en 250 ml de LBT) y agar blando (7.5 g de agar por litro de agua) para las transducciones con el fago P1.

Para almacenar las cepas construidas a largo plazo se utilizaron dos métodos. El primero fue crecer en medio sólido (0.8 g de nutrient broth, 0.76 g de agar y 80 mg de timina) a temperatura ambiente durante 16 h y almacenarlos a temperatura ambiente. El segundo fue crecer a 37° C con agitación de 175-200 rpm en LBT la cepa y guardar con glicerol al 20% a -80° C.

## 1.2 Preparación de células competentes y transformación de una cepa bacteriana

El método usado para hacer células competentes es mediante tratamiento con  $\text{CaCl}_2$  en frío. Cada cepa de interés se crece en medio LBT con agitación y aireación abundante a 37° C y cuando alcanza aproximadamente una  $\text{DO}_{600}$  de 0.6, se recogen las células en frío previa incubación en hielo durante unos 15 min. Se resuspende en  $\text{CaCl}_2$  0.1 M frío y se incuba durante 30 minutos en hielo. Se recogen las células en frío y esterilidad mediante centrifugación a 6000 rpm y se resuspenden en  $\text{CaCl}_2$  0.05 M, añadiendo glicerol al 20% para almacenar a -80° C aquellas que no vayan a usarse el mismo día de obtención.

La transformación bacteriana es un proceso que permite introducir un DNA exógeno a la bacteria. Habitualmente, 100  $\mu$ L de células competentes (frescas o descongeladas en frío) se mezclaron con 0.1 $\mu$ g de DNA plasmídico exógeno a introducir. Se incubó durante 15 min en hielo para seguidamente someter a las células al choque térmico a 42° C durante minuto y medio. Se añade medio LBT y se incuban a 37° C durante 1 h con agitación. Se siembran en medio selectivo LAT y se dejan 24 h creciendo a 37° C. Una variante de este protocolo se utilizó para los ensayos de sobreexpresión de tRNA. Debido a que el plásmido usado se pierde durante “pocas” generaciones, es necesario transformar cada vez que se quiere obtener un cultivo con tRNA sobreexpresado. Por ello, en el paso final del protocolo las células recién transformadas se inoculan directamente en el medio LBT rico sin pasar por placas LAT.

### 1.3 Obtención de cepas mediante transducción con el fago P1

Para introducir la mutación deseada en el cromosoma de *E. coli* se hace uso de bacteriófagos que nos permiten, mediante recombinación homóloga, transferir un carácter genético deseado de una bacteria a otra. El proceso consta de dos partes:

- Obtención del stock viral del fago P1 recombinado con la cepa portadora de la mutación: se usa la cepa portadora del gen de interés para la obtención de lisados con bacteriófago P1. En los lisados existen cápsulas virales conteniendo regiones cromosómicas, algunas de las cuales serán portadoras de la mutación deseada junto al marcador de resistencia. Se crece la cepa hasta una DO<sub>600</sub> aproximada de 0.4 y se añade CaCl<sub>2</sub> 5 mM dejándose 30 minutos a 37° C. De este cultivo se toman 0.25 ml y se ponen en contacto con 0.1 ml del virus P1 a una concentración de 10<sup>8</sup> fagos/ml. Se incubó durante 30 minutos a 37° C para favorecer la preadsorción del virus y se añaden 4 ml de agar líquido, se extiende en placas LA10 (1g de agar en 100 ml de LBT). Después de incubar a 37° C durante toda una noche se recoge el agar de la superficie de la placa, donde se encuentra el fago P1, se tritura en unas gotas de cloroformo y mediante centrifugación a 10.000 g durante 30 minutos se recupera.

- Transferencia de caracteres genéticos mediante transducción con el fago P1 y selección de transductantes portadores de la mutación por selección mediante algún gen marcador: el stock del fago P1 que contiene cápsulas virales, alguna de las cuales lleva la copia del gen deseada con el marcador de resistencia, es usado para la posterior infección de la cepa receptora a la que se quiere transferir la mutación siguiendo el método de Miller (Miller, 1992). Para ello, se parte de un cultivo fresco crecido hasta el inicio de la fase exponencial, se centrifugan 0.1 ml de células y se resuspenden en el mismo volumen de tampón MgSO<sub>4</sub> 0.1 M y CaCl<sub>2</sub> 5 mM, se toman 0.1 ml de células y se ponen en contacto con 0.1 ml del fago P1 (generalmente a una dilución 10<sup>-1</sup> y 10<sup>-2</sup>, diluido en LBT y CaCl<sub>2</sub> 5 mM), se incuba a 37° C durante 20 minutos para permitir la adsorción del virus. Posteriormente se añade 1 ml de MM (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 11g/L + KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3g/L + NH<sub>4</sub> 1g/L + Cl<sub>2</sub>Ca 0.1M + MgSO<sub>4</sub> 1M) con citrato sódico 10 mM (para inactivar el fago P1: precipitan los iones Ca<sup>2+</sup> evitando la reinfección por el P1) y se incuba durante una hora más para permitir la expresión de la resistencia al antibiótico que estamos seleccionando. Se centrifugan las células y se resuspenden en un volumen menor que permita extender las células en una placa LAT con citrato sódico 10 mM y la resistencia adecuada. Las placas se dejan incubando durante toda la noche a 37° C y al día siguiente las colonias de las cepas transducidas son seleccionadas y analizadas mediante el análisis de su DNA genómico. Se realiza la amplificación del gen por PCR y se determina la presencia del gen o la mutación mediante enzimas de restricción y/o secuenciación del fragmento. En los casos en que el gen de interés estaba interrumpido por una construcción del tipo *cassette* ( $\Delta mnmC::kan$ ) la verificación fue por PCR ya que el tamaño suele ser diferencial respecto al gen salvaje.

#### 1.4 Ensayos de complementación *in vivo*

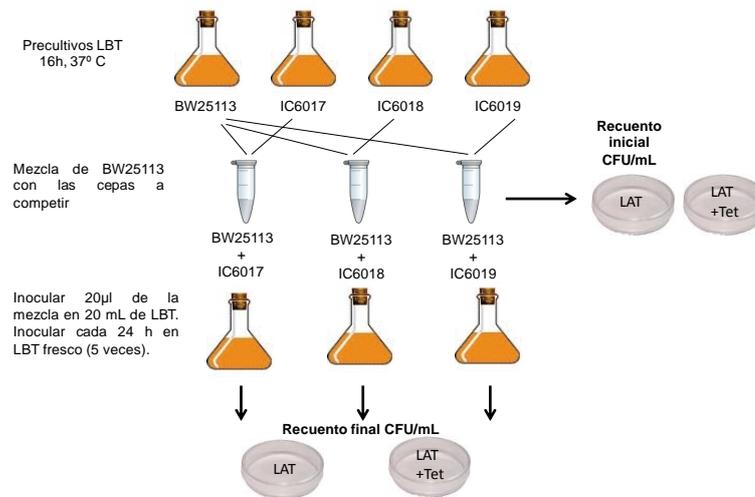
Las cepas mutantes *mnmC*-W131stop o *mnmC(m)*-G68D fueron transformadas con el plásmido pBAD-TOPO conteniendo los dominios MnmC(o) y MnmC(m) salvajes, o los mutantes de MnmC(m). Se realizó una dilución (dilución 1:100) del pre-cultivo de partida en 75 mL de LBT + antibióticos ( $\pm$  0.2% arabinosa) y se crecieron hasta una DO<sub>600</sub> de 0.4-0.5. Se centrifugó (4500 g durante 15 min a 4 °C) y se obtuvieron los tRNAs según se describirá en un apartado posterior. Este mismo protocolo se realizó para

la complementación *in vivo* de las proteínas de los dominios que llevan mutaciones puntuales.

### 1.5 Determinación de los tiempos de doblaje de una cepa bacteriana

Las cepas de interés se crecieron durante 16 h a 37° C para inocular 1:100 en LBT. Previo seguimiento del crecimiento durante la fase exponencial cada 30 min a DO<sub>600</sub>, el cultivo se diluyó a la mitad dos veces antes de alcanzar una DO<sub>600</sub> = 0.4. Los valores de DO<sub>600</sub> se graficaron frente al tiempo y se ajustaron con el programa GraphPad Prism v5.0 usando la ecuación de crecimiento exponencial  $Y=Y_0 \cdot \exp(k \cdot X)$ . Los valores finales fueron resultado de 2-3 ensayos independientes.

### 1.6 Ensayos de competición microbiana



**Figura 11. Esquema del ensayo de competición entre la cepa BW25113 y las cepas problema IC6017, IC6018 e IC6019.**

Las cepas de interés se crecieron en precultivos durante 16 h a 37° C. Se inoculó un volumen tal de precultivo para que hubiera una mezcla 1:1 de la cepa BW25113 (a una DO<sub>600</sub> ≈ 0.150) y las cepas problema (IC6017, 6018 y 6019) en 20 ml de LBT sin resistencia (Figura 11). Se plaquearon 100 µL de una dilución 10<sup>-5</sup>-10<sup>-6</sup> del cultivo en

LAT y LAT suplementado con tetraciclina (recuento inicial como CFU/mL). Cada 24 horas se inoculó 20 µl del cultivo en 20 ml de LBT fresco. Al sexto pase de 24 h, se plaquearon 100 µL de una dilución  $10^{-6}$ - $10^{-7}$  del cultivo en LAT y LAT suplementado con tetraciclina. Se dejó crecer para posteriormente contar las colonias (recuento final de supervivencia como CFU/mL).

## 2. Técnicas de ingeniería genética y bioquímica de proteínas

### 2.1 Aislamiento, purificación y electroforesis de DNA

El aislamiento y purificación se realizaron mediante kits comerciales para aislar DNA cromosómico, plasmídico y producto de PCR. El DNA cromosómico o plasmídico purificado es posteriormente analizado mediante secuenciación para la detección de mutaciones. Las electroforesis de DNA fueron en :

- Agarosa: en función del tamaño del fragmento a analizar la separación mediante electroforesis fue realizada en geles de agarosa cuyo porcentaje varió entre 0.8% y 3%. El tampón de electroforesis empleado fue TBE (89 mM Tris, 89 mM ácido bórico, 2 mM EDTA pH 8).

- Poliacrilamida (SSCP): esta técnica permite la detección de variaciones en la secuencia de un fragmento de DNA por comparación de los patrones de migración de un fragmento de DNA amplificado y sometido a desnaturalización seguida de enfriamiento rápido y electroforesis en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes. El cambio en una única base de la secuencia puede dar lugar a patrones de migración diferentes. Esta técnica no determina la mutación pero nos permite hacer un *screening* previo de los clones candidatos a llevar “una” mutación y posteriormente mediante secuenciación se confirma la presencia de la mutación. Se amplificaron fragmentos de 500 nucleótidos aproximadamente, mediante PCR a partir de colonias aisladas, usando un oligonucleótido perteneciente al gen *mnmC* (tabla 5) y otro al plásmido pBAD-TOPO

(pBAD *forward* o *reverse*, comerciales). Debido a los tamaños de los fragmentos, los geles se hicieron correr a 395 volts en geles del 10% de poliacrilamida. La rampa de temperatura se consiguió con un baño termostatzado (Selecta, Frigiterm) y fue la siguiente: 2 °C durante 25 min, 4 °C durante 20 min, 8 °C durante 15 min, 12 °C durante 10 min y 18 °C durante 10 min. Para observar las bandas se hizo una tinción con plata de la siguiente forma: se lavó el gel 10 min con etanol al 10%, se sumergió 3 min en una solución de ácido nítrico al 1%, se hicieron dos lavados de 30 s en agua bidestilada, se tiñó con nitrato de plata 2.02 g/l durante 20 min y se reveló con una solución de carbonato sódico anhidro (29.6 g/l) y 450 µL de formaldehído al 37% preparada en el momento.

## 2.2 PCR, mutagénesis y verificación de mutaciones

La PCR (reacción en cadena de la DNAPolimerasa) se utilizó para amplificar fragmentos de DNA para su posterior uso en varias técnicas:

- clonación de genes o fragmentos de genes en vectores de interés.
- mutagénesis dirigida (ver apartado posterior)
- verificación de la presencia de una mutación introducida en un plásmido o en el cromosoma bacteriano.

Las condiciones de la reacción de PCR variaron dependiendo del tamaño del fragmento a amplificar, de la  $T_m$  de los oligos y según las especificaciones de las DNA polimerasas empleadas.

La Mutagénesis dirigida se realizó siguiendo las indicaciones de Stratagene para la mutagénesis dirigida con la enzima Herculase<sup>TM</sup> Enhanced DNA Polymerase. Para la mutagénesis de los residuos seleccionados, se utilizaron los plásmidos pIC1532 (Flag-MnmC(o)) y pIC1340 (Flag-MnmC(m)), tabla 4. Los oligonucleótidos usados para mutar aquellos residuos presentados en este trabajo se muestran en la tabla 5. La diferencia entre el plásmido original y el sintetizado mediante PCR es que el original, al provenir de

una cepa con actividad modificadora *dam*<sup>+</sup> (añade grupos metilo en las adeninas), se encuentra metilado, mientras que el producto de PCR no está metilado. Por ello, cada reacción resultante se sometió a digestión con 0.5  $\mu$ l (1 unidad por  $\mu$ l) del enzima DpnI (NewEngland Biolabs) durante 16 h, la cual reconoce y corta una secuencia altamente abundante en los DNAs (GA<sup>m</sup>TC). Posteriormente, se transformaron células competentes de la cepa DH5 $\alpha$ . Para la búsqueda y análisis de los mutantes se utilizaron técnicas como SSCP (*single strand conformation polymorphism*) y digestión por enzimas de restricción. Cada clon de interés aislado se validó como mutante por secuenciación completa del inserto (Servicio de secuenciación del CIPF).

El oligonucleótido para conseguir la mutación D156A se diseñó creando un sitio diferencial de restricción con el enzima HaeII con respecto a la secuencia salvaje de MnmC(m). Se amplificó por PCR el dominio MnmC(m) completo, a partir de colonias aisladas de la cepa MnmC(m) salvaje (pIC1532) y clones de D156A a testar. Seguidamente, el producto de PCR se digiere con 0.5  $\mu$ l del enzima HaeII (Biolabs) por cada 500 ng de DNA incubando a 37 °C durante 3h. El digerido se cargó en un gel de agarosa del 1% y se tiñó con bromuro de etidio.

### 2.3 Sobreexpresión y purificación de proteínas

Para construir los plásmidos pIC1253, pIC1340 y pIC1532, el gen *mnmC* (2004 pb) y los dominios *mnmC(o)* (750-2004 pb) y *mnmC(m)* (0-750 pb) del gen *mnmC* fueron amplificados en nuestro laboratorio mediante PCR a partir del DNA genómico de la cepa MG1655 de *E. coli*. Los oligos usados fueron Flag-MnmC(o)F, Flag-MnmC(o)R, Flag-MnmC(m)F y Flag-MnmC(m)R. Estos se resumen en la tabla 5. Los amplificados que llevan el epítipo FLAG (octapéptido DYKDDDDK) en el extremo N-terminal se introdujeron en el sistema de expresión pBAD-TOPO. Este sistema se caracteriza por ser de moderada expresión ya que utiliza el promotor P<sub>araC</sub>, inducible por arabinosa, y su uso es bastante aconsejable para tratar con proteínas que tienen problemas de solubilidad. Cuando la proteína es bastante soluble, usamos el plasmido pET15b que lleva el promotor fuerte T7, inducible por IPTG. Este sistema está diseñado para etiquetar las

proteínas recombinantes en su extremo terminal mediante el epitopo 6xHis y es capaz de producir mayores cantidades de proteína recombinante.

Para obtener proteína recombinante, se sembró una colonia aislada de las cepas IC6023 (Flag-MnmC), IC6029 (Flag-MnmC(o)) e IC6030 (Flag-MnmC(m)) en 5 ml de LBT suplementado con ampicilina y kanamicina y se creció durante 16 h a 37 °C con agitación (175 rpm). Después, 1 L de LBT-medio rico con las mismas resistencias fue inoculado (dilución 1:100) y crecido a 37 °C con agitación hasta una DO<sub>600</sub> de 0.5. La inducción de la proteína se realizó entonces con 0.2 % de arabinosa. Los cultivos se dejaron crecer durante 4 h a 30 °C y 150 rpm. Se recogieron las células centrifugando durante 15 min a 4 °C a 4500 g. Se lavaron con tampón TBS (Tris 50 mM pH 7.5 150 mM NaCl 5 mM MgCl<sub>2</sub>) y se guardaron a -20°C. Para purificar las proteínas, las células se descongelaron en hielo y se resuspendieron en 20 ml de tampón de lisis TBS + 1mM PMSF + 1 mM EDTA. Las células se rompieron por ultrasonidos. El lisado se centrifugó a 10000 g durante 45 min y a 4 °C. El lisado se pasó por cromatografía de afinidad usando la resina antiFlag® M2 Agarose (Sigma) y siguiendo básicamente el protocolo descrito por el fabricante. Las proteínas se eluyeron con 1 mM de péptido Flag, y se dejaron en el tampón final Tris 50 mM pH 7.5 150 mM NaCl 5 mM MgCl<sub>2</sub>.

Las proteínas purificadas con el sistema His fueron MnmC(m) y MnmG de *E. coli*. El protocolo de obtención se basa en las publicadas en Shi *et al.*, 2009. Finalmente, el sistema pGEX permite la purificación de proteínas fusionadas a GST mediante cromatografía de afinidad con glutation inmovilizada sobre agarosa. Este protocolo se utilizó para purificar la proteína MnmE salvaje (Cabedo *et al.*, 1999).

#### 2.4 Cuantificación de proteínas y electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes y nativos

Se estimó la concentración de cada proteína en el espectrofotómetro Nanodrop® y se verificó su purificación mediante geles de SDS-PAGE al 10%. La separación de proteínas fue llevada a cabo por electroforesis en geles de poliacrilamida verticales SDS-

PAGE según el método de Laemmli (Laemmli., 1970). La electroforesis es llevada a cabo en tampón Tris-HCl 25 mM, glicina 14.4 g/l (192 mM) y SDS 1 g/l. Previamente, las muestras se desnaturalizaron en el tampón de carga durante 5 min a 95° C. Una vez finalizada la electroforesis los geles se tiñeron con una solución de azul de coomasie (0.25% coomasie brilliant Blue R-250 de Biorad, 10% de isopropanol, 10% ácido acético) o bien fueron sometidos a inmunotransferencia. En algún caso se hicieron geles nativos de poliacrilamida. Estos se hicieron igual que los desnaturalizantes pero sin añadir SDS ni DTT. Se corrieron siempre a 4 °C.

Para las tinciones de los geles de poliacrilamida se incuban en un baño con una solución de tinción (0.25% coomasie brilliant blue R250, 10% isopropanol, 10% ácido acético) durante 5 min. Una vez teñido el gel es desteñido parcialmente con una solución de isopropanol (10%) y ácido acético (10%) en agua.

## 2.5 Transferencia de proteínas a un soporte sólido

Tras realizar la electroforesis y separación de proteínas en gel de SDS-PAGE, estas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa en tampón Tris-glicina (192 mM glicina) aplicando una corriente de 390 mA constantes durante 1h a 4°C.

## 2.6 Inmunodetección de proteínas sobre soporte sólido

La inmunodetección se realizó con los anticuerpos primarios AntiFlag (1:5000) y AntiGroEL (1:10000) y con un secundario Anti-Mouse (1:5000). La membrana se incubaba un mínimo de 1 hora en tampón de bloqueo (leche en polvo desnatada al 5% en TBS (TrisHCl 100 mM, NaCl 150 mM) para evitar uniones inespecíficas del anticuerpo. Tras el bloqueo, la membrana se incubaba con el anticuerpo diluido en tampón TBS. Seguidamente, la membrana se lava dos veces durante 15 minutos con tampón de lavado (TBS con tween 20 al 0.1%) para eliminar restos de anticuerpos que no se han unido específicamente a la proteína y a continuación, se incubaba la membrana con el segundo anticuerpo que reconoce el IgG del animal en que fue obtenido el primer anticuerpo y que

se encuentra conjugado a peroxidasa para permitir la detección por quimioluminiscencia. La membrana es lavada dos veces con tampón de lavado y se procede a la detección con el sistema Lumi-light Western Blotting Substrate (Roche) exponiendo la membrana sobre una película para autoradiografía durante 1-10 min y revelándola en la reveladora Agfa Curix 60.

### **3. Técnicas de ARN**

#### 3.1 Purificación del tRNA total

Para obtener tRNA total de *E. coli* las cepas correspondientes en cada caso se crecieron en medio Luria-Bertoni a 37° C hasta las DO<sub>600</sub> correspondientes según el caso. Las células fueron lisadas y el RNA total obtenido (Emilsson *et al.*, 1990) se resuspendió en tampón R200 (100 mM Tris-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6.3, 15% Etanol, 200 mM KCl) y se añadió a columnas Nucleobond (AX500) equilibradas con el mismo tampón. La columna se lavó con 6 ml de tampón R200 y 2 ml de tampón R650 (igual que R200 pero conteniendo 650 mM KCl). La elución del tRNA total se consiguió con 7 ml de tampón R650 y posteriormente, se precipitó con 0.7 volúmenes de isopropanol frío mediante centrifugación a 4 °C durante 45 min a 7000 rpm. Los precipitados se lavaron dos veces con etanol 70% frío y se secaron para más tarde disolverlos en agua. Por último, se cuantificó en el espectrofotómetro Nanodrop® y se alicuotaron guardándose a -20°C.

#### 3.2 Obtención de tRNAs transcritos *in vitro*

Para obtener el tRNA requerido para los ensayos de unión tRNA-proteína por SPR y para las reacciones *in vitro* se construyeron plásmidos que contienen un gen sintético que corresponde al promotor de la RNA polimerasa T7 directamente conectado con la secuencia aguas abajo del tRNA y terminado con un sitio de restricción *Bst*NI. A continuación, estos plasmidos fueron digeridos con el enzima *Bst*NI para usarse como

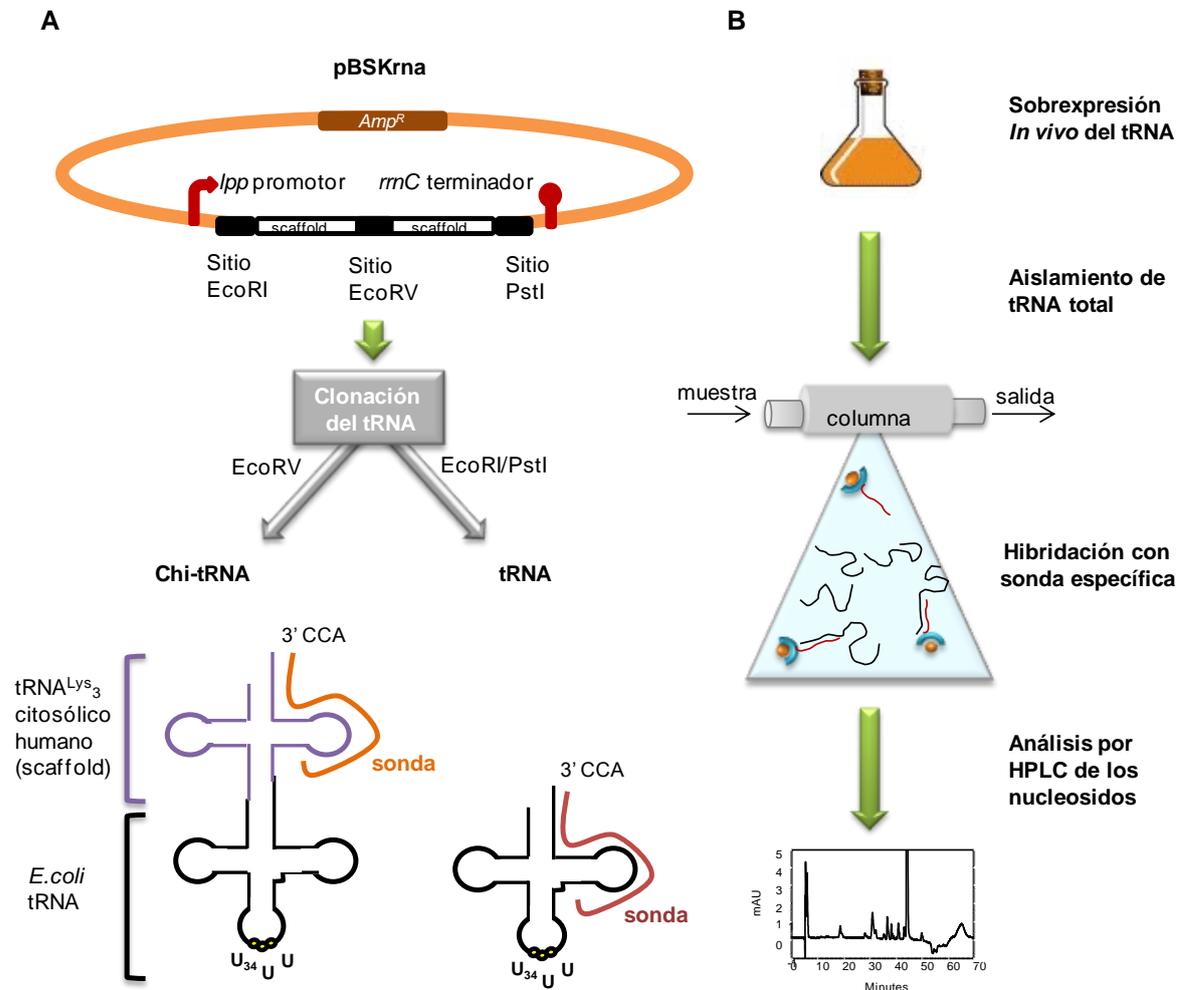
molde para la RNA polimerasa T7 en la reacción de transcripción *in vitro* de tRNAs. Dicha reacción fue llevada a cabo mediante uso del sistema de transcripción *in vitro* Riboprobe (Promega), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los tRNAs fueron extraídos mediante fenol, precipitados con etanol y purificados con las columnas de cromatografía Micro Bio-Spin 6 (BioRad). El estado del tRNA se verificó en un gel del 3% de agarosa.

### 3.3 Purificación de tRNAs nativos y sobrexpresados

Para obtener tRNA específico *in vivo* (el cual portará las modificaciones post-transcripcionales según la cepa en la que se haya sobrexpresado), se construyeron plásmidos (pBSK<sub>rna</sub>, donado por Dr. Dardel) conteniendo el gen de cada tRNA de interés. El plásmido pBSK<sub>rna</sub> lleva un promotor constitutivo (lpp) y la secuencia del tRNA citosólico humano sin el anticodón con sitios de restricción donde se inserta la secuencia del tRNA a clonar (Figura 12). Así en la célula se expresará nuestro tRNA de interés unido al tRNA citosólico humano o *scaffold* (chi-tRNA). Una variante realizada en el laboratorio fue la obtención de tRNA específico sin llevar el tRNA citosólico humano (sitios de corte EcoRI/PstI).

El protocolo seguido en la obtención de estos tRNAs fue el siguiente. El plásmido pBSK<sub>rna</sub> con el tRNA de interés se introdujo en la cepa correspondiente por transformación bacteriana y se dejó crecer en cultivo líquido 16 horas con agitación mínima de 200 rpm a 37° C. Se recogieron las células y se extrajo el RNA total mediante el método usado para la obtención de tRNA total nombrado arriba. A continuación, el chi-tRNA fue separado del resto de tRNAs mediante cromatografía de afinidad basada en la unión biotina-estreptavidina siguiendo el método descrito por Suzuki and Suzuki (2007). Básicamente, eso consiste en hibridar específicamente el tRNA de interés con el oligonucleótido biotinilado (complementario a la secuencia del tRNA citosólico humano que sirve de andamio en el caso de chi-tRNA o a las secuencias de los tRNAs sobrexpresados sin andamio) y previamente inmovilizado sobre una columna de

estreptavidina- sefarosa. Así, el RNA total se pasa varias veces por columnas de afinidad HiTrap Streptavidin HP (1 ml de GE Healthcare) hibridando específicamente a 72° C el tRNA quimera con el oligonucleótido biotinilado específico a la secuencia del tRNA. Finalmente, se eluye el tRNA quimera por un gradiente de sales. El rendimiento de purificación de tRNAs fue aproximadamente de 1 mg/150 mL de cultivo en LBT.



**Figura 12. Método de obtención de tRNAs sobrexpresados en *E. coli*.** A. Esquema del pBSKrna y los tRNA resultantes de la clonación con cualquier tRNA insertado en los sitios EcoRV y EcoRI/PstI. B. Protocolo esquematizado para la obtención de estos tRNAs (Suzuki and Suzuki, 2007; Ponchon *et al.*, 2009).

Para obtener tRNA *nativo* de *E. coli*, primero se purifica el tRNA total de la cepa de interés y luego se hibrida con la sonda específica para cada tRNA al igual que con el sobrexpresado, obteniéndose cantidades de unos 30 µg/400 mL de cultivo inicial en LBT.

### 3.4 Medida del estado de modificación de la U34

Para determinar la composición de nucleósidos modificados en la U34 según la fase de crecimiento celular se cultivaron las cepas deficientes en la actividad MnmC en medio LBT o medio mínimo (MM) siguiendo el crecimiento mediante la medida de la DO<sub>600</sub> y recogiendo alícuotas del cultivo (en la fase de crecimiento deseada) para procesarlo y obtener los tRNA totales, sobrexpresados o nativos tal y como se ha explicado anteriormente.

## 4. Otras técnicas

### 4.1 Separación proteica por FPLC

El análisis de los dominios de MnmC y la proteína MnmC entera fue llevada a cabo usando la columna Superdex 75 10/300 GL en el tampón Tris 50 mM pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM DTT a un flujo de 0.8 µl/min. Esta técnica fue realizada en el servicio de proteómica del CIPF.

