



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE MEDICINA**

**ESTUDIOS BIOFÍSICOS Y ESTRUCTURALES DEL  
COMPLEJO bacGlyRS-tRNA**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**LICENCIADO EN INVESTIGACIÓN  
BIOMÉDICA BÁSICA**

**P R E S E N T A:**

**EDUARDO CAMPOS CHÁVEZ**

**Facultad de Medicina**



**DIRECTOR DE TESIS:  
DR. ALFREDO TORRES LARIOS**

**Ciudad Universitaria, CD. MX. 2020**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

# 1. ÍNDICE DE CONTENIDO

1. ÍNDICE DE CONTENIDO .....	2
2. ÍNDICE DE FIGURAS.....	3
3. ÍNDICE DE TABLAS.....	4
4. RESUMEN.....	5
5. ABREVIATURAS .....	6
6. INTRODUCCIÓN.....	8
6.1 Importancia de las aminoacil-tRNA sintetasas.....	8
6.2 La bacGlyRS como una incógnita en la filogenia.....	8
6.3 Análisis estructural de la $\beta$ -bacGlyRS. ....	9
7. HIPÓTESIS .....	14
8. OBJETIVOS .....	15
9. MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
9.1 El sistema T7 RNA Pol para la sobreexpresión de tRNA-Gly. ....	16
9.2 Purificación de tRNA por el método de hibridación.....	18
9.3 Sobreexpresión y purificación de la bacGlyRS. ....	19
9.4 Ensayos de aminoacilación por la bacGlyRS usando una metodología espectrofotométrica. ....	21
9.5 Desplazamiento térmico por fluorimetría diferencial de barrido. ....	22
9.6 Interferometría de biocapa. ....	22
9.7 Experimentos de cocrystalización de la bacGlyRS y tRNA.....	23
9.8 Microscopía electrónica de partícula única por tinción negativa. ....	24
9.8.1 Preparación de las muestras biológicas.....	24
9.8.2 Fijación y tinción negativa con formato de uranilo. ....	25
9.8.3 Colecta y procesamiento de datos. ....	26
10. RESULTADOS .....	27
10.1 Producción de tRNA por el sistema T7 RNA Pol. ....	27
10.2 Evaluación de la termoestabilidad de la subunidad $\beta$ de la bacGlyRS de <i>T. daxensis</i> tras su unión al tRNA cognado. ....	30
10.3 Caracterización de la unión del tRNA a la subunidad $\beta$ de la bacGlyRS de <i>T. daxensis</i> por interferometría de biocapa. ....	32
10.4 Cocrystalización de la bacGlyRS con su tRNA cognado. ....	34
10.5 Microscopía electrónica de partícula única por tinción negativa. ....	35
11. DISCUSIÓN .....	37

11.1	Producción de tRNA por el sistema T7 RNA Pol. ....	37
11.2	Evaluación de la termoestabilidad de la subunidad $\beta$ de la bacGlyRS de <i>T. daxensis</i> tras su unión al tRNA cognado. ....	38
11.3	Caracterización de la unión del tRNA a la subunidad $\beta$ de la bacGlyRS de <i>T. daxensis</i> por interferometría de biocapa. ....	39
11.4	Cocrystalización de la bacGlyRS con su tRNA cognado .....	42
11.5	Microscopía electrónica de partícula única por tinción negativa del complejo bacGlyRS-tRNA.....	43
12.	CONCLUSIONES.....	44
12.1	El sistema T7 RNA Pol es eficiente para la producción de tRNAs con estructura secundaria estable.....	44
12.2	Tras la unión del tRNA a la bacGlyRS, el surco D <sup>1,2,4</sup> de la subunidad $\beta$ es ocupado.....	44
13.	PERSPECTIVAS.....	45
14.	ANEXO 1 (RESULTADOS ADICIONALES).....	46
15.	ANEXO 2 (FIGURAS SUPLEMENTARIAS) .....	47
16.	BIBLIOGRAFÍA .....	54

## 2. ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Comparación de las arquitecturas de la bacGlyRS y la eukGlyRS.. ....	9
<b>Figura 2.</b>	La $\beta$ -bacGlyRS puede dividirse en cuatro dominios .....	10
<b>Figura 3.</b>	Alineamiento estructural entre el D1 de la $\beta$ -bacGlyRS y una porción de la ArgRS. ....	11
<b>Figura 4.</b>	Alineamiento estructural entre el D4 de la $\beta$ -bacGlyRS y una porción de la CCA-adding enzyme.....	12
<b>Figura 5.</b>	El surco D <sup>1,2,4</sup> .....	13
<b>Figura 6.</b>	Diagrama representando los plásmidos diseñados para la sobreexpresión de tRNA .....	16
<b>Figura 7.</b>	Representación de la estructura secundaria de los transcritos primarios.....	17
<b>Figura 8.</b>	Diagrama representando los plásmidos diseñados para la sobreexpresión de la bacGlyRS.....	20
<b>Figura 9.</b>	El tRNA <sup>Gly</sup> puede purificarse por técnicas cromatográficas.....	27

<b>Figura 10.</b> El tRNA purificado logra hibridar con una secuencia de DNA diseñada para ser complementaria al tRNA <sup>Gly-GCC</sup> de <i>T. daxensis</i> .....	28
<b>Figura 11.</b> Un ensayo espectrofotométrico para medir la actividad aminoacil-tRNA sintetasa de la bacGlyRS .....	29
<b>Figura 12.</b> Curvas de fluorometría diferencial de barrido mostrando el desplazamiento de la T <sub>m</sub> de desnaturalización entre la subunidad β por sí sola y en presencia de tRNA.....	30
<b>Figura 13.</b> Histogramas comparativos de las T <sub>m</sub> de desnaturalización promedio del complejo; obtenidas por fluorometría diferencial de barrido en diferentes condiciones de pH .....	31
<b>Figura 14.</b> Ensayo de cinética de unión por interferometría de biocapa.....	33
<b>Figura 15.</b> Reconstrucción tridimensional de partículas de la bacGlyRS a partir de datos de microscopía electrónica de partícula única por tinción negativa .....	36
<b>Figura 16.</b> Comportamiento bifásico en la cinética de unión entre la β-bacGlyRS y el tRNA..	41
<b>Figura 17.</b> Ejemplo de micrografía del complejo bacGlyRS-tRNA por criomicroscopía electrónica.....	46

### 3. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Pasos y parámetros usados en los experimentos de interferometría de biocapa .....	23
Tabla 2. Algunos parámetros sobre los datos colectados por TEM .....	26
Tabla 3. Parámetros obtenidos a partir de un ajuste a un modelo 2:1 de los trazos del ensayo de cinética de unión .....	33
Tabla 4. Condiciones principales en las que se generaron cristales macromoleculares con ambos elementos del complejo presentes.....	35

## 4. RESUMEN

Las aminoacil tRNA sintetetasas (aaRSs) son enzimas ancestrales que participan en el proceso de traducción. Éstas reconocen de manera análoga a sus tRNAs cognados dependiendo de su clase (I o II). Sin embargo, en 2019 se determinó la estructura tridimensional de la glicil-tRNA sintetasa bacteriana (bacGlyRS); y la disposición de sus dominios indica que la orientación general del tRNA podría ser muy diferente a la de todos los complejos reportados hasta ahora. Esta posibilidad se suma al hecho de que esta enzima, que se encuentra en la mayoría de las bacterias y en cloroplastos, representa a un miembro atípico de las aaRSs. Su caracterización podría dar pistas sobre el origen y la evolución de estas enzimas. Asimismo, existe otro ancestro canónico de la GlyRS, no relacionado con la bacGlyRS, que está presente en arquea, eukarya y algunas bacterias. La obtención de información estructural y biofísica acerca del complejo bacGlyRS-tRNA es clave para dar luz sobre este problema. En este trabajo se introduce, por una parte, una manera novedosa de producción *in vivo* de tRNA. Este es sobreexpresado en un sistema análogo al utilizado para la producción de proteínas recombinantes en *E. coli*. Esto permite trascender problemas de costos, producción limitada y replegamiento de la molécula; comunes a la utilización de sistemas de transcripción *in vitro*. La nueva manera de producción de tRNA resultó fundamental para la realización de estudios del complejo. Por otra parte, un análisis de la estructura de la bacGlyRS propone que existen al menos dos sitios de unión al tRNA; correspondientes a un sitio de reconocimiento del anticodón y a otro sitio que se une al brazo aceptor y/o al brazo T. La medición de la interacción de la bacGlyRS con tRNA<sup>Gly</sup> por interferometría de biocapa mostró que la afinidad global del complejo se encuentra dentro del rango micromolar; como ha sido reportado para otras sintetetasas. También, apunta a que las velocidades de unión y disociación del tRNA<sup>Gly</sup> son rápidas. Estudios de microscopía electrónica de transmisión (TEM) del complejo por tinción negativa, muestran que la estructura de la proteína en solución corresponde a la obtenida por cristalografía de rayos X y que es posible mantener un complejo putativo estable en condiciones de ausencia de sal monovalente. El análisis de los datos arroja que el tRNA interacciona de manera general en el sitio esperado, aunque no es posible definir aún la orientación de éste. Este trabajo representa el establecimiento de bases sólidas para la continuación de los estudios propuestos.

## 5. ABREVIATURAS

**aaRSs:** aminoacil-tRNA sintetetasas

**ATP:** Adenosín trifosfato; trifosfato de adenosina

**bacGlyRS:** Glicil-tRNA sintetasa de origen bacteriano

**bacGlyRS<sup>apo</sup>:** Glicil-tRNA sintetasa de origen bacteriano sin tRNA unido

**BLI:** Interferometría de biocapa

**DEPC:** Dietil pirocarbonato; pirocarbonato de dietilo

**DNA:** Ácido desoxirribonucleico

**DO<sub>600nm</sub>:** Densidad óptica a 600 nanómetros

**DTT:** Ditiotreitól

**EDTA:** Ácido etilendiaminotetraacético

**eukGlyRS:** Glicil-tRNA sintetasa de origen eucarionte

**IMAC:** Cromatografía de afinidad a un ion metálico inmovilizado

**IPTG:** Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido

**K<sub>D</sub>:** Constante de disociación

**k<sub>off</sub>:** Tasa de disociación

**k<sub>on</sub>:** Tasa de asociación

**LB:** Medio de cultivo Lysogeny Broth

**MWCO:** Punto de corte de peso molecular

**Ori\_pUC:** Origen de replicación pUC

**P\_rhaBAD:** Promotor inducible por L-ramnosa

**P\_T7:** Promotor de la T7 RNA Pol

**PDB:** Protein Data Bank

**RCF:** Fuerza centrífuga relativa

**RNA:** Ácido ribonucleico

**TB:** Medio de cultivo Terrific Broth

**TEM:** Microscopía electrónica de transmisión

**Term\_T7:** Terminador para la T7 RNA Pol

**TEV:** Virus del grabado de la planta de tabaco

**T<sub>m</sub>:** Temperatura media de desnaturalización

**tRNA:** Ácido ribonucleico de transferencia

**tRNA<sup>Gly</sup>**: Ácido ribonucleico de transferencia isoceptor de glicina

**tRNA<sup>Gly-GCC</sup>**: Ácido ribonucleico de transferencia aceptor de glicina de anticodón GCC

**β-bacGlyRS**: Subunidad β de la glicil-tRNA sintetasa de origen bacteriano

## 6. INTRODUCCIÓN

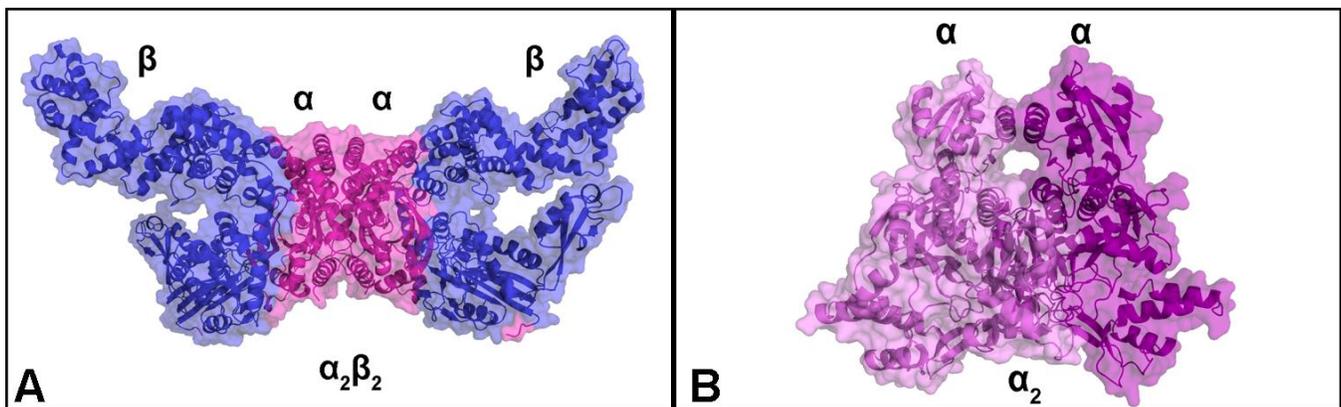
### 6.1 Importancia de las aminoacil-tRNA sintetasas.

La traducción es un proceso celular ubicuo en todos los dominios de la vida. Uno de los pasos más importantes en este proceso consiste en la unión de cada uno de los aminoácidos a sus RNAs de transferencia (tRNAs) correspondientes. Muestra de lo anterior se encuentra en el hecho de que uno de los mecanismos de verificación de fidelidad de la traducción se encuentra precisamente en la correcta aminoacilación de los tRNAs (Neidhardt, Parker y McKeever, 1975). Asimismo, existe una plétora de mecanismos de regulación que actúan en este nivel del proceso (Caillet et al., 2003; Sang, Ewalt y Kim, 2005). Son las aminoacil-tRNA sintetasas (aaRSs) las responsables de llevar a cabo esta reacción. Las aaRSs se encuentran entre las proteínas más antiguas y diversas. Existe una sintetasa específica para cada aminoácido, y cada una de ellas proviene generalmente de un ancestro común en los tres dominios de la vida (Chalioitis et al., 2017; O'Donoghue y Luthey-Schulten, 2003). Asimismo, todas ellas reconocen de manera análoga a sus tRNA cognados dependiendo de su clase (I o II) (Cavarelli y Moras, 1993).

### 6.2 La bacGlyRS como una incógnita en la filogenia.

Posiblemente una excepción al origen ancestral de las aaRSs sea la glicil-tRNA sintetasa bacteriana (bacGlyRS); ya que existe evidencia estructural que sugiere que ésta se encuentra estrechamente relacionada a la alanil-tRNA sintetasa y es un parálogo isofuncional lejano a su versión eucariótica (eukGlyRS) (Dimas Torres, 2019; Valencia-Sánchez et al., 2016). La bacGlyRS es una enzima heterotetramérica de subunidades  $\alpha_2\beta_2$  que se encuentra en la mayoría de las bacterias y en cloroplastos (Ostrem y Berg, 1974). Ésta presenta una enorme diferencia tanto a nivel de secuencia primaria, como de estructura tridimensional con la eukGlyRS homodimérica  $\alpha_2$  (Figura 1). La subunidad  $\alpha$  de la bacGlyRS contiene los elementos de unión a ATP y glicina, así como el plegamiento del dominio catalítico central (Eriani, Delarue, Poch, Gangloff y Moras, 1990). Además, se ha demostrado que la subunidad

$\alpha$  es capaz de realizar por sí sola la activación del aminoácido (Valencia-Sánchez et al., 2016). La subunidad  $\beta$  ( $\beta$ -bacGlyRS) se ve implicada en la unión al tRNA (Nagel, Cumberledge, Johnson, Petrella y Weber, 1984). El origen de la subunidad  $\beta$ , la forma en la que ésta reconoce el tRNA, y la relación que existe entre estos elementos con otras sintetasas siguen siendo preguntas abiertas. Responder a estas preguntas requiere de información estructural y biofísica acerca del complejo bacGlyRS-tRNA.

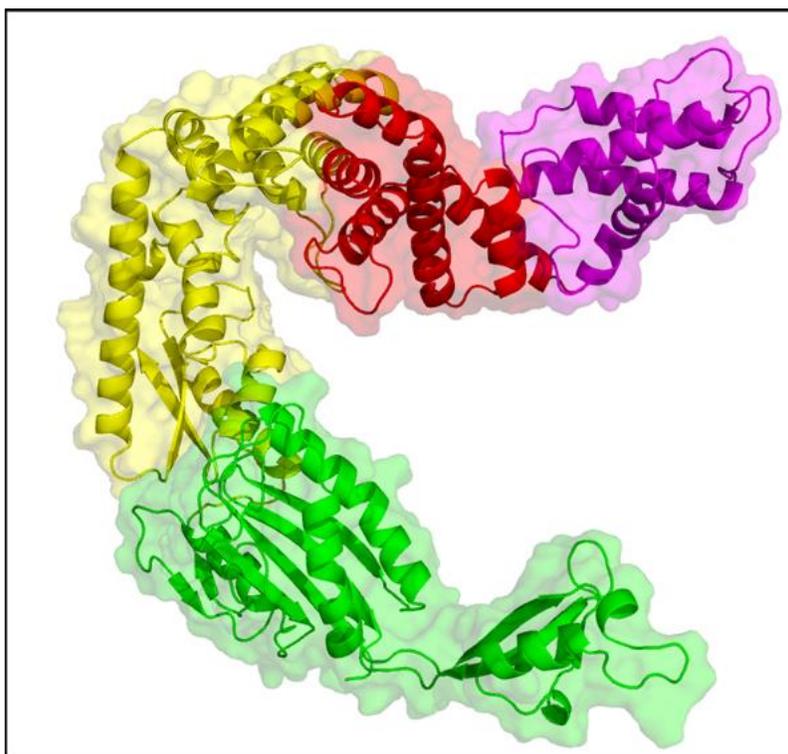


**Figura 1.** Comparación de las arquitecturas de la bacGlyRS y la eukGlyRS. **A)** Estructura tridimensional por cristalografía de rayos X de la bacGlyRS **B)** Estructura tridimensional por cristalografía de rayos X de la eukGlyRS.

