



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Estudios bioquímicos y estructurales del complejo de la
bacGlyRS-tRNA

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
VICTORIA GODÍNEZ LÓPEZ

TUTOR PRINCIPAL:
Dr. Alfredo Torres-Larios
[Instituto de Fisiología Celular](#)

Miembros del comité tutor:
Dra. Adela Rodríguez Romero
Dra. Annia Rodríguez Hernández
Dr. Armando Hernández García
[Instituto de Química](#)

Ciudad de México. Junio, 2021



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Dr. Rudiño Piñera Enrique

VOCAL: Dr. Bustos Jaimes Ismael

VOCAL: Dr. Costas Basín Miguel Antonio

VOCAL: Dr. Servín González Luis

SECRETARIO: Dr. Sosa Peinado Alejandro

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

*Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Fisiología
Celular, Ciudad Universitaria, Circuito Exterior, 04510, México.*

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Alfredo Torres-Larios

SUSTENTANTE:

Victoria Godínez López

Agradecimientos

El proyecto se desarrolló en el laboratorio 205 sur del Instituto de Fisiología Celular en donde se agradece el apoyo:

Al Laboratorio Nacional de Estructura de Macromoléculas (LANEM) del Instituto de Química de la UNAM por su apoyo en la difracción de varios cristales.

A la Dra. Adela Rodríguez Romero por el apoyo brindado en los experimentos de difracción de rayos X y su asesoramiento en el proyecto como parte del comité tutor.

A la Dra. Annia Rodríguez Hernández por aceptar la participación en el comité tutor, así como por sus ideas y comentarios que ayudaron al proyecto.

Al Dr. Armando Hernández García por participar en el comité tutor.

A la Biol. Elizabeth Nallely Cabrera González por el patrocinio y apoyo en el proyecto durante tiempos de pandemia.

Al Lic. Eduardo Campos Chávez por haberme enseñado y entrenado en el laboratorio, así como por transmitir los conocimientos necesarios para poder haber desarrollado el proyecto.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM. Proyecto IN204820.

Dedicatorias

Al Dr. Alfredo Torres-Larios por su gran apoyo a nivel académico y personal, gracias por creer en mí y guiarme en este camino, alentándome a continuar con mis sueños.

A Bernardo A. Salcido Santacruz, quién me ha acompañado estos últimos 6 años de mi vida y me ha dado todo su apoyo incondicional, motivándome día a día a llegar más lejos, gracias por creer en mí y darme todo tu amor.

Índice

Lista de figuras	XV
Lista de tablas	XVI
Resumen	XVII
Abstract	XVIII
1. Introducción	1
1.1. Las aminoacil-RNA sintetasas son enzimas ancestrales	2
1.2. Las aaRSs provienen de dos ancestros diferentes	3
1.3. GlyRS, una enzima esencial que tuvo doble origen	5
1.3.1. Los dos tipos de GlyRS no se parecen entre sí	6
1.4. Cada sintetasa utiliza un mecanismo característico para el reconocimiento de su tRNA	10
2. Antecedentes	13
2.1. La subunidad beta es una subunidad multidominio	14
2.2. La bacGlyRS <i>podría</i> reconocer de manera completamente diferente a su tRNA	16
3. Planteamiento del problema	22
4. Hipótesis	24
5. Objetivos	25
5.1. Objetivo general	25
5.2. Objetivos particulares	25
6. Metodología	26
6.1. Transformación, expresión y purificación de la TdaxGlyRS	26

6.2.	Transformación, expresión y purificación de las variantes GlyRSaceptor y GlyRSanticodón	27
6.3.	Co-transformación, expresión y purificación de GlyRSaceptor + el ACBD	28
6.4.	Transformación, expresión y purificación de las enzimas AMP deaminasa, IMP deshidrogenasa y D-aminoacil-tRNA desacilasa	29
6.5.	Transformación, expresión y purificación del tRNAGly <i>T. daxensis</i>	30
6.5.1.	Extracción del tRNA	31
6.5.2.	Deacilación del tRNA	31
6.5.3.	Purificación del tRNA	31
6.6.	Replegamiento del tRNA	34
6.7.	Ensayos de fluorimetría diferencial de barrido (Thermal Shift Assays)	34
6.8.	Ensayos de cristalización	35
6.8.1.	TdaxGlyRS	37
6.8.2.	GlyRSaceptor	37
6.9.	Prueba con aditivos	38
6.10.	Microseeding	39
6.11.	Sembrado cruzado (cross-seeding)	39
6.12.	Deshidratación de cristales	40
6.13.	Ensayos de difracción de rayos X	41
6.14.	Actividad	41
6.14.1.	Reacciones acopladas empleando NAD ⁺	41
6.14.2.	Interferometría de biocapa (BLI)	42
6.15.	Afinidad de la GlyRS por su tRNA	44
7.	Resultados	45
7.1.	La GlyRS y GlyRSaceptor se purifican en uno o dos pasos con altos rendimientos	45
7.2.	Se puede optimizar la purificación del tRNA	46
7.3.	La variante GlyRSaceptor es estable a pH básico, mientras que la GlyRSanticodón lo es a pH ácido	49
7.4.	La variante GlyRSaceptor es más estable en presencia de tRNA	51
7.5.	La GlyRSaceptor y el tRNA wt no forman un complejo estable	52
7.6.	La variante GlyRSaceptor no forma un complejo estable con el dominio de reconocimiento del anticodón (ACBD)	53
7.7.	La interacción tetraloop-receptor (RNA-RNA) favorece la cristalización	55
7.8.	El análogo del estado de transición ayuda a la formación del complejo	57
7.9.	Se encontró una nueva condición de cristalización mediante sembrado cruzado (cross-seeding)	59

7.9.1. Colecta y faseo de los cristales	60
7.9.2. Deshidratación, colecta y faseo de los cristales	61
7.10. Búsqueda de estrategias para medir la actividad de la GlyRS	62
7.10.1. La actividad se podría determinar mediante reacciones acopladas	63
7.10.2. Es posible monitorear la acilación del tRNA por interferometría de biocapa (BLI)	70
8. Discusión	73
8.1. La variante GlyRSacceptor es más estable con respecto a la GlyRSanticodón	73
8.2. Se necesita flexibilidad en los dominios de la subunidad beta para un reconocimiento total del tRNA	74
8.3. El par tRNAreceptor:tRNA tetraloop ayudó a obtener cristales en presencia de la GlyRSacceptor y GSA	74
8.4. La técnica de sembrado cruzado permite obtener nuevas condiciones de cristalización	75
8.5. Los cristales del complejo ternario no pueden ser resueltos por reemplazo molecular	76
8.6. Es posible monitorear el contraste tRNA-aa:tRNA por BLI	77
9. Conclusiones	79
10. Perspectivas	80
11. Apéndice A	81
11.1. Secuencia de aminoácidos de las nuevas construcciones	81
11.2. Secuencias tRNAreceptor y el tRNA tetraloop	83
11.3. Plásmidos empleados para la expresión <i>in vivo</i> de bacGlyRS, sus mutantes y los tRNAs modificados	83
11.4. Condiciones de cristalización encontradas durante el proyecto	86

Lista de figuras

- 1.1. **La aminoacilación del tRNA se realiza en dos pasos.** a) La aaRS une su aminoácido y un ATP para generar el aminoacil-adenilato. b) La aaRS reconoce a su tRNA cognado para poder transferir el aminoácido al extremo 3' del tRNA, en la adenina 76 dentro de uno de los grupos hidroxilos (2' o 3') de la ribosa, generando el aminoacil-tRNA 3
- 1.2. **Las aminoacil-tRNA sintetasas se dividen en dos clases no homólogas.** Cada clase tiene 10 sintetasas y a su vez éstas se dividen en subclases de acuerdo a la similitud de los demás dominios. En la figura se muestra el estado oligomérico y el peso molecular de cada enzima, siendo la glicil-tRNA sintetasa bacteriana, la más grande de todas. Las sintetasas de clase I generalmente unen al tRNA por el surco menor (morado) y las de clase II por el surco mayor (azul). Aún no se conoce la forma de unión de la glicil-tRNA sintetasa bacteriana con su tRNA; lo que se observa en la figura es un modelo propuesto. * La alanil-tRNA sintetasa (AlaRS), clase II, se encuentra como dímero o tetramero; el dímero sólo se ha observado en la estructura reportada del complejo de la enzima completa con tRNA (código PDB 1IL2). 5
- 1.3. **Existen dos tipos de GlyRS.** a) GlyRS homodimérica, presente en los tres dominios de la vida (Eukarya, Archaea y algunas especies de Bacteria), b) GlyRS heterotetramérica, presente en la mayoría de las Bacterias. 6

- 1.4. **Las GlyRSs sólo comparten el plegamiento del dominio catalítico.** a) GlyRS homodimérica, presente en los tres dominios de la vida, la cual muestra el dominio catalítico en color cian. b) GlyRS heterotetramérica, presente en la mayoría de las bacterias con su dominio catalítico en color cian. c) GlyRS eucarionte con un giro de 90° , cada monómero tiene diferente color. d) La GlyRS bacteriana tiene cuatro subunidades: 2 alfa y 2 beta. Cada subunidad alfa tiene 289 residuos, cada monómero tiene diferente color: azul y verde intenso; la subunidad alfa contiene el dominio catalítico, el cual comparte con su contraparte eucariota sólo a nivel de plegamiento general. Cada subunidad beta tiene 691 residuos y cada monómero se muestra en diferente color, color azul cielo y verde claro. La subunidad beta participa en el reconocimiento del tRNA. 8
- 1.5. **La GlyRSbac se parece más a la AlaRS que a su contraparte eucariota** a) Dominio catalítico de la GlyRSbac de *Thermoanaerobaculum* *daxensis* (PDB 7LU4) en presencia de glicina (residuos 4-21 y 53-174), con un total de 138 residuos que fueron alineados con la GlyRS-euk (PDB 2ZT7) (residuos 103-120, 269,276, 291-301, 349-411 y 518-537), con un total de 113 residuos. El alineamiento se realizó con el servidor DALÍ obteniendo un z score de 14.9 y un rmsd de 2.7 Å b) Se emplearon los mismos aminoácidos de la subunidad alpha de la GlyRSbac para alinearse con el dominio catalítico de la AlaRS (PDB 2ZZG) (residuos 62-76, 119-219 y 231-256), con un total de 144 residuos, resultando un z score 19.5 de y un rmsd de 2.3 Å. c) Comparación de los aminoácidos que participan en el reconocimiento de la glicina entre la GlyRSeuk (amarillo) y la GlyRSbac (azul). d) Comparación de los aminoácidos que participan en el reconocimiento de la alanina para la AlaRS (magenta) y para la glicina en la GlyRSbac (azul) 9
- 1.6. **El reconocimiento de los tRNAs tiene factores principales que son responsables de la precisión de su reconocimiento.** a) Representación 3D de un tRNA junto con los determinantes y antideterminantes de identidad que contribuyen al reconocimiento por parte de las sintetasas. b) Las sintetasas de clase I reconocen el surco menor del tRNA (morado), mientras que las de clase II reconocen el surco mayor (azul), tal y como se observa en la figura 1.2. 11

- 1.7. **El dominio aceptor del tRNA es la parte más antigua de esta molécula.** Molécula de RNA que se conocía como pre-tRNA, el cual pudo haber sido reconocido por proteínas para llevar a cabo la aminoacilación en su extremo 3'; el gen que expresaba esta minihélice de tRNA pudo haber tenido una duplicación y fusión, generando el tRNA actual con dos dominios: aceptor y anticodón. 12
- 2.1. **La subunidad beta tiene cuatro dominios que comparte con enzimas de unión a ácidos nucleicos.** Se muestra la subunidad beta de la bacGlyRS dividida en cuatro dominios que se encuentran presentes en otras enzimas que participan en el metabolismo de RNA: la enzima de adición CCA en tRNAs (dominio magenta); el dominio palma que se encuentra en enzimas como la DNA polimerasa alpha, la RNA polimerasa L, DNA polimerasa II (dominio verde); un dominio HD presente en enzimas como la nucleotidiltransferasa y poli A polimerasa, con actividad de fosfohidrolasa (dominio azul); el dominio de unión del anticodón (ACBD) de sintetasas de clase I (dominio rojo), lo cual representa un caso único de hibridación entre las aaRSs de clase I y II. Las zonas coloreadas en una tonalidad baja, son aquellas que no se superponen con los dominios de sus homólogos. 16
- 2.2. **Los dominios 1 y 4 de la GlyRSbac podrían interactuar con el tRNA**
 a) Superposición del dominio 1 de la subunidad beta con los dominios cuerpo y cola de la enzima de adición CCA de clase I (código PDB 1SZ1, z-score=7.4, rmsd=3.1 Å, 135 aa superpuestos). b) Superposición del dominio 4 de la subunidad beta con el dominio DARL, que reconoce el anticodón del tRNA por parte de las aaRSs de clase I; en la figura se representa a la MetRS (código PDB 2CSX, z-score=4.8, rmsd=4.2 Å, 160 aa superpuestos). 17
- 2.3. **Modelo de reconocimiento del tRNA por la GlyRSbac.** La posición del tRNA encaja en la cavidad de la subunidad beta, donde el dominio tipo cola de las enzimas de adición del CCA interactuaría con el bucle T del tRNA; se observa un posible reconocimiento de todo el tallo aceptor del tRNA, posicionando el extremo CCA cerca del análogo glicil-adenilato (GSA o G5A). Por otro lado, el dominio tipo DARL de las aaRSs de clase I se encuentra en distancia para interactuar con el bucle del anticodón. 19

- 2.4. **La bacGlyRS podría reconocer a su tRNA de manera diferente al resto de las sintetasas.** Complejos de las aaRSs de clase II con su tRNA reportados por cristalografía de rayos X, donde se muestra a cada sintetasa con la misma orientación de su dominio catalítico, el cual consta de una hoja beta de 7 hebras. La orientación del tRNA por parte de las sintetasas de clase II es la misma, con excepción de la AlaRS y la bacGlyRS, las cuales pudieron haber sido de las primeras aaRSs debido a que no tienen la forma de reconocimiento que presenta el resto de las aaRSs. 21
- 3.1. **Diseño de dos mutantes.** a) La información proporcionada por la subunidad beta nos permitió encontrar dos puntos de reconocimiento del tRNA (anticodón y tallo aceptor). b) Mutante que podría reconocer el anticodón del tRNA. c) Mutante que podría reconocer el tallo aceptor del tRNA. 23
- 6.1. **Estrategias de cristalización empleadas para la obtención del complejo bacGlyRS-tRNA** Se emplearon diversas estrategias, empezando con la proteína wt junto con su tRNA cognado, ambos del mismo organismo, sin embargo, no se lograron obtener cristales de complejo. Posteriormente se diseñaron mutantes, de las cuales la GlyRSaceptor mostró tener mayor estabilidad con el tRNA, dado esto, se realizaron diferentes ensayos de cristalización con esta mutante en complejo con el tRNA wt y tRNAs modificados. 36
- 7.1. **La GlyRS y la GlyRSaceptor se purifican en uno o dos pasos.** a) Purificación de la GlyRS wt. Gel SDS-PAGE al 8%. La proteína se obtiene con un alto grado de pureza después de dos pasos. b) Purificación de la GlyRSaceptor. Gel SDS-PAGE al 10%. Se obtiene a la proteína con un alto grado de pureza en un solo paso. c) Purificación de la GlyRSanticodón. Gel SDS-PAGE al 10%. Definición de abreviaturas: sobre: sobrenadante después de centrifugar el lisado; N.A.: fracción que no se unió a la columna; Ni-NTA: fracción que se unió a la columna y después fue eluida; 72 °C: fracción colectada después de precipitar contaminantes a 72 °C por 30 min. 46

- 7.2. **Cada tRNA se purifica de diferente forma.** El tRNA se sobre-expresa *in vivo* y se han diseñado diversas estrategias para su purificación, de tal forma que se obtenga con la menor cantidad de pasos. Con el tRNA wt se desarrollaron tres estrategias diferentes, siendo la ultracentrifugación la mejor opción. Para los tRNAs modificados se utilizan además geles desnaturizantes. a) Purificación del tRNA wt, primer carril se empleó dos columnas, una Topoyearl-butyl y una SourceQ, en el segundo carril se purificó mediante un gel de electroforesis UREA-PAGE al 16%; en el tercer carril se purificó por ultracentrifugación, b) Purificación del tRNA tetraloop: en el primer carril se muestra después de la ultracentrifugación y en el segundo carril el carril se purificó mediante un gel de electroforesis UREA-PAGE al 14%, c) Purificación del tRNA receptor: en el primer carril se muestra después de la ultracentrifugación y en el segundo carril se encuentra la banda purificada por geles UREA-PAGE al 18%, d) Purificación del tRNA receptor mediante cromatografía de intercambio aniónico, empleando una columna Mono Q. Se realizó un gradiente de 0-1 M de NaCl, las primeras fracciones empezaron a salir al 54% B y se visualizaron en un gel UREA-PAGE al 18%. 48
- 7.3. **Búsqueda del amortiguador para estabilizar a las mutantes** Curvas de desnaturalización obtenidas mediante fluorimetría diferencial de barrido. Se muestran las curvas con los componentes que implican una mejora a) Kit de solubilidad y estabilidad 1 (S&S1) de Hampton Research para la GlyRS-anticodón. b) S&S1 para GlyRS-aceptor, c) S&S2 para la GlyRS-aceptor, d) S&S2 para la GlyRS-anticodón 50
- 7.4. **La variante GlyRSaceptor es más estable en presencia del tRNA.** Curva de fluorimetría diferencial de barrido donde se observa que la GlyRS-aceptor (azul) tiene una T_m de 79.91 °C en 50 mM Tris pH 8.0, 50 mM betaína y tRNA a una relación 1:1.2 mol a comparación del control donde se encuentra la mutante sola con 75.5 °C; para la variante GlyRSanticodón (rojo) se obtuvo una T_m de 63.34 °C en 50 mM ácido succínico pH 5.5, 20 mM L-arg y 1:1.2 mol de tRNA con respecto a la proteína sola, que tiene una T_m de 67.3 °C. 51

- 7.5. **La GlyRSaceptor y el tRNA no eluyen al mismo tiempo en la columna de exclusión molecular.** Para la separación del complejo se emplearon dos columnas Superdex 200 conectadas en serie. Los cromatogramas muestran: a) Condición encontrada por los ensayos de desplazamiento térmico: 50 mM Tris pH 8.0, 50 mM betaína, b) Aumento de la fuerza iónica utilizando la betaína: 50 mM Tris pH 8.0, 50 mM betaína-HCl, c) Disminución de la fuerza iónica: 50 mM Tris pH 8.0, d) Gel UREA-PAGE 14 %, en el cual se visualizan las fracciones eluídas en el cromatograma (a), el gel fue teñido con Toluidina 53
- 7.6. **La GlyRSaceptor no forma un complejo estable con el dominio ACBD para reconstituir a la GlyRS completa** a) Representación de las dos partes en que se dividió la GlyRS para que tuviera mayor movilidad al reconocer el tRNA; por un lado esta la GlyRSaceptor (magenta) y por el otro el dominio que podría reconocer al anticodón: only ACBD (cian) b) Gel SDS-PAGE 8 % donde se cargaron las diferentes fracciones eluídas de la columna de níquel; ambas proteínas eluyen por separado. 55
- 7.7. **La interacción tetraloop-receptor como estrategia de cristalización** a) Representación esquemática de la interacción de las moléculas de RNA mediante secuencias modificadas (receptor y tetraloop), favoreciendo el empaquetamiento de las moléculas para la generación de cristal (PDB 3Q1Q). b) Modelo de la GlyRSaceptor con el tRNA tetraloop, donde muestra la secuencia de tetraloop libre para interactuar con la secuencia receptor del otro tRNA. 56
- 7.8. **Posible arreglo de las moléculas dentro del cristal.** Idealmente, la molécula de GlyRSaceptor podría estar uniendo a uno de los tRNAs modificados con la secuencia del receptor, mientras que otra GlyRSaceptor podría interactuar con un tRNA con la secuencia del tetraloop. El par tRNAreceptor:tRNA tetraloop interactuaría entre sí. . 60

- 7.9. **Esquema de las reacciones acopladas para la medición de la actividad de la GlyRS** a) La reacción principal se conforma de dos pasos: 1) Activación del aminoácido con ATP, generando Gly-AMP 2) Adición de Gly al extremo 3' del tRNA liberando el AMP. b) El AMP liberado después de la aminoacilación del tRNA es transformado en dos reacciones: 1) El AMP es transformado a IMP mediante la enzima AMP deaminasa 2) La IMP es reducida a XMP por la enzima IMP deshidrogenasa, empleando β - NAD⁺ como sustrato, siendo la reacción que genera la señal de medición. c) Reacción acoplada para la regeneración del tRNA mediante la enzima D-aminoacil-tRNA desacilasa, que retira la glicina del tRNA. 64
- 7.10. **Pruebas de expresión para la enzima AMP deshidrogenasa.** Todos los geles son SDS-PAGE al 10%. a) Prueba de expresión de la enzima AMD de *S. cerevisiae*, en donde se colocaron tres fracciones: lisado total, pastilla y sobrenadante de un cultivo sin inducir (azul) y un inducido (rojo). a) Pareciera tener expresión, ya que hay una banda en aproximadamente 100 KDa en el lisado y la pastilla inducidos, a comparación del no inducido; sin embargo, el resultado no es claro. b) Mismo gel que en (a), pero añadiendo 200 μ M Zn(AcO)₂, el cual no ayudó, ya que ni siquiera se ve la banda a 100 KDa del gel anterior. c) Prueba de expresión de la enzima de *A. oryzae* con dos diferentes tiempos de inducción, en el cual aparece una pequeña banda cerca de 100 KDa en la fracción inducida durante 4 h a comparación de las demás. d) Se modificaron las condiciones de expresión, en donde se puede observar claramente la expresión de la enzima AMD, ya que se ve una banda más intensa en las fracciones inducidas cerca de la banda de 100 KDa en la fracción de la pastilla. 66

- 7.11. **Las enzimas para la medición de actividad se purificaron en un solo paso.** a) Gel SDS-PAGE al 10 % de la AMP deaminasa; en el primer carril se encuentra la fracción no absorbida por la columna y en los siguientes están las fracciones eluidas por el gradiente de imidazol; sólo se tomaron las últimas 3 fracciones. b) Gel SDS-PAGE 12 %, donde se muestra la purificación de la IMP deshidrogenasa; en el primer carril está la fracción no soluble después de la lisis; en el segundo está la fracción soluble, en el tercero está la fracción no absorbida por la columna y en los carriles restantes se cargaron las fracciones eluidas por el gradiente de imidazol; sólo se tomaron las últimas 3 fracciones. c) Gel SDS-PAGE 18 % de la D-aminoacil-tRNA desacilasa; se observan tres fracciones: en el primer carril están las proteínas no solubles, en el segundo lo soluble y en el tercero esta la fracción eluída de la columna de níquel. 68
- 7.12. **Las enzimas AMD e IMD transforman el AMP a XMP.** La gráfica muestra la señal, medida a 340nm, de la producción de NADH a través de la reacción de transformación del AMP a XMP, tal y como se muestra en el esquema de reacción inferior. La reacción mostrada corresponde a la primera reacción acoplada de la figura 7.9b. En el ensayo se puso un control negativo usando ATP. De las gráficas se pudo inferir que las enzimas trabajan adecuadamente. 69
- 7.13. **Los biosensores AR2G permiten monitorear tRNA acilado** a) Esquema que representa la unión del tRNA-gly (o cualquier tRNA aminoacilado) al biosensor AR2G mediante una reacción nucleofílica del grupo amino libre de la glicina al carboxílo activado del biosensor. b) sensorgrama de los biosensores AR2G con dos muestras de RNA. Primero se observa la línea base, en donde están los biosensores en agua; posteriormente, se activa al ácido carboxílico del biosensor con 20 mM de EDC y 10 mM Sulfo-NHS para generar un grupo saliente; finalmente, el biosensor se pone en contacto con la muestra de RNA, el cual se unirá al mismo si está el grupo amino libre de algún aminoácido (tRNA-aa), mientras que para el tRNA deacilado no se observa unión y de hecho la señal disminuye. 72
- 11.1. **Plásmido empleado para expresar a la bacGlyRSwt.** Se empleo el vector de expresión pD861 con resistencia a kanamicina y con un promotor inducible con rhamnosa. 84

11.2. **Plásmido empleado para expresar a al tRNA receptor.** Se empleo el vector de expresión pM268 con resistencia a ampicilina y con un promotor inducible con IPTG. 85

Lista de tablas

- 7.1. La adición de G5A genera cristales del posible complejo. Los cristales fueron optimizados mediante dos rondas de aditivos. 59
- 7.2. Estadísticas de la colecta de datos a 4.5 Å del cristal obtenido a partir de la mezcla GlyRSacceptor:tRNAs:G5A. 62
- 7.3. Métodos diseñados para medir la actividad de la GlyRS en el segundo paso de aminoacilación. 71

Resumen

Los seres vivos conocidos se dividen en tres dominios (arquea, bacteria y eucaria), con un único origen que asume la existencia de un Ancestro Común Universal (LUCA, por sus siglas en inglés), el cual contenía los genes esenciales para la vida, presentes en la actualidad en la mayoría de los organismos. Se puede especular que LUCA no tenía duplicaciones de genes esenciales; sin embargo, se conoce al menos una proteína primigenia que tuvo un doble origen: la glicil-tRNA sintetasa (GlyRS). Muchos trabajos sugieren que sólo existía una GlyRS en LUCA, por lo que la pregunta central es si es posible proponer cuál de las dos enzimas surgió primero. En trabajos previos del laboratorio, se determinó la estructura tridimensional de la enzima bacteriana (GlyRSbac), la cual nos permitió proponer un modelo de reconocimiento de su tRNA, el cual podría ser muy diferente al resto de las aminoacil tRNA sintetetasas (aaRSs). El análisis de la estructura y el hallazgo de múltiples dominios ancestrales nos permite proponer que la GlyRSbac puede ser la enzima que de hecho precedió a todas las aaRSs.

En el presente trabajo, se buscó demostrar el modelo propuesto del complejo de la GlyRSbac con su tRNA a través de la obtención de su estructura cristalográfica. Para ello, por un lado se modificó a la proteína, utilizando dos construcciones de la GlyRS con distintos dominios eliminados. Por otro lado, se diseñaron tRNAs modificados para favorecer la formación de cristales. Gracias a ello y al uso de un análogo del estado de transición (GSA), se obtuvieron cristales del complejo putativo, los cuales difractaron a 4.5 Å en el sincrotrón Advanced Photon Source (APS). De manera sorprendente, con el juego de datos obtenido no se logró resolver la estructura por reemplazo molecular, lo que sugiere un posible cambio conformacional, tanto en la proteína como en el tRNA, por lo que la principal perspectiva de este estudio es mejorar la calidad de los cristales para incrementar su resolución y/o resolver la estructura a través de la búsqueda de átomos pesados.

Abstract

All known living organisms are divided into three domains (archaea, bacteria, and eucaria), with a single origin that implicates the existence of a Universal Common Ancestor (LUCA), which contained the genes essential to life, which are present today in all organisms. It can be speculated that LUCA had no duplicates of essential genes; however, at least one essential protein that had a double origin is known: glycyl-tRNA synthetase (GlyRS). Many papers suggest that there was only one GlyRS in LUCA, so the central question is whether it is possible to propose which one of the two enzymes, if any, came first. Previously, the three-dimensional structure of the bacterial enzyme (GlyRSbac) was determined, which allowed us to propose a model of tRNA recognition, which could be very different from the rest of the aminoacyl tRNA synthetases (aaRSs). The analysis of the structure and the discovery of multiple ancestral domains in the molecule, allows us to propose that GlyRSbac may be the enzyme that preceded all aaRSs.

In this work, we sought to demonstrate the proposed model of GlyRSbac-tRNA complex using X-ray crystallography. To accomplish this, we used two constructions of the GlyRS with different domains removed. We also designed modified tRNAs to favor the formation of crystals. Thanks to this and to the use of an analogue of the transition state, crystals were obtained from the putative complex, which diffracted to 4.5Å in the Advanced Photon Source (APS) synchrotron. Surprisingly, we could not solve the structure with the dataset obtained by molecular replacement, suggesting a possible conformational change, both in the protein and the tRNA, so the main perspective of this study is to refine the crystal quality to improve the resolution and/or to solve the structure through the search of heavy atoms.

| Introducción

El origen de la vida ha sido una incógnita que se ha buscado entender a lo largo del tiempo; se cree que uno de los primeros pasos fue la transición de moléculas orgánicas a moléculas esenciales para generar y preservar la vida, como los ácidos nucleicos y proteínas. La hipótesis del mundo de RNA sugiere que primero surgieron moléculas de RNA en un mundo prebiótico [Shapiro, 1987, Shapiro, 2007]. También es posible considerar el hecho de que las proteínas pudieron surgir de manera paralela a las moléculas de RNA, en un mundo de ribonucleoproteínas (RNPs) ejemplificado por moléculas como el ribosoma, el spliceosoma y la RNasa P [Higgs and Lehman, 2015, Fox, 2010]. En algún punto del origen de la vida tuvieron que coexistir ambos tipos de moléculas y esto fue antes de que las proteínas y los ácidos nucleicos (DNA y RNA) se encontraran en LUCA (Last Universal Common Ancestor), el organismo del cual se derivaron todas las demás formas de vida conocidas en la actualidad. LUCA ya era un organismo bastante complejo, que contaba con la maquinaria esencial para llevar a cabo funciones básicas del metabolismo energético, protección celular, replicación, metabolismo de RNA, etc., con al menos un grupo de aproximadamente 300 genes [Koonin, 2003], los cuales se consideran genes esenciales. Entre las enzimas esenciales se encuentran algunas aminoacil-tRNA sintetasas (aaRSs), que llevan a cabo

la aminoacilación del tRNA, indispensable para la síntesis de proteínas [Koonin, 2003]. Debido a que se cree que LUCA tenía pocos genes, se asume que no contenía genes duplicados, por lo que existía un solo gen por cada función esencial. Una excepción se podría encontrar en la glicil tRNA sintetasa (GlyRS). En la actualidad se conocen dos tipos de esta enzima que no comparten un origen común [Valencia-Sánchez et al., 2016, Tang and Huang, 2005], el cual pudo ser paralelo en LUCA o en diferentes eventos temporales.

En la actualidad, se conoce la estructura tridimensional de un tipo de GlyRS (eucariota) incluso en complejo con su tRNA cognado [Qin et al., 2014]. Se conoce también la estructura del otro tipo de GlyRS (bacteriana, datos sin publicar). Conocer la estructura del complejo de la GlyRS bacteriana (bacGlyRS) junto con su tRNA ofrecería mayor información sobre su origen, ya que ciertas características de esta enzima sugieren que podría reconocer a su tRNA de manera completamente diferente a las demás sintetasas (ver más adelante).