### 4.2 Análisis del contenido de nucleósidos de un tRNA por HPLC

Los nucleósidos digeridos con nucleasa P1 y fosfatasa alcalina de cada muestra de tRNA a analizar se corrieron por cromatografía líquida de alta presión -HPLC- en fase reversa (Gehrke and Kuo, 1989) en una columna Develosil C30 (2503 4.6 mm; Phenomenex Ltd.). Se cargaron de 40 a 75 µg de cada muestra cuando se trataba de tRNA total, y entre 1 y 30 µg para tRNAs sobrexpresados u obtenidos *in vitro*. Los cromatogramas resultantes fueron escaneados a 314 nm de longitud de onda para detectar los nucleósidos con tiolación o a 254 nm para detectar los nucleósidos no tiolados. Hay que tener en cuenta en los cromatogramas que el medio Luria-Bertoni es deficiente en Selenio por lo que los tRNAs aislados de los cultivos portan el Sulfuro en posición 2 en vez de Selenio. Todas las modificaciones se identificaron por el tiempo de elución y su espectro, característicos, siguiendo las indicaciones de Gehrke and Kuo, 1989. Los

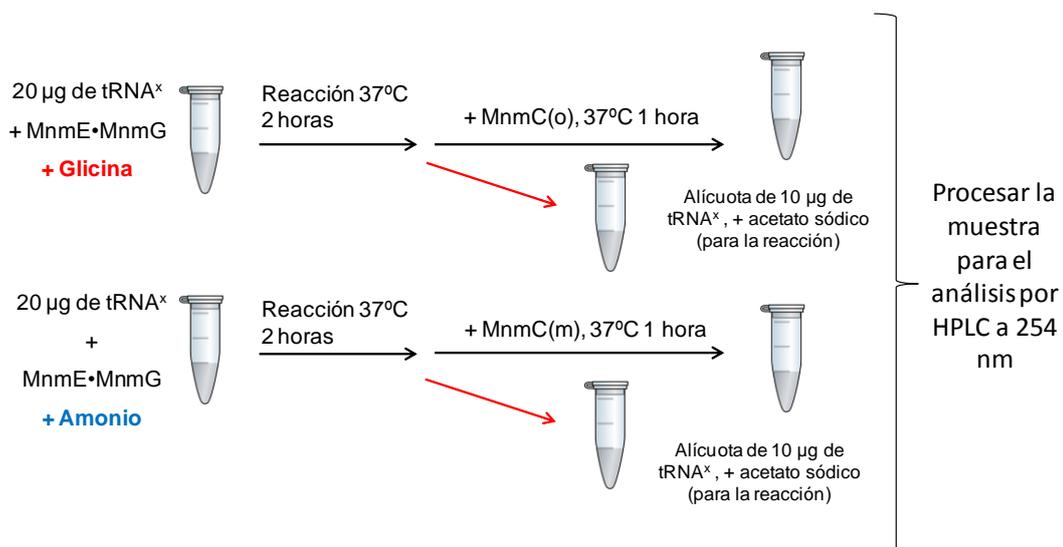
tampones empleados para correr la muestra fueron: Tampón A ( $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  10 mM y metanol 2.5% ajustado con  $\text{NH}_4\text{OH}$  a pH 5.3), Tampón B ( $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  10 mM y metanol 25%), Tampón C (50:50 (acetonitrilo:agua)) y Tampón D (70% metanol. Se usa para guardar la columna).

#### 4.3 Vida media de las proteínas recombinantes

El mutante  $\Delta mnmC$  (IC6010) se transformó con los plásmidos pIC1253 (Flag-MnmC), pIC1340 (Flag-MnmC(m)) o pIC1532 (Flag-MnmC(o)). La expresión de las proteínas recombinantes bajo el control del promotor  $P_{araC}$  es inducida por L-arabinosa y reprimida por glucosa. Se crecieron las células a 37°C durante 2 horas en LBT con 0.2% de arabinosa a partir de precultivos crecidos durante toda la noche. Para parar la síntesis de las proteínas recombinantes se recogieron las células mediante centrifugación y se lavaron con medio LB para eliminar el inductor. Los pellets se diluyeron en el mismo volumen de LBT + 1% glucosa para reprimir el promotor. Se dejaron 5 minutos a 37°C y se fueron recolectando alícuotas a distintos tiempos para obtener el extracto proteico total de las células. Se analizaron de 50 a 150  $\mu\text{g}$  de proteína total mediante inmunodetección con los anticuerpos antiFlag y antiGroEL.

#### 4.4 Reacción de modificación de tRNA

Los tRNA totales se obtuvieron de cepas mutantes para las actividades MnmC(o) o MnmC(m), respectivamente, tal como se describe más arriba. Un total de 50  $\mu\text{g}$  del tRNA total fue incubado en 200  $\mu\text{l}$  de mezcla de reacción total conteniendo tampón A: 50 mM de Tris-HCl (pH 8.0), 3% de glicerol y 50 mM acetato amónico. Se añadió FAD o SAM a 0.5 mM dependiendo de qué actividad era ensayada y 2  $\mu\text{M}$  de proteína recombinante purificada Flag-MnmC(o) o Flag-MnmC(m). Se incubó la mezcla 30 min a 37° C con agitación suave (450 rpm), y se recogieron los tRNAs por fenolización y precipitación con etanol. Por último, se realizó la digestión con nucleasa P1 y fosfatasa alcalina para analizar posteriormente los nucleósidos en HPLC de fase reversa. Como control negativo se utilizó en cada reacción la misma mezcla pero sin proteína recombinante.



**Figura 13. Esquema del protocolo seguido para la reacción *in vitro* con tRNA específico transcrito *in vitro*.** tRNA<sup>x</sup>= Lisina, Glutamina o Leucina.

Para realizar la reacción con tRNA transcrito *in vitro* se realizó la reacción con MnmEG durante 2 horas a 37° C, añadiendo amonio (100 mM) o glicina (2 mM) según la vía que queríamos estudiar: tampón tris 100 mM pH 8, 20 µg tRNA específico, 2 µM complejo MnmEG, 1 mM tetrahidrofolato (THF), 1 mM FAD, 5 mM DTT, 20 µg BSA, 2 mM GTP, 3 % glicerol y 5 mM MgCl<sub>2</sub>. Seguidamente se obtuvo una alícuota correspondiente a 10 microgramos de tRNA y se añadió el mismo volumen de acetato sódico pH 5.2 para parar la reacción. El resto de la mezcla se hizo reaccionar con cada dominio de MnmC en las mismas condiciones comentadas para MnmC durante 1 hora. Los tRNAs se procesaron para el análisis por HPLC a 254 nm (Figura 13).

#### 4.5 Cinéticas enzimáticas determinadas por HPLC

Las cinéticas se realizaron con concentraciones variables de chi-tRNA<sup>Lys</sup> obtenidos en distintas cepas manteniendo constantes y en valores saturantes los demás sustratos o cofactores de la reacción respecto a la concentración de enzima usada. Todas las reacciones se hicieron a 37° C con agitación en volúmenes de 100 µl. El tiempo de la reacción y la concentración de enzima fueron determinadas para cada actividad en ensayos previos optimizando las condiciones ya conocidas (Hagervall *et al.*, 1987, Pearson and Carell; 2011, Moukadiri *et al.*, 2009). Después, de parar la reacción con 100

μl de acetato sódico 0.3 M pH 5.2, los tRNAs se recuperaron por fenolización y precipitación con etanol y se digirieron con nucleasa P1 y fosfatasa alcalina para analizar los nucleósidos resultantes por HPLC. El área de los productos formados (nm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U, mnm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U o cmnm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U) se calculó mediante el programa de análisis EZCHROM elite y se obtuvo el valor en ηg extrapolando en curvas patrón de nucleósidos comerciales (rango de concentración de 0 a 250 ηg). Se hicieron de 2-3 experimentos independientes de cada ensayo. Para determinar los valores de V<sub>max</sub> y K<sub>m</sub> los datos se graficaron y se ajustaron a la ecuación de Michaelis-Menten usando una regresión no lineal en el programa GraphPad Prism 5.0.

Específicamente, el ensayo de actividad metiltransferasa con MnmC y MnmC(m) se realizó en tampón 50 mM Tris-HCl, pH 8, 50 mM acetato de amonio, 3% glicerol, 2 mM NaCl y 73 μM MgCl<sub>2</sub>; con 25 ηM de Flag-MnmC o Flag-MnmC(m), 100 μM de SAM y concentraciones variables de chi-tRNA<sup>Lys</sup> (0.5-5 μM) purificados de la cepa IC6018 (acumula nm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U). Las mezclas se preincubaron a 37° C durante 3 min antes de añadir la enzima. El tiempo de reacción fue de 60-90 segundos.

El ensayo de actividad óxido-reductasa de MnmC y MnmC(o) se realizó en el mismo tampón que la actividad metiltransferasa, con 25 ηM de Flag-MnmC o Flag-MnmC(o) y 100 μM de FAD. Las concentraciones de chi-tRNA<sup>Lys</sup> purificado en la cepa IC6010 fueron de 0.5-10 μM. Las mezclas se preincubaron a 37° C durante 3 min antes de añadir la enzima. El tiempo de reacción fue de 60-90 segundos.

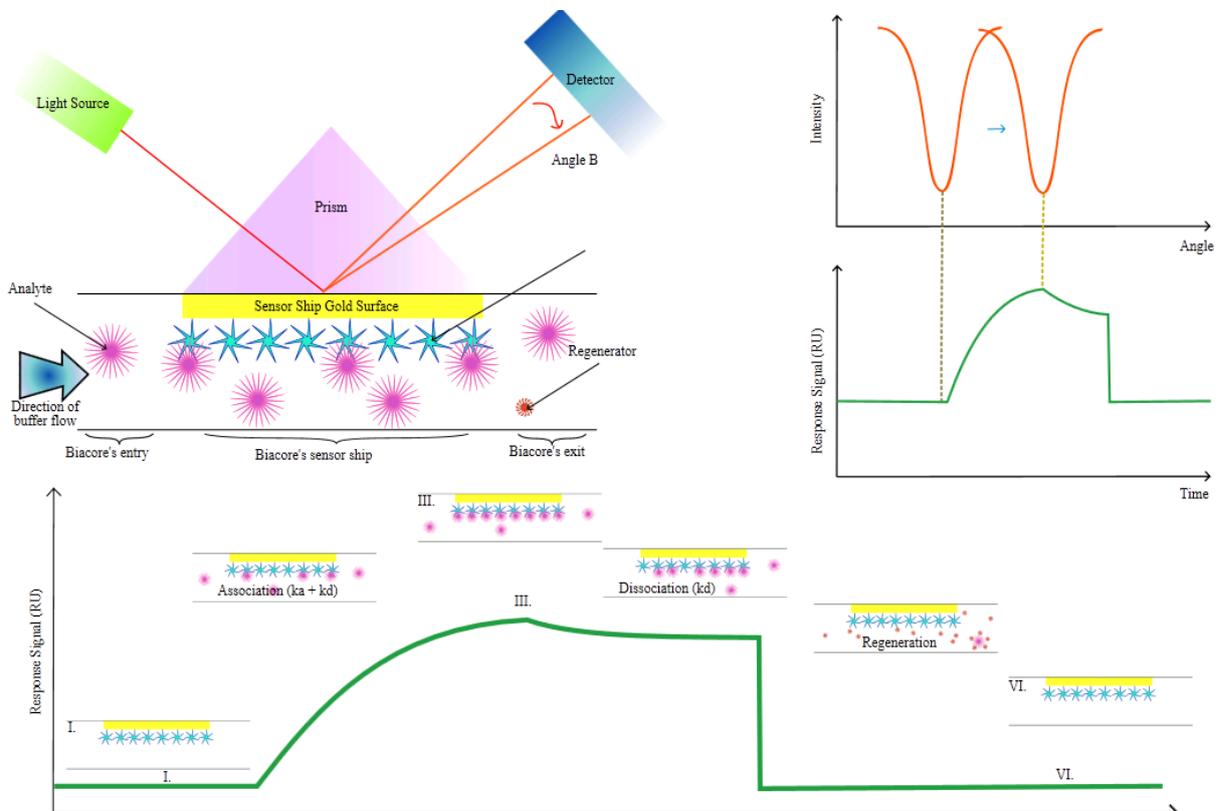
Para la cinética de MnmEG (vía del amonio), un volumen de reacción de 100 μL, conteniendo Tris-HCl pH 8, 100 mM acetato amónico, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5% glycerol, 5 mM DTT, 0.5 mM FAD, 2 mM GTP, 1 mM metileno-THF, 10 mg BSA y concentraciones variables de tRNA (0.1-2 mM), se hizo reaccionar con 0.1 mM del complejo MnmEG obtenido como se describe en Moukadiri *et al.*, 2009. La reacción se paró 2 min después con 100 μL de acetato sódico pH 5.2. Y se procesaron y analizaron los tRNAs como se describe más arriba.

#### 4.6 Determinación de interacciones moleculares por SPR-Biacore

La tecnología SPR (Biacore) se basa en un método físico-óptico en el que se mide el índice de refracción cercano a la superficie del sensor (biosensor). En el Biacore esta superficie forma parte de una celda de flujo con capacidad de 20 a 60  $\eta$ l en la que la solución acuosa pasa continuamente en un flujo determinado que puede ir de 1 a 100  $\mu$ l/min (Figura 14). Con este sistema se pueden detectar y medir interacciones proteína-proteína, proteína-ácido nucleico o proteína-cofactor o molécula pequeña. Para ello, debe inmovilizarse una de ellas (ligando) a la superficie del sensor mientras que la otra molécula (analito) se inyecta en solución a través de la celda de flujo. Conforme el analito se une al ligando hay un incremento en el índice de refracción que es medido en tiempo real y el aparato manda esta medida como una señal en RU (unidades de resonancia) frente al tiempo resultando ser un sensograma. Un RU es la unión de 1 picogramo de proteína/ $\text{mm}^2$ . El Biacore aporta información sobre la afinidad de la interacción evaluada (constante de equilibrio,  $K$  y la energía libre de Gibbs,  $\Delta G$ ), la estequiometría de la reacción ( $n$  o número de moléculas unidas al sensor), efectos cooperativos de la interacción y cinética de la unión ( $K$ ).

En esta tesis se utilizó esta tecnología para detectar interacciones proteína-proteína o proteína-ácido nucleico (tRNA). El modelo de aparato usado fue Biacore 2000. El tampón usado para los ensayos fue TBS (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5 mM DTT y 0.0005% tween20). Para el ensayo de interacción de los dominios de MnmC se usó un chip CM5 (dextran-carboximetilado) inmovilizado con el anticuerpo anti-His. La proteína His-MnmC(m) fue añadida a 2  $\mu$ M generando una señal de 600 RU. Después, se inyectaron concentraciones crecientes de Flag-MnmC(o) con un flujo de 30  $\mu$ l/min a 25° C durante 1 min de captura. Para el ensayo de interacción tRNA-proteína se usó el chip SA (streptavidin) inmovilizado con un oligonucleótido poliT. Se pasó el tRNA<sup>Lys</sup> transcrito *in vitro* (por lo que está sin modificar) con una cola poliA a una concentración de 25  $\eta$ g/ $\mu$ l con un flujo de 10  $\mu$ l/min durante 1 min. Seguidamente, se inyectó la proteína Flag-MnmC, Flag-MnmC(o) o Flag-MnmC(m) en concentraciones

variables (de 0.1 a 7.5  $\mu\text{M}$ ) con un flujo de 10  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Como control negativo se usó la proteína BSA a dos concentraciones de 5 y 15  $\mu\text{M}$ .



**Figura 14. Esquema explicativo de la tecnología SPR-Biacore.**

El análisis de los datos se realizó con el software BiaEvaluation versión 3.2 que suministra la casa comercial del aparato. Aunque permite este programa calcular las constantes de afinidad de forma directa analizando la unión en el estado de equilibrio, o indirecta, a partir de la relación entre las constantes cinéticas de asociación  $k_a$  y disociación  $k_d$ , en mi caso se han ajustado todos los sensogramas obtenidos con un ajuste cinético de la reacción siendo más significativas las concentraciones crecientes de analito que permitieron determinar el nivel de unión en el equilibrio. Además del valor de  $\text{Chi}^2$  resultante del análisis, todos los sensogramas analizados con este programa dan un informe de la calidad de los datos obtenidos. Esto asegura que el dato cinético o de afinidad calculado esté dentro de los límites de detección del instrumento.

#### 4.7 Interacción tRNA-proteína: Fluorescencia intrínseca de Triptófanos

Todos estos ensayos se realizaron en cubetas de cuarzo con 100  $\mu$ l de volumen de mezcla y en tampón Tris 50 mM pH 7.5 150 mM NaCl 5 mM MgCl<sub>2</sub> 5 mM DTT. Los parámetros fueron: rejillas de excitación de 3  $\eta$ m y de emisión de 5  $\eta$ m,  $\lambda_{em}$  310-425,  $\lambda_{ex}$  295. Se midió la señal de fluorescencia máxima que emite 0.25  $\mu$ M de cada proteína ensayada dejando que la señal se estabilizara entre 5 y 10 minutos. A esa señal se midió el cambio de fluorescencia máxima que ocurría al añadir cantidades crecientes de chi-tRNA<sup>Lys</sup> (purificado de un mutante *mnmE*) o tRNA<sup>Lys</sup> (purificado de un mutante *mnmG*) o tRNA<sup>Cys</sup> (purificado de una cepa salvaje). En los cálculos de la fluorescencia máxima se corrigió el valor de fluorescencia del tRNA (filtro interno), y los factores de dilución de la muestra. Finalmente, se ajustaron los datos de dos ensayos independientes a una curva de unión del tipo:  $\Delta F = B_{max} * [molécula] / (k_D + [molécula])$  donde  $k_D$  es la constante de unión (GraphPad 5.0, *one site specific binding*).

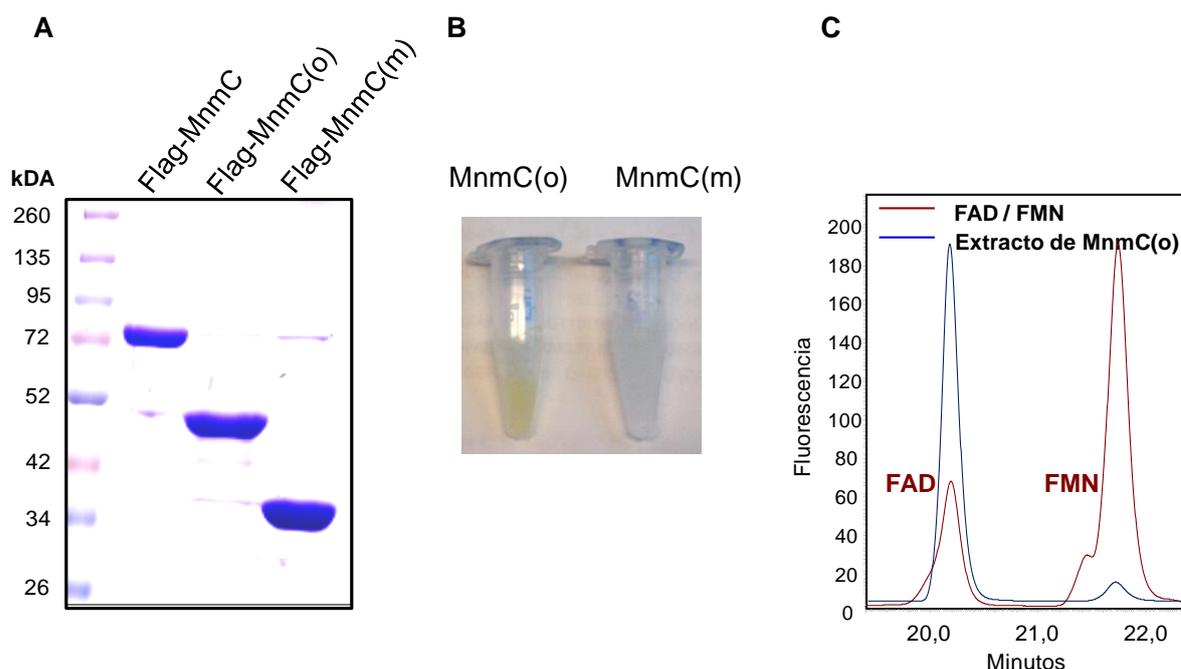
# Resultados





## 1. Purificación y caracterización preliminar de las proteínas MnmC

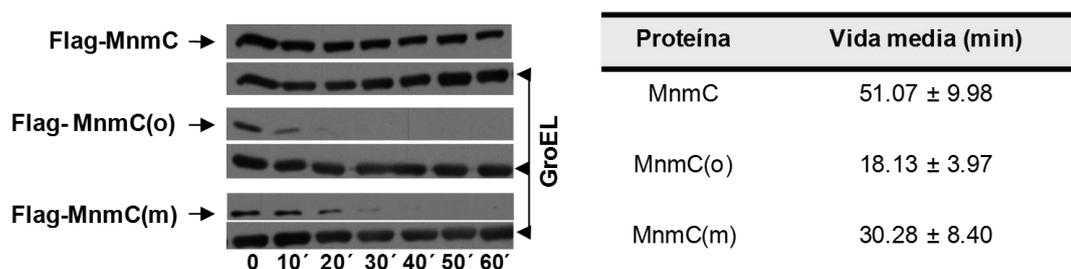
La proteína MnmC de *Escherichia coli* consta de 668 aminoácidos. Está compuesta de dos dominios: el dominio amino-terminal MnmC(m) (1-250 aa), con actividad metiltransferasa dependiente de SAM, y el dominio carboxi-terminal MnmC(o) (250-668 aa), con actividad óxido-reductasa dependiente de FAD.



**Figura 15. Caracterización de las proteínas MnmC recombinantes.** A. Gel SDS-PAGE al 10 % teñido con coomassie. Se muestran las proteínas recombinantes MnmC, MnmC(o) y MnmC(m) purificadas de la fracción soluble. B. Foto donde se muestra el color amarillo del dominio MnmC(o) purificado en comparación con el dominio MnmC(m). C. Análisis HPLC del sobrenadante de 100  $\mu$ g de MnmC(o) hervida durante 5 min y de una mezcla comercial de FAD y FMN.

Dado que en esta tesis se pretende averiguar cómo trabajan las rutas MnmEG-MnmC y la especificidad de sustrato de cada enzima, consideramos que la clonación independiente de los dos dominios de MnmC era un paso imprescindible para entender el funcionamiento de esta enzima bifuncional. Ya que en el trabajo de Roovers *et al.* (2008) no se consiguió obtener en forma soluble el dominio MnmC(o) fusionado a una etiqueta de Histidinas usando el sistema pET, probamos con otro sistema de clonación (pBAD-

TOPO) que permite una inducción más moderada y facilita la adición del péptido FLAG en el extremo N-terminal de la proteína recombinante. Como se observa en la figura 15A, tanto la proteína Flag-MnmC como los dominios Flag-MnmC(o) y Flag-MnmC(m) se expresaron bien y fueron solubles. Los tamaños moleculares de las proteínas recombinantes en un gel de poliacrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE) son de: 78, 48 y 34 kDa, para MnmC, MnmC(o) y MnmC(m), respectivamente.



**Figura 16. Vida media de las proteínas recombinantes Flag-MnmC, Flag-MnmC(o) y Flag-MnmC(m).** Se muestra la desaparición de cada proteína mediante inmunodetección según el tiempo transcurrido desde la adición de glucosa como represor de la expresión de las proteínas recombinantes. La cepa utilizada fue IC6010 ( $\Delta mnmC$ ) transformada con pIC1253 (Flag-MnmC), pIC1339 (Flag-MnmC(o)) y pIC1340 (Flag-MnmC(m)). La expresión de las proteínas recombinantes está bajo el control del promotor  $P_{ara}$ , inducible por arabinosa y reprimido por glucosa. El sistema utilizado permite determinar la vida media de la proteína recombinante siguiendo su desaparición tras la adición del represor. Izquierda: inmunotransferencia y detección con anti-Flag. Como control de carga se utilizó la proteína GroEL. Derecha: valores de la vida media calculados a partir de dos ensayos independientes.

Una observación inmediata a la purificación del dominio MnmC(o) fue que la proteína tiene un color amarillo intenso (Figura 15B). El hecho de que MnmC posea una actividad dependiente de FAD nos hizo pensar que la proteína recombinante MnmC(o) arrastra algún derivado flavínico igual que la proteína MnmC entera (Bujnicki *et al.*, 2004; Roovers *et al.*, 2008). Por esa razón, se estudió con un ensayo rápido qué tipo de flavina acompañaba al dominio MnmC(o), tanto en la proteína entera como en el dominio MnmC(o) aislado. La proteína MnmC(o) recién purificada se calentó a 75 °C durante 5 minutos en oscuridad, se precipitó y el sobrenadante se analizó por HPLC siguiendo la

señal de fluorescencia. Como patrón, se cargó una mezcla comercial de derivados flavínicos (FAD/FMN). Como muestra la figura 15C, el dominio MnmC(o) aislado arrastra mayoritariamente FAD como ya se había demostrado que ocurría con la proteína MnmC (Bujnicki *et al.*, 2004; Roovers *et al.*, 2008). El hecho de que MnmC(o) contenga FAD es un indicio indirecto de que el dominio recombinante está, al menos en parte, bien plegado.

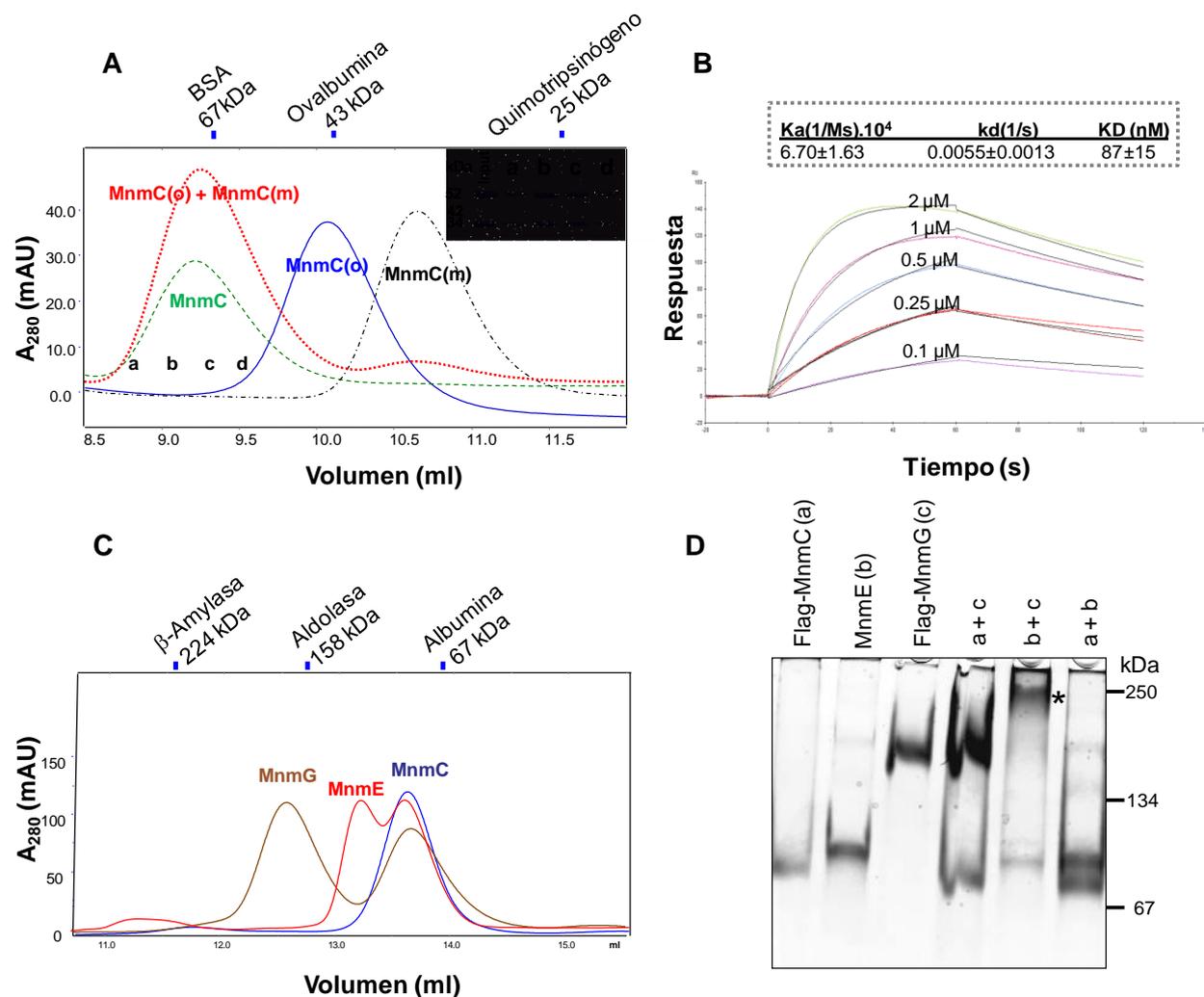
Para analizar la estabilidad de MnmC y sus dominios determinamos su vida media. Como se muestra en la figura 16, la proteína Flag-MnmC es muy estable comparada con los dominios MnmC(o) y MnmC(m) expresados independientemente, siendo el dominio MnmC(o) el que menos estabilidad tiene.

## **2. Interacción de los dominios MnmC(o) y MnmC(m), y de MnmC con MnmE o MnmG**

Los estudios bioinformáticos y los datos cristalográficos publicados de MnmC muestran que los dominios quedan plegados por separado en la proteína entera y que hay una interfaz por donde podrían interactuar (Bujnicki *et al.*, 2004; Kitamura *et al.*, 2011; Kim and Almo, 2013). Con el fin de estudiar la interacción entre los dominios recombinantes realizamos estudios de FPLC y SPR. En el primer caso observamos una clara interacción entre los dominios de MnmC ya que al mezclarlos eluyeron como la proteína entera (Figura 17A). Las fracciones de elución del pico reconstituido de MnmC se cargaron en un gel SDS-PAGE para ver que los dos dominios estaban en equimolaridad y que la reconstitución del pico MnmC correspondía a la unión de los dominios (Figura 17A, ventana).

Para determinar la constante de afinidad entre los dominios usamos la técnica SPR-Biacore. Mediante la inmovilización de la proteína His-MnmC(m) a un chip sensor (señal de 600 RU), se cuantificó la interacción con la proteína Flag-MnmC(o) pasando distintas concentraciones de la misma en unas condiciones determinadas de tampón, flujo de

inyección y tiempo de unión. La constante de afinidad de la interacción de tres experimentos independientes fue de  $87 \pm 15 \text{ nM}$  (Figura 17B), un valor indicativo de una fuerte asociación entre los dos dominios.