### 6.3 Análisis estructural de la $\beta$ -bacGlyRS.

Trabajo previo en el grupo de investigación del Dr. Alfredo Torres Larios logró la caracterización de la estructura tridimensional de la bacGlyRS en su forma tetramérica por cristalografía de rayos X (Dimas Torres, 2019) (Figura 1, A). A partir de esta información, se realizó un análisis estructural de la  $\beta$ -bacGlyRS en búsqueda de elementos que apuntaran a posibles mecanismos de reconocimiento del tRNA. Las coordenadas atómicas del modelo de la  $\beta$ -bacGlyRS fueron alimentadas al algoritmo de SWORD (Postic, Ghouzam, Chebrek y Gelly, 2017) para elucidar una posible subdivisión de los dominios que conforman a esta subunidad. Se evaluaron todas las particiones que dio como resultado el programa. Para cada una de las particiones, se sometieron los dominios arrojados por el algoritmo a una búsqueda

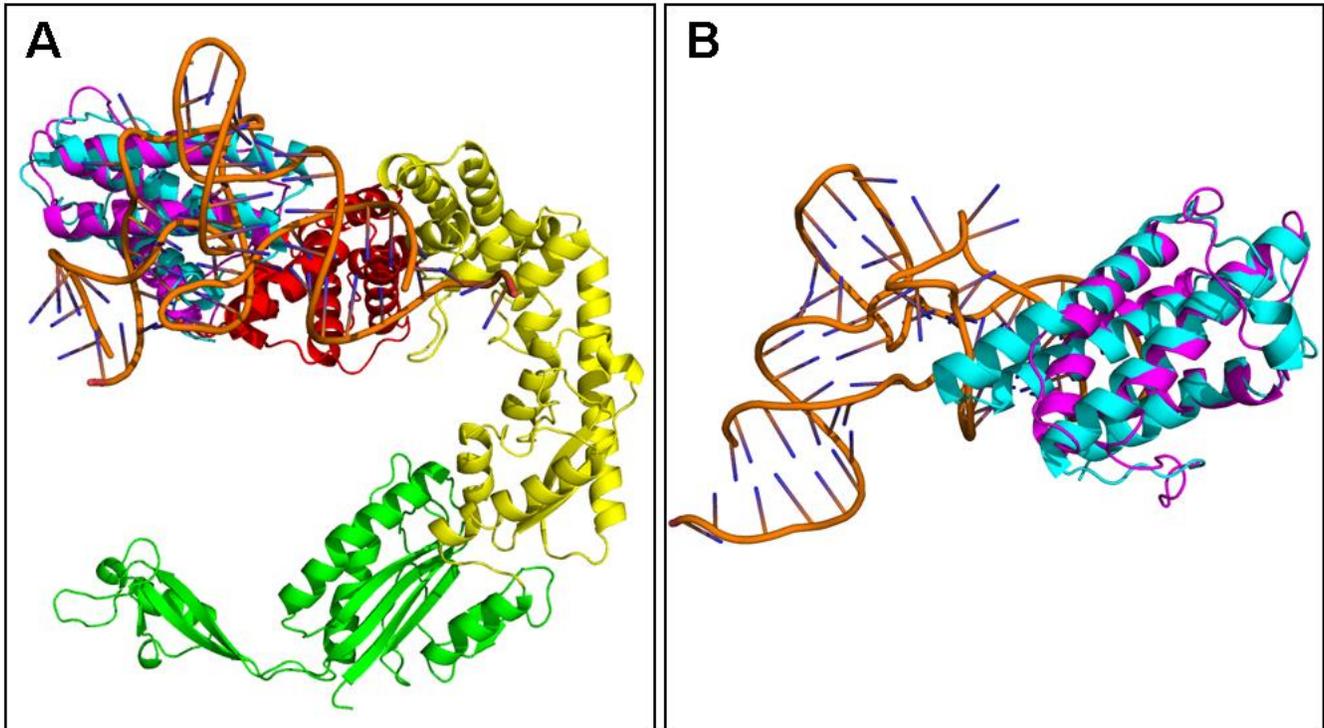
de similitud estructural contra las entradas del Protein Data Bank (PDB) por medio del servicio DALI (Holm y Elofsson, 2019). Resulta de especial interés una de las particiones; ésta divide a la  $\beta$ -bacGlyRS en cuatro dominios, denominados en este trabajo como D1, D2, D3 y D4 (Figura 2).



**Figura 2.** La  $\beta$ -bacGlyRS puede dividirse en cuatro dominios. Cada uno de los dominios se representa en un color distinto; D1 -magenta- D2 -rojo- D3 -amarillo- D4 -verde-.

Esta partición resultó de especial interés porque los dominios D1 y D4 mostraron similitudes estructurales con proteínas que unen tRNA. Asimismo, el PDB contiene a la fecha entradas de estas proteínas en complejo con tRNA. Esto podría arrojar pistas acerca del papel de estos dos dominios en el reconocimiento de su sustrato, así como el posible posicionamiento del tRNA en esta subunidad una vez formado el complejo. El D1 muestra similitud estructural con una porción de la arginil-tRNA sintetasa (ArgRS) de *Geobacillus stearothermophilus*. El PDB cuenta ya con una estructura de esta proteína en complejo con tRNA. El alineamiento

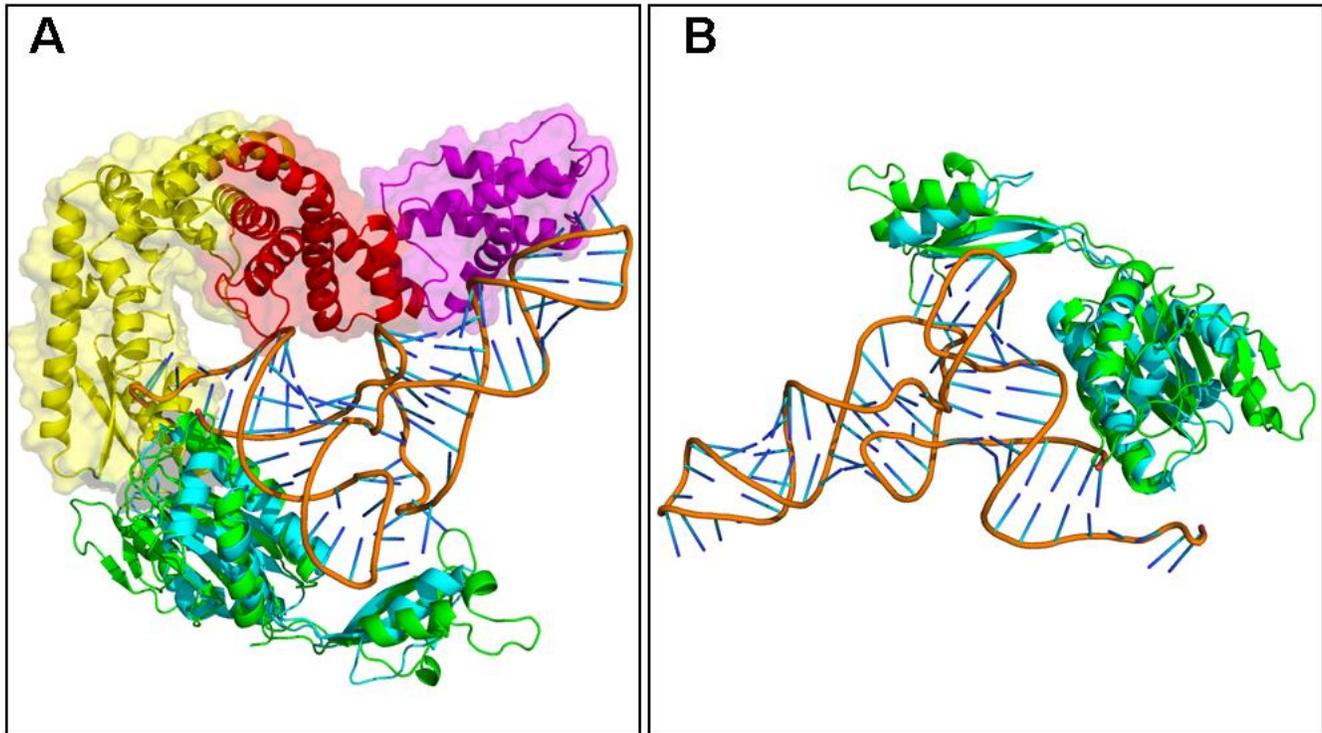
estructural de D1 con esta porción de la ArgRS parece indicar que este dominio puede estar involucrado en el reconocimiento del anticodón del tRNA (Figura 3).



**Figura 3.** Alineamiento estructural entre el D1 -magenta- de la  $\beta$ -bacGlyRS y una porción de la ArgRS de *Geobacillus stearothermophilus* -cian-. La cadena de tRNA que se muestra pertenece a la estructura de la ArgRS. **A)** Perspectiva global del alineamiento mostrando a todos los dominios de la  $\beta$ -bacGlyRS. **B)** Alineamiento desde la perspectiva exclusiva del D1. Estructura de la ArgRS tomada del PDB bajo la entrada 5YYN (“RCSB PDB - 5YYN: Crystal structures of E.coli arginyl-trna synthetase (argrs) in complex with substrate TRNA(Arg)”, s/f).

En el caso de D4, este dominio muestra similitudes estructurales con una porción de la CCA-adding enzyme de *Archaeoglobus fulgidus*. Esta proteína cuenta también con una entrada en el PDB en complejo con tRNA. La estructura mencionada muestra interacciones al menos con el brazo aceptor y quizás con el brazo T del tRNA. Esta pudiera ser una de las mejores pistas acerca del posicionamiento del tRNA en el complejo bacGlyRS-tRNA, ya que al hacer el alineamiento estructural entre el D4 y la CCA-adding enzyme, queda de manifiesto también

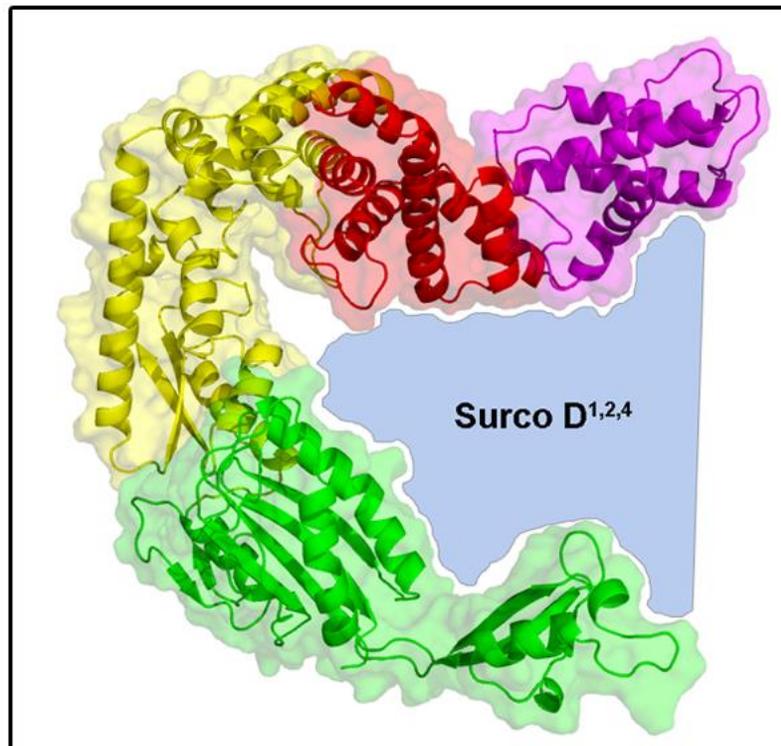
cómo el tRNA podría acomodarse en el surco formado -principalmente- por el espacio entre los dominios D1, D2 y D4 de la  $\beta$ -bacGlyRS (Figura 4). A este surco se le referirá en este trabajo como D<sup>1,2,4</sup> (Figura 5).



**Figura 4.** Alineamiento estructural entre el D4 -verde- de la  $\beta$ -bacGlyRS y una porción de la CCA-adding enzyme de *Archaeoglobus fulgidus* -cian-. La cadena de tRNA que se muestra pertenece a la estructura de la CCA-adding enzyme. **A)** Perspectiva global del alineamiento mostrando a todos los dominios de la  $\beta$ -bacGlyRS; revelando un posible posicionamiento para el tRNA en el complejo bacGlyRS-tRNA. **B)** Alineamiento desde la perspectiva exclusiva del D4. Estructura de la CCA-adding enzyme tomada del PDB bajo la entrada 1SZ1 (Xiong y Steitz, 2004).

Este análisis indicaría que existen al menos dos sitios de anclaje al tRNA en la bacGlyRS. Asimismo, apunta al surco D<sup>1,2,4</sup> como el sitio de anclaje general para el tRNA. Es entonces la principal intención de este trabajo el obtener información estructural y biofísica de la bacGlyRS

en complejo con su tRNA cognado, así como el análisis de las implicaciones que pueda arrojar esta información acerca del reconocimiento del tRNA por parte de la  $\beta$ -bacGlyRS.



**Figura 5.** El surco D<sup>1,2,4</sup>. Al surco formado -principalmente- por el espacio entre los dominios D1, D2 y D4 de la  $\beta$ -bacGlyRS se le refiere en este trabajo como surco D<sup>1,2,4</sup>.

## 7. HIPÓTESIS

Deben ocurrir cambios estructurales en el surco D<sup>1,2,4</sup> producto de la formación del complejo bacGlyRS-tRNA.

## **8. OBJETIVOS**

Caracterizar los parámetros cinéticos de unión del tRNA a la  $\beta$ -bacGlyRS. Esto aportará información acerca de los sitios de unión al sustrato.

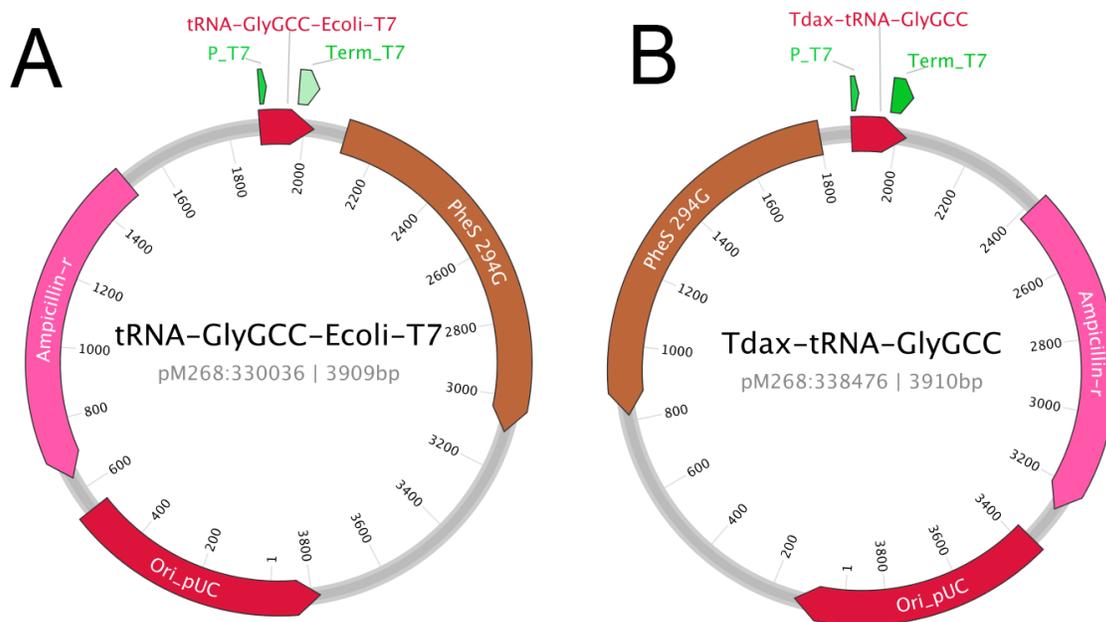
Obtener información estructural sobre el complejo bacGlyRS-tRNA para verificar si el surco D<sup>1,2,4</sup> juega algún rol en la formación del complejo bacGlyRS-tRNA.

## 9. MATERIALES Y MÉTODOS

### 9.1 El sistema T7 RNA Pol para la sobreexpresión de tRNA-Gly.

Dispusimos de un sistema de sobreexpresión de tRNA *in vivo* basado en el uso de la RNA Polimerasa del bacteriófago T7 (T7 RNA Pol) para producir el sustrato necesario para nuestros experimentos. Esta estrategia no ha sido reportada con anterioridad en la literatura.

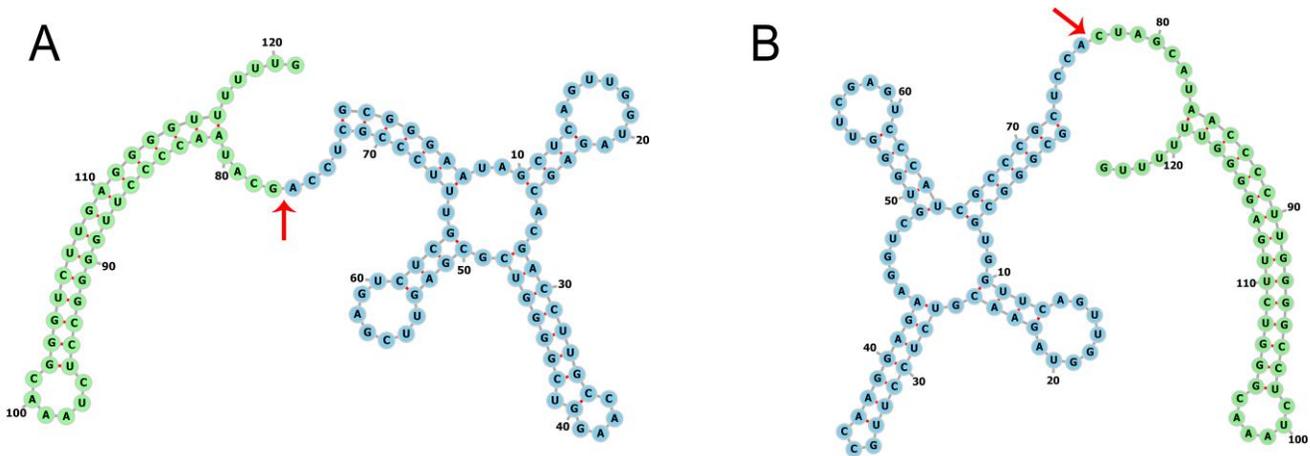
La metodología depende de que la sobreexpresión se realice en un huésped que produzca la T7 RNA Pol endógenamente. Subsecuentemente, esta polimerasa se encarga de la transcripción de una secuencia de DNA codificante para tRNA ubicada en un vector plasmídico. Se diseñaron y probaron dos plásmidos diferentes; estos difieren en la secuencia del tRNA que codifican (Figura 6). Se eligieron las secuencias de tRNA de *Escherichia coli* y de *Thermanaerotherix daxensis* correspondientes al anticodón GCC. Estos plásmidos fueron sintetizados por la empresa ATUM y expresados en la cepa BL21(DE3) de *Escherichia coli*.



**Figura 6.** Diagrama representando los plásmidos diseñados para la sobreexpresión de tRNA. **A)** Plásmido con la secuencia del tRNA de anticodón GCC de *Escherichia*

*coli*. **B)** Plásmido con la secuencia del tRNA de anticodón GCC de *Thermanaerotherix daxensis*. Adicional a la secuencia de tRNA; cuentan con un casete genético de resistencia a ampicilina para fines de selección. Asimismo, contiene una secuencia para contra-selección basada en una variante del gen pheS. Abreviaciones: -P\_T7- Promotor de la T7 RNA Pol, -Term\_T7- Terminador para la T7 RNA Pol, -Ori\_pUC- Origen de replicación pUC.

Una vez se transcribe el producto, la maquinaria de maduración de tRNA del organismo huésped se encarga de realizar las modificaciones necesarias para procesar el transcrito primario (Figura 7).



**Figura 7.** Representación de la estructura secundaria de los transcritos primarios. En color azul, los nucleótidos pertenecientes a la secuencia de tRNA y en verde aquellos del terminador para la T7 polimerasa. Una flecha roja indica la separación entre estos dos elementos. **A)** Transcrito primario que contiene la secuencia del tRNA GCC de *Escherichia coli*. **B)** Transcrito primario que contiene la secuencia del tRNA GCC de *Thermanaerotherix daxensis*.

Las células BL21(DE3) (New England BioLabs, C25271) transformadas con los plásmidos antes mencionados fueron seleccionadas y cultivadas en medio TB. La sobreexpresión de la T7 RNA Pol fue inducida a una  $DO_{600nm} = 0.6$  utilizando IPTG a una concentración de 1 mM. Las células son colectadas posteriormente por centrifugación a una RCF de 7480 x g después

de un periodo de 24 horas de expresión; para después realizar una extracción con fenol, aislando así el RNA soluble (von Ehrenstein, 1967; Zubay, 1962). El extracto de RNA soluble total es sometido entonces a cromatografía líquida de intercambio iónico en un sistema FPLC a pH 5.0 en medio Source Q; usando un buffer con Piperazina 20 mM y EDTA 250  $\mu$ M. El tRNA es eluido en un gradiente de 0 a 1 M de NaCl, y la fracción de interés se colecta entre 370 mM a 470 mM de NaCl. La fracción anterior pasa luego por cromatografía líquida de interacción hidrofóbica. Esto, en medio Toyopearl Butyl 650M equilibrado a pH 4.5 en 3.5 M de sulfato de amonio, 50 mM acetato de sodio, 5 mM MgCl<sub>2</sub> y 0.5 mM EDTA. El tRNA eluye en un gradiente escalonado de 3.5 M a 1.75 M de sulfato de amonio. Las fracciones finales fueron intercambiadas en un buffer de almacenamiento -50 mM Tris pH 7.5, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>- y concentradas a ~60 mg/mL por ultrafiltración. Posteriormente, la muestra era alicuotada y conservada a -20° C (Figura suplementaria 1).