1.1. Las aminoacil-RNA sintetasas son enzimas ancestrales

Las aminoacil-RNA sintetasas (aaRSs) son enzimas que participan en el proceso de traducción, llevando a cabo la aminoacilación de su tRNA cognado [Ibba and Söll, 2000]. Las aaRSs aminoacilan el tRNA en dos pasos: 1) La aaRS reconoce a su aminoácido y posteriormente lo activa con una molécula de ATP, generando un intermediario de alta energía, llamado aminoacil-adenilato (Figura 1.1a). 2) Se transfiere el aminoacil-adenilato a la A76 en el extremo 3' del tRNA hacia uno de los grupos hidroxilo (2' o 3') de la ribosa, liberando AMP al medio para generar el

aminoacil-tRNA (Figura 1.1b).

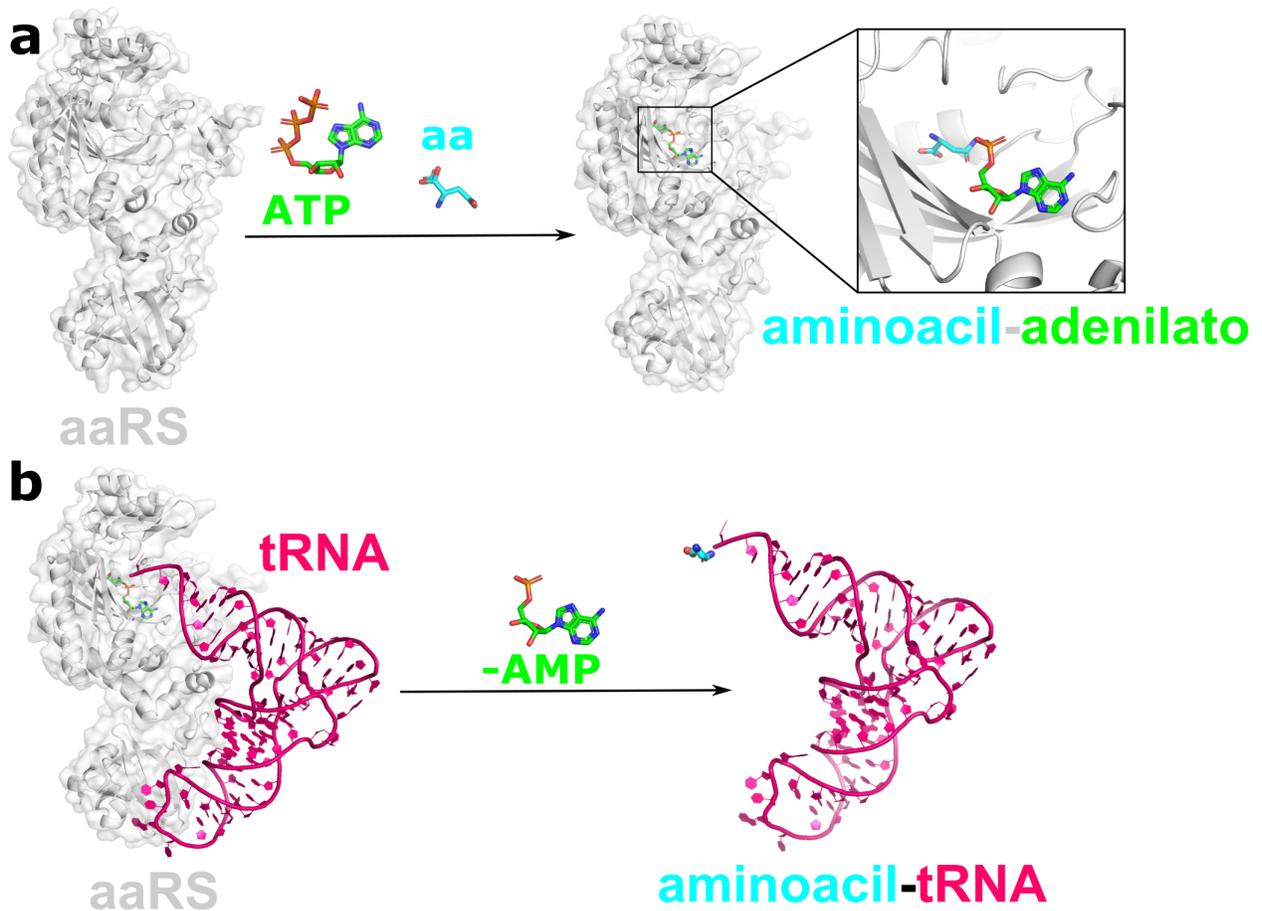


Figura 1.1. La aminoacilación del tRNA se realiza en dos pasos. a) La aaRS une su aminoácido y un ATP para generar el aminoacil-adenilato. b) La aaRS reconoce a su tRNA cognado para poder transferir el aminoácido al extremo 3' del tRNA, en la adenina 76 dentro de uno de los grupos hidroxilos (2' o 3') de la ribosa, generando el aminoacil-tRNA

1.2. Las aaRSs provienen de dos ancestros diferentes

Las aminoacil-tRNA sintetasas se dividen en dos clases no homólogas con 10 sintetasas cada una, las cuales fueron generadas por evolución divergente a partir de dos sintetasas principales [Eriani et al., 1990, Wetzel, 1995]. La separación de las aaRSs en dos clases fue hecha con base en sus diferencias a nivel de secuencia, estructura del dominio catalítico y estado oligomérico (Figura 1.2)[Cusack, 1993, Arnez et al., 2000];

lo único que comparten ambas clases es el tipo de reacción que catalizan. Cada clase de sintetasa a su vez se divide en subclases de acuerdo a la homología estructural y en secuencia de los dominios que participan en el reconocimiento del tRNA (Figura 1.2) [Arnez et al., 2000].

Las aaRSs de clase I generalmente se encuentran como monómeros (Figura 1.2-izquierda), con excepción de la TyrRS y la TrpRS, que son dímeros debido a que el tRNA interactúa con la región N-ter de una subunidad y con la región C-ter de la otra subunidad [Hountondji et al., 1986]. Las sintetasa de clase I adoptan un plegamiento de Rossmann: un dominio de unión a nucleótidos que consiste en cinco hojas beta antiparalelas que son conectadas por hélices. Estas enzimas también se caracterizan por tener dos pequeñas secuencias consenso: HIGH y KMSKS, que participan en el reconocimiento del aminoácido y del ATP [Delagoutte et al., 2000, Cusack, 1993].

Por otro lado, las aaRSs de clase II (Figura 1.2-derecha) tienden a encontrarse como dímeros y tienen 7 hebras formando una hoja beta antiparalela flanqueada por alfa hélices con 3 motivos estructurales altamente conservados (motivos 1, 2 y 3), que participan en oligomerización y en el reconocimiento del ATP y del aminoácido [Cusack, 1993, Moor et al., 2006, O'Donoghue and Luthey-Schulten, 2003].

La diferencia estructural del sitio activo en las dos clases de sintetasa conlleva una distinta regioselectividad al aminoacilar la ribosa de la adenina terminal del extremo 3' del tRNA; las sintetasa de clase I llevan a cabo la reacción en el 2'OH, mientras que las de clase II lo hacen en el 3'OH [Ibba and Söll, 2000, Safro and Klipcan, 2013].

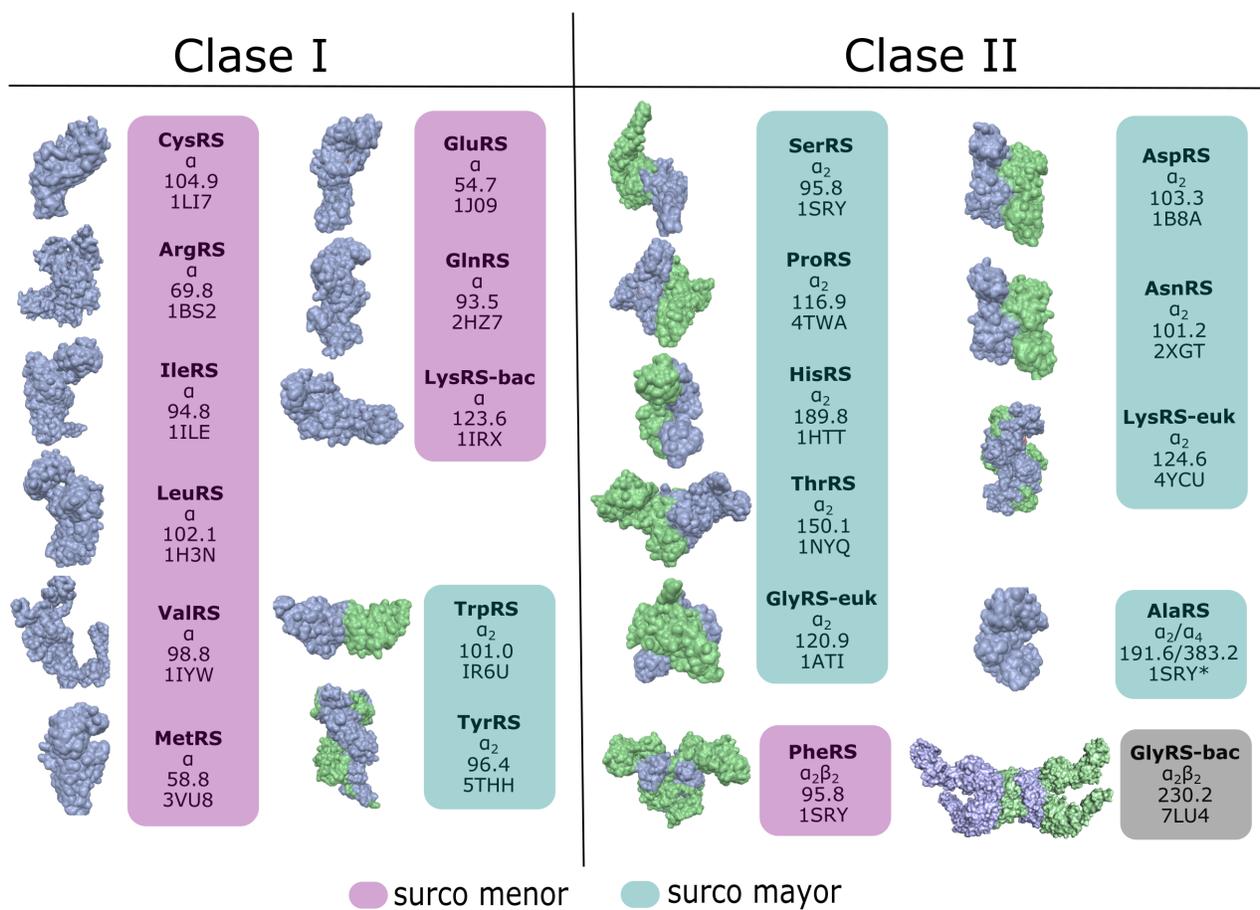


Figura 1.2. Las aminoacil-tRNA sintetasas se dividen en dos clases no homólogas. Cada clase tiene 10 sintetasas y a su vez éstas se dividen en subclases de acuerdo a la similitud de los demás dominios. En la figura se muestra el estado oligomérico y el peso molecular de cada enzima, siendo la glicil-tRNA sintetasa bacteriana, la más grande de todas. Las sintetasas de clase I generalmente unen al tRNA por el surco menor (morado) y las de clase II por el surco mayor (azul). Aún no se conoce la forma de unión de la glicil-tRNA sintetasa bacteriana con su tRNA; lo que se observa en la figura es un modelo propuesto. * La alanil-tRNA sintetasa (AlaRS), clase II, se encuentra como dímero o tetrámero; el dímero sólo se ha observado en la estructura reportada del complejo de la enzima completa con tRNA (código PDB 1IL2).

1.3. GlyRS, una enzima esencial que tuvo doble origen

Se cree que LUCA tenía unos 300 genes esenciales [Koonin, 2003] y sólo tenía un gen por cada enzima o función. Sin embargo, se conocen dos tipos de una enzima esencial, la glicil-tRNA sintetasa (GlyRS), que no comparten el mismo ancestro [Valencia-Sánchez et al., 2016]. Debido a que existen dos tipos de GlyRS, nos podemos

preguntar si hubo una coexistencia en LUCA de ambas enzimas o bien, si una surgió primero que la otra. Un tipo de GlyRS se encuentra presente en los 3 dominios de la vida (Eukarya, Archaea y algunas especies de Bacteria), mientras que la otra está presente en la mayoría de las bacterias Eukarya, [Valencia-Sánchez et al., 2016], (Figura 1.3); se podría sugerir que la enzima presente en todos los dominios de la vida es la más antigua. No obstante, la comparación entre ambos tipos de GlyRS también podría sugerir lo contrario, como se explica a continuación.

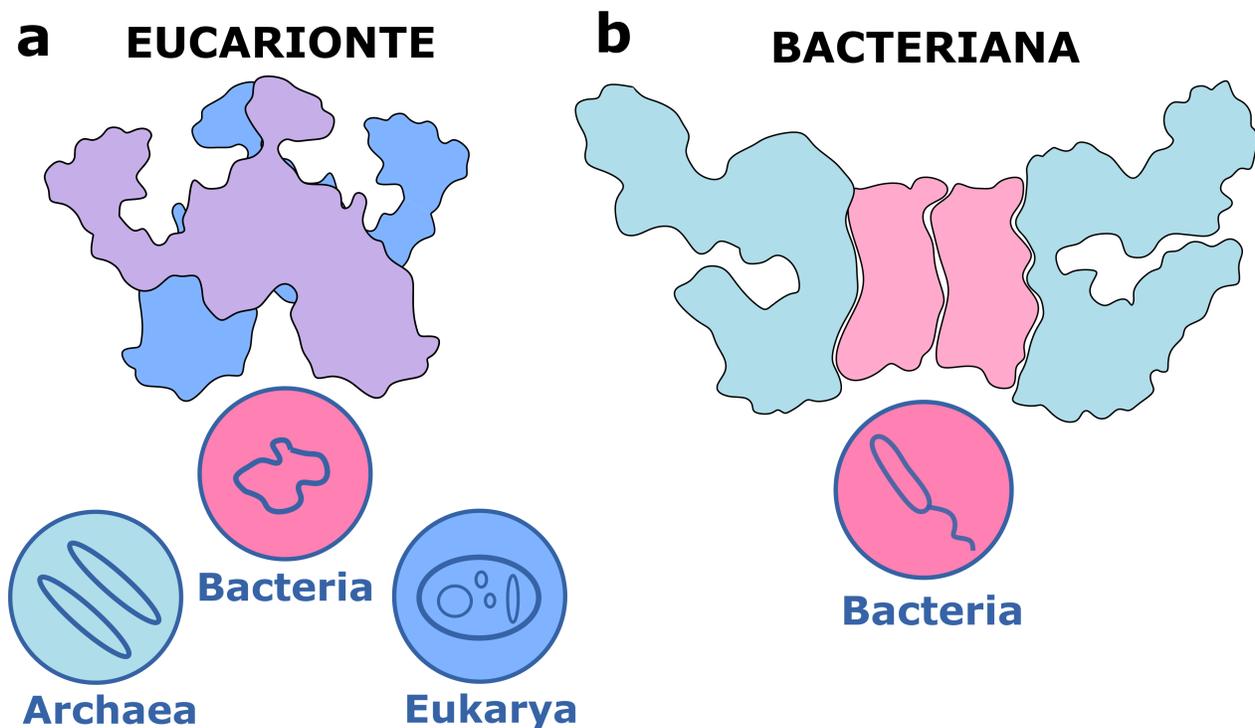


Figura 1.3. Existen dos tipos de GlyRS. a) GlyRS homodimérica, presente en los tres dominios de la vida (Eukarya, Archaea y algunas especies de Bacteria), b) GlyRS heterotetramérica, presente en la mayoría de las Bacterias.

1.3.1. Los dos tipos de GlyRS no se parecen entre sí

La poca similitud a nivel de secuencia entre ambas GlyRS, la cual es del 14% [Tang and Huang, 2005] indica que no tienen un mismo origen; sin embargo, ambas

GlyRS se encuentran dentro de la misma clase de sintetasas (clase II); si bien ambas moléculas tienen el mismo plegamiento del dominio catalítico, muchos de los residuos característicos del mismo son diferentes (ver más abajo) (Figura 1.5a); cada tipo de GlyRS se encuentra en una subclase distinta, lo cual implica la existencia de un ancestro diferente. La eukGlyRS se encuentra en la subclase IIa, junto con la SerRS, ProRS, HisRS y ThrRS, ya que comparten el dominio de unión al anticodón del tRNA, mientras que la bacGlyRS se encuentra en la clase IId junto con la AlaRS [Valencia-Sánchez et al., 2016], porque comparten una mayor similitud a nivel de secuencia y estructura del dominio catalítico (Figura 1.5b).

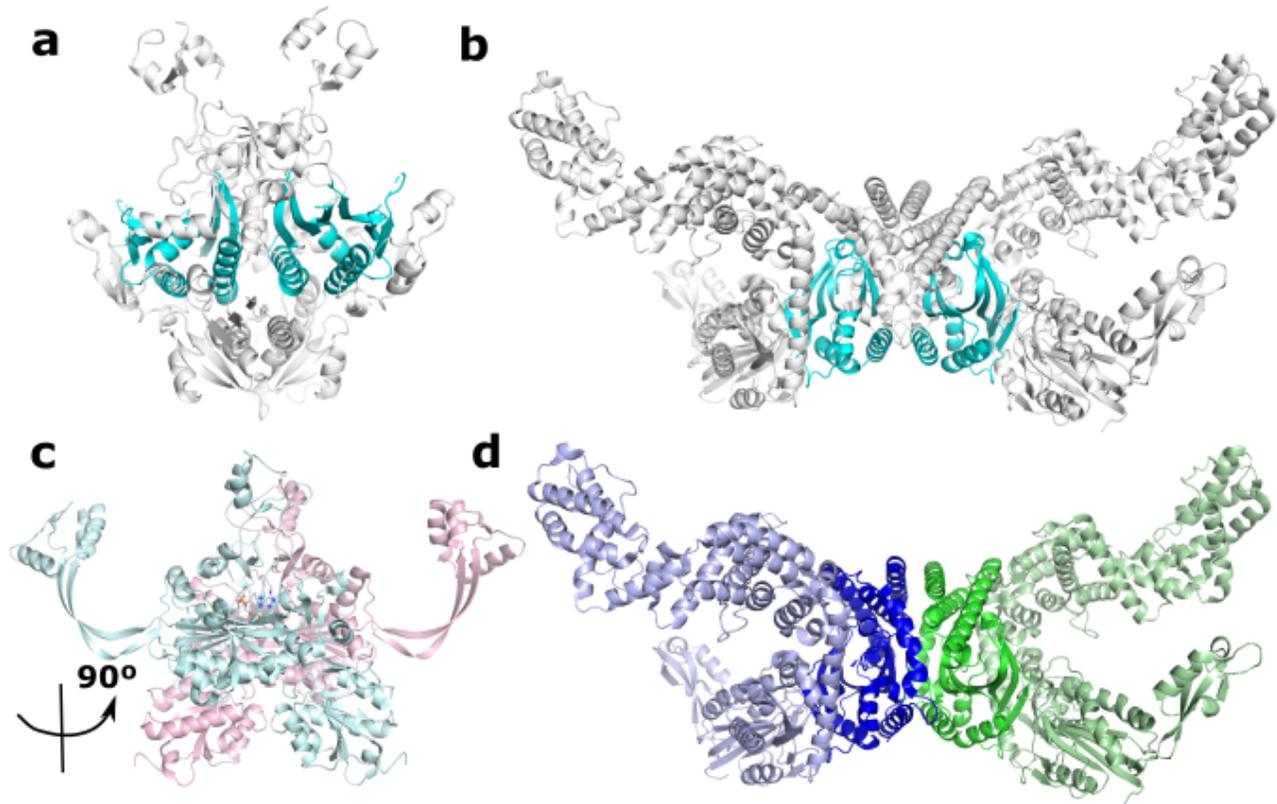


Figura 1.4. Las GlyRSs sólo comparten el plegamiento del dominio catalítico. a) GlyRS homodimérica, presente en los tres dominios de la vida, la cual muestra el dominio catalítico en color cian. b) GlyRS heterotetramérica, presente en la mayoría de las bacterias con su dominio catalítico en color cian. c) GlyRS eucarionte con un giro de 90° , cada monómero tiene diferente color. d) La GlyRS bacteriana tiene cuatro subunidades: 2 alfa y 2 beta. Cada subunidad alfa tiene 289 residuos, cada monómero tiene diferente color: azul y verde intenso; la subunidad alfa contiene el dominio catalítico, el cual comparte con su contraparte eucariota sólo a nivel de plegamiento general. Cada subunidad beta tiene 691 residuos y cada monómero se muestra en diferente color, color azul cielo y verde claro. La subunidad beta participa en el reconocimiento del tRNA.

Los dos tipos de GlyRS emplean diferentes estrategias para reconocer a su sustrato; la GlyRSeuk interacciona con la glicina mediante 3 aminoácidos cargados negativamente (Glu522, Glu296 y Glu245) (Figura1.5c), mientras que en la GlyRSbac interacciona a través de 5 residuos distintos (Gln80, Gln82, Glu160, Thr37 y Trp119) (Figura1.5d). Existen además diferencias tangenciales entre los motivos 1, 2 y 3 de ambas enzimas que implican principios distintos de oligomerización y de interacción con el ácido carboxílico de la glicina.

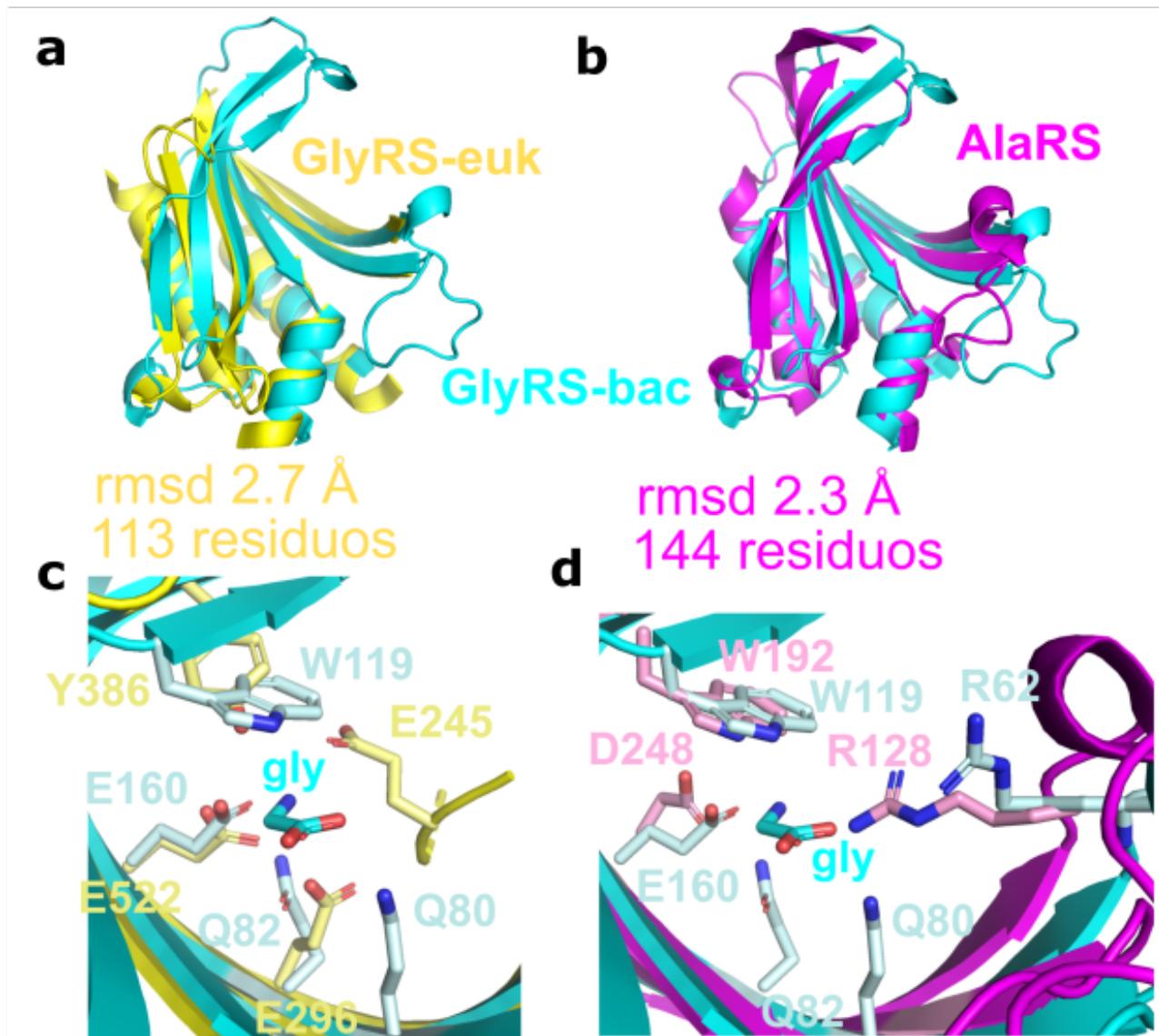


Figura 1.5. La GlyRSbac se parece más a la AlaRS que a su contraparte eucariota a) Dominio catalítico de la GlyRSbac de *Thermoanaerobaculum thermophilum* (PDB 7LU4) en presencia de glicina (residuos 4-21 y 53-174), con un total de 138 residuos que fueron alineados con la GlyRS-euk (PDB 2ZT7) (residuos 103-120, 269,276, 291-301, 349-411 y 518-537), con un total de 113 residuos. El alineamiento se realizó con el servidor DALÍ obteniendo un z score de 14.9 y un rmsd de 2.7 Å b) Se emplearon los mismos aminoácidos de la subunidad alpha de la GlyRSbac para alinearse con el dominio catalítico de la AlaRS (PDB 2ZZG) (residuos 62-76, 119-219 y 231-256), con un total de 144 residuos, resultando un z score 19.5 de y un rmsd de 2.3 Å. c) Comparación de los aminoácidos que participan en el reconocimiento de la glicina entre la GlyRS-euk (amarillo) y la GlyRSbac (azul). d) Comparación de los aminoácidos que participan en el reconocimiento de la alanina para la AlaRS (magenta) y para la glicina en la GlyRSbac (azul)

1.4. Cada sintetasa utiliza un mecanismo característico para el reconocimiento de su tRNA

Todas las sintetetasas llevan a cabo la misma reacción de aminoacilación en la última adenina (A76) del extremo 3' del tRNA; sin embargo, cada enzima utiliza un método propio para reconocer a sus sustratos (aminoácido y tRNA) [Giegé et al., 1993]. Todas las moléculas de tRNA tienen una estructura terciaria similar, pero con una estructura primaria completamente diferente que les permite ser discriminados más fácilmente. El reconocimiento de los tRNAs tiene factores principales que son responsables de la precisión de su reconocimiento, conocidos como determinantes de identidad, así como antideterminantes que anclan o evitan el posicionamiento del tRNA a la proteína [Giegé et al., 1993]; estos factores son la modificación y la posición de ciertas bases. Estos determinantes y antideterminantes generalmente se encuentran en el tallo aceptor, el tallo anticodón, en el brazo D, el brazo T y el bucle variable (Figura 1.6a). Los elementos de identidad más comunes son los nucleótidos del anticodón y la base discriminadora N73 que precede al extremo 3'-CCA [Levengood et al., 2007]. Las estructuras cristalinas que se han determinado de algunos complejos aaRS-tRNA revelan que cada determinante de identidad hace contacto específico con la proteína y que tanto los sustratos como la proteína sufren cambios conformacionales para la adaptación mutua [Delagoutte et al., 2000].

El reconocimiento del tRNA por parte de las sintetetasas de clase I ya ha sido estudiado [Nordin and Schimmel, 2002]; estas sintetetasas reconocen el surco menor del tRNA (Figura 1.6b); además, se sabe que el dominio C-terminal está involucrado

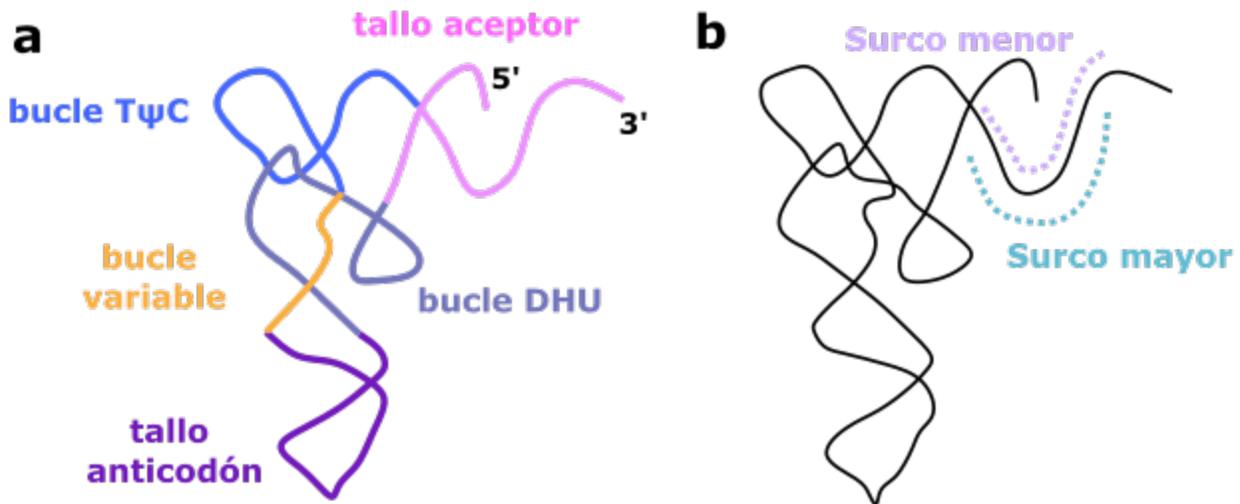


Figura 1.6. El reconocimiento de los tRNAs tiene factores principales que son responsables de la precisión de su reconocimiento. a) Representación 3D de un tRNA junto con los determinantes y antideterminantes de identidad que contribuyen al reconocimiento por parte de las sintetasas. b) Las sintetasas de clase I reconocen el surco menor del tRNA (morado), mientras que las de clase II reconocen el surco mayor (azul), tal y como se observa en la figura 1.2.

en el reconocimiento del anticodón, mientras que el dominio N-terminal participa en el reconocimiento de la secuencia CCA que se encuentra en el tallo aceptor del tRNA [Hountondji et al., 1986, Levengood et al., 2007, Nakanishi et al., 2005]. Por otro lado, las sintetasas de clase II reconocen el surco mayor del tRNA (Figura 1.6b), algunas bases del tallo aceptor, la secuencia CCA en el 3' y, en la mayoría de los casos, la secuencia del anticodón [Roy and Ibba, 2006, Qin et al., 2014]. El dominio de unión al tRNA en sintetasas de clase IIa, que incluyen a ProRS, HisRS, GlyRS y ThrRS, tiene un plegamiento tipo α/β que reconocen la secuencia del anticodón [Moor et al., 2006, Qin et al., 2014, Roy and Ibba, 2006], siendo un determinante de identidad muy importante por parte de las sintetasas (Figura 1.6).

