

Universidad de Valencia
Departamento de Genética
Centro de Investigación Príncipe Felipe



Naturaleza dinámica de MnmG

**Una flavoenzima ancestral modificadora de
tRNAs bacterianos y mitocondriales**

PRÍNCIPE FELIPE
CENTRO DE INVESTIGACIÓN

Tesis doctoral
Rafa Ruiz Partida

***A mis padres, a mi hermana y
muy especialmente a mi tío Carlos***



VNIVERSITAT
ID VALÈNCIA



PRINCIPE FELIPE
CENTRO DE INVESTIGACION

Título Tesis Doctoral:

Naturaleza dinámica de MnmG. Una flavoenzima ancestral modificadora de tRNAs bacterianos y mitocondriales.

Programa de doctorado:

Genética Molecular y Evolutiva II Código: 194C

Departamento de Genética.

Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad de Valencia.

Realizada por:

Rafael Ruiz Partida

Dirigida por:

Dra. M^aEugenia Armengod González



VNIVERSITAT
ID 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,

INFORMA:

Que la memoria de Tesis Doctoral realizada por **D. Rafael Ruiz Partida**, con título “Naturaleza dinámica de MnmG. Una flavoenzima ancestral modificadora de tRNAs bacterianos y mitocondriales”, ha sido realizada bajo su dirección y reúne a su juicio todos los requisitos necesarios para su presentación y defensa pública.

Valencia, 29 de octubre de 2015

Directora de Tesis:

M^a Eugenia Armengod González

Índice general

AGRADECIMIENTOS	6
ABREVIATURAS	9
I INTRODUCCIÓN	13
1 Estructura de los tRNAs.	16
2 Modificaciones post-transcripcionales moldean la conformación de los tRNAs.	17
3 Función de las modificaciones complejas en las posiciones 34 y 37 del tRNA.	23
4 Aspectos estructurales y bioquímicos de los complejos modificadores de tRNA.	26
4.1 Organización estructural de los complejos enzimáticos KEOPS y Elongator.	26
4.2 El complejo heterotetramérico MnmEG está compuesto por una GTPasa (MnmE) y una flavoenzima (MnmG).	29
5 Bases moleculares de la modificación introducida por el complejo MnmEG.	35
5.1 Modelo del mecanismo catalítico.	35
5.2 Modelos estructurales de la organización del holocomplejo MnmEG.	38
II OBJETIVOS	41
III METODOLOGÍA	45
6 Material biológico y oligonucleótidos.	47

7	Material químico y bioquímico.	51
7.1	Electroforesis	51
7.2	Extracción y purificación de DNA.	51
7.3	Extracción y purificación de tRNA.	51
7.4	Extracción y purificación de tRNA.	52
7.5	Reacciones de PCR.	52
7.6	Enzimas.	52
7.7	Transferencia e inmunodetección.	53
7.8	Purificación de proteínas.	53
7.9	Ligandos de MnmG y agentes químicos específicos.	54
7.10	Medios de cultivo.	54
8	Aparatos.	54
9	Software y servidores informáticos.	55
9.1	Análisis matemático.	55
9.2	Análisis de secuencias de proteínas y ácidos nucleicos.	55
9.3	Análisis de estructuras de proteínas y RNA.	56
9.4	Otros.	56
10	Técnicas microbiológicas.	56
10.1	Crecimiento de cepas bacterianas.	56
10.2	Conservación de cepas bacterianas.	57
10.3	Transformación de una cepa bacteriana.	57
11	Técnicas de ácidos nucleicos.	57
11.1	Extracción de DNA genómico y plasmídico.	57
11.2	Determinación de la pureza y tamaño de ácidos nucleicos.	58
11.3	Amplificación del gen <i>mnmG</i> a partir de DNA genómico extraído de <i>E.coli</i> .	58
11.4	Mutagénesis dirigida de MnmG.	59
11.5	Clonación de MnmG y MnmG(535-629).	60
11.6	Clonación tRNA ^{Lys} y tRNA ^{Cys} .	60
11.7	Extracción de RNA total.	61
11.8	Purificación de tRNA total.	61
11.9	Purificación de un tRNA específico.	61
11.10	Análisis del contenido en nucleósidos de una muestra de tRNA.	62
12	Técnicas de proteínas.	63

12.1	Expresión y purificación de proteínas por afinidad en el sistema pET15b-6xHis-.	63
12.2	Expresión y purificación de proteínas por afinidad MnmG en el sistema pBAD-Flag-.	63
12.3	Expresión y purificación de la proteína MnmE por afinidad en el sistema pGEX4T.	64
12.4	Cuantificación de proteínas y detección de la presencia de FAD por espectrofotometría.	65
12.5	Análisis de la pureza y tamaño de proteínas por SDS-PAGE.	65
12.6	Análisis de la conformación nativa y el estado de oligomerización de una proteína.	66
13	Técnicas de interacción (1)	68
13.1	Dicroísmo circular.	68
13.2	Proteólisis limitada.	68
13.3	Calorimetría isotérmica de titulación (ITC).	69
14	Técnicas de interacción (2):	71
14.1	Resonancia de superficie de plasmón	71
14.2	Calorimetría isotérmica de titulación.	72
15	Técnicas de interacción (3):	74
15.1	Fluorescencia intrínseca de proteínas.	74
16	Análisis de las formas diméricas de MnmG por Microscopía Electrónica (EM).	75

IV RESULTADOS Y DESARROLLO ARGUMENTAL 79

PARTE 1 81

17	Análisis estructural de un protómero de MnmG.	81
17.1	Clonación, expresión y purificación de MnmG.	81
17.2	Estructura monomérica de MnmG.	83
17.3	La unión de FAD induce cambios estructurales en MnmG.	87
17.4	Análisis comparativo de las diferentes estructuras cristalinas de MnmG.	89
17.5	Estudio de relaciones estructura-función en MnmG.	92
17.6	Importancia funcional del C _{ARM}	101

18	Organización dimérica de MnmG.	104
18.1	Interacciones proteína-proteína mediadas por el C _{ARM} sugieren la existencia de una conformación alternativa de MnmG.	104
18.2	Formas moleculares de MnmG en solución obtenidas por Microscopía Electrónica de Transmisión.	110
18.3	Detección de enlaces intermoleculares en el núcleo catalítico de MnmG.	122
18.4	El núcleo catalítico de MnmG interactúa con el dominio N-terminal de MnmE dependiendo de su estado redox.	130
18.5	La presencia simultánea de FAD y NADH aumenta la proporción de MnmG enlazada por el puente disulfuro intermolecular.	134
19	Interacción con tRNA.	136
19.1	Análisis de la afinidad de MnmE, MnmG y sus dominios por tRNA.	136
19.2	Influencia de las conformaciones diméricas de MnmG en la unión de tRNA.	138
20	El C_{ARM} de MnmG tiene similitud estructural con dominios SAM.	146
21	Consideraciones generales. Modelo del ciclo conformacional de MnmG.	148
PARTE 2		155
22	RNA ribosomal copurifica con MnmG.	155
23	Diferentes estados oligoméricos de MnmG están asociados con RNA ribosomal.	157
24	Una molécula de RNA ribosomal es capaz de unir varios dímeros de MnmG <i>in vitro</i>.	159
25	El tRNA compite por la unión de MnmG con el rRNA.	164
26	La fracción APM de MnmG presenta actividad NADH oxidasa.	165
27	La conformación II de MnmG promueve su oligomerización de orden superior.	168

28	Modelo estructural de la oligomerización APM de MnmG.	170
29	Consideraciones generales.	174

V	CONCLUSIONES	181
---	--------------	-----

	BIBLIOGRAFÍA	185
--	--------------	-----

Agradecimientos

Todos y cada uno de nosotros somos un complejo universo construido a partir de una herencia genética combinada que se moldea con la experiencia y, especialmente, a través de las interacciones con otros seres humanos. Por lo tanto la persona que soy, el científico en el que me he convertido y específicamente la elaboración de esta Tesis no sólo han sido producto de mi trabajo personal sino que la participación e influencia de otras personas han sido esenciales para ello. A veces no es una tarea sencilla reconocer en que grado han podido influir en uno mismo algunas personas, pues puede que no seamos conscientes de lo importantes que son, en determinados aspectos de nuestra vida, hasta años después de conocerlas. Aún así trataré de aprovechar esta oportunidad para expresar mi más sincero agradecimiento a aquellas personas de las que he sido consciente de su importancia en esta etapa de mi vida.

He tenido suerte de contar con personas que han apostado por mí, como mis padres que aún sin entender muy bien a lo que me dedicaba han confiado en mí y me han apoyado, sobretodo en estos últimos años especialmente duros, sin ellos nada de esto hubiera sido posible. Y como mi directora de Tesis que ha apostado por mí una y otra vez, a veces incluso no estando muy de acuerdo con lo que hacía. Gracias por tener absolutamente siempre tu puerta abierta para escuchar mis ideas, mis “locuras” e incluso mis emociones, por tu admirable dedicación y por haber rebuscado hasta debajo de las piedras para poder pagarme un sueldo digno en esta “complicada” época que vivimos. Y menos mal que he contado con compañeros de laboratorio estupendos que nos hemos apoyado mutuamente y de los cuales he aprendido muchísimo. He tenido una cariñosa “jefa” que me ha enseñado a manejarme con mis pequeñas bacterias como nadie, un “socio” que me introdujo en el mundo de MnmG y con el que compartía fundamentales investigaciones sumergidas y una queridísima compañera con la que creé un pequeño “micromundo proteico” en el que, al parecer, solo nos entendíamos ella y yo y cuyo apoyo y duro trabajo han sido determinantes para el desarrollo de esta Tesis. La verdad es que no sé que hubiera hecho sin poder desahogarme en esos finales de jornada con intensas conversaciones esquivando las pantallas del ordenador, sin los “ji, ji” y “ja, ja” compartidos, sin el apoyo moral en los descansos de larguísimos cigarrillos o sin la dulce sonrisa matutina de una de mis compañeras de I-08. De gran ayuda han sido también las verdaderas “reinas del laboratorio” ambas jubiladas ya y dedicadas

a una merecida “buena vida”. Imposible de obviar a la gente de I-11, grandes compañeros dirigidos por un excelente investigador cuyas conversaciones acerca de los más diversos temas llegan a mis oídos mientras trabajo, provocando carcajadas en incontables ocasiones. Pero lo más importante que les agradezco es su disponibilidad para echar una mano interrumpiendo su trabajo para contestar a las preguntas que me pudieran surgir.

Para el desarrollo de esta Tesis ha sido necesaria la colaboración de otros laboratorios especialistas cuyos investigadores también me han enseñado muchísimo. Gracias al Departamento de Bioquímica de la Universidad de Zaragoza y al laboratorio de Interacciones Biomoleculares del Instituto de Biocomputación y Física de Sistemas Complejos por su directa colaboración en esta Tesis y por transmitirme tantos conocimientos sobre proteínas, sus interacciones y como estudiarlas. Especial mención para una excelente investigadora que además de ayudarme profesionalmente, me recibió fantásticamente en su vida personal y a la que tengo un gran cariño. La colaboración con investigadores del laboratorio de Estructura de Macromoléculas del Centro Nacional de Biotecnología también ha sido indispensable para el desarrollo de algunos aspectos de esta Tesis. ¡Fascinante ha sido poder ver con mis propios ojos moléculas individuales de MnmG!

Y como no aprovechar esta oportunidad para decirle a mi hermana lo mucho que la quiero, para agradecerle a Txino su fundamental compañía en las largas horas de escritura de esta Tesis y para reflexionar acerca de los maravillosos amigos que tengo. Algunos amigos los conocí en el “cole” y me llevan acompañando tantos años que a veces hasta nos llamamos hermanos y aunque nuestras vidas hayan tomado rumbos diferentes cuando nos vemos siempre mantenemos esa complicidad que se creó cuando aún éramos niños. Otros amigos los conocí ya de adulto, algunos científicos dada mi trayectoria profesional y otros no científicos con los que comparto otras aficiones como la cerveza, la música, el ocio nocturno, la montaña, el teatro....El teatro ha sido especialmente importante para mí y enormemente agradecido estoy a la persona que me enseñó a disfrutar con la interpretación.

Algunos amigos han tenido que cruzar el charco en busca de sus sueños profesionales y les echo de menos aunque mi poca afición al “Skype” indique lo contrario, otros se han movido a otras ciudades españolas y los veo con cuenta gotas, pero que sepáis que me alegro muchísimo tanto de que estéis cumpliendo vuestros objetivos como de veros cada vez que venís de visita. Menos mal que

no todos se han ido y me quedan algunos en Valencia sin los cuales no sé si hubiera sido capaz de mantener la cordura en estos últimos años. Gracias pequeñas hobbits por aguantar mis rollos y por vuestro demostrado cariño. Y mis “amiguetes”, con los que me desahogo y me divierto cada semana, os conocí de adulto y os quiero como si os hubiera conocido de niño. Sois gente formidable, con inquietudes, con los que da gusto conversar de infinidad de temas y hasta os interesa la ciencia sin ser científicos (o al menos lo aparentáis muy bien) y que sepáis que cada uno de vosotros me sorprende frecuentemente, lo que hace que jamás pueda perder el interés por vosotros, gracias por dejarme formar parte de vuestras vidas. ¡¡Amigos alteanos!!, no me olvido de vosotros nuestra amistad es vieja y los recuerdos veraniegos imborrables.

Por último decir que pese a la época que vivimos en la que ser científico y solvente puede ser una tarea ardua pues los motivos económicos son los que priman en prácticamente todos los aspectos de nuestra sociedad, me he dado cuenta que a la mayor parte de los científicos que he conocido les mueve la pasión y/o la solidaridad. Me siento afortunado, por tanto, de pertenecer a este movimiento humano que es a fin de cuentas la ciencia. Pese a las dificultades obvias, vivimos una época fascinante en la que la tecnología ha avanzado tanto que nos permite obtener información desde el mundo subatómico hasta los confines del universo. Una época en la que cada año se cumplen las fantasías de antiguos escritores de ciencia ficción y las hipótesis tachadas de locura de genios adelantados a su tiempo, una época en la que se realizan descubrimientos, que abren mundos que jamás hubiésemos imaginado, mucho más alucinantes que cualquier mitología inventada. En conclusión, me siento agradecido por la gente que me rodea, por haber decidido ser científico y por la época en la que vivo ya que como le decía Gandalf a Frodo: “no nos toca a nosotros decidir qué tiempo vivir, sólo podemos elegir qué hacer con el tiempo que se nos ha dado”.

ABREVIATURAS

- ϵ , coeficiente de extinción molar
- ψ , pseudouridina
- $\tau\mathbf{m}^5\mathbf{U}$, uridina con un grupo taurinometileno en posición 5
- $\mu\mathbf{cal}$, microcalorías
- **APM**, alto peso molecular
- **CB**, azul de Coomassie
- **cmnm⁵U**, uridina con un grupo carboximetilaminometileno en posición 5
- **DNAg**, ácido desoxiribonucleico genómico
- **DNasa**, desoxiribonucleasa
- **DO**, densidad óptica
- **DTT**, ditioneitol
- **EDTA**, ácido etilendiaminotetracético
- **EMSA**, ensayo de desplazamiento de movilidad electroforética
- **F**, intensidad fluorescente
- **FAD**, flavín adenín dinucleótido
- **GDP**, guanosina 5'-difosfato
- **GR**, "gel red"
- **GTP**, guanosina 5'-trifosfato.
- **GTPasa**, guanosina 5'-trifosfatasa
- **IPTG**, Isopropil- β -tiogalactpiranosido
- **ITC**, calorimetría isotérmica de titulación

ABREVIATURAS

- **K_D**, constante de equilibrio de la formación de un complejo en sentido de disociación
- **kDa**, kilodalton
- **LBT**, medio de cultivo Luria-Bertani suplementado con timina
- **m/m**, proporción masa/masa
- **mcm⁵U**, uridina con un grupo metoxycarbonilmetileno en posición 5
- **mm⁵U**, uridina con un grupo metilaminometileno en posición 5.
- **MnmEG**, complejo formado por las proteínas MnmE y MnmG.
- **mRNA**, ácido ribonucleico mensajero
- **mt**, mitocondrial
- **MTHF**, metilentetrahidrofolato
- **MW**, marcador de masas moleculares
- **NADH**, nicotinamida adenina dinucleótido
- **NADPH**, nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
- **ncm⁵U**, uridina con un grupo carbamoilmetileno en posición 5
- **nm**, nanómetros
- **nm⁵U**, uridina con un grupo aminometileno en posición 5
- **NRE**, electroforesis roja nativa
- **nt**, nucleótido
- ***ori C***, origen de replicación
- **pb**, pares de bases
- **PCR**, reacción en cadena de la polimerasa
- **PMSF**, fluoruro de fenilmetilsulfonilo
- **RNasa**, ribonucleasa

- **rpm**, revoluciones por minuto
- **rRNA**, ácido ribonucleico ribosomal
- **RU**, unidades de resonancia
- **s**, tiol
- **s²U**, uridina tiolada en posición 2
- **s⁴U**, uridina tiolada en posición 4.
- **t⁶A**, adenina con un grupo treonilcarbamoilo en posición 6
- **S**, svedberg
- **SAM**, motivo alfa estéril
- **SDS**, dodecil sulfato de sodio
- **SDS-PAGE**, electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio
- **SPR**, resonancia de superficie de plasmón
- **THF**, tetrahidrofolato.
- **tRNA**, ácido ribonucleico de transferencia
- **xm⁵U**, uridina con un grupo derivado del metileno en posición 5

ABREVIATURAS

Parte I

INTRODUCCIÓN

“El científico no tiene por objeto un resultado inmediato, él no espera que sus ideas avanzadas sean fácilmente aceptadas. Su deber es sentar las bases para aquellos que están por venir, y señalar el camino.” Nikola Tesla.

A mediados de los años 50, junto con el “Dogma central de la Biología Molecular”, Francis Crick predijo la existencia de una molécula adaptadora para explicar la transferencia de información desde los ácidos nucleicos a las proteínas[17] (**figura 1**). Esta molécula adaptadora se uniría enzimáticamente a su aminoácido correspondiente, con lo que el orden de adición de un aminoácido, en una proteína en síntesis, vendría determinado por el reconocimiento específico entre este adaptador y el ácido nucleico portador de la secuencia informativa. Hoagland y colaboradores, en 1957, demostraron la existencia de esta molécula adaptadora y su naturaleza de RNA [45], llamada actualmente tRNA. Por tanto, ya que los tRNAs contribuyen a descifrar el material

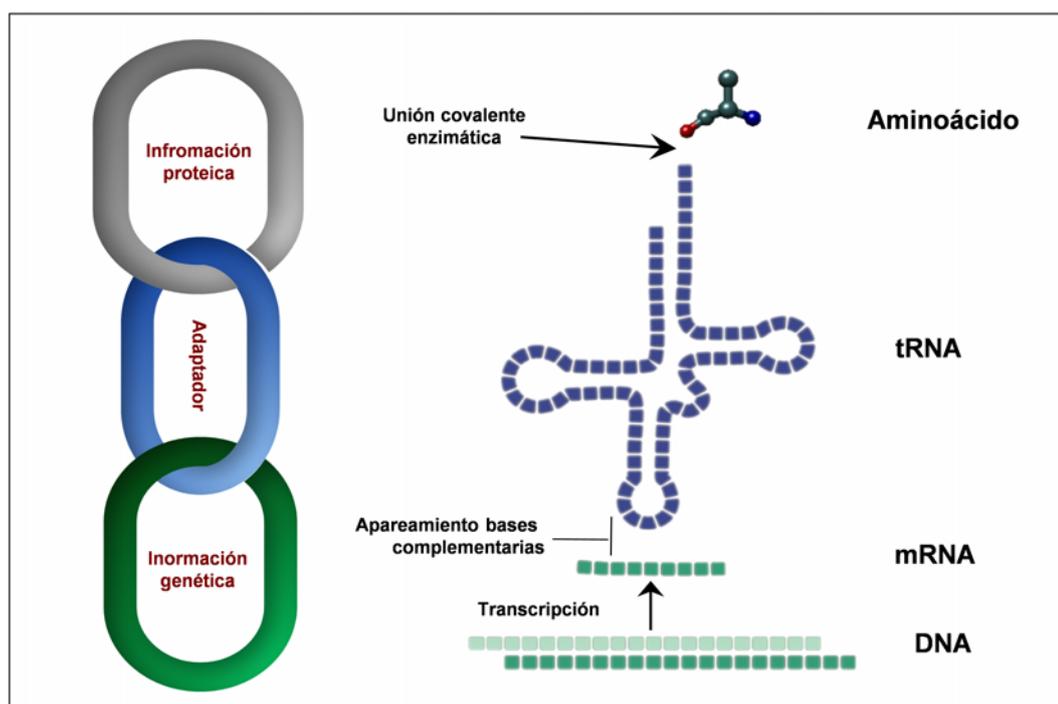


Figura 1: El tRNA es un adaptador entre la información contenida en ácidos nucleicos y proteínas

genético, su correcto funcionamiento es esencial para la viabilidad celular. La evolución ha ido conformando los diferentes tRNAs en objetos compactos, de alrededor de 80 nucleótidos (nt) de media, capaces de ser reconocidos por los diferentes elementos de la maquinaria de síntesis de proteínas. Todos los tRNAs

deben ser capaces de unirse a la misma maquinaria ribosomal pero, además, cada uno de ellos debe ser reconocido específicamente por su aminoacil-tRNA sintetasa, encargada de añadir al tRNA el aminoácido correspondiente, así como por enzimas específicas implicadas en su biogénesis incluyendo las enzimas modificadoras, encargadas de introducir post-transcripcionalmente grupos químicos en diferentes posiciones de los tRNAs. Por esta razón los tRNAs han mantenido cierta homogeneidad estructural lo que les permite ser reconocidos por parte de la maquinaria ribosomal pero, a su vez, poseen elementos específicos que le confieren a cada uno de ellos su propia identidad estructural.

1. Estructura de los tRNAs.

La estructura secundaria canónica del tRNA tiene forma de trébol de cuatro hojas debido a los 4 brazos formados por diferentes regiones nucleosídicas que aparean entre ellas (**figura 2A**). En primer lugar, tenemos el brazo aceptor formado por los extremos 5'P y 3'OH libres, siendo este último, con la conservada secuencia CCA, el que será atacado por una aminoacil-tRNA-sintetasa específica añadiendo el correspondiente aminoácido. Avanzando en sentido 5' → 3' nos encontramos con el llamado brazo D que incluye un tallo formado por el apareamiento de tres o cuatro bases junto con un lazo que varía entre 7 y 11 bases de longitud, llamado lazo D porque siempre tiene una dihidrouridina conservada y al que se debe el nombre asignado al brazo. A continuación tenemos el brazo anticodón formado por un tallo de unas 5 bases y un lazo de siete bases entre las que se incluyen las tres que forman el anticodón (posiciones 34, 35 y 36). Siguiendo hacia el extremo 3' tenemos el último brazo conservado, llamado brazo T o TΨC, debido a su composición, con un tallo de 5 pares de bases y un lazo compuesto por siete bases. Algunos tRNAs poseen un brazo adicional entre el brazo anticodón y el brazo TΨC formado por un lazo de una longitud variable, de ahí el nombre, entre 3 y 21 bases. Esta conformación en trébol se pliega sobre sí misma produciendo la estructura canónica tridimensional en L de los tRNAs, situándose el brazo aceptor de aminoácido (CCA) en un extremo y el anticodón en el extremo opuesto, quedando a un mínimo de 50 Å el uno del otro (**figura 2B**). En el "Protein Data Bank" (PDB) existen estructuras depositadas para tRNAs correspondientes a 19 aminoácidos distintos. Hay un total aproximado de 180 estructuras depositadas, estando representados 34 tRNAs bacterianos, 10 eucarióticos y 5 de arqueobacterias,

cubriendo por tanto los tres reinos de la vida [36]. Además, métodos de análisis de tRNA en solución y computacionales aportan evidencias de su flexibilidad bajo una amplia variedad de condiciones, incluyendo la interacción con otras moléculas.

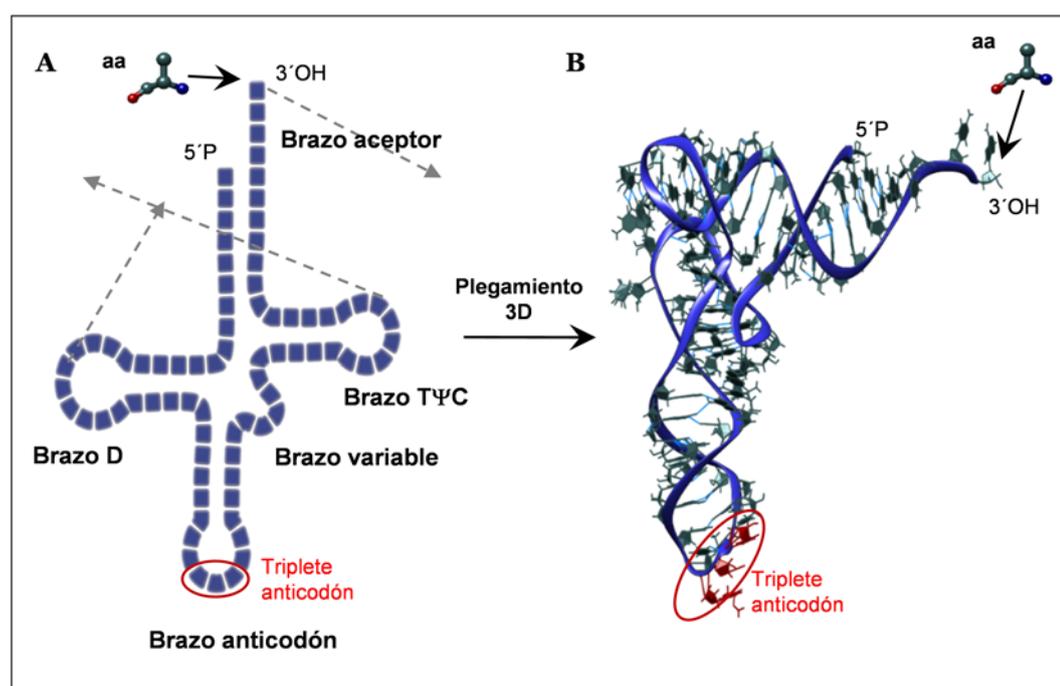


Figura 2: Estructura secundaria y terciaria de los tRNAs. A) Representación esquemática de la estructura secundaria en forma de trébol del tRNA. Las flechas en línea discontinua indican la trayectoria de los diferentes brazos al adquirir su estructura tridimensional. B) Representación en cintas de la estructura cristalina tridimensional del tRNA^{Glu} obtenida del PDB 2DET. Las bases nitrogenadas pertenecientes a los nucleósidos están representadas en varillas color gris y los puentes de hidrógeno entre ellas en azul claro.

2. Modificaciones post-transcripcionales moldean la conformación de los tRNAs.

Para adquirir su conformación nativa final los tRNAs requieren de toda una serie de modificaciones postranscripcionales, es decir, de grupos químicos que son introducidos en los tRNAs una vez transcritos. Los tRNAs son las moléculas de RNA más modificadas pues se han encontrado, en el conjunto de tRNAs, alrededor de 100 modificaciones distintas [49] (**figura 3**). La célula

INTRODUCCIÓN

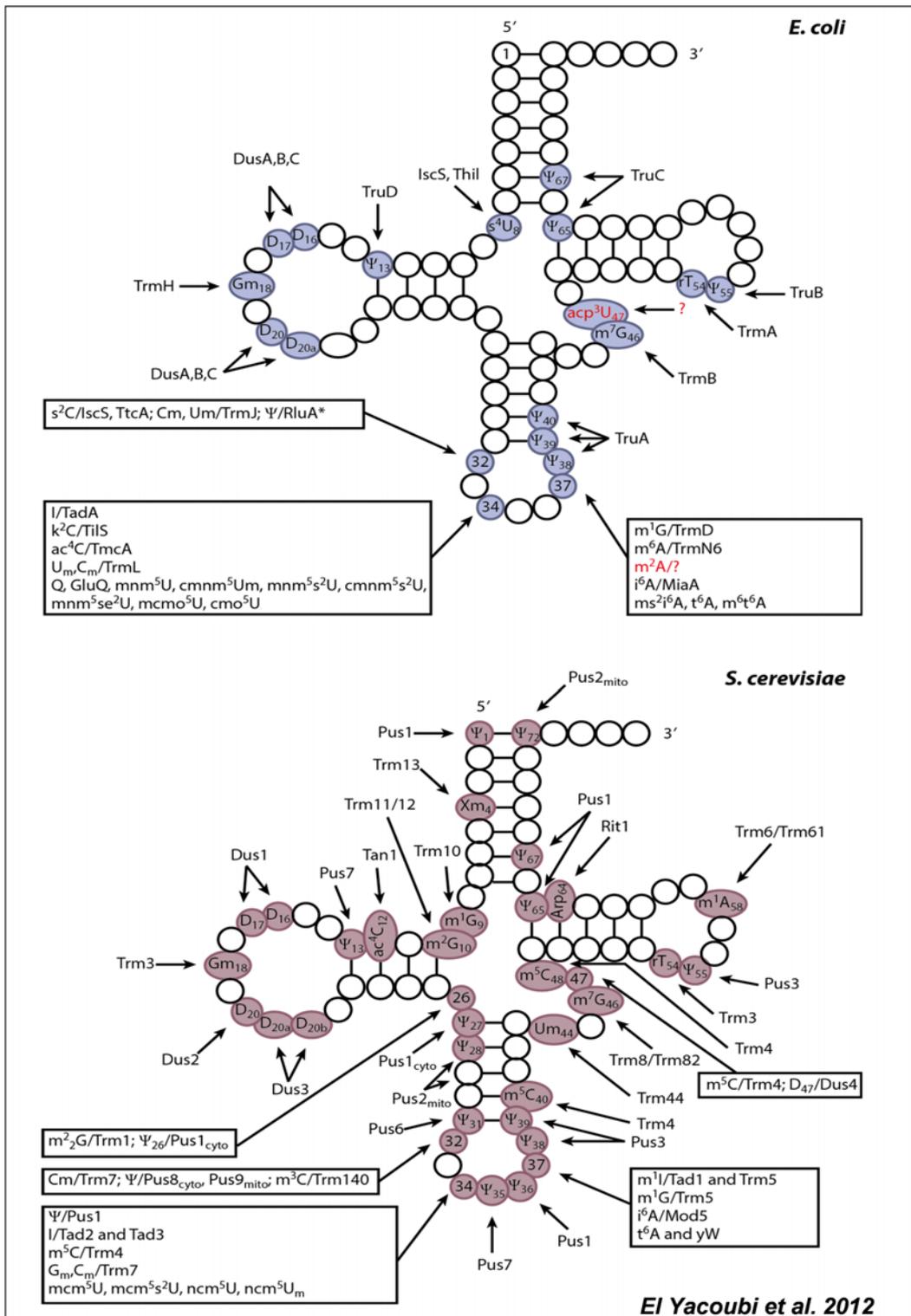


Figura 3: Localización de las modificaciones de tRNA descritas hasta el momento en *E. coli* y *S. cerevisiae*. Nótese la gran variedad de modificaciones identificadas en las posiciones 34 y 37.

invierte mucha energía en la introducción de estas modificaciones, calculando que entre el 1% y el 10% de los genes de un genoma dado están implicados en la modificación de tRNA [25]. Estas modificaciones amplían la diversidad química de las moléculas de tRNA que de otra forma quedaría restringida a las cuatro bases nitrogenadas clásicas. La modificación del tRNA es un proceso universal que se da en los tres reinos de la vida, afectando también a los tRNAs de los orgánulos de origen endosimbionte mitocondria y cloroplasto [76]. Generalmente, la falta de alguna de estas modificaciones por sí sola no genera fenotipos muy severos, a pesar de su alta conservación evolutiva, complicando así la identificación de los genes implicados. La mayoría de las modificaciones cuya ausencia genera los fenotipos más severos, llegando a ser letales en condiciones de estrés o en determinados fondos genéticos, son aquellas que se encuentran en el brazo anticodón y que, por lo tanto, van a afectar directamente al reconocimiento codón-anticodón.

Los nucleótidos modificados se agrupan principalmente en dos regiones del tRNA: el núcleo estructural de la forma en L tridimensional y el brazo anticodón (ASL). Modificaciones en el núcleo estructural se generan por reacciones relativamente simples de biosíntesis, implicando por lo general metilación o pseudouridinación, y contribuyen a la estabilización de la estructura tridimensional. En cambio, en el ASL, además de metilaciones y pseudouridinaciones, existe toda una serie de modificaciones más complejas que combinadas con las anteriores contribuyen a estabilizar la interacción codón-anticodón, manteniendo la pauta de lectura, dándole forma al anticodón y facilitando la translocación del sitio A al sitio P en el ribosoma [88, 1]. De hecho, la química diferencial que exhiben los nucleósidos modificados localizados en el lazo anticodón, principalmente en la posición 34 (posición de tambaleo) y la posición 37 (adyacente al anticodón), es crucial para el proceso de descodificación y, así, no es extraño que ambas posiciones sean las que presenten la mayor diversidad de modificaciones (**figura 3**) [25]. Hay que destacar que en estas dos posiciones (34 y 37) también se encuentran modificaciones introducidas por enzimas cuyos genes han resistido la erosión genómica acontecida en organismos endosimbiontes como los de la clase Mollicutes o de las especies *Buchnera aphidicola* y *Candidatus Riesa pediculicola* [18, 37, 40]. Este hecho sugiere que las enzimas mencionadas pertenecen a la maquinaria mínima de síntesis proteica y las modificaciones que introducen al conjunto mínimo de modificaciones de tRNA que son necesarias para una correcta traducción de proteínas (**figura4**).

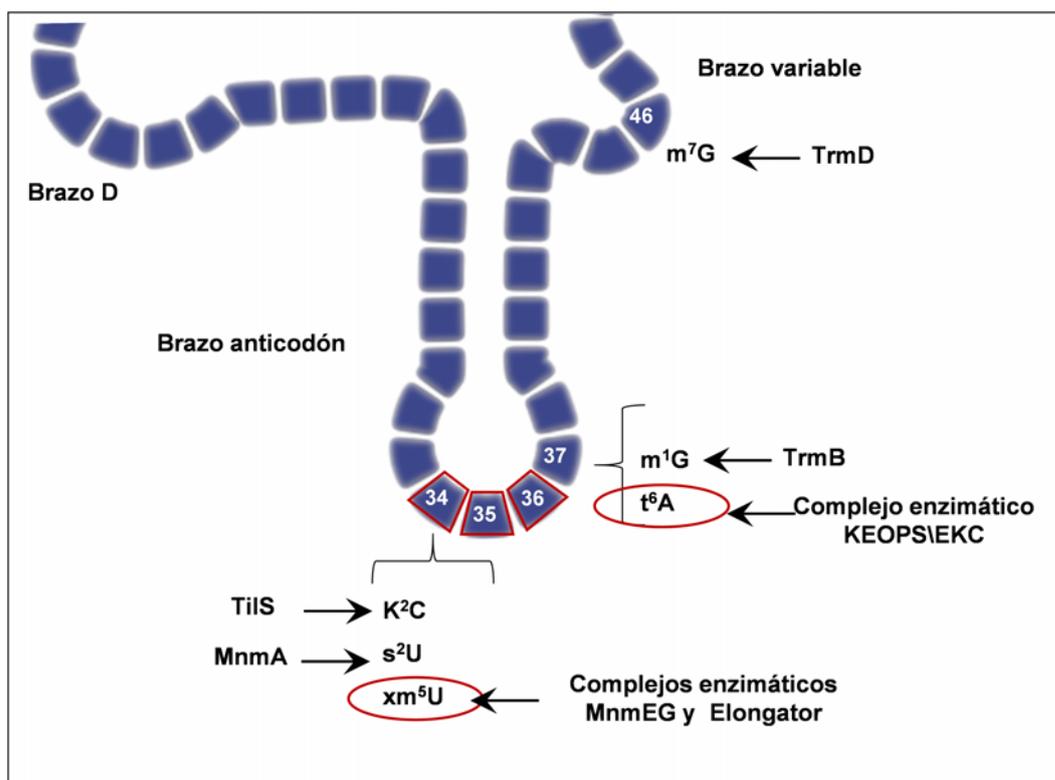


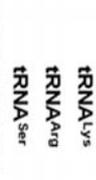
Figura 4: Figura 4. Conjunto mínimo de modificaciones de tRNA sugerido para una correcta traducción de proteínas. Representación esquemática de la localización de las modificaciones con indicación de las enzimas responsables de su síntesis. Con línea roja se han rodeado las modificaciones que requieren la formación de un complejo enzimático. En la figura “s” representa un grupo tiol y “k” una lisina.

Dentro de las modificaciones críticas se encuentran las derivadas de la adición de un grupo treonil-carbamoilo al carbono 6 de la adenina 37 (t^6A_{37}) y las derivadas de la adición de un grupo metileno al carbono 5 de la uridina 34 (derivados xm^5U_{34}).

Estas modificaciones son complejas por la naturaleza del grupo que incorporan y porque requieren la participación de más de una proteína en forma de elaborados complejos enzimáticos. Estos complejos comparten características comunes como la habilidad de hidrolizar nucleótido, una alta conservación evolutiva y, especialmente, su carácter multifacético al haber sido asociados con una amplia variedad de funciones. La t^6A_{37} es sintetizada por las proteínas de las familias universales Sua5/TsaC y Kae1/Qri7/TsaD. Kae1 forma el complejo enzimático KEOPS/EKC con otras proteínas conservadas entre arqueas y eucariotas, al igual que su homóloga bacteriana (TsaD) se asocia con pro-

teínas conservadas solo en eubacterias (**tabla 1**) [19, 24]. Qri7 es la versión mitocondrial de Kae1/TsaD [67]. Por otra parte, el complejo Elongator, formado por las proteínas Elp (1-3) y la ATPasa hexamérica tipo-RecA Elp (4-6), se encarga de la generación de los derivados xm^5U34 de tRNAs de arqueas y citosol de eucariotas, introduciendo los grupos metoxycarbonil-metileno (mcm^5) y carbamoil-metileno (ncm^5) en la posición 5 de la U34. Ambos complejos, KEOPS y Elongator, fueron relacionados en un primer momento con funciones aparentemente no relacionadas con la modificación de tRNAs. El complejo KEOPS/EKC y sus homólogos han sido relacionados con mantenimiento de DNA en bacterias y mitocondrias y con regulación de la transcripción y la homeostasis de telómeros en eucariotas [24]. Por otro lado, el Elongator ha sido asociado con acetilación de histonas, exocitosis, acetilación de α -tubulina, silenciamiento transcripcional y desmetilación del genoma zigótico paterno [39]. Actualmente aún está en discusión si la relación de estos complejos con las funciones mencionadas ocurre exclusivamente a través de su papel en la modificación de tRNAs y, por consiguiente, de la regulación traduccional de la expresión génica, y/o a través de actividades adicionales.

Tabla 1. Características generales de los complejos enzimáticos modificadores de tRNA altamente conservados

Modificación tRNA ASL	Complejo	Proteínas conservadas	Organismo/ organismo	Nucleótido	Grupo donador	tRNA sustratos
^{t6} A37	KEOPS/EKC	TsAD Tsab, Tsae	Prokarya	ATP	Thr/HCO ₃	
		Qri7	Mitochondria			
cmm ^{m5} U34 tm ⁵ U34	MmmEG	Kae1	Archeaea/ Eukarya(citosol)	GTP	Gly(Tau)/MTHF	
		MmmG-MmmE	Prokarya			
		MTO1-GTPBP3	Mitochondria			
m(n)cm ⁹ U34	Elongator	Elp(1-3)-Elp(4-6)	Archeaea/ Eukarya (citosol)	NTP	Acetyl-CoA/SAM	

 ^{t6}A37 Las enzimas homólogas que participan en la síntesis de ^{t6}A37 se resaltan en verde

 Las enzimas responsables de la síntesis de cmm^{m5}U (bacterias, levadura, nemátodos) o tm⁵U (humanos) que son homólogas se resaltan en el mismo color

 Solo fungi

 Solo Elongator

3. Función de las modificaciones complejas en las posiciones 34 y 37 del tRNA.

Nuestra investigación se centra en el complejo enzimático que introduce los derivados xm^5U34 en bacterias y mitocondrias. Este complejo está formado, en *Escherichia coli*, por las proteínas homodiméricas MnmG y MnmE que comparten alrededor de un 50% de identidad secuencial con sus homólogas mitocondriales humanas MTO1 y GTPBP3, respectivamente. Los derivados xm^5U34 encontrados en eubacterias son 5-carboximetilaminometiluridina ($cmnm^5U34$) y 5-aminometiluridina (nm^5U34), en función del uso de una molécula de glicina (gly) o de amonio (NH_4) como sustrato, respectivamente [63]. En la mitocondria, el derivado xm^5U34 es taurinometiluridina (τm^5U34) debido a que en la vía mitocondrial se usa como sustrato taurina en lugar de glicina o amonio como sucede en la vía bacteriana (**figura 5**) [91, 87].

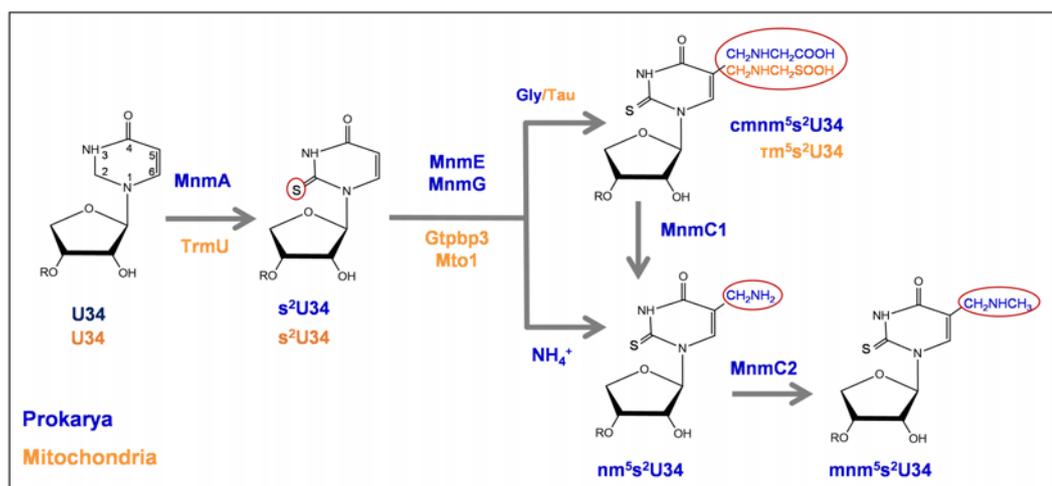


Figura 5: Ruta de modificación de la U34 en tRNAs de *E. coli* y mitocondria. Tanto las modificaciones como las proteínas que las introducen están representadas en color azul (*E. coli*) y en color naranja (mitocondria). Los grupos químicos añadidos en cada paso están rodeados en rojo. Se ha representado en primer lugar el paso de tiolación en la posición 2 de la U34 catalizado por MnmA/TrmU pero realmente las modificaciones en posición 2 y 5 ocurren independientemente por lo que la localización en el diagrama es arbitraria.

Al igual que en el caso de KEOPS/EKC y Elongator, diversos fenotipos se han asociado con mutaciones en MTO1 y GTPBP3 o en genes de tRNA cuyo efecto implica la falta de modificación en la U34 de los tRNAs mitocondriales (mt-tRNAs). Por ejemplo, en la encefalomiopatía mitocondrial con acidosis

láctica y episodios similares a apoplejía (síndrome MELAS) y en la epilepsia mioclónica asociada con fibras rojas rasgadas (síndrome MERRF) los pacientes portan frecuentemente mutaciones en el genoma mitocondrial que afectan al mt-tRNA^{Leu} (UUR) y mt-tRNA^{Lys}, respectivamente. Estas mutaciones previenen la modificación de la U34 llevada a cabo por MTO1 y GTPBP3. Además, desde 2012, se han encontrado mutaciones en MTO1 y GTPBP3 en pacientes con cardiomiopatía hipertrófica, acidosis láctica y encefalopatía [35, 9, 50].

En eubacterias, la inactivación de la vía MnmEG (contracción de MnmE y MnmG, las proteínas que controlan la ruta) produce una disminución de la velocidad de crecimiento, defectos en traducción de proteínas y sensibilidad extrema a pH ácido [4, 5]. En los casos específicos de *Salmonella*, *Streptococcus* y *Aeromonas*, se observó una notable reducción en la virulencia cuando MnmG era inactivada, lo que llevó a proponer MnmG como posible diana para la generación de vacunas vivas atenuadas [84, 83, 15]. Además, la combinación de mutaciones en los genes bacterianos *mnmE* o *mnmG* con mutaciones en el gen *mnmA* (responsable de tiolar la U34 en la posición 2) o la de mutaciones en sus genes homólogos en levadura o en *Caenorhabditis elegans* produce letalidad sintética (**figura 5**) [91, 5] (datos propios no publicados). También produce un fenotipo letal en levadura la combinación de mutaciones en cada uno de los homólogos de *mnmE* y *mnmG* con una mutación en el rRNA mitocondrial 15S que confiere resistencia a la paromomicina, revelando la fuerte interacción funcional que existe entre la modificación de los mt-tRNAs en la posición U34 y los mitorribosomas [91]. Esta combinación impide la respiración mitocondrial, haciendo que el crecimiento de las levaduras sea totalmente dependiente de su capacidad fermentativa.

Al igual que ocurrió con los genes responsables de los complejos Elongator y KEOPS/EKC, MnmG fue asociada inicialmente con una función aparentemente independiente de la modificación de tRNA. De hecho hasta hace relativamente poco tiempo MnmG recibía el nombre de GidA (Glucose Inhibition Division protein A) debido a la observación de que la división celular se inhibía en presencia de glucosa cuando el gen *gidA* estaba inactivado [93]. Los genes *gidA* (ahora *mnmG*) y *mioC* se encuentran junto al origen de replicación (*oriC*) en todas las eubacterias. Dado este contexto genómico y la inhibición de la división celular en presencia de glucosa, se asoció al gen *gidA* con replicación de DNA aunque, posteriormente, cuando se descubrió el papel de GidA/MnmG en la modificación del tRNA, ganó terreno la idea de que su

papel en la división celular sería indirecto, al controlar la traducción de alguna proteína requerida para la división celular en presencia de glucosa. Este mismo año, Lies and col. han sugerido que *gidA* y *mioC* forman parte del programa destinado a coordinar replicación y división celular pues controlan, en sentidos opuestos, la expresión de una proteína implicada en la formación del septo (YmgF): mientras que *GidA* tiene un efecto negativo, *MioC* tiene un efecto positivo. Los autores no entran a analizar las bases moleculares de este efecto, quedando pues por aclarar si *GidA* tiene una función independiente de la modificación de tRNA [54]. Por otro lado, en los dos últimos años se ha demostrado que proteínas *GidA* son capaces de inhibir la Topoisomerasa II interaccionando físicamente con ella y que su homóloga humana, MTO1, interacciona directamente con proteínas ribosomales, lo que sugiere que podría estar implicada en el ensamblaje del mitorribosoma [89, 65]. Todos estos datos sugieren, para las proteínas *GidA/MnmG* y sus homólogas, funciones independientes de la modificación de tRNA.

La diversidad de fenotipos asociados al déficit en los complejos modificadores de tRNA genera las siguientes cuestiones:

- ¿Los fenotipos son exclusivamente causados por defectos en la traducción de proteínas a su vez originados por la falta de la modificación?
- ¿Las proteínas que integran estos complejos o las modificaciones que generan llevan a cabo otras funciones en la célula independientes de la traducción de proteínas?

Aunque el papel central de los tRNAs sigue siendo el de actuar como adaptadores en la traducción de proteínas, en las últimas décadas se ha descubierto su implicación directa en procesos metabólicos, de señalización intracelular e incluso en varias respuestas a estrés [83, 69]. Por ejemplo, en 2009, Fu y colaboradores observaron que algunos tRNAs, ante diferentes estímulos de estrés, eran cortados por la angiogenina en el anticodón, generando dos fragmentos de tRNA [30]. Estas “mitades” de tRNA, llamadas actualmente tiRNAs, son capaces de inhibir apoptosis inducida por estrés osmótico, interaccionando directamente con el citocromo c [77]. Estos autores sugieren que las modificaciones en estos tiRNA pueden determinar su estructura así como la afinidad en la unión con sus ligandos. Por tanto, es lógico pensar que las modificaciones también van a jugar un papel importante en funciones no convencionales,

no asociadas directamente con la traducción de proteínas. Delimitar qué efectos de las modificaciones se ejercen a través de funciones no convencionales (señalizadoras) y de funciones convencionales (traducción de proteínas), puede ser una tarea difícil dado que la afectación de la síntesis de proteínas concretas puede alterar diversos procesos celulares y explicar la aparición de fenotipos pleiotrópicos. Curiosamente, tanto en *E. coli* como en *S. cerevisiae* se ha observado que la superproducción de ciertos tRNAs en cepas deficientes en la modificación de la U34 puede compensar ciertos fenotipos, a pesar de que los tRNAs superproducidos no están, obviamente, modificados [11, 12]. Esta observación ha llevado a proponer que las modificaciones de la U34 son necesarias para optimizar la lectura de los codones propios (“cognate codons”) y no para evitar la lectura de los codones impropios (“near cognate codons”) [4, 5]. Sin embargo, considerando el papel señalizador de los tRNAs y el jugado por las modificaciones en el mismo, no podemos descartar otras explicaciones para la reversión del fenotipo conferido por la acumulación de tRNAs no modificados. En este contexto, lograr un conocimiento en profundidad de las proteínas que la llevan a cabo podría aportar una información valiosa para contestar las preguntas planteadas.

4. Aspectos estructurales y bioquímicos de los complejos modificadores de tRNA.

4.1. Organización estructural de los complejos enzimáticos KEOPS y Elongator.

En la actualidad, no se dispone de la estructura de los holocomplejos KEOPS y Elongator aunque en los últimos años se han caracterizado bioquímica y estructuralmente varias de las proteínas individuales así como algunos subcomplejos, pudiéndose elaborar modelos de los holocomplejos que ayudan a entender su funcionamiento y regulación. El complejo KEOPS/EKC de eucariotas y arqueas está formado por cuatro proteínas diferentes, salvo en fungi donde la proteína Gon7 también forma parte de KEOPS, interaccionando de manera lineal de la siguiente manera: Gon7-Pcc1-Kae1-Bud32-Cgi121 [57, 71, 99] (**figura 6**). En cambio, el complejo Elongator está formado por un subcomplejo hexamérico, compuesto por las proteínas Elp4, Elp5 y Elp6, con

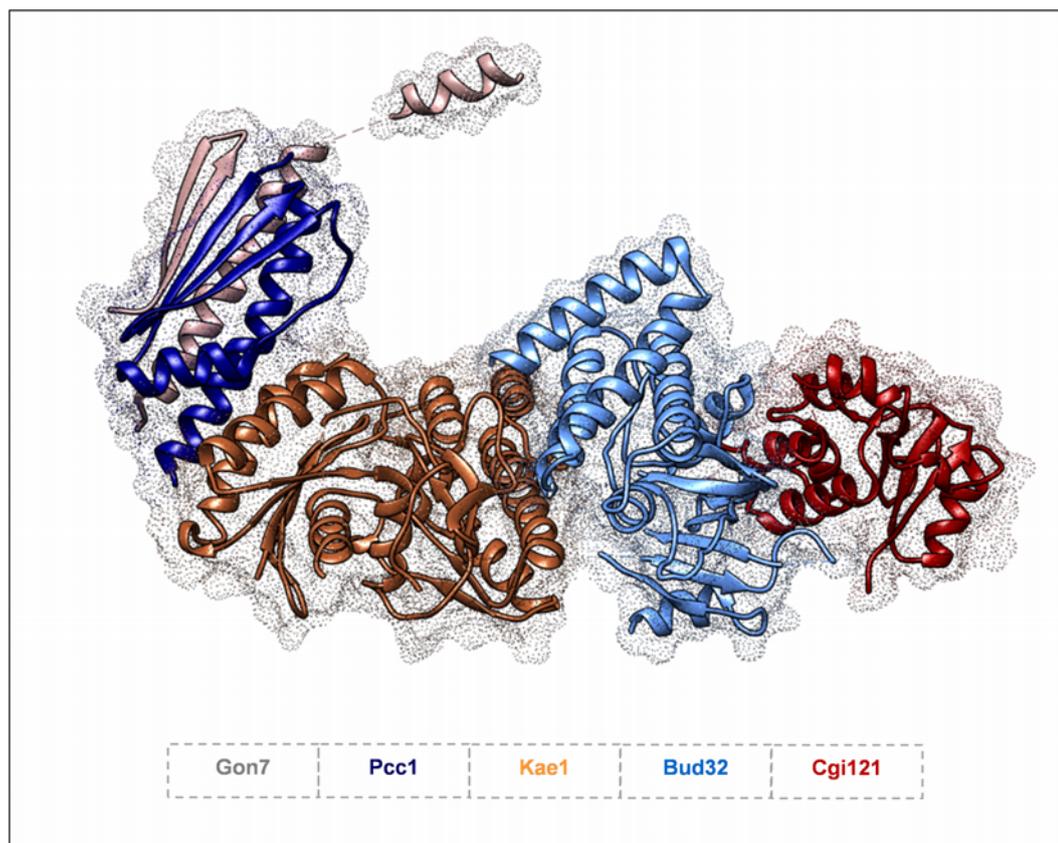


Figura 6: Modelo estructural del holocomplejo KEOPS de levadura. Representación en cintas de la estructura tridimensional de las diferentes proteínas que forman parte de KEOPS mostrando la superficie que ocupan. En la parte inferior se muestra un esquema de su organización en función de los colores utilizados. El modelo está basado en las estructuras de los subcomplejos Cgi121-Bud32-Kae1 (PDB: 3EN9), Kae1-Pcc1 (PDB: 3ENO) y Pcc1-Gon7 (PDB: 4WX7) además de la información publicada por Mao et al. 2008 y Zhang et al. 2015

actividad NTPasa, que interacciona con dos sucomplejos formados por las proteínas Elp1, Elp2 y Elp3 llegando a alcanzar una masa molecular total de 850 kDa, estimada por filtración en gel [39, 38, 72] (**figura 7**). Estos dos complejos modificadores de tRNA hidrolizan nucleótido y, en ambos casos, esta actividad hidrolítica se ha relacionado con la liberación del tRNA ya modificado [71, 39]. La energía producida en la hidrólisis del nucleótido es transformada en energía conformacional que genera importantes movimientos intraproteicos, transfiriéndose incluso a proteínas interaccionantes, que llevan finalmente a la liberación del tRNA.

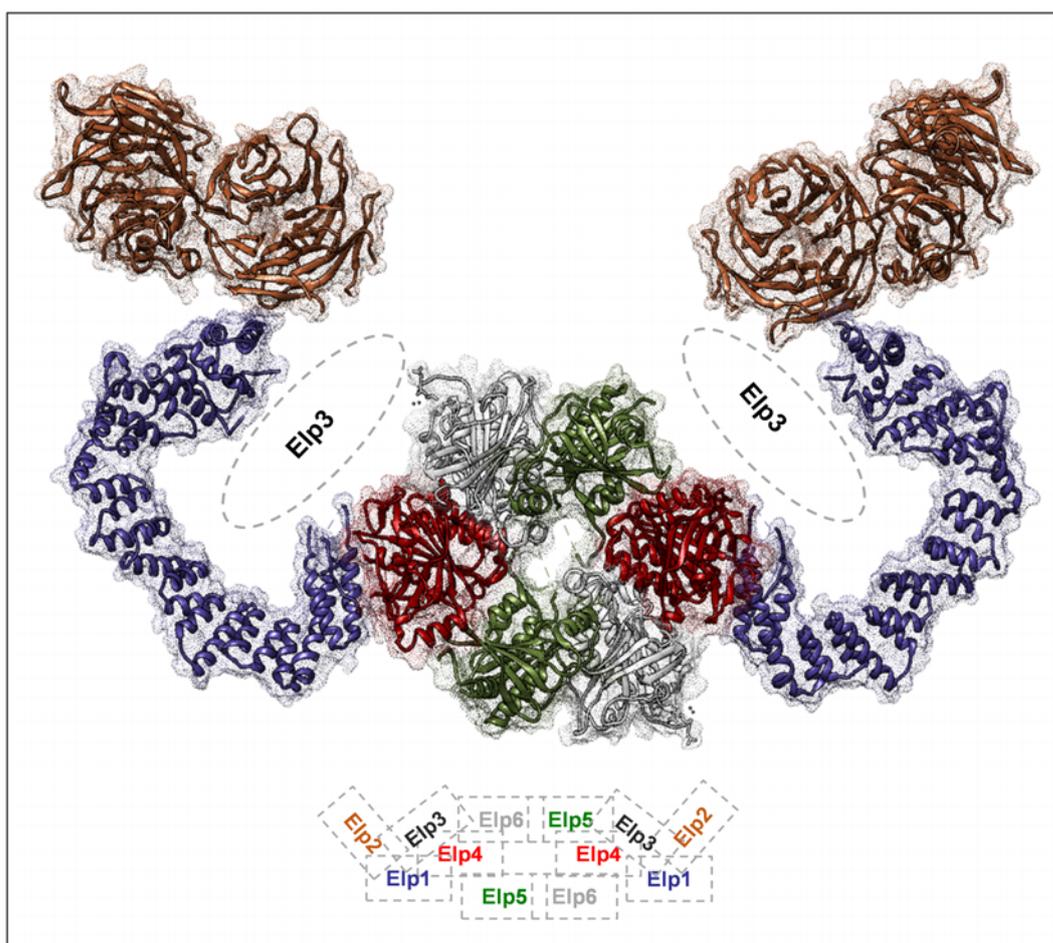


Figura 7: Modelo estructural del holocomplejo Elongator. Representación en cintas de la estructura tridimensional de las diferentes proteínas que forman parte de Elongator mostrando la superficie que ocupan. En la parte inferior se muestra un esquema de su organización en función de los colores utilizados. En línea discontinua se muestra la posición que ocuparía Elp3 de la cual no se ha depositado en el PDB ninguna estructura 3D. Modelo basado en el publicado por Glatt et al. 2013 y en las estructuras cristalinas del subcomplejo Elp (4-6) y de las proteínas Elp2 (PDB: 1PI6) y Elp1 (PDB: 5CQR)

4.2. El complejo heterotetramérico MnmEG está compuesto por una GTPasa (MnmE) y una flavoenzima (MnmG).

Actualmente la estructura del complejo formado por las proteínas bacterianas MnmE y MnmG (complejo MnmEG) no ha sido resuelta, aunque se dispone de la estructura cristalina de las proteínas que lo forman en varios microorganismos. Resultados de diferentes grupos indican que ambas proteínas sufren importantes cambios conformacionales que pueden afectar al complejo, lo que, probablemente, complica su cristalización. Tanto MnmE como MnmG han sido descritas como proteínas diméricas que interactúan entre ellas formando un heterotetrámero tipo $\alpha 2\beta 2$ y ambas son esenciales para catalizar la incorporación del grupo cmnm al carbono 5 de la U34 [97].

MnmE es una GTPasa dimérica con una dinámica conformacional regulada por la hidrólisis de GTP.

Nuestro grupo fue el primero en describir las peculiares características de la actividad GTPasa de MnmE. A diferencia de las GTPasas como Ras, MnmE tiene baja afinidad por nucleótidos y una alta actividad intrínseca, no necesitando activadores externos tipo GAP ni factores intercambiadores de nucleótidos, GEF. También fuimos los primeros en demostrar que la hidrólisis de GTP era necesaria para la función de modificación del tRNA [13, 58, 96]. En 2005, se obtuvo la estructura cristalina de MnmE de *Thermotoga marítima* [80], que reveló su organización en tres dominios (**figura 8**):

- Dominio N-terminal, formado por los residuos del 1 al 102. Responsable de la dimerización constitutiva de MnmE y de la unión del metilentetrahidrofolato (sustrato donador del grupo metileno que se une directamente al C5 de la U34 en la reacción de modificación de tRNA).
- Dominio helicoidal que comprende los residuos del 102 al 220 y, de la parte C-terminal de la proteína, del 385 al 454. Cada región se estructura en dos largas hélices- α que interactúan entre sí formando dos largos “brazos”.
- Dominio G, compuesto por los residuos del 221 al 385. Se encarga de la unión e hidrólisis de GTP. La dimerización y disociación de este domi-

INTRODUCCIÓN

nio como consecuencia del ciclo GTPasa son necesarias para la función modificadora de tRNA [74].

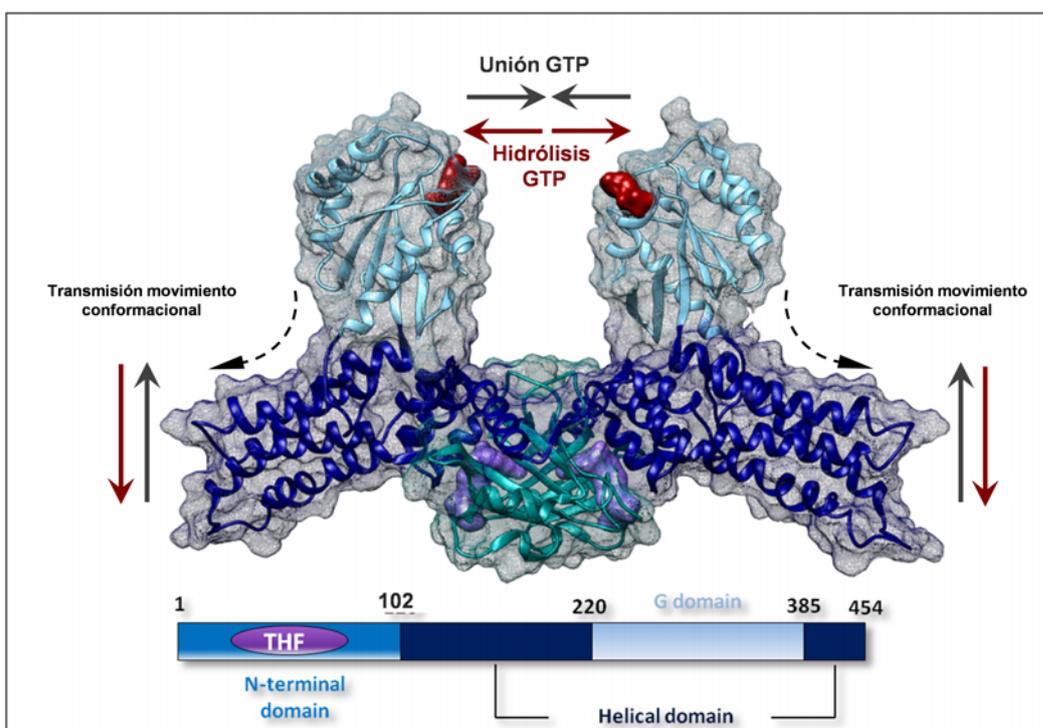


Figura 8: Estructura cristalina de MnmE de *Thermotoga marítima*. Representación en cintas del dímero de MnmE con los dominios en diferentes azules como indica el esquema. Las flechas continuas muestran la dirección de los movimientos del dominio G y en consecuencia del dominio helicoidal debido a la unión (gris) o la hidrólisis (rojo) de GTP. Las flechas discontinuas indican la dirección de la transmisión del cambio conformacional desde los dominios G a los helicoidales.

Scrima y Wittinghofer (2006) encontraron que la unión de GTP y potasio producía la dimerización del dominio G y la estimulación de la actividad GTPasa. Por esa razón, MnmE se incluyó dentro de un grupo relativamente nuevo de GTPasas llamadas GAD (Proteína G activada por dimerización) [32]. Aquel hallazgo explicó por qué MnmE, presentando su dominio G un plegamiento canónico, tiene un mecanismo catalítico que difiere del de las clásicas GTPasas Ras y no requiere la participación de ninguna proteína activadora de GTPasa (GAPs) ya que la dimerización estimulada por la unión de GTP (o un mimético) y potasio estabiliza el estado de transición. Recientemente, la cinética del ciclo GTPasa de MnmE ha sido estudiada revelando que se trata de un proceso secuencial que consiste en unión de GTP, dimerización del

dominio G, hidrólisis de GTP, disociación del dominio G y liberación de los productos de reacción GDP y Pi [74]. Estos productos, a su vez, controlan negativamente el ciclo GTPasa de MnmE ya que a concentraciones fisiológicas inhiben la hidrólisis de GTP. Por ello, se ha sugerido que un cambio conformacional promovido por algún paso del ciclo de modificación del tRNA (por ejemplo, la unión de una nueva molécula de tRNA no modificada) promueve la liberación del GDP y del Pi, permitiendo el inicio de un nuevo ciclo GTPasa y de modificación del tRNA [74]. A pesar de la información que se tiene sobre el ciclo GTPasa de MnmE, la función precisa de la hidrólisis del GTP en el mecanismo de modificación de tRNA todavía se desconoce. Wittinghofer y colaboradores propusieron que los cambios conformacionales generados en el dominio G, que implican movimientos de hasta 20 Å [62], a consecuencia del ciclo GTPasa podrían transmitirse al resto de MnmE y a MnmG dado que:

1. Mutaciones que afectan al ciclo GTPasa alteran la afinidad de MnmE por MnmG [61].
2. Mutaciones que parecen interferir en la transmisión de los cambios conformacionales (como el cambio D175A en el dominio helicoidal de MnmE) afectan severamente el proceso de modificación [61].

