



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**PURIFICACIÓN Y RECONSTITUCIÓN DEL COMPLEJO GLUTAMIL-tRNA
REDUCTASA (GLUTR), GLUTAMATO-1-SEMIALDEHIDO AMINOMUTASA
(GSAM), MAQUINARIA DE INICIO DEL PROCESO BIOSINTÉTICO DE
TETRAPIRROLES.**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**PRESENTA:
BIOL. ARMANDO CRUZ RANGEL**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. ALFREDO TORRES LARIOS.
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM**

**COMITÉ TUTOR: DR. ARMANDO GÓMEZ PUYOU.
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM**

**DR. JUAN MIRANDA RÍOS.
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

BIOLÓGÍA EXPERIMENTAL

**PURIFICACIÓN Y RECONSTITUCIÓN DEL COMPLEJO GLUTAMIL-tRNA
REDUCTASA (GLUTR), GLUTAMATO-1-SEMIALDEHIDO AMINOMUTASA
(GSAM), MAQUINARIA DE INICIO DEL PROCESO BIOSINTÉTICO DE
TETRAPIRROLES.**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**PRESENTA:
BIOL. ARMANDO CRUZ RANGEL**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. ALFREDO TORRES LARIOS.
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM**

**COMITÉ TUTOR: DR. ARMANDO GÓMEZ PUYOU.
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM**

**DR. JUAN MIRANDA RÍOS.
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM**

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 20 de mayo de 2013, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumno, **CRUZ RANGEL ARMANDO** con número de cuenta **30110518-3** con la tesis titulada **"PURIFICACIÓN Y RECONSTITUCIÓN DEL COMPLEJO GLUTAMIL-TRNA REDUCTASA (GluTR), GLUTAMATO-1-SEMIALDEHIDO AMINOMUTASA (GSAM), MAQUINARIA DE INICIO DEL PROCESO BIOSINTÉTICO DE TETRAPIRROLES"**, realizada bajo la dirección del **DR. ALFREDO TORRES LARIOS**:

Presidente: DRA. EMMA BERTA GUTIÉRREZ CIRLOS MADRID
Vocal: DRA. ALEJANDRA HERNÁNDEZ SANTOYO
Secretario: DR. ARMANDO GÓMEZ PUYOU
Suplente: DR. ROBERTO ARREGUÍN ESPINOSA DE LOS MONTEROS
Suplente: DR. ROBERTO CORIA ORTEGA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 5 de junio de 2013.

M. del Coro Arizmendi
DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

c.c.p. Expediente del (la) interesado (a)

AGRADECIMIENTOS.

- 1.** Mis mas sinceros agradecimientos al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

- 2.** Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (México) por el apoyo al proyecto 164838, y por la beca otorgada durante la realización de este trabajo.

- 3.** Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) IN201213.

- 4.** A los miembros de mi comité tutorial:
 - Dr. Armando Gómez Puyou.
 - Dr. Juan Miranda Ríos.
 - Dr. Alfredo Torres Larios

- 5.** Al Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

AGRADECIMIENTOS A TITULO PERSONAL.



- Al..G..D..G..A..D..U..
- Para mis estrellas guardianes que guían mis pasos desde el eterno Oriente (Rosendo, Héctor y Carlota).
- A mi universidad la UNAM, máxima casa de estudios ¡Gloria a ti!
- Especialmente a mi comité evaluador: Dra. Alejandra Santoyo, Emma Bertha Gutiérrez Cirlos-Madrid, Dr. Roberto Arreguín, Dr. Roberto Coria y por supuesto el Dr. Armando Gómez Puyou.
- Mis amigos de la facultad (James, Karla, Alanis, Eslevan, Horacio etc..).
- Mis compañeros de laboratorio (Nancy, Annia, Enrique, Igor, Aaron, Miguel, Sergio, Alex y Carlos).
- Dr. Alfredo Torres-Larios, solo me resta darte las gracias por tus enseñanzas.
- A la Dra. Adelaida Díaz Vilchis, técnica académica del laboratorio 205 S.
- Para mis soportes principales académicos, M. en C. Blanca Delgado Coello y el Dr. Jaime Mas Oliva, “gracias por su incondicional apoyo”.
- Gaby secretaria del Dpto. de Genética Molecular del IFC, gracias por tu paciencia.
- Algunos amigos del Instituto. Laura, Vero, Gaby, Paola, Yola, Luis Pablo, Dora, Claudia y Alan.
- Drs. Enrique Rudiño, Marat Yusupov, Venki Ramakrishnan, Jacqueline Cherfils y Adela Rodríguez, poco o mucho que me haya comunicado con ustedes fue suficiente para recordarme la grandeza de la calidad humana y la humildad, valores que a veces se olvidan.
- Finalmente a mi Brendita hermosa “gracias por tu generosidad y bondad”.

Esta tesis y mi maestría son dedicadas a mi familia “los verdaderos artífices de mis logros” (Mis Padres, mi hermano Isaac y mi abuelita mamá Carmen) ¡benditos sean!

INDICE

ABREVIATURAS.....	10
RESUMEN.....	12
ABSTRACT.....	13
I. INTRODUCCION.....	14
1.1 Canalización de sustratos.....	14
1.2 Ejemplos de canalización de sustratos.....	15
1.3 Biosíntesis de tetrapirroles y canalización de sustratos.....	20
II. OBJETIVOS.....	24
III. HIPÓTESIS.....	24
IV. ANTECEDENTES.....	24
4.1 Evidencias del complejo GluTR/GSAM.....	24
4.2 Planteamiento del problema.....	25
V. MATERIALES Y METODOS.....	27
5.1 Clonación y Sobreexpresión de HemA (GluTR) y Hem L (GSAM) de <i>C. thermocellum</i>	27
5.2 Purificación de His ₆ -GluTR y His ₆ -GSAM.....	28
5.3 Proteólisis del fragmento de Histidinas con TEV.....	29
5.4 Ensayos de desplazamiento térmico.....	29
5.5 Reconstitución del complejo GluTR/GSAM.....	29
VI. RESULTADOS.....	31
6.1 Clonación y sobreexpresión de GluTR y GSAM.....	31
6.2 Purificación de los componentes del complejo.....	33

6.3	Estabilización de GluTR.....	38
6.4	Reconstitución del complejo GluTR/GSAM.....	41
VII.	DISCUSIÓN.....	45
VIII.	CONCLUSIONES.....	48
IX	PERSPECTIVAS.....	48
X.	REFERENCIAS.....	49
XI.	ANEXO.....	53

ABREVIATURAS

ADA	Acido N-(2-acetamido)iminodiacetico.
ADP	Adenosindifosfato.
ALA	Ácido-5-aminolevulinico.
ATP	Adenosintrifosfato.
CAPS	Acido N-ciclohexil-3-aminopropano sulfónico.
CHES	Acido N-ciclohexil-2-aminoetano sulfónico.
CO₂	Dióxido de carbono.
CPS	Carbamil Fosfato Sintetasa.
DAVA	Dioxovalerato.
dNTP	Dinucleotidos trifosfatados.
DTT	Ditiotreitol.
EDTA	Etilen diamino tetraácido acetato (ácido).
EPPS	Acido 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-propanosulfónico.
G3P	Gliceraldehído 3 fosfato.
GluTR	Glutamil tRNA Reductasa.
GSA	Glutamato -1 –Semialdehido.
GSAM	Glutamato-1-Semialdehido Aminomutasa.
HEPES	N-2-hidroxietilpiperazina del ácido N'-2-etanosulfónico.
I¹²⁵	Yodo 125.
IGP	Indol 3-glicerol fosfato.
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido.
K_D	Constante de disociación.
MES	Acido 2-(N-morfolino)etanosulfónico.

Mg²⁺	Ion magnesio.
μM	Micromolar.
mg/ml	miligramos/mililitro.
MOPS	Acido 3-(N-morfolino)propanosulfónico.
NADPH	Nicotinamida Adeninina Dinucleótido Fosfato.
NH₃	Amonio.
Ni	Níquel.
ng	Nanogramos.
ORF	Marco abierto de lectura (<i>Open Reading Frame</i>).
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa.
PIPPS	Acido de piperazina-N,N'-bis(2-etanosulfónico).
PLP	Piridoxal 5' fosfato.
PMP	Piridoxal 5' fosfato.
rpm	Revoluciones por minuto.
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio.
SH2	Dominio de homología al dominio 2 de la proteína Src.
TEV	Proteasa del Virus de Tabaco.
Tm	Temperatura media de desnaturalización.
tRNA^{Glu}	RNA de transferencia de glutamato.

RESUMEN

El primer paso de biosíntesis de tetrapirroles en plantas, arqueas y algunos tipos de bacterias, implica dos reacciones para la formación del precursor ácido 5-aminolevulínico. La primera mediada por la glutamil tRNA reductasa, cataliza la reducción del tRNA^{Glu} mediante NADPH para formar el intermediario inestable glutamato semialdehído. El siguiente paso mediado por la glutamato-1-semialdehído aminomutasa, cataliza la transaminación del intermediario para producir el ácido 5-aminolevulínico mediante una reacción dependiente de fosfato de piridoxal.

Con base en las estructuras cristalográficas de la glutamil tRNA reductasa de *M. kandleri* y de la glutamato-1-semialdehído aminomutasa de *Synechococcus* sp., y al conocimiento de la alta reactividad del intermediario, se propuso la hipótesis de la formación de un complejo entre ambas enzimas. Otros grupos mostraron mediante ensayos de filtración en gel, co-inmunoprecipitaciones y de entrecruzamiento, que es factible la existencia de un complejo entre ambas enzimas. Con el objeto de obtener cristales del complejo, en este trabajo se muestran los métodos para la sobre-expresión y la purificación a homogeneidad de los componentes del complejo de *C.thermocellum*. Asimismo, demostramos que cuando retiramos la etiqueta de histidinas del extremo amino de la glutamil tRNA reductasa es posible la formación del complejo. Los resultados de este trabajo sugieren que el extremo amino es importante para el reconocimiento por la glutamato-1-semialdehído aminomutasa y en un futuro se realizará la validación y caracterización del complejo.

ABSTRACT

In plants, archaeas and several kinds of bacteria, the first step during the tetrapyrrols biosynthesis involves two reactions to the formation of the primary precursor 5-Aminolevulinic acid (ALA). First, the glutamyl tRNA reductase (GluTR) catalyses the NADPH-dependent reduction of tRNA^{Glu} to an unstable intermediate glutamate-1-semialdehyde (GSA). Then the Glutamate-1-semialdehyde aminomutase (GSAM) catalyses the transamination of GSA to ALA in a pyridoxal phosphate (PLP)-dependent reaction.

Based on the solved crystal structures of GluTR from *M. kandleri* and GSAM from *Synechococcus* sp, along with the high reactivity of GSA, the hypothesis of complex among both enzymes was proposed. Other groups showed that using gel filtration assays, co-immunoprecipitation and cross-linking experiments GluTR/GSAM forms a complex. Our goal has been to get crystals of this complex. Here we show the methods to overexpress, purify and reconstitute the two components of the complex of *C. thermocellum*. In addition, we tested that removal of the histidine tag at the N-terminus of GluTR, allowed the complex formation. These results suggest that the amino end is important for recognition by GSAM; however, the complete validation of the complex identity, is a pendant issue.

I. INTRODUCCION.

1.1 Canalización de sustratos.

Una de las ideas que involucran el concepto de metabolismo para la bioquímica clásica, señala que las enzimas son unidades físicamente independientes que difunden libremente en un ambiente intracelular acuoso en el cual los productos derivados de la catálisis se liberan al medio donde, mediante difusión pasiva, interactúan con la siguiente enzima de la secuencia metabólica.

Como una alternativa a esta hipótesis, se han descrito diversos complejos multienzimáticos cuya asociación engloba reacciones catalíticas secuenciales, las cuales favorecen la transferencia de intermediarios entre sitios activos, excluyendo en forma inmediata dichos metabolitos del ambiente; este fenómeno ha sido definido como canal metabólico (Srere, 1987), y su existencia proporciona ventajas fisiológicas tales como (Ovadi, 1991; Khan, 2004):

- Prevención de la pérdida por difusión de los intermediarios de reacción químicamente lábiles.
- Reducción del tiempo requerido por un intermediario para alcanzar el sitio activo de la siguiente enzima.
- Evitan que la reacción alcance equilibrios desfavorables, lográndose de esta manera que la reacción sea vectorial.
- Mantiene altas concentraciones de metabolitos en regiones específicas de la célula y excluye a los intermediarios tóxicos para la célula, mediante su regionalización.

Durante la formación de un canal metabólico, las fuerzas que regulan la asociación entre proteínas, proporcionan un carácter de estabilidad física que sirve como parámetro para clasificar a los complejos en estables o lábiles. Llamamos estables a aquellas enzimas compuestas por múltiples subunidades

que respetan una proporción estequiométrica, además de poseer valores de K_D ubicados en un intervalo de 10^{-7} M hasta 10^{-15} M.

1.2 Ejemplos de canalización de sustratos.

Triptófano Sintetasa.

Es una enzima ubicua de bacterias, hongos y plantas responsable de catalizar las últimas dos reacciones de la biosíntesis de triptófano. Estructuralmente se encuentra constituida por un tetrámero compuesto por dos subunidades α y dos β (Figura 1A). Cada subunidad α cataliza el rompimiento de una molécula indol 3-glicerol fosfato (IPG) para producir indol y gliceraldehído 3 fosfato (G3P); posteriormente el anillo indol es canalizado al sitio activo de la subunidad β donde finalmente, mediante una reacción dependiente de pirodoxal fosfato (PLP), se realiza la condensación con L-serina para dar origen a L-triptofano (Dunn *et al.*, 2008).

Al menos cuatro consideraciones bioquímicas fueron tomadas en cuenta para proponer la existencia de un canal metabólico entre cada subunidad α y β :

- 1) La dificultad para monitorear la formación del intermediario indol en ensayos tipo *single turnover* durante el estado estacionario de la reacción, lo cual supone una tasa de difusión muy rápida a través de la enzima.
- 2) La dependencia catalítica de la subunidad α por la reacción de transaminación entre L-serina y PLP en la subunidad β .
- 3) La Irreversibilidad de la reacción de condensación del anillo indol con L-serina.
- 4) Los Residuos específicos presentes en el canal, median el paso del grupo indol hacia el sitio activo de la subunidad β (Anderson *et al.*, 1991).

Finalmente, con la resolución de la estructura se logró determinar el canal metabólico de 26 Å de longitud que conecta los sitios activos de ambas subunidades (Dunn *et al.*, 2008) (Figura 1 B y C).