El reconocimiento del tRNA por parte de las sintetasas ha evolucionado junto con la estructura del tRNA [Wetzel, 1995, O'Donoghue and Luthey-Schulten, 2003]; se ha propuesto que, previo a LUCA, existían tRNAs con sólo una minihélice correspondiente

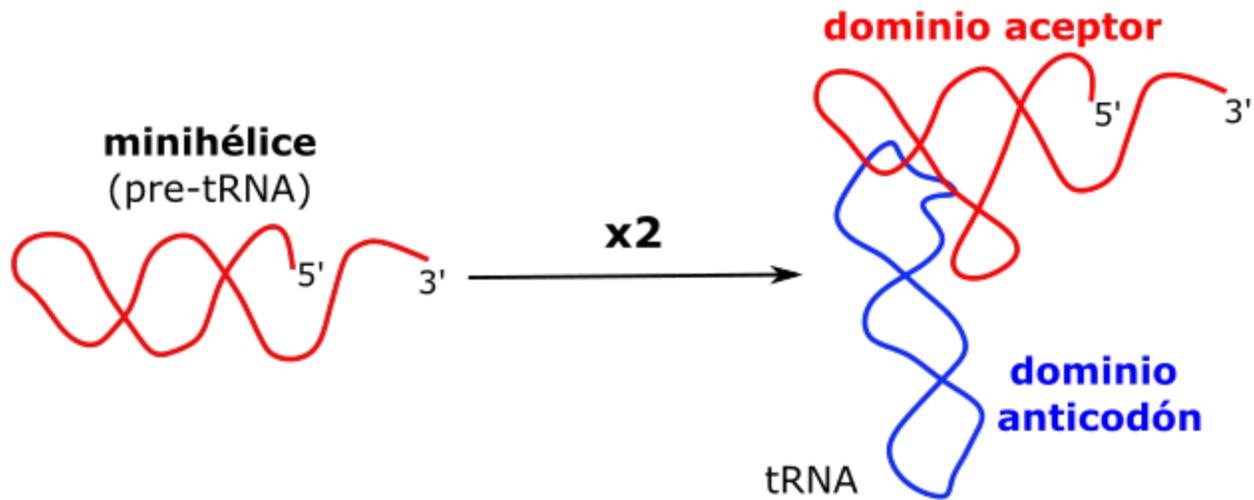


Figura 1.7. El dominio aceptor del tRNA es la parte más antigua de esta molécula. Molécula de RNA que se conocía como pre-tRNA, el cual pudo haber sido reconocido por proteínas para llevar a cabo la aminoacilación en su extremo 3'; el gen que expresaba esta minihélice de tRNA pudo haber tenido una duplicación y fusión, generando el tRNA actual con dos dominios: aceptor y anticodón.

al dominio aceptor de los tRNAs actuales (Figura 1.7 izquierda); posteriormente, mediante una duplicación y fusión de genes, se formó el tRNA tal y como lo conocemos [Schimmel and de Poupiana, 1995, Saito et al., 2001]. Dado lo anterior, es posible dividir al tRNA en dos dominios: el dominio aceptor y el dominio anticodón (Figura 1.7 derecha); ambos dominios contienen determinantes de identidad importantes para su reconocimiento. Sin embargo, se puede considerar que enzimas primigenias que reconocían a los tRNAs primigenios eran capaces de reconocer todo el dominio aceptor del tRNA, por lo que se podría postular que una aaRS que tiene como principal determinante el dominio aceptor del tRNA podría tener un origen más antiguo.

| Antecedentes

En la actualidad, sólo se ha reportado la estructura tridimensional de la subunidad alfa de la bacGlyRS, correspondiente a la subunidad catalítica de esta enzima [Valencia-Sánchez et al., 2016, Tan et al., 2012]. Al inicio de este proyecto, hace 20 años, se intentó obtener la estructura de la bacGlyRS de *Escherichia coli*, sin embargo, las subunidades alfa y beta se disociaban [Torres-Larios Alfredo, (2002). Structural studies on threonyl and glycyl tRNA synthetases (tesis de Doctorado, Institut Pasteur)]. Después de realizar varios intentos con enzimas provenientes de distintos organismos, la enzima de *Anaerolinea thermophila* parecía ser la más prometedora; la GlyRS de este organismo tiene las subunidades alfa y beta fusionadas de manera natural; sin embargo, la enzima sufría un corte proteolítico entre ambas subunidades, por lo que se buscó un conector que evitara dicho corte, con el cual se obtuvieron cristales en presencia de tRNA que difractaron anisotrópicamente a 3.0Å [Rodríguez-Hernández Annia, (2016). Estancia Postdoctoral, UNAM]. En un intento por mejorar esos cristales, se exploró una construcción con la secuencia de la bacteria *Thermanaerotherix daxensis* (TdaxGlyRS), que cuenta con una similitud del 70% con *Anaerolinea thermophila*, con la cual se logró obtener la estructura de la bacGlyRS en complejo con glicina por difracción de rayos X a una resolución de 2.7Å [Dimas-Torres Uriel, (2019). Cristalogenésis y

resolución de la estructura cristalográfica de la glicil-tRNA sintetasa bacteriana (tesis de Maestría, UNAM)]. La estructura de la subunidad beta hasta ese momento era completamente desconocida, aunque ya se sabía que es la subunidad que participa en el reconocimiento del tRNA [Nagel et al., 1984]. Haber determinado la estructura completa de la bacGlyRS nos brindó más información sobre el posible reconocimiento del tRNA.

2.1. La subunidad beta es una subunidad multidominio

La subunidad beta de la TdaxGlyRS tiene un peso molecular de 70 KDa (691 aminoácidos). Para el análisis de la subunidad, ésta se dividió en dominios con ayuda del servidor SWORD [Postic et al., 2017], obteniendo 5 segmentos: 1 [376-432], 2 [310-375 y 434-522], 3 [523-651], 4 [652-783] y 5 [784-999]. Posteriormente, se buscó la posible función de cada dominio realizando una búsqueda empleando el servidor DALI [Holm, 2020].

Durante el análisis se replanteó la división de dominios por SWORD, ya que la homología con otras proteínas incluye más de un segmento; se proponen entonces 4 dominios estructurales (Figura 2.1). El dominio 1 abarca los dominios 1 y 2 previos (residuos 310-523); ambos dominios tiene homología estructural con dos dominios característicos de enzimas de adición del CCA de clase I: dominio cuerpo y cola, respectivamente (Figura2.2a), estas enzimas llevan a cabo la edición del extremo 3' del tRNA [Xiong and Steitz, 2004]. El dominio 2 [524-651], tiene homología con el dominio palma presente en la subunidad catalítica de la DNA polimerasa [Perera et al., 2013]. El dominio 3 [652-840] es un dominio homólogo

al presente en enzimas con actividad de fosfohidrolasas, denominado dominio HD por dos aminoácidos altamente conservados: una histidina y un ácido aspártico, que participan en la unión de metales [Sun and Pandelia, 2020, Aravind and Koonin, 1998]. El dominio HD está presente en enzimas como la poli A polimerasa o en enzimas de adición del CCA de clase II. Este dominio, al fusionarse con los dominios nucleotidiltransferasa, helicasa y el dominio KH de unión a RNA, participa en el metabolismo de ácidos nucleicos [Aravind and Koonin, 1998]. Por último, el dominio 4 [841-999], es homólogo al dominio de reconocimiento del anticodón (ACBD) característico de muchas aaRSs de clase I (MetRS, ArgRS, ValRS, LeuRS y CysRS) (Figura 2.2b).

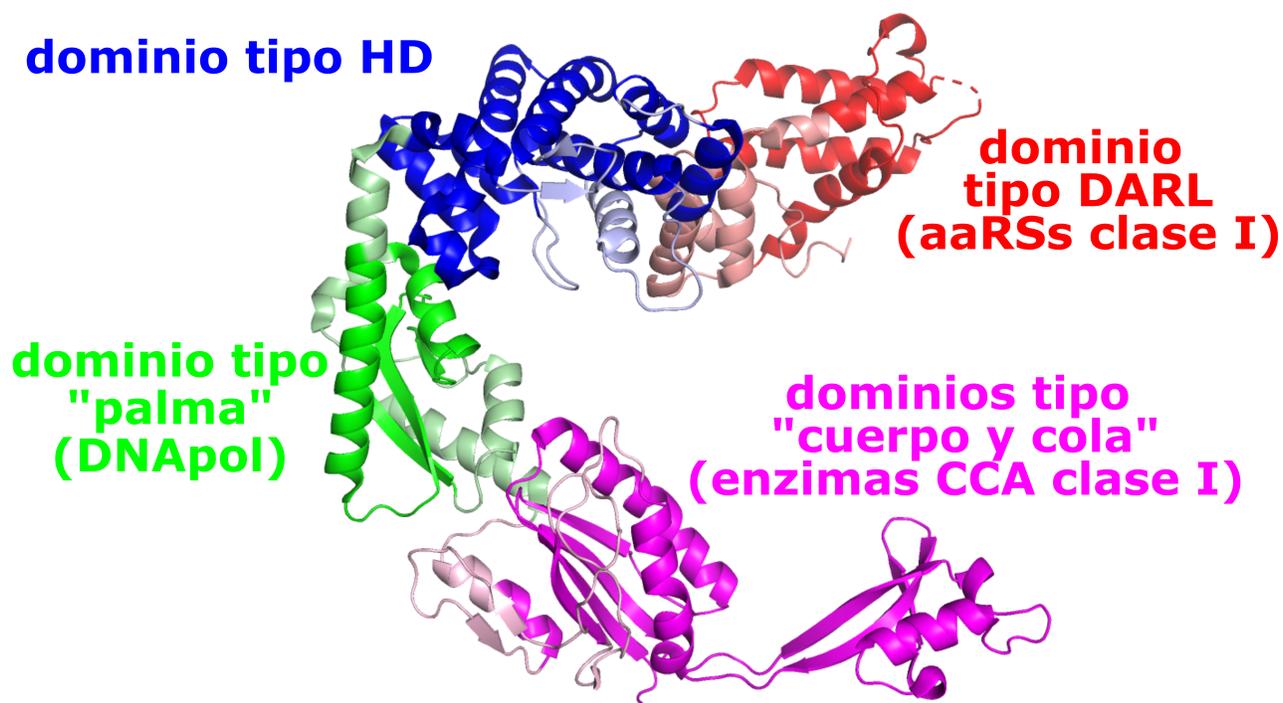


Figura 2.1. La subunidad beta tiene cuatro dominios que comparte con enzimas de unión a ácidos nucleicos. Se muestra la subunidad beta de la bacGlyRS dividida en cuatro dominios que se encuentran presentes en otras enzimas que participan en el metabolismo de RNA: la enzima de adición CCA en tRNAs (dominio magenta); el dominio palma que se encuentra en enzimas como la DNA polimerasa alpha, la RNA polimerasa L, DNA polimerasa II (dominio verde); un dominio HD presente en enzimas como la nucleotidiltransferasa y poli A polimerasa, con actividad de fosfohidrolasa (dominio azul); el dominio de unión del anticodón (ACBD) de sintetasa de clase I (dominio rojo), lo cual representa un caso único de hibridación entre las aaRSs de clase I y II. Las zonas coloreadas en una tonalidad baja, son aquellas que no se superponen con los dominios de sus homólogos.

2.2. La bacGlyRS *podría* reconocer de manera completamente diferente a su tRNA

Las homologías encontradas de la subunidad beta con las bases de datos muestran que al menos dos dominios podrían interactuar con el tRNA: por un lado, con el dominio 1 (Figura 2.1 magenta), con homología estructural al dominio cuerpo cola de las enzimas de adición del CCA, las cuales catalizan la adición postranscripcional de la secuencia CCA en el extremo 3' de los tRNAs inmaduros, utilizando CTP y ATP

como sustratos [Deutscher, 1982]. Estas enzimas son universales y se dividen en dos clases [Betat and Mörl, 2015]. El dominio 1 de la subunidad beta tiene homología con las enzimas de adición del CCA de clase I, presentes en arquea [Cho et al., 2003]. Las enzimas de adición del CCA de clase I unen el tallo aceptor y el bucle T del tRNA mediante la cavidad generada entre los dominios cabeza y cola; el bucle T contacta al dominio cola [Okabe et al., 2003]; el dominio del anticodón no hace contacto con esta enzima (Figura 2.2a).

Por otro lado, el dominio 4 de la subunidad beta (Figura 2.1 rojo) presenta el plegamiento del dominio DALR característico de aaRSs de clase I, el cual participa en el reconocimiento del anticodón del tRNA (Figura 2.2b) [Delagoutte et al., 2000].

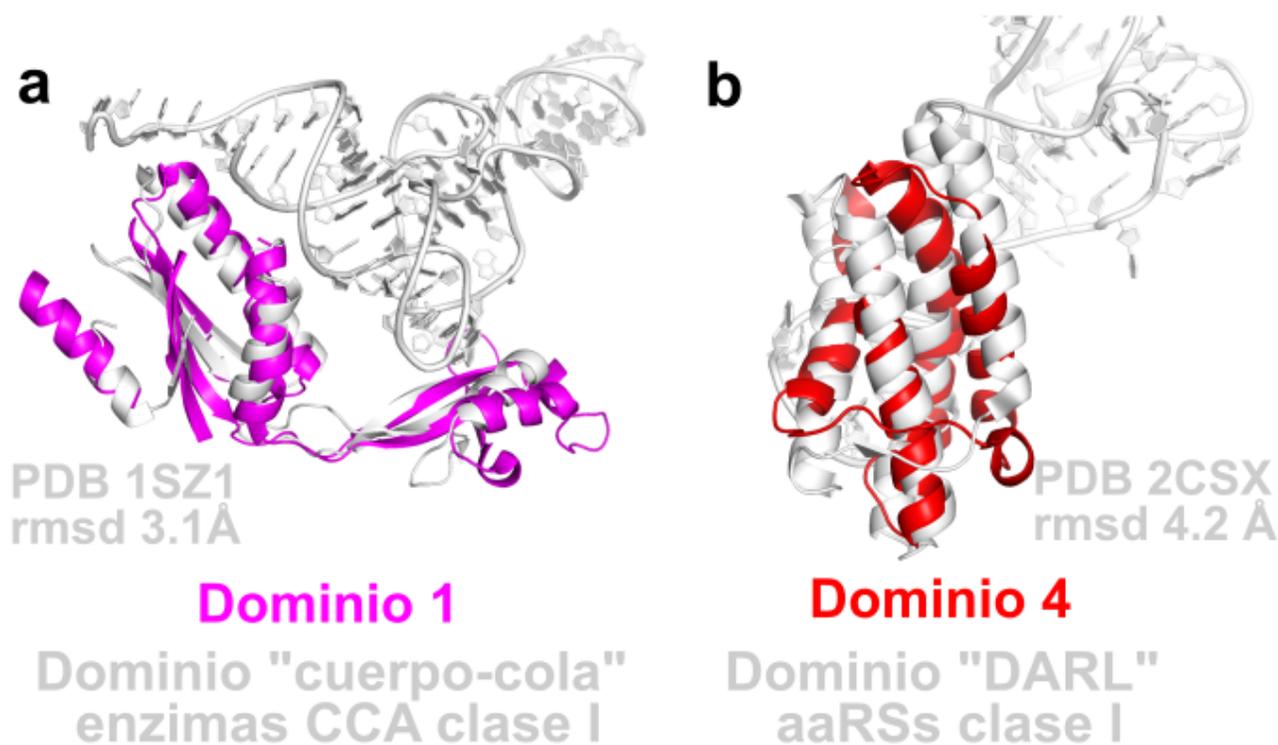


Figura 2.2. Los dominios 1 y 4 de la GlyRS β podrían interactuar con el tRNA a) Superposición del dominio 1 de la subunidad beta con los dominios cuerpo y cola de la enzima de adición CCA de clase I (código PDB 1SZ1, z-score=7.4, rmsd=3.1Å, 135 aa superpuestos). b) Superposición del dominio 4 de la subunidad beta con el dominio DARL, que reconoce el anticodón del tRNA por parte de las aaRSs de clase I; en la figura se representa a la MetRS (código PDB 2CSX, z-score=4.8, rmsd=4.2 Å, 160 aa superpuestos).

Dadas las características de ambos dominios, se propone un modelo de la forma de reconocimiento del tRNA por parte de la bacGlyRS (Figura 2.3): haciendo la superposición de la estructura de la enzima de adición CCA de clase I en complejo con su tRNA (código PDB 1SZ1), con el dominio 1 de la subunidad beta en la estructura de la bacGlyRS completa, se genera el modelo presentado en la Figura 2.3. Como se puede observar, el tRNA se ajusta en la cavidad de la subunidad beta y haría contacto con el ACBD. Otro aspecto importante es la distancia relativa de la secuencia CCA en el 3' del tRNA con respecto al análogo del estado de transición, la cual es de aproximadamente 6 Å, lo cual indica que un ligero ajuste podría ser suficiente para satisfacer las distancias de reacción.

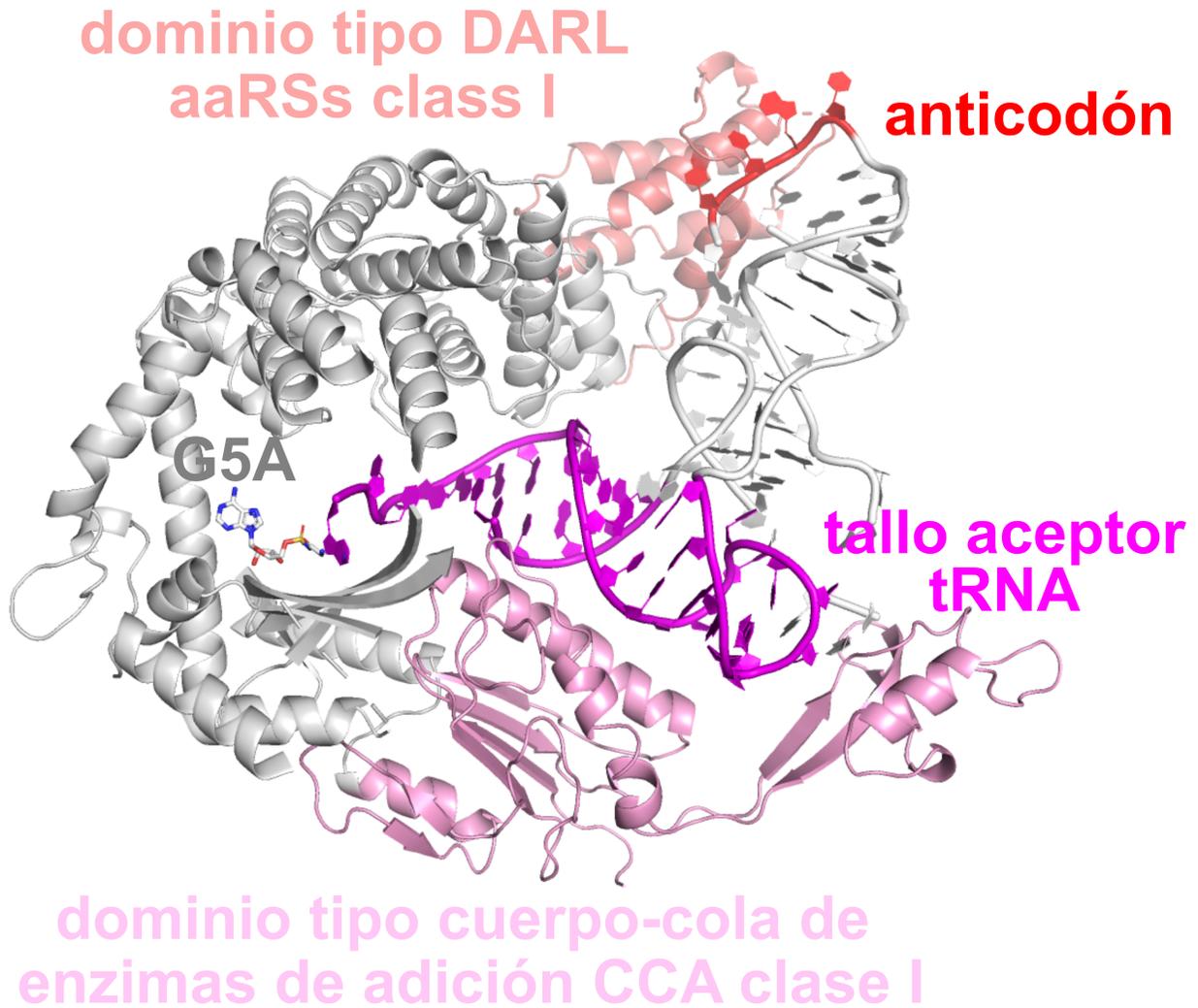


Figura 2.3. Modelo de reconocimiento del tRNA por la GlyRSbac. La posición del tRNA encaja en la cavidad de la subunidad beta, donde el dominio tipo cola de las enzimas de adición del CCA interactuaría con el bucle T del tRNA; se observa un posible reconocimiento de todo el tallo aceptor del tRNA, posicionando el extremo CCA cerca del análogo glicil-adenilato (GSA o G5A). Por otro lado, el dominio tipo DARL de las aaRSs de clase I se encuentra en distancia para interactuar con el bucle del anticodón.

El modelo que se propone implicaría que la bacGlyRS reconoce a su tRNA de una manera muy diferente a su contraparte eucariota y al resto de las aaRSs de clase II. Las aaRSs tienen dos dominios del tRNA que pueden reconocer: el dominio aceptor y el dominio del anticodón (ver Figura 1.7). La mayoría de las sintetasas de clase II tiene como primer determinante de identidad la secuencia del anticodón, con un dominio

característico que reconoce esta parte del tRNA. Por otro lado, también reconocen la secuencia CCA del tRNA en el dominio catalítico. La mayoría de las sintetasas reconocen a su tRNA en la misma orientación, tomando como punto de origen la orientación del dominio catalítico de cada sintetasa (zona azul de la Figura 2.4). Al comparar el reconocimiento del tRNA que ocurriría por parte de la GlyRS_{bac}, se puede apreciar que sería en una orientación opuesta al resto de las aaRSs. Es decir, la orientación relativa del tRNA sería análoga a la que ocurre en las aaRSs de clase I, reconociendo el surco menor del tRNA en vez del mayor. Si analizamos la figura 2.4, podemos observar que la forma en que la AlaRS y la bacGlyRS reconocen a sus tRNAs es muy diferente al resto de las aaRSs de clase II, siendo la bacGlyRS la que presentaría la diferencia más grande. Esto podría hablar de un posible reconocimiento primitivo, en donde se exploraban formas alternativas de interacción, hasta llegar al reconocimiento canónico. En este sentido, la AlaRS podría representar un reconocimiento transicional entre la bacGlyRS y el resto de las aaRSs de clase II. La subunidad beta de la bacGlyRS también podría representar los restos de una enzima multifuncional, con posibilidad de asociarse con otras enzimas, además de la subunidad alfa, para realizar diversas funciones en un mundo con una cantidad relativamente limitada de genes.

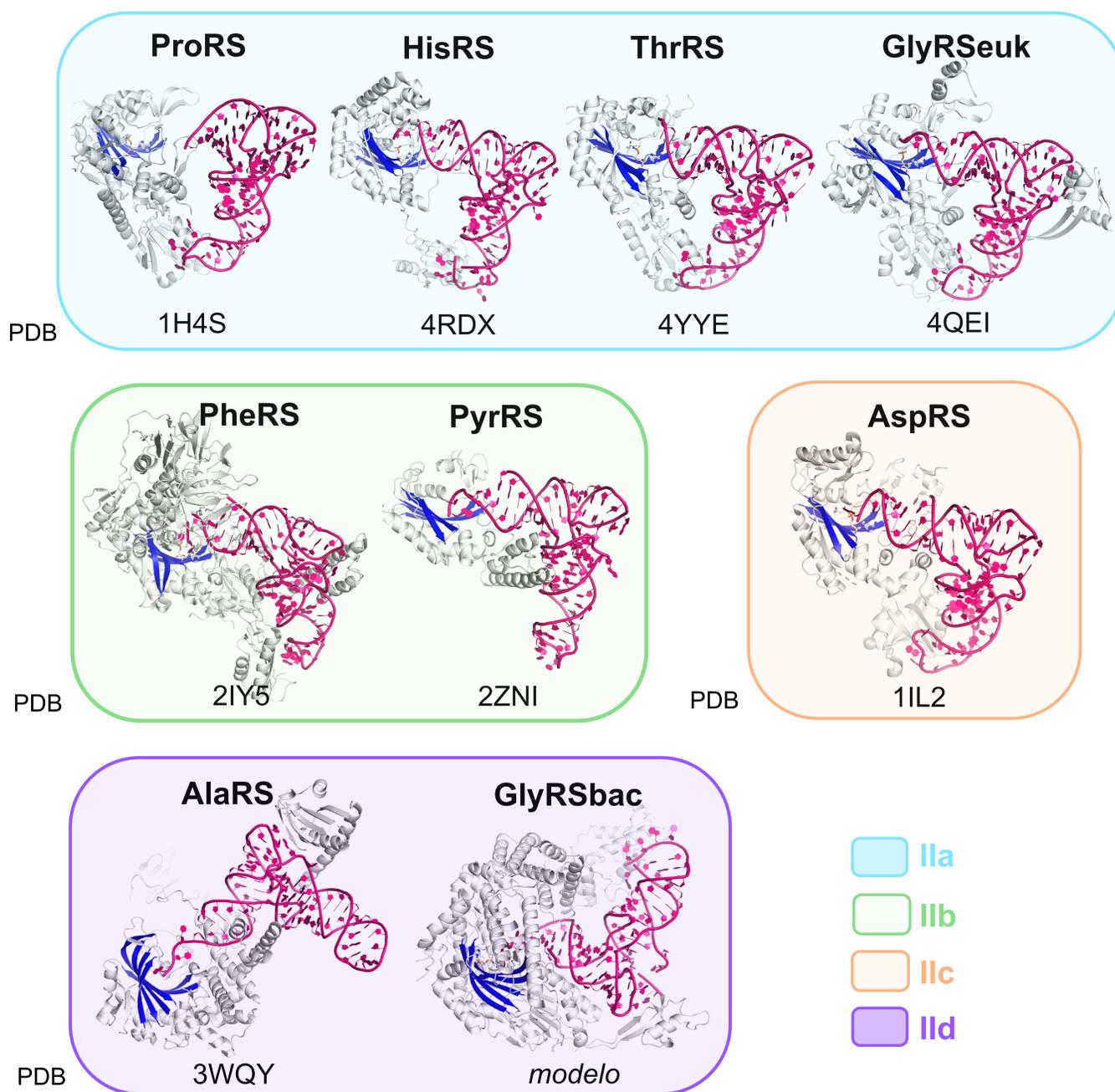


Figura 2.4. La bacGlyRS podría reconocer a su tRNA de manera diferente al resto de las sintetetas. Complejos de las aaRSs de clase II con su tRNA reportados por cristalografía de rayos X, donde se muestra a cada sintetetas con la misma orientación de su dominio catalítico, el cual consta de una hoja beta de 7 hebras. La orientación del tRNA por parte de las sintetetas de clase II es la misma, con excepción de la AlaRS y la bacGlyRS, las cuales pudieron haber sido de las primeras aaRSs debido a que no tienen la forma de reconocimiento que presenta el resto de las aaRSs.

| Planteamiento del problema

El origen de las aaRSs puede estar asociado con el del código genético mismo. Dentro de estas enzimas, descifrar el origen de la GlyRS tiene una gran importancia por presentar dos distintos ancestros que reconocen al aminoácido más pequeño de todos. Aunque la mayoría de los investigadores se inclinan por creer que la contraparte eucariota es la enzima ancestral por encontrarse en los tres dominios de la vida, la estructura tridimensional de la bacGlyRS y el reconocimiento putativo de su tRNA cognado muestra la posibilidad de que, en realidad, ésta representa, junto con la AlaRS, el origen mismo de todas las aaRSs.

A lo largo del tiempo se ha intentado obtener la estructura del complejo empleando varias construcciones provenientes de distintos organismos sin obtener éxito. El conocimiento de la estructura tridimensional de la proteína nos permite proponer nuevas construcciones para alcanzar este objetivo. En particular, la forma semicircular y modular de la subunidad beta permite, a priori, la exploración por separado de los dominios correspondientes al reconocimiento putativo del brazo aceptor y del anticodón (Figura 7.8).

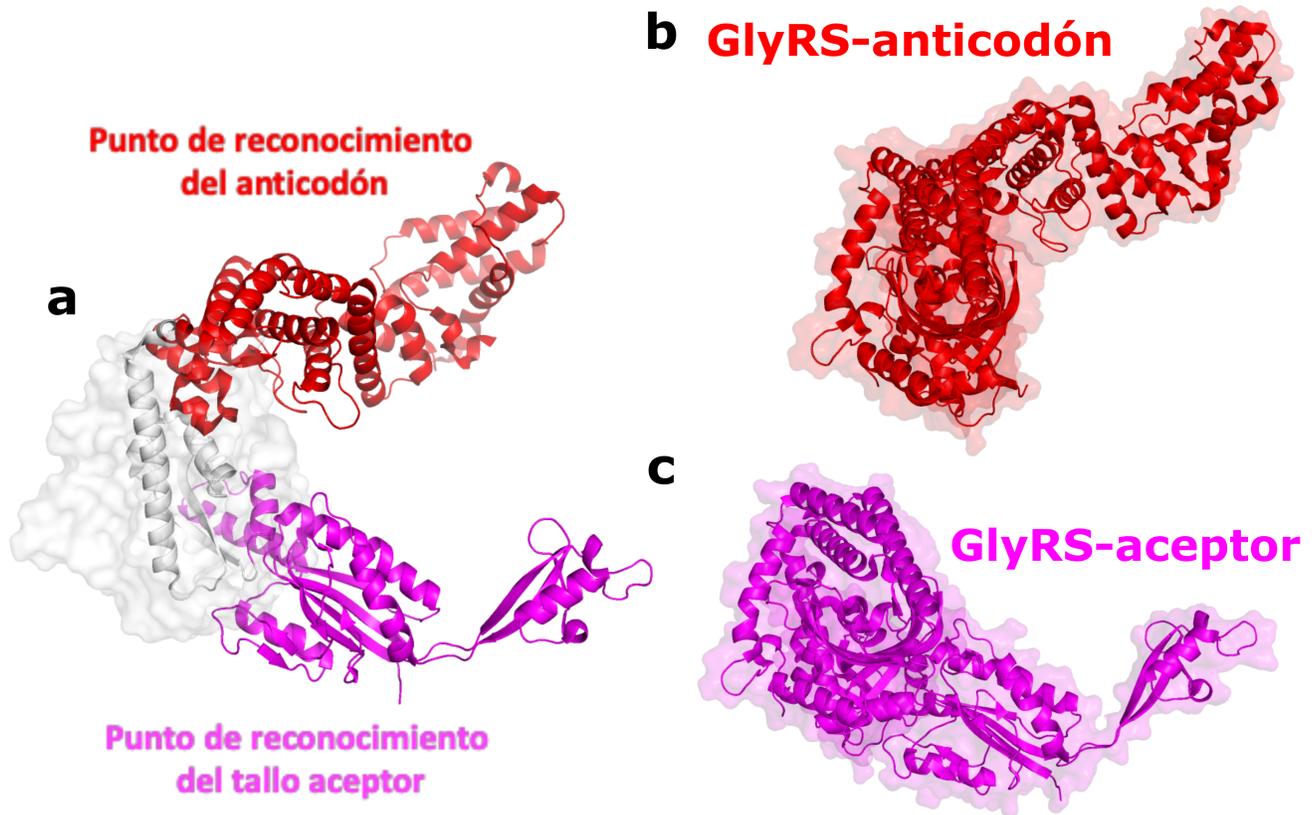


Figura 3.1. Diseño de dos mutantes. a) La información proporcionada por la subunidad beta nos permitió encontrar dos puntos de reconocimiento del tRNA (anticodón y tallo aceptor). b) Mutante que podría reconocer el anticodón del tRNA. c) Mutante que podría reconocer el tallo aceptor del tRNA.

| Hipótesis

TEÓRICA

Si la glicil-tRNA sintetasa bacteriana reconoce a su tRNA cognado de manera muy diferente al resto de las aaRSs, entonces se trataría de la aaRS más antigua.