La transmisión de cambios conformacionales desde el dominio G de MnmE a sus dominios helicoidales está apoyada por un modelo construido por Fislage et al. (2014) a partir de datos obtenidos mediante dispersión de rayos X de pequeño ángulo (SAXs) [28]. Estos datos indicaron que la dimerización del dominio G de MnmE, como consecuencia de la sustitución del GDP por un mimético del GTP, está acoplada con un movimiento de apertura de los dominios helicoidales (**figura 8**).

Proteínas GidA: flavoenzimas capaces de modificar tRNA.

Las proteínas MnmG pertenecen al grupo originalmente clasificado como proteínas GidA. Este grupo se divide en dos clases:

- GidA_L del que forman parte proteínas de alrededor de 600 aminoácidos y cuya posición en el cromosoma junto a *oriC* está conservada en todas las eubacterias. A este grupo pertenece la proteína GidA de *E. coli* que se ha renombrado como MnmG tras la demostración de que participa en la síntesis de la modificación carboximetilaminometil (cmnm) de la U34.

- $GidA_S$ compuesto por proteínas de unos 450 aminoácidos y de posición variable en el cromosoma bacteriano. En los últimos años, al igual que las $GidA_L$ como MnmG, las $GidA_S$ han sido renombradas como TrmFO, al demostrarse su participación en la metilación de la uridina 54 de los tRNAs de especies en las que la enzima está presente. A diferencia de MnmG, TrmFO solo se conserva entre eubacterias, principalmente en Gram positivas.

MnmG y TrmFO son parálogas, manteniendo un alto grado de similitud secuencial, radicando la mayor diferencia en la región C-terminal ya que TrmFO carece del dominio helicoidal que se encuentra presente en MnmG. Ambas proteínas contienen un motivo consenso de unión a dinucleótido GxGxxG en la región N-terminal, habiéndose demostrado experimentalmente que unen flavin adenin dinucleótido (FAD) y que las glicinas pertenecientes a ese motivo son esenciales para dicha unión [94, 97]. Además, MnmG une NADH [60] y lo necesita para llevar a cabo la reacción de modificación de tRNA *in vitro*, en determinadas condiciones [63]. Por tanto, las proteínas $GidA$ son flavoenzimas que, además, son capaces de unir NADH (MnmG) o NAD(P)H (TrmFO) [95], y están implicadas en la modificación de ciertos tRNAs.

En el año 2007, una vez publicada la estructura de MnmE [80], sabiendo que MnmG es una flavoenzima, y que ambas proteínas forman un complejo funcional para llevar a cabo la modificación de tRNA [97], nos planteamos la caracterización estructural de MnmG. Colaborando con el grupo de cristalografía del Dr. M. Cygler, en el laboratorio de Estructura de Macromoléculas de la Universidad McGill de Montreal, realizamos un estudio sobre las relaciones estructura-función de la proteína MnmG de *E. coli* [82]. Nuestra estructura de la proteína de *E. coli* coincidió con la obtenida por otros grupos con proteína MnmG también de *E. coli* y de otras bacterias [68, 60]. En esencia, la proteína MnmG es un homodímero en el que cada protómero se organiza en tres dominios estructurales (**figura 9**, arriba):

- Dominio FAD, subdividido en dos regiones separadas que incluyen los residuos del 1 al 201 y del 342 al 454.
- Dominio inserción compuesto por los residuos del 202 al 341 insertado en el dominio FAD.

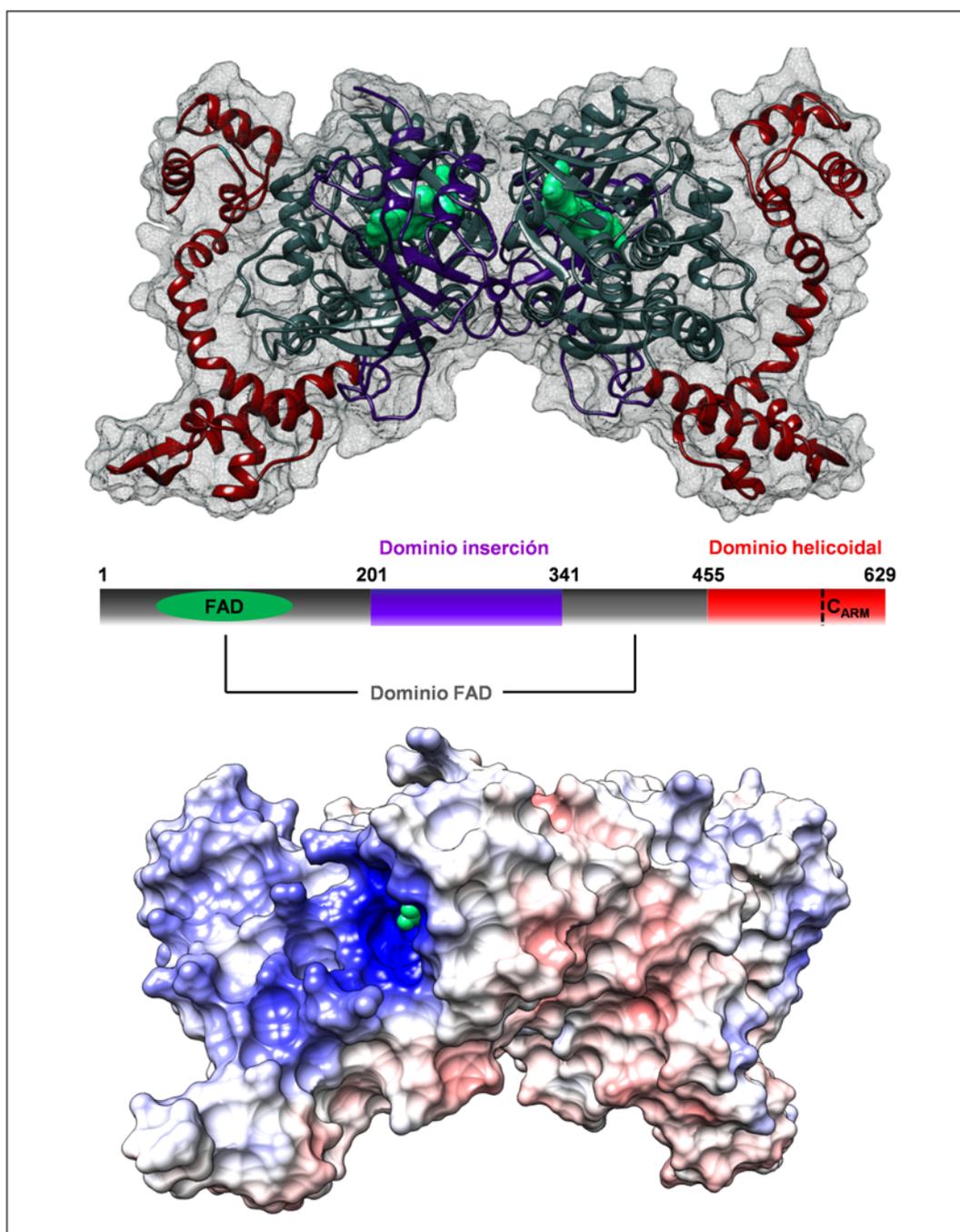


Figura 9: Estructura cristalina de MnmG de *Aquifex aeolicus*. A) Representación en cintas del dímero de MnmG (PDB:2ZZI) con los dominios en diferentes colores como indica el esquema. B) Representación del potencial electrostático de superficie del dímero MnmG. En azul se muestran las regiones expuestas al solvente cargadas positivamente, en rojo las cargadas negativamente y en blanco las zonas sin carga neta. En verde se ha representado el FAD que queda alojado en la zona más cargada positivamente.

- Dominio helicoidal, ausente en TrmFO, que comprende los residuos del 455 al 629.

La interfaz de dimerización propuesta por todos los autores a partir de los cristales obtenidos [60, 68, 82] está formada por la interacción antiparalela entre el dominio FAD de un protómero y el dominio inserción del protómero opuesto. Como se puede observar en la **figura 9** los dominios FAD e inserción forman un núcleo (aquí llamado núcleo catalítico), delimitando un profundo surco donde se aloja el FAD con el anillo de isoaloxacina orientado al solvente (**figura 9**, abajo). El dominio helicoidal se proyecta desde el núcleo catalítico, quedando la región C-terminal de MnmG (550-629), que está especialmente conservada, relativamente separada del resto de MnmG y a la que en esta tesis se le ha llamado C_{ARM} por su forma alargada similar a un brazo. Las estructuras de las proteínas procedentes de *E. coli* no se pudieron obtener con el FAD unido ni con suficiente densidad electrónica en la región correspondiente al C_{ARM} , seguramente debido a una alta movilidad [82, 60]. Gracias a los cristales obtenidos con MnmG de los microorganismos termoestables *Chlorobium tepidum* y *Aquifex aeolicus* se pudieron resolver estructuras de MnmG con FAD y con el C_{ARM} [68, 60]. El cálculo del potencial electrostático de superficie, tanto de las proteínas de *E. coli* como las de los microorganismos termoestables [82, 68, 60], reveló que la carga positiva en MnmG se concentraba en la zona donde queda el surco en el que se aloja el FAD, sugiriendo que esta zona podría ser la implicada en unión de tRNA (**figura 9**, abajo). De hecho, usando ensayos de retraso en gel (EMSA) [68], se demostró la interacción directa de MnmG con tRNA y la participación de varios residuos pertenecientes al parche cargado positivamente en la unión de tRNA. Los datos de EMSA de Numata y col. también apoyaron un papel principal para MnmG a la hora de unir el tRNA ya que indicaban que MnmE unía tRNA con una constante de disociación aparente (K_D) alrededor de 15 μM , a diferencia de MnmG que lo hacía con una K_D del orden de nanomolar. Dos cisteínas conservadas en MnmG han sido identificadas como residuos catalíticos: C47 y C277, situadas a unos 3 Å y 15 Å del FAD, respectivamente [68]. Estas cisteínas también están conservadas en TrmFO y su estructura cristalina reveló que ocupaban la misma posición en el espacio que las de MnmG. Hamdane y colaboradores demostraron que la C53 (C47 en MnmG) estaba implicada en el mantenimiento de la configuración y accesibilidad del sitio FAD y que la C226 (C277 en MnmG) actuaría como

nucleófilo atacando el carbono 5 de la uridina 34 del tRNA [42].

5. Bases moleculares de la modificación introducida por el complejo MnmEG.

5.1. Modelo del mecanismo catalítico.

Dados los requerimientos de la reacción de modificación *in vitro* catalizada por el complejo MnmEG, nuestro grupo propuso un modelo para su mecanismo basado, en parte, en el utilizado por la timidilato sintasa pues ambas enzimas utilizan un derivado del tetrahidrofolato en las respectivas reacciones [63]. Además, uno de los dos tipos de timidilato sintasa también requiere FAD [64]. Sin embargo, el grupo introducido por MnmEG es más complejo con lo que esta enzima también usa como sustrato, además del derivado de tetrahidrofolato, amonio o glicina, lo que junto a otros requerimientos de la reacción, tuvo que ser tomado en cuenta a la hora de elaborar el modelo (**figura 10**) [63, 4]. En primer lugar, Moukadiri et al. (2009) determinaron experimentalmente que el derivado de THF con el que era más eficiente la reacción de modificación era el metilentetrahydrofolato (ya que MnmE une, con afinidad similar, todos los derivados del THF *in vitro*), descartando al formiltetrahydrofolato que se había propuesto previamente por su mayor reactividad [80].

La propuesta de Moukadiri et al. implica que el metilentetrahydrofolato tiene que ser previamente activado por un ácido general de MnmE o MnmG, transformándose en un reactivo ión imino (*paso 1*), permitiendo así la posterior adición del grupo carboximetilamino (si procede de una glicina libre) o amino (si procede de amonio) al folato (*paso 2*). El grupo ahora unido al N5 del metilentetrahydrofolato (unido a su vez a MnmE) es deshidrogenado por el FAD unido a MnmG (*pasos 3-4*), facilitando así el ataque nucleofílico al carbono 5 de la U34 previamente activado a través de un enlace covalente transitorio entre el carbono 6 de la U34 y un residuo, que actúa como ácido general, del complejo MnmEG (*pasos 5-6*). La C277 de MnmG, según los estudios de Hamdane et al. (2011) en TrmFO, sería la encargada de formar este enlace covalente transitorio con la U34. Posteriormente, el FAD reducido (FADH₂) como consecuencia del paso de deshidrogenación actuaría como reductor de la base de Schiff formada (*pasos 8-9*), liberándose finalmente el

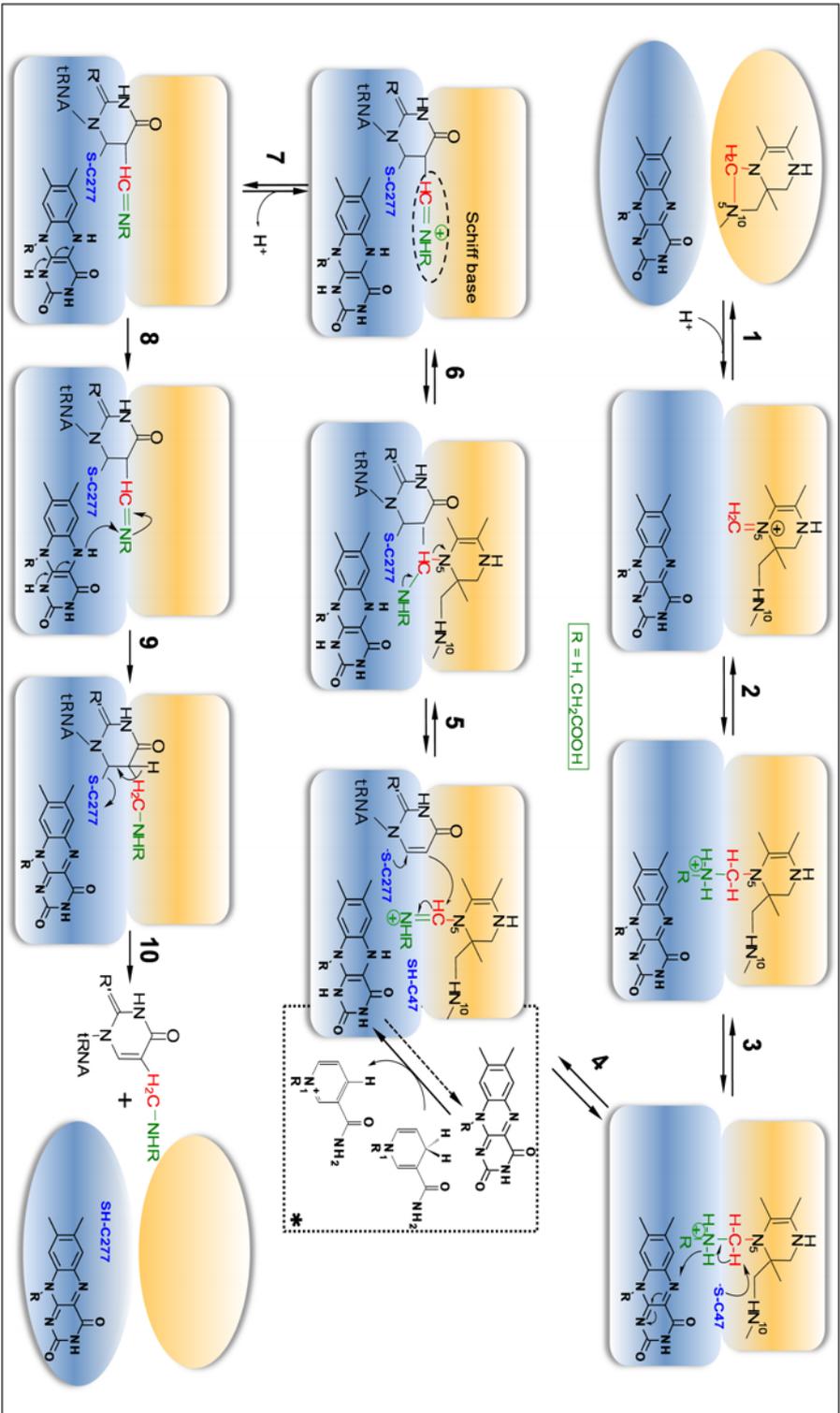


Figura 10: Modelo del mecanismo catalítico de la reacción de modificación de tRNA llevada a cabo por MmmEG. En naranja pálido se representa a MmmE, en azul a MmmG y los cambios en sus formas simbolizan las reorganizaciones conformacionales necesarias para poner en contacto los sitios de unión de MTHF en MmmE y de FAD en MmmG. El esquema delimitado con línea discontinua representa la acción del NADH manteniendo la forma reducida del FAD necesaria para la reducción de la base de Schiff formada.

tRNA modificado. Los requerimientos de la reacción de modificación puesta a punto por Moukadiri et al. (2009) indican que el NADH no es esencial para la modificación de tRNA *in vitro*. Solo en concentraciones limitantes de FAD la adición de NADH produce un aumento en la proporción de cmnm5U34 formado. Dado este resultado, y teniendo en cuenta que la estructura de MnmG indica que el anillo de isoaloxacina del FAD está expuesto al solvente, se le otorgó al NADH el papel de asegurar el mantenimiento del FAD en su forma reducida que es requerida para los últimos pasos de la reacción de modificación. El mecanismo catalítico planteado, considerando también la organización estructural de MnmE y MnmG, implica que el sitio de unión de MTHF en MnmE debería estar muy próximo al sitio de unión de FAD en MnmG, formando un único centro catalítico, al menos en la primera parte de la reacción de modificación en la que el FAD debe reaccionar con el grupo carboximetileno unido al MTHF. Por otro lado, el FAD sería esencial para dos reacciones; en primer lugar, actuaría como oxidante en una reacción aparentemente independiente del tRNA (**figura 10**, *pasos 3-4*) y, en segundo lugar, actuaría como reductor de la base de Schiff formada en la posición 5 de la U34 (**figura10**, *pasos 8-9*). En los trabajos publicados sobre las estructuras de MnmG, los autores siempre comentan las elaboradas a partir de cristales en los que, a consecuencia de la conformación adoptada por el homodímero, los anillos de isoaloxacina de los FAD están expuestos al solvente, apuntando en sentidos opuestos hacia el exterior de MnmG [82, 68, 60]. Esta conformación complica la formación del centro catalítico entre ambas proteínas en una interacción dímero a dímero, dadas las posiciones del FAD (en MnmG) y del MTHF (en MnmE), ya que no se observa ningún acceso que permita la interacción simultánea entre ambos ligandos (FAD y MTHF). Además, como se ha dicho, los FAD quedan expuestos al solvente, lo que contraviene una condición clave del modo de acción de las flavoenzimas: la catálisis mediada por FAD debe tener lugar en un microambiente protegido del solvente [29]. Así pues, parece que la reacción de modificación de tRNA requiere importantes reorganizaciones conformacionales en el complejo MnmEG para soslayar los dos inconvenientes citados. La hidrólisis de GTP, según el mecanismo de reacción descrito arriba y dada la lejanía del dominio G del sitio de unión del MTHF en MnmE (**figure 8**), no parece tener un papel directo en la reacción de modificación aunque sabemos que es esencial para la misma, tanto *in vivo* como *in vitro* [96, 58, 63]. Por ello, se ha propuesto que la hidrólisis de GTP por MnmE controla la reacción de

modificación ejecutada por el complejo MnmEG a través de la transmisión de cambios conformacionales desde el dominio G de MnmE a MnmG, regulando y coordinando las interacciones entre los diferentes ligandos que intervienen en la reacción [60, 63].

5.2. Modelos estructurales de la organización del holo-complejo MnmEG.

Aunque la estructura cristalina del complejo MnmEG no se ha obtenido hasta el momento, se han propuesto dos modelos para este complejo basados en las estructuras cristalinas de los dímeros y en diferentes datos bioquímicos y biofísicos [60, 28]. También se tienen en cuenta los resultados indicando que MnmE y MnmG interactúan a través de sus dominios helicoidales [82, 60]. Wittinghofer y colaboradores, analizando la interacción de proteínas MnmE y MnmG silvestres y mutantes, mediante filtración en gel, propusieron como partícipes de esa interacción a los residuos E171 y E179 de MnmE y, de MnmG, a los residuos E585 y K589, ambos pertenecientes al C_{ARM} [60]. Con ello, daban soporte a un modelo en el que las proteínas interactúan dímero a dímero por sus dominios helicoidales aunque, como ya se ha mencionado y se observa en la **figura 11A**, los sitios de FAD en MnmG y MTHF en MnmE quedan muy alejados, impidiendo cualquier tipo de reacción entre ellos. Por ello, estos autores propusieron que el acercamiento entre tales sitios de unión podría ser promovido por cambios conformacionales que tendrían lugar en el complejo, posiblemente asociados al ciclo GTPasa de MnmE [60]. Sin embargo, nuestro grupo demostró mediante SPR que el residuo E585 de MnmG no estaba implicado en la interacción con MnmE aunque su cambio a alanina o lisina afectaba significativamente la modificación del tRNA *in vivo*, por lo que quedaba pendiente dilucidar el rol de este residuo y aclarar las bases moleculares de la interacción MnmE-MnmG [82].

Recientemente, Versées y col. presentaron un segundo modelo del complejo, generado a partir de experimentos de dispersión de rayos X de pequeño ángulo (SAXS), modelado bioinformático y otros datos de interacción de calorimetría isotérmica de titulación (ITC) [28]. En este modelo, el heterotetramero está formado, asimétricamente, a través de la interacción entre los dominios N-terminal y helicoidal de un protómero de MnmE con el C_{ARM} de un protómero de MnmG (**figura 11B**, arriba).

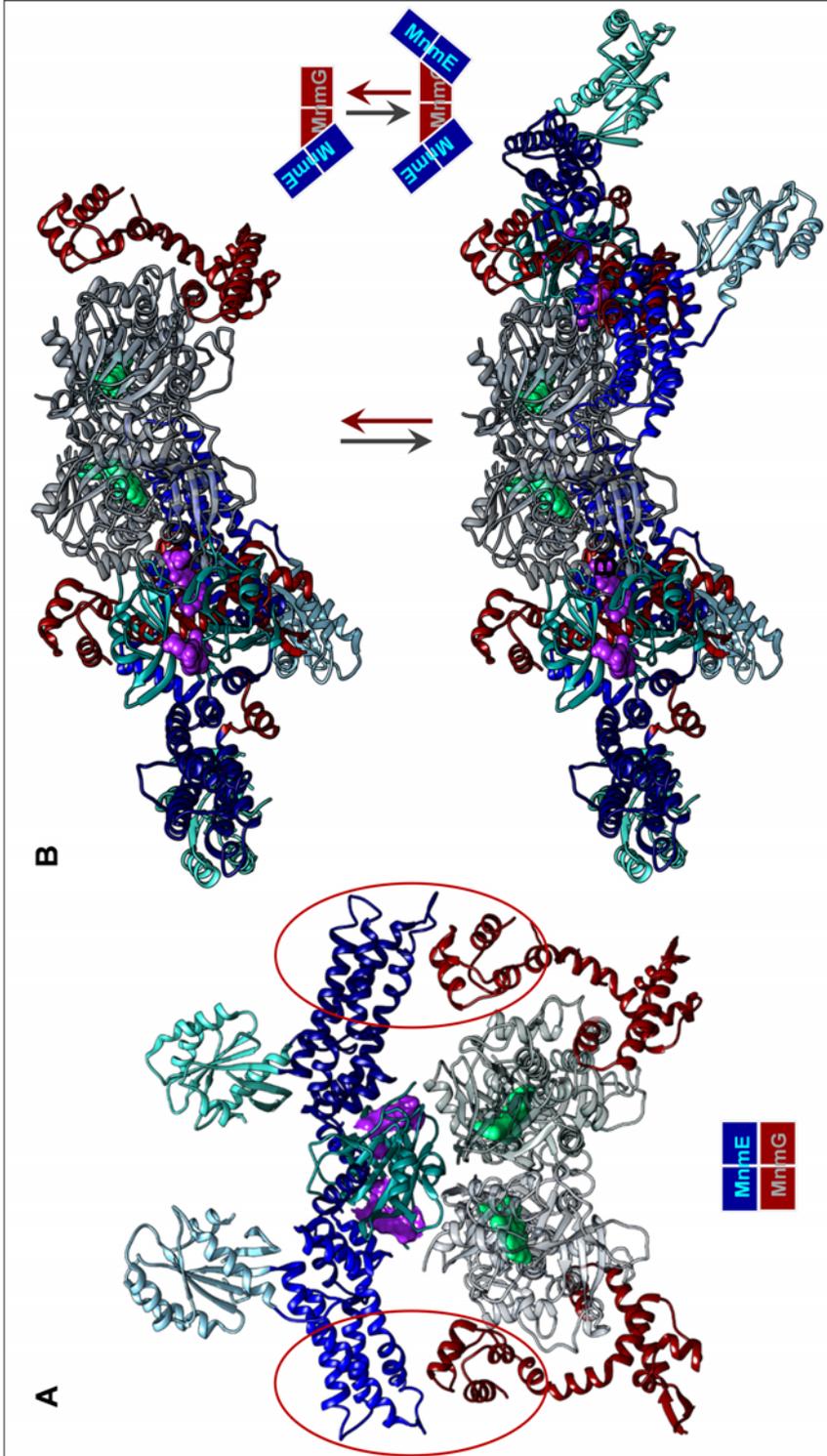


Figura 11: Modelos publicados del complejo MnmEG. A) Representación en cintas del modelo de Meyer y col. basado en la interacción entre los dominios helicoidales de ambas proteínas (línea roja) (Meyer et al. 2008, 2009). La superficie que ocupa tanto el MTHF como el FAD se representa en morado y verde respectivamente. B) Representación en cintas del modelo de Versées y col. $\alpha 2\beta 2$ (arriba) y $\alpha 4\beta 2$ (abajo). Las flechas representan la transición de uno a otro estado multimérico en función del ciclo GTPasa (Fislage et al. 2014).

Este modo de interacción permite el acercamiento entre el sitio de unión del MTHF en MnmE y el sitio de unión de FAD en MnmG, lo que es esencial para la primera parte de la reacción de modificación según el modelo propuesto por Moukadiri et al. (2009). Cabe destacar que esta manera asimétrica de interaccionar deja libre un protómero de cada uno de los homodímeros. Pero estos autores, estudiando como afectaba la unión de un mimético de GTP a la conformación global del complejo, concluyeron que tal unión producía cambios conformacionales en MnmE que se transmitían a MnmG, promoviendo que en el protómero libre de MnmG se uniese un segundo dímero de MnmE, formando un complejo $\alpha 4\beta 2$ (**figura 9B**, abajo), que se disociaría con la hidrólisis de GTP, regenerándose el complejo $\alpha 2\beta 2$.

Los dos modelos propuestos asumen que el *modus operandi* del complejo MnmEG implica una intrincada dinámica conformacional dados los numerosos datos indicativos de los cambios conformacionales que le afectan tras la unión de diferentes ligandos. Por ello, conviene no perder de vista que las estructuras cristalinas de las proteínas solo nos muestran instantáneas de un proceso dinámico en el que aún quedan muchos aspectos por resolver. Varias publicaciones han confirmado que MnmE sufre cambios conformacionales globales como consecuencia de su ciclo GTPasa [80, 61, 28] y, por tanto, MnmG debe responder a esta dinámica conformacional coordinándose con MnmE para llevar a cabo los distintos pasos de la reacción de modificación. Además, se ha visto que MnmG juega un papel importante en la estabilización del dímero del dominio G de MnmE tras su unión a un mimético del GTP [61]. En esta Tesis hemos abordado la interacción funcional entre MnmE y MnmG desde la información que nos proporciona MnmG. Nuestros resultados indican que MnmG sufre una compleja dinámica conformacional que afecta desde la formación del sitio de unión de FAD hasta su estado de oligomerización, pasando por una serie de conformaciones diméricas que podrían modular la intervención del FAD en las reacciones con el MTHF y el tRNA, así como la interacción de la proteína con el tRNA y con otros ácidos nucleicos.

Parte II

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL.

MnmG y MnmE son dos proteínas homodiméricas conservadas evolutivamente que forman un complejo enzimático (MnmEG), heterotetramérico de tipo $\alpha 2\beta 2$, encargado de la modificación de tRNAs bacterianos y mitocondriales. No conocemos con precisión ni el mecanismo de la reacción catalizada por el complejo MnmEG ni la función de MnmG, más allá de la posiblemente relacionada con su capacidad de unir FAD. En esta Tesis se ha pretendido profundizar en el conocimiento sobre estas cuestiones a través de un estudio minucioso de la estructura, conformaciones dimericas y actividades además del análisis de la unión de sustratos, cofactores y otras macromoléculas fundamentales para la función de MnmG.

OBJETIVOS CONCRETOS.

1. Contribuir a la caracterización estructural de MnmG (en colaboración con el grupo del Dr. Mirek Cygler, McGill University, Canadá)
2. Realizar un análisis comparativo de las estructuras depositadas de MnmG hasta la fecha.
3. Caracterizar las consecuencias de la unión a FAD en MnmG.
4. Realizar un estudio de las relaciones estructura-función de MnmG.
5. Determinar la importancia funcional del C_{ARM} (dominio helicoidal) de MnmG.
6. Estudiar la conformación dimerica de MnmG y la interfaz de dimerización.
7. Analizar la interacción entre el dominio N-terminal de MnmE y el núcleo catalítico de MnmG.
8. Estudiar la interacción de MnmG con el tRNA.
9. Elaborar un modelo de la reacción de modificación basado en los datos proporcionados por MnmG.

Como consecuencia de los descubrimientos hechos durante el abordaje de los objetivos mencionados, planteamos una ampliación de los mismos destinada al

OBJETIVOS

estudio de las dos conformaciones diméricas que tiene MnmG, lo que constituye la segunda parte de esta Tesis en la que se abordan los siguientes objetivos:

1. Estudio de la oligomerización de orden superior de MnmG
2. Asociación de MnmG con el rRNA
3. Estudio de competición tRNA y rRNA por la unión a MnmG
4. Actividad NADH oxidasa del oligómero de MnmG
5. Relación de las conformaciones diméricas de MnmG con la formación del oligómero
6. Elaboración de un modelo estructural de los oligómeros de MnmG

Parte III

METODOLOGÍA

6. Material biológico y oligonucleótidos.

Tabla 2. Relación de cepas bacterianas

Cepa	Genotipo	Origen
DH5 α	<i>supE44 ΔlaacU169 (Δ80 lacZ ΔM15) hsdR17 recAI endA1 gyrA96 thi-AI</i>	Elseviers et al. 1984
DEV16	<i>thi-1 rel-1 spoT1 lacZ105_{UAG} val^R mnmE-Q192X</i>	Cabedo et al 1999
BL21 (DE3)	<i>hsdS gal (λclts857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5 T7 gene 1)</i>	Stuider et al. 1990
IC5241	MG1655 <i>mnmG::Tn10 [Tet^R]</i>	Yim et al. 2006
IC5975	BL21-DE3 <i>mnmG::kan</i>	Shi et al., 2009
IC4639	DEV16 <i>mnmE⁺ bgl (Sal⁺)</i>	Yim et al. 2003
IC5975	BL21-DE3 <i>mnmG::kan</i>	Sí et al., 2009

Tabla 3. Relación de construcciones

Plásmido	Descripción	Origen o referencia
pIC1180	FLAG- <i>mnmG</i> insertado entre sitios NcoI and XbaI of pBAD22	Yim et al., 2006
pIC1181	Plásmido derivado de pIC1180 conteniendo FLAG- <i>mnmG</i> G13A	Yim et al., 2006
pIC1182	Plásmido derivado de pIC1180 conteniendo FLAG- <i>mnmG</i> G15A	Yim et al., 2006
pIC1183	Plásmido derivado de pIC1180 conteniendo FLAG- <i>mnmG</i> G13A/G15A	Yim et al., 2006
pIC1256	Plásmido derivado de pIC1180 conteniendo FLAG- <i>mnmG</i> Y377H	Shi et al. 2009
pIC1274	Plásmido derivado de pIC1180 conteniendo FLAG- <i>mnmG</i> G369A/G373A	Shi et al. 2009
pIC1276	Plásmido derivado de pIC1180 conteniendo FLAG- <i>mnmG</i> G373A/Y377H	Shi et al. 2009
pIC1283	Plásmido derivado de pIC1180 expresando FLAG-MnmG ₁₋₅₃₅	Shi et al. 2009
pIC1326	Plásmido derivado de pIC1180 conteniendo FLAG- <i>mnmG</i> G52A/G53A	Shi et al. 2009
pIC1327	Plásmido derivado de pIC1180 conteniendo FLAG- <i>mnmG</i> G67A/G68A	Shi et al. 2009
pIC1364	Plásmido derivado de pIC1180 conteniendo FLAG- <i>mnmG</i> Y377A	Shi et al. 2009
pIC1365	Plásmido derivado de pIC1180 conteniendo FLAG- <i>mnmG</i> G156A/T157A	Shi et al. 2009
pIC1366	Plásmido derivado de pIC1180 conteniendo FLAG- <i>mnmG</i> R174A	Shi et al. 2009
pIC1368	Plásmido derivado de pIC1180 conteniendo FLAG- <i>mnmG</i> F158A	Shi et al. 2009
pIC1382	Plásmido derivado de pIC1180 conteniendo FLAG- <i>mnmG</i> K56A	Shi et al. 2009
pIC1383	Plásmido derivado de pIC1180 conteniendo FLAG- <i>mnmG</i> K283A	Shi et al. 2009
pIC1384	Plásmido derivado de pIC1180 conteniendo FLAG- <i>mnmG</i> R286A	Shi et al. 2009
pIC1385	Plásmido derivado de pIC1180 conteniendo FLAG- <i>mnmG</i> R427A	Shi et al. 2009
pIC1386	Plásmido derivado de pIC1180 conteniendo FLAG- <i>mnmG</i> K88A	Shi et al. 2009
pIC1387	Plásmido derivado de pIC1180 conteniendo FLAG- <i>mnmG</i> N48A/P49A	Shi et al. 2009
pIC1388	Plásmido derivado de pIC1180 conteniendo FLAG- <i>mnmG</i> G89A/P90A	Shi et al. 2009
pIC1389	Plásmido derivado de pIC1180 conteniendo FLAG- <i>mnmG</i> R204A	Shi et al. 2009

Tabla 3 (continuación). Relación de construcciones

Plásmido	Descripción	Origen o referencia
pIC1390	Plásmido derivado de pIC1180 conteniendo <i>FLAG-mnmG T201A/P202A</i>	Shi et al. 2009
pIC1391	Plásmido derivado de pIC1180 conteniendo <i>FLAG-mnmG R196A</i>	Shi et al. 2009
pIC1392	Plásmido derivado de pIC1180 conteniendo <i>FLAG-mnmG T199A/G200A</i>	Shi et al. 2009
pIC1440	Plásmido derivado de pIC1180 conteniendo <i>FLAG-mnmG E585K</i>	Shi et al. 2009
pIC1442	Plásmido derivado de pIC1180 conteniendo <i>FLAG-mnmG R436A</i>	Shi et al. 2009
pIC1446	<i>mnmG</i> insertada entre los sitios NdeI y XhoI de pET15b	Este trabajo
pIC1755	Plásmido derivado de pIC1446 conteniendo <i>mnmG E585K</i>	Este trabajo
pIC1756	Plásmido derivado de pIC1446 conteniendo <i>mnmG R436A</i>	Este trabajo
pIC1760	Plásmido derivado de pIC1446 conteniendo <i>mnmG C47S</i>	Este trabajo
pIC1716	Plásmido derivado de pIC1446 conteniendo <i>mnmG C277S</i>	Este trabajo
pIC1690	Plásmido derivado de pIC1446 conteniendo <i>mnmG D575K</i>	Este trabajo
pIC1688	Plásmido derivado de pIC1446 conteniendo <i>mnmG Y576G</i>	Este trabajo
pIC1689	Plásmido derivado de pIC1446 conteniendo <i>mnmG L582G</i>	Este trabajo
pIC1703	Plásmido derivado de pIC1446 conteniendo <i>mnmG E566K</i>	Este trabajo
pIC1757	Plásmido derivado de pIC1755 conteniendo <i>mnmG R436A</i>	Este trabajo
pIC1574	Plásmido derivado de pIC1446 expresando MnmG(1-550)	Este trabajo
pIC1758	Plásmido derivado de pIC1574 expresando MnmG(1-550) <i>R436A</i>	Este trabajo
pIC1759	Plásmido derivado de pIC1574 expresando MnmG(1-550) <i>C277S</i>	Este trabajo
pIC684	<i>mnmE</i> insertada entre sitios BamHI y EcoRI pGEX4T	Cabedo et al. 1999
pIC1325	<i>mnmE</i> insertada entre los sitios NdeI y XhoI de pET15b	Este trabajo
pIC1614	<i>mnmE(1-360)</i> insertada entre los sitios NdeI y XhoI de pET-15b	Este trabajo
pIC758	Plásmido derivado de pIC684 expresando MnmE (220-385)	Cabedo et al. 1999
pIC1760	Plásmido derivado de pIC684 expresando MnmE (1-390)	Dra. Silvia Prado
pIC1761	Plásmido derivado de pIC684 expresando MnmE (102-454)	Dra. Silvia Prado
pIC1675	<i>mnmG(1650-1887)</i> insertada entre los sitios NdeI y XhoI de pET-15b	Este trabajo
pIC1710	Plásmido derivado de pIC1675 conteniendo <i>mnmG E585K</i>	Este trabajo
pIC1711	Plásmido derivado de pIC1675 conteniendo <i>mnmG K589E</i>	Este trabajo
pIC1692	Plásmido derivado de pIC1675 conteniendo <i>mnmG R603D</i>	Este trabajo
pIC1676	pIC16Plásmido derivado de pIC1675 conteniendo <i>mnmG G606A</i>	Este trabajo
pIC1618	<i>tRNA^{Lys}</i> insertado entre los sitios EcoRI y PstI de pBSK _{rna}	Este trabajo
pIC1619	<i>tRNA^{Cys}</i> insertado entre los sitios EcoRI y PstI de pBSK _{rna}	Este trabajo

Tabla 4. Relación de oligonucleótidos para mutagénesis

Nombre	5' → 3' Secuencia
G13A (F)	CGTCATCATCATTGCGGGGGTGCATGCAG
G13A (R)	CTGCATGACCCCGGCAATGATGATGACG
G15A (F)	CATCATTGGCGGGCTCATGCAGGCACCG
G15A (R)	CGGTGCCTGCATGAGCCCCGCCAATGATG
G13A/G15A (F)	CGTCATCATCATTGCGGGCGCCATGCAGGCACCG
G13A/G15A (R)	CGGTGCCTGCATGGGCGCCGGCAATGATGATGACG
N48A/P49A (F)	ATGAGCTGCGCCGCGGCGATCGGC
N48A/P49A (R)	GCCGATCGCCGCGGCGCAGCTCAT
G52A/G53A (F)	CCGGCGATGCGCGCTATTGGGAAG
G52A/G53A (R)	CTTCCAATAGCGGGATCGCCGG
K56A (F)	GGCGGTATTGGGCGGGACATCTGGTA
K56A (R)	TACCAGATGTCCCGCCCCAATACCGCC
G67A/G68A (F)	GATGCACTGCGCGCTCTGATGGCG
G67A/G68A (R)	CGCCATCAGAGCGGCGAGTGCATC
K88A (F)	CTAACGCAAGCGCAGGACCGGCGTTTC
K88A (R)	GAACCGCCGGTCTGCGCTTGCGTTTAG
G89A/P90A (F)	GCAAGCAAAGCGCGGCGGTTCCG
G89/P90A (R)	GCGAACCGCGCGGCTTTGCTTGC
G156A/T157A (F)	GCTCACCGTTGCGGCATTCTCGACGG
G156A/T157A (R)	CCGTCGAGGAATGCCGCAACGGTGAGC
F158A (F)	CTCACCGTTGGACGGCCCTCGACGGTAAAATT
F158A (R)	GAATTTTACCGTCGAGGGCCGTCCAACGGTGAG
R174A (F)	TACAGCGGTGGCGCTGCTGGTGATCCG
R174A (R)	CGGATCACCAGCAGCGCCACCGCTGTA
R196A (F)	TGCGCGTTGGTGCCTGAAAACCGG
R196A (R)	CCGGTTTTTCAGTGACCAACGCGCA
T199A/G200A (F)	TCGTCTGAAAGCGCCACACCACCGC
T199A/G200A (R)	GCGGTGGTGTGCGCGCTTTCAGACGA

Tabla 4 (continuación). Relación de oligonucleótidos para mutagénesis

Nombre	5' → 3' Secuencia
T201A/P202A (F)	GAAAACCGGGGCAGCGCCCGTATTGA
T201A/P202A (R)	TCAATACGGCGCTGCCCGGTTTTTC
R204A (F)	GGACACCACCGCAATTGATGCTCGA
R204A (R)	TCGAGCATCAATTGCCGGTGGTGCC
K283A (F)	CCGTCGATCGAAGACGCAGTCATGCGCTTCGCC
K283A (R)	GGCGAAGCGCATGACTGCGTCTTCGATCGACGG
R286A (F)	GAAGACAAAGTCATGGCCTTCGCCGACAGAAAT
R286A (R)	ATTTCTGTCGGCGAAGGCCATGACTTTGTCTTC
Y377A (F)	CGGCACTACCGGTGCCGAAGAAGCCGCT
Y377A (R)	CAGCGGCTTCTTCGGCACCGGTAGTGCCG
R427A (F)	CCAAAGAACCGTATGCTATGTTTACTTCGCG
R427A (R)	CGCGAAGTAAACATAGCATACGGTTCTTTGG
R436A (F)	CGCGCGCAGAATATGCTCTGATGCTACGCG
R436A (R)	CGCGTAGCATCAGAGCATATTCTGCGCGCG
R440A (F)	GAATATCGTCTGATGCTAGCGGAAGATAATGCGGATCTG
R440A (R)	CAGATCCGCATTATCTTCGGCTAGCATCAGACGATATTC
R447A (F)	GATAATGCGGATCTGGCTTTGACTGAAATCGGTC
R447A (R)	GACCGATTTCAAGTCAAAGCCAGATCCGCATTATC
E585K (F)	CCGGTCTTTCTAACAAAGTGATCGCCAAAC
E585K (R)	GTTTGGCGATCACTTTGTTAGAAAGACCGG
E585A (F)	CCGGTCTTTCTAACGCAGTGATCGCCAAAC
E585A (R)	GTTTGGCGATCACTGCGTTAGAAAGACCGG
E536X (F)	GCGTTGACAGACTAACAGCGGCGCG
E536X (R)	CCGCCGCCTGTTAGTCTGTCAACGC
C47S (F)	TGGGGCAGATGAGCAGCAACCCGGCGATCGG
C47S (R)	CCGATCGCCGGTTGCTGCTCATCTGCCCA
C277S (F)	GTCGGCCACGCTACAGCCCGTCGATCGAAGAC
C277S (R)	GTCTTCGATCGACGGGCTGTAGCGTGGGCCGAC
550X (F)	GGCCTCGAGTTAATAAACCTTCGTATTTAACCTG
550X (R)	CAGGTTAAATACGAAGGTTATTATTAACCTCGAGGCC

7. Material químico y bioquímico.

7.1. Electroforesis

- Agarosa en polvo de uso habitual Pronadisa. Uso: geles de ácidos nucleicos y geles de retardo ácido nucleico-proteína.
- Acrilamida procedente de una mezcla comercial 29:1 acrilamida, N', N' metilen-bis-acrilamida Amresco. Uso: Geles de poliacrilamida para migración de proteínas en condiciones nativas y desnaturalizantes.
- Geles comerciales de poliacrilamida en gradiente 3-12 %, Invitrogen. Uso: Migración de proteínas en condiciones nativas.
- Agentes de tinción:
 - Rojo Ponceau (Sigma) para Electroforesis Roja Nativa.
 - “Gel Red” (Invitrogen) agente de tinción de ácidos nucleicos en agarosa
 - Azul de Coomassie R-250 (BioRad)

7.2. Extracción y purificación de DNA.

- Extracción de DNA genómico bacteriano con “High Pure PCR Template Preparation Kit” (Roche).
- Purificación de plásmidos con “High Pure Plasmid Isolation kit” (Roche).
- Purificación de fragmentos de DNA productos de PCR “Hig Pure PCR Product Amplification kit” (Roche).

7.3. Extracción y purificación de tRNA.

- Columnas Nucleobond (AX500).
- Columnas de agarosa conjugada con Estreptavidina “HiTrap Streptavidin HP 1 ml “(GE Healthcare) para purificación de tRNAs específicos.

7.4. Extracción y purificación de tRNA.

- Columnas tRNA total.
- Columnas de agarosa conjugada con Estreptavidina “HiTrap Streptavidin HP 1 ml “(GE Healthcare) para purificación de tRNAs específicos.

7.5. Reacciones de PCR.

- Oligonucleótidos cebadores (Sigma).
- Desoxinucleótidos (dNTPs) (Invitrogen).
- Taq DNA polimerasas.
 - Para fragmentos de DNA largos “Expand Long Template” (Roche).
 - Para fragmentos de DNA cortos DNA polimerasa (Biotools).

7.6. Enzimas.

- Diferentes enzimas de restricción para clonación en plásmidos de fragmentos de DNA y comprobación de secuencias mutadas (MBI Fermentas, Amersham Biosciences, Roche, New England Biolabs y Promega).
- T4 DNA ligasa (Roche).
- Tripsina tratada con TPCK (Sigma), para ensayos de protección inducida por FAD.
- Trombina (Sigma), para purificación de GST-MnmE.
- Nucleasa P1 (Sigma), para digestión de tRNAs y posterior defosforilación con Fosfatasa alcalina (Sigma) para el análisis de nucleósidos por HPLC.
- RNasa A (Gibco), para degradación de RNA asociado a MnmG.
- DNasa I (Pharmacia), para degradación de DNA en extracciones de RNA total.

7.7. Transferencia e inmunodetección.

- Anticuerpo anti MnmG primario obtenido a partir de la inoculación de la proteína purificada MnmG a conejos neocelandeses blancos. El suero obtenido es posteriormente inmunopurificado a través de su retención y posterior elución en una membrana de nitroceluosa (Hybond Amersham Biosciences) con MnmG purificada previamente fijada.
- Anticuerpo secundario policlonal anticonejo IgG conjugado a peroxidasa (Sigma).
- Membranas de PVDF (Amersham Biosciences), para inmunodetección de MnmG.
- Revelado sistema ECL (Amersham Biosciences).

7.8. Purificación de proteínas.

- Isopropyl- β -D-thiogalactopiranosido (Apollo Scientific) inducción de la expresión de proteínas en el sistema pET y pGEX.
- Arabinosa (Sigma), inducción de la expresión de proteínas en sistema pBAD.
- Cromatografía de afinidad:
 - Resina de agarosa conjugada a glutation (Sigma), para purificación de GST-MnmE.
 - Resina de agarosa conjugada con anticuerpo AntiFlag(GE Healthcare), para purificación de proteínas etiquetadas Flag-MnmG.
 - Resina de agarosa conjugada con cobalto (Clontech), para purificación de proteínas etiquetadas con 6xHis.
 - Peptido FLAG (Genescript), para elución proteínas etiquetadas con Flag.
 - Imidazol (Sigma), para elución proteínas etiquetadas con 6xHis.
 - Concentración y lavado de proteínas con sistema de filtración centrífugas: Amicon Ultra 4 (NMWL 10K y 30K) y Amicon ULTRA 15 (NMWL 30K y 50K).

- Membranas de diálisis (Spectra Por).
- Columna cromatografía exclusión molecular para FPLC Superdex 200 HR 10/30 o para Ettan LC Superdex 200 5/150 GL (Amersham Biosciences).

7.9. Ligandos de MnmG y agentes químicos específicos.

- FAD, NAD⁺, NADH y NADPH (Sigma), en ensayos de unión y actividad.
- Iodacetamida (Amersham) alquilación irreversible de grupos tiol.
- Dithiotreitol agente reductor de proteínas.
- Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (Sigma), usado como inhibidor de Ser/Throproteasas en purificación de proteínas y ensayos de tripsinólisis.
- Glicerol (Sigma) agente estabilizante de proteínas en electroforesis.

7.10. Medios de cultivo.

- Los productos específicos para la elaboración de medios de cultivo fueron de Difco y Pronadisa.
- Ampicilina, Cloranfenicol y tetraciclina (Roche y Sigma), fueron los antibióticos usados para la selección de resistencias en medios de cultivo.

8. Aparatos.

- Centrífugas: Hereaus Biofuge 22R, Beckman Avanti J25 y Beckman Avanti J20XD.
- Termociclador PTC-100 y PTC-150 de MJ Research.
- Espectrofotómetros:
 - Nanodrop (Applied Biosciences).
 - Spectra Max M5 (Molecular Devices).
- Espectrofluorímetro JASCO FP6500.

- Dicrografo JASCO J-810.
- Sistemas automatizados de cromatografía líquida :
 - Elite LaChrom (HPLC) WWR Hitachi.
 - AKTA Purifier FPLC (Amersham Biosciences).
 - Ettan LC (Amersham Biosciences).
- Sonicador (Labsonic Braun).
- Calorímetro Isotérmico de titulación (Microcal LLC).
- Biacore T100 (GE-Healthcare).
- Otros aparatos como cubetas y fuentes de electroforesis, balanzas, incubadores, estufas, pHmetros..., habituales en un laboratorio de biología molecular.

9. Software y servidores informáticos.

9.1. Análisis matemático.

- Microsoft Excel: preparación de datos experimentales para su posterior análisis.
- GraphPad Prism 4.0: ajuste de datos experimentales a modelos teóricos preestablecidos y construcción de gráficas.

9.2. Análisis de secuencias de proteínas y ácidos nucleicos.

- “Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)” base de datos de secuencias de genes y proteínas y rutas metabólicas [47].
- Protparam computación de parámetros fisico-químicos a partir de secuencias de proteínas [33].
- BLAST alineamientos de secuencias de ácidos nucleicos [3].
- Clustal_W alineamiento local de secuencias de proteínas [53].

- Consurf alineamiento múltiple de secuencias de proteínas [6].
- BioEdit edición de secuencias de ácidos nucleicos y proteínas [41].
- NEBCutter generacion de patrones de restricción de secuencias de DNA [92].

9.3. Análisis de estructuras de proteínas y RNA.

- “Protein data bank” (PDB) base de datos de estructuras tridimensionales de proteínas y ácidos nucleicos [10].
- Chimera visualización, análisis, alineamiento y generación de imágenes de estructura de proteínas y volúmenes obtenidos por EM [73].
- “Adaptative Poisson-Boltzman Solver” (APBS) cálculo de potenciales electrostáticos de superficie de proteínas [8].
- Servidores DALI y PDBeFold para alineamiento múltiple de estructuras de proteínas [46, 51].
- Servidor elNemo para el análisis de modos normales [86].

9.4. Otros.

- “Modomics” base de datos de modificación de tRNA[22].
- Microsoft PowerPoint y Adobe Illustrator para composición de figuras

10. Técnicas microbiológicas.

10.1. Crecimiento de cepas bacterianas.

Las cepas de *E. coli* se crecieron a una temperatura de 37^oC, en presencia de antibiótico o no según convenga, usando el método descrito por Miller et al. 1992. El medio utilizado para ello fue LBT (extracto de levadura 5 g/L, bacto-triptona 10 g/L, 10 g/L de NaCl y 40 mg/ml de timina) para cultivo líquido o LAT (LBT+ agar 20 g/L) para cultivo en placa. El crecimiento en cultivo líquido es monitorizado por turbidometría midiendo la densidad óptica (DO) a 600 nm de longitud de onda.

10.2. Conservación de cepas bacterianas.

Las diferentes cepas bacterianas fueron conservadas, guardando una muestra de cultivo líquido en presencia de glicerol al 20 % rápidamente congelada en N₂ líquido y almacenada en un congelador a -80°C.

Generación de células bacterianas competentes para posterior transformación.

Las células son crecidas en LBT a 37°C y en agitación hasta una DO₆₀₀ de 0.6, se recoge el cultivo por centrifugación a 4°C a 4000 g. Manteniendo siempre las células en frío, se resuspende el pellet en CaCl₂ 0.1 M y se incuban en hielo durante 30 min. El CaCl₂ favorece la adhesión de las moléculas de DNA exógenas a la membrana celular ayudando además a la permeabilización de ésta. Tras la incubación se recogen las células por centrifugación en frío a 4000 g y se resuspenden en CaCl₂ 0.05 M y 20 % de glicerol para ser posteriormente congeladas y guardadas en congelador a -80°C.

10.3. Transformación de una cepa bacteriana.

La transformación bacteriana es un proceso, basado en la conjugación natural ocurrida entre bacterias, por el cual se introduce un DNA plasmídico en una célula bacteriana. El método consiste en poner un volumen de unos 100 µl de células competentes con 50-100 ng de DNA plasmídico. Se incuban durante 30 min en hielo y tras ese período se les aplica un choque térmico (90 s a 42°C y 120 s en hielo) lo que abre poros en la membrana plasmática de las células competentes permitiendo la entrada del DNA. A continuación se deja que las células se recuperen añadiendo medio LB (1ml) e incubándolas durante 90 min a 37°C en agitación. Tras la recuperación se siembran en placas con medio LAT selectivo y se dejan 20 h en una estufa a 37°C.

11. Técnicas de ácidos nucleicos.

11.1. Extracción de DNA genómico y plasmídico.

Mediante los kits comerciales “High Pure PCR Template” y “High Pure Plasmid Isolation” se extrajeron DNA genómico y DNA plasmídico de diferentes cepas bacterianas para su posterior uso. El protocolo del fabricante consiste

básicamente en resuspensión de cultivo, lisis celular, neutralización, recuperación de fracción soluble, adsorción del DNA a una columna de intercambio iónico y finalmente elución en tampón TE (Tris-EDTA).

11.2. Determinación de la pureza y tamaño de ácidos nucleicos.

Cuantificación de DNA: midiendo la A_{260} podemos calcular la concentración de DNA y conociendo la ratio A_{260}/A_{280} podemos hacernos una idea de su pureza. Usando el NanoDrop cuantificamos todas nuestras muestras de DNA asegurándonos que la ratio A_{260}/A_{280} sea mayor que 1.8. Para conocer el tamaño de una muestra con uno o varios fragmentos de DNA, se carga, en presencia de glicerol al 10 %, en un gel horizontal de agarosa de un porcentaje determinado en función de los tamaños esperados de los fragmentos de DNA a analizar. Los geles se someten a un voltaje constante de alrededor de 80 voltios el tiempo necesario para una separación óptima. Estos geles son previamente teñidos con “Gel Red” para su posterior revelado en un transiluminador UV.

11.3. Amplificación del gen *mnmG* a partir de DNA genómico extraído de *E.coli*.

Se diseñaron oligonucleótidos cebadores a partir de la secuencia genómica de *E.coli* (b3741 KEGG). Se realizó la siguiente mezcla para a reacción: dNTPs 2.5 μ M, $MgCl_2$ 1.5 μ M, oligonucleótidos cebadores a 3 μ M, 1 unidad de Taq DNA polimerasa y entre 20 y 100 ng de DNA genómico procedente de *E. coli*. Para la amplificación completa de este gen (1800 pb) se aplicó el siguiente protocolo en el termociclador:

- 1 ciclo de 3 min a 94^oC, apertura de las hebras de DNA
- 30 ciclos de :
 - 30 s a 94^oC.
 - 30 s a 63^oC temperatura de hibridación de los oligonucleótidos.
 - 5 min 72^oC tiempo y temperatura de extensión.
- 1 ciclo de 10 min a 72^oC.

11.4. Mutagénesis dirigida de MnmG.

Introducción de mutaciones específicas en las construcciones pBAD-FlagMnmG, pET15b-HisMnmG, pET15b-HisMnmG(1-550) y pET15b-HisMnmG(535-629). Se diseñan oligonucleótidos entre 30 pb y 40 pb con el cambio a introducir en el centro de la secuencia, lo que permitirá una correcta hibridación entre los oligonucleótidos y el DNA a mutagenizar a pesar del pequeño desapareamiento que se producirá en el centro. Ya que el proceso implica amplificar un DNA circular largo (plásmidos entre 4000 pb y 5000 pb) aumentaremos la concentración de dNTPs en la mezcla, el número de ciclos y el tiempo de extensión y usaremos la Taq DNA polimerasa Expand Long Template de alta robustez y fidelidad de copia. El protocolo aplicado en el termociclador fue el siguiente:

- 1 ciclo de 3min a 94°C
- 40 ciclos de:
 - 30s a 94°C.
 - 30s a 63°C.
 - 10min a 68°C (T óptima de la DNA polimerasa “Expand Long Template”)
- 1 ciclo de 10min a 68°C.

El producto amplificado es ahora digerido con la enzima de restricción *DpnI*. Esta enzima reconoce las hebras de DNA parentales a través de las secuencias GAmTC metiladas por la metilasa Dam en *E. coli*. Las hebras sintetizadas *de novo* no estarán metiladas y por tanto no serán digeridas por *DpnI*. El producto ya digerido es transformado en una cepa DH5 α que no tiene el sistema de restricción que degradaría el DNA no metilado exógeno.

Comprobación de la mutación introducida por análisis de restricción.

Habitualmente al introducir una mutación se produce un cambio en la secuencia diana de algún enzima de restricción. Para analizar esta posibilidad usamos el programa NEBCutter para identificar las secuencias diana que hayan podido cambiar así como los enzimas de restricción asociados. De esta manera comparando el patrón de restricción en un gel de agarosa podemos diferenciar los clones que han introducido la mutación de los que no lo han

hecho. El proceso consiste en extraer el plásmido a comprobar, amplificar una región alrededor de 500pb que incluya la zona supuestamente mutagenizada, digestión toda la noche con el enzima adecuado (según NEBCutter) y posteriormente comparar los patrones de restricción en un gel de agarosa. Por último se confirmará por secuenciación la presencia de la mutación y, además, que no se han introducido otras mutaciones no deseadas durante el proceso (Servicio de Secuenciación CIPF).

11.5. Clonación de *mnmG* y *MnmG*(535-629).

El producto amplificado de *mnmG* procedente del DNA genómico de *E. coli*, se reamplificó por PCR añadiendo colas con las secuencias diana de las enzimas de restricción *NdeI* y *XhoI* con los oligonucleótidos 5' *NdeI*-*mnmG*-CCGCATATGTTTTA TCCGGATCCTTTTGACGTC y 3' *XhoI*-*mnmG*-CCGCTCGAGTTATGCGCT ACGACGCAGCATAACCCTG. A continuación se digiere el fragmento y el plásmido cerrado pET15b con *NdeI* y *XhoI* lo que genera extremos cohesivos complementarios entre el amplificado *mnmG* y el vector pET15b. Tras la digestión se precipitan con 2.5 volúmenes de etanol absoluto y 0.1 volúmenes de acetato sódico 3 M. Finalmente se lleva a cabo una reacción de ligación con ligasa T4 y se deja reaccionar toda la noche a 16°C. La construcción será entonces comprobada por secuenciación. El mismo proceso se utilizó para clonar la región correspondiente a *MnmG*(535-629), pero partiendo de la construcción pET15b-*mnmG* (pIC1446) de donde fue amplificada usando los oligonucleótidos 5' *NdeI*-*C_{ARM}*-GCAGCCATATGACAGA CGAA-CAGGCGGCGGAACAG y 3' *XhoI*-*mnmG*-CCGCTCGAGTTATGC GCTACGACGCAGCATAACCCTG.

11.6. Clonación *tRNA^{Lys}* y *tRNA^{Cys}*.

Los genes correspondientes a los *tRNA^{Lys}* y *tRNA^{Cys}* fueron amplificados a partir de DNA genómico procedente de *E. coli* añadiendo colas con las secuencias diana de los enzimas de restricción *EcoRI* y *PstI* con los oligonucleótidos 5' *EcoRI*-*EcLys*-CCGGAATTCGGGTCGTTAGCTCAGTTGGTAGAG, 3' *PstI*-*EcLys*-TGCAC TGCAGTGGTG GGTCGTGCAGGATTCGA, 5' *EcoRI*-*EcCys*-CCGGA ATTCGGCGCGT TAACAAAGCGGTTATG y 3' *PstI* - *EcCys*-TGCA CTGCAGTGGAGGC GCGTTCCGGAGTCGAAC. Los fragmentos resultantes fueron insertados en el vector pBSK_{rna} [Ponchon2009] siguiendo

el procedimiento antes descrito pero usando los enzimas de restricción EcoRI y PstI.

11.7. Extracción de RNA total.

Se crecen 10 ml de un cultivo bacteriano hasta una DO_{600} 0.6 y se recogen las células. El pellet se resuspende en 0.6 ml de un tampón (25 mM Tris-HCl pH 7.4, 60 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$, 0.6 % Brij58, 0.2 % Na-deoxycholate, 0.02 % SDS) [26] y se añade 0.6 ml de fenol, se agita vigorosamente durante 1 min y se centrifuga a 16000G 5 min. Se recupera entonces la fase acuosa y se añade el mismo volumen de cloroformo. Se agita y centrifuga de la manera antes mencionada y se recupera la fase acuosa. En este momento si se quiere recuperar solo el RNA total se trata con DNasa I durante 45 min a 37°C y si no, se añade directamente 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío y se deja precipitando toda la noche a -20°C. A continuación se recuperan los ácidos nucleicos tras 30 min de centrifugación a 16000 g a 4°C y dos lavados con etanol 70 % frío. Finalmente el pellet se guarda seco a 80°C.

11.8. Purificación de tRNA total.

Un pellet de RNA total se resuspende en tampón R200 (100 mM Tris- H_3PO_4 , pH 6.3, 15 % Etanol, 200 mM KCl) y se añade a columnas Nucleobond (AX500) equilibradas con el mismo tampón. La columna se lava 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 consigue con 7 ml de tampón R650 y posteriormente, se precipita con 0.7 volúmenes de isopropanol frío mediante centrifugación a 4°C durante 45 min a 7000 rpm. Los precipitados se lavan dos veces con etanol 70 % frío y se secan para más tarde disolverlos en agua. Por último, se cuantifica en el espectrofotómetro Nanodrop y se alicuotan guardándose a -20°C.

11.9. Purificación de un tRNA específico.

Las construcciones pBSK-tRNA^{Lys} (pIC1618) y pBSK-tRNA^{Cys} (pIC1618) se transforman en una cepa DH5 α y se dejan crecer durante 16 h transcribiéndose el tRNA correspondiente gracias a la acción del promotor constitutivo (lpp). Se recogen las células y se lleva a cabo una extracción de tRNA total. Previa-

mente se ha unido oligonucleótido biotinilado, complementario a la región 3' del tRNA a purificar, a una columna de agarosa conjugada con streptavidina. Esta columna, entonces, es equilibrada con tampón BI (10mM Hepes-KOH pH 7.5, NaCl 400 mM, EDTA 5 mM) a través de un sistema con jeringuilla a la vez que se calienta en un baño a 72°C. A continuación, y manteniendo la columna a 72°C, se pasa la solución que contiene el tRNA total a un flujo de aproximadamente 1 ml por minuto y recuperándose en un tubo nuevo. Este proceso se repite hasta que la A₂₆₀ de la solución de tRNA total no varía, indicando que la columna ha llegado a su máxima capacidad de adsorción. La temperatura, en este caso a 72°C, es un factor crucial ya que permite la hibridación entre el tRNA y su oligonucleótido complementario conjugado con biotina. Por tanto esta temperatura puede variar en función de la longitud del oligonucleótido ya que variará su T_m. A continuación se deja enfriar hasta 42°C terminado así de hibridar el tRNA específico, la columna se lava dos veces con tampón BI (1:4) para eliminar tRNAs unidos a la columna inespecíficamente. Finalmente el tRNA específico adsorbido se eluye en tampón BI (1:20). Finalmente se añaden 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío y se deja precipitar toda la noche a -20°C. Al día siguiente se lava con etanol 70 % frío y se deja secar para guardarlo a -80°C o se resuspende en un tampón (Tris 50mM pH 7.5, 150 mM NaCl y 5mM MgCl₂) para comprobar su pureza en un gel 3 % agarosa.