## **9.2 Purificación de tRNA por el método de hibridación.**

En general, se siguió un protocolo reportado previamente en la literatura (Yokogawa, Kitamura, Nakamura, Ohno y Nishikawa, 2009) con algunas modificaciones. Se cargaron tubos de ultrafiltración Ultrafree-MC (0.22  $\mu$ m, Millipore UFC30GV0S) con 600  $\mu$ L de resina Streptavidin Sepharose HighPerformance (GE Healthcare). Para equilibrar la resina, se agregaron 300  $\mu$ L de una solución 10 mM de Tris-HCl pH 7.5 -tratada con DEPC-, y se mezcló con micropipeta para después remover el exceso por centrifugación a una RCF de 18,000  $\times$  g durante 10 segundos. Este proceso se repitió tres veces para asegurarse de que la resina se equilibrara al pH deseado.

Una vez equilibrada la resina, se añadieron 400  $\mu$ L de una solución 10  $\mu$ M del oligonucleótido de DNA -biotinilado en el extremo 3'- complementario a la secuencia del tRNA blanco. Se mezcló esta solución con micropipeta y se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente. Pasado el tiempo de incubación, se removió el sobrenadante por centrifugación a una RCF de 18,000  $\times$  g durante 10 segundos. Se lavó la resina por resuspensión y centrifugación con una solución 10 mM de Tris-HCl pH 7.5 -tratada con DEPC- en un total de dos ocasiones. Después de remover el sobrenadante residual del lavado; se resuspendió la resina en las

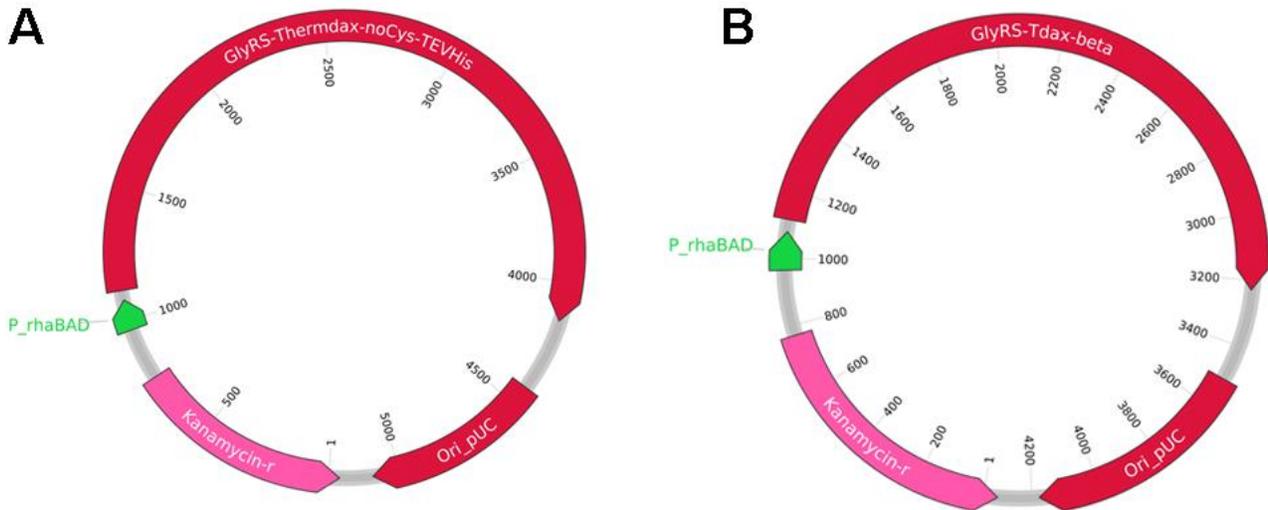
fracciones de RNA a purificar; previamente equilibradas en buffer de hibridación -20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1.8 M NaCl, 0.2 mM EDTA-. Esta mezcla se incubó a 65° C durante 10 min. para desnaturalizar al RNA y permitir su hibridación con el oligonucleótido de DNA. Pasado el tiempo de incubación, se permitió a la resina equilibrarse a temperatura ambiente.

Para deshacerse del RNA no adherido a la fase estacionaria, se lavó la resina por resuspensión y centrifugación a 4° C con 400 µL de la solución 10 mM de Tris-HCl pH 7.5. Lo anterior, hasta que el sobrenadante recuperado por centrifugación mostrara una absorbancia a 260nm < 0.01 u/ml. Se eluyó el RNA calentando la resina, previamente mezclada con 300 µL del buffer de almacenamiento deseado a 60° C durante 5 minutos. Posteriormente, se recuperó el RNA por centrifugación a una RCF de 18,000 × g durante 10 segundos.

### **9.3 Sobreexpresión y purificación de la bacGlyRS.**

Los plásmidos para la sobreexpresión de la bacGlyRS -αβ- y la β-bacGlyRS de *T. daxensis* fueron sintetizados por la empresa ATUM. La empresa optimizó el uso de codones a nivel de la secuencia de DNA para su expresión en *Escherichia coli*. La expresión de las proteínas codificadas en estos plásmidos está regulada por un promotor inducible por L-ramnosa -rhaBAD-. Estos plásmidos cuentan también con un casete genético de resistencia a kanamicina para fines de selección (Figura 8).

A la secuencia de la bacGlyRS -αβ- se le removieron todos los residuos de cisteínas y se le agregó una etiqueta de 6 histidinas en el extremo C terminal. Asimismo, se le añadió la secuencia de corte de la proteasa TEV previo a esta etiqueta para removerla de ser necesario. En cuanto a la secuencia de la β-bacGlyRS; se le agregó únicamente una etiqueta de polihistidinas en el extremo N terminal.



**Figura 8.** Diagrama representando los plásmidos diseñados para la sobreexpresión de la bacGlyRS  $\alpha\beta$ - y la  $\beta$ -bacGlyRS de *T. daxensis*. **A)** Plásmido con la secuencia la bacGlyRS  $\alpha\beta$ - de *T. daxensis* **B)** Plásmido con la secuencia la  $\beta$ -bacGlyRS de *T. daxensis*. Abreviaciones: -P\_rhaBAD- Promotor inducible por L-ramnosa, -Ori\_pUC- Origen de replicación pUC.

Las células BL21(DE3) (New England BioLabs C25271) transformadas con los plásmidos de sobreexpresión de la bacGlyRS  $\alpha\beta$ - y la  $\beta$ -bacGlyRS de *T. daxensis* fueron seleccionadas y cultivadas en medio LB. La sobreexpresión fue inducida a una  $DO_{600nm} = 0.6$  utilizando L-ramnosa a una concentración final de 3 mM. Las células eran colectadas por centrifugación a una RCF de  $7,480 \times g$  después de un periodo de 4 horas de expresión.

La purificación de estas proteínas se realizaba por cromatografía de afinidad a un ion metálico inmovilizado (IMAC) en un sistema de FPLC. La lisis celular se lograba por sonicación a una frecuencia de 20 kHz y una corrección de amplitud del 40% (Sonics VC 505) durante un tiempo acumulado de 15 minutos en pulsos de 15 segundos seguidos de 15 segundos de pausa. Este proceso se llevaba a cabo en buffer de unión  $-100$  mM fosfatos de potasio pH 7.2, KCl 300 mM, imidazol 20 mM-. Se ocupaban 10 mL de buffer por cada litro de cultivo. En todo momento se controlaba que la temperatura de la muestra no excediera los  $10^{\circ} C$ . Una vez terminado este proceso; la muestra era centrifugada a una RCF de  $20,000 \times g$  durante 30 minutos. El sobrenadante era sometido entonces a IMAC a pH 7.2 en medio HisTrap<sup>TM</sup> FF

crude de GE Healthcare, con un volumen de fase estacionaria de 5 mL. Seguido a la carga de la muestra, se lavaba la columna con buffer de unión hasta restablecer los niveles de absorbancia mostrados antes de la carga. La proteína retenida era eluida equilibrando la columna con buffer de elución –100 mM fosfatos de potasio pH 7.2, KCl 300 mM, imidazol 500 mM-. Exclusivamente en el caso de la bacGlyRS - $\alpha\beta$ -, esta fracción era posteriormente sometida a un tratamiento por calor a 72° C durante 30 minutos. La muestra entonces era centrifugada a 18,000 x g y se colectaba sólo el sobrenadante. Las fracciones finales eran intercambiadas a un buffer de almacenamiento -50 mM Tris pH 7.5, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>- y concentradas a 50 mg/mL por ultrafiltración. Posteriormente se conservaban las muestras a 4° C. Después de cada purificación se verificaba la integridad de las proteínas por SDS-PAGE -10%-.

#### **9.4 Ensayos de aminoacilación por la bacGlyRS usando una metodología espectrofotométrica.**

Estos experimentos fueron realizados en buffer HEPES 30 mM pH 7.5, 140 mM NaCl, 30 mM KCl, y 40 mM MgCl<sub>2</sub>. Se añadieron los siguientes componentes a modo de conseguir las concentraciones finales mencionadas: DTT 1 mM, ATP 200  $\mu$ M, pirofosfatasa inorgánica (SIGMA-Aldrich) a 2 u/mL, glicina 1 mM, bacGlyRS a 40  $\mu$ g/mL y tRNA<sup>Gly-GCC</sup> 8  $\mu$ M -en ese orden-. Para cada uno de los controles planteados, no se agregaba alguno de los componentes -bacGlyRS, tRNA o ATP como condición base - sin alterar las concentraciones del resto de la formulación. Las reacciones se prepararon en un volumen total de 50  $\mu$ L en placas de fondo plano de 96 pocillos (Costar<sup>®</sup> 96-Well Standard Microplates) y fueron incubadas por 30 minutos a 37° C. Las reacciones eran paradas posteriormente al adicionar 100  $\mu$ L de la solución de verde de malaquita (Sigma-Aldrich) y se dejaban desarrollar por 30 minutos más a temperatura ambiente. Las absorbancias eran medidas posteriormente a 620 nm usando un equipo lector de microplacas basado en monocromadores (Biotek Synergy-HT).

## **9.5 Desplazamiento térmico por fluorimetría diferencial de barrido.**

Para evaluar el desplazamiento térmico debido a la presencia de tRNA, se prepararon dos condiciones con cinco repeticiones de cada una. En una condición, a 1 mg de la  $\beta$ -bacGlyRS, se agregó tRNA en una relación estequiométrica 1:10 en buffer 50 mM Tris pH 7.5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 250  $\mu$ M EDTA. En la otra condición no se agregó tRNA. Se agregó posteriormente a ambas condiciones suficiente volumen del fluoróforo SYPRO Orange (Sigma-Aldrich) para conseguir una concentración final de 5 X en un volumen final de 10  $\mu$ L.

Para encontrar las condiciones de mayor termoestabilidad en presencia de la  $\beta$ -bacGlyRS y el tRNA, se usó la formulación de Solubility & Stability Screen™ (Hampton Research®). A 1 mg de la  $\beta$ -bacGlyRS, se agregó tRNA en una relación estequiométrica 1:10 y se diluyó esta mezcla en cada una de las condiciones del kit antes mencionado. Posteriormente, se agregó a ambas condiciones suficiente volumen del fluoróforo SYPRO Orange (Sigma-Aldrich) para conseguir una concentración final de 5 X en un volumen final de 10  $\mu$ L.

Las preparaciones antes mencionadas se colocaron en placas de 96 pocillos y fueron leídas en un gradiente de 25° C a 99° C con incrementos del 1% en modo rápido -40 minutos-. Esto es equivalente a incrementos de 1.8° C aproximadamente. La lectura se realizó en un termociclador StepOne (Applied Biosystems). Los datos fueron interpretados con el programa Protein Thermal Shift Software v1.3 (Thermo Fisher Scientific).

## **9.6 Interferometría de biocapa.**

Los experimentos de interferometría de biocapa aquí descritos se realizaron en un equipo Octet RED96 de ocho canales (ForteBio). En términos generales, se siguió un protocolo estándar para esta metodología (Tobias, 2013). En todos los experimentos, se utilizaron biosensores Ni-NTA (NTA) (ForteBio); aprovechando así la etiqueta de polihistidinas de la proteína. La concentración utilizada para inmovilizar la  $\beta$ -bacGlyRS al biosensor fue de 50  $\mu$ g/mL. Nunca se utilizó algún tipo de control de temperatura. A continuación, se detallan los

pasos y parámetros usados en todos los experimentos descritos próximamente (Tabla 1). Cabe destacar que las líneas base y el paso de disociación se realizaban en pocillos diferentes.

<b>Tabla 1.</b> Pasos y parámetros usados en los experimentos de interferometría de biocapa.			
Paso	Procedimiento	Tiempo (s)	Agitación (rpm)
1	Línea base	60	1000
2	Carga de ligando	250	1000
3	Línea base (2)	800	1000
4	Fase de asociación	200	1000
5	Fase de disociación	200	1000

Para encontrar las condiciones que lograban maximizar la asociación del tRNA a la  $\beta$ -bacGlyRS se iteró en un inicio sobre una solución amortiguada sencilla -HEPES pH 7.5-. Se probaron diferentes sales de magnesio -acetato, nitrato, cloruro, sulfato y nitrato de magnesio- en un rango de concentraciones entre 0 y 200 mM. Se experimentó también con el efecto de varias sales monovalentes -cloruros y nitratos de sodio y potasio, así como acetato de amonio-. La espermina, espermidina y glicina se probaron también en un rango de concentraciones entre 5 y 50 mM. El ensayo de cinética de unión se realizó en buffer HEPES pH 7.5 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 50mM, acetato de amonio 5 mM y espermina 5 mM. Las concentraciones de tRNA probadas en este ensayo fueron 0, 0.5, 1, 3, 10, 25, 50 y 100  $\mu$ M. El análisis de los datos se hizo en el programa Octet<sup>®</sup> Data Analysis HT (ForteBio).

## 9.7 Experimentos de cocrystalización de la bacGlyRS y tRNA.

Los experimentos de cocrystalización se llevaron a cabo por el método de difusión de vapor en la modalidad de gota sedante. La búsqueda de condiciones de cristalización iniciales fue realizada usando distintos kits de cristalización de las marcas Hampton Research<sup>®</sup>, Jena Bioscience<sup>®</sup> y Molecular Dimensions<sup>®</sup>. Los kits utilizados fueron: Crystal Screen HT<sup>™</sup>, Index

HT™, Natrix HT™, PEGRx HT™, SaltRx HT™, NucPro™ y MIDAS™. Para esta serie de experimentos, se mezclaba la bacGlyRS y el tRNA en una relación estequiométrica 1:1 ó 1:1.5 a una concentración final de la proteína de 30 µg/µL. La mezcla de estos elementos se hacía en buffer de almacenamiento -50 mM Tris pH 7.5, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>-. En las placas de cristalización (Swissci, HR-125); los volúmenes de reservorio y de gota eran de 40 µL y 3 µL, respectivamente. En el caso de la gota, se colocaban 1.5 µL de muestra y 1.5 µL de la respectiva solución de cristalización. Para sellar la placa, se utilizaba una película transparente autoadherente (ClearSeal Film, HR4-521). Todas las condiciones aquí descritas se desarrollaron a temperatura ambiente; aunque también se realizaron ensayos a 30° C. Las placas eran revisadas diariamente.

Al encontrar una condición de cristalización, se iteraba sobre ella en búsqueda de aditivos que mejoraran el aspecto morfológico de los cristales. Estos experimentos se hacían añadiendo a la condición de cristalización seleccionada, cada una de las soluciones presentes en el kit Additive Screen™ de Hampton Research® a una concentración final del 10%. Cuando se encontraba un aditivo que mejorara el aspecto morfológico de los cristales, se repetía una vez más el proceso. Una vez realizado este procedimiento, se utilizaban algunos cristales para ser probados, y otros para hacer cross-seeding en todas las condiciones de los kits mencionados en el párrafo anterior. Para preparar las semillas usadas en la metodología de cross-seeding, se resuspendían entre 4 o 5 gotas con cristales en 50 µL de licor madre para transferirlos a un tubo del kit Seed Bead™ de Hampton Research®. Se agitó por vortexeo este tubo durante 2 minutos y luego se realizaron varias diluciones de estas semillas -1/100, 1/10,000 y 1/1,000,000-. Cada una de estas diluciones eran probadas en los tres pocillos proveídos para cada condición en las placas de cristalización.

## **9.8 Microscopía electrónica de partícula única por tinción negativa.**

### **9.8.1 Preparación de las muestras biológicas.**

Para armar el complejo; se mezclaban bacGlyRS y tRNA en una relación estequiométrica 1:10 en buffer HEPES pH 7.5 50 mM, NaCl 200 mM y MgCl<sub>2</sub> 10 mM. Se alcanzaba una concentración final de la proteína de 1 mg/mL después de la mezcla. Esta muestra era

calentada posteriormente por 5 minutos a 60° C. Acto seguido, se dializaba por 12 horas en una membrana con MWCO de 10 kDa a temperatura ambiente. La diálisis se hizo en buffer HEPES pH 7.5 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 10mM, acetato de amonio 5 mM y espermina 5 mM. Una vez dializada la muestra, se realizaban al menos cinco rondas de ultrafiltración y resuspensión en tubos Amicon® (Merck Millipore) de 100 kDa de MWCO. Esto, para deshacerse del exceso de tRNA. Una vez concluido este proceso, se diluía la muestra a modo que la proteína quedara a una concentración de 15 ng/μL. En el caso de la condición de la bacGlyRS<sup>apo</sup>, únicamente era necesario diluir la muestra a una concentración final de 15 ng/μL. Esto, en buffer HEPES pH 7.5 50 mM, NaCl 200 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM.

### **9.8.2 Fijación y tinción negativa con formato de uranilo.**

Los grids (Electron Microscopy Sciences, CF200-Cu) utilizados en estos experimentos eran tratados previamente en un limpiador por plasma (Gatan Solarus 950) a una potencia de 25W durante 10 segundos.

Para las muestras de la bacGlyRS<sup>apo</sup>; la fijación y tinción se describe a continuación. En un rack para micropipetas, se colocaba un pedazo de PARAFILM® que cubría los hoyos y formaba pequeñas depresiones. En una de las depresiones se colocaban 30 μL de la muestra, y en otras dos, 30 μL de buffer. Se colocaba entonces el grid sobre la gota con la muestra y se le dejaba flotar ahí durante 5 minutos. Siempre se colocaba el grid con la cara cubierta de carbono viendo hacia la gota. Pasado este tiempo de incubación, se traspasaba el grid a una de las gotas con buffer y se le incubaba por 1 minuto. Se repitió este proceso una vez más pasándolo a la otra gota con buffer. Mientras pasa este último tiempo de incubación, se colocan dos gotas de 30 μL de la solución de tinción -Formato de uranilo 1 %- en otras depresiones. Pasado el tiempo de incubación, se remueve el exceso de líquido del grid tocando levemente la orilla de éste con un papel filtro. Posteriormente, se pasa el grid a la gota con el formato de uranilo durante 30 segundos. Después, se pasa el grid a la siguiente gota de formato de uranilo y se le incuba por otros 30 segundos. Al final, se vuelve a remover el exceso de líquido usando papel filtro. El grid se deja secar a temperatura ambiente durante aproximadamente 3 minutos terminando el proceso.

En el caso de los grids del complejo, se colocaban 3  $\mu\text{L}$  de la muestra sobre la cara cubierta de carbono. Se incubaba así el grid durante 5 minutos para después remover el exceso de muestra usando un papel filtro como se describió anteriormente. Inmediatamente después, se agregaban 3  $\mu\text{L}$  de la solución 1% de formato de uranilo sobre el grid, y se le incubaba durante 30 segundos. Terminado ese último paso, se volvía a remover el exceso de líquido usando un papel filtro. El grid se dejaba secar entonces a temperatura ambiente durante 3 minutos aproximadamente.

### 9.8.3 Colecta y procesamiento de datos.

La colecta de datos se realizó en un microscopio JEOL 1400 operando a 120 kV; equipado con una cámara Gatan 4k x 4k Ultrascan CCD. Todas las imágenes fueron colectadas a una magnificación de X30k de manera automática por el programa Legikon. El procesamiento de los datos se realizó en el paquete de software Relion3 por el procedimiento detallado en un manual del software (Scheres, 2014). A continuación, se detallan algunos parámetros de los datos colectados (Tabla 2).