EXPERIMENTAL

Si se diseñan mutantes de la bacGlyRS y tRNAs modificados para interactuar entre si, entonces es posible generar un complejo cristalizable.

| Objetivos

5.1. Objetivo general

- Obtener la estructura 3D del complejo bacGlyRS, o de una variante derivada, con su tRNA cognado, mediante difracción de rayos X.

5.2. Objetivos particulares

- Expresar y purificar la proteína TdaxGlyRS-wt y dos variantes: GlyRS-anticodón y GlyRS-aceptor.
- Optimizar la purificación del tRNA expresado *in vivo*.
- Estabilizar las dos variantes y caracterizarlas mediante técnicas biofísicas.
- Obtener y optimizar cristales del complejo GlyRS-tRNA con la proteína wt o con las variantes.
- Desarrollar un procedimiento para medir la actividad de la GlyRS y sus variantes.

| Metodología

6.1. Transformación, expresión y purificación de la TdaxGlyRS

El gen que codifica para la glicil-tRNA sintetasa de *T. daxensis* fue sintetizado por la compañía ATUM DNA2.0, y fue clonado en el vector de expresión pD861 (ver Apéndice I). El gen se transformó en la cepa de *Escherichia coli* BL21 (DE3), empleando 200 ng de DNA en 100 μ L de bacterias competentes preparadas en el laboratorio; se mezcló y se dejó en hielo durante 5 min; posteriormente se realizó un choque térmico de 42°C durante 30 s en un thermoblock. Se retiró el tubo del thermoblock y se regresó al hielo durante 2 min. Se le adicionó 400 μ L de medio SOC (Super Optimal Broth), se mezcló y se dejó en la incubadora bajo agitación a 240 rpm y 37 °C durante 1 h. Se sembraron las bacterias en una caja de agar con 25 μ g/mL de kanamicina y posteriormente se dejaron las cajas en la incubadora a 37°C durante 16 h.

Se prepararon 2 L de medio LB (Luria Broth) con 28 μ g/mL de kanamicina. Las bacterias se crecieron a 37°C y 230 rpm hasta alcanzar una OD_{600nm} de 0.6. La expresión del gen se indujo con 3 mM de rhamnosa durante 4 h a 37°C.

Las bacterias fueron cosechadas centrifugando el medio a 3,000 g durante 30 min

y se resuspendieron en amortiguador A (100 mM $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$, 300 mM KCl, 10 mM imidazol); las bacterias se lisaron por sonicación y el lisado total se centrifugó a 25,000 g durante 30 min.

Para la purificación se empleó una cromatografía de afinidad a iones de níquel (II) (IMAC; columna HisTrap FF crude de GE Healthcare, 5 mL) en un equipo AKTA FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography). El sobrenadante se cargó en una columna HisTrap de 5 mL (GE Healthcare) previamente equilibrada con el buffer A; posteriormente, se eluyó la proteína con un gradiente de 10 mM a 500 mM de imidazol en 150 mL. La proteína eluida se calentó a 72 °C durante 30 min en thermoblock; se centrifugó a 12,000 g durante 20 min a 4 °C y se recuperó el sobrenadante. La proteína soluble se concentró e intercambió en 5 mM MgCl_2 preparado con agua DEPC (dietilpirocarbonato) en un tubo Amicon® con un filtro de 100 KDa de corte de peso molecular. Se analizó la muestra por electroforesis en un gel desnaturalizante (SDS-PAGE) al 8 % para monitorear la purificación de la proteína.

6.2. Transformación, expresión y purificación de las variantes GlyRSacceptor y GlyRSanticodón

El gen que codifica para las mutantes fue sintetizado por la compañía ATUM DNA2.0, y fue clonado en el vector de expresión pD861; la secuencia de las variantes se encuentra en el Material Suplementario. Se realizó una co-transformación en la cepa de *E. coli* BL21 (DE3), empleando el DNA de la proteína mutante y el DNA del tRNA Tdax, con 200 ng de cada uno en 100 μL de bacterias competentes preparadas en el laboratorio.

Se prepararon 2 L de medio LB (Luria Broth) adicionando 28 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de kanamicina y 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ampicilina por cada 500 mL de medio. Las bacterias se hicieron crecer a 37°C y 230 rpm hasta alcanzar una OD_{600nm} de 0.5. El gen de tRNA se indujo con 3 mM de IPTG durante 30 min a 37°C. Pasando los 30 min, el gen de la proteína se indujo con 3 mM de rhamnosa durante 4 h a 37°C.

Las bacterias fueron cosechadas por centrifugación a 3,000 g durante 30 min y se lisaron por sonicación en amortiguador A (100 mM $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$, 300 mM KCl, 40 mM imidazol). El lisado total se centrifugó a 25,000 g durante 25 min y el sobrenadante se cargó en una columna HisTrap de 5 mL (GE Healthcare, 5 mL) previamente equilibrada con el amortiguador A; la proteína se eluyó con un gradiente de 20 mM a 500 mM de imidazol en 120 mL.

Después de eluir, la proteína se concentró en un tubo Amicon® con un filtro de 50 KDa de corte de peso molecular. Se intercambiaron las proteínas en sus respectivas soluciones: GlyRS-aceptor (50 mM Tris pH 8.0, 50 mM betaína) y GlyRS-anticodón (50 mM ácido succínico, 20 mM L-arginina).

Al final se realizó un gel SDS-PAGE al 10% para monitorear la purificación de las proteínas.

6.3. Co-transformación, expresión y purificación de GlyRSaceptor + el ACBD

El gen que codifica para el dominio correspondiente al reconocimiento del anticodón (ACBD) fue sintetizado por la compañía ATUM DNA2.0, y fue clonado en el vector de expresión pD861; la secuencia de las proteínas se puede observar en el Material

Suplementario. Se realizó una co-transformación porque al tratar de expresar sólo la proteína ACDB, ésta no expresaba o se precipitaba por completo. La co-transformación y la purificación se realizaron como se ha descrito en la sección anterior.

6.4. Transformación, expresión y purificación de las enzimas AMP deaminasa, IMP deshidrogenasa y D-aminoacil-tRNA desacilasa

El gen que codifica para cada gen fueron adquiridos en ATUM: AMP deaminasa (AMD) de *Aspergillus oryzae*, AMP deshidrogenasa (IMD) de *Saccharomyces cerevisiae* y D-aminoacil-tRNA desacilasa (DTD) de *Plasmodium falciparum*, cada gen fue clonado en el vector de expresión pD861. Las transformaciones se realizaron como se ha indicado con anterioridad. Se prepararon 2 L de medio LB (Luria Broth) adicionando 28 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de kanamicina. Las bacterias se crecieron a 37 °C y 230 rpm hasta una $OD_{600\text{nm}}$ de 0.6 y la expresión de las proteínas se indujo con 3 mM de rhamnosa. Las bacterias transformadas con el gen que codifica la enzima AMD se dejaron 24 h a 15 °C como condición de inducción, mientras que para la IMD y DTD se empleó 37 °C durante 4 h. Las bacterias fueron cosechadas por centrifugación a 3,000 g durante 30 min.

Las bacterias se lisaron por sonicación en el amortiguador A (100 mM $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$, 1 M KCl, 20 mM imidazol). El lisado total se centrifugó a 25,000 g durante 25 min y el sobrenadante se cargó en una columna HisTrap (GE Healthcare, 5 mL) previamente equilibrada con el amortiguador A; la proteína se eluyó con un

gradiente de 20 mM a 500 mM de imidazol en 90 mL (30 min a 3 mL/min. La proteína colectada se concentró e intercambió en 20 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂ y 15 % glicerol preparado con agua DEPC en un tubo Amicon® empleando diferentes cortes de peso molecular para cada enzima: 100 KDa para la enzima AMD, uno de 50 KDa para la enzima IMD y uno de 10 KDa para la enzima DTD. Se realizó un gel SDS-PAGE al 8 % para monitorear la purificación de la enzima AMD, uno al 12 % para la enzima IMD y uno al 15 % para la enzima DTD.

6.5. Transformación, expresión y purificación del tRNAGly *T. daxensis*

El gen que codifica para tRNAGlywt de (*Thermanaerotherix daxensis*), así como a los diferentes tRNAs modificados con las secuencias receptor y tetraloop (un asa tetraloop tiene la secuencia GAAA (o GNRA), y el bucle loop tiene una secuencia específica de 11 nucleótidos, que cuenta con una plataforma de adenosinas y varias interacciones no canónicas), fueron adquiridos en ATUM y cada gen fue clonado en el vector de expresión pM268, (ver Apéndice).

Los vectores tienen resistencia a ampicilina y se transformaron como se ha indicado con anterioridad.

Se prepararon 4 L de medio TB (Terrific Broth) adicionando 100 µg/mL de ampicilina por cada 500 mL de medio. Las bacterias se crecieron a 37 °C y 240 rpm hasta alcanzar una OD_{600nm} de 0.6 y se indujeron con 1 mM de IPTG durante 24 h a 37 °C. Las bacterias fueron cosechadas por centrifugación a 3,000 g durante 30 min.

6.5.1. Extracción del tRNA

Las bacterias cosechadas a partir de 500 mL de cultivo se resuspendieron en 10-15 mL de amortiguador de extracción (20 mM Tris pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 1 mM EDTA); posteriormente, se añadió un volumen de una solución de fenol pH 4.3 (catálogo Sigma P4682) y se agitó vigorosamente durante 5 min. Se centrifugó a 12,000 g durante 10 min a temperatura ambiente y se separó la fase superior para agregarle 2 volúmenes de EtOH (100 %, -4 °C) y 0.1 vol de acetato de sodio (NaAcO) 3 M, pH 5.2. La mezcla se dejó a -76 °C entre (10-16) h; posteriormente se centrifugó a 12,000 g durante 30 min a 4 °C y se desechó la fase acuosa.

6.5.2. Deacilación del tRNA

Se resuspendió el tRNA previamente precipitado con una disolución de 200 mM Tris pH 9.0, empleando el menor volumen posible y posteriormente se incubó a 37 °C durante 30 min en el thermoblock. Se le agregaron 2 volúmenes de EtOH (100 %, -4 °C) y 0.1 volúmenes de NaAcO 3 M, pH 5.2. La mezcla se dejó a -76 °C entre (10-16) h; posteriormente se centrifugó a 12,000 g durante 30 min a 4 °C y se desechó la fase acuosa.

6.5.3. Purificación del tRNA

Durante el proyecto se emplearon tres formas de purificar el tRNA:

Ultracentrifugación

El tRNA precipitado se resuspendió en una disolución de 5 mM de MgCl₂ preparado con agua DEPC (agregar 1 mol de DEPC a 1 L de agua; agitar vigorosamente durante 5 min y esterilizar 30 min a 121 °C, 15 psi) y se centrifugó a 28,000 g durante 1 h. Se recuperó el sobrenadante y se almacenó a -70 °C. Al final, se analizó por electroforesis en un gel UREA-PAGE al 16 % para verificar la pureza del tRNA.

Geles desnaturalizantes UREA-PAGE

El tRNA precipitado se resuspendió en el menor volumen posible de agua DEPC y se centrifugó a 14,000 g durante 30 min. Se recuperó el sobrenadante y se cuantificó el tRNA. Se preparó una solución de acrilamida/bis-acrilamida al 40 % con una proporción 37.5:1, empleando 194.8 g de acrilamida y 5.2 g de bis-acrilamida para 500 mL.

Para purificar los tRNAs, se emplearon geles UREA-PAGE al 14 % (tRNA-wt y tRNA-tetra-loop) y al 18 % (tRNA-receptor) con 1x de TBE (89 mM Tris-base, 2 mM EDTA pH 8.0 y 89 mM ácido bórico), 7 M de urea y 14 % o 16 % de acrilamida/Bis-acrilamida

Se hicieron geles de 135 mL y 500 mL para poder purificar el tRNA cortando la banda correspondiente. Para montar y preparar el gel se emplea agua DEPC (gel) y agua bidestilada, estéril y filtrada (amortiguador de corrida). Se cargaron entre 10-16 mg de muestra en un volumen de 2 mL, añadiendo un volumen del amortiguador de carga (1x TBE, 7 M urea, 10 % glicerol y 0.02 % azul de bromofenol). El gel se corre a 9 W durante 7-8 h (gel al 14 % de 135 mL), 16-18 h (gel al 18 % de 135 mL) o 24 h a 14 W (gel al 18 % de 500 mL). Posteriormente, con una lámpara UV, se reveló el gel

para marcar la banda correspondiente al tRNA, la cual se cortó. La banda de gel con el tRNA se transfirió a un tubo de 50 mL y se rompió el gel en pedazos pequeños con ayuda de una pipeta estéril. Posteriormente se añadió amortiguador de elución (500 mM NH₄AcO y 1 mM EDTA pH 8.0), de tal forma que el volumen tapara los fragmentos de gel y tuviera movimiento para su agitación. Se dejó en agitación suave durante 2 h a 4 °C; inmediatamente se centrifugó a 12,000 g durante 30 min a 20 °C y se colectó la mayor parte posible de fase acuosa, evitando tomar trozos del gel. Se repitió el mismo procedimiento entre 4-5 veces para extraer la mayor cantidad de tRNA del gel. El tRNA eluido se concentró, se dializó por ultracentrifugación a agua DEPC y finalmente se cuantificó para almacenarlo a -70 °C.

Cromatografía de intercambio iónico (Mono Q 10/100GL)

El tRNA previamente precipitado se resuspendió en el menor volumen posible del amortiguador A para la cromatografía de intercambio iónico (20 mM de MES pH 6.5), posteriormente se centrifugó a 14,000 rpm, 4 °C durante 30 min. La fase soluble se recupera para posteriormente inyectarla en la columna.

Se empleó una columna Mono Q 10/100GL (código: 17-5167-01), la cual previamente se lavó con 1 M NaOH, 2 M NaCl y 70% EtOH. La columna se equilibró con el amortiguador A (20 mM de MES pH 6.5) y posteriormente se inyectó 5 mg de tRNA en 1 mL de amortiguador. Se pasaron 2 volúmenes de columna del amortiguador A, antes de realizar el gradiente de 0-1 M de NaCl. Se aplicó un gradiente de 200 mL en 40 min a un flujo de 5 mL/min. Las fracciones se colectaron y finalmente se visualizaron empleando electroforesis con geles UREA-PAGE al 18%, los cuales se corrieron a 9 W

durante $2t$, donde t es el tiempo que tarda en salir el frente de corrida.

6.6. Replegamiento del tRNA

Después de purificar al tRNA por geles UREA-PAGE, se almacenó en agua DEPC. Para replegarlo, se diluyó a una concentración de 1.2 mg/mL y se calentó en el thermoblock a 99°C durante 2 min; posteriormente, se apagó el thermoblock y una vez que la temperatura disminuyó a 55 °C, se añadió MgCl₂ hasta una concentración de 5 mM. El bloque se sacó del thermoblock y se dejó que alcanzara la temperatura ambiente; finalmente, se puso en baño de hielo durante 15 min. El tRNA replegado se utilizó de inmediato o se almacenó a -70°C.

6.7. Ensayos de fluorimetría diferencial de barrido (Thermal Shift Assays)

La proteína se utilizó a una concentración final de 0.5 mg/mL; se tomó 1.0 µL de una solución 10x de proteína junto con 2.0 µL del colorante Sypro Orange (dilución 1:100) y se añadió el amortiguador de la proteína para un volumen final de 10 µL. Para los ensayos de solubilidad y estabilidad utilizando los kits de (Hampton Research®), se prepararon 100 µL de proteína a 3 mg/mL con 1.0 µL del colorante Sypro Orange; de esta solución se tomó 1 µL junto con 2.5 µL de cada solución más 6.5 µL de agua. Se empleó el software StepOne Biorender para el análisis de los datos.

6.8. Ensayos de cristalización

Los ensayos de cristalización se realizaron utilizando el método de difusión de vapor en su modalidad de gota sedente empleando distintos Kits de la marca Hampton Research, por lo general NucPro, Natrix e Index. Los ensayos se realizaron en placas de cristalización de 96 pozos con capacidad de 3 gotas en cada pozo. Para cada prueba se añadieron 40.0 μL de la solución madre en el reservorio y de ahí se tomó 1.0 μL de la solución, colocándola en el pozo junto con 1.0 μL de la proteína o complejo. Las placas fueron colocadas a temperatura ambiente o se dejaron en una incubadora a 22°C. En todos los ensayos de cristalización se empleó una concentración de 36 mg/mL de las enzimas.

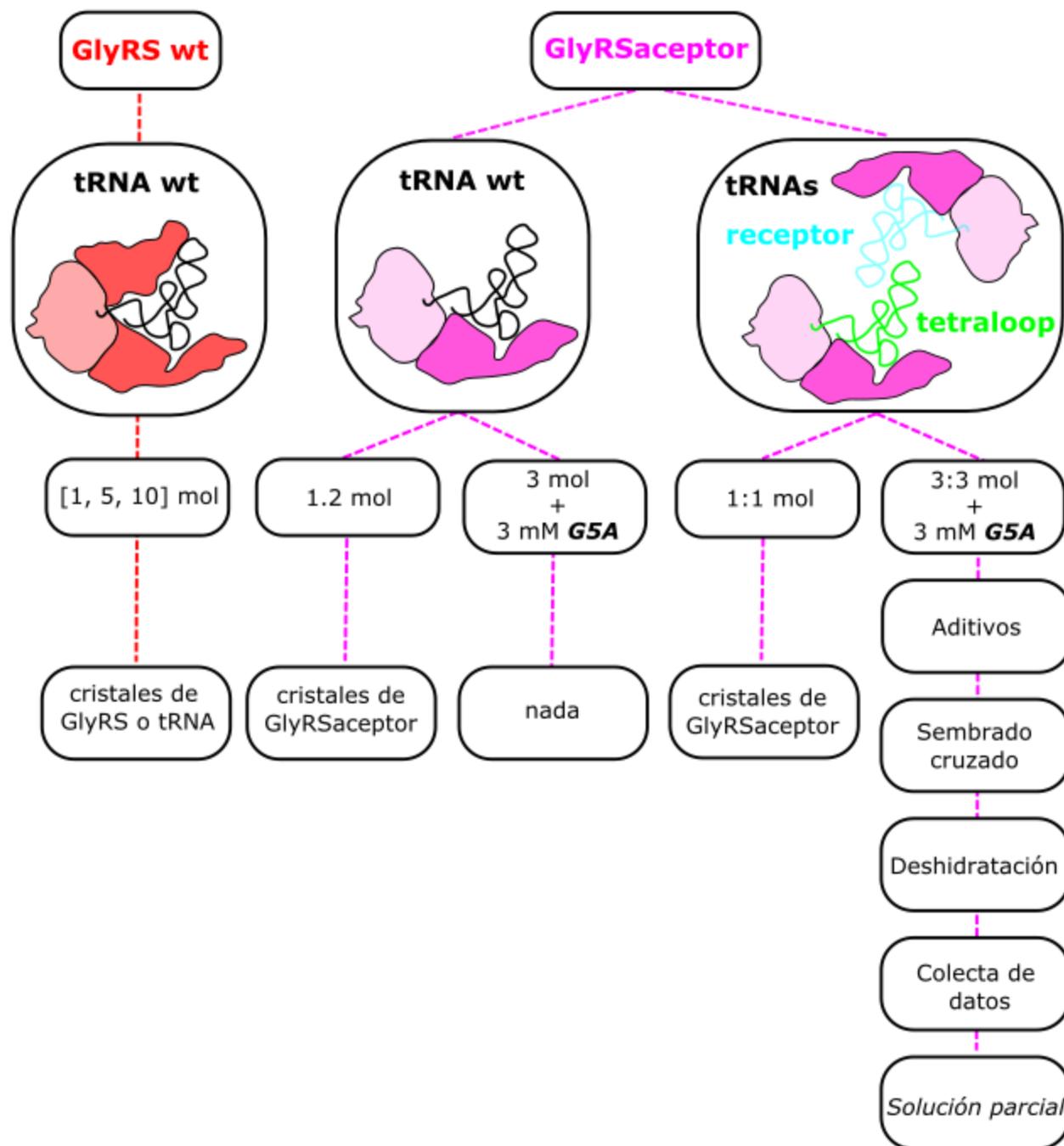


Figura 6.1. Estrategias de cristalización empleadas para la obtención del complejo bacGlyRS-tRNA
 Se emplearon diversas estrategias, empezando con la proteína wt junto con su tRNA cognado, ambos del mismo organismo, sin embargo, no se lograron obtener cristales de complejo. Posteriormente se diseñaron mutantes, de las cuales la GlyRSaceptor mostró tener mayor estabilidad con el tRNA, dado esto, se realizaron diferentes ensayos de cristalización con esta mutante en complejo con el tRNA wt y tRNAs modificados.

6.8.1. TdaxGlyRS

GlyRS + tRNA

Se probaron 3 diferentes concentraciones de tRNA en la misma placa: [9.8, 49.0 y 98.2] mg/mL para dos kits de cristalización: NucPro y Natrix.

Titulación de tRNA en dos condiciones de NucPro (G10 y B9)

Con cada condición encontrada en NucPro se realizó una titulación con el tRNA de 0 a 10 mol, con intervalos de 0.5 mol de tRNA, colocando 21 pozos para cada condición de NucPro.

GlyRS + tRNA + G5A

Se mezcló a la GlyRS y al tRNA en una relación estequiométrica 1:3 (36 mg/mL de proteína con 29.4 mg/mL de tRNA); posteriormente se intercambió y concentró la mezcla en 5 mM MgCl₂. Al final se le añadió G5A a una concentración final de 3 mM.

6.8.2. GlyRSacceptor

La variante con los dominios que potencialmente reconocen el tallo aceptor del tRNA se probó con diferentes tRNAs para favorecer la cristalización del complejo, utilizando diferentes relaciones estequiométricas de cada tRNA.

GlyRSacceptor + tRNA

Se mezcló la GlyRSacceptor y al tRNA en una relación estequiométrica 1:1.2 (36 mg/mL de proteína con 17.3 mg/mL de tRNA); posteriormente, se intercambió y concentró la mezcla en 5 mM MgCl₂.

GlyRS-acceptor + tRNA + G5A

Se mezcló la GlyRSacceptor (36 mg/mL) y al tRNA (43 mg/mL) siendo una relación estequiométrica 1:3 respectivamente; se intercambió y concentró la mezcla en 5 mM MgCl₂. Al final, se añadió G5A a una concentración final de 3 mM.

GlyRSacceptor + tRNAreceptor/tRNAtetraloop

Se mezcló la GlyRSacceptor con el tRNA-receptor y el tRNA-tetraloop en una relación estequiométrica 1:1:1 (36 mg/mL de proteína con 14.4 mg/mL de cada tRNA); se intercambió y concentró la mezcla en 5 mM MgCl₂.

GlyRSacceptor + tRNAreceptor/tRNAtetraloop + G5A

Se mezcló la GlyRSacceptor con el tRNA-receptor y el tRNA-tetraloop en una relación estequiométrica 1:3:3 (36 mg/mL de proteína con 43.1 mg/mL de cada tRNA); se intercambió y concentró la mezcla en 5 mM MgCl₂. Se añadió G5A a una concentración final de 3 mM.

6.9. Prueba con aditivos

Las condiciones seleccionadas (relación estequiométrica y condición de cristalización) fueron probadas con el kit de aditivos para mejorar los cristales. Se añadió un 10% del aditivo a la solución madre, es decir, 4 μL del aditivo con 36 μL de la solución madre.

6.10. Microseeding

Los ensayos de microseeding se realizaron con los cristales obtenidos de la mezcla GlyRS-tRNA. Se emplearon los cristales encontrados en 26 % v/v MPD, 50 mM PIPES pH 7.0, 65 mM MgCl₂ y 1 mM [Co(NH₃)₆]Cl₃ con una relación molar 1:3.5, y en 10 % w/v PEG 4,000, 50 mM MES; pH 6.5, 200 mM NH₄AcO y 10 mM CaCl₂ a una relación molar 1:5.

Se abrió la gota donde estaban los cristales y se les adicionó 8 μ L de la solución madre. Utilizando microherramientas, microasas y/o micropipeta, se fueron recuperando los mejores 4-8 cristales uno por uno y se fueron añadiendo a una gota con 8 μ L de solución madre depositada en un cubreobjetos. La suspensión se traspasó a un tubo de micro-centrifuga de 1.5 mL con dos perlas de vidrio y se agitó en un vórtex durante (2-4) min. Se tomó una alícuota de los cristales y se observó en el microscopio; los cristales debían de verse como microcristales. Se realizaron 6 diluciones seriadas con los microcristales: 1:10, 1:100, 1:1,000, 1:10,000, 1:100,000, 1:1,000,000. En la placa se colocaron 40 μ L de la solución madre preparada en el reservorio y en el pozo se colocó 1 μ L de la solución madre, 1 μ L del complejo y 1 μ L de la dilución respectiva.

6.11. Sembrado cruzado (cross-seeding)

Los ensayos se realizaron con los cristales obtenidos de la mezcla GlyRSaceptor-tRNAreceptor/tetraloop-G5A, en una relación estequiométrica 1:3:3 (36 mg/mL de proteína con 43.1 mg/mL de cada tRNA) y con 3 mM de G5A. Se tomaron los cristales provenientes de la condición de 18 % (m/v) PEG 6,000, 50 mM acetato de

sodio pH 4.8, 3 % (m/v) Dextran sulfato de sodio 5,000 y un segundo aditivo a escoger (10mM Trimetilamina, 10 mM Sarcosina, 0.5 % polivinilpirrolidona, 1 % PEG 3,350 o 3 % D-glucosa). Para realizar el sembrado cruzado se utilizaron las condiciones de NucPro, Index y Natrix, con objeto de encontrar una nueva condición de cristalización.

Se abrió la gota y se tomaron 8 μL de la solución madre, la cual fue adicionada al pozo donde se encontraban los cristales y posteriormente se tomaron 10 μL de los cristales. Los microcristales se traspasaron a un tubo de microcentrifuga de 1.5 mL con una perlas de plástico y posteriormente se agitó en un vórtex durante (2-4) min. Se tomó una alícuota de los cristales y se observó en el microscopio, los cristales debían de verse como microcristales. Se realizaron 6 diluciones seriadas con los microcristales: 1:10, 1:100, 1:1,000, 1:10,000, 1:100,000 y 1:1,000,000. Se tomó 40 μL de la solución de cristalización y se adicionaron en el reservorio. En el pozo se colocó 1 μL de la solución madre, 1 μL del complejo y 1 μL de la dilución 1:1,000,000 de los microcristales.

6.12. Deshidratación de cristales

Se hizo uso de las propiedades crioprotectoras de varios compuestos encontrados en la segunda ronda de aditivos y se emplearon a una concentración final de 30-35 %: D-glucosa, prolina, PEG 400 y polivinilpirrolidona K15. Para la condición encontrada por sembrado cruzado, se empleó el mismo precipitante como crioprotector y agente deshidratante: 35 % PEG 400.

Para poner a deshidratar los cristales, se abrió el pozo, se le extrajo la solución madre y se le añadió la solución deshidratante. Los pozos se volvieron a sellar y se dejaron en la incubadora a 22 °C durante 3 días.

6.13. Ensayos de difracción de rayos X

Los cristales se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron. Se realizaron diferentes experimentos de difracción de rayos X; la mayoría de éstos se realizaron en el LANEM del Instituto de Química de la UNAM, empleando el equipo generador de Rayos X MicroMax 007HF con detectores RAXIS IV++ y Dectris Pilatus R200K, con una longitud de onda de 1.54Å. Los datos de difracción a mayor resolución que se obtuvieron fueron a 4.5 Å y se colectaron a 100 K a una longitud de onda de 0.9785 Å en el Advanced Photon Source (Argonne National Laboratory, Argonne, Illinois, USA). Los datos fueron indizados y procesados con el programa XDS (Kabsch, 2010) y reducidos con el programa Aimless (MarcadorDePosición1; Evans, 2011).

6.14. Actividad

6.14.1. Reacciones acopladas empleando NAD+

Las reacciones fueron llevadas a cabo en un volumen total de 100 μL en placas de 96 pozos (Corning product number 3697). La actividad fue monitoreada en un instrumento Synergy MX Multimode Detector (BioTek) a 37 °C en régimen de agitación rápida. Se leía a 340 nm cada 4 s por un lapso de 6 min, teniendo 360 mediciones al final.

Medición de la actividad de la AMP deaminasa e IMP deshidrogenasa

Se preparó la mezcla de reacción añadiendo una cama de agua de 32 μL , posteriormente se añadieron los reactivos en el siguiente orden: 50 μL de amortiguador 5x (250 mM Tris pH 7.0, 25 mM MgCl_2 y 50% glicerol), 5 μL de AMP o ATP (100

mM) y 10 μL de $\beta\text{-NAD}^+$ (50 mM). Finalmente se agregaron las enzimas AMD e IMD en relación 1:25 molar respectivamente; se tomó 1 μL de AMD (1 mM) y 2 μL de IMD (13 mM).

Acoplando todas las enzimas

Se preparó la mezcla de reacción añadiendo una cama de agua de 25 μL , posteriormente se añaden los reactivos en el siguiente orden: 50 μL de amortiguador 5x (250 mM Tris pH 7.0, 25 mM MgCl_2 y 50% glicerol), 5 μL de AMP o ATP (100 mM), 1 μL glicina (500 mM) y 10 μL de $\beta\text{-NAD}^+$ (50 mM). Al final se añadieron las enzimas comenzando por la GlyRS, la D-aminoacil-tRNA deacilasa, la IMD y el tRNA a una concentración de 2 mM y la AMD a 89 μM . Se incubó la reacción a 50° C durante 20 min previo a la medición de la actividad en el instrumento Synergy.

6.14.2. Interferometría de biocapa (BLI)

Previo a los ensayos, los biosensores se hidrataron por 25 min en agua a temperatura ambiente. Los ensayos se realizaron en pozos de 96 placas negras de polipropileno (Greiner Bio-One part no.655209) empleando 7 biosensores como máximo al mismo tiempo en el equipo Octet® de ForteBio (Sartorius).