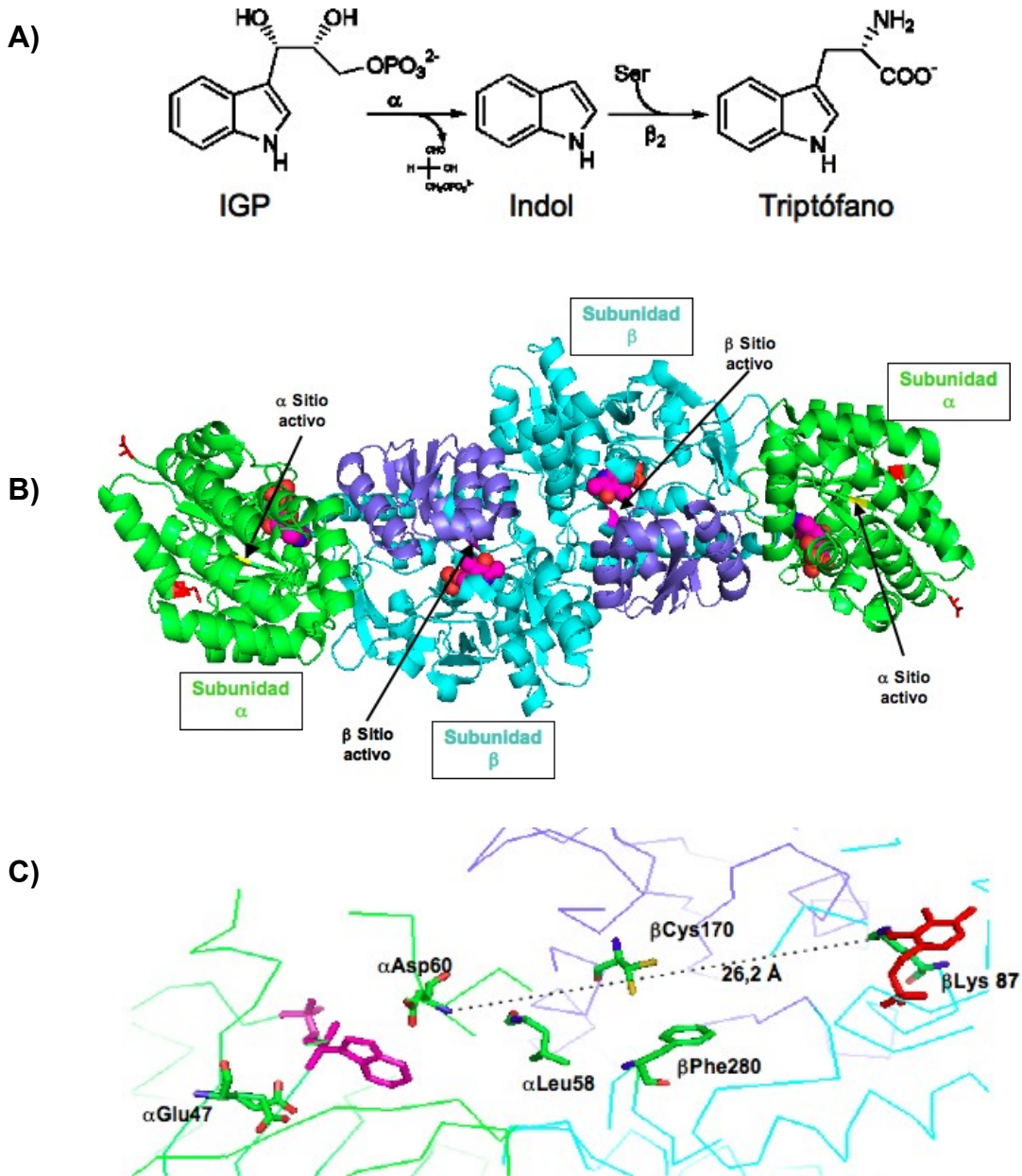


Figura 1. Tryptófano sintetasa. **A)** reacción catalizada por la triptófano sintetasa **B)** estructura cristalográfica del tetrámero $(\alpha \beta)_2$ de *Salmonera entérica*. En violeta se encuentran los residuos (Gly-93 a Gly-189) de la subunidad β , los cuales constituyen la tapa que obstruye la salida del intermediario indol. En las cercanías de los residuos catalíticos Glu-47 y Asp-60 de cada subunidad α , se representa una molécula de IGP, mientras que en las subunidades β , la Lys 87 catalítica, mantiene unido su cofactor PLP. **C)** el túnel hidrofóbico formado entre una subunidad α y una β constituye un camino de ~ 25 Å que conecta cada sitio activo; en magenta IGP y en rojo PLP. Los residuos clave que median el paso del intermediario indol son α Leu- 58 , β Phe-280 y β Cys-170 PDB 1KFB.

Carbamil Fosfato Sintetasa (CPS).

Cataliza la síntesis de una molécula de carbamifosfato a partir de bicarbonato, glutamina y dos moléculas de ATP, en una serie de cuatro reacciones separadas que generan tres intermediarios inestables: NH_3 , carboxifosfato y carbamato (Figura 2A).

En bacterias, la CPS es un tetrámero cuya unidad funcional es el heterodímero compuesto por una subunidad pequeña, así como de una subunidad mayor (Figuras 2B y C). La pequeña subunidad cataliza la hidrólisis de glutamina para formar glutamato y amonio, este último viajará 45 Å a través de un túnel para llegar al N-terminal de la subunidad mayor en donde reaccionará con el intermediario carboxifosfato (formado previamente por la fosforilación de bicarbonato) generándose el intermediario carbamato, el cual migrará por otro túnel hasta el C-terminal de la subunidad mayor ubicado a 36 Å, en donde se fosforilará para dar como producto final carbamifosfato.

Las evidencias cinéticas para el túnel de amonio se establecieron midiendo la capacidad de incorporación de ^{15}N en el producto carbamifosfato, mediante la competencia entre amonio derivado de la hidrólisis de glutamina y amonio exógeno $^{15}\text{NH}_3$ adicionado al solvente. Si la incorporación en de ^{15}N en carbamil fosfato correspondía a valores cercanos a razón de la concentración inicial del $^{15}\text{NH}_3$ del medio, indicaría que el amonio se disocia de la subunidad menor hacia el disolvente y que después se reasocia en el sitio de fosforilación de bicarbonato sin que el amonio viaje por un túnel metabólico. Los resultados mostraron incorporación mínima del isótopo en el producto carbamifosfato con respecto a la glutamina sin marca; esto sugirió que el NH_3 generado por la hidrólisis de glutamina, se encuentra aislado del resto del disolvente para difundir a través de la enzima sin exposición al medio acuoso (Mullins y Raushel, 1999).

Respecto a la canalización de carbamato hacia el sitio de fosforilación carbamifosfato, se demostró que mutaciones en residuos conservados de glutamato y arginina que se encuentran en la vecindad al segundo sitio de

fosforilación inhiben la formación de carbamilfosfato. Se propone que dichos residuos pueden funcionar de manera concertada para controlar la entrada del carbamato al túnel, esto previo a su fosforilación para formar carbamilfosfato.

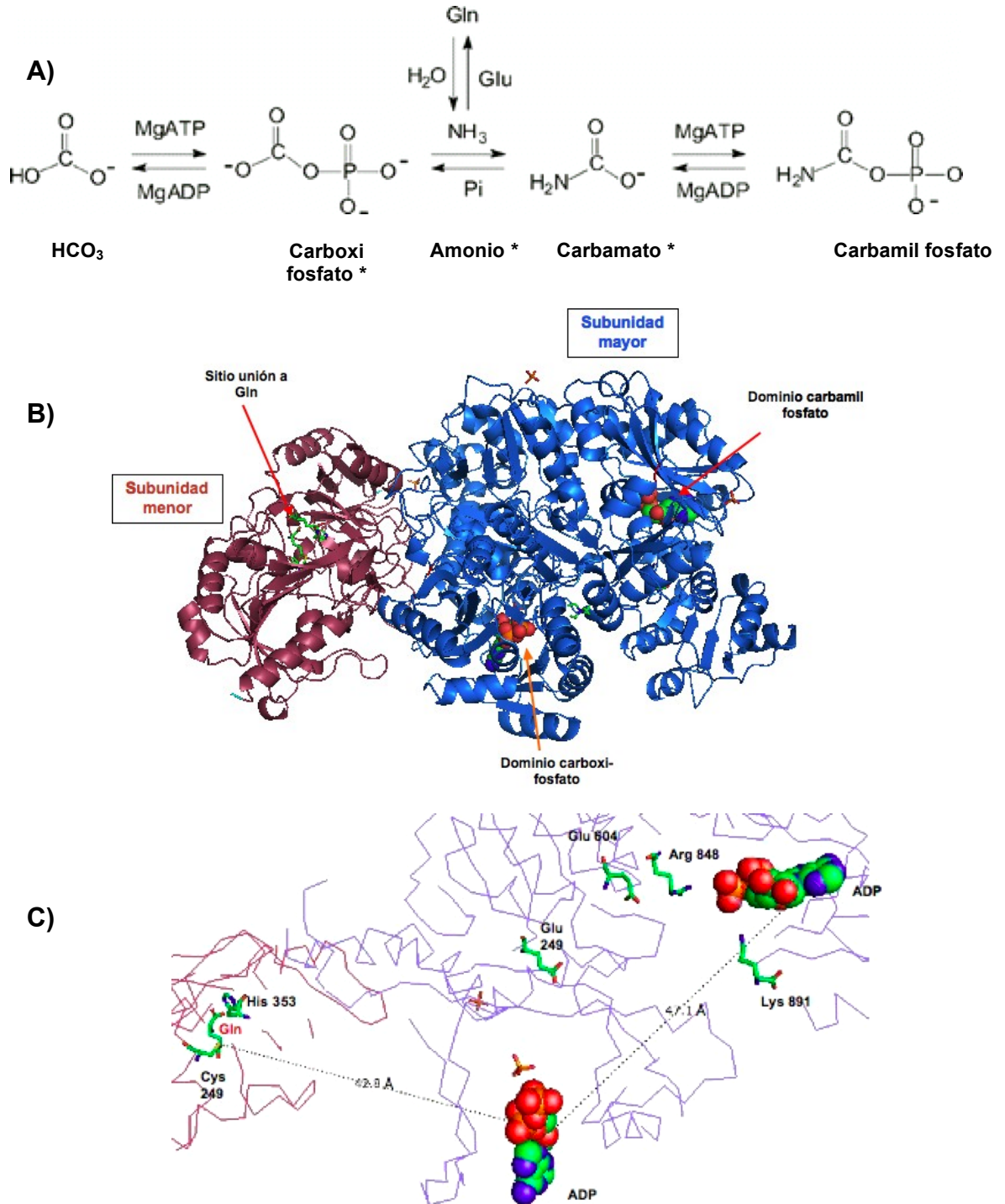


Figura 2. Carbamil Fosfato Sintetasa **A)** Reacción catalizada por Carbamil Fosfato Sintetasa. Cada asterisco representa un intermediario de reacción **B)** estructura cristalográfica de la CPS de *E. Coli*. El homodimero constituido por dos subunidades, la pequeña de 42 kDa alberga el sitio de hidrólisis de glutamina. La subunidad mayor de 148 kDa posee los sitios de fosforilación de carboxifosfato **C)** túnel metabólico que conecta los tres sitios activos. Los cofactores ADP se muestran en esferas; cercano al sitio carbamil fosfato se ubica un sitio de regulación alostérica por ornitina. Código PDB 1A9X.

Complejos Proteicos Dinámicos.

El fenómeno de canalización de sustratos también se ha observado en complejos multienzimáticos dinámicos, los cuales, a diferencia de los complejos estables, se caracterizan por ser asociaciones transitorias donde la K_D entre componentes se encuentra en el orden nanomolar (Winkel, 2004). Su rápido ensamblaje y desensamblaje ocurre como respuesta a una demanda metabólica específica, o a la presencia de un metabolito. A este tipo de complejos se les ha denominado metabolones y su principal ventaja es proveer un mecanismo molecular que pueda moderar o redireccionar diversas vías metabólicas interconectadas (Jorgensen *et al.*, 2005; Moller, 2010).

Por mencionar algunos ejemplos, en plantas la asociación transitoria de las enzimas de la vía glucolítica se favorece en respuesta a una demanda de piruvato (Giegé *et al.*, 2003). También en plantas se ha demostrado la formación de complejos dinámicos de las enzimas responsables de la biosíntesis de productos bioactivos (Jorgensen *et al.*, 2005). En humanos, algunas enzimas de la biosíntesis de nucleótidos de purinas, se ensamblan en complejos cuando existen niveles bajos de nucleótidos (Kyoung *et al.*, 2010) junto con diversos otros ejemplos (Farina *et al.*, 2004; Zaric *et al.*, 2005; Ignatev *et al.*, 2005; Aphasizhev *et al.*, 2013). La caracterización de este tipo de interacciones, se ha logrado mediante diversas técnicas, por ejemplo, la interacción entre el interferón gama y su receptor, se logró utilizando reactivos de entrecruzamiento e interferón gama marcado con I^{125} (Sarkar y Gupta, 1984).

La técnica mas empleada es la filtración en gel utilizando proteínas recombinantes purificadas. Dos métodos pueden emplearse; en el primero, una proteína es acoplada covalentemente a una resina para que interactúe con su proteína ligando. La segunda forma es inmovilizando de manera no covalente la etiqueta de fusión con la resina de la columna y finalmente eluir la proteína ligando en el medio de la columna. Con estos métodos se logró caracterizar por primera vez la interacción entre una proteína fosforilada de tirosina con el dominio SH2 de la Abl tirosina cinasa así como la determinación del N-terminal

de c-Raf con RAS (Weng *et al.*, 1993) La importancia de utilizar la filtración en gel es debido a que permite determinar interacciones proteína-proteína en intervalos mínimos de 10^{-5} M, considerando que la K_D mínima con relevancia fisiológica es de 10^{-3} M (Formosa *et al.*, 1991).

Otras técnicas tales como inmunoprecipitación, dispersión dinámica de luz, espectrofotometría de masas también son utilizados para la detección de complejos dinámicos.

1.3 Biosíntesis de tetrapirroles y canalización de sustratos.

Una de las vías metabólicas en la que se ha propuesto el fenómeno de canalización de sustratos es en la biosíntesis de tetrapirroles, en particular en las primeras dos reacciones de la vía, en donde ocurre la formación del precursor ácido-5-aminolevulinico (ALA), tema central de nuestra investigación (Figura 3).

En la naturaleza existen dos vías alternativas para la biosíntesis de ALA: la primera ocurre en mitocondrias de mamíferos y hongos, donde tiene lugar la condensación de succinil-CoA con glicina (Gibson *et al.*, 1958); la segunda vía se ha observado en cloroplastos de plantas, algunas eubacterias y arqueas, en las cuales sorpresivamente, la molécula precursora es el RNA de transferencia de glutamato (tRNA^{Glu}) (Beale y Castelfranco, 1973; Huang *et al.*, 1984; Schön *et al.*, 1986; Kannangara *et al.*, 1988)

La biosíntesis de ALA dependiente de tRNA implica dos pasos de reacción;

1) Glutamil tRNA reductasa (GluTR) cataliza la reducción del tRNA^{Glu} a glutamato -1 -semialdehído (GSA).

2) GSA sufre una transaminación dependiente de pirodoxal fosfato en la enzima Glutamato-1-semialdehído aminomutasa (GSAM) para dar como producto ALA (Jahn *et al.*, 1992) (Figura 3).

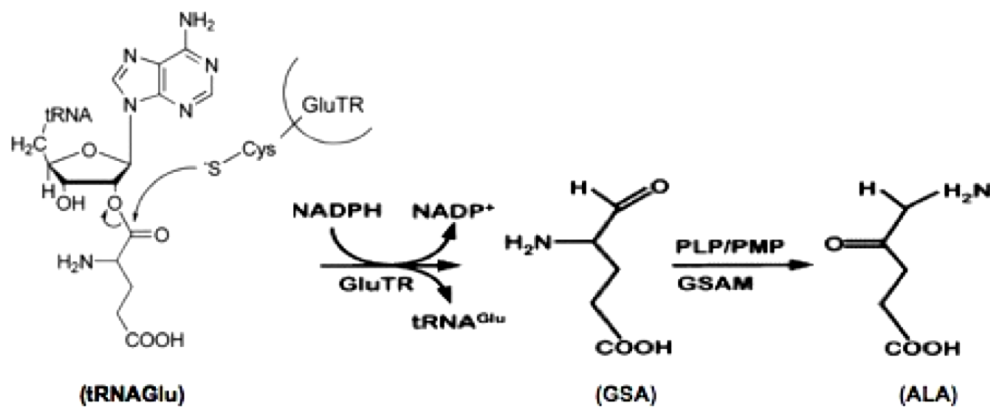


Figura 3 Ciclo de formación de ALA dependiente de tRNA^{Glu}

Glutamyl tRNA reductasa (GluTR).

La GluTR está codificada por el gen *Heme A*. Topológicamente, de acuerdo con la estructura propuesta por Moser y col. (Figura 4A), la GluTR está constituida por dos monómeros que se asocian para formar un homodímero en forma de V; cada monómero presenta una gran hélice alfa que soporta 3 dominios estructurales. El extremo amino terminal (dominio I o catalítico) constituye el sitio de unión al tRNA^{Glu}. El dominio II proporciona el sitio de unión a NADPH. El dominio III lo constituye el extremo carboxilo terminal responsable de la dimerización entre ambas hélices espinales (Moser *et al.*, 2001).