11.10. Análisis del contenido en nucleósidos de una muestra de tRNA.

100 µg de tRNA total o 25 µg de un tRNA específico son digeridos con nucleasa P1 (16 h 37°C) y defosforilados con fosfatasa alcalina (2 h 37°C). A continuación se analiza por cromatografía líquida de alta presión en fase reversa (RP-HPLC)[34] con una columna Develosil C30 (2503 4.6 mm; Phenomenex Ltd.). Se mide la absorbancia a 314 nm para detectar nucleósidos con tiolación (xm⁵s²U) o a 254 nm para detectar nucleósidos no tiolados (xm⁵U).

12. Técnicas de proteínas.

12.1. Expresión y purificación de proteínas por afinidad en el sistema pET15b-6xHis-.

Las construcciones pET15b-HisMnmG, pET15b-HisMnmG(1-550), pET15b-HisMnmG-(535-629) y pET15b-HisMnmE(1-120) se transforman en una cepa BL21DE3 competente. Se inocula una colonia en medio líquido a 37°C y se deja crecer toda la noche. Al día siguiente se inocula 10 ml por litro de medio LBT y se deja crecer hasta una $DO_{600} = 0.6$. A continuación se induce la expresión de las proteínas con IPTG 0.1 mM y se incuba 20 h a 20°C en agitación 120rpm. Al día siguiente se recogen las células por centrifugación. El pellet se resuspende en un tampón 50 mM Tris-HCl pH=7.5 500 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM β-mercaptoetanol, 20 mM imidazol y 2 mM de PMSF y se lisan las células por sonicación. Separamos las fases soluble e insoluble por centrifugación a 4°C 40000 g durante 30 min. Se incubaba la fase soluble con resina de cobalto, 1 ml por cada 1 mg de proteína esperado, durante 45 min a 4°C y en agitación suave. Repartimos la fase soluble incubada con la resina en dos columnas con filtro donde se quedará retenida la resina de cobalto con las proteínas adsorbidas. Entonces cada columna se lava con 150ml de tampón 50mM Tris-HCl pH 7.5, NaCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM β-mercaptoetanol e imidazol a 20 mM. Seguidamente las proteínas se eluyen por competición con un tampón, similar al de lavado pero sin β-mercaptoetanol y con 250 mM de imidazol, que competirá con las histidinas de la etiqueta (6xHis) de la proteína a purificar, por la unión del cobalto liberando a la proteína de la resina. Finalmente las proteínas se concentran por filtración con Amicon Ultra y se analiza su pureza y tamaño por SDS-PAGE.

12.2. Expresión y purificación de proteínas por afinidad MnmG en el sistema pBAD-Flag-.

La construcción pBAD-FlagMnmG y todas sus variantes fueron usadas para los ensayos de modificación de tRNA *in vivo* por las características de su promotor. Por este motivo se usaron también para el análisis en paralelo de la protección inducida por FAD. Las construcciones fueron introducidas en una cepa portadora de una mutación nula en el gen *mnmG* cromosomal (IC5241,

mnmG::Tn10) para un posterior análisis de nucleósidos modificados en HPLC o para la purificación de la proteína. En este caso el cultivo se induce con arabinosa 0.2% y se incuba a 20 h a 20°C en agitación a 120 rpm. Se obtiene la fracción soluble de la manera antes descrita pero en un tampón 50mM Tris-HCl pH 7.5, 300 mM NaCl, 5 mM MgCl₂ y 2 mM PMSF. La fracción soluble se incuba esta vez con resina de agarosa conjugada con un anticuerpo AntiFlag en las condiciones descritas previamente. Se lava cada columna con 250 ml del tampón 50 mM Tris-HC pH 7.5, 300 mM NaCl y 5 mM MgCl₂ y se eluye en este mismo tampón pero con una concentración de péptido Flag (DYKDDDDK) de 0.1 mg/ml. Finalmente se concentran la proteínas por filtración en Amicon Ultra y se analiza su pureza y tamaño por SDS-PAGE.

12.3. Expresión y purificación de la proteína MnmE por afinidad en el sistema pGEX4T.

El sistema pGEX permite la purificación de proteínas fusionadas a GST (Glutation-S-transferasa) mediante cromatografía de afinidad con una resina de agarosa conjugada con glutation a la cual se adsorberá la proteína GST-MnmE pudiendo eluir MnmE con una digestión con trombina, debido a la existencia de una diana de corte para la proteasa. La construcción pGEXGST-MnmE fue entonces introducida en una cepa DH5 α y crecida en medio LBT de la manera ya descrita. La expresión de la proteína se induce con IPTG 0.5 mM durante 6 h a 30°C. El pellet se resuspende en tampón PBS con 2.5 mM EDTA y 2 mM PMSF para inhibir metaloproteasas y Ser/Thr-proteasas respectivamente. La fracción soluble obtenida se incuba con resina agarosa conjugada con glutation 60 min a 4°C en agitación suave. Se reparte la mezcla en columnas y se lava cada una con 150 ml de PBS. A continuación se incuba la resina con GST-MnmE adsorbida con 1 ml de PBS con 4 unidades de trombina 1 h a temperatura ambiente y 16 h a 4°C en agitación suave. Al día siguiente se eluye MnmG con 10 ml de PBS por cada columna. Finalmente se concentra como siempre por filtración con Amicon Ultra y se analiza su pureza y tamaño por SDS-PAGE.

12.4. Cuantificación de proteínas y detección de la presencia de FAD por espectrofotometría.

Gracias a la capacidad de absorber luz ultravioleta (UV) de los residuos aromáticos (Trp, Tyr y Phe) de una proteína, podemos cuantificar su concentración midiendo la A₂₈₀. La ley de Lambert-Beer relaciona la absorbancia de una molécula dada con su concentración a través de la ecuación:

- $A = \epsilon C l$

Ecuación donde A es la absorbancia a una longitud de onda dada, ϵ es el coeficiente de extinción molar para la longitud de onda dada, l es el paso de luz y C la concentración de la muestra. Podemos calcular el coeficiente de extinción molar (ϵ) teórico de una proteína, a partir de su secuencia de aminoácidos usando ProtParam [gasteiger2005protein]. Los ϵ_{280} utilizados fueron:

- MnmG $\epsilon_{280} = 47.3 \text{ mM cm}^{-1}$, MnmG(1-550) $\epsilon_{280} = 38.8 \text{ mM cm}^{-1}$ y MnmG(535-629) $\epsilon_{280} = 9.9 \text{ mM cm}^{-1}$
- MnmE $\epsilon_{280} = 26.9 \text{ mM cm}^{-1}$, MnmE(1-120) $\epsilon_{280} = 8.5 \text{ mM cm}^{-1}$, MnmE(220-385) $\epsilon_{280} = 11.0 \text{ mM cm}^{-1}$, MnmE(102-454) $\epsilon_{280} = 18.0 \text{ mM cm}^{-1}$ y MnmE(1-390) $\epsilon_{280} = 20.9 \text{ mM cm}^{-1}$

Cuantificamos las proteínas, entonces, midiendo su A₂₈₀ en los espectrofotómetros NanoDrop o Cary UV. Dado que MnmG es un flavoenzima que copurifica con FAD, podemos detectar su presencia midiendo la absorbancia en el visible. El FAD es una molécula ópticamente activa con un característico espectro de absorción en el visible cuyos máximos de absorbancia se dan a 370 nm y 450 nm de longitud de onda (λ). Por tanto midiendo el espectro de absorción UV/visible de una solución de MnmG, podemos determinar si lleva la flavina unida e incluso determinar su concentración (FAD $\epsilon_{450} = 11.3 \text{ mM cm}^{-1}$).

12.5. Análisis de la pureza y tamaño de proteínas por SDS-PAGE.

Usando geles de poliacrilamida en presencia de SDS se separa y analiza el tamaño (comparando con un marcador de tamaños) de las proteínas presentes en una muestra. Las muestras se calientan a 95°C durante 5 min en un tampón de carga (50 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 10% glicerol, 1%

β -mercaptoetanol, 12.5 mM EDTA y 0.02% de azul de bromofenol). Las proteínas se desnaturalizan térmicamente a 95°C durante 5 min. El SDS se unirá a las proteínas manteniéndolas desnaturalizadas y aportando una carga negativa uniforme. A continuación las proteínas se analizan en un gel de poliacrilamida discontinuo siguiendo el protocolo de Laemmli[52] y se les aplica un amperaje constante de 25 mA. Gracias al SDS las proteínas migran hacia el ánodo y solo en función de su tamaño. Los geles posteriormente se tiñen con azul de Coomassie para revelar la presencia de proteínas en los geles.

12.6. Análisis de la conformación nativa y el estado de oligomerización de una proteína.

- **Electroforesis Roja Nativa [20].** Es una variación de los geles Azul Nativo desarrollados en un principio para la solubilización y separación de complejos mitocondriales en sus formas nativas y enzimáticamente activas [78]. Ambos métodos se basan en el uso de un colorante aniónico capaz de unirse a las proteínas confiriéndoles una carga negativa uniforme y ayudando a su solubilización. El azul de Coomassie, usado en los geles Azul Nativo, se une con mucha más fuerza que el rojo Ponceau S utilizado en la electroforesis Roja Nativa. Por lo tanto, es más sencillo eliminar el Rojo Ponceau S de las proteínas sin afectar a su conformación nativa. Las proteínas migrarán, entonces, solo en función de su masa y forma debido la cantidad de carga negativa aportada por los colorantes. Nos decantamos por el uso de rojo Ponceau S dado que vamos a usar este método para la separación de proteínas ya purificadas y por tanto solubilizadas (**figura 12**). Como resultado de este procedimiento obtuvimos una separación resolutive de las proteínas sin signos visibles de agregación y con bandas muy discretas.

- **Análisis del estado de oligomerización de MnmG :**

- Tanpón cátodo: 50 mM Tricina, 15 mM BisTris-HCl y 0.012% rojo Ponceau S, pH 7.0
- Tampón ánodo: 50 mM Bis/Tris-HCl, pH 7.0
- Tampón de carga: 50 mM Bis/Tris-HCl, 100 mM NaCl, 15% glicerol y 0.02% rojo Ponceau S, pH 7.0
- Gel en gradiente 3-12%Bis/Tris Novex Native PAGE

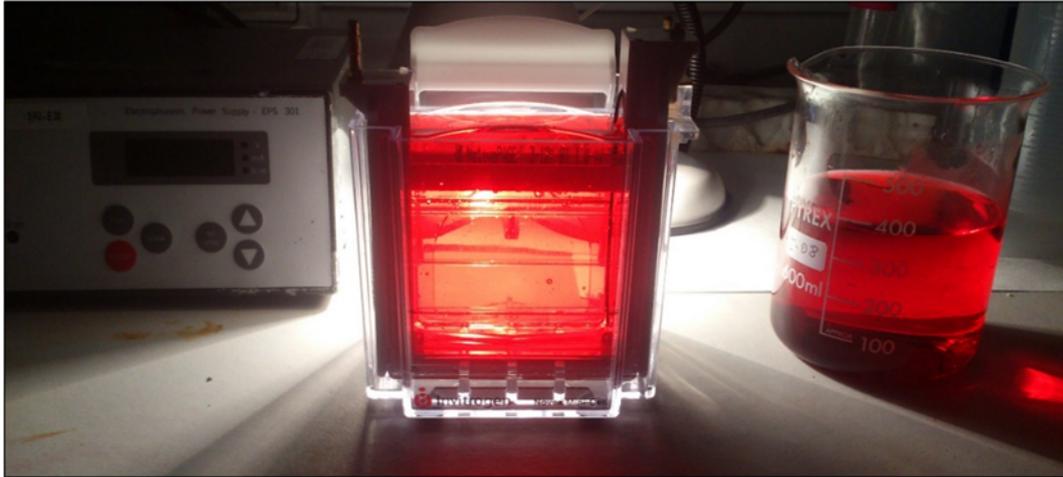


Figura 12: Imagen de una electroforesis Roja Nativa (NRE). Gel de poli-acrilamida continuo en presencia de rojo Ponceau.

- Condiciones de carrera: Amperaje constante 15 mA entre 90 min y 150 min a 4°C.
- **Comparación de las formas diméricas de MnmG :**
 - Tampón cátodo: 50 mM Tris-HCl, 190 mM Glicina y 0.012 % rojo Ponceau S, pH 8.3.
 - Tampón ánodo: 50 mM Tris-HCl y 190 mM Glicina, pH 8.8.
 - Tampón de carga: 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 15 % glicerol y 0.02 % de rojo Ponceau S, pH 7.5.
 - Tampón del gel: 8 % acrilamida/bisacrilamida (ratio 40:1), 50 mM Tris-HCl y 10 % glicerol. Polimerizado con pesulfato amónico (APS) y TEMED.
 - Condiciones de carrera: Amperaje constante 25mA entre 150 min y 240 min a 4°C.
- **Filtración en gel:** Se analizó el estado de oligomerización de MnmG por cromatografía de exclusión molecular (SEC) en FPLC permitiéndonos fraccionar la proteína en sus diferentes estados de oligomerización. Para ello se cargó una solución 8 mg/ml de MnmG, purificada por afinidad y tratada con 50 mM de DTT, en una columna Superdex 200 HR 10/30 o Superdex 200 5/150 GL con una fase móvil 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 250 mM NaCl y 5 mM MgCl₂ a un flujo de 0.8 ml/min.

13. Técnicas de interacción (1)

Proteína-ligando.

13.1. Dicroísmo circular.

Para analizar si la unión de FAD afectaba a la estructura de MnmG decidimos comparar los espectros de dicroísmo circular en el UV/lejano de MnmG en presencia y ausencia de FAD. Para ello, dializamos la proteína MnmG con membranas SpectraPor 50 kDa en un tampón 50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 5 mM MgCl₂ hasta asegurarnos que se ha liberado el FAD midiendo su espectro de absorción en el rango visible. A continuación comparamos los espectros de dicroísmo de una solución 1.5 μM de MnmG en ausencia o presencia de FAD 0.5 μM (concentración a la que el FAD no produce ninguna banda de absorción en el espectro de dicroísmo UV/lejano). El tampón utilizado fue 25 mM Tris-HCl pH 7.5 y 150 mM NaCl previamente filtrado y cubetas (Hellma) de 0.2 cm de paso de luz!. Los espectros resultantes proceden de la sustracción de los espectros del tampón y FAD libre.

13.2. Proteólisis limitada.

La proteólisis limitada puede ayudarnos a analizar la unión de un ligando a su proteína siempre y cuando el ligando induzca un cambio conformacional en la proteína. Este cambio de conformación en la proteína de interés, puede producir una alteración en el patrón o proporción de fragmentos que genera en ella la digestión limitada con una proteasa de amplio espectro. Nosotros utilizamos este método para detectar la unión de FAD a MnmG así como el cambio conformacional inducido por éste y además para identificar residuos de MnmG implicados en los mismos. Para ello se incuban las proteínas, previamente dializadas, a una concentración de 10 μM, con FAD a las concentraciones indicadas en las **figuras 19 y 23** durante 16 h a 4°C. Al día siguiente la proteína se digiere con tripsina en una relación m/m 1:300 durante 10 min a 30°C. Las reacciones se detienen con 2 mM PMSF y calientan a 95°C durante 10 min en presencia de SDS. Las muestras finalmente se cargan en geles SDS-PAGE al 12% y se analiza su patrón de digestión tras la tinción con azul de Coomassie.

13.3. Calorimetría isotérmica de titulación (ITC).

La transferencia de calor es un fenómeno universal en los procesos de unión entre moléculas. La calorimetría isotérmica de titulación (ITC) nos permite medir directamente este calor y obtener los parámetros de unión del proceso en cuestión. A partir de los cálculos de entalpía (H) y entropía (S) podemos obtener la energía libre de Gibbs (G) y finalmente la constante de equilibrio en sentido de disociación K_D como medida de la afinidad entre las moléculas estudiadas.

$$\blacksquare \Delta H - T\Delta S = \Delta G_0 = RT \ln K_A \rightarrow K_A = 1/K_D$$

El instrumento de ITC (**figura 13A**) es un calorímetro de flujo de calor que mide los incrementos de potencia necesarios para mantener constante la temperatura entre la celda de la muestra y una celda de referencia. Sobre la celda de la muestra con la molécula A, el inyector del aparato va titulando a intervalos de tiempo, preestablecidos empíricamente, una solución de la molécula B desencadenándose la reacción de unión y formándose paulatinamente complejo AB. La formación de complejo irá acompañada por a liberación (exotérmica) o absorción (endotérmica) de calor provocando la variación de la temperatura (T) entre la celda de la muestra y la de referencia. Si se trata de una interacción biológica en la que finalmente hay una saturación observaremos que la variación de temperatura se hará constante en el tiempo (**figura 13B**). Para determinar la afinidad de MnmG o sus variantes por FAD, una solución de 2 ml a 20 μM de proteína MnmG dializada fueron titulados con una solución de FAD a 225 μM en un tampón 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl_2 y 5 mM DTT previamente filtrado y degasificado.

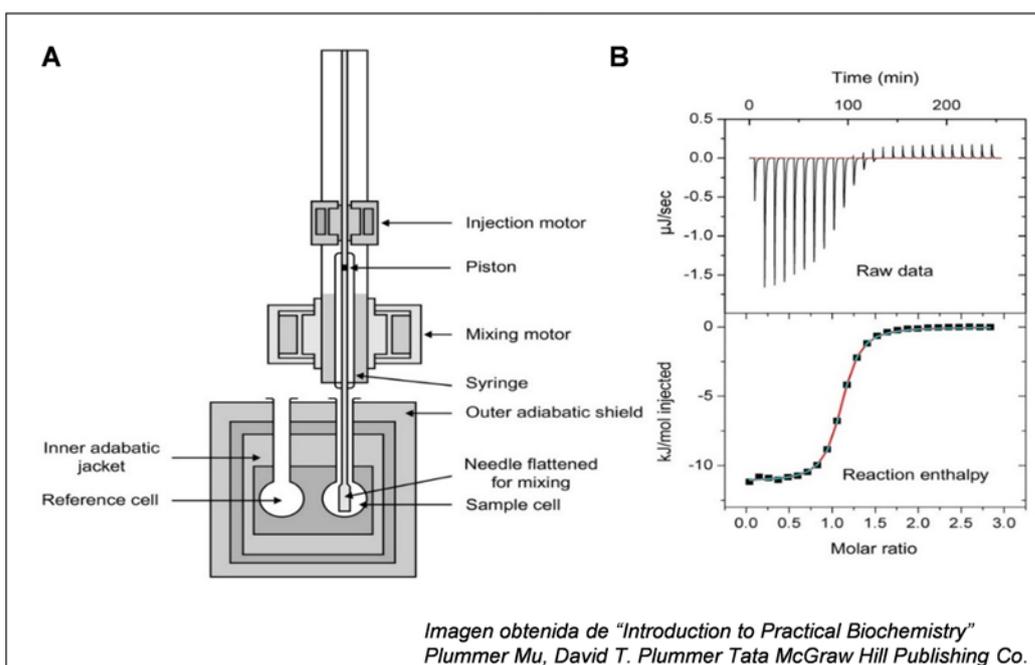


Figura 13: Representación de un experimento de ITC. A) Representación esquemática de un microcalorímetro de titulación isotérmico. **B)** Monitorización del calor (Q) emitido (picos hacia abajo) o absorbido (picos hacia arriba) de un experimento tipo de calorimetría (arriba). Representación del calor en función de la concentración de ligando añadida (abajo).

14. Técnicas de interacción (2):

Proteína-proteína.

14.1. Resonancia de superficie de plasmón

- **Plasma:** Estado fluido de agregación de la materia similar al estado gaseoso en el que una proporción de sus partículas están cargadas eléctricamente y no poseen equilibrio electromagnético, lo que les hace buenos conductores eléctricos y sus partículas responden fuertemente a las interacciones electromagnéticas de largo alcance. El plasma se puede considerar como un estado de la materia en el que se permite el movimiento colectivo de una gran cantidad de cargas eléctricas.
- **Plasmón:** cuanto de energía asociado con ondas propagándose en la materia a través del movimiento colectivo de un gran número de electrones. Actualmente, el nombre de plasmón también refleja el concepto de metal como un plasma de alta densidad con un enorme número de electrones.

La **Resonancia de Plasmón Superficial (SPR)** es un fenómeno óptico que ocurre en películas delgadas colocadas en la interfaz entre dos materiales de índice de refracción diferentes. La tecnología Biacore basada en SPR permite la detección de cambios en el índice de refracción de un haz de luz polarizado incidente en una superficie de oro de un grosor de 50 nm situada entre una capa de vidrio y una solución fluyendo a través de un cartucho microfluídico. Un sensor monitoriza la intensidad de la luz reflejada en la superficie. Bajo estas condiciones la luz genera una componente electromagnética, llamada onda evanescente, en toda de la interfaz de oro y dentro de la solución tampón/muestra. A un determinado ángulo de luz incidente, el campo de la onda evanescente excita electrones en la capa de oro resultando en la formación de plasmones de superficie con un consecuente descenso en la intensidad y ángulo de la luz reflejada (**figura 14**). La unión de cualquier molécula a la superficie del chip producirá un aumento de masa que resultará en una alteración en el índice de refracción, induciendo un cambio en el ángulo e intensidad de la luz incidente y por tanto también en la luz reflejada; cambio que será monitorizado por el detector. Estos cambios en la intensidad y el ángulo de la luz, son los que se reflejan en un sensorgrama en unidades de resonancia RU. Una RU corresponde con un cambio de ángulo de 0.0001° . Esta tecnología nos permite entonces

analizar la interacción entre dos moléculas al medir el cambio en el índice de refracción que produciría el aumento de masa debido a la formación de un complejo dado. Biacore nos ofrece una amplia variedad de chips con diferentes características según la naturaleza del ensayo a realizar. Nuestro objetivo era medir la afinidad de la interacción entre diferentes proteínas MnmG y MnmE por tanto nos decidimos por un chip CM5 cuya superficie contiene colas carboximetilo que permitirán fijar covalentemente proteínas a la superficie del chip una vez activada. Existen diferentes métodos para medir la interacción entre proteínas, nosotros nos decantamos por el denominado método de Captura (**figura 14**). Este método consiste en la inmovilización covalente de un anticuerpo a la superficie del chip (antiHis o antiFlag en nuestro caso), midiendo posteriormente la interacción entre una proteína etiquetada con Flag ó 6xHis y otra que no lo está. En primer lugar se inmoviliza el anticuerpo usando las soluciones proporcionadas por el comerciante y el método Etanolamina llegando al máximo de RUs posible. Una vez inmovilizado este chip pasamos una solución entre 0.5 μM y 2 μM de la proteína A etiquetada a un flujo constante (10-30 $\mu\text{l}/\text{min}$) durante un tiempo, previamente determinado empíricamente, para obtener una señal entre 1000 RU y 2000 RU. A continuación se pasa una solución también a flujo constante (10-30 $\mu\text{l}/\text{min}$) y por un tiempo determinado de la proteína B cuya interacción con la proteína A se quiera analizar. Finalmente regeneramos el chip con una solución de hidróxido de sodio (NaOH) a 7.5 mM, liberándose tanto la proteína A como la B. Este ciclo se repite varias veces con concentraciones crecientes entre 0.5 μM y 100 μM , según el orden de magnitud de la afinidad esperada, de la proteína B. La señal máxima de RU para cada concentración de proteína B añadida es lo que utilizaremos para generar la curva de saturación de donde obtendremos las K_D usando el software proporcionado por el fabricante.

14.2. Calorimetría isotérmica de titulación.

También usamos esta técnica para la interacción entre proteínas MnmG y MnmE. Las condiciones fueron similares que en el ensayo de unión de ligando.

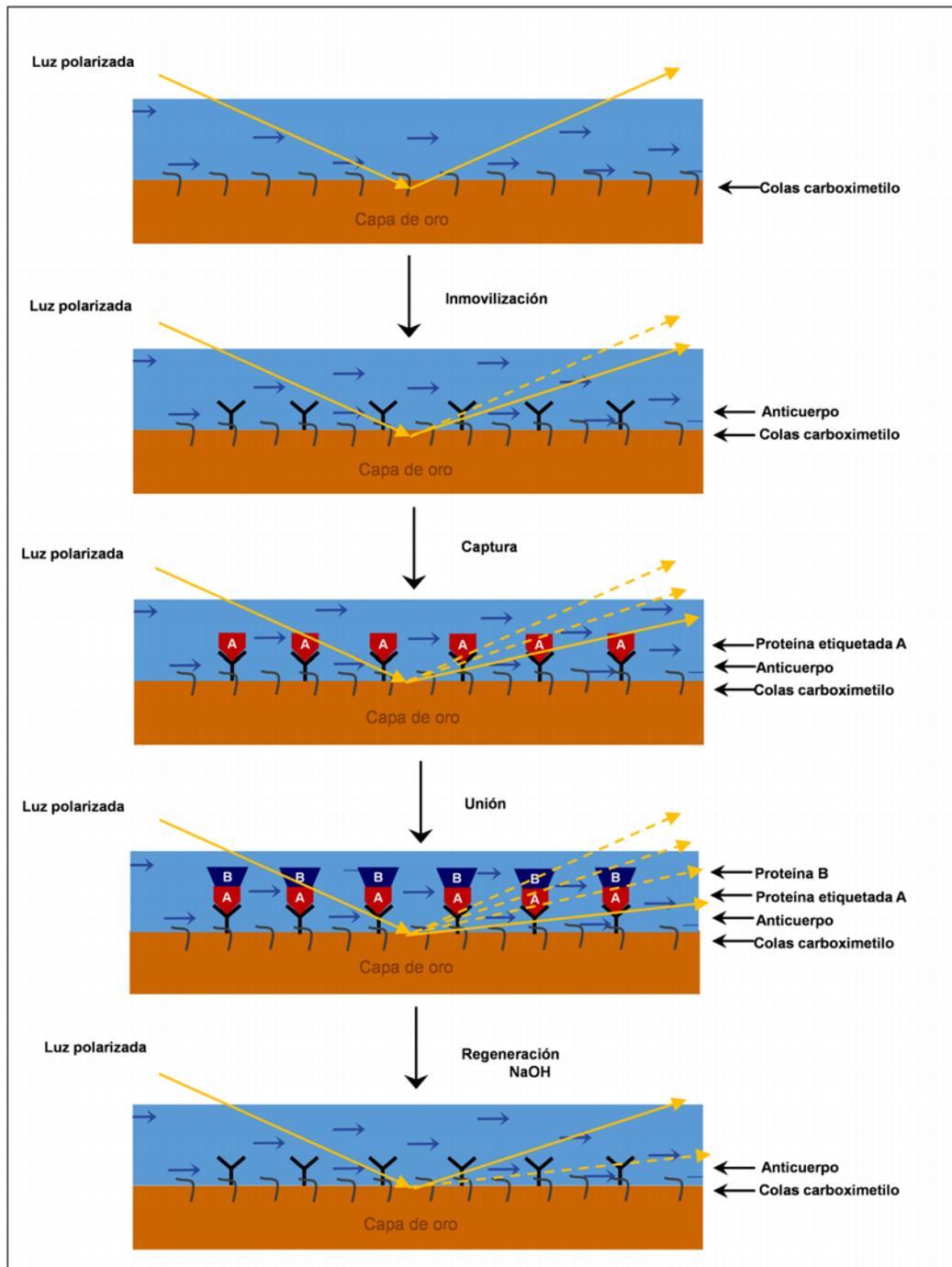


Figura 14: Representación esquemática del protocolo de Captura en Biacore para el análisis de interacciones proteína-proteína. Análisis de la interacción entre la proteína A y la proteína B usando un anticuerpo antiA en SPR. La flechas azules representan el flujo de la solución que pasa por el chip, las flechas amarillas representan el haz de luz incidente o reflejado en el paso actual (continua) o en pasos anteriores (discontinua).

15. Técnicas de interacción (3):

Proteína-ácido nucleico.

15.1. Fluorescencia intrínseca de proteínas.

Para medir la afinidad entre tRNA y diferentes constructos de MnmG y MnmE decidimos usar la señal producida por la emisión fluorescente de sus triptófanos. Para ello hicimos una titulación de una solución a 20 μM de un tRNA purificado sobre una solución de proteína a 1 μM . Usando el fluorímetro Jasco medimos los espectros de emisión de la proteína entre 300 y 400 nm de longitud de onda excitando a 295 nm. Un descenso en la fluorescencia de la proteína alrededor de 340 nm fue observado a medida que aumentaba la concentración de tRNA titulado. Debido a la significativa absorbancia del tRNA correcciones por filtro interno y externo tuvieron que ser realizadas utilizando la siguiente ecuación:

$$\blacksquare F_{\text{corr}} = F_{\text{obs}} 10^{(A_{\text{ex}} + A_{\text{em}})/2} [14]$$

Ecuación donde F_{obs} es la intensidad fluorescente observada, F_{corr} la intensidad fluorescente corregida, A_{ex} y A_{em} la absorbancia del RNA de una concentración dada a las longitudes de onda de excitación (ex) y de emisión (em) respectivamente. Una vez realizadas las correcciones mencionadas y sustraída la señal fluorescente correspondiente al tampón, la intensidad de fluorescencia F_{corr} fue transformada en el factor de amortiguamiento de fluorescencia Q (quenching) de la siguiente manera:

$$\blacksquare Q = (F_0 - F_{\text{corr}})/F_{\text{corr}} [59]$$

F_0 corresponde a la intensidad fluorescente de la proteína en ausencia de tRNA. Finalmente representamos el factor Q frente a la concentración de tRNA para obtener una curva de saturación de donde obtenemos las K_D ajustando la curva obtenida al modelo de “one site binding” en el programa de análisis GraphPad Prism.

Ensayo de desplazamiento de movilidad electroforética o geles de retardo (EMSA).

Para analizar la interacción entre tRNA o rRNA con MnmG usamos EMSA. Esta técnica nos permite detectar interacciones entre ácidos nucleicos y

proteínas así como comparar los complejos proteína-ácido nucleico formados. El método consiste en comparar la migración, en un gel de agarosa o poliacrilamida, de un ácido nucleico libre en presencia o no de la proteína con la cual se quiere comprobar su interacción. Si se forma un complejo deberemos observar un retraso en la migración proporcional a la concentración de proteína añadida, debido al aumento de masa y a la compensación de carga negativa, del ácido nucleico, que conlleva la formación de un complejo ácido nucleico-proteína[44]. Para llevar a cabo el experimento de EMSA, primero incubamos tRNA o rRNA total, según el ensayo, con concentraciones crecientes de MnmG en un tampón 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 20 % glicerol y 5 mM DTT durante 25 min a T ambiente y se introducen en hielo durante un mínimo de 5 min. Posteriormente se cargan en un gel de agarosa (porcentajes indicados en Resultados) previamente teñido con “Gel Red” y se aplica una intensidad de corriente constante de 40 mA entre 75 min y 240 min, según el ensayo, a 4°C. El gel de agarosa se revela posteriormente en un transiluminador UV detectando la posición en el gel de los RNAs y finalmente se tiñen con azul de Coomassie que indicará la posición de las proteínas en el gel.

16. Análisis de las formas diméricas de MnmG por Microscopía Electrónica (EM).

El análisis estructural de MnmG fue llevado a cabo mediante el empleo de microscopía electrónica (EM) por tinción negativa en colaboración con el laboratorio de Estructura de Macromoléculas en el Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC).

- **Preparación de la muestra por tinción negativa.** Se realizó la adsorción de alícuotas de 4 a 7 µl de MnmG de la fracción dimérica de MnmG, en un tampón 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 500 mM NaCl y 5 mM MgCl₂ sobre las rejillas de Cu/Rh de 400 “mesh”, cubiertas de una fina capa de carbón depositada por evaporación (**figura 15A**). Estas rejillas se sometieron previamente a una descarga iónica durante 15 segundos para hacer hidrófila su superficie, lo que favorece la adsorción de la muestra. Tras un periodo de adsorción de 2 minutos a temperatura ambiente, se eliminó el exceso de muestra y se tiñó con una solución de acetato de

uranilo al 2% p/v. A continuación, se retiró el exceso de tinción y la rejilla se dejó secar (**figura 15B**).

- **Obtención de imágenes.** La obtención de las micrografías se llevó a cabo en el microscopio FEI Tecnai G2 F20 operando a 200 kV. Las imágenes fueron tomadas bajo condiciones de mínima dosis, a 0° de inclinación utilizando una cámara CCD FEI Eagle 4K. La magnificación nominal fue de $\times 66.950$ y el rango de desenfoque fue entre 1-2 μm . La obtención de las micrografías se llevó a cabo en el microscopio FEI Tecnai G2 F20 operando a 200 kV.
- **Procesamiento de imagen.** Se procedió a la corrección de la función de contraste de transferencia (CTF) y al submuestreo de las mismas usando el protocolo implementado en el paquete XMIPP, obteniendo un paso de muestreo final de 4.24 $\text{\AA}/\text{pixel}$. Se seleccionaron manualmente 3054 partículas de 127 micrografías. Las imágenes de tamaño 80 x 80 píxeles fueron alineadas, clasificadas y promediadas por métodos de máxima verosimilitud implementado en el paquete XMIPP[79]. De esta manera, se obtienen imágenes medias donde existe una mayor relación señal/ruido respecto a las imágenes individuales y nos permite visualizar mejor los detalles estructurales de interés. Con este procedimiento anteriormente mencionado se obtuvieron 14 clases medias que fueron empleadas para la realización del modelo inicial mediante el protocolo de líneas comunes implementado en el paquete EMAN 1.9 [55]. Posteriormente, se realizó un refinamiento angular utilizando de nuevo el paquete EMAN 1.9. Este volumen fue filtrado a 90 \AA para ser utilizado como modelo de clasificación tridimensional usando los protocolos de máxima verosimilitud (ML3D) implementados en el paquete de XMIPP. En esta clasificación se obtuvieron 2 volúmenes que mostraron la existencia de dos conformaciones, a las que se asignaron 1639 imágenes (volumen 1) y 1400 imágenes (volumen 2). Posteriormente se ajustaron las estructuras cristalinas de MnmG sobre los mapas tridimensionales obtenidos generándose información biológica relevante. Tanto los ajustes como las imágenes resultantes se generaron con UCSF Chimera [73].

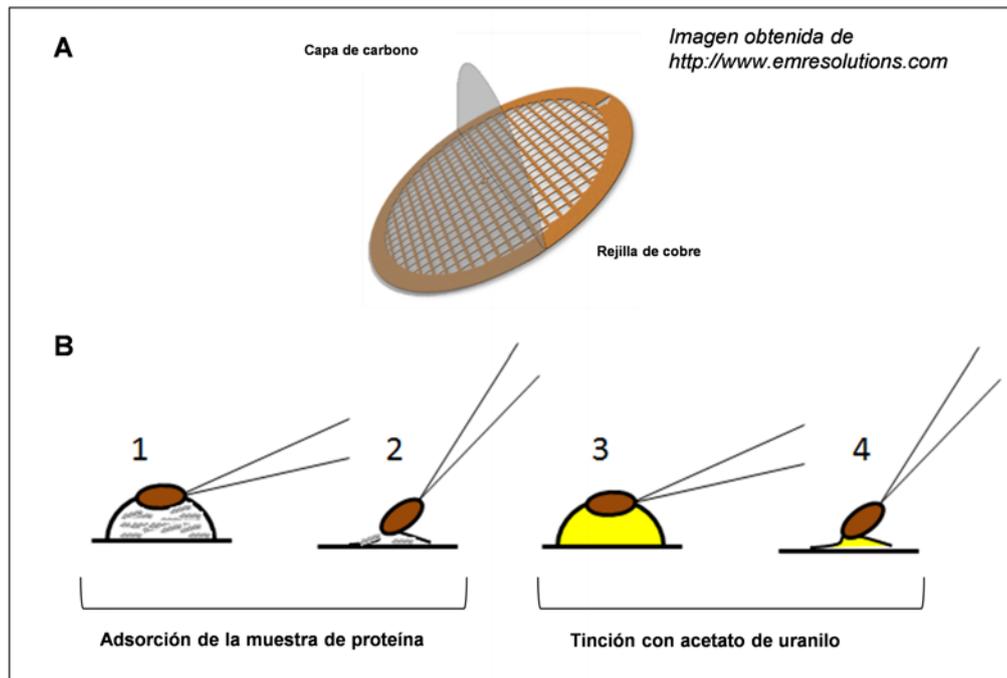


Figura 15: Preparación de muestras para microscopía electrónica convencional por tinción negativa. **A)** La muestra se introduce en el microscopio electrónico adherida a un soporte denominado rejilla, que es un círculo metálico enrejado de 3.3 mm de diámetro sobre el que se deposita por evaporación una capa de carbón, que sirve de soporte a la muestra. **B)** Preparación de muestras mediante tinción negativa (1-4) (1) La rejilla se deposita sobre una gota de muestra y se incuba durante 2 minutos. (2) Se elimina el exceso de muestra con un papel de filtro. (3) Se deposita sobre una gota de sal de metal pesado en este caso acetato de uranilo durante 1-2 minutos (4) La rejilla se seca en un papel de filtro

Parte IV

RESULTADOS Y DESARROLLO ARGUMENTAL

PARTE 1

17. Análisis estructural de un protómero de MnmG.

“Todas las conformaciones de una proteína pre-existen, y el ligando selecciona la conformación más favorable”. Teoría de la Selección Conformacional; Boehr, Nussinov and Wright, 2009

17.1. Clonación, expresión y purificación de MnmG.

Con el objetivo de obtener la proteína MnmG en cantidades y pureza aceptables para realizar posteriores experimentos *in vivo*, decidimos clonar el gen bacteriano *gidA* (*mnmG*) en el vector de expresión pET15b (Invitrogen), bajo control del fuerte promotor del fago T7 y fusionado en pauta con una secuencia codificadora de histidinas lo que nos permitió purificar el producto soluble (proteína HisMnmG) por cromatografía de afinidad. Al concentrar la proteína se pudo observar que presenta el característico color amarillo de flavoenzimas cuya flavina está oxidada; de hecho, al analizar el espectro de absorción UV/visible, se encontraron dos picos de absorción en el visible cuyos máximos rondan alrededor de 375 nm y 450 nm, lo que coincide con el típico espectro de absorción de una flavina oxidada (**figura 16A**). El análisis mediante SDS-PAGE de la proteína purificada reveló una banda cuya migración corresponde a un tamaño de alrededor de 70 kDa (**figura 16A**, inserto), lo que está de acuerdo con el tamaño teórico esperado para el producto del gen *mnmG*.

Por otro lado, quisimos confirmar el estado oligomérico de HisMnmG mediante filtración en gel. En el cromatograma obtenido (**figura 16B**) se observa un pico que eluye prácticamente en el volumen de vacío de la columna (A), correspondiente a tamaños mayores de 600 kDa, que asociamos inicialmente con precipitación de proteína, y otros dos picos con volúmenes de elución correspondientes a unos tamaños de 300 kDa (B) y 150 kDa (C). Considerando que la masa (MW) de un monómero de MnmG es de 70 kDa, asociamos el pico mayoritario (C) con la forma dimérica de MnmG y el pico B con una forma tetramérica minoritaria. Para confirmar la presencia de MnmG en las fracciones correspondientes a los picos A, B y C, analizamos una muestra de cada fracción, desnaturalizada a 95°C, en un gel 10 % SDS-PAGE en presencia

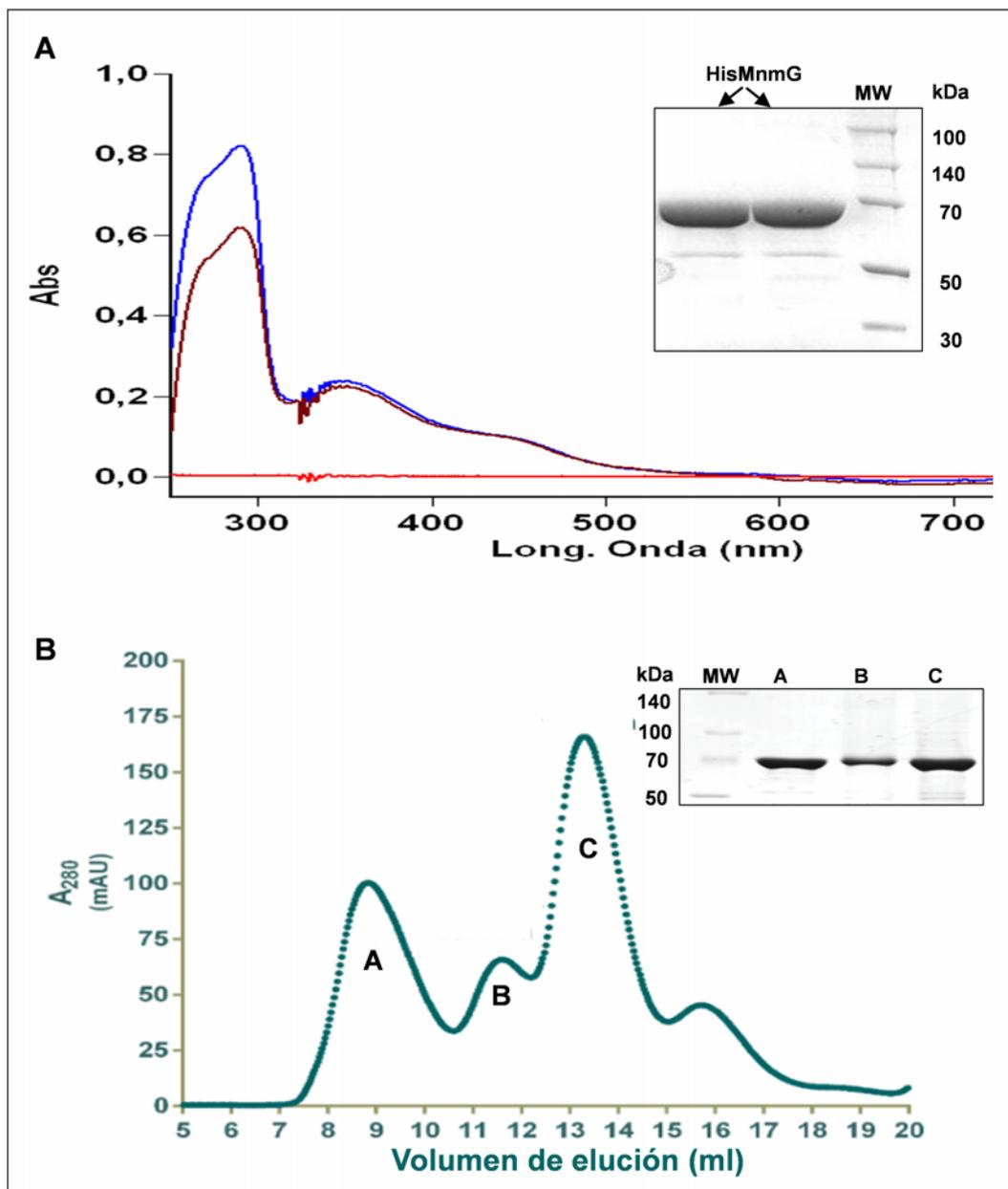


Figura 16: MnmG es un flavoenzima cuyo estado oligomérico es principalmente dimérico. A) Espectro de absorción en UV/visible de dos muestras purificadas de HisMnmG posteriormente analizadas en gel desnaturizante SDS-PAGE (inserto) B) Filtración en gel de HisMnmG en el que se observan tres picos de diferente volumen de elución correspondiendo a los estados dimérico (C), tetramérico (B) y agregados supramoleculares mayores de 600 kDa de MnmG. La imagen insertada corresponde a un análisis por SDS-PAGE de las fracciones A, B y C procedentes de la filtración en gel de MnmG.

de SDS y β -mercaptoetanol (**figure 16B**, inserto), observándose en todos los casos una banda correspondiente al tamaño monomérico de MnmG (70 kDa).

17.2. Estructura monomérica de MnmG.

El grupo del Dr. M. Cygler del Dpto. de Bioquímica de la Universidad de McGill en Montreal resolvió la estructura cristalina de MnmG de *E. coli* y a partir de sus datos cristalográficos llevamos a cabo un análisis de las relaciones estructura-función de MnmG [82] que se describirá posteriormente. A continuación, se describe la estructura que reveló este trabajo colaborativo coincidente con las obtenidas por otros grupos y con proteínas MnmG de otros organismos [68, 60].

Para obtener los cristales de la proteína MnmG de *E. coli*, el grupo del Dr. Cygler utilizó una solución de HisMnmG en un tampón Tris-HCl 20 mM (pH 8.0), 800 mM NaCl 5% glicerol y 5 mM de ditioneitol (DTT) y el método de la gota colgante en una solución reservorio de 100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM de formato sódico, 6,5% (peso/volumen) polietilenglicol (PEG8000) y 6% (vol/vol) de etilenglicol. La estructura de MnmG de *E. coli* fue resuelta a 2.4 Å de resolución usando el método de difracción anómala simple con el programa SHARP/AUTOSHARP. El cristal reveló que MnmG está compuesta por tres dominios bien estructurados (**figura 17**) que a su vez podemos agrupar en dos regiones estructuralmente diferenciadas (**figura 17 y 18**):

- **Núcleo catalítico:** compuesto por los dominios FAD e inserción, bien empaquetados y delimitando un profundo surco donde quedaría alojado el FAD (**figuras 17 y 18A**):
 - **El dominio FAD** (residuos del 1-201 y del 342-454), formado por tres grupos de hojas β con diferentes α hélices insertadas; el más grande está compuesto por 5 hojas β paralelas que forman el clásico plegamiento de Rossmann, incluyendo el motivo conservado de la secuencia de unión a dinucleótido G13XG15H16A17G18 (**figura 17 y 18A**). Este dominio FAD, con el plegamiento de Rossmann, es típico de la familia de la glutatión reductasa (GR). Esta familia según la clasificación de Dym y Eisenberg 2009 [23], se subdivide en GR1 y GR2. Las estructuras de los dominios FAD de los miembros de la subfamilia GR1 alinean completamente; en cambio, las de los

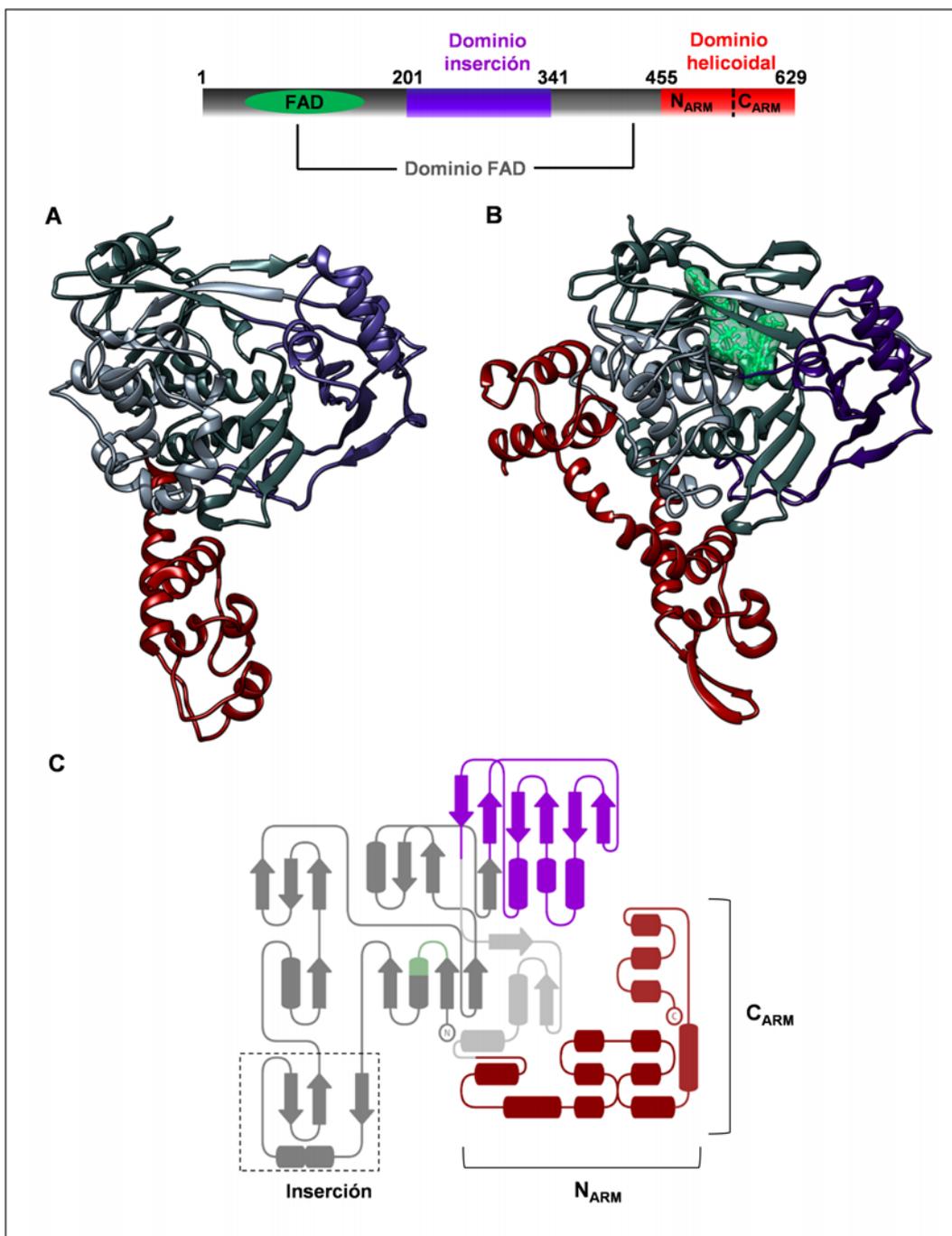


Figura 17: Estructura cristalina del protómero de MnmG. A) Representación en cintas de la estructura cristalina de MnmG de *E. coli* (PDB: 3CES) coloreada por dominios como se especifica en la representación lineal de la proteína en el esquema superior B) Representación en cintas de la estructura cristalina de MnmG de *A. aeolicus* (PDB: 2ZXI) coloreada por dominios con FAD unido (varillas verdes) y el C_{ARM} visible (rojo) C) Diagrama topológico de la estructura de MnmG de *A. aeolicus* (PDB: 2ZXI)

miembros pertenecientes a la subfamilia GR2 solo alinean en su región más N-terminal. MnmG posee una inserción en el plegamiento de Rossmann que no alinea con la familia GR1; por ello, la clasificamos en la familia GR2 en la cual este tipo de inserciones son, precisamente, las responsables de que solo puedan alinearse en su región más N-terminal. Además, una búsqueda posterior de estructuras similares en la base de datos DALI [46] usando los dominios FAD/inserción de MnmG reveló alta similitud estructural con proteínas de esta familia (GR2) como la succinato-NAD-oxidoreductasa o la glicina oxidasa, confirmando la clasificación propuesta.

- **El dominio inserción** (residuos del 202-341) es un dominio α/β de tamaño relativamente grande que subdivide al dominio FAD en dos partes (**figuras 17 y 18A**). Se trata de otra típica inserción en las proteínas de la familia GR2, con un motivo de secuencia conservado, exclusivo de las proteínas GidA, que Wittinghofer y col. denominaron GidA1 [60]. Este dominio guarda similitud estructural con un dominio pequeño de unión a NADH de la HMGC_oA-Reductasa; así pues, dichos autores propusieron que el dominio GidA1 es el encargado en MnmG de unir NADH. El dominio inserción posee dos cisteínas conservadas (C242 y C277); la C277 ha sido propuesta (por homología con TrmFO) como el nucleófilo que atacará al tRNA formando un enlace covalente con éste [42].

- **El dominio helicoidal** (residuos del 455-629) (**figuras 17 y 18B**), dominio en forma de brazo que puede subdividirse en dos regiones de diferente conservación:
 - **Región N-terminal** (N_{ARM}), compuesta por los residuos 455 al 549, con muy baja conservación evolutiva, estructurados en un grupo de hélices- α que protruye desde el núcleo catalítico.
 - **Región C-terminal** (C_{ARM}), con una alta conservación evolutiva, que incluye los residuos desde el 550 al 629. El C_{ARM} solo es visible en las estructuras cristalinas obtenidas de microorganismos termoestables (*C. tepidum* y *A. aeolicus*) en las que aparece con suficiente densidad electrónica, revelando que está compuesto por 4 hélices alfa, formando las tres últimas un núcleo sustentado por

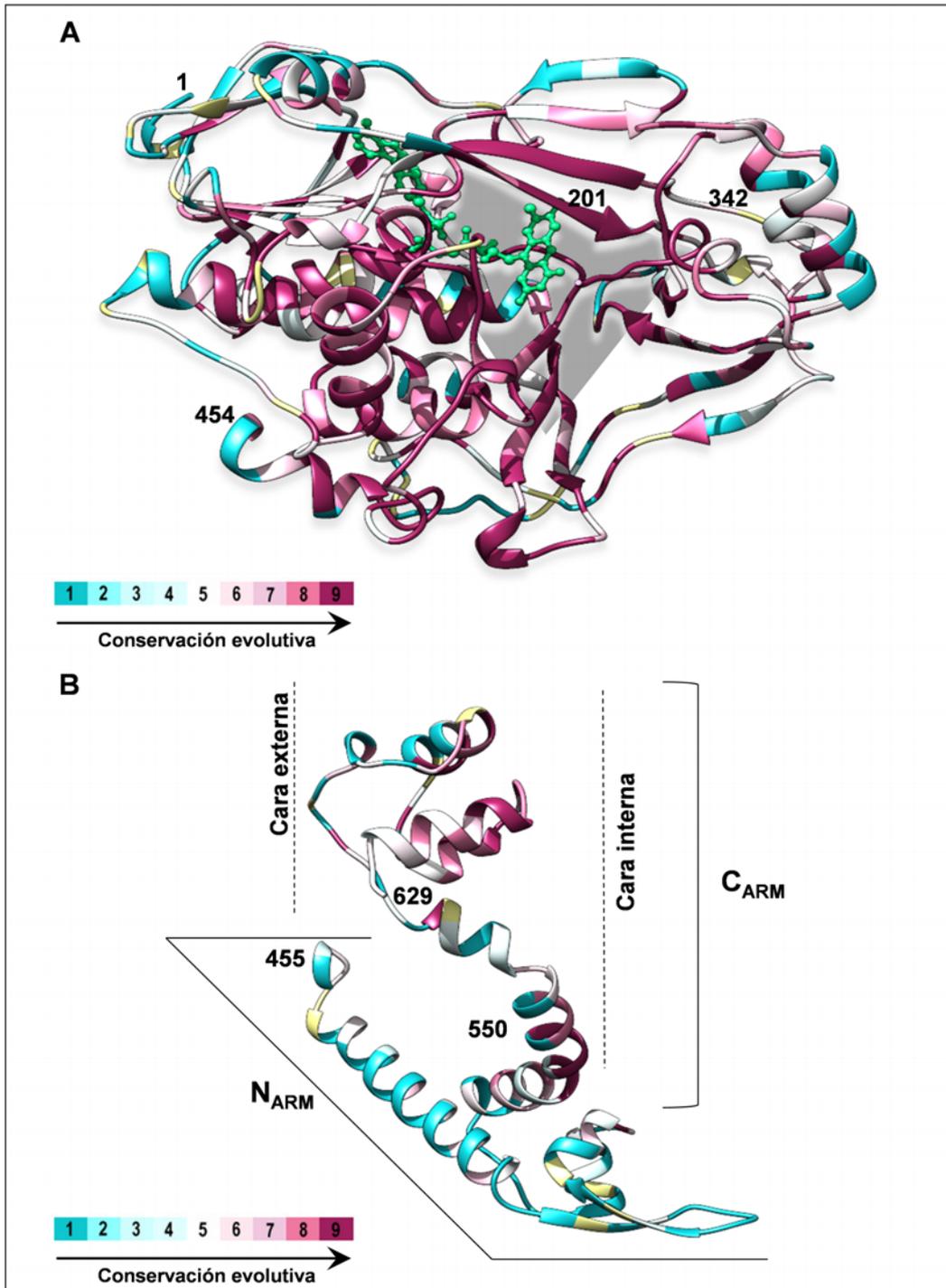


Figura 18: El núcleo catalítico y el dominio helicoidal de MnmG. A) Representación en cintas de los dominios FAD e inserción de MnmG que forman el núcleo catalítico, coloreados en función de su conservación evolutiva (ver leyenda). La zona sombreada indica el surco que delimitan estos dominios y donde queda alojado el FAD (verde). B) Representación en cintas del dominio helicoidal de MnmG coloreado en función de su conservación evolutiva. En la figura se señala la cara del C_{ARM} que quedaría orientada hacia el resto de MnmG (cara interna) y su opuesta (cara externa).

residuos hidrofóbicos [60, 68].

17.3. La unión de FAD induce cambios estructurales en MnmG.

El producto de la purificación de MnmG tiene un espectro de absorción UV/visible típico de proteínas con una flavina unida, con los típicos máximos alrededor de 370 nm y 450 nm (**figura 16A**). Conocíamos por datos previos que la flavina que arrastra la proteína MnmG al ser purificada es flavin adenin dinucleótido (FAD) [97] (**figura 19A**). Este FAD es fácilmente eliminado por diálisis o cromatografía de exclusión molecular, lo que indica que no está unido covalentemente a MnmG. Quisimos entonces examinar cómo afecta la unión de FAD a la estructura de MnmG. Para ello comparamos los espectros de dicroísmo circular (CD) en el ultravioleta (UV) lejano de MnmG antes y después de dializar y observamos que en ausencia de FAD MnmG tiene una mayor proporción de hélice alfa, dada la ganancia de elipticidad molar en los típicos mínimos de hélice alfa (alrededor de 210 nm y 225 nm) (**figura 19B**). Este resultado sugiere que el FAD induce un cambio conformacional en MnmG que implica cambios en estructura secundaria. Para confirmar este resultado analizamos la resistencia a tripsinólisis de MnmG en presencia de concentraciones crecientes de FAD. Las diferentes muestras incubadas con tripsina fueron analizadas mediante SDS-PAGE al 12% y usamos como control negativo nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH), un nucleótido que no es unido por MnmG (o lo es con muy baja afinidad). Los datos obtenidos muestran que MnmG gana resistencia a tripsinólisis con concentraciones crecientes de FAD, mientras que no hay efecto protector inducido por NADPH, todo lo cual indica que el FAD induce un cambio conformacional en MnmG que la hace más insensible al corte por tripsina (**figura 19C**).

Por otro lado, quisimos saber la afinidad del FAD por MnmG. Dado que cambios conformacionales ocurren en MnmG como consecuencia de la unión de FAD, tuvimos que descartar métodos clásicos de espectroscopía de absorción o fluorescencia, que usan la luz absorbida o emitida por el FAD, ya que las propiedades espectroscópicas del FAD son muy sensibles a cambios en su microambiente y, por lo tanto, no conseguíamos una señal estable al titular la proteína con FAD o viceversa. Finalmente nos decantamos por la calorimetría isotérmica de titulación (ITC) que mide el calor global absorbido o emitido en

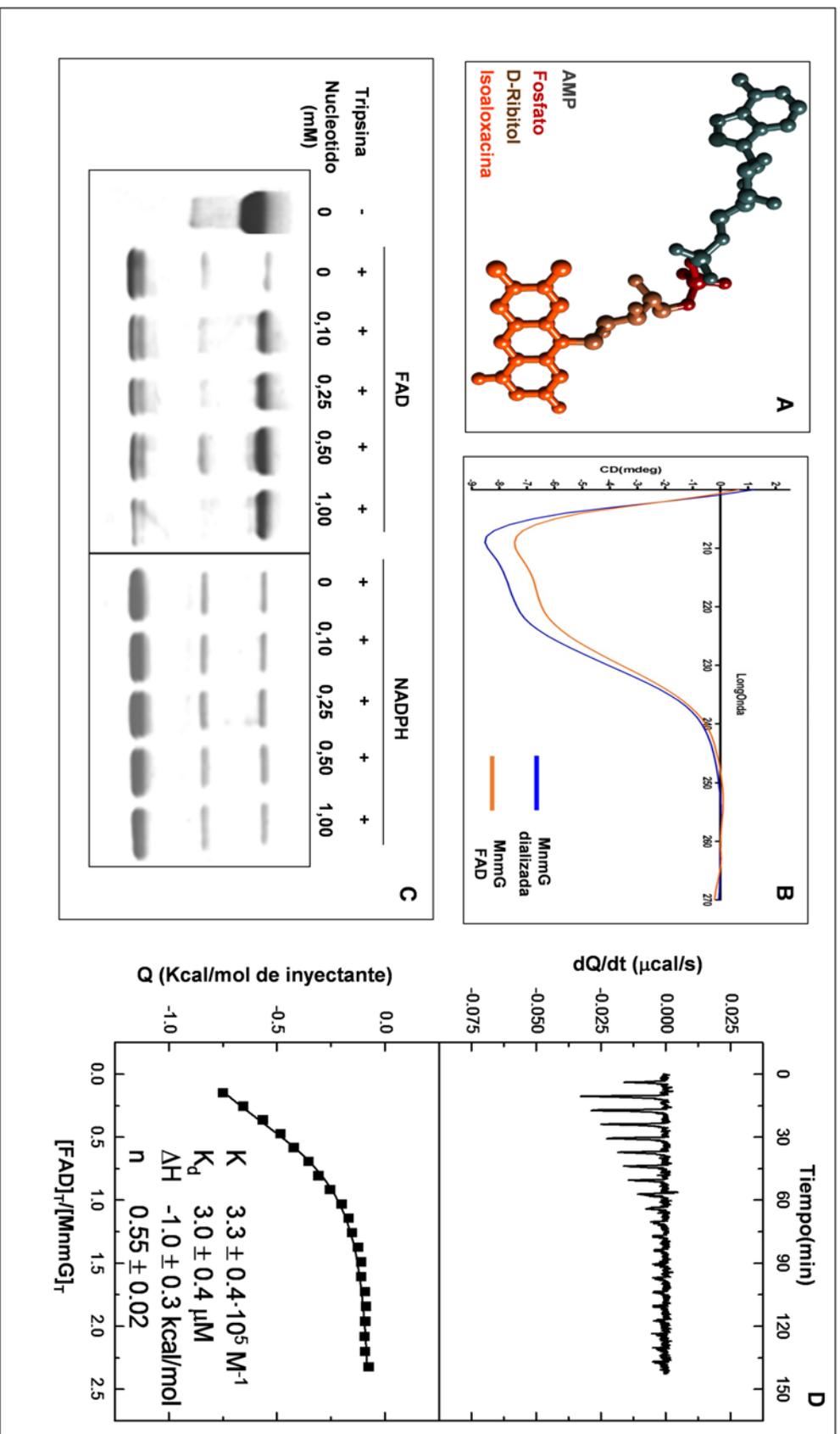


Figura 19: La unión de FAD induce cambios conformacionales en MmmG. A) Estructura del FAD con sus diferentes partes funcionales coloreadas según la leyenda. B) Espectro comparativo de diroísmo circular en el UV-lejano de MmmG con y sin FAD según se indica. C) Ensayo de resistencia a tripsinólisis de MmmG en presencia de FAD (panel izquierdo) y de NADPH (panel derecho) D) Ensayo de ITC en el que se observan los incrementos de calor (dQ/dt) en una titulación de MmmG con FAD (panel superior). Este calor (Q) es representado en función de la concentración de FAD en cada punto, obteniéndose una curva de saturación (panel inferior).

un proceso determinado.

La ITC nos permite una determinación directa de la K_D a partir del cálculo de la entalpía que a presión constante es directamente proporcional a la cantidad de calor absorbido o desprendido en la interacción molecular estudiada. La K_D se calcula a partir de la ecuación: $\Delta G = -RT \ln K_D = \Delta H - T \Delta S$, ecuación donde G es la energía libre de Gibbs, R la constante de gases, T temperatura, K_D la constante de equilibrio en sentido de disociación del complejo MnmG:FAD y H y S la entalpía y entropía del proceso de unión, respectivamente. Para llevar a cabo el experimento dializamos una solución de HisMnmG para eliminar el FAD arrastrado en la purificación y analizamos el espectro de absorción UV/Visible para asegurarnos que no quedaba FAD unido a MnmG. A continuación, llevamos a cabo el experimento de ITC titulando una solución de FAD a 225 μM sobre una solución de MnmG a 15 μM . En la **figura 19D** podemos ver el resultado de la titulación; en el panel superior se representan el calor, en este caso emitido, cada vez que inyectamos FAD. Se puede observar que el calor va disminuyendo a medida que aumenta la concentración de FAD en la solución de MnmG. Si calculamos la concentración de FAD tras cada inyección y la representamos frente al calor emitido obtenemos una curva de saturación (panel inferior) de la cual pudimos obtener la constante de disociación (K_D) del complejo MnmG:FAD ($K_D = 3.0 \mu\text{M}$). Así pues, MnmG de *E. coli*, a pesar de no cristalizar con FAD, es capaz de unirlo aunque con una afinidad relativamente baja (si la comparamos con la de flavoenzimas típicos), lo que explica que el FAD copurificado con MnmG sea fácilmente eliminado por diálisis o filtración en gel.