Biosensores de AR2G

Se emplearon biosensores con un ácido carboxílico libre: Reactive 2nd Generation (AR2G) biosensors (ForteBio part no.18-5092), los cuales se activaron con 20 mM de EDC (1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida) y con 10 mM de Sulfo-NHS (N-hidroxisulfosuccinamida) en agua DEPC. Una vez activado el biosensor, se puso en

contacto con el tRNA acilado (tRNA-gly) y el deacilado (tRNA) a una concentración de 30 μM en un amortiguador de 50 mM de NaAcO/HAcO pH 4.0, el cual previamente fue optimizado variando la concentración y el pH del amortiguador. Para la reacción de aminoacilación, se empleó 40 μM de tRNA, 40 μM de GlyRS, 5 mM de glicina, 5 mM de ATP en un amortiguador de 50 mM de Tris pH 8.0, 100 mM NaCl y 20 mM MgCl_2 , empleando un volumen de reacción de 100 μL . La reacción se llevó a cabo a 45 °C a diferentes tiempos de incubación [0 min, 5 min, 10 min, 15 min, 30 min, 1 h, 1.5 h]. Después del tiempo de reacción, se realizaron dos extracciones con un volumen de fenol pH 4.3, agitando vigorosamente durante 5 min. Posteriormente se centrifugó a 14,000 g durante 5 min a temperatura ambiente y se tomó la fase acuosa.

Biosensores de estreptavidina

Para la reacción de aminoacilación se empleó 10 μM de tRNA, 20 μM de GlyRS, 2 mM de glicina, 6 mM de ATP en un amortiguador de 50 mM de Tris pH 7.5 y 10 mM MgCl_2 , empleando un volumen de reacción de 100 μL . La reacción se llevó a cabo a 60 °C durante 30 min. Después del tiempo de reacción, se realizó una extracción con un volumen de fenol pH 4.3, agitando vigorosamente durante 5 min. Posteriormente se centrifugó a 14,000 g durante 5 min a temperatura ambiente y se tomó la fase acuosa. Se precipitó el tRNA con dos volúmenes de EtOH (100%, -4 °C) y 0.1 volúmenes de NaAcO 3 M, pH 5.6. La mezcla se dejó a -20 °C toda la noche. El tRNA se centrifugó a 14,000 g durante 30 min a 4 °C y se desechó la fase acuosa. La pastilla de tRNA se resuspendió con 5 mM de MgCl_2 con el menor volumen posible; posteriormente se cuantificó. Para biotinar el tRNA acilado (tRNA-gly), se empleó una concentración de

2.5 μM de tRNA previamente resuspendido junto con 15 mM de sulfo-NHS-biotina en un amortiguador de 60 mM HEPES pH 8.0; la mezcla se realizó en un volumen total de 60 μL . Se incubó a 4 °C por 1h. El tRNA se volvió a precipitar con EtOH y NaAcO. La mezcla se dejó a -20 °C toda la noche. El tRNA se centrifugó a 14,000g durante 30 min a 4 °C y se desechó la fase acuosa. La pastilla de tRNA se resuspendió con 200 μL de 5 mM MgCl_2 y se transfirió todo el volumen a un pozo de la placa de 96 pozos para el Octet, empleando el biosensor de estreptavidina (ForteBio part no. 18-5019e).

6.15. Afinidad de la GlyRS por su tRNA

Para intentar medir la afinidad de la enzima por el tRNA se emplearon biosensores de Ni (II) (Ni-NTA biosensor ForteBio part no. 18-5101). Para la unión de la proteína al biosensor (unión) y la unión del tRNA a la proteína (carga) se empleó el mismo amortiguador. Para el amortiguador se probaron diferentes pHs (7.0-6.0), modificando en intervalos de 0.2 unidades de pH, empleando HEPES y cacodilato como agentes amortiguantes a una concentración de 20 mM. Por otro lado, se modificó la concentración empleada de la proteína, teniendo fija la del tRNA a 250 μM , en donde se tituló desde 1 μM hasta 6.6 nM. Se añadió 4 % de PEG 400 a las mezclas para evitar la unión no específica.

| Resultados

7.1. La GlyRS y GlyRSaceptor se purifican en uno o dos pasos con altos rendimientos

La purificación de la GlyRS ya había sido optimizada con anterioridad empleando dos pasos [Dimas-Torres Uriel, (2019).Cristalogénesis y resolución de la estructura cristalográfica de la glicil-tRNA sintetasa bacteriana (tesis de Maestría, UNAM)]; en un primer paso se realizó una cromatografía de afinidad (IMAC) y en un segundo paso la precipitación por temperatura, obteniendo a la proteína con un alto grado de pureza (Figura 7.1a) y estabilidad (sin degradación visible) hasta por 3 semanas. La proteína se obtiene con un rendimiento de 20 mg de proteína por litro de cultivo. Las variantes GlyRSaceptor y GlyRSanticodón se transformaron de la misma manera que se transforma a la GlyRS; sin embargo, las proteínas eran insolubles una vez expresadas; la solubilización se logró coexpresando a la proteína con el tRNA. Una vez solubilizadas, se siguió un protocolo de purificación similar al de la GlyRS, empleando una cromatografía de afinidad (IMAC); en el caso de las variantes, no se empleó la precipitación de contaminantes por temperatura como segundo paso de purificación, ya que ambas proteínas se precipitaron por completo. La GlyRSaceptor se obtiene con

mayor pureza que la mutante del anticodón, tan solo en el primer paso de purificación (Figura 7.1c) y con altos rendimientos (25 mg/L). Para el caso de la GlyRSanticodón, tal vez se podría optimizar el proceso para obtener a la proteína con un mayor porcentaje de pureza (Figura 7.1d).

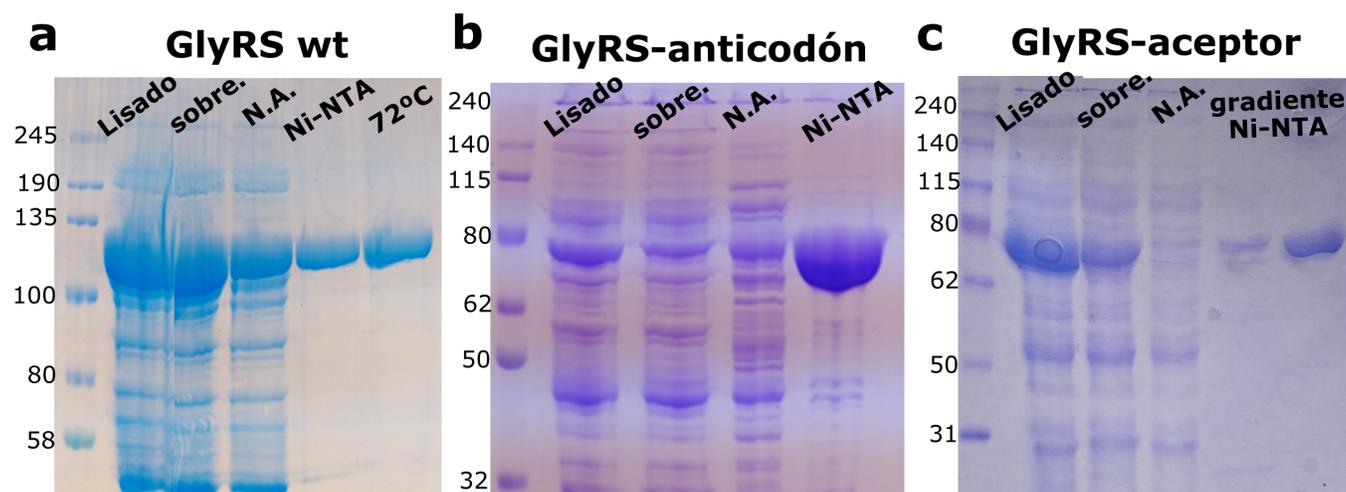


Figura 7.1. La GlyRS y la GlyRSaceptor se purifican en uno o dos pasos. a) Purificación de la GlyRS wt. Gel SDS-PAGE al 8%. La proteína se obtiene con un alto grado de pureza después de dos pasos. b) Purificación de la GlyRSaceptor. Gel SDS-PAGE al 10%. Se obtiene a la proteína con un alto grado de pureza en un solo paso. c) Purificación de la GlyRSanticodón. Gel SDS-PAGE al 10%. Definición de abreviaturas: sobre: sobrenadante después de centrifugar el lisado; N.A.: fracción que no se unió a la columna; Ni-NTA: fracción que se unió a la columna y después fue eluida; 72 °C: fracción colectada después de precipitar contaminantes a 72 °C por 30 min.

7.2. Se puede optimizar la purificación del tRNA

En todos los estudios previos de nuestro grupo, el tRNA se purificaba empleando dos columnas cromatográficas: una de intercambio iónico (Source Q) y una hidrofóbica (Toyopearl-butyl 650M). Entre los problemas que se encuentran antes de la inyección a la primera columna es la suspensión de tRNA, después del proceso de extracción y deacilación, ya que forma una emulsión que bloqueaba las columnas y el equipo de FPLC, por lo que se filtraba antes de inyectarla en la columna hidrofóbica. Como

alternativa, se decidió realizar una ultracentrifugación para eliminar los contaminantes, obteniendo así una mejor purificación del tRNA wt (Figura 7.2). Se empleó el mismo método de purificación en los tRNAs modificados (receptor y tetraloop), con los cuales se realizaron los ensayos de cristalización. Sin embargo, el tRNA receptor tenía tres contaminantes con peso molecular muy similar, que de hecho parecía ser una sola banda en el gel desnaturizante inicial. Los contaminantes se observaron probando diferentes concentraciones de acrilamida/bis-acrilamida y tiempos de corrida del gel.

Debido a que los tRNAs modificados tenían los contaminantes mencionados, que no se eliminan por el método de ultracentrifugación, se decidió optimizar el proceso de purificación empleando geles desnaturizantes UREA-PAGE al 18% de 135 mL. Sin embargo, dado que el tRNA receptor tiene contaminantes con peso molecular muy similar, es imposible cargar grandes cantidades en el gel debido a que las bandas se juntan, por lo que se optimizó la resolución del gel aumentando su grosor, en donde se emplean 500 mL de mezcla y de esta forma es posible cargar una mayor cantidad de tRNA. Como se puede observar en la (Figura 7.2) se logra obtener una alta pureza de los tRNAs (receptor y tetraloop) empleando geles desnaturizantes, sin embargo, para el tRNA receptor se seguían obteniendo bajos rendimientos (5-10%), por lo que se decidió tratar de purificar al tRNA receptor mediante cromatografía de intercambio iónico. Para la purificación se empleó una columna de intercambio aniónico (Mono Q) con un amortiguador de 20 mM MES pH 6.5, aplicando un gradiente a 1 M de NaCl, encontrando una forma más económica y rápida de purificar al tRNA receptor tal y como se ve en la figura 7.2d, lo que podría permitir mejorar la calidad de los cristales y posiblemente su resolución.

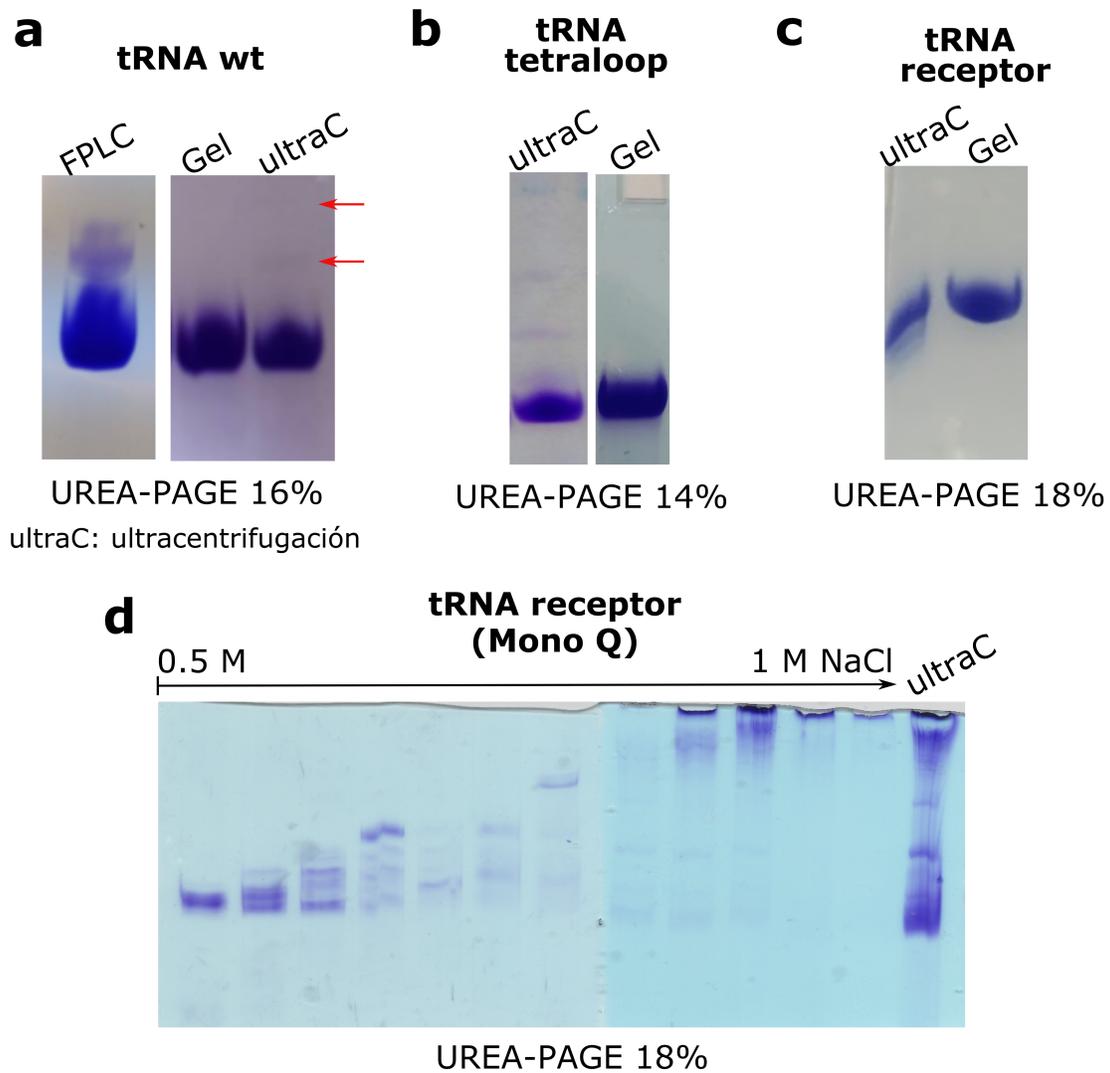


Figura 7.2. Cada tRNA se purifica de diferente forma. El tRNA se sobre-expresa *in vivo* y se han diseñado diversas estrategias para su purificación, de tal forma que se obtenga con la menor cantidad de pasos. Con el tRNA wt se desarrollaron tres estrategias diferentes, siendo la ultracentrifugación la mejor opción. Para los tRNAs modificados se utilizan además geles desnaturizantes. a) Purificación del tRNA wt, primer carril se empleó dos columnas, una Topoyearl-butyl y una SourceQ, en el segundo carril se purificó mediante un gel de electroforesis UREA-PAGE al 16%; en el tercer carril se purificó por ultracentrifugación, b) Purificación del tRNA tetraloop: en el primer carril se muestra después de la ultracentrifugación y en el segundo carril el carril se purificó mediante un gel de electroforesis UREA-PAGE al 14%, c) Purificación del tRNA receptor: en el primer carril se muestra después de la ultracentrifugación y en el segundo carril se encuentra la banda purificada por geles UREA-PAGE al 18%, d) Purificación del tRNA receptor mediante cromatografía de intercambio aniónico, empleando una columna Mono Q. Se realizó un gradiente de 0-1 M de NaCl, las primeras fracciones empezaron a salir al 54% B y se visualizaron en un gel UREA-PAGE al 18%.

7.3. La variante GlyRSacceptor es estable a pH básico, mientras que la GlyRSanticodón lo es a pH ácido

Después de solubilizar y purificar a las variantes, se buscó una condición donde las proteínas fueran estables, esto se logró empleando ensayos de fluorimetría diferencial de barrido (Thermal Shift Assays), con los cuales se identificaron los componentes amortiguadores y salinos donde las enzimas se encuentran estables (mayor temperatura media de desnaturalización (T_m)). La variante GlyRSanticodón mostró ser más estable a pH ácido (5.0-5.5) en un amortiguador de ácido succínico 50 mM (Figura 11.2a), al igual que la variante GlyRSacceptor (Figura 11.2b). Sin embargo, al intercambiar la GlyRSacceptor en ácido succínico 50 mM pH 5.5 y 150 mM NaCl, la proteína se precipitó de inmediato. Finalmente, se utilizó 50 mM Tris pH 8.0 como agente amortiguador. Posteriormente, se buscó algún aditivo para aumentar la estabilidad de las variantes. La GlyRSanticodón resultó tener estabilidad con tres aditivos: L-arginina, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ (Figura 11.2c); debido a la posible interferencia de los sulfatos y fosfatos con la unión del tRNA, se decidió utilizar 20 mM L-arginina. Por otro lado, se encontró que la betaína estabiliza a la variante GlyRSacceptor a una concentración de 625 mM (Figura 11.2d), lo cual es una concentración muy elevada para emplearla en los ensayos de cristalización. Debido a ello, se realizó una titulación de la betaína y se encontró que puede estabilizar a la proteína desde una concentración de 50 mM. Finalmente se encontró que la mutante GlyRSacceptor es estable en 50 mM de Tris pH 8.0 con 50 mM de betaína, mientras que la mutante GlyRSanticodón es estable en 50 mM de ácido succínico pH 5.0 con 20 mM L-arginina.

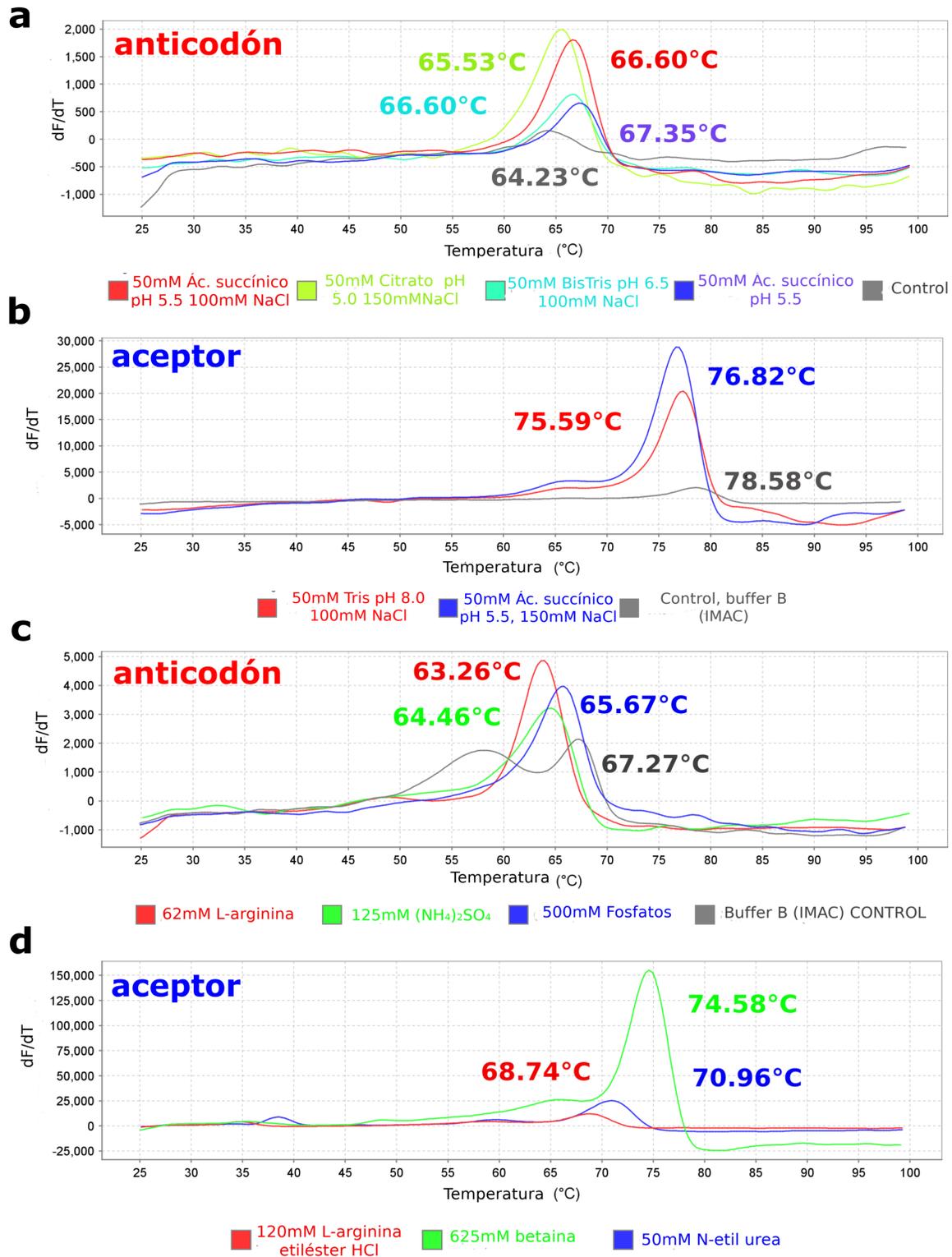


Figura 7.3. Búsqueda del amortiguador para estabilizar a las mutantes Curvas de desnaturalización obtenidas mediante fluorimetría diferencial de barrido. Se muestran las curvas con los componentes que implican una mejora a) Kit de solubilidad y estabilidad 1 (S&S1) de Hampton Research para la GlyRS-anticodón. b) S&S1 para GlyRS-aceptor, c) S&S2 para la GlyRS-aceptor, d) S&S2 para la GlyRS-anticodón

7.4. La variante GlyRSacceptor es más estable en presencia de tRNA

Las dos variantes se pusieron en contacto con el tRNA en una relación molar 1:1.2 respectivamente; esto se hizo justo después de su purificación, con el fin de aumentar la estabilidad de las variantes e intentar formar el complejo. Para la GlyRSanticodón no se observó ningún aumento en su estabilidad al adicionar el tRNA (T_m : 63.34 °C), mientras que para la GlyRSacceptor sí hubo un aumento de 4.4 °C en la T_m cuando se le adicionó el tRNA (T_m =79.9 °C) (Figura 7.4). Los valores de la T_m presentados de cada proteína sin tRNA son los valores de T_m más altos encontrados en los experimentos de solubilidad y estabilidad (Figura 11.2).

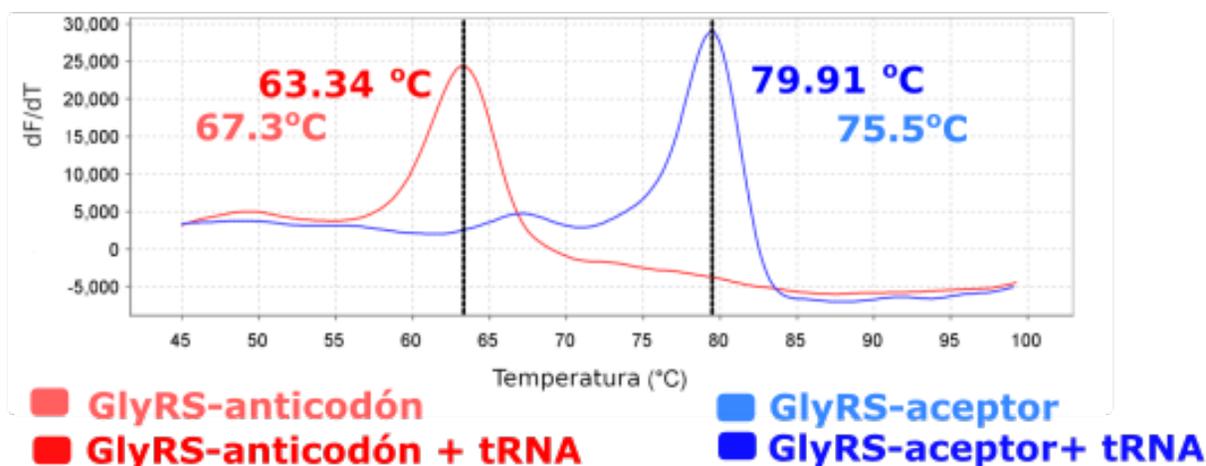


Figura 7.4. La variante GlyRSacceptor es más estable en presencia del tRNA. Curva de fluorimetría diferencial de barrido donde se observa que la GlyRS-acceptor (azul) tiene una T_m de 79.91 °C en 50 mM Tris pH 8.0, 50 mM betaína y tRNA a una relación 1:1.2 mol a comparación del control donde se encuentra la mutante sola con 75.5 °C; para la variante GlyRSanticodón (rojo) se obtuvo una T_m de 63.34 °C en 50 mM ácido succínico pH 5.5, 20 mM L-arg y 1:1.2 mol de tRNA con respecto a la proteína sola, que tiene una T_m de 67.3 °C.

7.5. La GlyRSaceptor y el tRNA wt no forman un complejo estable

Al realizar el ensayo de desplazamiento térmico de ambas variantes en presencia del tRNA, observamos que la GlyRSaceptor se estabiliza, aumentando su temperatura media de desnaturalización en 4.4°C, por lo que se buscó un método para separar el posible complejo, como cromatografía de exclusión molecular. Se probaron diferentes condiciones para pasar la muestra por la columna S200, modificando la fuerza iónica de la solución y la concentración del amortiguador (Figura 7.5), sin embargo, en todos los casos, la GlyRS-aceptor y el tRNA eluyen en diferentes fracciones, tal y como se puede ver en el gel UREA-PAGE al 14% de la Figura 7.5d.

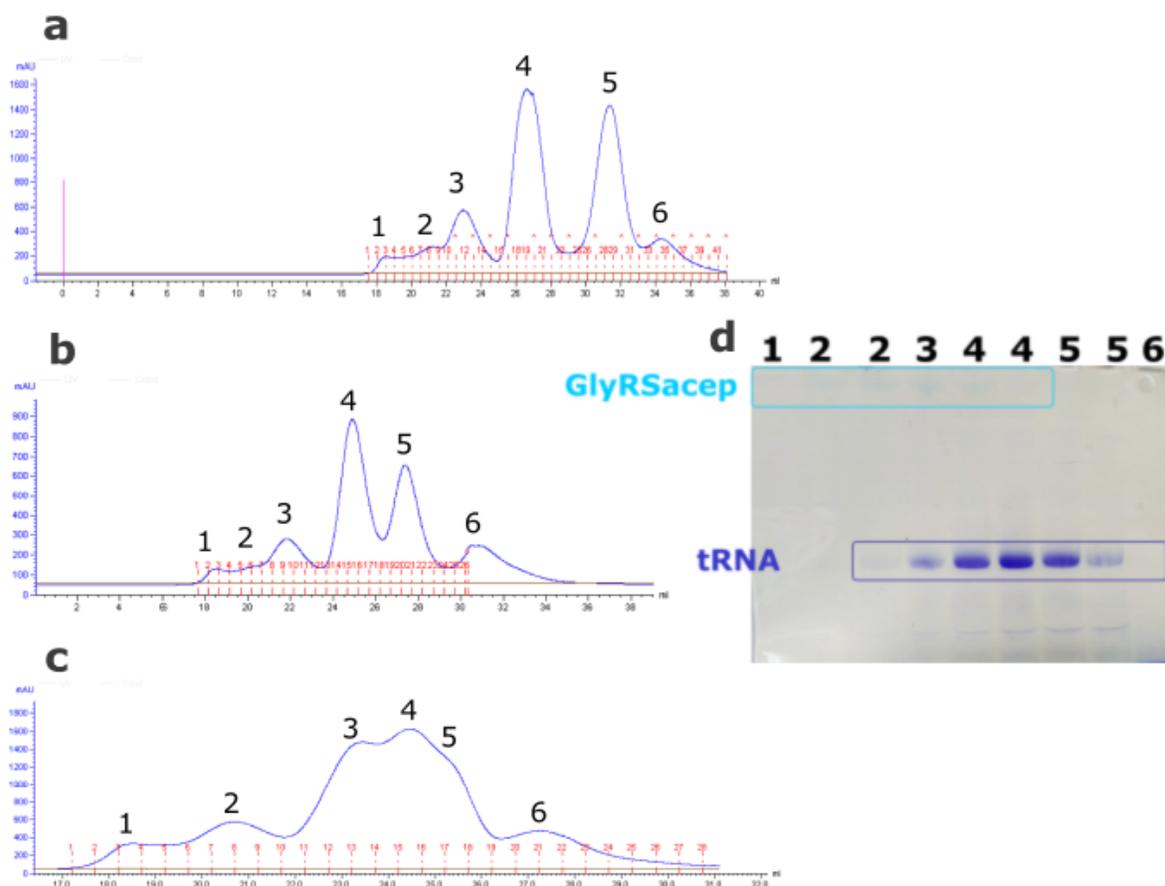


Figura 7.5. La GlyRSacceptor y el tRNA no eluyen al mismo tiempo en la columna de exclusión molecular. Para la separación del complejo se emplearon dos columnas Superdex 200 conectadas en serie. Los cromatogramas muestran: a) Condición encontrada por los ensayos de desplazamiento térmico: 50 mM Tris pH 8.0, 50 mM betaína, b) Aumento de la fuerza iónica utilizando la betaína: 50 mM Tris pH 8.0, 50 mM betaína-HCl, c) Disminución de la fuerza iónica: 50 mM Tris pH 8.0, d) Gel UREA-PAGE 14%, en el cual se visualizan las fracciones eluidas en el cromatograma (a), el gel fue teñido con Toluidina

7.6. La variante GlyRSacceptor no forma un complejo estable con el dominio de reconocimiento del anticodón (ACBD)

Debido a que no se lograba estabilizar al complejo GlyRS-tRNA, se buscaron otras alternativas, entre ellas, la generación de las mutantes GlyRSanticodón y GlyRSacceptor, tanto para buscar empaquetamientos alternos en los posibles cristales, como para generar espacio ante posibles cambios conformacionales necesarios para el

acomodo del tRNA. Los resultados mostraron, de manera sorprendente, que la variante GlyRSacceptor es más estable y se estabiliza en presencia del tRNA en comparación con la GlyRSanticodón (ver Figura 7.4), sin embargo, no es posible aislar un complejo por cromatografía de exclusión molecular (ver Figura 7.5).

Dado lo anterior, y al hecho de que la enzima natural está dividida en dos subunidades, se buscó una manera alterna de generar la enzima silvestre utilizando dos cadenas polipeptídicas para que, en principio, los dominios tuvieran mayor flexibilidad. Las dos partes que se utilizaron fueron: la variante GlyRSacceptor y el dominio de reconocimiento al anticodón (ACBD) (Figura 7.6a). Inicialmente, se buscó expresar y purificar el dominio ACBD individualmente; sin embargo, la proteína no era soluble. Se intentó la co-expresión con el tRNA, pero la bacteria tardaba en crecer y se lisaba durante la inducción, por lo que al final, se co-expresó con su parte complementaria: la GlyRSacceptor. Al co-expresar con esta variante, el dominio ACBD se solubilizó; sin embargo, al purificar, las proteínas eluyeron por separado en la columna de afinidad (Figura 7.6b). Después de la elución, la parte correspondiente al ACBD se precipitó de inmediato.

