

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA MOLECULAR

CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y FUNCIONAL DE LA
PROTEÍNA MnmE de *Escherichia coli*, UNA PROTEÍNA
ESENCIAL IMPLICADA EN LA MODIFICACIÓN DE LOS
tRNAs

MARTA MARTÍNEZ VICENTE

UNIVERSITAT DE VALENCIA
Servei de Publicacions
2004

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 04 de Juny de 2004 davant un tribunal format per:

- D. Javier Cervera Miralles
- D. Joaquín Moreno Masiño
- D. Jesús Mingorance
- D. Fernando Rojo De Castro
- D. Agustín Vioque Peña

Va ser dirigida per:

D^a. M^a Eugenia Amengod González

©Copyright: Servei de Publicacions
Marta Martínez Vicente

Depòsit legal:

I.S.B.N.:84-370-6005-2

Edita: Universitat de València
Servei de Publicacions
C/ Artes Gráficas, 13 bajo
46010 València
Spain
Telèfon: 963864115

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES CITOLÓGICAS
FUNDACIÓN VALENCIANA DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
Departamento de Genética Molecular.



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA



**Caracterización bioquímica y funcional de la proteína
MnmE de *Escherichia coli*, una proteína esencial
implicada en la modificación de los tRNAs.**

Memoria presentada por **Marta Martínez Vicente**,
licenciada en Ciencias Químicas, para optar al grado de
Doctora por la Universitat de València
València 2004



M^a Eugenia Armengod González, Doctora en Ciencias Biológicas e Investigadora del Instituto de Investigaciones Citológicas de la Fundación Valenciana de Investigaciones Biomédicas,

CERTIFICA

Que la memoria titulada: **“Caracterización bioquímica y funcional de la proteína MnmE de *Escherichia coli*, una proteína esencial implicada en la modificación de los tRNAs”**, ha sido realizada bajo su dirección en el Instituto de Investigaciones Citológicas de la FVIB por Marta Martínez Vicente, Licenciada en Ciencias Químicas, y considera que reúne las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor.

Y para que conste a los efectos oportunos, se expide la presente certificación en València, a 19 de Febrero de 2004.

Fdo: M^a Eugenia Armengod González

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN:	Página:
1. GTPasas:	13
1.1. Características generales	13
1.2. Evolución y clasificación	15
1.3. Estructura y motivos de las GTPasas	17
1.4. Extremo carboxiterminal	21
1.5. Cambio conformacional	21
1.6. GEFs	23
1.7. Hidrólisis del GTP, arginine finger y GAPs	23
1.8. Dinaminas	27
1.8.1 Características generales	28
1.8.2 Clasificación	30
1.8.3 ¿proteínas reguladoras o mecanoenzimas?	31
2. Modificación de los tRNAs:	33
2.1 Introducción	33
2.2 Estructura y función de los tRNAs	34
2.3 Reconocimiento codón-anticodón	36
2.4 Modificación de los tRNAs	39
2.4.1 Modificación en la posición 34	41
2.4.2 Modificaciones en otras posiciones del tRNA	42
2.5 Enzimas modificadores	44
3. MnmE:	46
3.1 Características generales	46
3.2 Función de MnmE	47
3.3 Extremo carboxiterminal y motivo CIVK	49
3.4 Proteínas homólogas	50
3.5 Viabilidad de los mutantes <i>mnmE</i> : letalidad sintética	52
OBJETIVOS	55
RESULTADOS	
1. Características bioquímicas generales de MnmE y de su dominio G:	59
1.1 Unión del nucleótido	59
1.1.1 Ensayos de unión en filtro	59
1.1.1.1 PROTEÓLISIS LIMITADA	
1.1.3 Ensayos de unión por fluorescencia	61
1.1.4 Ensayos de competición	66
1.1.5 Formación del estado de transición: complejo proteína-mantGDP-AIF _x	67
1.2 Actividad GTPasa	69

1.2.1	Actividad GTPasa de la proteína MnmE.y del dominio G	69
1.2.2	Dependencia con Mg ²⁺	
1.2.3	Dependencia con el pH	
1.3	Autoasociación	70
		72
2.	Caracterización bioquímica de los mutantes de los motivos G1, G3, G4 y G5:	73
2.1.	Propiedades bioquímicas de los mutantes de los motivos G1, G3, G4 y G5:	79
2.2.	Afinidad de los mutantes de los motivos G1, G3, G4 y G5:	81
2.2.1	Ensayos de unión en filtro.	82
2.2.2	Ensayos de afinidad por fluorescencia	82
2.3.	Actividad GTPasa de los mutantes de los motivos G1, G3, G4 y G5:	84
2.4.	Formación del complejo proteína-mantGDP-AIF _x	86
2.5.	Especificidad del motivo G4 y G5 en la unión del nucleótido	88
3.	Caracterización del motivo G2:	93
3.1.	Análisis mutacional del motivo G2:	93
3.2.	Unión y afinidad por nucleótidos:	95
3.3.	Actividad GTPasa de los mutantes G2:	96
3.3.1.	Actividad GTPasa	96
3.3.2.	Formación del complejo proteína-mantGDP-AIF _x	98
3.4.	Cambio Thr → Ser	99
4.	Caracterización de la cisteína del extremo carboxiterminal:	103
4.1.	Propiedades de la C4551 y datos previos sobre su función	103
4.2.	Caracterización bioquímica del mutante C451S	104
4.2.1.	Afinidad por nucleótido	104
4.2.2.	Actividad GTPasa	105
4.3.	Autoasociación y localización subcelular del mutante C451S	106
4.3.1.	Localización subcelular del mutante C451S	106
4.3.2.	Multimerización del mutante C451S <i>in vitro</i>	108
4.3.3.	Multimerización del mutante C451S <i>in vivo</i>	110
5.	Estudio del mecanismo de activación de la hidrólisis del GTP:	113
5.1.	Análisis mutacional de las argininas del dominio G	113
5.2.	Capacidad hidrolítica de los mutantes de las argininas del dominio G	117
5.3.	Unión y afinidad por nucleótidos	120
5.4.	Formación del complejo proteína-mantGDP-AIF _x	121
5.5.	Análisis de la mutación R252K	123
5.6.	Ausencia de la glutamina catalítica	125

6. Función modificadora de los tRNAs de MnmE:	129
6.1. Método indirecto: Ensayos de "readthrough"	130
6.2. Método directo: Northern blots	134
7. Viabilidad celular:	137
7.1. Introducción de las mutaciones en las distintas cepas	137
7.2. Obtención de transductantes kan ^R	139
7.3. Supervivencia relativa de las cepas derivadas de IC4621	144
7.4. Viabilidad del mutante <i>mnmE-T250S</i> : mutación termosensible	145
7.5. Viabilidad del mutante no modificador <i>mnmE-R288A</i>	150
8. Estudio de la interacción MnmE-tRNA:	155
8.1. Ensayos de retraso en gel	156
8.1.1. Unión de la proteína MnmE y los tRNAs totales de una cepa no modificadora	156
8.1.2. Unión de la proteína MnmE y tRNA ^{Lys}	159
8.2. Ensayos e cromatografía de afinidad	160
DISCUSIÓN	165
CONCLUSIONES	197
MATERIALES Y MÉTODOS	201
Material	201
1. Material Biológico	201
1.1. Cepas	201
1.2. Plásmidos	203
2. Material químico y bioquímico	204
2.2. Kits comerciales	204
2.3. Material para las reacciones de PCR	205
2.4. Enzimas de restricción y modificadoras	205
2.5. Material para transferencia e inmunodetección	205
2.6. Material para purificación de proteínas y cromatografía	206
2.7. Material para la caracterización de la actividad GTPasa y afinidad por nucleótidos	206
2.8. Reactivos para determinar la actividad β-galactosidasa	207
2.9. Material para medios de cultivo	207
3. Aparatos	207
Métodos	208
1. Cultivos bacterianos	208
1.2. Mantenimiento de las cepas bacterianas	208
1.3. Preparación de las células competentes	208
1.4. Transformación de una cepa bacteriana	209

1.5. Obtención de cepas con alelos mutantes de <i>mnmE</i> mediante el bacteriófago P1.	209
2. Técnicas de DNA	211
2.1. Aislamiento y purificación de DNA	211
2.1.1. DNA cromosomal bacteriano	211
2.1.2. DNA plasmídico	211
2.1.3. DNA producto de amplificación mediante PCR	212
2.2. Electroforésis de DNA	212
2.3. PCR	213
3. Técnicas de RNA	217
3.1. Purificación de tRNA total	217
3.2. Cuantificación y verificación de RNA	218
3.3. Análisis de la modificación de los tRNA ^{Glu} mediante Northern blot	218
4. Técnicas de proteínas	221
4.1. Clonación y sobreexpresión de proteínas	221
4.1.1. Sistema pGEX	221
4.1.2. Sistema pET	223
4.2. Purificación de proteínas	224
4.2.1. Sistema pGEX	224
4.2.2. Sistema pET	226
4.3. Cuantificación de proteínas	227
4.4. Electrforesis de proteínas en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)	228
4.5. Transferencia de proteínas a un soporte sólido	228
4.6. Inmunodetección de proteínas sobre soporte sólido	229
4.7. Inmunopurificación de anticuerpos	229
4.8. Ultracentrifugación analítica	229
4.9. Cross-linking <i>in vivo</i>	230
4.10 Cross-linking <i>in vitro</i>	230
5. Ensayos de actividad β -galactosidasa	230
6. Ensayos de actividad GTPasa	231
7. Ensayos de afinidad por nucleótido	231
7.1. Ensayos de unión del nucleótido en filtro	232
7.2. Proteólisis limitada	232
7.3. Ensayos de unión del nucleótido por fluorescencia	233
8. Ensayos de interacción tRNA-proteínas	233
8.1. Interacción tRNA-proteínas mediante retraso en gel	233
8.2. Interacción tRNA-proteínas mediante cromatografía de afinidad	234
ABREVIATURAS	237
BIBLIOGRAFÍA	241

INTRODUCCIÓN

Introducción:

1. GTPasas:

1.1. Características generales:

El objetivo de estudio de esta tesis es la proteína MnmE de *Escherichia coli*, proteína perteneciente a la superfamilia de las GTPasas.

La superfamilia de las GTPasas está constituida por proteínas que son capaces de unir e hidrolizar el GTP. Este tipo de proteínas están presentes y conservadas tanto en procariotas como eucariotas y juegan un papel fundamental en una gran variedad de fenómenos biológicos como la proliferación celular (ej: ras), la transducción de señales y control del ciclo celular (ej: "small G proteins"), la traducción y síntesis de proteínas (ej: EF-Tu), transporte vesicular (ej: RAB), translocación de proteínas a través de la membrana (ej: SRP), etc... (Bourne *et al.*, 1991; Leipe *et al.*, 2002)

A pesar de la extraordinaria variedad de funciones, algunos autores creen que todas las GTPasas pueden provenir de un único precursor común (Leipe *et al.*, 2002) lo que permitiría explicar la conservación de un mecanismo de acción común, un dominio estructural común y motivos con secuencias consenso comunes en todos los miembros de esta superfamilia. Sin embargo, otros autores también creen que en la superfamilia de las GTPasas ha existido un fenómeno de convergencia evolutiva, como es el caso de la familia de proteínas FtsZ, similares en función y estructura a las tubulinas eucariotas, y cuyo origen evolutivo puede ser diferente al del resto de GTPasas (Poland *et al.*, 1993; Kjeldgaard *et al.*, 1996; Pieper *et al.*, 1999; Schweins and Wittinghofer, 1994).

Las GTPasas clásicas (como la proteínas tipo Ras) suelen describirse como "interruptores moleculares" por su peculiar mecanismo de acción cíclico donde las proteínas pasan por tres estados conformacionales: estado vacío, estado unido a GTP y estado unido a GDP (aunque *in vivo*, el estado vacío no es estable, ya que tras la disociación del GDP, se une directamente una nueva molécula de GTP). Cuando la GTPasa une el nucleótido GTP, la proteína entra en su estado "ON" o activo ya que se produce un cambio conformacional que le permite interactuar con moléculas efectoras u otros enzimas, tras la hidrólisis del fosfato gamma del nucleótido, la proteína adquiere su

conformación de unión a GDP que se define como el estado "OFF" o inactivo. Finalmente el GDP es liberado de la proteína y ésta vuelve de nuevo a unir otra molécula de GTP y reiniciar el ciclo.

El ciclo es unidireccional debido a la irreversibilidad de la reacción de hidrólisis y permite a la GTPasa interactuar periódicamente con su molécula diana o efectora y de esta forma actuar como interruptor molecular en la célula.

Además, el ciclo de las GTPasas suele implicar otros factores ya que las GTPasas clásicas presentan una baja actividad GTPasa intrínseca y por tanto requieren de una enzima que catalice el paso de hidrólisis, estas proteínas son las GAP (GTPases activating proteins). Igualmente, debido a la alta afinidad que presentan las GTPasas clásicas por los nucleótidos de guanina se requiere de una proteína que catalice la liberación del GDP; estas proteínas son las llamadas GNRP (guanine nucleotide release protein) o GEF (guanine exchange factor) y permiten que la GTPasa vuelva a su estado libre y reinicie un nuevo ciclo (Bourne, 1995).

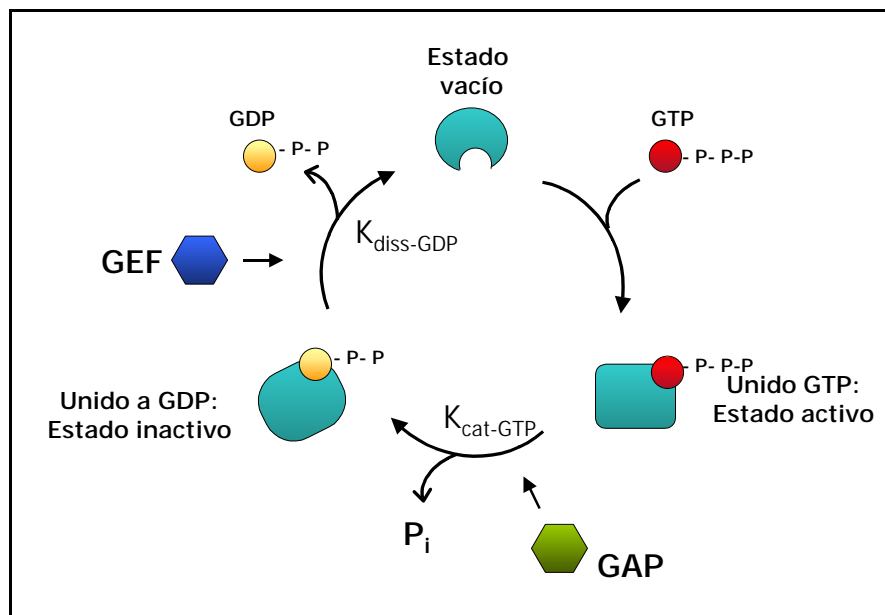


Figura1: Esquema del ciclo de las GTPasas

Cada GTPasa es única y por tanto las características de su ciclo (constantes de disociación del GDP y constantes catalíticas) dependen de las propiedades bioquímicas intrínsecas de ella, así como de los factores y de las proteínas con los que interactúa a lo largo del ciclo.

La principal característica que define a todas las GTPasas es el dominio G. Estudios cristalográficos con varias GTPasas han demostrado que todas presentan un dominio G con un plegamiento y una estructura muy similar y con muy pocas variaciones

a lo largo de la superfamilia de GTPasas (Vetter and Wittinghofer, 2001). De esta forma, podríamos definir las GTPasas como proteínas caracterizadas por la presencia de un dominio G principal al cual se pueden adicionar otros dominios amino o carboxiterminales que pueden tener otras funciones independientes o relacionadas con la actividad GTPasa (ver figura 4).

Aunque el dominio G de las GTPasas está muy conservado a nivel estructural no ocurre lo mismo con la secuencia de aminoácidos, los cuales presenta una gran variabilidad entre cada una de las GTPasas; únicamente se mantienen altamente conservadas cuatro secuencias consenso responsables de la interacción con el nucleótido y con los efectores. Estos cuatro elementos son los motivos G1, G2, G3 y G4 y están conservados en todas las GTPasas, con la excepción de algunas pocas como las GTPasas metabólicas adenilsuccinato sintetasa y PEP-carboxiquinasa (Wang *et al.*, 1997; Poland *et al.*, 1993) y otras como por ejemplo FtsZ (Kang and Fromm, 1994) las cuales no presentan conservados todos los motivos nombrados anteriormente.

Los motivos G1, G3 y G4 junto con el motivo G5, aunque éste no está presente en todas las GTPasas, son responsables del reconocimiento, unión e hidrólisis del GTP y también de la interacción con el cofactor Mg^{2+} (Bourne *et al.*, 1991). El motivo G2 no está implicado directamente en la unión del nucleótido pero sí en la interacción con el posible efector y con la correspondiente GAP; este motivo está altamente conservado dentro de una misma familia pero no entre las diferentes familias de GTPasas y sólo se mantiene una treonina como residuo invariable (Bourne *et al.*, 1991).

1.2. Evolución y clasificación:

La superfamilia de las GTPasas está formada por un gran número de familias y subfamilias que cada día aumenta y se reorganiza. Leipe *et al.* (2002) clasifica esta superfamilia en 20 familias y posteriormente en otras 57 subfamilias basándose en motivos de secuencia conservados, características estructurales comunes y dominios arquitectónicos. Incluso incluye en esta superfamilia algunas ATPasas, ya que considera que la característica principal de esta superfamilia de proteínas es la presencia de un motivo estructural P-loop (phosphate-binding loop, donde está presente el motivo G1) y algunas proteínas con actividad ATPasa mantienen esta característica a nivel estructural a pesar de carecer de actividad GTPasa.

Es en **eucariotas** donde la diversidad y el número de proteínas GTPasas es mayor. Entre todas las familias de GTPasas eucarióticas destaca la superfamilia de

proteínas tipo Ras donde se incluyen las familias de proteínas Ras/Rab, Rho/Rac/cdc42 y las proteínas G heterotrómicas/Arf. Son en especial las proteínas de esta superfamilia las mejor caracterizadas a nivel bioquímico y estructural y suelen servir de modelo para el estudio del resto de GTPasas tanto eucarióticas como bacterianas.

La característica principal de estas proteínas es que actúan como interruptores moleculares en mecanismos de transducción de señales mediante ciclos de unión e hidrólisis de GTP regulados por la asociación a proteínas GAPs y GEFs específicos para cada una de las GTPasas. En la conformación activa (unido a GTP) la proteína interactúa con su diana celular desencadenando la respuesta fisiológica; cuando se produce la hidrólisis del GTP (reacción catalizada por la GAP correspondiente), la proteína pasa a su estado inactivo (unida a GDP); la disociación del GDP, mediada por la GEF correspondiente, permite vaciar la proteína y otra molécula de GTP puede de nuevo entrar en el sitio activo (ver figura 1). En este tipo de mecanismo es la unión del nucleótido y no su hidrólisis el factor que desencadena la activación de la proteína.

En bacterias y arqueas no existe un tipo de GTPasa con una función equivalente a las proteínas tipo Ras, no existe ningún análogo de las subunidades α de las proteínas G heterotriméricas esenciales en las transmisión de señales desde receptores de membrana, igualmente tampoco existen análogos funcionales de las proteínas GTPasas pequeñas de las subfamilias Rho, ARF, Rab y Ran. La única excepción es la proteína MglA, una GTPasa pequeña tipo Ras perteneciente a *Myxococcus xanthus* y *Caulobacter crescentus* (Hartzell, 1997; Thomasson *et al.*, 2002) implicada en la transmisión de señales de membrana, aunque debido a su especial distribución algunos autores especulan que se trata de un gen adquirido desde eucariotas por transferencia horizontal (Leipe *et al.*, 2002) y no de una proteína de origen bacteriano.

Respecto a las **GTPasas bacterianas** se conocen menos y hasta la fecha, por las GTPasas procariontas descritas, parece que son inferiores en número y en variedad de funciones en comparación con las eucarióticas (March, 1992). En arquea todavía se han descrito muchas menos.

Dependiendo del autor, la clasificación de las familias de GTPasas conservadas evolutivamente puede variar. Caldon, C.E y March, P.E (Caldon and March, 2003; Caldon *et al.*, 2001) clasifican este tipo de proteínas en cuatro grandes grupos: la familia de los factores de elongación (EF-G, EF-Tu, LepA), la familia de las proteínas FtsY/Ffh (FtsY y Ffh), la familia de las proteínas Obg (Obg, YchF, HflX) y la familia de las proteínas tipo Era (Era, EngA, YihA y MnmE) (ver figura 2). Estos autores incluyen dentro de esta última familia a la proteína MnmE, mientras que otros autores, como Mittenhuber (Mittenhuber, 2001) y (Leipe *et al.*, 2002), prefieren considerar a la familia de MnmE

como una familia independiente de GTPasas conservadas evolutivamente.

En la figura 2 se representa la distribución filogenética de las GTPasas más conservadas a lo largo de la evolución según la clasificación de Caldon; la mayoría de estas GTPasas se ha demostrado que son esenciales para los procesos celulares (Caldon *et al.*, 2001).

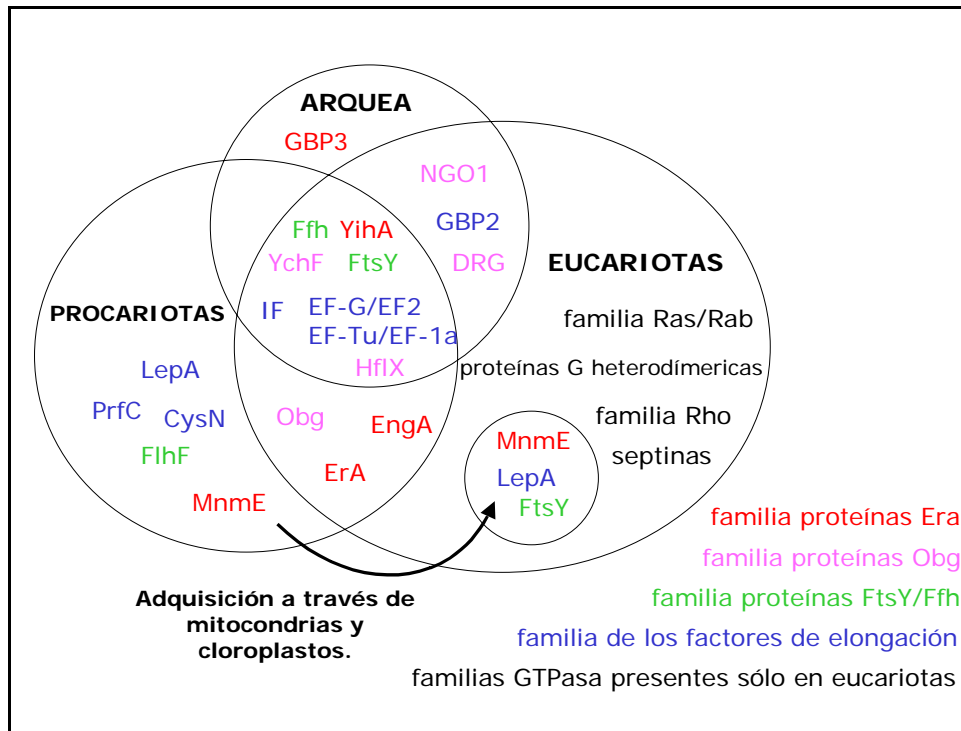


Figura 2: Distribución de las GTPasas altamente conservadas en bacterias, eucariotas y arquea según la clasificación realizada por Caldon *et al.* (2001). Las GTPasas de alta conservación se clasifican en cuatro grandes grupos indicados por colores, además también se indican las familias de GTPasas características sólo de eucariotas (en negro).

Exceptuando a los factores de transcripción EF-Tu y EF-G cuya estructura y ciclo GTPasa se conoce con bastante detalle, para la mayoría de las GTPasas bacterianas conservadas evolutivamente se desconoce el funcionamiento del ciclo GTPasa y no se puede descartar que el mecanismo de acción de estas proteínas sea diferente al descrito para las proteínas tipo Ras como sucede con EF-G y las dinaminas.

1.3. Estructura y motivos consenso de las GTPasas:

La primera estructura tridimensional obtenida de una GTPasa fue la del factor de elongación EF-Tu de *Escherichia coli* en 1977 (Kabsch *et al.*, 1977). Esta estructura permitió empezar a comprender el papel de los distintos motivos consenso conservados y definir el mecanismo general de las GTPasas. Desde entonces docenas de estructuras de

GTPasa han sido resueltas tanto en su forma vacía de nucleótido como unida a GTP (o análogos no hidrolizables como GppNHp), unida a GDP, formando complejos con su correspondiente GAP o GEF.

A nivel estructural el plegamiento y la **topología** de los dominios G es muy similar. Esta topología es común a casi todas las GTPasas y sólo existen algunas pequeñas variaciones en algunas GTPasas concretas. La topología consiste en 6 láminas β todas ellas paralelas excepto una antiparalela con una distribución 231456 y 5 hélices α localizadas en los extremos de las hojas.

La homología de secuencia entre las distintas GTPasas no es muy elevada a excepción de los **motivos** de secuencia consenso del dominio G: G1, G3 y G4. Usando la proteína Ras como modelo para la comparación con las otras GTPasas (ver figura 3) estos son los motivos consenso de las GTPasas :

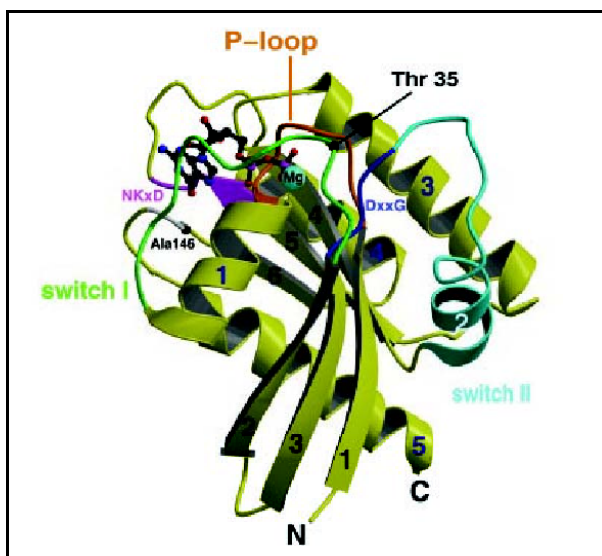


Figura 3: Estructura del dominio G de las GTPasas, con los motivos G1 (P-loop, naranja), G3(DxxG, azul) y G4 (NKxD, morado). (Vetter and Wittinghofer, 2001).

G1: la secuencia consenso es **GxxxxGKS**. Esta región es también llamada P-loop (phosphate-binding loop) y tiene como función unir los grupos fosfato del nucleótido mediante los residuos invariables de lisina y glicina (K16 y G15 en Ras) (ver figura 4). Además, el residuo de serina o treonina (S17 en Ras) tiene como función coordinar el cofactor Mg^{2+} tanto en la conformación unida a GTP como a GDP. Este motivo también está presente en otras proteínas diferentes a las GTPasas que también unen nucleótidos como las ATP sintetasas, miosina, algunas kinasas y otras proteínas (Walker *et al.*, 1982).

G3: la secuencia consenso es **DxxG**. La función de este motivo es coordinar el átomo de Mg^{2+} desde el residuo de aspártico conservado a través de una molécula de H_2O . Además, la glicina se une mediante un puente de hidrógeno al fosfato γ del nucleótido, interacción crucial para el cambio conformacional producido tras la hidrólisis del GTP (ver figura 4).

G4: la secuencia consenso es **NxxD**. Estos residuos conservados son los responsables de la especificidad en el reconocimiento del nucleótido ya que interaccionan con la base guanina del nucleótido mediante la formación de un doble puente de hidrógeno entre el aspártico y los nitrógenos de la guanina (ver figura 4).

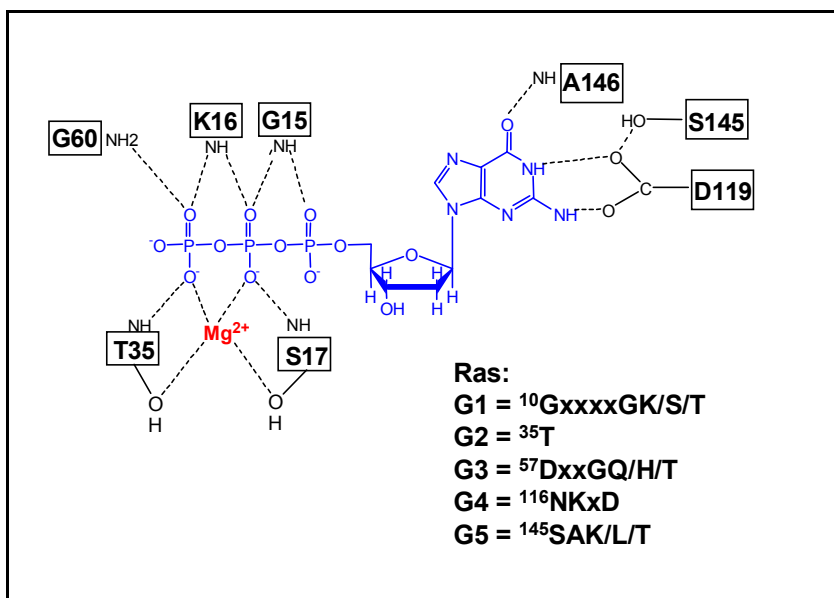


Figura 4: Localización de los residuos invariables de los motivos G1 a G5 de la proteína Ras y su coordinación a la molécula de GTP y el cofactor Mg^{2+} .

Además de los motivos G1, G3 y G4, principales responsables del reconocimiento del nucleótido, la unión y el cambio conformacional producido tras la hidrólisis, existen otros 2 motivos consenso presentes en las GTPasas:

-G2: este motivo consenso tiene una baja homología entre las distintas GTPasas, sólo un residuo de treonina se mantiene invariable, pero la homología de secuencia entre las GTPasas de una misma familia es muy alta. La treonina se coordina directamente al Mg^{2+} y al fosfato γ del GTP aunque su función no está implicada en la unión al GTP sino al efector; tras la hidrólisis del GTP, el cambio conformacional afecta al loop donde se encuentra este motivo y se produce un cambio en la orientación de la treonina que le permite a la proteína interactuar con el efector o diana molecular. En GTPasas tipo Ras la mutación de esta treonina a alanina (T35A en Ras) reduce la afinidad por el nucleótido y la proteína no puede ser activada por

la GAP, probablemente debido a una mala coordinación del átomo de Mg^{2+} . Dado que la secuencia consenso completa de este motivo se mantiene sólo dentro de una misma familia de GTPasas y dado que la función es interactuar con el posible efector el cual es específico para cada GTPasas, se puede afirmar que G2 es el motivo del dominio G que distingue y caracteriza a cada familia de GTPasas actuando como una especie de “huella digital”.

-G5: la secuencia consenso de este motivo es **S/CAK/L/T**, aunque realmente la alanina es el único residuo invariable y el resto de aminoácidos pueden variar dependiendo de la familia de GTPasas. Este motivo ayuda a mantener la interacción con la base de la guanina y por tanto es, junto con el motivo G4, el responsable de la especificidad por la base del nucleótido. El primer aminoácido (serina en la mayoría de las GTPasas) interacciona mediante un puente de hidrógeno con el aspártico del G4 que a su vez interacciona con la guanina. La alanina también interacciona con la guanina a través de un puente de hidrógeno entre el nitrógeno de la amina primaria y el O6 de la base guanina de forma que también regula la especificidad del reconocimiento ya que una adenina no podría realizar esta interacción por impedimentos estéricos.

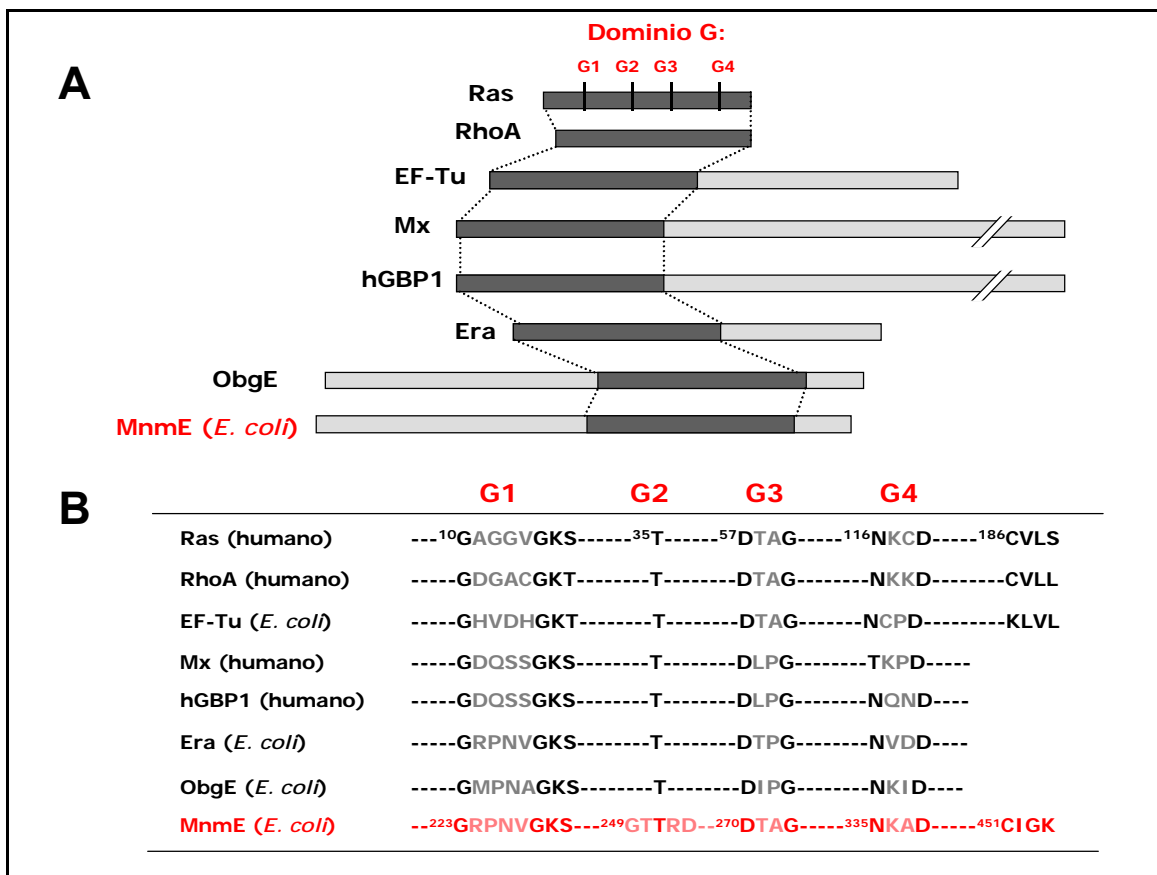


Figura 5: A: Localización del dominio G (en oscuro) en la secuencia de varias GTPasa: Ras y Rho de humanos como modelo de GTPasas pequeñas clásicas, EF-Tu (*E. coli*) como modelo de factores de elongación, las dinaminas humanas Mx y hGBP1, las GTPasa bacterianas Era y ObgE (YhbZ) y MnmE (*E. coli*). **B:** Alineamiento de las secuencia de los motivos G1, G2, G3, G4 y extremo Caax de estas GTPasas.

1.4. Extremo C-terminal:

Las GTPasas pequeñas reguladoras presentan en el extremo carboxiterminal una secuencia consenso conservada llamada secuencia Caax (que es la presente en la familia tipo Ras) y que en otras familias puede presentarse con algunas variaciones como CCax, GGCC o xCxC (donde C es una cisteína, x cualquier aminoácido y a un residuo alifático) (Valencia *et al.*, 1991).

Este motivo se caracteriza por la presencia invariable de la cisteína la cual tiene como función anclar la proteína a la membrana celular mediante modificaciones como farnesilaciones, carboximetilaciones y palmitosilaciones (Gutierrez *et al.*, 1989; Hancock *et al.*, 1989; Schafer *et al.*, 1989; Willumsen *et al.*, 1984). También se ha observado mediante la cristalización de algunas de estas proteínas completas que el extremo carboxiterminal corresponde a una región parcialmente desordenada lo que sugiere que es móvil y que sobresale del dominio G globular, por lo que puede actuar como brazo flexible entre el anclaje a la membrana y la proteína globular y citoplasmática (Milburn *et al.*, 1990).

1.5. Cambio conformacional:

La principal característica de las GTPasas es su habilidad para poder cambiar entre la conformación unida a GTP y la conformación unida a GDP. Se han descrito dos regiones implicadas en el cambio conformacional en las GTPasas: switch I y switch II.

El switch I incluye el loop efector, es decir el motivo G2 pero varía en longitud y secuencia entre las distintas familias de GTPasas, el switch II incluye el motivo G3 (DxxG) y es similar en todas las GTPasas. Mediante técnicas de rayos-X y RMN se ha visto que estas dos regiones presentan una gran flexibilidad, lo que confirma que son las dos regiones de la proteína que cambian como consecuencia de la unión del nucleótido.

Gracias a la comparación entre las distintas estructuras de GTPasas obtenidas hasta ahora, se ha observado que la estructura de la conformación unida a GTP es muy similar entre las distintas GTPasas, mientras que la estructura de la forma unida a GDP presenta más variabilidad. El mecanismo del cambio conformacional permite explicar el porqué de esta observación experimental.

Se puede sugerir que el mecanismo que desencadena el cambio conformacional es casi universal para todas las GTPasas: en la forma unida a GTP existen dos puentes de

hidrógeno que unen el fosfato γ del GTP: en el switch I, la amina primaria de la treonina conservada del G2 forma uno de los puentes de hidrógeno y en el switch II, la amina primaria de la glicina conservada del G3 forma el otro puente de hidrógeno. Estos dos puentes de hidrógeno actúan como si mantuvieran un muelle tensionado, y son los responsables de mantener estas dos regiones en una conformación concreta y similar en todas las GTPasas, es por ello que las estructuras resueltas hasta el momento de las proteínas en su forma unida a GTP tienen una alta homología estructural (ver figura 6).

Al producirse la hidrólisis, se libera el fosfato γ y estos dos puentes de hidrógeno desaparecen, la estructura mantenida por estos enlaces se rompe y las regiones switch I y switch II se relajan adoptando una nueva conformación (unida a GDP) sin tensiones y que es característica de cada proteína. Por eso, la comparación entre las distintas estructuras en su conformación unida a GDP son más variables.

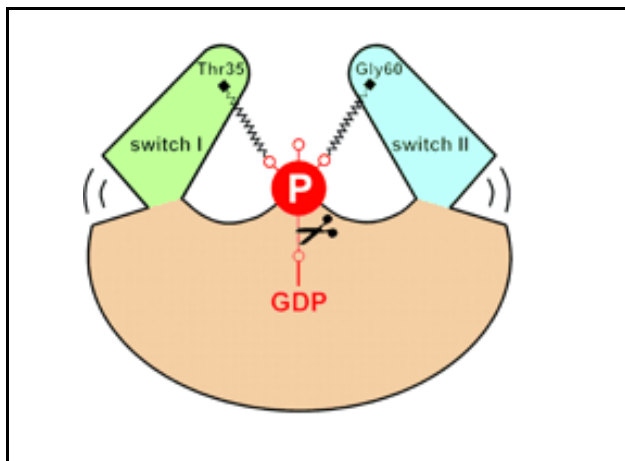


Figura 6: Diagrama esquemático del mecanismo universal de cambio conformacional en las GTPasas. Vetter *et al.*, (2001).

Aunque el mecanismo de cambio conformacional es universal no se puede descartar que se requieran otros factores específicos para cada GTPasa.

Las regiones switch y el cambio conformacional no sólo están presentes en las GTPasas, también se ha visto que la familia de las proteínas motoras ATP-binding como la miosina y la quinesina presentan un switch I (con una serina conservada) y un switch II (con un motivo DxxG) equivalente a las GTPasas y la unión del P_{γ} del nucleótido y la posterior relajación de la estructura es totalmente equivalente al descrito para las GTPasas. Este hecho, junto a la presencia del P-loop (G1) responsable de unir el nucleótido, permite a algunos autores sugerir que este tipo de ATPasas motoras pueden tener un ancestro común con las GTPasas (Kull *et al.*, 1998).

1.6. GEFs:

La reacción de liberación del nucleótido de la proteína es en general un proceso lento debido a la alta afinidad que presentan la mayoría de GTPasas por los nucleótidos. Este fenómeno puede acelerarse varios órdenes de magnitud gracias a la acción de los GEFs, factores externos específicos para cada GTPasa que catalizan la reacción de disociación del nucleótido.

El mecanismo de disociación del GDP es complejo y pasa por un estado trimérico entre la proteína, el nucleótido y el GEF que da como resultado la liberación del nucleótido y permite a la proteína volverse a activar mediante la unión a una nueva molécula de GTP.

Además de los GEFs que catalizan esta reacción de disociación del GDP, existen otros factores que acaban decidiendo la velocidad de la reacción y el estado en el que la proteína se encuentra en cada momento, estos factores son las afinidades de la GTPasas por GTP y GDP, la concentración intracelular de los nucleótidos y la afinidad y concentración de otros posibles efectores que pueden desplazar la reacción hacia la forma unida a GTP.

Los GEFs están conservados sólo dentro de una misma familia de GTPasas. Aunque los detalles del mecanismo de acción pueden ser diferentes entre las distintas familias de GEFs, existen similitudes estructurales entre los diferentes GEFs y se ha descrito un mecanismo general para explicar la acción de estos factores. A grandes rasgos, el GEF se une al complejo proteína-GDP interaccionando por sus regiones switch I y II e introduce algunos residuos cerca del motivo P-loop y del sitio de coordinación del Mg^{2+} provocando unos cambios estructurales en la zona que desencadenan la liberación del GDP.

Otros factores que pueden intervenir en la disociación del GDP son las proteínas reguladoras llamadas **GDI** (guanine-nucleotide dissociation inhibitor), aunque hasta la fecha sólo se han descrito este tipo de reguladores en las subfamilias Rho y Rab. Las GDI actúan inhibiendo la liberación del GDP al unirse a la proteína en su conformación unida a GDP y formando un complejo GTPasa-GDP-GDI estable que impide la entrada del GEF correspondiente.

1.7. Hidrólisis del GTP, dedo de arginina y GAPs:

La mayoría de las proteínas con actividad GTPasa, especialmente las proteínas G

pequeñas (Ras, Rho, Ran,...) y las proteínas G heterotriméricas, se caracterizan por tener una actividad GTPasa intrínseca baja, del orden de $0.001-0.1 \text{ min}^{-1}$. Pero esta tasa de hidrólisis puede ser acelerada varios órdenes de magnitud mediante la presencia de un residuo de arginina en el núcleo catalítico del dominio GTPasa, el cual es capaz de estabilizar el estado de transición y catalizar la hidrólisis de fosfato γ del GTP unido a la proteína. Este mecanismo que cataliza la hidrólisis del GTP se llama **dedo de arginina** ("arginine finger") y es el mecanismo general por el cual la hidrólisis del GTP se cataliza y se consigue bajar la tasa de hidrólisis del GTP a menos de 1 s^{-1} (Ahmadian *et al.*, 1997b; Bourne, 1997).

La arginina catalítica que realiza esta función puede ser aportada en *cis* o en *trans*:

-*Trans*: la arginina del dedo de arginina está presente en otra proteína que interactúa específicamente con la GTPasa y que es la responsable de catalizar la hidrólisis, esta proteína es llamada GAP por "GTPase activating protein". Este es el mecanismo de regulación de las GTPasas más habitual y se han descrito GAPs para la mayoría de las GTPasas mejor caracterizadas como Ras, Rho, Rab, Ran, Arf, etc,...