<b>Tabla 2.</b> Algunos parámetros sobre los datos colectados por TEM.			
<u>bacGlyRSapo</u>		<u>Complejo bacGlyRS-tRNA</u>	
Número de micrografías	225	Número de micrografías	197
Número de partículas	14,711	Número de partículas	14,045
Simetría <sup>a</sup>	C2	Simetría <sup>a</sup>	C2
Límite de resolución (Å)	21.85	Límite de resolución (Å)	20.56
Tamaño del píxel (Å)	3.8	Tamaño del píxel (Å)	3.8
Tamaño de caja (pixeles) <sup>b</sup>	92	Tamaño de caja (pixeles) <sup>b</sup>	92
Número de clases -2D-	7	Número de clases -2D-	4
Tamaño de la máscara (Å) <sup>c</sup>	340	Tamaño de la máscara (Å) <sup>c</sup>	340

<sup>a</sup> Este parámetro se refiere a la simetría impuesta para la generación de la reconstrucción tridimensional

<sup>b</sup> Tamaño designado al cuadro para el paso de extracción de partículas.

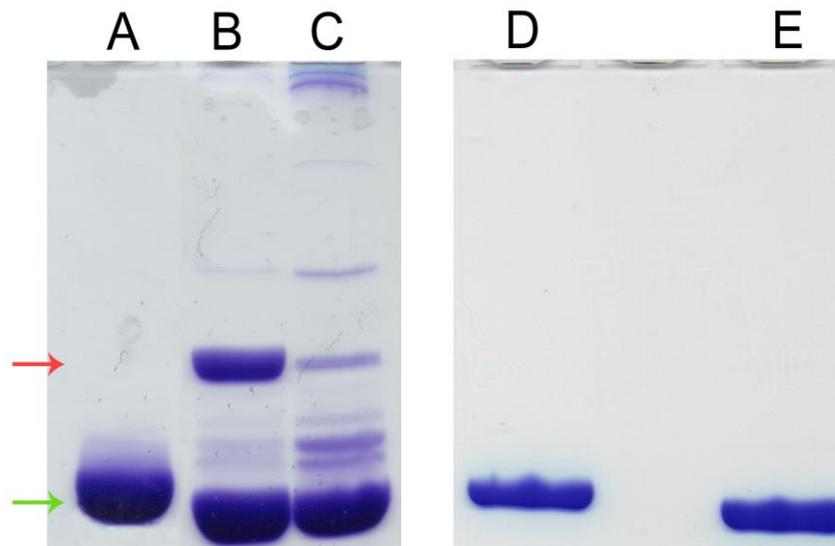
<sup>c</sup> Para la generación del modelo tridimensional

## 10. RESULTADOS

### 10.1 Producción de tRNA por el sistema T7 RNA Pol.

En primera instancia; se analizaron por UREA-PAGE los contenidos del extracto por fenol de RNA soluble total de las cepas transformadas con los plásmidos de sobreexpresión de tRNA. La cepa de sobreexpresión de tRNA-Gly GCC de *E. coli* genera un patrón electroforético con dos bandas de mayor expresión, a diferencia de la secuencia de *T. daxensis*, que sólo presenta una (Figura 9, B y C).

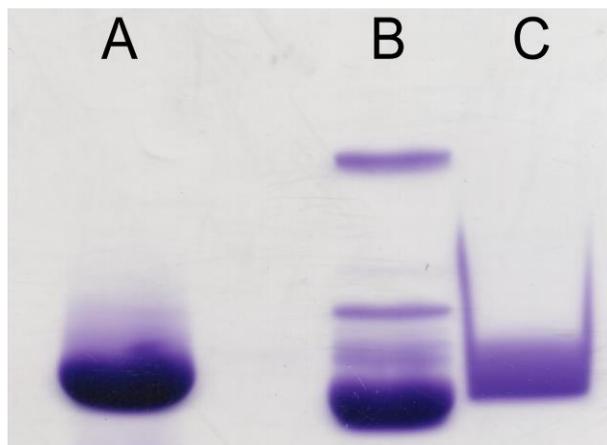
En el caso de la cepa de sobreexpresión del tRNA de *E. coli*, sólo era posible purificar el tRNA por medio de cromatografía de exclusión por tamaño o cortando la banda directamente de un gel UREA-PAGE, eluyendo posteriormente el producto de la matriz del gel. Otros protocolos de purificación mostraban contaminación con la segunda banda de sobreexpresión de mayor peso molecular. Mientras tanto, la cepa de *T. daxensis* permitió purificar el tRNA fácilmente por el protocolo detallado en la sección de materiales y métodos (Figura 9, E). Dada la practicidad de este tren de purificación, se trabajó exclusivamente con la secuencia de *T. daxensis*.



**Figura 9.** El tRNA<sup>Gly</sup> puede purificarse por técnicas cromatográficas. Análisis por UREA-PAGE. Del lado izquierdo, RNA soluble total de las cepas transformadas y

un control de peso molecular. Del lado derecho, se compara el producto final de purificación con el mismo control de peso molecular. La flecha verde resalta el peso esperado aproximado para un tRNA. La flecha roja resalta una segunda banda de sobreexpresión. **A y D)** Control de peso molecular para tRNA. Producto de transcripción in vitro de tRNA<sup>Gly-GCC</sup> de *Aquifex aeolicus*. **B)** RNA soluble total de la cepa transformada con el plásmido de sobreexpresión para tRNA<sup>Gly-GCC</sup> de *E. coli*. **C)** RNA soluble total de cepa transformada con el plásmido de sobreexpresión para tRNA<sup>Gly-GCC</sup> de *T. daxensis*. **E)** Producto final de purificación con la secuencia del tRNA Gly GCC de *T. daxensis*. Es de esperarse que las bandas D y E tengan un ligero desfase debido a las diferencias de secuencia entre ambos tRNAs. Esto les confiere pesos moleculares ligeramente distintos.

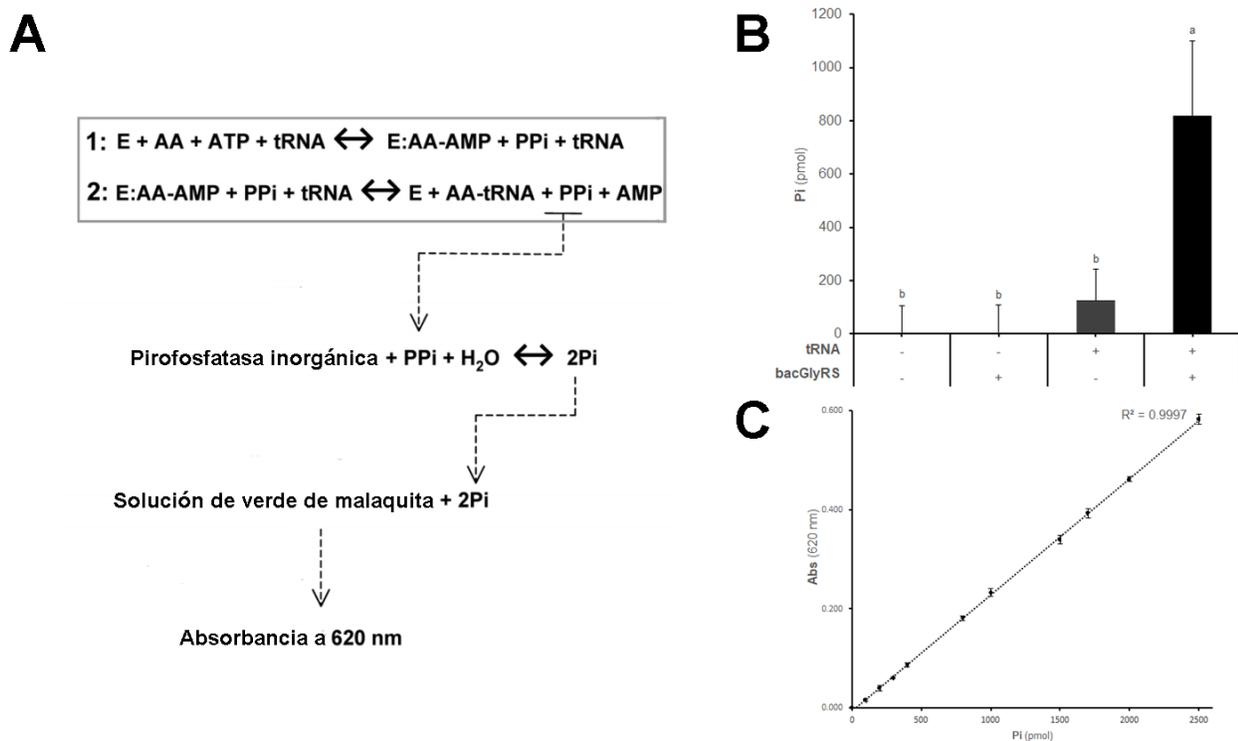
Para comprobar que la fracción aislada fuera de tRNA, se realizó un protocolo de purificación por hibridación descrito con anterioridad en la literatura (Yokogawa et al., 2009). Esta metodología permite aislar efectivamente tRNAs específicos de una mezcla con base en su secuencia; ya que se busca hibridar al tRNA blanco con un oligonucleótido de DNA diseñado para ser complementario a la secuencia deseada. Efectivamente, al aplicar este protocolo, se obtuvo RNA del mismo peso molecular que la referencia -tRNA sintetizado por transcripción in vitro- tanto en la fracción de RNA total, como en la fracción resultante de la purificación cromatográfica (Figura 10). Al someter al extracto de RNA total de la cepa de sobreexpresión de tRNA de *E. coli* a este protocolo, las dos bandas de mayor expresión son aisladas.



**Figura 10.** El tRNA purificado logra hibridar con una secuencia de DNA diseñada para ser complementaria al tRNA<sup>Gly-GCC</sup> de *T. daxensis*. UREA-PAGE. **A)** Control de

peso molecular para tRNA. Producto de transcripción in vitro de tRNA<sup>Gly-GCC</sup> de *Aquifex aeolicus*. **B)** RNA soluble total de cepa transformada con el plásmido de sobreexpresión para tRNA<sup>Gly-GCC</sup> de *T. daxensis*. **C)** Producto purificación por el método de hibridación usando un oligonucleótido de DNA biotinilado con secuencia complementaria al tRNA<sup>Gly-GCC</sup> de *T. daxensis*.

Adicionalmente, era de especial interés que el tRNA producido por nuestro sistema pudiera ser reconocido como sustrato por la bacGlyRS. Para comprobar esto, se evaluó la actividad de la bacGlyRS de *T. daxensis* usando una metodología espectroscópica de aplicación general para sintetetas (Cestari y Stuart, 2013). Efectivamente, la bacGlyRS presentó actividad en presencia del tRNA producido por este sistema (Figura 11).

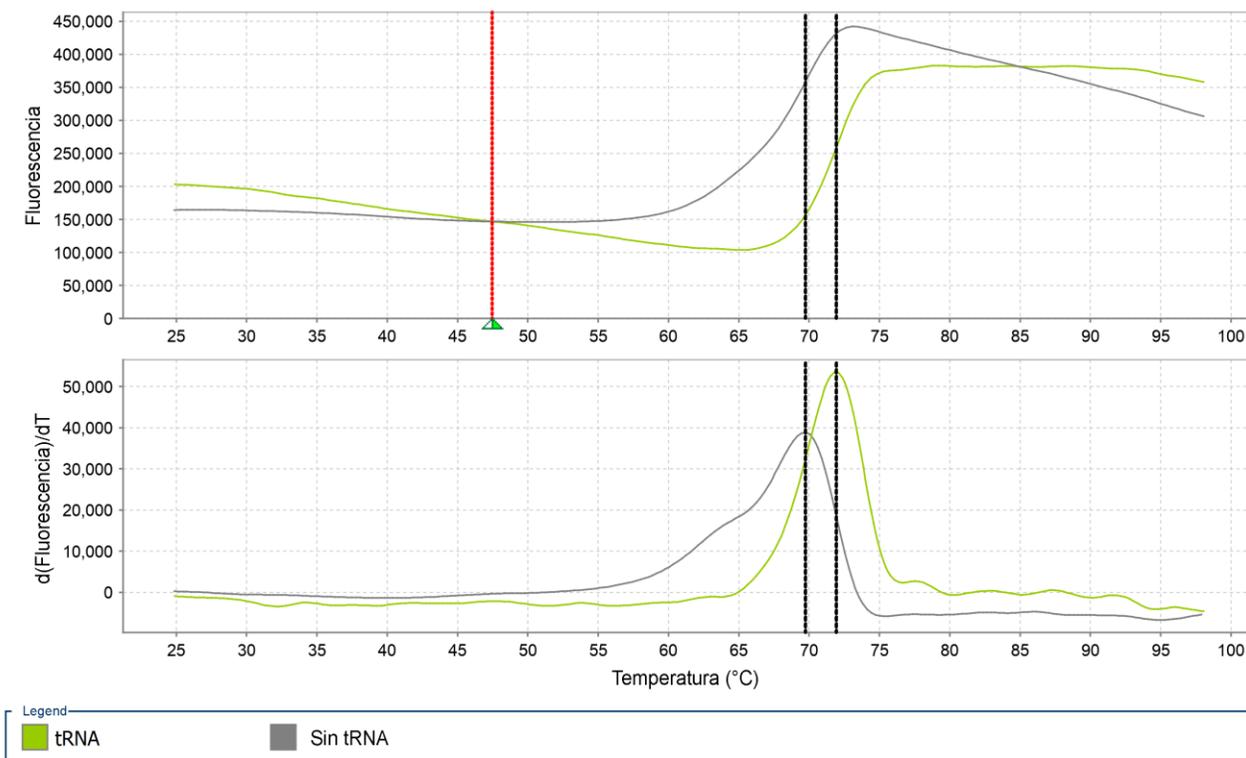


**Figura 11.** Un ensayo espectrofotométrico para medir la actividad aminoacil-tRNA sintetasa de la bacGlyRS. **A)** Esquema general de la reacción y el protocolo. **B)** Ensayo de aminoacilación usando verde de malaquita para detectar el fosfato inorgánico producto de la reacción (Pi) **C)** Curva estándar de fosfato inorgánico

usada para la cuantificación. Se realizaron diluciones seriales de fosfato de sodio en buffer de reacción para realizar esta curva.

## 10.2 Evaluación de la termoestabilidad de la subunidad $\beta$ de la bacGlyRS de *T. daxensis* tras su unión al tRNA cognado.

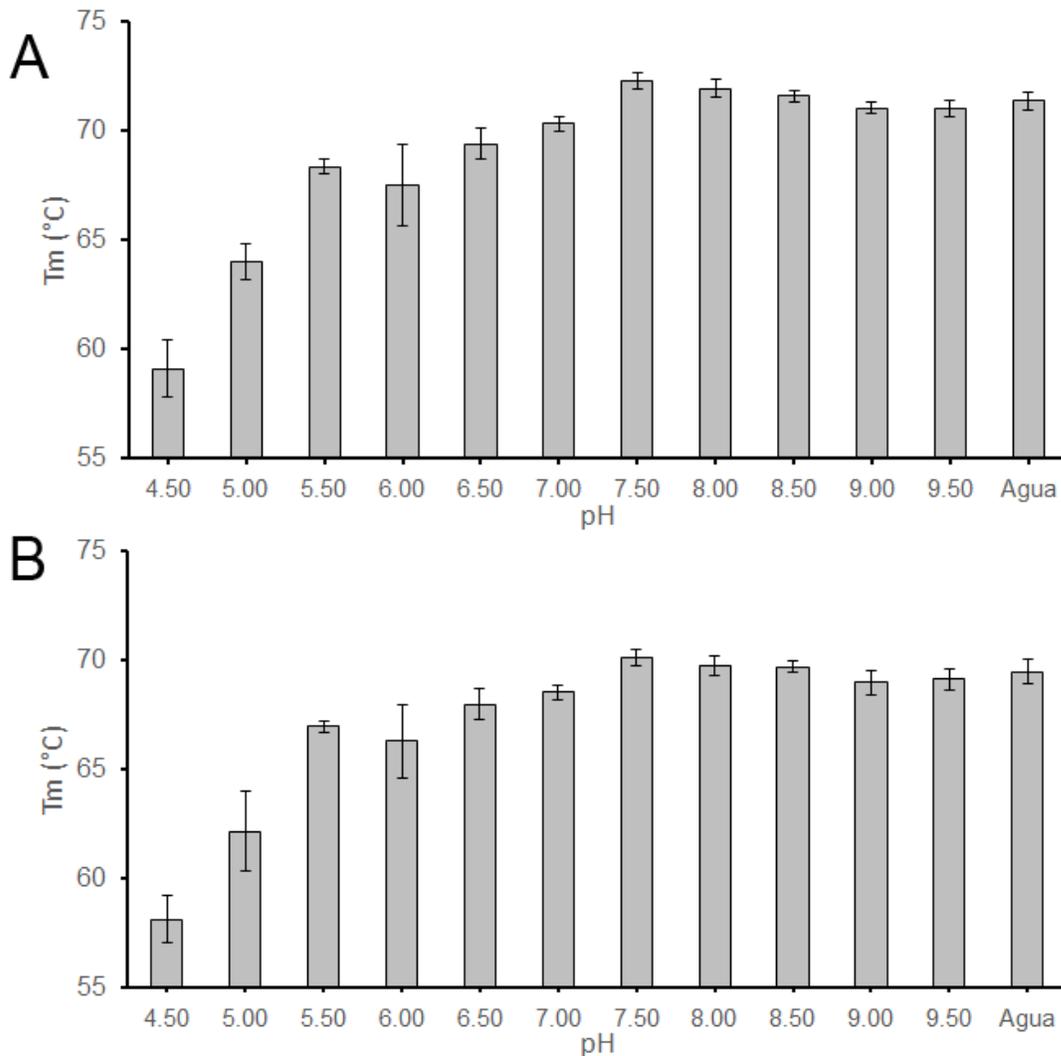
Se investigó la termoestabilidad del complejo bacGlyRS-tRNA por medio de ensayos de desplazamiento térmico por fluorometría diferencial de barrido. Como primer acercamiento a esto, se evaluó si existía un desplazamiento de la  $T_m$  de desnaturalización de la subunidad  $\beta$  en presencia de tRNA. Lo anterior suele ser una característica de la estabilización de un complejo macromolecular. La  $\Delta T_m$  entre la subunidad  $\beta$  por sí sola y en presencia de tRNA fue de  $2.6 \pm 0.6$  °C ( $n=5$ ). A continuación, se muestra un experimento representativo de este desplazamiento (Figura 12).



**Figura 12.** Curvas de fluorometría diferencial de barrido mostrando el desplazamiento de la  $T_m$  de desnaturalización entre la subunidad  $\beta$  por sí sola y en

presencia de tRNA. En la gráfica inferior, la curva de sus respectivas derivadas. Líneas negras verticales cruzan la  $T_m$  de cada condición calculada por el método de derivación numérica. Una línea vertical roja en la gráfica superior marca el punto a partir del cual se estableció la línea base para ambas curvas.

Posteriormente, por esta misma técnica se buscaron las condiciones de pH y concentración de cloruro de sodio que dieran como resultado la  $T_m$  de desnaturalización más alta en presencia de ambos elementos del complejo. A continuación, se muestran los resultados de esta búsqueda (Figura 13, Figura suplementaria 3 y Figura suplementaria 4).



**Figura 13.** Histogramas comparativos de las  $T_m$  de desnaturalización promedio del complejo; obtenidas por fluorimetría diferencial de barrido en diferentes

condiciones de pH. **A)** Valores de  $T_m$  calculados por el método de derivación numérica. **B)** Valores de la  $T_m$  calculados por el método de ajuste de Boltzmann.