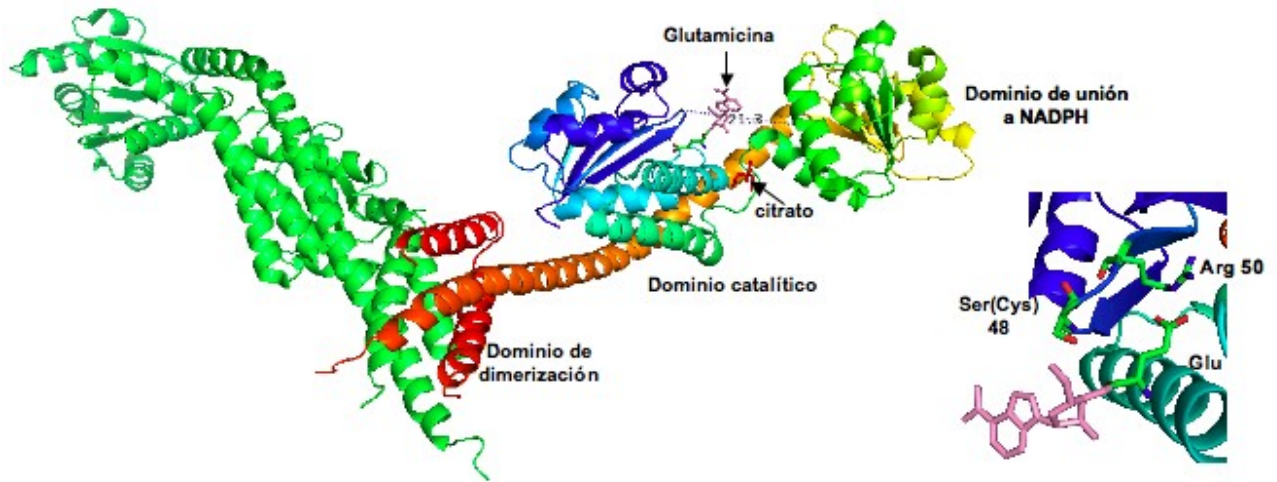
Con base en estudios bioquímicos y de acuerdo con la estructura cristalográfica de GluTR en complejo con un inhibidor análogo al tRNA^{Glu} (glutamicina) obtenida de *Methanopyrus kandleri* (Moser *et al.*, 2001; Moser *et al.*, 2002), se ha propuesto el mecanismo catalítico por el cual GluTR transforma al Glutamato en GSA. La reacción transcurre mediante el ataque nucleofílico del residuo cisteína 48 sobre la unión aminoacil de glutamyl-tRNA. Esta acción se lleva a cabo en presencia de Mg²⁺, permitiendo la formación de un intermediario tioéster altamente reactivo (Moser *et al.*, 1999). Finalmente, el intermediario es reducido por el NADPH, liberando como producto final GSA (Smith *et al.*, 1992).

Glutamato-1-semialdehído aminomutasa (GSAM).

La isomerización de GSA para formar ALA, requiere la transferencia del grupo amino del C2 al C1 de GSA. La reacción es catalizada por la aminotransferasa GSAM la cual utiliza como cofactor un piridoxal 5' fosfato (PMP), generando un intermediario dioxoalderato (DAVA). En el siguiente paso, otra especie de piridoxal 5' fosfato (PLP) en coordinación con un residuo de lisina llevan a cabo la oxidación del C2 para formar ALA (*Smith et al., 1992*).

La enzima GSAM presenta una estructura similar a la propuesta para la mayoría de las aminotransferasas, la cual está conformada por dos subunidades axiales en donde el sitio activo se ubica en la interfase (*Henning et al., 1997*) (figura 4B). La simetría imperfecta entre ambas subunidades, está determinada por una pequeña asa que regula el proceso de atracción de sustrato y la liberación de producto; de esta manera se establece la comunicación alostérica entre sitios distantes de la enzima, la cual confiere su función biológica (*Stetefeld et al., 2006*).

A)



B)

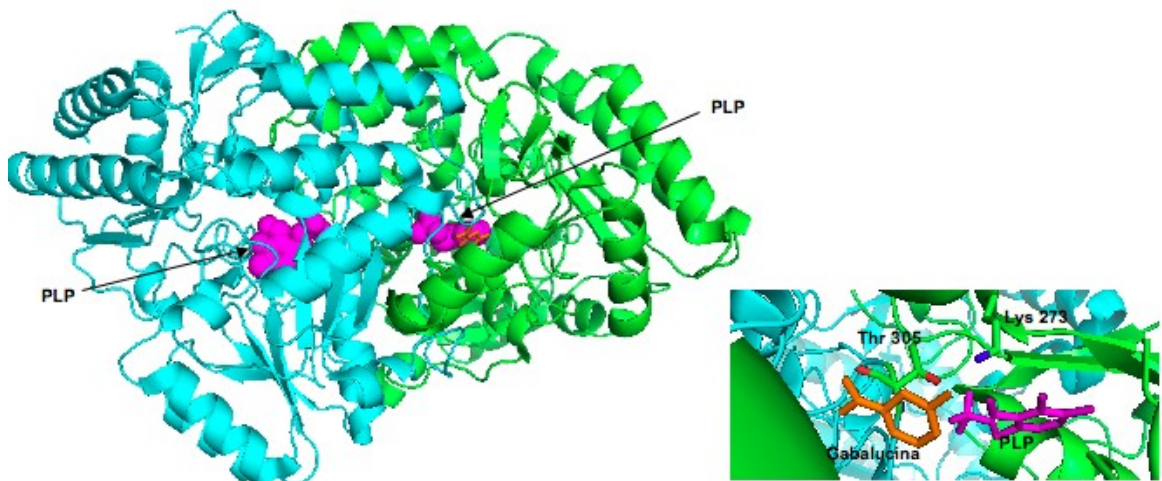


Figura 4 Arquitectura de las enzimas implicadas en la formación de ALA dependiente de tRNA^{Glu}. A) **Glutamyl tRNAreductasa** de *M. kandleri* El homodímero en forma de “V” fue obtenido en complejo con Glutamicina, el cual es un aminonucleósido que semeja la región aceptora del tRNA^{Glu} y una molécula de citrato unida a un residuo conservado R, algunos autores proponen que esta molécula podría mimetizar por sus cargas a grupos fosfato del esqueleto del tRNA. En el sitio activo la Arg 50 ayuda a posicionar el sustrato mediante un puente salino con el carboxilo de glutamicina; posteriormente la Cys (Ser) 48 realiza el ataque nucleofílico sobre el α -carboxilato activo del tRNA^{Glu}. Se estima que entre el sitio activo y el dominio de unión a nucleótidos hay una distancia cercana de $\sim 21\text{\AA}$ Código PDB 1GPJ B) **Glutamato-1-semialdehído aminotransferasa** de *Sinecococcus* sp. La enzima es un homodímero en el cual cada subunidad contiene una molécula PLP (magenta). El sitio activo posee la Lys 273 que es responsable de unir su cofactor PLP, en (naranja) el inhibidor gabalucina se asocia de manera covalente con el cofactor resultando en un intermediario estable m-carboxifenilpiridoxamina fosfato. Código PDB 3GSB.

II. OBJETIVO.

Obtener el complejo binario GluTR-GSAM, usando como modelo de estudio las proteínas de *Clostridium thermocellum* producidas en *Escherichia coli*.

OBJETIVOS PARTICULARES.

- 1) Clonación y sobreexpresión de las enzimas GluTR y GSAM de *C. thermocellum*.
- 2) Purificar por separado cada uno de los componentes del complejo; GluTR y GSAM de *C. thermocellum*.
- 3) Realizar los ensayos de reconstitución del complejo.

III. HIPOTESIS.

Es posible aislar el complejo GluTR/GSAM a escalas suficientes para la realización de estudios estructurales y biofísicos.

IV. ANTECEDENTES.

4.1 Evidencias del complejo GluTR/GSAM.

Desde la caracterización del intermediario GSA, se observó que dicho aminoaldehído sufría descomposición a (ALA) y otras formas de aminoaldehídos en periodos cortos de tiempo y bajo intervalos de pH cercanos a los fisiológicos (7.5-8.0), por lo que se propuso la posibilidad de una transferencia directa de GSA hacia GSAM sin exposición al solvente (Hoobert *et al.*, 1988).

Si bien la descomposición de GSA a ALA es espontánea con y sin GSAM, el complejo cumpliría con la función de regular la concentración libre de GSA en el medio puesto que, tanto en eucariontes como en bacterias, GSA es también sustrato de enzimas que participan en el catabolismo de prolina a glutamato (Srivastava *et al.*, 2010), por lo que el control de la concentración libre de GSA

debe ser relevante en una dinámica de regulación entre estas dos vías metabólicas.

Con la resolución de la estructura cristalográfica de la GluTR de *M. Kandleri*, así como de la GSAM de *Synechococcus*, se propuso un modelo en el cual el dímero de GSAM podría acoplarse al de la GluTR. (Moser *et al.*, 2001). Evidencias bioquímicas apoyaron la posibilidad de un complejo entre GluTR y GSAM como:

1) Interacción de ambas enzimas mediante experimentos de co-inmunoprecipitación (Nogaj y Beale 2005; Lüer *et al.*, 2005).

2) Experimentos utilizando una variante metodológica de filtración en gel (Hummel y Dreyer 1962) en donde se observó el desplazamiento equimolar de GluTR sobre el medio de equilibrio suplementado con GSAM (Lüer *et al.*, 2005).

3) La tasa de oxidación de NADPH por GluTR se incrementa fuertemente cuando se adiciona GSAM en el medio de reacción, ambas evidencias apoyaron la posibilidad acerca de que la interacción entre las dos enzimas está mediada por un canal metabólico (Nogaj y Beale, 2005).

4) Cuando se lleva a cabo la reacción de GluTR sin la presencia de GSAM, se observa que el sustrato tRNA^{Glu} es transformado en GSA y otros productos; en contraparte, cuando la GluTR se acopla con GSAM, es casi imperceptible la formación de GSA comparada con ALA, y no se detecta la formación de productos alternos a GSA (Lüer *et al.*, 2005).

4.2 Planteamiento del problema.

Las evidencias acerca de un complejo entre GluTR y GSAM han sido citadas con anterioridad; además, en plantas se ha encontrado que proteínas accesorias median la asociación entre GluTR y GSAM y que de esta manera

ocurre la regulación espacio temporal de la biosíntesis de tetrapirroles (Meskauskiene *et al.*, 2002; Czarnecki *et al.*, 2011) .

La estructura del complejo GluTR/GSAM aportaría grandes avances para entender la regulación de biosíntesis de terapirroles, tomando además en cuenta que diversos organismos patógenos contienen la vía de síntesis de ALA dependiente de tRNA^{Glu} .

Hasta la fecha no se ha reportado la reconstitución del complejo a escalas suficientes para pruebas de cristalización. Tomando en cuenta que la K_D del complejo observada en los experimentos en filtración en gel para las enzimas de *E. coli* se encuentra alrededor de 10 μ M y que la estequiometría se presenta en una relación 1:1 entre componentes (Lüer *et al.*, 2005, Nogal y Beale, 2005), el complejo GluTR/GSAM exhibe propiedades típicas de complejos estables que permitirían obtener una estructura cristalográfica.

Por lo tanto, la purificación del complejo a gran escala (miligramos) es el primer paso para obtener respuestas estructurales sobre la asociación GluTR/GSAM.

Nuestra investigación buscará los siguientes aspectos:

- 1) Montar un protocolo de purificación con rendimientos suficientes de ambas enzimas.
- 2) Establecer un protocolo de reconstitución del complejo GluTR/GSAM.

V. MATERIALES Y METODOS.

5.1 Clonación y Sobreexpresión de HemA (GluTR) y Hem L (GSAM) de *C. thermocellum*.

La clonación se realizó siguiendo el protocolo de clonación independiente de ligación (Stols *et al* 2001), partiendo de las construcciones sintetizadas por la compañía GenScript para la GluTR y GSAM de *C. thermocellum*. Los fragmentos correspondientes al ORF de GluTR y GSAM se amplificaron por PCR, los cuales fueron incubados 30 min a temperatura ambiente en presencia de 1.5 unidades de T4 DNA polimerasa en un amortiguador de reacción pfx Ampl. 10X pH 8,0 suplementado con: 0.1 mM de MgCl, 5mM de DTT, y 0.66 mM de acetato de potasio para generar fragmentos adyacentes de 15 nucleótidos en cada extremo.

Previo a la clonación, el vector pMCSG7 fue tratado con 20 unidades de la enzima Sspl y posteriormente con 1.5 unidades de T4 DNA polimerasa en presencia de dNTPs para generar las secuencias complementarias a los extremos sueltos de los productos de la PCR.

La clonación se realizó utilizando para cada construcción 650 ng de plásmido pMCSG7, y 100ng de inserto. Finalmente, el producto de la clonación fue utilizado para transformar células de *E. coli* BL21 y colocar en placas con medio LB-agar suplementado con ampicilina.

Las células BL21(DE3) fueron crecidas en medio LB con resistencia a ampicilina por espacio de 12 horas. Posteriormente se realizó la extracción de los plásmidos con los cuales se transformaron mediante choque térmico 500 μ l de células competentes BL21-(DE3) con o sin resistencia utilizando 100 ng de DNA plasmídico. Las células transformadas se sembraron y crecieron en medio LB-agar suplementado con ampicilina [100 mg/ml]. Posteriormente se separaron colonias crecidas en la placa y se crecieron en un precultivo de medio líquido suplementado con ampicilina [20 mg/ml]. La sobreexpresión de Hem A se realizó en 2 L de medio LB suplementado con ampicilina [20 mg/ml] y cloranfenicol [34 mg/ml], los cuales fueron inoculados previamente con 2 ml

de precultivo e incubados a 37°C con agitación constante hasta que se alcanzó una densidad óptica medida en 600 nm entre un rango de 0.8 a 1.0; posteriormente se adicionó 1 mM de isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) y se incubaron durante 4hrs a 37°C con agitación constante de 250 rpm. Los cultivos se centrifugaron a 5000 rpm por 20 min a 4°C en un rotor JA-10 marca Beckman. Se descartó el sobrenadante y la pastilla se congeló a -70°C.

Para GluTR, los oligos diseñados para amplificar el fragmento de 996pb corresponden con las secuencias 5'TACTTCCAA TCCAATGCGTTGAATGTAATCATGGCCGGA3' secuencia sentido y 5'TTA TCC ACT TCC AATGTCATGTCAAACCAGCCTTTTCCT3' antisentido.

Para Hem L, los oligos utilizados corresponden con las secuencias: 5'TACTTC CAATCCAATGCCACGTTATCAAATCGAAGC3' sentido y 5'TTTCCACTTCC AAT GTTATGCCGGGGGTGA3' antisentido.

5.2 Purificación de His₆-GluTR y His₆-GSAM.

Las pastillas de células obtenidas previamente, se resuspendieron en 20 ml de amortiguador A (NaH₂PO₄ 50mM pH 8.0; NaCl 300mM e imidazol 10mM) para ser lisadas en frío con un sonicador Branson, aplicando pulsos durante 30 segundos con 1.5 minutos de descanso. El extracto total de proteínas se centrifugó a 20,000 g por 20 min en un rotor JA-20 marca Beckman a 4°C y se recuperó el sobrenadante, que fue inyectado en una columna de Níquel (HisTrap FF crude, GE) de 5 ml previamente equilibrada con cinco volúmenes de amortiguador A (50mM NaH₂PO₄ pH 8.0; NaCl 300mM e imidazol 50 mM). La purificación se realizó mediante un gradiente de concentración con amortiguador B (50mM NaH₂PO₄ pH 8.0; NaCl 300mM e imidazol 500mM) de 0-100% en 60 ml con flujo de 5 ml/min, colectando fracciones de 1 ml.

5.3 Proteólisis del fragmento de Histidinas con TEV.

Las fracciones obtenidas de la purificación con Ni²⁺, fueron desaladas en una columna de filtración en gel (HiTrap desalting, GE) de 50 ml, la cual se equilibró con amortiguador (Tris 50 mM pH 8.0, DTT 1 mM y EDTA 0.5 mM, 200 mM de KCl). Posteriormente, la muestra se concentró con un Amicon Ultra de 15 ml con una membrana de corte de 30,000 Da y se incubó en presencia de la proteasa TEV en una relación 1:20 durante 20h a 30°C.

5.4 Ensayos de desplazamiento térmico.

Para medir la estabilidad de la proteína (Lavinder *et al.*, 2009), se probaron 23 amortiguadores del kit OptiSol (protein solubility screening, Dylis), tabla 1. La proteína debe estar en presencia del colorante SYPRO-Orange, por lo que se realizó una mezcla de 600 µg de proteína a la cual se adicionaron 5 µl de colorante SYPRO-Orange a 5000x. Partiendo de esta mezcla, se adicionaron sobre una placa de 48 pozos para PCR en tiempo real marca Applied Biosystems, 1.5 µg de proteína con colorante por pozo mas 9 µl de cada amortiguador del kit OptiSol.

El ensayo se llevó a cabo en un sistema de PCR en tiempo real StepOne (Applied Biosystems) llevando la temperatura de 25°C a 99°C a una velocidad de 1 grado por minuto.