17.4. Análisis comparativo de las diferentes estructuras cristalinas de MnmG.

Entre 2008 y 2009 dos grupos más obtuvieron la estructura cristalina de MnmG [60, 68] de *E. coli*, *C. tepidum* y *A. aeolicus*, siendo los dos últimos microorganismos termoestables. Solo las estructuras de MnmG procedentes de los organismos termoestables pudieron ser cristalizadas con el FAD unido y, concretamente, en el caso de MnmG de *C. tepidum*, la región correspondiente al anillo de isoaloxacina del FAD se obtuvo con baja densidad electrónica, lo que indica una alta movilidad, complicando el posicionamiento específico del anillo reactivo del FAD. Comparamos las estructuras cristalinas disponibles

(PDBs: 3CES, 2Cp8, 3CP8, 2ZXXI y 2ZXXH) para analizar las posibles diferencias generales y especialmente las inducidas por la unión de FAD. En general, las cinco estructuras son muy similares, alineando con una desviación del valor cuadrático medio (RMSD) de 0.69, aunque se aprecian diferencias en tres regiones flexibles que deben ser funcionalmente importantes (**figura 20**).

La primera región (155-180) está compuesta por un lazo (155-160) que forma parte del sitio de unión de la adenosina del FAD y un segmento, que aparece parcialmente desordenado en algunas de las estructuras, que incluye dos hojas- β antiparalelas (160-171) y un segundo lazo (172-180) (**figura 21A**). La segunda región (245-295) incluye un lazo (262-280) que aparece parcialmente desordenado en todas las estructuras aunque en las estructuras de los organismos termoestables, especialmente en una de las procedentes de *A. aeolicus* (PDB: 2ZXXH), está algo más estructurado. En la tercera región (420-440) se observa un cambio de estructura secundaria de hélice- α a lazo en las moléculas de MnmG unidas a FAD (**figura 20 y 21B**), lo que podría relacionarse con el resultado obtenido por CD (**figura 19B**) indicando que la unión de FAD induce una pérdida de hélice- α . La mayoría de las diferencias que se observan en las regiones comprendidas entre los residuos 155-180 y 420-440 pueden atribuirse a los cambios conformacionales inducidos por FAD ya que presentan rasgos comunes entre las estructuras con FAD, independientemente del organismo que procedan, que no están presentes en las estructuras sin FAD (**figuras 20 y 21**). La unión de FAD promueve el acercamiento del lazo (155-160) a la molécula de FAD, además de estabilizar la hoja- β que comprende los residuos 167-171. Esta reorganización posiciona los residuos conservados G156, T157 y R174 a unos 3.5 Å de la región del fosfato del FAD y a unos 5-6 Å del anillo de isoaloxacina (**figura 21A**). Por otro lado, en la región 420-440 la transición de helice- α a lazo del segmento 426-435 coloca a la conservada R427 a unos 3 Å del átomo de oxígeno del locus N1-C1=O2 del anillo de isoaloxacina. El grupo cargado positivamente de la R427 puede contribuir tanto a la unión como a regular las propiedades redox del FAD estabilizando la forma aniónica de la flavina reducida (FADH⁻) [29] (**figura 21B**). En esta región también podemos observar cambios en la posición de la conservada R436 que no parecen deberse a la interacción con el FAD pues adquiere diferentes posiciones que no son comunes entre las estructuras con FAD o sin FAD. Lo mismo puede decirse de los cambios observados en la región 245-295 en la que se aprecian notables diferencias incluso entre las estructuras con FAD procedentes del mismo or-

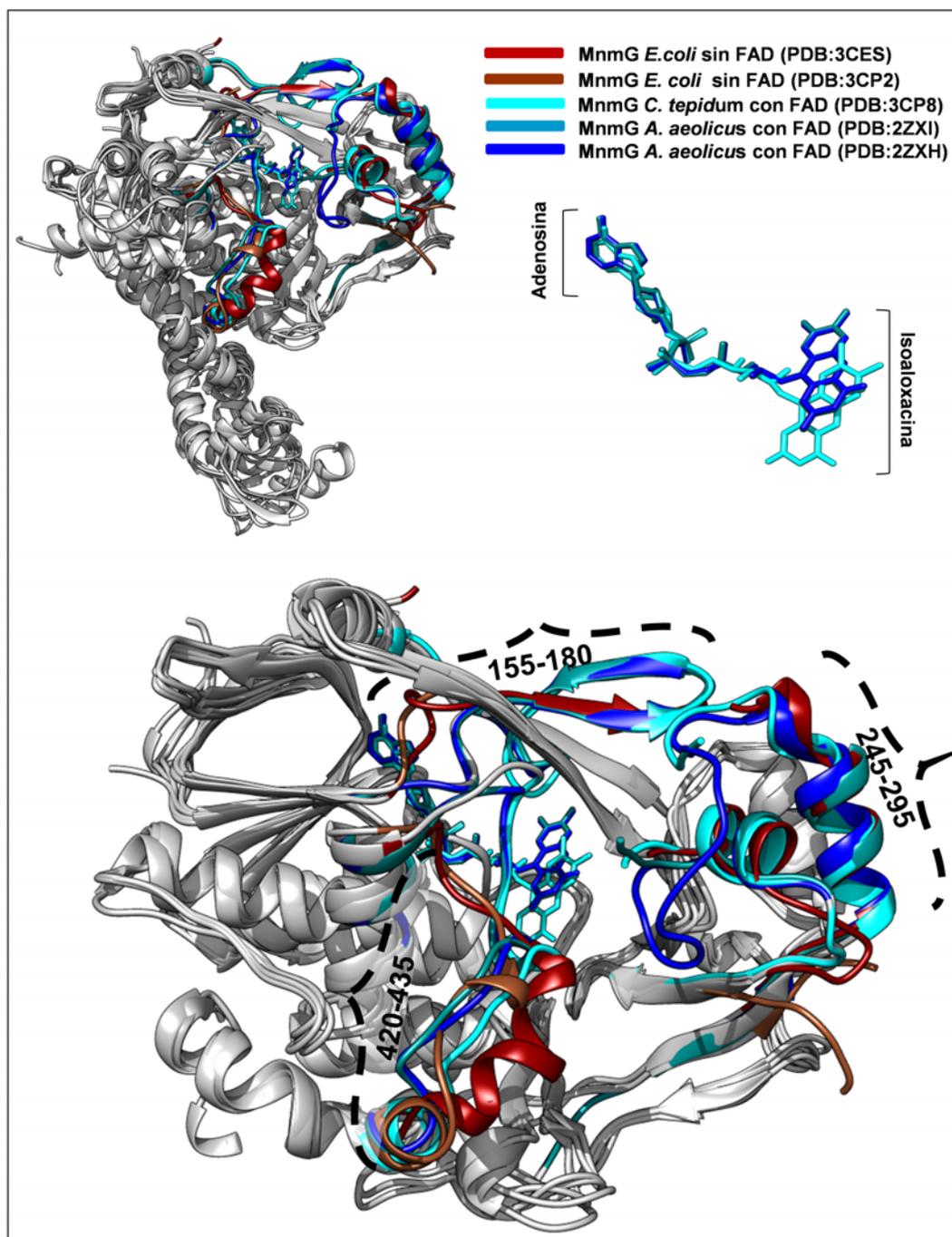


Figura 20: Regiones flexibles en MnmG. Alineamiento tridimensional de las estructuras disponibles de MnmG mostrando coloreadas (según se indica en la parte superior derecha) las regiones en las que se diferencian. En la parte superior izquierda se representa la posición de estas regiones en la estructura monomérica completa y en la parte inferior una ampliación de tales regiones. En la parte superior derecha también se representa el FAD tal y como se posiciona en las estructuras de MnmG con FAD (PDB: 3CP8, 2ZXI y 2ZXH).

ganismo (*A. aeolicus*). Por otro lado, hay que tener en cuenta que el C_{ARM} (550-629) solo es visible en las estructuras procedentes de los microorganismos termoestables, lo que indica una flexibilidad mayor que el resto de la proteína. No detectamos diferencias estructurales importantes entre los C_{ARM} de *C. tepidum* y *A. aeolicus* aunque sí un ligero cambio en su orientación relativa respecto al núcleo catalítico de MnmG. Su conservación evolutiva ya sugiere que va a ser funcionalmente importante como iremos demostrando a lo largo de esta Tesis.

17.5. Estudio de relaciones estructura-función en MnmG.

Basándonos en los datos estructurales proporcionados por la estructura de la proteína MnmG de *E. coli* obtenida por el equipo del Dr. Cygler procedimos a generar diferentes variantes de MnmG introduciendo cambios en residuos altamente conservados con el fin de determinar su importancia en la función modificadora de tRNA, en la unión de FAD o en los cambios conformacionales asociados a dicha unión [82].

Efectos de las mutaciones en la función modificadora de tRNAs: Análisis de la composición nucleosídica del tRNA mediante HPLC.

El análisis del estado de modificación del tRNA total extraído de cepas que expresan variantes de MnmG se efectuó mediante digestión del tRNA con nucleasa P1 y fosfatasa alcalina, seguida del análisis de los nucleósidos resultantes mediante HPLC, un procedimiento habitual en nuestro laboratorio [97, 63]. Las variantes de MnmG se expresan desde derivados del plásmido pIC1180 en el que la síntesis de la proteína está bajo el control de un promotor inducible (P_{BAD}), no muy fuerte en comparación, por ejemplo, con los promotores de tipo *tac*. Los plásmidos se introducen en una cepa portadora de una mutación nula en el gen *mnmG* cromosomal (IC5241, *mnmG*::Tn10). De esta manera se puede determinar la capacidad de cada variante de MnmG para complementar una cepa carente de la proteína MnmG funcional.

En la **figura 22** se presenta el esquema de la ruta de modificación de la U34 en los tRNAs de *E. coli* así como varios cromatogramas representativos del análisis de HPLC. El tRNA total de cualquier cepa defectiva en la conversión de s²U a mnm⁵s²U no presentará el pico correspondiente al nucleósido mnm⁵s²U (resultante de la acción del complejo MnmE-MnmG y típico de la posición

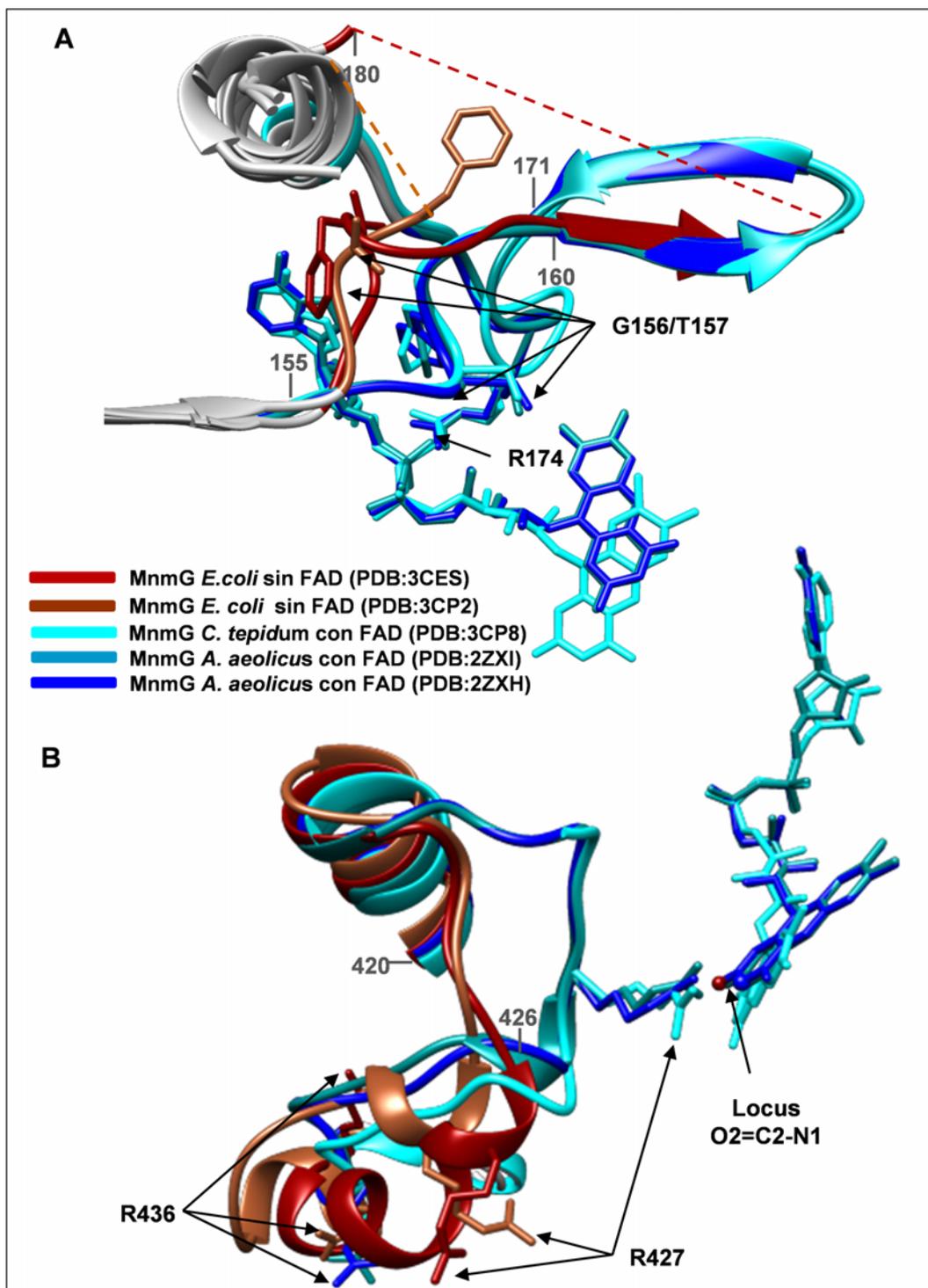


Figura 21: Diferencias entre las estructuras de MnmG atribuidas a la interacción con FAD. A) Representación en cintas coloreadas de la región flexible 155-180 en las diferentes estructuras de MnmG destacando el FAD y los residuos F158, T157 y R174 en varillas. **B)** Representación en cintas coloreadas de la región flexible 420-435 en las diferentes estructuras de MnmG destacando el FAD y los residuos R427 y R436 en varillas.

de tambaleo en los tRNAs que descodifican Lys, Glu y Gln en *E. coli*) y, en cambio, mostrará una acumulación del pico correspondiente al nucleósido s^2U , dado que la proteína MnmA introducirá la tiolación en la posición 2 de la U34 en los tRNAs mencionados. Este es el caso tanto de la cepa *mnmG* (IC5241) sin transformar (datos no mostrados) como de la transformada con el plásmido “vacío” (sin portar el gen *mnmG*, panel B) o con cualquier derivado expresando una variante de MnmG incapaz de modificar el tRNA (panel E). En cambio, si la cepa es transformada con el plásmido que expresa la proteína MnmG salvaje o una variante capaz de modificar, en cierto grado, el tRNA, se puede apreciar (y cuantificar) el pico correspondiente a la modificación mnm^5s^2U (paneles D y F). Además, en este caso, se puede observar que los niveles de s^2U varían de manera inversa a la amplitud con la que aparece el nucleósido mnm^5s^2U , desapareciendo en el caso de que la variante MnmG tenga una capacidad modificadora cercana a la de la proteína silvestre (panel D).

De esta manera, analizamos todas las variantes de MnmG construidas, comparando cultivos inducidos y no inducidos con arabinosa al 0,2% por si alguna variante defectiva recupera la función al aumentar la expresión de la proteína más allá de los niveles silvestres. Los resultados se normalizan frente al área correspondiente al nucleósido s^4U (presente en la posición 8 en tRNAs de *E. coli*) que no debe variar ya que no depende de la ruta controlada por MnmEG. Así pues, lo que comparamos es la fracción s^2U/s^4U del tRNA total de la cepa IC5241 (mutación cromosomal *mnmG* nula) portadora del plásmido vacío frente a la misma cepa portadora de los derivados de este plásmido que expresan las diferentes variantes de MnmG, en presencia o no de inductor (arabinosa 0,2%). Esta cuantificación nos permite clasificar las variantes como salvajes, nulas y parciales o parciales recuperables en función de la cantidad de proteína expresada. Como indican los datos de la **tabla 5**, la mayoría de las variantes construidas afectan la función modificadora de MnmG, al menos parcialmente, lo que sugiere que el residuo cambiado participa en algún tipo de actividad de la proteína o es importante para el mantenimiento de una estructura/conformación funcional. Cabe destacar la actividad modificadora nula que exhiben las variantes correspondientes a las dos Cys, C47S y C277S, propuestas como catalíticas [68].

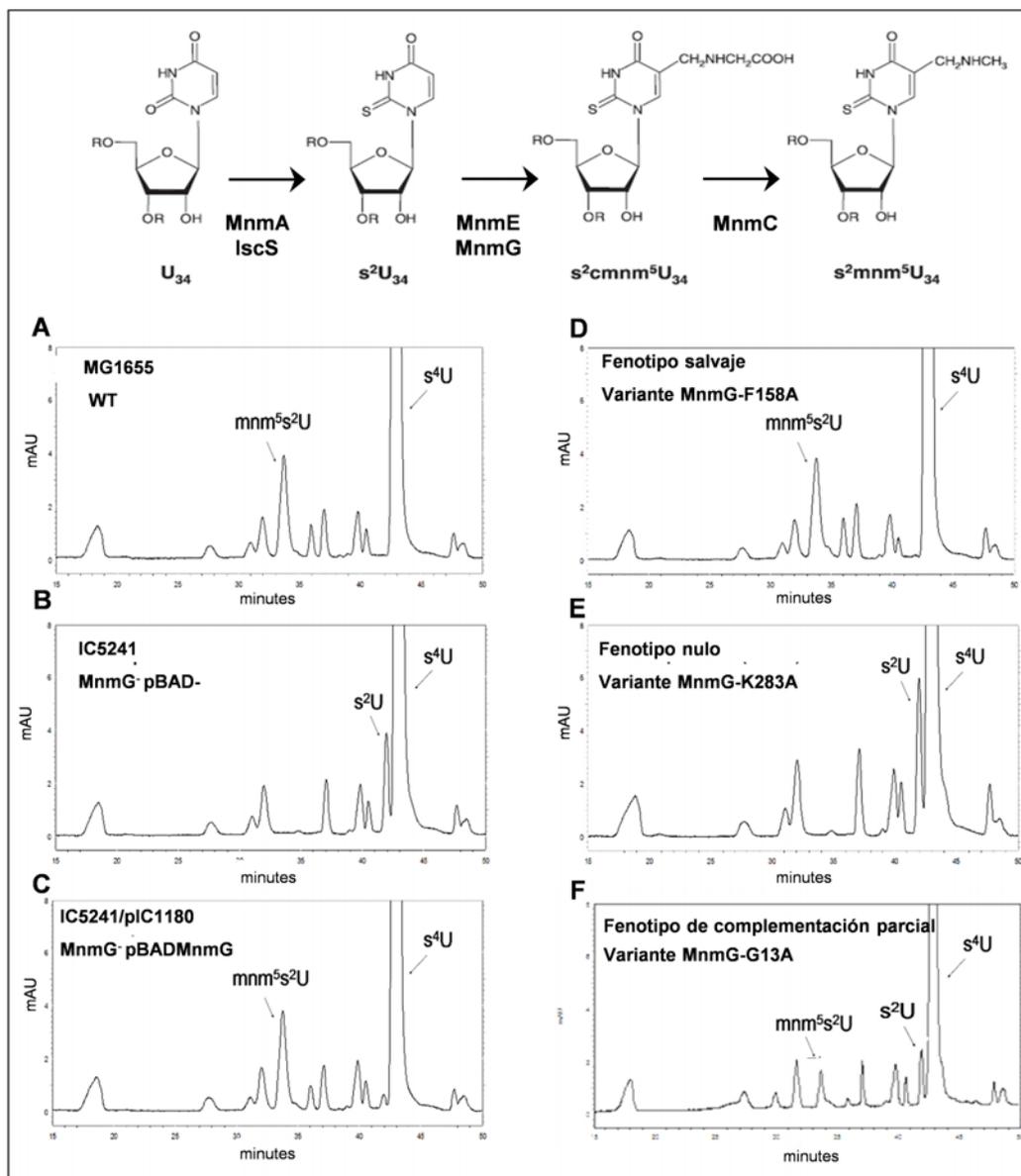


Figura 22: Análisis del estado de modificación de los tRNAs *in vivo*. En la parte superior se representa de forma esquemática las rutas de modificación que afectan a la U34. La ruta IscS-MnmA introduce un grupo tiol en la posición 2 de la U34; la proteína IscS controla el inicio de la ruta mientras que MnmA es responsable del último paso por el que se incorpora el grupo tiol a la U34. La ruta MnmEG es responsable de la introducción del grupo cmnm en la posición 5 de la U34. Este grupo se transforma, a continuación, en algunos tRNAs en mnm por la acción de la enzima bifuncional MnmC. En los paneles A, B y C se representan cromatogramas donde se señalan los picos correspondientes a los nucleósidos mnm⁵s²U (producto de de MnmEG y MnmA), s²U (nucleósido que se obtiene en ausencia de MnmG) y s⁴U (nucleósido modificado presente en la posición 8 de los tRNAs, independiente de MnmEG y MnmA y que es usado como control interno). En los paneles D, E y F se representan los cromatogramas típicos de proteínas MnmG que producen fenotipo salvaje, nulo o parcial, respectivamente.

Identificación de residuos implicados en la unión a FAD o en el cambio conformacional asociado con esta unión: Ensayo de protección frente a la digestión por tripsina.

Aprovechando que MnmG se protege ante tripsinólisis en presencia de FAD, realizamos el mismo ensayo con diferentes variantes de MnmG en las que hemos cambiado algún residuo perteneciente al bolsillo de unión de FAD o presuntamente relacionado con los cambios conformacionales que acontecen en MnmG tras la unión a este ligando. La **figura 23** muestra geles representativos de las proteólisis realizadas y en la **tabla 5** se resumen los resultados de las mismas, representando con los signos + y - si hay protección o no frente a la tripsina. La mayoría de las variantes tienen un patrón de digestión similar en ausencia de FAD lo que sugiere que los cambios introducidos no afectan de manera evidente a la estructura de MnmG (**figura 23**). La proteína MnmG-R204A, aunque mantiene un patrón similar de bandas, es más resistente a tripsinólisis en ausencia de FAD que la proteína salvaje. Este comportamiento de MnmG-R204A sugiere una pérdida de flexibilidad a causa del cambio en el residuo R204, desplazando el equilibrio de los conformeros de la proteína (en ausencia de FAD) hacia uno que confiere más resistencia a la proteasa. En contraste, las proteínas N48A/P49A, K56A y G89A/P90A, en ausencia de FAD, parecen más sensibles a la tripsinólisis que la proteína salvaje. Es posible que en estos casos el equilibrio de los conformeros de MnmG sin FAD se desplace hacia estados más sensibles a la proteasa. Curiosamente, mientras que la adición de FAD confiere más resistencia a las variantes N48A/P49A, K56A, G89A/P90A y C277S frente a la digestión, indicando que son capaces de unir FAD, la variante MnmG-R204A, en presencia de FAD, es más sensible a la proteasa, sugiriendo que: o no es capaz de unir FAD o que la unión del FAD estabiliza una conformación más susceptible a la enzima.

El análisis de los patrones de tripsinólisis en el resto de las proteínas mutantes nos indica que los cambios en residuos localizados alrededor del FAD (G13A, G15A, G156A/T157A, R174A, T201A/P202A y R204 impiden la protección inducida por FAD (**figura 19, 23** y **tabla 2**), sugiriendo que estos residuos o están implicados en la unión directa de FAD o participan en el cambio conformacional inducido por el ligando de forma que, al estar mutados, lo impiden, manteniendo a la proteína en una conformación que no aumenta su resistencia a la proteasa. Todos los cambios introducidos afectan, en mayor o

menor grado, a la modificación de tRNA *in vivo* (**tabla 5**). En las variantes que no resultan protegidas por el FAD frente a la digestión, el defecto en la modificación puede deberse a la ya demostrada participación (indispensable) del FAD en la reacción de modificación [63]. En contraste, el déficit modificador de las proteínas con cambios en residuos cercanos al FAD (N48, P49, G52, G53, K56, K283, T375 e Y377) pero que se protegen frente a tripsina, sugiere que tales residuos, aunque no tienen un papel directo en la interacción o en el cambio conformacional inducido por FAD, deben jugar un papel importante en la reacción de modificación, ya sea en el mecanismo de la catálisis mediada por FAD o en otras actividades como la unión de tRNA o NADH, por ejemplo. Finalmente, cabe señalar que los residuos R286 y R427, cuyo cambio a alanina no afecta al patrón de proteólisis pero sí a la capacidad modificadora de tRNA, están situados en los segmentos móviles 245-295 y 420-435, reforzando la hipótesis de que la flexibilidad/movilidad de estos segmentos debe tener implicaciones funcionales. De hecho la clara posición del residuo R427 junto al locus O2=C1-N2 de la isoaloxacina del FAD, comentada previamente (**figura 21B**), indica que el residuo R427 debe estar directamente implicado en la catálisis mediada por FAD.

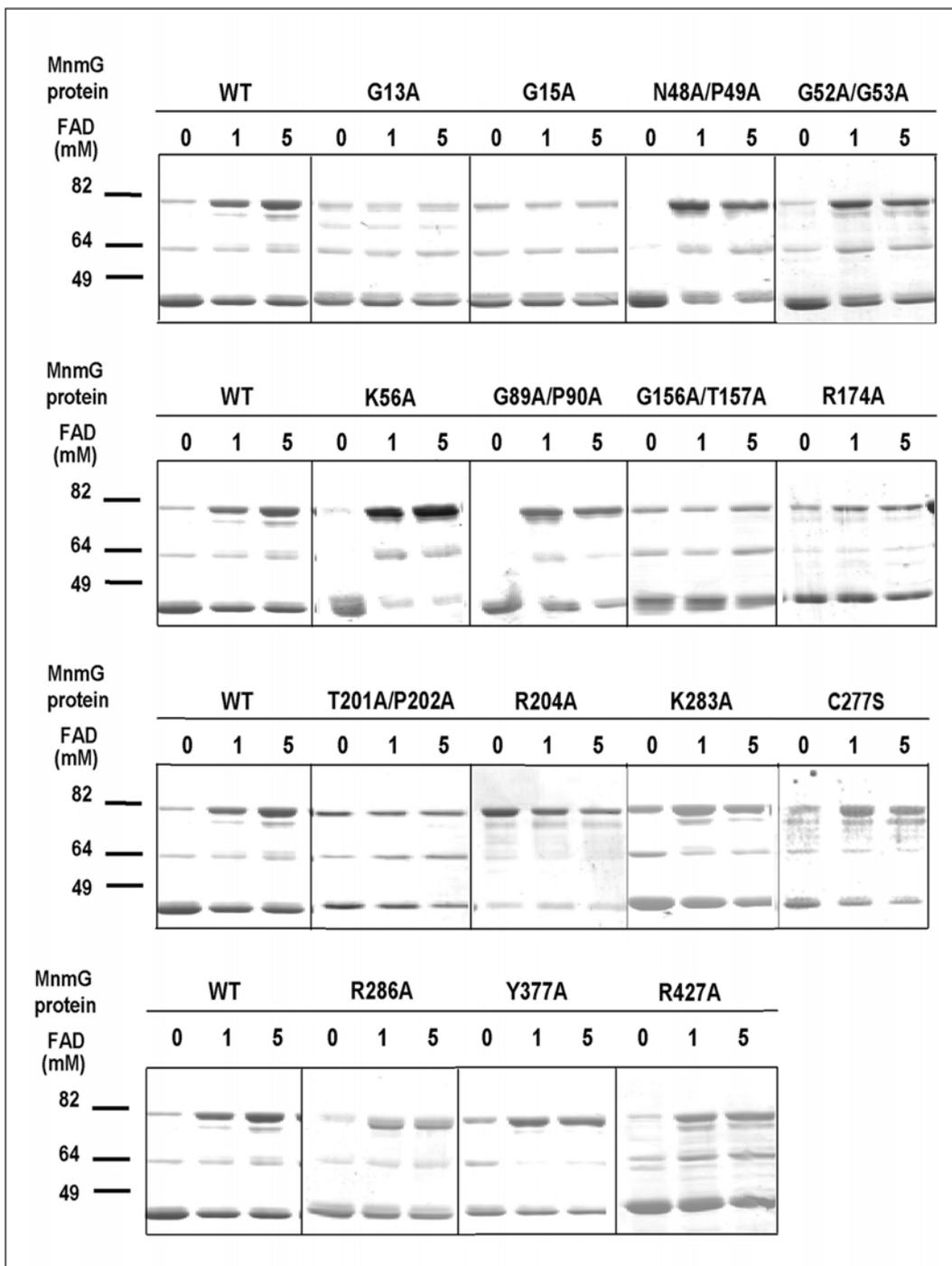


Figura 23: Identificación de residuos implicados en el cambio conformacional inducido por FAD. Geles SDS-PAGE mostrando los patrones de digestión con tripsina de MnmG-WT y diferentes variantes en presencia de concentraciones crecientes de FAD.

Tabla 5. Propiedades de las variantes de MnmG

Variantes MnmG	s ² U/s ⁴ U (-ind)*	s ² U/s ⁴ U (+ind)*	Protección FAD	Afinidad FAD K _D (uM)
pBAD22	0.020	0.020		
WT	0.001	0.000	+	3.00
G13A	0.015	0.002	-	27.0
G15A	0.015	0.004	-	ND
G13A/G15A	0.020	0.020	ND	ND
C47S	0.019	0.018	ND	210
N48A/P49A	0.015	0.007	+	ND
G52A/G53A	0.020	0.020	+	ND
K56A	0.014	0.005	+	ND
G89A/P90A	0.016	0.004	+	ND
G156A/T157A	0.020	0.020	-	150
F158	0.000	0.000	ND	ND
R174	0.011	0.000	-	ND
T201A/P202A	0.020	0.018	-	ND
R204A	0.015	0.000	-	8.90
C277S	0.020	0.018	+	8.1
K283A	0.018	0.017	+	3.70
R286A	0.012	0.000	+	ND
Y377A	0.015	0.013	+	0.70
R427A	0.018	0.000	+	ND

ND, ensayo no realizado

Las diferentes variantes de MnmG (primera columna) son expresadas en la cepa IC5241 desde el plásmido pIC1180 (pBAD conteniendo el gen *mnmG*) o sus derivados. La primera fila corresponde a los resultados de modificación obtenidos de la cepa IC5241 transformada con el plásmido vacío (pBAD22). En el resto de filas se incluyen las diferentes variantes de MnmG. Los datos de modificación *in vivo* (segunda columna) se obtienen del cálculo del área del pico de absorbancia a 314 nm correspondiente al nucleósido s²U respecto a la del s⁴U. En la columna de protección inducida por FAD se resumen los datos mostrados en la figura 19 y las constantes de afinidad (K_D) fueron obtenidas por ITC.

* En presencia (+) o ausencia (-) del inductor (ind), arainosa 0.2%.

**Identificación de residuos implicados directamente en unión de FAD:
Calorimetría de titulación isotérmica (ITC).**

Para confirmar algunos de los resultados de proteólisis limitada seleccionamos las variantes MnmG-G13A, MnmG-C47S, MnmG-G156A/T157A, MnmG-R204A, MnmG-C277S, MnmG-K283A y MnmG-Y377A expresadas en el vector pET15b bajo el control del fuerte promotor del fago T7 que nos permite conseguir las cantidades de proteína requeridas para el análisis por ITC. En la **tabla 5** se muestran las constantes de disociación obtenidas para cada una de estas variantes. Los resultados indican que las variantes que no muestran protección frente a tripsinólisis en presencia de FAD presentan las K_D mayores, lo que sustenta la idoneidad de la estrategia basada en la resistencia a la tripsinólisis para detectar residuos implicados en la unión del FAD o en el cambio conformacional asociado. Especial mención merece el comportamiento de la variante MnmG-R204A dado que el ligero incremento que se observa en su K_D no parece ser suficiente para justificar la ausencia de protección frente a la tripsinólisis. Los resultados obtenidos con MnmG-R204A sugieren que este residuo está implicado en la reorganización estructural inducida por el FAD y no en su unión directa, lo que debe ser importante para la función ya que esta variante es también defectiva en la modificación del tRNA (**tabla 5**). Al comparar la región 200-205 de las estructuras disponibles de MnmG nos dimos cuenta de que, en las estructuras con FAD, la R204 está formando un puente de hidrógeno con la cadena principal de la C47, reorientando su cadena lateral que ahora puede establecer un puente de hidrógeno con la T201 (**figura 24**). Las tres variantes MnmG-R204A, MnmG-T201A/P202A y la MnmG-C47S son deficientes en la actividad modificadora de tRNA (**tabla 5**), sobretodo las dos últimas en las que ni siquiera la producción de niveles elevados de proteína (al añadir arabinosa al cultivo) consiguen recuperar el fenotipo. Además, la variante MnmG-T201A/P202A no está protegida frente a la tripsina por la unión del FAD y la afinidad de MnmG-C47S por FAD es aproximadamente 70 veces menor que la de MnmG-WT. Este cambio en la afinidad por FAD de la variante MnmG-C47S es importante, indicando que C47 no está implicada solo en catálisis (como se había propuesto dada su cercanía al N5 del anillo de isoaloxacina del FAD) [68]. Así que, dadas las interacciones descritas, nosotros proponemos que este residuo (C47) debe tener, además, un papel clave en el mantenimiento de la conformación general del sitio FAD, como se propuso

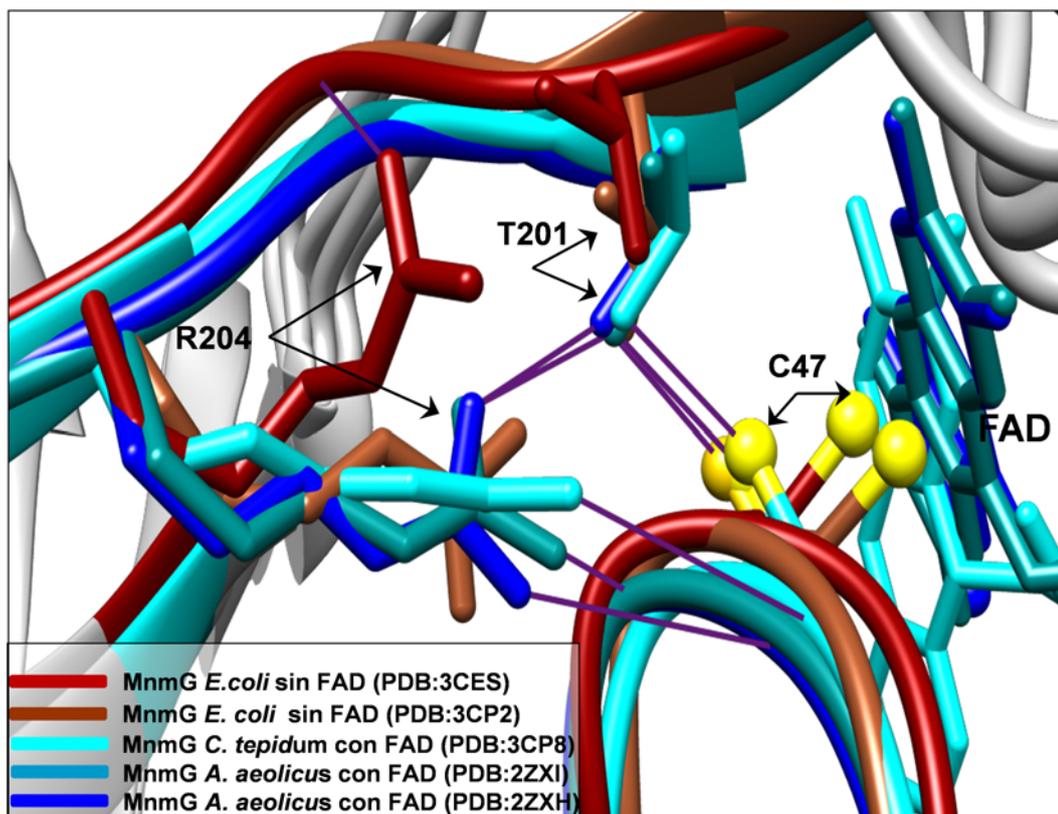


Figura 24: Cambios conformacionales inducidos por FAD estabilizan la C47 catalítica. Representación en cintas de la región 200-205 y del lazo conteniendo la C47 (amarillo) en las diferentes estructuras de MnmG. Los residuos R204, T201 y C47 están representados en varillas y los puentes de hidrógeno entre ellos con varillas de color morado.

para su equivalente C53 en TrmFO [42]. Por otro lado, la afinidad de la variante G156A/T157A por FAD es unas 50 veces menor que la de MnmG-WT. Además, la proteína no es protegida por este ligando frente a la digestión por tripsina y se muestra incapaz de modificar el tRNA. Estos resultados confirman la importancia del segmento flexible 155-160 en la interacción directa con la adenosina del FAD (figura 20 y 21A).

17.6. Importancia funcional del C_{ARM} .

Wittinghofer y col. demostraron la importancia del C_{ARM} de MnmG en la interacción con MnmE. Usando ensayos de fluorescencia y filtración en gel demostraron que una construcción de MnmG en la que se había deletado el C_{ARM} [MnmG(1-558)] no era capaz de interactuar con MnmE. Además

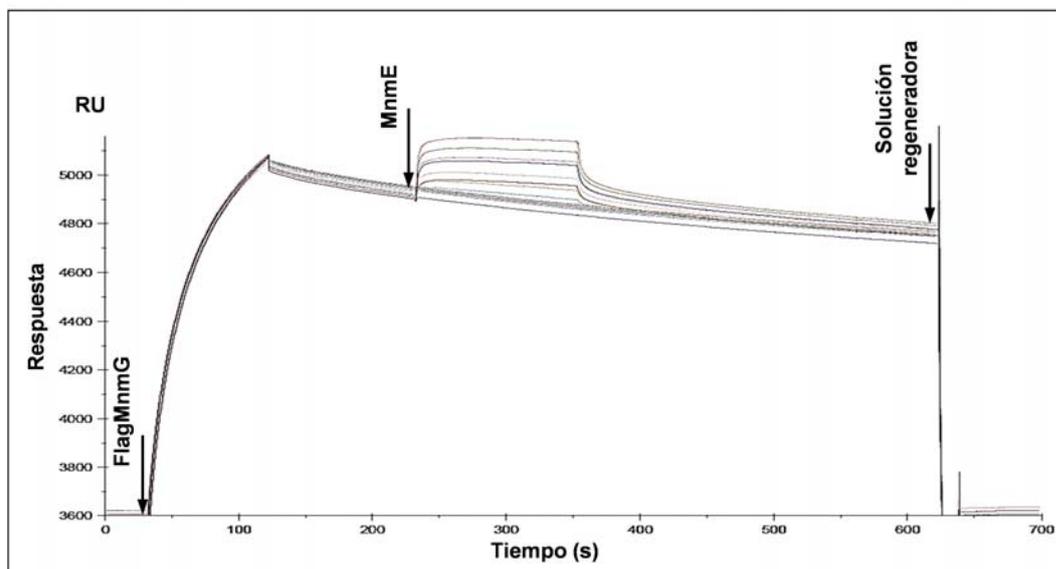


Figura 25: Sensorgrama representativo de la unión entre MnmG y MnmE. Se muestran varios ciclos que consisten en: unión de FlagMnmG, unión de MnmE y regeneración con NaOH. La línea base corresponde a la señal aportada por el anticuerpo inmovilizado en el chip CM5. Las flechas indican el momento de la inyección de cada una de las proteínas así como el de la solución de regeneración

propusieron los residuos K589 y E585 como implicados en la interacción directa con MnmE [60]. Nosotros quisimos confirmar estos resultados usando Resonancia de Plasmón Superficial (SPR) con la construcción MnmG(1-550) y las variantes de la proteína completa MnmG-E585A y MnmG-E585K. La Resonancia de Plasmón Superficial (SPR) es un fenómeno óptico que permite la detección de cambios de índice de refracción en las proximidades de la superficie de separación entre un metal y un material dieléctrico. Es una técnica muy sensible capaz de medir la interacción entre dos moléculas de manera cuantitativa usando la variación en el índice de refracción de una luz incidente causada por el aumento de masa que implica la formación de un complejo. Así pues decidimos usar el sistema de SPR de Biacore para determinar la afinidad entre MnmE y las distintas variantes de MnmG.

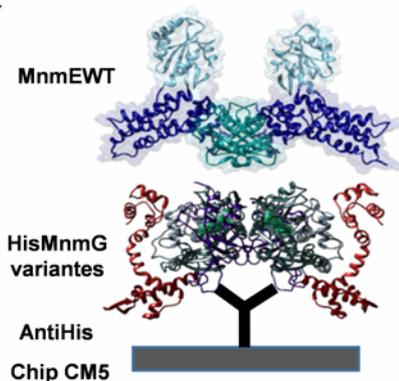
El método utilizado fue el denominado Captura que consiste en inmovilizar un anticuerpo a un chip con una superficie de colas carboximetilo activadas (chip CM5). Este chip, entonces, podemos usarlo para unir una proteína que sea reconocida por el anticuerpo inmovilizado y así realizar los pertinentes ensayos con otras macromoléculas cuya interacción con la proteína unida al anticuerpo se quiera analizar. En este caso, lo que hicimos fue fijar covalentemen-

te un anticuerpo antiFLAG (Flag = DYKDDDDK) y analizamos la interacción entre MnmE y las construcciones de MnmG etiquetadas FlagMnmG-WT, FlagMnmG(1-550), FlagMnmG-E585A y FlagMnmG-E585K. En la **figura 25** se muestra un sensorgrama representativo obtenido por SPR donde se representa la señal proporcional a la reflectancia (RU) frente al tiempo. Cuando MnmE es inyectada podemos observar un aumento en la señal proporcional a la concentración de MnmE hasta que la proteína MnmG unida al anticuerpo se va saturando. Una vez obtenido el sensorgrama, se representa la señal máxima obtenida en cada ciclo de interacción frente a las concentraciones de MnmE inyectadas obteniendo una curva de saturación típica que analizamos con el mismo software suministrado por el fabricante para obtener las constantes de disociación (K_D). Los resultados de la **tabla 6** muestran que MnmG-WT interacciona con MnmE con una $K_D = 1.99 \mu\text{M}$, que MnmG(1-550) no interacciona con MnmE y que los cambios E585A y E585K no afectan a la afinidad por MnmE. Por tanto, nuestros datos indican que el C_{ARM} interacciona con MnmE pero que el residuo E585 no está directamente implicado en esta interacción, contradiciendo lo propuesto por Wittinghofer y col. [60][61]. Además, analizamos la capacidad de modificar tRNA *in vivo* tanto de la variante MnmG-E585A como de la MnmG-E585K y ambas fueron defectivas, produciendo el cambio a lysina un efecto mayor, aunque en ambos casos puede ser compensado cuando la proteína se expresa en grandes cantidades, lo que ocurre en presencia del inductor arabinosa (**tabla 6**). Por tanto, el residuo E585 parece importante para la modificación de tRNA pero su rol queda por clarificar.

Tabla 6. Afinidad de unión entre MnmE y diferentes variantes de MnmG en el residuo E585

Proteínas MnmG	MnmE K_D (μM)	$s^2\text{U}/s^4\text{U}$ -ind*	$s^2\text{U}/s^4\text{U}$ +ind*
MnmGWT	1.99	0.001	0.000
MnmG(1-550)	NB	0.020	0.019
MnmG-E585A	1.69	0.007	0.000
MnmG-E585K	1.59	0.019	0.004

NB, unión no detectada
*inductor 0.2%arabinosa



A la derecha de la tabla se presenta un esquema de la interacción entre proteínas completas que se analiza por SPR, siendo MnmG la proteína capturada al chip CM5 con el anticuerpo (antiHis) previamente inmovilizado. Debe notarse que en la tabla se incluye una proteína MnmG carente del C_{ARM} (en rojo en la Figura) como control negativo.

18. Organización dimérica de MnmG.

“Para entender a las proteínas en acción, es necesario añadir a las instantáneas congeladas de las estructuras cristalinas una cuarta dimensión, el tiempo.” Henzler-Wildman and Kern, 2007

Según describen todos los artículos en los que presentan los cristales de MnmG [60, 82, 68], esta proteína forma homodímeros en los que la interfaz de dimerización se estabiliza principalmente por interacciones bien conservadas entre residuos del dominio de unión a FAD de un protómero y los residuos del dominio inserción (Ins-2, según Osawa et al., 2009) del otro, quedando los C_{ARM} relativamente separados (**figura 26**). En cada protómero el FAD queda alojado en un amplio surco delimitado por los dominios FAD e inserción. Estos surcos quedan orientados hacia el exterior de tal manera que los anillos de isoxaloxacina del FAD quedan expuestos al solvente (**figura 26**). Esta orientación del FAD permitiría la entrada y salida de un sustrato; sin embargo, la catálisis debe ocurrir en un ambiente aislado del solvente [29]. Por ello, cabe pensar que la interacción con MnmE o tRNA, o bien una importante reorganización conformacional en MnmG puedan ayudar a formar un centro catalítico en el que las reacciones mediadas por FAD queden aisladas del solvente. El cálculo del potencial electrostático de superficie reveló que la mayoría de la carga positiva superficial de MnmG se concentra, precisamente, en los mencionados surcos, sugiriendo que el brazo anticodón del tRNA quede alojado en esta zona facilitando la interacción entre la U34 y el FAD [68]. En resumen, MnmG forma homodímeros de 140 kDa, en forma de M, con un sitio independiente en cada protómero para ubicar FAD y tRNA, de manera que cada homodímero de MnmG tiene la capacidad de portar dos moléculas de FAD y dos moléculas de tRNA.

18.1. Interacciones proteína-proteína mediadas por el C_{ARM} sugieren la existencia de una conformación alternativa de MnmG.

La cara interna del C_{ARM} interacciona con el resto de MnmG.

Los flavoenzimas tienen mecanismos diversos para regular la accesibilidad de sustrato así como el aislamiento del solvente necesario para la catálisis mediada por FAD [29]. Dada la flexibilidad y conservación evolutiva del C_{ARM} ,

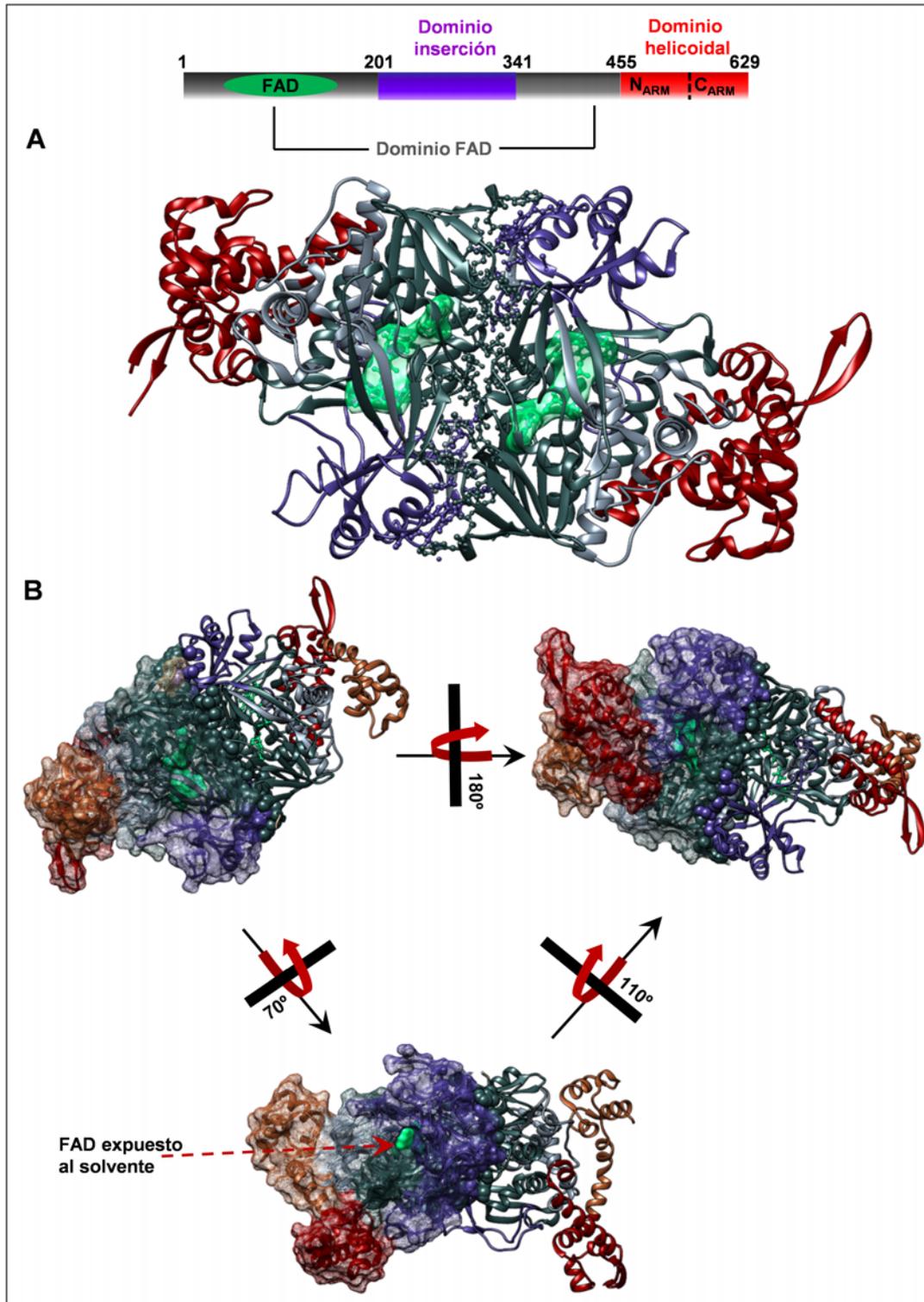


Figura 26: Estructura dimérica de MnmG. A) Representación en cintas de la estructura de MnmG con los residuos que forman la interfaz de dimerización representados en varillas y bolas. B) Tres orientaciones distintas del dímero de MnmG. Se ha representado la superficie en red de uno de los protómeros en cada orientación al igual que la superficie del FAD (verde).

es posible que MnmG pueda adquirir una conformación en la que el C_{ARM} interactúe con el núcleo catalítico, participando así en este aislamiento del FAD frente al solvente. De hecho, el residuo E585 localizado en el C_{ARM}, y cuyo rol no ha quedado claro, podría participar en esta interacción, explicando así el defecto en la modificación de tRNA de las variantes MnmG-E585A y MnmG-E585K (**tabla 6**). Para comprobar esta hipótesis decidimos analizar la interacción entre el C_{ARM} y el resto de MnmG. Para ello clonamos, expresamos y purificamos la región MnmG(535-629) que incluye el C_{ARM} (550-629), obteniendo una proteína soluble, de alta pureza y, aparentemente, bien plegada, tal y como indicaron su análisis en SDS-PAGE al 15% y el espectro de dicroísmo circular (**figura 27A**).

Para comprobar si el C_{ARM} interactúa con el resto de MnmG, realizamos un experimento de afinidad con SPR uniendo el constructo HisMnmG(535-629) a un chip, capturándolo mediante un anticuerpo antiHis, y determinando su afinidad por MnmG(1-550) fusionado a una etiqueta Flag [FlagMnmG(1-550)]. Como muestra la **tabla 7**, MnmG(1-550) y MnmG(535-629) interactúan con una K_D de aproximadamente 15 μM, sugiriendo la existencia de un estado conformacional de MnmG, en solución, en el que el C_{ARM} está plegado sobre el resto de MnmG. La flexibilidad inherente del C_{ARM} y su relativa baja afinidad en la interacción con el resto de MnmG probablemente permiten que el C_{ARM} pueda estar separado, tal como muestran las estructuras publicadas, o interactuando físicamente con el núcleo catalítico en función de las necesidades del ciclo de modificación de tRNA. En resumen, el C_{ARM} de MnmG tiene la capacidad de interactuar tanto con MnmE como con el resto de MnmG.

Nos propusimos identificar varios residuos implicados en la interacción directa con el resto de MnmG y así acotar la región que interactúa con éste. Para ello, generamos diferentes variantes de la construcción MnmG(535-629) y analizamos la afinidad, mediante SPR, por la proteína MnmG(1-550). En primer lugar, construimos la variante MnmG(535-629)-E585K ya que los controvertidos datos comentados previamente nos sugirieron que el residuo E585 podría estar implicado en esta interacción y no en la unión de MnmE. También generamos otras dos variantes conteniendo los cambios K589E y G606A, seleccionados porque los residuos K589 y G606 están situados en la misma cara del C_{ARM} que el residuo E585 (**figura 27B**). Además, cambiamos a aspartato el residuo R603 ya que las estructuras indican que podría interactuar electrostáticamente con el conservado D415 de su mismo protómero.

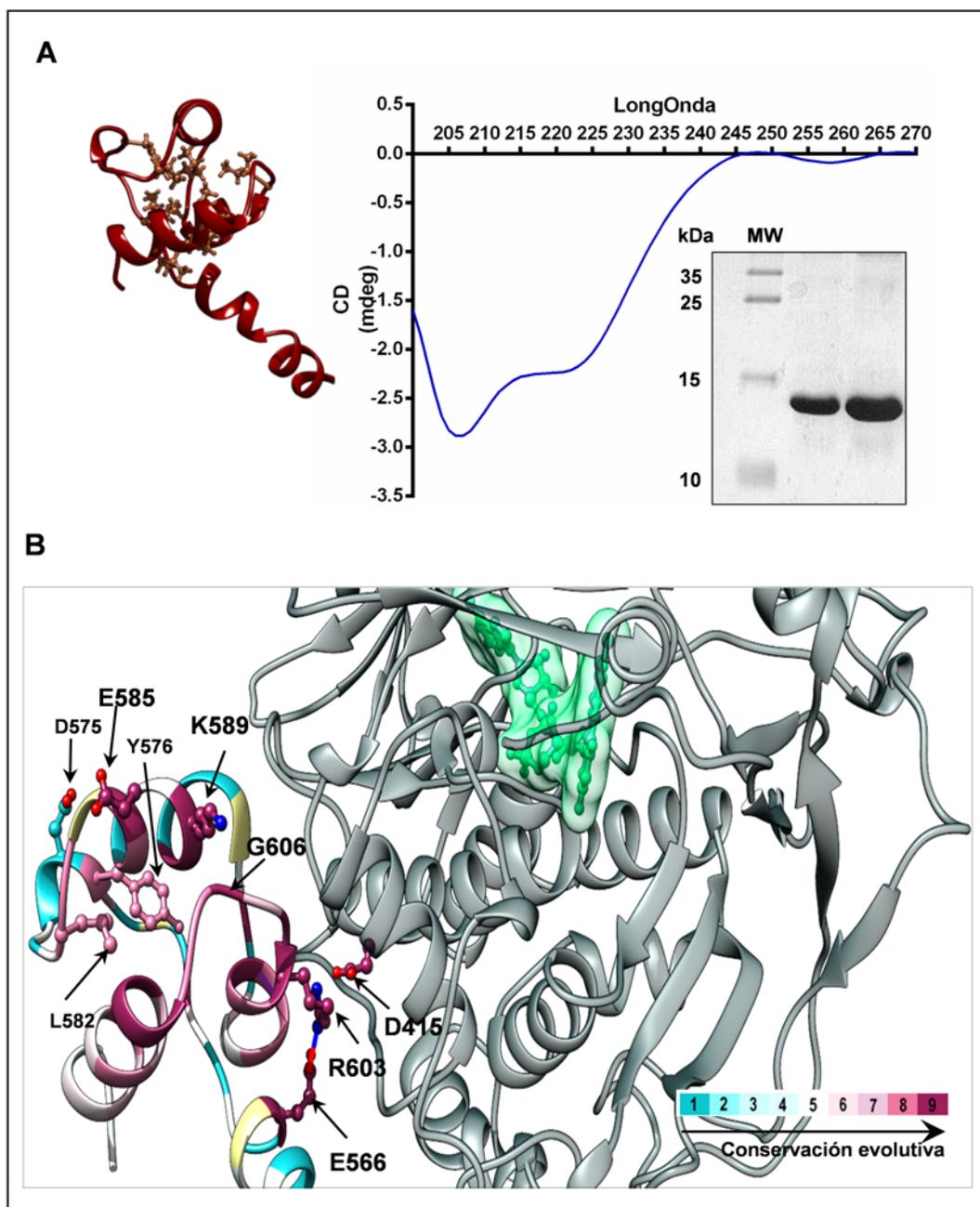


Figura 27: El C_{ARM} es un subdominio de MnmG conservado y estructuralmente independiente. A) A la izquierda se muestra una representación en cintas de la estructura de la región 535-629 de MnmG; a la derecha se muestra el espectro de CD UV/lejano del producto de purificación de la construcción MnmG(535-629) cuya pureza se aprecia en el análisis SDS-PAGE (inserto). B) Representación en cintas de un monómero de MnmG en el que se ha coloreado el C_{ARM} según su conservación evolutiva (leyenda), indicándose los residuos analizados en este estudio que se representan en varillas y bolas.

RESULTADOS Y DESARROLLO ARGUMENTAL

Los experimentos de SPR mostraron que la variante MnmG(535-629)-R603D no es capaz de interactuar con el resto de MnmG (**tabla 7**). Por otro lado, la afinidad de las variantes de MnmG(535-629)-E585K y G606A por MnmG(1-550) está también severamente afectada a pesar de que las estructuras publicadas no revelan ninguna interacción de estos residuos con el resto de MnmG (**figura 27B**). En cambio, la sustitución de la K589 por glutámico no altera la afinidad por el resto de MnmG aun estando situado en la misma cara que los residuos E585 y G606 por lo que cabe pensar que, tras el plegamiento del C_{ARM} sobre el núcleo catalítico, el residuo K589 no jugará un papel en la interacción. En resumen, estos resultados indican que MnmG puede adoptar una conformación en la que los residuos E585 y G606 interactúan con el resto de MnmG. Sin embargo, considerando que el estado oligomérico de MnmG(1-550) en solución es principalmente dimérico, no podemos discernir, a partir de estos experimentos, si el C_{ARM} interactúa solo con su propio protómero (a través, al menos, del residuo R603, como sugieren las estructuras) o, también, con el protómero opuesto.

Tabla 7. Afinidad de la unión entre variantes del C_{ARM} y el núcleo catalítico de MnmG

MnmG(535-629)	K _D (μM)	Interfaz
WT	14.9 ± 7.3	
E585K	143.0 ± 5.0	Interna
K589E	14.1	Interna
R603D	NB	Interna
G606A	>199.6	Interna

NB, unión no detectada

WT: se refiere a la proteína MnmG-(535-629) sin ningún cambio de residuo introducido

En la columna "Interfaz" se indica la situación relativa de los residuos en el C_{ARM}

NB: no se detecta unión

A la derecha se muestra un diagrama indicativo de cómo se analiza la interacción por SPR

El C_{ARM} de MnmG es capaz de unir MnmE a través de residuos situados en su cara externa.

Todas las variantes de MnmG(535-629) usadas para analizar la interacción con el resto de MnmG unen MnmE con afinidad similar (datos no mostrados), lo que sugiere que la interfaz de interacción C_{ARM}:MnmE no solapa con la formada por el C_{ARM} con el resto de MnmG. Para confirmar esta hipótesis nos propusimos identificar residuos del C_{ARM} implicados en la interacción con MnmE. Para ello, tuvimos en cuenta análisis previos de ITC que sugirieron que la interacción MnmE:MnmG está principalmente dirigida por contribuciones entrópicas y, por tanto, que fuerzas hidrofóbicas juegan un papel importante en esta interacción [82]. Así pues, decidimos cambiar, en la proteína MnmG completa, los residuos conservados hidrofóbicos Y576 y L582 (situados en la cara externa del C_{ARM}, opuesta a la cara que contiene los residuos E585 y G606) a glicina (**figura 27B**). También incluimos en este estudio la variante MnmG-D575K, en la que el cambio afecta a un residuo conservado (D575) situado en la misma cara que los anteriores pero con carácter hidrofílico. Por último, escogimos (en cierta forma, como control) un residuo conservado e hidrofílico, E566, situado en la cara interna pero que, en las estructuras publicadas, parece estar implicado en la interacción con el núcleo catalítico a través de un puente salino con el residuo R603 (**figura 27B** y **tabla 7**). Una vez introducidos estos cambios en la proteína MnmG completa, analizamos la capacidad de estas variantes para unir MnmE (mediante SPR) y modificar tRNA *in vivo* (**tabla 8**). Las variantes MnmG-Y576G y MnmG-L582G exhibieron constantes de afinidad más altas que la proteína WT (117 veces y 53 veces, respectivamente). Por lo tanto, estos residuos parecen estar implicados en la interacción con MnmE. Paradójicamente, la actividad de modificación de tRNA *in vivo* de la variante Y576G es mayor que la de la variante L582G, sugiriendo un segundo rol desconocido para el residuo L582. Nótese que el cambio en los dos residuos hidrofílicos, E566K y D575K, no parece afectar la unión a MnmE. Sin embargo, la capacidad para modificar el tRNA de estas dos variantes es muy diferente pues E566K es totalmente deficiente y D575K modifica tRNA perfectamente. Este dato apoya nuestra sospecha de que E566 está implicado en la interacción con el resto de MnmG, estabilizando la R603 (**figura 27B**) y de que esta interacción tiene profundas consecuencias funcionales. En general, nuestro análisis mutacional del C_{ARM} de MnmG sugiere que

el C_{ARM} puede interactuar con MnmE independientemente de estar acoplado al resto de MnmG o no, ya que las interfaces de interacción parecen no solapar.

Tabla 8. Cambios de residuos en el C_{ARM} disminuyen la afinidad entre MnmG y MnmE

MnmG	K_D (μ M)	Actividad (%)	Interfaz
WT	1.35 ± 0.61	100	
E566K	4.40	0	Interna
D575K	2.81 ± 1.85	100	Externa
Y576G	157.67 ± 18.34	42	Externa
L582G	71.50 ± 6.36	0	Externa

En la columna “Interfaz” se indica la situación relativa de los residuos en el C_{ARM} . A la derecha se muestra un diagrama que representa como se estudia en este caso la interacción entre MnmE y MnmG.