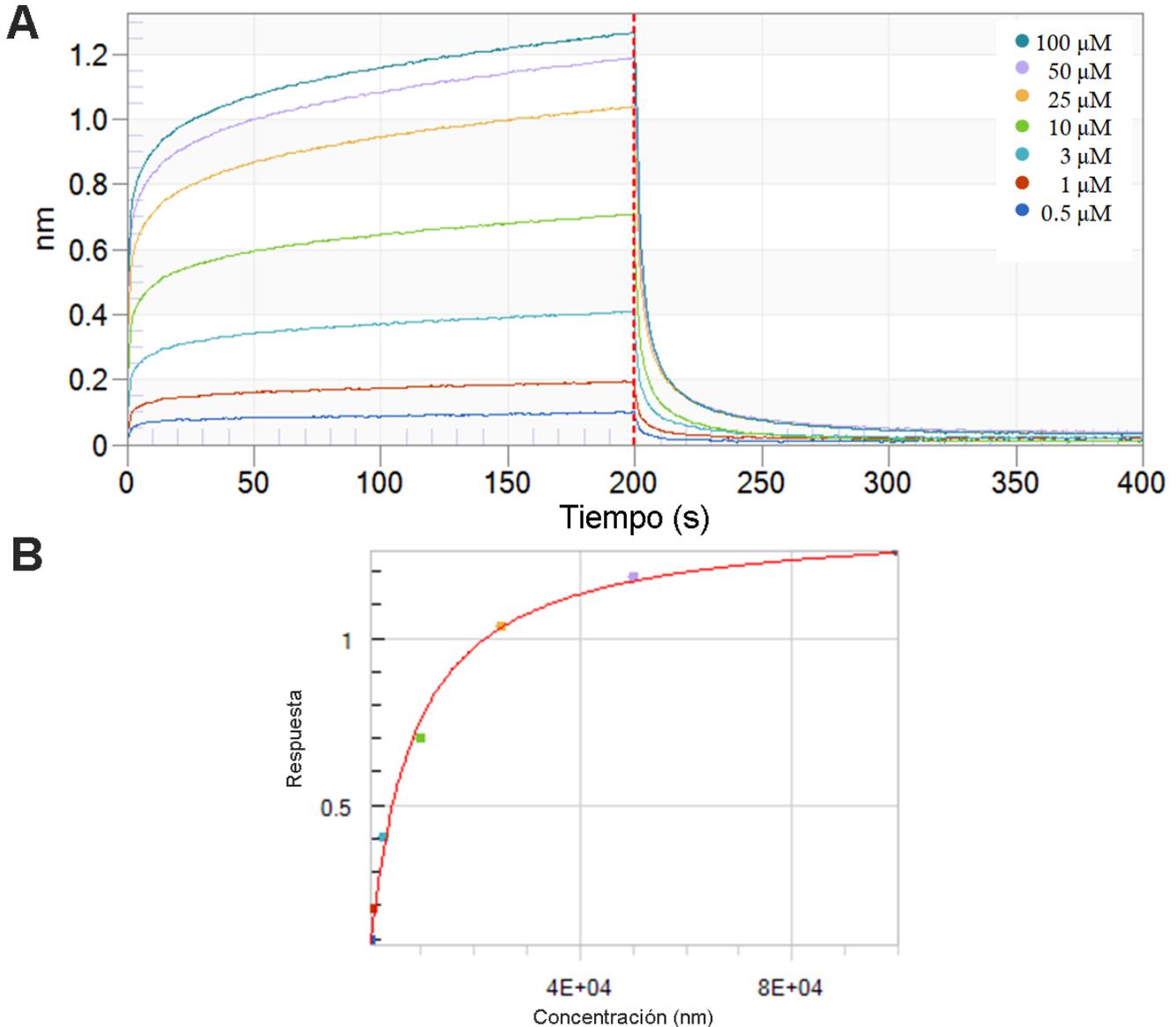
### **10.3 Caracterización de la unión del tRNA a la subunidad $\beta$ de la bacGlyRS de *T. daxensis* por interferometría de biocapa.**

Los experimentos de interferometría de biocapa sirvieron un doble propósito. En una primera etapa, se iteró sobre una solución amortiguada sencilla -HEPES pH 7.5- en búsqueda de aditivos que permitieran una mejor unión entre la  $\beta$ -bacGlyRS y el tRNA<sup>Gly</sup>. En esta búsqueda, se probaron diferentes sales de magnesio -acetato, nitrato, cloruro, sulfato y nitrato de magnesio- en un rango de concentraciones entre 0 y 200 mM. Todas parecían tener el mismo efecto en términos generales; a mayor concentración, mejoraban la respuesta de asociación. Esto hasta que a concentraciones >70 mM comenzaba a disminuir la respuesta. Se experimentó también con el efecto de varias sales monovalentes -cloruros y nitratos de sodio y potasio, así como acetato de amonio-. En todos los casos, las sales monovalentes disminuían la asociación a mayor concentración. Sólo el acetato de amonio a concentraciones de alrededor de 5 mM mostraba una mejor respuesta que la condición base. La espermina y la espermidina se probaron también, por su conocido efecto estabilizador de complejos proteína-ácido nucleico. Estas poliaminas sólo mejoraban la asociación del tRNA<sup>Gly</sup> a la  $\beta$ -bacGlyRS inmovilizada al biosensor a concentraciones entre 1 y 5 mM. La glicina siempre perturbó la asociación de la  $\beta$ -bacGlyRS al biosensor y por lo tanto resultaba contraproducente de usar. Con estas observaciones, se llegó a la formulación final -HEPES pH 7.5 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 50mM, acetato de amonio 5 mM y espermina 5 mM- con la cual se realizó un ensayo de cinética de unión.

Se procedió a hacer un ensayo clásico de cinética de unión en un rango de concentraciones entre 0 y 100  $\mu$ M de tRNA (Figura 14, A). Al ajustar las curvas del sensograma a un modelo de ligando heterogéneo -2:1-, se obtuvieron los parámetros descritos a continuación (Tabla 3). El análisis de estado estacionario de los datos arrojó una  $K_D$  aparente de  $7.80 \pm 0.67 \mu$ M ( $R^2$ : 0.995) (Figura 14, B).

**Tabla 3.** Parámetros obtenidos a partir de un ajuste a un modelo 2:1 de los trazos del ensayo de cinética de unión ( $X^2$ : 1.7245  $R^2$ : 0.9941).

Sitio 1		Sitio 2	
$K_{D1}$ (mM)	$3.42 \pm 0.34$	$K_{D2}$ ( $\mu$ M)	$59.8 \pm 6.2$
$k_{on1}$ (1/ M • s)	$5.90 \pm 0.59$	$k_{on2}$ (1/ M • s)	$7.13 \times 10^3 \pm 0.69 \times 10^3$
$k_{off1}$ (1/s)	$2.02 \times 10^{-2} \pm 0.04 \times 10^{-2}$	$k_{off2}$ (1/s)	$4.26 \times 10^{-1} \pm 0.15 \times 10^{-1}$

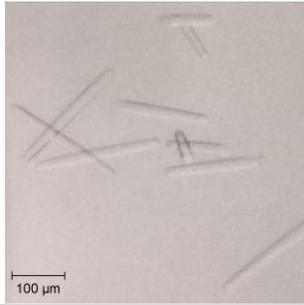
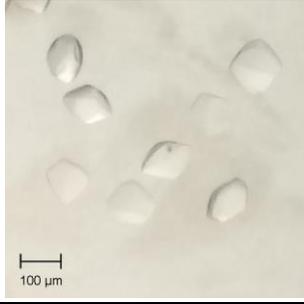
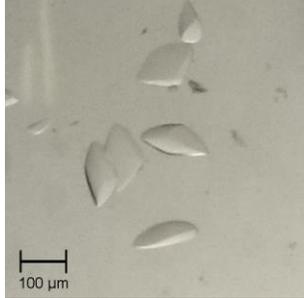


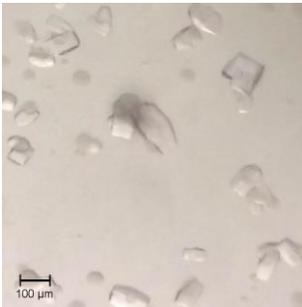
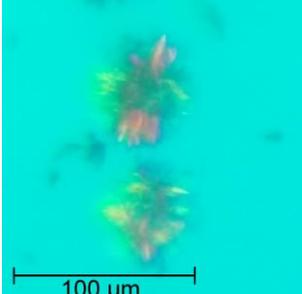
**Figura 14.** Ensayo de cinética de unión por interferometría de biocapa. **A)** Sensograma mostrando las secciones de asociación y disociación del tRNA en

presencia de la subunidad  $\beta$ -bacGlyRS inmovilizada al biosensor. **B)** Análisis de estado estacionario de los datos presentados en A.

#### 10.4 Cocrystalización de la bacGlyRS con su tRNA cognado.

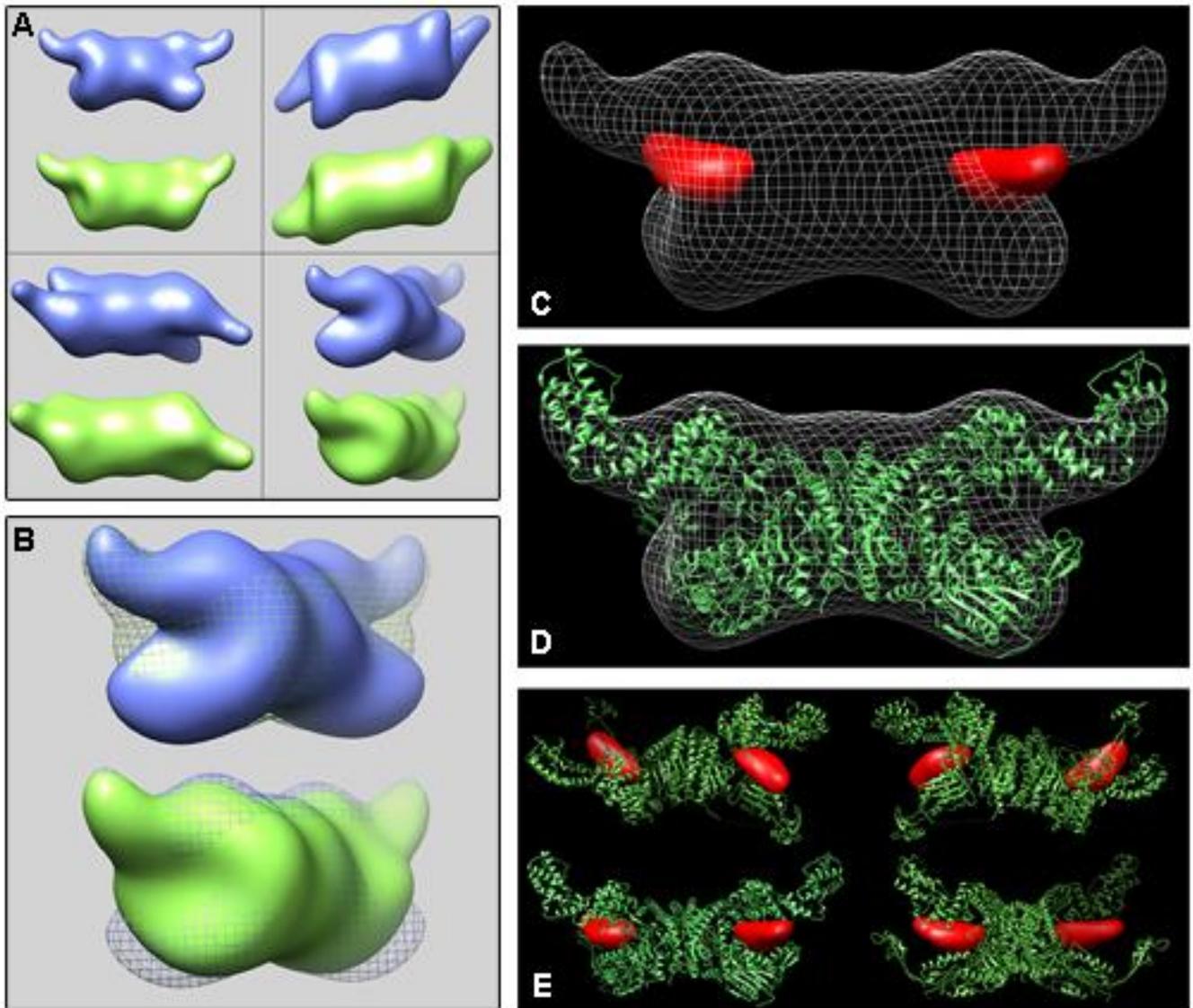
A pesar de que se logró obtener cristales en varias condiciones y producir diversas morfologías, no fue posible determinar la estructura tridimensional del complejo por esta metodología. A continuación; se resumen las condiciones principales en las que se generaron cristales macromoleculares con ambos elementos del complejo presentes (Tabla 4).

N°	Solución del reservorio	Comentarios	Hábito cristalino	Difracción	Cristal
1	26% polietilenglicol 200, 100 mM Citrate de sodio tribásico pH 5.0, sulfato de litio 200mM, cloruro de cobre 10 mM.	Relación 1:1 molar de proteína:RNA	Acicular. Cristales aparentemente únicos.	6.5 Å, muestra patologías cristalográficas propias de una macla.	 Micrograph showing several thin, needle-shaped (acicular) crystals. A scale bar in the bottom right corner indicates 100 μm.
2	26% polietilenglicol 200, 100 mM Citrate de sodio tribásico pH 5.0, sulfato de litio 200mM, citrate de amonio 180 mM, 4% formamida.	Relación 1:1 molar de proteína:RNA	Tabular. Cristales únicos.	7.0 Å, reflexiones débiles.	 Micrograph showing several flat, plate-like (tabular) crystals. A scale bar in the bottom right corner indicates 100 μm.
3	5% polietilenglicol 4000, MES 50 mM pH 6.0, 5 mM sulfato de magnesio, 100 mM sulfato de amonio.	Relación 1:1 molar de proteína:RNA. Producto de cross-seeding de cristales de la condición (1).	Trapezoédrico. Cristales únicos	8.0 Å, reflexiones débiles.	 Micrograph showing several trapezoidal crystals. A scale bar in the bottom right corner indicates 100 μm.

4	25% hexilenglicol, 50 mM cacodilato de sodio pH 6.0, 20 mM sulfato de magnesio, 2 mM cloruro de cobalto (III), 0.5 mM espermina.	Relación 1:1 molar de proteína:RNA. Producto de microseeding de cristales la la condición (3). Datos no procesables.	Prismático. Maclado.	7.0 Å, muestra patologías cristalográficas propias de una macla.	
5	30% hexilenglicol, 100 mM cacodilato de sodio pH 6.5, 200 mM acetato de magnesio.	Relación 1:2 molar de proteína:RNA.	Acicular. En ramillete irregular.	No probado	

### 10.5 Microscopía electrónica de partícula única por tinción negativa.

Las reconstrucciones tridimensionales que se obtuvieron presentan una diferencia de densidad electrónica significativa entre el complejo y la bacGlyRS<sup>apo</sup>. Esta diferencia se ubica en los extremos más distales al eje de simetría bilateral del tetrámero ( $\alpha_2\beta_2$ ) y se visualiza más fácilmente a través de un mapa de diferencia (Figura 15, C y E). Esta diferencia de densidad colocaliza con el surco D<sup>1,2,4</sup> de la subunidad  $\beta$ .



**Figura 15.** Reconstrucción tridimensional de partículas de la bacGlyRS a partir de datos de microscopía electrónica de partícula única por tinción negativa. Comparación de los resultados entre el complejo y la bacGlyRS<sup>apo</sup>, así como el mapa de diferencia y superposición de los modelos reconstruidos por microscopía y los datos cristalográficos (Dimas Torres, 2019) de la bacGlyRS<sup>apo</sup>. **A)** Comparación visual de las reconstrucciones tridimensionales de la bacGlyRS<sup>apo</sup> -azul- y el complejo -verde- desde varios ángulos. **B)** Superposición de las reconstrucciones de la bacGlyRS<sup>apo</sup> -azul- y el complejo -verde-. Para resaltar las diferencias, en cada caso, uno de los mapas se muestra en forma de una malla. **C)** Mapa de diferencia entre los datos de la bacGlyRS<sup>apo</sup> y el complejo mostrado como una

superficie roja. En superposición, la reconstrucción tridimensional de la bacGlyRS<sup>apo</sup> por microscopía como una malla blanca. **D)** Superposición de la reconstrucción tridimensional de la bacGlyRS<sup>apo</sup> por microscopía electrónica -malla blanca- y por cristalografía de rayos X -diagrama de caricatura en color verde-. **E)** Superposición del mapa de diferencia entre los datos de la bacGlyRS<sup>apo</sup> y el complejo por microscopía electrónica -superficie roja- y modelo de la bacGlyRS<sup>apo</sup> por cristalografía de rayos X -diagrama de caricatura en color verde-.

## 11. DISCUSIÓN

### 11.1 Producción de tRNA por el sistema T7 RNA Pol.

Se diseñó este sistema teniendo mente la alta procesividad de la T7 RNA Pol; característica que hoy la hace una herramienta ubicua para las metodologías de transcripción in vitro. Sin embargo; había que tomar en cuenta también que esta polimerasa, en un contexto de DNA circular, necesita de una estructura de terminación tallo-asa seguida de una secuencia de poliuracilos (Mairhofer, Wittwer, Cserjan-Puschmann y Striedner, 2015; McAllister, Morris, Rosenberg y Studier, 1981). Previamente se había reportado el uso de tRNA como molécula reportera de la transcripción (Lopez, Lost y Dreyfus, 1994). Con base en estos resultados; se asumió que los niveles basales de expresión de la maquinaria de maduración del tRNA pudieran ser suficientes para procesar los transcritos de interés aún en condiciones de sobreexpresión. Lo anterior significaría que la maquinaria de maduración del tRNA - específicamente las proteínas involucradas en el procesamiento del extremo 3'- lograrán separar al tRNA de la estructura de terminación. Esto no sería posible si las estructuras, tanto del tRNA como del terminador, no se formaran correctamente tras su síntesis. Es por esto que la estabilidad de la estructura secundaria de la secuencia del tRNA a producir era un factor importante a evaluar para este sistema. Servicios bioinformáticos de predicción de estructura secundaria de RNA (Lorenz et al., 2011), arrojan que la estructura de la secuencia del tRNA<sup>Gly-GCC</sup> de *T. daxensis* es más estable que la de *E. coli* en contexto de la presencia del terminador (Figura suplementaria 2).

Resulta interesante entonces, la diferencia presente en el patrón electroforético al evaluar la expresión del plásmido con la secuencia del tRNA *E. coli* con respecto a la de *T. daxensis*. En el caso de la cepa que sobreexpresa el tRNA de *E. coli*, las dos bandas de mayor expresión logran retenerse y eluir en la metodología de purificación por hibridación (Yokogawa et al., 2009). Esto hace pensar que probablemente, la banda de mayor peso molecular sea producto de la incapacidad de los sistemas de maduración del organismo huésped de procesar en su totalidad al transcrito primario sobreexpresado. Dado que esto no ocurre en la expresión del plásmido con la secuencia de *T. daxensis*, se intuye que algunos de los transcritos primarios con la secuencia de *E. coli* adoptan estructuras secundarias que les impiden ser reconocidos por la maquinaria de maduración. Este efecto, a su vez puede ser debido a la inestabilidad de la estructura secundaria del tRNA<sup>Gly-GCC</sup> de *E. coli* en el contexto de su terminador adyacente.

Debido a la naturaleza de los experimentos aquí descritos, cantidades considerables de tRNA fueron requeridas. El sistema de sobreexpresión T7-RNA Pol permitió purificar entre 50 y 90 mg de tRNA por cada tres litros de cultivo, lo cual resultó eficiente para los fines de este trabajo. La purificación por hibridación y los ensayos de actividad indican en conjunto que el tRNA purificado por esta metodología es un sustrato productivo para la bacGlyRS.