5.5 Reconstitución del complejo GluTR/GSAM.

Se purificaron por separado GluTR y GSAM con y sin etiqueta de His, obteniéndose cuatro poblaciones distintas: GluTR-His, GluTR, GSAM-His y GSAM (Figura 5).

Se realizaron experimentos (figura 6) de la siguiente manera:

- 1) Mezclar 500 µg de ambas proteínas en amortiguador Na/K fosfatos pH 7.0, 500 µM de MgCl y 1 mM de DTT.
- 2) Calentar a 50°C durante 20 min con el fin de aumentar la energía cinética de los componentes del complejo y de esta manera facilitar su interacción.

- 3) Incubar a temperatura ambiente durante 40 min para estabilizar las interacciones ocurridas.
- 4) Concentrar en un centricon de 30,000 hasta obtener el mínimo volumen, este paso con el fin de forzar mas la interacción entre ambos componentes del complejo.
- 5) Colocar las muestras en tubos eppendorf de 500 μ l.
- 6) Adicionar 50 μ l de resina Ni-NTA Azarosa (Qiagen)
- 7) Incubar 45 min a 50°C
- 8) Realizar cuatro lavados con amortiguador Na/K fosfatos pH 7.0
- 9) Eluir con amortiguador Na/K fosfatos pH 7.0, Imidazol 500 mM.

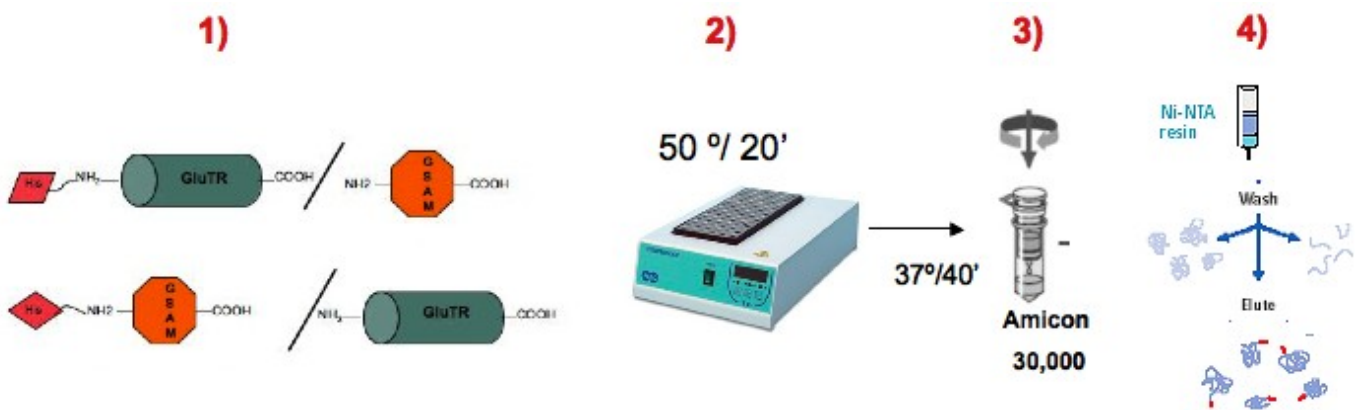


Figura 5 Diseño experimental de la formación del complejo.

VI. RESULTADOS.

6.1 Clonación y sobreexpresión de GluTR y GSAM .

Para llevar a cabo nuestros objetivos, realizamos la búsqueda informática de organismos bacterianos cuyo genoma contuviera la información codificante de ambas enzimas, sin olvidar que nuestros estudios están direccionados hacia la información estructural. El servidor XtalPred nos proporcionó algoritmos probabilísticos para deducir la capacidad de cristalización de una proteína; tomando en cuenta parámetros físico-químicos tales como: arreglos tipo coiled-coil, punto isoeléctrico, longitud de secuencias desordenadas, regiones hidrofóbicas y cruces transmembranales. Con la interpolación de estos valores se obtiene un índice probabilístico de cristalización con cinco categorías posibles, en donde una proteína que tiene una probabilidad de cristalizar de 50%, se le asigna la categoría 1. Entre mayor sea la clasificación (hasta 5), existe menor probabilidad de que cristalice la proteína de interés.

De acuerdo a las estimaciones del servidor, el par de enzimas GluTR y GSAM contenido dentro del genoma de *Clostridium thermocellum* fue acorde para el estudio por tener el potencial de ser termoestable y pertenecer a la categoría 1 de acuerdo a XtalPred (anexo 1).

Los genes de GluTR y GSAM fueron sintetizados por la compañía GenScript dentro del vector pUC57. Posteriormente fueron subclonados en el vector pMCSG7 (Stols *et al.*, 2002). Las características principales del vector consisten en un cassette de expresión que contiene una secuencia codificante para un tallo de 6 Histidinas, adyacente a ésta una secuencia (ENLYFQG) de reconocimiento y corte de la proteasa del virus del tabaco (TEV); la expresión se lleva a cabo bajo el sistema de inducción *Lac* cuya actividad se encuentra regulada por el promotor de la RNA polimerasa del fago T7 (Figura 6).

Prom. T7	Shine-Delgarno, Codon de inicio	His tag	TEV	GluTR	Term.
----------	---------------------------------	---------	-----	-------	-------

Prom. T7	Shine-Delgarno, Codon de inicio	His tag	TEV	GSAM	Term.
----------	---------------------------------	---------	-----	------	-------

Figura 6 Esquema de la secuencia líder de la región codificante del vector pMCSG7. En color rojo la construcción con el injerto de GluTR (pGTR). En azul la construcción de GSAM.

Con las construcciones se transformaron cepas de *E. coli* BL21- CodonPlus, de las cuales se obtuvieron colonias y de cinco de ellas se mandó a secuenciar el inserto a la unidad de secuenciación masiva (htSEQ) de la Universidad de Washington, USA (<http://www.htseq.org>).

Las secuencias se analizaron para seleccionar las clonas cuyo ORF no contuvieran mutaciones ni codones de paro que generaran proteínas deletadas o incompletas. Escogimos una clona positiva por lote de colonias con las cuales realizamos los trabajos de sobreexpresión y purificación.

Los protocolos de inducción y purificación fueron establecidos para ambas enzimas. Se realizaron diversos experimentos en los que se variaron factores tales como: concentración de IPTG, célula hospedera y temperatura (ver materiales y métodos).

La inducción se determinó cualitativamente y la figura 7 nos muestra una banda de peso molecular aproximado al esperado para His-GluTR (39 KDa), mientras que para His-GSAM también se observó cualitativamente la presencia de la banda acorde a su tamaño (46 KDa).

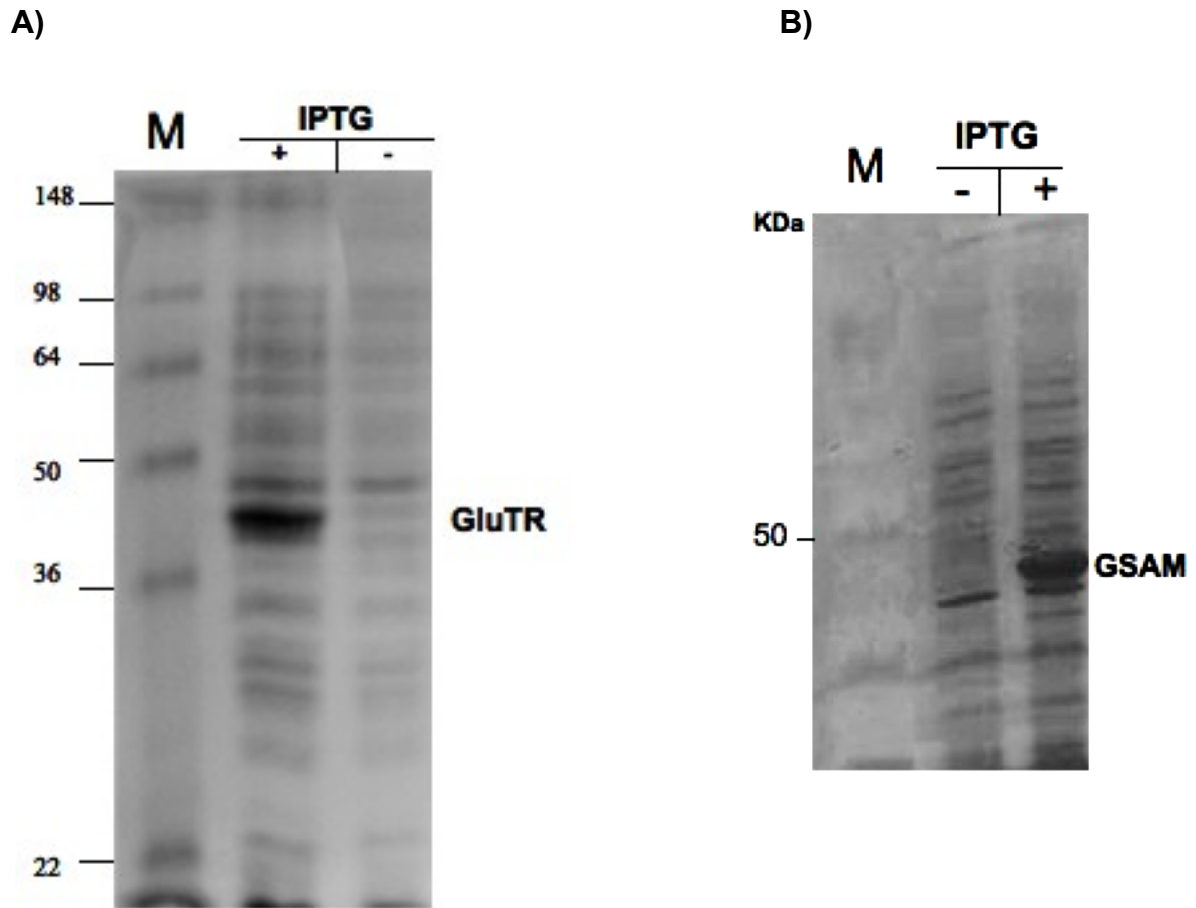


Figura. 7 Inducción de His-GluTR y His -GSAM. A) Gel de poliacrilamida al 15% donde se muestran lisados de un cultivo de BL21(DE3)-pGTR. **B)** Gel de poliacrilamida al 10% donde se observa la inducción de GSAM. En ambos paneles se muestran los cultivos respectivos previo a la adición de IPTG y posterior a la adición del inductor.

6.2 Purificación de los componentes del complejo.

Para ambas enzimas nos apegamos al protocolo de purificación descrito en la figura 8. La estrategia se puede dividir en dos fases; en la primera, se siguió un tren de purificación que partió desde el lisado celular, hasta la purificación por columna de afinidad a Ni.

La bacteria *C. thermocellum* es un organismo termo-resistente que crece en ambientes donde la temperatura supera los 50°C (Freier *et al.*, 1988). Tomando ventaja de ello, el proceso de purificación contempló un paso previo de precipitación por calor de las proteínas endógenas del hospedero mesófilo, en este caso *E. coli*; de esta manera se aprovechó la característica termofílica de

las proteínas de interés y se eliminaron proteínas contaminantes del hospedero. La separación del precipitado de la fracción soluble se realizó mediante centrifugación.

La fracción soluble se eluyó a través de una columna analítica de afinidad a Ni. En las figura 9 y 10 junto con las tablas de cuantificación de proteína (I y II) se muestran los diferentes pasos de purificación de ambas enzimas hasta dicho punto.

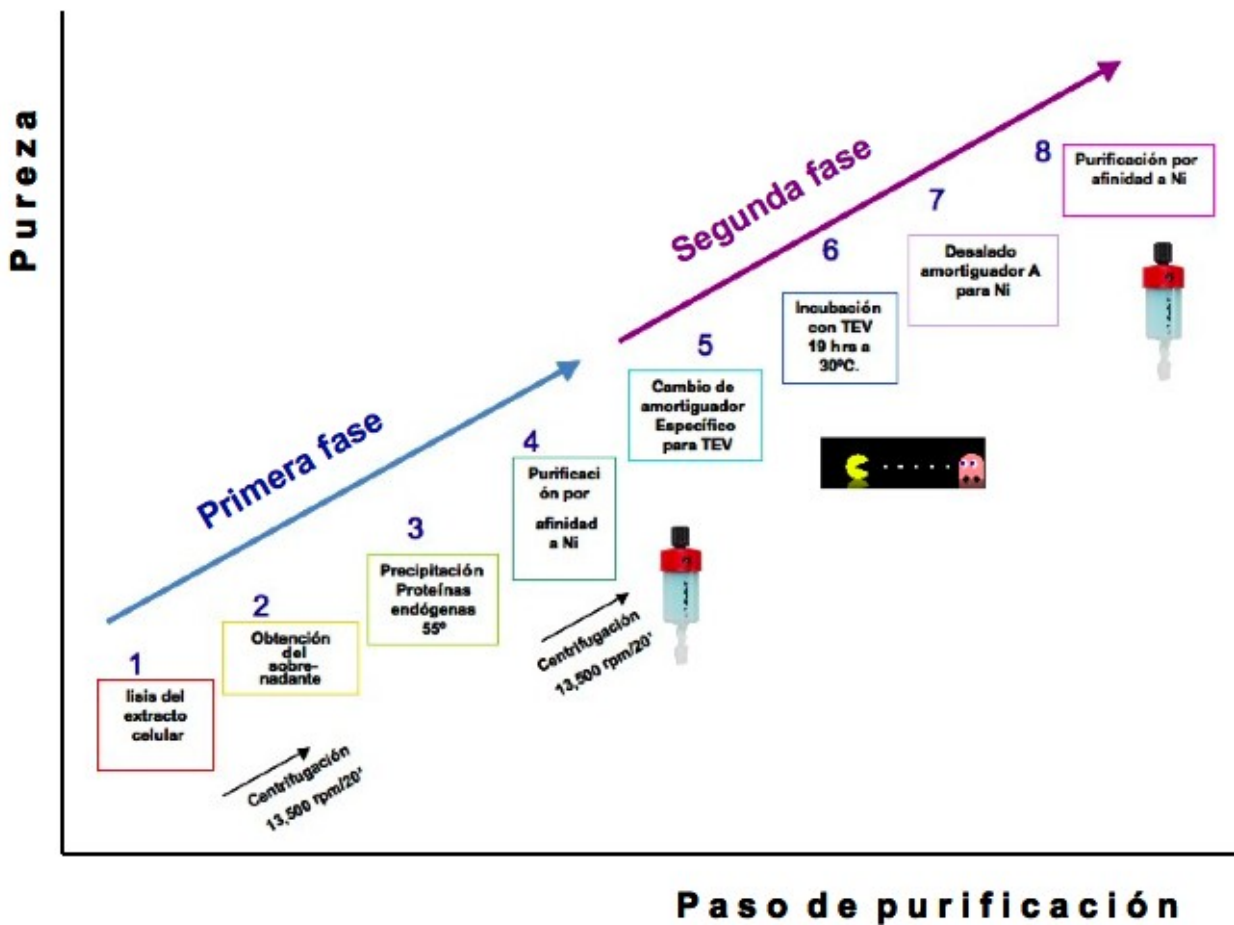


Figura 8. Estrategia de purificación las proteínas GluTR y GSAM por digestión parcial con TEV.