Al igual que ocurría con los GEFs, no se encuentra homología de secuencia o estructura entre las distintas GAPs, únicamente la arginina catalítica y alguna otra arginina o lisina secundaria que ayudan a estabilizar el "finger loop". La homología existe sólo dentro de una misma familia de GAPs.

Numerosas GAPs han sido cristalizadas formando complejos con su correspondiente GTPasa (ej: Ras-RasGAP (Scheffzek *et al.*, 1997), Rho-RhoGAP (Rittinger *et al.*, 1997)) y se han hecho estudios bioquímicos para determinar los residuos implicados en la interacción.

El principal residuo de este mecanismo es la arginina que estabiliza el estado de transición (Arg789 en RasGAP, de nuevo modelo para estudiar y comparar el resto de proteínas GAPs), pero también existen otros aminoácidos adicionales que participan en este mecanismo; así, en la proteína GAP existe otra arginina o lisina conservada que ayuda a estabilizar el "finger loop" y en la propia GTPasa algunos residuos localizados en el switch I y II interactúan con la GAP optimizando la orientación de la maquinaria catalítica en la conformación de la proteína unida a GTP. De estos aminoácidos el que realiza la función más importante es la glutamina adyacente al motivo G3 (DxxGQ) (Gln61 en Ras) presente en el switch II y que interacciona directamente con el fosfato γ y con la arginina de la GAP. Además también intervienen la glicina invariable del G3 (G60), las lisina y serina del G1 (Lys16 y Ser17) y la treonina del G2 (Thr35), es decir los aminoácidos invariables implicados en la unión del GTP (ver figura 7).

El mecanismo del dedo de arginina puede ser mimetizado mediante la

introducción de una molécula de AlF_3^- en el sitio catalítico del nucleótido de forma que se puede obtener un complejo estable de la proteína unida a GDP-AlF_3 y a la GAP que equivale al estado de transición (Ahmadian *et al.*, 1997a).

El AlF_x (donde x puede ser 3 o 4 ya que el fluoruro de aluminio se encuentra como AlF_3^- o AlF_4^- dependiendo del pH del medio y por eso suele representarse como AlF_x^-) es una molécula plana que puede mimetizar al P_γ ya que las distancias de los enlaces Al-F y P-O son muy similares y porque la base trigonal del AlF_3 es equivalente a la del grupo fosforil. De esta forma el Al (pentavalente) se coordina al O del P_β y a una molécula de H_2O y los átomos de F forman puentes de hidrógeno con el Mg^{2+} , la Thr (G2), Gln y Gly (G3), Lys (G1) y la Arg catalítica de la GAP.

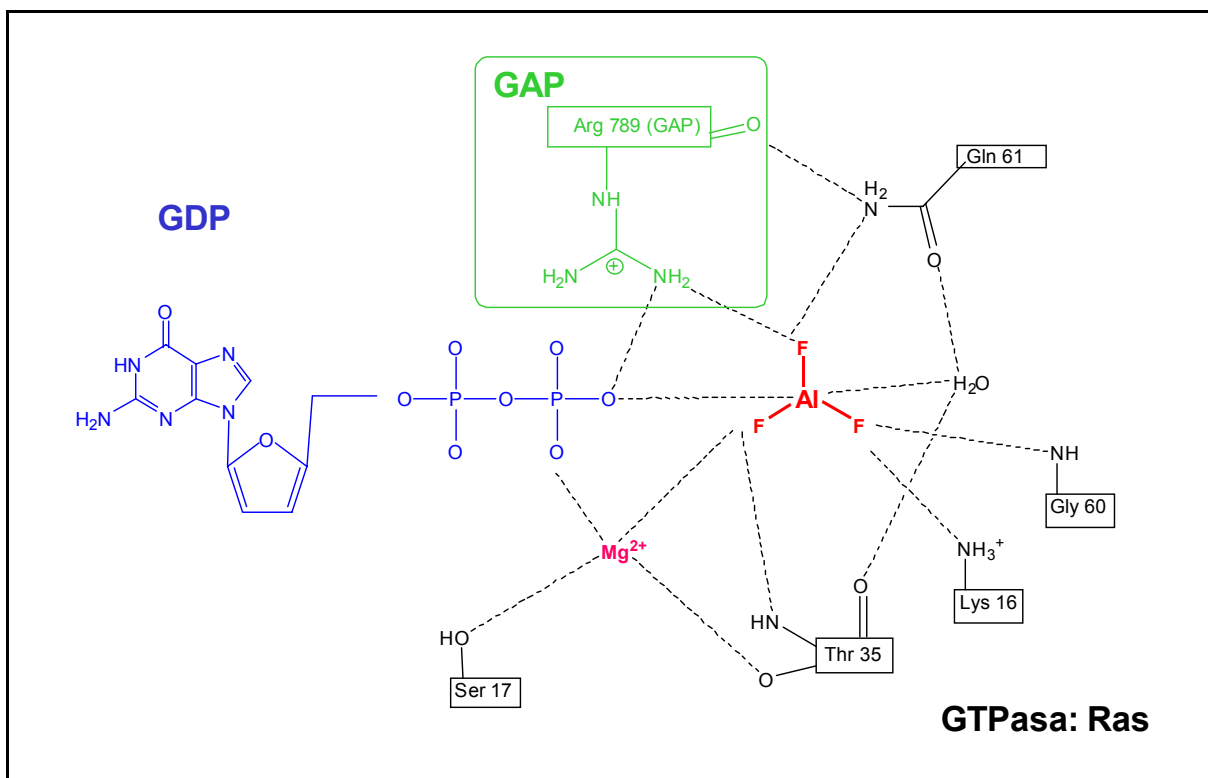


Figura 7: estructura del complejo $\text{GDP-AlF}_3\text{-Ras-GAP}$. En azul la molécula de GDP , en rojo la molécula de AlF_x mimetizando el fosfato gamma del nucleótido y coordinándose a los aminoácidos del dominio G de la GTPasa Ras (en negro) y a la arginina catalítica de la proteína GAP (en verde).

El uso de esta molécula es extremadamente útil en el estudio de la función de las argininas y otros aminoácidos catalíticos implicados en la hidrólisis del GTP ya que mediante esta técnica se pueden “congelar” de forma estable las GTPasas en su estado de transición unidas a la GAP, al AlF_x y al nucleótido (en la forma GDP) permitiendo observar la estructura del núcleo catalítico y los aminoácidos implicados.

-Cis: en algunos casos la arginina catalítica puede ser aportada en *cis* por la propia proteína. Se han descrito GTPasas con una actividad GTPasa intrínseca inusualmente alta y sin GAPs conocidas. Esta alta tasa de hidrólisis se debe a la presencia de una arginina catalítica interna que realiza el papel del dedo de arginina.

Existen también otros casos de mecanismos en *cis* diferentes como el observado en algunas GTPasas de la familia Rho como cdc42, RhoC y Rac2. En estos casos se han descrito proteínas GAPs propias, pero además también existe un mecanismo adicional de regulación en *cis*: existe una Arg interna que es capaz de actuar como dedo de arginina proporcionando una actividad autoGAP ("self-stimulated GAP activity"), este mecanismo no excluye la acción de las GAPs y constituye un mecanismo adicional de regulación (Zhang and Zheng, 1998; Zhang *et al.*, 1998).

Otro caso particular de activación de la hidrólisis en *cis* es el observado en la proteína G heterotrimérica $G_{\alpha i}$ y en el factor de elongación EF-G de bacterias.

En el caso de la proteína $G_{\alpha i}$ se conocen proteínas reguladoras de las proteínas G señalizadoras llamadas proteínas RGS (regulators of the G protein signaling). Se ha observado experimentalmente que estas proteínas se unen a la subunidad $G_{\alpha i}$ y provocan el aumento la actividad GTPasa como hacen las GAPs convencionales, pero en este caso no existe ninguna arginina catalítica aportada por la proteína reguladora. En realidad la arginina catalítica se encuentra en la propia subunidad $G_{\alpha i}$ en un dominio helicoidal extra, pero requiere de la unión a la proteína RGS para orientar correctamente y alinear el residuo de arginina que desencadena el mecanismo de activación (Berman *et al.*, 1996; Hall, 2000; Sondek *et al.* 1994).

En el factor de elongación de EF-G ocurre un mecanismo similar, se sabe experimentalmente que la activación de la hidrólisis ocurre cuando el EF-G interactúa con la proteína ribosomal L7/L12, pero no se ha encontrado ninguna arginina en esta proteína candidata a hacer el papel del residuo catalítico, sino que la arginina está dentro del propio dominio G de la GTPasa, pero se requiere la unión con las proteínas ribosomales L7/L12 para promover la reorientación de los residuos catalíticos dentro de la propia molécula de EF-G (Mohr *et al.*, 2000; Rodnina *et al.* 2000).

Es también importante remarcar que el mecanismo del dedo de arginina no debe ser necesariamente universal para todas las GTPasas; aunque para la mayoría de las GTPasas todavía no se han llegado a describir los mecanismos moleculares de la hidrólisis, ya se conocen algunos casos donde debe descartarse la acción de un mecanismo de dedo de arginina.

Rap1 es una proteína GTPasa pequeña tipo Ras implicada en cascadas de transducción de señal y que es regulada mediante la interacción con su proteína GAP: Rap1GAP. El estudio del mecanismo molecular de la activación de la hidrólisis de esta proteína demuestra que no existe ningún residuo de arginina implicado (ya sea aportado en *trans* por la GAP o en *cis* por la propia proteína) así como tampoco existe un aminoácido de glutamina presente en el G3 del dominio G; por tanto, esta proteína es un ejemplo de la activación de una GTPasa mediante un mecanismo alternativo al dedo de arginina (Brinkmann *et al.*, 2002).

Recientemente se ha observado que la proteína Ran (GTPasa nuclear tipo Ras) es activada por su RanGAP pero mediante un mecanismo donde tampoco está presente ninguna arginina, además los autores han demostrado que la función de la GAP en este caso es posicionar el residuo de glutamina adyacente al G3 en la orientación correcta para desencadenar la hidrólisis (Seewald *et al.*, 2002).

La proteína hGBP-1 (human guanylate-binding protein 1) es otro ejemplo de mecanismo de activación diferente al dedo de arginina, en esta proteína está presente un residuo hidrofóbico en el sitio de la glutamina del G3 (Q61 en Ras) y además se ha observado mediante la estructura tridimensional de la hGBP-1-GppNHp (complejo entre la proteína y el GTP no hidrolizable) que en la reacción de catálisis no existe ningún residuo cargado implicado (Praefcke *et al.*, 1999; Prakash *et al.*, 2000b).

Estos ejemplos demuestran que el mecanismo del dedo de arginina de las GAP, así como la presencia de una Arg catalítica y una Gln conservada, no es universal y pueden existir otros mecanismos alternativos de hidrólisis.

1.8. Dinaminas:

Las dinaminas constituyen una familia de GTPasas que presentan algunas características interesantes para el estudio de la proteína MnmE de *E. coli*, objeto de estudio de esta tesis, ya que a pesar de no pertenecer a esta familia, comparten propiedades y características especiales que las diferencian de las GTPasas clásicas, por ello hacemos un breve repaso de las propiedades de esta peculiar familia de GTPasas.

En general se acepta que las GTPasas actúan como interruptores moleculares y su actividad está regulada por la interacción con un factor GEF que activa a las proteínas

porque permite que puedan unirse a una molécula de GTP y por una proteína GAP que las inactiva mediante la hidrólisis. Estas características han sido establecidas para la mayoría de las GTPasas pequeñas de tipo Ras, las cuales están implicadas en rutas de transmisión de señales intracelulares y para las proteínas G heterotriméricas relacionadas con la señalización transmembrana. Estos tipos de función requieren que la activación y desactivación sean procesos rápidos. Sin embargo, existen ejemplos de GTPasas con estructura de multidominio cuya función en la célula no está relacionada con la transmisión de señales y donde el mecanismo clásico de activación/desactivación de la proteína puede ser diferente.

Un ejemplo de esto es la familia de las dinaminas, un grupo de GTPasas implicadas en numerosos y diversos procesos celulares que incluyen fenómenos relacionados con endocitosis, tráfico vesicular, actividad antiviral, biogénesis de cloroplastos, fisión de mitocondrias, formación de la pared celular en plantas, etc.. (Danino and Hinshaw, 2001; Song and Schmid, 2003; Thompson and McNiven, 2001; van der Blik, 1999a; van der Blik, 1999b; Wiejak and Wyroba, 2002).

1.8.1 Características generales:

Las proteínas que integran la familia de las dinaminas comparten una estructura y una distribución en dominios similar a lo largo de todas las subfamilias que la componen. Constan de 5 dominios diferentes (ver figura 8):

- Dominio GTPasa: gran dominio aminoterminal constituido por el dominio G donde están presentes los motivos característicos de las GTPasas (G1, G3 y G4) y un motivo de autoasociación.
- Dominio central: dominio posiblemente implicado en autoasociación pero de función desconocida.
- Dominio PH: (pleckstrin-homology) implicado en unión a membrana.
- Dominio GED: (GTPase effector domain) responsable de la estimulación de la actividad GTPasa de la proteína, es decir, se puede definir como un dominio GAP interno el cual presenta los residuos de argininas catalíticas característicos, aunque algunos autores discrepan de esta posible función auto-GAP (Marks *et al.*, 2001)
- Dominio PRD: (proline/arginine-rich domain) rico en residuos de arginina y prolina que ayudan a incrementar las interacciones dinamina-dinamina, contiene motivos de unión a SH3.

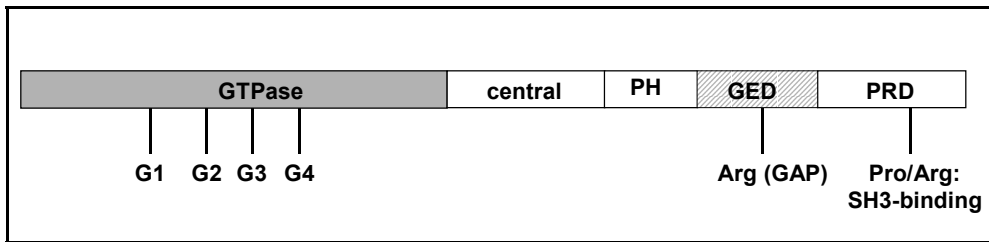


Figura 8: Esquema de la distribución de los dominios en las dinaminas

Las proteínas de la familia de las dinaminas se caracterizan por su capacidad de autoasociación y oligomerización para formar estructuras complejas tipo espirales o anillos (las cuales pueden tener cierta similitud con algunas estructuras formadas por las tubulinas, las septinas y FtsZ de *E. coli*). Varios de los dominios que están conservados y presentes en todas las proteínas tipo dinaminas descritas hasta el momento están directamente relacionados con la interacción dinamina-dinamina y la formación de estructuras "coiled-coil".

Aunque los tipos de función en los que están relacionadas las dinaminas son aparentemente muy diversos, en general tienen en común que participan en la biomecánica de membranas, como por ejemplo, en la formación de vesículas durante la endocitosis, fisión de mitocondrias, biogénesis de membrana celular en plantas, biogénesis en la membrana de cloroplastos, etc... En todos estos procesos parece ser que las dinaminas son capaces de asociarse a la membrana y promover el estrangulamiento de la bicapa lipídica, por lo que reciben el nombre de proteínas "pinchase" o "pellizcadoras".

Además, la unión y/o hidrólisis del GTP y el posterior cambio conformacional está relacionado con la formación de estas estructuras proteicas en espirales o anillos. Aunque de momento se desconoce cómo funciona este mecanismo, algunos autores sugieren que la unión del GTP favorece la oligomerización ya que al añadir GTP no hidrolizable se desencadena la formación de espirales; otros autores sugieren que es la hidrólisis lo que desencadena la multimerización, por último algunos resultados apuntan a que es la oligomerización el fenómeno que permite la unión e hidrólisis del GTP (Takei *et al.*, 1995).

Otra peculiaridad de las dinaminas que las distingue de la mayoría de las GTPasas y en especial de la familia de las de tipo Ras, es su aparente baja afinidad por nucleótidos, lo cual hace que no requiera de un GEF para liberar el GDP. Otra característica de las dinaminas es la alta actividad GTPasa, lo cual permite que no requieran de una GAP para activar la hidrólisis del GTP. Aunque las dinaminas presentan una alta actividad GTPasa intrínseca, ésta se incrementa como consecuencia de la

autoasociación de la proteína, pero no está clara, como se había propuesto inicialmente, la participación de una arginina catalítica presente en un dominio de la proteína diferente al dominio G; además no existe una glutamina tras el motivo G3 sino un residuo hidrofóbico (Marks *et al.*, 2001; Vetter and Wittinghofer, 2001).

1.8.2. Clasificación:

Las GTPasas de la familia tipo dinaminas están presentes en todos los organismos desde bacterias hasta humanos. Se podrían clasificar las distintas familias dependiendo de los fenómenos celulares en los que participan:

Función	Proteína	comentarios	Referencia
Endocitosos y tráfico vesicular	Dinaminas	relacionada con procesos de endocitosis mediada por clathrin y tráfico vesicular de endosoma a Golgi	(Danino and Hinshaw, 2001) (Schmid <i>et al.</i> , 1998) (Urrutia <i>et al.</i> , 1997)
	Vsp1 (levadura)		
Morfología y fisión mitocondrial	Dnm1 (levadura) Drp1 (mammalian) DRP-1 (<i>C.elegans</i>)	implicadas en la morfología y división de mitocondrias	(Yoon <i>et al.</i> , 2001) (Shepard and Yaffe, 1999) (Yaffe, 1999) (Erickson, 2000)
	Mgm1 (levadura) Msp1 (<i>S.pombe</i>) OPA1 (humano)		
Dinaminas en plantas	Pragmoplastina	implicadas en la biogénesis y morfología de la pared celular en plantas y en la división de cloroplastos	(Jin <i>et al.</i> , 2003)
	ADL (<i>Arabidopsis</i> dynamin-like)		
Dinaminas inducidas por interferones	hGBP1 (human guanylate-binding protein)	Familia de dinaminas inducidas por interferon- γ e implicadas en procesos antivirales	(Praefcke <i>et al.</i> , 1999; Prakash <i>et al.</i> , 2000b; Schwemmle <i>et al.</i> , 1995; Schwemmle and Staeheli, 1994)
	Familia proteínas Mx		
Dinaminas bacterianas	YjdA (<i>E. coli</i>)	Presenta los dominios característicos de las dinaminas pero la función y propiedades bioquímicas se desconocen	(van der Blik, 1999a)

Tabla 1: Resumen de las familias y funciones de las dinaminas descritas.

Las dinaminas son proteínas que se describieron por primera vez hace relativamente pocos años en la década de los ochenta, desde entonces se ha ido incrementando continuamente el número de miembros pertenecientes a esta familia las cuales están presentes en organismos muy diversos y tienen funciones aparentemente distintas aunque todos tienen en común su característica distribución en los 5 dominios anteriormente descritos: De entre todas las dinaminas destacamos las implicadas en la

respuesta antiviral: **hGBP1** y **Mx**.

Estas dinaminas son algunas de las mejor estudiadas a nivel bioquímico y estructural y por tanto nos pueden servir de modelo (mejor que la proteína Ras) para el estudio de MnmE dado que este grupo de GTPasas presentan propiedades bioquímicas peculiares e interesantes similares a la proteína MnmE de *Escherichia coli*.

-hGBP-1: proteína humana con capacidad para bloquear la replicación de varios virus aunque el mecanismo por el cual actúa se desconoce. La proteína ha sido caracterizada a nivel bioquímico y estructural y es una GTPasa que presenta características peculiares e interesantes: presenta la misma afinidad por GTP, GDP y GMP, hidroliza el GTP a GDP y GMP y es capaz de autoasociarse siendo la formación de oligómeros dependiente de la unión del GTP. Además, la cristalización de la estructura de la proteína en su conformación unida a GTP no hidrolizable (GppNHp) ha permitido demostrar que el mecanismo de hidrólisis de esta GTPasa se realiza mediante un mecanismo alternativo al del dedo de arginina y diferente al del resto de GTPasas tipo Ras (Praefcke *et al.*, 1999; Prakash *et al.*, 2000a; Prakash *et al.*, 2000b).

-Proteínas Mx: proteínas presentes en vertebrados con alta actividad antiviral. MxA y MxB se expresan en humanos, mientras que Mx1, Mx2 y Mx3 están presentes en roedores. Estas GTPasas como el resto de las dinaminas presentan baja afinidad por nucleótidos (en comparación con Ras) y alta actividad GTPasa intrínseca. Se desconoce el mecanismo de funcionamiento de estas proteínas, pero se sabe que son capaces de formar homo-oligómeros y que presentan una secuencia LZ (leucine zipper) responsable de la interacción intra e intermolecular que regula la actividad GTPasa y el reconocimiento de la diana viral (Flohr *et al.*, 1999; Kochs and Haller, 1999a; Kochs and Haller, 1999b), también se ha observado que para su actividad antiviral se requiere la unión del GTP (y no su hidrólisis), y que la proteína en su forma monomérica tiene actividad antiviral (Janzen *et al.*, 2000), es el primer caso descrito de una dinamina que es activa en una conformación monomérica.

1.8.3. ¿Proteínas reguladoras o mecanoenzimas?

Existe una gran controversia acerca de la función de las dinaminas y su clasificación dentro de las GTPasas. Algunos autores sugieren que las características peculiares de las dinaminas permiten definir a esta familia de GTPasas como mecanoenzimas para diferenciarlas del resto de GTPasas reguladoras como las tipo Ras.

Los argumentos esgrimidos por estos autores están basados en las características bioquímicas de las dinaminas: baja afinidad por nucleótido y alta actividad GTPasa intrínseca, propiedades que alejan estas proteínas de las GTPasas clásicas y las acercan a

otras mecanoenzimas como la dineína, kinesina y miosina, tres familias de ATPasas que se describen como motores moleculares ya que unen e hidrolizan el ATP con el fin de usar su energía en procesos mecánicos en la célula; estas proteínas poseen baja afinidad por el ATP y alta tasa de hidrólisis. Además las dinaminas comparten otras características con las mecanoenzimas como es el gran tamaño de la proteína, las dinaminas tienen un tamaño medio de aproximadamente 100 kDa mientras que la mayoría de las GTPasas reguladoras suelen ser proteínas relativamente pequeñas, alrededor de 20-30 kDa. Por último, la capacidad de formar oligómeros mediante autoasociación es otra característica típica de las dinaminas y compartida con las mecanoenzimas (Sweitzer and Hinshaw, 1998) (Marks *et al.*, 2001; McNiven, 1998; McNiven *et al.*, 2000; Yoon *et al.*, 2001).

Por otro lado, algunos autores creen que a pesar de sus peculiaridades las dinaminas, como el resto de GTPasas tienen una función reguladora, basada en la capacidad para unir GTP y GDP y por las distintas conformaciones que la proteína adopta en función del nucleótido al que esté unida. Según estos autores, la hidrólisis del GTP no es un fenómeno empleado por la célula para generar energía, sino un mecanismo para pasar de una conformación activa a una inactiva, como ocurre con las GTPasas clásicas. Además, la existencia de un dominio GED con actividad GAP demuestra que el mecanismo de activación/desactivación es análogo al de otras GTPasas, lo que reforzaría el papel de las dinaminas como proteínas reguladores capaces de transmitir la señal en una cascada de señalización (Sever, 2002). Sin embargo, algunos autores como Marks *et al.* (2001) proponen que el papel del dominio GED no es el de activar la actividad GTPasa ni creen que exista un mecanismo de dedo de arginina, ya que se ha visto que en algunos casos el dominio GTPasa aislado mantiene la actividad intrínseca alta. Por otro lado, el extremo carboxiterminal contiene una región rica en prolinas que estructuralmente sobresale y que permitiría a las dinaminas interactuar con otras proteínas que contienen secuencias de unión SH3. Esta última característica de las dinaminas permite sugerir un posible papel en la transducción de señales.

El debate sobre el tipo de función realizado por las dinaminas continúa y argumentos a favor de ambas propuestas continúan apareciendo, no se puede descartar ninguna de las dos hipótesis y puede también que ambas no sean excluyentes: las dinaminas podrían definirse como mecanoenzimas capaces de usar la hidrólisis del GTP para realizar procesos de formación de vesículas y estrangulamientos de la membrana lipídica y, por otro lado, funcionar como reguladores moleculares en procesos de señalización haciendo uso de su capacidad de interactuar con otras moléculas con motivos SH3 al producirse un cambio conformacional mediado por la unión del nucleótido.

2. Modificación de los tRNAs:

2.1. Introducción:

El proceso de **traducción** de proteínas es uno de los mecanismos biológicos más complejos e importantes de la célula y en este proceso la modificación de los tRNAs juega un papel esencial.

Una de las características principales del RNA celular es la presencia de gran variedad de nucleótidos modificados químicamente. Estas modificaciones son siempre post-transcripcionales y, por lo tanto, se trata de nucleótidos derivados de adenina, guanosina, citosina y uridina que han sufrido un proceso enzimático de modificación química. Estas modificaciones del RNA están presentes en todos los organismos desde arqueobacterias y bacterias a eucariotas superiores e incluyen también mitocondrias y cloroplastos. Igualmente, existen modificaciones en todos los tipos de RNAs (tRNA, rRNA, mRNA, tmRNA y snRNA) aunque es en los tRNAs donde mayor número de modificaciones se han observado (Rozenki *et al.*, 1999).

Hasta la fecha se han descrito más de 95 tipos diferentes de modificaciones químicas en los tRNAs (Bjork, 1995), la mayoría de las cuales son específicas para tRNAs concretos y se localizan en un nucleótido determinado, por lo que se sugiere que cada nucleótido modificado puede tener una función diferente. Estas modificaciones son llevadas a cabo por enzimas modificadores que forman parte del complejo sistema multienzimático de maduración del RNA. Hasta la fecha se han descrito más de 45 enzimas modificadores de tRNAs en *E. coli* y se calcula que la información genética destinada a la modificación de los tRNAs es al menos 4 veces superior a la información genética destinada a la síntesis de los propios tRNAs (Bjork, 1995), llegando a ocupar hasta el 1% del genoma bacteriano (Bjork *et al.*, 1987). Estos datos reflejan la importancia del proceso de modificación de los nucleótidos del tRNA en la traducción de proteínas.

La modificación de los nucleótidos en los tRNAs es un proceso crucial para asegurar la fidelidad de la traducción. Los mecanismos por los cuales los nucleótidos modificados ejercen su función son muy diversos; las modificaciones en el anticodón como por ejemplo las presentes en la posición 34 (posición "wobble" o de tambaleo) pueden alterar la especificidad del apareamiento codón-anticodón, mejorando o inhibiendo el reconocimiento entre las bases, la modificación en la posición 37 (3' del anticodón) mejora la eficacia de la traducción y ayuda a mantener la pauta de lectura

evitando el frameshift traduccional (pérdida de la pauta de lectura). Igualmente, modificaciones en otras posiciones del tRNA (las cuales mayoritariamente se localizan en el loop-anticodón) participan en la descodificación del mensaje genético mediante la estabilización estructural de la interacción con el codón y/o con el ribosoma aumentando así la eficacia del proceso traduccional.

2.2. Estructura y función de los tRNAs:

Los tRNAs son las moléculas adaptadoras que permiten realizar la transición desde los tripletes de nucleótidos a los aminoácidos. Todos los tRNAs tienen unas características comunes de secuencia y estructura que les permiten interactuar con los diferentes enzimas implicados en la traducción, pero a la vez cada uno de los tRNAs posee características particulares que les dotan de especificidad.

Los tRNAs comparten una estructura secundaria similar la cual puede representarse como una estructura en forma de trébol mantenida por los apareamientos entre cortas zonas de bases complementarias en la secuencia del tRNA.

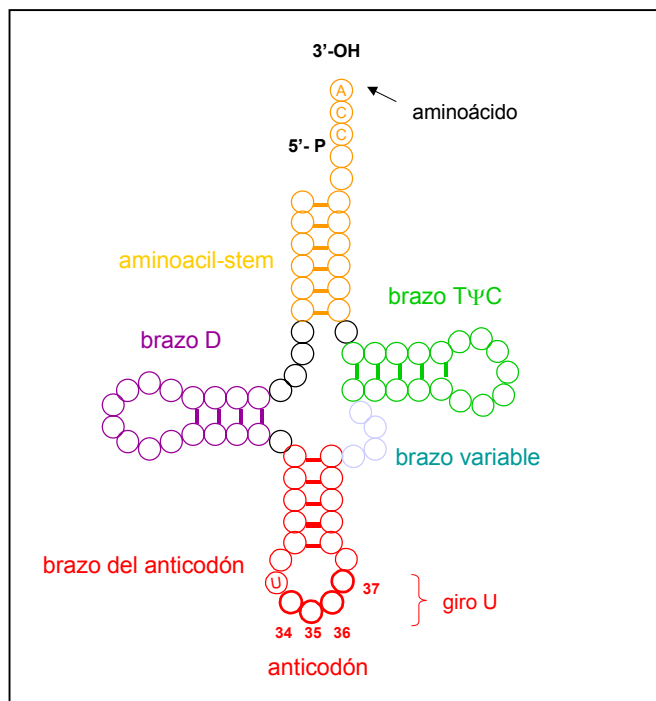


Figura 9: Estructura secundaria de los tRNAs (hoja de trébol)

La figura 9 ilustra la estructura general de los tRNAs; las posiciones de los nucleótidos son numeradas desde el extremo 5' hasta el 3' según la secuencia estándar más común de los tRNAs que consta de 76 bases. Algunos tRNAs presentan variaciones en el número de bases (desde 74 a 95), por lo que algunas posiciones tienen una numeración del tipo 20, 20a, 20b que permite nombrar las bases extras respecto al patrón de 76 bases.

Las secuencias de los tRNAs varían para tipo de especie de tRNA, pero existen

algunas posiciones conservadas en todos los tRNAs independientemente del aminoácido que codifiquen y del organismo al que pertenezcan; otras posiciones se encuentran semiconservadas, es decir, presentan purinas o pirimidinas pero sin especificar el tipo de base, el resto de nucleótidos varían para cada tRNA. Igualmente, algunas posiciones se encuentran siempre modificadas o presentan gran tendencia a sufrir modificaciones post-transcripcionales mientras que otras nunca varían.

La estructura en forma de hoja de trébol está constituida por:

- Braço aceptor: formado por el apareamiento de 6 bases correspondientes a los extremos 5' y 3' de la secuencia. El extremo CCA-3'OH queda siempre libre y es por donde el enzima aminoacil-tRNAsintetasa carga el aminoácido correspondiente para formar el aminoacil-tRNA.
- Braço D: formado por una zona de apareada de 3 o 4 bases complementarias y un lazo que puede variar su tamaño de 7 a 11 bases, su nombre proviene de la presencia de bases modificadas D (dihidrouridina).
- Braço TΨC: formado por una región de 5 bases complementarias y un lazo de 7 bases donde se encuentra la secuencia TΨC conservada para todos los tRNAs (Ψ = pseudouridina)
- Braço del anticodón: formado por una zona de 5 bases complementarias apareadas y un lazo de 7 bases donde se encuentra el anticodón: posiciones 34, 35 y 36. La posición 33 es siempre un U y la posición 37 una base púrica (A o G) que se encuentra siempre modificada. La posición 38 es siempre una base pirimidínica (C o U) y también se encuentra siempre modificada. La posición 34 del anticodón (posición "wobble" o de tambaleo) reconoce y se une a la tercera base del codón del mRNA y la posición 36 del anticodón reconoce la primera del codón (ambas secuencias se escriben de 5' a 3' pero son complementarias y están en sentido opuesto, por ejemplo, el codón $5'CAA^3'$ se une al anticodón $5'UUG^3'$).
- Braço extra o variable: loop localizado entre el braço TΨC y el del anticodón que está presente solo en algunos tRNAs, su longitud puede variar entre 3-5 bases a 21. Las bases extras se numeran e1, e2, ...hasta e21.

La estructura terciaria de los tRNAs es creada mediante puentes de hidrógeno donde principalmente participan las bases no apareadas en la estructura secundaria. Muchas de las bases conservadas o semiconservadas en la secuencia de los tRNAs son las que participan en la formación de estos puentes de hidrógeno lo que explica su conservación a lo largo de la evolución así como el hecho de que todos los tRNAs tengan una estructura tridimensional muy parecida en forma de L. La figura 10 muestra la

estructura tridimensional general que adoptan los tRNAs con el anticodón en uno de los extremos de la molécula y el brazo aceptor en el extremo opuesto.

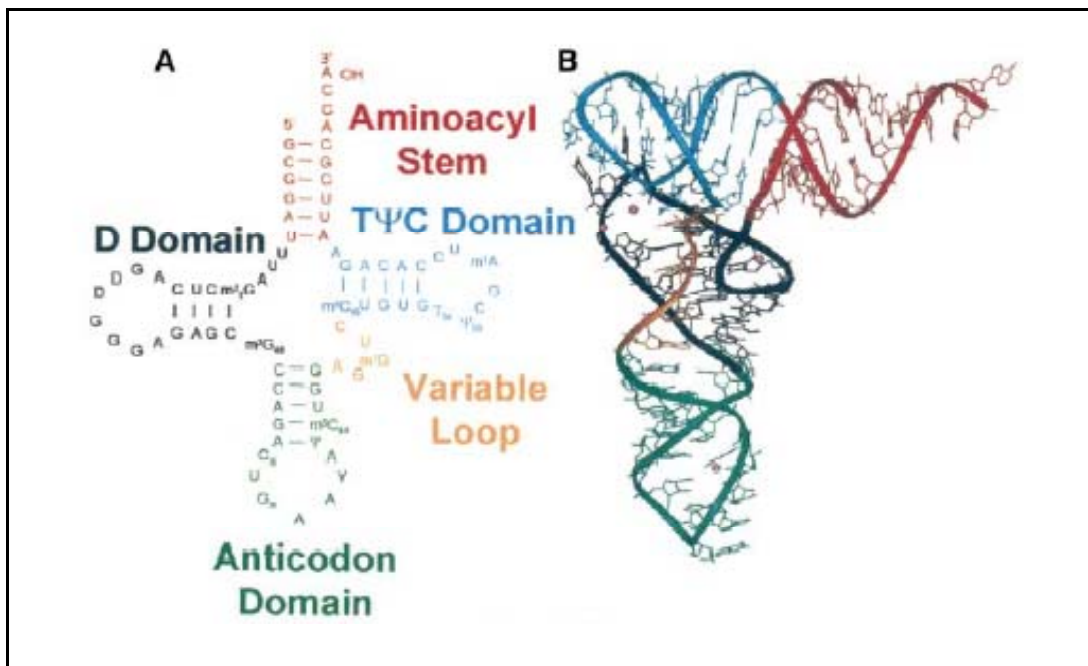


Figura 10 : Estructura secundaria (A) y terciaria (B) del tRNA (tomado de *Nucleic Acids Research*, 2002, 30 No.21).

Por lo tanto, se puede afirmar que todos los tRNAs presentan una secuencia y una estructura parecidas a nivel general, pero con particularidades muy importantes que permiten el reconocimiento, la interacción y la unión específica entre la molécula de tRNA y las otras moléculas como el mRNA, el ribosoma (tanto el rRNA como las proteínas ribosomales), la aminoacil-tRNA sintetasa y otras enzimas que participan indirectamente en la maquinaria de traducción como las enzimas modificadoras de los nucleótidos.

Se puede concluir que la estructura terciaria junto con la presencia de modificaciones en los nucleótidos son los factores responsables de la especificidad de los tRNAs.

2.3. Reconocimiento codón-anticodón:

La función de los tRNAs es servir de molécula adaptadora entre la secuencia de nucleótidos del mRNA y los aminoácidos que configuran la secuencia proteica. Para ello el código genético define la traducción entre los codones de RNA y los aminoácidos correspondientes:

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

Figura 11: Código genético. En azul las casillas pertenecientes a las cajas únicas ("family boxes") donde únicamente las dos primeras posiciones del codón son suficiente para identificar el aminoácido, en amarillo las casillas pertenecientes a las cajas mixtas ("split boxes") en las cuales, la especificidad del aminoácido viene definida por la presencia de una base púrica o pirimidínica en la tercera posición del codón y en rosa las casillas de codones únicos donde se requieren las tres bases del codón para determinar el aminoácido.

Según este modelo, el código genético está degenerado ya que existen 64 combinaciones de codones diferentes para traducirse a 21 aminoácidos (más los codones de parada) lo que implica que la mayoría de aminoácidos son codificados por varios codones. En algunos casos existen varios codones para un único aminoácido los cuales sólo se diferencian en la última base, por lo que únicamente se requieren las dos primeras posiciones del codón para definir el aminoácido, este grupo de codones conforman las **cajas únicas** ("family boxes", en azul en la figura 11) y codifican 8 aminoácidos. Existen otro grupo de codones incluidos en las llamadas **cajas mixtas** ("split boxes", en amarillo en la figura 11) donde la especificidad del aminoácido viene definida por la presencia de una base púrica (C o U) o pirimidínica (A o G) en la tercera base del codón, 12 aminoácidos son reconocidos por este tipo de codones, aunque 2 de ellos también poseen una caja única para su traducción (Leu y Arg). Por último, existen 2 cajas (en rosa en la figura) donde existen codones únicos, en los cuales un solo codón define un único aminoácido o la terminación.

Basándose en la degeneración del código genético, Crick propuso la **Hipótesis del "Wobble" o Tambaleo** (Crick, 1966), donde propone que durante el apareamiento codón-anticodón únicamente las dos primeras posiciones mantienen una unión del tipo Watson-Crick : A-U y C-G, mientras que la tercera posición del codón (correspondiente a la posición 34 o "wobble" del anticodón) puede ser estrictamente no complementaria. De esta manera se pueden producir apareamientos no definidos por el código genético donde un U en la primera posición del anticodón puede unirse a una A o G en la tercera

base del codón, de la misma forma una G puede unirse, no sólo a una C, sino también a un U. Así, los siguientes apareamientos serían posibles según la hipótesis del tambaleo (únicamente para la 3ª posición del codón):

1ª base anticodón (tRNA)	3ª base codón (mRNA)	Unión Watson-Crick	Unión "wobble"
U	A o G	U-A	U-G
C	G	C-G	
A	U	A-U	
G	C o U	G-C	G-U

Tabla 2: Ampliación de los apareamientos posibles entre la posición de tambaleo del tRNA y la tercera base del codón según la Hipótesis del Tambaleo.

La principal consecuencia de esta hipótesis es la posibilidad de reducir el número de tRNAs necesarios para codificar los aminoácidos, ya que por ejemplo, un único tRNA^{His} con el anticodón GUG puede reconocer igualmente el codón CAC y el CAU ya que la G en la posición "wobble" del anticodón reconoce codones terminados en C o U. Esto también implica que aquellos codones terminados en A ya no pueden ser codones únicos ya que serán reconocidos por un tRNA con anticodón empezado por U, el cual a su vez puede reconocer otros codones terminados en G, por lo tanto, sólo pueden haber codones únicos cuando la 3ª base sea G o U y estos codifiquen aminoácidos del tipo cajas únicas, en la práctica, estos codones son los terminados en G: UGG (Trp) y AUG (Met).

Pero datos experimentales posteriores han obligado a corregir y ampliar las reglas de Crick para el reconocimiento de los codones. En primer lugar se ha demostrado teórica y experimentalmente (Lim and Curran, 2001) que son posibles más emparejamientos entre las bases que los inicialmente descritos por Crick (recordamos que estos apareamientos se refieren únicamente para la interacción entre la base 34 del anticodón y la tercera base del codón); de hecho, él mismo estableció que los apareamientos U-U y U-C también debían ser estables pero los omitió porque eso hubiera significado errores en la traducción y la no discriminación de los codones de las cajas mixtas. Las nuevas posibilidades de apareamiento sugeridas por Lim y Curran son las siguientes:

1ª base anticodón (base 34 o de tambaleo)	3ª base codón	Unión Watson-Crick	Unión "wobble"
U	A, G, U, C	U-A	U-C / U-U / U-A
C	G	C-G	
A	A < G < C < U	A-U	A-A / A-G / A-C
G	C, U	G-C	G-U

Tabla 3: Ampliación de los apareamientos posibles entre la posición de tambaleo del tRNA y la tercera base del codón según Lim y Curran (2001).

Estas nuevas interacciones entre bases implican que el código genético no es capaz de desarrollar correctamente la descodificación de los codones ya que un tRNA con un anticodón con un U en la posición 34 podría reconocer codones terminados en C, G, A o U. Si se tratara de un codón perteneciente a una caja única este hecho no sería relevante, sin embargo, si se tratara de una caja mixta no podría llegarse a discernir entre los dos aminoácidos diferenciados por la tercera base del codón.

Experimentalmente se ha demostrado que la U₃₄ no modificada puede reconocer las 4 bases A, U, C, G (Andachi *et al.*, 1989; Heckman *et al.*, 1980; Osawa *et al.*, 1992) y de hecho se ha llegado a describir *in vivo* anticodones con U₃₄ en mitocondrias y *Mycoplasma* que son capaces de leer los 4 codones de una misma caja única/family box (Sprinz, 1996), pero por lo general este modelo no es suficiente para asegurar la fidelidad de la traducción y otros factores deben intervenir.

Por todo esto, el factor determinante a tener en cuenta en el reconocimiento codón-anticodón es la presencia de modificaciones en la posición 34 del tRNA ("wobble position" o posición de tambaleo) que permite restringir el "wobble" en esta posición y por tanto limita la unión de la U₃₄ a A y G pero no a C y U, permitiendo así la correcta descodificación de los codones pertenecientes a las cajas mixtas.

2.4. Modificación química de los tRNAs:

Como ya se ha comentado anteriormente el proceso de traducción depende de la correcta interacción entre las diversas moléculas que realizan este proceso: el aminoacil-tRNA, el mRNA molde, los sitios A y P del ribosoma (que incluyen los rRNAs y proteínas ribosomales) y otros tRNAs entrantes. Todas estas interacciones se realizan a través del reconocimiento entre nucleótidos y aminoácidos, con interacciones de tipo RNA-RNA y RNA-proteína; la presencia de modificaciones post-transcripcionales en el RNA es fundamental para el correcto reconocimiento y estabilidad en la interacción entre las

moléculas que participan.

Las modificaciones en los tRNAs pueden influir directamente en el proceso de reconocimiento codón-anticodón porque restringen el fenómeno de tambaleo como ya se ha comentado en el apartado anterior. Pero también pueden ejercer su función a través de fenómenos como la disminución de la **hiperexactitud**.

La hiperexactitud es un fenómeno que consiste en la lectura hiperexacta de codones stop internos en la secuencia de un gen. En ciertos genes de *E. Coli* se ha descrito la presencia de codones de stop en el interior de la secuencia del gen (Gao *et al.*, 1995), la presencia de modificaciones en el tRNA (como por ejemplo mnm⁵U₃₄ introducida por MnmE) permite que en ocasiones la maquinaria de traducción pueda leer a través de este codón y la síntesis proteica no se detenga en el codón de stop (Elseviers *et al.*, 1984). La ausencia de la modificación en la posición de tambaleo del tRNA produce la lectura exacta del codón de stop, la detención de la síntesis y por tanto la truncación de la proteína. Aunque este fenómeno se ha estudiado como estrategia para desarrollar métodos de detección indirecta de modificación de tRNAs empleando cepas portadoras de mutaciones de stop en genes marcadores (ver apartado 6 de Resultados), no se descarta que *in vivo* sea un mecanismo empleado por la célula para la regulación traduccional de ciertos genes.