18.2. Formas moleculares de MnmG en solución obtenidas por Microscopía Electrónica de Transmisión.

Los resultados obtenidos por SPR indican que MnmG puede adoptar una conformación que no muestran las estructuras cristalinas manejadas habitualmente. Por tanto, es posible que MnmG adquiera más de una conformación y por cristalización sólo se haya detectado aquella en la que los C_{ARM} no están interactuando con el resto de la proteína. Para intentar captar otras conformaciones diméricas que MnmG pudiera adoptar en solución decidimos analizar MnmG por Microscopía electrónica (EM). Con este fin, usamos una dilución de la fracción dimérica obtenida por filtración en gel y la preparamos para visualizarla, mediante tinción negativa con acetato de uranilo, en el microscopio. En el laboratorio del Dr. López Carrascosa (CNB, CSIC), conseguimos obtener muestras de aspecto homogéneo de un tamaño que concuerda con el esperado para un dímero de MnmG (**figura 28**, arriba). Se seleccionaron manualmente 3054 partículas de 127 micrografías. Las imágenes de un tamaño de 80x80 píxeles fueron corregidas, alineadas, clasificadas y promediadas por máxima verosimilitud. Este procesamiento permitió obtener imágenes medias

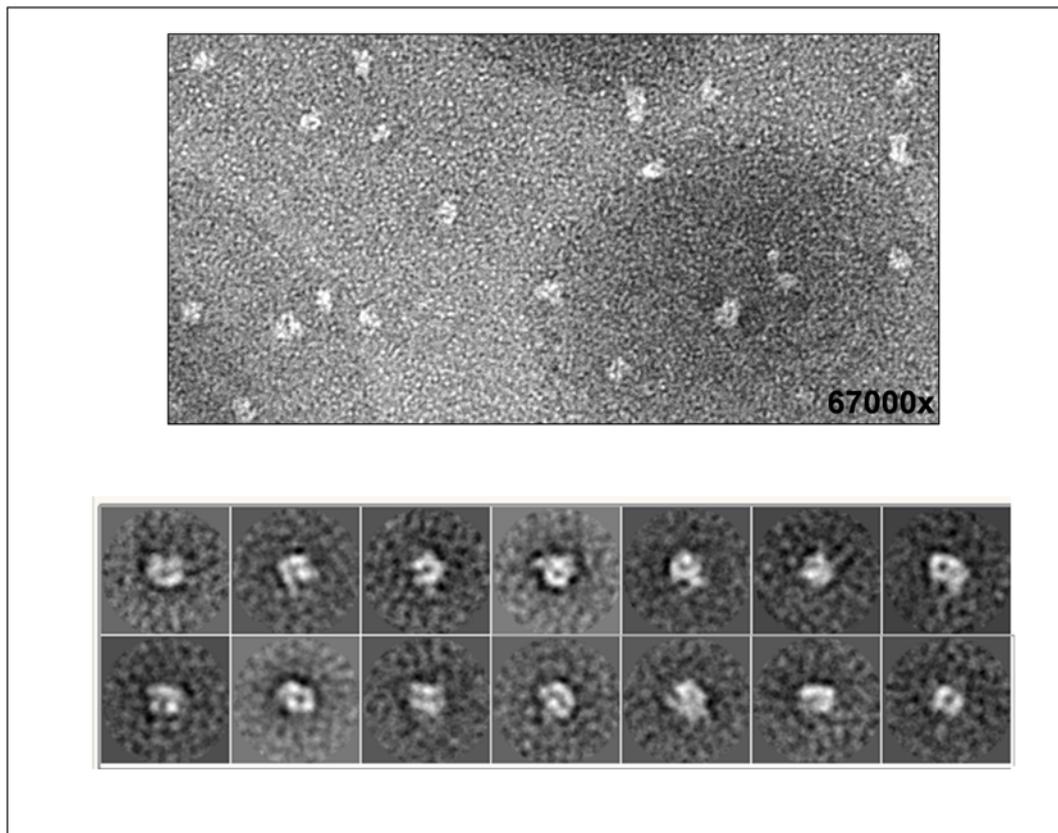


Figura 28: Imágenes de MnmG obtenidas por EM. Micrografía de una solución de MnmG teñida con acetato de uranilo (arriba) . El procesamiento posterior de las imágenes las agrupó en 14 clases (abajo) para su posterior reconstrucción tridimensional.

de mayor relación señal/ruido respecto a las imágenes individuales, lográndose visualizar con mayor resolución detalles de interés. A partir de 14 clases medias (**figura 28**, abajo) se obtuvieron finalmente dos volúmenes diferentes que indicaban la existencia de dos conformaciones diméricas de MnmG, a las que se asignaron 1639 imágenes (volumen A) y 1400 imágenes (volumen B).

Los volúmenes obtenidos, aunque tienen un tamaño y forma general similar, presentan diferencias destacables (**figura 29**). En ambos volúmenes podemos apreciar un núcleo del cual surgen dos protuberancias cuya distancia y orientación relativa varían de un volumen a otro. En el volumen cuya distancia entre las protuberancias es mayor (volumen A), el núcleo tiene una forma redondeada observándose un espacio intermolecular en el centro de éste (**figura 29**, panel superior). En cambio, en el volumen B el núcleo adquiere una forma más alargada en la que en lugar de un espacio intermolecular se observa una

depresión en la misma zona. Además, en el volumen B, aparecen dos espacios en forma de túnel situados simétricamente y cuya apertura apunta hacia el espacio entre las protuberancias (**figura 29**, panel medio e inferior).

Una vez obtenidas las reconstrucciones tridimensionales de las dos clases quisimos comparar los volúmenes obtenidos con la estructura dimérica cristalina de MnmG. Para ello ajustamos el PDB 2ZXI sobre los mapas 3D de los dos volúmenes A y B usando el programa Chimera [73] (**figura 30**). La estructura cristalina de MnmG cabe en los dos volúmenes obtenidos salvo por el C_{ARM} que no encaja en ninguno de los dos (**figura 30**, panel medio). Las protuberancias parecen corresponder a los N_{ARM} (la región no conservada del dominio helicoidal) y el resto del volumen al núcleo catalítico de MnmG. Aun así, las zonas correspondientes al núcleo catalítico parecen más ensanchadas en los volúmenes obtenidos por EM de lo que cabría esperar según las estructuras cristalinas. Por otro lado, no existe en la estructura cristalina ningún indicio del espacio intermolecular que se observa en el volumen A al igual que de los túneles observados en el volumen B. Por tanto, los resultados de EM sugieren que MnmG en solución, en ausencia de ligandos y en las condiciones utilizadas, adquiere un tipo de conformación dimérica que no coincide con la de las estructuras cristalinas manejadas en la literatura y en el que los C_{ARM} están probablemente interaccionando con el resto de la proteína (pues es lo que explicaría que los C_{ARM} sobresalgan en las superposiciones realizadas). Los datos de EM, junto con los cristalográficos, sugieren que existe una dinámica conformacional de MnmG que da lugar, al menos, a tres conformaciones:

- Una conformación en la que los C_{ARM} están relativamente separados del núcleo catalítico (PDB 3CP8, 2ZXI, **figura 26**).
- Dos conformaciones (o dos subtipos de la misma conformación) en las que los C_{ARM} están interaccionando con el resto de MnmG (EM, **figura 29**).

Considerando estos resultados, revisamos las formas diméricas depositadas en el PDB. Sorprendentemente, encontramos que una de las estructuras depositadas por Numata y colaboradores (PDB 2ZXH), llamada por ellos forma I, revela una configuración dimérica diferente al resto de las estructuras de MnmG depositadas. Como ya se ha explicado, la interfaz de dimerización de MnmG descrita en la literatura, incluyendo la publicación del grupo de Numata [68], está formada por una interacción antiparalela entre el dominio FAD

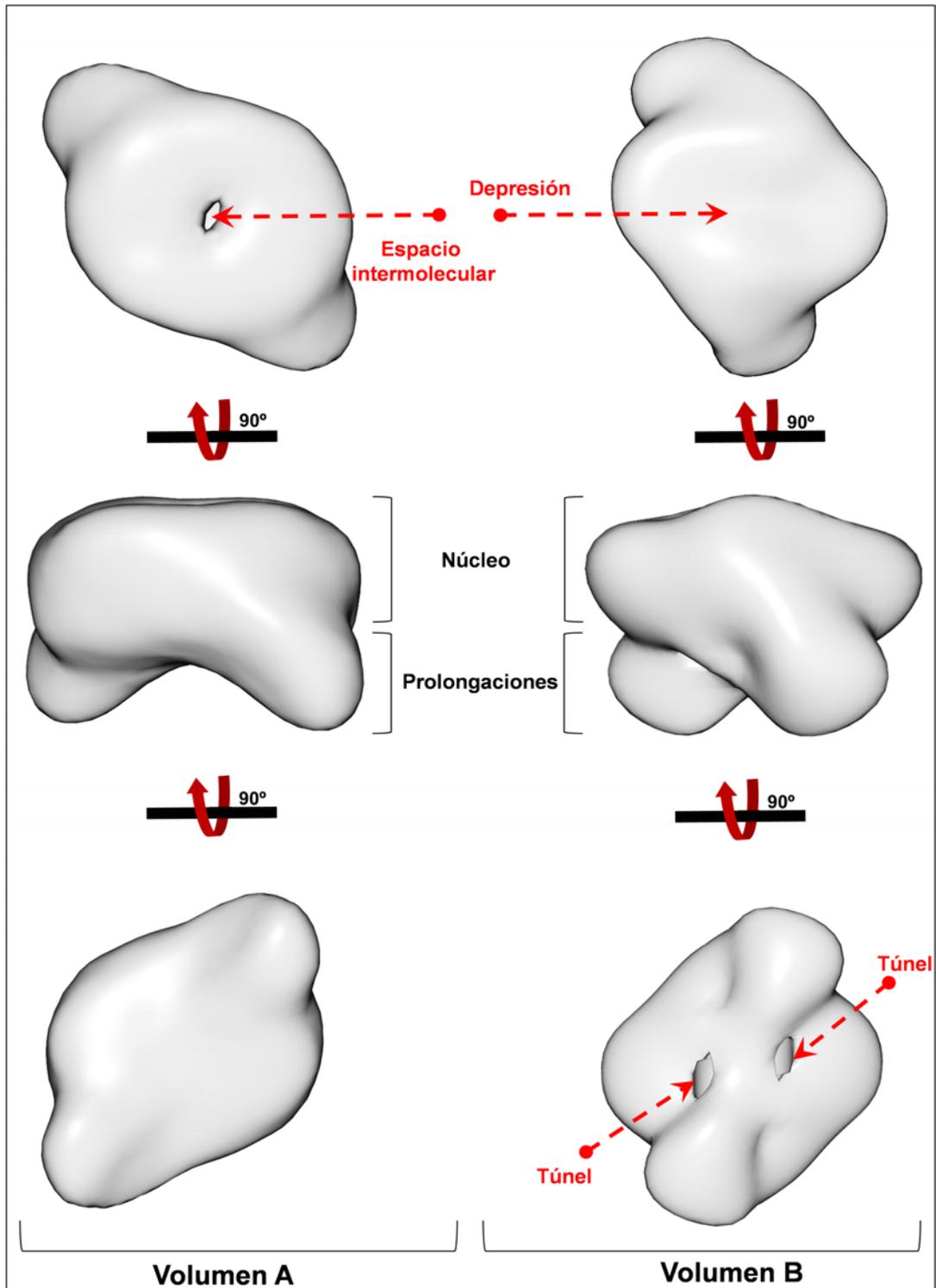


Figura 29: Volúmenes obtenidos en EM. Vistas de los mapas tridimensionales de MnmG obtenidos de las imágenes de EM por tinción negativa para la clase A (izquierda) y para la clase B (derecha). Las flechas rojas señalan espacios moleculares

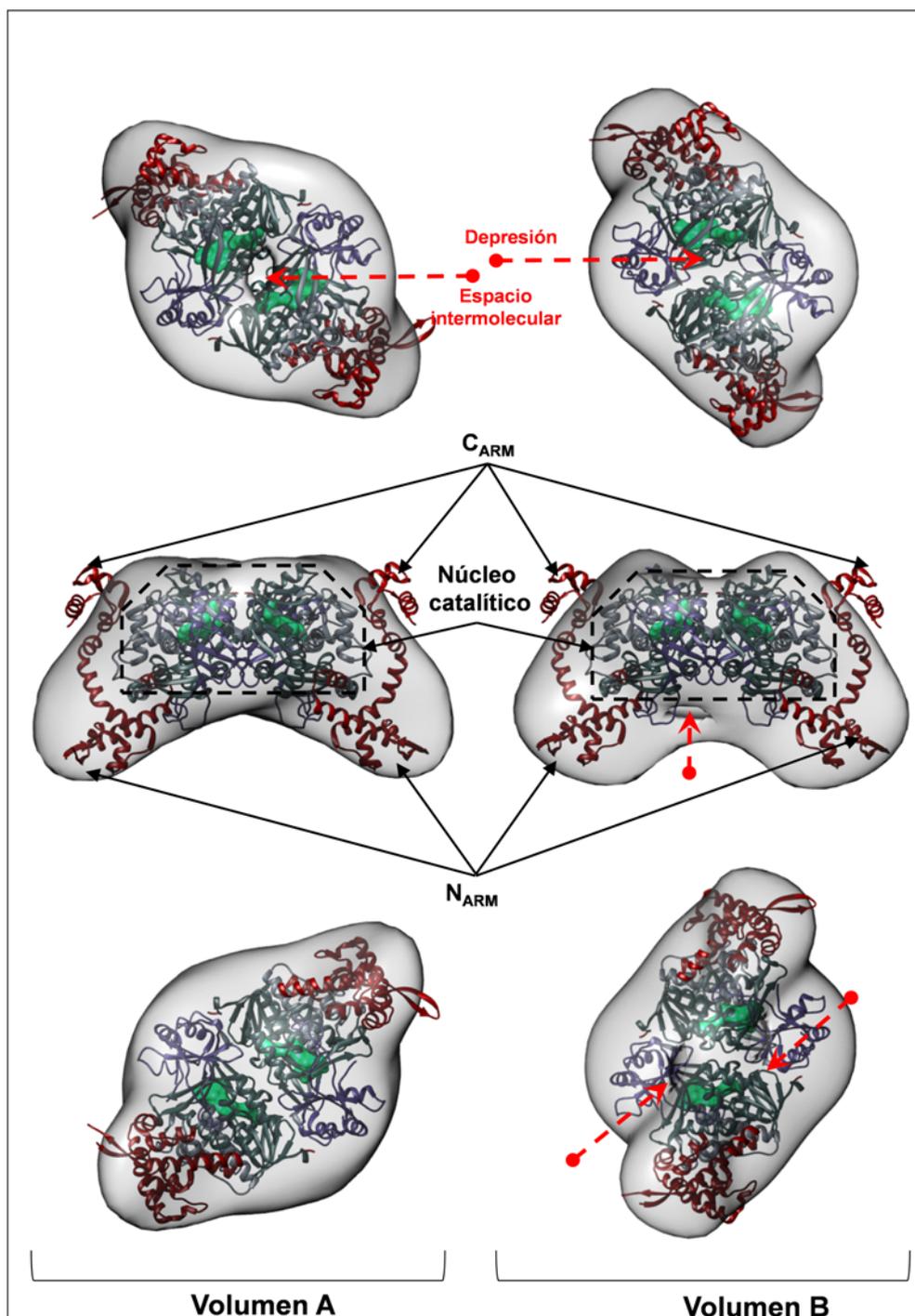


Figura 30: Superposición de la estructura cristalina dimérica de MnmG en los volúmenes obtenidos por EM. Diferentes vistas de una representación en cintas de la estructura dimérica de MnmG (PDB 2Z XI) ajustada en el mapa del volumen A (izquierda) y del volumen B (derecha). Las flechas rojas señalan la posición de los espacios moleculares y las negras las posiciones del C_{ARM} y N_{ARM} del dominio helicoidal y la del núcleo catalítico.

de un protómero y el dominio inserción del otro protómero. A la conformación que presenta esta interfaz la llamaremos forma II a partir de ahora, siguiendo la nomenclatura dada por Numata y colaboradores (**figura 26**). Sin embargo, la llamada forma I (PDB 2ZXH), y que ha pasado desapercibida hasta ahora, muestra un conformero alternativo, en el que la interfaz de dimerización está formada por la interacción entre el C_{ARM} de un protómero con los dominios FAD e inserción del protómero opuesto (**figura 31**). En esta conformación, el residuo E585 del C_{ARM} está a unos 4 Å de la conservada R196 del dominio FAD del protómero opuesto, pudiendo establecer una interacción electrostática. Esta forma dimérica concuerda con nuestros resultados mostrando que los cambios E585K y G606A impiden la interacción del C_{ARM} con el núcleo catalítico (**tabla 7**) y sustenta la propuesta de que tal interacción ocurre entre el C_{ARM} de un protómero y el núcleo catalítico del opuesto, estando mediada por la interacción del residuo E585 de un protómero y el R196 del otro. Es sorprendente que el grupo de Numata haya pasado por alto esta conformación I y base su estudio sobre las relaciones estructura-función en MnmG en la estructura de la forma II [68].

Cuando comparamos las estructuras monoméricas de MnmG solo encontramos cambios locales, nada que sugiriera una configuración dimérica diferente (**figura 20**). Las diferencias entre ambas configuraciones diméricas son debidas a un importante cambio en la orientación relativa de los protómeros que conduce a interfaces de dimerización totalmente distintas. De hecho, en la conformación alternativa I se forma un espacio intermolecular entre los protómeros, quedando los FAD apuntando hacia el interior, a diferencia de la conformación II clásica en la que los anillos de isoaloxacina apuntan hacia el exterior (**figuras 31 y 32A**). Realmente este espacio intermolecular de la conformación I está formado por los surcos, donde queda el FAD alojado, delimitados por los dominios FAD e inserción de cada protómero que hemos descrito con anterioridad (**figuras 9, 17, 18 y 26**). Analizando la superficie de la conformación I, se observan dos túneles cuya abertura apunta hacia la parte inferior del interior de la proteína y en la cual queda accesible el anillo de isoaloxacina del FAD (**figura 32B**). El espacio intermolecular de esta conformación dimérica I podría corresponder al espacio/depresión observados en los volúmenes A y B obtenidos por microscopía electrónica (**figura 29 y 33**), mientras que los túneles de FAD parecen corresponderse con los túneles detectados en el volumen B (**figura 29 y 34**). Por consiguiente, las dos

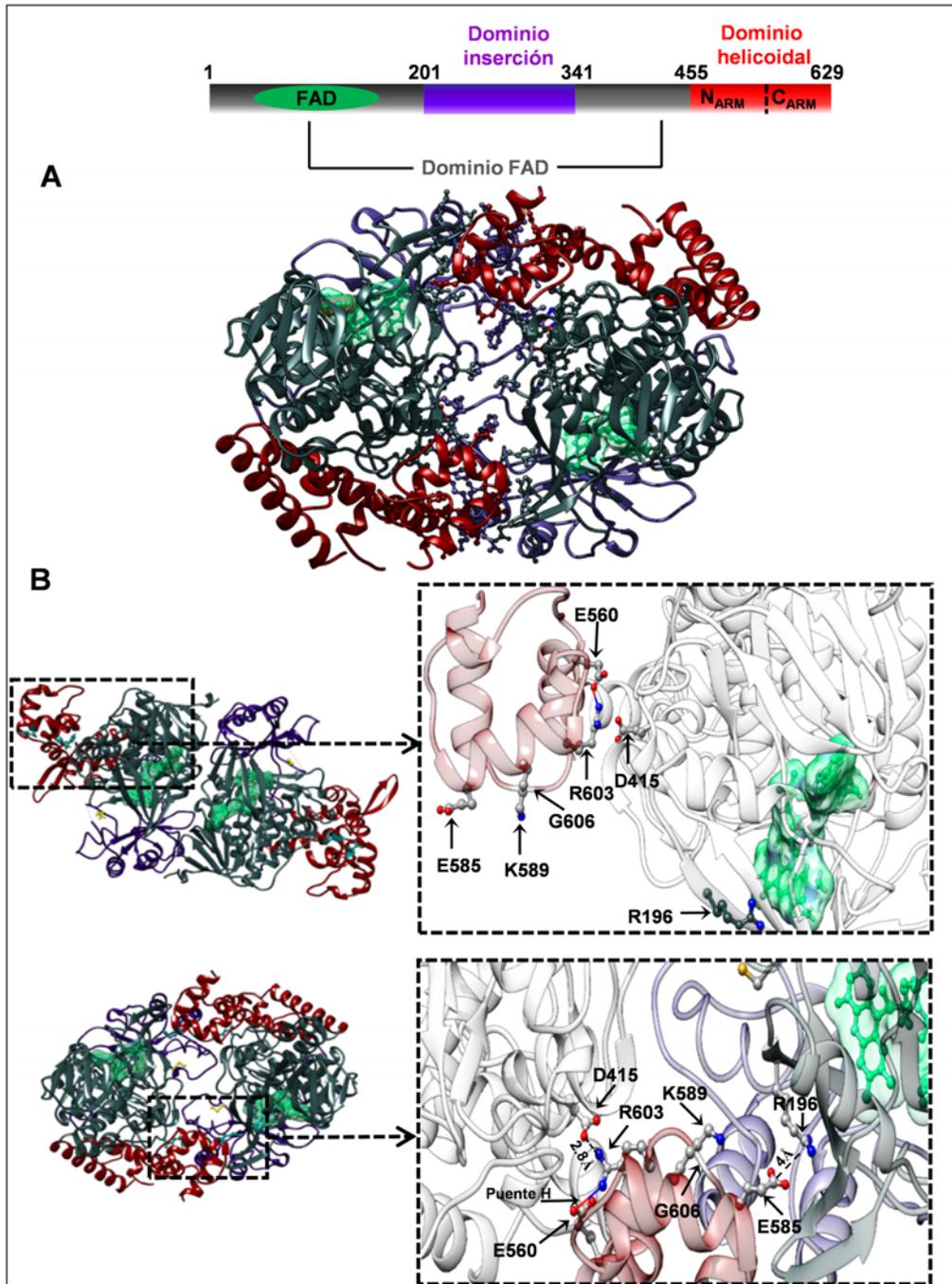


Figura 31: Estructura dimérica de la forma I de MnmG y diferencias con la forma II. A) Representación en cintas de la estructura de MnmG en la conformación I (PDB 2ZXH) con los dominios coloreados como indica el esquema (arriba). En varillas y bolas se representan los residuos que forman parte de la interfaz de dimerización B) Comparación estructural entre la forma II (arriba) y la forma I (abajo) de MnmG. A la derecha se amplían las zonas correspondientes a la cara interna del C_{ARM}, destacando en varillas y bolas residuos implicados en la interacción del C_{ARM} con el núcleo catalítico de MnmG del mismo protómero (blanco) o del protómero opuesto (gris oscuro).

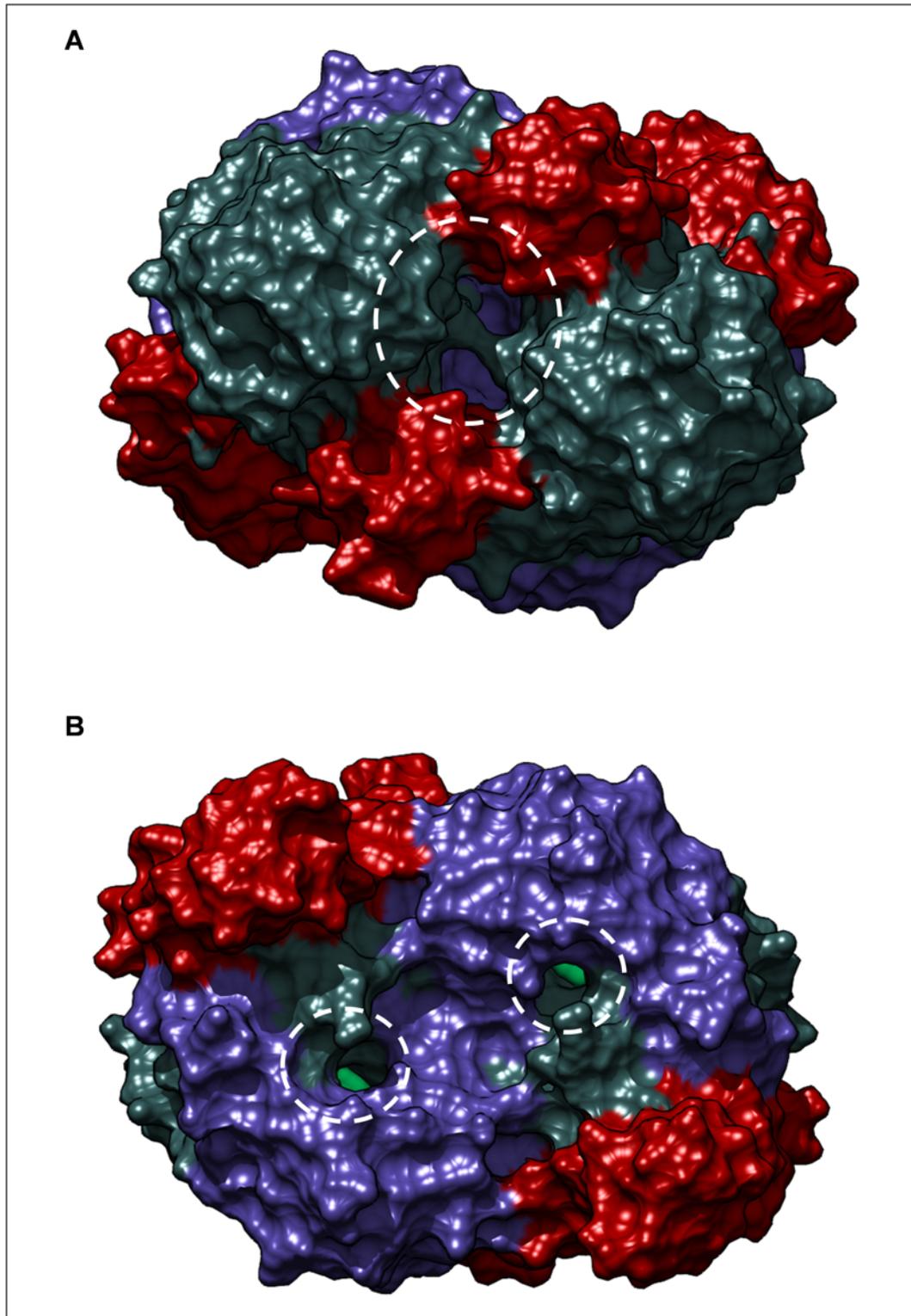


Figura 32: Espacios moleculares en la forma I de MnmG. Vista superior (arriba) e inferior (abajo) de una representación de la superficie de la forma I de MnmG coloreada por dominios donde se aprecia un espacio intermolecular así como dos túneles de acceso (líneas blancas) al FAD (verde).

conformaciones diméricas de MnmG obtenidas por cristalografía revelan dos orientaciones diferentes del núcleo catalítico de MnmG, además de importantes diferencias en la interacción de éste con el C_{ARM} .

Para analizar si la conformación dimérica alternativa de MnmG (forma I) se acopla a los volúmenes obtenidos por EM ajustamos el PDB 2ZXH sobre los mismos. En la superposición (**figura 35**) observamos que los N_{ARM} de los dominios helicoidales, una región poco conservada y muy flexible (móvil), no encajan con los volúmenes de EM. Sin embargo, el núcleo catalítico encaja perfectamente con el volumen B (**figura 35**) obtenido por EM, coincidiendo los túneles de FAD que se observan en la estructura con los túneles que se observan en los volúmenes de EM. Además, la depresión en el núcleo catalítico del volumen B coincide con el espacio intermolecular observado en la conformación cristalina (**figura 33 y 35**). Por otro lado, el núcleo catalítico del volumen A está más ensanchado que en la conformación cristalina, lo que resultaría en un espacio intermolecular más amplio y por tanto más visible en EM (dada la menor resolución de las estructuras obtenidas por EM que por cristalografía). Curiosamente, los túneles de FAD no se observan en el volumen A, sugiriendo un cierre de la accesibilidad a través de este túnel al sitio de unión del FAD.

El hecho que los N_{ARM} de la forma I de MnmG no encajen con las prolongaciones del volumen B podría deberse a que poseen una alta movilidad. Esto explicaría que en las estructuras obtenidas por cristalografía o EM adquieran posiciones diferentes. La unión de tRNA o MnmE podría estabilizar alguna de estas posiciones de los N_{ARM} . Para confirmar y visualizar la movilidad de los N_{ARM} decidimos realizar un análisis de modos normales de la forma I de MnmG usando el servidor web “Elnémo” [86]. El análisis generó una serie de modelos estructurales a partir de los cuales se compuso una animación en la que se aprecia un movimiento entre los N_{ARM} , variando la distancia entre ellos, acompañado de un movimiento de apertura y cierre del núcleo catalítico, al igual que sugiere la comparación entre los volúmenes obtenidos por EM (**figura 29 y animación 1**, archivo animaciones.ppt CD-Tesis). En conclusión, el análisis conjunto de los datos cristalográficos y de EM, indica la existencia de, al menos, tres conformaciones diméricas de MnmG. Dos configuraciones cuya interfaz de dimerización está formada por la interacción del C_{ARM} con el núcleo catalítico de su protómero opuesto, siendo una más ensanchada que otra, y una tercera donde la interfaz de dimerización es la clásicamente descrita en la literatura y en la que los C_{ARM} quedan separados del núcleo catalítico.

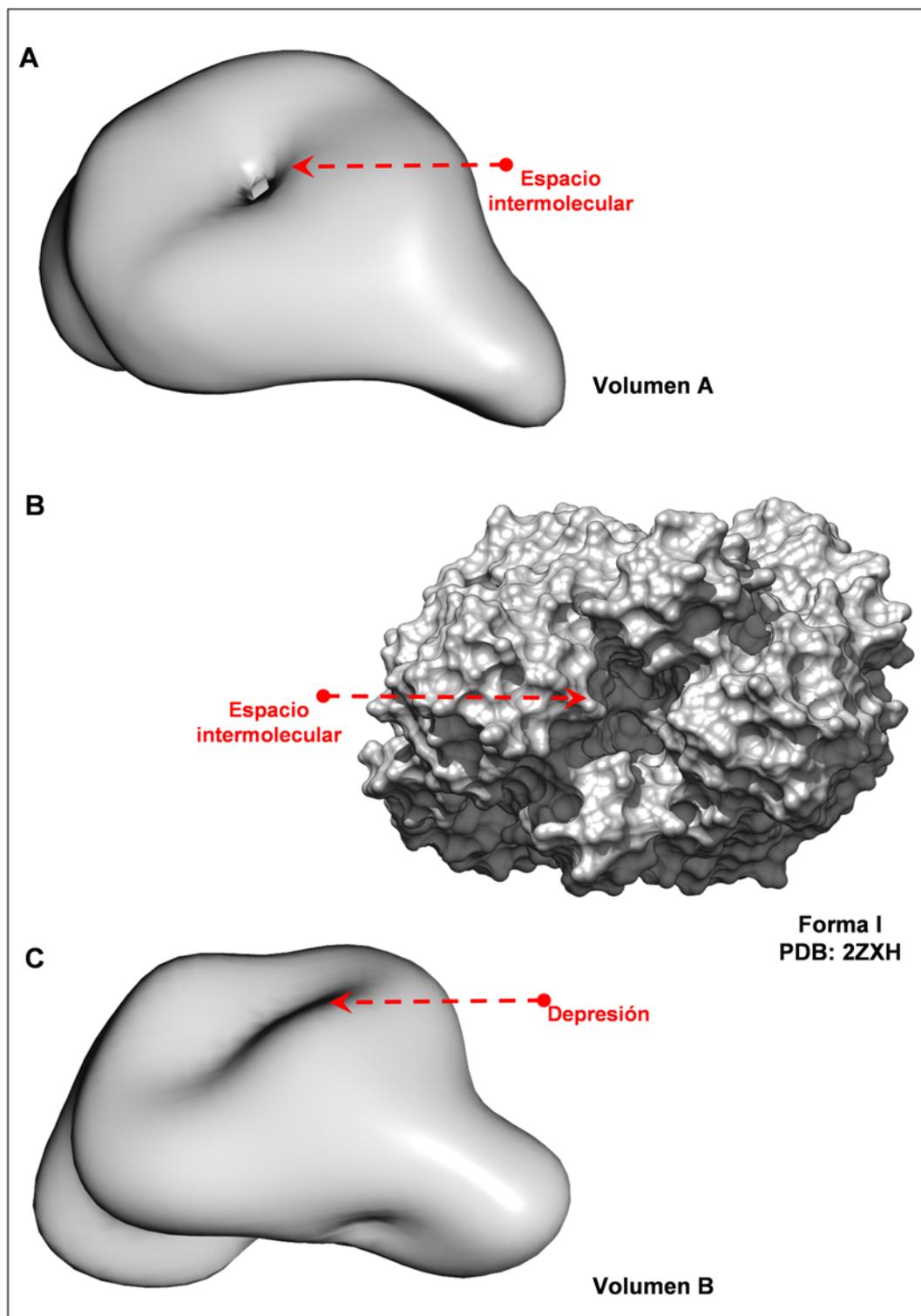


Figura 33: Comparación de los volúmenes de MnmG obtenidos por EM con la superficie de la forma I obtenida por cristalografía. **A)** Volumen A donde se indica la posición del espacio intermolecular. **B)** Representación de la superficie de la forma I de MnmG señalando el espacio intermolecular entre los protómeros. **C)** Volumen B donde se indica la posición de la depresión observada

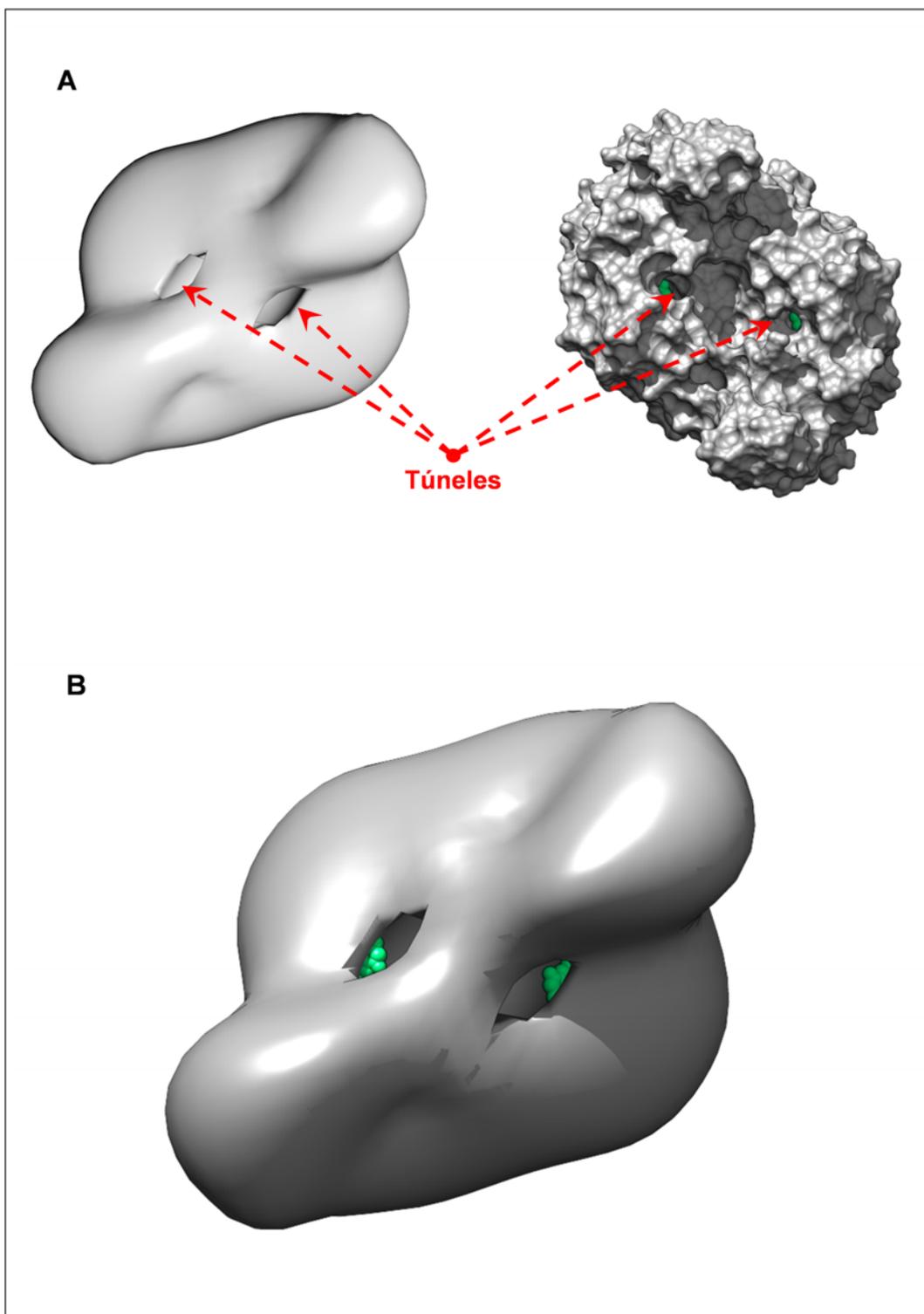


Figura 34: Comparación del volumen B de MnmG obtenido por EM con la superficie de la forma I obtenida por cristalografía. **A)** Túneles observados en el volumen B (izquierda) y en la forma I (derecha) de MnmG representándose en verde el FAD. **B)** Volumen B de MnmG en el que se ha ajustado la forma I de MnmG de la que se muestran únicamente los FAD (verde).

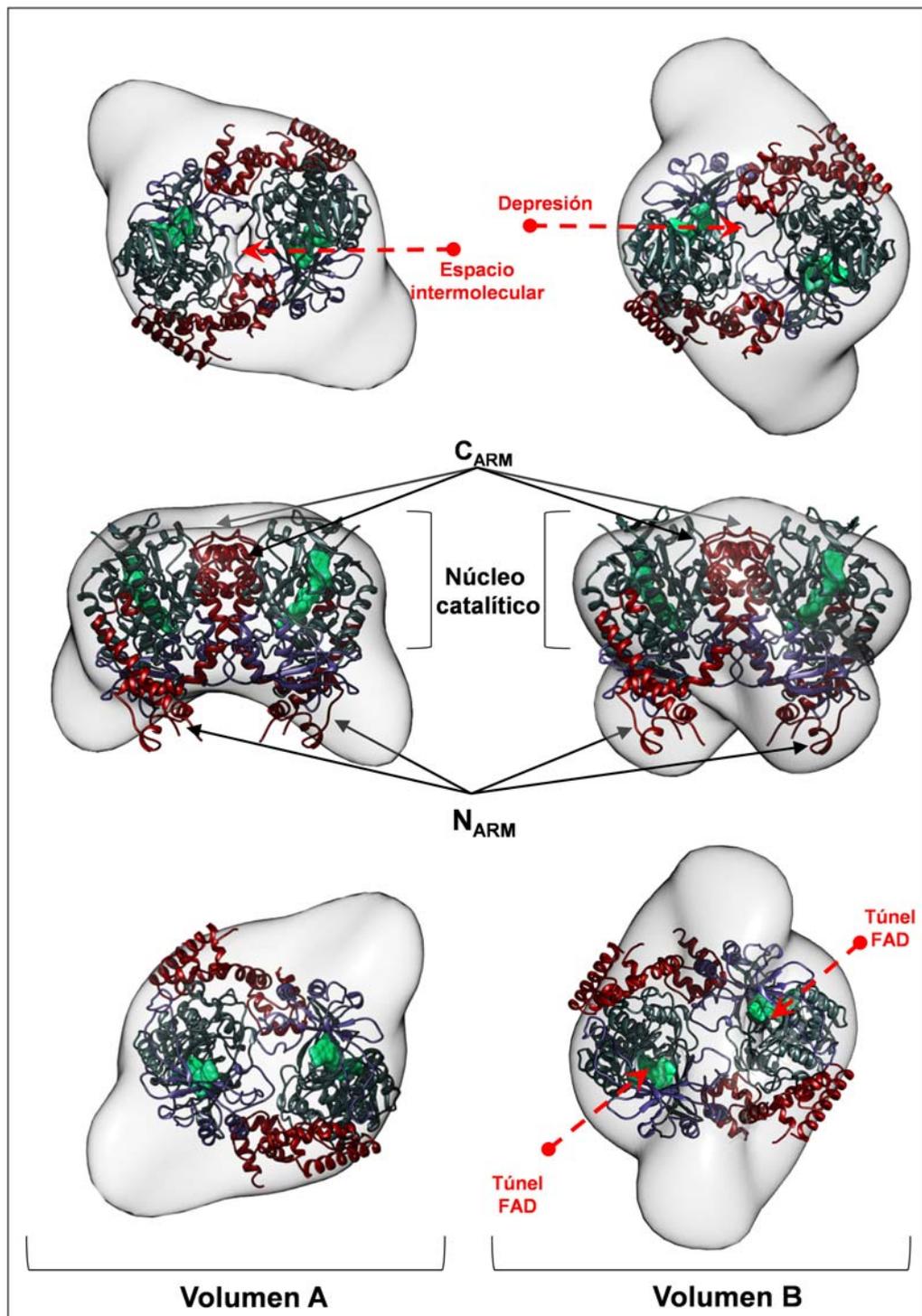


Figura 35: Superposición de la forma I de MnmG en los volúmenes obtenidos por EM. Diferentes vistas de una representación en cintas de la estructura dimérica de la forma I de MnmG (PDB 2ZXH) ajustada en el mapa del volumen A (izquierda) y del volumen B (derecha). Flechas discontinuas marcan la posición de los espacios moleculares y los FAD se representan en verde.

18.3. Detección de enlaces intermoleculares en el núcleo catalítico de MnmG.

Los datos obtenidos por SPR y EM indican que MnmG, en solución, adopta principalmente una conformación en la que los C_{ARM} están interaccionando con el núcleo catalítico. Por otro lado la estructura cristalina de la forma I muestra una conformación de MnmG, con una interfaz de dimerización alternativa, cuyo núcleo catalítico parece encajar mejor con los volúmenes obtenidos por EM que la forma II (clásica) de MnmG. Para confirmar que MnmG, en solución y en ausencia de ligandos, está adoptando principalmente la interfaz de dimerización correspondiente a la forma I, buscamos diferencias clave entre ambas interfaces que pudieran afectar al equilibrio entre ambas formas. En la estructura cristalina de la forma II (con los C_{ARM} separados), los residuos conservados D289 (localizado en el dominio inserción) de un protómero y R436 (localizado en el dominio FAD) del protómero opuesto están a una distancia de 83 Å (**figura 36A**). En cambio, en la forma I estos residuos están interaccionando formando un puente salino (**figura 36B**). Estos datos estructurales, junto con nuestra observación previa de que la mutación R436A abole la modificación de tRNA *in vivo* [82], nos llevó a considerar que el puente salino intermolecular R436-D289 podría ser esencial en la estabilización del núcleo catalítico de la forma I de MnmG. Por otro lado, nuestros resultados indican que el cambio E585K afecta a la interacción del C_{ARM} con el núcleo catalítico de MnmG (**tabla 7**).

Si estos residuos están implicados en la estabilización de la conformación I, la sustitución por alanina de la R436 así como el cambio E585K debería producir una alteración del volumen hidrodinámico de MnmG. Si esto es así, observaríamos un cambio en el patrón de migración en una electroforesis Roja Nativa (NRE) [20]. NRE se basa en el mismo principio que los geles de acrilamida “Blue Native” pero usando rojo Ponceau en vez de azul de Coomassie. Las proteínas se separan en los geles NRE, en los que mantienen su conformación nativa, solo en función de su masa y forma, dada la carga negativa aportada por el rojo Ponceau. Como el objetivo era comparar en cada gel variantes de MnmG que tienen la misma masa hicimos el gel con un porcentaje de acrilamida determinado (no en gradiente como es más habitual) y en presencia de rojo Ponceau. De esta forma pensábamos obtener suficiente resolución en la separación de proteínas para comparar diferentes estados diméricos de

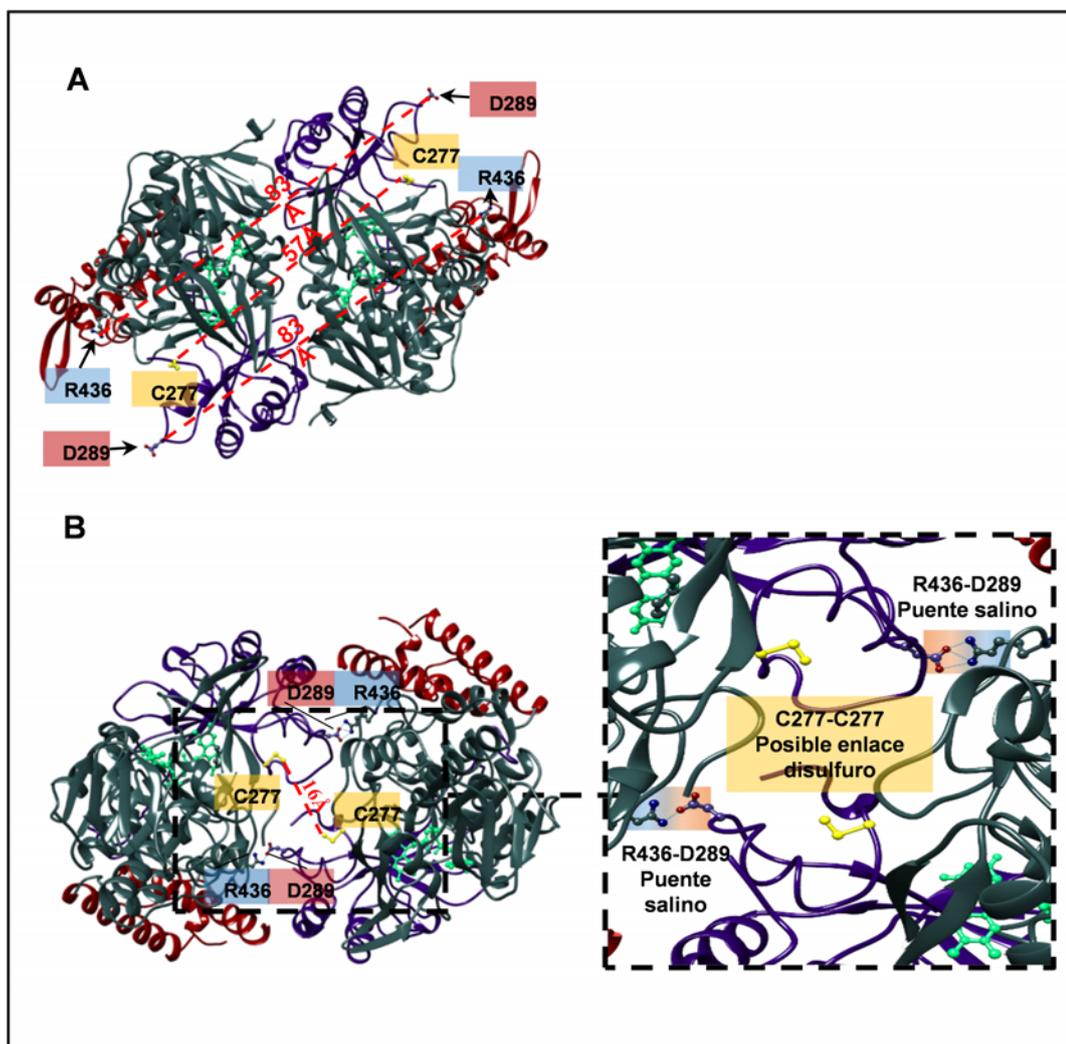


Figura 36: Comparación estructural entre los núcleos catalíticos de las formas I y II de MnmG. Representación en cintas la región 1-550 de la forma II (A) y de la forma I (B) de MnmG, mostrando las distancias intermoleculares entre los residuos C277 y entre la R436 y la D289 de protómeros opuestos. El espacio intermolecular de la forma I está ampliado (derecha) pudiéndose apreciar el puente de hidrógeno (línea azul) entre la R436 y el D289 de protómeros opuestos. También se destacan en amarillo las C277 enfrentadas y situadas en dos largos lazos (morado), lo que les da capacidad de movimiento. El FAD se representa en color verde.

MnmG. Específicamente, consideramos que la estrategia podría ser apropiada para comprobar que MnmG en solución está adoptando principalmente la conformación dimérica I, tal y como apuntan nuestros experimentos de EM, mediante la comparación de la migración de MnmG y sus variantes MnmG-E585K y MnmG-R436A, por un lado, y las variantes MnmG(1-550)-WT y MnmG(1-550)-R436A, que carecen del C_{ARM}, por otro.

Los geles NRE mostraron que MnmG-WT migra con una movilidad mayor que las variantes MnmG-E585K y MnmG-R436A (**figura 37A**). Debido a que la diferencia de migración entre MnmG-WT y MnmG-R436A es pequeña, cargamos esta última a ambos lados de la proteína WT para asegurarnos de que las diferencias de migración no eran debidas a otro motivo. Como se aprecia en la **figura 37A**, la proteína WT migró más rápido que las muestras de R436A que la acompañaban en los carriles colindantes. Además, cuando comparamos el cambio R436A en la variante de MnmG que carece del C_{ARM} (**figura 37B**), el cambio en el patrón de migración es mucho más evidente. Por tanto, estos datos indican que MnmG está adoptando una conformación dimérica dependiente de los residuos E585 y R436 lo que correspondería únicamente con la forma I de MnmG (**figura 31**).

Otro rasgo diferencial importante entre ambas conformaciones cristalinas es la distancia intermolecular entre los estrictamente conservados residuos C277 (localizados en el dominio inserción). En la forma I la distancia intermolecular C277-C277 es mucho menor (16 Å) que en la forma II (53 Å) (**figura 36 y 38**). A pesar de que 16 Å es una distancia demasiado larga para que pueda formarse un enlace disulfuro, ambas cisteínas quedan encaradas, aisladas del solvente y localizadas en dos largos y flexibles lazos que pueden permitir el acercamiento entre ambas. Dado que la C277 ha sido propuesta como residuo catalítico [42][68] la formación de un puente disulfuro entre las C277 de cada protómero, a pesar del citoplasma reductor de *E. coli*, es factible si la C277 es oxidada como consecuencia del ciclo catalítico de MnmG y queda protegida del solvente.

Para comprobar si es posible la formación de tal puente disulfuro, que estabilizaría la conformación dimérica de MnmG, las proteínas MnmG-WT, MnmG-C277S, MnmG-E585K y MnmG-C47S fueron analizadas en condiciones desnaturalizantes mediante SDS-PAGE en presencia y ausencia de agente reductor (DTT, 20 mM). La C47 es un residuo estrictamente conservado situado a una distancia de 3 Å del átomo N5 del anillo de isoaloxacina del FAD

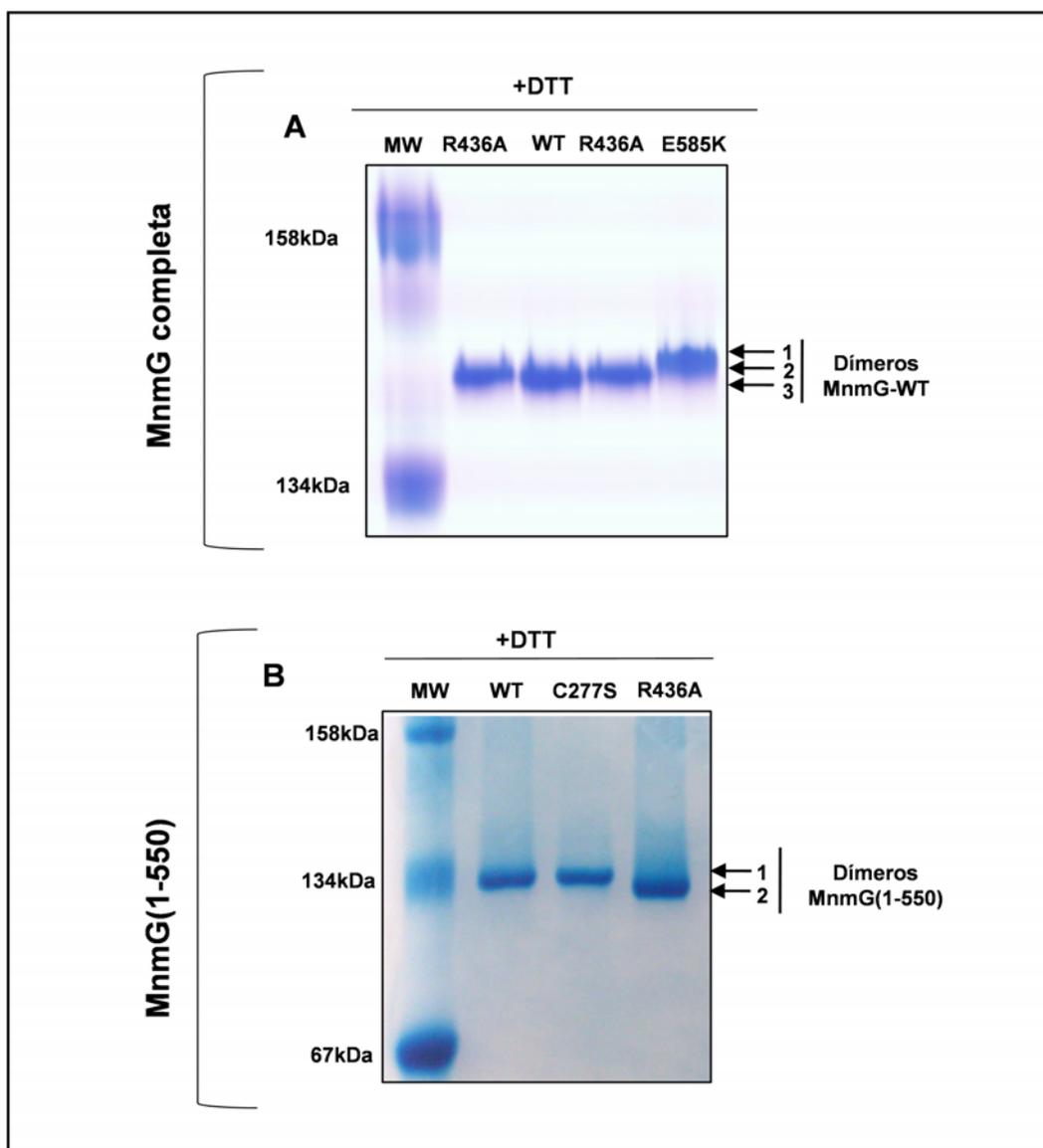


Figura 37: MnmG existe en una conformación dimérica estabilizada por los residuos **R436** y **E585**. Electroforesis Rojo-Nativa (NRE) en presencia de agente reductor en la que se compara la migración de los dímeros de las variantes indicadas de la proteína MnmG completa (A) y en ausencia del C_{ARM} , MnmG(1-550) (B).

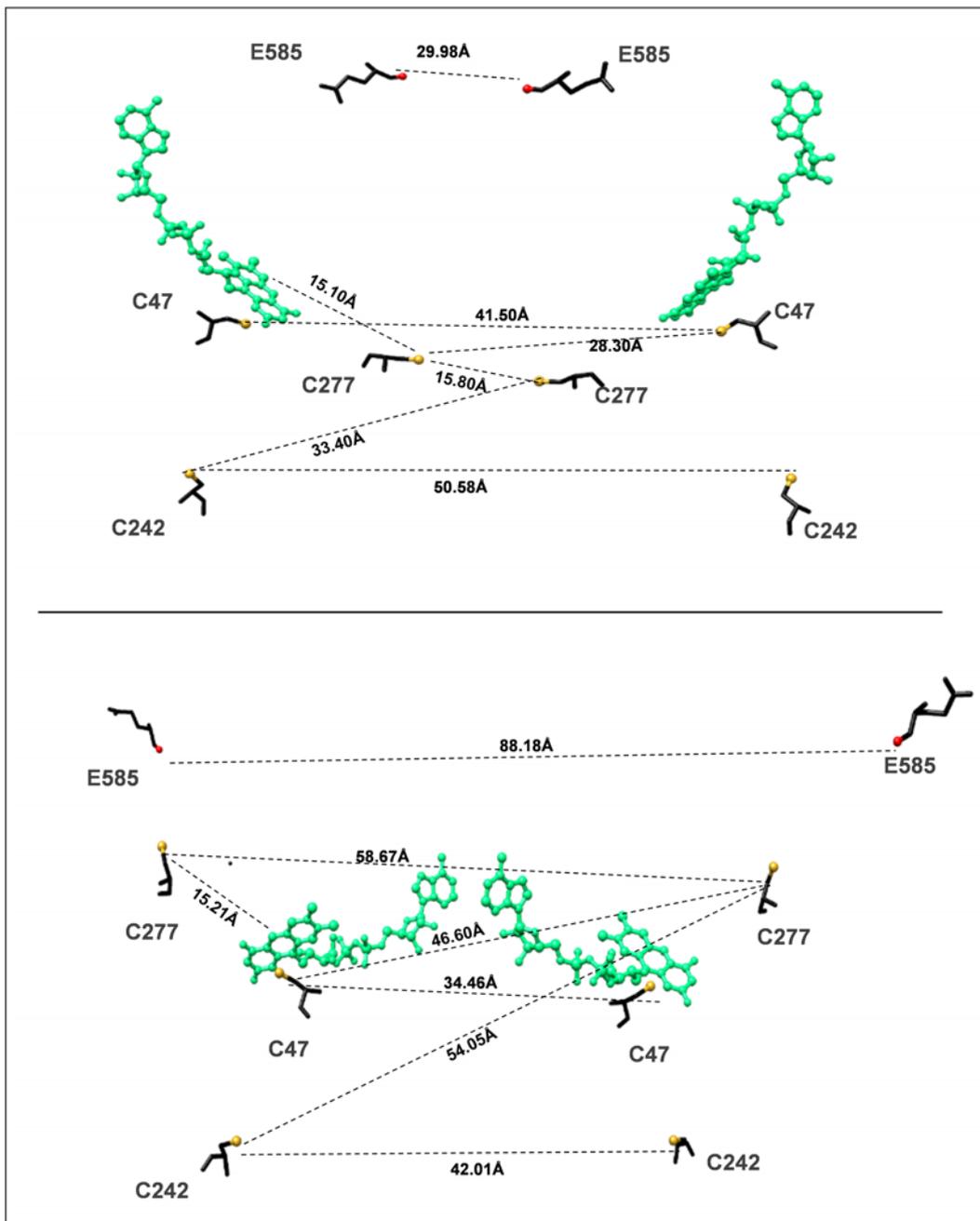


Figura 38: Distancias intermoleculares entre las Cys conservadas de MnmG en las conformaciones I y II. En la forma I de MnmG (panel superior) la distancia intermolecular entre las C277 es aproximadamente 40 Å menor que en la forma II de MnmG (panel inferior) .

(**figura 24 y 38**) y su sustitución por Ser o Ala impide la modificación de tRNA *in vivo* y disminuye drásticamente la afinidad por FAD (**Tabla 5**). Al igual que proponemos para la C277, la C47 podría ser oxidada por una reacción mediada por el FAD de MnmG, pero la distancia intermolecular con cualquier Cys del protómero opuesto es demasiado larga para formar un puente disulfuro (**figura 38**). Las muestras fueron tratadas con 20 mM de iodoacetamida antes de la desnaturalización térmica. La iodoacetamida alquila irreversiblemente los grupos tioles libres (SH) de las cisteínas, impidiendo la formación *de novo* de puentes disulfuro durante la manipulación de las muestras. En la **figura 39A** (izquierda), el análisis SDS-PAGE en ausencia de agente reductor muestra la aparición de una banda adicional de migración retrasada en los carriles correspondientes a MnmG-WT, MnmG-C47S y, en mucha menor proporción, MnmG-E585K; sin embargo, no se aprecia esta banda en el carril correspondiente a la variante C277S. En presencia de agente reductor (20 mM de DTT) no se detecta banda retrasada en ninguna muestra (**figura 39A**, derecha). MnmG posee dos cisteínas además de C47 y C277, la conservada C242 y la no conservada C418, pero sus distancias intermoleculares son mayores de 30 Å en las dos configuraciones cristalinas de MnmG (como es el caso de la C47), eliminado la posibilidad de formar un puente disulfuro intercatenario en condiciones nativas (**figura 38**). De hecho, el resultado obtenido con la variante C277S indica que es la C277 la única responsable de la formación del puente disulfuro que se aprecia en la proteína WT y en las variantes C47S y (en menor medida) E585K (**figura 39A**, izquierda).

Estos resultados indican que, como habíamos supuesto, es posible la formación de un enlace disulfuro entre las C277 y sugieren que parte del dímero de MnmG está estabilizado por dicho puente. También sugieren que la interacción de los C_{ARM} con el núcleo catalítico a través de E585 es importante para que el puente disulfuro entre las C277 se forme o sea estable, ya que la cantidad de dímero está muy disminuida en la variante E585K (**figura 39A**, izquierda). Esta interacción entre el C_{ARM} y el núcleo catalítico puede ser importante para que las C277 queden aisladas del citoplasma reductor de *E. coli* y así se puedan mantener oxidadas.

Dado el resultado descrito arriba, quisimos ver hasta qué punto el puente disulfuro entre las C277 puede formarse en ausencia del C_{ARM} y alterar la forma dimérica del núcleo catalítico de MnmG. Para ello, comparamos en NRE la migración de las formas oxidadas de MnmG(1-550)-WT, MnmG(1-550)-

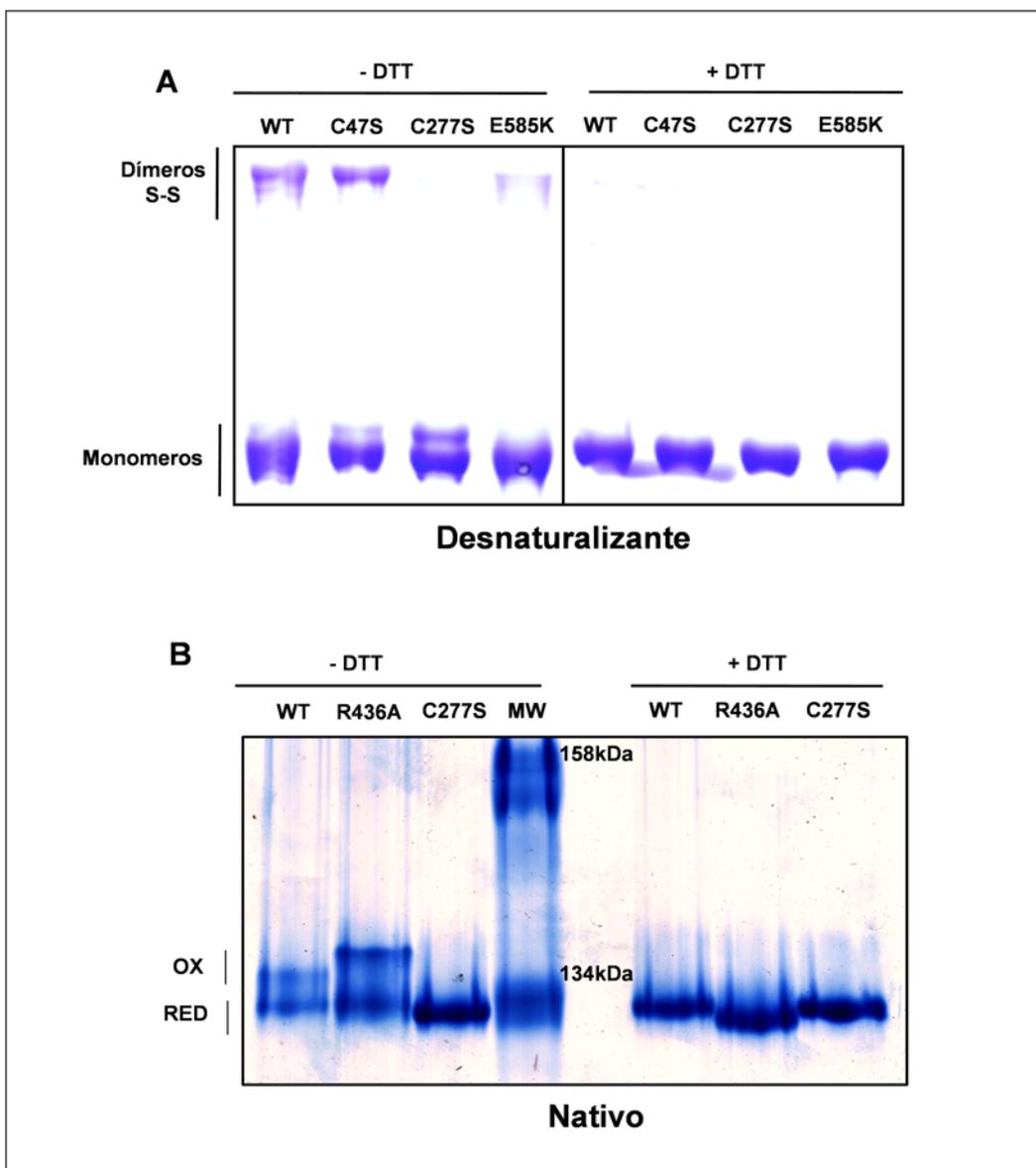


Figura 39: MnmG puede adoptar una conformación dimérica enlazada por un puente disulfuro intermolecular entre las C277 de cada protómero. A) SDS-PAGE en presencia y ausencia de agente reductor (DTT) de las variantes de la proteína MnmG completa que se indican. B) NRE comparando las variantes del núcleo catalítico de MnmG [MnmG(1-550)] indicadas, tras el proceso de diálisis, en ausencia (izquierda) o presencia (derecha) de agente reductor.

C277S y MnmG(1-550)-R436A. Todas estas variantes fueron dializadas 36 h, en agitación, en un tampón Tris-HCl 50 mM pH 7.5, 500 mM NaCl y 5 mM MgCl₂ para eliminar cualquier traza de agente reductor y permitir que las proteínas se oxidaran por acción del oxígeno ambiental. El análisis por NRE de las proteínas dializadas mostró la presencia de una banda retardada en las muestras de MnmG(1-550)-WT y MnmG(1-550)-R436A pero no en la muestra de MnmG(1-550)-C277S (**figura 39B**, izquierda). Las bandas retrasadas desaparecieron cuando las proteínas fueron reducidas con DTT, lo que indica que estas bandas corresponden a conformaciones diméricas de MnmG(1-550) dependientes de las C277 oxidadas.