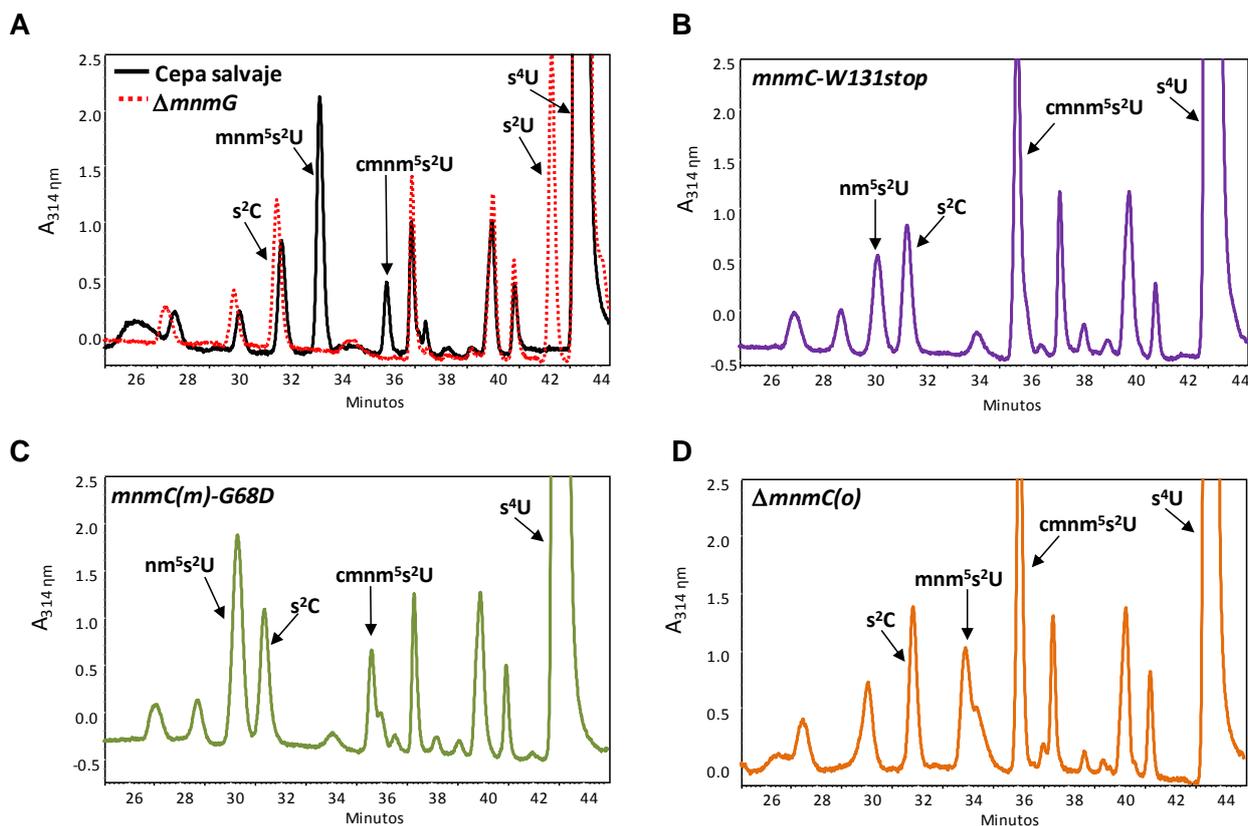


**Figura 17. Interacción proteica.** **A.** Cromatografía de exclusión molecular de la proteína MnmC (línea verde), del dominio MnmC(o) (línea azul), del dominio MnmC(m) (línea negra) y de la mezcla de los dominios MnmC (línea roja). Ventana: gel de SDS-PAGE al 10 % de las fracciones a-d recuperadas. La detección de las proteínas fue a 280 nm de absorbancia. **B.** Análisis mediante SPR de la interacción de los dominios MnmC. **C.** Estudio de la interacción de MnmC (línea azul) con MnmE (línea roja) o MnmG (línea marrón) usando cromatografía de filtración en gel. **D.** Gel nativo de Flag-MnmC (a), MnmE (b), Flag-MnmG (c), de la mezcla de MnmC con MnmE (a+b) o MnmG (a+c) y de MnmE con MnmG (b+c). Con un asterisco se indica la posición del complejo MnmEG.

Por otra parte, dada la relación funcional de MnmC con MnmEG, quisimos analizar si MnmC era capaz de interactuar con alguna de las dos proteínas del complejo MnmEG (MnmE o MnmG). El análisis por FPLC (Figura 17C) indicó que no hay interacción entre MnmC y MnmE o MnmG en las condiciones ensayadas, aunque conviene señalar que esta técnica detecta interacciones relativamente fuertes entre moléculas. Sin embargo, tampoco detectamos interacción de MnmC con MnmE o MnmG mediante un ensayo de SPR (datos no mostrados). Finalmente, un resultado idéntico se obtuvo mediante análisis en gel nativo (Figura 17D). En conclusión, los dominios de MnmC son capaces de interactuar entre ellos con una afinidad de rango nanomolar y no se han encontrado evidencias de que MnmC pueda interactuar con MnmE o MnmG en las condiciones *in vitro* ensayadas.

### 3. Actividad modificadora de tRNA de los dominios MnmC

Con el fin de analizar la actividad funcional de los dominios aislados de MnmC realizamos ensayos de modificación de tRNA *in vitro* e *in vivo*. Como primer paso para estos estudios obtuvimos los tRNAs totales en cepas mutantes de las rutas MnmEG-MnmC para conocer, en fase exponencial y en medio rico LBT, qué modificaciones están presentes en la U34 y así definir bien el estado de modificación inicial del tRNA que íbamos a usar en algunos de los experimentos programados. En la figura 18 se muestran cromatogramas representativos de los obtenidos en el análisis del tRNA total en las distintas cepas. Hay que recordar que las cepas  $\Delta mnmE$ ,  $\Delta mnmG$ ,  $\Delta mnmC(o)$  o  $\Delta mnmC$  usadas portan deleciones parciales o completas del gen señalado. La cepa mutante *mnmC(m)*-G68D (IC6018) lleva una mutación puntual (es un cambio de G por D que inactiva funcionalmente el dominio MnmC(m) pero deja el dominio MnmC(o) intacto). En contraste, la mutación *mnmC*-W131stop (cepa IC6019) produce una proteína MnmC completamente inactiva porque introduce un codón de paro al principio de *mnmC*.



**Figura 18. Análisis por HPLC de tRNA total extraído en fase exponencial de cepas: salvaje y  $\Delta mnmG$  (A),  $mnmC$ -W131stop (B),  $mnmC(m)$ -G68D (C) y  $\Delta mnmC(o)$  (D). Los nucleósidos se trataron con nucleasa P1 y fosfatasa alcalina para después ser detectados a 314 nm en el HPLC.**

Como se observa en la tabla 6, los mutantes portadores de una deleción en el gen *mnmE* o *mnmG* sólo llevan  $s^2U_{34}$ . En los mutantes  $\Delta mnmC(o)$ , *mnmC*-W131stop o  $\Delta mnmC$  hay una mayoría de  $cmnm^5s^2U$  en fase exponencial, lo que sugiere que, en las condiciones usadas *in vivo*, la vía de la glicina es predominante (ver esquema de la ruta en la Figura 19). En cambio, en las cepas salvajes y en la cepa *mnmC(m)*-G68D encontramos un porcentaje relativamente bajo de  $cmnm^5s^2U$  ( $\approx 17\%$ ). Este puede ser un intermediario en la formación del  $mnm^5s^2U$  presente en el  $tRNA^{Lys}$  o  $tRNA^{Glu}$  o bien puede ser la modificación final de un tRNA que no sea sustrato para MnmC, como se espera del  $tRNA^{Gln}$ . En cualquier caso, no encontramos intermediario  $nm^5s^2U$  en las cepas salvajes, si bien  $nm^5s^2U$  es mayoritario en el mutante *mnmC(m)*-G68D dado que en su formación convergen la vía del amonio y la de la glicina (a través de la acción de MnmC(o)). En la cepa  $\Delta mnmC(o)$  hay  $cmnm^5s^2U$  y  $mnm^5s^2U$ . Estos resultados sugieren que el  $nm^5(s^2)$  es estable (ya que no se degrada en la cepa *mnm(m)*-G68D) y no se

acumula como intermediario en la cepa silvestre o en la cepa  $\Delta mnmC(o)$ , siendo rápidamente transformado en  $mnm^5(s^2)U$  en cualquier cepa en la que esté presente la actividad MnmC(m).

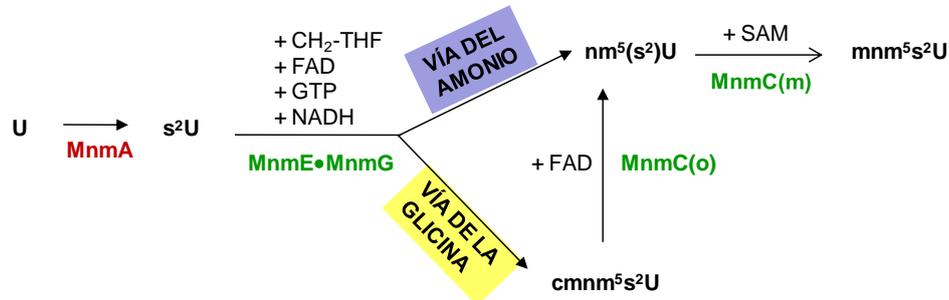


Figura 19. Esquema de las rutas de modificación de la U34 del tRNA en *E. coli*.

Tabla 6. Efecto de las mutaciones *mnmE*, *mnmG* y *mnmC* en la modificación del tRNA.

Fondo genético	Cepa	Distribución relativa (%) <sup>1</sup>			
		$nm^5s^2U$	$mnm^5s^2U$	$cmnm^5s^2U$	$s^2U$
TH48	salvaje	-	83 ± 5	17 ± 5	-
	<i>mnmC-W131stop</i>	31 ± 1	-	69 ± 1	-
	<i>mnmC(m)-G68D</i>	85 ± 5	-	15 ± 5	-
BW25113	salvaje	-	83 ± 3	17 ± 3	-
	$\Delta mnmG$ o $\Delta mnmE$	-	-	-	100
	$\Delta mnmC$	27 ± 4	-	73 ± 4	-
	$\Delta mnmC(o)$	-	14 ± 3	86 ± 3	-
MG1655	Salvaje	-	85 ± 3	15 ± 3	-
	$\Delta mnmG$	-	-	-	100

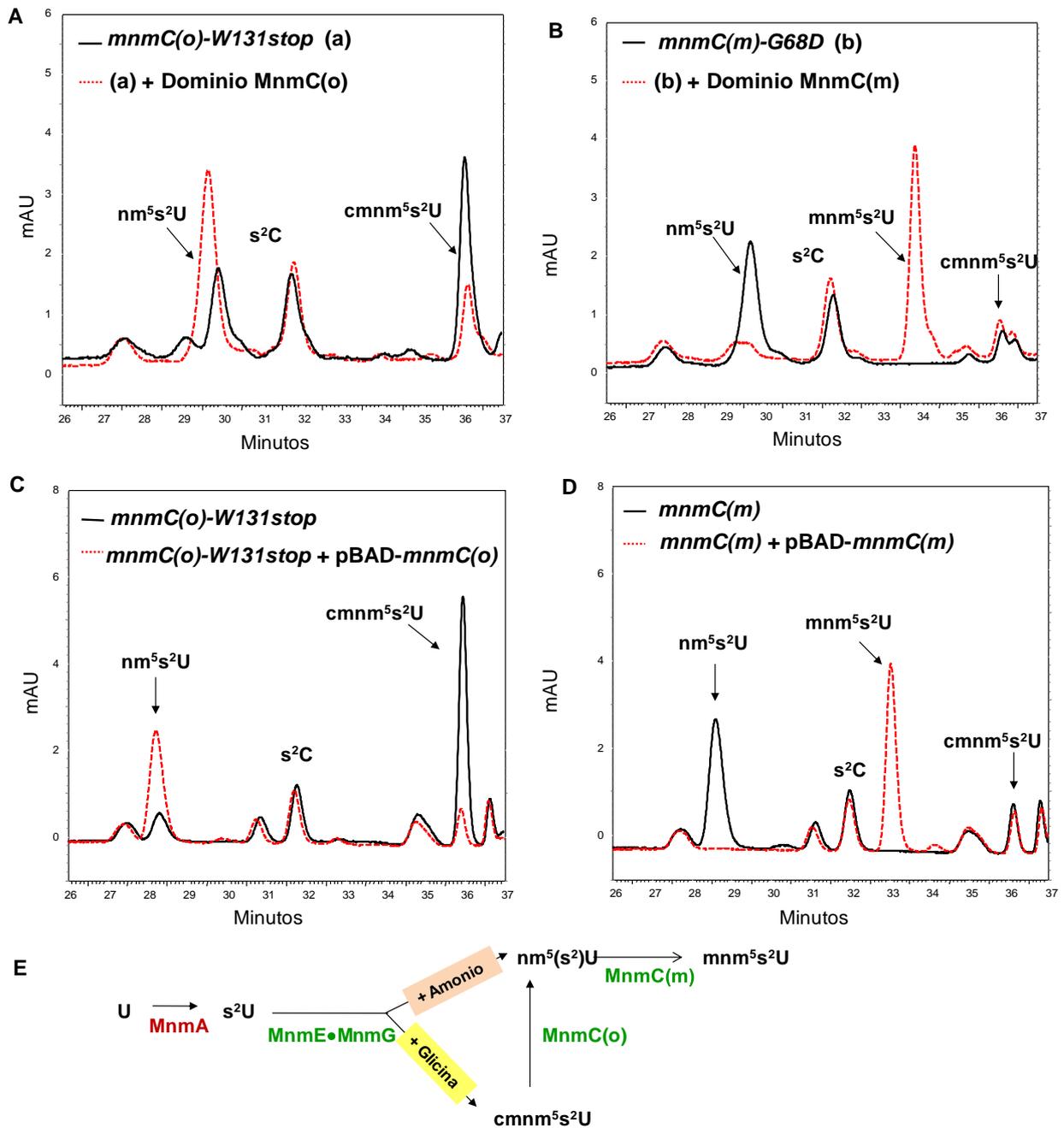
La tabla muestra la distribución relativa de nucleósidos en el tRNA total purificado durante la fase exponencial de cultivos crecidos en medio LBT. Las mutaciones  $\Delta mnmE$ ,  $\Delta mnmG$  y  $\Delta mnmC$  eliminan completamente el gen en cuestión mientras que las mutaciones *mnmC(m)-G68D* y  $\Delta mnmC(o)$  inactivan el dominio MnmC(m) o MnmC(o), respectivamente. La mutación *mnmC-W131stop* impide la síntesis de MnmC. <sup>1</sup>El porcentaje de nucleósido representa el área de pico de cada nucleósido (analizado por HPLC a 314 nm) comparado con la suma de los picos considerados (área de  $cmnm^5s^2U$  +  $nm^5s^2U$  +  $mnm^5s^2U$  +  $s^2U$  = 100%).

### 3.1 Estudios *in vitro*

Conociendo el estado de modificación del tRNA purificado de distintas cepas (Tabla 6), pasamos a estudiar la actividad modificadora de los dominios MnmC *in vitro*. La incubación con MnmC(o) de un tRNA total purificado a partir del mutante *mnmC-W131stop* (69% de  $\text{cmnm}^5\text{s}^2\text{U}$ , 31%  $\text{nm}^5\text{s}^2\text{U}$ ) promueve el incremento de  $\text{nm}^5\text{s}^2\text{U}$  a costa de  $\text{cmnm}^5\text{s}^2\text{U}$  (Figura 20A). En cambio, la incubación con MnmC(m) del tRNA total extraído de la cepa *mnmC(m)-G68D* (85% de  $\text{nm}^5\text{s}^2\text{U}$ , 15% de  $\text{cmnm}^5\text{s}^2\text{U}$ ) promueve la acumulación de  $\text{mnm}^5\text{s}^2\text{U}$  a costa de  $\text{nm}^5\text{s}^2\text{U}$  (Figura 20B). Estos resultados indican que las proteínas recombinantes Flag-MnmC(o) y Flag-MnmC(m) son capaces de modificar *in vitro* el tRNA sustrato de forma independiente.

### 3.2 Estudios *in vivo*

Con el fin de analizar *in vivo* la actividad de las proteínas MnmC recombinantes, la cepa con la mutación nula *mnmC-W131stop* fue transformada con el plásmido pBAD-TOPO y un derivado (pIC1339) que expresa Flag-MnmC(o), mientras que la cepa portadora de la mutación *mnmC(m)-G68D* se transformó con pBAD-TOPO y un derivado (pIC1340) que expresa Flag-MnmC(m). En las cepas resultantes crecidas en presencia de arabinosa como agente inductor, la proteína recombinante MnmC(o) catalizó la conversión de  $\text{cmnm}^5\text{s}^2\text{U}$  en  $\text{nm}^5\text{s}^2\text{U}$  (Figura 20C), aunque quedó un remanente de  $\text{cmnm}^5\text{s}^2\text{U}$ , mientras que la proteína MnmC(m) fue capaz de transformar todo el  $\text{nm}^5\text{s}^2\text{U}$  en  $\text{mnm}^5\text{s}^2\text{U}$  (Figura 20D). Por tanto, estos resultados muestran que *in vivo* las proteínas recombinantes Mnm(o) y MnmC(m) son también capaces de llevar a cabo su actividad de forma independiente.



**Figura 20. Estudios *in vitro* e *in vivo* de la actividad de los dominios MnmC.** **A-B.** Cromatogramas de las actividades *in vitro* (detección a 314 nm): (A), tRNA total extraído del mutante *mnmC*-W131stop (IC6019, línea negra) y su perfil tras la incubación con MnmC(o) (línea roja); (B), tRNA total extraído del mutante *mnmC*(m)-G68D (IC6018, línea negra) y tras su incubación con MnmC(m) (línea roja). **C-D.** Cromatogramas de las actividades *in vivo*: (C), tRNA total extraído del mutante *mnmC*-W131stop (IC6019, línea negra) y tRNA total del mutante *mnmC*-W131stop + plásmido pBAD-*mnmC*(o) (IC6019 + pIC1532, línea roja) en presencia de arabinosa; (D), tRNA total extraído del mutante *mnmC*(m)-G68D (IC6018, línea negra) y tRNA total extraído del mutante *mnmC*(m)-G68D + plásmido pBAD-*mnmC*(m) (IC6018 + pIC1340, línea roja) en presencia de arabinosa. **E.** Esquema de la ruta MnmEG-MnmC.

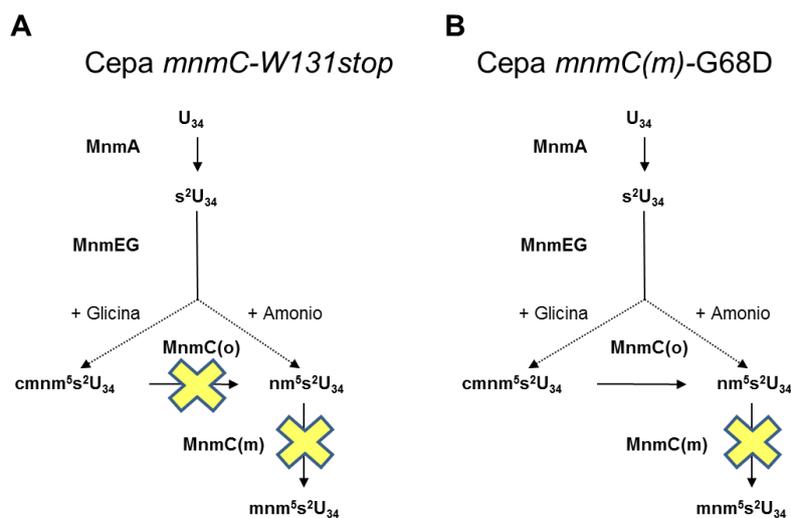
## 4. Estudio cinético de las actividades modificadoras de MnmEG y MnmC

4.1 Cinética de los dominios de MnmC y MnmEG, y acoplamiento cinético de las reacciones catalizadas *in vivo*

Que los dominios de MnmC sean funcionales por separado en sistemas *in vivo* e *in vitro* demuestra que las actividades pueden ejercer su función independientemente una de la otra. Sin embargo, estos ensayos no nos dicen si la actividad catalítica de cada dominio resulta afectada por la ausencia del otro. Por ello, decidimos comparar la actividad catalítica de cada dominio aislado con la actividad de la proteína entera. Para ello, determiné las constantes cinéticas de Michaelis-Menten de la actividad modificadora de tRNA (en condiciones de estado estacionario) respecto al sustrato chi-tRNA<sup>Lys</sup>, mediante análisis directo del producto de la reacción (nucleósido modificado) por HPLC.

La actividad MnmC(o) de la proteína MnmC fue estudiada mediante reacciones *in vitro* con cantidades de FAD (cofactor) constantes y en saturación respecto a la concentración de enzima y con concentraciones variables de tRNA sustrato. El tRNA sustrato elegido fue chi-tRNA<sup>Lys</sup> ya que este tRNA se purifica fácilmente y es apropiado para comparar las actividades de los dominios separados de MnmC con la actividad que presentan en la proteína entera. Este tRNA consiste en un tRNA<sup>Lys</sup> citosólico humano carente de la región anticodón en cuyo lugar se inserta el tRNA<sup>Lys</sup> de *E. coli*. Este sistema tiene la ventaja de facilitar la superproducción y purificación de construcciones de tRNA (Ponchon *et al.*, 2009) y nuestro grupo lo ha usado previamente con éxito (Benítez-Páez *et al.*, 2012b). El tRNA quimera construido para nuestros experimentos (chi-tRNA<sup>Lys</sup>) lo purifiqué de una cepa  $\Delta mnmC$ , dado que pretendía ensayar precisamente las actividades de MnmC (ver Figura 21A). Para determinar el tiempo de reacción en el que la actividad estaba en fase lineal en las condiciones de concentración de enzima y sustrato fijadas, se realizaron pre-cinéticas, y así determinamos que el tiempo debía de ser de 90 segundos como máximo. En la tabla 7 se muestra la media y la desviación de los valores cinéticos obtenidos de tres ensayos independientes. Para MnmC y MnmC(o), los valores de  $k_{cat}$  fueron de  $0.59 \text{ s}^{-1}$  y  $0.39 \text{ s}^{-1}$ , respectivamente, lo que indica que tienen un número de

recambio catalítico similar. Los valores de  $K_m$  fueron de 15.7  $\mu\text{M}$  y 6.1  $\mu\text{M}$ , respectivamente: esto sugiere que puede existir una pequeña diferencia en la afinidad por el sustrato. A pesar de esto, si observamos los valores de eficacia catalítica ( $k_{cat}/K_m$ ) podemos decir que el dominio MnmC(o) aislado es igual de eficaz que la proteína MnmC entera para la actividad óxido-reductasa, si las condiciones de FAD son saturantes, ya que el análisis estadístico por ANOVA (y Tukey-test) no dio ninguna diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).



**Figura 21.** Esquema de la ruta MnmEG en las cepas usadas para la sobreexpresión del chi-tRNA<sup>Lys</sup>.

Por otro lado, para determinar las constantes cinéticas de la actividad MnmC(m) respecto al tRNA<sup>Lys</sup>, mantuvimos una concentración constante y saturante de SAM, mientras variamos las concentraciones del Chi-tRNA<sup>Lys</sup> purificado de la cepa *mnmC(m)-G68D* (ver Figura 21B). Antes de realizar las cinéticas, también se determinó el tiempo de reacción límite (60 segundos) para una respuesta lineal de la actividad modificadora, tal y como se hizo con las cinéticas de MnmC(o). Como se observa en la tabla 7, donde se muestran los valores de tres ensayos independientes, la actividad MnmC(m) presenta el mismo valor de  $K_m$  para el chi-tRNA<sup>Lys</sup> (4.4-4.2  $\mu\text{M}$ ) ya se trate del dominio MnmC(m) aislado o de la proteína MnmC entera. Además, tampoco hay diferencias significativas entre ambas proteínas en los valores de número de recambio (0.46-0.52  $\text{s}^{-1}$ ) y eficiencia catalítica (0.111-0.129  $\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ ). Por tanto, la actividad MnmC(m) del

dominio aislado y de la proteína completa, respecto al tRNA, es similar si las concentraciones de SAM son saturantes.

**Tabla 7. Constantes cinéticas de las proteínas MnmC y MnmEG respecto al tRNA.**

Reacción	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$k_{\text{cat}}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$k_{\text{cat}}/K_m$ ( $\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ )
<b>MnmC (FAD)</b>	15.7 $\pm$ 3.4	0.59 $\pm$ 0.02	0.039
<b>Dominio MnmC(o) (FAD)</b>	6.1 $\pm$ 2.1	0.39 $\pm$ 0.05	0.069
<b>MnmC (SAM)</b>	4.4 $\pm$ 1.1	0.46 $\pm$ 0.10	0.111*
<b>Dominio MnmC(m) (SAM)</b>	4.2 $\pm$ 1.1	0.52 $\pm$ 0.10	0.129*
<b>MnmEG (Amonio)</b>	0.34 $\pm$ 0.01	0.012 $\pm$ 0.001	0.035*

En conjunto, los valores cinéticos de las reacciones catalizadas por MnmC(o) y MnmC(m) respecto al tRNA nos permiten concluir que la actividad de cada dominio de MnmC es independiente de la presencia del otro ya que, en iguales circunstancias, no observamos diferencias en la actividad de cada dominio, bien aislado, bien en la proteína entera. Por otra parte, la eficiencia catalítica de la reacción catalizada por MnmC(m) es ligeramente superior (2 veces, aproximadamente) a la de la reacción catalizada por MnmC(o). Otros autores han encontrado que la diferencia es algo mayor. Concretamente, Pearson y Carell (2011) encontraron que MnmC(m) presentaba una diferencia 10 veces superior a MnmC(o). Tal diferencia era debida a que la  $K_m$  de la primera era 10 veces inferior a la de la segunda, mientras la  $k_{\text{cat}}$  era similar para ambas reacciones. Estos datos sugerían (según los autores) que la afinidad de MnmC(m) por el sustrato era mayor y que ambas reacciones podrían estar acopladas cinéticamente *in vivo*. Sin embargo, este razonamiento es discutible ya que las condiciones usadas en cada reacción fueron diferentes y aunque pudieran ser óptimas para cada actividad *in vitro*, no sabemos cómo pueden estar moduladas *in vivo*. Por lo tanto, hace falta otro tipo de estrategias para determinar hasta qué punto ambas reacciones están acopladas *in vivo*.

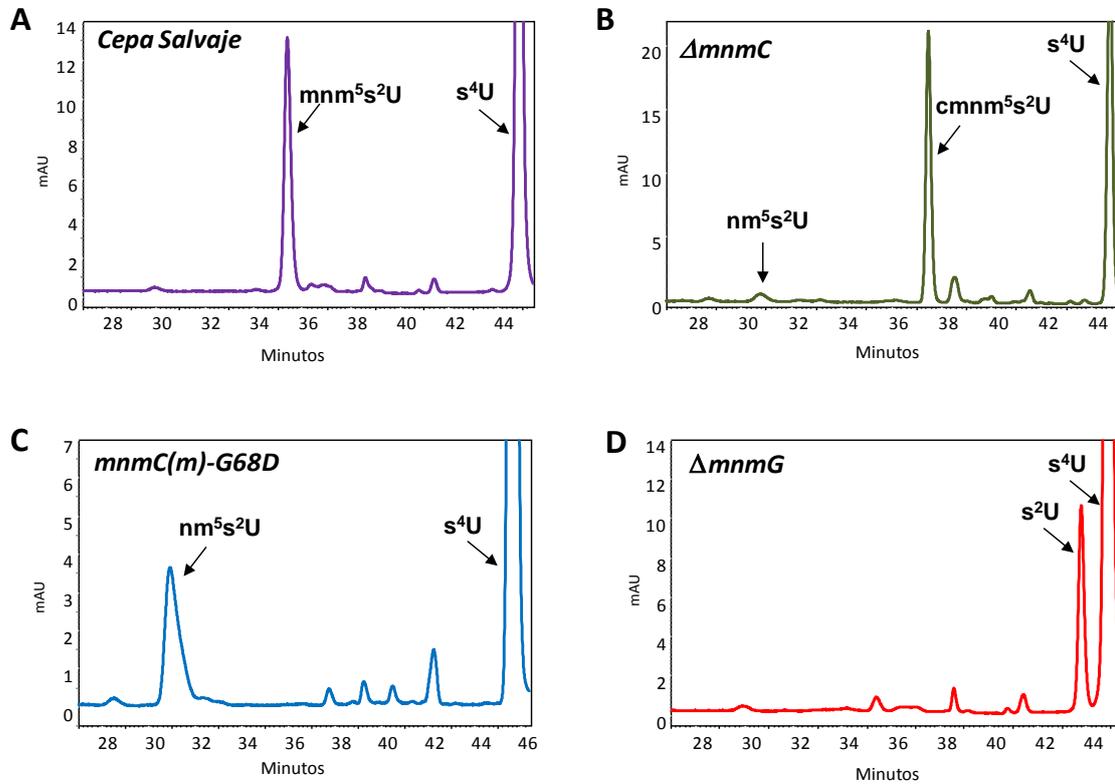
Por lo que respecta al complejo MnmEG, se determinaron los valores de las constantes cinéticas para la reacción de MnmEG por la vía del amonio en condiciones favorables para la reacción (Moukadiri *et al.*, 2009). Los resultados sugieren (Tabla 7)

que MnmEG tiene mejor afinidad que MnmC por el sustrato chi-tRNA<sup>Lys</sup> (ya que su  $K_m$  es menor) pero su  $k_{cat}$  es peor. Este último dato también sugiere que la actividad de MnmEG limita el funcionamiento de la ruta.