## **11.2 Evaluación de la termoestabilidad de la subunidad $\beta$ de la bacGlyRS de *T. daxensis* tras su unión al tRNA cognado.**

El M. en C. Uriel Dimas había realizado previamente ensayos de desplazamiento térmico por fluorimetría diferencial de barrido con la bacGlyRS de *T. daxensis* -ambas subunidades-. Estos experimentos mostraban un amplio rango de estabilidad para la enzima. Se esperaba entonces, que la termoestabilidad general de la bacGlyRS de *T. daxensis* no permitiera notar si hubiera algún desplazamiento térmico debido a la unión del tRNA<sup>Gly</sup>. Por esto, se consideró de utilidad aislar la subunidad  $\beta$  para estos fines. Asimismo, cabe recordar para esta discusión que solamente la subunidad  $\beta$  es necesaria para la unión al tRNA<sup>Gly</sup> (Nagel et al., 1984). La  $\Delta T_m$  entre la subunidad  $\beta$  por sí sola y en presencia de tRNA que se observó no podría

atribuirse a un efecto de estabilización debido a su baja magnitud. Sin embargo, esta misma observación ha sido reportada en experimentos con otras aminoacil-tRNA sintetasas (Neuenfeldt et al., 2013). Debido a lo anterior, se procedió a buscar las condiciones de pH y salinidad donde se consiguiera la  $T_m$  más alta posible; con vistas a usar esta condición al migrar a otra técnica que pudiera arrojar información sobre los parámetros de unión entre la bacGlyRS y su tRNA cognado.

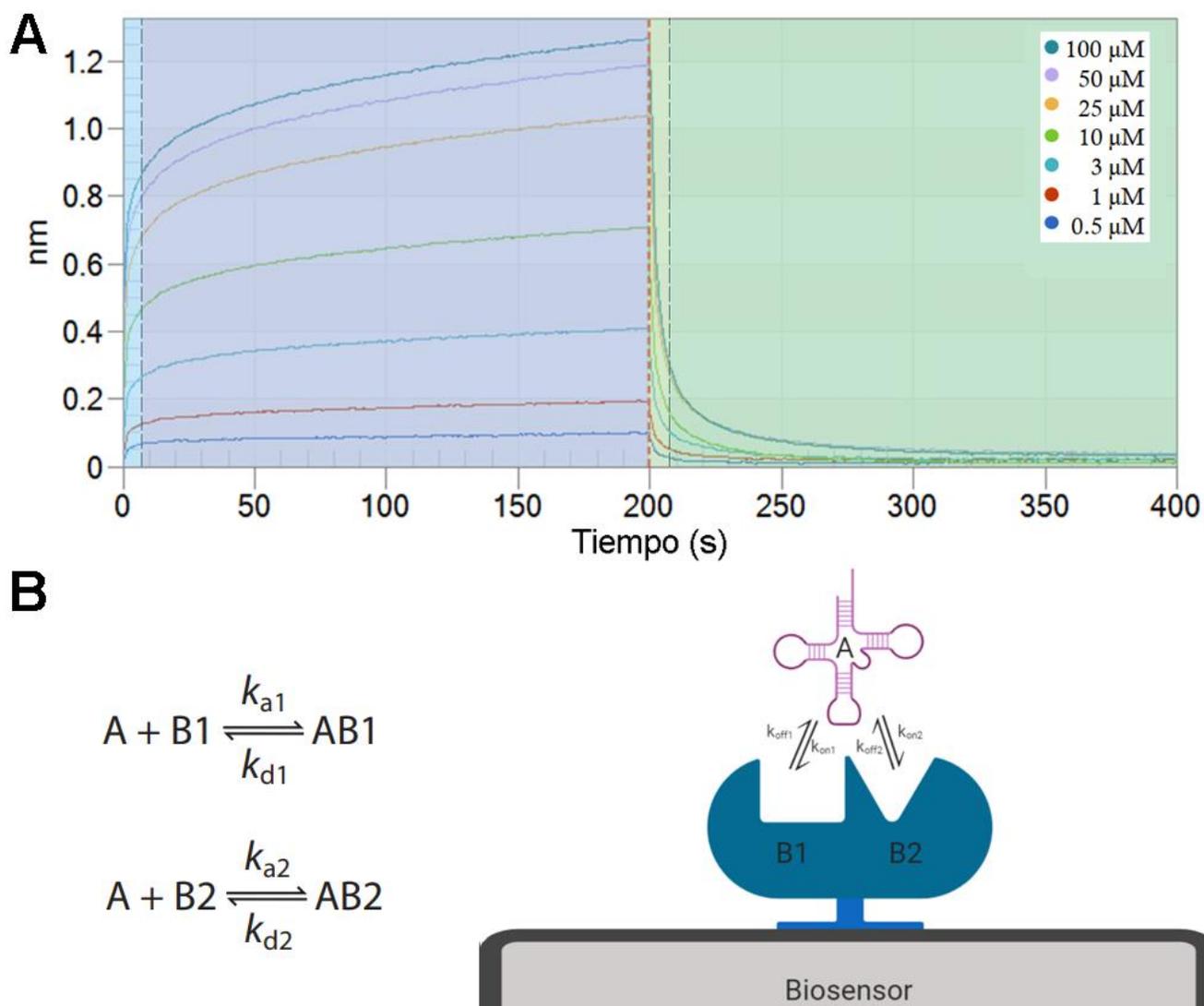
Al evaluar el efecto de las condiciones de pH y salinidad en la termoestabilidad de la subunidad  $\beta$  en presencia de tRNA<sup>Gly</sup>; se halló poca variación atribuible a la concentración de cloruro de sodio en la muestra, principalmente en condiciones de pH entre 7.0 y 9.5. Debido a esto, se agruparon y analizaron los datos únicamente en términos de pH (Figura 13), con la consecuencia de que la dispersión de los datos en esta gráfica es también producto de la concentración de cloruro de sodio. La condición con la  $T_m$  promedio más alta fue en pH 7.5 ( $T_{m\mu}$ :  $72.31 \pm 0.38$  °C ó  $70.13 \pm 0.37$  °C). Esta condición de pH fue la base para empezar a trabajar en los experimentos de interferometría de biocapa.

### **11.3 Caracterización de la unión del tRNA a la subunidad $\beta$ de la bacGlyRS de *T. daxensis* por interferometría de biocapa.**

Cabe recordar la relación de tamaños entre la  $\beta$ -bacGlyRS y el tRNA; además de que se ha reportado previamente que sólo la subunidad  $\beta$  de la bacGlyRS es capaz de unir al tRNA (Nagel et al., 1984). Con base en esto, se decidió usar exclusivamente a la subunidad  $\beta$  de la bacGlyRS de *T. daxensis* para evaluar su unión al tRNA<sup>Gly</sup>.

Al inspeccionar visualmente las curvas del sensograma en el ensayo de cinética de unión, queda clara la naturaleza bifásica de éstas. En la fase de asociación, existe un segmento donde la tasa de respuesta inicial es muy rápida, seguido de otro segmento donde señal continúa incrementando lentamente a lo largo de la fase, en vez de alcanzar el equilibrio. En la fase de disociación, existe un primer segmento donde la tasa de respuesta baja rápidamente, seguido de otro donde la señal decrece lentamente y no alcanza la línea base (Figura 16, A). Es por esta razón, que resulta imposible realizar un ajuste de estas curvas a un

modelo 1:1 (Figura suplementaria 5, A). En este modelo, todos los eventos de unión estarían gobernados por un solo juego de parámetros que dan como resultado una curva de una sola fase. Las curvas tampoco se pueden ajustar a un modelo bivalente o a uno basado en transporte de masas. La única alternativa para lograr un ajuste es el modelo de ligando heterogéneo -2:1- (Figura suplementaria 5, B); el cual asume que el analito -en este caso, el tRNA- se une a dos sitios independientes del ligando inmovilizado - $\beta$ -bacGlyRS-; con constantes de velocidad diferentes en cada sitio (Figura 16, B). La presencia de estos dos sitios sería consistente con el modelo planteado en la sección introductoria de este trabajo. El comportamiento bifásico en la cinética de unión entre la  $\beta$ -bacGlyRS y el tRNA evaluado por BLI parece sugerir la existencia de estos dos sitios.



**Figura 16.** Comportamiento bifásico en la cinética de unión entre la  $\beta$ -bacGlyRS y el tRNA. **A)** Se resaltan las cuatro fases que muestran los procesos de asociación y disociación. **B)** Modelos esquemático y gráfico del modelo de ligando heterogéneo. Aquí A representa al analito y B representa al ligando inmovilizado (Tobias, 2013). En el modelo gráfico, la  $\beta$ -bacGlyRS inmovilizada al biosensor se representa como la figura azul, y el tRNA en magenta.

Esto impone una imposibilidad para hacer una de las verificaciones protocolarias a los resultados de esta metodología. Cuando el comportamiento de unión se ajusta a un modelo 1:1 es imperante verificar que la  $K_D$  calculada a partir del análisis de estado estacionario y la calculada a partir del ajuste al sensograma coincidan. Bajo el modelo 2:1, esta comparación

no es posible a menos que se establezca cómo interactúan los dos sitios de unión -si es que lo hacen- entre sí. Esta interacción entre ambos sitios se ve reflejada a nivel global como una  $K_D$  aparente; medible por medio del análisis de estado estacionario.

La  $K_D$  aparente obtenida por el análisis de estado estacionario se encuentra dentro de los órdenes de magnitud reportados para otras aminoacil-tRNA sintetasas de bacteria (Gustilo, Dubois, Lapointe y Agris, 2007; Neuenfeldt et al., 2013). Sin embargo, en al menos uno de los sitios, los procesos tanto de asociación como de disociación ocurren muy rápidamente y con baja afinidad. Por esto, no es difícil intuir que el complejo bacGlyRS-tRNA sea inestable, aun cuando la afinidad global se encuentre dentro del rango esperado para una aminoacil-tRNA sintetasa bacteriana.

#### **11.4 Cocrystalización de la bacGlyRS con su tRNA cognado**

La caracterización estructural del complejo bacGlyRS-tRNA se buscó abordar, en una primera instancia, a través cristalografía de rayos X. Por lo tanto, se realizó la cocrystalización de esta enzima con su tRNA cognado. Como se estableció en la sección anterior, a pesar de que se obtuvieron cristales en varias condiciones y se produjeron diversas morfologías, no fue posible determinar la estructura del complejo por cristalografía de rayos X. Aquellos cristales que permitieron realizar una colecta completa de datos de difracción no parecían contener el tRNA una vez se resolvía el juego de datos. Cabe resaltar, que, en todas las condiciones analizadas, la presencia de ambos elementos del complejo -tRNA y enzima- era indispensable para que ocurriera la cristalización. Ninguno de los elementos por sí mismos cristalizaban sin la presencia del otro.

La Dra. Annia Rodríguez Hernández obtuvo previamente, en este mismo grupo de investigación, cristales con la bacGlyRS y tRNA. Ella usó construcciones diferentes a las utilizadas en este trabajo. Los cristales que obtuvo muestran varios paralelismos morfológicos y en cuanto a condiciones de cristalización con los aquí presentados. Del mismo modo, los datos obtenidos a partir de sus cristales tampoco lograron proveer información acerca del complejo. Es posible que la inestabilidad del complejo o la naturaleza de recambio rápido en

la cinética de unión entre la  $\beta$ -bacGlyRS y el tRNAGly jueguen un papel en la dificultad presentada para cristalizarlo.

## **11.5 Microscopía electrónica de partícula única por tinción negativa del complejo bacGlyRS-tRNA.**

Ante las dificultades que se presentaron para obtener información estructural por medio de cristalografía; se optó por abordar este objetivo por medio de microscopía electrónica de partícula única. El tamaño de las partículas a analizar, así como la presencia de algún tipo de simetría son probablemente los factores más importantes a considerar si se busca utilizar la microscopía electrónica de partícula única. Es esto por lo que se eligió emplear al tetramero  $\alpha_2\beta_2$  para estos experimentos. Convencionalmente, el límite de resolución de la microscopía electrónica de partícula única por tinción negativa es de alrededor de 20 Å (Scarff, Fuller, Thompson y Iadanza, 2018). Esto hace que la única forma de obtener alguna información estructural acerca del complejo por esta metodología, sea compararlo con la enzima en ausencia de tRNA (bacGlyRS<sup>apo</sup>).

Al comparar ambas reconstrucciones tridimensionales, las diferencias pueden ser informativas acerca de cambios conformacionales grandes o de la ubicación del tRNA en el complejo. Una de las condiciones que deben cumplirse para poder hacer esta comparación, es que las imágenes sean tomadas con los mismos parámetros de magnificación y con un detector de características al menos, similares. Asimismo, los juegos de datos deben ser comparables en cuanto al número de partículas usadas para hacer la reconstrucción. También es importante que durante el procesamiento de datos se siga el mismo procedimiento para ambos casos. Todas estas precauciones fueron tomadas para obtener y procesar las micrografías de ambas muestras y procesar los datos. Se proveen ejemplos con dos de las micrografías tomadas en el Anexo 2 (Figura suplementaria 6, Figura suplementaria 7). Nótese que hay más orientaciones discernibles en el juego de datos de la bacGlyRS<sup>apo</sup> que en las del complejo. Esto presumiblemente porque al no estar ocupado el surco D<sup>1,2,4</sup> de la subunidad  $\beta$ , hay más elementos de simetría disponibles para clasificar las orientaciones de las partículas.

La densidad adicional, presente en las partículas del complejo en relación con las de la bacGlyRS<sup>apo</sup>, es consistente con la hipótesis planteada al inicio de este trabajo. Hay que recordar, sin embargo, que esta diferencia puede deberse tanto a la presencia del tRNA como a cambios conformacionales en la proteína producto de la unión al tRNA. O incluso, a una combinación de ambos factores. Es por esto que no se puede aseverar nada acerca de la orientación del tRNA en el complejo. Es necesario obtener datos por alguna otra metodología -cristalografía o criomicroscopía electrónica- que permitan generar un modelo a mayor resolución del complejo para aclarar estos aspectos. Aun así, la evidencia aquí presentada confirma que la estructura de la bacGlyRS<sup>apo</sup> en solución es la misma que se obtuvo por cristalografía (Dimas Torres, 2019). Asimismo, apunta a que cualquier cambio al tetrámero que ocurra tras la formación del complejo bacGlyRS-tRNA -de igual o superior magnitud al límite de resolución de la técnica-; ocurre el surco D<sup>1,2,4</sup> de la subunidad  $\beta$ .

## **12. CONCLUSIONES.**

### **12.1 El sistema T7 RNA Pol es eficiente para la producción de tRNAs con estructura secundaria estable.**

El sistema descrito en este trabajo para la síntesis *in vivo* de tRNA, aporta muchas ventajas en términos económicos y de eficiencia. El factor más importante a considerar si se busca utilizar este sistema para la producción de tRNA; es la estabilidad de la estructura secundaria del tRNA blanco, en el contexto de la estructura de terminación adyacente que necesita la T7 RNA Pol.

### **12.2 Tras la unión del tRNA a la bacGlyRS, el surco D<sup>1,2,4</sup> de la subunidad $\beta$ es ocupado.**

Al comparar las reconstrucciones tridimensionales de las partículas de la bacGlyRS<sup>apo</sup> y el complejo con tRNA obtenidas por microscopía electrónica, queda claro que existen marcadas

diferencias. Los límites de resolución de la microscopía electrónica de partícula única por tinción negativa imponen una limitación técnica. Nada se puede aseverar acerca de la orientación del tRNA en el complejo bacGlyRS-tRNA. Sin embargo, ya sea por cambios conformacionales, por la ocupación del tRNA, o por ambos fenómenos; el surco D<sup>1,2,4</sup> se encuentra ocupado en el caso del complejo.

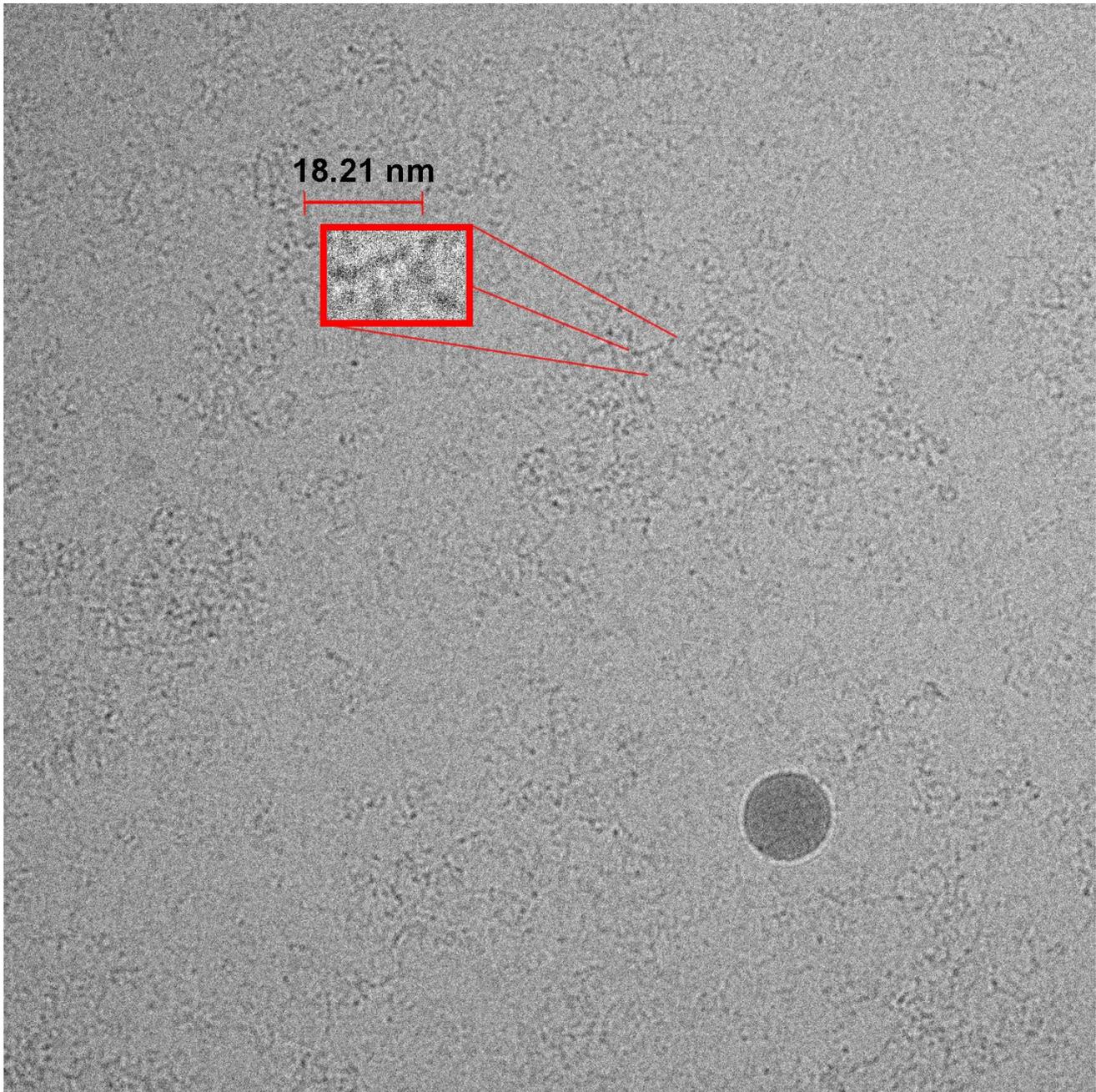
### **13. PERSPECTIVAS**

La perspectiva principal es obtener un modelo estructural a mayor resolución del complejo bacGlyRS-tRNA. Este modelo ayudaría a confirmar la existencia de los dos sitios de anclaje al sustrato. Asimismo, proveería de información sobre los elementos necesarios para el reconocimiento del tRNA. Se realizaron experimentos preliminares de criomicroscopía electrónica con el complejo (Figura 17, Anexo 1). Entender los detalles sobre la formación del complejo bacGlyRS-tRNA sería de gran utilidad para evaluar el potencial de la bacGlyRS como blanco farmacológico, así como su posición en la filogenia.

El diseño de mutantes de la  $\beta$ -bacGlyRS es una posible vía para entender el rol que cada uno de sus dominios pueda jugar sobre el reconocimiento del tRNA. Aquí se estableció al menos una metodología -BLI- que permite evaluar de manera directa el impacto que pueda tener una mutación en la  $\beta$ -bacGlyRS sobre el reconocimiento del tRNA. Se esperaría que la delección, ya sea del dominio D1 o D4, convierta a los procesos de asociación y disociación a un comportamiento monofásico ajustable a un modelo 1:1.