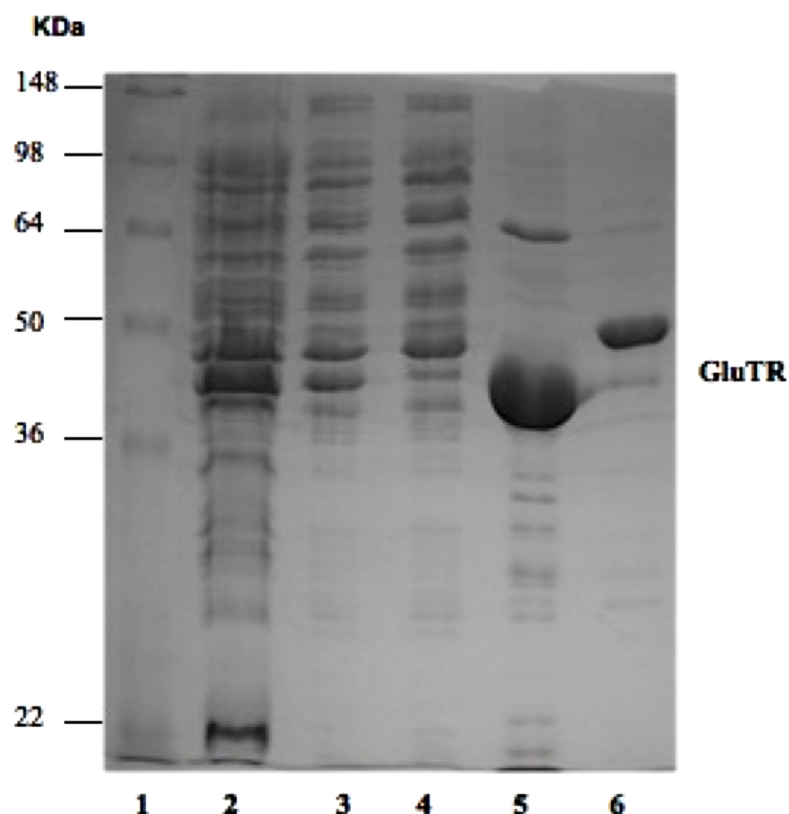


Figura 9 A) SDS-PAGE de la purificación de His-GluTR. La electroforesis muestra la purificación de la proteína recombinante desde el lisado de *E.coli* BL21(DE3) transformadas con el plásmido pGTR hasta la primer purificación con Ni. Carril 1, marcador de peso; carril 2 lisado de células inducidas con 1 mM de IPTG; carril 3 proteína soluble a 55°C; carril 4 proteína no afin a Ni; carril 5 GluTR inmovilizada en la columna de Ni; carril 6 proteína control. Gel SDS-PAGE al 15 % teñido con azul de Coomassie.

Tabla I Concentración de proteína a lo largo del proceso de purificación de GluTR *

	Extracto crudo sonicado	Proteína soluble después de calentar a 55°C	Proteína purificada por afinidad a Ni	Proteína digerida por TEV	Proteína sin digerir por TEV
Concentración (mg/ml)	215	140	1.63	9.53	16
Vol. (ml)	40	40	12	0.7	0.7
Proteína total (mg)	8,600	5,600	17.93	7	11.2

* Durante el proceso de purificación, se realizó la cuantificación de proteína en cada uno de los pasos citados en la figura 10. La proteína que eluyó de Ni, fue desalada en amortiguador (Tris 50 mM pH 8.0, DTT 1 mM y EDTA 0.5 mM, 200 mM de KCl) y se incubó en presencia de la proteasa TEV durante 19 hrs. Posterior a esto, la muestra se volvió a desalar en amortiguador A de Ni (NaH₂PO₄ 50mM pH 8.0; NaCl 300mM e imidazol 10mM) y se eluyó de nuevo en la columna de afinidad a Ni. Por último, se recuperaron las fracción digeridas y no digeridas, las cuales fueron concentradas por separado en 0.7 ml que fueron medidos en un nanodrop a una λ de 280 nm.

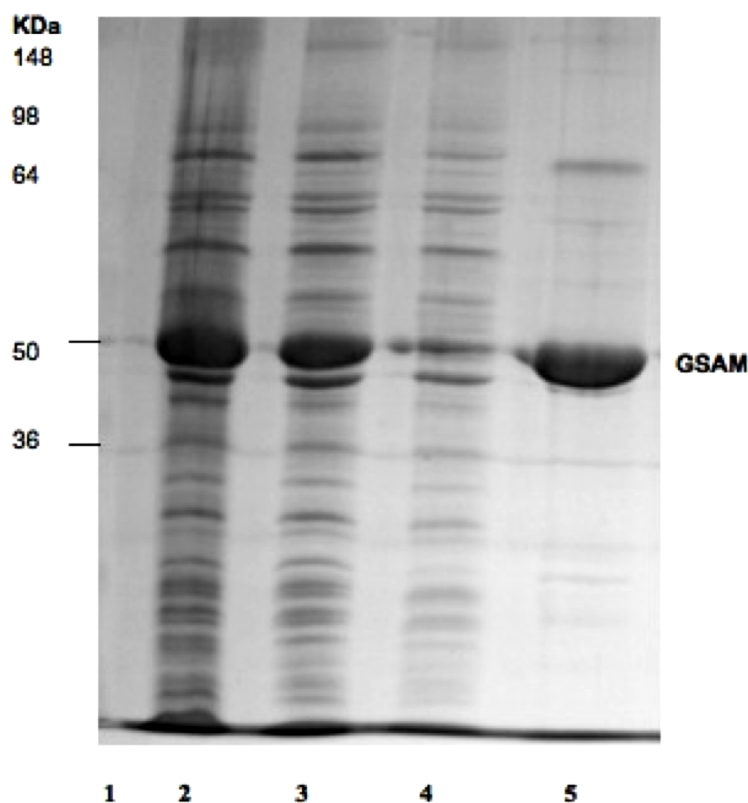


Figura 10 Purificación de His-GSAM. Carril 1 marcador de peso; carril 2: sonificado; carril 3: proteína soluble a 55°; carril 4: proteína no específica a Ni; carril 5 GSAM inmovilizada en la columna de Ni. Gel SDS-PAGE de al 15% teñido con azul de Coomassie.

Tabla II Concentración de proteína a lo largo de la purificación de GSAM *

	Extracto crudo sonificado	Proteína soluble después de calentar a 55°C	Proteína purificada por afinidad a Ni	Proteína digerida por TEV
<i>Concentración (mg/ml)</i>	250	152	2	12.2
<i>Vol. (ml)</i>	30	25	21	2
<i>Proteína total (mg)</i>	7,500	3,800	42	25

* Durante el proceso de purificación, se realizó la cuantificación de proteína en cada uno de los pasos citados en la figura 10. La proteína que eluyó de Ni, fue desalada en amortiguador (Tris 50 mM pH 8.0, DTT 1 mM y EDTA 0.5 mM, 200 mM de KCl) y se incubó en presencia de la proteasa TEV durante 19 hrs. Posterior a esto, la muestra se volvió a desalar en amortiguador A de Ni (NaH₂PO₄ 50mM pH 8.0; NaCl 300mM e imidazol 10mM) y se eluyó de nuevo en la columna de afinidad a Ni. Para finalizar, se recuperó la fracción digerida la cual fue concentrada por separado en 2 ml y cuantificada con un nanodrop a una λ de 280 nm.

Cualitativamente se observó la banda de sobreexpresión de ambas enzimas (Figura 7). A nivel cuantitativo, durante el paso de purificación por choque térmico siempre se observó disminución de la presencia de GluTR en comparación con GSAM, esto puede deberse a que GluTR es más sensible a la desnaturalización por calor (datos no mostrados de desplazamiento térmico señalan que la T_m de la GSAM es en promedio 10°C mayor que la T_m de la GluTR), no obstante, a pesar de que no se observa disminución drástica de contaminantes, decidimos darle continuidad a la precipitación de proteínas por calor ya que sin éste, se observan más impurezas cuando se eluye la proteína por la columna de Ni.

La purificación por Ni se logró mediante un gradiente continuo de concentración de imidazol (0 a 500 mM); después de obtener las proteínas solubles del tratamiento térmico, se equilibró la columna de Ni con amortiguador A (NaH_2PO_4 50mM pH 8.0; NaCl 300mM e imidazol 10mM), se inyectó la muestra y finalmente se realizó la elución de la proteína con amortiguador B (NaH_2PO_4 50mM pH 8.0; NaCl 300mM y 500mM de imidazol). La GluTR mostró un pico de absorbancia en un intervalo de a 150 a 200 mM de imidazol mientras que la GSAM lo hace a una concentración cercana de 200 mM. En las figuras 9 y 10 se muestran las purificaciones de ambas proteínas, en los dos casos se observa enriquecimiento de las bandas correspondientes a sus respectivos pesos.

Proteólisis de His-GluTR y His-GSAM.

Como ya se mencionó líneas atrás, las construcciones génicas donde se encuentran ambas enzimas contienen una secuencia codificante para un fragmento extra de 6 histidinas el cual funciona como sitio de anclaje a cationes divalentes tales como Ni; adyacente a la etiqueta de histidinas, se encuentra la secuencia específica de corte que es reconocida por la proteasa TEV. La proteasa del virus de tabaco (TEV), es similar a la familia serin-proteasas tales como quimiotripsina, dicha enzima es altamente específica por el epítipo ENLYFQS, su alta selectividad así como su fácil purificación y el hecho de ser

producida con etiqueta de histidinas la hacen propicia para experimentos de proteólisis de proteínas recombinantes.

La proteólisis ocurre cuando se expone la proteasa a la etiqueta y el sitio de corte de la proteína recombinante. La purificación se realiza mediante una columna de afinidad a Ni sin gradiente de imidazol, la población de proteína sin tag de Histidinas saldrá en el volumen no afin a la columna dejando unida a la resina la proteína que no se cortó y el resto de los contaminantes.

El método establecido es adecuado para obtener GluTR con alto grado de pureza, sin dejar de resaltar que también existe una proporción considerable de enzima que no es cortada, esta observación concuerda con la tabla de purificación en la que se puede apreciar pérdida en una proporción cercana al 50% de proteína total cuando se somete a digestión con TEV; este comportamiento también se observa para GSAM (datos no mostrados); sin embargo, a pesar de la pérdida considerable de proteína, el rendimiento final del proceso fue de 1.5 mg/L de GluTR y 11 mg/L de GSAM (Tablas I y II), cantidades suficientes para hacer ensayos de acomplejamiento y cristalización.

6.3 Estabilización de GluTR

La alta concentración de componentes iónicos en el medio de elución de las proteínas puras (50 mM NaH_2PO_4 pH 8.0; 300 mM NaCl e imidazol 50mM) puede interferir en el proceso de formación de cristales de proteína, razón por la cual se debe dializar la proteína en contra de un amortiguador cuya fuerza iónica sea la menor posible.

Para la GluTR observamos un comportamiento inestable al cambiar a un amortiguador de menor salinidad. El primer amortiguador que se usó fue 20 mM de Tris HCL pH8.0; 1 mM de MgCl y 1 mM de DTT; bajo tal condición y a temperaturas de 37°C y 4°C, la proteína precipitó a una concentración de 20 mg/ml, al igual que en una condición que incluía 20 mM de HEPES, 1 mM de MgCl, 1mM de DTT y 50 mM de NaCl.

Diversos autores han demostrado que la termoestabilidad de una proteína es dependiente de los parámetros de solubilidad y fuerza iónica del medio (Matulis *et al.*, 2005; Treviño *et al.*, 2007). Por lo tanto, la medición de la temperatura media de desnaturalización (T_m) de una proteína es un parámetro efectivo para determinar su comportamiento en un medio específico. En este trabajo utilizamos la técnica de desplazamiento térmico (*thermal shift*), la cual permite monitorear la T_m de una proteína en una variedad de condiciones (Figura 11).

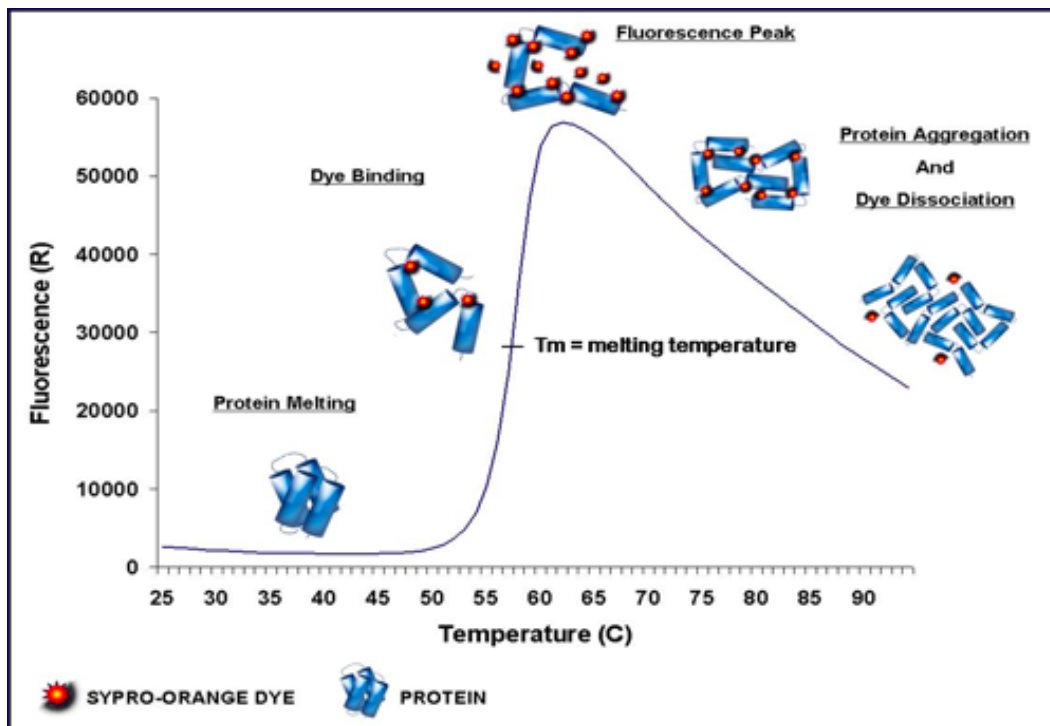


Figura 11. Ensayo de desplazamiento térmico. El cambio en el plegamiento de la proteína se monitorea mediante la fluorescencia emitida por el compuesto SYPRO orange el cual emite fluorescencia cuando por consecuencia de la desnaturalización, se exponen al ambiente acuoso las regiones hidrofóbicas de la proteína. El valor de la temperatura media de fusión (T_m) se incrementará en presencia de ligandos que se unen con gran afinidad al estado nativo de la proteína que al estado desplegado de esta.

Con dicho propósito se utilizó un grupo de 23 amortiguadores cada uno a una concentración de 100 mM y con un intervalo de pH de 3.0 a 10.0 (Figura 13), donde se observa que el amortiguador de Na/K fosfatos a pH 7,0 favorece el corrimiento de la T_m de GluTR 15°C respecto al amortiguador empleado en un inicio para resuspensión (HEPES 20 mM, 1 mM de MgCl, 1mM de DTT, 50 mM de NaCl mM pH 8,0). (figura 12). Es importante resaltar que bajo la condición

de fosfatos, la GluTR se mantiene soluble por tiempo indefinido sin importar la temperatura a la que se encuentre.

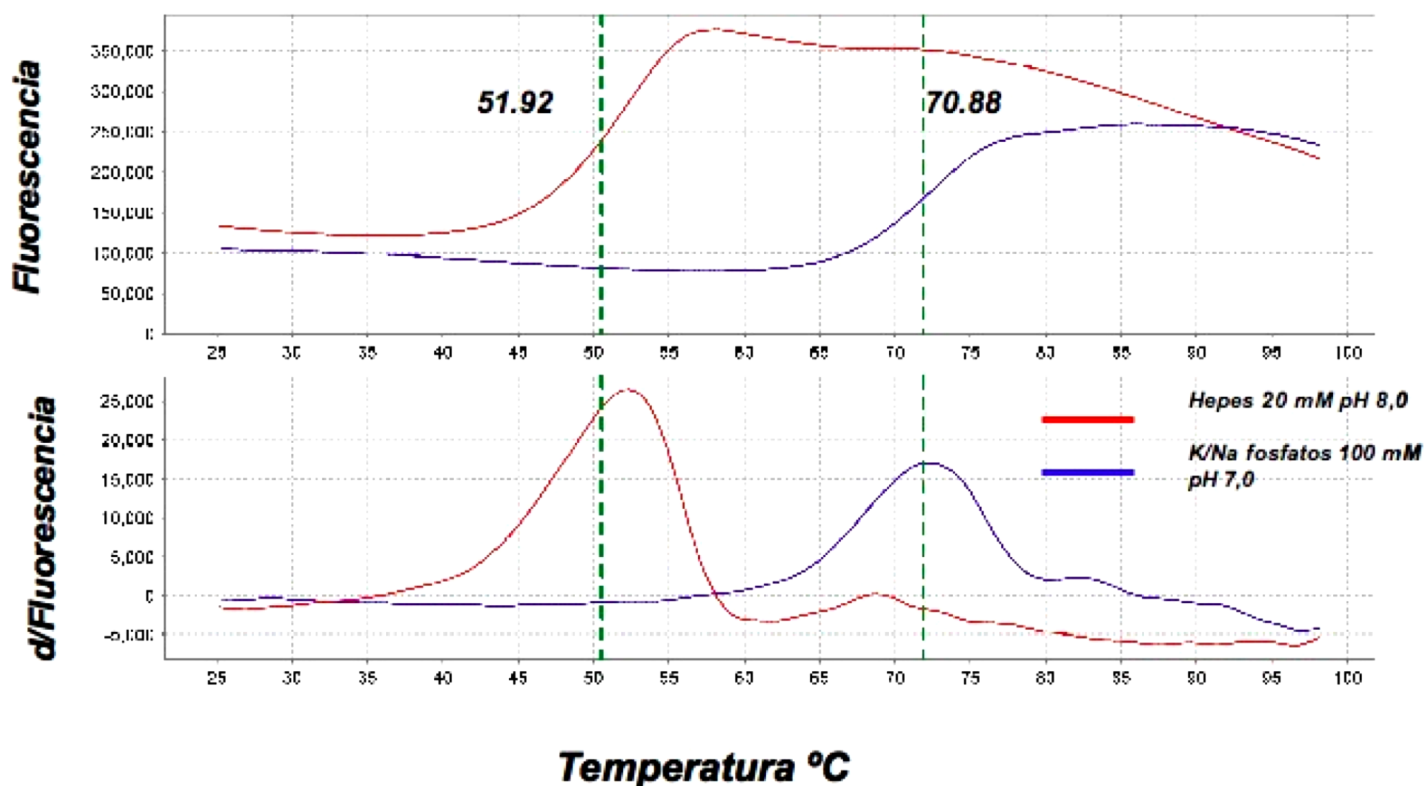


Figura 12. Gráficas representativas del ensayo tipo desplazamiento térmico. En el panel superior se muestran las principales curvas de termoestabilidad de GluTR en presencia de dos diferentes amortiguadores, en rojo GluTR resuspendida en amortiguador 20 mM Hepes pH 8,0, 1 mM DTT, 1mM MgCl. En azul 100 mM de amortiguador Na/K fosfatos. El ensayo se comparó con los valores de fluorescencia de cada amortiguador sin proteína (líneas basales). La grafica del panel inferior representa las curvas derivadas de la fluorescencia, donde se observan claramente los picos máximos de emisión de luz fluorescente de SYPRO Orange que correlacionan con el valor de Tm. Las líneas verdes muestran la posición calculada del Tm.