Además, las modificaciones en los tRNAs pueden también realizar su función sin intervenir directamente en el reconocimiento del codón-anticodón. Algunas de las modificaciones presentes en los tRNAs influyen en el proceso de traducción porque los grupos químicos de las modificaciones interactúan directamente con otros grupos químicos de moléculas que participan en el proceso de traducción como pueden ser las bases de las moléculas del rRNA o aminoácidos de las proteínas ribosomales u otras implicadas en este mecanismo. Así, la ausencia de una modificación concreta puede producir la ausencia de una interacción RNA-RNA o RNA-proteína que puede desestabilizar la interacción tRNA/mRNA/rRNA/proteínas y afectar a la descodificación del mensaje genético.

Evidentemente, el brazo anticodón es donde más modificaciones se acumulan porque es la zona más importante de la molécula y la que sitúa el anticodón sobre el codón, por lo tanto, cualquier modificación que afecte a la zona puede afectar también al reconocimiento y a las interacciones en el sitio de descodificación del ribosoma. A continuación se presentan un resumen de las modificaciones y su función dependiendo de su localización en la molécula de tRNA:

2.4.1. Modificación de la posición 34 del tRNA:

La posición 34 del tRNA es la primera base del anticodón (correspondiente a la tercera del codón) y es la única posición para la cual se permite un apareamiento "wobble" o diferente a los clásicos apareamientos Watson-Crick.

Esta posición está altamente modificada en casi todos los tRNAs ya que este fenómeno es esencial para el correcto mantenimiento del código genético.

Las modificaciones en la posición 34 pueden ser variadas dependiendo de la base, el codón y del organismo al que pertenece. Estas modificaciones pueden localizarse en la base del nucleótido por ejemplo mnm⁵ (grupo metilaminometil) en la posición 5 del anillo de algunas bases púricas o también se pueden localizar en la propia ribosa U_m (grupo metilo) en la posición 2-OH.

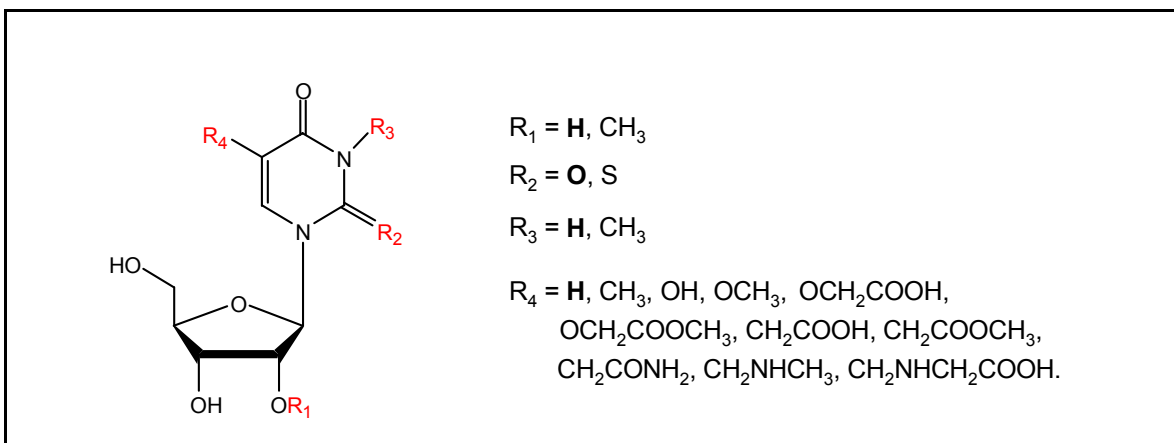


Figura 12: Modificaciones descritas en la U₃₄. A la derecha se indican los grupos que pueden introducirse mediante las modificaciones químicas y en **negrita** el grupo inicial de cada posición sin modificar.

Los mecanismos por los cuales estos grupos químicos afectan al proceso de descodificación son diversos, algunas de estas modificaciones alteran el patrón de los puentes de hidrógeno donadores y aceptores y, por lo tanto, afectan directamente al reconocimiento y unión de las bases, otras modificaciones afectan al proceso de descodificación del mensaje genético al alterar la conformación estructural del loop anticodón.

Cuando en la posición 34 se encuentra una uridina éste casi en la totalidad de los casos estudiados se encuentra modificada ya que este es el mecanismo diseñado por la célula para restringir el "wobbling" y mantener el código genético.

Como habíamos dicho anteriormente, cuando la U₃₄ no se encuentra modificado es capaz de reconocer las 4 bases A, C, G y U. La presencia de modificaciones químicas en esta posición limitan el fenómeno de “wobbling” y permiten únicamente el reconocimiento de los codones terminados en A y G, promoviendo así la correcta traducción de los codones de las cajas mixtas.

Los tipos y funciones de las modificaciones en la uridina de la posición 34 son variadas, las más comunes y presentes en *E. coli* son las siguientes:

Modificación U ₃₄	DESCRIPCIÓN	referencia
S ² U	Introducción de un grupo tiol en la posición 2 de la base. La consecuencia es restringir el movimiento del nucleósido impidiendo la unión con bases C y U y limitando la lectura a codones terminados en A y G. Ashraf propone que este átomo de azufre altera la conformación y estructura del anticodón mejorando la estabilidad del dúplex de RNA formado entre el codón y el anticodón y favoreciendo así la eficacia del proceso.	Lim 1994; Hagervall <i>et al.</i> , 1987; Yokoyama <i>et al.</i> , 1985; Kambampati and Lauhon, 2003; Nilsson <i>et al.</i> , 2002.
U _m	Introducción de un grupo metilo en la ribosa de la uridina sustituyendo al grupo 2'-OH. La función atribuida a esta modificación es la misma que para S ² U (Lim, 1994) ya que ambas posiciones se encuentran próximas en la estructura del nucleótido y tendrían el mismo efecto restringiendo la lectura de las bases pirimidínicas.	(Lim, 1994)
xm ⁵ U	Incluyen modificaciones del tipo mnm⁵U (presente en <i>E. coli</i> y en cuya ruta enzimática participa MnmE), mcm⁵U y cmcm⁵U . El efecto de estas modificaciones es también la restricción del fenómeno del “wobble”, o lo que es lo mismo, inhibe la unión de codones terminados en U o C. Algunos autores como Yokoyama proponen que el grupo mnm⁵U₃₄ puede interactuar con el grupo 2'-OH de la U ₃₃ (posición conservada en todos los tRNAs) y esta unión estabiliza la estructura del giro U y del loop anticodón favoreciendo en general la descodificación. Estos mismos autores sugieren que estos tipos de modificaciones pueden tener un efecto aditivo y el resultado es que un nucleósido hipermodificado que tiene restringida la unión a las pirimidinas.	Bregeon <i>et al.</i> , 2001; Cabedo <i>et al.</i> , 1999; Hagervall <i>et al.</i> , 1987; Urbonavicius <i>et al.</i> , 2001; Yim <i>et al.</i> , 2003; Yokoyama <i>et al.</i> , 1985

Tabla 4: Resumen de las modificaciones descritas en la posición U₃₄.

2.4.2. Modificaciones en otras posiciones del tRNA:

a) modificaciones en las posiciones 35 y 36 del tRNA:

Las posiciones 35 y 36 del tRNA, correspondientes a la segunda y tercera posición del anticodón, reconocen las dos primeras bases del codón, no suelen estar nunca

modificadas ya que estas dos bases se aparean al codón mediante uniones clásicas del tipo Watson-Crick y cualquier modificación podría desestabilizar esta interacción. Se ha demostrado que mutaciones en esta posición disminuyen drásticamente la eficacia del proceso de traducción (Yarus *et al.*, 1986).

Pero no sólo las modificaciones en la posición 34 del anticodón son importantes para la eficacia de la traducción, muchas otras modificaciones se localizan a lo largo del tRNA y especialmente en el brazo del anticodón. De todas estas otras modificaciones las más importantes para la viabilidad celular son las que se localizan en la posición 37, la primera base 3' del anticodón:

b) modificaciones en la posición 37:

Esta posición es una de las bases semiconservadas del tRNA, en la práctica totalidad de los tRNAs de todos los organismos es una base púrica (A o G) y se encuentra casi siempre modificada. La modificación de esta base aumenta el correcto reconocimiento mediante la estabilización de las interacciones Watson-Crick de las posiciones 36 y 35 del anticodón, esto evita errores de "miscoding" (introducir un aminoacil-tRNA incorrecto) y sobretodo de "frameshift" (desplazamiento de la pauta de lectura) que tiene como consecuencia la pérdida de la pauta de lectura y por tanto la casi segura truncación de la proteína (Bjork *et al.*, 1999; Bjork *et al.*, 1989; Urbonavicius *et al.*, 2001; Urbonavicius *et al.*, 2003; Yarian *et al.*, 2002).

Otros autores también sugieren que estas modificaciones en la posición 37 ayudan a localizar el anticodón, es decir, sirven de marca para señalar dónde se encuentra la tercera posición (36) del anticodón que debe ser reconocida y unirse a la primera del codón. Las modificaciones más comunes en la posición 37 son: $ms^2i^6A_{37}$, m^1G_{37} y t^6A_{37} .

c) Modificaciones en otras posiciones del tRNA:

Se han descrito otras muchas modificaciones a lo largo del tRNA, algunas son particulares de un tipo de tRNA y otras son comunes para muchos organismos como las Ψ_{38} , Ψ_{39} , Ψ_{40} y la posición 32 que casi siempre se encuentra modificada. Igualmente, más alejadas del anticodón existen otras modificaciones que deben tener un papel fundamental ya que se encuentran presentes en la gran mayoría de los tRNAs como son las localizadas en el brazo D (que debe su nombre a la presencia de bases D = dihidrouridina) y el brazo T Ψ C que también debe su nombre a la existencia de esta pseudouridina (Ψ) conservada en todos los tRNAs.

Aunque muchas de las funciones atribuidas a estas modificaciones todavía se desconocen, es evidente la importancia fundamental que juegan en el proceso de traducción y por tanto en la viabilidad de la célula.

2.5. Enzimas modificadoras:

Hasta la fecha más de 45 enzimas modificadoras de tRNA se han descrito en *E. coli*, implicados en la síntesis de los 31 nucleótidos modificados diferentes encontrados en las 46 especies de tRNAs existentes.

Algunas de las modificaciones son llevadas a cabo por un único enzima modificador, como es el caso de HisT (producto del gen *hisT*) que realiza la biosíntesis de la pseudouridina (Ψ) en la posiciones 38, 39 y 40 de los tRNAs. En otros casos las modificaciones son consecuencia de una compleja ruta enzimática donde intervienen varias enzimas como es el caso de la modificación $ms^2io^6A_{37}$ donde intervienen los productos de los genes *miaA*, *miaB* y *miaE* o el caso de la hipermodificación $mnm^5s^2U_{34}$ donde participan *mnmA*, *mnmE*, *gidA* y *mnmC*.

A continuación se presenta una tabla resumen con algunos de los enzimas modificadores de tRNAs descritos en *E. coli*:

Posición en tRNA	modificación	gen	referencia
34	mnm^5s^2U	<i>mnmA</i>	(Hagervall <i>et al.</i> , 1998; Kambampati and Lauhon, 2003)
		<i>mnmE (trmE)</i>	(Bregeon <i>et al.</i> , 2001; Cabedo <i>et al.</i> , 1999; Elseviers <i>et al.</i> , 1984; Hagervall <i>et al.</i> , 1998; Kambampati and Lauhon, 2003; Yim <i>et al.</i> , 2003)
		<i>gidA (trmF)</i>	(Bregeon <i>et al.</i> , 2001; Elseviers <i>et al.</i> , 1984)
		<i>mnmC</i>	(Hagervall <i>et al.</i> , 1987) (Marinus <i>et al.</i> , 1975)
34	cmo^5U	<i>aroA</i>	(Wosten <i>et al.</i> , 1996); (Mayes <i>et al.</i> , 1993)
		<i>aroB</i>	(Bereswill <i>et al.</i> , 1997)
		<i>aroC</i>	(Hagervall and Bjork, 1984)
		<i>aroD</i>	(Borg-Olivier <i>et al.</i> , 1987)
		<i>aroE</i>	(Anton and Coggins, 1988)
34	Q	<i>queA</i>	(Mueller and Slany, 1995)
37	m^1G	<i>trmD</i>	(Bjork <i>et al.</i> , 1989; Hagervall <i>et al.</i> , 1990)
37	ms^2i^6A	<i>miaA</i>	(Hagervall <i>et al.</i> , 1990) (Leung <i>et al.</i> , 1997; Urbonavicius <i>et al.</i> , 2001; Urbonavicius <i>et al.</i> , 2003)
		<i>miaB</i>	(Urbonavicius <i>et al.</i> , 2001; Urbonavicius <i>et al.</i> , 2003)
37	m^6t^6A	<i>mtaA</i> o <i>tsaA</i>	(Qian <i>et al.</i> , 1998)
38,39,40	Ψ	<i>hisT</i> o <i>truA</i>	(Urbonavicius, 2003; Urbonavicius <i>et al.</i> , 2001; Urbonavicius <i>et al.</i> , 2003)

Tabla 5: Tabla de algunos enzimas modificadores de los tRNAs de *E. coli*.

De entre todos estos enzimas modificadores nos centraremos en el producto del gen *mnmE* de *Escherichia coli*, ya que la proteína MnmE codificada por este gen es el objeto de estudio de esta tesis. A continuación se presenta un resumen de los datos bioquímicos y funcionales disponibles de la proteína.

3. MnmE:

3.1. Características generales:

MnmE es el producto del gen *mnmE*, localizado en el minuto 83 del cromosoma de *Escherichia coli* en el operón *rpmH*. Este operón es una agrupación génica formada por *rpmH*, *rnpA*, *yidC* y *mnmE* (Burland *et al.*, 1993), todos ellos genes implicados en la biosíntesis y translocación de proteínas.

La proteína MnmE está conservada a lo largo de la escala evolutiva y está presente desde procariotas a eucariotas, pero no se ha descrito en arqueas.

MnmE es una GTPasa de 50kDa implicada en la modificación de los tRNAs y presenta propiedades bioquímicas peculiares que la distinguen de las proteínas GTPasas clásicas como las Ras (Cabedo *et al.*, 1999). A diferencia de la mayoría de GTPasas tipo Ras las cuales son proteínas pequeñas con un único dominio correspondiente al dominio G y un tamaño aproximado de 20 kDa, MnmE es una proteína multidominio formada por un dominio G central de 165 aminoácidos (17 kDa) que presenta los motivos consenso de las GTPasas (G1 a G5) y dos dominios adyacentes, el dominio aminoterminal consta de aproximadamente 220 aminoácidos y está probablemente implicado en la autoasociación de la proteína y un dominio carboxiterminal pequeño de aproximadamente 75 aminoácidos donde se localiza el motivo C-I-G-K que incluye la única cisteína de la proteína, la cual podría estar relacionada con la asociación a membrana observada MnmE (Cabedo *et al.*, 1999) como ocurre en otras proteínas GTPasas que presentan un motivo CaaX (Bourne *et al.*, 1990).

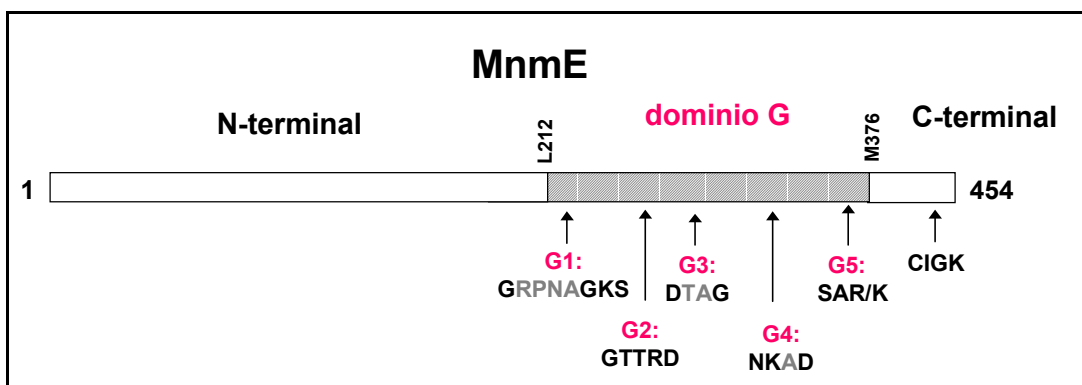


Figura 13: Organización en motivos de la proteína MnmE.

Las características bioquímicas especiales que presenta la proteína MnmE son:

-1. Capacidad de autoasociación: Los resultados obtenidos por gel filtración, entrecruzamiento *in vitro* e *in vivo* y ultracentrifugación analítica indican que la proteína es capaz de autoasociarse para formar dímeros y quizás estructuras mayores, aunque no debemos descartar que también se asocie a otras proteínas.

-2. Alta actividad GTPasa intrínseca: la proteína tiene una alta tasa de hidrólisis *in vitro* ($k_{cat} = 10.834 \text{ min}^{-1}$ y $k_m = 754 \text{ }\mu\text{M}$). A diferencia de la mayoría de las GTPasas y en especial de las pequeñas GTPasas reguladoras, la proteína MnmE es capaz de hidrolizar el GTP en sucesivos ciclos GTPasa con la ausencia de otras proteínas y/o efectores. Además el dominio G de la proteína aislado y purificado mantiene estas propiedades bioquímicas prácticamente intactas, por lo que deducimos que la estructura del dominio se mantiene y que no requiere de los dominios amino y carboxiterminal para el reconocimiento, la unión y la hidrólisis del nucleótido.

-3. Baja afinidad por GTP y GDP: la proteína MnmE presenta afinidades bajas por GTP ($K_d = 1.514 \text{ }\mu\text{M}$) y GDP ($k_d = 4.128 \text{ }\mu\text{M}$) lo que implica que *in vitro* no requiere de ningún factor tipo GEF para liberar el nucleótido unido y empezar un nuevo ciclo GTPasa.

Estas características bioquímicas peculiares diferencian a MnmE del resto de GTPasas clásicas y la acercan a la familia de las dinaminas las cuales también presentan capacidad de autoasociación, baja afinidad por nucleótido y alta actividad GTPasa intrínseca (van der Blik, 1999a). Sin embargo, la organización de MnmE en dominios difiere completamente de la clásica distribución en dinaminas; además, evolutivamente no pertenecen a la misma familia de GTPasas, por lo que descartamos que MnmE pertenezca a la familia de las dinaminas y proponemos que constituye una nueva familia de GTPasas evolutivamente conservadas y con propiedades bioquímicas inusuales.

3.2. Función de MnmE:

La proteína MnmE participa en la ruta de modificación de algunos tRNAs, en concreto modifica la posición U₃₄ de ciertos tRNAs (Lys, Glu, Gln y posiblemente también Leu y Arg). La modificación química introducida en esta base es un grupo metilaminometil en la posición 5 y un grupo tiol en la posición 2, obteniéndose la base hipermodificada s²mnm⁵U₃₄.

Se describió que mutantes *mnmE* son deficientes en la biosíntesis del nucleótido hipermodificado $s^2mnm^5U_{34}$ (Elseviers *et al.*, 1984; Kruger *et al.*, 1998; Kruger and Sorensen, 1998) por lo que propuso se la siguiente ruta enzimática de modificación:

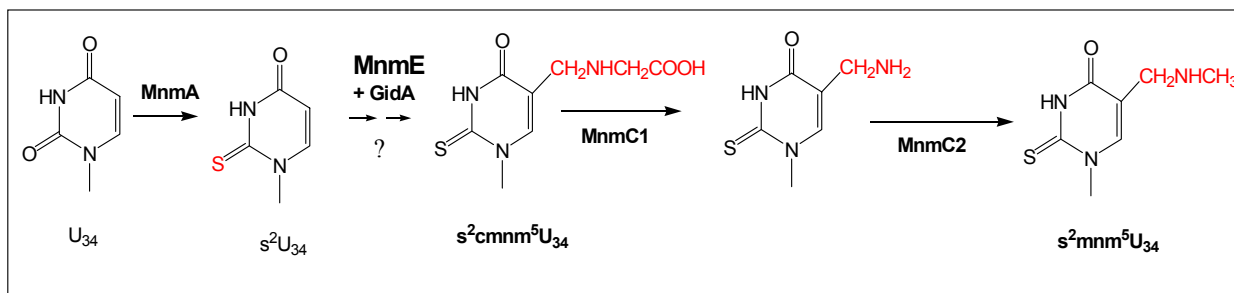


Figura 14: Ruta de hipermodificación de la posición U_{34} del tRNA donde interviene la proteína MnmE, junto con GidA, en la introducción del grupo carboximetilaminometil (cmnm) en la posición 5 de la uridina.

El producto del gen *mnmA* (antes *AsuE*) es la proteína MnmA, la cual introduce el grupo tiol en la posición 2 de la uridina 34. Esta primera reacción es anterior a la modificación en la posición 5 pero es totalmente independiente, ya que mutaciones en el gen *mnmA* conllevan a la aparición de tRNAs mnm^5U_{34} (Sullivan *et al.*, 1985), lo que indica que la segunda modificación puede ser llevada a cabo sin necesidad de que la modificación s^2U_{34} esté presente, lo que a su vez implica que MnmE no debe reconocer ni requerir el grupo tiol en esta posición.

El producto del gen *mnmE* es el responsable del primer paso de la modificación en la posición 5, pero se desconoce cuántos pasos preceden a la formación del grupo s^2cmnm^5 (Elseviers *et al.*, 1984; Hagervall *et al.*, 1987) así como la función exacta de la proteína MnmE en esta ruta enzimática.

El grupo de Brégeon propone que GidA y MnmE están implicados en la misma ruta enzimática y postulan que la modificación introducida por MnmE precede la acción de GidA (Brégeon *et al.*, 2001), aunque estos mismos autores sugieren que la proteína GidA puede estar implicada en otras rutas modificadoras de tRNAs o incluso en replicación del DNA (Ogawa and Okazaki, 1994).

Mutantes *mnmE* bloquean la ruta de modificación en la posición 5 y producen tRNAs que solamente presentan la modificación s^2U_{34} .

Se han descrito algunos enzimas implicados en la modificación de los tRNAs que utilizan el ATP como fuente de energía, pero hasta la fecha no hay ningún enzima modificador descrito con actividad GTPasa. Como más tarde se verá en los resultados de este trabajo, hemos visto que la hidrólisis del GTP es necesaria para la presencia de la

modificación, pero desconocemos si esta actividad GTPasa está directa o indirectamente implicada en la introducción del grupo cmnm^5 , así como tampoco, quién es el donador de este grupo.

La última proteína implicada en esta ruta enzimática es MnmC, la cual tiene dos actividades enzimáticas diferentes, la primera eliminar el grupo carboximetil y la segunda metilar la posición 5 para obtener el grupo metilaminometil definitivo. Se han aislado mutantes *mnmC* deficientes en cada una de las dos actividades enzimáticas: el mutante *mnmC1* contiene tRNAs con $\text{cmnm}^5\text{s}^2\text{U}_{34}$ (Marinus *et al.*, 1975) y el mutante *mnmC2* presenta tRNAs con la modificación $\text{nm}^5\text{s}^2\text{U}_{34}$ (Hagervall *et al.*, 1987).

3.3. Extremo carboxiterminal y motivo CIGK:

Las proteínas GTPasas pequeñas reguladoras presentan en su extremo carboxiterminal la secuencia consenso Caax, aunque en algunas familias puede presentarse con algunas variaciones como CCax, GGCC o xCxC (donde C es una cisteína, G una glicina, x cualquier aminoácido y a un residuo alifático) (Valencia *et al.*, 1991a). El motivo Caax se caracteriza por la presencia invariable de una cisteína la cual tiene como función anclar la proteína a membrana mediante modificaciones tipo farnesilaciones, carboximetilaciones y palmitosilaciones (Gutierrez *et al.*, 1989; Hancock *et al.*, 1989; Schafer *et al.*, 1989; Willumsen *et al.*, 1984).

Entre la proteína MnmE de *Escherichia coli* y el resto de proteínas homólogas existe una alta homología de secuencia en el extremo carboxiterminal, especialmente los últimos cuatro aminoácidos que presentan el motivo CIGK (el cual cumple los requisitos para ser un motivo Caax). Esta secuencia se presenta casi invariable a lo largo de todas las secuencias homólogas encontradas en procariotas y eucariotas, únicamente se observan variaciones en el segundo residuo I (isoleucina) que puede presentarse como L o V (leucina o valina) en algunos organismos.

Interesantemente, en MnmE de *E. coli* esta cisteína conservada en el extremo carboxiterminal (C451) es la única cisteína presente en toda la proteína por lo que es fácil sugerir que debe realizar alguna función destacable en la proteína. Un objetivo de este trabajo es dilucidar el posible papel de esta cisteína en las propiedades bioquímicas y funcionales de la proteína MnmE.

3. 4. Proteínas homólogas:

La proteína MnmE es una proteína conservada evolutivamente, hasta la fecha más de 91 proteínas homólogas a MnmE han sido encontradas en procariotas y eucariotas.

Se han caracterizado a nivel bioquímico y funcional los homólogos de MnmE de *Thermotoga maritima* (Yamanaka *et al.*, 2000), MSS1 homóloga en levadura (Colby *et al.*, 1998; Decoster *et al.*, 1993) y la proteína GTPBP3 homóloga en humanos y ratón (Li and Guan, 2002; Li and Guan, 2003).

Todos los homólogos de MnmE presentan una alta identidad de secuencia a lo largo de los dominios aminoterminal, carboxiterminal y en especial el dominio G donde los motivos G1-G3-G4 de unión e hidrólisis del GTP están perfectamente conservados, así como el dominio G2 con su secuencia GTTRD que caracteriza a esta familia de GTPasas.

Los homólogos encontrados en eucariotas están codificados por genes nucleares pero presentan en su extremo aminoterminal una secuencia señal característica de transporte a mitocondria; además, se ha visto que tanto MSS1 de levadura, como GTPBP3 de humanos y ratón, tienen una localización y función mitocondrial (Decoster *et al.*, 1993; Li and Guan, 2002; Li and Guan, 2003). Estos datos, junto a la ausencia de un homólogo en arqueas, apoyan la hipótesis de que la proteína en eucariotas tiene un origen bacteriano, y que probablemente, el gen *mnmE* eucariota debe haber evolucionado a partir de un gen presente en un progenitor mitocondrial. Por tanto, la proteína MnmE pertenece al grupo de GTPasas conservadas evolutivamente que están presentes en procariotas y eucariotas pero no en arquea y cuyos homólogos eucariotas, a pesar de tener localización nuclear, tienen funciones mitocondriales o cloroplásticas por lo que se supone que fueron adquiridos por migración desde los orgánulos al núcleo (Caldon and March, 2003).

	1	15	16	30	31	45	46	60	61	75	76	90
TRME_ECOL	-----	-----	-----	-----	--MSDNDTIVAQA	TP	P-GRGGVILIRISGF	KAREVAETVLG----	-----	---KLPKPRYADYL	49	
TRME_SAL	-----	-----	-----	-----	--MSHNDTIVAQA	TP	P-GRGGVILIRISGL	KARDVAQEVLG----	-----	---KLPKPRYADYL	49	
TRME_BACSU	-----	-----	-----	-----	---MDTTAAISTP	M	M-GEGAIAIVRLSGP	EAIQIADKIYKPKG	KTLSSVSPRLASVR	-----	47	
TRME_STR	-----	-----	-----	-----	---MITREDFTHA	ISTP	L-GEGAIGIVRLSGT	DSFALIAQKIFK--G	-----	---KDLNKKVASHTLYN	56	
TRME_THE	-----	-----	-----	-----	---MDTIVAVATP	P	P-GKGAIAILRLSGP	DSWKIVQKHLRTR--	-----	---SKIVPRKAIHGW	49	
TRME_CAU	-----	-----	-----	-----	---MTDTTFALATA	A	A-GRSAVAVVRSVSGP	RSSEIAAALCG----	-----	---RLPSFRPLASVR	47	
MSS1_SCH	-----	-----	---MR	ILNRVFLNTFQACFR	R	RVHQIPTIYALSTP	P-GTSAVAIVRISGP	NACKVAKTLAG----	-----	---SVPKPRIASLRT	69	
MSS1_YEAS	MNSASFQSRILSRS	FLVRRSLKRYSGLAK	PYTFTQOPTIYALSTP	ANQTSAAIIRISGT	HAKYIYNRLVDSS--	---	---TVPPIRKAILRN	85				
TRME_CYA	-----	-----	-----	---	MYKRDTTAAIATC	P	P-NGGGVSIILRLSGS	KSIDVVKTVSLVSS--	---	---SNQCVHSHCILYGW	54	
TRME_CAEL	-----	-----	-----	---	MSTIFALSSG	T	T-LPSAIAMFRVSGS	QSLPVLRLQRSRK--	---	---VWPKPTMKYTK	48	
H_SAPIENS	---	MWRGLWTLAAQA	ARGPRLCTRSSGA	PAPGSGATIFALSSG	Q	Q-GRCGIAVIRTSGP	ASGHALRILTAPR--	D----	---	---LPLARHASLRL	81	
MUS_MUS	---	MWRGLSALVTQA	AWAPLRLCARCSTSA	ESLVPSSITFALSSG	Q	Q-GRCAIAVIRTSGP	ASGLALRSLTALQ--	E----	---	---PPPARRACLRL	81	
	91	105	106	120	121	135	136	150	151	165	166	180
TRME_ECOL	PFKDA-----	---	DGSVLDQGIQALWFP	GNPSFTGEDVLELQ	HGGPVLDDLLLR--	---	---	---	---	---	---	---
TRME_SAL	PFKDV-----	---	DGSALDQGIQALWFP	GNPSFTGEDVLELQ	HGGPVLDDLLLR--	---	---	---	---	---	---	---
TRME_BACSU	IVDRP-----	---	SDRVVEVMVSVLGS	ADRFTTREGVIEINC	HGGVIVTLNQVLQ--	---	---	---	---	---	---	---
TRME_STR	IIDPL-----	---	TGKVMDEVMVGMAMK	SPKFTTREDIEEINT	HGGIAVTNEILQ--	---	---	---	---	---	---	---
TRME_THE	IHE-----	---	NGEDVDEVVVVFYK	SPKSYTGEDMVEVMC	HGGPLVVKLLD--	---	---	---	---	---	---	---
TRME_CAU	TLK-H-----	---	NGVALDALALVLRFE	KPASYTGEDSVEFHV	HGGRAVVEALLA--	---	---	---	---	---	---	---
MSS1_SCH	IKHPV-----	---	RSEVIDKALMLYFK	KPSSTFTGEDVVLEQL	HGGTAVVDVTLEAI-	---	---	---	---	---	---	---
MSS1_YEAS	IYSPSSCSVKPHDQK	ESKILLDTSLLLYFK	APYSFTGEDVLELHV	HGGKAVVNSILKAI	GLHDHRSSGKDIRFAL	---	---	---	---	---	---	---
TRME_CYA	IKDNE-----	---	DQSFVDEVLLLM	APRSYTAENVVEIHC	HASIVLANEILR--	---	---	---	---	---	---	---
TRME_CAEL	LYDSE-----	---	SKIIDEAMAVYLP	GPKFTTGEDTAEFFL	HGSQAVAVKFAS--	---	---	---	---	---	---	---
H_SAPIENS	LSDFP-----	---	SPEPLDRALVWF	GQSFTEGDCVFEHV	HGGPAVVSGVLQA--	---	---	---	---	---	---	---
MUS_MUS	LRHPC-----	---	SPEPLDRSLVWF	GQSFTEGDCVFEHV	HGGPAVVSGVLQA--	---	---	---	---	---	---	---
	181	195	196	210	211	225	226	240	241	255	256	270
TRME_ECOL	LAQAEAIADLIDASS	EQAARSALNSLQGAF	SARVNLHVEALTHLR	IYVEAAIDFPD-E--	---	---	---	---	---	---	---	---
TRME_SAL	LAQAEAIADLIDASS	EQAARSALNSLQGAF	SARVNLHVEALTHLR	IYVEAAIDFPD-E--	---	---	---	---	---	---	---	---
TRME_BACSU	LSQAEAVMDLIRAKT	DRAMNVAMNQMEGR	SALVRLRLSEILETL	AHVEVNIIDYPEYD--	---	---	---	---	---	---	---	---
TRME_STR	LTQAEAVMDIIRAKT	DKAMNIAVKQLDGLSL	SDLINNTREQIILN	AQVEVNIIDYPEYD--	---	---	---	---	---	---	---	---
TRME_THE	LTSAEAVRDLEIAKS	ETSLKLSLRNKGGL	RDFVDSLRLRELIEVL	AERVELVDYD----	---	---	---	---	---	---	---	---
TRME_CAU	LAQAEVADLIDAET	EAQRRLQALQVGGAL	SQRYDRWRDQVLAAL	AMLEAAVDFPD-E--	---	---	---	---	---	---	---	---
MSS1_SCH	LTQLEGLIDVINAQT	AEQLYSANKAHSI	YDICFRWRKLEIEYR	AFLEASIDFSEEH--	---	---	---	---	---	---	---	---
MSS1_YEAS	LTQLEGLIDVINAQT	ESQRRLQALQVGGAL	SQRYDRWRDQVLAAL	AMLEAAVDFPD-E--	---	---	---	---	---	---	---	---
TRME_CYA	LSQVESVLKVIHSKT	IASAKLAANTLRRRG	SEIRIRLKHHTLSLL	ADLEFFHDFDSEFTD	---	---	---	---	---	---	---	---
TRME_CAEL	ISEVRGIDRLIKSR	EKERNAAFQMRGG--	YDAIEIRKLIQIL	SKLFSVVIDFGEHVN-	---	---	---	---	---	---	---	---
H_SAPIENS	LTEVEGLADLHAET	EAQRRLQALQVGGAL	GHLRCRQWBTTLTKAL	AHVEAYIDFGEDD--	---	---	---	---	---	---	---	---
MUS_MUS	LTEVEGLADLIRAET	EAQRRLQALQVGGAL	SQLCQGWAKTLTKAL	AYVEAYIDFGEDD--	---	---	---	---	---	---	---	---
	271	285	286	300	301	315	316	330	331	345	346	360
TRME_ECOL	RQGSLLREGMKVVIA	GRPNAGKSSLLNALA	GREAAIVTDIAGTTR	DVLRREHIIHIDGMPLH	IIDTAGLR--	EASDE	VERIGIERAWQIEQ	295				
TRME_SAL	RQGSLLREGMKVVIA	GRPNAGKSSLLNALA	GREAAIVTDIAGTTR	DVLRREHIIHIDGMPLH	IIDTAGLR--	DASSE	VERIGIERAWQIEQ	295				
TRME_BACSU	EQGIKILREGLSTVII	GRPNVKGSSLLNLSLV	HEAKAIVTDIPGTR	DVIEEYVNVGRVPLR	LVDTAGIR--	ETEDI	VERIGVERSQVLEKE	300				
TRME_STR	RRGKILREGLSTVII	GRPNVKGSSLLNLSLV	HEAKAIVTDIPGTR	DVIEEYVNVGRVPLR	LVDTAGIR--	ETEDI	VERIGVERSQVLEKE	300				
TRME_THE	DAGILLNRGRMIV	GKPNVKGSTLLNRL	NEDRAIVTDIPGTR	DVLEAVVIRGILFR	LVDTAGVRS--	ETNDL	VERLGTLETQVLEIEK	302				
TRME_CAU	SRGRVRDRGFRIALI	GAPNAGKSTLLNGLA	ERDAAIVTDVAGTTR	DVIEVPLVLGGYKVL	VADTAGIR--	ETADV	IEAEGVRRAKAWAEA	291				
MSS1_SCH	KCKEVLKRGINVAII	GPSNAGKSSLLNLSLV	NRRISIVSPQSGTTR	DAIEVLDVINDGFPV	LSDTAGLRKGDVQV	---	IEKIGIEIAKARAE	320				
MSS1_YEAS	EKSTILQNGIKLVL	GAPNVKGSSLVNLS	NDDISIVSDIPGTR	DSIDAMVINGVYKI	ICDTAGIRE--	KSSDK	IEMLGIDRAKKSQV	354				
TRME_CYA	NKVSKLNEGKVICI	GKPNVKGSSLLNLSLV	KRECSIVTFNPPGTR	DIVSFETMLGNLTV	LYDTAGIR--	QSVDE	IEKIGISKTELPVDE	300				
TRME_CAEL	DGAERAQRGLDIVY	GRPNAGKSSLLNLSLV	HDDVAIVSSIPGTR	DSLETIIQINGVRCR	LTDTAGVR--	QKTNDV	IEAEGIRRAQRKIQS	290				
H_SAPIENS	RGRQLRSGVHVVV	GPPNAGKSSLVNLS	GPPNAGKSSLVNLS	DVLETPVDLAGFPVL	LSDTAGLR--	EGVGA	VEQEGVRRARERLEQ	328				
MUS_MUS	RRGQLRSGANVVV	GPPNAGKSSLVNLS	QKPVSIIVSPPGTR	DVLETPVDLAGFPVL	LSDTAGLR--	EGVGA	VEQEGVRRARERLEQ	328				
	361	375	376	390	391	405	406	420	421	435	436	450
TRME_ECOL	ADRVLFMVDGTTTTDA	VDPAEIWPFIARLP	AKLP-----	ITVVR	NKADITGETLGMSS	-----	EVNGHA	LIRLSARTGEGVDVL	368			
TRME_SAL	ADRVLFMVDGTTTTDA	VDPADIWPDFIARLP	KNLP-----	ITVVR	NKADITGETLGMSS	-----	EVNGHS	LVRLSARTGEGVDVL	368			
TRME_BACSU	ADLILLVLN----	Y	SEELSEEDVCLFEAV	EGMD-----	VIVIL	NKTDLEPKIDTERV-	---	---	---	---	---	
TRME_STR	ADLILLVLN----	A	SEPLTAQDRQLLEIS	QETN-----	RIILL	NKTDLPETIETS--	---	---	---	---	---	
TRME_THE	ADIVLFVLD-----	A	SSPLDEEDRKILERI	KNKR-----	YLVI	NKVDVVEKINEEIE-	---	---	---	---	---	
TRME_CAU	ADLRLLWVDD----	F	HVKQADAR----	PEA	IRVG-----	DWLIL	NKTDIADADASAHV-	---	---	---	---	
MSS1_SCH	SQTLFPVFPINYNHS	SESLKQSELETIKD	CLRQR----	KPIHPLI	NKVDVSDYITMFKP	---	---	---	---	---	---	
MSS1_YEAS	SDLCLFIVDPDLSK	LLPEDILAHLSKTF	GNKR-----	IIIV	NKSDLVSDDEMKTVL	N---	---	---	---	---	---	
TRME_CYA	CQIVFVFLD-----	A	IQGLSSEDSVIFNK	NLMNKN----	VVILI	NKIDKVKQRKIDEIY	ET-----	---	---	---	---	
TRME_CAEL	ADICVVDPPQFTSD	DDVESILNDEVVMRN	REAR-----	VIIAK	NKSDLSLKYPKLP--	---	---	---	---	---	---	
H_SAPIENS	ADLILAMDASDLAS	PSSCNFLATVVASV	AQSPSSSSQRLLLV	NKSDLTLSPGPGP--	---	---	---	---	---	---	---	
MUS_MUS	ADLILGLVLDASDLAS	SSSCFLDTVVTPLL	AQSQDSSGQQLLLV	NKSDLTLSPANAPAC	-----	---	---	---	---	---	---	
RN--	HLKQSMG---	FDTNMEGGFLARRRH	LQALEQAEEHLEQK	A--	QLLGAWAGELLA	EELRLAQQLNSEITG	EFT--	SDDLGRIFSS	FCIGK	454		
RN--	HLKQSMG---	FDTNMEGGFLARRRH	LQALEQAEEHLEQK	A--	QLLGAWAGELLA	EELRLAQQLNSEITG	EFT--	SDDLGRIFSS	FCIGK	454		
EEAIQSLFYT-G--	---	AIESGDLTYVSNTRH	ITILQAKRAIEDAL	S--	GIEQVDPIDMVQ	IDLTRCWEELGELI	DSV--	HESLIDQLFSQ	FCLGK	459		
EERINNLFENA---	---	GLVEQDATYLSNARH	ISLEKAVESLQAVN	Q--	GLELGMVDLVLQ	VDLTRTWEILGETG	DAA--	PELITQLFSQ	FCLGK	457		
EES--	IYRETQE---	IFERGSLSLITNLRL	QQLLENVKGHLEDAI	K--	SLKEGMPVDMAS	IDLERALNLLDEV	RSF--	REDLITDFISN	FVCGK	450		
RAALASHVAD----	---	ALSGAEFFPAATRLRH	AERLSEARSYLER--	A--	LSDDVLEVELEAA	EDVRLAARALERIS	RID--	PENLVGRVFST	FCIGK	446		
LQALSTFECMNVPL	TNKKIQANLWNERQ	RQCLSSCSSHLS--	L--	ALQKSSDIVVAA	EEVKLATEIDIGRV	AVD--	MNVFVSIFSK	FVCGK	496			
ISTLTSNFEELSQ--	---	SSADASPVIIVSKRVS	EILKNDVLYGLEEFF	K--	SKDFHNDIVLAT	ENLRYASDGIKITG	QAIGIEEILDSVFSK	FCIGK	526			
NQCILDLSSK----	---	EDFDLPHVFSVNCYK	LEILNINIYLIDLELY	TGSLNKSVTSDYDIA	VELRRVLQQLNQITG	DEVVENVLDAIFSK	FVCGK	465				
QQNCLGIEIVDDLC	---	EASYLLD	ADLLRCSFELES--	---	AVTNCDAIMC	SHLEVALEQIGELTE	GIV--	TESVLDGIFSK	FCIGK	439		
LEALRKELAAVC---	---	GDPSTDPPLLTRARH	QHHLQGCCLDALG	---	HYKQSKDLALAA	EALRVARGHLTRITG	GGG--	TEEIILDIIFQD	FVCGK	492		
LQALKTELAAVC---	---	GDPSTGPPLLTRVHR	QHHLQGCCLDALG	---	HYQATLDLALAA	EALRQARRQLNHITG	GGG--	TEEIILDIIFQD	FVCGK	492		

Figura 15: Alineamiento de MnmE de *E. coli* y sus proteínas homólogas en *S. typhimurium*, *B. subtilis*, *S. pneumoniae*, *T. maritima*, *C. crescentus*, *S. pombe*, *S. cerevisiae*, *C. caldarium*, *C. elegans*, *H. sapiens* y *M. musculus*. En rojo se indican los motivos característicos de las GTPasas G1, G2, G3, G4, G5 y el motivo carboxiterminal.

3. 5. Viabilidad de los mutantes *mnmE*: letalidad sintética.

En los resultados presentados por nuestro grupo (Cabedo *et al.*, 1999), se obtuvieron varios mutantes nulos del gen *mnmE* mediante la inserción del gen de resistencia a kanamicina en la secuencia del gen. El resultado son proteínas truncadas no funcionales que son degradadas por la célula.

Curiosamente, estas mutaciones nulas en *mnmE* son letales dependiendo del fondo genético, es decir, la misma mutación que produce la interrupción del gen *mnmE* que sintetiza la proteína, es letal en determinadas estirpes de *E. coli* pero no en otras. Los resultados del trabajo permitieron concluir que la proteína MnmE es esencial en el fondo genético JC7623 y V5701 pero no en el fondo de las cepas MC1000 y DEV16.