Como se ha comentado, no conocemos si las condiciones usadas para las reacciones catalizadas *in vitro* por MnmC y MnmEG y basadas en las descritas previamente por varios autores (Hagervall *et al.*, 1987; Moukadiri *et al.*, 2009; Pearson and Carell, 2011) son similares a las que ocurren en la célula. Por ello, decidimos analizar la acumulación de intermediarios de la modificación *in vivo*, pues tal acumulación sería indicativa de que las reacciones de las rutas MnmEG-MnmC no están cinéticamente acopladas. Para tal fin, se obtuvo el tRNA<sup>Lys</sup> “nativo” (el tRNA<sup>Lys</sup> presente de forma natural en *E. coli*) de distintas cepas deficientes en enzimas de las rutas MnmEG-MnmC.

Como se muestra en la figura 22, no existe acumulación del nucleósido cmnm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U en el tRNA<sup>Lys</sup> obtenido de la cepa salvaje (Figura 22A). En cambio, este nucleósido es mayoritario en la cepa  $\Delta mnmC$  (Figura 22B). El nucleósido nm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U aparece en la cepa *mnmC(m)*-G68D (Figura 22C), no observándose en la cepa salvaje. Conjuntamente, los datos demuestran que los nucleósidos cmnm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U y nm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U en la posición de tambaleo del tRNA<sup>Lys</sup> de *E. coli* son estables y la no acumulación de ellos en la cepa salvaje supone que las enzimas MnmEG y MnmC están cinéticamente moduladas *in vivo* para producir la modificación final mnm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U. En la cepa  $\Delta mnmG$  (Figura 22D), como consecuencia de la modificación de MnmA y la ausencia de MnmG, sólo se detecta el nucleósido s<sup>2</sup>U. Como puede observarse en la Figura 22A, no encontramos s<sup>2</sup>U en el tRNA de una cepa salvaje. Además, aunque no se muestra en la figura, también se analizó la región a 254 nm de los cromatogramas para buscar los nucleósidos intermediarios de la ruta MnmEG-MnmC no tiolados. En ningún caso se encontró cmnm<sup>5</sup>U o nm<sup>5</sup>U en la cepa salvaje. Estos resultados sugieren que también existe una estrecha coordinación entre las rutas MnmA y MnmEG-MnmC para sintetizar mnm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U en el tRNA<sup>Lys</sup> de *E. coli* sin acumulación de intermediarios. Por lo tanto, el análisis *in vivo* realizado con tRNA<sup>Lys</sup> obtenido en fase exponencial apoya la idea de que las reacciones catalizadas por MnmEG

y MnmC están cinéticamente acopladas para promover la acumulación del nucleósido final  $mnm^5s^2U$ , y evitar la acumulación de intermediarios.



**Figura 22. Análisis HPLC del tRNA<sup>Lys</sup> nativo purificado de distintas cepas en fase exponencial. A.** tRNA<sup>Lys</sup> obtenido de una cepa salvaje. **B.** tRNA<sup>Lys</sup> obtenido de una cepa  $\Delta mnmC$ . **C.** tRNA<sup>Lys</sup> obtenido de una cepa  $mnmC(m)$ -G68D. **D.** tRNA<sup>Lys</sup> obtenido de una cepa  $\Delta mnmG$ .

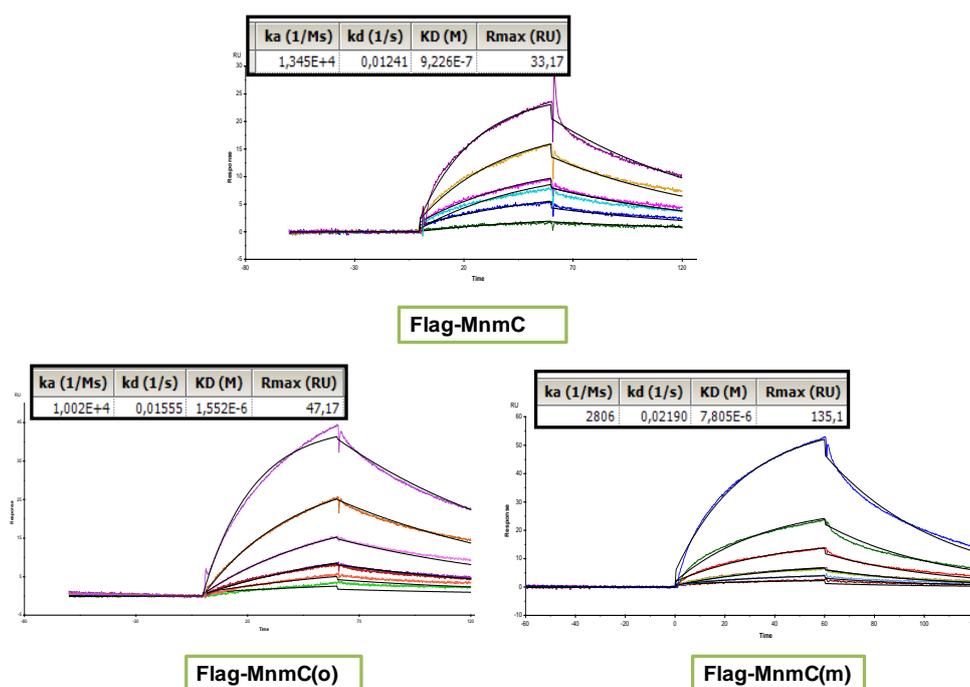
#### 4.2 Determinación de la afinidad de tRNA por las proteínas MnmC

Con el fin de determinar la afinidad de MnmC(o) y MnmC(m) por tRNAs sustrato, utilicé dos estrategias: SPR y fluorescencia (haciendo uso de la fluorescencia intrínseca de ambas proteínas debida a sus triptófanos). Curiosamente, con ambas técnicas encontré que las proteínas MnmC recombinantes mostraban una afinidad similar tanto por tRNAs sustrato y no sustrato. Los datos se muestran en la Tabla 8 mientras que ejemplos de experimentos representativos se muestran en las Figuras 23 y 24. Estos resultados sugieren que las proteínas son capaces de unir todos los tRNAs y que un paso posterior debe encargarse de rechazar al tRNA que no es sustrato.

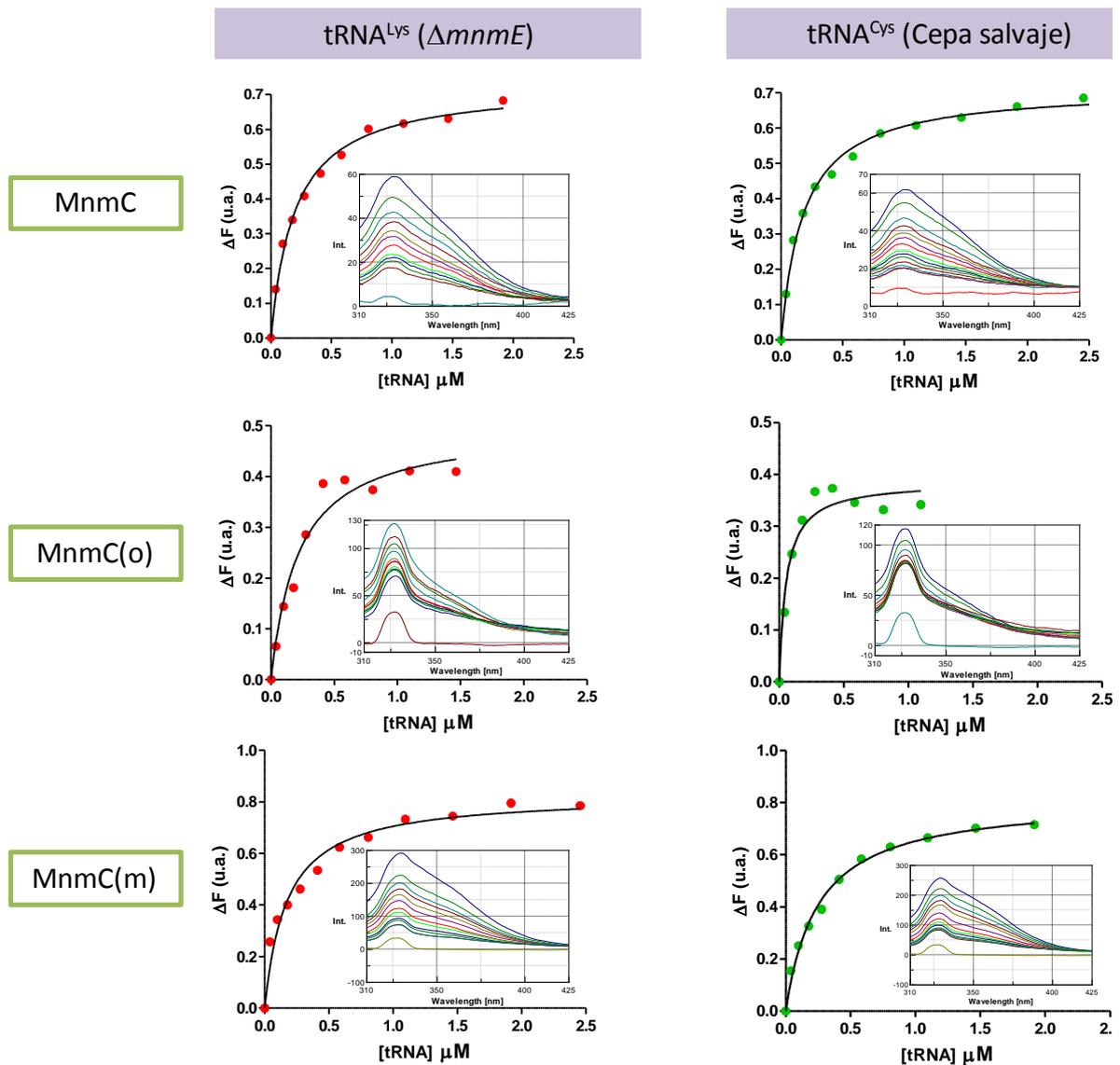
**Tabla 8. Constantes de afinidad o  $K_D$  ( $\mu\text{M}$ ) de unión tRNA<sup>Lys</sup>-proteína obtenida.**

Técnica	tRNA (Cepa)	MnmC	MnmC(o)	MnmC(m)
SPR	tRNA <sup>Lys</sup> *	$1.63 \pm 0.64$	$1.19 \pm 0.52$	$6.51 \pm 1.82$
Fluorescencia intrínseca de Trp proteicos	tRNA <sup>Lys</sup> ( $\Delta\text{mnmE}$ )	$0.20 \pm 0.003$	$0.21 \pm 0.02$	$0.21 \pm 0.05$
	Chi-tRNA <sup>Lys</sup> ( $\Delta\text{mnmE}$ )	$0.18 \pm 0.001$	$0.11 \pm 0.05$	$0.10 \pm 0.06$
	tRNA <sup>Cys</sup> ( <i>Cepa salvaje</i> )	$0.19 \pm 0.009$	$0.18 \pm 0.06$	$0.34 \pm 0.1$

Datos de 2 ensayos independientes. \* tRNA transcrito *in vitro*, es decir, carente de modificaciones post-transcripcionales. El resto de tRNAs se obtuvieron de las cepas indicadas.



**Figura 23. Ejemplos de sensogramas de la interacción entre las proteínas recombinantes MnmC y tRNA<sup>Lys</sup> obtenido por transcripción *in vitro*.** El tRNA, al ser transcrito *in vitro*, carece de modificaciones post-transcripcionales y lleva una cola poliA en el extremo 3' la cual permite unir el tRNA al chip sensor (cola poliT) para, seguidamente, pasar (a un determinado flujo y concentración) las distintas proteínas a ensayar en el tampón escogido (Ver materiales y métodos para más información).

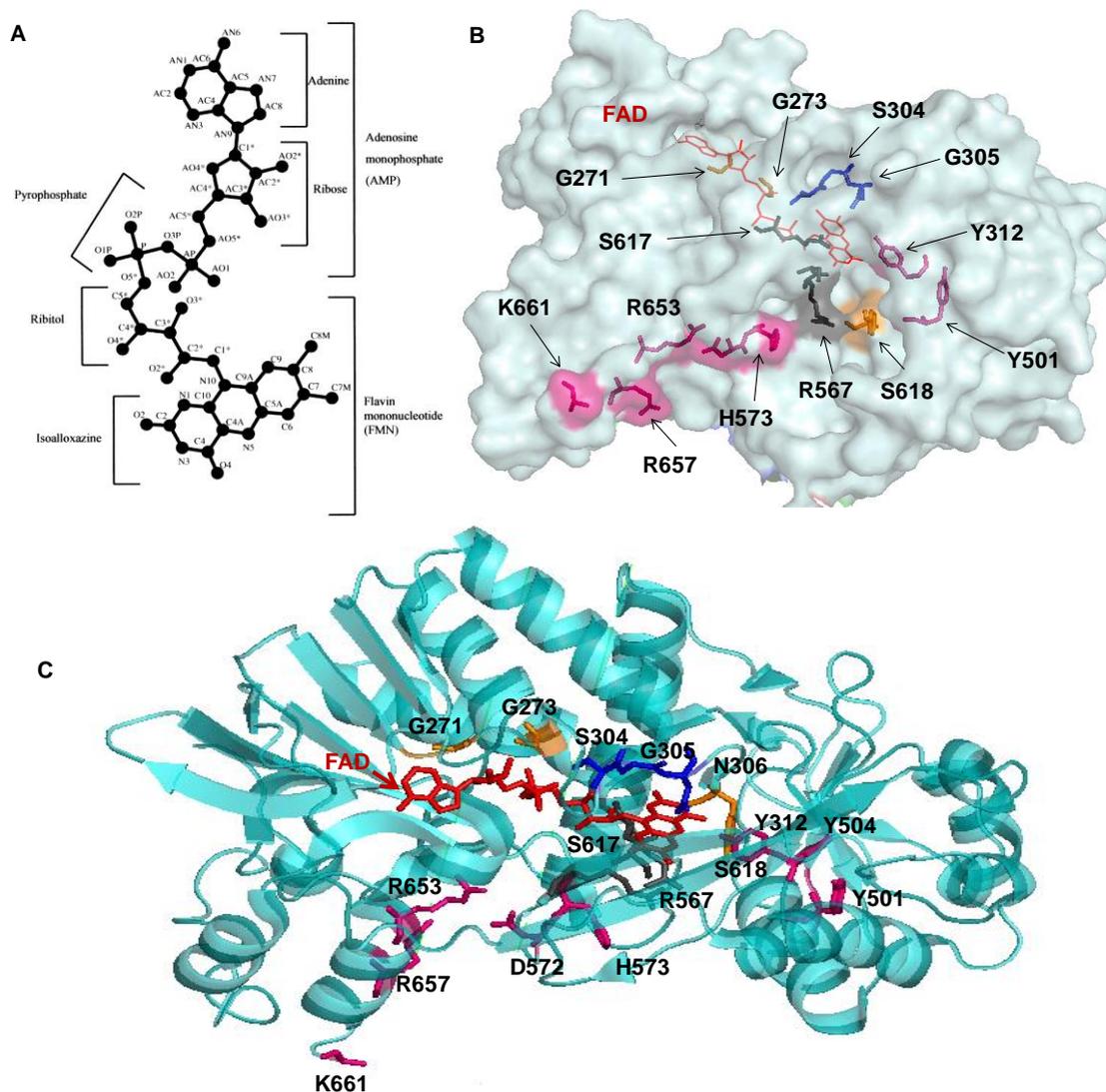


**Figura 24. Ajustes del ensayo de interacción entre los distintos tRNAs y proteínas MnmC.** En las gráficas interiores se muestran las curvas originales de fluorescencia observada a las longitudes de onda de emisión indicadas (Wavelength).  $\Delta F$  (u.a.): aumento de la fluorescencia en unidades arbitrarias.

Datos recientes de nuestro laboratorio sugieren que aunque las proteínas modificadoras de tRNA que son objeto de estudio en esta Tesis puedan mostrar una afinidad similar por tRNAs sustrato y no sustrato usando técnicas como ITC o fluorescencia, las constantes de asociación y disociación,  $k_a$  y  $k_d$ , pueden ser mayores en el caso de los tRNAs no sustrato, lo que en geles de retardo produce un patrón diferente: mientras la proteína es ampliamente retrasada por la unión del tRNA sustrato, el retraso causado por el tRNA no sustrato es mucho menor. Esta característica podría estar implicada en el mecanismo de rechazo de los tRNAs no sustrato siendo un punto a investigar actualmente en nuestro laboratorio.

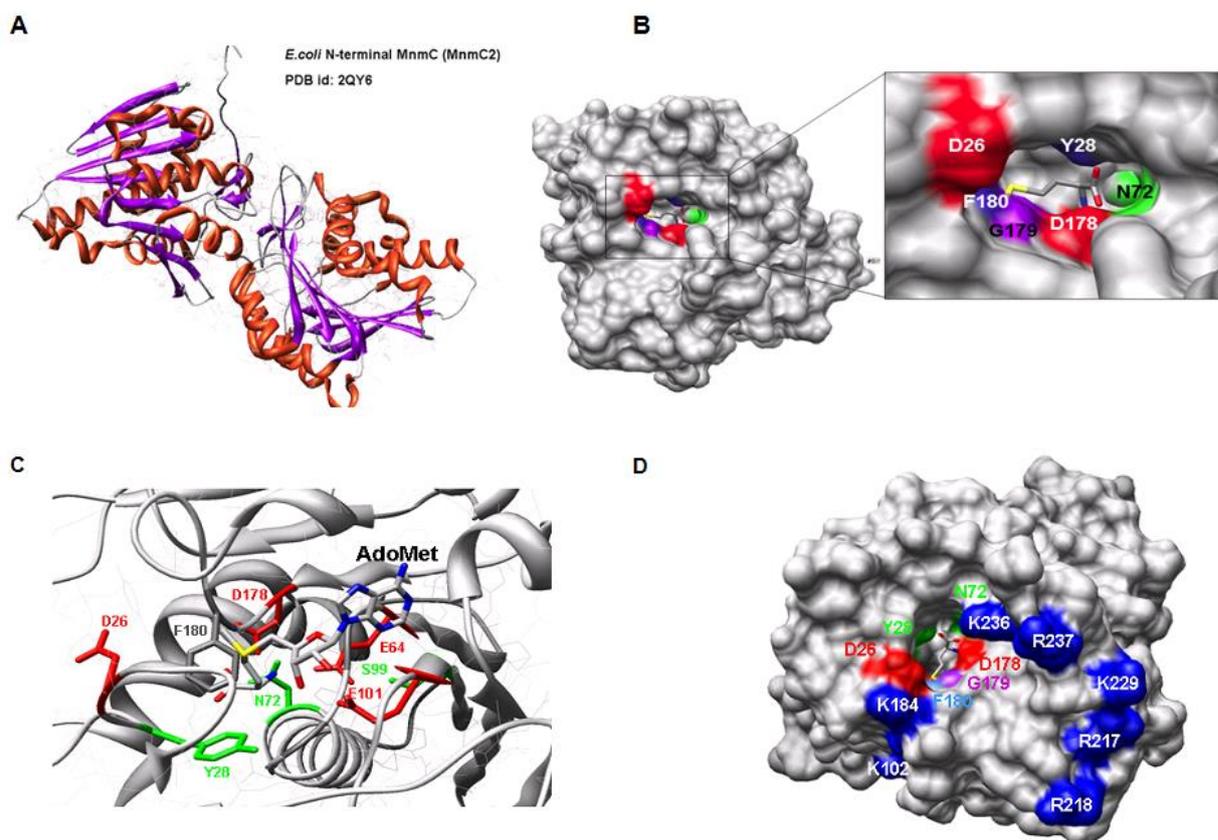
## 5. Análisis mutacional de los dominios MnmC(o) y MnmC(m)

Al iniciar nuestro estudio sobre MnmC, sólo existía una estructura cristalina del dominio MnmC(m) de *E. coli* sin FAD, depositada en el PDB (2QY6). Con el fin de abordar un estudio sobre las relaciones estructura-función de MnmC, decidimos elaborar modelos estructurales que guiasen la selección de posibles residuos funcionales. Estos modelos fueron realizados por el Dr. Alfonso Benítez-Páez, investigador de nuestro laboratorio, con la ayuda de procedimientos bioinformáticos.



**Figura 25. Residuos candidatos para el análisis mutacional del dominio MnmC(o).** A. Esquema del cofactor FAD. B. Representación de la superficie del dominio MnmC(o) mostrando la molécula FAD y algunos residuos comentados en el texto. C. Modelo estructural del dominio MnmC(o) con los residuos comentados en el texto. En rojo: el cofactor FAD; en magenta: los residuos de unión a tRNA; en gris: los residuos catalíticos; y en azul oscuro y dorado: los residuos de unión a FAD. Modelo realizado con el programa PyMol.

En el caso del dominio MnmC(o), al no tener ningún dato cristalográfico en el momento de realizar el análisis, se optó por alinear las secuencias homólogas para obtener un listado de residuos candidatos a ejercer funciones importantes. Se estudiaron 69 secuencias de MnmC pertenecientes a especies representativas de los *phyla* bacterianos: Bacteroidetes Deinococci, Firmicutes, Proteobacteria y Spirochaetes. Así se identificaron los residuos conservados del motivo consenso para la unión de FAD: G271 y G273. En base al modelo construido, se postuló que los residuos Y312, S304, G305 y N306 interaccionarían con la flavina del FAD (Figura 25A) y serían importantes junto con los residuos R567, S617 y R618 (implicados en la unión del nucleósido diana) en la reacción de descarboxilación (Figuras 25B-C). Además, se postuló que los residuos Y501, Y504, D572, H573, R653, R657 y K661 (Figura 25B-C) interaccionarían con la molécula del tRNA.



**Figura 26. Modelo de la holoenzima MnmC(m).** A. Estructura cristalina de MnmC(m) de *Escherichia coli* ( PDB id:2QY6). Modelos realizados con el programa PyMol. B. Sitio de unión a SAM, obtenido mediante *docking manual*, con los posibles residuos catalíticos en MnmC(m). C-D. Localización de los residuos candidatos resultantes del análisis bioinformático.

Debido a que la distribución filogenética de la proteína MnmC se restringe a Eubacterias y dentro de este reino su distribución es igualmente restringida a unos cuantos grupos taxonómicos, el análisis para el dominio MnmC(m) se realizó mediante alineamiento múltiple de 26 secuencias de aminoácidos diferentes obtenidas a partir de especies bacterianas representantes de los grupos taxonómicos donde MnmC está presente. Además, se obtuvo un modelo de la holoenzima MnmC(m) (con su cofactor SAM) mediante *docking manual* a partir de la estructura cristalina de la MTasa de clase I HemK de *Thermotoga maritima* (PDB id 1NV8) y la estructura de MnmC(m) de *Escherichia coli* (Figura 26A) depositadas en el PDB. En este análisis se acopló la estructura del cofactor SAM a la estructura cristalina del apoenzima y con el modelo resultante se seleccionaron los residuos G66, E64, G68, G70, y E101 por tener superficies de contacto con el cofactor SAM en el modelo. Además, se detectó un bolsillo hidrofóbico delimitado por los residuos F100 e I157 que uniría la base nitrogenada del SAM (Figura 26B-C). En cuanto a los residuos implicados en catálisis y coordinación del nucleótido diana se encontró, de acuerdo con patrones de conservación de la secuencia, una pequeña cavidad con acceso directo al grupo CH<sub>3</sub> donador. Los residuos altamente conservados de este bolsillo que supuestamente participarían en catálisis son: D26, Y28 y un motivo muy conservado compuesto por los aminoácidos 178 a 180 (DGF). Considerando la naturaleza electronegativa del tRNA, se encontraron motivos de aminoácidos básicos que podrían estar implicados en su unión: K184, R217, R218, K229, K236 y R237. Éstos convergen espacialmente sobre la misma superficie de la proteína: en la entrada de la cavidad de acceso al grupo CH<sub>3</sub> donador (Figura 26D).

En resumen, el análisis bioinformático permitió seleccionar residuos conservados que podrían estar implicados en la unión de SAM y tRNA así como en la reacción de modificación y, consecuentemente, procedimos a su estudio experimental. Tras la mutagénesis de algunos de los residuos seleccionados, procedí a la caracterización del fenotipo de modificación mediante un ensayo *in vivo* consistente en introducir la mutación de interés en el gen *mnmC* transportado por un plásmido en la cepa deficiente para la actividad MnmC ensayada. Los tRNAs totales de cada cepa se analizaron por HPLC: si la cepa *mnmC*<sup>-</sup> recupera la actividad modificadora (fenotipo salvaje) tras la incorporación del plásmido, ese residuo mutado se considera que no es funcionalmente

importante. Si la actividad se recupera sólo parcialmente o no se recupera, consideramos que el residuo mutado es importante para la función de MnmC.

### 5.1 Dominio MnmC(o)

Para el estudio del fenotipo causado por la mutación de residuos en el dominio MnmC(o), se transformó la cepa *mnmC-W131stop* (IC6019), la cual tiene interrumpido el gen *mnmC* con un codón de parada al principio del gen (y por tanto, no produce proteína) con los plásmidos que portan el dominio MnmC(o) silvestre o con la mutación puntual escogida. En el momento de la fase de crecimiento donde se recogieron los tRNAs ( $DO_{600} = 0.5$ ), el porcentaje de la modificación  $nm^5s^2U$  proveniente de la vía del amonio ronda el 30 % (Tablas 6 y 9). Al introducir un plásmido que expresa MnmC(o) lo que vamos a observar es la transformación de  $cmnm^5$  en  $nm^5$  y, por tanto, un incremento de este último. Como se muestra en la tabla 9, los residuos analizados están afectando al estado de modificación cuando no se induce la expresión proteica bajo el inductor arabinosa (-Arabinosa) ya que todas las cepas expresando las proteínas MnmC(o) mutantes tienen niveles de modificación ( $nm^5s^2U$ ) similares a la cepa *mnmC-W131stop*. Conviene señalar que cuando es el dominio MnmC(o) salvaje el que se introduce en la cepa *mnmC-W131stop*, el valor de modificación de  $cmnm^5s^2U$  a  $nm^5s^2U$  sin inducir la expresión proteica, es el doble que sin el plásmido (52% frente a 21% de la cepa IC6019). Esto indica que el escape del promotor del plásmido pBAD que puede existir en estas condiciones *in vivo* permite la expresión del dominio MnmC(o), siendo suficiente para modificar parcialmente el tRNA (ya que queda un 50% de  $cmnm^5s^2U$ ). Cuando inducimos la expresión de MnmC(o) (+Arabinosa) vemos que el dominio MnmC(o) salvaje incrementa el nivel de  $nm^5s^2U$  hasta un 74% frente al 28% alcanzado en la cepa *mnmC-W131stop*. Los residuos mutados que muestran peor fenotipo son G271, G273 y R653. Los demás no afectan a la función del dominio cuando están sobrepresados lo que sugiere la existencia de una compensación por dosis.

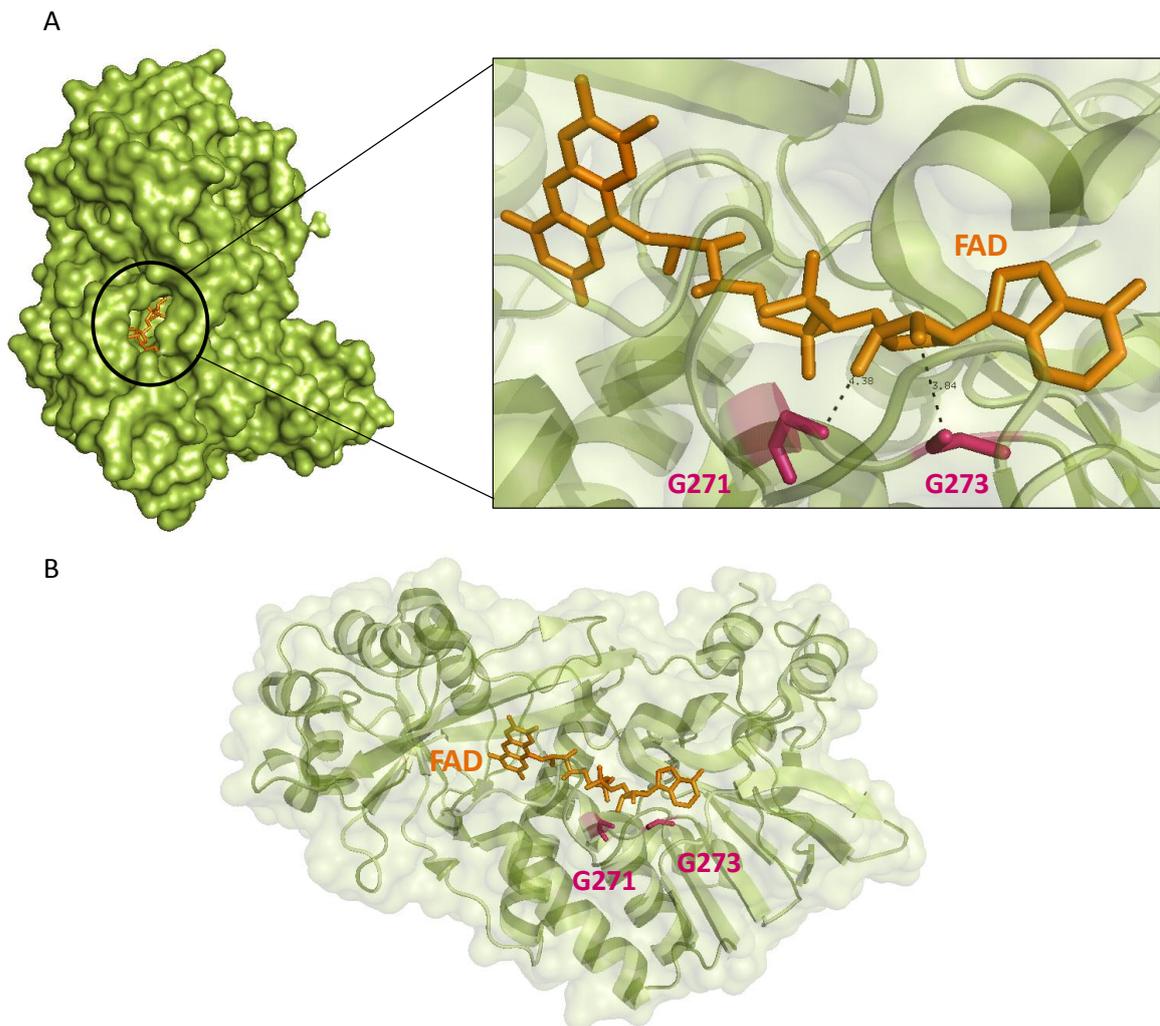
**Tabla 9. Niveles de modificación de tRNA encontrados *in vivo* en distintos mutantes de MnmC(o) en fase exponencial (DO<sub>600</sub> = 0.5).**

Cepa / Plásmido	Proteína	% $\frac{nm^5s^2U}{s^4U}$ (- Ara)	% $\frac{nm^5s^2U}{s^4U}$ (+ Ara)	Predicción de la función del residuo	Fenotipo
IC6019	-	22	28	-	Nulo
IC6019/ pIC1532	MnmC(o) Salvaje	52	74	-	Salvaje
IC6019/ pIC1680	G271A	21	36	Unión a FAD	Parcial
IC6019/ pIC1681	G273A	15	51	Unión a FAD	Parcial
IC6019/pIC1682	Y501A	17	78	Unión a tRNA	Parcial*
IC6019/ pIC1683	H573A	21	76	Unión a tRNA	Parcial*
IC6019/ pIC1684	S617A	18	72	Unión y/o Catálisis	Parcial*
IC6019/ pIC1685	R653A	16	42	Unión a tRNA	Parcial

El grado de modificación del tRNA (conversión del  $cmnm^5s^2U$  a  $nm^5s^2U$ , posible gracias a la actividad MnmC(o)) fue calculado mediante la relación del área de los nucleósidos  $cmnm^5s^2U$  y  $nm^5s^2U$  respecto al área del  $s^4U$ . Se muestra el valor medio de la cantidad de producto ( $nm^5s^2U$ ) en porcentaje respecto al nucleósido  $s^4U$  de tres ensayos independientes. Las desviaciones no superaron el 20%. El fenotipo hace referencia a la capacidad modificadora de la proteína mutante tanto en ausencia como en presencia del inductor (arabinosa). Cepa *mnmC*-W131stop (IC6019). \* Parcial suprimible por cantidad de proteína.