Estos datos indican que el puente disulfuro entre las C277 puede formarse incluso en ausencia del C_{ARM}(tras 36 h de diálisis) y del puente salino intermolecular R436-D289 (**figura 39B**). La forma más retrasada de MnmG(1-550)-R436A oxidada debe corresponder al dímero del núcleo catalítico de MnmG(1-550) enlazado por el puente C277-C277 pero en una conformación más extendida que en MnmG(1-550)-WT, dado que el puente salino R436-D289 no puede formarse. Debe notarse, a partir de los datos arriba descritos, que la conformación del núcleo catalítico dimérico (en ausencia del C_{ARM}) es alterada tanto por la disrupción del puente disulfuro entre las C277 como de los puentes salinos intermoleculares R436-D289 (**figura 39B**, izquierda). La reducción del puente disulfuro en la variante de la proteína completa MnmG-E585K (**figura 39A**, izquierda) sugiere que la interacción del C_{ARM} con el núcleo catalítico contribuiría al aislamiento de las C277 del citoplasma reductor de *E. coli* permitiendo la formación y el mantenimiento del puente disulfuro. Dado que ambos enlaces intermoleculares (R436-D289 y C277-C277) pueden formarse en ausencia del C_{ARM}, proponemos que el C_{ARM} actúa como una especie de candado que estabiliza el núcleo catalítico en conformación I, candado que deberá abrirse para que la interfaz de dimerización del núcleo catalítico pueda transitar desde la forma I a la II.

En conjunto, nuestros resultados indican que MnmG en solución está preferentemente adoptando la conformación dimérica I (PDB 2ZXH), en la que el C_{ARM} de un protómero interacciona con el núcleo catalítico del opuesto (a través, en parte, de la E585) y que la interacción entre los dos núcleos catalíticos está estabilizada por dos puentes salinos intermoleculares R436-D289 y, al menos parte de ella, por un puente disulfuro entre las C277 (**figuras 36B**, **37** y **39**). Esta organización determina el volumen hidrodinámico de

MnmG. Los resultados de NRE muestran que el núcleo catalítico dimérico de MnmG adquiere una conformación más ensanchada cuando el puente disulfuro (C277-C277) está formado (**figura 39B**, izquierda), lo que sugiere que esta conformación podría corresponder al volumen A obtenido por EM (**figura 29** y **33**). Dado que las imágenes de EM se obtuvieron en ausencia de agente reductor y las C277 quedan totalmente aisladas del solvente, es posible que en las muestras de EM tengamos una mezcla de formas oxidadas y reducidas de MnmG, correspondiendo las más ensanchadas (volumen A) a una conformación estabilizada por el puente disulfuro intermolecular C277-C277, además de por el puente salino R436-D289, y el volumen B a una conformación estabilizada por el puente salino pero teniendo las C277 reducidas, tal y como muestra el PDB 2ZXH, (**figura 31**). En el volumen A obtenido por EM, el núcleo catalítico de MnmG tiene una forma más redondeada y ensanchada que en el volumen B (**figura 29**), abriéndose el espacio intermolecular entre los protómeros y cerrándose los túneles de FAD de cada protómero. Así pues, la interacción entre las C277 podría regular la accesibilidad del FAD (y por tanto del centro catalítico) a los diferentes sustratos requeridos para la modificación de tRNA (tRNA, MTHF y glicina o amonio).

18.4. El núcleo catalítico de MnmG interacciona con el dominio N-terminal de MnmE dependiendo de su estado redox.

Como ya se ha comentado, la conformación dimérica I tiene los FAD orientados de tal manera que los reactivos anillos de isoaloxacina apuntan hacia el espacio intermolecular, a diferencia de lo que ocurre en la forma II en la que ambas moléculas de FAD apuntan en sentidos opuestos hacia el exterior de la proteína (**figura 31**). Por tanto, las dos configuraciones diméricas implican dos diferentes orientaciones de los centros catalíticos de MnmG. La formación del centro catalítico del complejo MnmEG, a través de la interacción entre los sitios de unión de MTHF en MnmE y de FAD en MnmG, debe ser muy distinta si MnmG adopta la forma I o la forma II.

Los modelos publicados del complejo MnmEG, basados en las estructuras cristalinas de los dímeros, [60, 28] solo han tenido en cuenta la conformación dimérica correspondiente a la forma II. Dado que nuestros resultados apuntan a que MnmG en solución está adoptando principalmente la conformación I,

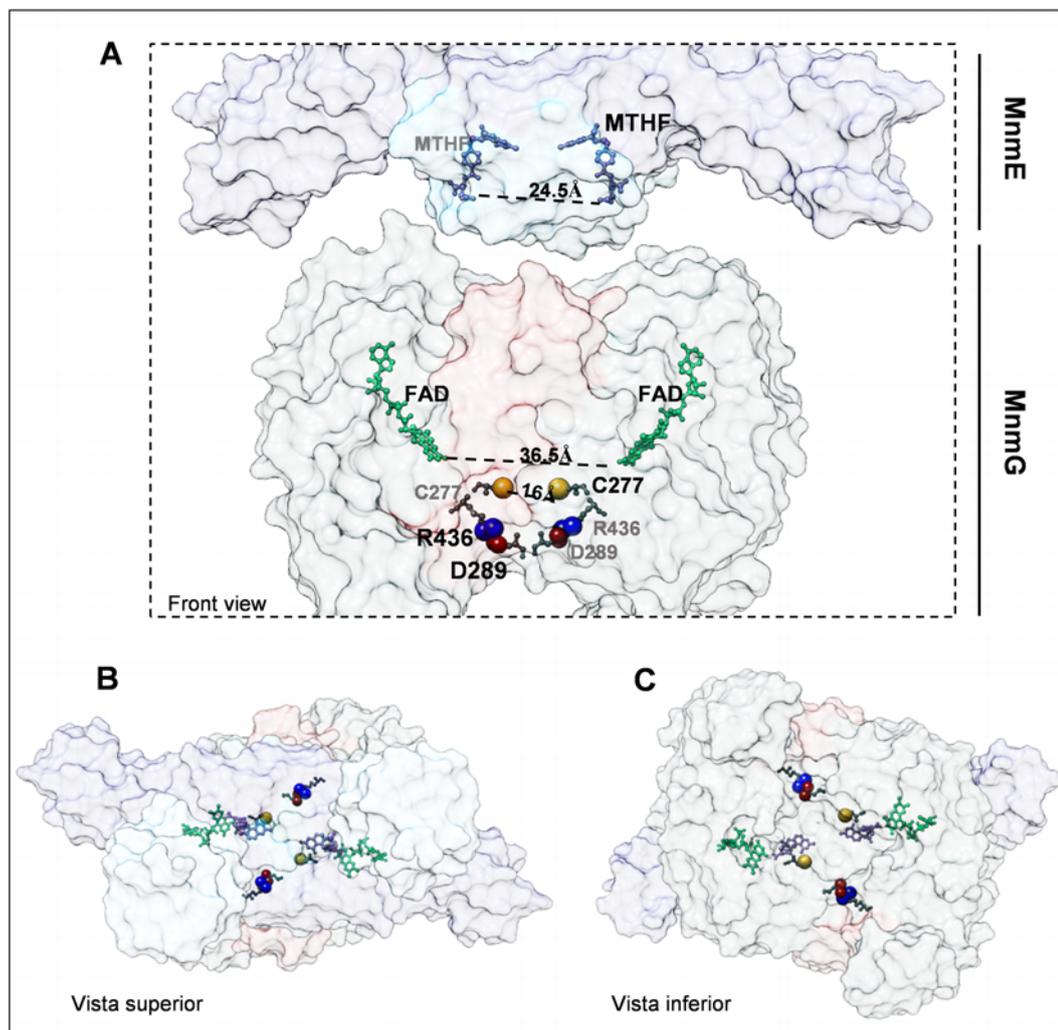


Figura 40: El dominio N-terminal dimérico de MnME y el espacio intermolecular de la forma I de MnMG tienen unas dimensiones similares. A) Representación de la superficie del dominio N-terminal dimérico de MnME y de la forma I de MnMG focalizada en su espacio intermolecular. Se representan las distancias intermoleculares entre los ligandos en ambas proteínas (MTHF en color azul y FAD en color verde) así como la posición de los residuos R436, D289 y C277 (esferas). B,C) vistas superior e inferior, respectivamente, de la superficie de MnMG mostrando las posiciones relativas de los ligandos (MTHF en lila y FAD en verde) y de los residuos R436, D289 y C277 (esferas azules, rojas y amarillas respectivamente).

RESULTADOS Y DESARROLLO ARGUMENTAL

el modo de interacción entre MnmE y MnmG que lleva a la formación de un centro catalítico funcional aún está por clarificar. El espacio intermolecular de la forma I de MnmG y el dominio dimérico N-terminal de MnmE tienen un tamaño similar (**figura 40**). Esto significa que las distancias intermoleculares entre los MTHF en MnmE y los FAD en MnmG permiten que pueda haber una interacción entre la molécula de FAD y de MTHF de cada heterodímero simultáneamente. Estos hechos nos llevaron a sospechar que el centro catalítico de MnmEG podría formarse a través de una interacción homodímero a homodímero entre el dominio N-terminal dimérico de MnmE y el núcleo catalítico dimérico de MnmG en la configuración I. Para comprobar esta hipótesis decidimos analizar cuidadosamente la afinidad entre ambos dominios. Para ello, clonamos la región que comprende desde el residuo 1 al 120 de MnmE, que incluye el dominio N-terminal (1-102), en un vector de expresión pET15b. La proteína purificada eluye, en filtración en gel, en dos fracciones que corresponden a formas diméricas y monoméricas pero solo usamos la forma dimérica para estos ensayos. A continuación, determinamos la afinidad de la unión entre la proteína MnmE(1-120) y las proteínas MnmG y MnmG(1-550) usando ITC. Como se muestra en la **tabla 9**, la proteína MnmE(1-120) es capaz de interactuar con la proteína MnmG completa ($K_D=15 \mu\text{M}$), apoyando la idea de que la formación del centro catalítico del complejo MnmEG puede ocurrir a través de una interacción directa con el dominio N-terminal de MnmE.

Tabla 9 Afinidad de MnmG y MnmG(1-550) por MnmE y MnmE(1-120)

	MnmE completa $K_D(\mu\text{M})$	MnmE(1-120) $K_D(\mu\text{M})$
MnmG completa	2.2	15.2
MnmG(1-550)red	NB	NB
MnmG(1-550)ox	3.3	18.0

NB, unión no detectada

Las desviaciones estándar no superaron el 20% en ningún caso.

La proteína MnmG(1-550)ox se ha obtenido tras una exhaustiva diálisis en ausencia de agente reductor y la MnmG(1-550)red tras tratar a la primera con DTT..

Datos publicados previos indican que MnmG(1-550), purificada en condiciones reductoras, no interactúa con la proteína completa MnmE. Pero nuestros resultados han demostrado que la conformación del núcleo catalítico de

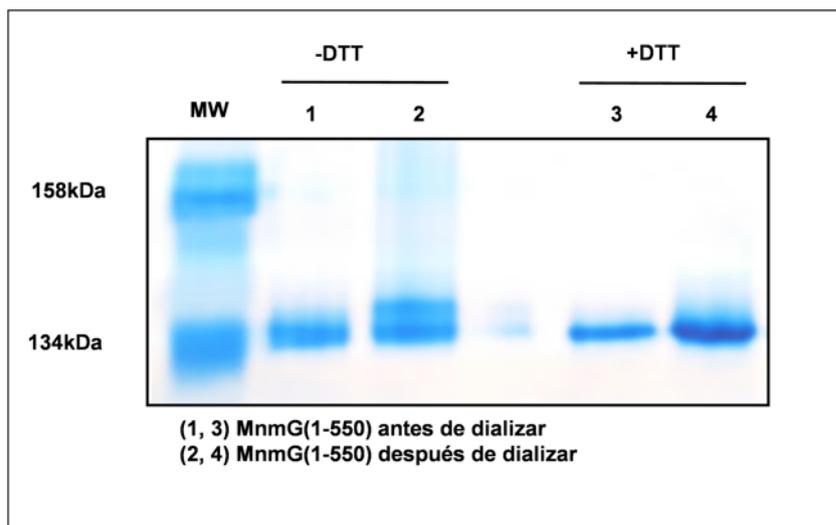


Figura 41: MnmG adopta dos conformaciones diméricas en función de su estado redox. Comparación en NRE de la migración de MnmG(1-550) antes y después de dializar y en presencia (+) y ausencia (-) de agente reductor (DTT).

MnmG es fuertemente influida por su estado redox a través del puente disulfuro entre las C277. Dado que la formación de este puente disulfuro intermolecular se traduce en un ensanchamiento del núcleo de catalítico (**figura 39B**), lo que a su vez hemos asociado con el ensanchado volumen A obtenido por EM (**figuras 29, 33A y 35**), es posible que el enlace disulfuro C277-C277 abra aún más el espacio intermolecular entre los protómeros de la forma I de MnmG, pudiéndose así acomodar el dominio N-terminal de MnmE y permitiendo la interacción entre las moléculas de MTHF y FAD simultáneamente. Por tanto, decidimos analizar la interacción entre las proteínas MnmE y MnmE(1-120) con las formas oxidada y reducida de MnmG(1-550). Para ello, hicimos una exhaustiva diálisis de la proteína MnmG(1-550) como se ha descrito previamente y por NRE nos aseguramos de la aparición de la banda correspondiente a MnmG(1-550) oxidada (**figura 41**). La proteína MnmG(1-550) dializada fue capaz de interactuar tanto con la proteína completa MnmE como con MnmE(1-120) con unos valores de K_D de 3.3 μM y 18 μM , respectivamente (**tabla 9**), valores que son similares a los obtenidos con la proteína completa MnmG (K_D , 2.2 μM y 15.2 μM). Cuando redujimos con DTT la proteína MnmG(1-550) dializada, la proteína reducida no fue capaz de interactuar con MnmE (de acuerdo con los datos publicados) [60, 82] ni con MnmE(1-120). Según los datos de la **tabla 9**, el núcleo catalítico de MnmG es capaz de interactuar con MnmE sin la participación del C_{ARM} . Nuestros resultados indicaron que el núcleo ca-

talítico de MnmG adopta la configuración I (mediada por los residuos R436 y C277) aún en ausencia del C_{ARM} (**figura 39B**); por tanto, concluimos que esta configuración I, ensanchada por el puente disulfuro C277-C277, es esencial para interactuar con el N-terminal de MnmE y para la formación del centro catalítico del complejo MnmEG.

18.5. La presencia simultánea de FAD y NADH aumenta la proporción de MnmG enlazada por el puente disulfuro intermolecular.

Los datos del apartado anterior indican que el puente disulfuro intermolecular debe formarse previamente a la interacción con el dominio N-terminal de MnmE y, por tanto, su formación no parece ser consecuencia de oxidaciones que ocurren durante el ciclo de modificación de tRNA como habíamos sugerido inicialmente. Entonces, dado el citoplasma reductor de *E. coli*, ¿cómo se oxidan las C277 para que se pueda formar el puente disulfuro intermolecular? Dado que MnmG es una flavoenzima que une FAD (**figura 19**) y NADH [60], en ausencia de MnmE quisimos comprobar si la unión de alguno estos ligandos podría promover la formación del puente disulfuro. Para ello incubamos la proteína MnmG toda una noche (a 4°C) en presencia o ausencia de FAD, NADH y DTT. Las muestras fueron tratadas posteriormente con iodoacetamida y analizadas por SDS-PAGE en condiciones no reductoras. El resultado mostró que la proporción de la banda correspondiente al dímero covalentemente estabilizado por el puente disulfuro aumenta solo cuando incubamos MnmG con ambos ligandos (FAD y NADH) (**figura 42**, panel izquierdo).

Dado que el NADH es requerido y se trata de una molécula reductora, ¿es necesaria su oxidación para la inducción de la formación del puente disulfuro? Para abordar esta cuestión determinamos la capacidad de MnmG de oxidar NADH midiendo la absorbancia a 340 nm (A₃₄₀) de una solución de NADH a 250 µM en presencia de MnmG. La forma oxidada de la nicotinamida (NAD⁺) no es capaz de absorber a 340 nm, a diferencia de lo que ocurre con su forma reducida (NADH), lo que nos permite monitorizar su oxidación espectrofotométricamente. En la **figura 42** (panel derecho), donde se representa la absorbancia normalizada expresada en porcentaje de actividad, se muestra que solo hay una ligera disminución de la A₃₄₀, un 10 % en 20 min a 30°C. Por tanto, en las condiciones usadas, MnmG no oxida NADH eficazmente. Los

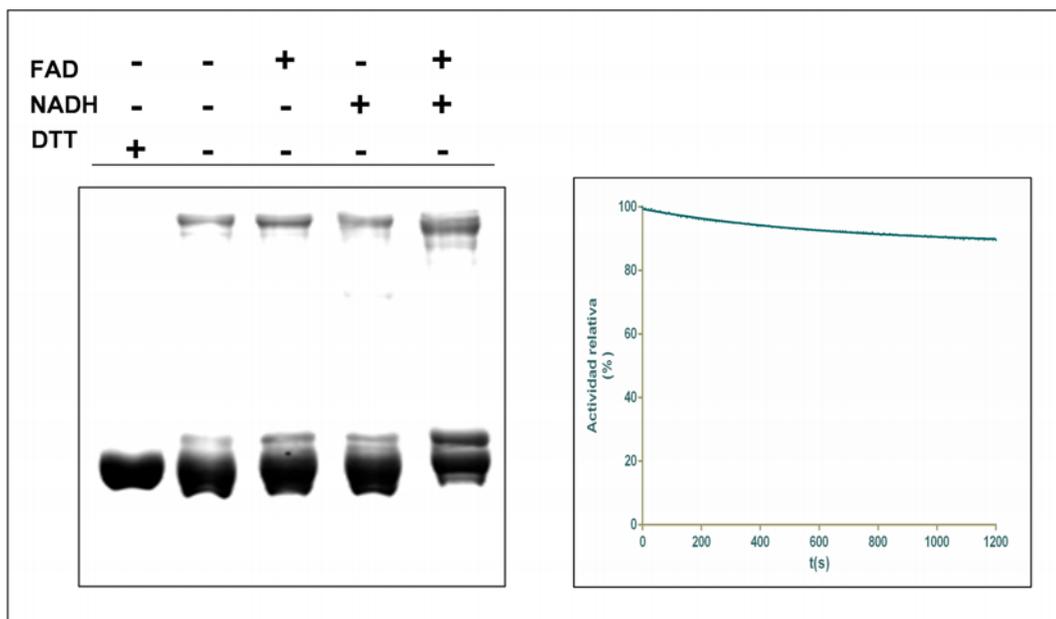


Figura 42: La presencia simultánea de FAD y NADH induce la formación del puente disulfuro intermolecular en MnmG. En el panel izquierdo se muestra un ensayo en SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras donde se puede observar un aumento en la proporción de la banda superior que informa de la formación del puente disulfuro. En el panel derecho se muestra la monitorización en el tiempo de la A340 de una solución de NADH (250 μ M) en presencia de MnmG.

datos sugieren que el FAD, que es una molécula oxidante, es quien oxida las C277 y la unión de NADH parece importante para este proceso de oxidación.

Como ya hemos comentado, la estructura cristalina de la forma I de MnmG muestra que las C277 se encuentran en sendos lazos flexibles y a una distancia de unos 15 Å entre ellas así como del FAD de su protómero correspondiente (**figura 36 y 38**). Es posible, entonces, que la unión de NADH induzca los cambios conformacionales requeridos para el acercamiento de las C277 entre ellas o a sus correspondientes FAD. Además, parece indudable que el mecanismo de la reacción de modificación es muy complejo pues ya solo el ciclo GTPasa de MnmE lo es [74]. No podemos excluir la posibilidad de que los cambios conformacionales de MnmE, que van aparejados tanto a la unión como a la hidrólisis de GTP, puedan influir en la conformación de MnmG y en el acercamiento de las Cys. De hecho, la unión de un análogo del GTP no hidrolizable (GppCP) que representa el estado basal del GTP (no mimetiza el estado de transición) aumenta la afinidad de MnmE por MnmG [61]. Cabe, por lo tanto, pensar que MnmE puede influir en la conformación de MnmG

incluso antes de que se forme el centro catalítico para lo cual, como hemos dicho, tendría que establecerse, como paso previo, el puente disulfuro entre las Cys de MnmG.

19. Interacción con tRNA.

19.1. Análisis de la afinidad de MnmE, MnmG y sus dominios por tRNA.

La interacción de MnmE y MnmG con tRNA ha sido demostrada usando geles de retardo (EMSA) [68]. Estos autores concluyeron que MnmG tiene una mayor participación en la interacción con tRNA que MnmE e identificaron varios residuos implicados en la interacción con tRNA que pertenecían a los dominios FAD e inserción de MnmG. Sin embargo, el grado de participación de los dominios de MnmE y la posible implicación del C_{ARM} de MnmG en la interacción con tRNA no han sido estudiados. Para profundizar en la organización del complejo MnmEG:tRNA, decidimos determinar la afinidad de diferentes constructos de MnmE y MnmG por tRNA usando la fluorescencia intrínseca de triptófano. Para este fin, un tRNA sustrato (tRNA^{Lys}) y un tRNA no sustrato (tRNA^{Cys}) fueron sobrexpresados en *E. coli* y purificados por técnicas estándar. A continuación, realizamos un ensayo de titulación de tRNA sobre las diferentes proteínas, observando una disminución en la intensidad de emisión fluorescente de los constructos tras la formación del complejo con tRNA (**figura 43**, panel superior). Debido a la alta absorbancia del tRNA, fue necesario realizar correcciones por los efectos de filtro interno y externo. Los datos de fluorescencia corregidos (F_{corr}) fueron transformados en el factor Q (“quenching”) de la siguiente manera $Q = (F_0 - F_{\text{corr}}) / F_{\text{corr}}$, donde F_0 es la fluorescencia de la proteína en ausencia de tRNA, y representados frente a las concentraciones de tRNA añadidas, obteniéndose las consiguientes curvas de saturación (**figura 43**, panel inferior) de las cuales dedujimos las constantes de disociación (K_D) de los diferentes constructos de MnmE y MnmG por tRNA (**tabla 10**).

Los resultados obtenidos indicaron que: 1) las proteínas MnmG y MnmE completas comparten una afinidad similar por tRNA (con una K_D aproximada de 0.2 μM), en las condiciones y técnica usadas en nuestros experimentos; 2) el núcleo catalítico y el C_{ARM} de MnmG, al igual que todos los dominios

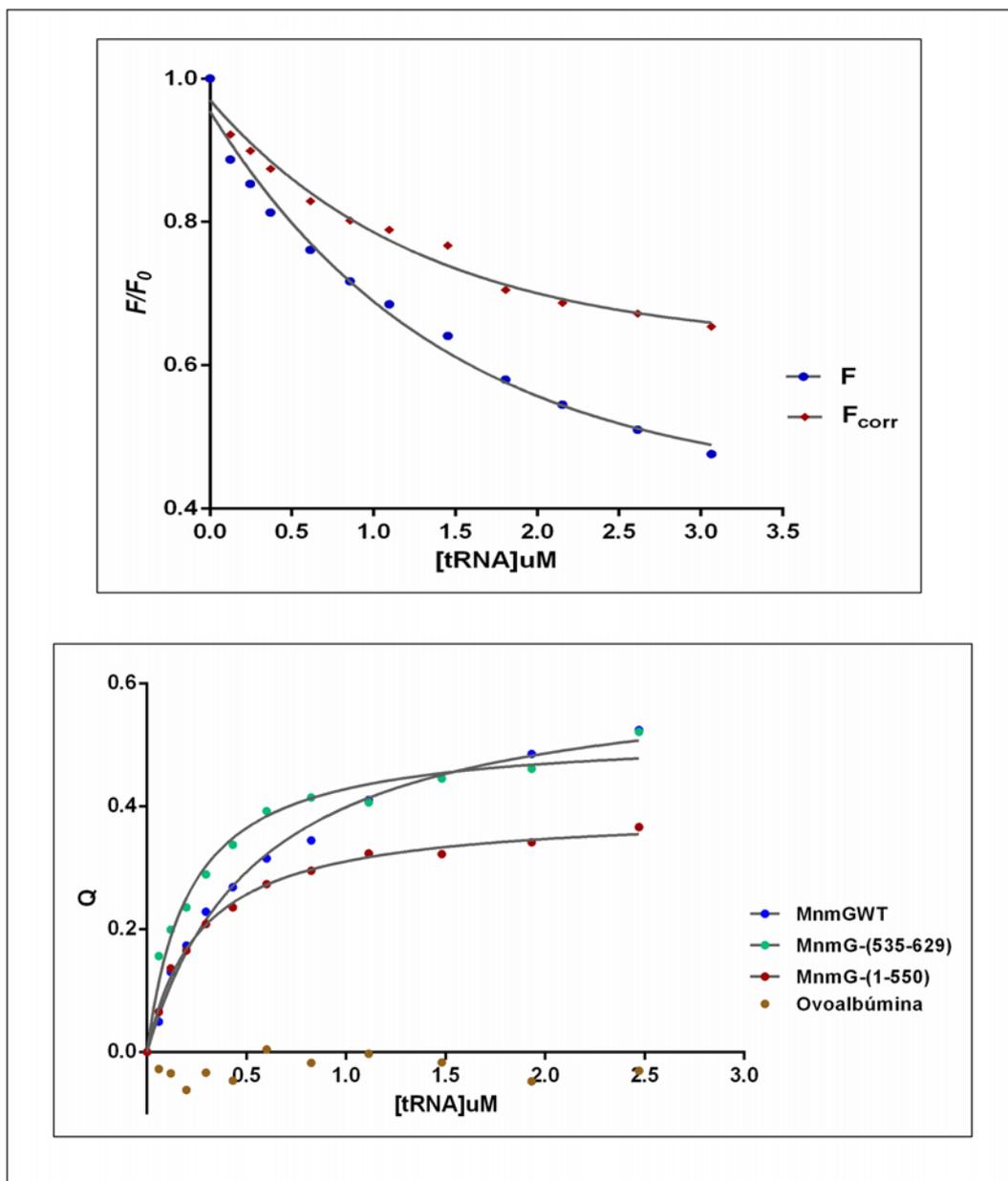


Figura 43: Gráficas representativas de la determinación de la afinidad por tRNA de MnmG y MnmE. Descenso de la fluorescencia, normalizada por la fluorescencia en ausencia de tRNA (F_0), a 340 nm al titular MnmG o MnmE con tRNA antes (F_{obs}) y después de corregir por el efecto filtro (F_{corr}) (panel superior). Curvas de saturación representativas de la afinidad entre tRNA^{Lys} y MnmG-WT (azul), MnmG(1-550) (rojo) y MnmG(535-629) (verde) obtenidas al transformar los datos de fluorescencia corregidos en el factor $Q = (F_0 - F_{\text{corr}}) / F_{\text{corr}}$ y representarlo en función de la concentración de tRNA añadido (panel inferior). También se han representado los valores del factor Q correspondientes a la ovoalbúmina (marrón) que hemos usado como control negativo.

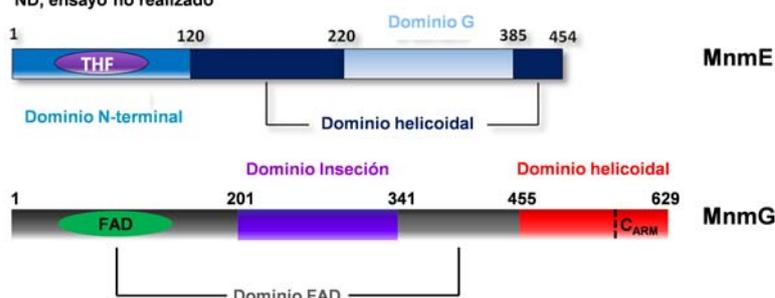
RESULTADOS Y DESARROLLO ARGUMENTAL

de MnmE con la excepción del dominio G, son capaces de interactuar con tRNA; 3) MnmG y MnmE no muestran diferencias de afinidad entre un tRNA sustrato y un tRNA no sustrato. Esta última observación sugiere que MnmE y MnmG no son capaces inicialmente de diferenciar entre tRNA sustrato y tRNA no sustrato y que un paso posterior a la unión será responsable de la discriminación entre ambos tipos de tRNAs.

Tabla 10. Afinidad del tRNA por construcciones de MnmG y MnmE usando Fluorescencia Intrínseca de triptófano.

MnmE ó MnmG construcción	tRNA ^{lys} K_D (μ M)	tRNA ^{cys} K_D (μ M)
MnmGWT	0.19 \pm 0.01	0.19 \pm 0.02
MnmG(1-550)	0.93 \pm 0.10	0.24 \pm 0.03
MnmG(535-629)	0.57 \pm 0.05	0.25 \pm 0.05
MnmEWT	0.14 \pm 0.01	0.14 \pm 0.01
MnmE(1-120)	0.97 \pm 0.11	0.90 \pm 0.02
MnmE(102-454)	1.57 \pm 0.04	1.54 \pm 0.15
MnmE(1-390)	0.97 \pm 0.01	0.97
MnmE(220-385)	NB	ND

NB, unión no detectada
ND, ensayo no realizado



19.2. Influencia de las conformaciones diméricas de MnmG en la unión de tRNA.

Como hemos comentado previamente, la orientación relativa entre los protómeros de las formas I y II de MnmG es diferente ya que dimerizan a través de regiones distintas. Estos cambios de orientación conllevan importantes diferencias en la superficie expuesta al solvente así como en las propiedades electrostáticas

de aquélla. Las estructuras cristalinas publicadas revelaron un parche cargado positivamente en cada protómero de MnmG y se ha demostrado que cuando se cambian varios residuos conservados básicos de este parche a alanina la unión de tRNA queda afectada [68]. Nosotros calculamos y comparamos el potencial electrostático de superficie de ambas formas diméricas de MnmG (PDBs 2ZXI y 2ZXH) con el objetivo de identificar diferencias respecto a la localización de los parches cargados positivamente y, por tanto, de los posibles sitios de unión del tRNA.

En la forma II, cada protómero tiene un parche positivamente cargado e independiente donde se localizan los surcos en los que las moléculas de FAD quedan alojadas con los anillos de isoaloxacina apuntando al exterior (**figura 44**, izquierda). Además, la cara interna del C_{ARM} muestra también varias zonas cargadas positivamente, lo que puede explicar su capacidad de unión a tRNA (**tabla 10**). En cambio, en la forma I de MnmG hay un solo parche cargado positivamente aunque de gran tamaño pues resulta de la coincidencia espacial de los parches individuales de cada protómero en el espacio intermolecular de MnmG (**figura 44**, derecha). En este parche pueden observarse los túneles de FAD apuntando hacia la parte inferior del espacio intermolecular de MnmG, lo que sugiere que los brazos anticodón de dos moléculas de tRNA podrían ser acomodados, simultáneamente, en esta zona, permitiendo una reacción entre la U34 del anticodón y el FAD de MnmG. Además, en la forma I el C_{ARM} está encajado en el protómero opuesto, encarando sus regiones positivas hacia el interior de la proteína. Por tanto, la superficie del espacio intermolecular de la forma I de MnmG queda cargada positivamente, extendiéndose este amplio parche positivo hasta la zona que queda entre los N_{ARM} de MnmG. Cabe destacar que tres moléculas de fosfato, interaccionando con varios residuos básicos conservados, cocrystalizaron con la forma I de MnmG, mimetizando los fosfatos del esqueleto del tRNA y, por tanto, sugiriendo capacidad de unión a ácido nucleico [68].

Basándonos en los datos que acabamos de describir, generamos un modelo de interacción con tRNA para cada forma dimérica de MnmG usando el programa Chimera [73]. Ajustamos manualmente la estructura cristalina de un tRNA^{Glu} (sutrato de MnmG) obtenido del PDB: 2DET en los parches cargados positivamente de MnmG. En ambos modelos, el tRNA queda ajustado de tal manera que la U34 podría interaccionar con el FAD de MnmG accediendo a través de los túneles descritos (**figura 45**). A *grosso modo*, la principal diferen-

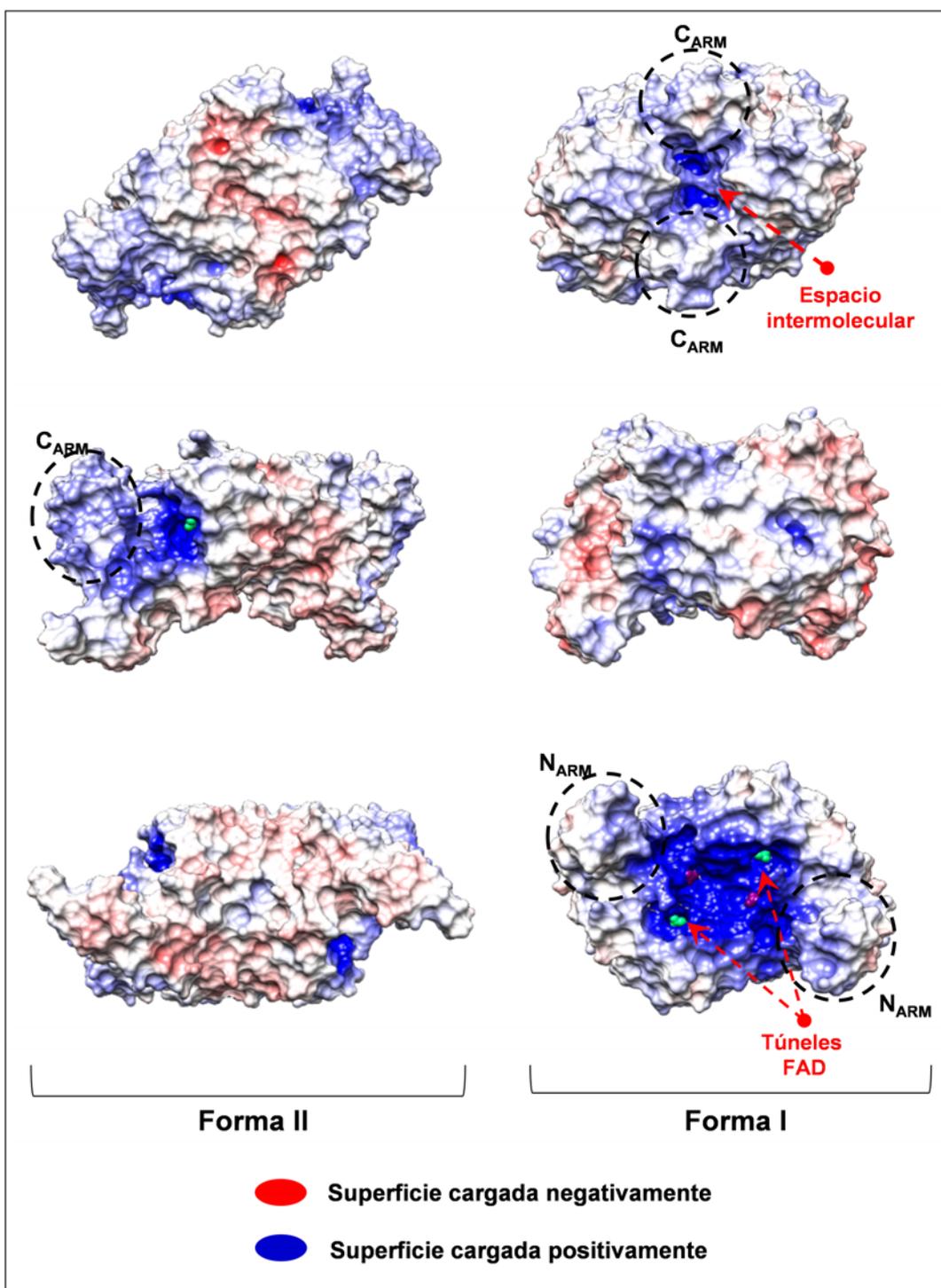


Figura 44: Comparación del potencial electrostático de superficie entre las formas I y II de MnmG. Diferentes vistas de una representación de la superficie de la forma II (izquierda) y de la forma I (derecha) de MnmG donde se aprecia una diferente orientación relativa de los parches cargados positivamente (azul). En verde se representa el FAD y en magenta los átomos de fosfato cocrystalizados.

cia radica en que en la forma I de MnmG (paneles C y D) ambos protómeros participan en la interacción con cada una de las moléculas de tRNA unidas; en cambio, en la forma II, cada protómero interacciona con solo una molécula de tRNA (paneles A y B), reduciéndose entonces el número de interacciones tRNA:proteína. Debe notarse que nuestros resultados indican que MnmE debe participar en la interacción con tRNA (**tabla 10**) y que los modelos propuestos admiten la posibilidad de que MnmE interaccione a su vez con el tRNA a través de los brazos aceptores de éste.

El parche de MnmG cargado positivamente incluye la región móvil 245-295 que ha sido sugerida como funcionalmente importante [82, 68] a pesar de que su movilidad no parece tener relación con los cambios conformacionales inducidos por FAD (**figura 20 y 46**). Esta región está estabilizada en la forma I de MnmG, precisamente, a través del puente salino intermolecular R436-D289 y de varias interacciones de residuos básicos conservados con los átomos de fosfato cocrystalizados (**figura 47A**). De hecho, el lazo que se extiende desde el residuo 262 al 280 solo es completamente visible en el cristal correspondiente a la forma I (PDB; 2ZXH) (**figura 46**), lo que indica una alta movilidad a menos que sea estabilizado por el puente salino intermolecular que solo se observa en esta conformación I. La estabilización de este lazo en la forma I resulta en la estructuración de la entrada del túnel del FAD al quedar fija la posición del voluminoso grupo de la conservada Y276 y de la cadena lateral de la R275 (**figura 47**). Además, la formación de un puente de hidrógeno entre la C277 y la conservada G273 estabiliza un pequeño bucle que es precisamente donde se encuentran la Y276 y la R275, contribuyendo así a la estructuración de la entrada al túnel de FAD. En uno de los dos protómeros de MnmG (**figura 47**, cian) se observa la cocrystalización de una tercera molécula de fosfato adicional cuyas interacciones con los residuos conservados básicos H293 y R275 estabilizan aún más el pequeño bucle mencionado. La entrada al túnel de FAD en la forma I de MnmG tiene unas dimensiones de 10x15 Å (**figura 47B**) lo que coincide con el diámetro de la hélice del anticodón del tRNA cuyo diámetro oscila entre 10 Å y 12.5 Å. Así pues, estos datos estructurales sugieren que los residuos R436 y C277, que afectan al estado conformacional dimerico de MnmG (**figuras 37 y 39**), son importantes para la formación del túnel de FAD y, por tanto, para una adecuada accesibilidad del tRNA al FAD.

Los datos sugieren que todas las conformaciones de MnmG deben ser capaces de unir tRNA, ya que muestran parches positivamente cargados expuestos

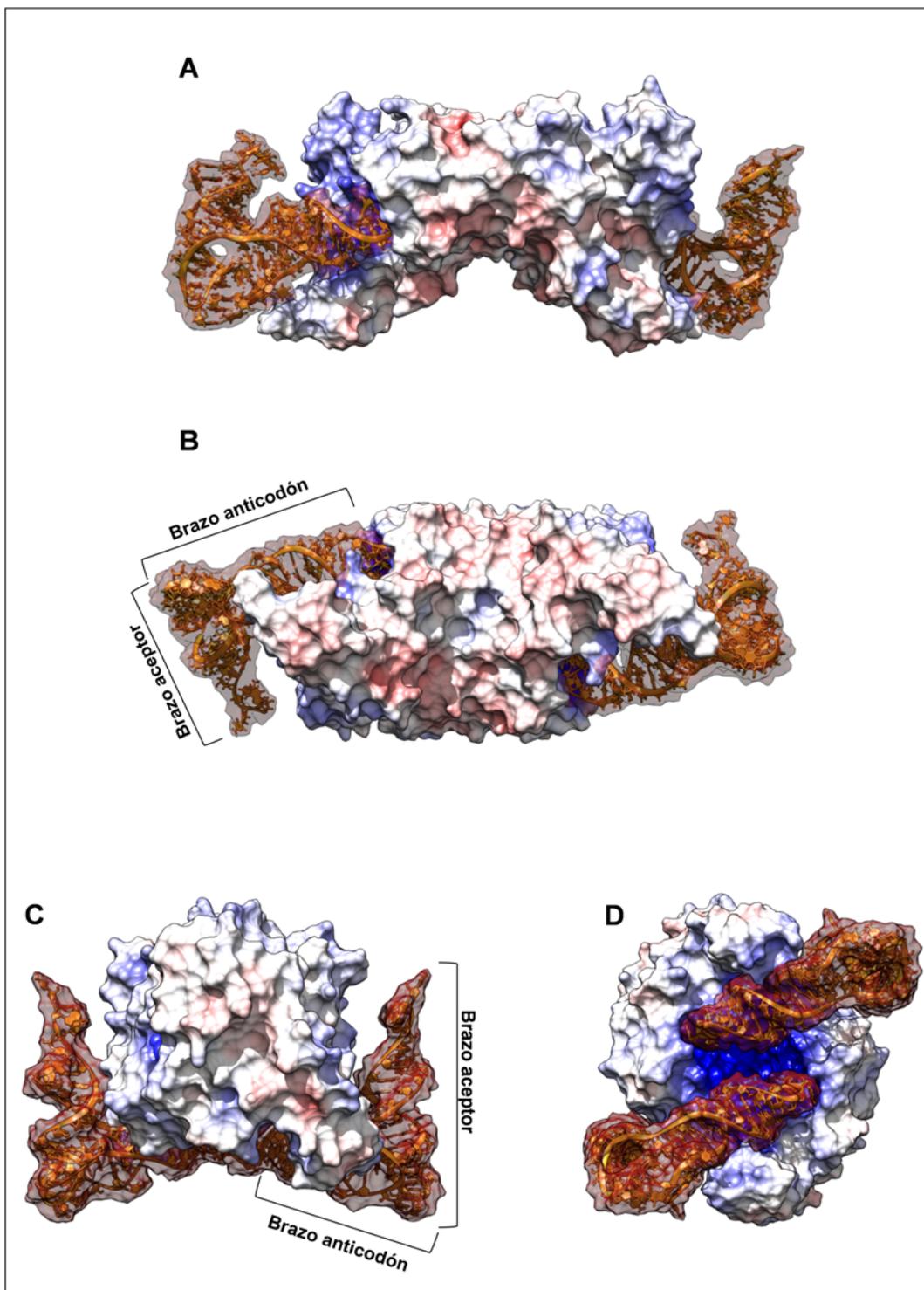


Figura 45: Modelos estructurales de la interacción de tRNA con las formas I y II de MnmG. Vistas frontales (A, C) e inferiores (B,D) de los potenciales electrostáticos de superficie de las formas I (C, D) y II (A, B) en las que hemos ajustado manualmente dos moléculas de tRNA^{Glu} (dorado) (PDB 2DET) en función de la distribución de cargas positivas y la posición de los FAD en MnmG.

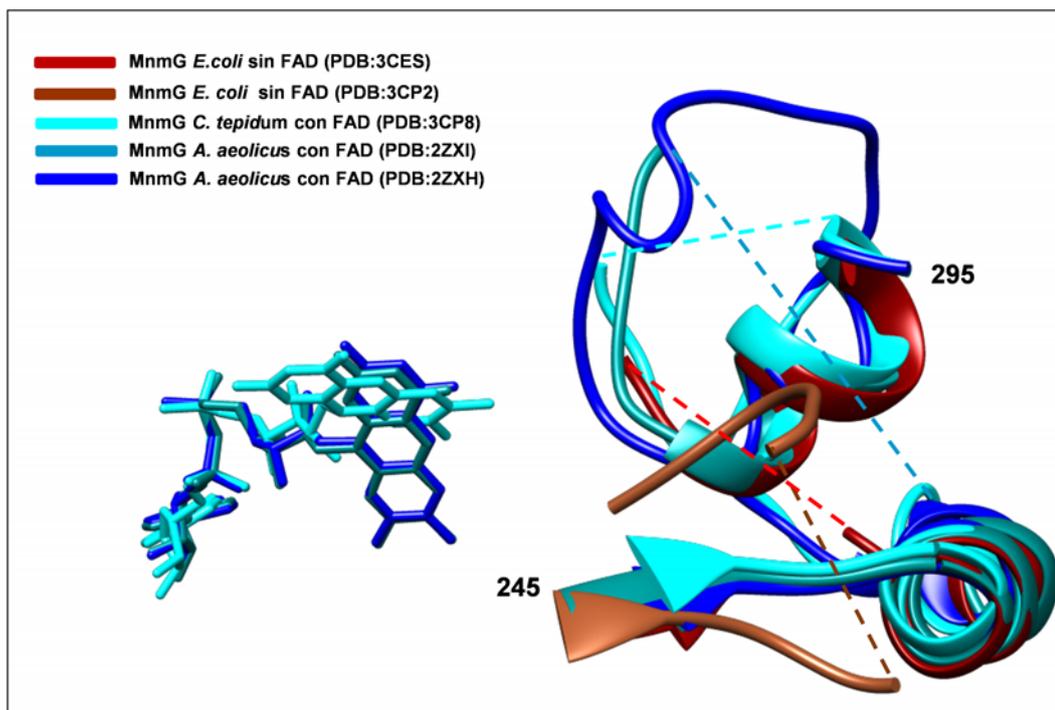


Figura 46: La región flexible 245-295 solo es completamente visible en la forma I de MnmG. Superposición de las estructuras cristalinas disponibles de MnmG focalizada en la región 245-295. Las líneas discontinuas representan segmentos no visibles en las estructuras cristalinas.

al solvente, pero los complejos resultantes deben tener configuraciones diferentes. Para apoyar experimentalmente esta cuestión, llevamos a cabo varios experimentos de EMSA comparando la migración de un tRNA substrato (tRNA^{Lys}) tras su unión a proteínas MnmG portadoras de los cambios R436A y C277S que, como hemos visto, afectan simultáneamente al estado conformacional de MnmG y a la configuración del acceso al túnel de FAD. En la **figura 48** se muestra el patrón de migración del tRNA tras su unión a concentraciones crecientes de las proteínas MnmG y MnmG(1-550) y a sus variantes R436A y C277S MnmG. Los resultados revelan que no hay grandes diferencias en la afinidad aparente por tRNA entre las variantes y las proteínas WT. En cualquier caso, lo que nos interesa de estos experimentos no es la determinación de la afinidad sino cómo migra el tRNA que forma complejo con las variantes de MnmG portadoras de cambios que afectan a su conformación. Como muestra la **figura 48**, se observa una mayor movilidad del tRNA que forma complejo con las variantes R436A y C277S respecto al asociado a las proteínas WT. Además, los complejos formados por las variantes parecen migrar a la misma

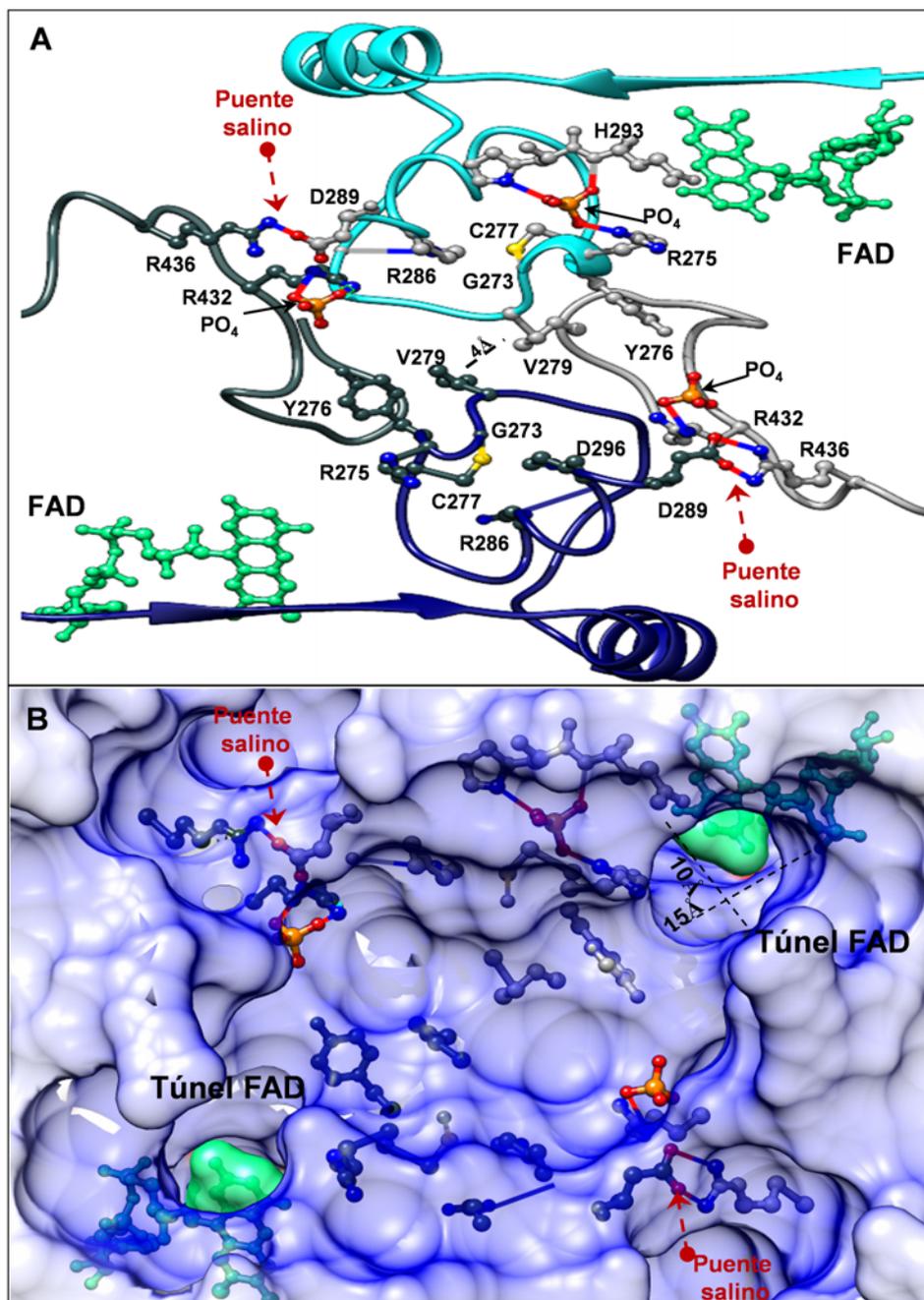


Figura 47: El puente salino intermolecular R436-D289 estabiliza el segmento 245-295 de MnmG y estructura el acceso al túnel de FAD. A) Representación en cintas de la forma I dimérica de MnmG focalizada en las regiones 245-295 (azules) enlazando, a través del puente salino D289-436, el lazo 422-442 (grises) de su protomero opuesto. Los puentes de hidrógeno que están estabilizando la región se representan en varillas y los átomos con carga positiva o negativa en azul y rojo respectivamente B) Representación del potencial electrostático de superficie superficie de la forma I de MnmG focalizada en las entradas de los túneles de acceso al FAD. En azul se representa la superficie cargada positivamente de MnmG, en verde la del FAD y en varillas y bolas naranjas los átomos de fosfato cocrystalizados

velocidad, sugiriendo que los complejos formados son similares, probablemente a causa de que los cambios introducidos (R436A y C277S) tienen un efecto similar inestabilizando el lazo 262-280 (**figura 47**) y, en consecuencia, sobre el modo de interactuar con el tRNA. Estos efectos se producen tanto en las proteínas MnmG completas como en aquellas que carecen del C_{ARM}, apoyando la idea de que la mayor velocidad de migración de los complejos formados por las variantes es debido al efecto específico producido por los residuos cambiados sobre la configuración del núcleo catalítico de MnmG.

En resumen, los datos obtenidos indican que la estabilización de la región 245-295, a través al menos de la R436 y de la C277, afecta directamente a la formación de los complejos MnmG:tRNA. Considerando el rol de los residuos mencionados en la estabilización de la forma I de MnmG, debe existir una relación directa entre las conformaciones diméricas de MnmG y la interacción con el tRNA.

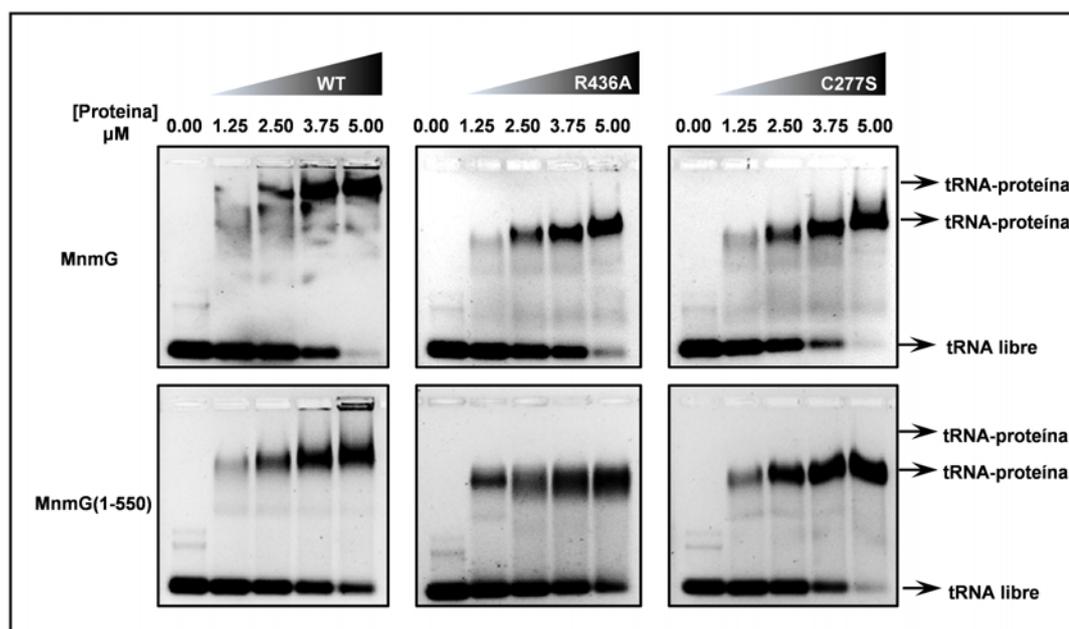


Figura 48: Geles de retardo de los complejos tRNA:MnmG. Comparación en geles de agarosa de la migración de un tRNA sustrato (tRNA^{Lys}) con concentraciones crecientes de variantes de las proteínas MnmG completa (paneles superiores) y MnmG(1-550) (paneles inferiores).

20. El C_{ARM} de MnmG tiene similitud estructural con dominios SAM.

El dominio helicoidal de MnmG (455-629) comprende dos regiones con muy diferente grado de conservación. La primera región, aquí llamada N_{ARM}, está muy poco conservada, a diferencia de la segunda o C_{ARM} (550-629) que está muy conservada evolutivamente. Hemos demostrado que el C_{ARM} es capaz de interactuar con MnmE, con MnmG(1-550) y con tRNA (tablas 7, 8 y 10 respectivamente). Todos los datos indican que el C_{ARM} es un dominio independiente y establemente estructurado, implicado en interacciones proteína-proteína y proteína-tRNA.

La implicación del C_{ARM} en diferente interfaces de interacción nos llevó a profundizar en la identidad de este dominio. Para ello comparamos la estructura del C_{ARM} de *A. aeolicus* (PDB; 2ZXH) con otras estructuras conocidas utilizando el software del servidor DALI [46]. Este programa alineó la región 560-629 del C_{ARM} con el dominio N-terminal de la recombinasa humana Rad51, con el de su homóloga en arqueas RadA y con los dominios C-terminales de la helicasa Hjm y de la RNA polimerasa (RpoA α -CTD) (figura 49). Estos dominios están clasificados como dominios tipo SAM (motivo alfa estéril) en las proteínas Rad51 (Interpro, IPR010995) y RpoA. En la **tabla 11** se resumen las proteínas que obtuvieron los mayores índices Z (que mide la significación estadística de una coincidencia en términos de estadísticas de Gauss) según los resultados obtenidos con DALI.

Tabla 11. Dominios de proteínas estructuralmente homólogos al C_{ARM} de MnmG

Protein	PDB	RMSD	Índice Z	Número de residuos alineados	% identidad de secuencia	Función
Rad51	3LDA	2.1	5.2	49	24	Recombinación
RadA	3ETL	2.3	5.1	49	22	Recombinación
Hjm	2ZJ8	1.7	5.1	45	18	Reparación de DNA
RpoA	1DOQ	2.1	4.5	48	19	Transcripción
Smaug	10XJ	2.5	4.4	37	22	Traducción

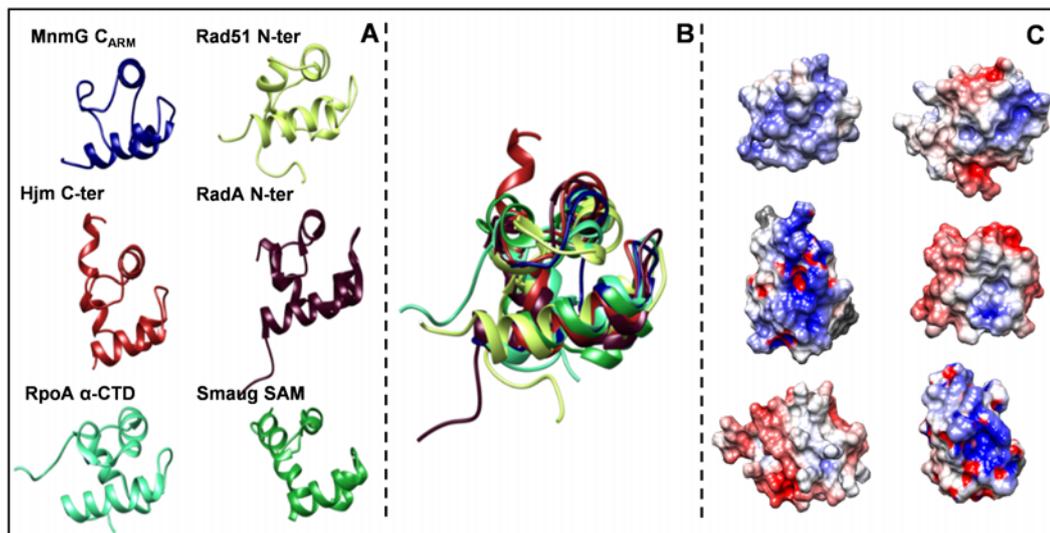


Figura 49: Comparación estructural entre diferentes dominios SAM y el C_{ARM} de MnmG. **A)** Representación en cintas de los dominios SAM con los mayores índices Z obtenidos de un alineamiento estructural múltiple con DALI (**Tabla 8**). **B)** Superposición de los dominios SAM seleccionados con el C_{ARM} de MnmG. **C)** Potencial electrostático de superficie del C_{ARM} de MnmG y los dominios SAM seleccionados, en el mismo orden que se muestran en el panel A, revelando los parches cargados positivamente que sugieren capacidad de unión a ácido nucleico.

El dominio SAM fue inicialmente asociado con interacciones proteína-proteína incluyendo homo- y hetero-oligomerización pero posteriormente fue también demostrada su implicación en interacción con DNA, RNA e incluso con lípidos [48]. Por ello, los dominios SAM se caracterizan por su diversidad funcional a pesar de su homología estructural. El C_{ARM} interacciona con dos motivos de proteína que no son tipo SAM: 1) con MnmE a través de residuos hidrofóbicos localizados en su cara externa (**tabla 8**); 2) con el núcleo catalítico de MnmG formando la mayor parte de la interfaz de dimerización de la forma I (**tabla 7** y **figura 31**). Además, hemos demostrado que el C_{ARM} por sí mismo es capaz de unir tRNA con una constante de disociación de $0.57 \mu\text{M}$ (**tabla 10**). En este aspecto, el dominio SAM del represor traduccional Smaug [7] fue el primer dominio SAM identificado capaz de unir mRNA directamente. Dada la naturaleza de RNA del sustrato del dominio SAM de Smaug decidimos alinearlo tridimensionalmente con la región MnmG(560-629) usando PDBeFold [51]. Como muestra la **figura 49**, la arquitectura del dominio SAM de Smaug es similar a la de los dominios de MnmG, Rad51, RadA, Hjm y RpoA, también representados en la figura. Además, los dominios SAM de algunas de

estas proteínas muestran claras agrupaciones superficiales de carga positiva, sugiriendo capacidad para unir ácido nucleico (**figura 49C**, regiones en azul). Hasta el momento, el único dominio tipo SAM descrito capaz de interactuar con tRNA es el que pertenece al C_{ARM} de MnmG.

21. Consideraciones generales. Modelo del ciclo conformacional de MnmG.

La obtención de una estructura tridimensional del holocomplejo MnmEG permanece elusiva hasta la actualidad. La naturaleza dinámica de las proteínas que lo componen parece dificultar tanto la cristalización de este complejo como su análisis estructural por EM. La falta de esta información estructural dificulta la clarificación del *modus operandi* de este complejo para llevar a cabo la modificación de tRNA así como el conocimiento en detalle de las bases moleculares que subyacen bajo los fenotipos o patologías generadas por su mal funcionamiento [50, 30, 9, 83, 93, 100]. En la última década diferentes grupos, entre ellos el nuestro, han analizado diversas características estructurales, bioquímicas y funcionales de MnmE y MnmG, por separado o en conjunto, que han puesto de manifiesto una compleja dinámica conformacional en ambas proteínas, esencial para su función y que informa de algunos aspectos del *modus operandi* del complejo MnmEG. Dada la alta conservación evolutiva de estas proteínas, los datos obtenidos del estudio de las versiones bacterianas puede ayudar a comprender las propiedades de las homólogas humanas y los mecanismos de las patologías asociadas. Datos publicados por varios autores han evidenciado la existencia de grandes cambios conformacionales en MnmE originados en su dominio G y transmitidos al resto de la proteína, así como su importancia para la función modificadora [61, 28, 74].

Del mismo modo, los datos presentados en esta Tesis muestran un comportamiento dinámico de MnmG, tanto en la estructuración y organización del sitio FAD (y en consecuencia del centro catalítico del complejo MnmEG) como en su organización dimérica y, por tanto, en la conformación global del complejo MnmEG. El análisis comparativo de las estructuras cristalinas de MnmG ya muestra una importante flexibilidad en zonas de alta conservación evolutiva incluyendo el bolsillo de unión del FAD (**figura 20**). De hecho, el FAD participa en la construcción de su propio bolsillo a través de la inducción de

cambios conformacionales en MnmG que resultan en el posicionamiento funcional de diferentes residuos necesarios para la catálisis (**figuras 19, 20, 21, 23 y tabla 5**). Además, el FAD podría participar en la formación del puente disulfuro intermolecular C277-C277 (**figura 42**) que afecta a la conformación general del núcleo catalítico de MnmG (**figura 39**) e influye en la accesibilidad del tRNA sustrato al túnel de FAD de la forma I de MnmG.

Por otro lado, nuestros resultados han destacado la importancia del C_{ARM} en la organización funcional del complejo MnmEG:tRNA y su análisis estructural detallado nos llevó a la identificación de un dominio tipo SAM (Motivo Alfa Estéril) muy similar al que posee la recombinasa Rad51 en su región N-terminal (**tabla 11 y figura 49**). Hemos detectado interacciones directas del C_{ARM} con MnmE y tRNA (**tabla 8 y tabla 10**), siendo la primera vez que se describe un dominio SAM capaz de unir tRNA, aunque su papel concreto en la interacción con el tRNA está por clarificar. Además, el C_{ARM} es capaz de interactuar con el núcleo catalítico del protómero opuesto, formando la mayor parte de la interfaz de homodimerización de MnmG cuando adopta la forma I (**tabla 8 y figura 31**). De esta manera, el C_{ARM} participa directamente en la formación de un espacio intermolecular en MnmG que, tras la interacción con el dominio N-terminal de MnmE (**tabla 9**), quedará totalmente aislado del solvente permitiendo así las reacciones mediadas por el FAD.

Los datos cristalográficos muestran la existencia de dos formas de MnmG (forma I y forma II) cuyas interfaces de dimerización son totalmente independientes y no solapantes (**figura 26 y 31**). MnmG, en ausencia de ligandos, se encuentra principalmente adoptando la interfaz de dimerización de la forma I tal y como sugieren los resultados de EM y confirman nuestros análisis bioquímicos con las variantes de MnmG R436A y E585K (**figuras 29 y 37**). Además, la forma I de MnmG puede adoptar dos subtipos conformacionales diferentes como muestran los volúmenes A y B obtenidos por EM. La distancia intermolecular entre los N_{ARM} varía de un volumen a otro, así como la forma del núcleo catalítico, lo que está de acuerdo con el análisis de modos normales que indica un movimiento de los N_{ARM} concomitante con una “apertura” y “cierre” del núcleo catalítico (**animación 1**, archivo ppt CDTesis). De hecho en el volumen A, el núcleo catalítico adquiere una forma más ensanchada y redondeada que en el volumen B, apreciándose un espacio intermolecular entre ambos protómeros (**figuras 29 y 33**). En cambio, en el núcleo catalítico de apariencia más alargada del volumen B, se observa una depresión entre los

protómeros, lo que sugiere un espacio intermolecular más estrecho que en el volumen A, además de la apertura de un túnel en cada protómero (**figuras 29, 33 y 34**). Estos túneles del volumen B coinciden con los túneles de acceso al FAD que se pueden apreciar solo en la forma I de MnmG (**figuras 32 y 34**). En la interfaz de dimerización de la forma II no existe ningún espacio intermolecular (**figuras 26 y 31**) a diferencia de la forma I que, a través de la interacción de los C_{ARM} con los dominios FAD e inserción del protómero opuesto, presenta un espacio en el centro hacia donde apuntan los anillos de isoaloxacina del FAD (**figuras 31 a 33**). Nuestros experimentos con la variante MnmG-C277S indican que el núcleo catalítico de MnmG adquiere una forma más expandida cuando se forma un puente disulfuro intermolecular entre las C277 (**figura 39B**). Esta conformación C277-C277 expandida de la forma I de MnmG es necesaria para interactuar con el N-terminal de MnmE (**tabla 10**) y así poder formar un centro catalítico en el que el FAD de MnmG y el MTHF de MnmE puedan interactuar para llevar a cabo la reacción de modificación del tRNA.