Para intentar explicar estos resultados, analizamos los datos disponibles de la proteína homóloga de MnmE en levadura, denominada MSS1. Ésta es una proteína mitocondrial codificada por un gen nuclear (Decoster *et al.*, 1993) y curiosamente, en levadura se ha observado que la combinación de mutaciones en el gen *MSS1*, homólogo de *mnmE*, con una mutación del RNA de mitorribosomas que confiere resistencia a la paramomicina (la mutación afecta al apareamiento entre las bases 1477 y 1583 del rRNA 15S) hace a las células deficientes en la respiración, mientras que cada una de las mutaciones por separado no tiene efecto en el fenotipo. Aunque las bases de este efecto sinérgico se desconocen, se ha propuesto que tal combinación de mutaciones debe afectar la síntesis de proteínas mitocondriales (Decoster *et al.*, 1993). La mutación en el rRNA se da precisamente en una zona con la que el tRNA interactúa directamente en el proceso de descodificación.

Todos estos resultados nos llevan a proponer que la letalidad que hemos observado en ciertas cepas de *E. coli* portadoras de mutaciones *mnmE* sería debida a un efecto sinérgico, al combinarse mutaciones en *mnmE* con mutaciones en genes que también intervienen en el proceso de descodificación del mensaje genético.

Parte del objetivo de esta tesis es establecer la relación entre mutaciones puntuales en el gen *mnmE* (las cuales afectan de diferente forma a la actividad GTPasa y la funcionalidad de la proteína) con el proceso de letalidad sintética.

OBJETIVOS

Objetivos:

1. Caracterizar las propiedades bioquímicas generales de la proteína MnmE de *Escherichia coli* y su dominio G.
2. Identificar y estudiar los motivos que caracterizan a las GTPasas (G1, G3, G4 y G5) de la proteína MnmE de *Escherichia coli* a nivel bioquímico: afinidad y especificidad por nucleótidos y actividad GTPasa.
3. Caracterizar el motivo G2 de la proteína MnmE y determinar su papel en la función de esta proteína.
4. Estudiar la función de la única cisteína presente en la proteína MnmE y su relación con la actividad GTPasa, localización subcelular, capacidad de autoasociación y función modificadora de los tRNAs de la proteína.
5. Caracterizar bioquímica y funcionalmente las argininas conservadas del dominio G para dilucidar la presencia de un posible mecanismo de dedo de arginina responsable de la alta actividad GTPasa intrínseca de la proteína MnmE.
6. Estudiar la relación entre la actividad GTPasa de la proteína MnmE, su función modificadora de los tRNAs y la viabilidad celular.
7. Estudio de la interacción entre la proteína MnmE y el tRNA.

RESULTADOS

1. Características bioquímicas generales de MnmE y de su dominio G.

Previamente al trabajo que presento, disponíamos de datos obtenidos en nuestro laboratorio, sobre las características bioquímicas generales de la proteína MnmE y su dominio G (Cabedo *et al.*, 1999) . En este apartado profundizamos en el estudio de estas propiedades especialmente en relación a la unión del nucleótido, la actividad GTPasa y la capacidad de autoasociación.

1.1 Unión del nucleótido:

Se estudiaron las propiedades de la unión de los nucleótidos a la proteína MnmE y el dominio G mediante diferentes aproximaciones.

La primera de ellas fue mediante ensayos de unión en filtro; esta técnica tiene bastantes limitaciones y aunque es útil para obtener valores comparativos entre diversas proteínas en las mismas condiciones, los valores de k_d obtenidos pueden no ser reales y estar influenciados por las limitaciones intrínsecas de la técnica, especialmente cuando la proteína presenta baja afinidad por nucleótido como es nuestro caso.

Por ello, decidimos usar otra estrategia alternativa para confirmar los resultados obtenidos. Esta estrategia se basa en la proteólisis limitada de la proteína con quimiotripsina, que permite, indirectamente, valorar la unión del nucleótido y del cambio conformacional asociado. Como veremos, esta técnica confirmó los datos obtenidos mediante los ensayos de unión en filtro.

Finalmente, usamos técnicas de espectrofluorescencia para medir la afinidad de la proteína y todos sus mutantes por los nucleótidos. Mediante esta técnica se mide la fluorescencia emitida por un análogo del nucleótido marcado con un grupo fluorescente la cual varía como consecuencia de la unión entre la proteína y el nucleótido. Esta técnica nos permitió obtener valores de las constantes de afinidad para el GTP y el GDP más precisas y reales.

1.1.1. Ensayos de unión en filtro:

Realizamos los ensayos de unión en filtro poniendo en contacto una concentración fija de la proteína MnmE (0.25 mg/ml = 4.7 μ M) con concentraciones crecientes de ^{35}S - γ -GTP (análogo no hidrolizable y radioactivo del GTP) en el tampón de reacción GTPasa. Tras una incubación de 30 minutos a 30° C, cargamos la muestra sobre un filtro de nitrocelulosa y lavamos tres veces con el tampón de la reacción frío para eliminar los restos de nucleótido no unido; el filtro retiene la proteína unida al nucleótido y

posteriormente, una vez seco, se mide la cantidad del nucleótido unido mediante un contador de centelleo. Sin embargo, debido a la baja afinidad de la proteína por el nucleótido, éste tiene bastante facilidad para disociarse de la proteína durante los lavados y, por tanto, la cantidad de nucleótido detectado finalmente es muy baja en relación a la cantidad de proteína y el nucleótido libre añadido inicialmente. Así pues, aunque la técnica puede ser válida para comparar diferentes proteínas en las mismas condiciones, decidimos emplear otras estrategias como la proteólisis limitada para confirmar los datos y posteriormente la espectrofluorescencia.

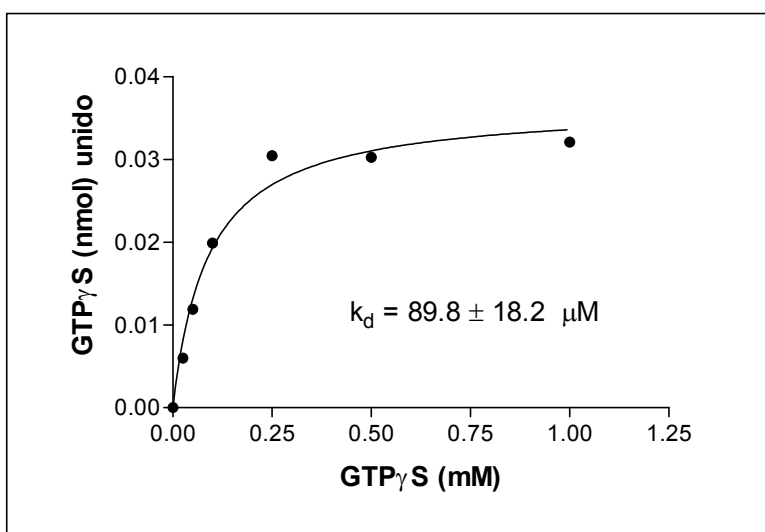


Figura 16: Afinidad de la proteína MnmE a ^{35}S - γ -GTP mediante ensayo de unión en filtro.

1.1.2. Proteólisis limitada:

La proteólisis limitada con quimiotripsina es una técnica indirecta que nos permite detectar la unión del nucleótido a la proteína ya que cuando éste se une, se produce un cambio en la conformación de la proteína y sitios de reconocimiento de la quimiotripsina pueden quedar expuestos u ocultos dando lugar a patrones de proteólisis característicos para cada conformación.

La proteína MnmE se sometió a proteólisis con quimiotripsina en presencia de diferentes nucleótidos. Para ello la proteína purificada (1 μg) fue incubada previamente con los nucleótidos de indicados: ATP, GTP, GTP γ S y GDP (todos ellos a una concentración 5 mM) y posteriormente se añadió quimiotripsina (50 ng), se incubó a 30°C durante 20 minutos y, a continuación, las muestras fueron sometidas a SDS-PAGE y transferidas a una membrana de nitrocelulosa para su posterior detección con anticuerpo anti-MnmE.

Como puede apreciarse en la figura 17, la proteólisis limitada de la proteína MnmE recombinante (de 53kDa) da lugar a la aparición de dos bandas mayoritarias de 50kDa y 36 kDa y una minoritaria de 39 kDa (carrera 3). La incubación previa con ATP de la proteína no modifica el patrón de proteólisis; sin embargo, la incubación con los nucleótidos GTP, GTP γ S y GDP da lugar a un patrón distinto donde se aprecia la aparición de nuevas bandas de menor tamaño; concretamente observamos la aparición de un triplete de un tamaño aproximado de 28 kDa y una banda correspondiente aproximadamente a 21 kDa. Por una parte, estos resultados nos indican que el ATP no es capaz de unirse a la proteína MnmE, cosa que ya había sido demostrada por nuestro grupo mediante ensayos de competición de la proteína unida a [α - 32 P]GTP (Cabedo *et al.*, 1999), en los que se observó que el ATP, UTP, CTP y GMP no eran capaces de desplazar al nucleótido unido a la proteína y, por tanto, no eran nucleótidos capaces de unirse a la misma.

Por otra parte, los nucleótidos GTP, GTP γ S y GDP dan un patrón de proteólisis característico y equivalente, lo que indica que existe unión y cambio conformacional. Las concentraciones saturantes de los nucleótidos permiten ver el mismo efecto con el nucleótido GTP y su análogo no hidrolizable GTP γ S.

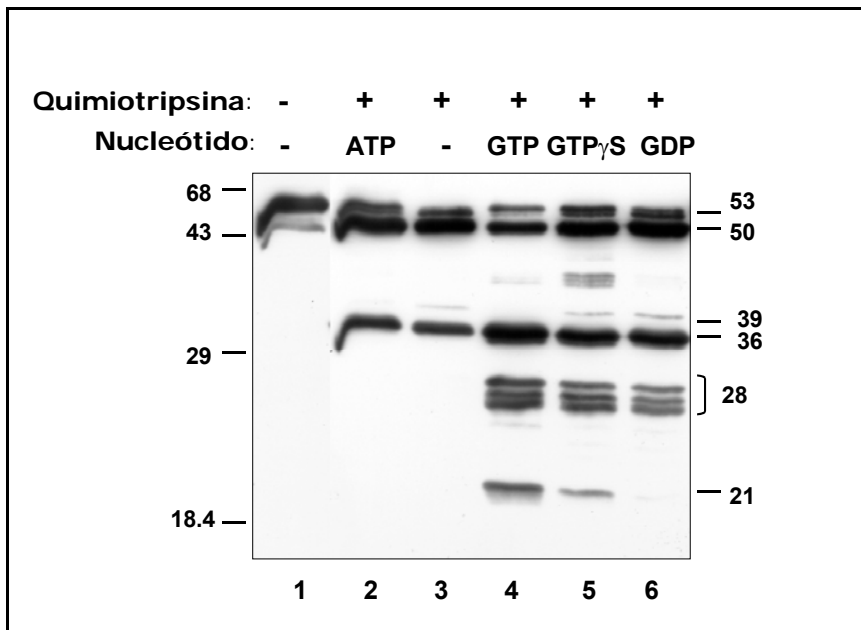


Figura 17: Proteólisis limitada de MnmE con quimiotripsina. Se incubó 1 μ g de proteína con los nucleótidos indicados a una concentración 5mM. Se sometieron las muestras a proteólisis limitada con quimiotripsina (50 ng) excepto la carrera 1 que no fue digerida. A la izquierda se indican los marcadores de masa molecular en kDa y a la derecha el tamaño aproximado de las bandas características de la proteólisis también en kDa.

1.1.3. Ensayos de unión por fluorescencia:

Por último, pusimos a punto técnicas de espectrofluorimetría y desarrollamos ensayos de unión de nucleótidos que nos permitieron hacer estudios más precisos de las afinidades entre la proteína MnmE y los nucleótidos.

Existen análogos de nucleótidos que llevan un grupo fluorescente unido a la ribosa el cual no altera, aparentemente de forma importante, la unión del nucleótido a la proteína. La fluorescencia del nucleótido depende de las condiciones donde se encuentre la molécula; cuando el nucleótido pasa de estar libre en la disolución acuosa a estar unido a la proteína se produce un aumento de la intensidad de fluorescencia que puede ser registrado en un espectrofluorímetro.

Se emplearon los análogos mant de los nucleótidos GTP γ S y GDP. El grupo mant (N-metil-antraniloil) se localiza en la posición 2' o 3' del anillo de ribosa del nucleótido y emite fluorescencia con un pico de intensidad a una longitud de onda de 448 nm cuando es excitado a 360 nm. Esta intensidad de fluorescencia aumenta cuando la molécula se encuentra unida a la proteína ya que cuando el fluoróforo (el nucleótido mant) se une, se produce un cambio en la polaridad del medio: unido al núcleo catalítico de la proteína, donde el ambiente del fluoróforo es menos polar, se produce una menor extinción de fluorescencia o, lo que es lo mismo, una disminución del fenómeno de "quenching" producido por el agua sobre el nucleótido fluorescente y como consecuencia observamos un aumento de la intensidad de fluorescencia de la muestra.

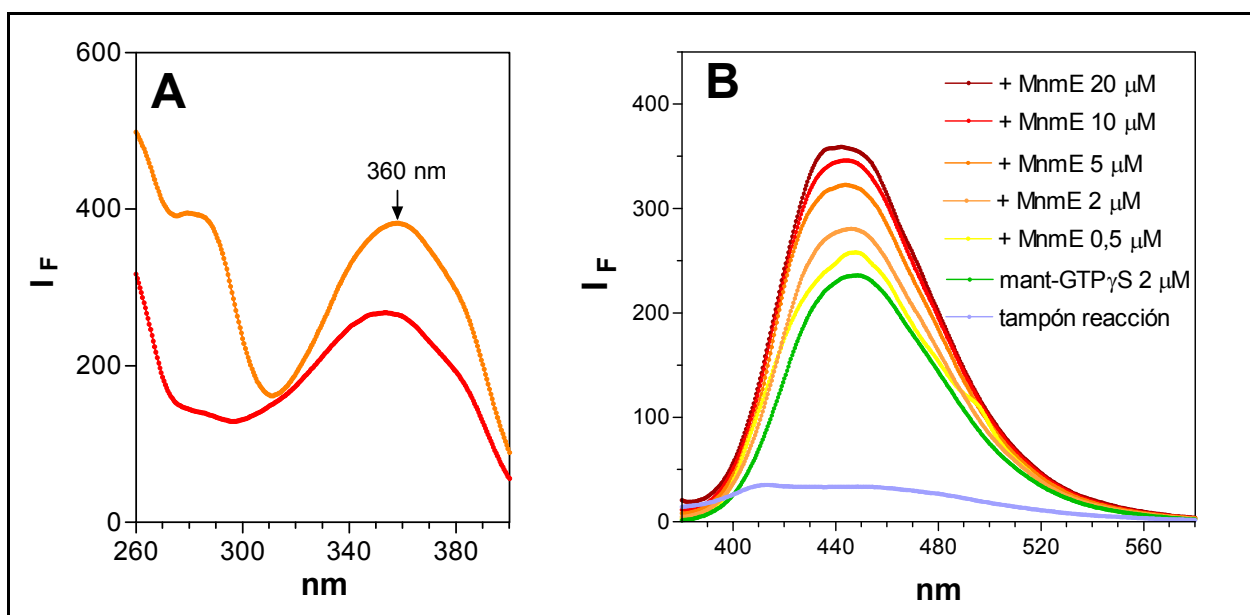


Figura 18: **A:** espectro de excitación del mant-GTP γ S (naranja) (2 μ M) y del complejo formado con la proteína MnME (rojo), con una longitud de onda de emisión de 440 nm. El pico de I_F máxima del mant-GTP γ S corresponde a una longitud de onda de excitación de 360 nm. **B:** espectro de emisión del mant-GTP γ S (verde) (2 μ M) con cantidades crecientes de proteína MnME a una longitud de onda de excitación de 360 nm.

Se realizó en primer lugar un espectro de excitación (Figura 18A) de la molécula fluorescente para observar su comportamiento y determinar la longitud de onda de excitación adecuada para realizar los ensayos de afinidad. El espectro demuestra que la unión del nucleótido libre a la proteína produce un cambio en la fluorescencia de la molécula indicándonos que el sistema funciona y que podemos estudiar la afinidad mediante los cambios en la intensidad de fluorescencia del nucleótido análogo. Posteriormente, realizamos un espectro de emisión (con $\lambda_{ex} = 360$ nm) del nucleótido mant-GTP γ S (línea verde en la figura 18B) y añadimos concentraciones crecientes de la proteína MnmE hasta 20 μ M. Como se muestra en la figura, al producirse la unión entre el nucleótido y la proteína, hay un aumento de la intensidad de fluorescencia y un ligero desplazamiento de la I_F máxima hacia una longitud de onda menor ($\lambda_{em} = 435$ nm). Este tipo de experimentos nos permitieron ajustar las condiciones de concentración de proteína y nucleótido para la determinación de las constantes de afinidad y los ensayos de formación del complejo con AIF $_x$ que posteriormente se desarrollaron. También se realizaron espectros de fluorescencia de la proteína sola sin el nucleótido en estas mismas condiciones y concentraciones con el fin de comprobar que la proteína no emite fluorescencia intrínseca que pudiera enmascarar los resultados.

Una vez ajustadas las condiciones del sistema, determinamos las propiedades de afinidad de la proteína MnmE por los nucleótidos mant-GTP γ S y mant-GDP mediante el seguimiento del aumento de la intensidad de fluorescencia; para ello, partimos de una concentración de 2 μ M del nucleótido mant y añadimos concentraciones crecientes de proteína (al igual que se hizo en la figura 18B). En las siguientes figuras se representa el incremento detectado en la intensidad de fluorescencia a 440 nm (ΔI_F) como consecuencia de la unión del nucleótido a la proteína y en función de la concentración de ésta.

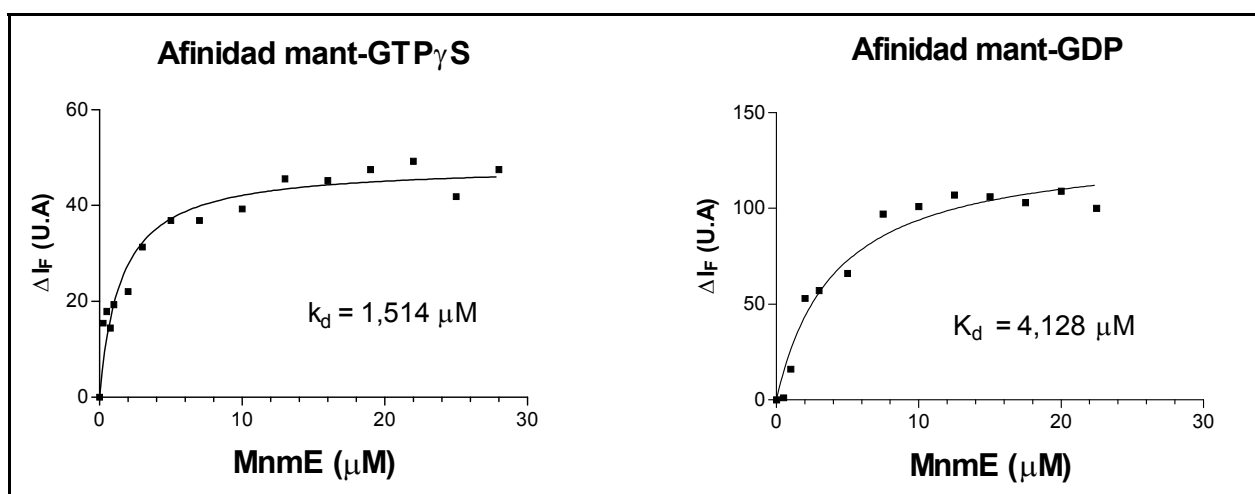


Figura 19: Ensayos de unión de la proteína MnmE a mantGTP γ S y mantGDP (2 μ M) obtenidos mediante la detección del incremento de la intensidad de fluorescencia de las muestras.

Como técnica complementaria a la medida directa de la fluorescencia también detectamos los cambios sufridos en la **anisotropía de fluorescencia** (r) de las muestras al añadir concentraciones crecientes de proteína.

La anisotropía de fluorescencia o polarización de fluorescencia del nucleótido aumenta cuando el nucleótido está unido a la proteína ya que al unirse a la proteína restringe su movilidad, la molécula gira más lentamente y el valor de la anisotropía aumenta. Este fenómeno nos permite calcular las K_d por una técnica alternativa:

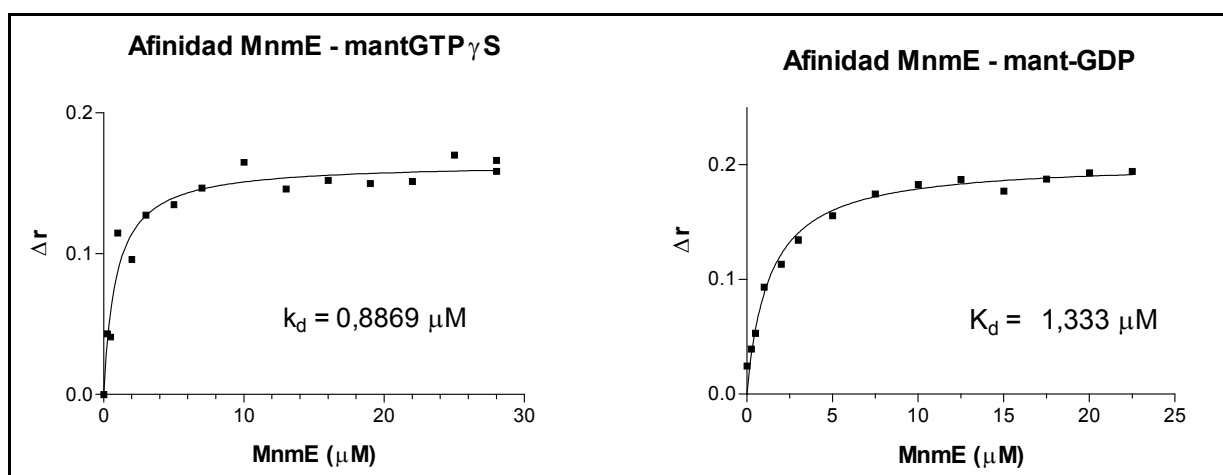


Figura 20: Ensayos de unión la proteína MnME a mantGTP γ S y mantGDP (2 μM) obtenidas por anisotropía de fluorescencia.

Como ya se indica en la figuras 19, con ambos tipos de medida, los valores de K_d son del orden de μM tanto para el mantGTP γ S como mantGPD y la afinidad de MnME por ambos nucleótido es parecida, aunque ligeramente menor por el mantGDP.

Realizamos también ensayos de unión con el **dominio G** de la proteína MnME aislado y purificado. Anteriormente habíamos observado mediante los ensayos de unión en filtro que el dominio G presentaba una afinidad por GTP $\gamma^{35}\text{S}$ algo mayor (5 veces) que la proteína completa (Cabedo *et al.*, 1999).

Con los ensayos de espectrofluorescencia observamos que, en comparación con la proteína MnME completa, el dominio G presenta una afinidad del mismo orden aunque ligeramente mayor por mantGTP γ S y levemente menor por mantGDP. Y al igual que ocurría con la proteína MnME completa, el dominio G presenta una ligera menor afinidad por el nucleótido mantGDP respecto al mantGTP γ S, aunque las diferencias son poco significativas (ver tabla 6).

En la figura 21 se representa los ensayos de unión a mantGTP γ S y mantGDP del dominio G por detección de la intensidad y la anisotropía de fluorescencia:

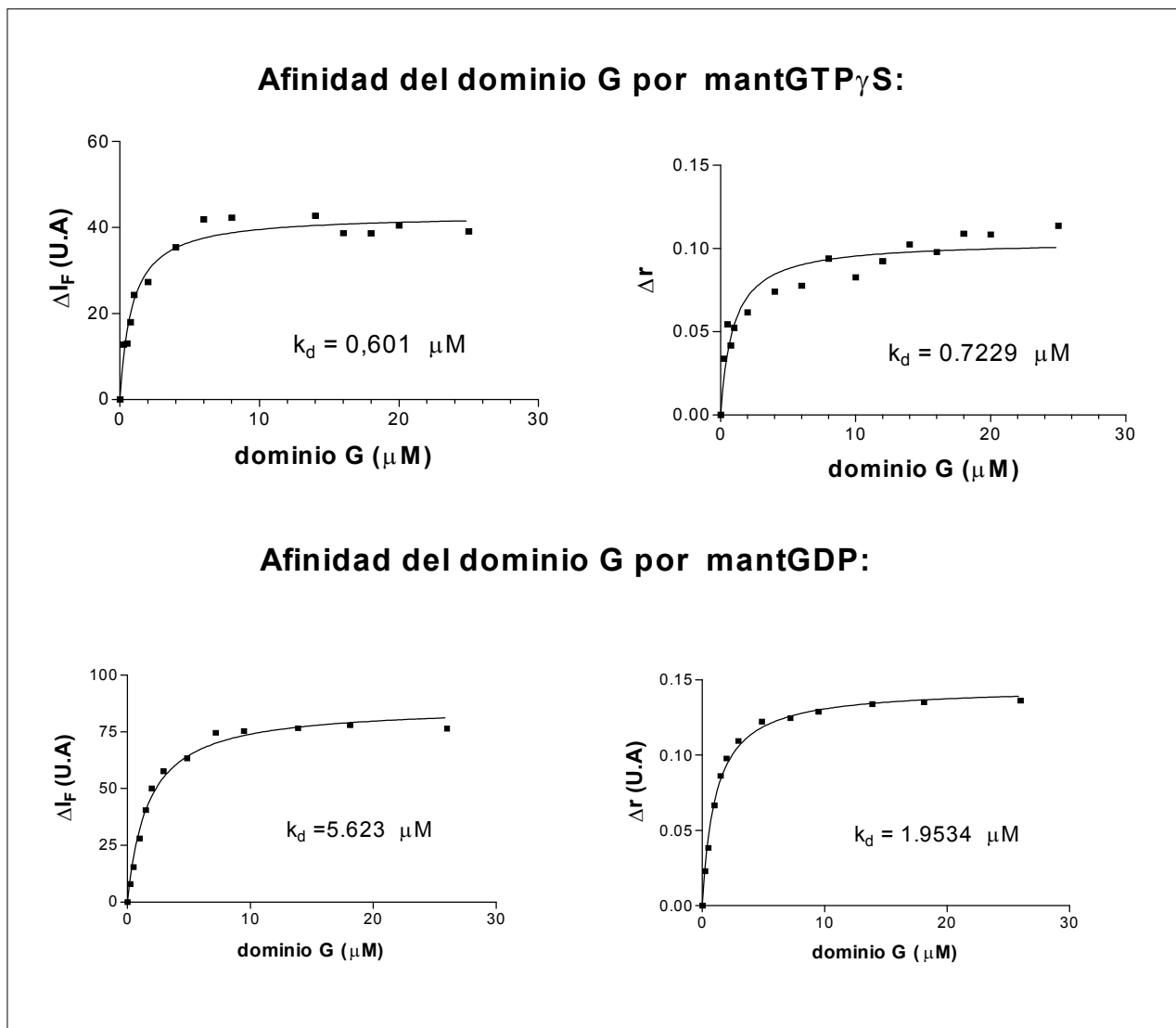


Figura 21: Ensayos de unión del dominio G a mantGTP γ S y mantGDP (2 μ M) obtenidas por fluorescencia y anisotropía.

La siguiente tabla resume las constantes de afinidad obtenidas con la proteína MnME completa y su dominio G aislado:

	K_d (mant-GTPγS) (μM)		K_d (mant-GDP) (μM)	
	Fluorescencia	Anisotropía	Fluorescencia	Anisotropía
MnME completa	1.514	0.887	4.128	1.333
dominio G	0.601	0.723	5.623	1.953

Tabla 6: Constantes de afinidad (k_d) de la proteína MnME completa y de su dominio G aislado con mantGTP γ S y mantGDP obtenidas por fluorescencia y anisotropía.

Los resultados de unión de la proteína MnmE a nucleótidos fluorescentes indican que la afinidad observada con ambos nucleótidos es bastante similar y del orden de μM . Estos valores son del mismo orden que los encontrados para las dinaminas y algunos factores de elongación como EF-Tu, y muy alejados de los observados con las GTPasas clásicas como las proteínas tipo Ras y las proteínas G heterotriméricas (del orden de nM o pM). Por tanto, MnmE se incluye dentro del grupo de GTPasas que presenta una baja afinidad por nucleótidos.

Además, aunque las diferencias entre la proteína completa y el dominio G no son especialmente significativas por esta técnica, vemos que el dominio G aislado presenta una afinidad por mantGTP γ S ligeramente mayor (0.601 μM frente a 1.514 μM). Lo cual coincide con los datos anteriores de los ensayos de unión en filtro, donde se observaba una mayor afinidad (5 veces) del dominio G por GTP. Estos resultados nos permiten especular sobre una posible función moduladora de los dominios amino y carboxiterminal en la entrada del nucleótido a su centro de unión.

1.1.4. Ensayos de competición:

Realizamos ensayos de competición con varios nucleótidos mediante el seguimiento de la intensidad de fluorescencia emitida durante la liberación del nucleótido fluorescente (ver figura 18B).

Para realizar este ensayo partimos de 2 μM mantGTP γ S y añadimos 10 μM de la proteína MnmE, la unión del nucleótido a la proteína produce un aumento de la intensidad de fluorescencia de aproximadamente 40 unidades, a esta mezcla de reacción añadimos cantidades crecientes de nucleótidos no fluorescentes: GTP γ S, GDP, ATP y XTP. El nuevo nucleótido compite con el fluorescente inicialmente unido a la proteína, y dependiendo del nucleótido, se produce un desplazamiento por competición que se observa como una bajada de la intensidad de fluorescencia debido a la liberación del mantGTP γ S de la proteína.

Como puede observarse en la figura 22, el nucleótido GTP γ S y GDP desplazan completamente al nucleótido fluorescente, volviéndose a observar valores de fluorescencia equivalentes a los iniciales antes de añadir la proteína. Adicionalmente podemos apreciar mediante este experimento, la ligera mayor afinidad de la proteína por GTP γ S frente a GDP, ya que el primero consigue desplazar más rápidamente al nucleótido fluorescente. Por lo contrario, el ATP apenas consigue desplazar el mantGTP γ S, manteniéndose casi invariable la fluorescencia de la unión MnmE-mantGTP γ S. Por último, el XTP (xantosina trifosfato, nucleótido muy similar al GTP pero con el cambio del grupo amina por ceto en la posición 7 de la base nitrogenada, ver apartado 2.5 de resultados) es capaz de desplazar parcialmente la molécula de mantGTP γ S disminuyendo hasta un

26% el valor máximo de intensidad. Estos datos con el nucleótido XTP son coherentes con los observados en los ensayos de hidrólisis (ver apartado 2.5 de resultados).

En conclusión, estos datos demuestran que la proteína MnmE es capaz de unir los nucleótidos GTP γ S y GDP, con menor afinidad el nucleótido XTP y es incapaz de unir el ATP.

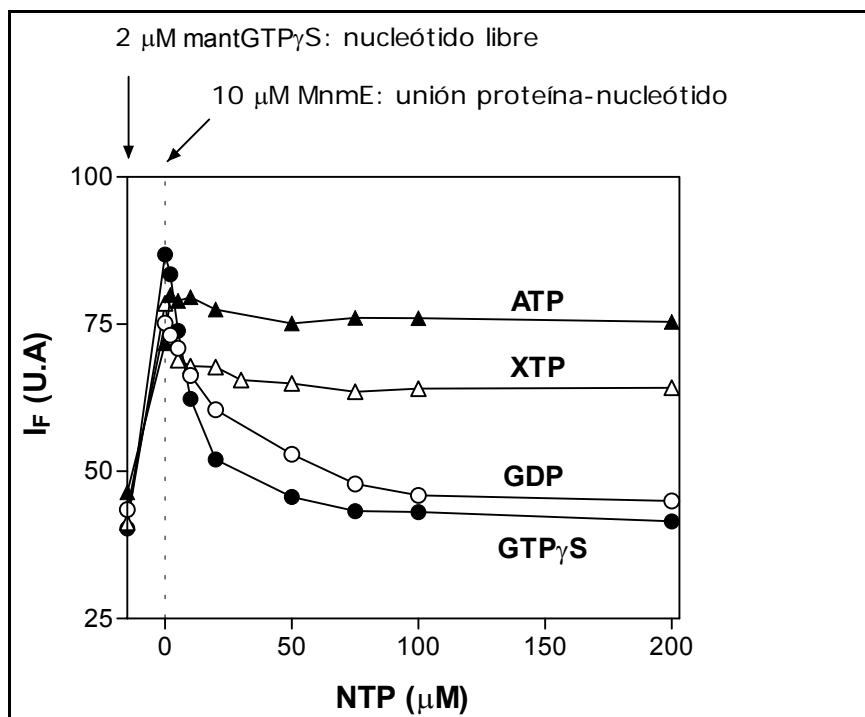


Figura 22: Competición de nucleótidos. Las muestras contienen inicialmente 2 μ M de mantGTP γ S y se añaden 10 μ M de la proteína MnmE. A continuación se agregan cantidades crecientes de los nucleótidos no fluorescentes indicados hasta una concentración final de 200 μ M.

1.1.5. Formación del estado de transición: complejos proteína-AIF $_x$ -mantGDP.

La molécula de AIF $_x$ (donde x corresponde a 3 o 4, ver apartado 1.7 de la Introducción) ha permitido desarrollar técnicas que nos permiten estudiar el mecanismo de activación de la hidrólisis del GTP en las proteínas GTPasas.

La característica que dota a esta molécula de tanto interés en el estudio de las GTPasas es su habilidad por introducirse en el núcleo catalítico de las GTPasas y formar un complejo estable entre la proteína, el nucleótido (en su forma GDP) y la propia molécula de AIF $_x$. Este complejo es estable porque mimetiza el estado de transición producido tras la unión del nucleótido y previo a la hidrólisis del GTP, de forma que permite "congelar" la proteína en esta conformación (ver figura 7 del apartado 1.7 de la introducción). El AIF $_x$ es una molécula plana que puede mimetizar al P γ , ya que las distancias de los enlaces Al-F y P-O son muy similares y porque la base trigonal del AIF $_3$ es equivalente a la del grupo fosforil.

La introducción de la molécula de AlF_x y la formación del complejo mantGDP-proteína- AlF_x es detectable mediante fluorescencia como un cambio en la intensidad de fluorescencia de la muestra y nos indica que la proteína es capaz de unir el nucleótido y realizar el posterior cambio conformacional previo a la hidrólisis, estabilizándose en este estado de transición.

Sometemos la proteína MnmE y su dominio G al ensayo de sensibilidad a AlF_x para observar la capacidad de formación del complejo proteína-nucleótido- AlF_x . En primer lugar añadimos el nucleótido fluorescente (mantGDP 2 μM) y posteriormente la proteína a una concentración 10 μM , el aumento de la intensidad de fluorescencia y el ligero desplazamiento del pico de máxima intensidad hacia una longitud de onda ligeramente menor, indican la unión del nucleótido a la proteína. Posteriormente para la formación del complejo con AlF_x añadimos por separado y de forma secuencial NaF 10 mM y AlCl_3 70 μM (sales que formaran la molécula de AlF_3 y/o AlF_4). La introducción del NaF no afecta a las propiedades fluorescentes del complejo proteína-nucleótido, pero tras la adición del AlCl_3 se forma el complejo proteína-mantGDP- AlF_x y aumenta considerablemente la intensidad de fluorescencia de la muestra, además de un ligero desplazamiento del pico de intensidad de fluorescencia máxima a una longitud de onda aproximada de 435 nm.

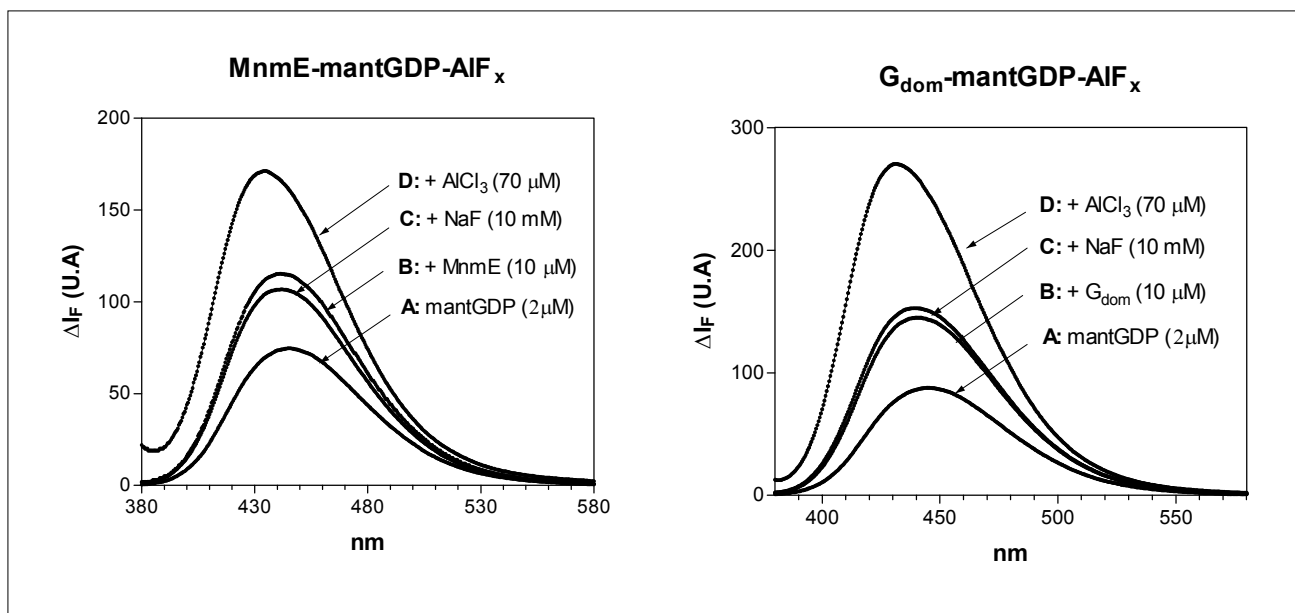


Figura 23: Formación de los complejos proteína-mantGDP- AlF_x con la proteína completa y el dominio G.

Este ensayo de formación del complejo entre la proteína, el nucleótido y la molécula de AlF_x se desarrolló para la detección de las argininas catalíticas en las proteínas GAPs, ya que la proteína GAP es capaz de activar a su correspondiente GTPasa

mediante la introducción en su núcleo catalítico de un residuo de arginina que estabiliza el estado de transición y permite la hidrólisis. La proteína sola no es capaz de formar complejo con el GDP y el AlF_x , pero sí en presencia de la proteína GAP; ésta aporta la arginina catalítica la cual se coordina directamente a la molécula de AlF_x .

En nuestro caso, la proteína MnmE y su dominio G aislado, son capaces de formar el complejo con la molécula de AlF_x y el nucleótido sin la ayuda de ningún factor externo como una proteína activadora GAP. Esta observación demuestra que la proteína MnmE presenta actividad intrínseca GTPasa y, al menos *in vitro*, no requiere de la acción de ninguna proteína GAP.

1.2 Actividad GTPasa de la proteína MnmE:

Como acabamos de ver, una de las principales características de la proteína MnmE y que la diferencia de la mayoría de GTPasas clásicas caracterizadas hasta la fecha, es su alta actividad GTPasa intrínseca y el hecho de no requerir de ninguna proteína GAP para su activación; además estas propiedades las conserva el dominio G aislado. El estudio de actividad GTPasa de la proteína MnmE se realizó mediante un ensayo colorimétrico que detecta la liberación del fosfato en la hidrólisis del GTP (Hoenig *et al.*, 1989) esta técnica nos permitió estudiar las propiedades de la actividad GTPasa de la proteína MnmE, su dominio G, así como los mutantes posteriormente obtenidos y la dependencia de la de hidrólisis de otros factores como el pH, la concentración de la proteína y la presencia de Mg^{2+} .

1.2.1. Actividad GTPasa de la proteína MnmE y del dominio G:

Se realizaron los ensayos de actividad GTPasa de la proteína completa y de su dominio G; para ello se parte de concentraciones constantes de proteína (2 μM) y se añaden distintas concentraciones de GTP, desde 0.1 mM a 4 mM. La reacción es llevada a cabo en tampón GTPasa a 37° C durante 10 minutos, transcurrido este tiempo se agrega el reactivo colorimétrico "malachita green" a las muestras y tras 2 minutos se detiene la reacción con citrato sódico 34%. Finalmente se detecta la absorbancia de las muestras a 690 nm.

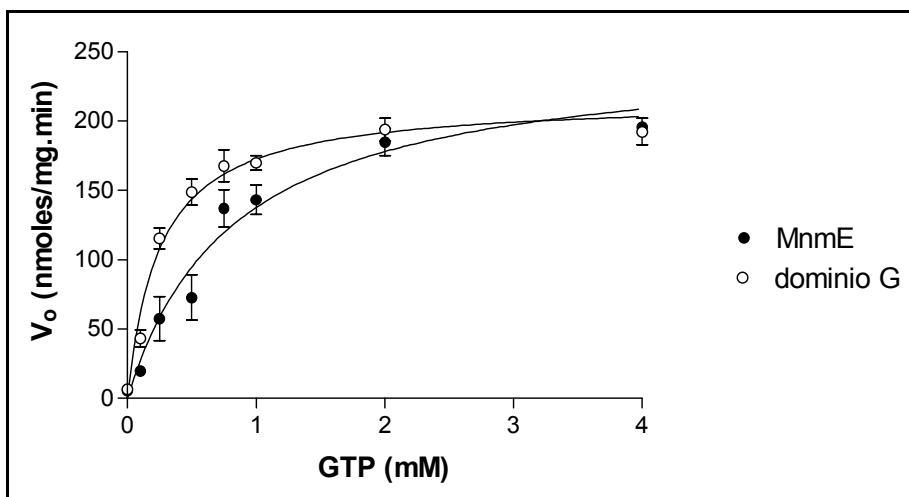


Figura 24: Actividad GTPasa de la proteína MnME y de su dominio G (2 μ M de proteína en ambos

	Hidrólisis			
	V_{max} (nmoles/mg.min)	k_m (μ M)	k_{cat} (min^{-1})	k_{cat} / k_m ($min^{-1} \mu M^{-1}$)
MnME	203.00 \pm 8.31	754 \pm 79.14	10.834	0,0143
domino G	224,7 \pm 9,095	252 \pm 36.79	4,045	0,0153

Tabla 7: Tabla resumen de las constantes de hidrólisis de la proteína MnME y su dominio G aislado.

La proteína MnME de *E. coli* presenta una alta actividad GTPasa intrínseca; en la reacción *in vitro* es capaz de hidrolizar completamente el GTP a GDP sin la necesidad de otros factores auxiliares o proteínas GAPs como ocurre en la mayoría de proteínas GTPasa clásicas.

Interesantemente, el dominio G de la proteína mantiene las propiedades cinéticas, por lo que deducimos que los residuos responsables de la actividad GTPasa intrínseca deben encontrarse dentro del propio dominio G de la proteína.

1.2.2. Dependencia del Mg^{2+} :

Una vez caracterizada la actividad GTPasa de la proteína completa y de su dominio G, decidimos estudiar la dependencia con el Mg^{2+} . En las GTPasas el Mg^{2+} juega un papel esencial en el mecanismo de la proteína ya que este catión se localiza en el núcleo catalítico de la proteína coordinándose al nucleótido y a algunos aminoácidos de los motivos GTPasa de la proteína (ver figuras 5 y 7 de la Introducción).