Los valores obtenidos de Tm de cada condición, se compararon con los valores promedio de los experimentos control (GluTR en amortiguador 20 mM Hepes pH 8,0 , 1mM de DTT y 1mM de MgCl₂) siguiendo una simple fórmula: $\Delta T_m = T_m - T_0$ donde $T_0 = T_m$ control y $T_m = T_m$ para cada amortiguador del OptiSol; valores con ΔT_m negativos indican que el amortiguador ejerce un factor desestabilizante y viceversa (Ericsson *et. al* 2006).

La mayoría de los amortiguadores empleados tienen un efecto desestabilizante sobre la Tm de la GluTR, lo cual pueda deberse al efecto del pH o de la

presencia de alguna sal; al respecto, la gráfica de la figura 13 muestra que existe una tendencia de la proteína a mantener su estabilidad en intervalos de pH de 6.5 a 8.0 y de manera específica en el amortiguador Na/K a pH de 7.0; fuera de ello, ambientes altamente ácidos como pH (3,0-5,0) son menos favorables para estabilizar a la proteína, el mismo efecto se observa a valores de pH básicos (9.0 a 11).

Es posible que la estabilidad de la GluTR conferida por los grupos de fosfato, se deba a que mimeticen al tRNA e interactúen en la superficie de contacto del mismo con la proteína.

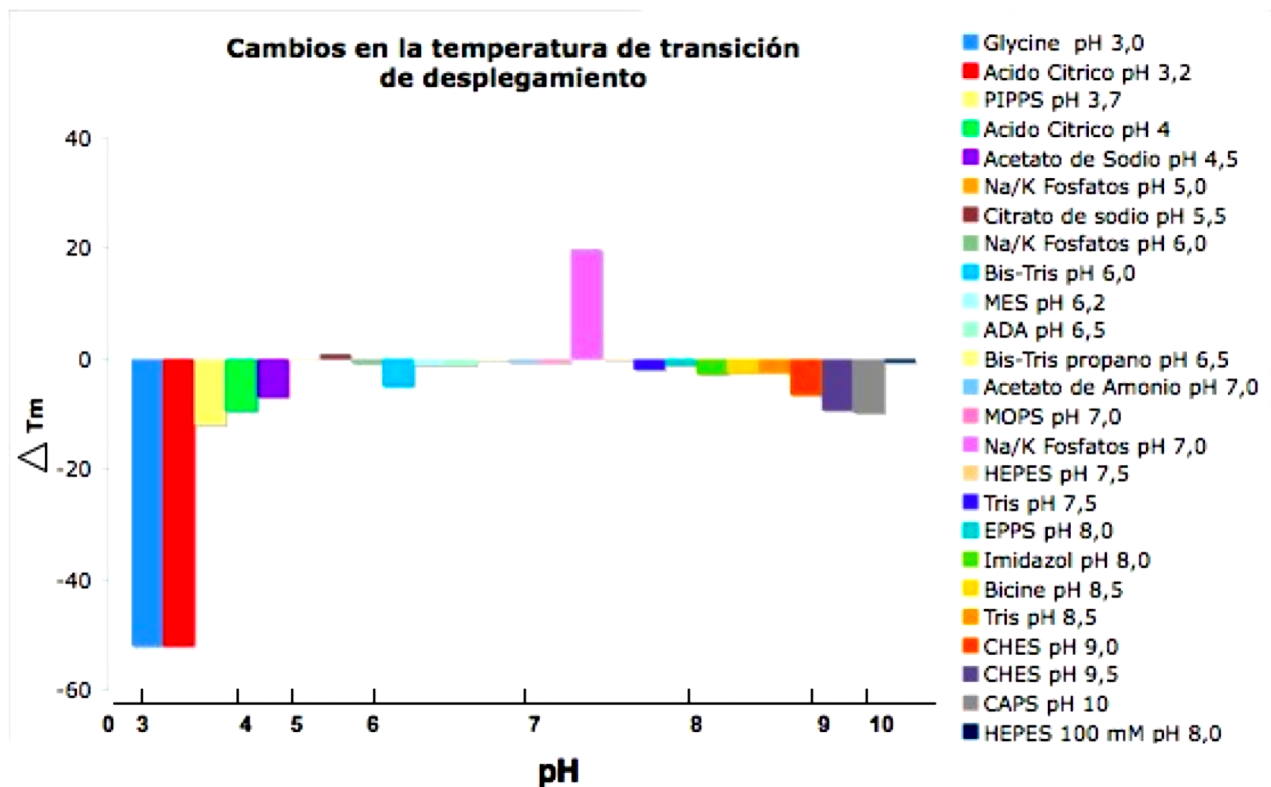


Figura 13. Cambios en la temperatura de transición de desnaturalización para GluTR. Una ΔT_m negativa significa que el amortiguador desestabiliza a la proteína y un valor positivo indica que el amortiguador tiene un efecto estabilizante. Todos los amortiguadores empleados se usaron a 100 mM.

6.4 Reconstitución del complejo GluTR/GSAM.

Para analizar la formación del complejo propuesto se aprovecharon las etiquetas de fusión que se añadieron a las proteínas de interés; el complejo

puede purificarse por afinidad y la visualización se logra con SDS-PAGE (Berggard *et al.*, 2007).

Purificamos por separado ambas proteínas y se obtuvieron cuatro poblaciones diferentes (GluTR-His (1); GluTR (2); GSAM-His (3) , GSAM (4)) (Figura 14); se realizaron las mezclas 1,4 y 2,3 en un amortiguador cuya base fue 50 mM de Na/K fosfatos pH 7.0, 500 μ M de MgCl y 1 mM de DTT, y finalmente se pusieron en contacto con la resina Ni-NTA. Si existe la formación de complejo, ambas proteínas deberían de observarse en un gel de poliacrilamida de lo contrario si no hay asociación entre ellas, solo se observará la proteína que contiene la etiqueta de histidinas (ver diseño experimental en materiales y métodos).

En la figura 15 A se exhiben las fracciones eluídas de la resina de Ni después del experimento de reconstitución. En apariencia no existe formación del complejo entre His-GluTR y GSAM.

Contrario al experimento del panel A de la figura 15, en el par GluTR/ His-GSAM (figura 15 B) se presentan en la fracción eluída de Ni las bandas correspondientes a ambas proteínas con una estequiometría aparente de 1:1.

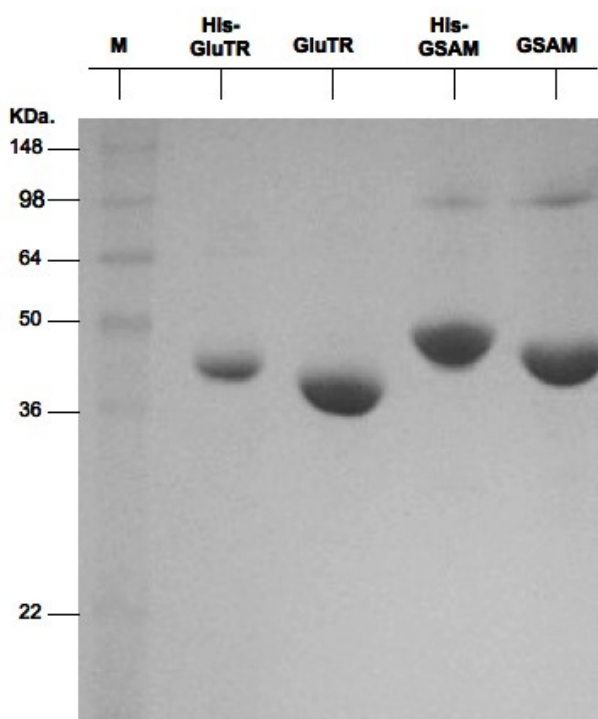


Figura 14. Purificación de las enzimas recombinantes y silvestres. 4 poblaciones de enzimas con y sin tag de histidinas se requirieron para realizar los ensayos de reconstitución del complejo.

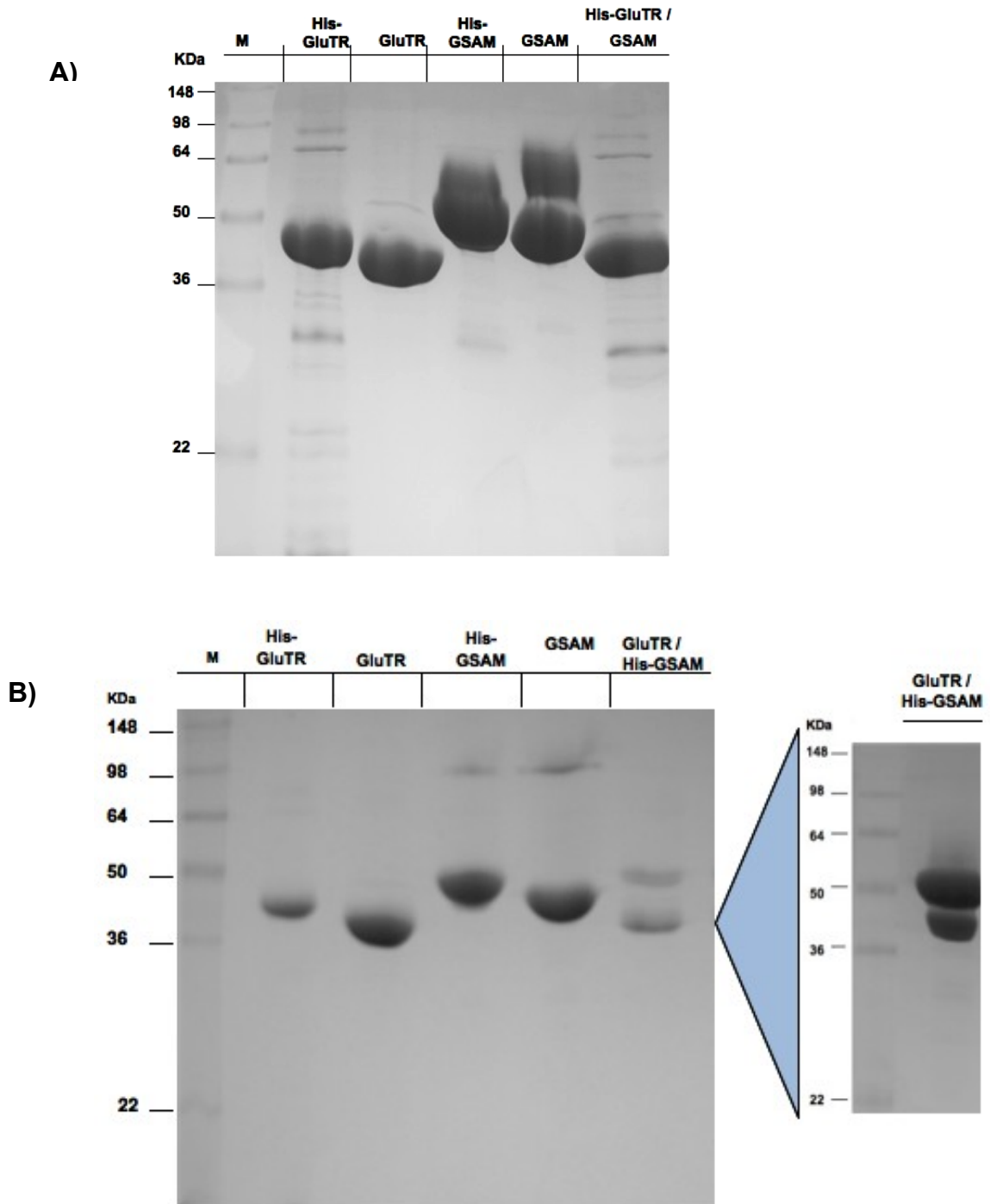


Figura 15. Reconstitución del complejo GluTR/GSAM. A) SDS-PAGE de la incubación de las proteínas GluTR-His y GSAM. **B)** complejo GSAM-His/GluTR; en el recuadro se muestra la repetición del experimento pero con un gel cargado con 30 µg de proteína.

Dos experimentos se realizaron; en un tubo eppendorf de 500 µl, se mezclaron 100 µg de GluTR-His con 100 µg de GSAM, mientras que en otro tubo se mezclaron 100 µg de GSAM-His con 100 µg de GluTR, posterior a ello, las mezclas se colocaron a 50°C durante 20 min y después se reposaron 40 min a temperatura ambiente. En el siguiente paso, las mezclas se concentraron hasta 150 µl mediante centrifugaciones de 30,000. Las proteínas se recuperaron incubando cada mezcla con 90 µl de resina Ni-NTA durante 40 min en agitación constante y a 4°C, enseguida se realizaron tres lavados de 150 µl con amortiguador Na/K fosfatos pH 7.0 (entre cada lavado, las muestras fueron centrifugadas 2 min a 13,000 rpm, desechando el sobrenadante). La elución de la proteína adherida se realizó incubando 10 min con 75 µl de amortiguador Na/K fosfatos pH 7.0 suplementado con 500 mM de imidazol para finalizar con una centrifugación de 13,000 rpm durante 2 min. El sobrenadante fue recuperado y monitoreado en SDS-PAGE al 15%.

Por tanto, la formación del complejo en apariencia es dependiente del N-terminal de la GluTR y probablemente de la concentración de grupos fosfato en el medio. Al respecto, se realizó un experimento en el cual se cambió el amortiguador de fosfatos por otro con características químicas semejantes, tal como cacodilato de sodio (Figura 16).