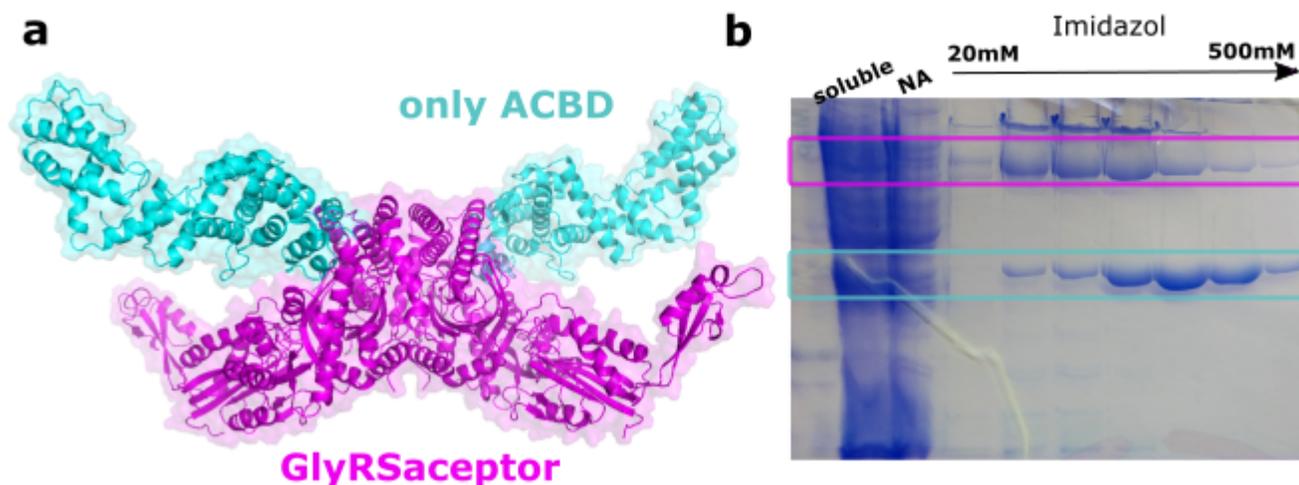


Figura 7.6. La GlyRSacceptor no forma un complejo estable con el dominio ACBD para reconstituir a la GlyRS completa a) Representación de las dos partes en que se dividió la GlyRS para que tuviera mayor movilidad al reconocer el tRNA; por un lado esta la GlyRSacceptor (magenta) y por el otro el dominio que podría reconocer al anticodón: only ACBD (cian) b) Gel SDS-PAGE 8% donde se cargaron las diferentes fracciones eluidas de la columna de níquel; ambas proteínas eluyen por separado.

7.7. La interacción tetraloop-receptor (RNA-RNA) favorece la cristalización

La cristalización de moléculas de RNA o complejos con ácidos nucleicos ha sido un reto en cristalografía. Un ejemplo de la resolución de este problema, fue la obtención de la estructura tridimensional de una ribozima, la RNasa P, en complejo con tRNA, el cual se logró cristalizar empleando una interacción intermolecular RNA-RNA, conocida como tetraloop-receptor, como estrategia de cristalización [Reiter et al., 2010]. Esta estrategia consiste en el diseño de dos moléculas de RNA: una que contenga un asa (tetraloop) con la secuencia GAAA (o GNRA), y otra que contenga un bucle interno (internal loop) con una secuencia específica de 11 nucleótidos y que cuenta con una plataforma de adenosinas y varias interacciones no canónicas (apareamientos

que difieren de los Watson-Crick (WC)). Estos dos elementos forman una interacción estable que se ha observado en múltiples estructuras naturales de RNA (Figura 7.7a); su uso en cristalografía favorece en principio la formación de la red de empaquetamiento de moléculas que requiere un cristal, además de que disminuye la movilidad de las moléculas de RNA; la inclusión de estos módulos de interacción se hace en puntos en donde no se afecte la actividad [Ferré-D'Amaré et al., 1998]. En este caso, se escogió el brazo del anticodón, con la intención de formar un complejo con la GlyRS-aceptor. Se diseñaron dos tRNAs a partir del tRNA wt: tRNA-receptor (modificado en el tallo del anticodón) y tRNA-tetraloop (modificado en el asa del anticodón). Se lograron expresar y purificar los dos tipos de tRNA (Figura 7.7b) empleando el mismo protocolo de expresión y purificación del tRNA wt.

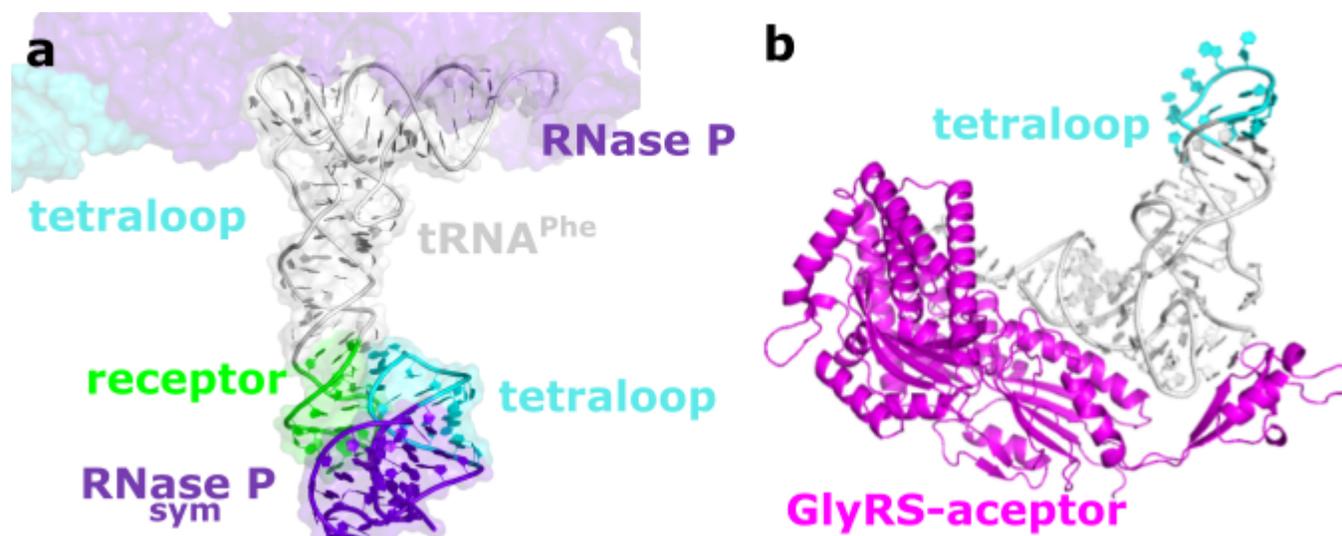


Figura 7.7. La interacción tetraloop-receptor como estrategia de cristalización a) Representación esquemática de la interacción de las moléculas de RNA mediante secuencias modificadas (receptor y tetraloop), favoreciendo el empaquetamiento de las moléculas para la generación de cristal (PDB 3Q1Q). b) Modelo de la GlyRS-aceptor con el tRNA tetraloop, donde muestra la secuencia de tetraloop libre para interactuar con la secuencia receptor del otro tRNA.

Se montaron ensayos de cristalización con la mutante GlyRS-aceptor para formar el complejo, tanto con el tRNA wt como con el par de tRNAs

(receptor y tetraloop), empleando una relación estequiométrica de 1:1.2 y 1:1:1 respectivamente. Se obtuvieron cristales en 11 condiciones diferentes para la mezcla GlyRS-aceptor:tRNA (1:1.2), de los cuales 9 resultaron ser cristales de la enzima sin el tRNA, mientras que las dos condiciones restantes se intentaron mejorar con aditivos, sin tener resultados alentadores. Por otro lado, para la mezcla de GlyRS-aceptor:tRNAreceptor/tRNAtetraloop (1:1:1) se obtuvieron cristales en 9 condiciones distintas, de las cuales 5 pertenecían a la enzima; las 4 condiciones restantes se trataron de optimizar con aditivos. Se encontró una condición en donde los cristales tenían el tamaño suficiente para poder congelarlos y difractar. Los cristales de la mezcla GlyRS-aceptor:tRNAreceptor/tRNAtetraloop (1:1:1) crecen después de 24 h en la condición 10 % PEG 4,000, 50 mM cacodilato de sodio pH 6.5, 200 mM KCl y 10 mM MgCl₂. Los cristales se congelaron empleando 35 % PEG 4,000 como agente crío-protector y se guardaron hasta su uso. Un cristal se difractó y colectó en el LANEM del Instituto de Química a 4.1Å con parámetros de celda $a=127.86 \text{ \AA}$, $b=133.06 \text{ \AA}$, $c=238.58 \text{ \AA}$, $\alpha= 90^\circ$, $\beta= 103.6^\circ$ y $\gamma= 90^\circ$ con un grupo espacial C1₂1. Al resolver la estructura por remplazo molecular, sólo se obtuvo la estructura de la mutante GlyRS-aceptor, sin observarse la presencia de tRNA.

7.8. El análogo del estado de transición ayuda a la formación del complejo

Debido a la dificultad de poder estabilizar el complejo para cristalizar, se han tenido que diseñar diversas estrategias para favorecer la formación del complejo en la condición de cristalización, como la formación de las mutantes (GlyRSaceptor y

GlyRSanticodón), la generación de un par de tRNAs para aumentar los contactos e interacciones (tRNAreceptor y tRNAtetraloop), así como la modificación de la relación estequiométrica de la enzima y el tRNA, empleando al tRNA en exceso (1:3) para favorecer la unión. Sin embargo, no se lograron obtener cristales del complejo, por lo que se decidió añadir un componente más a la mezcla: la molécula del análogo del estado de transición: (5'-O-[N-(1-glicil)sulfamoil] adenosina (G5A). Se hizo una búsqueda de condiciones de cristalización empleando la mezcla de GlyRSaceptor (36 mg/mL), el par de tRNAs (receptor y tetraloop) con una relación estequiométrica de 1:3:3 respectivamente (43.1 mg/mL de cada tRNA) y 3 mM de G5A, con lo cual se obtuvieron cristales en la condición de 18 % PEG 6,000 y 50 mM acetato de sodio pH 5.0, los cuales crecieron en 2 días. Se decidió realizar una primera ronda de aditivos, encontrando que con 3 % de dextran sulfato de sodio 5,000 mejoraba el tamaño y la morfología de los cristales, además de que crecían en 24 h. Los cristales se trataron de congelar; sin embargo, tenían una gran fragilidad, por lo que se realizó una segunda ronda de aditivos implementando la deshidratación. En la segunda ronda se encontraron diversos compuestos donde los cristales eran más grandes. Los aditivos encontrados se emplearon como agentes deshidratantes y crío-protectores (Tabla 7.1). Se probaron varios agentes deshidratantes, encontrando que 30 % de glucosa es el mejor agente deshidratante y crío-protector; estos cristales se congelaron y se llevaron a difractar al LANEM del Instituto de Química, sin embargo, difractaban a muy baja resolución (sólo algunas reflexiones que ni siquiera permitieron la indexación) y no se pudieron coleccionar.

Tabla 7.1. La adición de G5A genera cristales del posible complejo. Los cristales fueron optimizados mediante dos rondas de aditivos.

Solución madre	Primera ronda de aditivos	Segunda ronda de aditivos
18 % PEG 6,000 50mM NaAcO/HAcO pH 5.0	3 % Dextran sulfato de sodio (muy frágiles)	10mM Trimetilamina 10mM Sarcosina 0.5 % polivinilpirrolidona 1 % PEG 3,350 3 % D-glucosa (Difracción pobre)

7.9. Se encontró una nueva condición de cristalización mediante sembrado cruzado (cross-seeding)

Los cristales obtenidos con la mezcla GlyRSaceptor (36 mg/mL), el par de tRNAs (receptor y tetraloop) con una relación estequiométrica de 1:3:3 respectivamente (43.1 mg/mL de cada tRNA) y 3 mM de G5A en la condición con 18 % PEG 6,000 y 50 mM acetato de sodio pH 5.0, fueron optimizados mediante dos rondas de aditivos (Tabla 7.1), sin embargo, los cristales tenían una difracción pobre o no difractaban. Para que lograran difractar, se buscó un método en donde las moléculas cambiaran potencialmente su empaquetamiento. Para ello se realizó un sembrado cruzado, usando los cristales previamente obtenidos en PEG 6,000 como semillas para una nueva búsqueda en los kits de cristalización. El resultado del sembrado cruzado fue la obtención de cristales en una nueva condición: 15 % PEG 400, 50 mM cacodilato de sodio pH 6.5, 80 mM Mg(AcO)₂ y 15 mM MgCl₂. La nueva condición se trató de optimizar con una ronda de aditivos; sin embargo, no se obtuvieron cristales.

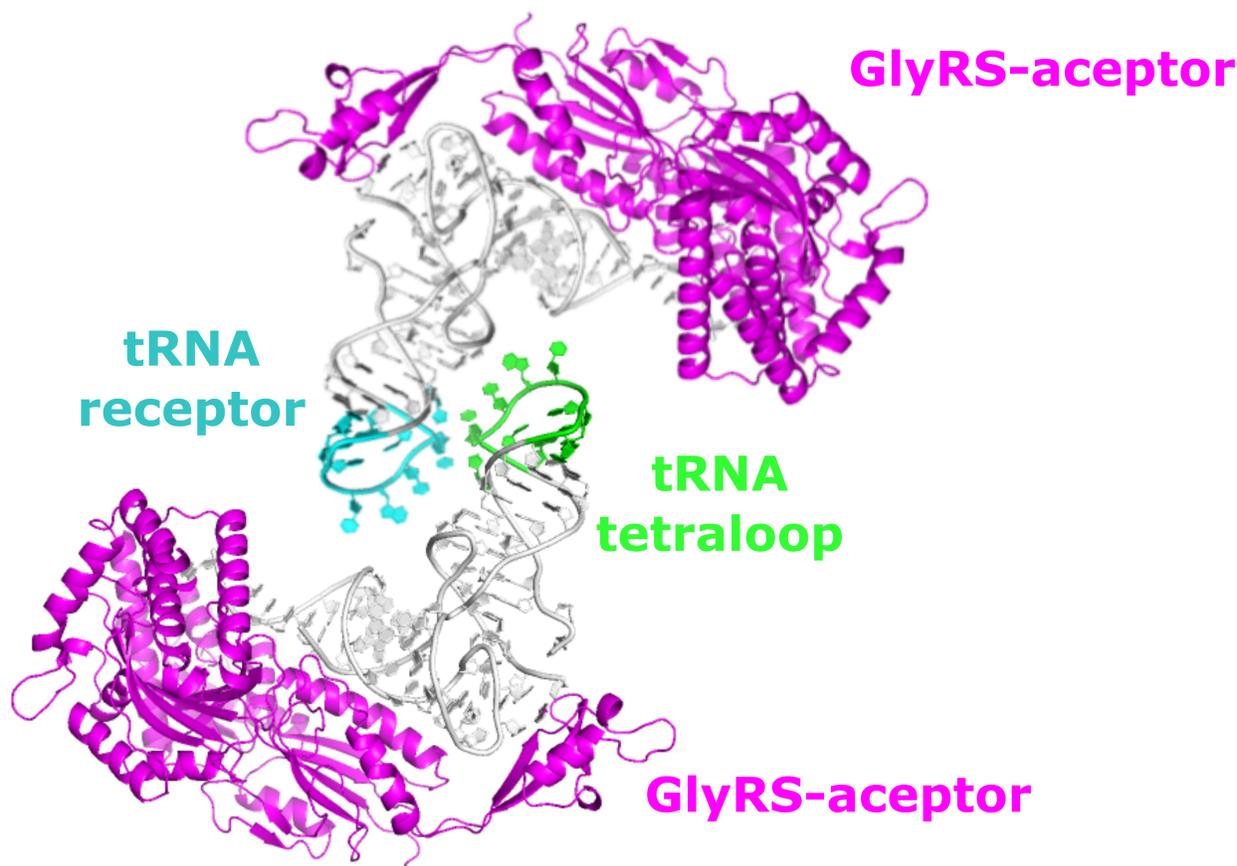


Figura 7.8. Posible arreglo de las moléculas dentro del cristal. Idealmente, la molécula de GlyRSaceptor podría estar uniendo a uno de los tRNAs modificados con la secuencia del receptor, mientras que otra GlyRSaceptor podría interaccionar con un tRNA con la secuencia del tetraloop. El par tRNAreceptor:tRNAtetraloop interaccionaría entre sí.

7.9.1. Colecta y faseo de los cristales

Los cristales obtenidos mediante sembrado cruzado en la condición 15 % PEG 400, 50 mM cacodilato de sodio pH 6.5, 80 mM $\text{Mg}(\text{AcO})_2$ y 15 mM MgCl_2 fueron congelados en nitrógeno líquido, empleando 35 % PEG 400 como agente crio-protector. Los cristales fueron difractados y colectados en el LANEM del Instituto de Química, UNAM. Los datos se colectaron a 7\AA con un grupo espacial $C2_12$; sin embargo, al procesar los datos y hacer reemplazo molecular, no se encontraron resultados satisfactorios. Por un lado, de acuerdo a los valores del Z-score, se tenía una solución

que podría corresponder a la mutante GlyRSacceptor y por otro lado se tenía una solución que podría contener al tRNA; al fijar una molécula y buscar la segunda, no pudimos obtener ninguna solución que incrementara su valor de Z-score.

7.9.2. Deshidratación, colecta y faseo de los cristales

Dados los resultados obtenidos, se replicaron los cristales descritos en la sección anterior y se deshidrataron durante 2 días a 22 °C con 35 % PEG 400 y posteriormente se congelaron con el mismo agente deshidratante. Los cristales fueron difractados y colectados en el Advanced Photon Source (Argonne National Laboratory, Argonne, Illinois, USA). Los datos se colectaron a 4.5 Å con un tamaño de celda $a = 95.9$ Å, $b = 95.9$ Å, $c = 183.9$ Å, $\alpha = 90^\circ$, $\beta = 90^\circ$, $\gamma = 90^\circ$ y un grupo espacial P4₂2₁2 (Figura ??) La estructura se intentó resolver usando reemplazo molecular con las coordenadas de la GlyRS-acceptor previamente obtenidas (ver página 46, sección 7.6. La interacción tetraloop-receptor (RNA-RNA) favorece la cristalización), sin embargo, no se obtuvo un resultado satisfactorio empleando la molécula completa. Posteriormente se emplearon las coordenadas de la molécula del tRNA, de los dominios de la subunidad beta y de la subunidad alfa, sin obtenerse algún resultado promisorio. Al final, se emplearon las coordenadas del dímero del dominio catalítico dentro de la subunidad α y en apariencia se logró resolver dicha subunidad (Z-score >8), encontrando un empaquetamiento con espacios vacíos entre cada subunidad α en donde en principio existe espacio para que se pudiera ubicar el resto de la subunidad β en complejo con el tRNA.

Tabla 7.2. Estadísticas de la colecta de datos a 4.5 Å del cristal obtenido a partir de la mezcla GlyRSacceptor:tRNAs:G5A.

Colecta de datos	
Grupo espacial	P4 ₂ 2 ₁ 2
Dimensiones de la celda	a= 95.9 Å b= 95.9 Å c= 183.9 Å $\alpha= 90^\circ$ C $\beta= 90^\circ$ C $\gamma= 90^\circ$ C
Resolución (Å)	47.94-4.51 (4.74-4.62)
Rsym o Rmerge	0.09 (1.03)
Número de reflexiones	133,219 (38,460)
I/ σ	17 (3.5)
Compleción (%)	99.3 (98.4)
Redundancia	24.4 (26.0)
CC _{1/2}	0.997 (0.902)
Wilson B-factor (Å ²)	263.65
Reemplazo molecular	
Top LLG	36.44
Top TFZ	9.3

7.10. Búsqueda de estrategias para medir la actividad de la GlyRS

Debido a que se ha trabajado con proteínas con dominios eliminados y a que los cristales muestran ser de su posible complejo, es necesario diseñar una forma de medir la actividad de las mutantes con el tRNA. La actividad de varias sintetasas se ha determinado midiendo el primer paso de aminoacilación; es decir, la reacción de activación del aminoácido mediante la liberación de pirofosfato, el cual reacciona, por ejemplo, con el verde de malaquita, generando señal a 620 nm

[Cestari and Stuart, 2013]; también se puede marcar el fosfato β del ATP con un isótopo radioactivo [Zeng et al., 2019]. Estas reacciones sólo ofrecen información de la activación del aminoácido por parte de la sintetasa; sin embargo, nosotros estamos interesados en determinar la actividad de aminoacilación en el segundo paso (formación del aminoacil-tRNA). Para poder determinar el segundo paso de la reacción principal sin utilizar radioactividad (Figura 7.9a), tenemos que generar algún método para poder medir los productos generados: el AMP y/o el tRNA acilado (tRNA-gly).

7.10.1. La actividad se podría determinar mediante reacciones acopladas

Se ha descrito un método espectrofotométrico para la medición de AMP a 340nm [First, 2015]. La reacción descrita se acoplará a la reacción aminoacilación para poder medir la actividad de la GlyRS. La reacción acoplada consta de dos pasos: 1) desaminación de AMP para producir inosina 5-monofosfato (IMP) y 2) oxidación de IMP con NAD⁺ para producir xantina 5-monofosfato (XMP) y NADH (7.9, b) Estas reacciones son catalizadas por la AMP desaminasa (AMD) y la IMP deshidrogenasa (IMD), respectivamente. Debido a que la producción de NADH va acompañada de un aumento de la absorbancia a 340 nm, la liberación de AMP se puede monitorear de forma continua.

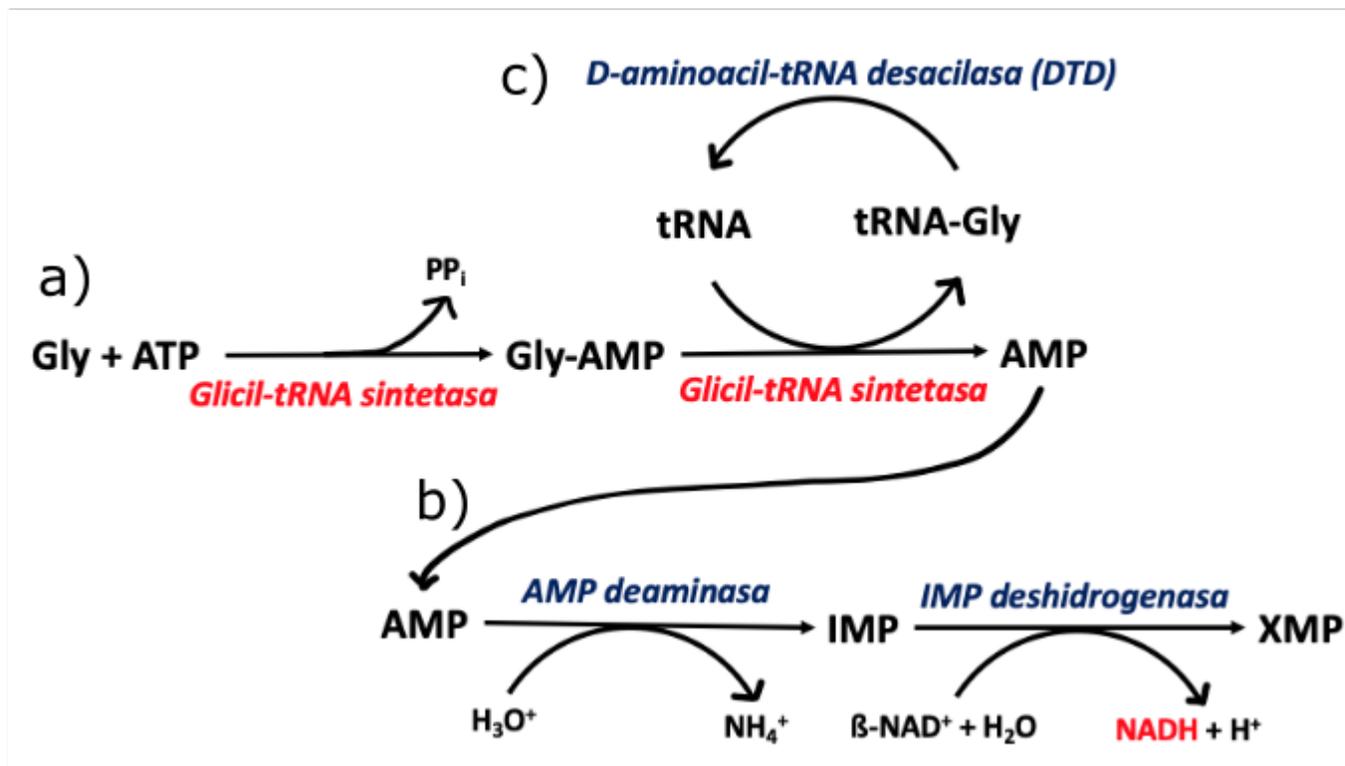


Figura 7.9. Esquema de las reacciones acopladas para la medición de la actividad de la GlyRS
a) La reacción principal se conforma de dos pasos: 1) Activación del aminoácido con ATP, generando Gly-AMP 2) Adición de Gly al extremo 3' del tRNA liberando el AMP. b) El AMP liberado después de la aminoacilación del tRNA es transformado en dos reacciones: 1) El AMP es transformado a IMP mediante la enzima AMP deaminasa 2) La IMP es reducida a XMP por la enzima IMP deshidrogenasa, empleando $\beta\text{-NAD}^+$ como sustrato, siendo la reacción que genera la señal de medición. c) Reacción acoplada para la regeneración del tRNA mediante la enzima D-aminoacil-tRNA desacilasa, que retira la glicina del tRNA.

Los ensayos de actividad descritos tienen el problema de que el tRNA es el reactivo limitante, lo que disminuye la sensibilidad y aumenta el costo del ensayo. Para eliminar esta limitante, se puede acoplar una reacción al ensayo en el que se escinda el aminoácido del tRNA-Gly, regenerando el tRNA libre. Esta reacción acoplada ha sido utilizada para monitorear la reacción de la TyrRS [First and Richardson, 2017]. Como segunda reacción acoplada, emplearemos la enzima D-aminoacil-tRNA desacilasa (DTD) (Figura 7.9c). La enzima DTD se encarga de editar a los tRNAs que fueron erróneamente aminoacilados con un D-aminoácido [Rybak et al., 2019]. A pesar de que

la glicina es un aminoácido no quiral, la enzima DTD es capaz de reconocer y deacilar a la glicina del tRNA [Routh et al., 2016].

Expresión de AMP deaminasa

Inicialmente, se empleó el gen que expresa a la enzima AMP deaminasa de *S. cerevisiae* [Merkler et al., 1989], de 95 KDa de masa molecular. La primera prueba de expresión fue con 3 mM de rhamnosa a 37 °C durante 4 h; sin embargo, la enzima no se expresó (Figura 7.10a). Posteriormente, se creció a la bacteria empleando diferentes concentraciones de Zn(AcO)₂, por ser el ion zinc un cofactor de la enzima; sin embargo, la enzima tampoco se expresó (Figura 7.10b). Posteriormente, se buscó el gen de la AMD de otro organismo que se hubiera reportado como sobre-expresado, encontrando el gen de *Aspergillus oryzae*, con una masa molecular de 112.8 KDa [Li et al., 2016]. La enzima AMD se expresó en dos tiempos diferentes de inducción: 4 h y 24 h, ambas con 3 mM de rhamnosa a 37 °C. Como se puede observar en el gel de la figura 7.10c, en el segundo carril, donde se dejó induciendo durante 4 h, se observa una banda a la altura del peso molecular que corresponde a la enzima AMD, que no se observa en el control sin inducir (primer carril). Sin embargo, la expresión es muy poca, por lo que se modificaron las condiciones de expresión. Finalmente, se logró expresar la enzima AMD de *A. oryzae* con 3 mM de rhamnosa a 15 °C durante 24h, lo cual se puede observar en gel de la figura 7.10d, en donde se ve claramente una banda más intensa en el lisado total inducido con respecto al no inducido; sin embargo, la enzima se precipitaba, por lo que posteriormente se buscó una forma de solubilizarla.

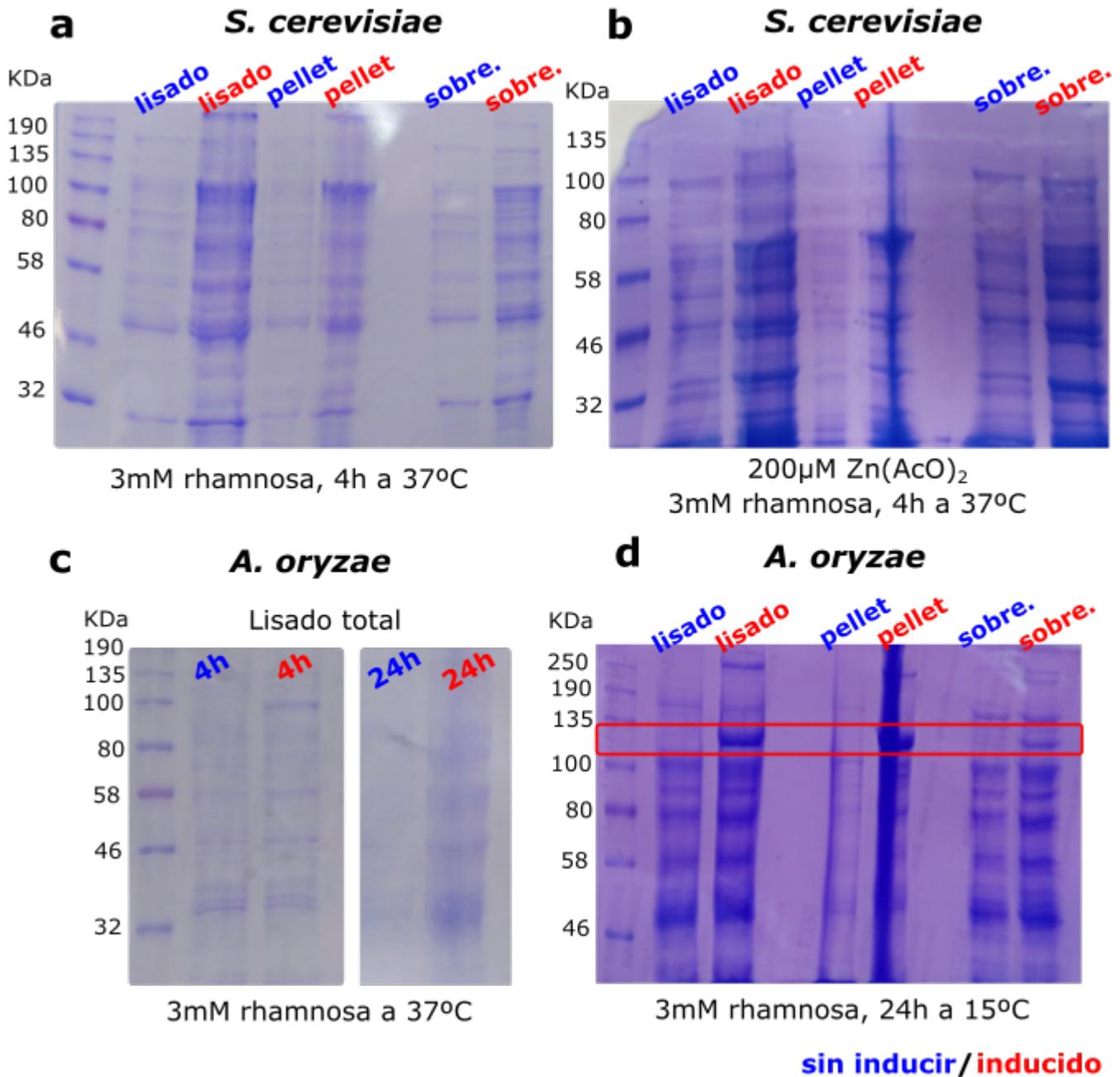


Figura 7.10. Pruebas de expresión para la enzima AMP deshidrogenasa. Todos los geles son SDS-PAGE al 10%. a) Prueba de expresión de la enzima AMD de *S. cerevisiae*, en donde se colocaron tres fracciones: lisado total, pastilla y sobrenadante de un cultivo sin inducir (azul) y un inducido (rojo). a) Pareciera tener expresión, ya que hay una banda en aproximadamente 100 KDa en el lisado y la pastilla inducidos, a comparación del no inducido; sin embargo, el resultado no es claro. b) Mismo gel que en (a), pero añadiendo 200 µM Zn(AcO)₂, el cual no ayudó, ya que ni siquiera se ve la banda a 100 KDa del gel anterior. c) Prueba de expresión de la enzima de *A. oryzae* con dos diferentes tiempos de inducción, en el cual aparece una pequeña banda cerca de 100 KDa en la fracción inducida durante 4 h a comparación de las demás. d) Se modificaron las condiciones de expresión, en donde se puede observar claramente la expresión de la enzima AMD, ya que se ve una banda más intensa en las fracciones inducidas cerca de la banda de 100 KDa en la fracción de la pastilla.