La diferente orientación relativa entre los protómeros en la forma I y II implica también una posición diferente de las regiones cargadas positivamente a través de las cuales interactuará el tRNA (**figura 44**). En ambas formas de MnmG estos parches cargados positivamente están expuestos al solvente indicando que ambas son capaces de unir tRNA. Pero la construcción de los modelos de interacción sugiere que la interacción del tRNA con la forma I debe ser más estable ya que ambos protómeros participan en la interacción de cada molécula de tRNA, aumentando, por tanto, la superficie de interacción (**figura 45**). Además, solo la forma I de MnmG tiene los túneles de acceso al FAD perfectamente formados y estabilizados y con unas dimensiones similares al diámetro de la hélice del brazo anticodón del tRNA (**figura 47**). Esta estructuración del túnel de acceso al FAD es debida en gran medida a la estabilización de la región 245-295, y concretamente del lazo 262-280, a través del puente salino intermolecular R436-D289, lazo en el que precisamente se encuentra la C277 que puede formar un puente disulfuro con la C277 del protómero opuesto, uniendo ambos lazos entre sí. De hecho, los complejos formados con tRNA de MnmG o MnmG(1-550) son diferentes de los formados con sus correspondientes variantes R436A y C277S pues migran, en un gel de agarosa, con diferente velocidad (**figura 48**). Así pues, parece que existe una relación entre la formación del centro catalítico, a través de la interacción entre

el N-terminal de MnmE y el núcleo catalítico de MnmG, y el acceso al FAD del tRNA a través de los túneles situados en el parche cargado positivamente que queda entre los N_{ARM} de la cara opuesta de MnmG (**figuras 40, 44 y 45**).

Para integrar funcionalmente toda esta información acerca de la naturaleza dinámica de MnmG, proponemos un modelo del ciclo conformacional que puede experimentar MnmG para llevar a cabo la modificación de tRNA. En la **figura 50** se muestra un esquema de las asociaciones entre las estructuras cristalinas, los volúmenes obtenidos por EM y las representaciones de los mismos que se usan en el modelo que proponemos y que se muestra en la **figura 51**.

En primer lugar, al expresarse MnmG en el citoplasma reductor de *E. coli* adquiriría la forma dimérica I con las C277 reducidas y aisladas del solvente y los puentes salinos R436-D289 formados; es decir, una conformación que se correspondería con el volumen B (*estadio 1*). La unión de FAD y NADH, y probablemente de MnmE, induciría en MnmG los consecuentes cambios conformacionales, estructurando el sitio FAD y formándose el puente disulfuro intermolecular entre las C277 previamente oxidadas por el FAD. El núcleo catalítico de MnmG adoptará entonces una conformación más ensanchada que podría corresponder con el volumen A obtenido por EM (*estadio 2*). Esta conformación podrá entonces interactuar con el N-terminal de MnmE (cuyos dominios helicoidales estarán ya interactuando con los C_{ARM} de MnmG), formándose el centro catalítico del complejo MnmEG en el que interactuarán el FAD de MnmG y el MTHF de MnmE (*estadio 3*). En esta conformación también podrá unirse el tRNA pero el acceso al sitio FAD estará restringido por el puente disulfuro intermolecular (*estadio 4*). Este complejo MnmEG, en el que el FAD, interactuando con el MTHF, quedaría aislado del solvente, podría llevar a cabo la parte oxidativa de la reacción de modificación de tRNA (**figura 10**) [63] en la que el FAD deshidrogena el grupo carboximetileno o aminometileno, según su procedencia, previamente unido al MTHF. Como consecuencia de esta reacción, las C277 deberían reducirse, rompiéndose entonces el puente disulfuro intermolecular y permitiendo el acceso del tRNA al sitio FAD (*estadio 5*). Entonces, MnmG adoptaría la conformación correspondiente al volumen B en la que se observan los túneles de acceso al FAD abiertos y bien estructurados (**figuras 29, 31A, 34 y 47**). Por tanto, el tRNA puede acceder al sitio catalítico y el complejo MnmEG podrá llevar a cabo entonces la segunda parte del ciclo modificación de tRNA, donde se transfiere

el grupo nm (aminometileno) o cmnm (carboximetilaminometileno) al tRNA que posteriormente será reducido por el FADH. Además, al estrecharse el espacio intermolecular de MnmG, se romperá la interacción con el N-terminal de MnmE, pudiéndose liberar el THF. En este modelo se propone, por lo tanto, la existencia de un mecanismo conformacional que separa espacialmente las reacciones oxidativa y reductiva mediadas por el mismo cofactor (FAD) pero con sustratos diferentes. Finalmente, para la liberación del tRNA proponemos que MnmG adoptará la forma II en la que cada molécula de tRNA interacciona con un solo protómero de MnmG y, por tanto, el número de interacciones con éste será menor que con la forma I donde ambos protómeros participan en la interacción de cada una de las moléculas unidas de tRNA (**figura 42**). Pero para que MnmG adopte la forma II son necesarias al menos dos condiciones:

- Rotura del puente salino intermolecular R436-D289, que podría ser causada por la misma interacción con el tRNA ya que el enlace R436-D289 se encuentra en la zona de unión a éste (**figuras 46 y 47**). De hecho la disrupción de puentes salinos en la superficie de las proteínas es un factor dominante en el acomodamiento de ácido nucleicos en proteínas [75, 56].
- Separación de los C_{ARM} de sus correspondientes núcleos catalíticos. Dado que MnmE interacciona a través de sus dominios helicoidales con los C_{ARM} de MnmG y se ha descrito la transmisión de cambios conformacionales desde el dominio G de MnmE a sus dominios helicoidales como consecuencia del ciclo GTPasa [62, 28], es posible que sea MnmE quien induzca la apertura de los C_{ARM} de MnmG induciendo la transición de la forma I a la forma II de MnmG y, en consecuencia, la liberación del tRNA modificado (*estadio 6*). Así pues, el ciclo GTPasa de MnmE podría orquestar el ciclo de modificación de tRNA, como han propuesto diversos grupos, a través de la transmisión de cambios conformacionales desde el dominio G a sus dominios helicoidales y de éstos a los C_{ARM} de MnmG.

Finalmente, MnmG, ya sea por su tendencia intrínseca o con la ayuda de MnmE (posiblemente por su retorno al estado conformacional anterior promovida por la unión de una nueva molécula de GTP), volvería a adoptar la interfaz de dimerización de la forma I, pudiendo iniciar un nuevo ciclo de modificación. En general, nuestros resultados indican que MnmG sufre una compleja dinámica

conformacional que ha de coordinarse con MnmE, operando en conjunto como una máquina molecular que llevará a cabo la compleja adición del grupo carboximetilaminometileno o aminometileno en la posición 5 de la U34 de un grupo específico de tRNAs.

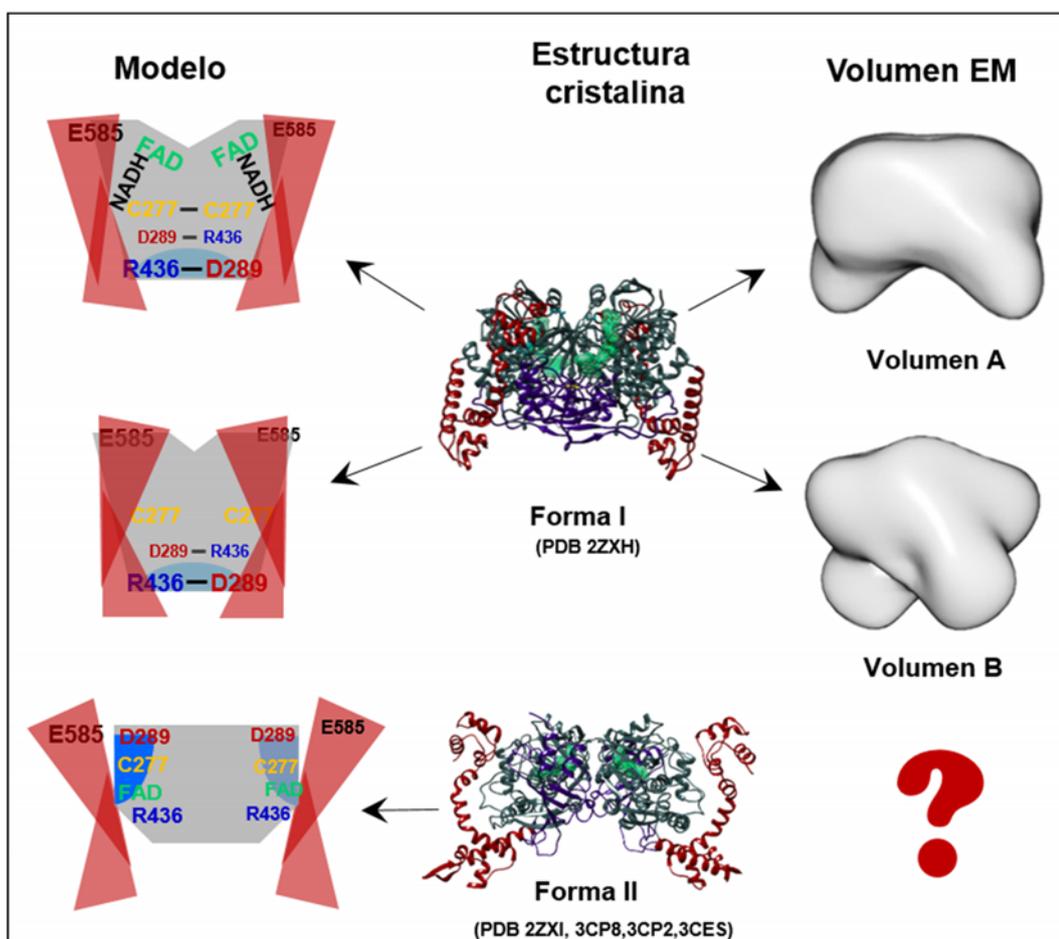


Figura 50: Equivalencia entre las estructuras cristalinas de MnmG, los volúmenes resueltos por microscopía electrónica y las representaciones esquemáticas de los mismos que se usarán en el modelo del ciclo conformacional de MnmG

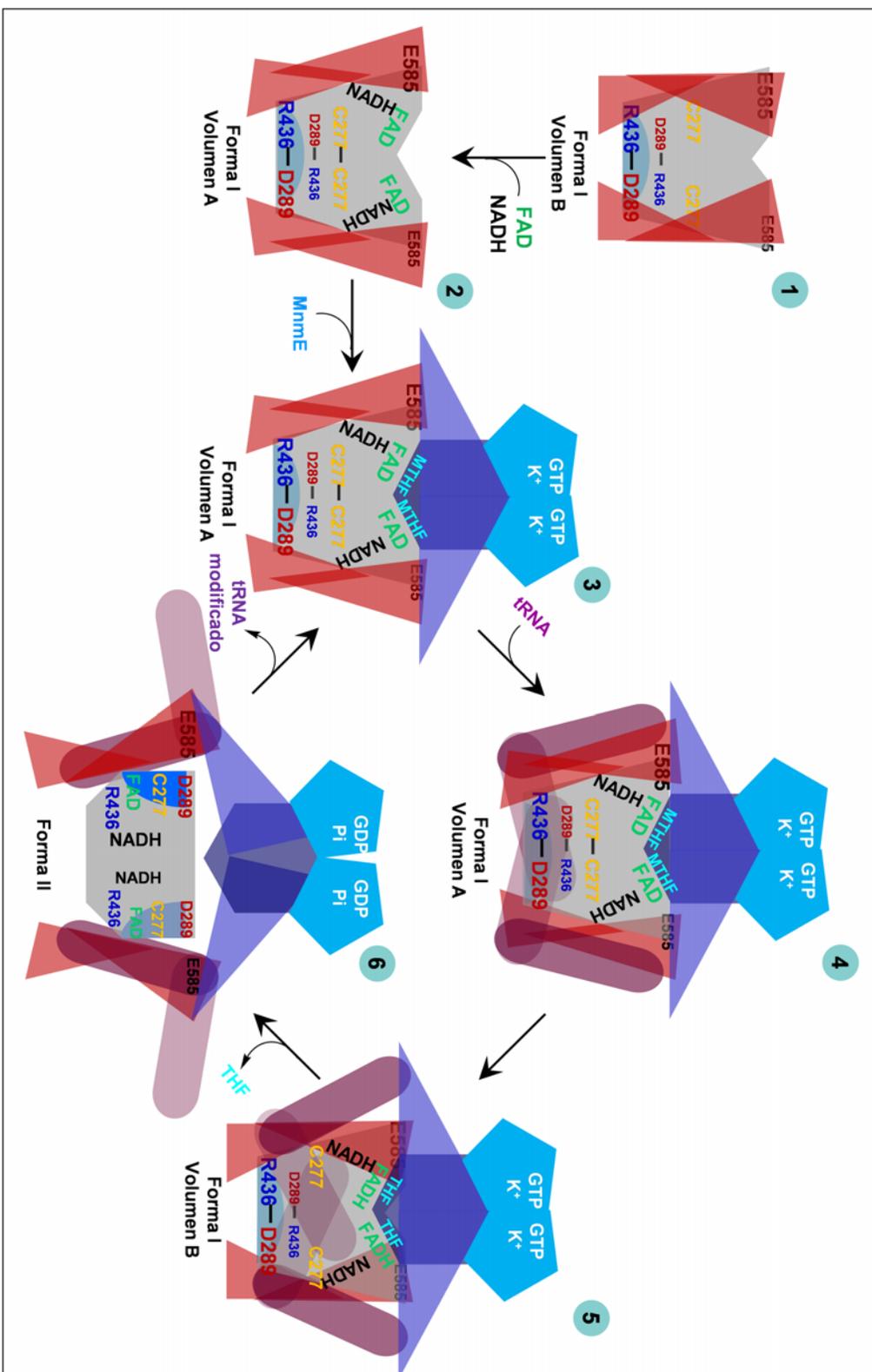


Figura 51: Modelo propuesto para el ciclo conformacional de MnmG.

PARTE 2

“¡Y vaya si la hizo crecer! ¡Mucho más aprisa de lo que imaginaba!”

Alicia en el País de las Maravillas. Lewis Carroll, 1865.

Cuando analizamos el estado de oligomerización de MnmG por filtración en gel observamos la aparición de dos picos de volumen de elución inferior al de la forma dimérica (**figura 53A**). El volumen de elución de estas fracciones adicionales corresponde a tamaños de alrededor de 300 kDa (pico B) y mayores de 600 kDa (pico A). La presencia de MnmG fue confirmada por SDS-PAGE en todas las fracciones (**figura 53A**, inserto). En un principio, asociamos la fracción A con precipitación de la proteína y la fracción B con una forma tetramérica minoritaria de MnmG. Sin embargo, una observación cuidadosa de las dos conformaciones de MnmG nos hizo sospechar la posibilidad de que los conformeros idénticos pudieran asociarse entre sí, dando oligómeros de mayor tamaño que podrían eluir en la fracción A.

Como se muestra en la **figura 52**, las interfaces de dimerización de la forma I y II de MnmG no solapan; además, los residuos que pertenecen a la interfaz de dimerización de la forma I están expuestos al solvente en la forma II y viceversa. Esto sugiere que varios dímeros de idéntica conformación (forma I o forma II) podrían interaccionar entre ellos a través de los residuos que formarían parte de la interfaz de dimerización en la conformación alternativa (**figura 52**). En consecuencia, decidimos estudiar con más detenimiento el material que se separa en la fracción A de la filtración en gel.

22. RNA ribosomal copurifica con MnmG.

Al estudiar los espectros de absorción de las fracciones de MnmG observamos que la fracción A, que podría corresponder a oligómeros de alto peso molecular, abreviadamente APM, presentaba un máximo a 260 nm y no alrededor de 280 nm (que es la longitud de onda donde las proteínas tienen un máximo de absorbancia debido a sus residuos aromáticos) (**figura 53B**). Este cambio en el máximo de absorbancia podría deberse a la presencia de ácidos nucleicos en la muestra cuya absorbancia máxima ocurre precisamente a 260 nm. Para investigar la naturaleza del material copurificado con MnmG, calentamos una muestra de la fracción A a 95°C durante 15 minutos y, tras 10 minutos de centrifugación, recuperamos el sobrenadante. A continuación,

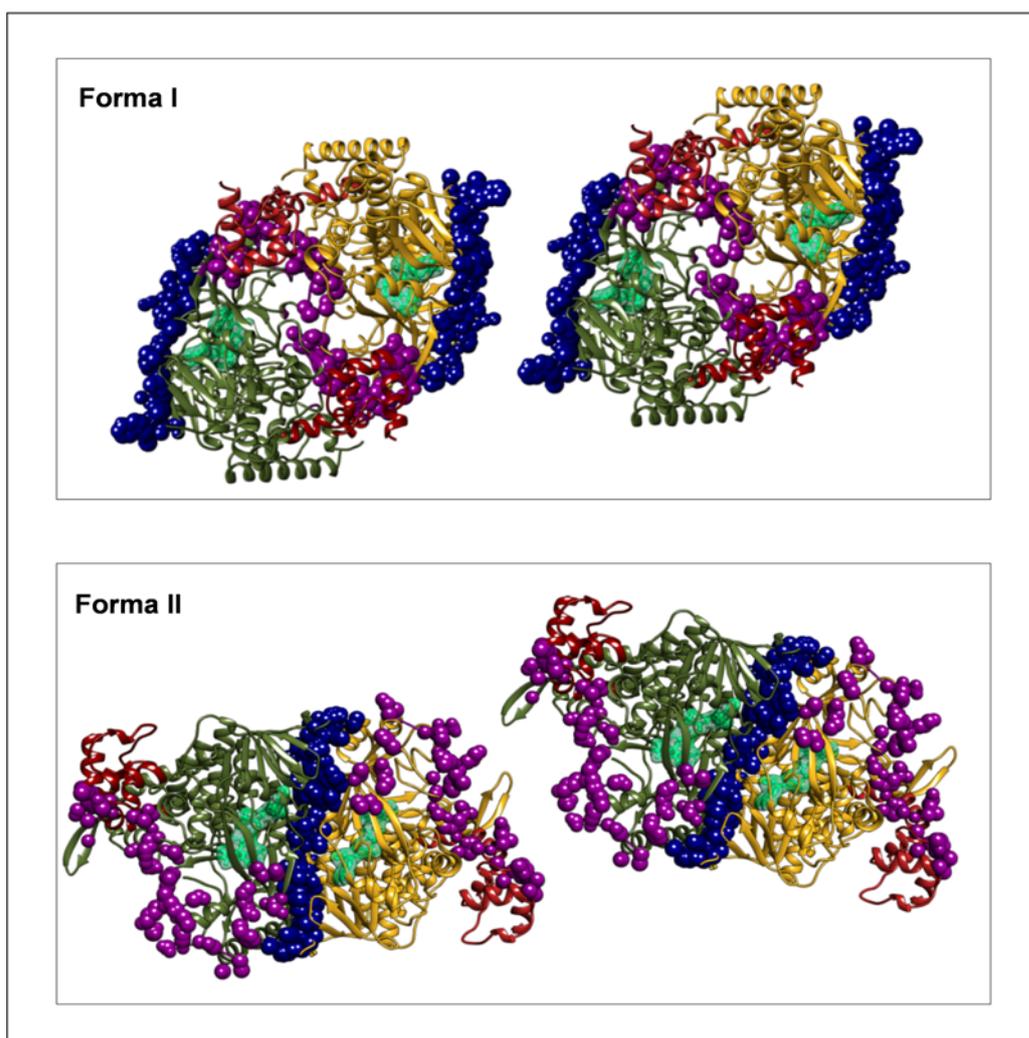


Figura 52: Las interfaces alternativas de dimerización de MnmG permiten la interacción entre los dímeros de una misma conformación. Representación en cintas de dos dímeros de la forma I (arriba) y de la forma II (abajo) de MnmG encarando los residuos que forman parte de la interfaz de dimerización de la forma II (arriba, esferas azules) y de la forma I (abajo, esferas magenta).

tratamos el sobrenadante con DNasa o RNasa durante 45 min a 37°C. En la **figura 53C** se muestra un gel de agarosa en el cual corrimos el sobrenadante con y sin tratamiento con DNasa o RNasa. La tinción del gel con “Gel Red” confirmó que el material copurificado con MnmG y presente en la fracción A es un ácido nucleico y la degradación específica con RNasa demostró su naturaleza de RNA. Dado que MnmG es una enzima modificadora de tRNA, en principio pensamos que el RNA copurificado podría ser tRNA pero el rango de tamaños que abarcaba el material obtenido por desnaturalización térmica de la proteína (**figura 53C**) no nos cuadraba de manera precisa con el tamaño esperado para un tRNA (alrededor de 70 pb) y, además, daba un barrido que sugería cierta degradación de moléculas de mayor tamaño.

Para conservar la integridad del RNA copurificado e intentar identificar el tipo de RNA, realizamos una extracción de ácidos nucleicos con fenol-cloroformo de la fracción A de MnmG y la comparamos en agarosa con un extracto fenol-cloroformo de RNA total procedente de *E. coli* (**figura 53D**). Dos bandas pudieron ser observadas, una banda mayoritaria que mostraba una migración similar al RNA 23S y una segunda banda con migración similar al RNA 16S. En el análisis se apreciaba que parte del RNA está degradado, seguramente debido al proceso de purificación de la proteína MnmG, lo que podría haber alterado ligeramente la proporción de las bandas observadas. En síntesis, los resultados indicaban que el RNA ribosomal grande (23S y 16S) copurificaba con MnmG y sugerían que MnmG podría estar asociada al rRNA en la fracción A.

23. Diferentes estados oligoméricos de MnmG están asociados con RNA ribosomal.

Las moléculas de rRNA de 16S y 23S tienen masas de aproximadamente 500 kDa y 1000 kDa, respectivamente (**figura 54**). Por lo tanto, es difícil saber a priori como estará asociada la proteína MnmG a las mismas, dado que el rango óptimo de separación de proteínas en la columna utilizada de filtración en gel (Superdex 200 HR10/30) es desde 10 kDa a 600 kDa. Con el fin de dilucidar esta cuestión, decidimos tratar con RNasa A las fracciones de MnmG, separadas por filtración en gel, para degradar cualquier RNA asociado a MnmG y, a continuación, analizar las muestras mediante electroforesis en gel roja nativa (NRE)

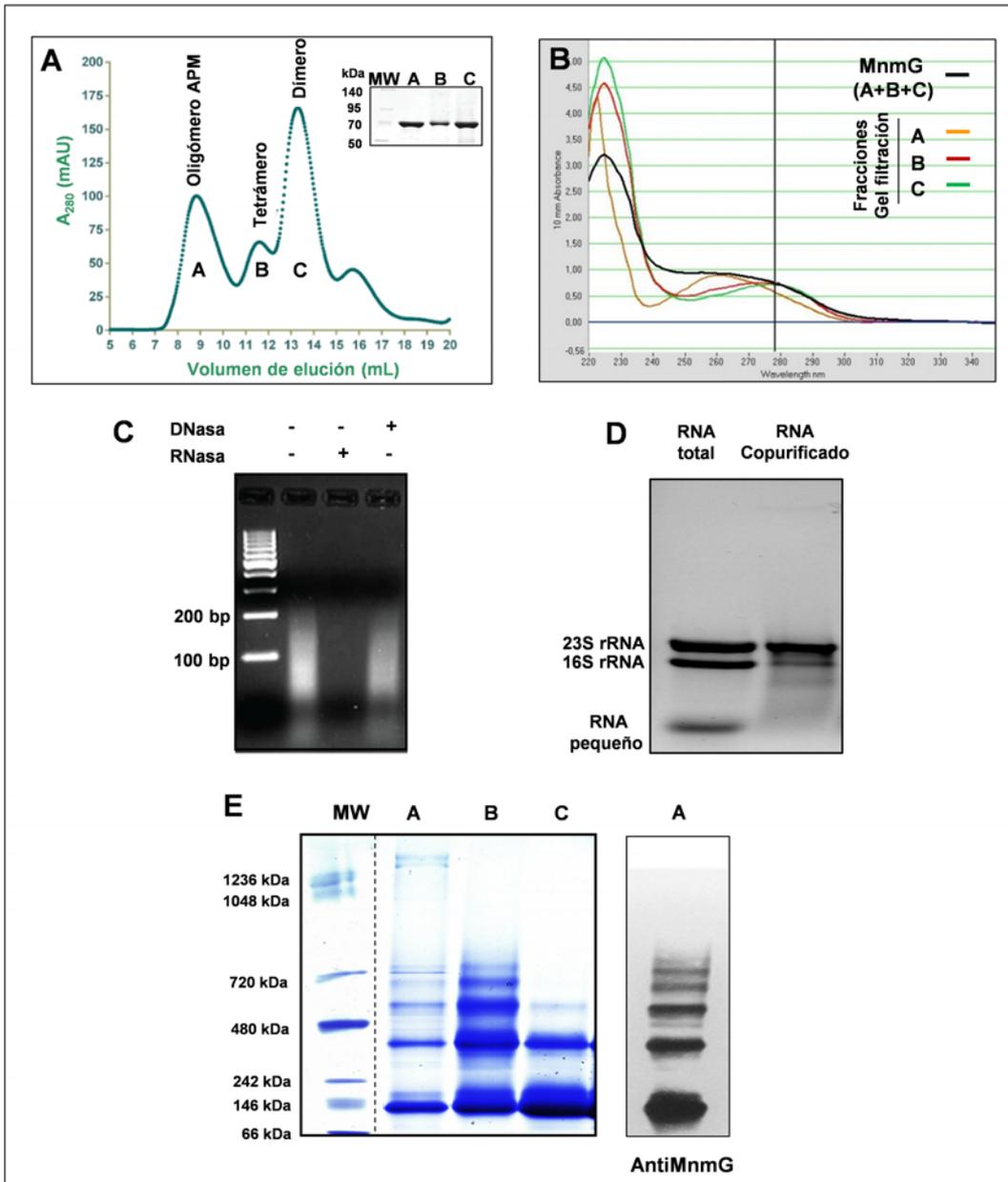


Figura 53: MnmG puede formar oligómeros de alto peso molecular que copurifican con RNA ribosomal. **A)** Filtración en gel de MnmG purificada mostrando tres picos principales correspondientes a complejos de MnmG de diferente tamaño (dímeros, tetrámeros y de alto peso molecular). **B)** Espectro de absorción en el UV de las diferentes fracciones de MnmG obtenidas por filtración en gel. **C)** Degradación específica por RNasa del material copurificado con MnmG extraído por desnaturalización térmica. **D)** Gel de agarosa comparando la migración de un RNA total y el RNA copurificado con MnmG, ambos extraídos con fenol-cloroformo. **E)** Electroforesis rojo nativa (NRE) en gradiente (3-12%) comparando las fracciones de MnmG obtenidas por gel filtración y tratadas con RNasa (panel izquierdo). Inmunotransferencia del carril A del gel NRE mostrado en el panel izquierdo usando un anticuerpo policlonal contra MnmG (panel derecho).

en gradiente (3-12 % de acrilamida). El gel fue posteriormente teñido con azul de Coomassie para detectar el estado de oligomerización de las proteínas en el gel. En todos los carriles fueron detectadas formas diméricas, tetraméricas y otras formas de mayor masa molecular (**figura 53E**, panel izquierdo). Concretamente, en el carril correspondiente a la fracción A, observamos bandas con una migración correspondiente a masas moleculares entre 140 kDa y 1200 kDa. Estos resultados sugieren que el pico APM está compuesto por diferentes complejos RNA-MnmG formados por RNA y diversas formas oligoméricas de MnmG. Realizando un análisis Western de la fracción A, con un anticuerpo policlonal anti-MnmG, comprobamos que, efectivamente, no solo las bandas correspondientes a dímeros y tetrámeros de MnmG sino también bandas de masas superiores a 700 kDa eran reconocidas por el anticuerpo (**figura 53E**, panel derecho). Únicamente las dos bandas de migración más lenta no fueron detectadas en el análisis Western pero es posible que la transferencia de estas formas a la membrana de PVDF no fuese eficiente dada su alta masa molecular (>1000 kDa). En conjunto, todos estos resultados indican que MnmG puede formar oligómeros APM estabilizados por interacciones proteína-proteína ya que el RNA no es requerido para su mantenimiento.

24. Una molécula de RNA ribosomal es capaz de unir varios dímeros de MnmG *in vitro*.

Los resultados anteriores indican que MnmG interacciona con RNA (**figura 53**) y sugieren que esta interacción podría influir en el estado de oligomerización de MnmG. MnmG podría utilizar el rRNA como andamio para su oligomerización APM. Dado el relativamente gran tamaño de los rRNAs, una molécula de rRNA podría ser capaz de albergar inicialmente varios dímeros de MnmG (**figura 54**). Por tanto, decidimos comprobar mediante EMSA si la forma dimérica de MnmG era capaz de unirse al rRNA *in vitro*. Para este propósito, hicimos una extracción fenol-cloroformo de ácidos nucleicos de *E. coli* seguida de un tratamiento con DNasa para eliminar cualquier resto de DNA. A continuación, incubamos 2.5 µg del RNA extraído con cantidades crecientes de la forma dimérica de MnmG (**figura 53A**, fracción B) y analizamos su patrón de migración en geles de agarosa al 1.75 %, para cantidades menores de MnmG y al 1.25 %, para cantidades mayores de MnmG, (**figura**

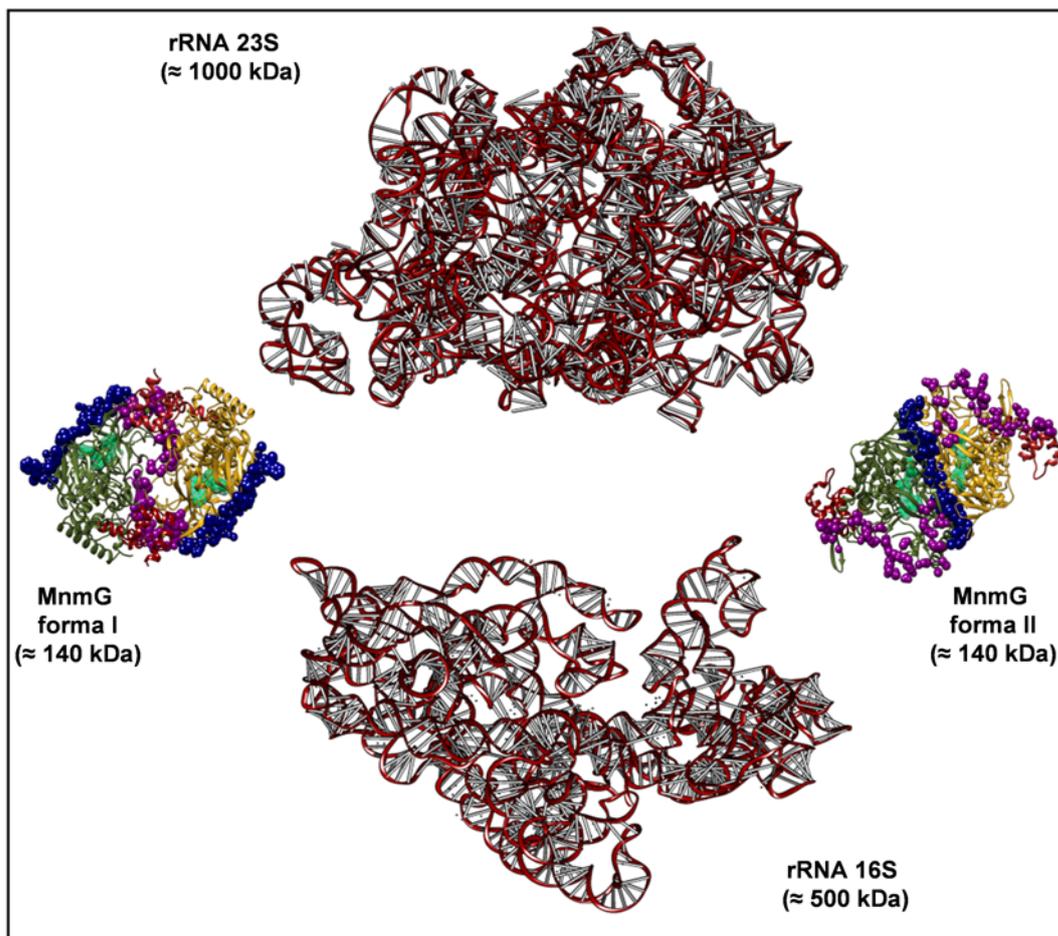


Figura 54: Comparación de la masa molecular de los rRNA 23S y 16S con la de MnmG. Estructuras tridimensionales del rRNA 23S y rRNA 16S obtenidas de los PDBs 1C2W y 4DR3 respectivamente. Las formas I y II de MnmG proceden de los PDBs 2ZXH y 2ZXI respectivamente.

55A). Dado que en la muestra de RNA hay moléculas de diferente tamaño, es difícil calcular con precisión su concentración. Por esa razón, expresamos la proporción RNA:proteína en función de su masa.

El ensayo de EMSA reveló un retraso en las bandas correspondientes a los rRNAs 23S y 16S, principalmente a concentraciones mayores de MnmG (**figura 55A**, arriba). Los gels fueron teñidos, tras el revelado con “Gel Red” (GR), con azul de Coomassie (CB), detectando la presencia de proteína en las mismas posiciones que el RNA y confirmando así la formación de complejos RNA:proteína (**figura 55A**, abajo). Conviene resaltar el desplazamiento gradual en la movilidad de los complejos RNA:proteína a medida que aumentamos la concentración de MnmG. Este patrón de migración sugiere que se están formando complejos de diferente tamaño debido a que múltiples dímeros de MnmG se están uniendo por molécula de RNA y que altas concentraciones de MnmG son necesarias para saturar el sistema. En la **figura 55B** se presenta un esquema ilustrativo de esta cuestión. Para confirmar que el desplazamiento en función de la concentración de MnmG es debido a la interacción con el RNA, repetimos este mismo experimento en ausencia de RNA pero con las mismas concentraciones de MnmG usadas para visualizar la interacción con el RNA. Como puede observarse en el gel teñido con CB que se presenta en la **figura 55C**, no hay variación en la migración relativa de MnmG a medida que aumenta su concentración. Hay que tener en cuenta que la migración en un gel de agarosa en condiciones nativas depende de la forma, tamaño y carga de la molécula o complejo que se analiza. Dado el gran tamaño de los rRNAs 23S y 16S (**figura 54**) y, por consiguiente, la gran cantidad de carga negativa que aportan al complejo, éste avanza más rápidamente que la proteína MnmG sola (**figura 55, A y C**). Por otra parte, es lógico que a bajas concentraciones de MnmG (**figura 55A**, izquierda) no se observen desplazamientos ya que el incremento de masa del complejo es pequeño, al igual que la compensación de carga negativa que pueda haber producido la unión de MnmG sobre el rRNA. La unión de MnmG por el rRNA parece ser bastante específica puesto que no se observa ninguna disminución de la banda correspondiente al RNA pequeño que hemos asociado con el RNA 5S, salvo un ligero descenso a las concentraciones más elevadas de MnmG (**figura 55A**). El RNA pequeño probablemente incluye tRNA además del rRNA 5S. Dado que MnmG es capaz de unir tRNA (**figura 48 y tabla 10**), es posible que a concentraciones saturantes de MnmG, dímeros libres de MnmG interaccionen con el tRNA presente en el extracto .

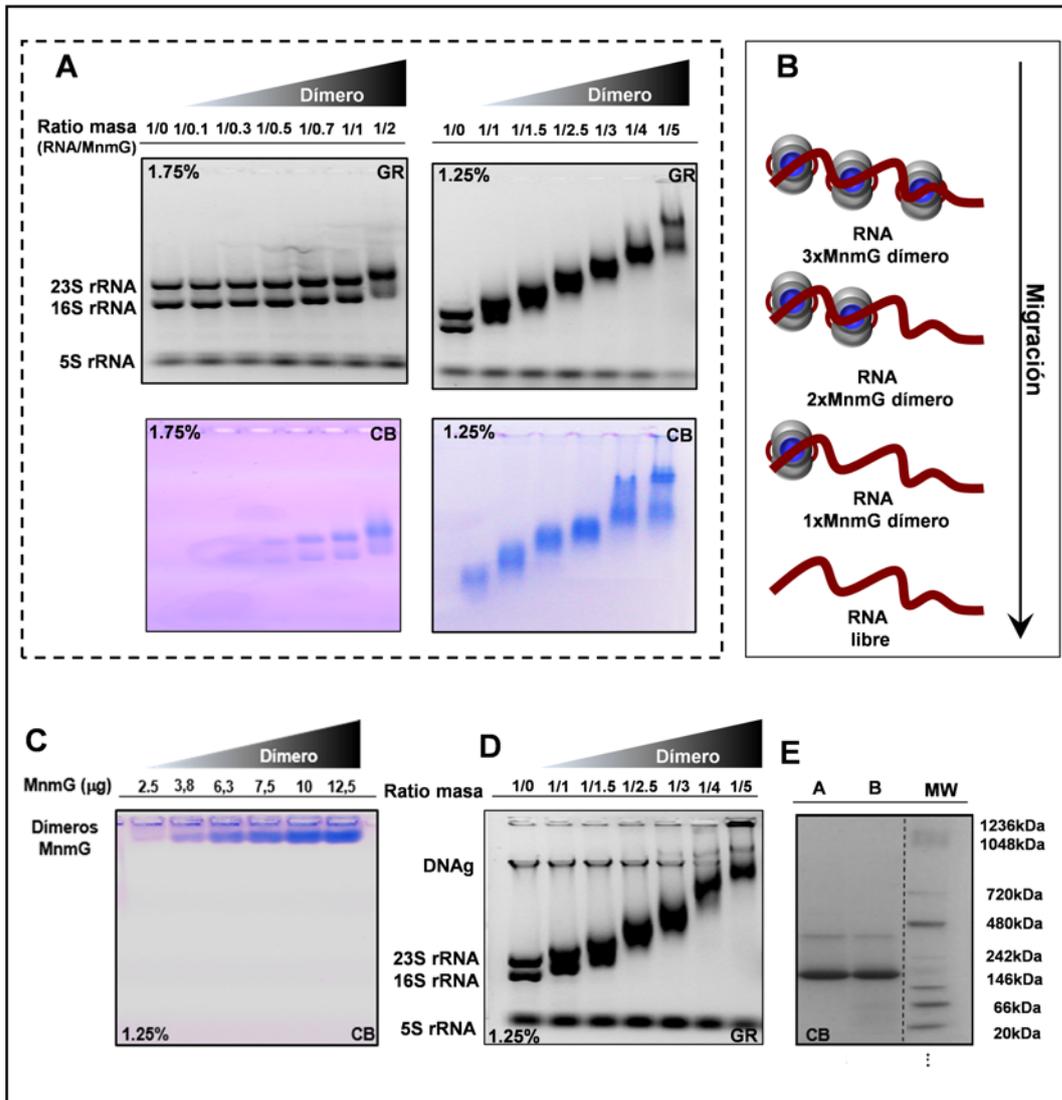


Figura 55: Reconstitución *in vitro* de los complejos rRNA-MnmG. **A)** Geles de retardo (EMSA) teñidos con Gel Red (GR, paneles superiores) o azul de Coomassie (CB, paneles inferiores) a los porcentajes de agarosa indicados (1.75 % y 1.25 %) muestran la capacidad de MnmG de unir rRNA *in vitro*. La ratio indica la proporción RNA (2.5 μg)/dímero de MnmG analizada en cada carril. **B)** Diagrama mostrando la incorporación de dímeros de MnmG sobre el andamio de rRNA. **C)** Gel de agarosa en el que se ha cargado MnmG en las mismas condiciones que en los geles de retardo pero en ausencia de rRNA. **D)** Gel de retardo en presencia de DNA genómico mostrando la especificidad de MnmG por el rRNA. **E)** Análisis en NRE de gradiente (3-12 % poliacrilamida) de MnmG (12.5 μg) incubada (B) o no (A) con rRNA (2.5 μg) y tratada con RNasa. Gel teñido con azul de Coomassie (CB)

Quisimos también comprobar la especificidad de MnmG por RNA respecto DNA. Para ello obtuvimos de nuevo un extracto de ácidos nucleicos de *E. coli* por el método fenol-cloroformo pero sin tratamiento con DNasa y repetimos el experimento descrito arriba de retraso en gel con las concentraciones más elevadas de MnmG. En un gel de agarosa se apreció en esta ocasión una banda de DNA genómico (DNAg) cuya movilidad no varió al aumentar la concentración de MnmG excepto a las concentraciones más altas (**figura 55D**). Además, el patrón de migración de los complejos rRNA:MnmG es similar al observado en ausencia de DNAg (**figura 55A**, arriba panel derecho).

Parece evidente que en las condiciones experimentales usadas, la interacción del rRNA con MnmG es muy clara y específica. No podemos, sin embargo, descartar que MnmG pueda también interactuar con el DNA. Se necesitarán experimentos adicionales para probar la especificidad de tal interacción MnmG-DNA. En conjunto, los resultados que se muestran en la **figura 55** sustentan la idea que el rRNA puede actuar como andamio para la oligomerización de MnmG ya que es capaz de unir varios dímeros de MnmG por molécula. Dado el gran tamaño de los rRNAs, es factible que un número específico de dímeros de MnmG se una al rRNA formando un complejo nucleoproteico de alto peso molecular .

Estos experimentos, sin embargo, no aclaran si en los complejos rRNA:MnmG reconstituidos *in vitro* los dímeros de MnmG interactúan entre sí formando un oligómero proteico como parece que ocurre en los complejos rRNA:MnmG purificados a partir de cultivos de *E. coli* (**figura 53E**). Para comprobar esta posibilidad analizamos en NRE en gradiente (3-12 %) una muestra de MnmG (12.5 µg), incubada o no con rRNA (2.5 µg) y tratada posteriormente con RNasa. La tinción con CB del gel no mostró ninguna diferencia entre la muestra incubada con RNA y la que no lo estaba ya que en ambas calles solo se observan bandas, de intensidad similar, correspondientes a la forma dimérica y, en mucha menor proporción, a la forma tetramérica de MnmG (**figura 55E**). Este resultado sugiere que además del rRNA es necesario otro factor/es para promover las interacciones proteína-proteína entre los dímeros o tetrámeros de MnmG y formar un oligómero APM.

25. El tRNA compite por la unión de MnmG con el rRNA.

Nuestros resultados han demostrado que la forma dimérica de MnmG interactúa con el rRNA y con tRNA (figuras 55, 48 y tabla 10). Dado que MnmG tiene un único parche cargado positivamente en cada protómero (figura 44) es posible que el tRNA y el rRNA compitan por el mismo sitio de unión en MnmG. Para demostrar esta hipótesis realizamos un ensayo de competición usando EMSA (en gel de agarosa), analizando la migración de un complejo rRNA:MnmG (1:5) preformado tras su incubación con concentraciones crecientes de tRNA^{Lys} (purificado de una cepa de *E. coli*). Los resultados (figura 56) indicaron que a medida que aumentaba la concentración de tRNA se producía la aparición de rRNA libre así como un aumento en la movilidad de los complejos rRNA:MnmG. Estos datos permiten concluir que el tRNA compite con el rRNA por la unión de MnmG, al menos *in vitro*, siendo capaz de liberar rRNA y dímeros de MnmG de los complejos rRNA:MnmG preformados

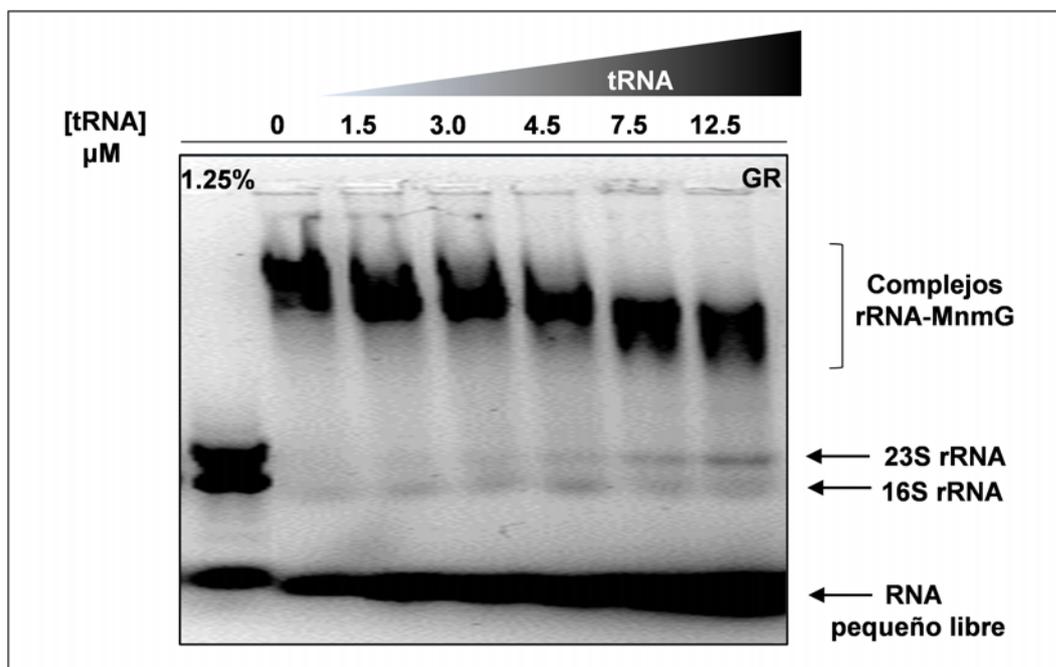


Figura 56: El tRNA disocia los complejos rRNA:MnmG reconstituidos *in vitro*. Ensayo de competición usando EMSA de un complejo 1:5 rRNA:MnmG (preformado) con concentraciones crecientes de un tRNA purificado (tRNA^{Lys}).

Utilizando el software del servidor ARTs [21], hemos encontrado estructuras similares al brazo anticodón del tRNA en el rRNA alineando tridimensionalmente un tRNA^{Glu} (PDB: 2DET) con las estructuras de los rRNA 23S y 16S (**figura 57**) (PDBs 1C2W y 4DR3 respectivamente). Dado que MnmG interacciona *in vitro* tanto con tRNAs sustratos como no sustratos (**tabla 10**), parece que es capaz de reconocer estructuras similares en todos los tRNAs aunque solo modifique un grupo de tRNAs determinado. Por tanto, es posible que MnmG pueda unirse al rRNA reconociendo regiones estructurales accesibles similares al brazo anticodón del tRNA.

26. La fracción APM de MnmG presenta actividad NADH oxidasa.

Como se ha comentado previamente, MnmG es una flavoenzima [97] capaz de unir NADH específicamente [60]. Una actividad NADH oxidasa en MnmG nunca ha sido descrita, pero la presencia de NADH es necesaria para la formación del puente disulfuro C277-C277 intermolecular (**figura 39**) y aumenta la proporción de tRNA modificado *in vitro* por MnmEG aunque solo en concentraciones limitantes de FAD [63]. Con la forma dimérica de MnmG nunca hemos detectado una actividad NADH oxidasa relevante (**figura 42**, panel derecho) pero se ha visto que la actividad de un gran número de proteínas está regulada por su estado de oligomerización. De hecho, varios estudios han demostrado el importante papel de la homo-oligomerización en diferentes rutas regulando expresión génica, actividad enzimática, canales iónicos e incluso adhesiones célula-célula [43]. Por ejemplo, la peroxiredoxina bacteriana AhpC requiere la transición desde formas diméricas a formas decaméricas para llevar a cabo su actividad peroxidasa [70]. Así que nos propusimos monitorizar la actividad NADH oxidasa en las diferentes fracciones de MnmG eluidas por filtración en gel. Para ello, teniendo en cuenta que solo la forma reducida del NAD (es decir, el NADH) absorbe a 340 nm, medimos la absorbancia (A_{340}) a esta longitud de onda de una solución de 250 μ M de NADH durante 20 min añadiendo proteína a una concentración final de 2 μ M. Dada la presencia de rRNA en la fracción APM de MnmG, no pudimos cuantificar espectrofotométricamente de manera precisa la proteína presente en esa muestra. Lo que hicimos fue igualar las absorbancias de las fracciones de MnmG llevando a

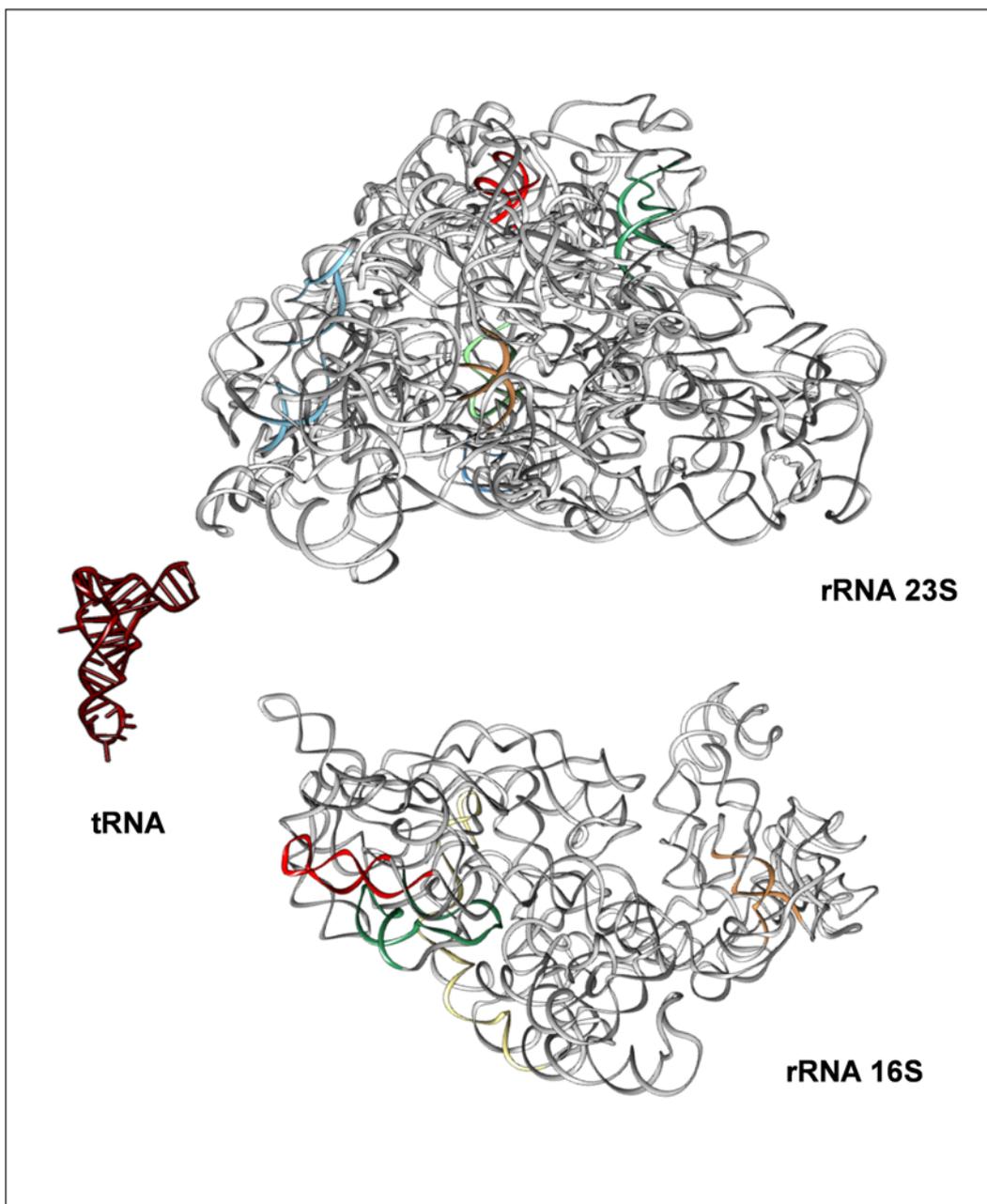


Figura 57: El rRNA tiene estructuras similares a tRNA expuestas al solvente. Representación en cintas de la estructura tridimensional de los rRNAs 23S y 16S así como del tRNA^{Glu} procedente del PDB: 2DET). En diferentes colores se destacan las regiones del rRNA que adquieren una estructura similar al tRNA, según el software del servidor ARTs.

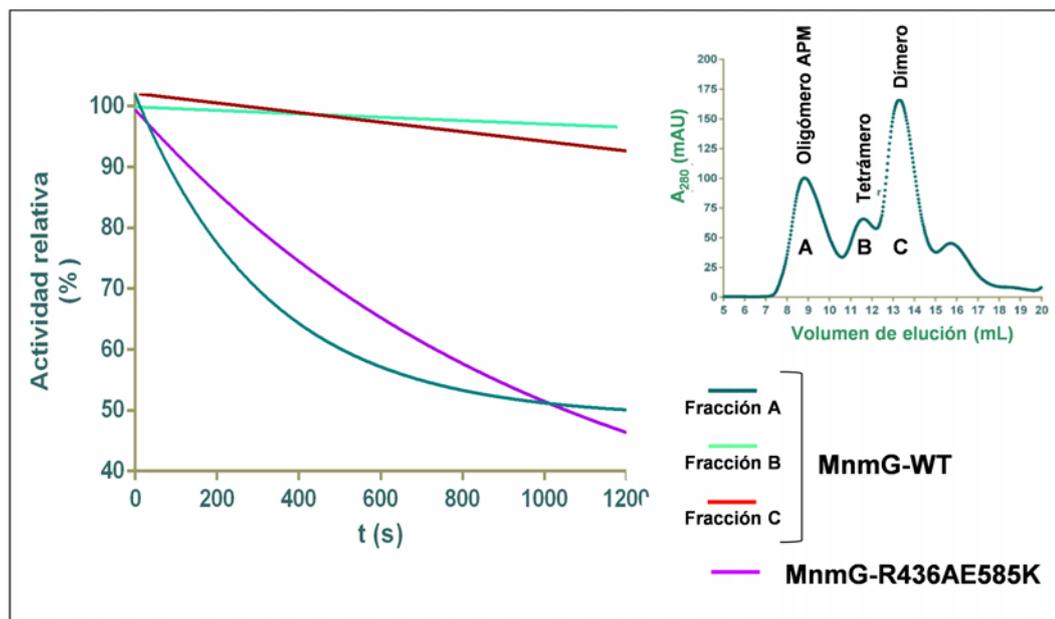


Figura 58: La fracción de MnmG de alto peso molecular exhibe actividad NADH oxidasa. Medida de la oxidación de NADH en el tiempo monitorizando la A_{340} de las diferentes fracciones de MnmG eluidas desde la filtración en gel y de la variante MnmG-R436AE585K

cabo las diluciones pertinentes para añadir el mismo volumen en el ensayo de actividad. Así pues hay que tener en cuenta que la fracción de alto peso molecular tendrá una concentración de proteína MnmG menor a $2 \mu\text{M}$, a diferencia de las otras dos fracciones cuya concentración pudo ser calculada de manera precisa. Aun así, un descenso significativo en la A_{340} , con un comportamiento que se ajusta a una función de decaimiento exponencial, fue detectado exclusivamente en la fracción APM (**figura 58**). Concretamente, con la fracción A (oligómero APM) se observa una caída en la A_{340} del 35 % a los 7 min, mientras que la incubación de la solución de NADH con las fracciones B (tetrámeros) y C (dímeros) solo disminuyó la A_{340} muy ligeramente: menos del 5 % tras 20 min de incubación (**figura 58**).

Estos datos muestran que la fracción APM de MnmG tiene una actividad NADH oxidasa incrementada, lo que a su vez sugiere que el rRNA o la oligomerización de MnmG mediada por rRNA son responsables de esta estimulación de la actividad. Medimos, entonces, la actividad NADH oxidasa de un complejo rRNA:MnmG 1:5 reconstituido *in vitro* y no detectamos ningún descenso significativo en la A_{340} (datos no mostrados). Nuestros datos indicaron, por tanto, que la incubación durante 30 min de rRNA con MnmG es suficiente

para formar complejos rRNA:MnmG (**figura 55A**) pero no para que se forme un oligómero APM (estabilizado por interacciones proteína-proteína) (**figura 55E**) ni para estimular la actividad NADH oxidasa de MnmG. Así pues, proponemos que la formación de un oligómero APM de MnmG, en el que varios dímeros interaccionan entre sí, es necesaria para promover la actividad NADH oxidasa.

27. La conformación II de MnmG promueve su oligomerización de orden superior.

Nuestros hallazgos han sugerido que, además de la unión de rRNA, otro factor/es son necesarios para establecer las interacciones proteína-proteína que requiere la oligomerización APM de MnmG y la consiguiente estimulación de la actividad NADH oxidasa. Resultados previos (primera parte de esta Tesis) indican que MnmG en solución está principalmente adoptando la forma I de MnmG, estabilizada por el puente salino intermolecular R436-D289 y la interacción del C_{ARM} con el núcleo catalítico de su protómero opuesto (mediada por los residuos E585 y G606). Esta información nos llevó a pensar que una transición de la forma I a la forma II de MnmG podría ser necesaria para la oligomerización APM de MnmG. Por tanto, para desplazar el equilibrio conformacional de MnmG hacia la forma II introdujimos el cambio R436A en la variante MnmG-E585K. Una vez construida y purificada la nueva variante MnmG-R436AE585K en condiciones reductoras, analizamos su estado de oligomerización usando filtración en gel. La proteína, casi en su totalidad, eluyó en volúmenes correspondientes a masas superiores a 600 kDa (**figura 59A**). Dado que con MnmG-WT habíamos detectado la presencia de rRNA en la fracción APM (**figura 53, B-D**), esta vez analizamos el experimento de filtración en gel a las longitudes de onda de 280 nm y 260 nm. Como se observa en los cromatogramas de la **figura 59A**, la absorbancia de MnmG-R436AE585K a 260 nm fue mucho mayor que a 280 nm, sugiriendo que lleva rRNA asociado. Para confirmar esta posibilidad y determinar el estado oligomérico de la proteína MnmG-R436AE585K unida al rRNA, repetimos el experimento de filtración en gel tras hacer un tratamiento con RNasa. En este caso observamos un solo pico correspondiente a tamaños mayores de 600 kDa pero con una absorción a 260 nm mucho menor que la muestra sin tratar con RNasa a consecuencia

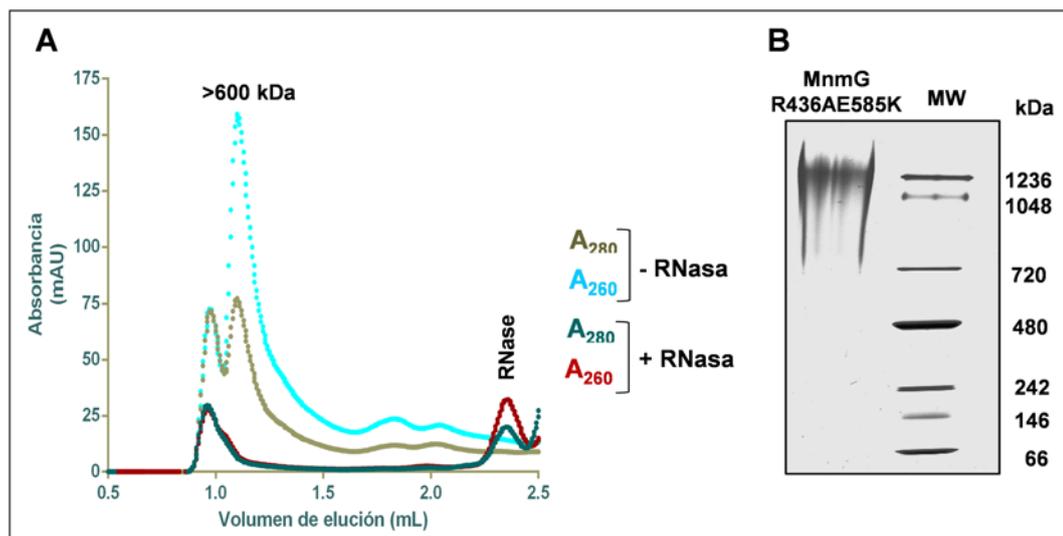


Figura 59: La variante MnmG-R436E585K adopta un estado de oligomerización de alto peso molecular asociado a RNA. A) Perfil de elución en gel filtración de la variante MnmG-R436AE585K monitorizado a las longitudes de onda de 260 nm y 280 nm antes y después del tratamiento con RNasa. **B)** Análisis en NRE en gradiente (3-12 %) de la variante MnmG-R436E585K tratada con RNasa (carril izquierdo). Un marcador de masas moleculares (MW) se corrió en el carril derecho.

de la degradación del rRNA. Picos correspondientes a formas tetraméricas o diméricas de MnmG no fueron detectados, indicando que prácticamente toda la variante MnmG-R436E585K estaba en la forma de un oligómero proteico de alto peso molecular asociado al rRNA.

Para confirmar este resultado y precisar el tamaño del oligómero formado por esta variante decidimos analizar mediante NRE en gradiente (3-12 %) una muestra de MnmG-R436AE585K tratada con RNasa. Solo una banda con una migración correspondiente a un tamaño mayor de 1100 kDa fue detectada, confirmando que la proteína está en forma de oligómero APM (**figura 59B**). El conjunto de estos datos sugiere que una transición desde la forma I a la forma II, además de la unión a rRNA, promueve la oligomerización APM de MnmG. Analizamos también si la variante MnmG-R436AE585K era capaz de oxidar NADH y, tal como esperábamos, detectamos un descenso en la A_{340} similar al observado con la fracción APM de MnmG-WT, (**figura 58**). Estos datos apoyan la idea de que la actividad NADH oxidasa en MnmG es estimulada por su oligomerización APM lo que a su vez requiere una transición de la conformación I a la conformación II de MnmG.

28. Modelo estructural de la oligomerización APM de MnmG.

Nuestros resultados indican que en los complejos rRNA:MnmG purificados de cultivos de *E. coli* existen interacciones proteína-proteína entre los dímeros de MnmG ya que los oligómeros APM resisten el tratamiento con RNasa (**figura 53E**). Además, experimentos *in vitro* indican que varios dímeros de MnmG son capaces de asociarse con una molécula de rRNA (**figura 55A**), sugiriendo que MnmG puede usar al rRNA como andamio para su oligomerización (**figura 55B**). Por tanto, parece que el rRNA es necesario para la oligomerización APM de MnmG pero no para su mantenimiento. Finalmente, nuestros datos indican que la oligomerización está favorecida por la conformación II de MnmG (**figura 59**).

A partir de todos estos datos hemos construido un modelo para explicar la oligomerización APM de las formas diméricas de MnmG y que se detalla a continuación. Dado que nuestros experimentos nunca han mostrado formas monoméricas de MnmG y que la afinidad entre monómeros es muy alta, con una constante de disociación menor de $0.1 \mu\text{M}$ según datos de ITC, asumimos que la unidad básica de repetición en el oligómero de MnmG es el dímero. Las interfaces de dimerización de las formas I y II de MnmG no solapan y los residuos que forman la interfaz de dimerización de una forma están expuestos al solvente en la otra. Como hemos comentado ya, tal disposición permite interacciones entre las conformaciones I o entre las conformaciones II de MnmG. Nuestros experimentos indican que la forma II de MnmG promueve la oligomerización APM (**figura 59**). Así pues, para la construcción del modelo, superpusimos dos dímeros de la forma II sobre un dímero de la forma I de tal manera, que un protómero de cada dímero de la forma II alinee con un protómero del dímero de la forma I y así sucesivamente. De esta manera conseguimos situar varios dímeros de MnmG en su forma II interaccionando entre sí a través de los residuos que pertenecen a la interfaz de dimerización de la forma I (PDB 2ZXH). Como resultado de este procedimiento obtuvimos un oligómero filamentoso de simetría helicoidal dextrógira (**figura 60**).