Si bien se necesitan experimentos adicionales para confirmar el rol asignado a cada residuo, dicho rol se ha visto reforzado por la estructura cristalina resuelta recientemente por otros autores (Kim and Almo, 2013). En la figura 27 se muestra el dominio MnmC(o) con el cofactor FAD. Los residuos G271 y G273 forman parte del motivo de unión a FAD clásico de óxidorreductasas (GxGxxG) y se muestran en la figura cercanos a la molécula FAD. Cuando estos residuos se cambian por una Alanina, cuyo grupo lateral (CH<sub>3</sub>) es pequeño, la modificación del tRNA se ve afectada. Los residuos G13 y G15 de la proteína MnmG son homólogos a los residuos G271 y G273 de MnmC(o) y fueron caracterizados por nuestro grupo (Yim *et al.*, 2006; Shi *et al.*, 2009) dando un fenotipo

similar en el mismo tipo de ensayo, además de confirmar que unían FAD por otras técnicas. En el estudio bioinformático inicial se seleccionó el residuo R653 debido a que tiene una cadena lateral cargada positivamente y podría formar parte de un “*patch*” o camino de cargas positivas (Figura 26D, residuos en magenta) por donde el tRNA interaccionara (Bujnicki *et al.*, 2004). El hecho de que la mutación R653A no produzca un fenotipo nulo, sugiere que la mutación de un solo residuo implicado en la unión no es suficiente para romper completamente las interacciones del tRNA con MnmC(o).



**Figura 27. Estructura del dominio MnmC(o).** **A.** En el cuadro se muestran los residuos G271, G273 y el cofactor FAD inmersos en la proteína; y en línea discontinua negra, la distancia entre G271-FAD (4.38 angstroms) y G273-FAD (3.84 angstroms). **B.** Vista del dominio MnmC(o) con los residuos señalados. Estructura de MnmC de *E. coli* depositada con el código PDB:3PS9 y publicada por Kim and Almo, 2013. Modelo realizado con el programa PyMol.

## 5.2 Dominio MnmC(m)

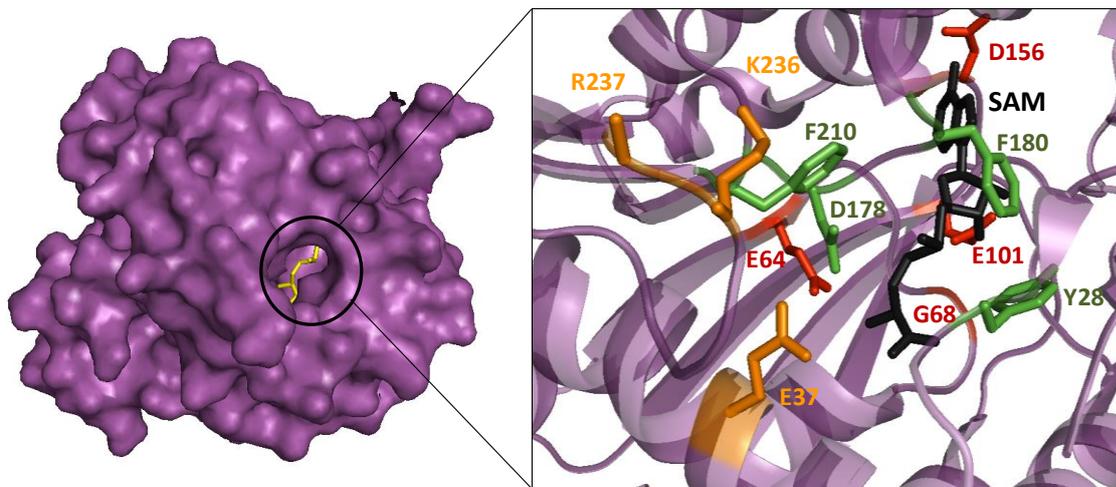
De nuevo utilizamos un ensayo de complementación para estudiar el papel de los residuos de MnmC(m) presuntamente implicados en la actividad modificadora. El mutante *mnmC(m)*-G68D (IC6018), que acumula mayoritariamente en su tRNA el nucleósido nm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U (Tabla 6), fue transformado con plásmidos expresando las diferentes proteínas MnmC(m) portadoras de los cambios aminoacídicos escogidos y analizamos la transformación de nm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U en mnm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U.

**Tabla 10. Niveles de modificación de tRNA encontrados *in vivo* en distintos mutantes de MnmC(m) a DO<sub>600</sub> = 0.5.**

Cepa/ Plásmido	Proteína	% $\frac{\text{mnm}^5\text{s}^2\text{U}}{\text{s}^4}$ (- Ara)	% $\frac{\text{mnm}^5\text{s}^2\text{U}}{\text{s}^4}$ (+ Ara)	Predicción de la función del residuo	Fenotipo
IC6018	MnmC(m) mutante (G68D)	0	0	-	Nulo
IC6018/pIC1340	MnmC(m) Salvaje	97	100	-	Salvaje
IC6018/pIC1521	Y28A	1	0	Catálisis	Nulo
IC6018/pIC1522	E37A	6	88	Unión a tRNA	Parcial
IC6018/pIC1523	E64A	0	57	SAM	Parcial
IC6018/pIC1341	G68D	0	0	SAM	Nulo
IC6018/pIC1524	E101A	0	8	SAM (Ribosa)	Nulo
IC6018/pIC1525	D156A	36	79	SAM (Adenina)	Parcial
IC6018/pIC1526	D178A	0	0	Unión a la base diana y transferencia del metil	Nulo
IC6018/pIC1527	F180A	3	14		Nulo
IC6018/pIC1528	F210A	0	0		Nulo
IC6018/pIC1529	K236A	0	9	Unión a tRNA	Nulo
IC6018/pIC1530	R237A	71	100	Unión a tRNA	Salvaje

El grado de modificación del tRNA (conversión del nm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U a mnm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U) fue calculado mediante la relación del área de los nucleósidos nm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U y mnm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U respecto al área del s<sup>4</sup>U. Las desviaciones no superaron el 20% (2 ensayos independientes). El fenotipo hace referencia a la capacidad modificadora de la proteína mutante tanto en ausencia como en presencia del inductor (arabinosa). Cepa *mnmC(m)*-G68D (IC6018) en fase exponencial.

Como queda reflejado en la tabla 10, en ausencia del inductor arabinosa, la proteína salvaje Flag-MnmC(m) es capaz de modificar el 97 % del sustrato  $\text{nm}^5\text{s}^2\text{U}$ ; sin embargo, la mayoría de los mutantes tienen afectada, en mayor o menor grado, la actividad modificadora. Cuando el nivel de las proteínas mutadas aumenta, por la presencia del inductor en el medio, algunos mutantes llegan a comportarse muy parecidos (E37A y D156A) o igual (R237A) que la cepa salvaje. Los demás mutantes siguen teniendo muy afectada su actividad a pesar de su alto nivel de inducción, en especial Y28A, D68G, E101A, D178A, F180A, F210A y K236A.



**Figura 28. Estructura de MnmC(m).** Se muestran residuos mutados. En rojo: residuos de unión a SAM; en naranja: de unión a tRNA; en verde: residuos implicados en catálisis; y en negro: la molécula de SAM. Depositada con el código pdb:3PS9 y publicada por Kim and Almo, 2013. Modelo realizado con el programa PyMol.

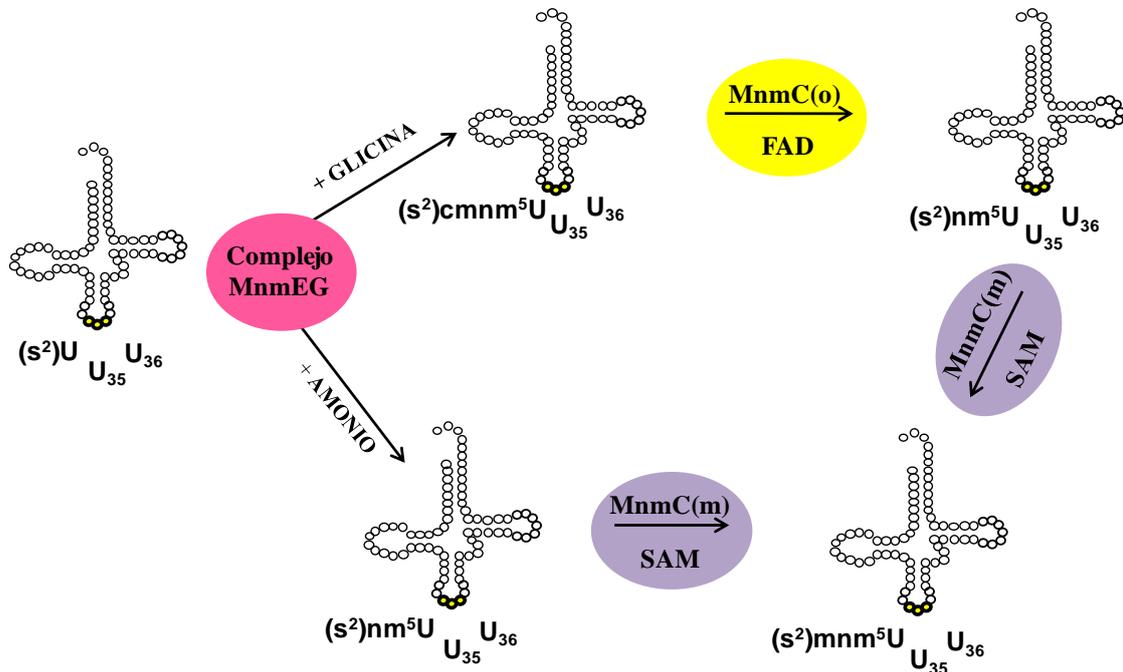
La obtención de la estructura cristalina de MnmC (Kim and Almo, 2013), publicada durante la realización de este trabajo, apoya nuestras predicciones. En la figura 28 podemos observar que todos los residuos estudiados están muy cerca de la molécula SAM (la mayoría a menos de 5 angstroms), por lo que es factible que participen en la reacción de modificación en diferente medida. El residuo K236, de fenotipo nulo cuando se muta a alanina, está a más de 10 angstroms de distancia del SAM. Como se comentó en el dominio MnmC(o), un único cambio de un residuo de unión a tRNA no es esperable que afecte drásticamente a la reacción. Por ello, no excluimos que el residuo K236 tenga algún rol adicional al de unir tRNA.

Queremos resaltar que nuestro estudio funcional apoya y complementa algunas de las predicciones obtenidas a partir de la estructura cristalina. Por nuestra propia experiencia con la proteína MnmE sabemos que es muy importante confirmar con otro tipo de estudios las asignaciones funcionales predichas por los estudios cristalográficos.

## **6. Determinación de la especificidad de MnmC(o) y MnmC(m) por los tRNAs sustrato**

Otro de los objetivos planteados en este trabajo fue conocer el papel que realiza MnmC dentro de la ruta MnmEG de *E. coli*. Hasta la fecha, se ha descrito que en *E. coli* el grupo mnm<sup>5</sup> se encuentra en los tRNAs que descodifican Lisina, Glutámico, Arginina y Glicina (Tabla 2). Por el contrario, sólo se ha identificado el grupo cmnm<sup>5</sup> en los tRNAs Leucina y Glutamina. Estos datos sugieren que tanto tRNA<sup>Gln</sup> como tRNA<sup>Leu</sup> no son sustratos para MnmC(o). Curiosamente, se ha encontrado que el tRNA<sup>Gln</sup> de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium contiene un 80% de cmnm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U y un 20 % de mnm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U (Chen *et al.*, 2005), lo que plantea a través de qué vía se origina el mnm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U en *Salmonella*. Nosotros especulamos que podría formarse por la vía del amonio, de forma que el tRNA<sup>Gln</sup> sería sustrato de MnmC(m) pero no de MnmC(o). Como se observó anteriormente, cuando obtenemos un tRNA total de la cepa sin actividad MnmC y añadimos MnmC(o) (*in vitro* o *in vivo*), queda un remanente de nucleósido modificado con cmnm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U que no se convierte a nm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U (Figuras 20A y 20C). Por lo tanto, la cuestión es saber si el tRNA<sup>Gln</sup> se comporta como el de *S. enterica* o sólo tiene cmnm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U; es decir, averiguar si en *E. coli* el tRNA<sup>Gln</sup> sigue la vía del amonio para dar una proporción de modificación mnm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U parecida a la de *S. enterica* o si ninguna actividad MnmC lo modifica. Decidimos usar dos tipos de estrategias para testar la hipótesis: *in vivo* e *in vitro*. Por una parte, realizamos ensayos de sobreexpresión de tRNA<sup>Gln</sup> en las cepas de interés para ver el estado de modificación del tRNA<sup>Gln</sup> *in vivo*. Además, al igual que con el tRNA<sup>Gln</sup>, se trató de ver cuál era la ruta seguida por el tRNA<sup>Leu</sup><sub>UAA</sub> de *E. coli*. Como control se utilizó siempre el tRNA<sup>Lys</sup> de *E. coli* cuya ruta se esquematiza en la figura 29. Por otra parte, mediante reacción *in vitro* hicimos un

seguimiento de un tRNA<sup>Gln</sup> sin modificar (transcrito *in vitro*) usando consecutivamente las enzimas MnmEG y MnmC(o) o MnmC(m), según se estudiara la vía de la glicina o del amonio, respectivamente.



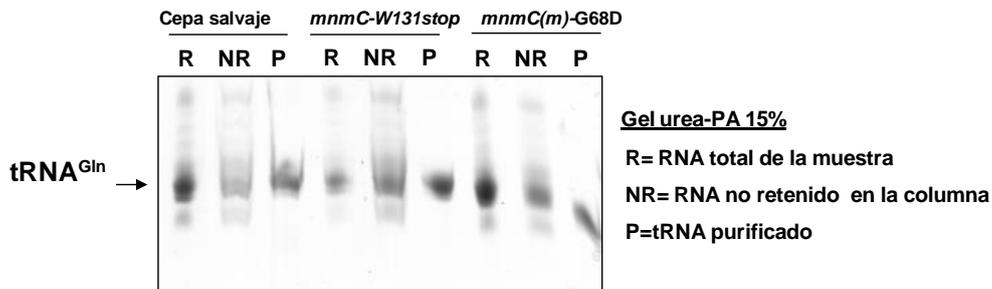
**Figura 29. Ruta MnmEG-MnmC para el tRNA<sup>Lys</sup> de *E. coli*.** La tiolación (s<sup>2</sup>U) está introducida por MnmA.

## 6.1 Estudios *in vivo*

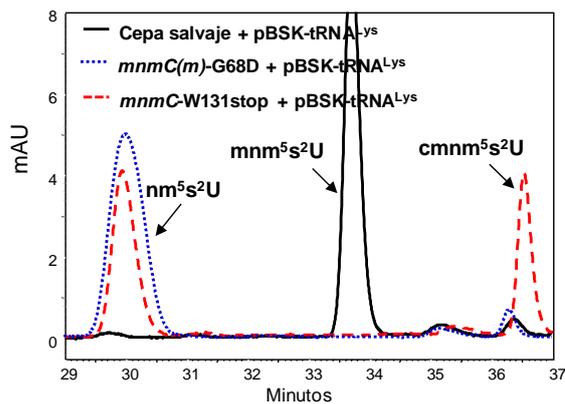
Inicialmente, usamos derivados del chi-tRNA conteniendo las secuencias de los tRNAs de *E. coli* específicos de Lys, Gln y Leu. Sin embargo, no observamos acumulación de los tRNAs recombinantes específicos de Gln y Leu, probablemente porque en la construcción se generan secuencias sensibles a nucleasas endógenas. Por este motivo, se decidió cambiar la estrategia seguida en la sobreexpresión de los tRNAs, prescindiendo del tRNA citosólico humano (*scaffold*) e insertando directamente la secuencia codificante de los tRNAs de interés en el plásmido pBSK<sub>rna</sub> bajo el control del promotor *lpp*, tras digerir el plásmido con EcoRI y PstI. Esta estrategia permite expresar el tRNA de interés sin el *scaffold*. Los datos de la sobreexpresión (Figura 30A) de estos tRNAs indican que mientras el tRNA<sup>Lys</sup> es modificado *in vivo* por la proteína MnmC(o) presente en la cepa mutante *mnmC(m)*-G68D (Figura 30B, el cmm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U es transformado a nm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U), el tRNA<sup>Gln</sup> no es sustrato para MnmC(o) (Figura 30C). Además, los datos

indican que en la cepa salvaje de *E. coli* hay entre un 10-20 % aproximadamente de nucleósido  $mnm^5s^2U$  en el  $tRNA^{Gln}$  (Figura 30C línea negra) que, en consecuencia, debe provenir del  $nm^5s^2U$  procedente de la ruta del amonio y modificado a  $mnm^5s^2U$  por MnmC(m). El comportamiento diferencial observado entre  $tRNA^{Lys}$  y  $tRNA^{Gln}$  indica que los dominios funcionales de MnmC tienen distinta especificidad de sustrato *in vivo*.

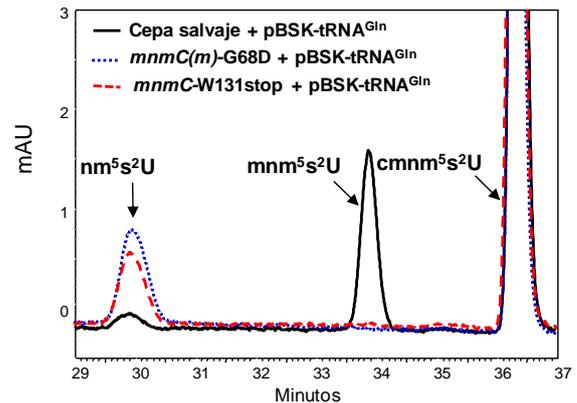
**A**



**B**

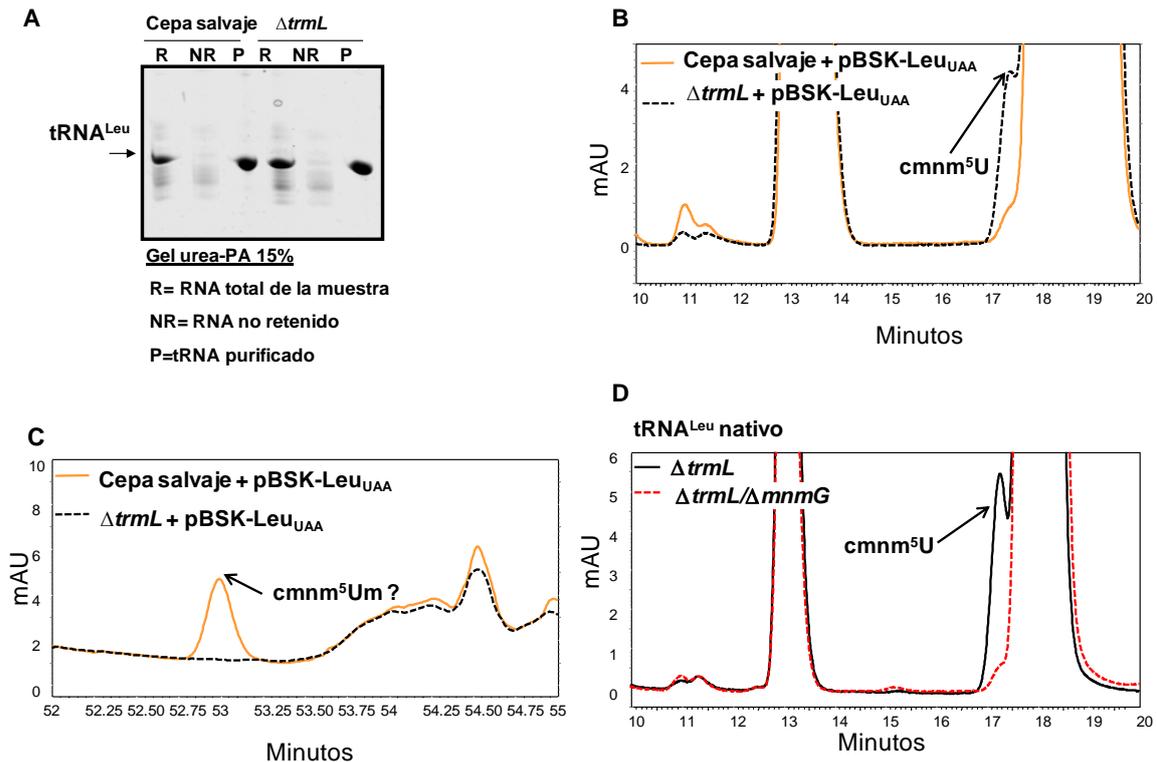


**C**



**Figura 30. Cromatogramas del  $tRNA^{Lys}$  y  $tRNA^{Gln}$  sobrexpresados sin *scaffold* en fase estacionaria.** A. Ejemplo del  $tRNA^{Gln}$  purificado. Gel poliácridamida (PA) 15%-Urea 8M. B-C. Cromatogramas de  $tRNA^{Lys}$  (B) y  $tRNA^{Gln}$  (C) obtenidos en las cepas salvaje (línea negra), *mnmC(m)-G68D* (línea azul punteada) y *mnmC-W131stop* (línea roja discontinua).

Debe observarse que si se compara el perfil cromatográfico de  $tRNA^{Lys}$  y  $tRNA^{Gln}$  en la cepa *mnmC-W131stop*, existe una proporción entre  $cmnm^5s^2U$  y  $nm^5s^2U$  distinta: 35/65 para  $tRNA^{Lys}$  y 90/10 para  $tRNA^{Gln}$ . Esto sugiere que la vía de la glicina es menos eficaz en la modificación del  $tRNA^{Lys}$  en las condiciones usadas (fase estacionaria de cultivo crecido en LBT).



**Figura 31. Sobreexpresión del tRNA<sup>Leu</sup>.** A. Análisis del tRNA<sup>Leu</sup><sub>UAA</sub> purificado en gel poliacrilamida 15%. B. Cromatograma de los tRNA<sup>Leu</sup> obtenidos en las cepas  $\Delta trmL$  (línea negra) y salvaje (línea marrón). C. Detalle de la región de elución del minuto 52 al 55 de los cromatogramas de (B) a 254 nm. D. Perfil cromatográfico del tRNA<sup>Leu</sup> nativo purificado en las cepas  $\Delta trmL$  y  $\Delta trmL/\Delta mnmG$ .

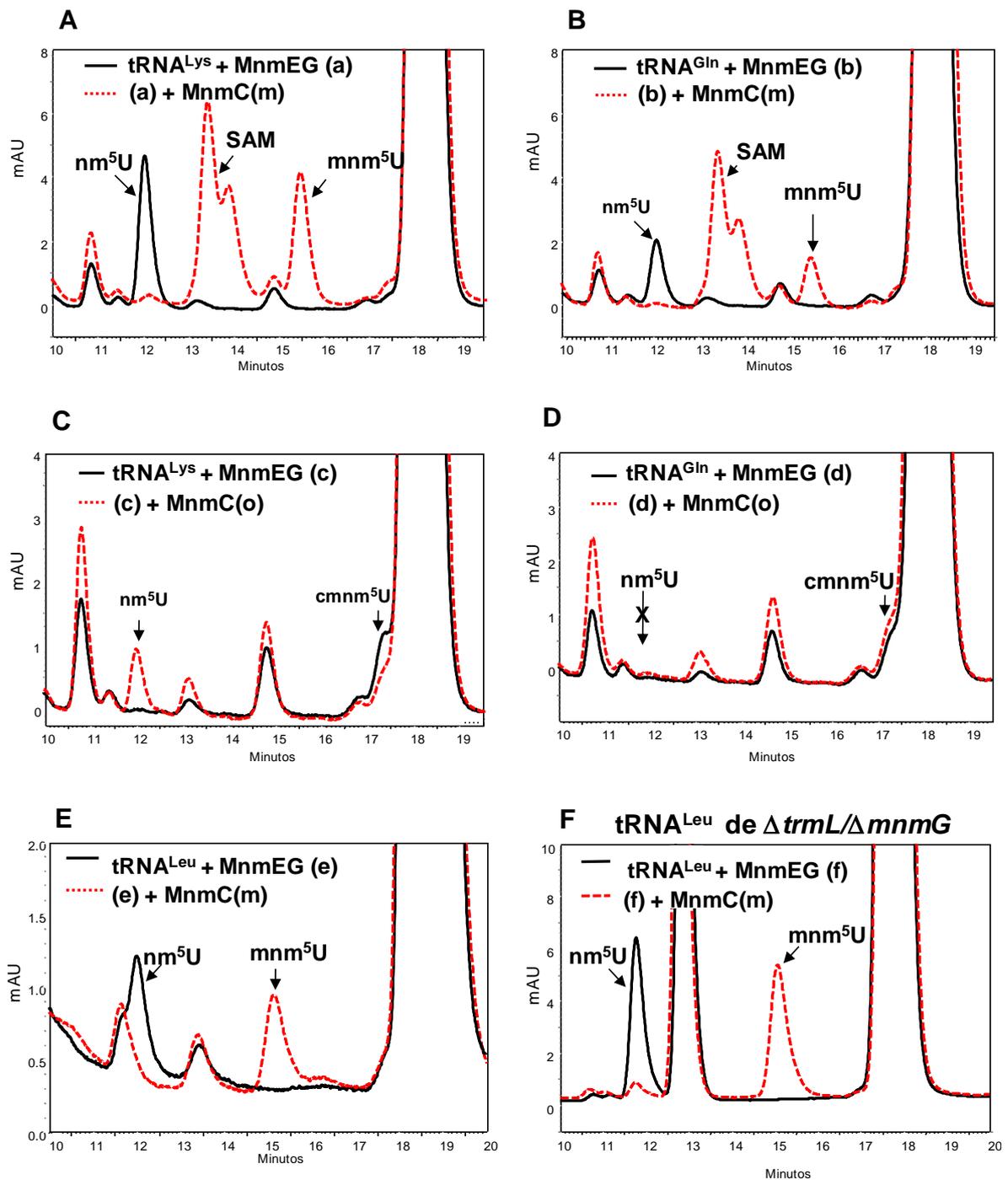
Por otra parte, el tRNA<sup>Leu</sup> sobreexpresado (Figura 31A) en una cepa salvaje y en la cepa deficiente en la actividad TrmL (responsable de la Um) dio como resultado que *in vivo*, al menos en las condiciones de cultivo ensayadas (fase estacionaria), no es modificado por MnmC ya que solamente encontramos cmnm<sup>5</sup>U, producto de la actividad de MnmEG a través de la vía de la glicina (Figura 31B) y no encontramos rastros de mnm<sup>5</sup> o nm<sup>5</sup>. En la cepa salvaje hay un pico diferencial en el minuto 53 que podría ser cmnm<sup>5</sup>Um (Figura 31C) aunque al no existir patrones comerciales para cmnm<sup>5</sup>Um (ni para nm<sup>5</sup>Um o mnm<sup>5</sup>Um) no es posible conocer sus tiempos de retención y estar seguros de la identidad de los picos encontrados. Esta es la razón de que usáramos la cepa  $\Delta trmL$  pues en ella se forma cmnm<sup>5</sup> que sí somos capaces de identificar. Adicionalmente, purificamos el tRNA<sup>Leu</sup> nativo de las cepas  $\Delta trmL$  y  $\Delta trmL/\Delta mnmG$ , encontrando sólo cmnm<sup>5</sup>U en la cepa  $\Delta trmL$  (Figura 31D). Por tanto, ninguna actividad de MnmC modifica

el tRNA<sup>Leu</sup> *in vivo* y el complejo MnmEG sólo lo modifica a través de la ruta de la glicina.