Las enzimas AMD, IMD y DTD se lograron purificar en un solo paso

Una vez expresadas las enzimas, se buscó la forma de solubilizarlas ya que las enzimas AMD e IMD no eran solubles, mientras que la DTD era poco soluble. Se logró solubilizarlas aumentando la fuerza iónica del amortiguador de lisis, ajustándolo a 1 M de KCl. Las enzimas fueron purificadas empleando la cromatografía de afinidad con resina de Ni(II) (IMAC). Los rendimientos de las enzimas por 1 L de cultivo fueron variables; para la enzima AMD se obtuvieron 470 μ g y para la enzima IMD fueron 2.89 mg, mientras que para la enzima DTD fueron 48.3 mg. Las tres enzimas son estables y no pierden su actividad hasta por 2 meses.

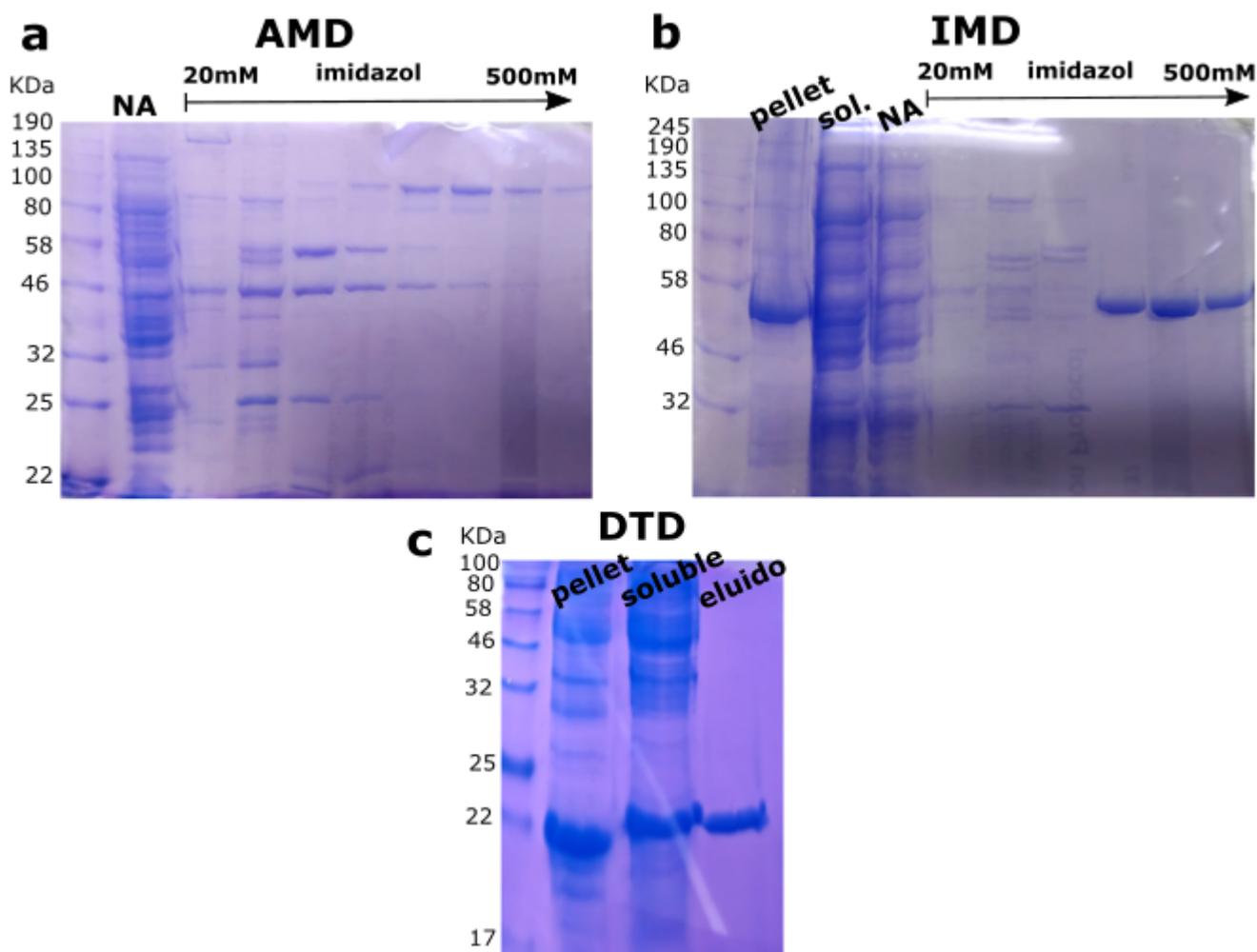


Figura 7.11. Las enzimas para la medición de actividad se purificaron en un solo paso. a) Gel SDS-PAGE al 10 % de la AMP deaminasa; en el primer carril se encuentra la fracción no absorbida por la columna y en los siguientes están las fracciones eluidas por el gradiente de imidazol; sólo se tomaron las últimas 3 fracciones. b) Gel SDS-PAGE 12 %, donde se muestra la purificación de la IMP deshidrogenasa; en el primer carril está la fracción no soluble después de la lisis; en el segundo está la fracción soluble, en el tercero está la fracción no absorbida por la columna y en los carriles restantes se cargaron las fracciones eluidas por el gradiente de imidazol; sólo se tomaron las últimas 3 fracciones. c) Gel SDS-PAGE 18 % de la D-aminoacil-tRNA desacilasa; se observan tres fracciones: en el primer carril están las proteínas no solubles, en el segundo lo soluble y en el tercero esta la fracción eluída de la columna de níquel.

Es posible monitorear la reacción de transformación del AMP a XMP

Para poder medir la actividad de la GlyRS es necesario cerciorarnos que la reacción responsable de generar la señal medible este funcionando adecuadamente. En este caso, la señal es la transformación de AMP a XMP empleando β -NAD⁺ que posteriormente

se transforma a NADH, el cual absorbe luz a 340 nm. La reacción se lleva a cabo por las enzimas AMP deaminasa y la IMP deshidrogenasa, las cuales fueron expresadas, purificadas y estabilizadas. Como se puede observar en la gráfica de la figura 7.12, las enzimas AMD e IMD llevan a cabo la reacción de manera adecuada, ya que al poner ATP al medio en lugar de AMP, no hay absorción a 340 nm.

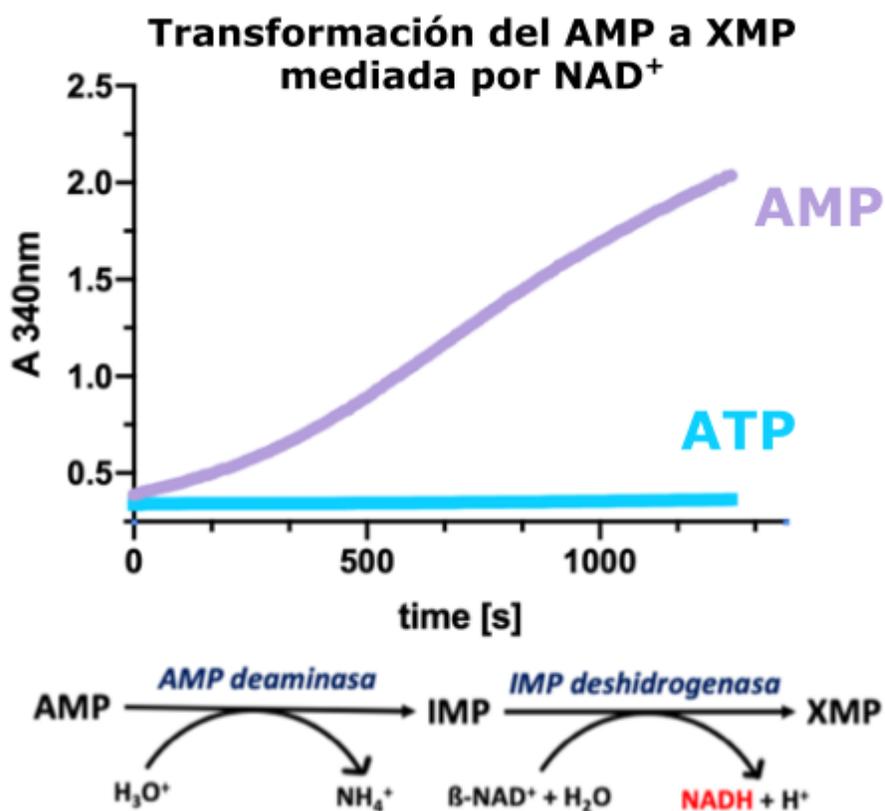


Figura 7.12. Las enzimas AMD e IMD transforman el AMP a XMP. La gráfica muestra la señal, medida a 340nm, de la producción de NADH a través de la reacción de transformación del AMP a XMP, tal y como se muestra en el esquema de reacción inferior. La reacción mostrada corresponde a la primera reacción acoplada de la figura 7.9b. En el ensayo se puso un control negativo usando ATP. De las gráficas se pudo inferir que las enzimas trabajan adecuadamente.

7.10.2. Es posible monitorear la acilación del tRNA por interferometría de biocapa (BLI)

La reacción de aminoacilación del tRNA se lleva en dos pasos y generalmente se mide la actividad de una sintetasa mediante el primer paso (activación del aminoácido); sin embargo, nos interesa conocer la actividad de la GlyRS una vez que transfiere el aminoácido a su tRNA, el cual corresponde al segundo paso. En este último paso se generan dos productos: el AMP y el tRNA acilado (tRNA-gly). En el método de reacciones acopladas (Figura 7.9) se siguió la producción del AMP por espectroscopía; sin embargo, se han tenido diversas complicaciones en la medición de la actividad; las más importantes son que se utilizan muchas enzimas con posibles distintos requerimientos de condiciones; además, es posible que la sensibilidad del ensayo no sea la suficiente para que se pueda monitorear la cantidad de AMP producida en la reacción de aminoacilación; por ello, se buscó una alternativa para medir la misma.

La acilación del tRNA se lleva a cabo uniendo el grupo carboxílico (COOH) del aminoácido a uno de los hidroxilos (OH) de la pentosa en la última base del tRNA (A76), dejando libre el grupo amino (NH₂) del aminoácido. El grupo amino funciona como un nucleófilo que podría reaccionar con grupos carbonilo, por lo que se diseñaron diversas estrategias para unir el tRNA-gly a biosensores y discernir entre un tRNA acilado y un deacilado (ver tabla 7.3).

Tabla 7.3. Métodos diseñados para medir la actividad de la GlyRS en el segundo paso de aminoacilación.

Método	¿Qué mide?	Estrategia	Problema
Espectrofotómetro 320 nm	conversión de AMP	Reacciones acopladas	No se ha logrado acoplar todas las enzimas
BLI	tRNA-gly	biosensor de estreptavidina	La condición de biotilación deacila al tRNA
BLI	tRNA-gly	biosensor AR2G	Se necesita optimizar la extracción del tRNA de la reacción

No fue posible monitorear la reacción de biotilación del tRNA-gly en el grupo amino libre del aminoácido; esto puede deberse a que las condiciones de biotilación son muy similares a las de deacilación (pH básico) y a pesar de realizar la reacción a baja temperatura, tal vez no fue posible evitar la deacilación.

Como alternativa, se emplearon los biosensores AR2G, los cuales tienen un grupo carboxílico libre (COOH) que puede ser activado y posteriormente el grupo amino del tRNA-gly se podría unir al biosensor mediante un ataque nucleofílico, generando una señal que diferencia el tRNA-gly del deacilado (tRNA) (Figura 7.13). Se optimizaron las condiciones de unión del tRNA al biosensor y se han realizado pruebas de dosis respuesta, empleando diferentes tiempos de la reacción de aminoacilación; sin embargo, no se han obtenido resultados concluyentes, ya que el proceso de aislamiento del tRNA utilizado para la reacción no ha sido optimizado. Es decir, los volúmenes que se han manejado son muy pequeños para realizar las extracciones de fenol y no hemos podido garantizar la homogeneidad en la cantidad de muestra obtenida.

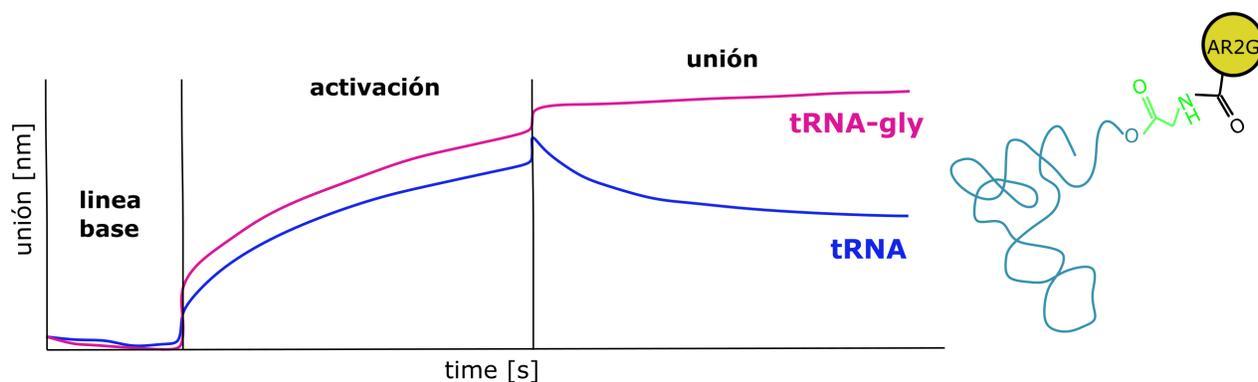


Figura 7.13. Los biosensores AR2G permiten monitorear tRNA acilado a) Esquema que representa la unión del tRNA-gly (o cualquier tRNA aminoacilado) al biosensor AR2G mediante una reacción nucleofílica del grupo amino libre de la glicina al carboxilo activado del biosensor. b) sensorgrama de los biosensores AR2G con dos muestras de RNA. Primero se observa la línea base, en donde están los biosensores en agua; posteriormente, se activa al ácido carboxílico del biosensor con 20 mM de EDC y 10 mM Sulfo-NHS para generar un grupo saliente; finalmente, el biosensor se pone en contacto con la muestra de RNA, el cual se unirá al mismo si está el grupo amino libre de algún aminoácido (tRNA-aa), mientras que para el tRNA deacilado no se observa unión y de hecho la señal disminuye.

| **Discusión**

8.1. La variante GlyRSacceptor es más estable con respecto a la GlyRSanticodón

El diseño de variantes de la GlyRS fue importante para conocer la estabilidad relativa de las dos regiones putativas de reconocimiento del tRNA: el anticodón y el tallo aceptor. Mediante ensayos de fluorimetría diferencial de barrido, se observó que la variante que podría reconocer al tallo aceptor del tRNA (GlyRSacceptor, $T_m: 75.5^\circ\text{C}$) es más estable que la del anticodón (GlyRSanticodón, $T_m: 67.3^\circ\text{C}$). Este hecho es contrario a lo que pudiera creerse, ya que el anticodón es un determinante de identidad muy importante en general para las tRNA sintetasas. También, de manera sorprendente, al poner en contacto ambas mutantes con el tRNA en ensayos de fluorimetría diferencial de barrido, también se observó una mayor estabilización de la enzima GlyRSacceptor ($T_m: 79.9^\circ\text{C}$) con respecto a la GlyRSanticodón (63.34°C), lo cual podría ser indicativo de que la interacción con el brazo aceptor del tRNA es aún más estable y/o menos transiente que la que podría ocurrir con el asa del anticodón; debido a su mayor estabilidad, se diseñaron diversas estrategias para aislar un complejo de la GlyRS-aceptor con el tRNA; sin embargo, la interacción de la proteína con el tRNA

parece no ser lo suficiente fuerte para ello (Figura 7.5).

8.2. Se necesita flexibilidad en los dominios de la subunidad beta para un reconocimiento total del tRNA

A pesar que la variante GlyRSacceptor podría tener la región de mayor contacto con el tRNA, también podría ser necesario el reconocimiento del tRNA en el anticodón para poder estabilizar al complejo, ya que ambos puntos de reconocimiento parecen rodear al tRNA en el modelo propuesto. El posicionamiento del tRNA en la cavidad sugiere que uno de los dominios que participan en el reconocimiento del tRNA podría sufrir un cambio conformacional, por lo que darle flexibilidad a los dominios tal vez permitiría que la unión con el tRNA fuera más sencilla. En realidad, la mayoría de las bacGlyRSs expresan la cadena alfa y la beta por separado. En un intento por emular este hecho, intentamos reconstituir la enzima completa a partir de la construcción GlyRSacceptor y el dominio de unión al anticodón (ACBD), sin embargo, el ACBD era inestable al expresarlo individualmente. Dado esto, se co-expresó con su parte complementaria (GlyRSacceptor) y se logró solubilizar; sin embargo, no pudimos aislar un complejo de los dos fragmentos proteicos.

8.3. El par tRNAreceptor:tRNA tetraloop ayudó a obtener cristales en presencia de la GlyRSacceptor y GSA

En trabajos previos del laboratorio se habían intentado diversas estrategias para obtener el complejo de la GlyRS con su tRNA sin éxito; el diseño de las variantes fue

un paso importante para favorecer la interacción del tRNA con la proteína; asimismo, el diseño de tRNAs que favorecieran la cristalización fue uno de los puntos determinantes para la obtención de cristales. Aunado a lo anterior, en complejos reportados de otras aaRSs con su tRNA emplean al análogo del estado de transición (aminoacil-adenilato) para estabilizar a la proteína y al complejo, por lo que se utilizó también (síntesis por parte de nuestro colaborador Morten Grötli, Gothenburg University, Sweden). Con estas tres estrategias (variante carente de dominios completos, tRNAs modificados y uso del un análogo del estado de transición), fue posible la obtención de cristales del posible complejo.

8.4. La técnica de sembrado cruzado permite obtener nuevas condiciones de cristalización

Si bien con las estrategias mencionadas en la sección anterior se obtuvieron cristales (18% PEG 6,000 y 50 mM de acetato de sodio pH 5.0), éstos eran muy frágiles. Los cristales de ácidos nucleicos tienden a tener un gran porcentaje de agua debido a los grupos fosfato, que tienden a hidratarse, lo que hace difícil su cristalización y difracción a resolución atómica. Se trató de mejorar estos cristales buscando aditivos y deshidratándolos, pero no mejoró la calidad ni la resolución del patrón de difracción. El sembrado cruzado fue una estrategia para buscar una condición nueva de cristalización, empleando semillas de la mejor condición inicial, con objeto de encontrar un nuevo empaquetamiento de las moléculas dentro del cristal; así, se obtuvieron cristales en 20% PEG 400, 50 mM de cacodilato de sodio pH 6.5, 80 mM de $\text{Mg}(\text{AcO})_2$ y 10 mM de MgCl_2 , los cuales se difractaron y colectaron a una resolución de 4.5 Å.

8.5. Los cristales del complejo ternario no pueden ser resueltos por reemplazo molecular

La variante GlyRSacceptor es una proteína que cristaliza fácilmente; se obtienen cristales que difractan a 4.1 Å, incluso sin optimización, por lo que ha sido necesario poner controles cada vez que se obtienen cristales en alguna condición. El juego de datos obtenido a 4.1 Å de la GlyRSacceptor se pudo resolver por reemplazo molecular sin ningún problema. Por el contrario, al obtener los cristales del complejo GlyRSacceptor:tRNAreceptor/tRNAtetraloop:GSA con las estrategias ya descritas y sembrado cruzado, se obtuvieron datos a 4.5 Å que no se han logrado resolver por reemplazo molecular. El hecho de que, en apariencia, sólo se haya podido resolver la densidad electrónica del dominio catalítico de la subunidad alfa (sin observarse densidad electrónica adicional), nos habla de que la GlyRSacceptor pudo haber sufrido un cambio conformacional importante. Al analizar el empaquetamiento putativo del cristal, podemos apreciar que existen espacios vacíos entre las subunidades alfa, en donde encajarían los dominios correspondientes de la subunidad beta y el tRNA unido. Sin embargo, tampoco debemos olvidar que la resolución es tan baja, que el mismo reemplazo molecular pudo haber fallado en encontrar alguna solución adecuada. Por ello, se tienen que buscar estrategias para mejorar la resolución y/o emplear estrategias de faseo experimental.

8.6. Es posible monitorear el contraste tRNA-aa:tRNA por BLI

En cuanto a los ensayos de actividad, se pudo demostrar que la reacción que genera la señal espectrofotométrica funciona con las enzimas purificadas en presencia de AMP y β NAD⁺; no obstante, ha sido imposible saber si la segunda reacción acoplada a la deacilación del tRNA funciona, siendo una variable que no se ha podido controlar. Al juntar todas las enzimas en la mezcla de reacción, no se observa señal, aún habiendo modificado relaciones estequiométricas, tiempo y temperatura de reacción. Es necesario saber que la enzima D-aminocil-tRNA deacilasa está activa y de esta forma se podría trabajar a partir de las condiciones de la primera reacción para optimizar y encontrar la condición de actividad de la GlyRS. De cualquier manera, como son muchas las enzimas involucradas y en última instancia se desconoce la sensibilidad del ensayo en cuanto al AMP, buscamos estrategias alternas de medición. Los ensayos que se han diseñado usando el equipo de interferometría de biocapa (BLI) también han tenido inconvenientes. Trabajar con los biosensores de estreptavidina hubiera sido una muy buena opción, dada su gran afinidad por biotina, la cual puede, en principio, unirse al amino libre de la glicina en el glicil-tRNA; sin embargo, las condiciones óptimas reportadas para la biotinilación (pH básico) son desfavorables para mantener el tRNA aminoacilado; tal vez por ello no fue posible ver señal de unión con este tipo de biosensores. Por otro lado, con el uso de los biosensores de AR2G se trasciende el problema del pH y se obtiene una clara diferencia entre un tRNA libre y uno acilado (tRNA vs tRNA-aa). Sin embargo, el método requiere aislar de manera adecuada al tRNA después de la reacción. Es necesario realizar muy bien este paso porque la señal

de unión de la GlyRS es mucho más grande con respecto a la del tRNA-gly, lo que genera falsos positivos.

| Conclusiones

- En la TdaxGlyRS, la región que potencialmente reconoce al tallo aceptor del tRNA es más estable, tanto sola como en presencia de tRNA, que la región con homología a un dominio de reconocimiento del anticodón.
- Es posible cristalizar a la proteína GlyRSaceptor en complejo con tRNAs con secuencias diseñadas en el tallo del anticodón (receptor y tetraloop) y el análogo del estado de transición (GSA).
- Es posible monitorear la reacción acoplada que transforma AMP a XMP para medir la actividad de una aaRS.
- Es posible visualizar una diferencia clara entre tRNA deacilado y sin deacilar utilizando interferometría de biocapas con biosensores ARG2.

| Perspectivas

1) Mejorar la resolución de los cristales para poder intentar de nuevo el reemplazo molecular o el faseo experimental y resolver la estructura. Para resolver la estructura de forma experimental se pretenden probar tres caminos diferentes:

- Emplear diferentes sales con átomos pesados, principalmente mimetizadores de iones Mg^{+2} , como Osmio (III), en su sal pentammine(trifluorometanesulfonate)osmium (III) triflate, los cuales se añadirán al cristal por remojo.
- Sustituir las uridinas del tRNA por iodo-uridina *in vivo* y emplear los tRNAs sustituidos para generar los cristales.
- Mejorar la resolución de los cristales explorando diversos métodos de deshidratación y/o purificación de los componentes.

2) Continuar con los ensayos de actividad, optimizando las condiciones de aislamiento de tRNA después de la reacción.

| Apéndice A

11.1. Secuencia de aminoácidos de las nuevas construcciones

GlyRSanticodón

MRDPLDFQSIIMKLQQFWAEQGS LIWQPYYTQVGAGTMNPATFLRVLGPEPWNVAYVEPSIRPDD
 GRYGENPNRLQQHYQFQVILKPDGPNPQEIYLRSL EALGIDPREHDIRFVEDNWESPALGAWGLG
 WEVWLDGLEITQFTYFQQAGGMVLEPVSVEITYGLERIAMALQRVSNFRDIRWNAERTYGDVNLQ
 GEREHSTYYFEVADVERLRQMFALFEAEAEAALARGLVLP AHDYVLKSSHTFNVL DTRGAVGVTE
 RQVLFARMRDMARRVAEAYVAQRQALGFPWLKPTAQVSEAPAVREAPRSIPEQGVVVEPEIRRAR
 IAEQARTLIADVGGDPEHLDEAVLNEVTHLVEAPTALRGRFEDEYLRLPEEVLVSVMKKHQRYFP
 VYTREGQLLPYFIAVRNGGKEGLDVVTDGNEQVIRARFADAAYFIREDLKHPLEYL PRLSTLTF
 QAKLGSMLDKTHRIEVLVERLIPMVGLEAEDAAAVRRAAHL SKADLVTHMVVEMTSLQGVMGRYY
 ALQSGEPRAVAEAI FEAYLPRFAGDRYPETPAGLV LGLADRLDTLMGLFAVGLAPTGTKDPFALR
 RAALGLVQNLIHWNLDFDLRQGLEAAAQGLPVPVSPEAKMESLEFIVGRLQNELLEQGYRYDVVA
 AVLAAQGHNPAATARGVRELSAWVSRSDWNTILPAYAR SVRITRDQTERFAIDPARLVEPAEKHL
 LSALLQAEVTPRRPGSVEDFFQVFLPMIPVINRFFDEVLVMAEDAGLRANRLG LLQRIVALADGV
 ADFSKLEGFENLYFQGHHHHHH

GlyRSaceptor

MRDPLDFQSIIMKLQQFWAEQGS LIWQPYYTQVGAGTMNPATFLRVLGPEPWNVAYVEPSIRPDD
 GRYGENPNRLQQHYQFQVILKPDGPNPQEIYLRSLALGIDPREHDIRFVEDNWESPALGAWGLGW
 EVWLDGLEITQFTYFQQAGGMVLEPVSVEITYGLERIAMALQRVSNFRDIRWNAERTYGDVNLQGE
 REHSTYYFEVADVERLRQMFALFEAEAEAALARGLVLP AHDYVLKSSHTFNVLDTRGAVGVTERQV
 LFARMRDMARRVAEAYVAQRQALGFPWLKPTAQVSEAPAVREAPRSIPEQETLLIEIGTEELPPAD
 LEAALAQLRQRVPALLDELHLP HGDVQVWGTPRRLVWVVEDLAGRQPDRELI IKGPPANRAFDAEG
 RPTAAAEGFARSKGVPVEALTVAEMDGGRYVVAHVRETGRPAVEVLAEVLP GVIADLRFERSMRWN
 SSGVAFSRPIRWLVALHGETVIPFTYAGLTSGRVTRGLRFAEPATFALSHPRDYRIFLERQGVVVE
 PEIRRARIAEQARTLIADVGGDPEHLDEAVLNEVTHLVEAPTALRGRFEDEYLRLPEEVLVSVMKK
 HQRYPVYTTREGQLLPYFIAVRNGGKEGLDVVTDGNEQVIRARFADAAYFIREDLKENLYFQGH
 HHH

GlyRSACBD (dominio de reconocimiento del anticodón)

MRDPLDFQSIIMKLQQFWAEQGS LIWQPYYTQVGAGTMNPATFLRVLGPEPWNVAYVEPSIRPDDG
 RYGENPNRLQQHYQFQVILKPDGPNPQEIYLRSLALGIDPREHDIRFVEDNWESPALGAWGLGWEV
 WLDGLEITQFTYFQQAGGMVLEPVSVEITYGLERIAMALQRVSNFRDIRWNAERTYGDVNLQGEREH
 STYYFEVADVERLRQMFALFEAEAEAALARGLVLP AHDYVLKSSHTFNVLDTRGAVGVTERQVLFAR
 MRDMARRVAEAYVAQRQALGFPWLKPTAQVSEAPAVREAPRSIPEQGVVVEPEIRRARIAEQARTLI
 ADVGGDPEHLDEAVLNEVTHLVEAPTALRGRFEDEYLRLPEEVLVSVMKKHQRYPVYTTREGQLLPY
 FIAVRNGGKEGLDVVTDGNEQVIRARFADAAYFIREDLKHPLEYL PRLSTLTFQAKLGSMLDKTHR
 IEVLVERLIPMVGLEAEDAAVRRAAHLSKADLVTHMVVEMTSLQGVMGRYYALQS GEPRAVAEAIF
 EAYLPRFAGDRYPETPAGLV LGLADRLDTLMGLFAVGLAPTGTKDPFALRRAALGLVQNL IHWNLDF
 DLRQGLEAAAQGLPVPVSPEAKMESLEFIVGRLQNELLEQGYRYDVVA AVLAAQGHNPAATARGVRE
 LSAWVSRSDWNTILPAYARSVRITRDQTERFAIDPARLVEPAEKHLLSALLQAEVTPRRPGSVEDFF

QVFLPMIPVINRFFDEVLVMAEDAGLRANRLGLLQRIVALADGVADFSKLEGFENLYFQGHHHHHH

11.2. Secuencias tRNAreceptor y el tRNA tetraloop

Secuencias de los genes diseñados para el tRNAreceptor y el tRNA tetraloop.

Original tRNA TdaxGly (76)

ATGTAATACGACTCACTATAGCGGGCGTGGTTCAGTTGGTAGAACGTC
 TCCTTGCCAAGGAGAAGGTCGTGGGTTTCGAGTCCCATCGCCCGCTCCA
 CTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTG

Tetraloop (76)

ATGTAATACGACTCACTATAGCGGGCGTGGTTCAGTTGGTAGAACGTC
 TCCTGAAAAGGAGAAGGTCGTGGGTTTCGAGTCCCATCGCCCGCTCCAC
 TAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTG

Receptor (82)

ATGTAATACGACTCACTATAGCGGGCGTGGTTCAGTTGGTAGAACGTC
 UAUGGGGCACCCCCUAAGGAAGGTCGTGGGTTTCGAGTCCCATCGCCC
 GCTCCACTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGT TTTTTG

11.3. Plásmidos empleados para la expresión *in vivo* de bacGlyRS, sus mutantes y los tRNAs modificados

El gen que codifica para la glicil-tRNA sintetasa de *T. daxensis* y sus mutantes fue sintetizado por la compañía ATUM DNA2.0, y fue clonado en el vector de expresión pD861.