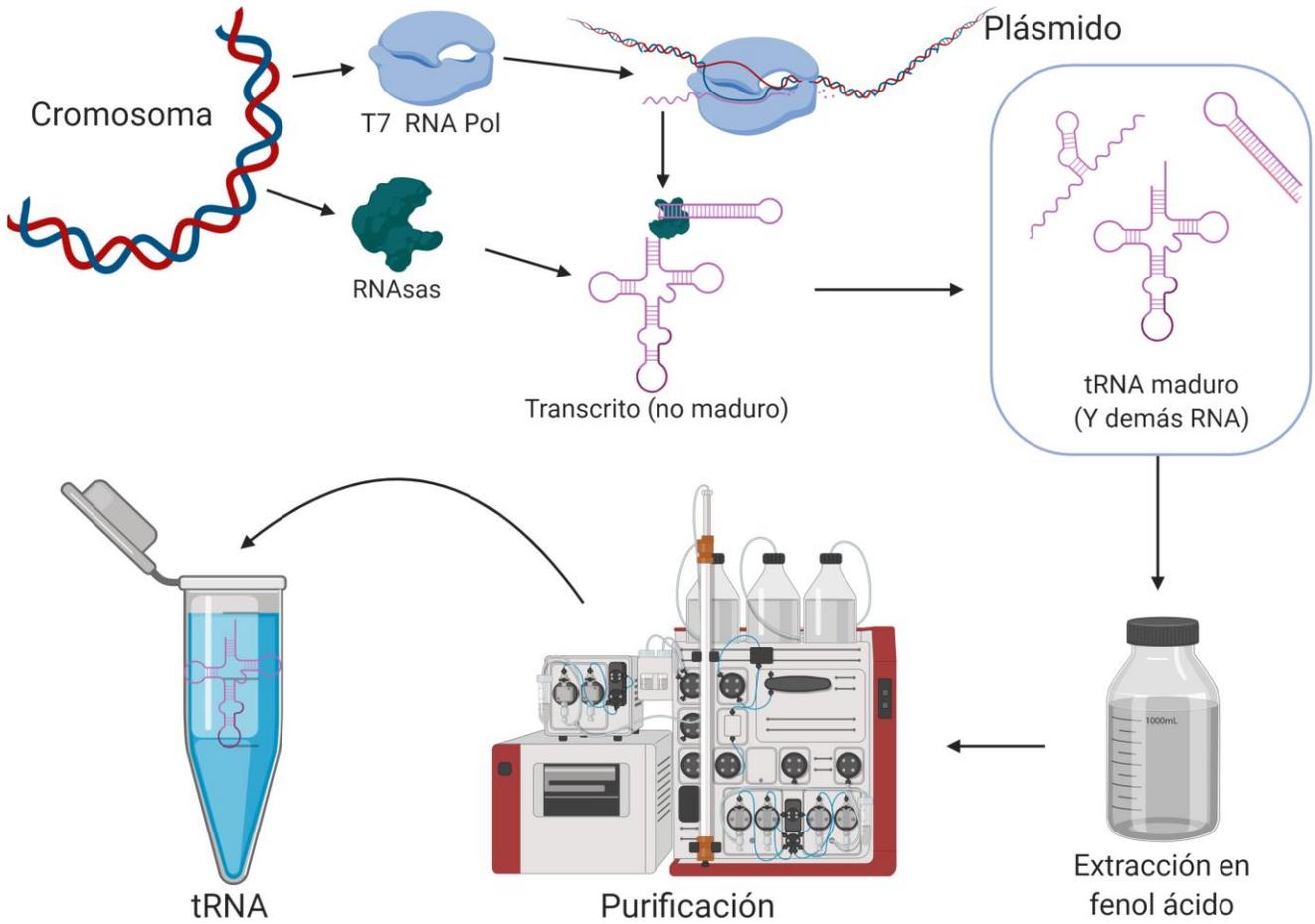
El uso de técnicas ortogonales a la BLI -como la termoforesis o la calorimetría de titulación isotérmica- aportarían información invaluable sobre el comportamiento cinético de unión entre la  $\beta$ -bacGlyRS y el tRNA. Asimismo, permitiría formular un modelo de unión que también contemplara los factores termodinámicos que gobiernan el proceso de unión entre estos dos elementos. También, los resultados podrían explicar el hecho de que el complejo bacGlyRS-tRNA parece no estabilizarse tras la unión del tRNA.

## 14. ANEXO 1 (RESULTADOS ADICIONALES)

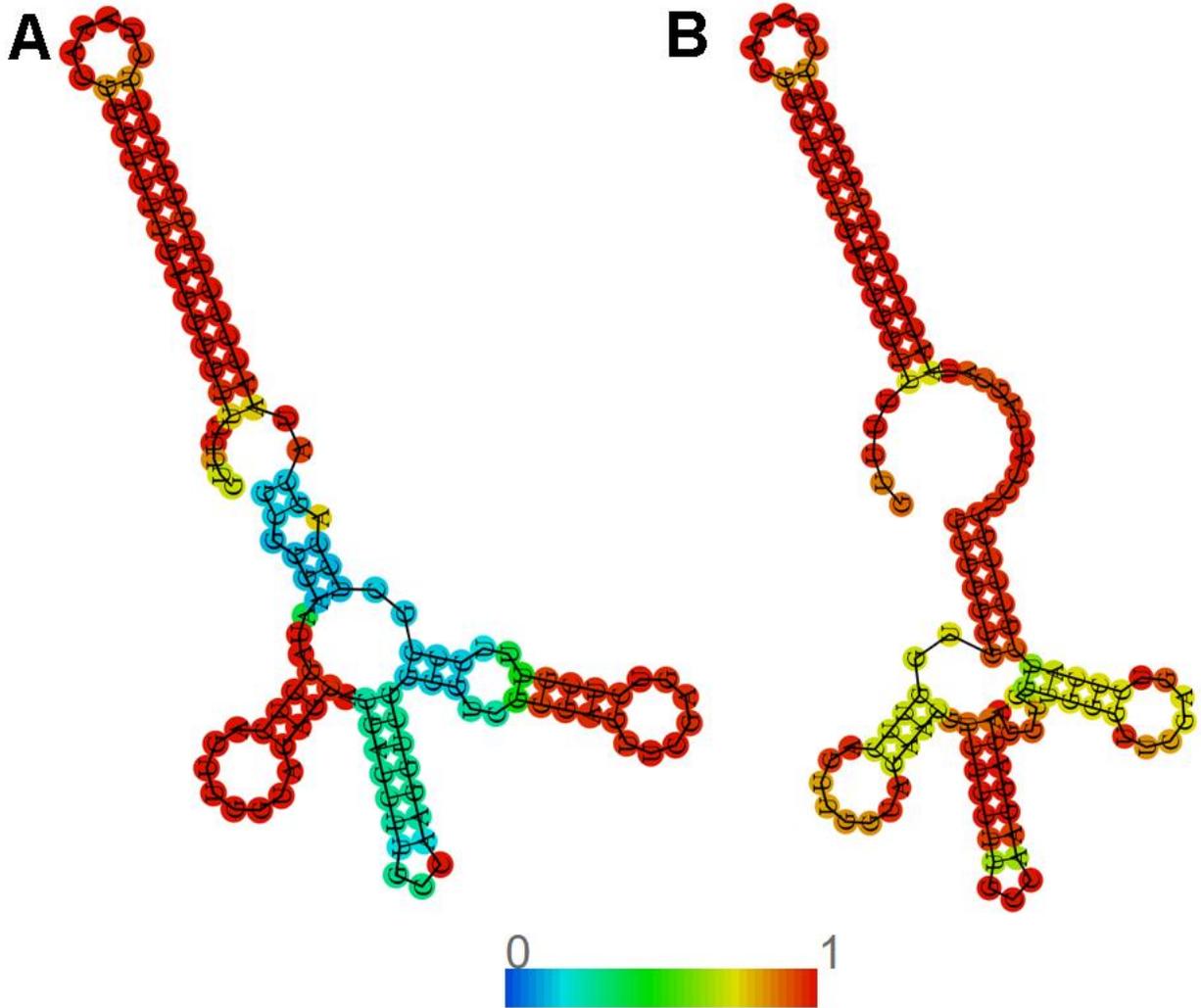


**Figura 17.** Ejemplo de micrografía del complejo bacGlyRS-tRNA por criomicroscopía electrónica. En un recuadro rojo se muestra el acercamiento a una posible partícula del complejo.

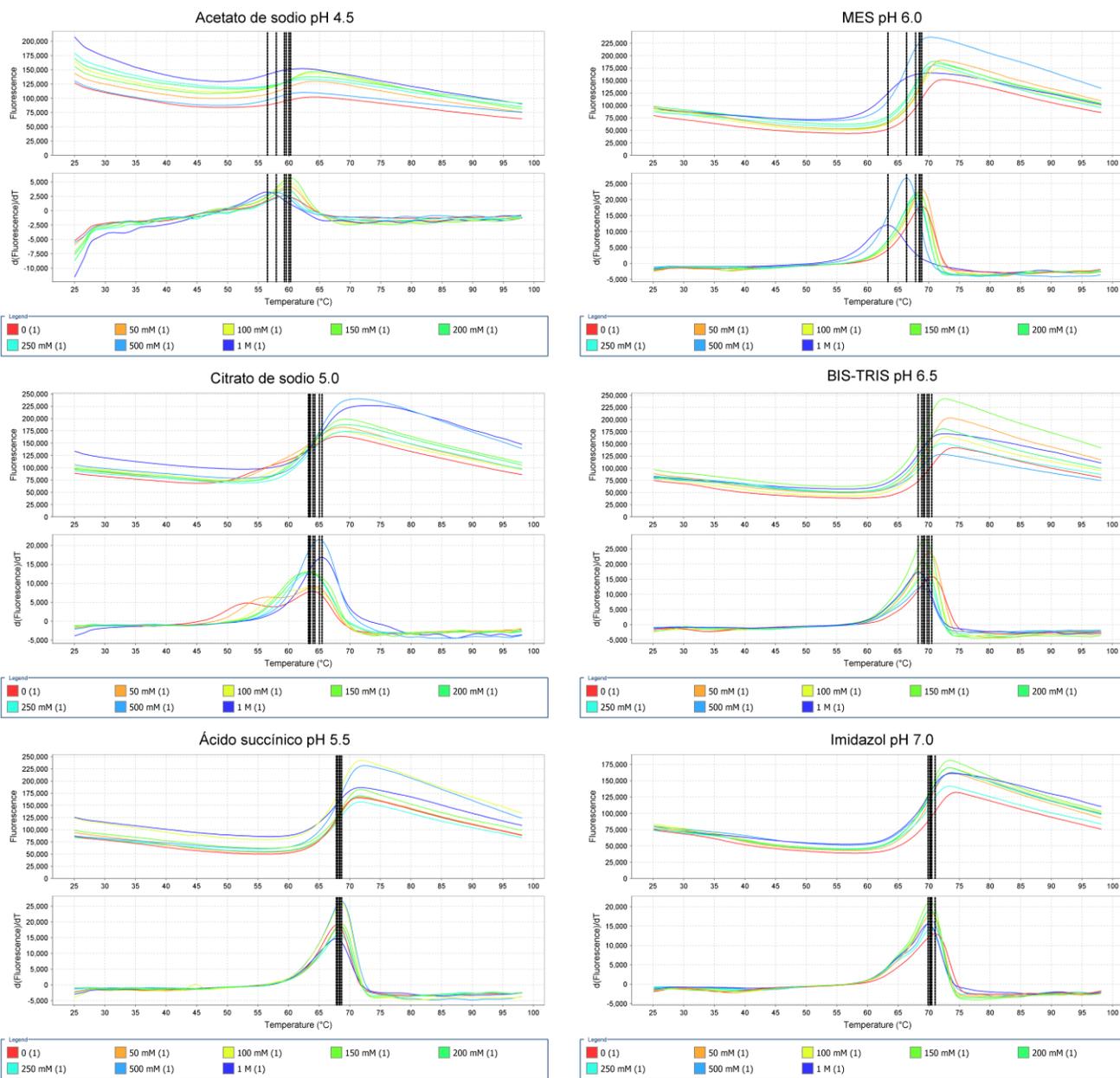
## 15. ANEXO 2 (FIGURAS SUPLEMENTARIAS)



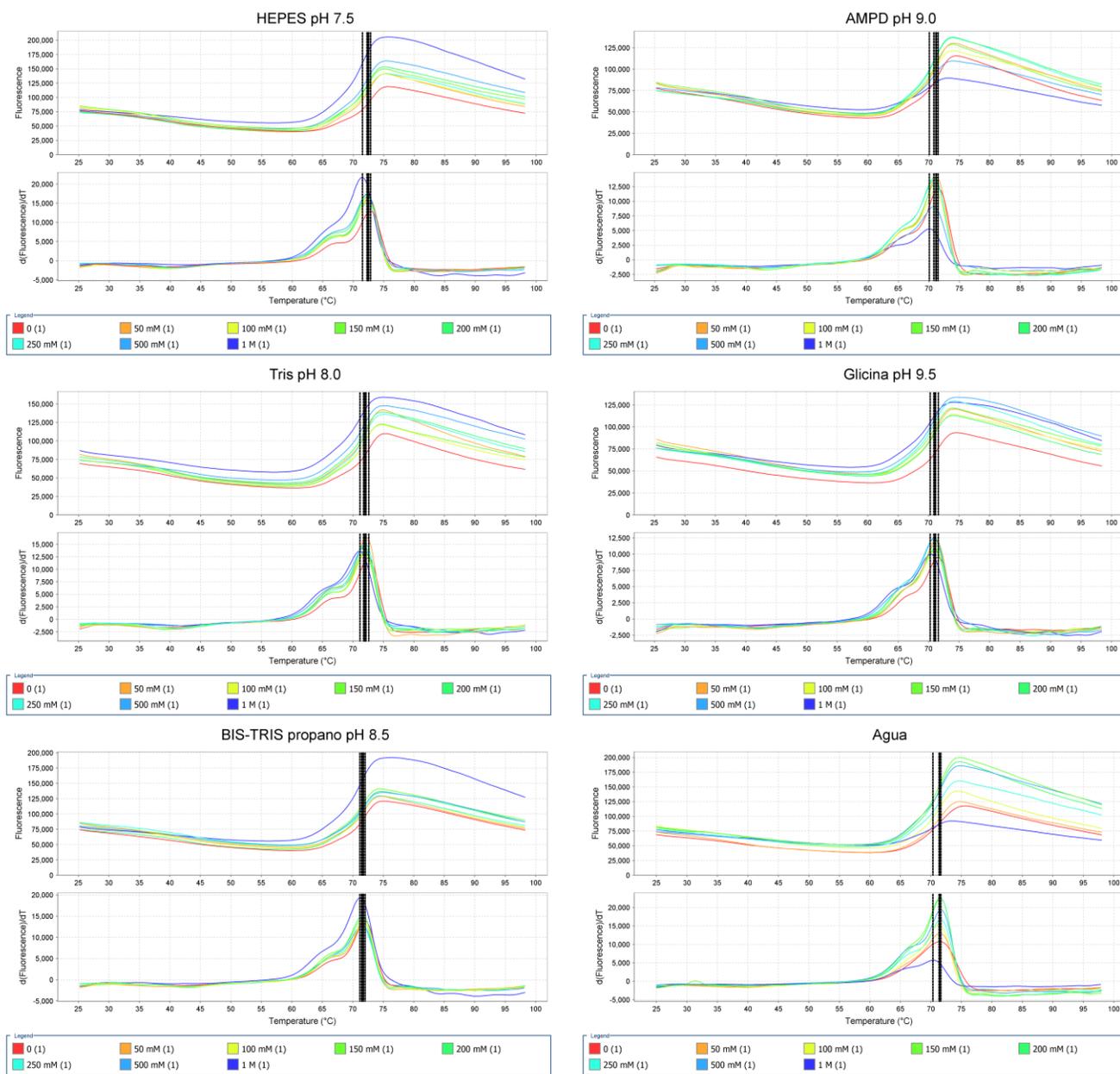
**Figura suplementaria 1.** Esquematización general del procedimiento utilizado para purificar el tRNA Gly GCC.



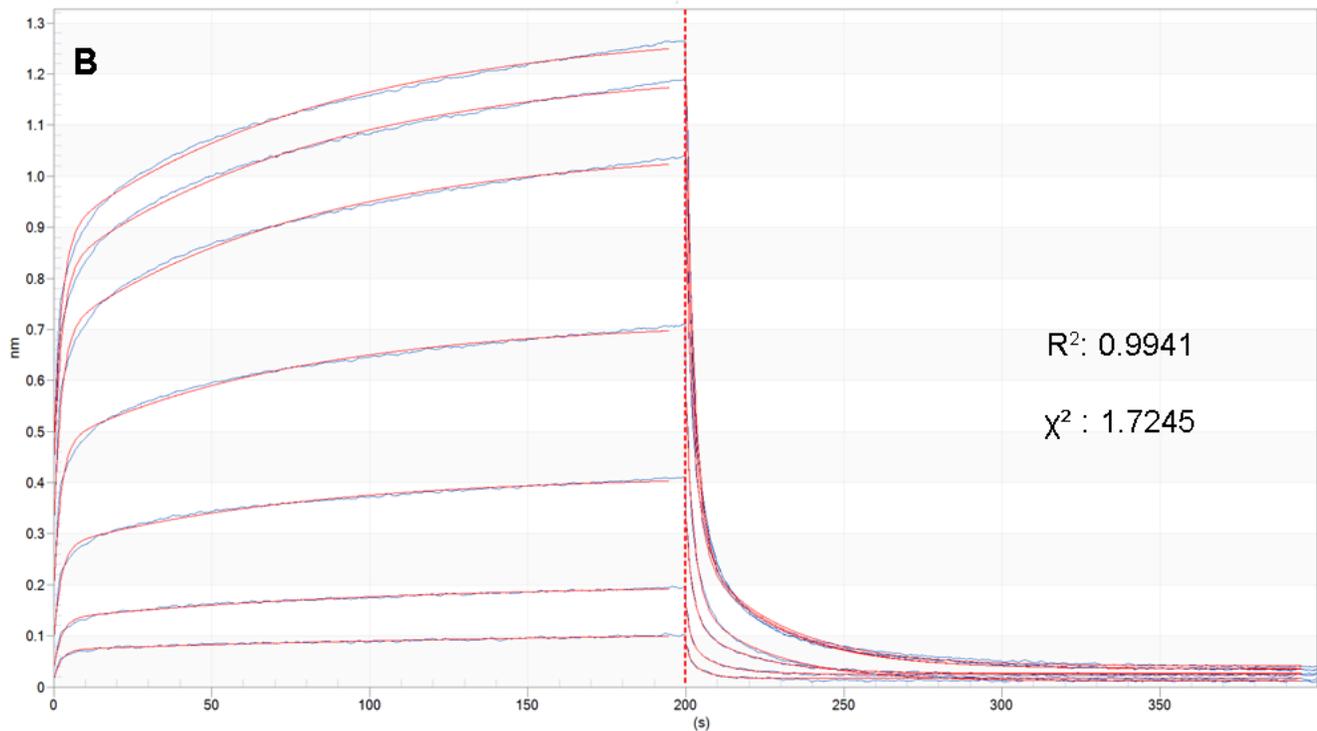
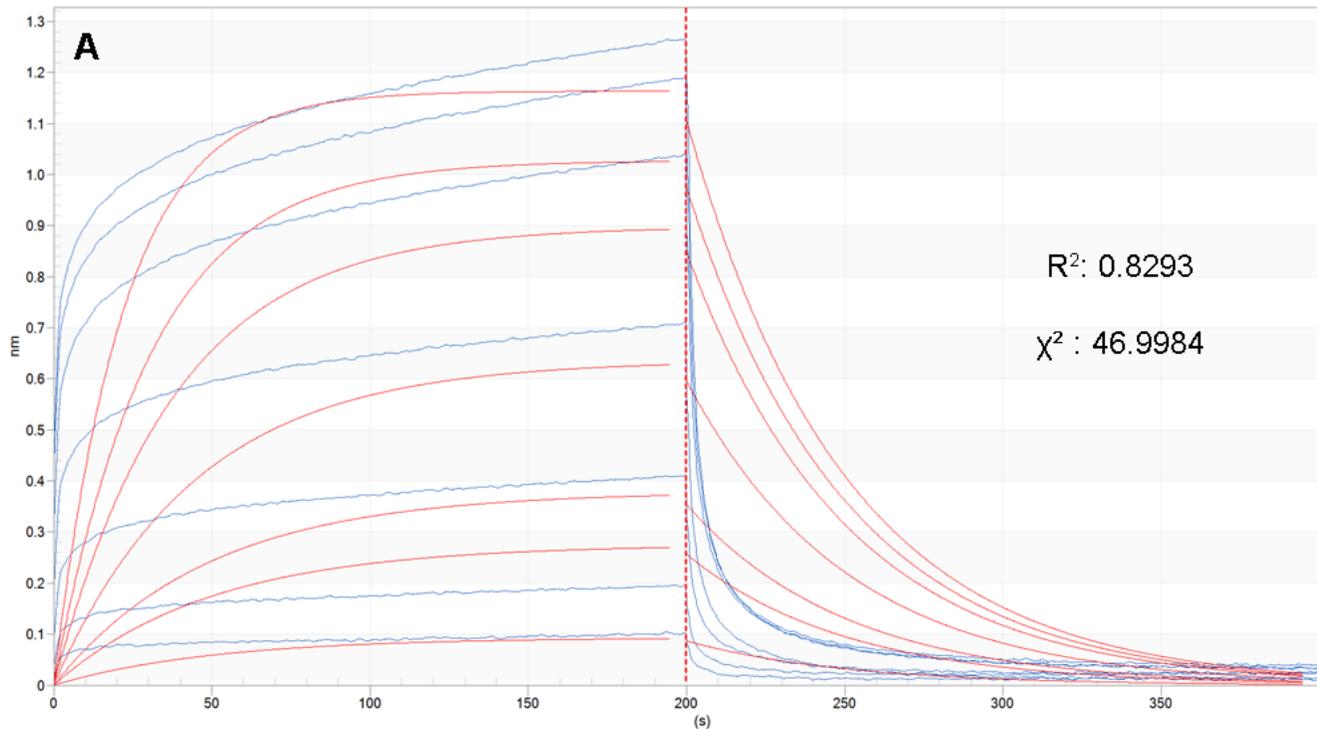
**Figura suplementaria 2.** Probabilidades de apareamiento de bases de los tRNAs usados en esta trabajo, en el contexto del terminador T7. El código gradiente de colores se indica en la parte inferior de la figura. Estas predicciones fueron hechas por el servicio RNAfold (Lorenz et al., 2011). **A)** Transcrito primario que contiene la secuencia del tRNA GCC de *Escherichia coli*. **B)** Transcrito primario que contiene la secuencia del tRNA GCC de *Thermanaerotherrix daxensis*.