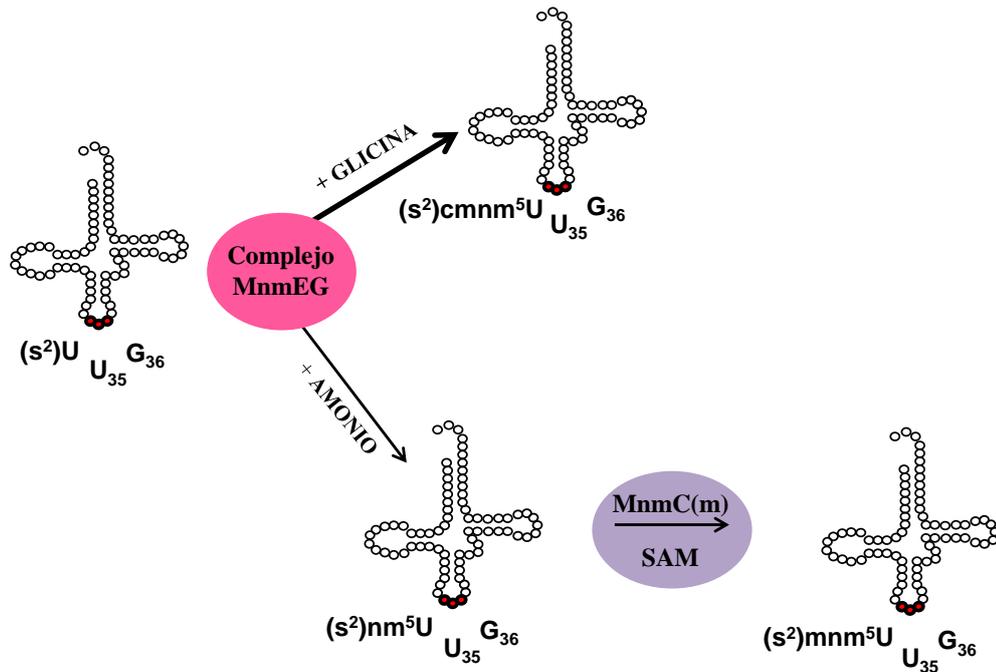
## 6.2 Estudios *in vitro*

Con el fin de comprobar la especificidad de sustrato de los dominios MnmC, deducida de los ensayos *in vivo*, procedimos a realizar reacciones *in vitro*. Los tres tRNAs sustratos se obtuvieron por transcripción *in vitro*, por lo que carecían de modificaciones. El tRNA<sup>Lys</sup> se usó como control positivo de la ruta y cada tRNA se reaccionó con MnmEG añadiendo amonio o glicina, y los cofactores y sustratos adecuados para cada reacción. De ahí se extrajo una alícuota de tRNA para parar la reacción de MnmEG y el resto se reaccionó con MnmC(o) (que actuaría sobre el producto de la ruta de la glicina, cmnm<sup>5</sup>) o con MnmC(m) (que actuaría sobre el producto de la ruta del amonio, nm<sup>5</sup>). La detección de las modificaciones presentes en la U34 se realizó por HPLC a 254 nm de absorbancia ya que es la región donde somos capaces de distinguir las modificaciones de interés sin tiolaciones (nm<sup>5</sup>U y mnm<sup>5</sup>U).

En las reacciones por la vía del amonio, observamos que, tanto para el tRNA<sup>Lys</sup> como para el tRNA<sup>Gln</sup>, existe la modificación final mnm<sup>5</sup>U cuando se añade la proteína MnmC(m) (Figura 32A-B). Estos ensayos indican que el tRNA<sup>Gln</sup> es modificado por MnmC(m) al igual que habíamos encontrado en los ensayos *in vivo*. En el caso de la vía de la glicina (Figura 32C-D), el tRNA<sup>Lys</sup> modificado por MnmEG lleva cmnm<sup>5</sup>U (Figura 32C, pico no resuelto en su totalidad en estas condiciones de HPLC a 254 nm de longitud de onda). Cuando el cmnm<sup>5</sup>U es reaccionado con MnmC(o) pasa a ser nm<sup>5</sup>U. En cambio, para el tRNA<sup>Gln</sup> no hay aparición de nm<sup>5</sup>U (Figura 32D), lo que, de acuerdo con los ensayos *in vivo*, indica que el tRNA<sup>Gln</sup> no es sustrato de MnmC(o). En conjunto, nuestros experimentos demuestran que el tRNA<sup>Gln</sup> puede ser modificado por la vía del amonio, lo que explica que una fracción de este tRNA en *E. coli* lleve mnm<sup>5</sup>. Por ello, proponemos que la nueva nomenclatura para el tRNA<sup>Gln</sup><sub>cmnm5s2UUG</sub> sea tRNA<sup>Gln</sup><sub>(c)mnm5s2UUG</sub>. La ruta propuesta para el tRNA<sup>Gln</sup> de *E. coli* se resume en la Figura 33.



**Figura 32. Reacción *in vitro* de la ruta MnmEG-MnmC con tRNAs transcritos *in vitro*.** **A.** tRNA<sup>Lys</sup> reaccionado con MnmEG por la vía de la glicina (línea negra) y posteriormente reaccionado con MnmC(o) (línea roja). **B.** Igual que A pero con tRNA<sup>Gln</sup>. **C.** tRNA<sup>Lys</sup> reaccionado con MnmEG por la vía del amonio (línea negra) y posteriormente reaccionado con MnmC(m) (línea roja). **D.** Igual que C pero con tRNA<sup>Gln</sup>. **E.** tRNA<sup>Leu</sup> reaccionado con MnmEG por la vía del amonio (línea negra) y posteriormente reaccionado con MnmC(m) (línea roja). **F.** tRNA<sup>Leu</sup> sobrexpresado en la cepa  $\Delta trmL/\Delta mnmG$  y reaccionado con MnmEG por la vía del amonio (línea negra) y posteriormente reaccionado con MnmC(m) (línea roja).



**Figura 33. Ruta de modificación propuesta para el tRNA<sup>Gln</sup> de *E. coli*.** El tRNA<sup>Gln</sup> es modificado mayoritariamente siguiendo la vía de glicina quedando en cmnm<sup>5</sup>. Sin embargo, una proporción menor de es modificada vía amonio y gracias a MnmC(m) se convierte en mnm<sup>5</sup>.

En el caso del tRNA<sup>Leu</sup> obtenido *in vitro*, encontramos la modificación nm<sup>5</sup>U cuando se reacciona con el complejo MnmEG por la vía del amonio que se transforma en mnm<sup>5</sup>U cuando lo tratamos con MnmC(m) (Figura 32E). Tras reaccionar el tRNA<sup>Leu</sup> modificado por MnmEG a través de MnmEG por la vía de glicina y llevando, por tanto, cmnm<sup>5</sup>, con MnmC(o) no detectamos cambios en los niveles de cmnm<sup>5</sup> ni aparición de nm<sup>5</sup> (datos no mostrados), por lo que, aparentemente, el tRNA<sup>Leu</sup><sub>UAA</sub> de *E. coli* no es modificado por MnmC(o) *in vitro* pero sí por MnmC(m). Este resultado contradice los datos obtenidos *in vivo* sugerentes de que tRNA<sup>Leu</sup> no es modificado por MnmEG a través de la vía de amonio y, por tanto, no contiene mnm<sup>5</sup> (que se formaría a través de la actividad de MnmC(m)). Teniendo en cuenta que el tRNA<sup>Leu</sup> usado *in vitro* no lleva modificaciones, pensamos que la presencia de modificaciones en el tRNA<sup>Leu</sup> obtenido *in vivo* podría impedir el funcionamiento de MnmEG a través de la vía del amonio. Por ello, hicimos la reacción *in vitro* usando tRNA<sup>Leu</sup> sobrepresado en la cepa  $\Delta trmL/\Delta mnmG$  (Figura 32F). Sin embargo, el resultado fue similar al encontrado con el tRNA no modificado; es decir, el tRNA<sup>Leu</sup> pudo ser modificado por MnmEG *in vitro* a través de la vía del amonio. En

resumen, los resultados indican que el tRNA<sup>Leu</sup> es modificado *in vivo* predominantemente por la vía de la glicina aunque no es sustrato de MnmC(o) (Figura 34). Aparentemente, este tRNA es modificado *in vivo* muy ineficazmente por la vía del amonio aunque, en las condiciones usadas *in vitro* puede ser modificado por esta vía y ser reconocido por MnmC(m).

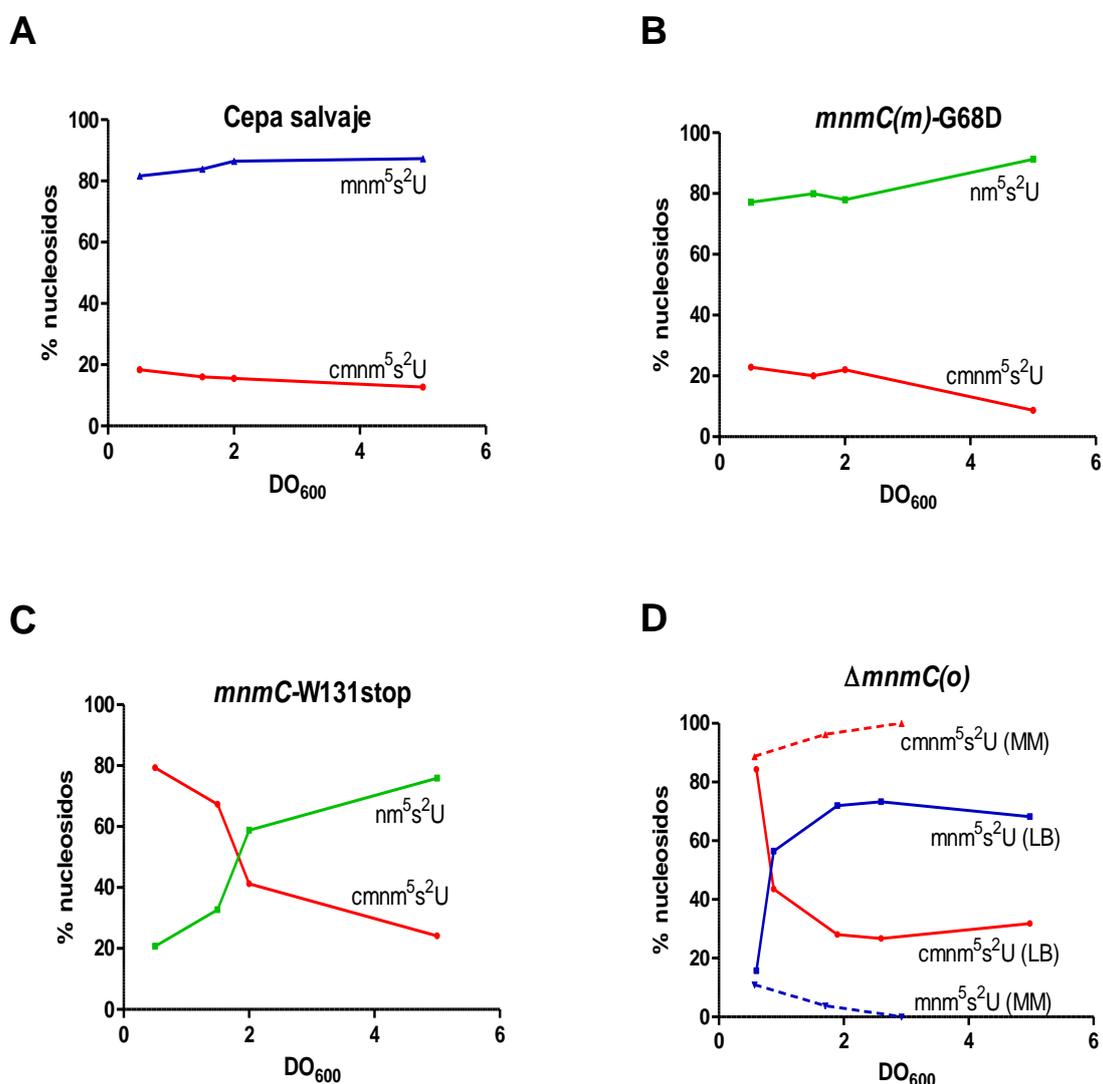


**Figura 34. Ruta de modificación propuesta para el tRNA<sup>Leu</sup><sub>UAA</sub> de *E. coli*.** La modificación Um proviene de la metiltransferasa TrmL. La vía del amonio no se ha detectado en las condiciones *in vivo* estudiadas aunque *in vitro* el MnmEG y el dominio MnmC(m) modifican este tRNA.

## 7. La síntesis de nm<sup>5</sup>U y cmnm<sup>5</sup>U en *E. coli* está determinada por las condiciones de crecimiento y la especie de tRNA

Durante los últimos años se han acumulado evidencias de que el estado de modificación de los RNAs puede variar en respuesta a situaciones de estrés (Phizicky and Hooper, 2010; Chan, 2012 y Chae *et al.*, 2013). Sin embargo, datos antiguos en la literatura indicaban que el nivel de mnm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U era relativamente constante a lo largo de la curva de crecimiento de una cepa silvestre de *E. coli* (Emilsson *et al.*, 1992). En el apartado anterior, cuando se analizó la modificación del tRNA<sup>Lys</sup> y el tRNA<sup>Gln</sup> en la cepa *mnmC*-W131stop (fase estacionaria) se observó que la proporción cmnm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U /nm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U era distinta en cada tRNA (Figura 30B-C), siendo de 35/65 para tRNA<sup>Lys</sup> y de 90/10 para tRNA<sup>Gln</sup>. Asimismo, la proporción de nucleósidos encontrada en el tRNA<sup>Lys</sup> en fase estacionaria no coincide con la encontrada en el tRNA total durante la fase exponencial de la cepa *mnmC*-W131stop (proporción de 69/31, ver Tabla 6). Estos resultados

sugieren que puede haber variaciones en el uso por parte de MnmEG de las vías de amonio y glicina dependiendo de la fase de crecimiento y del tRNA.



**Figura 35. Variación del porcentaje de nucleósidos de la ruta MnmEG-MnmC en función de la fase de crecimiento y medio de cultivo:** de la cepa salvaje (IC6017) (A), de la cepa *mnmC(m)-G68D* (IC6018) (B), de la cepa *mnmC-W131stop* (IC6019) (C), los tres en medio LB; y de la cepa  $\Delta mnmC(o)$  (IC6629) en medio LB o MM (D). Los valores representan la media de 2-3 ensayos independientes siendo la desviación menor a  $\pm 20\%$ .

Para comprobar esta hipótesis analizamos la composición del tRNA extraído de la cepa salvaje (IC6017), el mutante *mnmC(m)-G68D* (IC6018) y la cepa *mnmC-W131stop* (IC6019), crecidas en LBT, a distintas  $DO_{600}$ . Como se muestra en la figura 35, únicamente las cepas deficientes en la actividad MnmC(o) presentan una variación en la

composición de los nucleósidos modificados en la U34 según la fase de crecimiento celular indicando que la actividad de MnmC(o) nos impide saber en la cepa *mnmC(m)-G68D* si el  $\text{nm}^5\text{U}$  que se acumula viene de la vía del amonio o de la glicina y lo mismo ocurre con el  $\text{mnm}^5$  que se acumula en la cepa silvestre. La variación observada cuando no hay MnmC (Figura 35C) muestra que la vía del amonio se hace más importante (aumento de la cantidad de  $\text{nm}^5\text{s}^2\text{U}$ ) cuando el cultivo pasa de la fase exponencial a la fase estacionaria ( $\text{DO}_{600}=0.5 \rightarrow 1.5$ ). La construcción del mutante  $\Delta\text{mnmC}(o)$  (cepa IC6629) fue clave para demostrar cómo la actividad de MnmC(o) puede engañarnos e impedir apreciar la capacidad de MnmEG para usar amonio o glicina según las circunstancias. La figura 35D (líneas continuas) muestra el resultado obtenido con este mutante siendo similar al obtenido en el mutante nulo *mnmC-W131stop* (Figura 35C) excepto que los nucleósidos formados no son los mismos debido a la presencia del dominio MnmC(m) en el nuevo mutante. Curiosamente, si el medio de crecimiento es pobre (medio mínimo) aparece otro tipo de perfil de modificación pues la vía de la glicina siempre es predominante, independientemente de la fase de crecimiento (Figura 35D líneas discontinuas).

A priori estas observaciones muestran una variación del estado de modificación de la U34 en cepas deficientes en MnmC(o), variación que es dependiente del medio y de la fase de crecimiento. Esto indica que las modificaciones post-transcripcionales de la U34 no son grupos químicos permanentes sino que la célula es capaz de variar la composición de los nucleósidos como respuesta a condiciones ambientales y fisiológicas. Hasta ahora el cambio de ruta dependiente de MnmEG se ha observado en tRNAs totales (obtenidos en cepas sin actividad MnmC), lo que no nos permite conocer si el cambio es general para todos los tRNAs sustratos de *E. coli* o sólo se produce en tRNAs específicos. Por ello, preliminarmente analizamos lo que le ocurría a  $\text{tRNA}^{\text{Lys}}$  y  $\text{tRNA}^{\text{Gln}}$  superexpresados en bacterias crecidas en medio LBT o MM en fase estacionaria (Figura 35C). En medio LBT (Tabla 11) se observa que el  $\text{tRNA}^{\text{Lys}}$  sobrepresado tiene un patrón similar al tRNA total en fase estacionaria. En cambio, el  $\text{tRNA}^{\text{Gln}}$  tiene mayoritariamente  $\text{cmnm}^5\text{s}^2\text{U}$  en esta fase. Además, se obtuvieron estos dos tRNAs en medio mínimo (MM) observándose que en estas condiciones la vía de la glicina es siempre mayoritaria.

**Tabla 11. Relación de nucleósidos modificados en tRNAs sobrepresados observada en fase estacionaria.**

Cepa	tRNA	Medio LBT		Medio MM*	
		%	%	%	%
		nm <sup>5</sup> s <sup>2</sup> U	cmnm <sup>5</sup> s <sup>2</sup> U	nm <sup>5</sup> s <sup>2</sup> U	cmnm <sup>5</sup> s <sup>2</sup> U
<i>ΔmnmC</i>	Lys	64 ± 1	36 ± 1	0 ± 0	100 ± 0
	Gln	10 ± 2	90 ± 2	0 ± 0	100 ± 0

En la tabla se muestra la distribución relativa de nucleósidos en porcentaje en fase estacionaria (DO<sub>600</sub> ≈3) de tRNA sobrepresados en la cepa *ΔmnmC* (IC6010) usando medio LBT o MM. \*Medio YM9 suplementado con glucosa al 0.4%.

El uso de tRNAs superexpresados facilita la purificación de los mismos pero su protocolo de obtención implica recuperarlos en fase estacionaria. Por ello, no es posible estudiar lo que ocurre en fase exponencial. Por tanto, procedimos a obtener los tRNA<sup>Lys</sup> y tRNA<sup>Gln</sup> nativos (es decir, sin sobrepresar) de la cepa *ΔmnmC* (LBT) en las dos fases, usando sondas específicas. Como puede observarse en la Tabla 12, tRNA<sup>Lys</sup> y tRNA<sup>Gln</sup> son mayoritariamente modificados a través de la ruta de la glicina cuando la cepa *ΔmnmC* crece exponencialmente en LBT (acumulación de cmnm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U). Sin embargo, la situación cambia cuando entra en fase estacionaria pues entonces el tRNA<sup>Lys</sup> se modifica predominantemente por la ruta del amonio (se acumula nm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U) mientras que el tRNA<sup>Gln</sup> sigue modificándose por la ruta de la glicina. Estos datos demuestran que la acumulación de cmnm<sup>5</sup> o nm<sup>5</sup> depende de la especie de tRNA.

Como he dicho, los datos de la Tabla 11 también demuestran que el estado de modificación es dependiente del medio de cultivo dado que en medio mínimo la vía de la glicina es siempre mayoritaria en fase estacionaria, independientemente de la especie de tRNA (Lys o Gln). Este hecho directamente apunta a que el medio de cultivo está afectando la actividad MnmEG. En general, todos estos datos plantean la existencia de

algún tipo de regulación que depende de la especie de tRNA, del medio de cultivo y de la fase de crecimiento.

**Tabla 12. Relación de nucleósidos modificados en tRNAs nativos observada en distintas fases.**

tRNA nativo	fase de crecimiento	LBT*	
		% nm <sup>5</sup> s <sup>2</sup> U	% cmm <sup>5</sup> s <sup>2</sup> U
Lys	Exponencial	6 ± 1	94 ± 1
	Estacionaria	96 ± 2	4 ± 2
Gln	Exponencial	1 ± 1	99 ± 1
	Estacionaria	7 ± 2	93 ± 2

\* Distribución relativa de nucleósidos en porcentaje según la fase de crecimiento y la especie de tRNA. Los tRNAs nativos se purificaron de la cepa *ΔmnmC* (IC6010) durante fase exponencial (DO<sub>600</sub> ≈ 0.4) o estacionaria (DO<sub>600</sub> ≈ 3).

## 8. Coste biológico de las mutaciones *mnmC*

8.1 Estudio del efecto de las mutaciones *mnmC(o)* y *mnmC(m)* sobre el crecimiento de *E. coli* en fase exponencial: tiempos de doblaje

La modificación en la U34 de los tRNAs es importante para la exactitud y eficacia del proceso de traducción de proteínas, contribuyendo a la correcta descodificación de mRNA. Por ello, la falta de alguna modificación (o la presencia de alguna modificación intermediaria) podría afectar a la maquinaria traduccional y consecuentemente al crecimiento celular. Por esta razón, analizamos los tiempos de doblaje de distintas cepas deficientes en MnmC en varios fondos genéticos de *E. coli* (Tabla 13).

Las cepas deficientes en *mnmC*, *mnmC(o)* y *mnmC(m)*, no muestran diferencias significativas en los valores del tiempo de doblaje respecto a la cepa salvaje en ningún fondo estudiado. Esto contrasta con el crecimiento lento conferido por las mutaciones *mnmE* y *mnmG*, detectado previamente por nuestro grupo (Martínez-Vicente *et al.*, 2005), y sugiere que la carencia de modificaciones en la posición 5 de la U34 debido a las mutaciones *mnmE* y *mnmG* es más deletérea que la acumulación de un intermediario de la modificación como ocurre en los mutantes *mnmC*.

**Tabla 13. Tiempos de doblaje en minutos de las cepas ensayadas.**

Cepas	Fondo genético		
	TH48	BW25113	Dev16
Salvaje	34 ± 1	28 ± 1	28 ± 1
<i>mnmC</i> *	33 ± 1	30 ± 1	29 ± 1
<i>mnmC(m)</i> -G68D	32 ± 1	N	30 ± 1
$\Delta$ <i>mnmC(o)</i>	N	28 ± 1	N
<i>mnmA</i> <sup>‡</sup>	N	40 ± 1	56 ± 1
<i>mnmA</i> / $\Delta$ <i>mnmC</i> <sup>#</sup>	N	N	73 ± 2 <sup>↓</sup>
$\Delta$ <i>mnmA</i> / <i>mnmC(m)</i> -G68D	N	N	78 ± 2 <sup>↓</sup>
$\Delta$ <i>mnmA</i> / $\Delta$ <i>mnmC(o)</i>	N	58 ± 3	N

La tabla muestra los tiempos de doblaje bacterianos, en minutos, de al menos dos ensayos independientes. Los doblajes se hicieron en medio LBT y en fase exponencial. N= no testado. \* Mutantes  $\Delta$ *mnmC* para las cepas: IC6010 (fondo BW25113), IC6222 (Fondo Dev16). Mutante *mnmC*-W131stop para la cepa IC6019 (Fondo TH48). ‡ Mutante  $\Delta$ *mnmA* para la cepa IC5829 (Fondo BW25113) y mutante *mnmA*-Q233stop para la cepa IC5397 (Fondo Dev16). # Cepa *mnmA*-Q233stop/ $\Delta$ *mnmC* (IC6589). <sup>↓</sup> Las diferencias estadísticas entre los tiempos de doblaje indicados se calcularon mediante un test ANOVA con p-valor < 0.05 siendo significativa.

Dado que los datos previos de nuestro grupo han indicado que la combinación de mutaciones *mnmE* y *mnmA* es letal (Armengod *et al.*, 2014), decidimos analizar qué fenotipo producía la combinación de mutaciones *mnmC* y *mnmA*. En la tabla 13, puede observarse que el mutante *mnmA* muestra un aumento en el tiempo de doblaje en los dos fondos genéticos estudiados respecto a la cepa salvaje, confirmando datos previos

(Nilsson *et al*; 2002 y Kruger *et al*; 1998). Notablemente, los dobles mutantes construidos, presentan diferencias significativas en los valores del tiempo de doblaje respecto al simple mutante *mnmA*. Esto indica que la combinación de las mutaciones *mnmC* y *mnmA* tiene un efecto sinérgico: las mutaciones *mnmC* que no tienen efecto en una cepa silvestre empeoran el crecimiento de un mutante *mnmA*. Además, la presencia mayoritaria de  $\text{nm}^5\text{U}$  (cepa *mnmC(m)*-G68D/ $\Delta$ *mnmA*) perjudica ligeramente más a la célula que la presencia mayoritaria de  $\text{cmnm}^5\text{U}$  (cepa *mnmA*/ $\Delta$ *mnmC*) en las condiciones ensayadas (crecimiento en fase exponencial en medio LBT).

## 8.2 Análisis del papel de MnmC(o) y MnmC(m) de *E. coli* en la fase estacionaria: ensayos de competición

En determinadas condiciones ambientales una cepa deficiente en una actividad enzimática puede tener ventajas o inconvenientes a la hora de competir frente a la cepa salvaje. A veces, un problema de crecimiento no se detecta en las condiciones relativamente óptimas que se dan cuando una cepa crece en solitario y a velocidad máxima para las condiciones utilizadas. Como los resultados de los tiempos de doblaje indican que no hay una diferencia en el crecimiento atribuible a la sola presencia de mutaciones *mnmC*, nos planteamos realizar un ensayo de competición para conocer si alguna de estas cepas mutantes simples presentaba alguna ventaja o desventaja frente a la cepa salvaje. Para ello, pusimos a competir con la cepa silvestre de referencia (BW25113) cada uno de los mutantes *mnmC* seleccionados, *mnmC(m)*-G68D (IC6018) y *mnmC*-W131stop (IC6019), así como su cepa silvestre originaria (IC6017), representativa del fondo genético de los mutantes. El resultado se muestra en la tabla 14. Al cabo de seis diluciones (ciclos de 24 horas), la cepa silvestre analizada (IC6017) frente a la de referencia (BW25113) mostraba una clara desventaja pues sólo representaba el 2.1% de las colonias recuperadas. Notablemente, la presencia de las mutaciones agravó la desventaja, teniendo un efecto más negativo la mutación W131stop que la mutación *mnmC(m)*-G68D. Estos resultados sugieren que las modificaciones introducidas por MnmC confieren una ventaja selectiva a *E. coli*.

**Tabla 14. Resultados del ensayo de competición.**

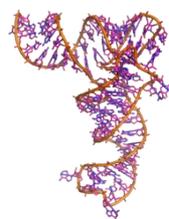
<b>Cepa BW25113 contra:</b>	<b>Ratio* al inicio del ensayo</b>	<b>Ratio después de seis diluciones</b>
<b>Cepa salvaje</b>	0.56 ± 0.007	0.021 ± 0.03
<b><i>mnmC(m)</i>-G68D</b>	0.53 ± 0.09	0.0020 ± 0.0006 $\alpha$
<b><i>mnmC</i>-W131stop</b>	0.56 ± 0.04	0.0002 ± 0.0001 $\alpha$

Cepa salvaje (IC6017), *mnmC(m)*-G68D (IC6018) y *mnmC*-W131stop (IC6019).

\*El ratio se calculó como UFC/mL en medio sólido LAT suplementado con tetraciclina frente al recuento en LAT. UFC: unidades formadoras de colonias.  $\alpha$  La diferencia estadística entre los ratios de competición de estas cepas se calcularon mediante un test ANOVA con p-valor < 0.001 siendo no significativas entre ellas.



# Discusión





MnmC es una enzima bifuncional que actúa sobre la uridina 34 de un grupo de tRNAs y que consta de dos dominios con funciones diferentes: un dominio carboxi-terminal con función óxido-reductasa dependiente de FAD y un dominio amino-terminal con función metiltransferasa dependiente de SAM. Esta Tesis explora las actividades y especificidades de MnmC (y sus dominios), la habilidad de tRNAs específicos para seguir las rutas de amonio y glicina controladas por MnmEG bajo diferentes condiciones de crecimiento y el coste biológico de mutaciones *mnmC*.

## 1. Los dominios de MnmC son funcionalmente independientes

Nuestros resultados claramente demuestran que los dominios de MnmC son funcionalmente independientes. Importante para el logro de esta conclusión fue la expresión separada de ambos dominios. El hecho de que el dominio MnmC(o) purificado lleve unido FAD sugiere que se ha plegado correctamente y, en consecuencia, que el dominio MnmC(m) no es necesario para tal plegamiento en contra de lo sugerido previamente (Roovers *et al.*, 2008). Además, los dos dominios separados son catalíticamente activos en ensayos *in vitro* e *in vivo* y muestran propiedades cinéticas similares a las de la proteína MnmC entera. Finalmente, nuestros datos indican que los dominios tienen diferente especificidad por los tRNAs sustrato. Así, el dominio MnmC(o) modifica tRNA<sup>Lys</sup><sub>UUU</sub> pero no tRNA<sup>Gln</sup><sub>UUG</sub> ni tRNA<sup>Leu</sup><sub>UAA</sub>. Todos estos datos apoyan que los dominios MnmC(o) y MnmC(m) funcionan independientemente.

Los análisis de las secuencias de genomas completos han mostrado que posibles ortólogos (genes con secuencia similar derivados de un ancestro común) de MnmC de *E. coli* están conservados sólo en  $\gamma$ -proteobacterias, con algunos miembros en otras clases bacterianas (Bujnicki *et al.*; 2004). Interesantemente, se han identificado en varios genomas los ortólogos potenciales de un solo dominio pero su función biológica sólo se ha demostrado experimentalmente en el caso de la proteína DUF752 de *Aquifex aeolicus*, homóloga de MnmC(m) (Kitamura *et al.*; 2012). No se sabe cuál es la versión ancestral de MnmC, si la proteína bifuncional o los dominios separados, aunque los datos presentados en esta Tesis favorecen la idea de que MnmC de *E. coli* es un ejemplo de fusión génica.

Esta fusión aportaría ventajas en cuanto a la transcripción y traducción en una única ORF y, además, podría incrementar la estabilidad en la célula de la proteína resultante. De hecho, los resultados de vida media indican que la proteína MnmC entera es más estable (51 min) que los dominios MnmC(m) (30 min) y MnmC(o) (18 min), y que otras proteínas modificadoras de RNA como son RsmG (17 min) o MnmG (31 min) (Benítez-Páez *et al*; 2012). No se puede descartar la posibilidad de que la fusión también facilite la cooperación funcional entre los dominios durante la modificación del tRNA siguiendo la ruta canónica MnmEG-MnmC(o)-MnmC(m), gracias a la proximidad espacial de los dominios fusionados en una única entidad proteica.