A continuación se presentan los resultados de los ensayos de **unión** en filtro de la proteína MnME y el nucleótido $GTP\gamma^{35}S$ en función de la concentración de Mg^{2+} . Para ello,

se incubaron durante 30 minutos a 30° C la proteína purificada (4.7 μM) con GTPγ-3⁵S en tampón GTPasa a la concentración de Mg²⁺ indicada; en condiciones estándar, la concentración de Mg²⁺ en el tampón de reacción es 2 mM y en esta ocasión variamos la concentración entre 0 y 10 mM, los lavados del filtro fueron realizados con el tampón a la misma concentración Mg²⁺ y finalmente se cuantificó la cantidad de GTPγ³⁵S retenido en el filtro.

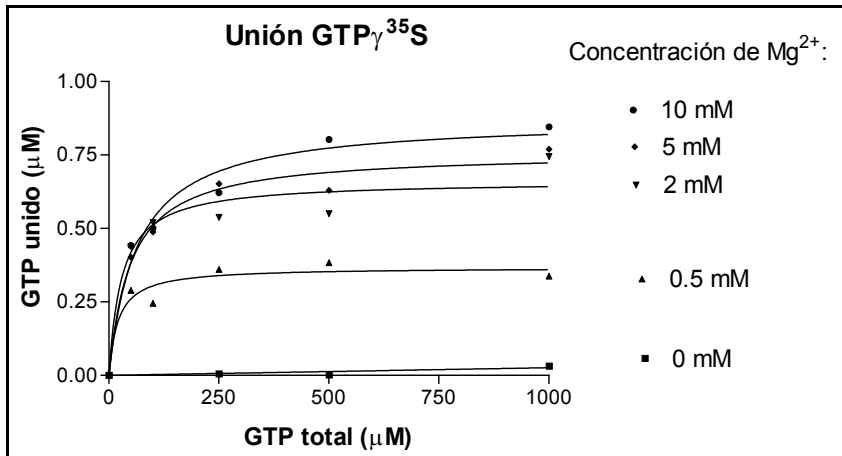


Figura 25: Unión de GTPγ³⁵S a MnME en función de la concentración de Mg²⁺ en la reacción de unión.

Como puede apreciarse, sin Mg²⁺ en la reacción, no se aprecia unión del nucleótido y ésta aumenta con la subida de la concentración de Mg²⁺, por lo que podemos concluir que el Mg²⁺ es esencial para la unión del nucleótido.

A continuación, estudiamos la dependencia del Mg²⁺ en la **hidrólisis** del nucleótido *in vitro*. Se observó la variación de las constantes de hidrólisis en función de la concentración de Mg²⁺ realizando varios ensayos de actividad GTPasa a concentraciones de MgCl₂ variables desde 0 a 10 mM:

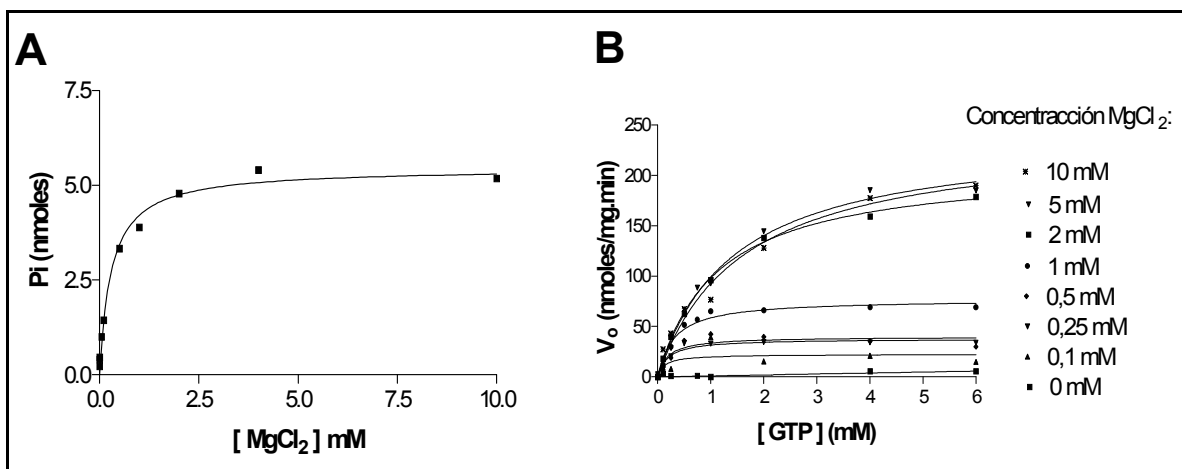


Figura 26: A: nmoles P_i liberados en función de la concentración de MgCl₂ a una concentración de proteína (0.1 mg/ml) y nucleótido (0.5 mM) constante. **B:** Curvas de hidrólisis a diferentes concentraciones de MgCl₂ (de 0 a 10 mM) y concentración de proteína 0.1 mg/ml (2 μM).

Los resultados demuestran que para la hidrólisis del nucleótido la proteína MnmE requiere la presencia del Mg^{2+} . Como puede observarse en la figura B la hidrólisis del GTP aumenta junto con la concentración de Mg^{2+} hasta llegar a una concentración aproximada de 2 mM de $MgCl_2$ (correspondiente a la concentración de $MgCl_2$ en el tampón GTPasa usado en todas las reacciones de unión e hidrólisis) a partir de la cual ya no se observa un incremento en la tasa de hidrólisis del GTP.

1.2.3. Dependencia del pH:

Estudiamos la dependencia de la hidrólisis del nucleótido con el pH, para ello realizamos curvas de hidrólisis en condiciones de pH diferentes entre 5.5 y 9.5 (figura 27A):

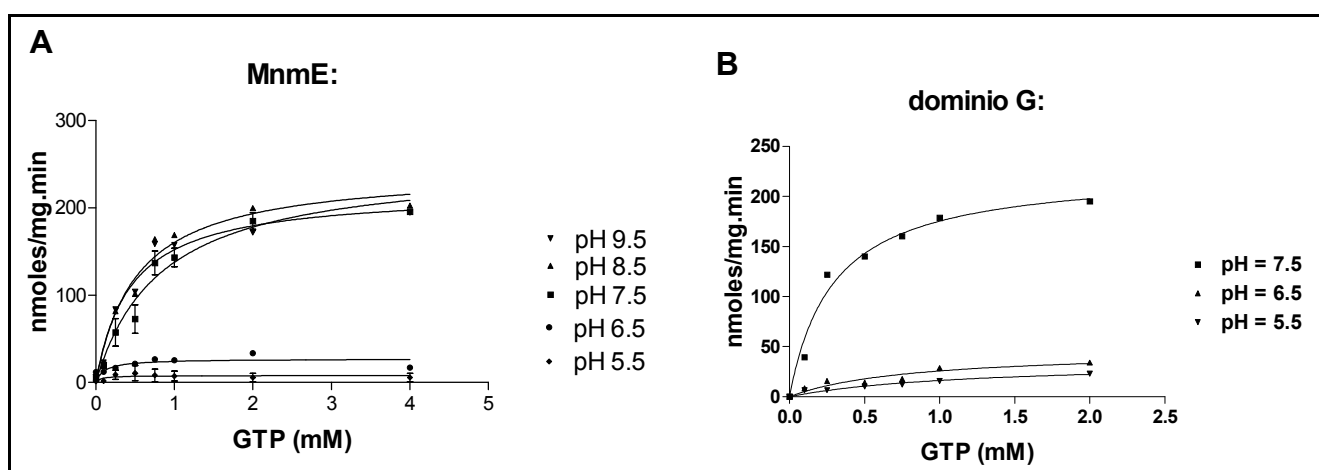


Figura 27: Hidrólisis del GTP realizada por la proteína MnmE completa y su dominio G en función del pH.

Curiosamente observamos a pH 6.5 la proteína pierde prácticamente toda su actividad GTPasa y a pH 5.5 es totalmente inactiva, mientras que a pH superiores a 7.5 parece que la actividad GTPasa no está afectada. Esta propiedad la mantiene el dominio G aislado (figura 27B).

Una posible explicación ha este fenómeno es que, a este pH ligeramente ácido, algunos aminoácidos pueden encontrarse protonados, por ejemplo la His (con un punto isoeléctrico de 7.6) a pH neutro se encontraría con una carga neta neutra pero por debajo de pH 7.6 se protonaría, la presencia de histidinas con cargas positivas puede afectar a la estabilidad de las interacciones de la estructura y a la funcionalidad de los aminoácidos implicados en los mecanismos de unión e hidrólisis. Otros aminoácidos

neutros tienen un punto isoeléctrico entre 6 y 6.3 (Pro, Leu, Ile, Ala, Gly, Val) que también pueden encontrarse protonados en estas condiciones y la presencia de estas cargas afectar al proceso de hidrólisis del GTP.

Realizamos un ensayo de unión en condiciones de pH 5.5 con de la proteína MnmE y el análogo fluorescente mantGTP γ S. Como puede apreciarse en la figura 27 el pH ácido no afecta a la unión del nucleótido obteniéndose unos espectros de emisión a pH 5.5 equivalentes a los de pH 7.5. Estos resultados nos indican que probablemente el/los residuo/s afectados que, en condiciones ácidas cambian su estado de protonación e impiden la actividad GTPasa de la proteína, son residuos implicados en el mecanismo de hidrólisis del nucleótido pero no en la unión.

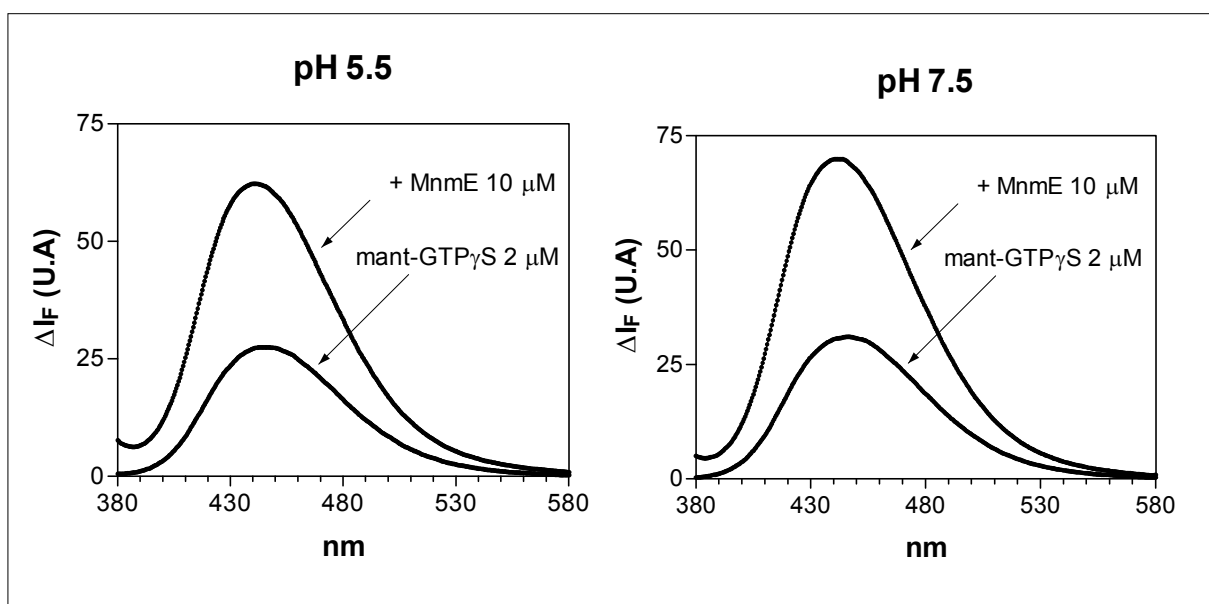


Figura 28: Unión de la proteína MnmE al nucleótido mantGTP γ S a pH5.5 y pH7.5.

1.3. Autoasociación:

Los resultados publicados por nuestro grupo con anterioridad ya habían demostrado, mediante técnicas *in vivo* e *in vitro*, la capacidad de la proteína MnmE para autoasociarse.

Mediante cross-linking *in vivo* se demostró que la proteína MnmE es capaz de multimerizar *in vivo*, observándose la aparición de complejos con una masa molecular aproximada de 100 y 150 KDa que podrían corresponder dimeros y trímeros de la

proteína, aunque no se puede descartar que la proteína pueda asociarse con otras proteínas para formar los complejos observados. Además, mediante técnicas de cross-linking *in vitro* con el entrecruzador DTSP se observó la capacidad *in vitro* de la proteína MnmE de formar dímeros y por gel filtración, con una columna de Sephacryl S-200, también se detectó la capacidad de multimerizar de la proteína (Cabedo *et al.*, 1999).

Con el propósito de profundizar en el estudio de la capacidad de autoasociación que presenta la proteína MnmE e intentar relacionar este fenómeno con las propiedades bioquímicas de la proteína tales como la presencia del nucleótido, la concentración de proteína y la hidrólisis del GTP se realizaron estudios de autoasociación de la proteína mediante técnicas de **equilibrio y velocidad de sedimentación por ultracentrifugación analítica**.

Los resultados de los ensayos de velocidad de sedimentación nos permiten medir el coeficiente de sedimentación (S) de la proteína en diferentes condiciones. El coeficiente de sedimentación depende de la masa molecular y del coeficiente de fricción translacional (f) de la proteína, es decir, depende de la masa molecular y de la forma hidrodinámica de la proteína, por tanto, en este tipo de ensayos podemos obtener información de la existencia y distribución de las diferentes especies multiméricas, así como comparar si existe variación en su forma hidrodinámica. Esta técnica se complementó con los ensayos de equilibrio de sedimentación los cuales nos permiten determinar la masa molecular y por tanto el estado de asociación de la proteína.

En primer lugar se estudió el efecto de la concentración de proteína en el estado de asociación. Los resultados obtenidos sugieren que la concentración de la proteína influye en el estado multimérico de la proteína; a mayor concentración de la proteína, mayor % de proteína en el estado dimérico respecto al monomérico, aunque este efecto es ligero y se estudió en ausencia de nucleótido.

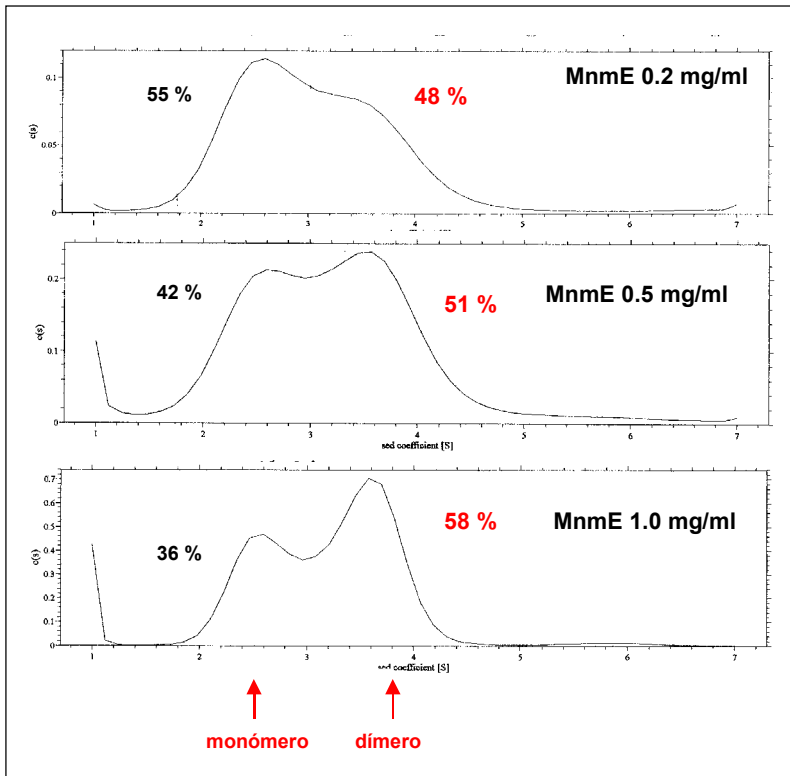


Figura 29: Velocidad de sedimentación de la proteína MnME en función de la concentración de proteína. A la izquierda en negro el % de proteína monomérica, a la derecha en rojo, % de proteína dimerica (los valores de los % no son absolutos porque son los valores promedios obtenidos de las áreas resultantes y en algunas ocasiones la suma total no corresponde al 100%).

En segundo lugar, también se estudió la influencia del Mg^{2+} en el estado de asociación de la proteína y el efecto de la presencia de nucleótido (GTP γ S y GDP a dos concentraciones diferentes):

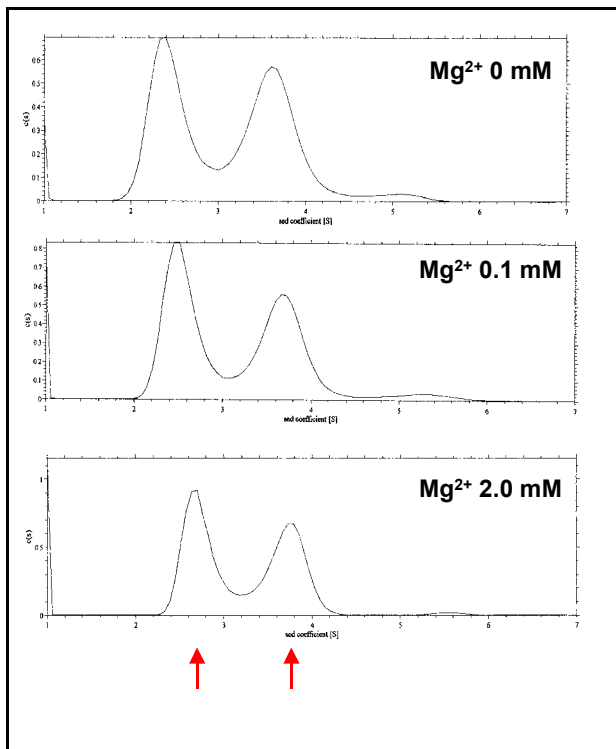


Figura 30: Velocidad de sedimentación de la proteína MnME (0.5 mg/ml) en función de la concentración de Mg^{2+} . Se indica en rojo el % de proteína en la forma dimerica (los valores de los % no son absolutos porque son los valores promedios obtenidos de las áreas resultantes y en algunas ocasiones la suma total no corresponde al 100%)

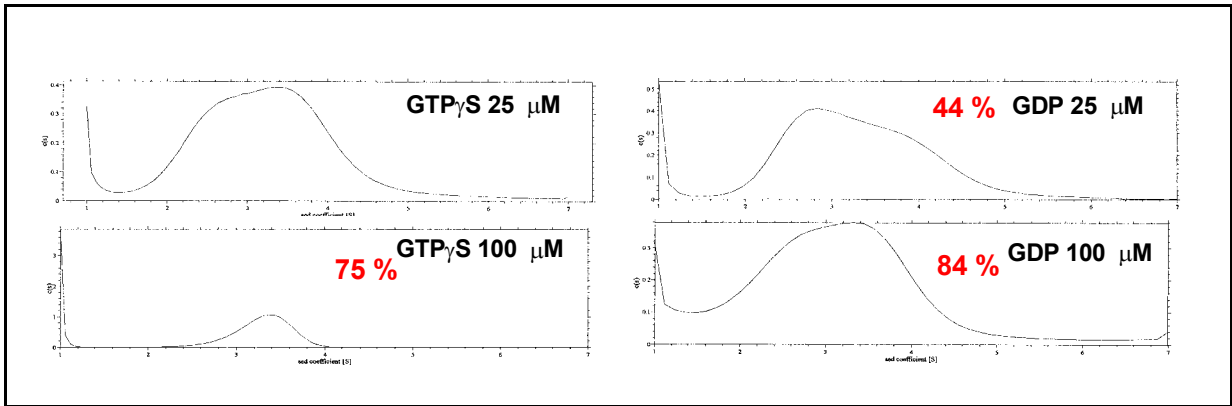


Figura 31: Velocidad de sedimentación de la proteína MnME en función de la presencia de nucleótido. La concentración de proteína se mantiene constante a 0.5 mg/ml y la concentración de Mg^{2+} a 2 mM. Hay que tener en cuenta que las escalas son diferentes en cada gráfica y los valores de los % no son absolutos porque son los valores promedios obtenidos de las áreas resultantes y en algunas ocasiones la suma total no corresponde al 100%)

Los resultados parecen sugerir que la presencia de Mg^{2+} (en ausencia de nucleótido) no afecta de forma significativa al fenómeno de autoasociación, ya que se obtienen un % de conformación monómero/dímero prácticamente iguales para muestras de proteína sin Mg^{2+} y en presencia de Mg^{2+} 0.1 y 2 mM.

Por otro lado, los resultados indican que la proteína tiende a dimerizar en presencia de nucleótido (siempre que exista Mg^{2+}) y además, este fenómeno se ve favorecido con el aumento de la concentración del nucleótido, tanto con $GTP\gamma S$ como con GDP, (tener en cuenta que la escala de los ejes es diferente en cada gráfica). Sin embargo, hay que remarcar que en presencia de Mg^{2+} y nucleótido se observa una mayor mezcla de especies, no existen dos poblaciones diferenciadas de monómero y dímero como observábamos sin nucleótido, sino observamos un único pico ancho que tiende a distribuirse hacia el dímero cuando aumentamos la cantidad de nucleótido hasta prácticamente encontrarse únicamente en esta conformación. Además, el dímero tiene un coeficiente de sedimentación (S) menor que el de la proteína sola, lo que podría significar que la estructura tridimensional de la proteína es diferente y menos compacta o globular.

En conclusión, aunque sólo estudiamos pocas condiciones con esta técnica, parece que la proteína MnME tiene tendencia a autoasociarse y este fenómeno parece estar favorecido con el aumento de la concentración de proteína y en presencia de nucleótido.

Estos datos son parecidos a los observados en otras proteínas GTPasa; especialmente encontramos ejemplos similares en la familia de las dinaminas; en las proteínas Mx se ha demostrado que existe un incremento de la actividad GTPasa debido

a la autoasociación de la proteína, la cual a la vez es dependiente de GTP (Haller and Kochs, 2002; Kochs *et al.*, 2002; Kochs *et al.*, 1998; Schwemmle *et al.*, 1995). Otras dos dinaminas, las proteínas hGBP1 y IIGB1, relacionadas ambas con la respuesta inducida por interferón durante la infección viral, se caracterizan por tener capacidad de multimerización, la cual es dependiente de nucleótido. Además, la multimerización se ve favorecida con la actividad GTPasa, observándose un comportamiento de cooperatividad positiva en la actividad GTPasa con el aumento de la concentración de proteína (Praefcke *et al.*, 1999; Prakash *et al.*, 2000a; Prakash *et al.*, 2000b; Uthaiyah *et al.*, 2003).

Otras proteínas no pertenecientes a la familia de las dinaminas como Rac1 (GTPasas de la familia Rho) también presenta un aumento de la actividad GTPasa como consecuencia de oligomerización, aunque en este caso, y a diferencia de lo que ocurre en las dinaminas, la oligomerización es independiente del GTP (Zhang *et al.*, 2001).

Puesto que hemos observado que la autoasociación de MnmE se favorece con el aumento de su concentración, quisimos estudiar la posible relación entre la concentración de la proteína MnmE y la actividad GTPasa para intentar establecer una relación entre la autoasociación y la actividad GTPasa, tal y como ya se ha visto en otras GTPasas. Para ello, realizamos ensayos de actividad GTPasa a diferentes concentraciones de proteína, tanto en su forma completa como el dominio G aislado, y observamos si se detecta un efecto de cooperatividad positiva en la actividad GTPasa debido a la concentración de proteína:

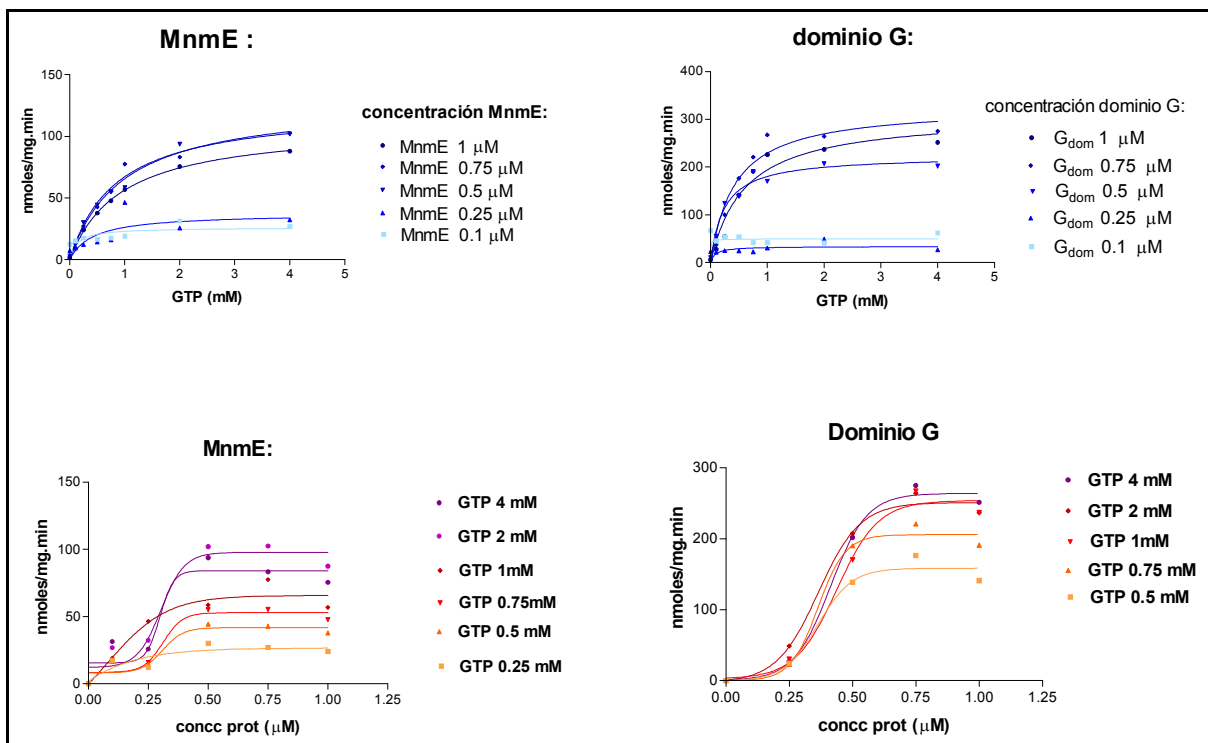


Figura 32: Actividad GTPasa de la proteína MnmE y de su dominio G en función de la concentración de proteína. En las gráficas superiores se muestra la hidrólisis del GTP en función de la concentración de nucleótido para diferentes concentraciones de proteína. En las gráficas inferiores, se muestra la hidrólisis de GTP en función de la concentración de proteína para diferentes concentraciones de nucleótido.

En la figura 32 se exponen los resultados de los ensayos de hidrólisis de la proteína MnmE y de su dominio G aislado, en función de la concentración de proteína y nucleótido. Observando las gráficas inferiores (dependencia de la actividad GTPasa en función de la concentración de proteína), se aprecia diferencia entre el comportamiento de la proteína completa y el dominio G. Este último, parece presentar un claro comportamiento característico de cooperatividad positiva (ajuste de los puntos a una curva sigmoideal en lugar de una curva hiperbólica), donde el aumento de la concentración de la proteína favorece la actividad GTPasa, mientras que la proteína completa no parece ajustarse con tanta claridad a este comportamiento, especialmente a bajas concentraciones de nucleótido. Por tanto, podríamos establecer una relación entre la capacidad hidrolítica y la concentración de proteína, aunque desconocemos qué significado podría tener este fenómeno en el mecanismo de acción de la proteína *in vivo*, así como el hecho de encontrar un claro comportamiento cooperativo en el dominio G pero no tan evidente con la proteína completa.

En conclusión, los resultados parecen indicar que la proteína MnmE de *E.coli* no forma grandes oligómeros como algunas las dinaminas u otras GTPasa como FtsZ. únicamente hemos observado, mediante diferentes técnicas, la tendencia de MnmE a formar dímeros y puede que algunas estructuras mayores, aunque nunca grandes multímeros.

Por otro lado, parece que, al igual que ocurre en muchas de las GTPasa nombradas con anterioridad, la formación de estos multímeros se ve favorecida con la concentración de proteína y con la presencia de nucleótido. A la vez, observamos que la actividad GTPasa se ve favorecida también por la concentración de proteína (especialmente el dominio G) por lo que podríamos especular con la posibilidad de que la multimerización se ve favorecida con la actividad GTPasa, aunque no podemos descartar que sea al revés, la actividad GTPasa se ve favorecida con la multimerización de la proteína.

2. Caracterización bioquímica de los motivos G1, G3, G4 y G5:

2.1. Propiedades de los motivos G1, G3, G4 y G5:

Los motivos que caracterizan a una proteína como perteneciente a la superfamilia de las GTPasas son los motivos del dominio G: G1, G3, G4 y también en menor medida el motivo G5, aunque este último debido a su baja conservación no suele incluirse dentro de los motivos característicos de la superfamilia ya que en muchas familias de GTPasas no está presente, o al menos, no se puede definir una secuencia consenso para todas las GTPasas. Estos residuos conservados en el dominio G están invariablemente implicados en la unión de nucleótidos de guanina, la hidrólisis del GTP y el control del cambio conformacional y así ha sido demostrado mediante el estudio de las estructuras tridimensionales de proteínas que forman parte de la superfamilia de las GTPasas (Hall, 2000; Kjeldgaard *et al.*, 1996).

Por ello empezamos el estudio de la caracterización de las propiedades bioquímicas de MnmE mediante un análisis mutacional de los motivos G1, G3, G4 y G5 del dominio G para intentar dilucidar si la proteína MnmE se comporta como el resto de las GTPasas. Más tarde, nos centraremos en el estudio del motivo G2 y de otras regiones de MnmE que la caracterizan como una GTPasa con propiedades peculiares y la diferencian del resto de las GTPasas de la superfamilia.

Los residuos del motivo **G1 (GxxxxGK(S/T))** están implicados en la unión del nucleótido, esta región también se denomina P-loop (phosphate-binding loop) y está presente en las proteínas que unen nucleótidos, incluso en aquellas que unen nucleótidos diferentes al GTP como las ATPasas ya que su unión al nucleótido es por los grupos fosfato y no distingue entre las base de guanina y de adenina.

Los residuos invariables de lisina y la segunda glicina son los encargados de unir los grupos fosfatos del nucleótido y el residuo de serina o treonina tienen como función coordinar el cofactor Mg^{2+} tanto en su conformación unida a GTP como GDP. Mutaciones en estos residuos tienen como resultado una pérdida de la capacidad de unión del nucleótido y por tanto también de su actividad GTPasa (Farnsworth and Feig, 1991). La sexta posición de este motivo es un residuo de Gly que se coordina al los fosfato α y β mediante puentes de hidrógeno desde el grupo NH de su cadena principal a los oxígenos de los grupos fosfato; un cambio de este aminoácido por un residuo con cadena

lateral produciría un impedimento estérico con la base nitrogenada del nucleótido, por lo que la entrada de la molécula de GTP se vería afectada.

Para estudiar el papel del motivo G1 en las propiedades bioquímicas de MnmE decidimos introducir la mutación **G228A**, donde la segunda Gly del motivo G1 (G15 en H-Ras) es cambiada a Ala.

El motivo **G3** tiene como secuencia consenso **DxxG**, la función de este motivo es coordinar el átomo de Mg^{2+} desde el residuo de Asp (D) conservado a través de una molécula de H_2O . Además la Gly se une mediante un puente de hidrógeno al fosfato γ del nucleótido, interacción crucial para el cambio conformacional producido tras la hidrólisis del GTP. En MnmE hemos mutagenizado el residuo **D270** cambiando el aminoácido de aspártico por una alanina y estudiando el efecto sobre la unión e hidrólisis del nucleótido.

El motivo **G4**, con la secuencia consenso **NKxD**, es el responsable de la especificidad en el reconocimiento del nucleótido ya que los residuos invariables interaccionan con la base guanina del nucleótido mediante la formación de un doble puente de hidrógeno entre el aspártico y los nitrógenos de la base de guanina. Un cambio en el residuo de Asp debe cambiar la especificidad de la unión del nucleótido (ver figura 33).

El motivo **G5 (S/CAK/L/T)** es un tripéptido localizado en el extremo carboxi-terminal del dominio G cuya función es ayudar al motivo G4 en la estabilización de la base de guanina y, por tanto, también participa en la especificidad por el nucleótido. Presenta un grado de conservación bastante bajo en la superfamilia de GTPasas, y en muchas familias no está presente, por lo que no se suele incluir en los motivos esenciales de las GTPasas. En la familia de las proteínas tipo Ras se ha observado que sí presente,

definiéndose la secuencia consenso S/CAK/L/T; de los tres residuos solamente la alanina central es invariable. Se ha determinado que la Ser del G5 (S145), en Ras, forma un puente de hidrógeno con el Asp del G4 (D119) y la Ala (A146) tiene como función impedir la entrada de otra base, como el ATP, porque forma un fuerte puente de hidrógeno entre el N de la cadena principal y el O6 de la base (ver figura 33).

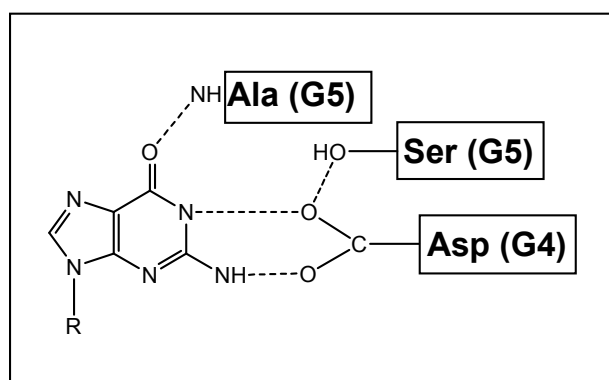


Figura 33: Función de los aminoácidos de los motivos G4 y G5 en la coordinación de la base guanina del GTP (en Ras).

En MnmE de *E.coli* encontramos este motivo como ³⁵⁸SAR y al comparar esta secuencia con la de las otras proteínas homólogas observamos su poca conservación, únicamente la Ser (S358) se mantiene invariable. En la mayoría de los homólogos procariotas en la posición que ocupa la A359 encontramos Ala o Val y la posición que ocupa la Arg (R360) encontramos Arg o Lys, aunque no de forma invariable. En los homólogos eucariotas esta conservación es todavía menor, encontrando el motivo SCK en levadura (*s.cerevisiae* y *s.pombe*) y SCL en humanos.

Decidimos por tanto mutar la serina en la posición 358 a alanina (**S358A**) y ver si este cambio afectaba a las propiedades bioquímicas de la proteína y a la especificidad del reconocimiento de la guanina.

En la figura 34 se representan las mutaciones realizadas en los motivos G1, G3, G4 y G5 del dominio G de MnmE:

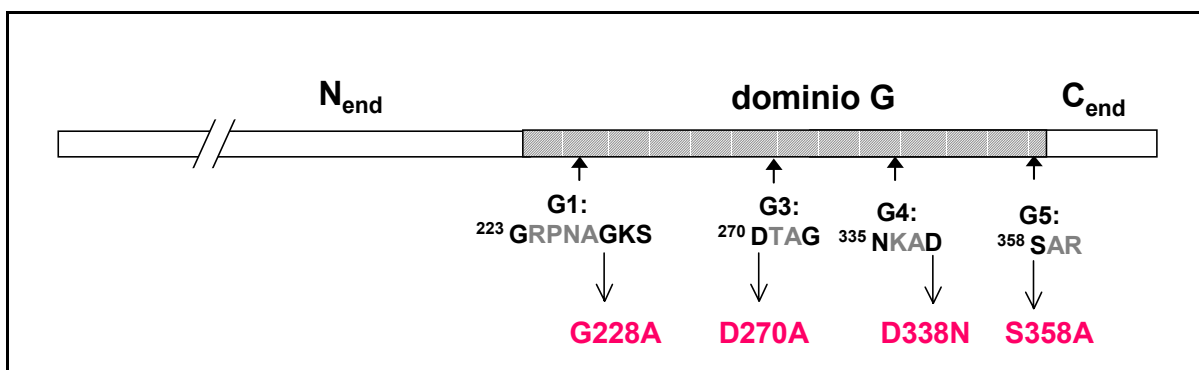


Figura 34: Mutaciones en los motivos G1, G3, G4 y G5 y su localización en el dominio G de la proteína MnmE.

-2.2. Afinidad de los mutantes de los motivos G1, G3, G4 y G5:

Los ensayos de unión a GTP de los mutantes se realizaron en primer lugar mediante la técnica de unión en filtro, como ya hemos comentado anteriormente en el apartado 1.1 de Resultados, esta técnica no es la más adecuada para la obtención de constantes de afinidad de la proteína por nucleótidos cuando las afinidades son bajas, pero sin duda nos permite hacer un estudio comparativo válido entre los distintos mutantes. Los resultados presentados a continuación pertenecen a los ensayos de afinidad realizados con filtros y posteriormente confirmados mediante proteólisis parcial con quimiotripsina (datos no mostrados) y espectrofluorescencia.

2.2.1. Ensayos de unión en filtros:

Se determinó la afinidad de los diferentes mutantes mediante ensayos de unión en filtro, para ello se incubó durante 30 minutos a 30° C la proteína purificada (4.7 μM) con GTP-γ-³⁵S (análogo radioactivo no hidrolizable del GTP) en tampón GTPasa, posteriormente se pasa la mezcla por un filtro de nitrocelulosa, se lava dos veces el filtro con el mismo tampón y finalmente se cuantifica la cantidad de GTP-γ-³⁵S retenido en el filtro que corresponde al unido a la proteína. Realizando este ensayo con diferentes concentraciones de nucleótido podemos conocer la afinidad (K_d) de cada uno de los mutantes por el nucleótido. En la figura 35 se muestra el resultado de los ensayos de unión y en la tabla 8 los valores de K_d.

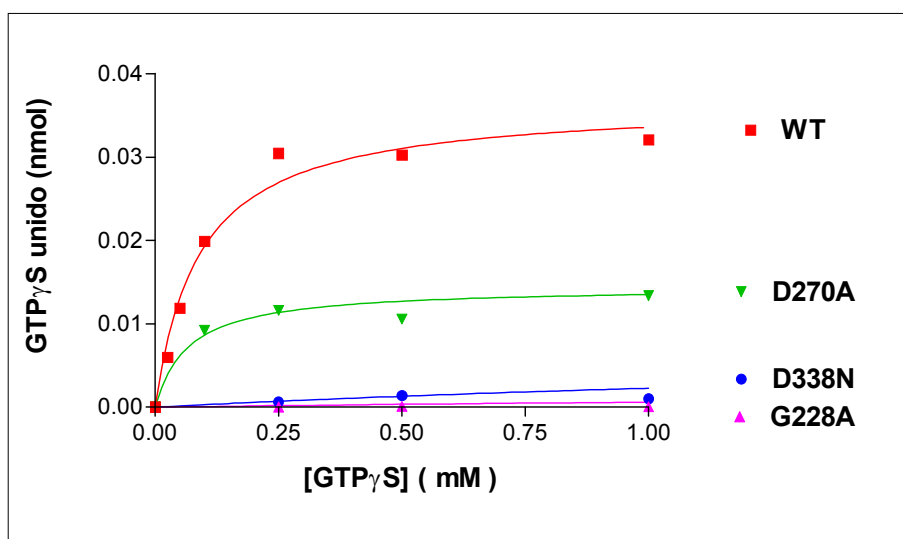


Figura 35: Ensayos de unión a GTP-γ-³⁵S de la proteína MnME y sus derivados con mutaciones en los motivos G1 (G228A), G3 (D270A) y G4 (D338N) mediante técnicas de unión en filtro.

Como puede apreciarse en la figura 35; el mutante G228A (G1) no es capaz de unir el nucleótido como era esperable, ya que la función de este motivo está relacionada con la unión del nucleótido. El mutante D338N (G4) tiene una afinidad por el nucleótido extremadamente baja y sólo a altas concentraciones de GTP llegamos a ver un poco de unión. El mutante en G3 (D270A) presenta una afinidad equivalente a la proteína nativa, pero con un valor de unión máxima inferior.

2.2.2. Ensayos de afinidad por espectrofluorescencia.

Realizamos también ensayos de afinidad por el nucleótido mediante otras técnicas alternativas como la detección mediante **espectrofluorescencia** de la unión de la proteína a nucleótidos análogos fluorescente como ya hicimos para la proteína nativa completa y su dominio G en el apartado 1.1.3. de Resultados.

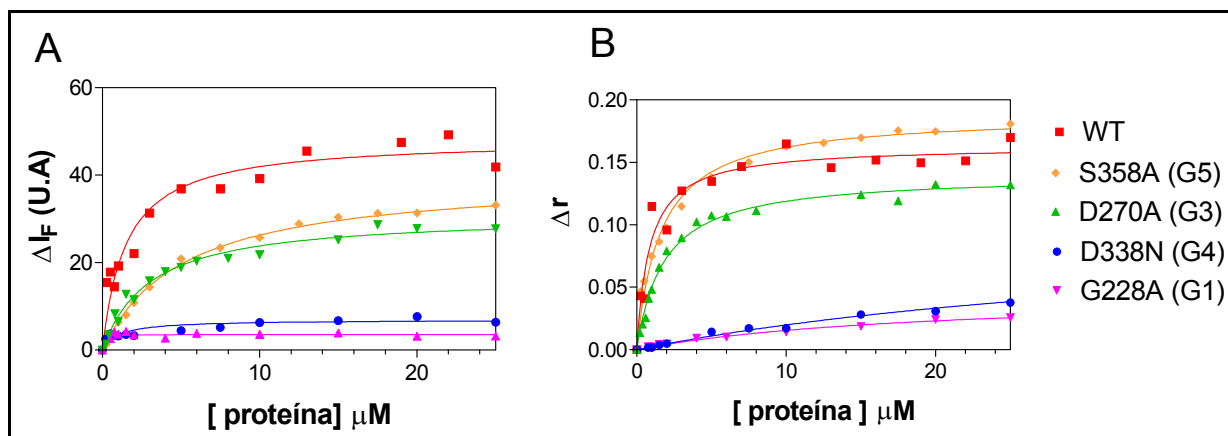


Figura 36: Ensayos de unión a mantGTP γ S (2 μ M) de la proteína MnmeE y sus derivados con mutaciones en los motivos G1 (G228A), G3 (D270A), G4 (D338N) y G5 (S358A). Los ensayos fueron realizados detectando los cambios en la intensidad (A) y la anisotropía (B) de fluorescencia.

Los resultados obtenidos mediante esta técnica son equivalentes a los observados mediante unión en filtros, lo que confirma que esta última técnica aunque no sea la mejor para calcular valores de K_d (debido a la baja afinidad de nuestra proteína), sí es válida para comparar entre distintos mutantes.

A continuación presentamos una tabla resumen con los valores obtenidos de K_d para los distintos mutantes mediante ensayos de unión en filtro y mediante la detección de cambios en la intensidad de fluorescencia y anisotropía con los análogos mant de los nucleótidos:

MnmeE	Unión a nucleótido: k_d (μ M)			Unión máxima:	
	Filtros: Unión a GTP γ ³⁵ S	Fluorescencia : unión a mant-GTP γ S	Anisotropía: unión a mant- GTP γ S	Fluorescencia: unión a mant- GTP γ S	Anisotropía: unión a mant- GTP γ S
WT	90 \pm 23	1.495 \pm 0.312	0.867 \pm 0.171	48.230 \pm 2.179	0.1633 \pm 0.005
G228A	> 3000	n.d	19.490 \pm 4.284	3.571 \pm 0.221	0.0456 \pm 0.0056
D270A	67 \pm 17	2.995 \pm 0.321	1.8140 \pm 0.133	30.960 \pm 1.002	0.1414 \pm 0.0028
D338N	~ 2800	n.d	42.140 \pm 12.74	6.928 \pm 0.483	0.1034 \pm 0.0210
S358A	-	5.113 \pm 0.2584	1.617 \pm 0.156	39.750 \pm 0.258	0.1883 \pm 0.0039

Tabla 8: Resumen de los parámetros de la afinidad de los diferentes mutantes en G1 (G228A), G3(D270A), G4(D338N), G5 (GS358A) y la proteína nativa obtenidos por ensayos de unión en filtro y espectrofluorescencia.