Según el modelo construido, tres dímeros de MnmG son necesarios para completar una vuelta de hélice, lo que correspondería con un paso de hélice (P) de unos 190 \AA , un radio (R) de 65 \AA y una masa molecular teórica de 420 kDa. Dada esta forma filamentosa, el oligómero de MnmG podría alcanzar

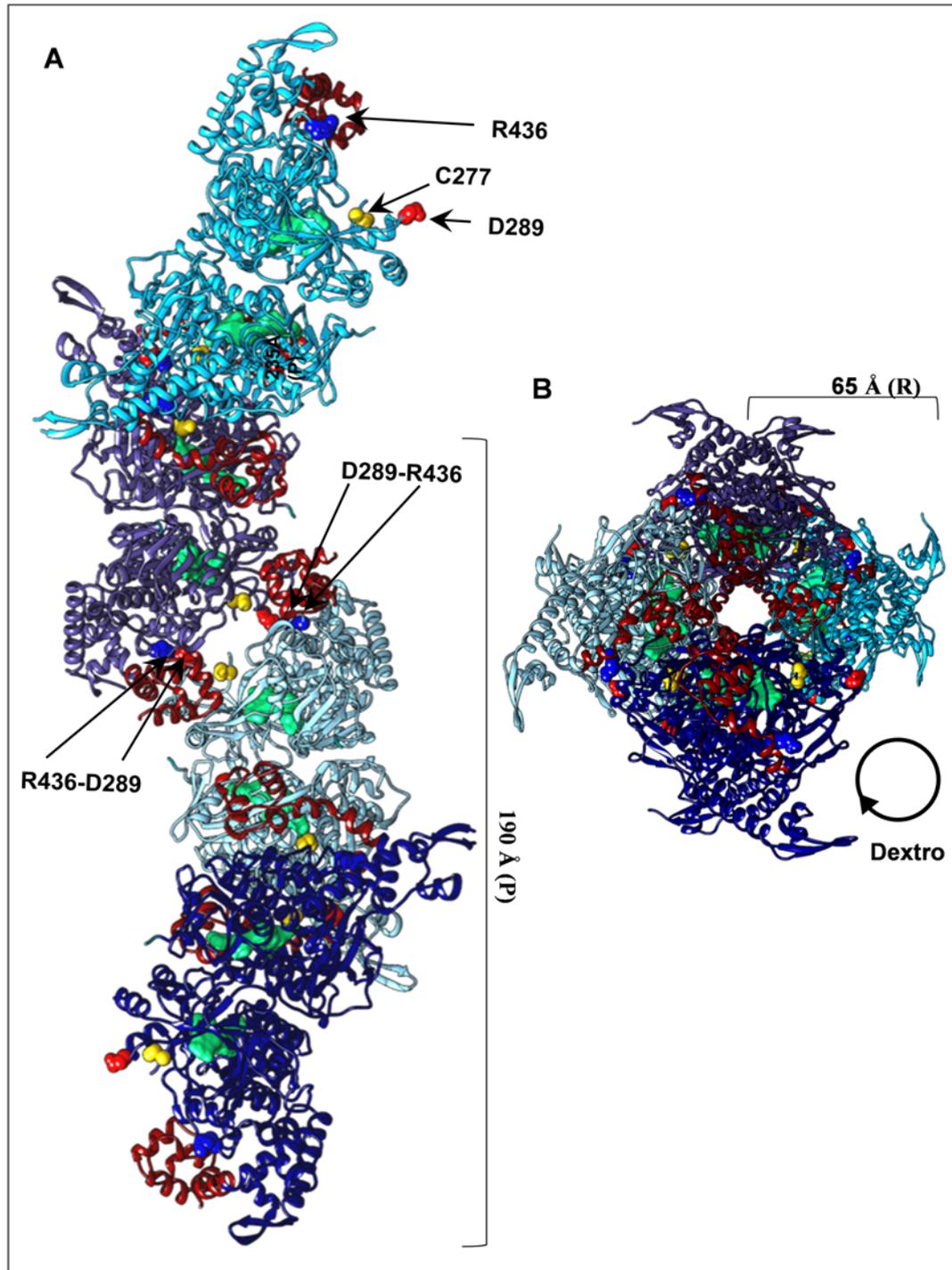


Figura 60: Modelo estructural de oligómeros de APM de MnmG. A) Vista longitudinal de un oligómero helicoidal de APM formado con cuatro dímeros de la forma II de MnmG, cada uno coloreado de manera diferente. Los residuos C277, D289 y R436 está representados en esferas amarillas, rojas y azules, respectivamente. En angstroms se expresa la longitud de una vuelta de hélice que es completada por tres dímeros de MnmG **B)** Vista transversal del oligómero helicoidal de APM de MnmG donde se puede apreciar la simetría dextrógira de la hélice y su radio de unos 65 Å.

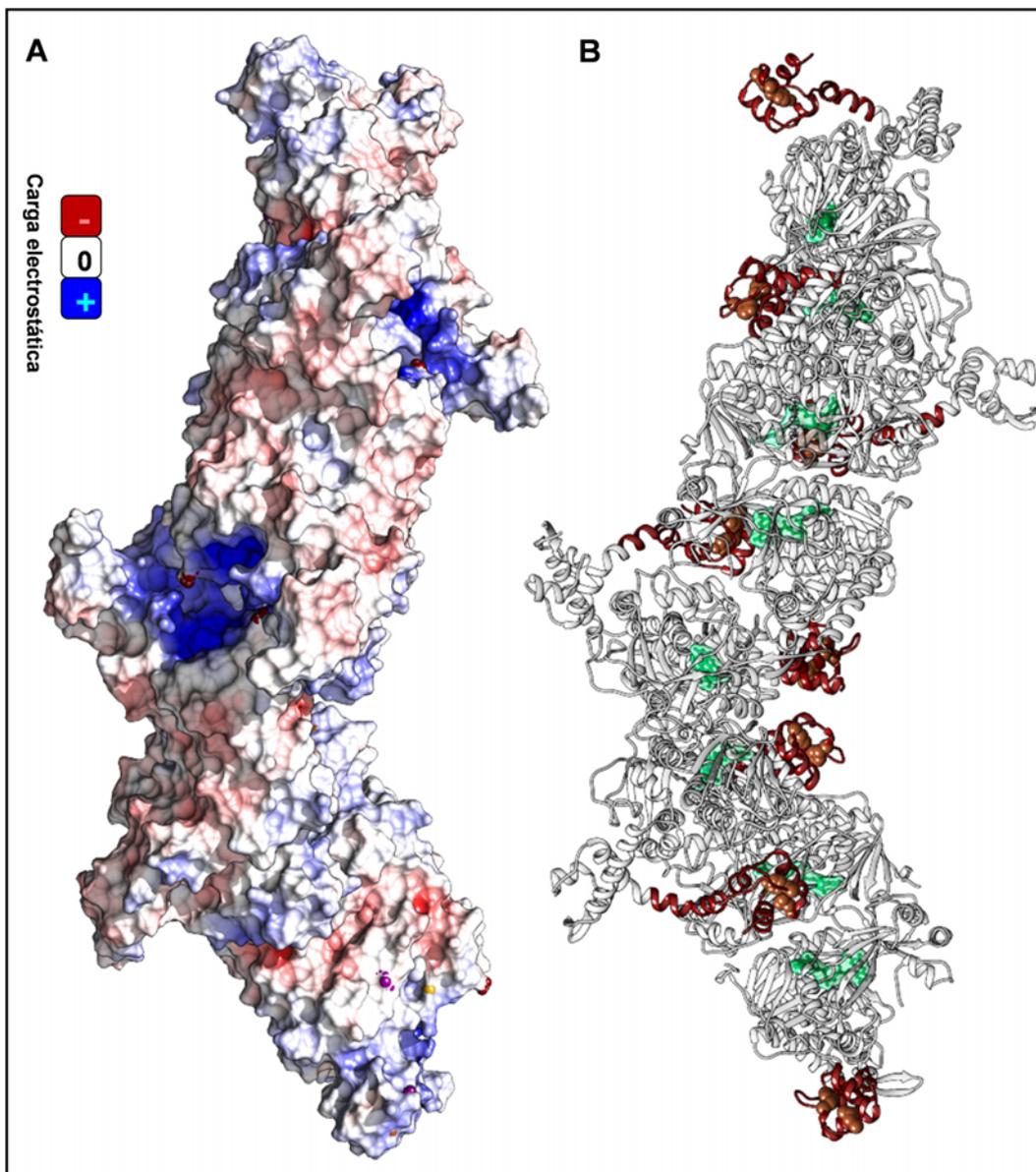


Figura 61: El oligómero de APM de MnmG permite la interacción con RNA y MnmE. A) Representación del potencial de superficie electrostático de un oligómero APM de MnmG construido a partir de dímeros de MnmG en forma II. En azul se han coloreado las zonas cargadas positivamente y capaces de unir RNA. **B)** Representación en cintas de un oligómero APM de MnmG con los C_{ARM} coloreados en rojo. Los residuos del C_{ARM} que hemos identificado como implicados en la unión de MnmE (Y576 y L582) están destacados en esferas marrones

tamaños realmente elevados. Nuestros experimentos han mostrado oligómeros de MnmG de más de 1100 kDa (**figuras 53E y 59**), correspondiendo a más de dos vueltas de hélice, aunque hay que tener en cuenta que las formas filamentosas se retrasan al atravesar matrices porosas (como es el caso de filtración en gel o NRE) respecto a formas más globulares, pudiendo sobreestimarse el tamaño del oligómero en cuestión. Si representamos el potencial electrostático de superficie de los dímeros que forman el oligómero se observa que los parches cargados positivamente quedan expuestos al solvente permitiendo la interacción con RNA (**figura 61A y animación 2**, archivo animaciones.ppt CDTesis). Nuestro modelo, por tanto, apoya que el rRNA actúe como andamio de la oligomerización APM de MnmG, limitando a su vez el tamaño del filamento proteico helicoidal. Por otro lado, los residuos pertenecientes al C_{ARM} de MnmG que hemos identificado como implicados en la interacción con MnmE (Y576 y L582) (**tabla 8**) quedan accesibles en nuestro modelo (**figura 61B**) sugiriendo que MnmE podría interaccionar con el oligómero APM de MnmG.

También hemos elaborado un modelo de oligómero APM partiendo de la conformación I (**figura 62**, panel central y **animación 3** archivo animaciones.ppt CDTesis). En este caso, los extremos del oligómero son, como era de esperar, distintos. Además, el paso de hélice es de 160 Å, en lugar de los 190 Å que se observan en el oligómero de la forma II, aunque el radio en ambos casos es de unos 65 Å. Mientras ha sido relativamente fácil detectar residuos que, como el R436 y el E585, afectan la estabilidad de la conformación I y promueven la adopción de la conformación II cuando son cambiados, no es fácil encontrar residuos que impidan la adopción de la conformación II. Por tanto, este es un tema que deberá ser estudiado más adelante y, por el momento, no podemos excluir la posibilidad de que en la célula pueda haber oligómeros APM tanto de la forma I como de la forma II.

29. Consideraciones generales.

La capacidad de MnmG para adoptar diferentes configuraciones diméricas, no solo ha revelado información valiosa acerca del *modus operandi* del complejo MnmEG para llevar a cabo la modificación de tRNA (parte I de esta Tesis), sino que, además, nos ha llevado a descubrir la habilidad de MnmG para formar oligómeros APM gracias a sus dos posibles interfaces de dimerización (parte II de esta Tesis). Nuestros resultados apoyan la idea de que MnmG usa el rRNA (16S y 23S) como andamio arquitectónico para su oligomerización APM, lo que abre una nueva perspectiva en la función y/o regulación de MnmG al introducir el rRNA como un nuevo elemento de interacción con esta flavoenzima.

El RNA actúa como andamio en diferentes complejos macromoleculares como el espliceosoma [90], la telomerasa [98], la partícula de reconocimiento de señal (SRP) [81], el propio ribosoma [66] o el complejo Rev-RRE del virus HIV [27]. Concretamente, en este último ejemplo, las secuencias de RNA RRE (Respuesta a Elemento Rev) guían la homo-oligomerización de la proteína Rev de manera similar a lo que parece suceder con el rRNA y MnmG. Aunque nuestros experimentos indican que el rRNA es quien guía la oligomerización APM de MnmG reclutando varios dímeros por molécula (**figura 55, A y B**), el intento de reconstituir *in vitro* el oligómero APM mostró la necesidad de otro factor/es para el establecimiento de las interacciones proteína-proteína necesarias para su formación (**figura 55E**). Al introducir los cambios R436A y E585K en MnmG, que deberían abolir la adopción de la forma I dimérica en condiciones reductoras (**figuras 36 y 37**), la variante adquirió en su totalidad el estado oligomérico APM *in vivo* y, tras un tratamiento con RNasa, no fueron observadas formas oligoméricas de MnmG inferiores a 1000 kDa (**figura 59**), a diferencia de lo que se observa en la proteína WT (**figura 53E**). Dado que nuestros datos apuntan a que MnmG-WT está adoptando principalmente la forma dimerica I, y que en esta forma es capaz de unirse al rRNA, es posible que una transición de la forma I a la forma II de MnmG, mientras está unida al rRNA, sea necesaria para que los dímeros de MnmG interactúen entre sí formando el homo-oligómero APM. La interacción con rRNA podría romper el puente salino R436-D289 y MnmE “abrir” los C_{ARM} de MnmG como consecuencia del ciclo GTPasa, induciendo así una transición de la forma I a la forma II, tal y como se ha propuesto en el modelo del *modus operandi* de la reacción de modificación de tRNA (**figura 51**). Una vez los dímeros de MnmG

interaccionan entre sí, el rRNA no es necesario para su mantenimiento ya que los oligómeros APM resisten el tratamiento con RNasa (**figuras 52E y 59**).

Por lo tanto, en nuestro modelo de trabajo proponemos que, por un lado, la interacción con una molécula de RNA, ya sea tRNA o rRNA, sería responsable de la rotura del puente salino, dada su accesible posición en el sitio de unión de RNA y la conocida importancia de este tipo de enlaces en la interacción con ácidos nucleicos [56, 75] y, por otro lado, la interacción con MnmE, modulada por el ciclo GTPasa de esta proteína, sería responsable de la apertura del C_{ARM} , pasando así MnmG de la conformación I a la II. En la conformación II, si el tRNA es la molécula interactuante, proseguiría el proceso de modificación como hemos propuesto en el modelo presentado en la **figura 51** (parte I de la Tesis), mientras que si es el rRNA la molécula interactuante, la adquisición de la conformación II promovería la formación del oligómero MnmG mediante interacciones homodímero-homodímero.

El modelo construido del homo-oligómero APM con la forma II, sitúa varios dímeros de MnmG en forma II interaccionando entre ellos a través de la interfaz de dimerización de la forma I, resultando en un filamento de simetría helicoidal que deja expuestas tanto las zonas de interacción con RNA como con MnmE (**figura 61**) y, por tanto, manteniendo *a priori* su capacidad de interaccionar con estas moléculas. Aunque la construcción de la proteína MnmG-R436E585K nos ha permitido confirmar que MnmG es capaz de formar oligómeros *in vivo* de una masa superior a 1000 kDa, no podemos descartar que también un oligómero de la forma I pueda formarse *in vivo*, generando oligómeros de masa superior al tetrámero. En cualquier caso, ambas interfaces de dimerización (forma I y forma II) coexisten tanto en los oligómeros APM construidos a partir de la forma II como de la forma I. Conviene señalar que la actividad NADH oxidasa solo está estimulada en la fracción con oligómeros de masa superior a 1000 kDa y es mucho menor en las fracciones conteniendo solo oligómeros de masa inferior a 1000 kDa (**figura 58**).

La asociación de MnmG al rRNA y su consecuente oligomerización APM sugiere la existencia de una función no convencional de MnmG o de un complejo mecanismo de regulación de la modificación de tRNA en la U34. La asociación de MnmG con el rRNA podría ocurrir ya durante la transcripción del rRNA (y la adopción de estructura secundaria por parte de éste), dado que es entonces cuando el rRNA podría estar más desnudo de proteínas ribosomales; en cualquier caso, parece razonable que la interacción entre MnmG y

el rRNA se produzca en unas condiciones en las que esté favorecida frente a la de otras proteínas.

Dado que el oligómero APM de MnmG, en principio, puede aceptar tRNA y MnmE y, además, tiene actividad NADH oxidasa, cabe preguntarse si la formación de este oligómero facilitaría la reacción de modificación. La reacción de modificación *in vitro* realizada por MnmEG requiere NADH cuando la concentración de FAD es limitante [63]. Por ello, se propuso que su actividad NADH oxidasa sería necesaria para mantener el FAD reducido durante el proceso de modificación (**figura 10**). Curiosamente, la oligomerización APM de MnmG induce la actividad NADH oxidasa pero esta actividad es mínima en los oligómeros inferiores a 1000 kDa (**figura 58**). Por tanto, si la actividad NADH oxidasa es necesaria para la modificación de tRNA, cabe pensar que MnmG debe estar participando adoptando un estado homo-oligomérico superior a 1000 kDa. Alternativamente, podría ser la unión de NADH, y no la actividad NADH oxidasa el requisito para que la modificación de tRNA tenga lugar porque tal unión estabilizaría alguna variación conformacional local cuando el FAD es limitante. En este caso, la actividad NADH oxidasa del oligómero APM podría estar relacionada con una segunda función de MnmG. Hasta ahora, las reacciones de modificación *in vitro* se han realizado con proteína MnmG purificada, sin evaluar su estado oligomérico [63][61]. Experimentos futuros usando diferentes fracciones de la proteína MnmG (dímeros, tetrámeros, oligómeros de APM) podrán ayudar a discernir la contribución de cada forma oligomérica de MnmG a la reacción de modificación.

Como se sugiere arriba, no podemos descartar que el oligómero tenga una segunda función que, sospechamos, podría estar relacionada con la biogénesis, estabilidad o funcionamiento del ribosoma. Esta sospecha es apoyada por la reciente demostración de que la homóloga de MnmG en humanos, la proteína MTO1, interacciona con las proteínas MPRL37 y MPRS35, constituyentes de la subunidad grande y pequeña, respectivamente, de los ribosomas mitocondriales [89]. Nuestros datos han mostrado la capacidad de MnmG de interactuar tanto con el rRNA 16S como con el rRNA 23S, que forman parte de la subunidad pequeña (30S) y grande (50S) del ribosoma bacteriano, respectivamente. Por ello, es posible que el oligómero de MnmG, una vez formado, participe en el ensamblaje funcional del ribosoma interactuando además con proteínas ribosomales, como indican los resultados obtenidos con MTO1[89].

El C_{ARM} de MnmG contiene un dominio tipo SAM que guarda una alta

homología estructural con el flexible dominio N-terminal de la recombinasa RAD51 (**figura 49** y **tabla 11**). La recombinasa RAD51 está implicada en recombinación homóloga, catalizando reacciones de intercambio de hebra con DNA de doble cadena y DNA de cadena simple. RAD51 forma filamentos alrededor del DNA de simetría helicoidal dextrógira, con pasos de hélices de unos 130 Å, [16, 2]. Nuestro modelo del oligómero APM de MnmG también muestra un filamento de simetría helicoidal dextrógira con un paso de hélice de 190 Å para el construido con la forma II y de 160 Å para el de la forma I (**figura 62**). La exposición al solvente de los parches cargados positivamente permite la interacción con RNA al igual que sucede con RAD51 en su interacción con DNA (**figura 63**). Cabe recordar, en este punto, que nuestros datos no descartan que MnmG también pueda interaccionar con DNA (**figura 55D**). Hay que tener en cuenta que nuestro modelo de oligómero no puede predecir las fuerzas topológicas que entran en juego al interaccionar varios dímeros de MnmG entre sí y que el filamento podría comprimirse al interaccionar con el rRNA, por lo que las dimensiones predichas para la hélice podrían variar. En cualquier caso, los oligómeros helicoidales de MnmG tienen una forma similar a los formados por RAD51, teniendo en cuenta que la masa molecular de un protómero de MnmG es de 70 kDa y la del protómero de RAD51 es de unos 53 kDa. En ambos casos se requiere un número de seis protómeros para completar una vuelta de hélice de configuración dextrógira quedando los parches positivos expuestos al solvente y los dominios SAM accesibles para la interacción con otras proteínas o ácidos nucleicos (**figura 62**). De hecho, el dominio SAM de RAD51 interacciona con DNA [2], con la proteína supresora de tumores BRCA2 [85] y, además, con su propio dominio C-terminal con actividad ATPasa [31]. Por lo tanto, no sería extraño que el dominio SAM (C_{ARM}) de MnmG pueda participar en la interacción con rRNA y proteínas ribosomales, además de con tRNA, MnmE y el núcleo catalítico de MnmG, como se ha demostrado en la primera parte de esta Tesis. RAD51 requiere la hidrólisis de ATP, que lleva a cabo su dominio C-terminal, para modular la dinámica de su nucleofilamento [31]. Para la formación del nucleofilamento RAD51:DNA debe producirse una interacción entre el dominio C-terminal (ATPasa) de una subunidad y el N-terminal (dominio SAM) de la subunidad adyacente, lo que a su vez modula la hidrólisis de ATP necesaria para la actividad de intercambio de hebra. Es tentador especular que, de manera similar a RAD51, MnmG, con la colaboración de MnmE, tenga una acción topológica sobre el rRNA en la

RESULTADOS Y DESARROLLO ARGUMENTAL

que la hidrólisis de GTP de MnmE y la oxidación de NADH de MnmG fueran requeridas, pudiendo participar en el ensamblaje del ribosoma.

En conclusión, en esta parte de la Tesis demostramos la capacidad de MnmG para formar oligómeros de alto peso molecular, la participación del rRNA como andamio arquitectónico de estos oligómeros y que una transición de la conformación I a la II facilita la oligomerización *in vivo*. Además, demostramos que la actividad NADH oxidasa de MnmG está asociada a su estado oligomérico APM. En tal conformación, los sitios de unión a RNA y los C_{ARM} permanecen accesibles, lo que brinda múltiples posibilidades de interacción que serán exploradas en un futuro.

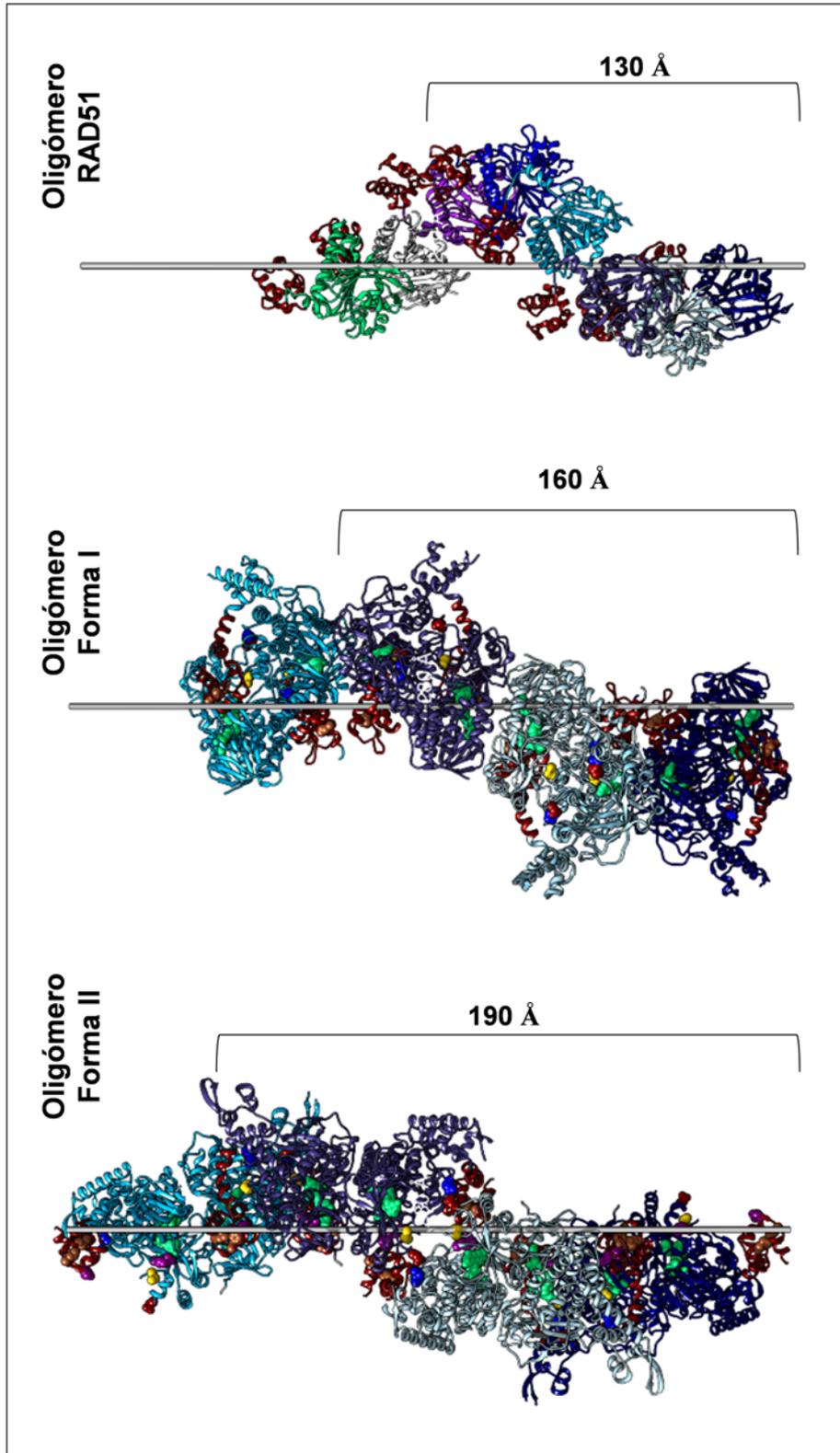


Figura 62: Comparación de los modelos del oligómero APM de MnmG con el oligómero formado por RAD51. Representación en cintas del oligómero APM de MnmG construido con cuatro dímeros de la forma II (izquierda) o de la forma I (centro) y el oligómero de 8 protómeros formado por la proteína RAD51 (derecha). En angstroms (Å) se expresa la longitud correspondiente a una vuelta de hélice en cada oligómero. Los dominios SAM tanto de MnmG (C_{ARM}) como de RAD51 (N-terminal) se colorean en rojo.

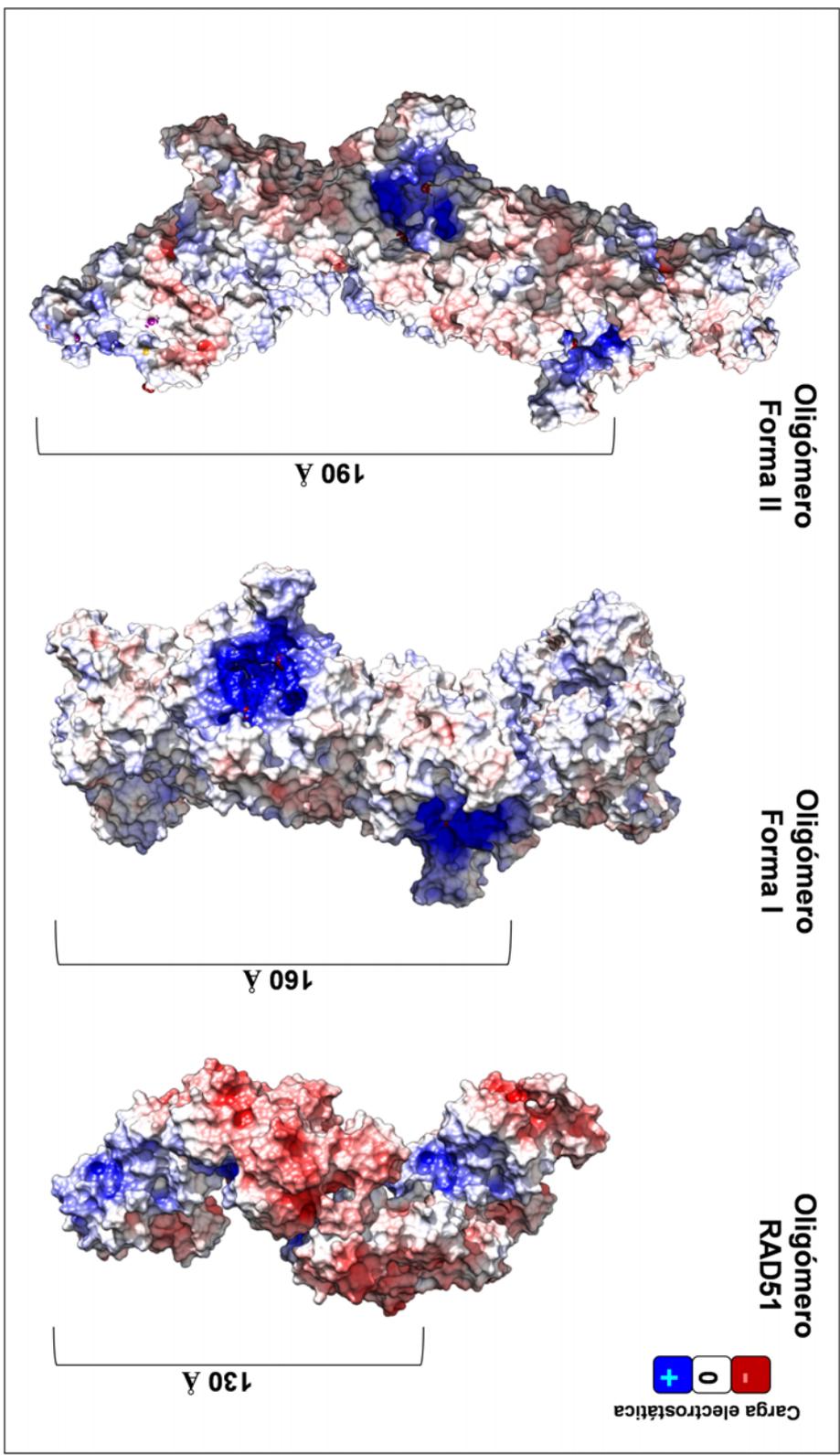


Figura 63: Comparación de los modelos contruidos del oligómero APM de MnmG con el oligómero formado por RAD51. Representación del potencial electrostático del oligómero APM de MnmG construido con cuatro dímeros de la forma II (izquierda) o de la forma I (centro) y del oligómero de 8 protómeros formado por la proteína RAD51 (derecha). En angstroms (Å) se expresa la longitud correspondiente a una vuelta de hélice en cada oligómero.

Parte V

CONCLUSIONES

1. La estructura tridimensional de MnmG está compuesta por tres dominios, que a su vez se organizan en un núcleo catalítico (FAD + inserción) y un “brazo” altamente móvil compuesto por dos regiones designadas N_{ARM} , poco conservada y C_{ARM} , altamente conservada. La unión de FAD induce cambios conformacionales en MnmG que contribuyen a la formación de un centro catalítico funcional ya que mutaciones que alteran la unión de FAD o los mencionados cambios conformacionales causan un déficit en la función modificadora de MnmG.
2. El C_{ARM} de MnmG es capaz de interactuar, a través de su cara interna, con el núcleo catalítico de MnmG y, a través de su cara externa, con MnmE.
3. Los dímeros MnmG pueden adoptar dos conformaciones (I y II) con interfaces de dimerización distintas y no solapantes. La conformación I se estabiliza a través de un puente salino intermolecular (R436-D289) y de la interacción del C_{ARM} con el núcleo catalítico. La rotura de estas interacciones produce la conformación II. Además, la forma I puede transitar entre dos estadios dependientes de un puente disulfuro intermolecular (C277-C277) que regula la interacción con el dominio de unión de MTHF de MnmE y el acceso del tRNA al centro catalítico del complejo MnmEG.
4. El C_{ARM} de MnmG contiene un dominio α -estéril (SAM) que guarda alta similitud con el dominio N-terminal de RAD51. Este dominio es fundamental para las interacciones proteína-proteína de MnmG y participa directamente en su interacción con tRNA.
5. MnmG, además de formar dímeros y tetrámeros, es capaz de formar oligómeros de masas moleculares próximas a 1000 kDa que copurifican con los rRNAs 16S y 23S.
6. El RNA ribosomal (16S y 23S) es capaz de reclutar varios dímeros de MnmG actuando como andamio arquitectónico y probablemente guiando la homo-oligomerización de alto peso molecular de MnmG que se observa *in vivo*. La transición de la forma I a la II promueve la oligomerización de MnmG *in vivo* lo que a su vez estimula su actividad NADH oxidasa.

CONCLUSIONES

Nuestros resultados son compatibles con un modelo por el que los cambios conformacionales de MnmG dirigen su participación en los diferentes pasos de la reacción de modificación del tRNA y promueven su oligomerización de orden superior. La función de los oligómeros APM de MnmG está por determinar pero la asociación de MnmG con los rRNAs y la de su homóloga humana MTO1 con proteínas de los mitorribosomas sugiere que puede relacionarse con la biogénesis ribosomal.

Bibliografía

- [1] Agris, Paul F. 2008. Bringing order to translation: the contributions of transfer RNA anticodon-domain modifications. *EMBO reports*, **9**(7), 629–635.
- [2] Aihara, Hideki, Ito, Yutaka, Kurumizaka, Hitoshi, Yokoyama, Shigeyuki, & Shibata, Takehiko. 1999. The N-terminal domain of the human Rad51 protein binds DNA: structure and a DNA binding surface as revealed by NMR. *Journal of molecular biology*, **290**(2), 495–504.
- [3] Altschul, Stephen F, Gish, Warren, Miller, Webb, Myers, Eugene W, & Lipman, David J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*, **215**(3), 403–410.
- [4] Armengod, M-Eugenia, Moukadiri, Ismaïl, Prado, Silvia, Ruiz-Partida, Rafael, Benítez-Páez, Alfonso, Villarroya, Magda, Lomas, Rodrigo, Garzón, María J, Martínez-Zamora, Ana, Meseguer, Salvador, *et al.* 2012. Enzymology of tRNA modification in the bacterial MnmEG pathway. *Biochimie*, **94**(7), 1510–1520.
- [5] Armengod, M Eugenia, Meseguer, Salvador, Villarroya, Magda, Prado, Silvia, Moukadiri, Ismaïl, Ruiz-Partida, Rafael, Garzón, M José, Navarro-González, Carmen, & Martínez-Zamora, Ana. 2014. Modification of the wobble uridine in bacterial and mitochondrial tRNAs reading NNA/NNG triplets of 2-codon boxes. *RNA biology*, **11**(12), 1495–1507.
- [6] Ashkenazy, Haim, Erez, Elana, Martz, Eric, Pupko, Tal, & Ben-Tal, Nir. 2010. ConSurf 2010: calculating evolutionary conservation in sequence and structure of proteins and nucleic acids. *Nucleic acids research*, gkq399.
- [7] Aviv, Tzvi, Lin, Zhen, Lau, Stefanie, Rendl, Laura M, Sicheri, Frank, & Smibert, Craig A. 2003. The RNA-binding SAM domain of Smaug defines a

- new family of post-transcriptional regulators. *Nature Structural & Molecular Biology*, **10**(8), 614–621.
- [8] Baker, Nathan A, Sept, David, Joseph, Simpson, Holst, Michael J, & McCammon, J Andrew. 2001. Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **98**(18), 10037–10041.
- [9] Baruffini, Enrico, Dallabona, Cristina, Invernizzi, Federica, Yarham, John W, Melchionda, Laura, Blakely, Emma L, Lamantea, Eleonora, Donnini, Claudia, Santra, Saikat, Vijayaraghavan, Suresh, *et al.* 2013. MTO1 mutations are associated with hypertrophic cardiomyopathy and lactic acidosis and cause respiratory chain deficiency in humans and yeast. *Human mutation*, **34**(11), 1501–1509.
- [10] Berman, Helen M, Westbrook, John, Feng, Zukang, Gilliland, Gary, Bhat, TN, Weissig, Helge, Shindyalov, Ilya N, & Bourne, Philip E. 2000. The protein data bank. *Nucleic acids research*, **28**(1), 235–242.
- [11] Björk, Glenn R, Huang, Bo, Persson, Olof P, & Byström, Anders S. 2007. A conserved modified wobble nucleoside (mcm5s2U) in lysyl-tRNA is required for viability in yeast. *Rna*, **13**(8), 1245–1255.
- [12] Brégeon, Damien, Colot, Vincent, Radman, Miroslav, & Taddei, François. 2001. Translational misreading: a tRNA modification counteracts a+ 2 ribosomal frameshift. *Genes & development*, **15**(17), 2295–2306.
- [13] Cabedo, Hugo, Macián, Fernando, Villarroya, Magda, Escudero, Juan C, Martínez-Vicente, Marta, Knecht, Erwin, & Armengod, M Eugenia. 1999. The *Escherichia coli* trmE (mnmE) gene, involved in tRNA modification, codes for an evolutionarily conserved GTPase with unusual biochemical properties. *The EMBO journal*, **18**(24), 7063–7076.
- [14] Carpenter, Mark L, & Kiteale, G Geof. 1994. Analysis of DNA-protein interactions by intrinsic fluorescence. *Pages 313–325 of: DNA-Protein Interactions*. Springer.
- [15] Cho, Kyu Hong, & Caparon, Michael G. 2008. tRNA modification by GidA/MnmE is necessary for *Streptococcus pyogenes* virulence: a new strategy to make live attenuated strains. *Infection and immunity*, **76**(7), 3176–3186.

- [16] Conway, Adam B, Lynch, Thomas W, Zhang, Ying, Fortin, Gary S, Fung, Cindy W, Symington, Lorraine S, & Rice, Phoebe A. 2004. Crystal structure of a Rad51 filament. *Nature structural & molecular biology*, **11**(8), 791–796.
- [17] Crick, Francis H. 1958. On protein synthesis. *Page 138 of: Symposia of the Society for Experimental Biology*, vol. 12.
- [18] de Crécy-Lagard, Valérie, Marck, Christian, & Grosjean, Henri. 2012. Decoding in *Candidatus RIESIA pediculicola*, close to a minimal tRNA modification set? *Trends in cell & molecular biology*, **7**, 11.
- [19] Deutsch, Christopher, El Yacoubi, Basma, de Crécy-Lagard, Valérie, & Iwata-Reuyl, Dirk. 2012. Biosynthesis of threonylcarbamoyl adenosine (t6A), a universal tRNA nucleoside. *Journal of Biological Chemistry*, **287**(17), 13666–13673.
- [20] Dráb, Tomáš, Kračmerová, Jana, Tichá, Ivana, Hanzlíková, Eva, Tichá, Marie, Ryšlavá, Helena, Doubnerová, Veronika, Maňásková-Postlerová, Pavla, & Liberda, Jiří. 2011. Native Red Electrophoresis—A new method suitable for separation of native proteins. *Electrophoresis*, **32**(24), 3597–3599.
- [21] Dror, Oranit, Nussinov, Ruth, & Wolfson, Haim. 2005. ARTS: alignment of RNA tertiary structures. *Bioinformatics*, **21**(suppl 2), ii47–ii53.
- [22] Dunin-Horkawicz, Stanislaw, Czerwoniec, Anna, Gajda, Michal J, Feder, Marcin, Grosjean, Henri, & Bujnicki, Janusz M. 2006. MODOMICS: a database of RNA modification pathways. *Nucleic acids research*, **34**(suppl 1), D145–D149.
- [23] Dym, Orly, & Eisenberg, David. 2001. Sequence-structure analysis of FAD-containing proteins. *Protein Science*, **10**(9), 1712–1728.
- [24] El Yacoubi, Basma, Hatin, Isabelle, Deutsch, Christopher, Kahveci, Tamer, Rousset, Jean-Pierre, Iwata-Reuyl, Dirk, Murzin, Alexey G, & de Crécy-Lagard, Valérie. 2011. A role for the universal Kae1/Qri7/YgjD (COG0533) family in tRNA modification. *The EMBO journal*, **30**(5), 882–893.
- [25] El Yacoubi, Basma, Bailly, Marc, & de Crécy-Lagard, Valérie. 2012. Biosynthesis and function of posttranscriptional modifications of transfer RNAs. *Annual review of genetics*, **46**, 69–95.

-
- [26] Emilsson, Valur, & Kurland, Charles G. 1990. Growth rate dependence of transfer RNA abundance in *Escherichia coli*. *The EMBO journal*, **9**(13), 4359.
- [27] Fernandes, Jason, Jayaraman, Bhargavi, & Frankel, Alan. 2012. The HIV-1 Rev response element: an RNA scaffold that directs the cooperative assembly of a homo-oligomeric ribonucleoprotein complex. *RNA biology*, **9**(1), 6–11.
- [28] Fislage, Marcus, Brosens, Elke, Deyaert, Egon, Spilotros, Alessandro, Pardon, Els, Loris, Remy, Steyaert, Jan, Garcia-Pino, Abel, & Versées, Wim. 2014. SAXS analysis of the tRNA-modifying enzyme complex MnmE/MnmG reveals a novel interaction mode and GTP-induced oligomerization. *Nucleic acids research*, **42**(9), 5978–5992.
- [29] Fraaije, Marco W, & Mattevi, Andrea. 2000. Flavoenzymes: diverse catalysts with recurrent features. *Trends in biochemical sciences*, **25**(3), 126–132.
- [30] Fu, Hanjiang, Feng, Junjun, Liu, Qin, Sun, Fang, Tie, Yi, Zhu, Jie, Xing, Ruiyun, Sun, Zhixian, & Zheng, Xiaofei. 2009. Stress induces tRNA cleavage by angiogenin in mammalian cells. *FEBS letters*, **583**(2), 437–442.
- [31] Galkin, Vitold E, Wu, Yan, Zhang, Xiao-Ping, Qian, Xinguo, He, Yujiong, Yu, Xiong, Heyer, Wolf-Dietrich, Luo, Yu, & Egelman, Edward H. 2006. The Rad51/RadA N-terminal domain activates nucleoprotein filament ATPase activity. *Structure*, **14**(6), 983–992.
- [32] Gasper, Raphael, Meyer, Simon, Gotthardt, Katja, Sirajuddin, Minhajuddin, & Wittinghofer, Alfred. 2009. It takes two to tango: regulation of G proteins by dimerization. *Nature reviews Molecular cell biology*, **10**(6), 423–429.
- [33] Gasteiger, Elisabeth, Hoogland, Christine, Gattiker, Alexandre, Wilkins, Marc R, Appel, Ron D, Bairoch, Amos, *et al.* 2005. *Protein identification and analysis tools on the ExPASy server*. Springer.
- [34] Gehrke, Charles W, & Kuo, Kenneth C. 1989. Ribonucleoside analysis by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, **471**, 3–36.

- [35] Ghezzi, Daniele, Baruffini, Enrico, Haack, Tobias B, Invernizzi, Federica, Melchionda, Laura, Dallabona, Cristina, Strom, Tim M, Parini, Rosella, Burlina, Alberto B, Meitinger, Thomas, *et al.* 2012. Mutations of the mitochondrial-tRNA modifier MTO1 cause hypertrophic cardiomyopathy and lactic acidosis. *The American Journal of Human Genetics*, **90**(6), 1079–1087.
- [36] Giegé, Richard, Jühling, Frank, Pütz, Joern, Stadler, Peter, Sauter, Claude, & Florentz, Catherine. 2012. Structure of transfer RNAs: similarity and variability. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, **3**(1), 37–61.
- [37] Gil, Rosario, Silva, Francisco J, Peretó, Juli, & Moya, Andrés. 2004. Determination of the core of a minimal bacterial gene set. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **68**(3), 518–537.
- [38] Glatt, Sebastian, & Müller, Christoph W. 2013. Structural insights into Elongator function. *Current opinion in structural biology*, **23**(2), 235–242.
- [39] Glatt, Sebastian, Létoquart, Juliette, Faux, Céline, Taylor, Nicholas MI, Séraphin, Bertrand, & Müller, Christoph W. 2012. The Elongator subcomplex Elp456 is a hexameric RecA-like ATPase. *Nature structural & molecular biology*, **19**(3), 314–320.
- [40] Grosjean, Henri, Breton, Marc, Sirand-Pugnet, Pascal, Tardy, Florence, Thiaucourt, François, Citti, Christine, Barré, Aurélien, Yoshizawa, Satoko, Fourmy, Dominique, de Crécy-Lagard, Valérie, *et al.* 2014. Predicting the minimal translation apparatus: lessons from the reductive evolution of molluscs.
- [41] Hall, Tom A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Pages 95–98 of: Nucleic acids symposium series*, vol. 41.
- [42] Hamdane, Djemel, Argentini, Manuela, Cornu, David, Myllykallio, Hannu, Skouloubris, Stéphane, Hui-Bon-Hoa, Gaston, & Golinelli-Pimpaneau, Béatrice. 2011. Insights into folate/fad-dependent trna methyltransferase mechanism role of two highly conserved cysteines in catalysis. *Journal of Biological Chemistry*, **286**(42), 36268–36280.

-
- [43] Hashimoto, Kosuke, & Panchenko, Anna R. 2010. Mechanisms of protein oligomerization, the critical role of insertions and deletions in maintaining different oligomeric states. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **107**(47), 20352–20357.
- [44] Hellman, Lance M, & Fried, Michael G. 2007. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) for detecting protein–nucleic acid interactions. *Nature protocols*, **2**(8), 1849–1861.
- [45] Hoagland, Mahlon B, Stephenson, Mary L, Scott, Jesse F, Hecht, Liselotte I, & Zamecnik, Paul C. 1958. A soluble ribonucleic acid intermediate in protein synthesis. *J Biol Chem*, **231**(1), 241–257.
- [46] Holm, Liisa, & Sander, Chris. 1995. Dali: a network tool for protein structure comparison. *Trends in biochemical sciences*, **20**(11), 478–480.
- [47] Kanehisa, Minoru. 1996. Toward pathway engineering: a new database of genetic and molecular pathways. *Science & Technology Japan*, **59**, 34–38.
- [48] Kim, Chongwoo A, & Bowie, James U. 2003. SAM domains: uniform structure, diversity of function. *Trends in biochemical sciences*, **28**(12), 625–628.
- [49] Kirchner, Sebastian, & Ignatova, Zoya. 2015. Emerging roles of tRNA in adaptive translation, signalling dynamics and disease. *Nature Reviews Genetics*, **16**(2), 98–112.
- [50] Kopajtich, Robert, Nicholls, Thomas J, Rorbach, Joanna, Metodiev, Metodi D, Freisinger, Peter, Mandel, Hanna, Vanlander, Arnaud, Ghezzi, Daniele, Carrozzo, Rosalba, Taylor, Robert W, *et al.* 2014. Mutations in GTPBP3 cause a mitochondrial translation defect associated with hypertrophic cardiomyopathy, lactic acidosis, and encephalopathy. *The American Journal of Human Genetics*, **95**(6), 708–720.
- [51] Krissinel, E, & Henrick, K. 2004. Secondary-structure matching (SSM), a new tool for fast protein structure alignment in three dimensions. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, **60**(12), 2256–2268.
- [52] Laemmli, Ulrich K, *et al.* 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature*, **227**(5259), 680–685.

- [53] Larkin, Mark A, Blackshields, Gordon, Brown, NP, Chenna, R, McGettigan, Paul A, McWilliam, Hamish, Valentin, Franck, Wallace, Iain M, Wilm, Andreas, Lopez, Rodrigo, *et al.* 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, **23**(21), 2947–2948.
- [54] Lies, Mark, Visser, Bryan J, Joshi, Mohan C, Magnan, David, & Bates, David. 2015. MioC and GidA proteins promote cell division in *E. coli*. *Frontiers in Microbiology*, **6**, 516.
- [55] Ludtke, Steven J, Baldwin, Philip R, & Chiu, Wah. 1999. EMAN: semiautomated software for high-resolution single-particle reconstructions. *Journal of structural biology*, **128**(1), 82–97.
- [56] Ma, L, Sundlass, NK, Raines, RT, & Cui, Q. 2010. Disruption and formation of surface salt bridges are coupled to DNA binding by the integration host factor: a computational analysis. *Biochemistry*, **50**(2), 266–275.
- [57] Mao, Daniel YL, Neculai, Dante, Downey, Michael, Orlicky, Stephen, Hafnani, Yosr Z, Ceccarelli, Derek F, Ho, Jenny SL, Szilard, Rachel K, Zhang, Wei, Ho, Cynthia S, *et al.* 2008. Atomic structure of the KEOPS complex: an ancient protein kinase-containing molecular machine. *Molecular cell*, **32**(2), 259–275.
- [58] Martínez-Vicente, Marta, Yim, Lucía, Villarroya, Magda, Mellado, Mara, Pérez-Payá, Enrique, Björk, Glenn R, & Armengod, M-Eugenia. 2005. Effects of mutagenesis in the switch I region and conserved arginines of *Escherichia coli* MnmE protein, a GTPase involved in tRNA modification. *Journal of Biological Chemistry*, **280**(35), 30660–30670.
- [59] Mély, Yves, de Rocquigny, Hugues, Sorinas-Jimeno, Monica, Keith, Gérard, Roques, Bernard P, Marquet, Roland, & Gérard, Dominique. 1995. Binding of the HIV-1 Nucleocapsid Protein to the Primer tRNA, in Vitro, Is Essentially Not Specific. *Journal of Biological Chemistry*, **270**(4), 1650–1656.
- [60] Meyer, S, Scrima, Andrea, Versees, W, & Wittinghofer, Alfred. 2008. Crystal structures of the conserved tRNA-modifying enzyme GidA: implications for its interaction with MnmE and substrate. *Journal of molecular biology*, **380**(3), 532–547.

- [61] Meyer, Simon, Wittinghofer, Alfred, & Versées, Wim. 2009a. G-domain dimerization orchestrates the tRNA wobble modification reaction in the MnmE/GidA complex. *Journal of molecular biology*, **392**(4), 910–922.
- [62] Meyer, Simon, Böhme, Sabine, Krüger, André, Steinhoff, Heinz-Jürgen, Klare, Johann P, & Wittinghofer, Alfred. 2009b. Kissing G domains of MnmE monitored by X-ray crystallography and pulse electron paramagnetic resonance spectroscopy.
- [63] Moukadiri, Ismail, Prado, Silvia, Piera, Julio, Velázquez-Campoy, Adrián, Björk, Glenn R, & Armengod, M-Eugenia. 2009. Evolutionarily conserved proteins MnmE and GidA catalyze the formation of two methyluridine derivatives at tRNA wobble positions. *Nucleic acids research*, gkp762.
- [64] Myllykallio, Hannu, Lipowski, Gerard, Leduc, Damien, Filee, Jonathan, Forterre, Patrick, & Liebl, Ursula. 2002. An alternative flavin-dependent mechanism for thymidylate synthesis. *Science*, **297**(5578), 105–107.
- [65] Nisshanthini, SD, Palaniswamy, M, Angayarkanni, J, *et al.* 2014. Purification of GidA protein, a novel topoisomerase II inhibitor produced by *Streptomyces flavoviridis*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **30**(2), 555–565.
- [66] Noller, Harry F. 2005. RNA structure: reading the ribosome. *Science*, **309**(5740), 1508–1514.
- [67] Oberto, Jacques, Breuil, Norman, Hecker, Arnaud, Farina, Francesca, Brochier-Armanet, Céline, Culetto, Emmanuel, & Forterre, Patrick. 2009. Qri7/OSGEPL, the mitochondrial version of the universal Kae1/YgjD protein, is essential for mitochondrial genome maintenance. *Nucleic acids research*, gkp557.
- [68] Osawa, Takuo, Ito, Koichi, Inanaga, Hideko, Nureki, Osamu, Tomita, Kozo, & Numata, Tomoyuki. 2009. Conserved cysteine residues of GidA are essential for biogenesis of 5-carboxymethylaminomethyluridine at tRNA anticodon. *Structure*, **17**(5), 713–724.
- [69] Pang, Yan Ling Joy, Abo, Ryan, Levine, Stuart S, & Dedon, Peter C. 2014. Diverse cell stresses induce unique patterns of tRNA up-and down-

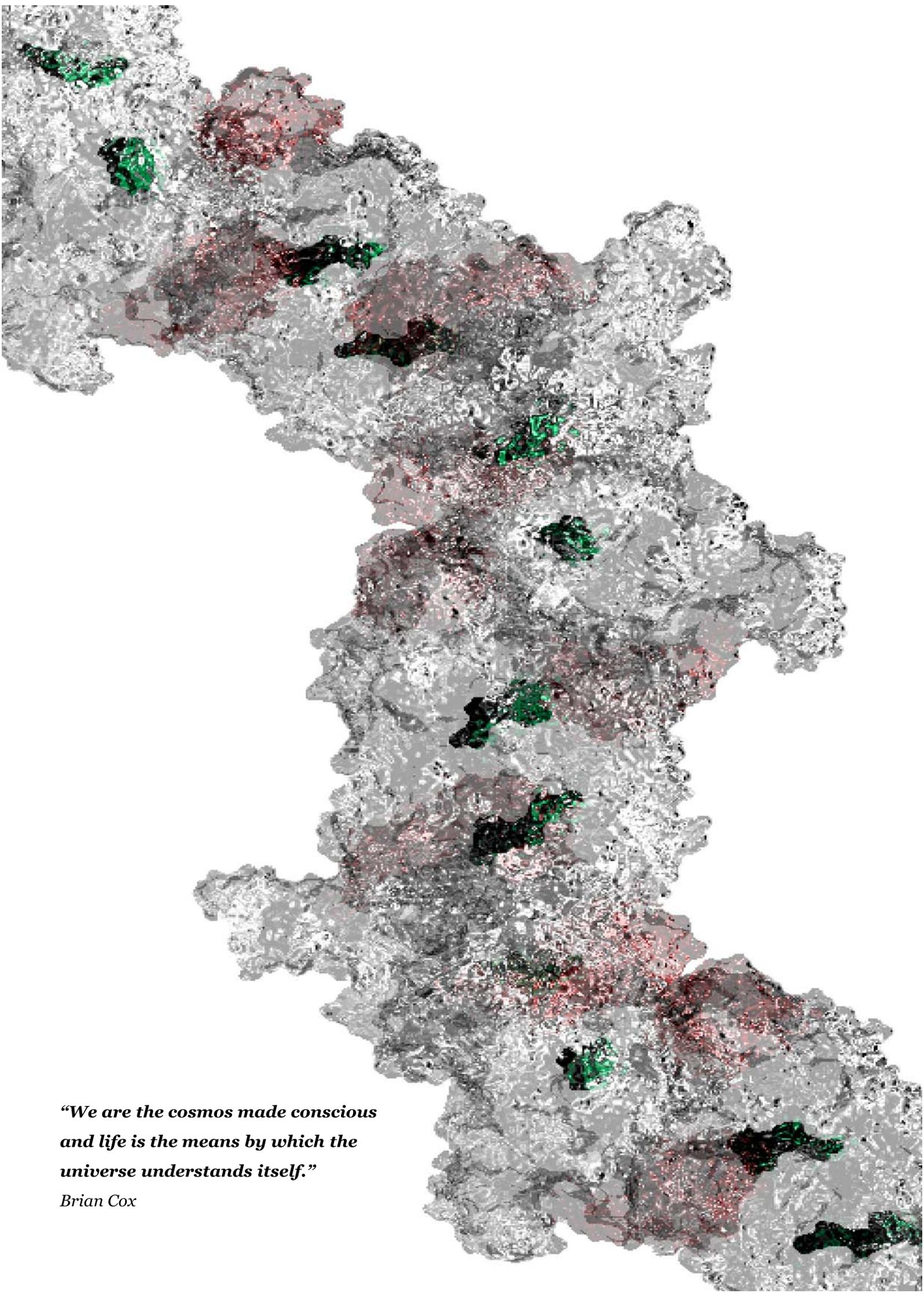
- regulation: tRNA-seq for quantifying changes in tRNA copy number. *Nucleic acids research*, gku945.
- [70] Parsonage, Derek, Youngblood, Derek S, Sarma, Ganapathy N, Wood, Zachary A, Karplus, P Andrew, & Poole, Leslie B. 2005. Analysis of the link between enzymatic activity and oligomeric state in AhpC, a bacterial peroxiredoxin. *Biochemistry*, **44**(31), 10583–10592.
- [71] Perrochia, Ludovic, Guetta, Dorian, Hecker, Arnaud, Forterre, Patrick, & Basta, Tamara. 2013. Functional assignment of KEOPS/EKC complex subunits in the biosynthesis of the universal t6A tRNA modification. *Nucleic acids research*, gkt720.
- [72] Petrakis, Thodoris G, Wittschieben, Birgitte Ø, & Svejstrup, Jesper Q. 2004. Molecular architecture, structure-function relationship, and importance of the Elp3 subunit for the RNA binding of holo-elongator. *Journal of Biological Chemistry*, **279**(31), 32087–32092.
- [73] Pettersen, Eric F, Goddard, Thomas D, Huang, Conrad C, Couch, Gregory S, Greenblatt, Daniel M, Meng, Elaine C, & Ferrin, Thomas E. 2004. UCSF Chimera a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of computational chemistry*, **25**(13), 1605–1612.
- [74] Prado, Silvia, Villarroya, Magda, Medina, Milagros, & Armengod, M-Eugenia. 2013. The tRNA-modifying function of MnmE is controlled by post-hydrolysis steps of its GTPase cycle. *Nucleic acids research*, **41**(12), 6190–6208.
- [75] Saecker, Ruth M, & Record, M Thomas. 2002. Protein surface salt bridges and paths for DNA wrapping. *Current opinion in structural biology*, **12**(3), 311–319.
- [76] Sagan, L. 1993. On the origin of mitosing cells. 1967. *The Journal of NIH research: life sciences research and news about the National Institutes of Health and the Alcohol, Drug Abuse, and Mental Health Administration*, **5**(3), 65–72.
- [77] Saikia, Mridusmita, Jobava, Raul, Parisien, Marc, Putnam, Andrea, Krokowski, Dawid, Gao, Xing-Huang, Guan, Bo-Jhih, Yuan, Yiyuan, Jan-kowsky, Eckhard, Feng, Zhaoyang, *et al.* 2014. Angiogenin-cleaved tRNA

- halves interact with cytochrome c, protecting cells from apoptosis during osmotic stress. *Molecular and cellular biology*, **34**(13), 2450–2463.
- [78] Schagger, Hermann, & von Jagow, Gebhard. 1991. Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Analytical biochemistry*, **199**(2), 223–231.
- [79] Scheres, Sjors HW, Valle, Mikel, & Carazo, José-María. 2005. Fast maximum-likelihood refinement of electron microscopy images. *Bioinformatics*, **21**(suppl 2), ii243–ii244.
- [80] Scrima, Andrea, Vetter, Ingrid R, Armengod, M Eugenia, & Wittinghofer, Alfred. 2005. The structure of the TrmE GTP-binding protein and its implications for tRNA modification. *The EMBO journal*, **24**(1), 23–33.
- [81] Shen, Kuang, Arslan, Sinan, Akopian, David, Ha, Taekjip, & Shan, Shuou. 2012. Activated GTPase movement on an RNA scaffold drives co-translational protein targeting. *Nature*, **492**(7428), 271–275.
- [82] Shi, Rong, Villarroya, Magda, Ruiz-Partida, Rafael, Li, Yunge, Proteau, Ariane, Prado, Silvia, Moukadiri, Ismail, Benítez-Páez, Alfonso, Lomas, Rodrigo, Wagner, John, *et al.* 2009. Structure-function analysis of Escherichia coli MnmG (GidA), a highly conserved tRNA-modifying enzyme. *Journal of bacteriology*, **191**(24), 7614–7619.
- [83] Shippy, Daniel C, & Fadl, Amin A. 2014. tRNA modification enzymes GidA and MnmE: Potential role in virulence of bacterial pathogens. *International journal of molecular sciences*, **15**(10), 18267–18280.
- [84] Shippy, Daniel C, Eakley, Nicholas M, Bochsler, Philip N, & Fadl, Amin A. 2011. Biological and virulence characteristics of Salmonella enterica serovar Typhimurium following deletion of glucose-inhibited division (gidA) gene. *Microbial pathogenesis*, **50**(6), 303–313.
- [85] Subramanyam, Shyamal, Jones, William T, Spies, Maria, & Spies, M Ashley. 2013. Contributions of the RAD51 N-terminal domain to BRCA2-RAD51 interaction. *Nucleic acids research*, **41**(19), 9020–9032.
- [86] Suhre, Karsten, & Sanejouand, Yves-Henri. 2004. ElNemo: a normal mode web server for protein movement analysis and the generation of templates for molecular replacement. *Nucleic acids research*, **32**(suppl 2), W610–W614.

BIBLIOGRAFÍA

- [87] Suzuki, Takeo, & Suzuki, Tsutomu. 2014. A complete landscape of post-transcriptional modifications in mammalian mitochondrial tRNAs. *Nucleic acids research*, gku390.
- [88] Thiaville, Patrick C, & de Crécy-Lagard, Valérie. 2015. The emerging role of complex modifications of tRNA^{LysUUU} in signaling pathways. *Microbial cell*, **2**(1), 1.
- [89] Tischner, Christin, Hofer, Annette, Wulff, Veronika, Stepek, Joanna, Dumitru, Iulia, Becker, Lore, Haack, Tobias, Kremer, Laura, Datta, Alexandre N, Sperl, Wolfgang, *et al.* 2015. MTO1 mediates tissue specificity of OXPHOS defects via tRNA modification and translation optimization, which can be bypassed by dietary intervention. *Human molecular genetics*, **24**(8), 2247–2266.
- [90] Trowitzsch, Simon, Weber, Gert, Lührmann, Reinhard, & Wahl, Markus C. 2008. An unusual RNA recognition motif acts as a scaffold for multiple proteins in the pre-mRNA retention and splicing complex. *Journal of Biological Chemistry*, **283**(47), 32317–32327.
- [91] Umeda, Noriko, Suzuki, Takeo, Yukawa, Masashi, Ohya, Yoshikazu, Shindo, Heisaburo, Watanabe, Kimitsuna, & Suzuki, Tsutomu. 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. *Journal of Biological Chemistry*, **280**(2), 1613–1624.
- [92] Vincze, Tamas, Posfai, Janos, & Roberts, Richard J. 2003. NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic acids research*, **31**(13), 3688–3691.
- [93] von Meyenburg, Kaspar, & Hansen, Flemming G. 1980. The Origin of Replication, oriC, of Escherichia Coli Chromosome: Genes Near oriC and Constriction of oriC Deletion Mutations. *Pages 137–159 of: Mechanistic studies of DNA replication and genetic recombination*, vol. 14. Academic Press New York.
- [94] White, David J, Merod, Robin, Thomasson, Bobbie, & Hartzell, Patricia L. 2001. GidA is an FAD-binding protein involved in development of Myxococcus xanthus. *Molecular microbiology*, **42**(2), 503–517.

- [95] Yamagami, Ryota, Yamashita, Koki, Nishimasu, Hiroshi, Tomikawa, Chie, Ochi, Anna, Iwashita, Chikako, Hirata, Akira, Ishitani, Ryuichiro, Nureki, Osamu, & Hori, Hiroyuki. 2012. The tRNA recognition mechanism of folate/FAD-dependent tRNA methyltransferase (TrmFO). *Journal of Biological Chemistry*, **287**(51), 42480–42494.
- [96] Yim, Lucía, Martínez-Vicente, Marta, Villarroya, Magdalena, Aguado, Carmen, Knecht, Erwin, & Armengod, María-Eugenia. 2003. The GTPase activity and C-terminal cysteine of the Escherichia coli MnmE protein are essential for its tRNA modifying function. *Journal of Biological Chemistry*, **278**(31), 28378–28387.
- [97] Yim, Lucía, Moukadiri, Ismaïl, Björk, Glenn R, & Armengod, M-Eugenia. 2006. Further insights into the tRNA modification process controlled by proteins MnmE and GidA of Escherichia coli. *Nucleic acids research*, **34**(20), 5892–5905.
- [98] Zappulla, David C, & Cech, Thomas R. 2004. Yeast telomerase RNA: a flexible scaffold for protein subunits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**(27), 10024–10029.
- [99] Zhang, Wenhua, Collinet, Bruno, Graille, Marc, Daugeron, Marie-Claire, Lazar, Noureddine, Libri, Domenico, Durand, Dominique, & van Tilbeurgh, Herman. 2015. Crystal structures of the Gon7/Pcc1 and Bud32/Cgi121 complexes provide a model for the complete yeast KEOPS complex. *Nucleic acids research*, gkv155.
- [100] Zhu, Xiaoyu, He, Xiangyu, Wang, Wei, Zhou, Qiyin, Yu, Zhe, Dai, Yu, Zhu, Xufen, & Yan, Qingfeng. 2015. MTO1 Worked as a Modifier in the Aminoglycosides Sensitivity of Yeast Carrying a Mitochondrial 15S rRNA C1477G Mutation.



***“We are the cosmos made conscious
and life is the means by which the
universe understands itself.”***

Brian Cox