La formación de macrocomplejos proteicos que faciliten la modificación de los tRNAs ha sido un tema planteado recientemente. En *A. aeolicus* se ha observado la interacción entre el homólogo de MnmC(m) y MnmE o MnmG (Kitamura *et al*; 2012). En *E. coli* no hemos encontrado interacción de MnmC con MnmE o MnmG mediante análisis por FPLC o SPR. Sin embargo, no descartamos la posibilidad de que el complejo MnmEG pueda interactuar con MnmC *in vivo* para formar estructuras que ayuden a su función como se ha descrito en otras enzimas implicadas en la biología del RNA (Bandyra *et al*; 2013).

La gran variabilidad encontrada en la distribución filogenética de MnmC plantea además la cuestión de por qué no se mantiene el esquema de MnmC de *E. coli* en otros organismos. Es decir, por qué en unos organismos existen las dos actividades (*Salmonella entérica* serovar *typhimurium*, *E. coli*), en otros sólo MnmC(m) (*A. aeolicus*) o incluso, en la mayoría, no hay ninguna actividad MnmC que introduzca la modificación mnm<sup>5</sup>, con lo que el complejo MnmEG (GTPBP3-MTO1, en mitocondrias humanas) se queda aparentemente solo en la modificación de la posición 5 de la U34. Probablemente ha habido un proceso de convergencia evolutiva por el que otra(s) proteínas han asumido la función de MnmC (“MnmC-like proteins”). Resultados recientes de nuestro laboratorio indican que existe mnm<sup>5</sup> en *Bacillus subtilis* (usada como modelo de gram positivas) a pesar de no tener secuencias homólogas de *mnmC*. El hecho de que exista mnm<sup>5</sup> en *B. subtilis* sugiere que este nucleósido confiere ventajas en la descodificación de ciertos

mRNAs frente a  $\text{cmnm}^5$  o  $\text{nm}^5$ , como apoyan los datos obtenidos en este trabajo en los experimentos de competición (Tabla 14).

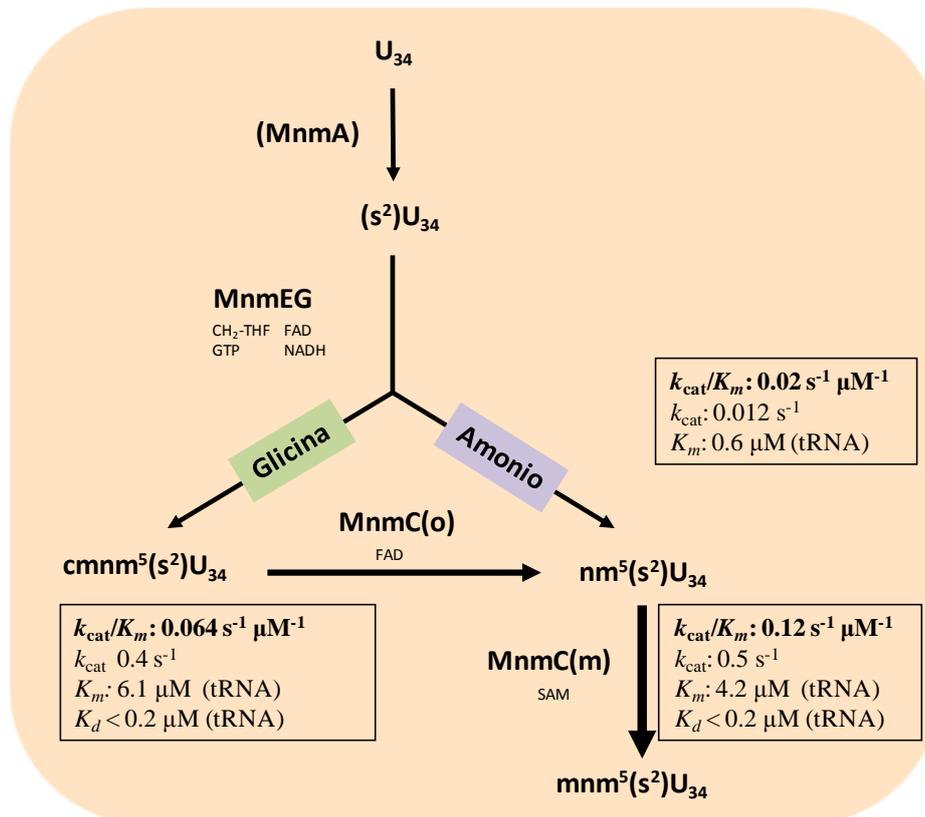
## 2. Las rutas MnmEG-MnmC están reguladas cinéticamente

La biosíntesis de modificaciones complejas como son  $\text{mnm}^5\text{s}^2\text{U}$ ,  $\text{cmnm}^5\text{s}^2\text{U}$ ,  $\text{cmnm}^5\text{Um}$  y  $\text{mnm}^5\text{U}$  requiere la participación de al menos dos enzimas específicas (Figura 36). De acuerdo con los datos *in vitro* (matizables en cuanto a que es discutible que las condiciones usadas sean las óptimas y representen realmente las condiciones *in vivo*), la eficacia catalítica de la ruta MnmEG-MnmC sigue el orden:

$$\text{MnmEG} < \text{MnmC(o)} < \text{MnmC(m)}$$

lo que indica que la ruta podría estar controlada cinéticamente para “evitar” la acumulación de intermediarios.

Ante la duda de si las condiciones usadas *in vitro* son similares a las que se dan *in vivo*, decidimos analizar el estado de modificación de los tRNAs en la célula y la posible acumulación de intermediarios. Los datos obtenidos con el  $\text{tRNA}^{\text{Lys}}$  *in vivo* apoyan la idea de que MnmEG y MnmC parecen estar acopladas cinéticamente para producir la modificación final  $\text{mnm}^5\text{s}^2\text{U}$  ya que no se encontraron intermediarios ( $\text{cmnm}^5\text{s}^2\text{U}$  y  $\text{nm}^5\text{s}^2\text{U}$ ) en la cepa salvaje (Figura 22A). Aparentemente, los posibles intermediarios no son eliminados por degradación ya que se pueden observar en las cepas  $\Delta\text{mnmC}$  y  $\text{mnmC(m)}\text{-G68D}$  y son, por tanto, estables (Figura 22B-C). El hecho de que en la cepa salvaje no se detecten intermediarios con  $\text{s}^2\text{U}$  (o intermediarios no tiolados del tipo  $\text{nm}^5$ ) sugiere que los procesos de síntesis de las modificaciones que ocurren en las posiciones 2 y 5 deben estar coordinados a través de la modulación de las actividades y abundancias relativas de las enzimas MnmEG y MnmA.



**Figura 36. Esquema resumen de las cinéticas enzimáticas de la ruta MnmEG-MnmC.**

La regulación de la ruta MnmEG-MnmC es compleja. El descubrimiento en nuestro laboratorio de la presencia de  $mnm^5$  en el tRNA de *B. subtilis* a pesar de que esta bacteria no tenga homólogos de MnmC plantea algunas dudas relativas al encuentro de que en *A. aeolicus*, el complejo MnmEG sólo utiliza la vía del amonio. El trabajo publicado por Bessho y colaboradores (Kitamura *et al*; 2012) indicaba la presencia de  $mnm^5$  en el tRNA de *A. aeolicus*. Dado que en este organismo sólo hay una homóloga del dominio MnmC(m) pero no se encuentra homóloga de MnmC(o), se propuso que MnmEG utilizaría la vía del amonio para dar lugar a  $nm^5$  y la homóloga de MnmC(m), DUF752, lo transformaría a  $mnm^5$ . En consecuencia, MnmEG no usaría la vía de la glicina en *A. aeolicus*. La detección de los nucleósidos del tRNA no es una tarea simple como lo demuestra el hecho de que hasta ahora haya pasado desapercibida la presencia de  $mnm^5$  en *B. subtilis*. Por lo tanto, nosotros creemos que hay que ser prudentes a la hora de interpretar los datos de *Aquifex* pues no se puede descartar la posibilidad de que una proteína con “actividad MnmC(o)-like”, no homóloga al dominio MnmC(o) de *E. coli*, se encargue de transformar el  $cmnm^5$  producido por MnmEG a través de la vía de la glicina

en nm<sup>5</sup> y que la homóloga de MnmC(m) transforme este nm<sup>5</sup> (así como el que pueda venir por la vía del amonio) en mnm<sup>5</sup>, tal y como ocurre con MnmC de *E. coli*.

Un aspecto interesante respecto a la reacción de modificación del tRNA es en qué paso las interacciones físicas entre el tRNA sustrato y la enzima son discriminatorias frente a un tRNA no sustrato. Los estudios de interacción entre tRNA y las proteínas MnmC obtenidos por SPR y fluorescencia intrínseca señalan que MnmC no distingue entre un tRNA sustrato y un tRNA no sustrato en el momento de la unión. Como estos dos ensayos se realizaron tanto con tRNA no modificado (tRNA transcrito *in vitro*) como con tRNA modificado *in vivo*, pensamos que estas modificaciones presentes en el tRNA no ejercen de determinantes de discriminación en este primer paso de unión. Por tanto, puede existir un acople inducido, posterior al de la unión, que provoque la acomodación del tRNA sustrato en el sitio catalítico de la enzima. Esta característica ya ha sido reportada en otras proteínas modificadoras de tRNA como por ejemplo TrmFO (introduce un metil en U54) de *Thermus thermophilus* (Yamagami *et al.*, 2012).

### **3. Análisis mutacional de los dominios de MnmC**

Uno de los objetivos de esta Tesis fue profundizar en las relaciones estructura-función que se dan en MnmC. Mediante una estrategia *in vivo* analizamos el fenotipo conferido por mutaciones en residuos presuntamente importantes para la actividad modificadora. Los análisis realizados indicaron, primero, que el plásmido con la secuencia salvaje complementa la función de las cepas mutantes (Tablas 9 y 10). Segundo, que los residuos mutados están afectando a la actividad funcional en diferentes grados. Los mutantes Y28A, D68G, E101A, D178A, F180A, F210A y K236A dan unos valores típicos del fenotipo nulo (Tabla 15). Parece que están funcionalmente afectados ya que no son capaces de convertir el sustrato en producto. En cambio, los mutantes Y501A, H573A, S617A dan un fenotipo parcial suprimible según la cantidad de proteína mutante que se acumule. En una posición intermedia se encuentran los mutantes G271A, G273A, R653A, E64A, E37A y el D156A, pues dan siempre un fenotipo parcial aún cuando la proteína mutante se acumule en exceso.

**Tabla 15. Resumen de los residuos mutados en este estudio.**

Residuo mutado	Predicción de la función del residuo	Fenotipo <sup>1</sup>	Residuo mutado	Predicción de la función del residuo	Fenotipo <sup>1</sup>
Dominio MnmC(o)			Dominio MnmC(m)		
<b>G271A</b>	Unión a FAD	Parcial	<b>Y28A</b>	Catálisis	Nulo
<b>G273A</b>	Unión a FAD	Parcial	<b>E37A</b>	Unión a tRNA	Parcial
<b>Y501A</b>	Unión a tRNA	Parcial*	<b>E64A</b>	SAM	Parcial
<b>H573A</b>	Unión a tRNA	Parcial*	<b>G68D</b>	SAM	Nulo
<b>S617A</b>	Unión y/o Catálisis	Parcial*	<b>E101A</b>	SAM (Ribosa)	Nulo
<b>R653A</b>	Unión a tRNA	Parcial	<b>D156A</b>	SAM (Adenina)	Parcial
			<b>D178A</b>	Unión a la base diana y transferencia del metil	Nulo
			<b>F180A</b>		Nulo
			<b>F210A</b>		Nulo
			<b>K236A</b>	Unión a tRNA	Nulo

\*Parcial suprimible por cantidad de proteína. <sup>1</sup>Fenotipo de acuerdo al grado de modificación del tRNA encontrado.

Al respecto, Roovers *et al.* (2008) obtuvieron datos *in vitro* sobre los mutantes E64A, D178A y F180A. Mediante un ensayo de complementación *in vitro* con [metil-<sup>14</sup>C]SAM y tRNAs totales purificados de *B. subtilis*, las proteínas recombinantes purificadas con cola de Histidinas indicaron que el mutante E64A no tiene actividad metilasa porque su función sería la de unirse a la metionina del SAM y que los otros dos residuos tienen actividad metilasa parcial: por tanto, estarían perjudicados para unirse a la base diana y catalizar la transferencia del metilo. Nosotros demostramos *in vivo* que estos mutantes no son, efectivamente, funcionales (Kitamura *et al.*; 2011 y Kim and Almo, 2013).

#### 4. El uso de las rutas controladas por MnmEG y MnmC depende de las condiciones de crecimiento y del tRNA sustrato

En esta Tesis se ha demostrado que cada dominio de MnmC tiene su propia especificidad de sustrato. Esto determina que cada tRNA pueda seguir una ruta MnmEG-MnmC diferente. Así, el tRNA<sup>Lys</sup> puede ser modificado por MnmEG por las rutas de amonio y glicina y, dado que es sustrato de MnmC(o) y MnmC(m), su modificación final es mnm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U. En cambio, el tRNA<sup>Gln</sup> es modificado por MnmEG predominantemente por la ruta de la glicina y no siendo sustrato de MnmC(o) lleva mayoritariamente cmnm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U como modificación final. Sin embargo, como una pequeña parte de moléculas de tRNA<sup>Gln</sup> es modificada por MnmEG a través de la ruta del amonio y el tRNA<sup>Gln</sup> es sustrato de MnmC(m), esas moléculas llevan mnm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U como modificación final. Por ello, nuestro grupo ha propuesto cambiar la nomenclatura de este tRNA a RNA<sup>Gln</sup><sub>(c)mnm5s2UUG</sub> (Moukadiri *et al.*, 2014). Finalmente, el tRNA<sup>Leu</sup> aparentemente sólo puede ser modificado por MnmEG *in vivo* a través de la ruta de la glicina y no siendo sustrato de MnmC(o) lleva cmnm como modificación final en la posición 5 de la U34.

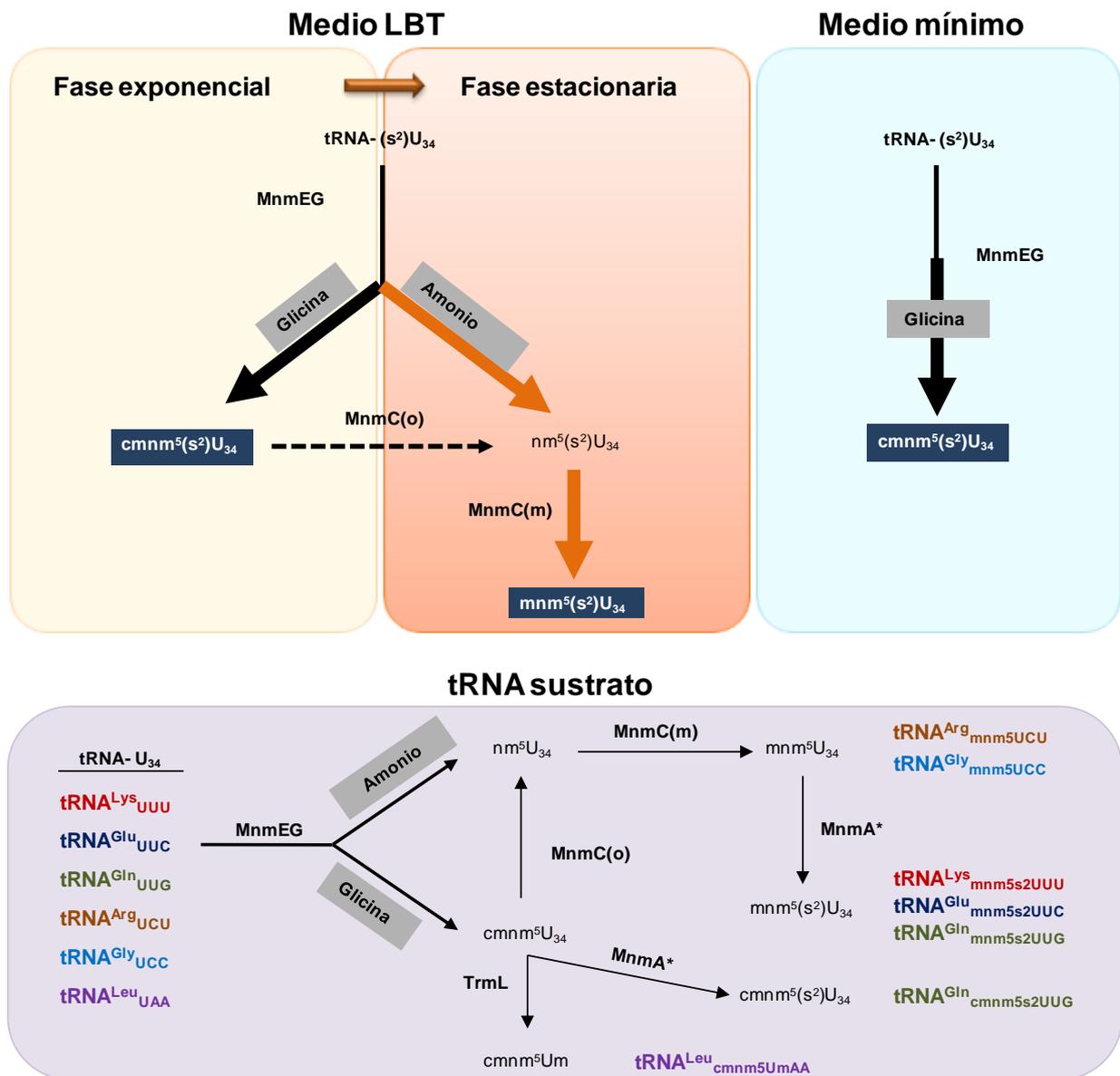
El uso de las cepas  $\Delta mnmC(o)$  o  $\Delta mnmC$  nos permitió estudiar la capacidad de usar amonio o glicina por parte del complejo MnmEG bajo distintas condiciones y detectar que existe una reprogramación en la modificación de la U34 de tRNAs de *E. coli*. El análisis del tRNA total recuperado en la cepa  $\Delta mnmC(o)$  en fase exponencial en estas cepas crecidas en medio LBT indica que la vía de la glicina está favorecida frente a la vía del amonio, ya que se detecta cmnm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U mayoritariamente (Figura 35D, línea roja continua). No obstante, se observa un cambio gradual de las vías dependiente del crecimiento (según entra la fase estacionaria predomina la vía del amonio). En contraposición, cuando las células son crecidas en medio mínimo, la vía predominante es la de la glicina en cualquier fase de crecimiento (Figura 35D, línea roja discontinua). Dado que las variaciones en el tRNA total pueden depender de tRNAs específicos, en esta Tesis hemos analizado el comportamiento de tRNA<sup>Lys</sup><sub>UUU</sub>, tRNA<sup>Gln</sup><sub>UUG</sub> y tRNA<sup>Leu</sup><sub>UAA</sub>.

La naturaleza de los distintos tRNAs parece ser crucial para la acción de la ruta MnmEG-MnmC (Tabla 12). De este modo, mientras el tRNA<sup>Lys</sup><sub>mnm5s2UUU</sub> sigue el patrón observado en el tRNA total y es preferentemente modificado por la vía del amonio durante la transición a la fase estacionaria, el tRNA<sup>Gln</sup><sub>(c)mnm5s2UUG</sub>, en cambio, es modificado mayoritariamente por la vía de la glicina en cualquier fase. Además, la vía del amonio es incapaz de modificar el tRNA<sup>Leu</sup><sub>cmm5UmAA</sub> en cualquier fase de crecimiento ya que no se detectó ni nm<sup>5</sup>U ni mnm<sup>5</sup>U en la cepa *trmL* (Figura 31D, línea negra). Por lo tanto, ni tRNA<sup>Leu</sup><sub>cmm5UmAA</sub> ni tRNA<sup>Gln</sup><sub>(c)mnm5s2UUG</sub> son buenos sustratos *in vivo* para la vía del amonio a pesar de que ambos puedan ser modificados *in vitro* a través de esta vía (Figuras 32B, 32E y 38).

La razón de por qué el tRNA<sup>Leu</sup><sub>cmm5UmAA</sub> y el tRNA<sup>Gln</sup><sub>(c)mnm5s2UUG</sub> se comportan de distinta forma al tRNA<sup>Lys</sup><sub>mnm5s2UUU</sub> está por resolver. El uso de amonio o glicina por el complejo MnmEG podría estar regulado por interacciones del complejo con sus tRNAs sustrato y por factores desconocidos *in vivo*. El tRNA<sup>Leu</sup><sub>cmm5UmAA</sub> y el tRNA<sup>Gln</sup><sub>(c)mnm5s2UUG</sub> podrían ser malos sustratos para la vía del amonio y por tanto, ser malos competidores frente a los demás tRNAs sustratos de la vía. Alternativamente, el tRNA<sup>Leu</sup><sub>UAA</sub> y el tRNA<sup>Gln</sup> si llevaran nm<sup>5</sup>U o mnm<sup>5</sup>U podrían ser más inestables que si llevan cmm<sup>5</sup>U y estar específicamente degradados por alguna nucleasa (Phizicky and Hopper, 2010; Phizicky and Alfonzo, 2010).

La base molecular de este comportamiento no la conocemos pero los resultados claramente demuestran que la modificación de la posición 5 está sometida a un dinamismo marcado por los condicionantes mencionados, indicando que el complejo MnmEG se adapta a situaciones “cambiantes”. Nuestros resultados indican que los dominios de MnmC tienen una función crucial en la biosíntesis del nucleósido final mnm<sup>5</sup>(s<sup>2</sup>)U dependiente de las condiciones de crecimiento (Figura 38). Durante la fase exponencial en medio LBT y en cualquier fase en medio mínimo, la actividad oxidoreductasa del dominio MnmC(o) es usada para llevar al intermediario generado por MnmEG (cmm<sup>5</sup>(s<sup>2</sup>)U) hacia la síntesis de mnm<sup>5</sup>(s<sup>2</sup>)U en tRNA<sup>Lys</sup><sub>mnm5s2UUU</sub>, tRNA<sup>Glu</sup><sub>mnm5s2UUC</sub>, tRNA<sup>Arg</sup><sub>mnm5UCU</sub> y tRNA<sup>Gly</sup><sub>mnm5UCC</sub>. Por el contrario, el dominio MnmC(o) juega un papel menos importante en fase estacionaria en medio LBT. En este

caso, la actividad metilasa de MnmC(m) funciona, sin necesitar aparentemente al dominio MnmC(o), para dar la modificación final  $mnm^5(s^2)U$ . Por ello, la incorporación del dominio MnmC(o) y del dominio MnmC(m) en la enzima de *E. coli* amplía la adaptabilidad de esta bacteria a las cambiantes condiciones de crecimiento.



**Figura 38.** Esquema resumen de las variaciones en la modificación U34 encontradas dependientes de las condiciones de cultivo y del tRNA sustrato.

Todo esto plantea la idea de si existe algún tipo de regulación que controle las modificaciones introducidas en la U34 de los tRNAs y a su vez, qué es lo que controlan

estas modificaciones variables en la célula. Al respecto, en la literatura científica se han acumulado recientemente ejemplos de modificaciones en el tRNA (u otros RNAs) que cambian o parecen estar sometidos a algún tipo de regulación, todavía por esclarecer, lo que apoya la idea de que la modificación del RNA puede actuar como mecanismo de regulación de la expresión génica frente a situaciones de estrés (Persson, 1993; Yi and Pan, 2011; Chan *et al.*, 2012., El Yacoubi and Crécy-Lagard, 2012; Preston *et al.*, 2013; Meseguer *et al.*; 2014). En este contexto, la dinámica de las modificaciones en la U34 descrita en esta Tesis es un nuevo ejemplo de cómo la célula responde a estímulos variando el estado de modificación de los tRNAs y de cómo selecciona la adquisición de nuevas actividades (MnmC) para conseguir unos nucleósidos que probablemente optimizan mejor la función de los tRNAs.

## **5. La ausencia de MnmC tiene un coste biológico en *E. coli*.**

La falta de modificaciones en la U34 debida a la presencia de mutaciones *mnmE* o *mnmG* lleva a la reducción del crecimiento celular, sensibilidad a pH ácido y a defectos en la fidelidad traduccional (Brierley *et al.*, 1997; Bregeon *et al.*, 2001; Urbonavicius *et al.*, 2001; Nilsson *et al.*, 2002; Yim *et al.*, 2003; Yim *et al.*, 2006; Benítez-Páez *et al.*, 2012; Kanjee and Houry, 2013). Los estudios de crecimiento realizados en esta Tesis sugieren que la falta de MnmC es menos perjudicial que la inactivación del complejo MnmEG ya que las mutaciones *mnmC* no reducen la tasa de crecimiento en fase exponencial en medio LBT. Sin embargo, nuestros datos indican que las mutaciones *mnmC* retrasan el crecimiento de una cepa deficiente en MnmA, mostrando un efecto sinérgico de la combinación de ambas mutaciones. Como las mutaciones *mnmC* no afectan por sí solas la tasa de crecimiento (tiempo de doblaje), parece que la presencia de una tiolación en la posición 2 de la U34 dependiente de MnmA en ciertos tRNAs puede compensar la falta de las modificaciones introducidas por MnmC en la posición 5 durante el crecimiento exponencial. En un fondo genético sin proteína MnmA, la acumulación de  $\text{nm}^5\text{U}$  parece ser algo peor para el crecimiento de la célula (cepa *mnmC(m)*-G68D) que la acumulación de  $\text{cmnm}^5\text{U}$  por la mutación que anula las dos actividades de MnmC (*mnmC-W131stop*) (Tabla 13). De acuerdo con esta idea, se ha demostrado que la lectura

de un codón ámbar por un tRNA<sup>Lys</sup> (*supG*), derivado de un supresor ocre, está más afectada por una mutación *mnmC(m)*-G68D que por una mutación *mnmC*-W131stop (Hagervall and Björk., 1984a), aunque este efecto depende del contexto de codones. Estos datos sugieren que *cmnm*<sup>5</sup>U confiere a la célula alguna ventaja con respecto a *nm*<sup>5</sup>U para traducir mRNAs específicos durante la fase exponencial.

El coste biológico que supone la falta de cualquier actividad MnmC se ve claramente en experimentos de competición: las mutaciones *mnmC* disminuyen la habilidad de las células para competir con células silvestres lo que sugiere que se necesitan los tRNAs completamente modificados para una traducción eficiente de los mRNA involucrados en la fase estacionaria (fase de estrés celular). En los ensayos de competición, el mutante *mnmC*-W131stop parece tener una ligera desventaja compitiendo respecto al mutante *mnmC(m)*-G68D, lo que parece contradictorio con lo observado en los tiempos de doblaje en fase exponencial. Durante la transición a la fase estacionaria, el nucleósido *nm*<sup>5</sup>(*s*<sup>2</sup>)U es más abundante en el mutante *mnmC(m)*-G68D que en el mutante *mnmC*-W131stop (Figura 35B y C). Por ello, la mayor habilidad para competir del mutante *mnmC(m)*-G68D sugiere que *nm*<sup>5</sup>(*s*<sup>2</sup>)U es más efectivo que *cmnm*<sup>5</sup>(*s*<sup>2</sup>)U en la traducción de mensajeros requeridos en la fase estacionaria. Esto lleva a la idea de que las ventajas ofrecidas por cada intermediario dependen de la naturaleza de cada mRNA, lo que depende, a su vez, de las condiciones de crecimiento. Es obvio que la síntesis de la modificación final *mnm*<sup>5</sup>*s*<sup>2</sup>U es la más ventajosa en las condiciones ensayadas. El hecho de que en *Bacillus* se encuentre *mnm*<sup>5</sup>, a consecuencia de la aparición de una proteína que hace las funciones de MnmC(*m*), apoya la importancia de este nucleósido para la optimización de las funciones de ciertos tRNAs y la selección evolutiva de proteínas con actividad “MnmC-like”. En definitiva, la adaptación de MnmEG para usar amonio o glicina, junto con la adquisición de las actividades de MnmC proporcionan a *E. coli* una ventaja al sintetizar *mnm*<sup>5</sup>*s*<sup>2</sup>U para afrontar diferentes condiciones de estrés (Moukadiri *et al.*, 2014; Armengod *et al.*, 2014).



# Conclusiones generales





1. La clonación individual de los dos dominios de MnmC nos ha permitido determinar sus parámetros bioquímicos en relación a la proteína completa, su actividad biológica y su diferente especificidad de tRNA-sustrato. Nuestros datos claramente demuestran la independencia funcional de cada dominio y apoyan la hipótesis de que la proteína MnmC de *E. coli* y, en general, de  $\gamma$ -proteobacterias, ha surgido por fusión génica.

2. Los parámetros cinéticos de las reacciones catalizadas por las enzimas MnmC y MnmEG y los estudios del estado de modificación del tRNA<sup>Lys</sup><sub>UUU</sub> nativo en diferentes mutantes indican que existe un acoplamiento cinético de las rutas MnmEG-MnmC de forma que en la célula se evita la acumulación de intermediarios.

3. El uso por parte de MnmEG de la ruta de amonio o glicina depende de las condiciones de crecimiento y el tRNA sustrato. El dinamismo modificador de MnmEG revela su capacidad para adaptarse a condiciones cambiantes y a la naturaleza del tRNA.

4. La pérdida de cualquier actividad de MnmC, decarboxilasa o metilasa, tiene un coste biológico para *E. coli*.

5. Cada tRNA-sustrato de MnmEG tiene su propia pauta de modificación a través de las rutas MnmEG-MnmC, lo que sugiere una coevolución de tRNAs y enzimas modificadoras para conseguir que la modificación final presente en cada tRNA sea la que optimice mejor sus funciones.

6. La adquisición de las actividades de MnmC junto a la capacidad de MnmEG de usar amonio o glicina amplía la capacidad adaptativa de *E. coli* para garantizar el estado óptimo de modificación de sus tRNAs en diferentes condiciones.