Analizando los datos obtenidos, observamos que el mutante **G228A** (G1), es el que presenta un efecto más drástico en la unión, estos datos son los esperables para una

mutación en la segunda glicina del motivo G1 encargada de coordinarse directamente con los fosfatos α y β del GTP (Hall, 2000). Los ensayos de unión dan valores de k_d que indican una afinidad del mutante extremadamente baja por el nucleótido y unos valores de unión máxima igualmente muy bajos en comparación con la proteína nativa.

Curiosamente el mutante en **D270A** (G3) tiene una afinidad hacia el GTP similar a la observada con la proteína nativa, mediante las técnicas de fluorescencia observamos valores de k_d ligeramente superiores pero en el mismo rango, mediante ensayos de unión en filtro se observa un valor de k_d incluso un poco más bajo que la proteína. Estos valores parecen indicar que este mutante no parece tener afectada la unión del nucleótido, lo cual difiere bastante de resultados descritos con otras GTPasas como p21^{ras}, donde la sustitución del Asp del G3 (D57) por una Ala produce una pérdida en la afinidad de la proteína por el GTP de aproximadamente 100 veces (John *et al.*, 1993).

El mutante **D338N** (G4) presenta una afinidad muy baja por el GTP, pero a diferencia del mutante G228A (G1), a altas concentraciones de GTP parece que es capaz de unir mejor el nucleótido, lo cual se aprecia en los valores de unión máxima; por intensidad de fluorescencia se alcanza 6.928 U.A frente a 48.23 U.A del WT y mediante anisotropía 0.1034 U.A frente 0.1633 U.A, mientras que para el mutante G288A los valores son bastante inferiores. Estos datos sugieren que el mutante en G4 es capaz de unir el GTP pero requiere concentraciones altas de nucleótido.

Por último, el mutante **S358A** (G5) presenta una afinidad inferior al WT, aunque dentro del mismo rango. Observamos valores de $k_d = 5.113 \mu\text{M}$ para este mutante frente a $1.495 \mu\text{M}$ del WT por intensidad de fluorescencia y $k_d = 1.617 \mu\text{M}$ frente a $0.867 \mu\text{M}$ por anisotropía de fluorescencia. Sin embargo, los valores de unión máxima son muy parecidos a los de la proteína nativa, indicando que la ausencia de este aminoácido implicado en el reconocimiento del nucleótido afecta con moderación a su afinidad, pero su capacidad de unión a altas concentraciones no parece verse afectada.

2.3. Actividad GTPasa de los mutantes de los motivos G1, G3 y G4:

Para determinar los parámetros bioquímicos de la hidrólisis de GTP se realizaron ensayos de actividad GTPasa *in vitro* mediante el método colorimétrico que cuantifica la cantidad de P_i liberado durante la hidrólisis. Cantidades fijas de las proteínas purificadas ($0.1 \text{ mg/ml} = 2 \mu\text{M}$) se incubaron con cantidades crecientes de GTP de 0 a 5 mM en

tampón GTPasa; tras incubar la mezcla de reacción 10 minutos a 37°C se midió la cantidad de P_i (Hoenig *et al.*, 1989).

En la figura 37 se representan los ensayos de actividad GTPasa de los mutantes en G1 (G288A), G3 (D270A) y G4 (D338N). Las propiedades cinéticas del mutante G5 (S358A) se analizan en el apartado 2.5 (especificidad en la unión del nucleótido). En la tabla 8, se recogen los parámetros cinéticos obtenidos:

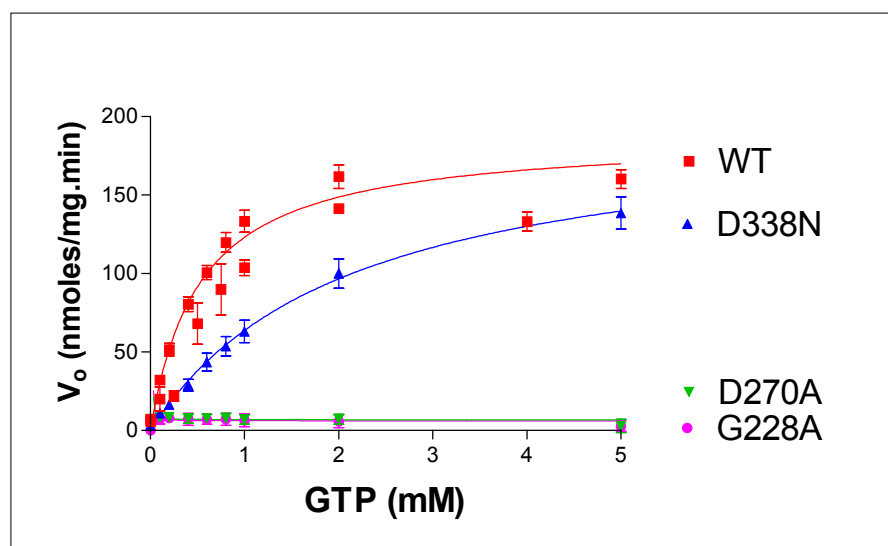


Figura 37: Ensayo de hidrólisis de la proteína MnmE y sus derivados con mutaciones en los motivos G1 (G228A), G3 (D270A) y G4 (D338N).

MnmE	Hidrólisis GTP			
	V _{max} (nmol/min.mg)	k _{cat} (min ⁻¹)	k _m (μM)	k _{cat} /k _m (min ⁻¹ .μM ⁻¹)
WT	203 ± 8.306	10,650	739.7 ± 79.1	0,0144
G228A (G1)	6.1 ± 1.3	0.3	nd	-
D270A (G3)	6.8 ± 1.2	0.4	nd	-
D338N (G4)	199.2 ± 15.3	10.5	2126 ± 326	0.005

Tabla 9: Constantes cinéticas de la proteína nativa y los mutantes en los motivos G1, G3 y G4.

Como puede observarse en la figura 37 los mutantes en G1 (G288A) y G3 (D270A) son incapaces de realizar la hidrólisis del GTP. Para el mutante **G228A (G1)** el resultado es esperable ya que habíamos observado con anterioridad que no era capaz de unir el GTP

y esta incapacidad de unir el nucleótido, es sin duda, la responsable de los niveles de hidrólisis infinitamente bajos que observemos.

En cambio, el mutante **D270A (G3)** es capaz de unir el nucleótido y sin embargo no lo hidroliza, indicándonos que el residuo D270 es esencial para la hidrólisis del GTP. Si la función del residuo D270 en MnmE es equivalente al de otras GTPasas, debe estar implicado en la unión del Mg^{2+} vía una molécula de H_2O y nuestros datos sugieren que la mutación D270A no debe impedir la unión de la molécula de GTP pero sí su hidrólisis por lo que es posible que esta mutación impida la correcta coordinación del Mg^{2+} .

Curiosamente el mutante **D388A (G4)** es capaz de hidrolizar el GTP con una eficacia equivalente al WT; obtenemos valores de V_{max} de 199.2 para el mutante frente 193.1 del WT (en nmoles/min.mg), sin embargo la k_m es significativamente superior (2116 μM frente a 511 μM). Estos datos indican que este mutante requiere de una concentración alta de sustrato para alcanzar la velocidad en el punto medio de la V_{max} , lo cual significa que a pesar de ser capaz de hidrolizar con la misma actividad que la WT, presenta un problema de afinidad hacia el nucleótido. Esta observación ya había sido detectada claramente con los ensayos de unión a nucleótido donde obteníamos valores de k_d para D388N muy bajos.

2.4. Formación del complejo proteína-mantGDP-AIF_x:

El ensayo de sensibilidad al AIF_x no aporta nueva información sobre las propiedades de los mutantes, pero confirma los datos obtenidos hasta el momento y demuestra, de una forma visual y rápida, las características de los mutantes obtenidos respecto a la capacidad de unión del nucleótido y la formación del estado de transición previo a la hidrólisis.

El ensayo se realiza como ya se ha explicado en el apartado 1.1.5 de Resultados; partimos de 2 μM del nucleótido fluorescente mant-GDP y añadimos 10 μM de la proteína correspondiente, en el caso de que la proteína mutante sea capaz de unir el nucleótido se forma un complejo proteína-nucleótido cuya intensidad de fluorescencia es significativamente superior a la intensidad de fluorescencia del nucleótido libre. Posteriormente, se añade NaF 10 mM y $AlCl_3$ 70 μM , si la proteína es capaz de hidrolizar el nucleótido se formará el complejo análogo al estado de transición entre la proteína, el nucleótido mant y el AIF_x. Este complejo tripartito también tiene una intensidad de fluorescencia mayor además de un desplazamiento de la longitud de onda máxima de 445 del nucleótido libre a 435 nm.

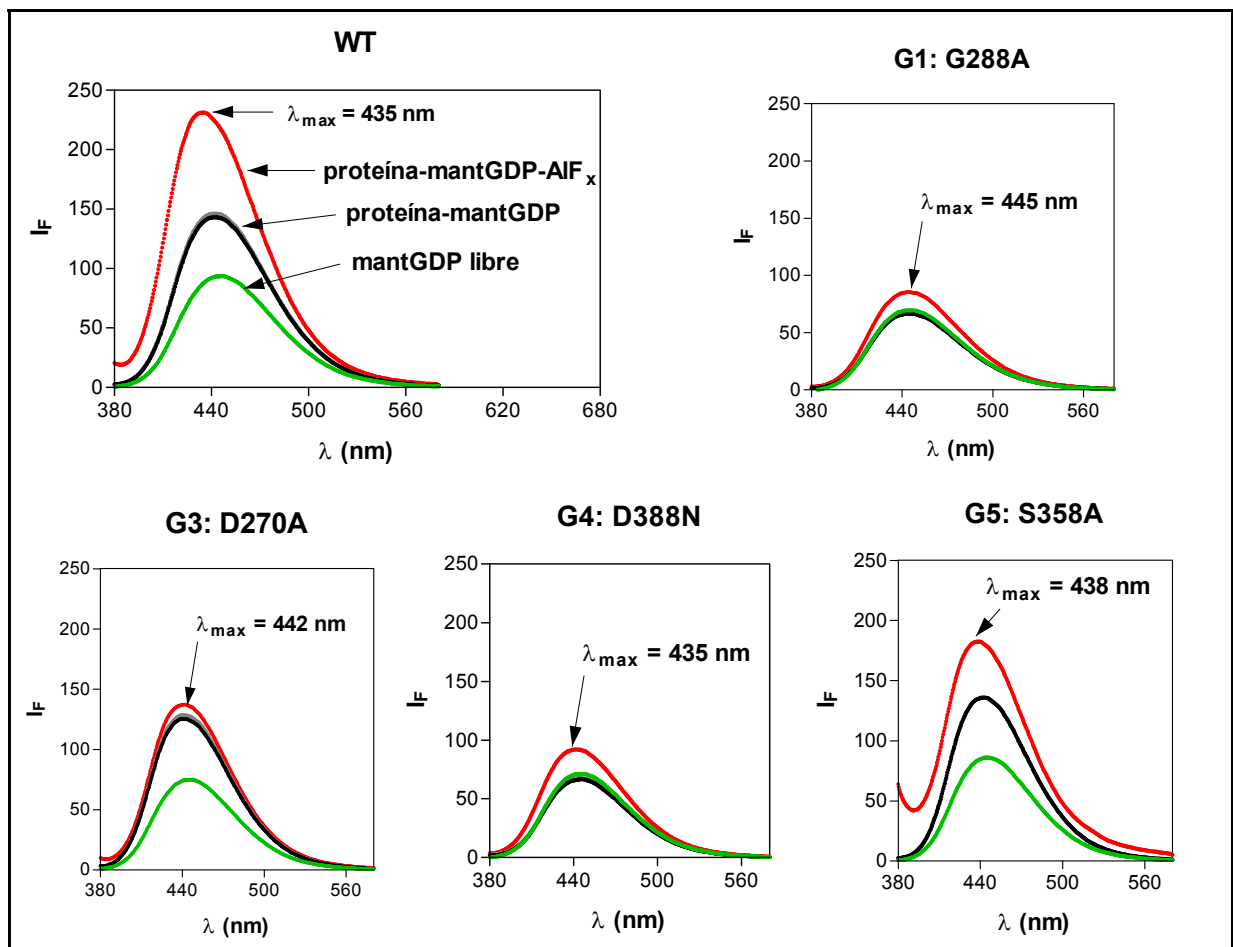


Figura 38: Ensayos de sensibilidad a AIF_x. La muestra inicial contiene 2 μM de mantGDP (espectro verde) y se añade secuencialmente 10 μM de proteína (espectro negro), 10 mM de NaF (espectro gris) y 70 μM de AlCl₃ (espectro rojo).

Como puede observarse en la figura 38, el mutante G1 (G288A) no es capaz de unir, por tanto, no forma el complejo proteína-nucleótido, obteniéndose un espectro equivalente antes y después de haber añadido la proteína. Al agregar el NaF + AlCl₃ apenas existe un incremento de la I_F, pudiendo considerarse este valor de ΔI_F como intrínseco de la adición de AlCl₃ y blanco para el resto de los mutantes.

El mutante del motivo G3 (D270A) es capaz de unir el nucleótido y por tanto vemos la formación del complejo proteína-mantGDP (diferencia entre el espectro verde y el negro); sin embargo, no presenta actividad GTPasa y por tanto no esperamos observar la formación del complejo, ya que si no se alcanza el estado de transición no hay hidrólisis (diferencia entre el espectro negro y el rojo).

El mutante en G4 (D388A) prácticamente no presentaba capacidad de unión en los ensayos en filtro y mediante fluorescencia y sin embargo tiene capacidad GTPasa, especialmente a altas concentraciones de GTP, por lo que necesariamente debe ser capaz de unir el nucleótido aunque con dificultades. En el ensayo de sensibilidad al AIF_x el mutante en G4 se llevo a cabo con 2 μM de mantGDP como con el resto de proteínas, pero esta concentración es probablemente insuficiente para las propiedades de este mutante, por lo que observamos que parece comportarse de forma similar al mutante en G1: no forma complejo con la proteína y al parecer tampoco parece que forme complejo con el AIF_x. Sin embargo, existe un diferencia importante entre ambos espectros, en el mutante G4 la λ_{\max} del espectro se encuentra a 435 nm, igual que en la proteína nativa, indicando que ha habido un desplazamiento desde la λ_{\max} del nucleótido libre (445 nm) a la λ_{\max} característica de la formación del complejo proteína-mantGDP-AIF_x (435 nm). Además, si dejamos incubando la muestra, vemos que tras 2 horas, la I_F aumentado 24 unidades más, mientras que con los mutantes en G1 y G3 se mantiene el mismo valor y la λ_{\max} no se desplaza. Estos datos indican que este mutante, aunque con dificultad, es capaz de unir el nucleótido mantGDP y formar el estado de transición previo a la hidrólisis que permite explicar la actividad GTPasa observada en los ensayos de hidrólisis del GTP.

Por último el mutante G5, como era esperable, es capaz de unir el nucleótido y formar el estado de transición, aunque a esta concentración de nucleótido parece que no alcanza el estado de transición con la misma eficacia que la proteína nativa.

2.5. Especificidad del motivo G4 y G5 en la unión al nucleótido:

Para confirmar el papel del motivo G4 y G5 en la especificidad por el nucleótido se estudió la afinidad de los mutante D388N (G4) y S358A (G5) por el nucleótido XTP (xantosina trifosfato). Este nucleótido es equivalente al GTP pero en la posición 2 de la base contiene un grupo cetónico en lugar de una amina, transformando el grupo guanina en xantina (ver figura 39).

La función del motivo G4 es crear un bolsillo hidrofóbico permitiendo a la base guanina ser estabilizada mediante puentes de hidrógeno, concretamente se forman dos puentes de hidrógeno entre el grupo ácido carboxílico de la cadena lateral del Asp (D) y la base de guanina, estas interacciones son las responsables de la alta especificidad de la proteína hacia los nucleótidos de guanina.

Además los residuos del G5 (S/CAK/L/T) ayudan, mediante la formación de más puentes de hidrógeno, en la estabilización de la base del nucleótido y en la especificidad del reconocimiento.

Al realizar la mutación D338N se cambia un residuo de Asn (con un grupo COO^- en su cadena lateral) por otro de Asn (N) (con un grupo amida CONH_2^-), este cambio produce una bajada de la afinidad de la proteína D338N por el GTP y un incremento de la afinidad por el XTP, ya que este nucleótido similar al GTP pero con un grupo ceto en la posición 2 de la base, el cual restituye el doble puente de hidrogeno existente entre la base y el residuo.

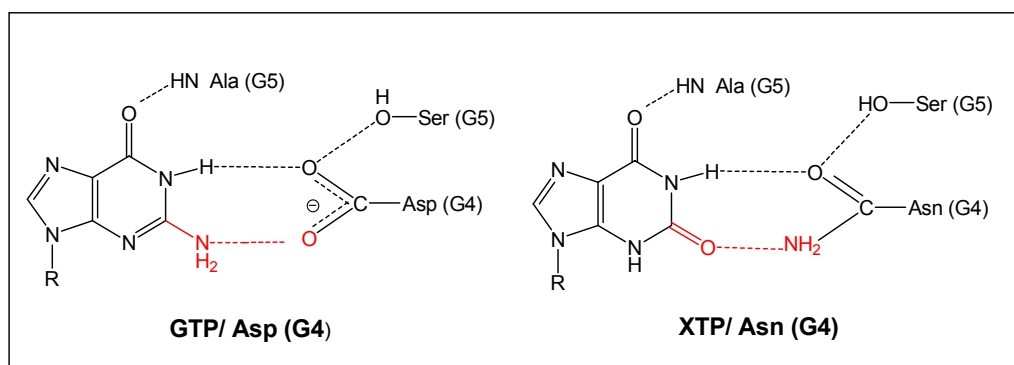


Figura 39: Comparación de la unión de la guanina del GTP al aspártico de G4 (Asp) (izquierda de la figura) y la xantósina del XTP a la asparragina (Asn) (derecha de la figura).

Otros autores habían ya demostrado la función del residuo de aspártico del motivo G4 en la especificidad por el nucleótido mediante la sustitución del aspártico del G4 por asparragina y la consiguiente comparación de la actividad de ambas proteínas por proteínas por GTP y XTP (Kjeldgaard *et al.*, 1996; Praefcke *et al.*, 1999; Yu *et al.*, 1997).

Nuestro objetivo es estudiar si los motivos G4 y G5 también realizan esta función en la proteína MnME, para ello se realizaron las mutaciones D338N (G4) y S358A (G5) con el fin de estudiar si este cambio afectaba a las propiedades bioquímicas de la proteína y a la especificidad del reconocimiento de la guanina, realizando ensayos de actividad GTPasa de los mutantes con los nucleótidos GTP y XTP y comparando las actividades con la proteína nativa.

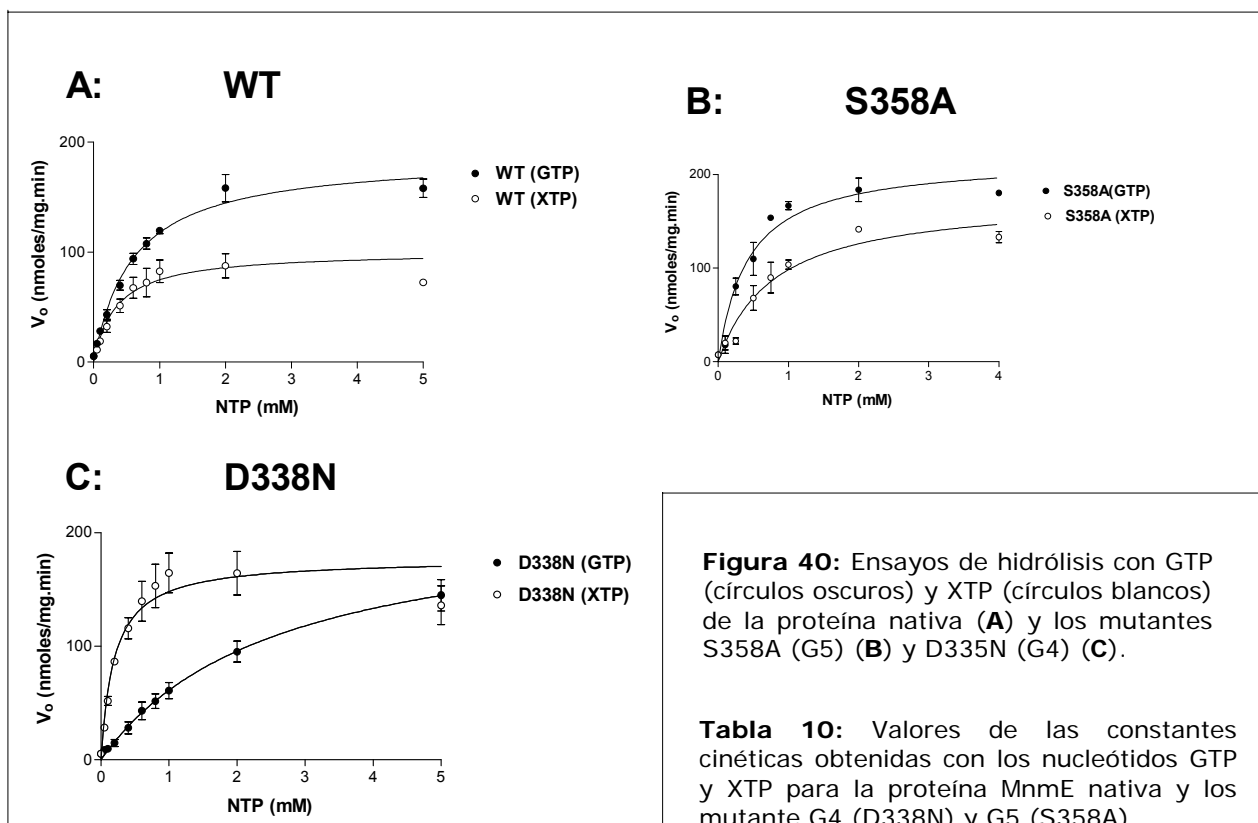


Figura 40: Ensayos de hidrólisis con GTP (círculos oscuros) y XTP (círculos blancos) de la proteína nativa (A) y los mutantes S358A (G5) (B) y D338N (G4) (C).

Tabla 10: Valores de las constantes cinéticas obtenidas con los nucleótidos GTP y XTP para la proteína MnME nativa y los mutante G4 (D338N) y G5 (S358A).

MnME		Hidrólisis			
		V_{max} (nmol/min.mg)	k_{cat} (min ⁻¹)	k_m (μ M)	k_{cat}/k_m (min ⁻¹ . μ M ⁻¹)
WT	GTP	193.1 ± 7.1	10.2	511 ± 53	0.020
	XTP	100.8 ± 8.9	5.3	346 ± 95	0.015
D253A	GTP	192.2 ± 15.3	10.5	2126 ± 326	0.005
	XTP	180.4 ± 11.9	9.5	206 ± 50	0.046
S358A	GTP	208.60 ± 13.35	11.02	384 ± 82.50	0.028
	XTP	192.87 ± 19.29	10.19	1162 ± 265.1	0.009

Como puede observarse en la tabla 10, el mutante **D338N** es capaz de hidrolizar el XTP con una eficacia similar a la que presenta por el GTP: k_{cat} (XTP) = 9.5 min⁻¹ frente a k_{cat} (GTP) = 10.5 min⁻¹, lo cual indica que el mutante D338N no tiene afectado el mecanismo de hidrólisis. Sin embargo, la K_m para la hidrólisis del XTP es 10 veces superior a la observada para la hidrólisis de GTP (206 frente 2126 μ M respectivamente) lo cual apoya la idea de que la afinidad del D338N por el XTP es mayor que por el GTP,

confirmando así el papel del residuo D338 del tetrapéptido NKDA en la unión específica de la guanina.

Curiosamente la constante de especificidad (K_{cat}/K_m) para el XTP y GTP mostrada por la proteína MnmE nativa son muy similares ($0.02 \mu\text{M}^{-1}\text{min}^{-1}$) lo cual sugiere que MnmE une XTP mejor de lo esperado. Normalmente la afinidad de la proteína GTPasa nativa por el GTP es significativamente superior que la del XTP por las características del doble puente de hidrógeno entre el Asp del G4 y la base guanina. Por tanto, esto nos puede hacer pensar que en la proteína MnmE nativa pueden existir algunos residuos, que contribuyen a la unión del XTP y compensan la falta de enlaces entre el Asp 338 y el XTP.

Uno de estos residuos que pueden ayudar a la estabilización del nucleótido es el residuo de serina del motivo G5. Los resultados experimentales demuestran que la sustitución de la serina del G5 por alanina (**S358A**) no influye especialmente en las propiedades de hidrólisis de la proteína frente al nucleótido GTP, ya que las constantes cinéticas del mutante S358A son muy similares a las de la proteína MnmE nativa; la V_{max} y K_{cat} son prácticamente equivalentes, aunque debemos destacar que la $k_m(\text{GTP})$ es ligeramente inferior en el mutante S358A frente al WT: $384 \mu\text{M}$ respecto a $511 \mu\text{M}$. A la vista de estos resultados, todo parece indicar que la serina, por si sola, no es capaz de modificar la especificidad de la unión al nucleótido, aunque probablemente colabora en su estabilización. La ausencia de la cadena lateral de la serina y de su grupo hidroxilo polar, no afecta significativamente las propiedades de hidrólisis, por lo que podemos esperar que en el caso de producirse un puente de hidrógeno entre el grupo OH de la serina y el COOH del aspártico, éste se produzca igualmente desde otro átomo de hidrógeno en el mutante S358A, aunque también debemos considerar que la ausencia de este puente de hidrógeno pueda no afectar a la estabilidad del conjunto proteína/GTP hasta el punto de afectar la capacidad hidrolítica de la proteína.

Por otro lado, basándonos en los datos estructurales de otras proteínas GTPasas y en las diferencias químicas entre los dos nucleótidos no esperamos encontrar grandes diferencias en las propiedades bioquímicas al comparar la actividad hidrolítica del mutante S3358A con GTP y XTP. Pensamos que la presencia de un residuo de serina o alanina en el motivo G5 no debe afectar especialmente al reconocimiento de la base xantosina frente a guanina y, por tanto, a la hidrólisis ya que la interacción del residuo de serina es con el aspártico del G4 y no directamente con la base del nucleótido. Evidentemente, MnmE no debe necesariamente presentar una estructura similar a otras GTPasa clásicas descritas, especialmente si pensamos que la proteína presenta unas propiedades bioquímicas que las diferencia de la mayoría de GTPasas clásicas y estas diferencias deben estar fundamentadas en diferencias estructurales.

Al estudiar los datos experimentales, se observan valores de V_{\max} y k_{cat} equivalentes con ambos nucleótidos, sin embargo la k_m que presenta el mutante S358A por XTP es bastante más alta que la que presenta por GTP, reflejando la preferencia de la proteína mutante hacia el nucleótido de guanosina. Este valor de k_m es también significativamente superior al que presenta la proteína WT por el XTP, indicándonos que de alguna forma, el cambio del residuo de serina por alanina sí afecta al reconocimiento e interacción del nucleótido y por tanto este residuo debe de alguna forma participar en la estabilización del nucleótido entrante.

En conclusión podemos afirmar que los residuos conservados de los motivos G4 y G5 tienen como función ayudar al reconocimiento específico del nucleótido mediante interacciones con su base nitrogenada. El cambio D338N confirma el papel decisivo de este aminoácido en la especificidad de la unión y el cambio S358A indica que este aminoácido del motivo G5 probablemente también participa en la estabilización. Debemos remarcar la inusual afinidad que la proteína MnmE nativa parece presentar por el XTP y proponemos hacer estudios futuros más detallados de unión a mantXTP para dilucidar este peculiar comportamiento.

3. Motivo G2:

3.1. Análisis mutacional del motivo G2 de MnmE:

El motivo G2 de las GTPasas se localiza en el switch I del dominio G. En las proteínas tipo Ras este motivo forma el loop efector, la región que junto al switch II, reorienta su posición tras el cambio conformacional y permiten la interacción de la GTPasa con sus moléculas efectoras o dianas moleculares. Este es el mecanismo a través del cual las GTPasas clásicas actúan como interruptores moleculares porque la unión del GTP permite la transmisión de una señal mediante la interacción con su efector.

No existe una secuencia consenso para el motivo G2 en la superfamilia de GTPasas a excepción de una treonina invariable, el resto del motivo únicamente conserva su secuencia dentro de una misma familia de GTPasas. La treonina conservada es esencial para la actividad GTPasa de la proteína ya que su grupo hidroxilo se coordina directamente al Mg^{2+} y al fosfato γ del GTP, además juega un papel fundamental en la dinámica del cambio conformacional.

En MnmE localizamos el motivo G2 como ²⁴⁹**GTTRD**, la secuencia presenta un grado de conservación absoluto, estando presente sin variaciones en todas las proteínas homólogas, lo que fuertemente sugiere que este motivo caracteriza a la familia de las proteínas MnmE.

	G2
<i>E.coli</i> :	LAGREAAIVTDIAG GTTRD VLREHIHID
<i>S.typhimurium</i> :	LAGREAAIVTDIAG GTTRD VLREHIHID
<i>B.subtilis</i> :	LVHEAKAIVTDIP GTTRD VIEEYVNR
<i>S.pneumoniae</i> :	LLREDKAIVTDIAG GTTRD VIEEYVNIN
<i>T.marítima</i> :	LLNEDRAIVTDIP GTTRD VISEEIVIR
<i>C.crescentus</i> :	LAERDAAIVTDVAG GTTRD VIEVPLVLG
<i>S.pombe</i> :	LANRRI SIVSPQSG GTTRD AIEVLVDIN
<i>S.cerevisiae</i> :	LTNDDI SIVSDIP GTTRD SIDAMINVN
<i>C.caldarium</i> :	IAKRECSIVTNFP GTTRD IVSFETMLG
<i>C.elegans</i> :	LAHDDVAIVSSIP GTTRD SLETI IQIN
<i>H.sapiens</i> :	LSRKPV SIVSPEP GTTRD VLETPVDLA
<i>M.musculus</i> :	LSQKPV SIVSPEP GTTRD VLETPVDLA

Figura 41: Fragmento de la secuencia (incluyendo la región del motivo G2) de 12 proteínas homólogas de MnmE, desde *E. coli* hasta humanos donde se puede apreciar la conservación del motivo G2.

Realizamos una análisis mutacional de los residuos del motivo G2 para estudiar el papel de esta región en las propiedades de la proteína MnmE. Existen numerosos estudios de mutagénesis de la treonina del G2 y sus efectos en la unión/hidrólisis del nucleótido, unión al efector, afinidad por Mg^{2+} y funcionalidad de la proteína: (Ahmadian *et al.*, 1995; Lin *et al.*, 2001), (John *et al.*, 1993; Spoerner *et al.*, 2001).

En Ras, cuando esta treonina es cambiada a alanina (Ras-T35A) se observa un descenso en la afinidad por el nucleótido y la imposibilidad de que la proteína sea activada por la GAP debido probablemente a la incorrecta coordinación del átomo de Mg^{2+} (John *et al.*, 1993). Además el mutante T35A presenta un descenso drástico de la afinidad por algunos de sus efectores (Raf-RBD, RaIGDS-RBD y AF6-RBD) (Spoerner *et al.*, 2001). Curiosamente, la sustitución de la treonina por serina (T35S), la cual presenta el mismo grupo hidroxilo en la cadena lateral pero carece de un grupo metilo presente en la treonina, no es capaz de recuperar las propiedades de la proteína, demostrando la esencialidad del residuo de treonina y la imposibilidad de ser sustituido por ningún otro aminoácido (Spoerner *et al.*, 2001).

El motivo G2 de MnmE contiene dos treoninas consecutivas, por lo que inicialmente desconocíamos cual de las dos era la responsable de coordinarse con el Mg^{2+} y el fosfato γ del GTP, así que cambiamos estas dos treoninas (T250 y T251) a alanina y serina, tanto por separado como conjuntamente (dobles mutantes). Igualmente mutamos el resto de los residuos del motivo a alanina y estudiamos los efectos de todos estos cambios en las propiedades bioquímicas y funcionales de la proteína.

Obtuvimos los siguientes mutantes en el motivo G2: T250A, T250S, T251A, T251S, T250A/T251A, T250S/T251S, G249A, R252A y D253A. Los alelos mutantes se obtuvieron por mutagénesis dirigida sobre el plásmido pIC684 (pGEX2T-MnmE); las proteínas correspondientes se purificaron fusionadas a GST y posteriormente fueron digeridas con trombina recuperando la proteína MnmE con la mutación y un tamaño aproximado de 53 kDa. Todas las proteínas fueron purificadas según el protocolo descrito en materiales y métodos (apartado 4.2 de Materiales y Métodos) excepto el doble mutante T250A/T251A, el cual es altamente insoluble por lo que hubo que cambiar las condiciones de expresión y purificación, tal y como se indica en el correspondiente apartado de Materiales y Métodos.

3.2. Unión y afinidad por nucleótidos:

Se estudió la capacidad de unión de los mutantes del motivo G2 a GTP por distintas técnicas, según se describe a continuación.

Se analizó la afinidad por nucleótidos de los mutantes mediante ensayos de unión a filtro con el análogo $\text{GTP-}\gamma\text{-}^{35}\text{S}$ (datos no mostrados), proteólisis limitada (datos no mostrados) y ensayos de unión al análogo fluorescente $\text{mantGTP}\gamma\text{S}$ (figura 41). Como ya habíamos observado anteriormente con los mutantes en G1, G3 y G4, de nuevo los ensayos mediante las tres técnicas dan resultados equivalentes, demostrando en ambos casos que todos los mutantes del motivo G2 son capaces de unir GTP y mantienen intacta la afinidad por este nucleótido (ver tabla 11).

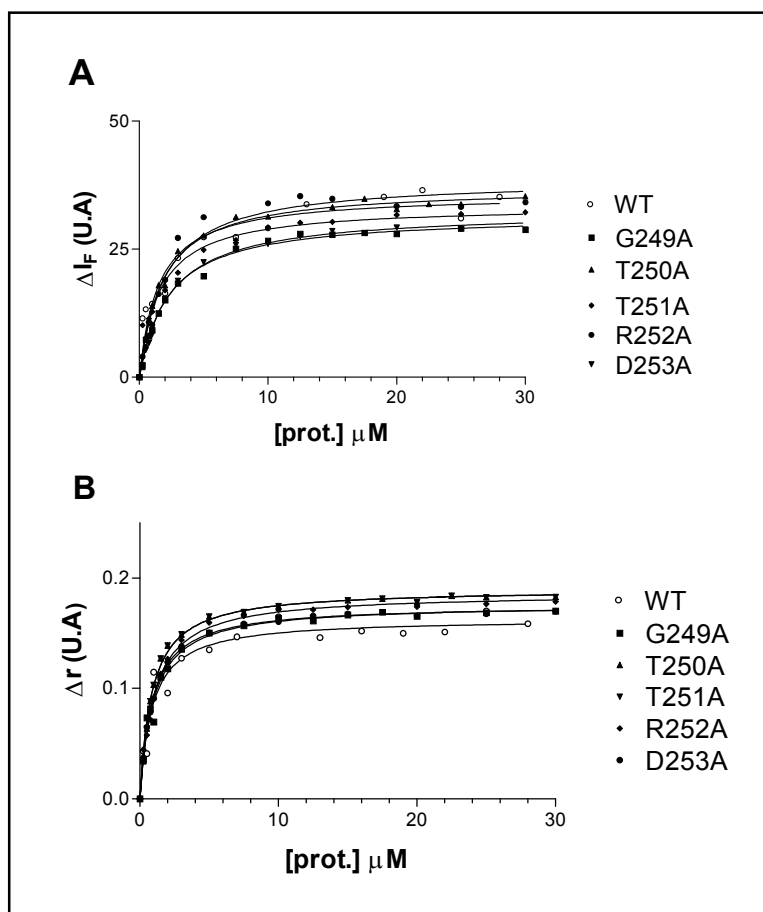


Figura 42: Ensayos de unión a $\text{mantGTP}\gamma\text{S}$ ($2\mu\text{M}$) de todos los mutantes del motivo G2 y la proteína nativa mediante el seguimiento de la intensidad de fluorescencia (A) y la anisotropía de fluorescencia (B).

A continuación se resumen los valores de k_d obtenidos mediante intensidad y anisotropía de fluorescencia para los mutantes del motivo G2:

MnmE	Unión a mantGTP γ S: k_d (μ M)	
	Fluorescencia	Anisotropía
WT	1.5140 \pm 0.2863	0.8869 \pm 0.1664
G249A	2.265 \pm 0.0147	0.9596 \pm 0.0783
T250A	1.767 \pm 0.1198	0.8572 \pm 0.0382
T251A	1.677 \pm 0.1257	1.4830 \pm 0.0480
R252A	1.965 \pm 0.271	0.9976 \pm 0.0472
D252A	2.350 \pm 0.1330	0.8841 \pm 0.0188

Tabla 11: Tabla resumen de los valores de k_d (μ M) de los mutantes del motivo G2.

Los valores obtenidos por espectrofluorescencia para todos los mutantes G2 son equivalentes y las pequeñas variaciones observadas no son significativas, por lo que podemos concluir que todos los mutantes de este motivo mantienen la misma afinidad por GTP que la proteína nativa.

3.3. Actividad GTPasa de los mutantes en G2:

3.3.1. Ensayos de actividad GTPasa:

Realizamos ensayos de la actividad GTPasa de las proteínas mutantes detectando la liberación del fosfato libre producido durante la hidrólisis del GTP mediante el ensayo colorimétrico con verde de malachita (ver apartado 6 de Materiales y Métodos).

En la siguiente figura se observa la hidrólisis del GTP de los 5 residuos del motivo G2 (GTTRD) sustituidos por alaninas:

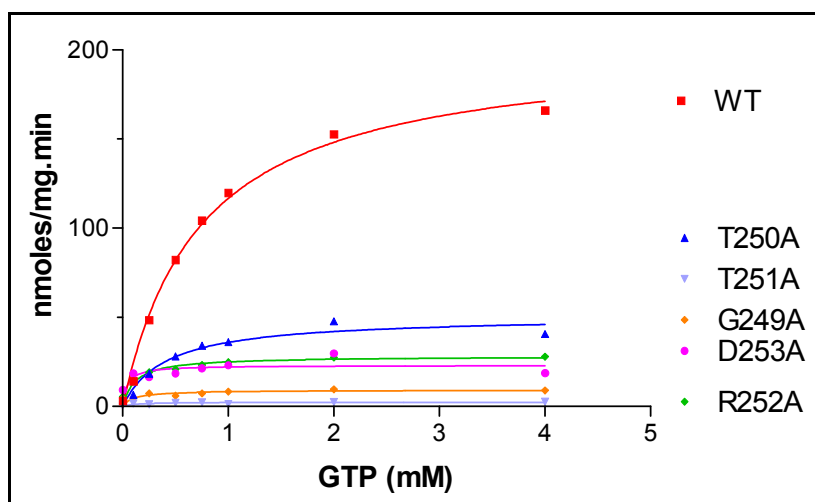


Figura 43: Ensayo de actividad GTPasa de los mutantes del motivo G2.

En la siguiente tabla se recogen los parámetros cinéticos para todos los mutantes del motivo G2 sustituidos por alanina:

PROTEÍNAS	V_{max} (molesl/mg.min)	K_{cat} (min^{-1})	K_m (μM)	K_{cat}/K_m ($min^{-1}\mu M^{-1}$)
WT	203.00 \pm 8.31	10,834	754 \pm 79.14	0,0143
G249A	9.01 \pm 1.36	0,477	105 \pm 19.5	0,0045
T250A	50.58 \pm 4.26	2,924	497 \pm 15.13	0,0059
T251A	2.22 \pm 0.34	0,111	12.70 \pm 5.66	0,0087
R252A	27.99 \pm 1.74	1,479	119.1 \pm 4.00	0,0124
D253A	22.97 \pm 3.12	1,281	57.17 \pm 10.79	0,0224

Tabla 12: Constantes cinéticas de los mutantes de G2.

Como puede apreciarse, al mutagenizar el motivo G2 se produce un descenso generalizado de la capacidad de hidrólisis de la proteína. Todos los mutantes presentan la capacidad de unión al GTP intacta, por lo que las mutaciones G2 afectan a nivel de la hidrólisis del GTP pero no de su unión; este efecto es similar al observado con el mutante G3 (D270A) (ver apartado 2.3 de Resultados).

Dependiendo del residuo cambiado, el grado de inactivación es diferente. La mutación de la primera treonina (T250A) es la que produce un menor descenso en la actividad GTPasa quedándose con una V_{max} de 50.58 nmoles/mg.min (k_{cat} 2,924 min^{-1}), correspondiente a un 27 % de la V_{max} de la proteína nativa. El cambio en la segunda treonina (T251A) es la mutación que produce una inactivación más drástica de la actividad, obteniéndose unos valores prácticamente nulos. El doble mutante T250A/T251A no presenta actividad GTPasa detectable. Estos resultados apuntan hacia la segunda treonina (T251) como el residuo que directamente se coordina al fosfato γ del GTP y al Mg^{2+} ya que su sustitución deja a la proteína sin capacidad hidrolítica.

El resto de residuos del dominio también sufren un descenso muy acusado de la actividad GTPasa de la proteína; el mutante G249A prácticamente no presenta actividad GTPasa y con los mutantes R252A y D253A obtenemos valores de V_{max} y K_{cat} inferiores al 15% de la nativa.

3.3.2. Formación del complejo proteína-mantGDP-AIF_x:

Mediante el análogo fluorescente del GDP y la formación del complejo con AIF_x podemos estudiar y confirmar las propiedades de los mutantes del motivo G2 para la unión y la formación del estado de transición previo a la hidrólisis.

El ensayo de sensibilidad al AIF_x se realiza partiendo de mantGDP (2 μM) al que añadimos la proteína mutante correspondiente (10 μM); si existe unión, inmediatamente vemos el incremento de la intensidad de fluorescencia del nucleótido, a continuación añadimos NaF 10 mM y AlCl₃ 70 μM. Sólo cuando la proteína es activa y capaz de realizar el cambio conformacional previo a la hidrólisis se puede formar el complejo proteína-mantGDP- AIF_x observándose un importante incremento de la intensidad de fluorescencia de la muestra.