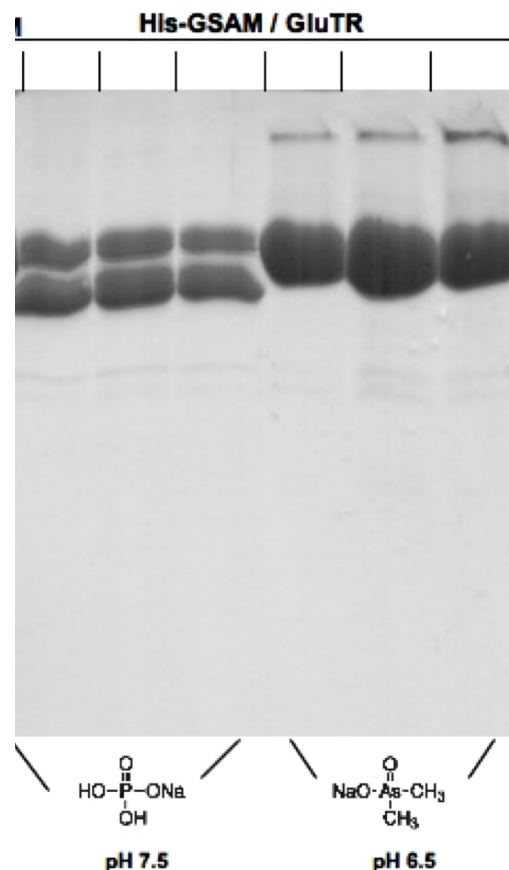


Figura 16. La formación del complejo GluTR/GSAM requiere de grupos fosfato. SDS-PAGE al 18% donde se muestran dos experimentos paralelos de reconstitución del complejo putativo. La presencia de ambas bandas en el eluyente de la resina se observa sólo con amortiguador de fosfatos, en contraste con cacodilato de sodio donde sólo se muestra la banda de la proteína recombinante. El amortiguador de cacodilato se ajustó a pH de 6.5.

La figura 16 demuestra que el fosfato es de relevancia para la formación del complejo, en comparación con el cacodilato en el cual sólo se visualiza His-GSAM en el eluido de la resina de Ni.

Este resultado podría indicar que los grupos fosfato mimetizan la presencia del tRNA y que quizás, más que un complejo binario, se trate de un complejo ternario compuesto por el par de proteínas y el tRNA.

VII. DISCUSIÓN.

El objetivo de este trabajo fue explorar la posibilidad de aislar, en escala suficiente para la realización de ensayos de cristalización, un complejo formado por las enzimas GSAM y GluTR. Nuestros resultados muestran que es factible realizar dicha reconstitución.

El ensayo de desplazamiento térmico fue clave para definir el amortiguador en el cual la GluTR presenta mayor estabilidad. Un ensayo posterior mostró que el regulador de fosfatos es de igual manera benéfico para la GSAM, con lo cual el experimento de acomplejamiento se facilitó. El ensayo de desplazamiento térmico es sencillo, económico, requiere de poca muestra, es reproducible y sin lugar a dudas representa una alternativa respecto a ensayos como dicroísmo circular, calorimetría diferencial de barrido o dispersión dinámica de luz, por la facilidad adicional de probar 96 muestras en un solo experimento.

En cuanto al experimento de reconstitución, un aspecto a resaltar es la especificidad que mostró el ensayo. Es decir, el complejo pudo purificarse utilizando el par His-GSAM / GluTR pero no con el par His-GluTR con GSAM, lo cual es indicativo de la especificidad del ensayo, por un lado y por otro indica la posible importancia del extremo N-terminal de la GluTR para la formación del complejo.

Con base a las estructuras reportadas para ambas enzimas, se propuso el primer modelo del complejo (Figura 17) en el cual, la cavidad formada por el dímero de GluTR de *M. kandleri* se ajusta con la superficie del dímero de GSAM de *Synechococcus sp* (Moser et al., 2001). La estructura de GluTR en complejo putativo muestra que el N-terminal se encuentra menos expuesto en comparación con el N-terminal de la GSAM. En la discusión del modelo no se hizo referencia al papel que podría jugar el N terminal en la formación del complejo, lo cual representa un aporte del presente trabajo.

Otro punto interesante es que en un estudio previo se determinó que el dominio de dimerización participa en la formación del complejo (Lüer et al., 2005). El

análisis de la secuencia de GluTR de *C. thermocellum* objeto de este trabajo indica que la proteína carece de este dominio (Figura 18).

Sin embargo, ensayos preliminares en columnas de exclusión molecular indican un comportamiento dimérico. La resolución de la estructura tridimensional dará más indicios acerca de la naturaleza oligomérica de la GluTR.

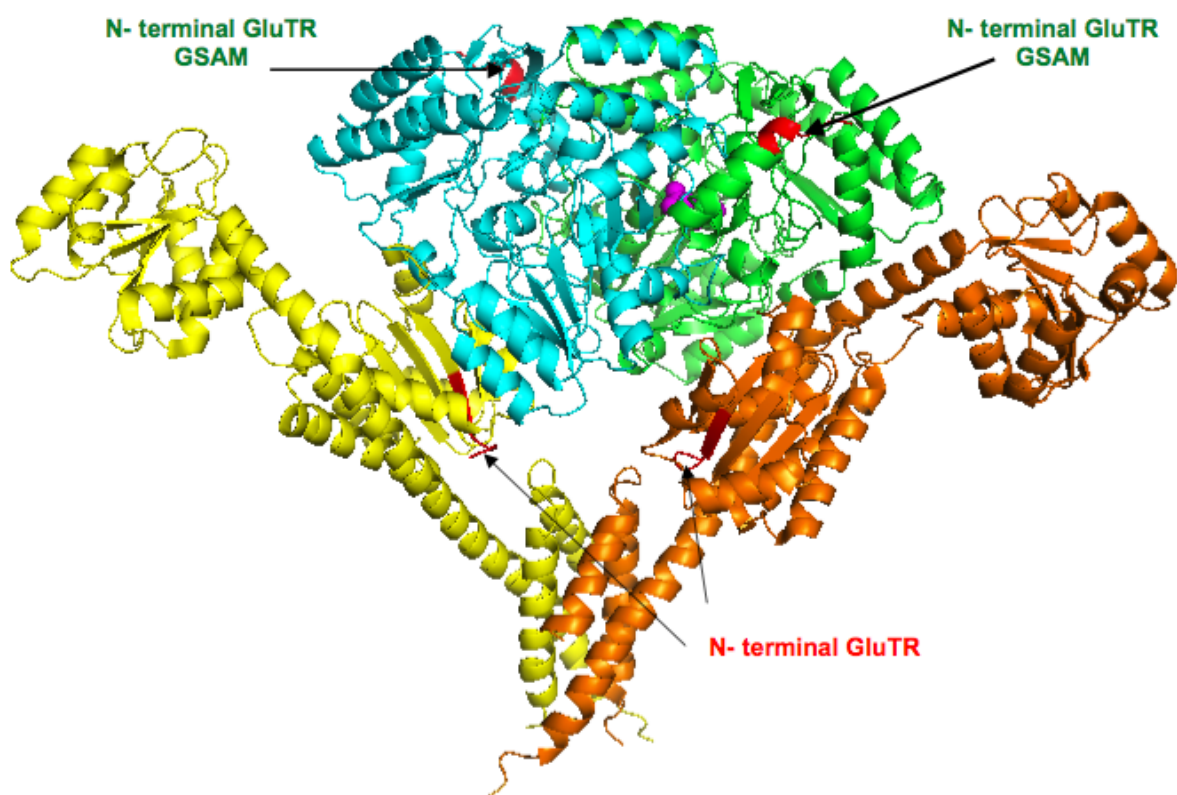


Figura 17. Modelo del complejo glutamyl tRNA reductasa y glutamato 1 semialdehído aminomutasa en rojo se representa el N y C- terminales de cada monómero. Modelo basado en el propuesto por Moser y col 2001.

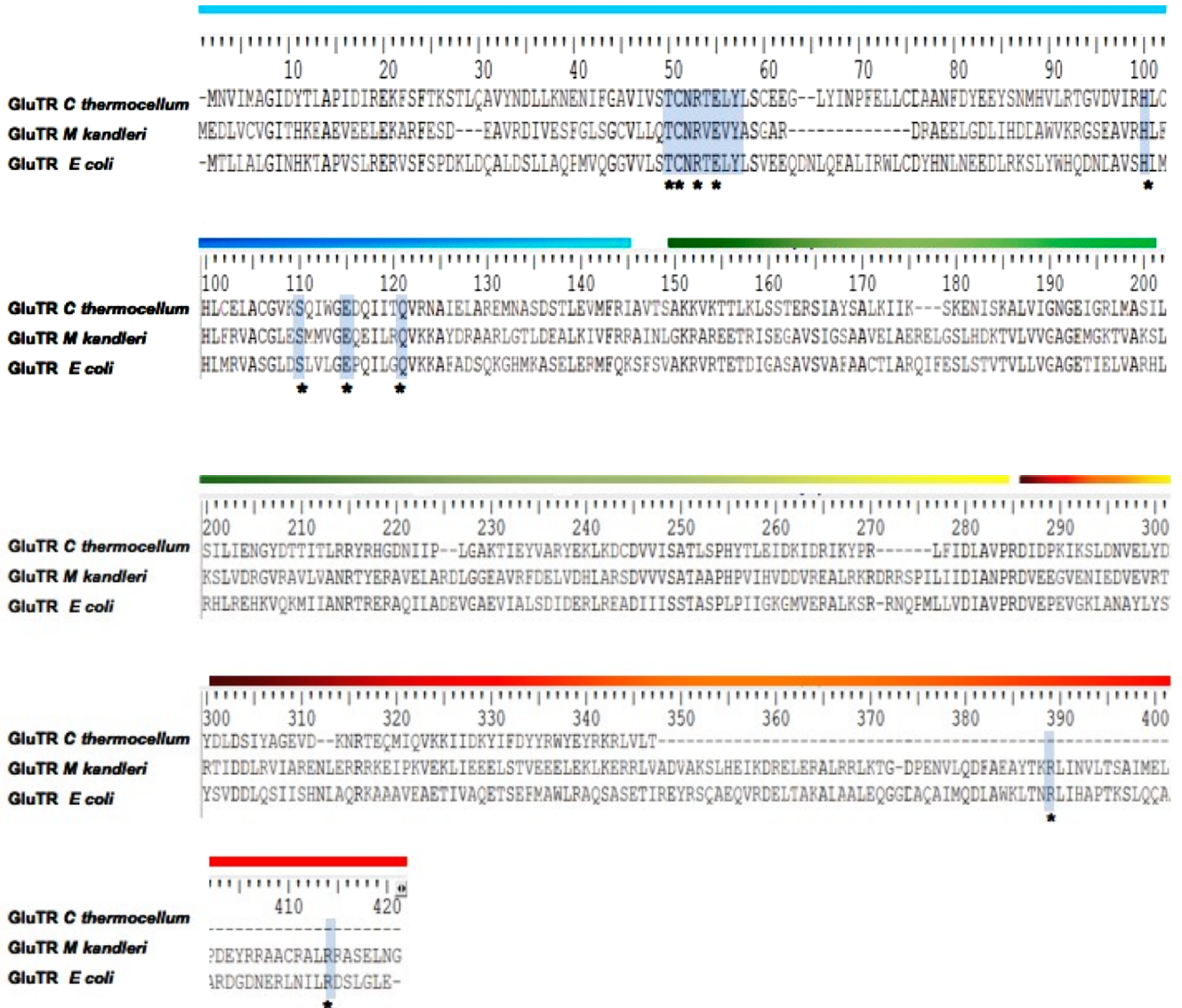


Figura 18. Alineamiento entre algunas secuencias de GluTR. Las barras de colores representan los dominios que conforman la topología de la enzima; en azul para el dominio catalítico, verde el sitio de unión a NADPH y rojo al dominio de dimerización. En el sitio I se encuentran marcados con un * los residuos que conforman el sitio activo de la enzima, mientras que en el sitio III se marcan los residuos de Arg que permiten el reconocimiento entre monómeros. Tanto la GluTR de *E. coli* como *M. kandleri* mantienen una longitud parecida, en comparación con *C. thermocellum* en donde el dominio III, de casi 80 residuos, se encuentra ausente. Alineamiento realizado mediante el servidor BioEdit.

VIII. CONCLUSIONES.

- Es posible formar un complejo GluTR-GSAM, con una aparente estequiometría de 1:1.
- La estabilidad de la GluTR y de la formación del complejo GluTR-GSAM depende de iones fosfato.
- El extremo amino terminal de la GluTR es importante para el reconocimiento entre GluTR y GSAM.

IX. PERSPECTIVAS.

- Validar la existencia del complejo con otras metodologías como cromatografía de exclusión molecular o geles nativos.
- Realizar pruebas de cristalización del complejo GSAM/GluTR.
- Purificar el tRNA^{Glu} específico para la GluTR e *C. thermocellum*.
- Buscar reconstituir el complejo ternario GluTR/GSAM/tRNA^{Glu}

X. REFERENCIAS.

1. An, S., Kyoung, M., Allen, J. J., Shokat, K. M. and Benkovic, S. J. (2010). Dynamic Regulation of a Metabolic Multi-enzyme Complex by Protein Kinase CK2. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(15), 11093–11099.
2. Anderson, K. S., Miles, E. W. and Johnson, K. A. (1991). Serine modulates substrate channeling in tryptophan synthase. A novel intersubunit triggering mechanism. *The Journal of Biological Chemistry*, 266(13), 8020–8033.
3. Aphasizhev, R., Aphasizheva, I., Nelson, R. E., and Simpson, L. (2003). A 100-kD complex of two RNA-binding proteins from mitochondria of *Leishmania tarentolae* catalyzes RNA annealing and interacts with several RNA editing components. *Rna New York Ny*, 9(1), 62–76.
4. Beale, S. I., Castelfranco, P. A. (1973). ¹⁴C incorporation from exogenous compounds into α -aminolevulinic acid by greening cucumber cotyledons. *Biochem Biophys Res Commun.* 52(1): 143-149.
5. Beale, S. I., Gough, S. P. and Granick, S. (1975). Biosynthesis of δ -aminolevulinic acid from the intact carbon skeleton of glutamic acid in greening barley. *Proc Natl Acad Sci.* 72(7): 2719-2723.
6. Czarnecki, O., Hedtke, B., Melzer, M., Rothbart, M., Richter, A., Schröter, Y., Pfannschmidt, T. and Grim, B. (2011). An Arabidopsis GluTR binding protein mediates spatial separation of 5-aminolevulinic acid synthesis in chloroplasts. *Plant Cell.* 4476-91.
7. De Armas-Ricard, M., Levicán, G., Katz, A., Moser, J., Jahn, D. and Orellana, O. (2011). Cellular levels of heme affect the activity of dimeric glutamyl-tRNA reductase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 405(1), 134–139.
8. Dunn, M. F., Niks, D., Ngo, H., Barends, T. R. M. and Schlichting, I. (2008). Tryptophan synthase: the workings of a channeling nanomachine. *Trends in Biochemical Sciences* , 33(6), 254–264.
9. Schmitt, E., Panvert, M., Blanquet, S. and Mechulam, I. (2005). Structural basis for tRNA-dependent amidotransferase function. *Structure London England* 1993 13 (10) p. 1421-1433.
10. Endrizzi, J. A., Kim, H., Anderson, P. M. and Baldwin, E. P. (2004). Crystal structure of *Escherichia coli* cytidine triphosphate synthetase, a nucleotide-regulated glutamine amidotransferase/ATP-dependent amidoligase fusion protein and homologue of anticancer and antiparasitic drug targets. *Biochemistry.* 43 (21):6447-63.

11. Farina, A., Faiola, F., and Martinez, E. (2004). Reconstitution of an E box-binding Myc:Max complex with recombinant full-length proteins expressed in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 34(2), 215–222.
12. Freier, D., Mothershed, C. P., and Wiegel, J. (1988). Characterization of *Clostridium thermocellum* JW20. *Applied and Environmental Microbiology*, 54(1), 204–211.
13. Feng, L., Sheppard, K., Tumbula-Hansen D. and Söll D. (2005) Gln-tRNA^{Gln} formation from Glu-tRNA^{Gln} requires cooperation of an asparaginase and a Glu-tRNA^{Gln} kinase. *J Biol Chem*. 280(9):8150-5.
14. Formosa, T., Barry, J., Alberts, B. M. and Greenblatt, J. (1991). Using protein affinity chromatography to probe structure of protein machines. *Methods Enzymol*. 208:24-45.
15. Giegé, P., Heazlewood, J. L., Roessner-Tunali, U., Millar, A. H., Fernie, A. R., Leaver, C. J., & Sweetlove, L. J. (2003). Enzymes of glycolysis are functionally associated with the mitochondrion in *Arabidopsis* cells. *Plant Cell*, 15(9), 2140–2151.
16. Gough, S. P. and Kannangara, C. G. (1976) Synthesis of δ -aminolevulinic acid by isolated plastids 41: 183-190.
17. Huang, D. D., Wang W. Y., Gough, S. P. and Kannangara, C. G. (1984) Delta-aminolevulinic acid synthesizing enzymes need an RNA moiety for activity. *Science* 225:1482-1484.
18. Hummel, J. P., and Dreyer, W. J. (1962). Measurement of protein-binding phenomena by gel filtration. *Biochimica et Biophysica Acta*, 63, 530–532.
19. Jahn, D., Verkamp, E., and Söll, D (1992). Glutamyl-transfer RNA: a precursor of heme and chlorophyll biosynthesis. *Trends Biochem. Sci.* 17: 215-218.
20. Jørgensen, K., Rasmussen, A. V., Morant, M., Nielsen, A. H., Bjarnholt, N., Zagrobelny, M., Bak, S., et al. (2005). Metabolon formation and metabolic channeling in the biosynthesis of plant natural products. *Current Opinion in Plant Biology*, 8(3), 280–291.
21. Kannangara, C. G. and Gough, S. P. (1978) Biosynthesis of delta-aminolevulinate in greening barley leaves: glutamate 1-semialdehyde aminotransferase [chloroplast, etioplast, glutamate substrate, synthetic substrate. *Carlsberg Research Communications*. 43:185-194.
22. Kannangara, C. G., Gough, S. P., Bruyant, P., Hooper, J. K., Kahn, A. and von Wettstein, D. (1988). tRNA^{Glu} as a cofactor in δ -aminolevulinate biosynthesis: steps that regulate chlorophyll synthesis. *TIBS* 13: 139-143.