# Abreviaturas





<b>A<sub>xxx</sub></b>	<b>Absorbancia recogida a XXX nm de longitud de onda</b>
<b>Amp</b>	<b>Ampicilina</b>
<b>ATP</b>	<i>Adenosine Triphosphate</i>
<b>au (ua)</b>	<b>Unidades arbitrarias</b>
<b>Cat</b>	<b>Cloranfenicol</b>
<b>cmnm</b>	<b>Grupo carboximetilaminometil</b>
<b>cmnm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U</b>	<b>5-carboximetilaminometil-2-tiouridina</b>
<b>cmnm<sup>5</sup>U<sub>m</sub></b>	<b>5-carboximetilaminometil-2'-O-metiluridina</b>
<b>DAAO</b>	<b>Oxidasas de D-AminoÁcidos</b>
<b>DO<sub>600</sub></b>	<b>Densidad Óptica a 600 nm de longitud de onda</b>
<b>DTT</b>	<b>DiTioTreitol</b>
<b>EDTA</b>	<b>Ácido EtilenDiaminoTetracético</b>
<b>FAD</b>	<i>Flavin Adenine Dinucleotide</i>
<b>FMN</b>	<i>Flavin MonoNucleotide</i>
<b>FPLC</b>	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>
<b>GTP</b>	<b>Guanosine Trifosfato</b>
<b>GTPasa</b>	<b>Guanosina Trifosfatasa</b>
<b>HPLC</b>	<i>High-Performance Liquid Chromatography</i>
<b>Kan</b>	<b>Kanamicina</b>
<i>k<sub>cat</sub></i>	<b>Número de recambio</b>
<i>K<sub>D</sub></i>	<b>Constante de afinidad</b>
<i>k<sub>a</sub></i>	<b>Constante cinética de asociación</b>
<i>k<sub>d</sub></i>	<b>Constante cinética de disociación</b>
<b>kDa</b>	<b>KiloDalton</b>
<i>K<sub>m</sub></i>	<b>Constante de Michaelis-Menten</b>
<b>LAT</b>	<i>Luria-bertoni Agar Thimine media</i>
<b>LB(T)</b>	<i>Luria-Bertoni media, Timine</i>
<b>MELAS</b>	<i>Mitochondrial Encephalomyopathy, Lactic Acidosis, and Stroke-like episodes</i>
<b>MERRF</b>	<i>Myoclonic Epilepsy with Ragged Red Fibers</i>
<b>mm</b>	<b>Grupo metilaminometil</b>

<b>mm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U</b>	<b>5-metilaminometil-2-tiouridina</b>
<b>MTasa</b>	<b>Metiltransferasa</b>
<b>MTHF</b>	<i>MethyleneTetraHydroFolate</i>
<b>NAD(P)/H</b>	<b>Nicotinamide Adenine Dinucleotide (Phosphate)</b>
<b>nm</b>	<b>Grupo aminometil</b>
<b>nm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U</b>	<b>5-aminometil-2-tiouridina</b>
<b>ORF</b>	<i>Open Reading Frame</i> (Marco abierto de lectura)
<b>PCR</b>	<b>Polymerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)</b>
<b>PMSF</b>	<b>Fluoruro de fenilmetil sulfonilo</b>
<b>rpm</b>	<b>Revoluciones por minuto</b>
<b>s<sup>2</sup>C</b>	<b>2-tiocitidina</b>
<b>s<sup>2</sup>U</b>	<b>2-tiouridina</b>
<b>s<sup>4</sup>U</b>	<b>4-tiouridina</b>
<b>SAM</b>	<i>S-methyl Adenosyl Methionine</i>
<b>SAH</b>	<i>S-Adenosyl Homocysteine</i>
<b>SDS-PAGE</b>	<i>Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i>
<b>SPR</b>	<i>Surface Plasmon Resonance</i>
<b>Tet</b>	<b>Tetraciclina</b>
<b>UFC</b>	<b>Unidades Formadoras de Colonias</b>
<b>MM</b>	<b>Medio mínimo</b>

# Bibliografía





- Agris PF. 1996.** The importance of being modified: Roles of modified nucleosides and Mg<sup>2+</sup> in RNA structure and function. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 53: 79–129.
- Agris P. F. 2004.** Decoding the genome: a modified view. *Nucleic Acids Research*, 2004, Vol. 32, N. 1, 223:238 DOI: 10.1093/nar/gkh185.
- Agris P. F., Vendeix F. A. and Graham W. D. 2007.** tRNA's wobble decoding of the genome: 40 years of modification. *J Mol Biol* 366(1): 1-13.
- Agris P.F. 2008.** Bringing order to translation: the contributions of transfer RNA anticodon-domain modifications. *EMBO Rep* 9(7): 629-635.
- Armengod M.E., Moukadiri I., Prado S., Ruiz-Partida R., Benítez-Páez A., Villarroya M., Lomas R., Garzón M.J., Martínez-Zamora A., Meseguer S. and Navarro-González C. 2012.** Enzymology of tRNA modification in the bacterial MnmEG pathway. *Biochimie.* 94(7):1510-20. Epub 2012 Feb 28.
- Armengod M.E., Meseguer S., Villarroya M., Prado S., Moukadiri I., Ruiz-Partida R., Garzón M.J., Navarro-González C. and Martínez-Zamora A. 2014.** Modification of the wobble uridine in bacterial and mitochondrial tRNAs reading NNA/NNG triplets of two-codon boxes. *RNA biol.* (*In press*).
- Baumann U., Fischer W. and Sprinzl M. 1985.** Analysis of modification-dependent structural alterations in the anticodon loop of *Escherichia coli* tRNA<sup>Arg</sup> and their effects on the translation of MS2 RNA. *Eur J Biochem* 152:645-649.
- Bandyra K.J., Boouvier M., Carpousis, A.J. and Luisi, B.F. 2013.** The social fabric of the RNA degradosome. *Biochim Biophys Acta*, 1829, 514-522.
- Baruffini E., Dallabona C., Invernizzi F., Yarham J.W., Melchionda L., Blakely E.L., Lamantea E., Donnini C., Santra S., Vijayaraghavan S., Roper H.P., Burlina A., Kopajtich R., Walther A., Strom T.M., Haack T.B., Prokisch H., Taylor R.W., Ferrero I., Zeviani M. and Ghezzi D. 2013.** MTO1 mutations are associated with hypertrophic cardiomyopathy and lactic acidosis and cause respiratory chain deficiency in humans and yeast. *Hum Mutat.* 34(11):1501-9.

- Benítez-Páez A., Villarroya M. Doutwaite S. Gabaldon T. and Armengod M.E. 2010.** YibK is the 2'-O-methyltransferase TrmL that modifies the wobble nucleotide in Escherichia coli tRNA<sup>Leu</sup> isoacceptors. *RNA*, 16, 2131-2143.
- Benítez-Páez A., Villarroya M. and Armengod M.E. 2012.** Regulation of expression and catalytic activity of Escherichia coli RsmG methyltransferase. *RNA*, 18, 795-806.
- Benítez-Páez A., Villarroya M. and Armengod M.E. 2012a.** The Escherichia coli RlmN methyltransferase is a dual-specificity enzyme that modifies both rRNA and tRNA and controls translational accuracy. *RNA*;18: 1783-1795\_ doi:10.1261/rna.033266.112
- Björk G.R. and Kjellin-Straby K. 1978.** Escherichia coli mutants with defects in the biosynthesis of 5-methylaminomethyl-2-thio-uridine or 1-methylguanosine in their tRNA. *J. of Bacteriol.* Vol. 133 nº 2. 508-517.
- Björk G.R. and Hagervall T.G. 2005.** Transfer RNA modification. In: Böck RCI, J. B. Kaper, F. C. Neidhardt, T. Nyström, K. E. Rudd, and C. L. Squires, ed. *EcoSal Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*: ASM Press. Washington, D.C.
- Bjork GR, Huang B, Persson OP, Bystrom AS. 2007.** A conserved modified wobble nucleoside (mcm5s2U) in lysyl-tRNA is required for viability in yeast. *RNA*; 13:1245-55.
- Brégeon D., Colot V., Radman M. and Taddei F. 2001.** Translational misreading: a tRNA modification counteracts a +2 ribosomal frameshift. *Genes Dev.* 15, 2295-2306.
- Brierley, I., Meredith, M.R., Bloys, A.J. and Hagervall, T.G. 1997.** Expression of a coronavirus ribosomal frameshift signal in Escherichia coli: influence of tRNA anticodon modification on frameshifting. *J. Mol. Biol.*, 270, 360-373.
- Bujnicki J.M., Oudjama, Y., Roovers, M. Owczarek, S. Caillet, J. and Droogmans, L. 2004.** Identification of a bifunctional enzyme MnmC involved in the biosynthesis of a hypermodified uridine in the wobble position of tRNA. *RNA* 10: 1236-1242.
- Cabedo H., Macián F., Villarroya M., Escudero J.C., Martínez-Vicente M., Knecht E. and Armengod M.E. 1999.** The Escherichia coli trmE (mnmE) gene, involved in tRNA modification, codes for an evolutionarily conserved GTPase with unusual biochemical properties. *EMBO J*, 18, 7063-7076.

- Chan C.T., Pang Y.L., Deng W., Babu I.R., Dyavaiah M., Begley T.J., Dedon P.C. 2012.** Reprogramming of tRNA modifications controls the oxidative stress response by codon-biased translation of proteins. *Nat Commun.* 2012 Jul 3;3:937. doi: 10.1038/ncomms1938.
- Chae S., Ahn B.Y., Byun K., Cho Y.M., Yu M.H., Lee B., Hwang D. and Park K.S. 2013.** A systems approach for decoding mitochondrial retrograde signaling pathways. *Sci Signal.* 26;6(264):rs4.
- Chen P., Crain P.F., Näsvall S.J., Pomerantz S.C. and Björk G.R. 2005.** A 'gain of function' mutation in a protein mediates production of novel modified nucleosides. *EMBO J.* Vol 24 n°10, 1842-1851.
- Crick F. H. 1966.** Codon-anticodon pairing: the wobble hypothesis. *J. Mol. Biol.* 19 (2): 548-555.
- Datsenko K.A. and Wanner B.L. 2000.** One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97, 6640-6645.
- Dym O. and Eisenberg D. 2001.** Sequence-structure analysis of FAD-containing proteins. *Protein Science.* 10:1712-1728.
- El Yacoubi B. and Crécy-Lagard V. 2012.** Biosynthesis and function of posttranscriptional modifications of transfer RNAs. *Annu. Rev. Genet.* 46:69-95.
- El Yacoubi B., Bailly M. and Crécy-Lagard V. 2012b.** Biosynthesis and function of posttranscriptional modifications of transfer RNAs. *Annu Rev Genet.*; 46:69-95. doi: 10.1146/annurev-genet-110711-155641. Review.
- Elseviers D., Petrullo L.A. and Gallagher P.J. 1984.** Novel *E. coli* mutants deficient in biosynthesis of 5-methylaminomethyl-2-thiouridine, *Nucleic Acids Res.* 12 3521-3534.
- Emilsson V, Näslund A.K. and Kurland C.G. 1992.** Thiolation of transfer RNA in *Escherichia coli* varies with growth rate. *Nucleic Acids Res.* 20(17):4499-505.
- Gaignard P., Gonzales E., Ackermann O., Labrune P., Correia I., Therond P., Jacquemin E. and Slama A. 2013.** Mitochondrial Infantile Liver Disease due to TRMU Gene Mutations: Three New Cases. *JIMD Rep.* 11:117-23.

- Gehrke C. W. and Kuo K. C. 1989.** Ribonucleoside analysis by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. of Chromatography*, 471 3 36.
- Ghezzi D, Baruffini E, Haack TB, Invernizzi F, Melchionda L, Dallabona C, Strom TM, Parini R, Burlina AB, Meitinger T, Prokisch H, Ferrero I, Zeviani M. 2012.** Mutations of the mitochondrial-tRNA modifier MTO1 cause hypertrophic cardiomyopathy and lactic acidosis. *Am J Hum Genet.* 90(6):1079-87. doi: 10.1016/j.ajhg.
- Gong S., Ma Z., and Foster J.W. 2004.** The Era-like GTPase TrmE conditionally activates gadE and glutamatedependent acid resistance in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 54(4): p. 948-61.
- Grosjean H. 2009.** Nucleic acids are not boring long polymers of only four types of nucleotides: A guided tour. *DNA and RNA Modification Enzymes: Structure, Mechanism, Function and Evolution.* In: Grosjean H, ed. Austin, USA: Landes Bioscience. pp 1-18.
- Hagervall T.G. and Björk G.R. 1984a.** Undermodification in the first position of the anticodon of supG-tRNA reduces transcriptional efficiency. *Mol. Gen Genet.* 196:194-200.
- Hagervall T.G. and Björk G.R. 1984b.** Genetic mapping and cloning of the gene (*trmC*) responsible for the synthesis of tRNA (*mm5s2U*) methyltransferase in *Escherichia coli* K12. *Mol. Gen Genet.* 196:201-207.
- Hagervall T.G., Edmonds C.G., McCloskey J.A. and Björk G.R. 1987.** Transfer RNA (5-Methylaminomethyl-2-thiouridine)-Methyltransferase from *Escherichia coli* K12 has two enzymatic activities. *The Journal of Biological Chemistry.* Vol 262 n° 18.8488-8495.
- Hagervall T.G., Pomerantz S.C. and McCloskey J.A. 1998.** Reduced misreading of asparagine codons by *Escherichia coli* tRNA<sup>Lys</sup> with hypomodified derivatives of 5-methylaminomethyl-2-thiouridine in the wobble position. *J Mol Biol*; 284:33-42.
- Hori H. 2014.** Methylated nucleosides in tRNA and tRNA methyltransferases. *Frontiers in Genetics.* Vol 5, 144. doi: 10.3389/fgene.2014.00144.
- Johansson M.J., Esberg A., Huang B., Bjork G.R. and Bystrom A.S. 2008.** Eukaryotic wobble uridine modifications promote a functionally redundant decoding system. *Mol Cell Biol*; 28:3301-12.

- Kambampati R. and Lauhon C.T. 2003.** MnmA and IscS are required for in vitro 2-thiouridine biosynthesis in Escherichia coli. *Biochemistry*.42(4):1109-17.
- Kanjee, U. and Houry, W.A. 2013.** Mechanisms of acid resistance in Escherichia coli. *Annu. Rev. Microbiol.*, 67, 65-81.
- Kawai G., Yamamoto Y., Kamimura T., Masegi T., Sekine M., Hata T., Iimori T., Watanabe T., Miyazawa T. and Yokoyama S. 1992.** Conformational rigidity of specific pyrimidine residues in tRNA arises from posttranscriptional modifications that enhance steric interaction between the base and the 2'-hydroxyl group. *Biochemistry*. 31(4):1040-6.
- Kim J. and Almo S.C. 2013.** Structural basis for hypermodification of the wobble uridine in tRNA by bifunctional enzyme MnmC. *BMC Structural Biology*. 13:5.
- Kirino,Y. and Suzuki,T. 2005.** Human mitochondrial diseases associated with tRNA wobble modification deficiency. *RNA Biol.*, 2, 41–44.
- Kitamura A., Sengoku T., Nishimoto M., Yokoyama S. and Bessho Y. 2011.** Crystal structure of the bifunctional tRNA modification enzyme MnmC from Escherichia coli. *Protein Sci.* 20 (7):1105-13.
- Kitamura A., Nishimoto M., Sengoku T., Shibata R., Jäger G., Björk G.R., Grosjean H., Yokoyama S., Bessho Y. 2012.** Characterization and structure of the Aquifex aeolicus protein DUF752: a bacterial tRNA-methyltransferase (MnmC2) functioning without the usually fused oxidase domain (MnmC1). *J.Biol.Chem.* 21;287(52):43950-60.
- Kruger M.K., Pedersen S., Hagervall T.G. and Sorensen M.A. 1998.** The modification of the wobble base of tRNA<sup>Glu</sup> modulates the translation rate of glutamic acid codons in vivo. *J.Mol.Biol.* 284, 621-631.
- Laemmli U.K. 1970.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (5259): pp. 680–685.
- Leung H.C.E., Hagervall T.G., Björk G.R., Winkler M.E. 1998.** Genetic locations and database accession numbers of RNA-modifying and -editing enzymes. In *Modification and editing of RNA*, eds Grosjean H., Benne R. (American Society for Microbiology, Washington, DC.) pp 561–568.

- Liu R.J., Zhou M., Fang Z.P., Wang M., Zhou X.L. and Wang E.D. 2013.** The tRNA recognition mechanism of the minimalist SPOUT methyltransferase, TrmL. *Nucleic Acids Res.* 41(16):7828-42.
- Marinus M.G., Morris N.R. Soll D. and Kwong T.C. 1975.** Isolation and partial characterization of three *Escherichia coli* mutants with altered transfer ribonucleic acid methylases. *J. of Bacteriol.* Vol. 122 n° 1. 257-265.
- Martin, R.P., Sibler, A.P., Gehrke, C.W., Kuo, K., Edmonds, C.G., McCloskey, J.A. and Dirheimer, G. 1990.** 5-Carboxymethylaminomethyluridine is found in the anticodon of yeast mitochondrial tRNAs recognizing two-codon families ending in a purine. *Biochemistry.* 29(4), 956–959.
- Martínez-Vicente M., Yim L., Villarroya M., Mellado M., Pérez-Payá E., Björk G.R., and Armengod M.E. 2005.** Effects of Mutagenesis in the Switch I Region and Conserved Arginines of *Escherichia coli* MnmE Protein, A GTPase Involved in tRNA Modification. *J Biol Chem.* Vol. 280, No. 35, pp. 30660–30670.
- Meseguer S., Martínez-Zamora A., García-Arumi E., Andreu A.L. and Armengod M.E. 2014.** The ROS-sensitive microRNA-9/9\* controls the expression of mitochondrial tRNA-modifying enzymes and is involved in the molecular mechanisms of MELAS syndrome. *Hum. Mol. Genet.* Pii:ddu427.
- Miller, J. H. 1992.** *A Short Course in Bacterial Genetics: A laboratory manual and handbook for Escherichia coli and related bacteria.* Cold Spring Harbor. Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- MODOMICS DATABASE:** <http://modomics.genesilico.pl/>
- Motorin Y. and Helm M. 2010.** tRNA stabilization by modified nucleotides. *Biochemistry* 49: 4934-4944.
- Motorin, Y. 2011.** RNA nucleotide methylation. *WIREs RNA.*
- Moukadiri I., Prado S., Piera J., Velazquez-Campoy A., Bjork G.R. and Armengod M.E. 2009.** Evolutionarily conserved proteins MnmE and GidA catalyze the formation of two methyluridine derivatives at tRNA wobble positions. *Nucleic Acids Res* 37:7177-7193.

- Moukadiri I., Garzón M.J., Björk G.R. and Armengod M.E. 2013.** The output of the tRNA modification pathways controlled by the Escherichia coli MnmEG and MnmC enzymes depends on the growth conditions and the tRNA species. *Nucleic Acids Res.* 42:2602-2623.
- Murphy F.V., Ramakrishnan V., Malkiewicz A. and Agris P.F. 2004.** The role of modifications in codon discrimination by tRNA(Lys)UUU. *Nat Struct Mol Biol*; 11:1186-91.
- Nasvall S.J., Chen P. and Bjork G.R. 2004.** The modified wobble nucleoside uridine-5-oxyacetic acid in tRNA<sup>Pro</sup>(cmo5UGG) promotes reading of all four proline codons in vivo. *RNA*; 10:1662-73.
- Nasvall S.J., Chen P. and Bjork G.R. 2007.** The wobble hypothesis revisited: uridine-5-oxyacetic acid is critical for reading of G-ending codons. *RNA*; 13:2151-64.
- Nilsson K., Lundgren H.K., Hagervall T.G. and Björk G.R. 2002.** The cysteine desulfurase IscS is required for synthesis of all five thiolated nucleosides present in tRNA from Salmonella enteric serovar typhimurium. *J. Bacteriol.* 184:6830-6835.
- Pearson D. and Carell T. 2011.** Assay of both activities of the bifunctional tRNA-modifying enzyme MnmC reveals a kinetic basis for selective full modification of cmnm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U to mnm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U. *Nucleic Acid Res.* 39 (11):4818-26.
- Persson B.C. 1993.** Modification of tRNA as a regulatory device. *Mol. Microbiol.* 8 (6):1011-1016.
- Phizicky E. M. and Alfonzo J. D. 2010.** Do all modifications benefit all tRNAs? *FEBS let.* 584(2):265-271
- Phizicky E. M. and Hooper A. K. 2010.** tRNA biology charges to the front. *Genes & Development.* 24:1832–1860. Review.
- Ponchon L., Beauvais G., Nonin-Lecomte S. and Dardel F. 2009.** A generic protocol for the expression and purification of recombinant RNA in Escherichia coli using a tRNA scaffold. *Nat. Protoc.* 4, 947-959.
- Prado S., Villarroya M., Medina M. and Armengod M.E. 2013.** The tRNA modifying function of MnmE is controlled by post-hydrolysis steps of its GTPase cycle. *Nucleic Acid Res.* 41, 6190-6208.

- Preston M. A., D'Silva S., Kon Y. and Phizicky E. M. 2013.** tRNA His 5-methylcitidine levels increase in response to several growth arrest conditions in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA*. 19:1-14.
- Roovers, M. Oudjama, Y., Kaminska K.H., Purta E., Caillet, J., Droogmans, L. and Bujnicki J.M. 2008.** Sequence-structure-function analysis of the bifunctional enzyme MnmC that catalyses the last two steps in the biosynthesis of hypermodified nucleoside mnm5s2U in tRNA. *Proteins* **71**: 2076-2085.
- Sakamoto K., Kawai G., Niimi T., Satoh T., Sekine M., Yamaizumi Z., Nishimura S., Miyazawa T. and Yokoyama S. 1993.** A modified uridine in the first position of the anticodon of a minor species of arginine tRNA, the argU gene product, from *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* 2016, 369-375.
- Schubert, H. L., Blumenthal, R. M. and Cheng, X. 2003.** Many paths to methyltransfer: a chronicle of convergence. *Trends Biochem Sci.* 28 (6) 329-35.
- Scrima A., Vetter I.R., Armengod M.E., Wittinghofer A. 2005.** The structure of the TrmE GTP-binding protein and its implications for tRNA modification. *EMBO J.* 24(1):23-33.
- Scrima A., Wittinghofer A. 2006.** Dimerisation-dependent GTPase reaction of MnmE: how potassium acts as GTPase-activating element. *EMBO J.* 25(12):2940-51.
- Shi R., Villarroya M., Ruiz-Partida R., Li Y., Proteau A., Prado S., Moukadiri I., Benítez-Páez A., Lomas R., Wagner J., Matte A., Velázquez-Campoy A., Armengod M.E. and Cygler M. J. 2009.** Structure-function analysis of *Escherichia coli* MnmG (GidA), a highly conserved tRNA-modifying enzyme. 191(24):7614-9. doi: 10.1128/JB.00650-09. Epub 2009 Oct 2.
- Shi R., Proteau A., Villarroya M., Moukadiri I., Zhang L., Trempe J.F., Matte A., Armengod M.E. and Cygler M. 2010.** Structural basis for Fe-S cluster assembly and tRNA thiolation mediated by IscS protein-protein interactions. *PLoS Biol.* 8(4):e1000354.
- Shippy D.C., Eakley N.M., Bochsler P.N. and Fadl A.A. 2011.** Biological and virulence characteristics of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium following deletion of glucose-inhibited division (*gidA*) gene. *Microb. Pathog.* 50 303-313.

- Shippy D.C., Heintz J. A., Albrecht R. M., Eakley N.M. and Fadl A.A. 2012.** Deletion of glucose-inhibited division (*gidA*) gene alters the morphological and replication characteristics of *Salmonella enteric* serovar Typhimurium. *Arch Microbiol*, 194:405-412.
- Steinberg S., Misch A. and Sprinzl M. 1993.** Compilation of tRNA sequence and sequences of tRNA genes. *Nucleic Acids Res.* 21, 3011-3015.
- Sullivan M.A., Cannon J.F., Webb F.H. and Bock R.M. 1985.** Antisuppressor mutation in *Escherichia coli* defective in biosynthesis of 5- methylaminomethyl-2-thiouridine, *J. of Bacteriol.* 161 368-376.
- Suzuki T., Suzuki T., Wada T., Saigo K. and Watanabe K. 2002.** Taurine as a constituent of mitochondrial tRNAs: new insights into the functions of taurine and human mitochondrial diseases. *EMBO J.* 21(23):6581-9.
- Suzuki T. and Suzuki T. 2007.** Chaplet column chromatography: isolation of a large set of individual RNAs in a single step. *Methods Enzymol.*, 425, 231–239.
- Suzuki T., Nagao A. and Suzuki T. 2011a.** Human Mitochondrial tRNAs: Biogenesis, Function, Structural Aspects, and Diseases. *Annu. Rev. Genet.* 2011. 45:299–329.
- Suzuki T., Nagao A. and Suzuki T. 2011b.** Human mitochondrial diseases caused by lack of taurine modification in mitochondrial tRNAs. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 2(3):376-86.
- Taya Y. and Nishimura S. 1973.** Biosynthesis of 5-methylaminomethyl-2-thiouridylate. I. Isolation of a new tRNA-methylase specific for 5-methylaminomethyl-2-thiouridylate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 51: 1062-1068.
- Tamura K., Himeno H., Asahara H., Hasegawa T. and Shimizu M. 1992.** In vitro study of *E. coli* tRNA(Arg) and tRNA(Lys) identity elements. *Nucleic Acids Res*, 20, 2335-2339.
- Umeda N., Suzuki T., Yukawa M., Ohya Y., Shindo H. and Watanabe K. 2005.** Mitochondria-specific RNA-modifying enzymes responsible for the biosynthesis of the wobble base in mitochondrial tRNAs. Implications for the molecular pathogenesis of human mitochondrial diseases. *J Biol Chem*, 280(2): p. 1613-24.

- Urbonavicius J., Qian Q., Durand J.M., Hagervall T.G. and Björk G.R. 2001.** Improvement of reading frame maintenance is a common function for several tRNA modifications. *EMBO J.* 20(17):4863-73.
- Urbonavicius J., Stahl G., Durand J.M., Ben Salem S.N., Qian Q., Farabaugh P.J. and Björk G.R. 2003.** Transfer RNA modifications that alter +1 frameshifting in general fail to affect -1 frameshifting. *RNA.* 9(6):760-8.
- Villarroya M., Prado S., Esteve J. M., Soriano M. A., Aguado C., Perez-Martinez D., Martinez-Ferrandis J. I., Yim L., Victor V. M., Cebolla E., Montaner A., Knecht E. and Armengod M. E. 2008.** Characterization of human GTPBP3, a GTP-binding protein involved in mitochondrial tRNA modification. *Mol Cell Biol,* 28(24): p. 7514-31.
- Watanabe K. 2010.** Unique features of animal mitochondrial translation systems. The non-universal genetic code, unusual features of the translational apparatus and their relevance to human mitochondrial diseases. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys Biol Sci.*86:11-39.
- Wang X., Yan Q., and Guan M.X. 2009.** Combination of the loss of cmnm5U34 with the lack of s2U34 modifications of tRNA<sup>Lys</sup>, tRNA<sup>Glu</sup>, and tRNA<sup>Gln</sup> altered mitochondrial biogenesis and respiration. *J Mol Biol.* 395(5): p. 1038-48.
- Westhof E., Yusupov M. and Yusupova G. 2014.** Recognition of Watson-Crick base pairs: constraints and limits due to geometric selection and tautomerism. *F1000Prime Rep.* 1;6:19. doi: 10.12703/P6-19.
- Yamagami R., Yamashita K., Nishimasu H., Tomikawa., Ochi A., Iwashita C., Hirata A., Ishitani R., Nureki O. and Hori H. 2012.** The tRNA recognition mechanism of folate/FAD-dependent tRNA methyltransferase (TrmFO). *J Biol Chem.* October 24, 2012.
- Yasukawa T., Kirino Y., Ishii N., Holt I.J., Jacobs H.T., Makifuchi T., Fukuhara N., Ohta S., Suzuki T. and Watanabe K. 2005.** Wobble modification deficiency in mutant tRNAs in patients with mitochondrial diseases. *FEBS Lett.*579(13):2948-52.
- Yi C. and Pan T. 2011.** Cellular dynamics of RNA modification. *Acc Chem Res.* 44(12):1380-8.

- Yim, L., Martínez-Vicente, M. Villarroya, M., Aguado, C., Knecht, E. and Armengod, M.E. 2003.** The GTPase activity and C-terminal cysteine of the Escherichia coli MnmE protein are essential for its tRNA modifying function. *J. Chem. Biol.*, 278, 28378-28387.
- Yim L., Moukadiri I., Björk G.R. and Armengod M.E. 2006.** Further insights into the tRNA modification process controlled by proteins MnmE and GidA of Escherichia coli. *Nucleic Acids Res.* 34(20):5892-905. Epub 2006 Oct 24.
- Yokoyama S., Watanabe T., Murao K., Ishikura H., Yamaizumi Z., Nishimura S. and Miyazawa T. 1985.** Molecular mechanism of codon recognition by tRNA species with modified uridine in the first position of the anticodon. *Proc Natl Acad Sci USA*; 82:4905-9.
- Yokoyama S. and Nishimura S. 1995.** Modified nucleosides and codon recognition. In *tRNA: Structure, Biosynthesis and Function* (Söl, D. and RajBhandary, U. L., eds), pp. 207-224, ASM Press, Washington, DC.
- Zeharia A., Shaag A., Pappo O., Mager-Heckel A.M., Saada A., Beinat M., Karicheva O., Mandel H., Ofek N., Segel R. Marom D., Rötig A., Tarassov I. and Elpeleg O. 2009.** Acute infantile liver failure due to mutations in the TRMU gene. *Am. J. Hum. Genet.*, 85, 401–407.
- Zinshteyn B. and Gilbert W.V. 2013.** Loss of a conserved tRNA anticodon modification perturbs cellular signaling. *PLoS Genet.* 9(8):e1003675. doi: 10.1371/journal.pgen.1003675.



# Caracterización bioquímica y funcional de MnmC, una proteína modificadora de tRNA de *Escherichia coli*

Tesis doctoral de  
María José Garzón Garzón