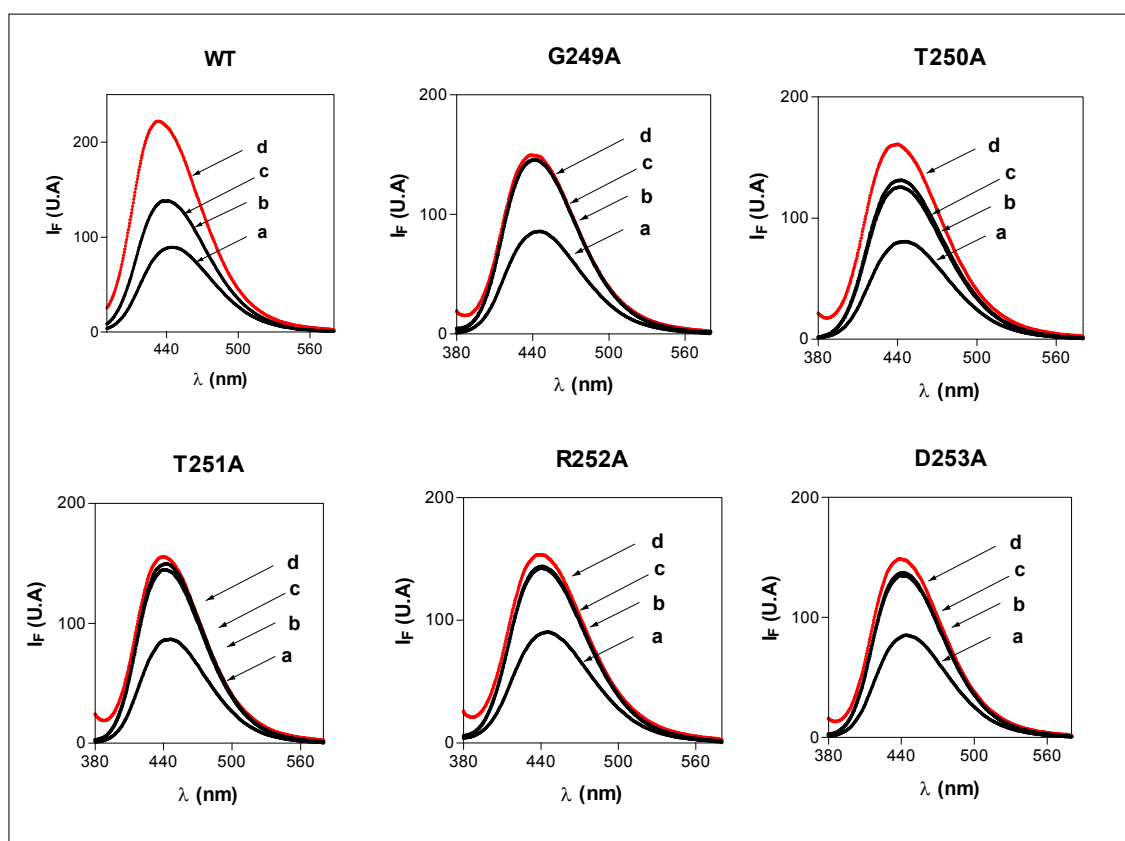


Figura 44: Ensayos de sensibilidad a AIF_x. La muestra inicial contiene 2 μM de mantGDP (a) y se añade secuencialmente 10 μM de proteína (b), 10 mM de NaF (c) y 70 μM de AlCl₃ (d, en rojo).

Al realizar este ensayo con los mutantes de G2 vemos que todos ellos son capaces de unir el nucleótido (comparar espectro "a" con "b" en la figura 44); sin embargo, son incapaces de formar el complejo con el AIF_x (d) como lo realiza la proteína MnmE nativa

(con un incremento del 36% de la intensidad de fluorescencia a los 15 minutos de haber añadido el AlCl_3); únicamente el mutante T250A, el cual es el que presenta más actividad GTPasa de todos los mutantes de G2, presenta también un incremento aproximado del 18.6% de la intensidad de fluorescencia mientras que el resto de los mutantes que no presentan prácticamente actividad GTPasa no sufren este incremento. Los mutantes R252A y D253A aumentan un 6.2% y un 7.8% respectivamente la intensidad de fluorescencia, mientras los mutantes G249A y T251A (los que menos actividad GTPasa tienen) presentan un incremento inferior al 4% en ambos casos.

Comparando estos resultados con los datos de los ensayos de hidrólisis también podemos afirmar que la actividad GTPasa observada depende de la capacidad para alcanzar el estado de transición. Por tanto, podemos concluir que los residuos del motivo G2, cuando son cambiados a alanina, las correspondientes proteínas mutantes presentan un descenso generalizado en la actividad GTPasa y en especial la mutación T251A inactiva la capacidad hidrolítica de MnME.

3.4. Cambio Thr → Ser:

Estudiamos también el cambio de las treoninas a serinas porque se ha demostrado para otras GTPasas que la treonina invariable del G2 no puede ser sustituida por ningún otro aminoácido incluyendo un residuo de serina (John *et al.*, 1993). El cambio Thr → Ser es funcionalmente conservativo porque mantiene el grupo hidroxilo de la cadena lateral pero no incluye el grupo metilo que presenta la treonina y está ausente en la serina.

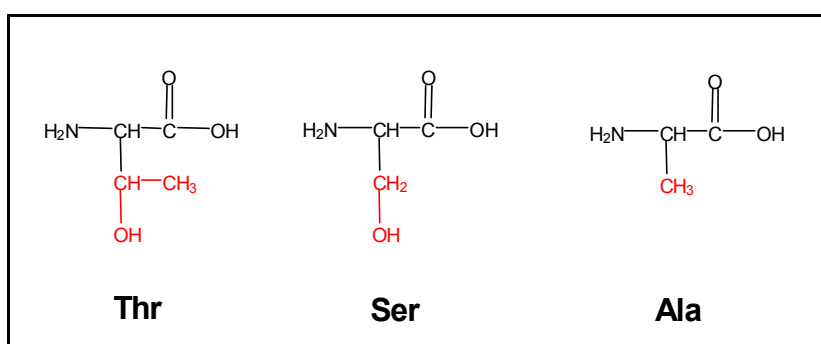


Figura 45: comparación de las cadenas laterales de la Thr, Ser y Ala.

En la siguiente figura se representa las curvas de hidrólisis comparativas de las mutaciones de treonina a alanina y serina:

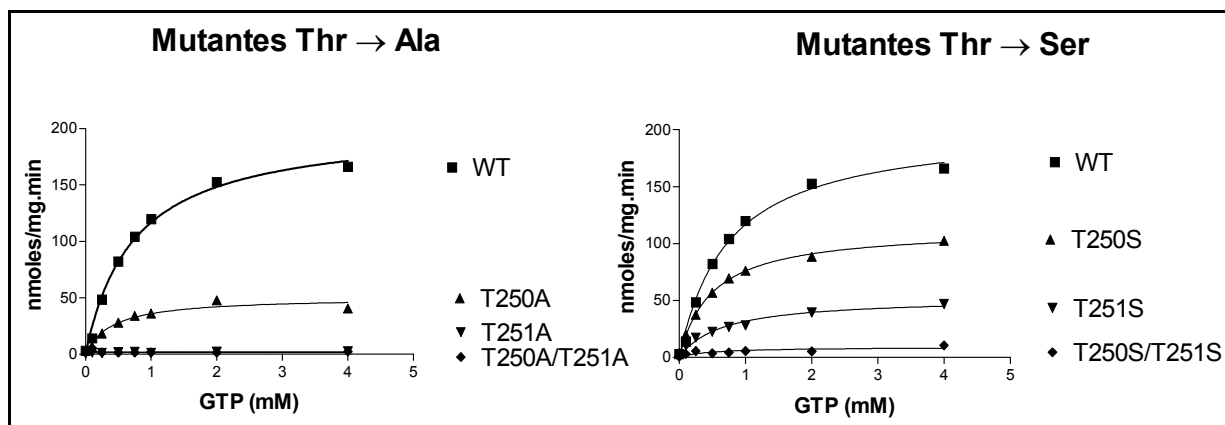


Figura 46: Comparación de la actividad GTPasa de los mutantes de treonina a alanina y serina.

Cuando las treoninas son reemplazadas por serinas se observa una recuperación parcial de la actividad GTPasa en comparación con las mismas sustituciones por alanina.

El mutante T251A no presenta actividad, sin embargo el mutante T251S alcanza una tasa de hidrólisis del 27% respecto a la velocidad máxima del WT.

El mutante T250S también presenta el mismo aumento proporcional de la actividad GTPasa respecto al T250A: k_{cat} (T250A) = 2,924 min^{-1} y k_{cat} (T250S) = 6.016 min^{-1} (aumento del 27 al 55.5% respecto a la actividad GTPasa máxima del WT).

El doble mutante T250S/T251S apenas presenta actividad GTPasa, pero llega a ser detectable, a diferencia del doble mutante con argininas cuya hidrólisis no se podía detectar. Además durante la expresión y purificación no presenta las dificultades que se observaban con MnmE-T250A/T251A, en este caso la proteína es soluble y se purifica sin dificultad.

En la siguiente tabla se muestran las constantes cinéticas de los mutantes de las treoninas mutagenizadas a alanina y serina:

PROTEÍNAS	V_{max} (moles/mg.min)	K_{cat} (min^{-1})	K_m (μM)	K_{cat}/K_m ($\text{min}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$)
WT	203.00 ± 8.31	10,834	754 ± 79.14	0,0143
T250A	50.58 ± 4.26	2,924	497 ± 15.13	0,0059
T250S	113.5 ± 2.614	6.016	494.4 ± 17.05	0.0121
T251A	2.22 ± 0.34	0,111	12.70 ± 5.66	0,0087
T251S	52.32 ± 3.53	2.772	645.80 ± 12.67	0.0043
T250A/T251A	nd	nd	nd	nd
T250S/T251S	9.08 ± 2.19	0.483	464.0 ± 36.29	0.0010

Figura 13: Comparación de los parámetros cinéticos de las proteínas mutantes en las treoninas del G2 cambiadas a serina y alanina.

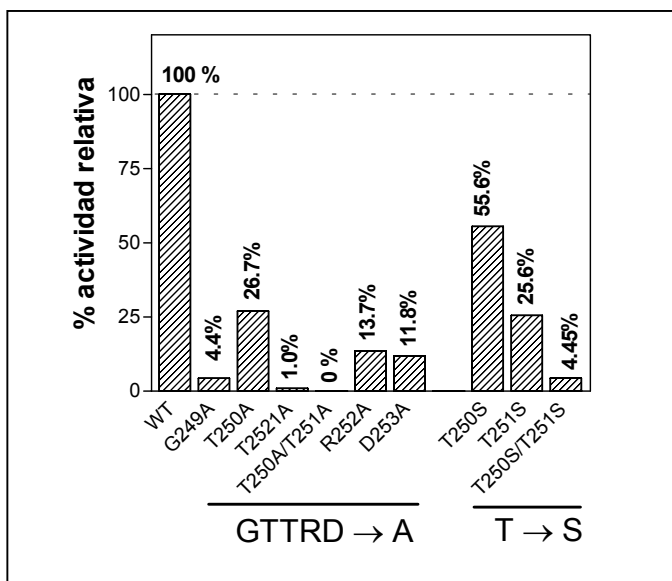


Figura 47: Actividad relativa de los mutantes del motivo G2 cambiados a alanina y a serina.

La figura 47 representa la actividad GTPasa relativa a la proteína nativa de los mutantes en G2 (considerando el 100% la actividad de la proteína sin mutaciones); se puede apreciar el incremento de la actividad GTPasa cuando introducimos en la posición de la treonina 250 y 251 una serina en lugar de una alanina.

Estas mismas propiedades en la hidrólisis de los mutantes de la treonina del G2 ya se habían visto con otras proteínas. En Ras se estudió el efecto con las mutaciones T35A y se observó una disminución en la actividad GTPasa intrínseca de la proteína hasta un 23% respecto a la nativa y la pérdida de la capacidad de ser activada por la correspondiente GAP (John *et al.*, 1993). Además, cuando se comparó la capacidad de unión al efector del mutante T35A y T35S con la proteína WT también se observó una recuperación parcial de la afinidad cuando estaba presente una serina mientras que con alanina no se observaba unión efectiva al efector (Spoerner *et al.*, 2001).

Con el factor de elongación EF-Tu de *Thermus thermophilus* también se realizaron estudios comparativos de mutagénesis de la treonina del G2 a alanina y serina, en este caso se observó un efecto equivalente al nuestro: el mutante a alanina (T62A) prácticamente perdía actividad GTPasa mientras que el mutante a serina (T62S) recuperaba parte de la actividad (Ahmadian *et al.*, 1995).

Aunque vemos una recuperación parcial de la actividad GTPasa en el mutante T251S, la proteína no llega a ser funcional, es decir no se observa modificación de los tRNAs en este mutante (ver apartado 6 de Resultados) lo que confirma el papel esencial de la treonina 251 del G2 y la imposibilidad de cambiar el residuo por cualquier otro.

Como ya hemos comentado, la treonina invariable presente en el G2 de todas las GTPasas no puede ser intercambiada por ningún otro residuo, ya que su función no es simplemente catalítica en la hidrólisis (a través de su grupo OH), sino que el grupo metilo de la cadena lateral también juega un papel esencial durante el cambio conformacional

del switch I. Cuando esta posición es cambiada a serina no existe este grupo metilo en la cadena lateral, lo que proporciona mucha más flexibilidad al aminoácido y en especial al grupo hidroxilo, esta alteración en la movilidad de la región del loop efector impide el correcto cambio conformacional asociado a la unión del nucleótido. Esto explicaría por qué el cambio de treonina a serina aunque recupera un poco de actividad GTPasa respecto al cambio a alanina (ya que posee un grupo hidroxilo y por tanto se coordina al Mg^{2+} y al GTP), la proteína continúa no siendo funcional ya que el cambio conformacional tras la hidrólisis y los fenómenos que le siguen (posible unión al efector) no son realizados correctamente (Ahmadian *et al.*, 1995), (Spoerner *et al.*, 2001).

4. Caracterización bioquímica de la cisteína del extremo carboxiterminal.

4.1 Propiedades de la C451 y datos previos sobre su función:

El extremo carboxiterminal de MnmE de *E. coli* presenta el tetrapéptido ⁴⁵¹**CIGK**, secuencia altamente conservada en todos las proteínas homólogas de procariotas y eucariotas como motivo C(I/L/V)GK. Debe indicarse que en la proteína MnmE de *E. coli*, la cisteína (C451) del extremo carboxiterminal es la única presente en toda la proteína. Las cisteínas son residuos altamente reactivos implicados frecuentemente en la actividad funcional de muchas proteínas, por lo que creemos que esta cisteína C451 debe tener un papel importante en la función de MnmE.

Sugerimos tres hipotéticas funciones para esta cisteína; en primer lugar podemos pensar que la cisteína está implicada en el **anclaje** a membrana, ya que el motivo C(I/L/V)GK muestra homología con la caja CaaX, característica de las proteínas tipo Ras y cuya Cys participa en el anclaje de estas proteínas a membrana en las células eucariotas (ver apartado 1.4 de la introducción). En datos anteriores publicados por nuestro grupo (Cabedo *et al.*, 1999) se observó mediante microscopía electrónica y subfraccionamiento celular seguido de inmunodetección que la proteína MnmE es capaz de asociarse en una pequeña pero significativa fracción a la membrana interna de la célula. Por tanto, parece interesante proponer un posible papel de esta cisteína en la localización subcelular de la proteína.

En segundo lugar, y debido a la capacidad de la proteína MnmE de formar dímeros sugerimos la posible participación de la cisteína en procesos de **autoasociación** mediante la formación de puentes de disulfuro intramoleculares. En datos anteriores publicados por nuestro grupo (Cabedo *et al.*, 1999) se demostró la capacidad de la proteína para multimerizar *in vivo*. Cuando células de una cepa WT son tratadas con formaldehído al 1% y analizamos mediante SDS-PAGE e inmunobloting se observa la aparición de complejos con una masa aproximada de 100 y 150 KDa que podrían corresponder dímeros y trímeros de la proteína. Además también se observó la capacidad *in vitro* de la proteína MnmE de formar dímeros mediante técnicas de cross-linking *in vitro* con el entrecruzador DTSP y mediante gelfiltración. Dado que la cisteína 451 es la

única presente en la proteína se puede proponer la posible participación del residuo en la formación de estos complejos multiméricos.

Por último, también especulamos sobre el posible papel **catalítico** de la cisteína en la reacción de modificación de los tRNAs como ya se ha descrito para otras enzimas modificadoras (Kealey and Santi, 1991). Creemos que la capacidad modificadora de la posición U₃₄ no debe estar necesariamente unida a la actividad GTPasa de la proteína y, por tanto, la cisteína puede participar directa o indirectamente en la reacción de introducción del grupo químico en el tRNA. Para ello, estudiamos el papel de este aminoácido en la actividad modificadora de una cepa que presenta una única copia del gen *mnmE* con la mutación C451S.

En todos estos fenómenos observados la C451, por ser la única cisteína presente en la proteína, es el residuo candidato a ser estudiado y por ello se decidió mutagenizar este residuo cambiándolo por serina. Esta mutación Cys→Ser se había descrito anteriormente en otras GTPasas; el cambio en la Cys del motivo CaaX impide a la célula anclarse en la membrana (Bourne *et al.*, 1990). Este cambio es estructuralmente conservativo porque la Cys y la Ser comparten la estructura a excepción del grupo tiol presente en la Cys y sustituido por un grupo hidroxilo en la Ser, por lo que los cambios observados en las propiedades del mutante C451S pueden ser atribuibles a la acción del grupo tiol.

Se obtuvo por tanto, la proteína MnmE con la mutación C451S y estudiamos las propiedades bioquímicas en la unión e hidrólisis del GTP, su implicación en fenómenos de autoasociación y localización subcelular y la relación con la modificación de los tRNAs.

4.2 Caracterización bioquímica del mutante C451S:

La proteína purificada con la mutación C451S fue sometida a ensayos de unión a nucleótido y actividad GTPasas de manera análoga a los realizados con los mutantes de los motivos del dominio G analizados con anterioridad.

4.2.1. Ensayos de unión a nucleótido:

La proteína MnmE-C451S fue sometida a ensayos de unión en filtro con GTP- γ -³⁵S y a ensayos de afinidad con el análogo fluorescente mant-GTP γ S. Los datos obtenidos mediante las dos estrategias demuestran que la proteína con la mutación C451S

conserva intactas las propiedades de unión al nucleótido. A continuación, en la figura 48 y la tabla 14, presentamos únicamente los resultados obtenidos de los ensayos con espectrofluorescencia:

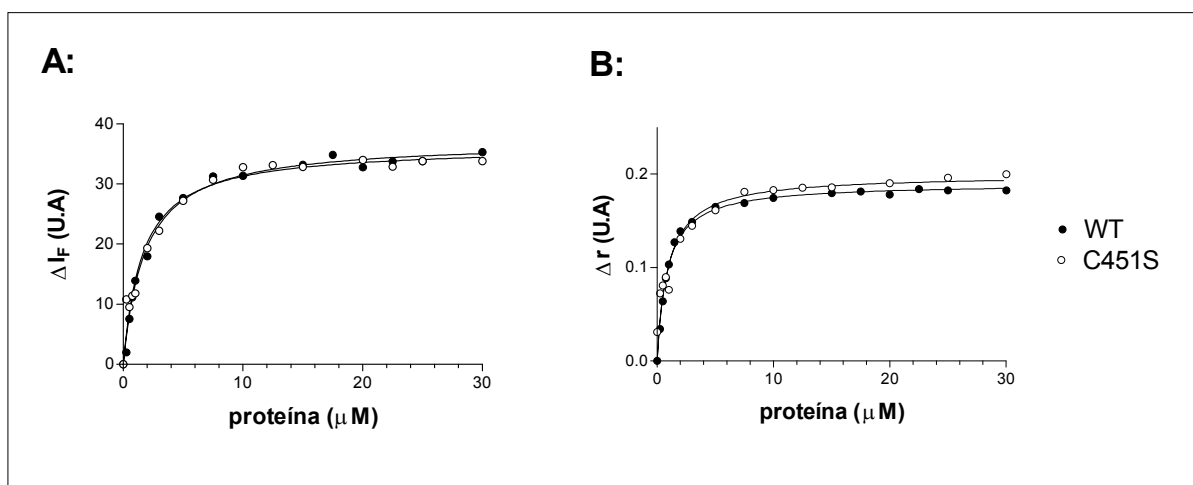


Figura 48: Ensayo de unión del mutante MnME-C451S y la proteína nativa al nucleótido mant-GTP γ S (2 μ M) por incremento de la intensidad de fluorescencia (A) y por el incremento de la anisotropía (B) del análogo fluorescente del nucleótido GTP γ S.

En la siguiente tabla se resumen los valores de k_d (μ M) de la proteína mutante MnME-C451S y la nativa por el nucleótido análogo mantGTP γ S obtenidos mediante el estudio de las variaciones en la intensidad de fluorescencia y la anisotropía del nucleótido al unirse a la proteína:

MnME:	Afinidad por mant-GTP γ S: k_d (μ M)	
	Fluorescencia	Anisotropía
WT	1.495 \pm 0.312	0.867 \pm 0.171
C451S	1.590 \pm 0.2105	0.9577 \pm 0.1704

Tabla 14: Tabla resumen de los valores de K_d obtenidos mediante técnicas espectrofluorométricas.

4.2.2. Actividad GTPasa:

Realizamos ensayos de hidrólisis del GTP de la proteína nativa y del mutante C451S:

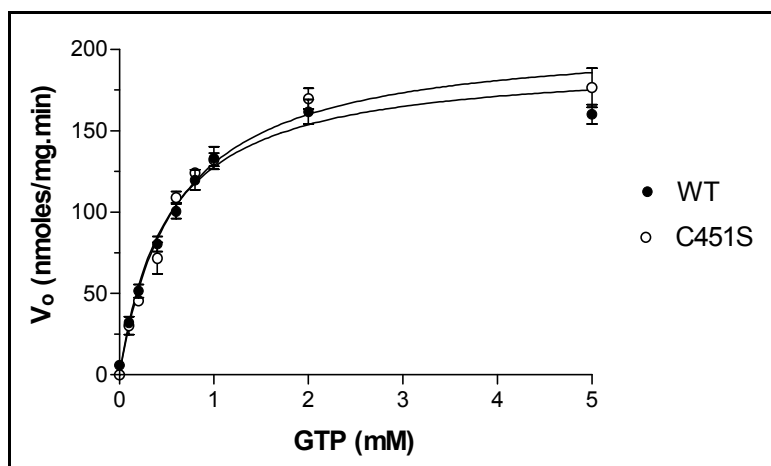


Figura 49. Ensayo de hidrólisis de GTP de la proteína MnmE nativa (círculos negros) y el mutante C451A (círculos blancos).

La tabla resume las constantes cinéticas del mutante C451S:

MNME	Hidrólisis GTP			
	V_{max} (nmoles/mg.min)	K_{cat} (min^{-1})	K_m (μM)	K_{cat}/K_m ($min^{-1} \cdot \mu M^{-1}$)
WT	203 ± 8.306	10,650	739.7 ± 79.1	0,0144
C541S	208.1 ± 8.4	11.0	599 ± 68	0.018

Tabla 15: Tabla resumen de los parámetros cinéticos del mutante C451S y la proteína WT.

Los resultados demuestran que el mutante C451S no tiene afectado las propiedades bioquímicas de hidrólisis del GTP observándose que su comportamiento es equivalente al de la proteína nativa. Por lo tanto, podemos afirmar que el residuo de cisteína y concretamente su grupo tiol no son necesarios para la reacción GTPasa de la proteína MnmE. Estos resultados eran en parte esperados, ya que habíamos visto con antelación que el dominio G de MnmE aislado conserva, a grandes rasgos, las propiedades bioquímicas de la proteína entera.

4.3. Autoasociación y localización subcelular del mutante C451S:

4.3.1. Localización subcelular del mutante C451S:

Como ya habíamos observado por microscopía electrónica, la proteína MnmE es una proteína citoplasmática parcialmente asociada a membrana (Cabedo *et al.*, 1999).

Se quiso estudiar la posible participación de la cisteína carboxiterminal en la localización subcelular de la proteína, para lo cual se analizó por microscopía electrónica la localización de la proteína mutante MnmE-C451S en la célula; los resultados muestran una distribución equivalente a la de la proteína nativa (Yim *et al.*, 2003), por lo que concluimos que la C451 no está implicada en la asociación parcial de la proteína MnmE a la membrana interna.

También se realizó un estudio de la localización subcelular de la proteína mediante fraccionamiento celular y posterior detección por western blot con anticuerpo anti-MnmE. Para este método se empleó la cepa DEV16 y dos derivadas de ésta. La cepa DEV16 contiene una mutación de stop (Q192X) en el gen *mnmE* cromosomal, por tanto expresa una proteína truncada inestable que es degradada. Como control WT usamos la cepa DEV16-WT (IC4770), esta cepa es una derivada de la DEV16 donde hemos introducido por transducción mediante un fago P1 una copia WT del gen *mnmE* en el cromosoma reemplazando el alelo *mnmE*-Q192X (ver apartado 4.9 de Materiales y Métodos y apartado 7 de Resultados). Por tanto, esta cepa con una única copia de *mnmE* expresa la proteína nativa. La cepa portadora de la mutación C451S es obtenida por la misma estrategia; mediante transducción con un fago P1 introducimos una copia del alelo *mnmE*-C451S en el cromosoma de la cepa DEV16 y por tanto, esta célula expresa una proteína MnmE mutante con el cambio C451S.

Cultivos de estas tres cepas fueron sometidos a fraccionamiento subcelular, separando la fracción insoluble (membrana) de la soluble (citoplasma). Posteriormente se realizó un análisis de estas fracciones mediante inmunodetección con el anticuerpo anti-MnmE. Los resultados (ver figura 52) revelan que la proteína MnmE nativa se encuentra mayoritariamente en la fracción soluble (carrera 2) y en menor medida en la fracción de membrana (carrera 3).

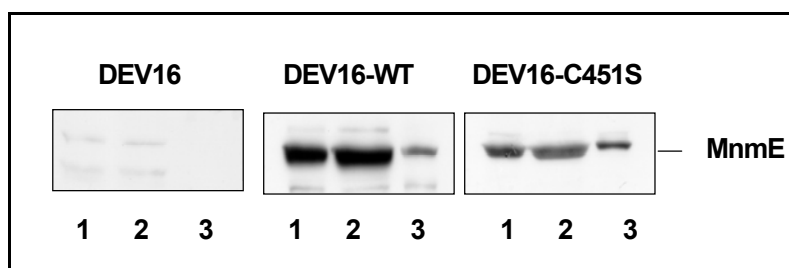


Figura 52: Localización subcelular. Fraccionamiento celular de las cepas DEV16 (Q192X), DEV16-WT (IC4770) y DEV16-C451S (IC4640). Las carreras 1 corresponden a la fracción total del lisado celular, las carreras 2 a la fracción soluble y las carreras 3 a la fracción de membrana. En cada carrera se cargaron 100 µg de muestra y fueron detectadas con anti-MnmE .

Al realizar este mismo ensayo con el mutante C451S observamos exactamente el mismo patrón de localización, por lo que podemos también concluir que la cisteína del extremo carboxiterminal no está implicada en la localización subcelular de la MnmE en la célula.

Se emplearon dos tipos de controles para asegurarnos que las correspondientes fracciones obtenidas tras el lisado celular estaban correctamente purificadas; en primer lugar se empleó la actividad glucosa-6-fosfato deshidrogenasa como marcador citoplasmático y se detectó una actividad nula en la fracción de membrana, indicando que no existía contaminación citoplasmática en la fracción insoluble (carreras 2). Como marcador de la fracción de membrana se empleó la detección de la proteína CyoA (proteína de membrana de *E. coli*) detectada mediante western blot con anticuerpo anti-CyoA; únicamente detectamos esta proteína en la fracción del lisado total (carrera 1) y la fracción insoluble (carrera 3) de cada cepa.

4.3.2. Multimerización del mutante C451S *in vitro*.

Quisimos estudiar la implicación de la cisteína C451 en la capacidad de autoasociación de la proteína *in vitro*. En primer lugar, observamos el comportamiento de la proteína sola (tanto de la WT como del mutante C451S) en condiciones reductoras y no reductoras y en presencia y ausencia de nucleótido. Y en segundo lugar, mediante el uso de un entrecruzador químico (DTSP) que detecta la posible formación de complejos de la proteína MnmE.

Como se observa en la figura 50, cuando analizamos directamente la proteína MnmE nativa en un gel de poliacrilamida en condiciones no reductoras se observa la presencia de dos bandas correspondientes al monómero y el dímero de MnmE (carrera 6), cuando añadimos un agente reductor como el β -mercaptoetanol la banda del dímero desaparece (carrera 1). Sin embargo, el mutante C451S no es capaz de formar dímeros en condiciones no reductoras (carrera 8), lo que implica que los dímeros se están formando a través de puentes de disulfuro. De acuerdo con esto, podemos sugerir que la proteína MnmE, en condiciones *in vitro* y no reductoras, es capaz de formar un puente de disulfuro para formar un dímero.

Adicionalmente, añadimos nucleótido (GTP 5 mM) a la reacción, para ver si existía algún efecto en la tendencia a formar dímeros de la proteína MnmE (carreras 2, 4, 7 y 9), pero en estas condiciones no se observa que el nucleótido influya en la formación del dímero.

La banda de aproximadamente 80 kDa observada en las carreras 3, 4, 8 y 9 (las muestras de la proteína mutante C451S) corresponden a la proteína de fusión GST-

MnmE-C451S y son debidas a la contaminación de la proteína recombinante no digerida con trombina y arrastrada durante la purificación.

Debemos remarcar que este fenómeno de formación de puentes de disulfuro se observa en condiciones *in vitro* y no debe significar necesariamente que la proteína MnmE en la célula es capaz de autoasociarse mediante este tipo de interacciones. De hecho, en condiciones *in vivo*, el citoplasma de *E. Coli* es un ambiente reductor que no permite la formación de puentes disulfuro entre proteínas citoplasmáticas, por lo que no es probable que este tipo de interacción que observamos mediante puentes disulfuro, pueda reproducirse *in vivo* en la célula (Derman and Beckwith, 1995; Snyder and Silhavy, 1995).

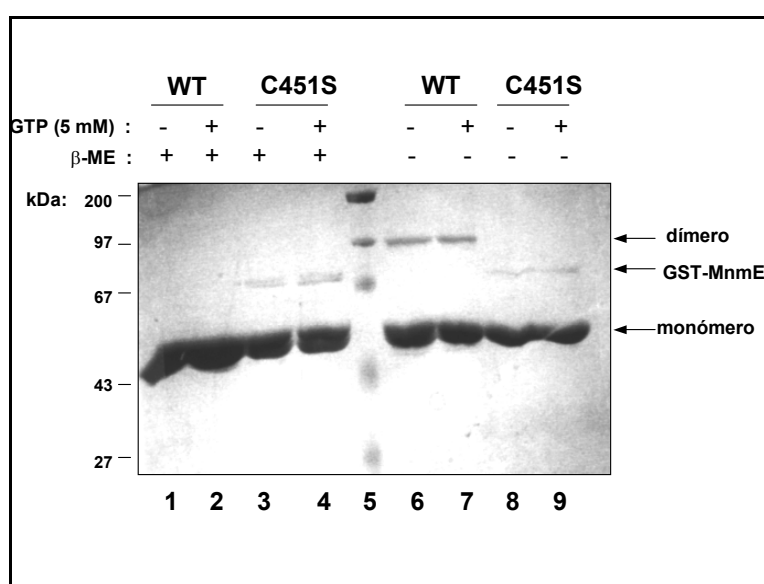


Fig 50: Estudio de la formación de dímeros mediante puentes disulfuro *in vitro* de la proteína MnmE y su mutante C451S. SDS-PAGE con 10 μ g de proteína, en presencia de 5 mM de GTP y 0.86 mM de β -ME en las muestras indicadas.

Adicionalmente, se estudió la implicación de la cisteína C451 en la capacidad de la proteína nativa de formar dímeros *in vitro* mediante cross-linking con el entrecruzados DTSP (ditiobis-succinimidil propionato). A diferencia de la figura anterior, con esta técnica los complejos detectados no deben estar necesariamente formados a través de puentes de disulfuro, ya que este agente tiene la capacidad de entrecruzar proteínas que forman un complejo multiproteico (mediante cualquier tipo de interacción) a través de la formación de enlaces entre los grupos ϵ -aminas de los residuos de Lys de las proteínas que conforman el complejo proteico. Además, esta interacción mediante DTSP es reversible con la presencia de un agente reductor fuerte como el β -mercaptoetanol que rompe el enlace.

Analizando los resultados mostrados en la figura 51, en primer lugar podemos deducir las mismas observaciones que en la figura 50: la proteína MnmE WT es capaz de formar dímeros *in vitro* sin la presencia del entrecruzador (carrera 1), mientras que el mutante C451S no es capaz de formar dímeros (carrera 5), además el dímero de la

proteína WT desaparece con la presencia del agente reductos (carrera 3), por lo que deducimos, de nuevo, la capacidad de MnmE de formar dímeros en condiciones *in vitro* y no reductoras, a través de un puente disulfuro formado por el grupo tiol de la C451.

Adicionalmente, si analizamos los resultados del entrecruzamiento *in vitro* de la proteína con DTSP se aprecia la formación de dímeros cuando añadimos el agente entrecruzador DTSP (carrera 2), además este efecto se impide añadiendo β -mercaptoetanol (carrera 4). Cuando estudiamos este mismo efecto con la proteína mutante C451S vemos que con la presencia del entrecruzador se forma el mismo dímero (carrera 6), el cual no puede estar formado mediante un puente de disulfuro dado que no existe ninguna cisteína en esta proteína, sino por otro tipo de interacciones de tipo no covalente.

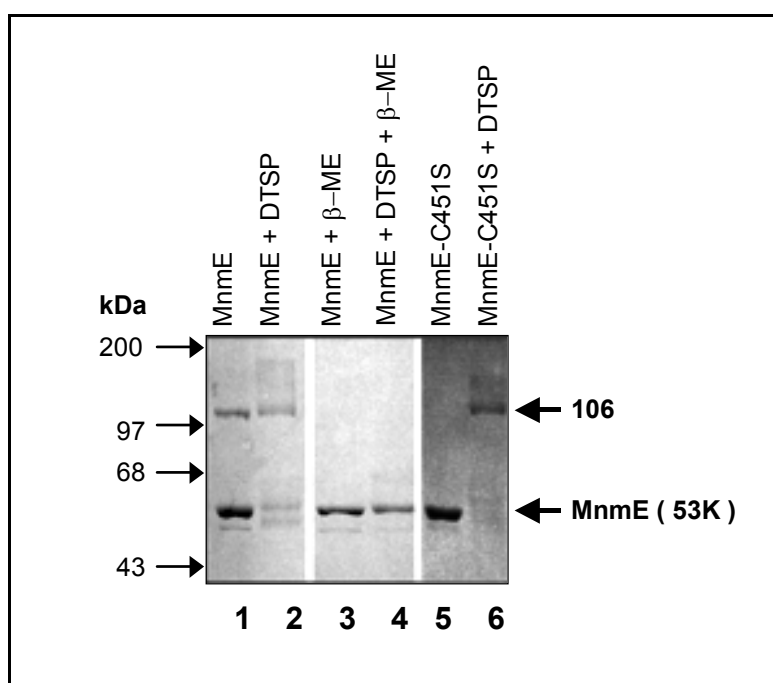


Figura 51: Crosslinking *in vitro* con DTSP: 0.3 mg/ml de cada proteína es entrecruzada con DTSP 1 mM en un volumen final de 50 μ l conteniendo 80 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM KCl, 100 mM NaCl, 2 mM $MgCl_2$, 1.5 mM $CaCl_2$ y 5% glicerol. Las muestras 2 y 3 llevan β -mercaptoetanol a 100 mM y todas las muestras son incubadas a 37°C antes de someterlas a electroforesis en SDS-PAGE en condiciones no reductoras.

En conclusión, podemos afirmar que la cisteína del extremo carboxiterminal, a pesar de que en condiciones no reductoras e *in vitro* puede formar un puente disulfuro intermolecular, no participa en la formación del complejo de 106 kDa observado mediante el entrecruzador DTSP, ya que el mutante C451S forma los mismos complejos que la proteína nativa.

4.3.3. Multimerización del mutante C451S *in vivo*.

Una vez caracterizada la implicación de la cisteína C451S en la formación de los multímeros observados *in vitro*, quisimos estudiar el efecto de la mutación C451S en

la multimerización de MnmE en la célula mediante ensayos de **cross-linking *in vivo***. Recordamos que en el citoplasma de *E. coli*, el ambiente es reductor, por lo que en principio se debe descartar la formación de puentes disulfuro entre proteínas citoplasmáticas (Derman and Beckwith, 1995; Snyder and Silhavy, 1995) y por tanto, la capacidad observada de formar dímeros a través de puentes disulfuro por la cisteína carboxiterminal, en principio no debería darse en la célula en condiciones *in vivo*.

Para el cross-linking *in vivo* trabajamos con la cepa DEV16 y las dos derivadas DEV16-WT (IC4770) y DEV16-C451S (IC4640) explicadas en el apartado 4.3.3. En este caso, no trabajamos con las proteínas purificadas *in vitro*, sino con las células enteras, las cuales son entrecruzadas usando como agente entrecruzados el formaldehído (Peters and Richards, 1977).

Las células de cada una de las tres cepas se entrecruzan durante 60 minutos con formaldehído al 1% y posteriormente se analizan por western blot con el anticuerpo anti-MnmE. El resultado puede observarse en la figura 52:

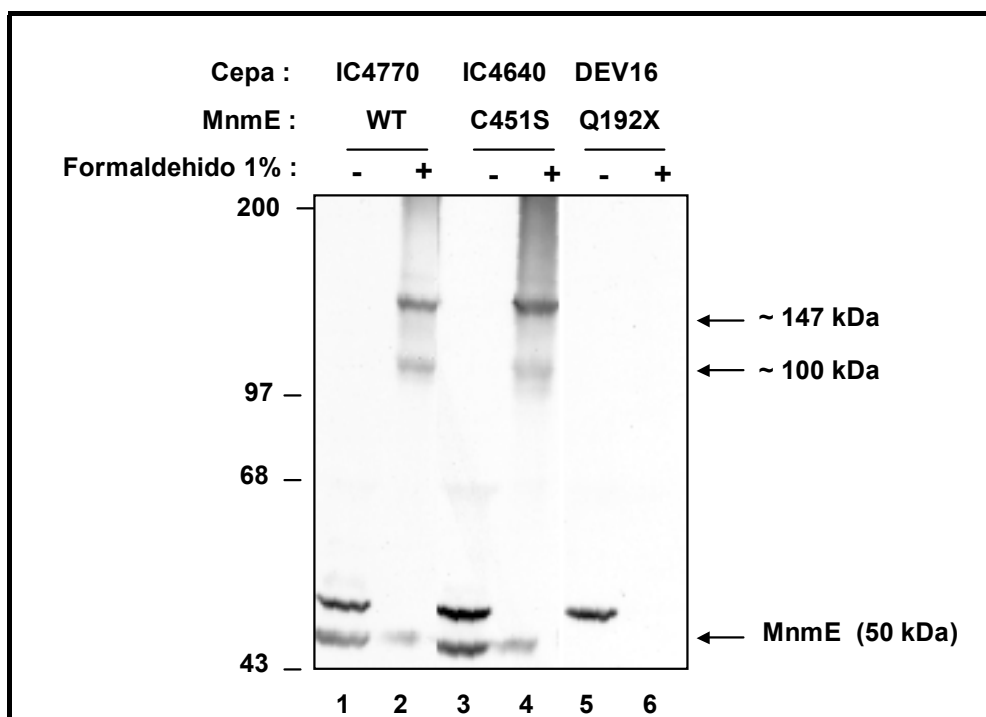


Figura 52: Cross-linking *in vivo* con formaldehido 1% (muestras 2,4 y 6) y western blotting con anti-MnmE de las cepas: DEV16 (Q192X), IC4640 = DEV16-C451S (C451S), IC4770 = DEV16-WT (WT).

Como se observa en la figura 52, tras el cross-linking se detectan dos complejos de 100 y 150 kDa en la cepa WT y C451S pero no en la DEV16 (que no se detecta proteína MnmE ya que la proteína truncada que expresa esta cepa es inestable y se degrada). Estos complejos pueden corresponder a la formación de dímeros y trímeros de

MnmE, aunque tampoco podemos descartar que se trate de complejos de MnmE con otras proteínas desconocidas.

En todas las muestras antes del cross-linking se observa una banda inespecífica por encima de la banda de 50kDa de MnmE monomérica, incluso en la cepa DEV16 que no expresa la proteína; por lo que deducimos que es una banda inespecífica y no está implicado en la formación de los complejos, además tras el tratamiento con formaldehído esta banda desaparece.

Las cepas IC4770 (MnmE-WT) y IC4640 (MnmE-C451S) dan lugar al mismo patrón tras el cross-linking con formaldehído; por tanto, la ausencia de la cisteína del extremo carboxiterminal no afecta a la formación de los complejos de 100 y 150 kDa y podemos concluir que esta cisteína no está implicada en la formación de los complejos de la proteína que se detectan *in vivo*.

Como resumen del análisis de la cisteína 451, podemos concluir que la única cisteína presente en la proteína MnmE de *E. coli* no es necesaria para la función GTPasa de la proteína y su ausencia no influye en las propiedades bioquímicas de la unión e hidrólisis del nucleótido. Este residuo no parece estar implicado en los mecanismos de multimerización observados *in vivo* ya que sin la cisteína se observan los mismos complejos multiméricos. Igualmente, la cisteína tampoco parece estar implicada en la asociación parcial de la proteína a membrana interna de la célula.

Una vez descartada la participación de la C451 en estas funciones de la proteína por último sólo nos queda analizar el posible papel catalítico de este residuo en la modificación de los tRNAs. El abordaje del estudio de la capacidad modificadora de tRNAs del mutante C451S es llevado a cabo en el apartado 6 de Resultados.

5. Búsqueda de la arginina catalítica con actividad GAP:

5.1. Análisis mutacional de las argininas del dominio G:

Como ya explicamos en el apartado 1.7 de la introducción, las GTPasas clásicas y especialmente las proteínas G pequeñas (Ras, Rho, Ran,...) y las proteínas G heterotriméricas, se caracterizan por tener una actividad de hidrólisis muy baja; sin embargo, esta actividad se incrementa varios ordenes de magnitud a través de un mecanismo llamado **dedo de arginina** ("arginine finger"), que implica la participación de un residuo de arginina en el núcleo catalítico del dominio GTPasa y que es capaz de estabilizar el estado de transición y catalizar la hidrólisis de fosfato γ (Ahmadian *et al.*, 1997a; Bourne, 1997).

Como ya comentamos, la arginina catalítica que realiza esta función puede ser aportada en *trans* o en *cis*. En el primer caso, la arginina está presente en otra proteína llamada GAP (GTPase activating protein) la cual interactúa específicamente con la GTPasa y es la responsable de catalizar la hidrólisis. Este mecanismo de regulación de las GTPasas mediante proteínas GAPs es característico de las GTPasas clásicas que son las más estudiadas y mejor caracterizadas; aunque no implica que este mecanismo sea general para todas las GTPasas y se han descrito mecanismo alternativos, incluso en algún miembro de la familia Ras.

En el caso de la arginina catalítica aportada en *cis*, el residuo de Arg está dentro de la propia proteína GTPasa, por lo que la proteína presenta una actividad GTPasa intrínseca alta; éste parece ser el caso de las dinaminas, las cuales tienen un dominio especial llamado dominio GED (GTPase effector domain) donde se ha descrito que se localiza la arginina catalítica, aunque algunos autores discrepan de la función de este dominio y existe controversia sobre el tema (Marks *et al.*, 2001).