23. Lavinder, J. J., Hari, S. B., Sullivan, B. J., and Magliery, T. J. (2009). High-throughput thermal scanning: a general, rapid dye-binding thermal shift screen for protein engineering. *Journal of the American Chemical Society*, 131(11), 3794–3795.
24. Lindahl, P. A. (2004) Acetyl-coenzyme A synthase: the case for a Ni(p)(0)-based mechanism of catalysis. *J Biol Inorg Chem*. 9(5):516-24.
25. Lüer, C., Schauer, S., Virus, S., Schubert, W.-D., Heinz, D. W., Moser, J. and Jahn, D. (2007). Glutamate recognition and hydride transfer by *Escherichia coli* glutamyl-tRNA reductase. *FEBS* 274(17), 4609–4614.
26. Meskauskiene, R. and Apel, K. (2002). Interaction of FLU, a negative regulator of tetrapyrrole biosynthesis, with the glutamyl-tRNA reductase requires the tetratricopeptide repeat domain of FLU. *FEBS Letters*, 532(1-2), 27–30.
27. Møller, B. L. (2010) Dynamic Metabolons. *Science*, 330(6009), 1328-1329.
28. Mullins, L. S. and Raushel, F. M. (1999) Channeling of Ammonia through the Intermolecular Tunnel Contained within Carbamoyl Phosphate Synthetase. *J. Am. Soc.* 121: 3803-3804.
29. Ovádi, J. (1991) Physiological significance of metabolic channelling. *J Theor Biol.* 152(1):1-22.
30. Sarkar, F. H. and Gupta, S. L. (1984). Receptors for human gamma interferon: binding and crosslinking of ¹²⁵I-labeled recombinant human gamma interferon to receptors on WISH cells. *Proc Natl Acad Sci*, 81(16), 5160–5164.
31. Schön, A., Krupp, G., Gough SP., Kannangara C. G., Berry-Lowe, S. and Soy, D. (1986). The tRNA required in the first step of chlorophyll biosynthesis is a chloroplast glutamate tRNA. *Nature* 322: 281-286.
32. Srere, P. A. 1987. Complex of sequential metabolic enzymes. *Annu Rev Biochem* 56: 89-124.
33. Thoden, J. B., Holden, H. M., Wesenberg, G., Raushel, F. M. and Rayment I. (1997) Structure of carbamoyl phosphate synthetase: a journey of 96 Å from substrate to product. *Biochemistry*. 36(21):6305-16.
34. Thoden, J. B., Holden, H. M., Wesenberg, G., Raushel, F. M. and Rayment, I. (1997). Structure of carbamoyl phosphate synthetase: a journey of 96 Å from substrate to product. *Biochemistry*, 36(21), 6305–6316.
35. Wang, W. Y, Huang, D. D., Stachon, D., Gough, S. P. and Kannangara, C. G. (1984) Purification, Characterization, and Fractionation of the delta-

Aminolevulinic Acid Synthesizing Enzymes from Light-Grown *Chlamydomonas reinhardtii* Cells. *Plant Physiol* 74(3): 569-75.

36. Wang, L. Y., Brown, L., Elliott, M., and Elliott, T. (1997). Regulation of heme biosynthesis in *Salmonella typhimurium*: activity of glutamyl-tRNA reductase (HemA) is greatly elevated during heme limitation by a mechanism which increases abundance of the protein. *Journal Of Bacteriology*, 179(9), 2907–2914.
37. Weeks, A., Lund, L. and Raushel, F. M. (2006). Tunneling of intermediates in enzyme-catalyzed reaction. *Curr Opin Chem Biol.* 10 (5): 465-72
38. Weng, Z., Taylor, J. A., Turner, C. E., Brugge, J. S., and Seidel-Dugan, C. (1993). Detection of Src homology 3-binding proteins, including paxillin, in normal and v-Src-transformed Balb/c 3T3 cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 268(20), 14956–14963.
39. Winkel, B. S. J. (2004). Metabolic channeling in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 55(1), 85-107.
40. Zaric, B., Chami, M., Rémygy, H., Engel, A., Ballmer-Hofer, K., Winkler, F. K. and Kambach, C. (2005). Reconstitution of two recombinant LSm protein complexes reveals aspects of their architecture, assembly, and function. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(16), 16066–16075.

XI. ANEXO.

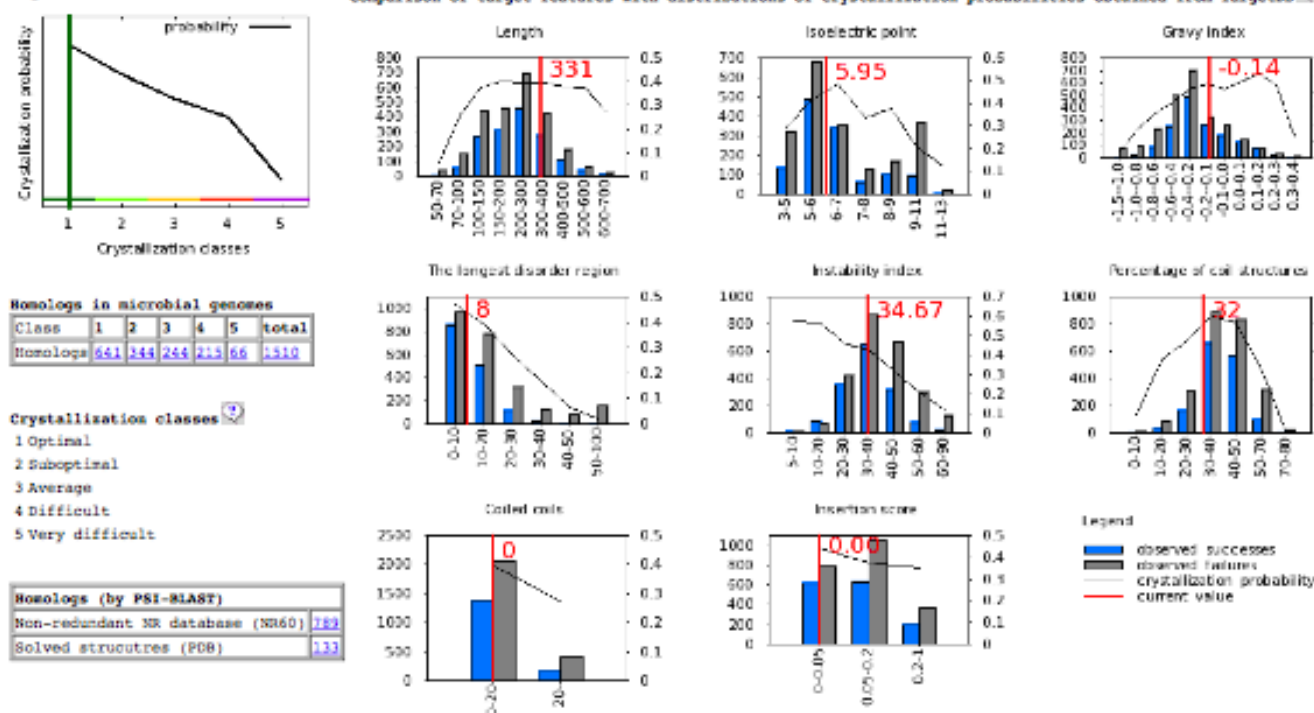


Target desc: gl|125715235|gb|ABN53727.1|
 Glutamy-tRNA reductase
 [Clostridium thermocellum ATCC 27405 X]

JCMM | J
 Godzil
 SI

Crystallization class: 1

Comparison of target features with distributions of crystallization probabilities obtained from TargetDB



Protein features	
Length	331
Molecular weight	38029
Gravy index	-0.14
Isoelectric point	5.95
Instability index	34.67
Predictions	
Transmembrane helices (number)	No
Signal peptides (length)	No
Longest disorder req.	8
Longest low complexity req.	17
Coiled coils	0
% disorder residues	2
% coil residues	32
% helix residues	51
% strand residues	18
Other	
Number of Cys residues	6
Number of Met residues	7
Number of Trp residues	2
Number of Tyr residues	20
Number of Phe residues	8
Epsilon 280	40800
Insertions score	0.00

```

1...*..10...*..20...*..30...*..40...*..50...*..60...*..70...*..80...*..90...*..100
MNVIMAGIDYTLAPIDIREKFSPTKSTLQAVYNDLAKXENIPGAVIVSTCNRTELYLSCEBGLYINPPPELLCDANPQYEEYSMMVRLTGVVIRHLCE
...*..110...*..120...*..130...*..140...*..150...*..160...*..170...*..180...*..190...*..200
LACGVKQIWDQDIITQVRNAIELAREMNASDSTLEVMFRIAVTSAKVYKTYLKLSTERSIAYSALKIISKENISKALVIGSIGRLNASILRNG
...*..210...*..220...*..230...*..240...*..250...*..260...*..270...*..280...*..290...*..300
YDPTTLRVRHGGDNIIPLGAKTIYVARYKLNKDCVVISATLSPETLEIDKIDRIKYPRLFIDLAVPRDIDPKIKSLDVELVGLDSIYAGEYDKNR
...*..310...*..320...*..330
TRQMTQVKKIIDKYIFDYTRWYERKRLVLT
    
```

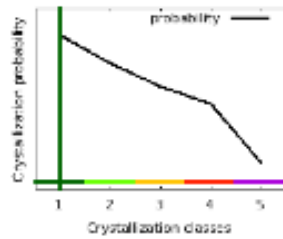
Legend

- LOOP loop secondary structure predicted by [PSIPRED](#)
- HELIX helix secondary structure predicted by [PSIPRED](#)
- STRAND strand secondary structure predicted by [PSIPRED](#)
- DISORDER disordered region predicted by [DISORDER2](#)
- LOW COMPLEXITY low complexity region predicted by [SEG](#)
- COILS coiled coils region predicted by [COILS](#)
- TRANSMEMBRANE HELICES transmembrane helices predicted by [TMHMM](#)
- SIGNAL PEPTIDES signal peptides predicted by [ESPP](#)

Download

- FASTA sequence text file with protein sequence in FASTA format
- Summary text file with a summary of protein features

Crystallization class: 1



Homologs in microbial genomes						
Class	1	2	3	4	5	total
Homologs	832	488	334	142	84	1880

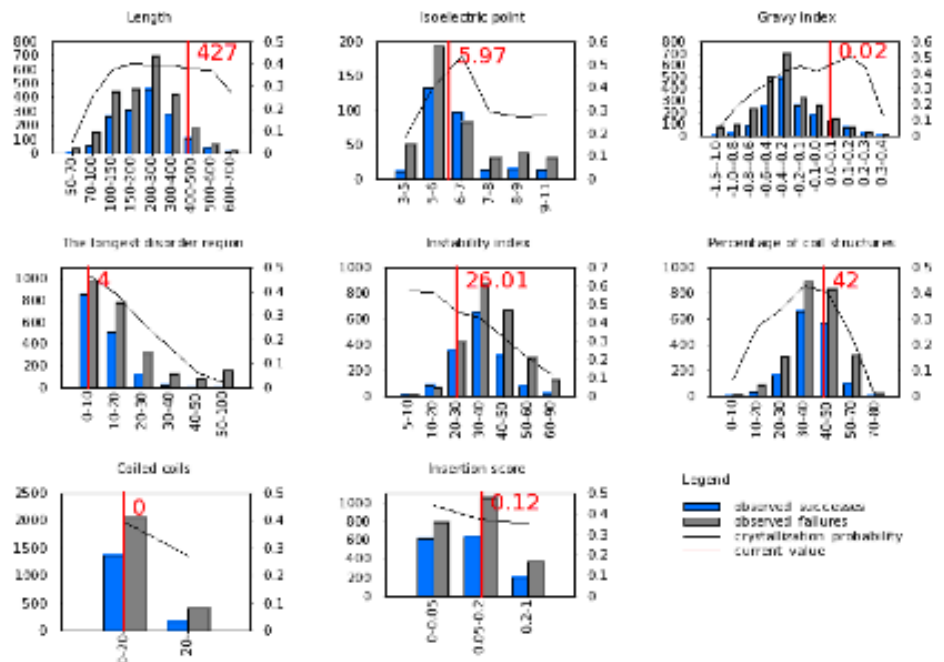
Crystallization classes

- 1 Optimal
- 2 Suboptimal
- 3 Average
- 4 Difficult
- 5 Very difficult

Homologs (by PSI-BLAST)

All known proteins (NR)	4001
Non-redundant NR database (NR60)	1011
Solved structures (PDB)	174

Comparison of target features with distributions of crystallization probabilities obtained from TargetDB



Protein features	
Length	427
Molecular weight	45937
Gravy index	0.02
Isoelectric point	5.97
Instability index	26.01
Predictions	
Transmembrane helices (number)	No
Signal peptides (length)	No
Longest disorder req.	4
Longest low complexity req.	0
Coiled coils	0
% disorder residues	2
% coil residues	42
% helix residues	42
% strand residues	17
Other	
Number of Cys residues	4
Number of Met residues	15
Number of Trp residues	1
Number of Tyr residues	16
Number of Phe residues	18
Epsilon 280	29340
Insertions score	0.12

```

1...*...10...*...20...*...30...*...40...*...50...*...60...*...70...*...80...*...90...*...100
MFLRSKLLPERAKVPIGVGVRPVRPFAVGAVGGVPPFKKAKGARIYDAGCNEYIDYVGGWGPNIIGRHSIPKVLAVSKTMDGLGFGAATELEIVQMAEL
...*...110...*...120...*...130...*...140...*...150...*...160...*...170...*...180...*...190...*...200
ITELVPSVEMVRMNSOTEAVMSAIRVARGYTKREKIKFAGCYHGRADSHLVKVGSGAMTNGIPNSGQVTAGAARDTLARYNDIDGVKLLPQXKRONI
...*...210...*...220...*...230...*...240...*...250...*...260...*...270...*...280...*...290...*...300
AAVIVEPVAANMOVVPPKINPLEELRKLCKRREALIPDEVITGPRLAIGGADQYFGVNADELVTYKTIIGGGPQVAVGGRRIMBCVAPVGDVVQAGTEL
...*...310...*...320...*...330...*...340...*...350...*...360...*...370...*...380...*...390...*...400
SGNPIAMRAGIATLRELYESGPIFENINRLOGRLSEGLGKIKYITVKAVALGSLVCFVNTSEEVNDYDGAVKSDYGLPGRIFPHLLKNGIYIAPSGREAMVY
...*...410...*...420...*...
SNANTRDSDIDETLEKVSRLFPARNSPPA
    
```

Legend	
LOOP	loop secondary structure predicted by PSIPRED
HELIX	helix secondary structure predicted by PSIPRED
STRAND	strand secondary structure predicted by PSIPRED
DISORDER	disordered region predicted by DISORDER2
LOW COMPLEXITY	low complexity region predicted by SEG
COILS	coiled coils region predicted by COILS
TRANSMEMBRANE HELICES	transmembrane helices predicted by TMHMM
SIGNAL PEPTIDES	signal peptides predicted by SPPSP
Download	
FASTA sequence	text file with protein sequence in FASTA format
Summary	text file with a summary of protein features

Anexo I. Selección de las proteínas blanco. La búsqueda se realizó con el servidor XtalPred. La grafica representa la clasificación en la cual se ubica el valor probabilístico obtenido para ambas enzimas