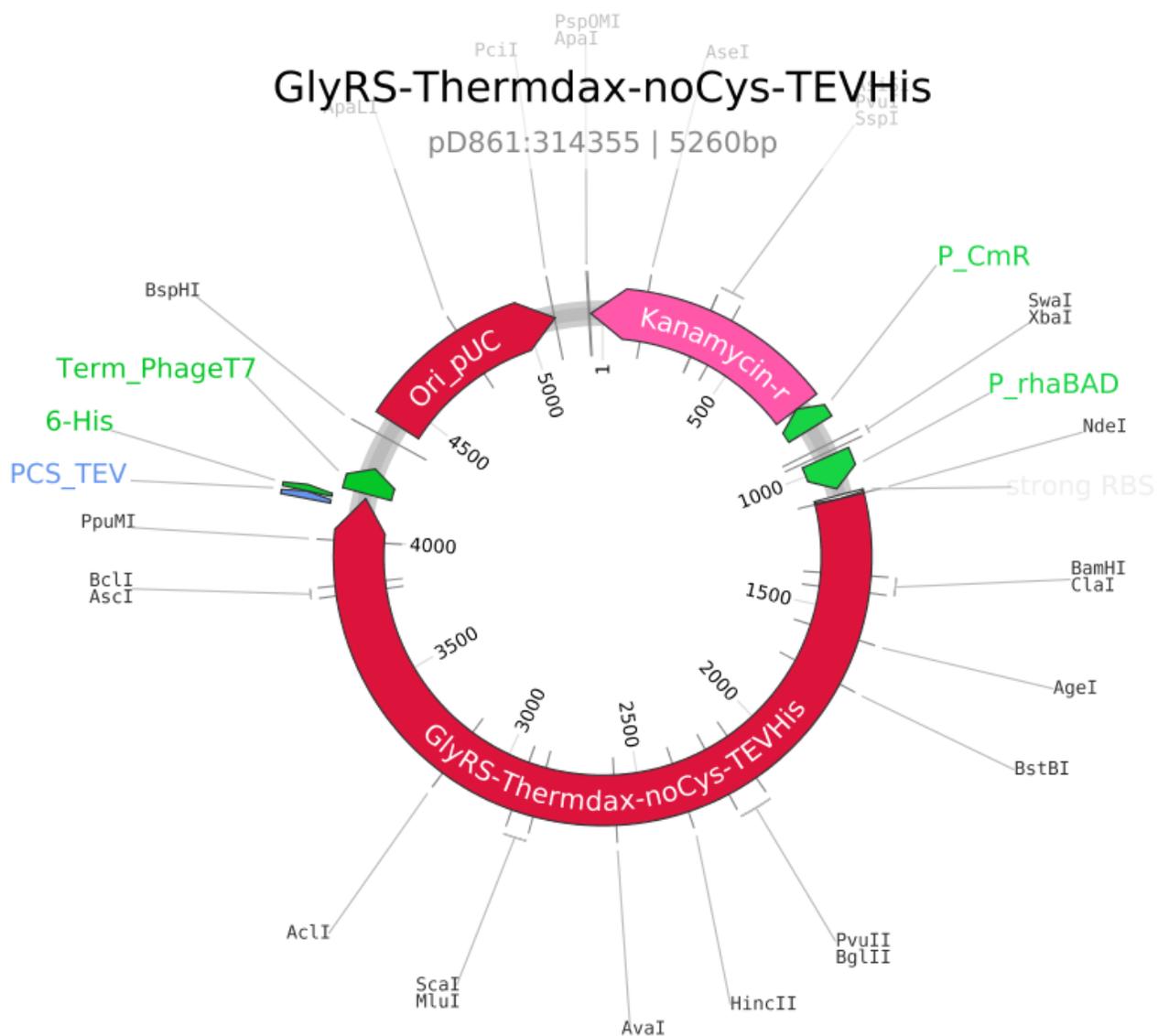


Figura 11.1. Plásmido empleado para expresar a la bacGlyRSwt. Se empleó el vector de expresión pD861 con resistencia a kanamicina y con un promotor inducible con rhamnosa.

El gen que codifica para tRNA^{Gly}wt de (*Thermanaerotherix daxensis*), así como a los diferentes tRNAs modificados con las secuencias receptor y tetraloop, fueron adquiridos en ATUM y cada gen fue clonado en el vector de expresión pM268 tal y como se muestra en la siguiente figura.

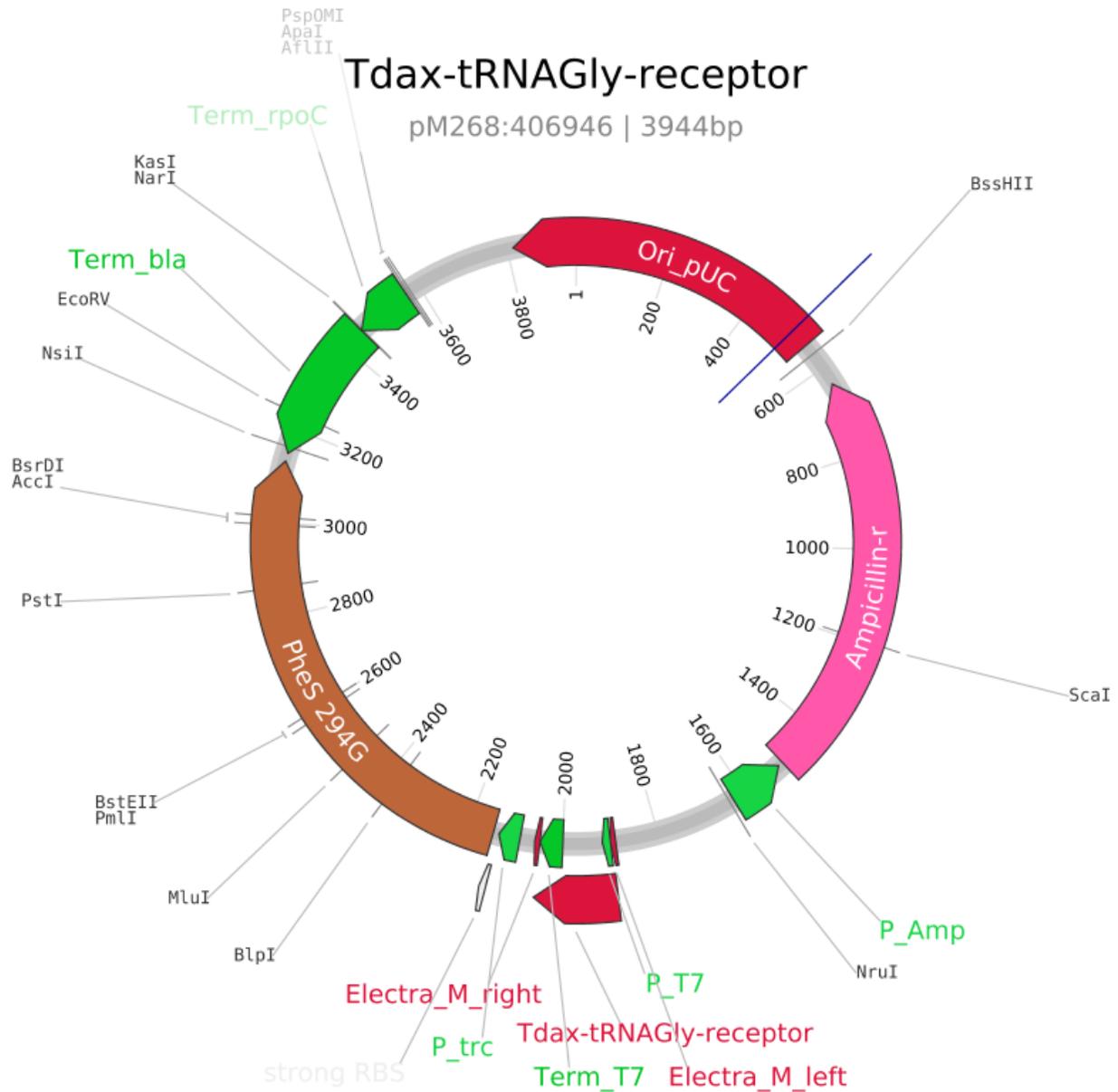


Figura 11.2. Plásmido empleado para expresar a al tRNA receptor. Se empleo el vector de expresión pM268 con resistencia a ampicilina y con un promotor inducible con IPTG.

11.4. Condiciones de cristalización encontradas durante el proyecto

KIT	POZO	CONDICIÓN	MOLÉCULA	MOLÉCULA ADICIONAL	ESTEQUIOMETRÍA Y CONCENTRACIÓN	OBSERVACIONES
Uriel	-	320mM Fosfato de amonio, 100mM Glicina pH 8.5, 3% DSS 5,000	TdaxGlyRS	NaN	36mg/mL	Era condición de Uriel que no me repetía
Uriel	-	320mM Fosfato de amonio, 100mM Glicina pH 8.5, 3% DSS 5,000 y 150mM sacarosa	TdaxGlyRS	NaN	36mg/mL	Era condición de Uriel que no me repetía
Uriel	-	320 mM Fosfato de amonio, 100mM Glicina pH 8.5, 3% DSS 5,000	TdaxGlyRS	500 μ M GSA	35mg/mL	Genera microcristales
Uriel	NaN	320mM Fosfato de amonio, 100mM Glicina pH 8.5, 3% DSS 5,000	TdaxGlyRS	5mM ATP, 2mM MgCl ₂	35mg/mL	No hay cristales
NucPro	G10	26% MPD, 50mM PIPES pH 7.0, 65mM MgCl ₂ y 1mM [Co(NH ₃) ₆]Cl ₃	TdaxGlyRS-tRNA	NaN	1:1 35mg/mL	Se optimizaron pero fueron cristales de tRNA
NucPro	B9	10% PEG 4,000, 50mM MES pH 6.5, 200mM NH ₄ AcO y 10mM CaCl ₂	TdaxGlyRS-tRNA	NaN	1:5, 35mg/mL	Se optimizaron pero fueron cristales de tRNA
NucPro	C1	20% PEG 4,000 , 100mM Citrato de sodio pH 5.6, 10mM KCl y 10% 2-propanol	GlyRSacceptor-tRNA	NaN	1:1.2, 36mg/mL	Cristales de la proteína sola
NucPro	C3	10% PEG 4,000 y 100mM HEPES pH 7.5	GlyRSacceptor-tRNA	NaN	1:3, 36mg/mL	Cristales de la proteína sola
Natrix	H2	40% MPD, 12mM Spermina, 40mM cacodilato de sodio pH 7.0, 80mM KCl y 20mM BaCl ₂	GlyRSacceptor-tRNA	NaN	1:3, 36mg/mL	Cristales de la proteína sola
Natrix	H3	40% MPD, 12mM Spermina, 40mM cacodilato de sodio pH 7.0, 80mM KCl y 20mM MgCl ₂	GlyRSacceptor-tRNA	NaN	1:3, 36mg/mL	Cristales de la proteína sola
NucPro	A11	30% PEG 400, 50mM Tris pH 8.5, 100mM KCl y 10mM MgCl ₂	GlyRSacceptor-tRNA	NaN	1:3, 36mg/mL	muy pequeños y no se siguieron
Natrix	D11	30% PEG 400, 50mM Tris pH 8.5, 100mM KCl y 10mM MgCl ₂	GlyRSacceptor-tRNA	NaN	1:3, 36mg/mL	muy pequeños y no se siguieron
Natrix	G11	35% MPD, 12mM Spermina, 40mM cacodilato de sodio pH 7.0, 12mM KCl, 80mM NaCl y 20mM MgCl ₂	GlyRSacceptor-tRNA	NaN	1:3, 36mg/mL	Misma condición que Natrix H3 por lo que es la proteína sola
Natrix	G12	35% MPD, 12mM Spermina, 40mM cacodilato de sodio pH 7.0, 12mM KCl y 80mM NaCl	GlyRSacceptor-tRNA	NaN	1:3, 36mg/mL	Misma condición que Natrix H3 por lo que es la proteína sola
NucPro	A6	15% PEG 400, 50mM MES pH 6.5, 80mM Mg(AcO) ₂ y 15mM MgCl ₂	GlyRSacceptor-tRNA	NaN	1:3, 36mg/mL	microcristales
NucPro	A11	15% PEG 400, 50mM Tris pH 8.5, 100mM KCl y 15mM MgCl ₂	GlyRSacceptor-tRNA	NaN	1:3, 36mg/mL	microcristales
NucPro	B9	10% PEG 4,000, 50mM MES pH 6.5, 200mM NH ₄ AcO y 10mM CaCl ₂	GlyRSacceptor-tRNA	NaN	1:3, 36mg/mL	solo proteína
NucPro	C2	20% PEG 4,000, 50mM MOPS pH 7.0, 100mM NaCl	GlyRSacceptor-tRNA	NaN	1:3, 36mg/mL	solo proteína
NucPro	C3	20% PEG 4,000, 50mM HEPES pH 7.5	GlyRSacceptor-tRNA	NaN	1:3, 36mg/mL	solo proteína
NucPro	D6	10% PEG 8,000, 100mM Tris pH 8.0, 10% glycerol y 1mM Tris(2-carboxietil)fosfina-HCl	GlyRSacceptor-tRNA	NaN	1:3, 36mg/mL	Morfología de estrellas

KIT	POZO	CONDICIÓN	MOLÉCULA	MOLÉCULA ADICIONAL	ESTEQUIOMETRÍA Y CONCENTRACIÓN	OBSERVACIONES
NucPro	G11	27%MPD, 20mM MES pH 5.8, 10mM MgCl ₂	GlyRSacceptor-tRNA	NaN	1:3, 36mg/mL	Morfología de estrellas
Uriel	NaN	550mM Formato de magnesio, 100mM NaAcO pH4.6, 100mM glicina pH8.5, 3% DSS 5,000 y 3% sucrosa	TdaxGlyRS	NaN	36mg/mL	repetición condición Uriel
Index	A8	100mM sodium acetate pH 4.5 and 3M NaCl	GlyRSacceptor-tRNA loop/tetraloop	3mM GSA	1:3:3, 36mg/mL	NaN
Index	H3	20% PEG 3,350 y 150mM ácido málico pH 7.0	GlyRSacceptor-tRNA	3mM GSA	1:3, 36mg/mL	microcristales
Index	H7	20%PEG 3,350 y 200mM malonato de sodio pH 7.0	GlyRSacceptor-tRNA	3mM GSA	1:3, 36mg/mL	microcristales
Index	F3	10%PEG 5,000, 100mM HEPES pH 7.0 and 5% Tacsimato pH7.0	GlyRSacceptor-tRNA	3mM GSA	1:3, 36mg/mL	brillan con luz UV
NucPro	D2	18% PEG 6,000 y 50mM NaAcO pH 5.0	GlyRSacceptor-tRNA loop/tetraloop	3mM GSA	1:3:3, 36mg/mL	brillan con luz UV, se optimizaron
NucPro	A6	20% PEG 400, 50mM cacodilato de sodio pH 6.5, 80Mg(AcO) ₂ y 10 MgCl ₂	GlyRSacceptor-tRNA loop/tetraloop	3mM GSA	1:3:3, 36mg/mL	Cross-seeding

Bibliografía

- [Ahmad et al., 2013] Ahmad, S., Routh, S. B., Kamarthapu, V., Chalissery, J., Muthukumar, S., Hussain, T., Kruparani, S. P., Deshmukh, M. V., and Sankaranarayanan, R. (2013). Mechanism of chiral proofreading during translation of the genetic code. *Elife*, 2:e01519.
- [Aravind, 2001] Aravind, L. (2001). A natural classification of ribonucleases. *Methods Enzymol*, 341:3–28.
- [Aravind and Koonin, 1998] Aravind, L. and Koonin, E. V. (1998). The hd domain defines a new superfamily of metal-dependent phosphohydrolases. *Trends in biochemical sciences*, 23(12):469–472.
- [Arnez et al., 2000] Arnez, J. G., Sankaranarayanan, R., Dock-Bregeon, A.-C., Francklyn, C. S., and Moras, D. (2000). Aminoacylation at the atomic level in class iia aminoacyl-trna synthetases. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 17(sup1):23–27.
- [Ataide and Ibba, 2004] Ataide, S. F. and Ibba, M. (2004). Discrimination of cognate and noncognate substrates at the active site of class ii lysyl-trna synthetase. *Biochemistry*, 43(37):11836–11841.
- [Bernal, 1967] Bernal, J. D. (1967). The origin of life. Technical report.
- [Betat and Mörl, 2015] Betat, H. and Mörl, M. (2015). The cca-adding enzyme: A central scrutinizer in trna quality control. *Bioessays*, 37(9):975–982.
- [Cate et al., 1996] Cate, J. H., Gooding, A. R., Podell, E., Zhou, K., Golden, B. L., Kundrot, C. E., Cech, T. R., and Doudna, J. A. (1996). Crystal structure of a group i ribozyme domain: principles of rna packing. *Science*, 273(5282):1678–1685.

- [Cestari and Stuart, 2013] Cestari, I. and Stuart, K. (2013). A spectrophotometric assay for quantitative measurement of aminoacyl-trna synthetase activity. *Journal of biomolecular screening*, 18(4):490–497.
- [Chalioitis et al., 2017] Chalioitis, A., Vlastaridis, P., Mossialos, D., Ibba, M., Becker, H. D., Stathopoulos, C., and Amoutzias, G. D. (2017). The complex evolutionary history of aminoacyl-trna synthetases. *Nucleic acids research*, 45(3):1059–1068.
- [Cho et al., 2003] Cho, H. D., Oyelere, A. K., Strobel, S. A., and Weiner, A. M. (2003). Use of nucleotide analogs by class i and class ii cca-adding enzymes (trna nucleotidyltransferase): Deciphering the basis for nucleotide selection. *Rna*, 9(8):970–981.
- [Cusack, 1993] Cusack, S. (1993). Sequence, structure and evolutionary relationships between class 2 aminoacyl-trna synthetases: an update. *Biochimie*, 75(12):1077–1081.
- [Delagoutte et al., 2000] Delagoutte, B., Moras, D., and Cavarelli, J. (2000). trna aminoacylation by arginyl-trna synthetase: induced conformations during substrates binding. *The EMBO journal*, 19(21):5599–5610.
- [Deutscher, 1982] Deutscher, M. P. (1982). 7 trna nucleotidyltransferase. In *The enzymes*, volume 15, pages 183–215. Elsevier.
- [Eriani et al., 1990] Eriani, G., Delarue, M., Poch, O., Gangloff, J., and Moras, D. (1990). Partition of trna synthetases into two classes based on mutually exclusive sets of sequence motifs. *Nature*, 347(6289):203–206.
- [Ferré-D’Amaré et al., 1998] Ferré-D’Amaré, A. R., Zhou, K., and Doudna, J. A. (1998). A general module for rna crystallization. *Journal of molecular biology*, 279(3):621–631.
- [First, 2015] First, E. A. (2015). A continuous spectrophotometric assay for monitoring adenosine 5-monophosphate production. *Analytical biochemistry*, 483:34–39.
- [First and Richardson, 2017] First, E. A. and Richardson, C. J. (2017). Spectrophotometric assays for monitoring trna aminoacylation and aminoacyl-trna hydrolysis reactions. *Methods*, 113:3–12.

- [Fox, 2010] Fox, G. E. (2010). Origin and evolution of the ribosome. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(9):a003483.
- [Fox, 2016] Fox, G. E. (2016). Origins and early evolution of the ribosome. In *Evolution of the protein synthesis machinery and its regulation*, pages 31–60. Springer.
- [Giegé et al., 1993] Giegé, R., Puglisi, J. D., and Florentz, C. (1993). trna structure and aminoacylation efficiency. In *Progress in nucleic acid research and molecular biology*, volume 45, pages 129–206. Elsevier.
- [Haldane, 1929] Haldane, J. (1929). Natural selection. *Nature*, 124(3125):444–444.
- [Higgs and Lehman, 2015] Higgs, P. G. and Lehman, N. (2015). The rna world: molecular cooperation at the origins of life. *Nature Reviews Genetics*, 16(1):7–17.
- [Holm, 2020] Holm, L. (2020). Dali and the persistence of protein shape. *Protein Science*, 29(1):128–140.
- [Hountondji et al., 1986] Hountondji, C., Lederer, F., Dessen, P., and Blanquet, S. (1986). E. coli tyrosyl- and methionyl-trna synthetases display sequence similarity at the binding site for the 3'-end of trna. *Biochemistry*, 25(1):16–21.
- [Ibba and Söll, 2000] Ibba, M. and Söll, D. (2000). Aminoacyl-trna synthesis. *Annual review of biochemistry*, 69(1):617–650.
- [Klipcan and Safro, 2004] Klipcan, L. and Safro, M. (2004). Amino acid biogenesis, evolution of the genetic code and aminoacyl-trna synthetases. *Journal of theoretical biology*, 228(3):389–396.
- [Koonin, 2003] Koonin, E. V. (2003). Comparative genomics, minimal gene-sets and the last universal common ancestor. *Nature Reviews Microbiology*, 1(2):127–136.
- [Koonin and Novozhilov, 2009] Koonin, E. V. and Novozhilov, A. S. (2009). Origin and evolution of the genetic code: the universal enigma. *IUBMB life*, 61(2):99–111.
- [Lei and Burton, 2020] Lei, L. and Burton, Z. F. (2020). Evolution of life on earth: trna, aminoacyl-trna synthetases and the genetic code. *Life*, 10(3):21.

- [Levengood et al., 2007] Levengood, J. D., Roy, H., Ishitani, R., Söll, D., Nureki, O., and Ibba, M. (2007). Anticodon recognition and discrimination by the α -helix cage domain of class I lysyl-tRNA synthetase. *Biochemistry*, 46(39):11033–11038.
- [Li et al., 2017] Li, S., Chen, L., Hu, Y., Fang, G., Zhao, M., Guo, Y., and Pang, Z. (2017). Enzymatic production of 5-inosinic acid by AMP deaminase from a newly isolated *Aspergillus oryzae*. *Food chemistry*, 216:275–281.
- [Li et al., 2016] Li, S., Qian, Y., Liang, Y., Chen, X., Zhao, M., Guo, Y., and Pang, Z. (2016). Overproduction, purification and characterization of adenylyl deaminase from *Aspergillus oryzae*. *Applied biochemistry and biotechnology*, 180(8):1635–1643.
- [Ling et al., 2012] Ling, J., Peterson, K. M., Simonović, I., Cho, C., Söll, D., and Simonović, M. (2012). Yeast mitochondrial threonyl-tRNA synthetase recognizes tRNA isoacceptors by distinct mechanisms and promotes tRNA codon reassignment. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(9):3281–3286.
- [Merkler et al., 1989] Merkler, D. J., Wali, A. S., Taylor, J., and Schramm, V. (1989). AMP deaminase from yeast: role in AMP degradation, large scale purification, and properties of the native and proteolyzed enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, 264(35):21422–21430.
- [Moor et al., 2006] Moor, N., Kotik-Kogan, O., Tworowski, D., Sukhanova, M., and Safro, M. (2006). The crystal structure of the ternary complex of phenylalanyl-tRNA synthetase with tRNA^{Phe} and a phenylalanyl-adenylyl analogue reveals a conformational switch of the CCA end. *Biochemistry*, 45(35):10572–10583.
- [Nagaswamy and Fox, 2003] Nagaswamy, U. and Fox, G. E. (2003). RNA ligation and the origin of tRNA. *Origins of Life and Evolution of the Biosphere*, 33(2):199–209.
- [Nagel et al., 1984] Nagel, G. M., Cumberledge, S., Johnson, M. S., Petrella, E., and Weber, B. H. (1984). The β subunit of *E. coli* glycyl-tRNA synthetase plays a major role in tRNA recognition. *Nucleic acids research*, 12(10):4377–4384.

- [Nakanishi et al., 2005] Nakanishi, K., Ogiso, Y., Nakama, T., Fukai, S., and Nureki, O. (2005). Structural basis for anticodon recognition by methionyl-trna synthetase. *Nature structural & molecular biology*, 12(10):931–932.
- [Nordin and Schimmel, 2002] Nordin, B. E. and Schimmel, P. (2002). Plasticity of recognition of the 3-end of mischarged trna by class i aminoacyl-trna synthetases. *Journal of Biological Chemistry*, 277(23):20510–20517.
- [O’Donoghue and Luthey-Schulten, 2003] O’Donoghue, P. and Luthey-Schulten, Z. (2003). On the evolution of structure in aminoacyl-trna synthetases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 67(4):550–573.
- [Okabe et al., 2003] Okabe, M., Tomita, K., Ishitani, R., Ishii, R., Takeuchi, N., Arisaka, F., Nureki, O., and Yokoyama, S. (2003). Divergent evolutions of trinucleotide polymerization revealed by an archaeal cca-adding enzyme structure. *The EMBO journal*, 22(21):5918–5927.
- [Oparin, 1924] Oparin, A. (1924). Proskhodenie zhisni.
- [Perera et al., 2013] Perera, R. L., Torella, R., Klinge, S., Kilkenny, M. L., Maman, J. D., and Pellegrini, L. (2013). Mechanism for priming dna synthesis by yeast dna polymerase α . *Elife*, 2:e00482.
- [Postic et al., 2017] Postic, G., Ghouzam, Y., Chebrek, R., and Gelly, J.-C. (2017). An ambiguity principle for assigning protein structural domains. *Science advances*, 3(1):e1600552.
- [Qin et al., 2014] Qin, X., Hao, Z., Tian, Q., Zhang, Z., Zhou, C., and Xie, W. (2014). Cocrystal structures of glycyl-trna synthetase in complex with trna suggest multiple conformational states in glycylation. *Journal of Biological Chemistry*, 289(29):20359–20369.
- [Reiter et al., 2010] Reiter, N. J., Osterman, A., Torres-Larios, A., Swinger, K. K., Pan, T., and Mondragón, A. (2010). Structure of a bacterial ribonuclease p holoenzyme in complex with trna. *Nature*, 468(7325):784–789.
- [Routh et al., 2016] Routh, S. B., Pawar, K. I., Ahmad, S., Singh, S., Suma, K., Kumar, M., Kuncha, S. K., Yadav, K., Kruparani, S. P., and Sankaranarayanan, R. (2016). Elongation factor tu

prevents misediting of gly-trna (gly) caused by the design behind the chiral proofreading site of d-aminoacyl-trna deacylase. *PLoS biology*, 14(5):e1002465.

[Roy and Ibba, 2006] Roy, H. and Ibba, M. (2006). Phenylalanyl-trna synthetase contains a dispensable rna-binding domain that contributes to the editing of noncognate aminoacyl-trna. *Biochemistry*, 45(30):9156–9162.

[Rybak et al., 2019] Rybak, M. Y., Rayevsky, A. V., Gudzera, O. I., and Tukalo, M. A. (2019). Stereospecificity control in aminoacyl-trna-synthetases: new evidence of d-amino acids activation and editing. *Nucleic acids research*, 47(18):9777–9788.

[Safro and Klipcan, 2013] Safro, M. and Klipcan, L. (2013). The mechanistic and evolutionary aspects of the 2-and 3-oh paradigm in biosynthetic machinery. *Biology direct*, 8(1):1–12.

[Saito et al., 2001] Saito, H., Watanabe, K., and Suga, H. (2001). Concurrent molecular recognition of the amino acid and trna by a ribozyme. *RNA*, 7(12):1867–1878.

[Schimmel and de Pouplana, 1995] Schimmel, P. and de Pouplana, L. R. (1995). Transfer rna: from minihelix to genetic code. *Cell*, 81(7):983–986.

[Schimmel and Henderson, 1994] Schimmel, P. and Henderson, B. (1994). Possible role of aminoacyl-rna complexes in noncoded peptide synthesis and origin of coded synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(24):11283.

[Schimmel and Kelley, 2000] Schimmel, P. and Kelley, S. O. (2000). Exiting an rna world. *nature structural biology*, 7(1):5–7.

[Sekine et al., 2006] Sekine, S.-i., Shichiri, M., Bernier, S., Chênevert, R., Lapointe, J., and Yokoyama, S. (2006). Structural bases of transfer rna-dependent amino acid recognition and activation by glutamyl-trna synthetase. *Structure*, 14(12):1791–1799.

[Shapiro, 1987] Shapiro, R. (1987). *Origins: A skeptic's guide to the creation of life on earth*. Bantam.

[Shapiro, 2007] Shapiro, R. (2007). A simpler origin for life. *Scientific American*, 296(6):46–53.

- [Sun and Pandelia, 2020] Sun, S. and Pandelia, M.-E. (2020). Hd-[hd-gyp] phosphodiesterases: Activities and evolutionary diversification within the hd-gyp family. *Biochemistry*, 59(25):2340–2350.
- [Tan et al., 2012] Tan, K., Zhou, M., Zhang, R., Anderson, W. F., and Joachimiak, A. (2012). The crystal structures of the α -subunit of the $\alpha 2 \beta 2$ tetrameric glycyl-trna synthetase. *Journal of structural and functional genomics*, 13(4):233–239.
- [Tang and Huang, 2005] Tang, S.-N. and Huang, J.-F. (2005). Evolution of different oligomeric glycyl-trna synthetases. *FEBS letters*, 579(6):1441–1445.
- [Torres-Larios et al., 2003] Torres-Larios, A., Sankaranarayanan, R., Rees, B., Dock-Bregeon, A.-C., and Moras, D. (2003). Conformational movements and cooperativity upon amino acid, atp and trna binding in threonyl-trna synthetase. *Journal of molecular biology*, 331(1):201–211.
- [Valencia-Sánchez et al., 2016] Valencia-Sánchez, M. I., Rodríguez-Hernández, A., Ferreira, R., Santamaría-Suárez, H. A., Arciniega, M., Dock-Bregeon, A.-C., Moras, D., Beinsteiner, B., Mertens, H., Svergun, D., et al. (2016). Structural insights into the polyphyletic origins of glycyl trna synthetases. *Journal of Biological Chemistry*, 291(28):14430–14446.
- [Wetzel, 1995] Wetzel, R. (1995). Evolution of the aminoacyl-trna synthetases and the origin of the genetic code. *Journal of molecular evolution*, 40(5):545–550.
- [Xiong and Steitz, 2004] Xiong, Y. and Steitz, T. A. (2004). Mechanism of transfer rna maturation by cca-adding enzyme without using an oligonucleotide template. *Nature*, 430(7000):640–645.
- [Yaremchuk et al., 2001] Yaremchuk, A., Tukalo, M., Grøtli, M., and Cusack, S. (2001). A succession of substrate induced conformational changes ensures the amino acid specificity of thermus thermophilus prolyl-trna synthetase: comparison with histidyl-trna synthetase. *Journal of molecular biology*, 309(4):989–1002.
- [Zeng et al., 2019] Zeng, Q.-Y., Peng, G.-X., Li, G., Zhou, J.-B., Zheng, W.-Q., Xue, M.-Q., Wang, E.-D., and Zhou, X.-L. (2019). The g3-u70-independent trna recognition by human mitochondrial alanyl-trna synthetase. *Nucleic acids research*, 47(6):3072–3085.