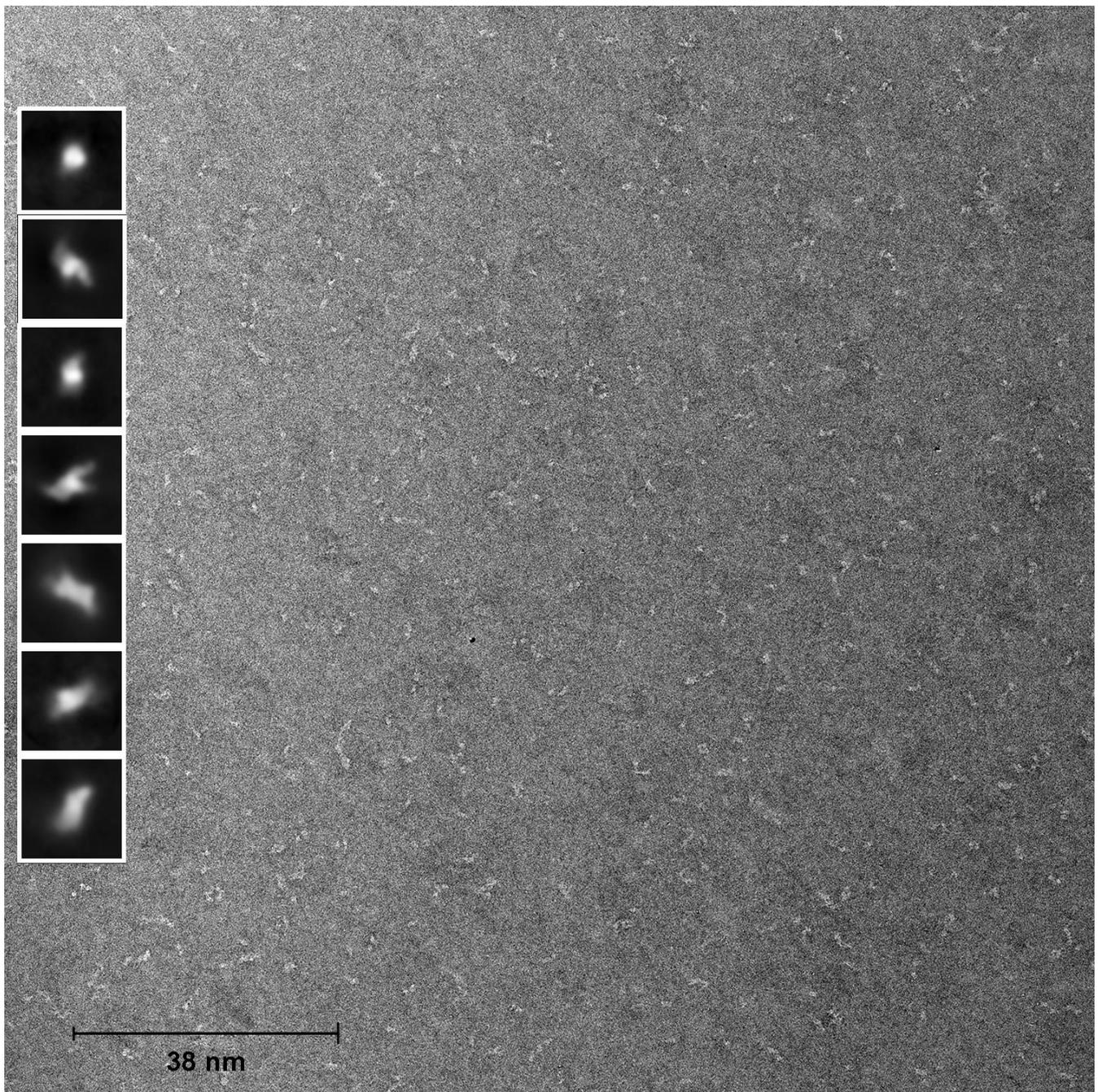
**Figura suplementaria 3 (pH entre 4.5 y 7.0).** Curvas de fluorimetría diferencial de barrido del complejo bacGlyRS-tRNA acompañadas de la curva de su respectiva derivada. En las cajas de leyenda, se detalla la concentración de NaCl de cada condición. Líneas negras verticales cruzan la  $T_m$  calculada de cada condición por el método de derivación numérica.



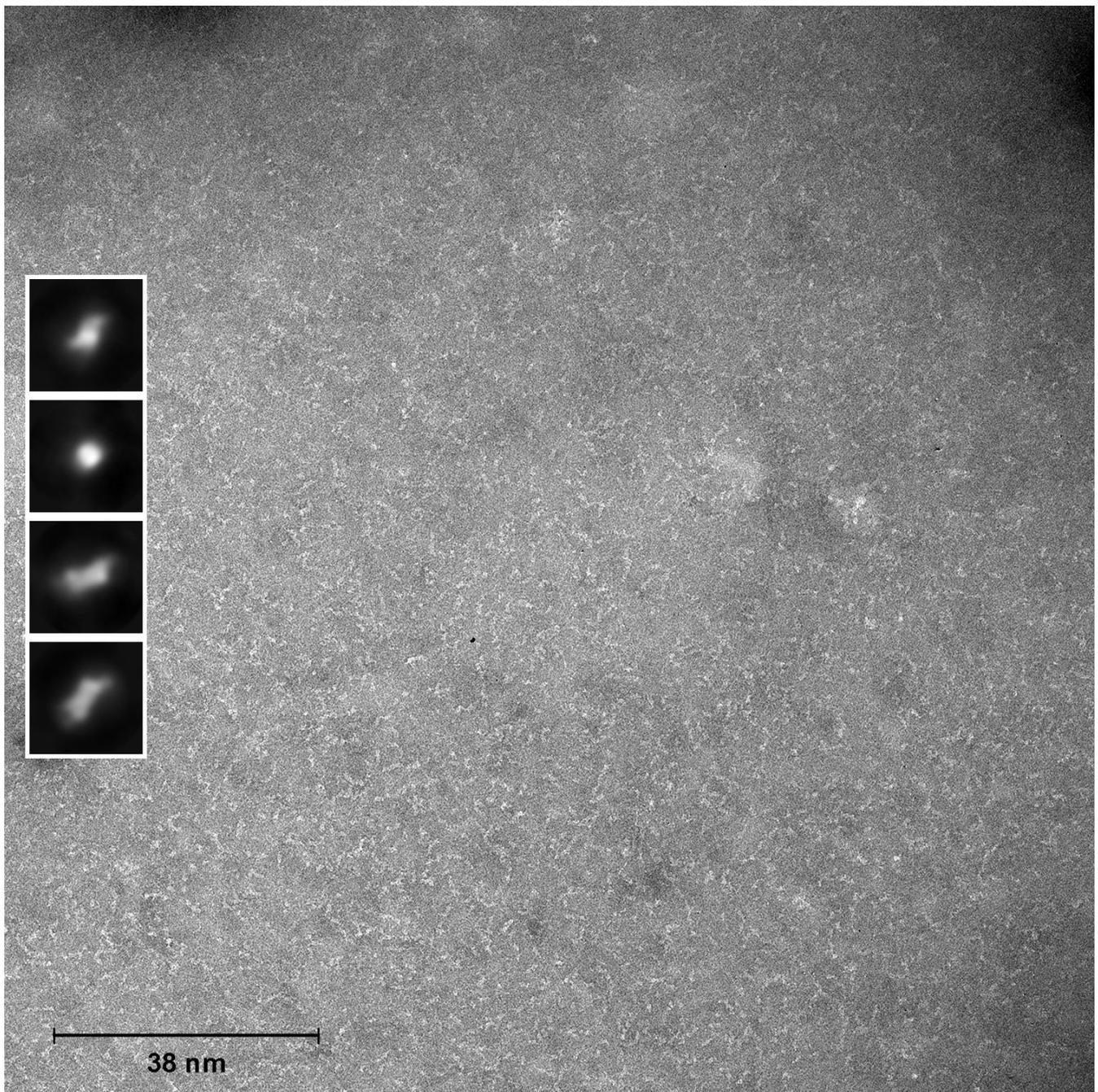
**Figura suplementaria 4 (pH entre 7.5 y 9.5).** Curvas de fluorimetría diferencial de barrido del complejo bacGlyRS-tRNA acompañadas de la curva de su respectiva derivada. En las cajas de leyenda, se detalla la concentración de NaCl de cada condición. Líneas negras verticales cruzan la  $T_m$  calculada de cada condición por el método de derivación numérica.



**Figura suplementaria 5.** El sensograma del ensayo cinético de unión sólo se ajusta al modelo 2:1. **A)** Sensograma de las fases de asociación y disociación del ensayo. El ajuste a un modelo 1:1 se muestra como líneas rojas. **B)** Sensograma de las fases de asociación y disociación del ensayo. El ajuste a un modelo 2:1 se muestra como líneas rojas. En ambos paneles se encuentra una leyenda con los estadísticos del ajuste.



**Figura suplementaria 6.** Ejemplo representativo de una micrografía de la muestra de bacGlyRS<sup>apo</sup>. En el lado izquierdo se muestran la clasificación bidimensional promedio de las partículas de acuerdo con su orientación.



**Figura suplementaria 7.** Ejemplo representativo de una micrografía de la muestra del complejo bacGlyRS-tRNA. En el lado izquierdo se muestran la clasificación bidimensional promedio de las partículas de acuerdo con su orientación.

## 16. BIBLIOGRAFÍA

- Caillet, J., Nogueira, T., Masquida, B., Winter, F., Graffe, M., Dock-Brégeon, A.-C., ... Springer, M. (2003). The modular structure of *Escherichia coli* threonyl-tRNA synthetase as both an enzyme and a regulator of gene expression. *Molecular Microbiology*, 47(4), 961–974. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03364.x>
- Cavarelli, J. y Moras, D. (1993). Recognition of tRNAs by aminoacyl-tRNA synthetases. *The FASEB Journal*, 7(1), 79–86. <https://doi.org/10.1096/fasebj.7.1.8422978>
- Cestari, I. y Stuart, K. (2013). A spectrophotometric assay for quantitative measurement of aminoacyl-tRNA synthetase activity. *Journal of Biomolecular Screening*, 18(4), 490–497. <https://doi.org/10.1177/1087057112465980>
- Chaliotis, A., Vlastaridis, P., Mossialos, D., Ibba, M., Becker, H. D., Stathopoulos, C. y Amoutzias, G. D. (2017). The complex evolutionary history of aminoacyl-tRNA synthetases. *Nucleic Acids Research*, 45(3). <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1182>
- Dimas Torres, J. U. (2019). *Cristalogenésis y resolución de la estructura cristalográfica de la glicil-tRNA sintetasa bacteriana*. Universidad Nacional Autónoma de México. Recuperado a partir de [http://oreon.dgbiblio.unam.mx/F/CEYLQ8ARNCXTLUBADBN7NPNKJ5U6H3IN55HJY3FRF7EMVLV9I9-50535?func=full-set-set&set\\_number=014527&set\\_entry=000001&format=999](http://oreon.dgbiblio.unam.mx/F/CEYLQ8ARNCXTLUBADBN7NPNKJ5U6H3IN55HJY3FRF7EMVLV9I9-50535?func=full-set-set&set_number=014527&set_entry=000001&format=999)
- Eriani, G., Delarue, M., Poch, O., Gangloff, J. y Moras, D. (1990). Partition of tRNA synthetases into two classes based on mutually exclusive sets of sequence motifs. *Nature*, 347(6289), 203–206. <https://doi.org/10.1038/347203a0>
- Gustilo, E. M., Dubois, D. Y., Lapointe, J. y Agris, P. F. (2007). *E. coli* glutamyl-tRNA synthetase is inhibited by anticodon stem-loop domains and a minihelix. *RNA Biology*, 4(2), 85–92. <https://doi.org/10.4161/rna.4.2.4736>
- Holm, L. y Elofsson, A. (2019). Benchmarking fold detection by DaliLite v.5. *Bioinformatics*, 35(24), 5326–5327. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz536>
- Lopez, P. J., Lost, I. y Dreyfus, M. (1994). The use of a tRNA as a transcriptional reporter: The T7 late promoter is extremely efficient in *Escherichia coli* but its transcripts are poorly expressed. *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/22.7.1186>
- Lorenz, R., Bernhart, S. H., Höner zu Siederdissen, C., Tafer, H., Flamm, C., Stadler, P. F. y Hofacker, I. L. (2011). ViennaRNA Package 2.0. *Algorithms for Molecular Biology*, 6(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/1748-7188-6-26>

- Mairhofer, J., Wittwer, A., Cserjan-Puschmann, M. y Striedner, G. (2015). Preventing T7 RNA polymerase read-through transcription-A synthetic termination signal capable of improving bioprocess stability. *ACS Synthetic Biology*, 4(3), 265–273. <https://doi.org/10.1021/sb5000115>
- McAllister, W. T., Morris, C., Rosenberg, A. H. y Studier, F. W. (1981). Utilization of bacteriophage T7 late promoters in recombinant plasmids during infection. *Journal of Molecular Biology*, 153(3), 527–544. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(81\)90406-X](https://doi.org/10.1016/0022-2836(81)90406-X)
- Nagel, G. M., Cumberledge, S., Johnson, M. S., Petrella, E. y Weber, B. H. (1984). The  $\beta$  subunit of *E. coli* glycyl-tRNA synthetase plays a major role in tRNA recognition. *Nucleic Acids Research*, 12(10), 4377–4384. <https://doi.org/10.1093/nar/12.10.4377>
- Neidhardt, F. C., Parker, J. y McKeever, W. G. (1975). Function and Regulation of Aminoacyl-tRNA Synthetases in Prokaryotic and Eukaryotic Cells. *Annual Review of Microbiology*, 29(1), 215–250. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.29.100175.001243>
- Neuenfeldt, A., Lorber, B., Ennifar, E., Gaudry, A., Sauter, C., Sissler, M. y Florentz, C. (2013). Thermodynamic properties distinguish human mitochondrial aspartyl-tRNA synthetase from bacterial homolog with same 3D architecture. *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1322>
- O'Donoghue, P. y Luthey-Schulten, Z. (2003). On the Evolution of Structure in Aminoacyl-tRNA Synthetases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(4), 550–573. <https://doi.org/10.1128/mubr.67.4.550-573.2003>
- Ostrem, D. L. y Berg, P. (1974). Glycyl transfer ribonucleic acid synthetase from *Escherichia coli*. Purification, properties, and substrate binding. *Biochemistry*, 13(7), 1338–1348. <https://doi.org/10.1021/bi00704a006>
- Postic, G., Ghouzam, Y., Chebrek, R. y Gelly, J. C. (2017). An ambiguity principle for assigning protein structural domains. *Science Advances*, 3(1), e1600552. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1600552>
- RCSB PDB - 5YYN: Crystal structures of *E. coli* arginyl-trna synthetase (argrs) in complex with substrate TRNA(Arg). (s/f). Recuperado el 18 de mayo de 2020, a partir de <https://www.rcsb.org/structure/5YYN>
- Sang, G. P., Ewalt, K. L. y Kim, S. (2005, octubre 1). Functional expansion of aminoacyl-tRNA synthetases and their interacting factors: New perspectives on housekeepers. *Trends in Biochemical Sciences*. Elsevier Current Trends. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2005.08.004>
- Scarff, C. A., Fuller, M. J. G., Thompson, R. F. y Iadanza, M. G. (2018). Variations on negative stain electron microscopy methods: Tools for tackling challenging systems. *Journal of Visualized Experiments*, 2018(132). <https://doi.org/10.3791/57199>

- Scheres, S. H. W. (2014). Single-particle processing in RELION-1.3. *MRC Laboratory of Molecular Biology*, (オンライン), [http://www2.mrc-lmb.cam.ac.uk/groups/scheres/relion13\\_tutorial.pdf](http://www2.mrc-lmb.cam.ac.uk/groups/scheres/relion13_tutorial.pdf) (参照: 2016-09-09).
- Tobias, R. (2013). Biomolecular Binding Kinetics Assays on the Octet Platform. *ForteBio Interactions*, Pall Life Sciences. Recuperado a partir de [http://www.fortebio.com/doc\\_download.html?docid=329&source=](http://www.fortebio.com/doc_download.html?docid=329&source=)
- Valencia-Sánchez, M. I., Rodríguez-Hernández, A., Ferreira, R., Santamaría-Suárez, H. A., Arciniega, M., Dock-Bregeon, A.-C., ... Torres-Larios, A. (2016). Structural Insights into the Polyphyletic Origins of Glycyl tRNA Synthetases. *Journal of Biological Chemistry*, 291(28), 14430–14446. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.730382>
- von Ehrenstein, G. (1967). [76] Isolation of sRNA from intact Escherichia coli cells. *Methods in Enzymology*, 12(PART A), 588–596. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(67\)12088-0](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(67)12088-0)
- Xiong, Y. y Steitz, T. A. (2004). Mechanism of transfer RNA maturation by CCA-adding enzyme without using an oligonucleotide template. *Nature*, 430(7000), 640–645. <https://doi.org/10.1038/nature02711>
- Yokogawa, T., Kitamura, Y., Nakamura, D., Ohno, S. y Nishikawa, K. (2009). Optimization of the hybridization-based method for purification of thermostable tRNAs in the presence of tetraalkylammonium salts. *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp1182>
- Zubay, G. (1962). The isolation and fractionation of soluble ribonucleic acid. *Journal of Molecular Biology*, 4(5), 347–356. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(62\)80015-1](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(62)80015-1)