Otro caso particular de activación de la hidrólisis en *cis* es el observado en la proteína G heterotrimérica $G_{\alpha i}$ y en el factor de elongación EF-G de bacterias, en estos casos la proteína incrementa su actividad por una mecanismo de dedo de arginina y el residuo catalítico se encuentra en la propia proteína, pero requieren de la interacción con otra proteína (que actúa como GAP pero sin arginina catalítica), ésta al unirse forma un complejo que produce un cambio conformacional en la GTPasa necesario para situar la arginina catalítica en la posición adecuada para desencadenar la hidrólisis (Hall, 2000),

(Berman *et al.*, 1996; Mohr *et al.*, 2000; Rodnina and Wintermeyer, 2001; Sondek *et al.*, 1994). Existen casos de proteínas GTPasas (como cdc42, RhoC y Rac2) que poseen ambos sistemas en *cis* y en *trans* simultáneamente, es decir, existe su proteína GAP correspondiente, pero a la vez también su propio mecanismo autocatalítico mediante una arginina interna que actúa por un mecanismo del dedo de arginina, que no excluye la acción de las GAPs y constituye un mecanismo adicional de regulación (Zhang *et al.*, 1999; Zhang and Zheng, 1998a).

Como se ha comentado arriba, el mecanismo del dedo de arginina no parece ser universal para todas las GTPasas y pueden existir otros mecanismos alternativos de hidrólisis; de hecho ya se conocen algunos casos donde debe descartarse la acción de un mecanismo de dedo de arginina como ocurre en algunas proteínas de la familia Ras, por ejemplo, la propia proteína Ras con una de las GAPs (Rap1GAP) (Brinkmann *et al.*, 2002), Ran con RanGAP (Seewald *et al.*, 2002) y, dentro de la familia de las dinaminas, la proteína hGBP-1 que posee una actividad GTPasas intrínseca alta y no existe ningún residuo de arginina implicado en la hidrólisis (Praefcke *et al.*, 1999; Prakash *et al.*, 2000b).

Scheffzek estudió las secuencias de las diferentes GAPs descritas hasta la fecha y las propiedades de las argininas catalíticas, definiendo las condiciones que debía cumplir una arginina para poder realizar la función de dedo de arginina (Scheffzek *et al.*, 1998):

- 1. Son residuos conservados e invariables a lo largo de una misma familia de GAPs.
- 2. No pueden ser sustituidos sin pérdida de función por ningún otro aminoácido, incluyendo residuos de lisina.
- 3. Mutaciones en esta arginina producen una drástica disminución de la actividad GAP pero sin afectar la afinidad de unión por el nucleótido.

El caso de MnmE es especialmente particular porque es una proteína que presenta actividad GTPasa intrínseca muy alta (en comparación con las GTPasa clásicas) y además, esta propiedad la conserva el dominio G purificado *in vitro*, por lo que suponemos que no requiere de una proteína GAP para activar la hidrólisis y por tanto proponemos que puede tratarse de un mecanismo de activación en *cis*, cuyas bases deben residir en el propio dominio G de la proteína, es decir, la proteína puede tener un residuo de arginina en el dominio G responsable de la alta actividad GTPasa intrínseca de la proteína, o bien, otro mecanismo alternativo y desconocido de hidrólisis.

Para intentar dilucidar el mecanismo peculiar de activación de la hidrólisis en MnmE decidimos hacer un estudio de sus residuos de arginina mediante mutagénesis y

estudiar el efecto de estas mutaciones sobre la unión y la hidrólisis del GTP, así como su relación con otras funciones de la proteína como la modificación de los tRNAs y la viabilidad celular.

Para localizar la arginina de MnmE que pudiera actuar como GAP interna buscamos los residuos de Arg conservados a lo largo del dominio G entre los residuos L212 a M376 (esta es la construcción del dominio G más pequeña con actividad GTPasa) (ver figura 53 y 54). Comparando las secuencias del dominio G de 61 proteínas homólogas de procariontes y eucariotes, localizamos 3 argininas altamente conservadas (R252, R275 y R288) y, por tanto, candidatas a realizar la función catalítica; además, entre las 11 argininas restantes decidimos seleccionar otras dos no tan conservadas por diversos motivos y que fueron utilizadas como control.

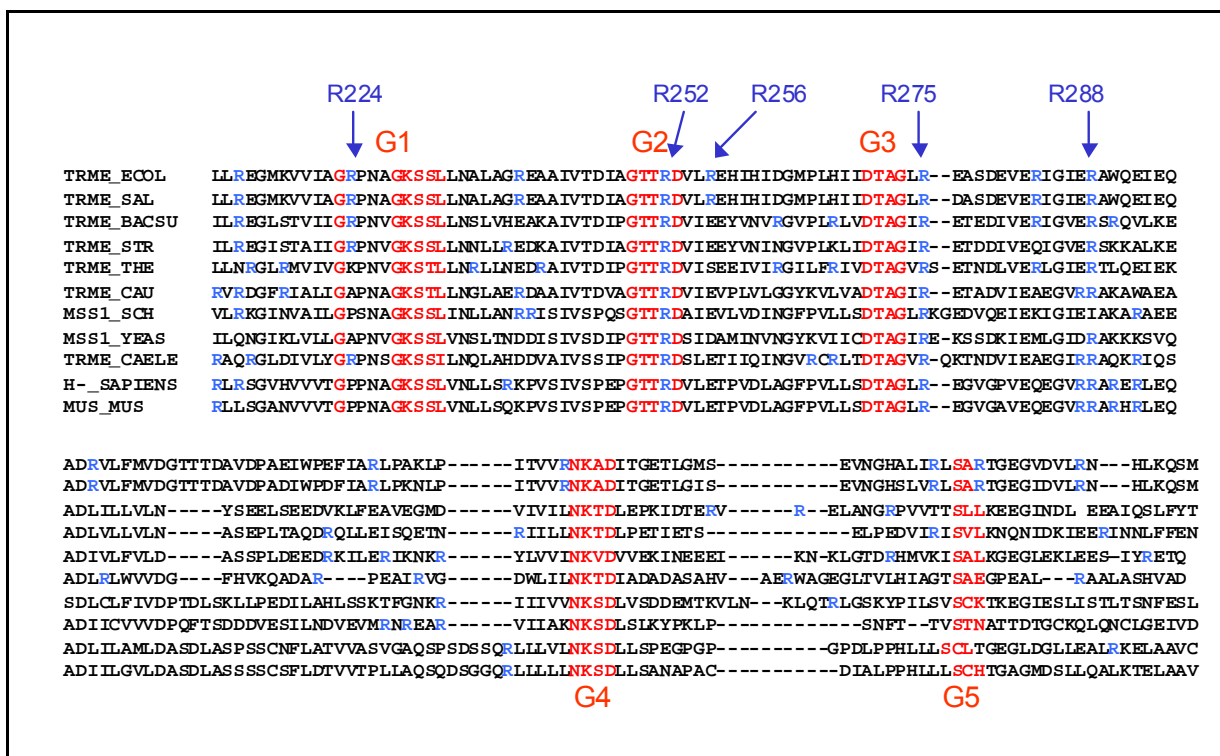


Figura 53: Localización y conservación de las argininas (en azul) presentes del motivo G de MnmE de *E. coli* (de L212 a M376) y otras proteínas homólogas. En rojo se indican los motivos característicos de las GTPasas.

- R275:** residuo localizado junto a G3 (²⁷⁰DTAG) y conservado en 60 de las 61 secuencias homólogas disponibles.
- R252:** residuo perteneciente al motivo G2 (²⁴⁹GTTRD) y por tanto conservado en todas las secuencias de las que se dispone ya que el G2 es el motivo que caracteriza a las proteínas dentro de una misma familia de GTPasas y por tanto está

conservado en todas ellas. El hecho de estar localizado en el G2 no nos impide pensar que sea la arginina catalítica y por tanto también decidimos estudiarla.

-R288: residuo de arginina con una alta conservación, pero que en algunas especies está presente como Lys. Teóricamente este residuo puede ser funcionalmente equivalente a la Arg en algunas funciones, pero se describió que en el caso del mecanismo dedo de arginina el residuo implicado debía ser una arginina la cual nunca puede ser sustituida por una Lys (Scheffzek *et al.*, 1998). A pesar de esta matización decidimos mutagenizar este residuo y estudiar sus efectos en las propiedades bioquímicas de la proteína.

Adicionalmente se mutagenizaron otras argininas del motivo G que no presentaban niveles de conservación tan altos, pero que pensamos podrían servirnos de control y/o aportar información adicional. Estas argininas son:

-R256: esta arginina se encuentra cerca del motivo G2 y sólo se conserva en algunos homólogos bacterianos más próximos a *E. coli* como *V. Cholerae*, *P. Multocida*, *H. Influenza*, *P. Aeruginosa*, *P. Putida*, *C. Burnettii*, pero no en las secuencias disponibles de eucariotas como levadura, humanos y ratón donde se localiza un residuo de Glu. Nuestro grupo había clonado y purificado la proteína homóloga a MnmE humana y el dominio G de la homóloga de ratón y los ensayos de hidrólisis del GTP revelaron que estas proteínas purificadas no presentan actividad GTPasa *in vitro*, pero sí unión a GTP. Una posible explicación a este fenómeno es que los homólogos procariotas poseen un mecanismo autoGAP, es decir, un residuo de arginina capaz de catalizar la hidrólisis mientras que los homólogos eucariotas carecen de este residuo y requieren otra proteína externa GAP para activar la hidrólisis, esta teoría permitiría explicar la ausencia de actividad GTPasa de los homólogos eucariotas. Por esta razón se decidió estudiar el papel de la R256 como candidata a realizar el mecanismo del dedo de arginina y dotar a la proteína de *E. coli* de actividad GTPasa intrínseca. Sin embargo, posteriormente a la obtención de esta mutación, nuestro grupo clonó el gen de *B. subtilis* y el grupo de Yamanaka (Yamanaka *et al.*, 2000) el de *T. maritima* y se observó que ambas proteínas, carentes de R256, son igual de activas que la de *E. coli*, por lo que descartamos la hipótesis de R256 como la arginina catalítica que aporta la actividad intrínseca en procariotas y empleamos esta mutación como control.

-R224: este residuo está poco conservado y se localiza en la segunda posición del G1 (²²³GRPNAGKSSL). Comparando las secuencias se observa un grado de

conservación bastante bajo, sólo en algunos homólogos bacterianos se presenta como arginina, mientras que en otros organismos se presenta como lisina e incluso otros residuos sin ningún tipo de similitud estructural o funcional como alanina en levadura y prolina en humanos y ratón. A pesar de esta baja homología se decidió estudiar este residuo por la misma razón que la R256 y, sobretudo porque algunos datos preliminares de la estructura del dominio G obtenidos por RMN (Monleon *et al.*, 2004) sugerían que este residuo era la arginina mejor situada en el núcleo catalítico de la proteína para desarrollar la función del dedo de arginina.

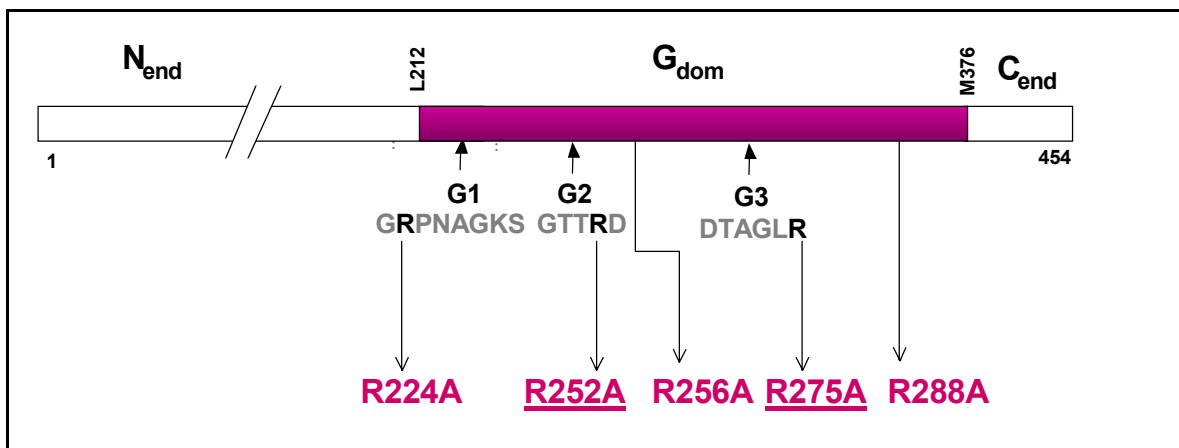


Figura 54: Localización de las argininas mutagenizadas a alanina del motivo G de MnME

5.2. Capacidad hidrolítica de los mutantes de las argininas:

Mediante mutagénesis dirigida sustituimos las argininas seleccionadas por alanina, con este cambio esperamos observar la desaparición drástica o absoluta de la actividad GTPasa en aquella proteína sin la hipotética arginina catalítica, pero no su capacidad de unión al nucleótido. Además, un posterior un ensayo de formación del complejo con mantGDP y AIF_x también puede confirmarnos la implicación de la Arg en el mecanismo del dedo de arginina, ya que la estructura formada entre la proteína-GDP-AIF_x, mimetizando el estado de transición, no se puede conseguir con la proteína mutante sin la Arg catalítica (Ahmadian *et al.*, 1997a).

La figura 55 resume los resultados de los ensayos de hidrólisis del GTP de todos los mutantes de las argininas del dominio G y en la tabla 16 se muestran los valores de los parámetros cinéticos:

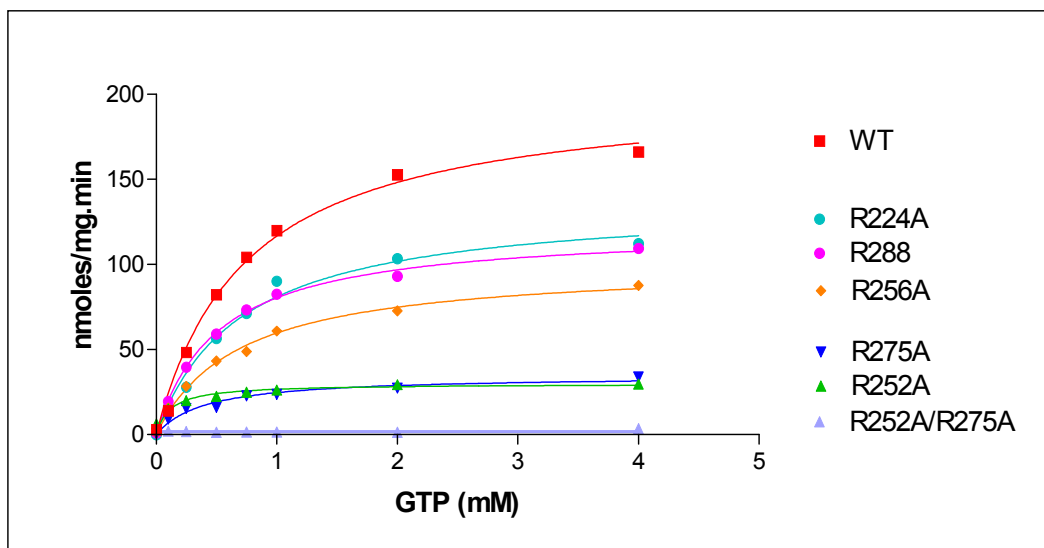


Figura 55: Ensayos de actividad GTPasa de la proteína nativa y los mutantes en las argininas.

MNME	V_{max} (nmoles/mg.min)	k_m (μM)	K_{cat} (min^{-1})	K_{cat}/k_m ($\mu M^{-1}.min^{-1}$)
WT	203 ± 8.306	739.7 ± 79.1	10,650	0,0144
R252A	29.9 ± 1.970	118.6 ± 39.8	1,569	0,0132
R275A	34.73 ± 2.431	403.2 ± 81.0	1,8221	0,0045
R288A	121.6 ± 2.504	511.4 ± 71.5	6,380	0,0125
R256A	100.4 ± 3.477	680.1 ± 11.1	5,268	0,0077
R224A	137.1 ± 7.963	693.7 ± 13.3	7,193	0,0104
R252A/ R275A	1.921 ± 0.5136	nd	nd	nd

Tabla 16: Parámetros cinéticos de la proteína nativa y los mutantes en las argininas.

Los datos obtenidos indican que ninguna de las sustituciones de las argininas por alaninas consigue inhibir completamente la actividad GTPasa de la proteína; con las dos argininas más conservadas (R252 y R275) se obtienen los descensos de la actividad más importantes, hasta el 13.6% de la actividad de la proteína nativa para el mutante R252A y un 16.85% para el mutante R275A (figura 57). Revisando estudios anteriores de mutagénesis de argininas en GAPs, observamos que la disminución de la actividad GTPasa es del orden de 1000 o más veces, por lo que parece que los valores obtenidos con los mutantes MnME no son suficientes para considerar estos residuos de arginina los responsables de la activación de la proteína MnME.

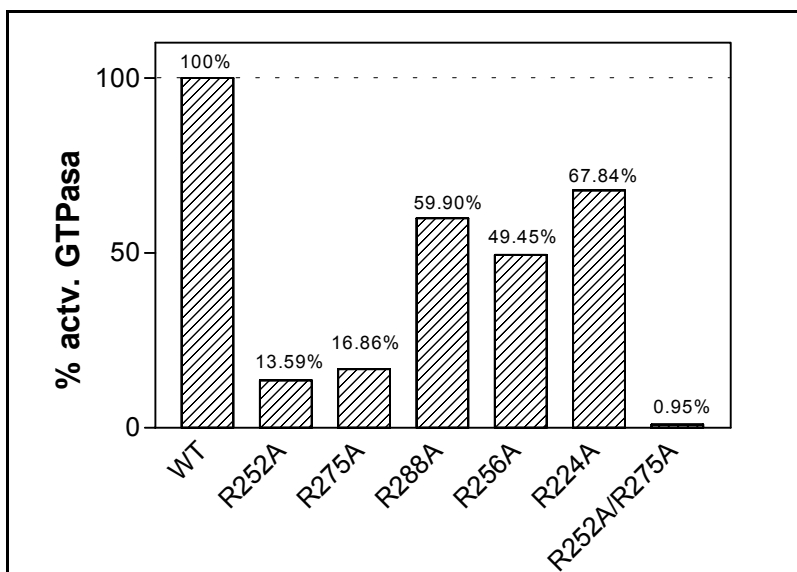


Figura 57: Porcentaje de actividad de los mutantes Arg a Ala del dominio G de MnME.

Únicamente el **doble mutante R252A/R275A** pierde toda la actividad GTPasa, aunque en este caso creemos que no sólo se debe a una pérdida de función debido a la ausencia de las dos argininas, sino que pensamos que existe una desestructuración general de la proteína ya que durante la purificación de la proteína nos encontramos con bastantes dificultades; en primer lugar, la proteína de fusión GST-MnME(R252A/R275A) es insoluble y forma cuerpos de inclusión durante su sobreexpresión; en cambio, la proteína de fusión GST-MnME nativa y los y mutantes simples son solubles y se purifican con facilidad. Para purificar el doble mutante tuvimos que ajustar las condiciones de la inducción y expresión de la proteína reduciendo la concentración de IPTG a 10 mM y expresando la proteína recombinante a una temperatura entre 25 y 30 °C; de esta forma conseguimos obtener una pequeña cantidad de la proteína de fusión en la fracción soluble. También hubo dificultades para cortar y purificar la proteína de la GST ya que la proteína de fusión prácticamente no es cortada por trombina (puede que el mal plegamiento de la proteína impida a la proteasa acceder a sus sitios de corte), por tanto, debimos dejar la digestión con trombina un periodo largo de tiempo para intentar mejorar la eficacia de la digestión; además, tras la digestión, la fracción de la proteína MnME(R252A/R275A) tendía a quedarse retenida en la columna a la glutation-agarosa y sólo una pequeña parte podía ser eluida. Por tanto, algunos ensayos de actividad GTPasa se realizaron con la proteína fusionada a GST, ya que se había visto que la presencia de la GST unida a MnME no influye en su actividad, así el rendimiento de la purificación era mayor y tras la cromatografía de afinidad con glutation-agarosa se eluyó la proteína sin digerir con trombina. Sólo en una ocasión se realizó el corte con GST y se llegó a purificar suficiente cantidad de proteína para realizar un ensayo de actividad GTPasa. Los resultados de los ensayos de la proteína en su forma recombinante (GST-

MnmE(R252A/R275A) y purificada (MnmE(R252A/R275A)) fueron equivalentes y en ambos casos no se detectó actividad.

5.3. Afinidad de los mutantes Arg por nucleótido:

Se estudió la afinidad por GTP de los dos mutantes que presentan una actividad GTPasa más baja: R252A y R275A. En principio, si la función de las argininas está implicada en la catálisis de la hidrólisis del GTP, no debemos esperar que la unión del nucleótido esté afectada, únicamente su hidrólisis.

Con los otros mutantes: R288A, R256A y R224A no hicimos ensayos de unión porque vimos que el mecanismo general de reconocimiento, unión e hidrólisis del nucleótido no debía estar afectado ya que la tasa de hidrólisis en los tres mutantes está por encima del 50% y la k_m es muy similar a la obtenida con la proteína silvestre.

La afinidad de los mutantes por el nucleótido se estudió mediante ensayos de unión a mant-nucleótidos.

Realizamos los ensayos de unión de las proteínas mutantes MnmE-R252A y MnmE-R275A al análogo no hidrolizable y fluorescente mantGTP γ S mediante la detección del incremento de la intensidad de fluorescencia y anisotropía producido al añadir cantidades crecientes de proteína purificada a una muestra inicial de mantGTP γ S 2 μ M.

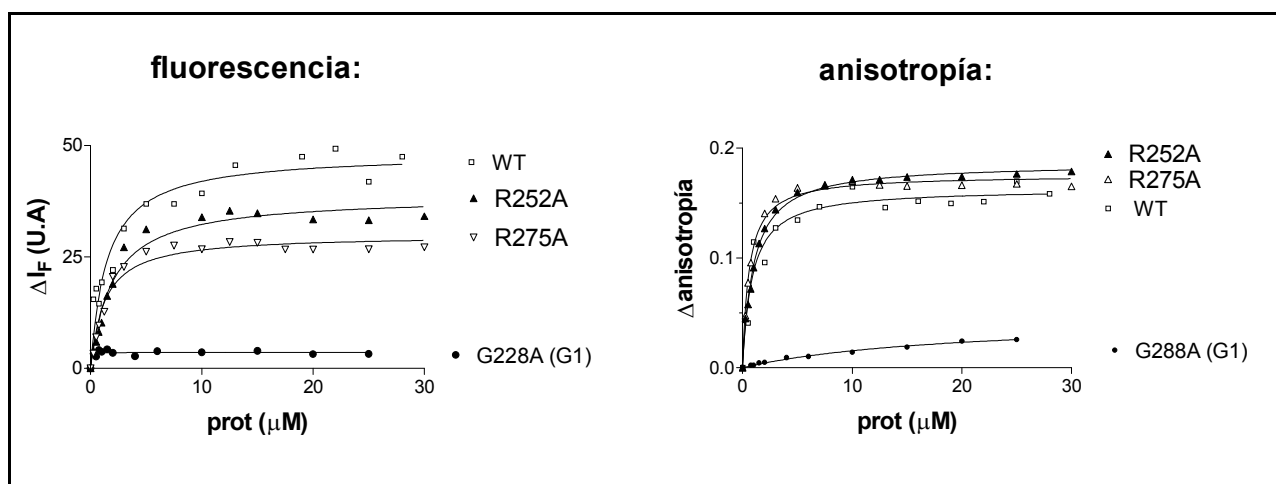


Figura 58: Ensayos de unión a mantGTP γ S de los mutantes R252A, R275A, la proteína nativa y como control negativo de la unión el mutante en G1 (G288A).

La tabla 17 recoge los resultados de las constantes de afinidad por el mantGTP γ S de los dos mutantes en comparación con la proteína nativa y el control negativo G288A (G1):

MnmE:	Afinidad: k_d (μM)	
	Fluorescencia	anisotropía
WT	1.5140 ± 0.2863	0.8869 ± 0.1664
R252A	1.965 ± 0.2715	0.9976 ± 0.04718
R275A	1.275 ± 0.1712	0.5887 ± 0.0428

Tabla 17: Constantes de afinidad de los mutantes R252A y R275A medidas por técnicas espectrofluorométricas.

Como puede observarse, ambos mutantes tienen propiedades de afinidad muy similares a la proteína nativa, obtenemos valores de k_d similares para los dos mutantes R252A y R275A y la proteína WT mediante la medida de la intensidad de fluorescencia y la anisotropía de fluorescencia. En conclusión, podemos afirmar que la unión de la proteína MnmE al nucleótido no está afectada cuando sustituimos estos dos residuos conservados de arginina por alanina.

5.4. Formación del complejo proteína-mantGDP-AIF_x:

La formación de un complejo estable con la molécula de AIF_x mimetizando el estado de transición de las GTPasa, fue desarrollado por Ahmadian *et al.* (1997) para demostrar la acción de las proteínas GAPs y su función activadora.

Cuando la molécula de AIF_x se incorpora en el núcleo catalítico de la GTPasa, realiza la función estructural del fosfato gamma del GTP y por tanto se coordina al nucleótido GDP y a los residuos de la proteína que intervienen en la hidrólisis, en el caso de Ras Thr (G2), Gln y Gly (G3) y, en el caso de las proteínas activadas por una proteína GAP mediante el mecanismo del dedo de arginina, también se une a la arginina catalítica de la GAP (ver figura 7 del apartado 1.7 de la introducción).

De esta forma se identificaron las argininas catalíticas de algunas GAPs (Sever *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 1999; Zhang and Zheng, 1998b), (Ahmadian *et al.*, 1997a). Estos autores consiguen obtener complejos entre la proteína GTPasa, su correspondiente proteína GAP, mantGDP y AIF_x (como indica la figura 7 de la introducción). Además para demostrar la participación de la arginina catalítica en el mecanismo de dedo de arginina, se mutageniza la arginina de la GAP a alanina y se observa que sin la presencia de este residuo no es posible formar el complejo.

En nuestro caso, la proteína MnmE debido a su actividad intrínseca es capaz de formar el complejo con el mantGDP y el AlF_x sin la necesidad de una proteína GAP. Para comprobar si es posible la existencia de un mecanismo autoGAP, con la presencia dentro de la propia proteína de la arginina responsable de activar permanentemente la proteína, decidimos desarrollar un ensayo de sensibilidad a AlF_x con los mutantes de las argininas R252A y R275A.

Como se observa en la figura 59, el incremento de la intensidad de fluorescencia producido al agregar el AlCl_3 a la mezcla de mantGDP, proteína y NaF es proporcional a la actividad GTPasa de cada uno de los mutantes.

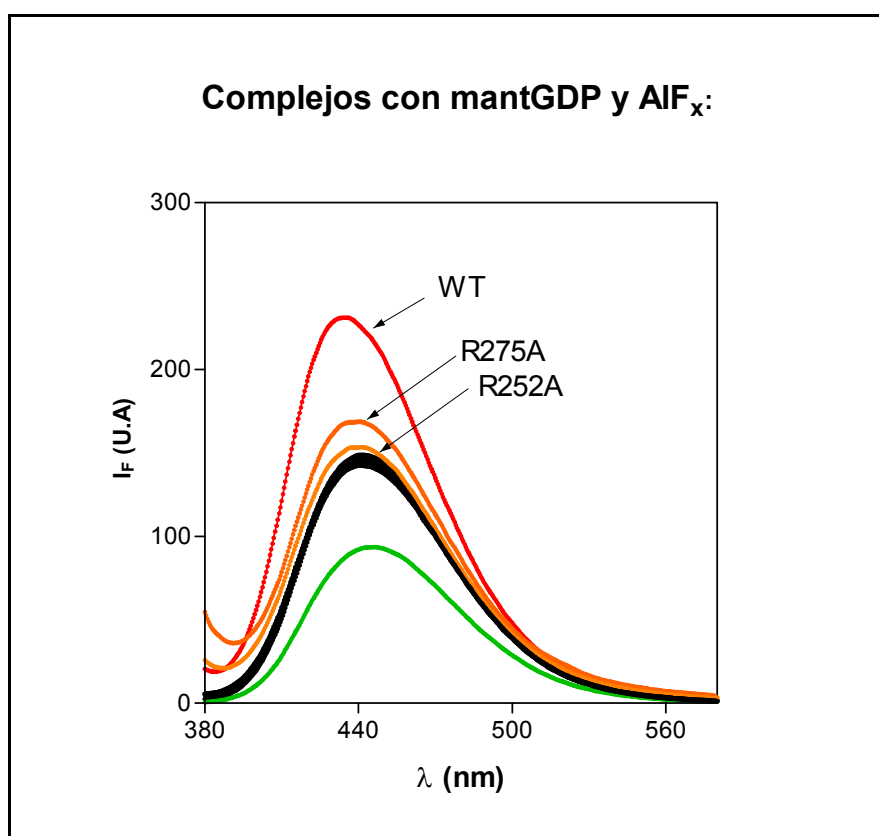


Figura 59: Formación del complejo proteína-mantGDP- AlF_x con la proteína MnmE nativa y los mutantes MnmE-R252A y R275A. En verde el espectro del mantGDP, en negro solapados los tres espectros obtenidos tras la adición de las proteínas ($10 \mu\text{M}$) y los tres espectros tras la adición del NaF 10 mM . En naranja y rojo los espectros correspondientes a la formación del complejo tras 15 minutos de la adición de AlCl_3 $70 \mu\text{M}$.

La proteína nativa aumenta un 55.36% el valor de la intensidad de fluorescencia cuando se forma el complejo. Sin embargo con el mutante R275A sólo observamos un incremento del 16.34% (correspondiente a un 29.31% del incremento del WT) y para el mutante R252A detectamos un aumento del 6.72% (correspondiente a un 11.94% del WT).

Suponiendo que la causa de la alta actividad intrínseca de la proteína MnmE se debiera a la existencia de una arginina catalítica presente en el dominio G de la proteína y que su mecanismo de activación siguiera el mecanismo del dedo de arginina descrito

hasta ahora, esperaríamos que el mutante de la arginina catalítica fuera incapaz de formar el complejo con AlF_x ya que la ausencia de la arginina impide estabilizar esta interacción y por tanto no esperaríamos ver incremento de la intensidad de fluorescencia cuando añadimos NaF y AlCl_3 a la muestra de proteína y mantGDP .

Los resultados observados con esta técnica parecen indicar que la arginina **275** no es probable que sea el residuo catalítico, dado que al mutagenizar este residuo a alanina si bien se observa un descenso de la intensidad máxima de fluorescencia, no es suficiente para considerar que la ausencia de esta arginina inactiva la proteína.

El efecto de la mutagénesis de la arginina **252** parece ser más acusado, pero de nuevo, al igual que observábamos con los ensayos de actividad GTPasa, llegamos a detectar un ligero incremento debido a la formación del complejo y correspondiente al 11.94% del incremento observado con la proteína WT. Además, si tomando como referencia de la inactivación de la hidrólisis la mutación del aminoácido adyacente T251A; ésta consigue disminuir 100 veces la actividad GTPasa (ver tabla 12, apartado 3.3.1. de Resultados) mientras la mutación R252A sólo lo hace 10 veces, por lo que no nos atrevemos a asegurar, con los resultados de este ensayo de sensibilidad a AlF_x y valores de tasa de hidrólisis, que este residuo es el responsable de la alta actividad intrínseca de MnmE y que actúa mediante el mecanismo de dedo de arginina.

5.5. Análisis mutación R252K:

Todos los resultados presentados hasta ahora sugieren que, si bien la R252 de entre las argininas del dominio G es la mejor candidata a cumplir una posible función catalítica en la hidrólisis, los valores de actividad GTPasa y formación de complejo con mant-GDP y AlF_x indican que probablemente no lo es. Para dilucidar finalmente la posible participación de este residuo en un hipotético mecanismo de dedo de arginina, decidimos mutagenizar la arginina 252 a lisina. Recordamos que una de las condiciones que debe cumplir la arginina catalítica responsable de activar el mecanismo de hidrólisis, es que no puede ser sustituida por ningún otro residuo, incluyendo lisina, sin pérdida de función (Scheffzek *et al.*, 1998).

En primer lugar se estudió la capacidad hidrolítica de la proteína MnmE portadora de la mutación R252K y, en segundo lugar, se introdujo esta mutación en la varias cepas sustituyendo al alelo salvaje, con el fin de estudiar la funcionalidad de la proteína MnmE con la mutación R252K.

A continuación se presenta los resultados de los ensayos de hidrólisis del GTP del mutante R252K:

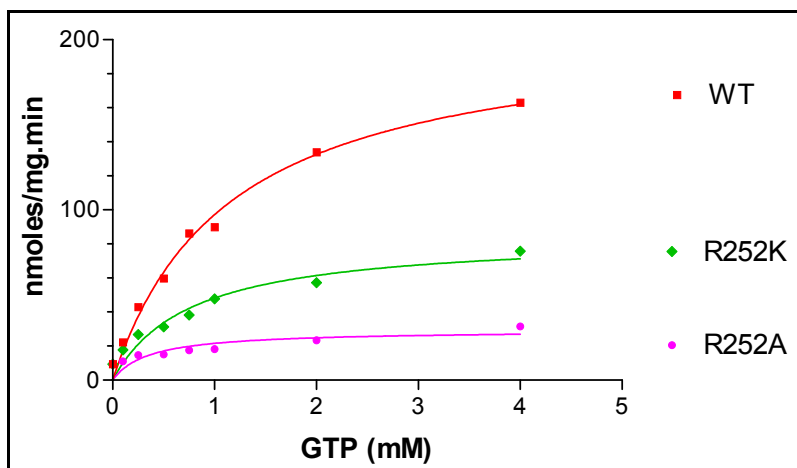


Figura 60: Actividad GTPasa del mutante R252K comparado con R252A y la proteína nativa.

IE	V_{max} (nmoles/mg.min)	k_m (μM)	K_{cat} (min^{-1})	K_{cat}/k_m ($\mu M^{-1}.min^{-1}$)
WT	203 \pm 8.306	739.7 \pm 79.1	10.650	0.0144
R252A	29.9 \pm 1.970	118.6 \pm 39.8	1.569	0.0132
R252K	84.78 \pm 9.721	759.6 \pm 233.5	4.448	0.0059

Tabla 18: Valores cinéticos de los mutantes R252K, R252A y la proteína nativa.

Como puede apreciarse en la tabla 18 y en la figura 60, cuando sustituimos las arginina por lisina, se observa una recuperación parcial de la actividad GTPasa respecto al mismo mutante por alanina: el mutante R252A presenta un 14% de la actividad de la proteína nativa y el mutante R252K un 42%.

Esta recuperación parcial de la actividad GTPasa, probablemente indica que la lisina (aminoácido con una cadena lateral químicamente similar a la arginina, ya que es un aminoácido básico y presenta una amina protonada al pH de la reacción) puede realizar parcialmente la función de la arginina, lo cual sugiere que probablemente la función realizada por este aminoácido es debida al grupo químico de su cadena lateral.

Si la arginina 252 es el residuo catalítico responsable de la alta actividad intrínseca de la proteína, cuando es sustituido a lisina no esperamos encontrar funcionalidad en la proteína. La única función conocida de la proteína MnmE es la modificación de los tRNAs, por ello estudiamos el efecto de esta mutación en la modificación de tRNAs mediante técnicas indirectas y en la viabilidad celular.

Los resultados de este estudio se exponen en los apartados 6 y 7 de Resultados junto al resto de mutantes, pero podemos adelantar que en conclusión el mutante R252K es capaz de modificar los tRNAs (figura 63) y, por tanto, no existe pérdida de la función

modificadora, además la mutación es viable en fondos genéticos donde sólo se permite la viabilidad celular cuando la célula lleva una copia del gen *mnmE* capaz de sintetizar una proteína funcional (ver tabla 20).

Estos resultados nos permiten descartar definitivamente la R252 como posible responsable de la actividad GTPasa intrínseca y por tanto, no encontramos ninguna arginina en el dominio G de la proteína MnmE que pueda explicar la alta tasa de hidrólisis observada y que no sea necesario que MnmE sea activada por una proteína GAP.

5.6. Ausencia de la glutamina catalítica:

En el mecanismo de activación por dedo de arginina, además de la propia arginina catalítica, interviene un residuo de glutamina presente en la proteína GTPasa y que se localiza junto al G3 (en Ras DTAG⁶¹Q). Esta glutamina se coordina directamente a la arginina, al fosfato y, vía una molécula de H₂O, a la Thr35 del G2 (ver figura 7 del apartado 1.7 de la introducción); su función es crucial en la activación de la proteína mediante la estabilización del estado de transición (Resat *et al.*, 2001; Scheffzek *et al.*, 1997).

El importante papel que juega esta glutamina en la activación de la proteína se pone de manifiesto cuando se sustituye por otro residuo, por ejemplo, la mutación G61L en Ras produce una bajada en la actividad GTPasa intrínseca de la proteína y la imposibilidad de ser estimuladas por RasGAP (Der *et al.* 1986).

Recientemente también se ha observado que la proteína Ran (GTPasa nuclear tipo Ras) es activada por su RanGAP correspondiente pero mediante un mecanismo donde no interviene una arginina catalítica (ni en la propia proteína Ran ni en la GAP). En este caso, la función de la GAP es posicionar el residuo de glutamina del G3 en la orientación correcta para desencadenar la hidrólisis. (Seewald *et al.*, 2002). Este ejemplo, pone de manifiesto la importancia de la glutamina del G3 y la posibilidad de que otros mecanismos alternativos de activación en las GTPasas puedan existir.

Realizamos un estudio de la conservación del residuo de glutamina en diferentes GTPasas y dentro de la familia de proteínas homólogas de MnmE, en la figura 60 se muestran las secuencias de algunas de estas proteínas analizadas:

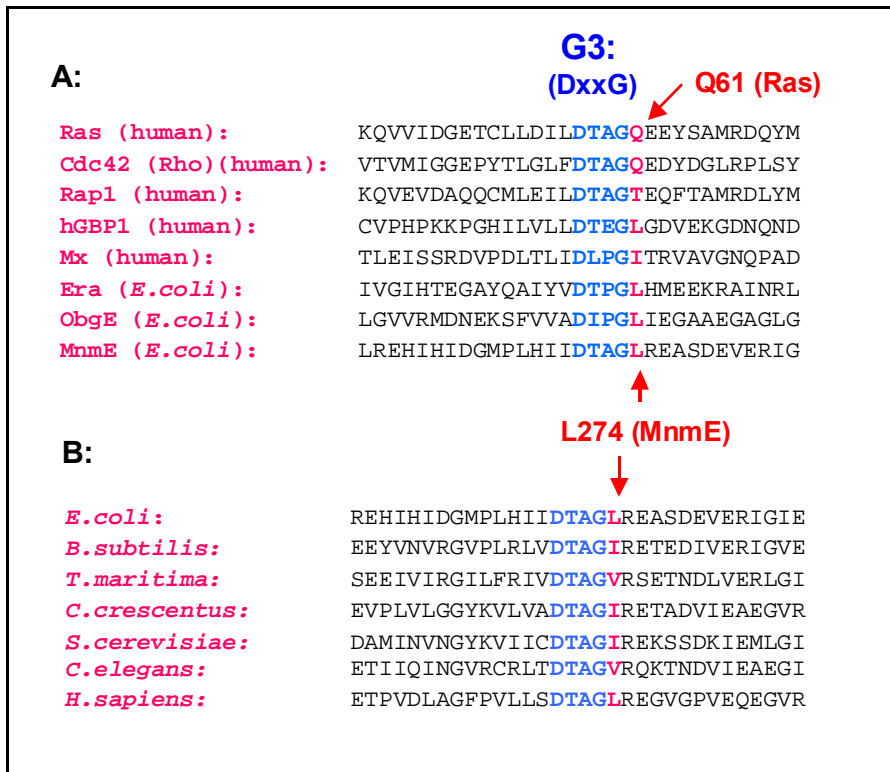


Figura 61: **A:** Alineamiento del motivo G3 (en azul) de varias GTPasas. En rojo se indica el residuo correspondiente a la Q61(Ras) implicado en el mecanismo del dedo de arginina. **B:** Alineamiento del motivo G3 (en azul) de varias proteínas homólogas de MnmE de *E. coli*, en rojo se indica el residuo equivalente a L274 de MnmE.

Encontramos que en las GTPasas estudiadas pertenecientes a la familia de las proteínas tipo Ras y las proteínas $G\alpha$, todas presentan un residuo de Gln junto al G3, y en aquellas proteínas de las cuales se dispone de la estructura proteica y, por tanto, se conocen los detalles de su mecanismo de acción, se ha visto que esta glutamina participa de forma esencial en la activación de la proteína a través del dedo de arginina (Resat *et al.*, 2001; Scheffzek *et al.*, 1997).

Únicamente se ha encontrado una proteína perteneciente a esta familia, Rap1, que no presenta un residuo de glutamina en esta posición, sino una treonina. Brinckmann *et al.* (2002) analizaron las propiedades bioquímicas de la proteína Rap1 y observaron que no existe ninguna otra glutamina capaz de realizar esta función, ni en la secuencia de la GTPasa, ni en la secuencia de la proteína GAP, por tanto concluyeron que esta proteína posee un mecanismo de activación alternativo al del dedo de arginina, siendo la primera GTPasa de la familia de las proteínas tipo Ras que presenta estas propiedades inusuales (Brinckmann *et al.*, 2002).

La proteína MnmE tampoco presenta una glutamina en esta posición, sino un residuo de leucina (DATG²⁷⁴L); además, a lo largo de la secuencia del dominio G no hemos encontrado ninguna glutamina conservada candidata a realizar la función que desempeña la Q61 en Ras.

Estudiando las secuencias disponibles de las 61 proteínas homólogas a MnmE, encontramos siempre en esta posición adyacente al motivo G3, un residuo de leucina,

valina o isoleucina; aminoácidos estructuralmente parecidos e hidrofóbicos (figura 60B), la única excepción, es la proteína MnmE homóloga de *Clamylidia pneumoniae*, la cual curiosamente presenta una glutamina.

Comparando las secuencias de otras GTPasas, encontramos que las dinaminas (proteínas Mx, hGBP1, septinas, ...) tampoco presentan el residuo conservado de glutamina junto al G3, sino un residuo conservado hidrofóbico de leucina o isoleucina. El grupo de Prakash, tras obtener la estructura de la proteína hGBP1 humana, pudieron establecer los detalles del mecanismo de hidrólisis de esta proteína, mostrando que la presencia de la leucina en esta posición en lugar de la glutamina característica de Ras, junto a la ausencia de una arginina catalítica (en *trans* o en *cis*), demuestra la existencia de un mecanismo de hidrólisis del GTP alternativo al mecanismo del dedo de arginina y que permite explicar la actividad GTPasa intrínseca que caracteriza también a esta dinamina (Praefcke *et al.*, 1999; Prakash *et al.*, 2000a; Prakash *et al.*, 2000b).

Por último, encontramos también en otras GTPasas bacterianas como Era y ObgE un residuo de leucina en esta posición. Se desconoce de momento el mecanismo de activación de estas proteínas, aunque no se ha observado la participación de ninguna GAP. Estas proteínas son, junto a las dinaminas, las que presentan unos parámetros bioquímicos más parecidas a MnmE, ya que no se han descrito mecanismos de activación mediante GAPs y presentan una baja afinidad por nucleótidos (del orden de μM).

Dado que las propiedades bioquímicas (alta actividad intrínseca) y la secuencia de aminoácidos (ausencia de Arg catalítica y Gln en G3), acercan MnmE a proteínas como la hGBP1, creemos que es probable que MnmE presente también un mecanismo de hidrólisis alternativo al dedo de arginina, que pueda explicar su alta actividad intrínseca.

Los resultados de este apartado, demuestran que todos los mutantes de las argininas estudiadas mantienen la afinidad por el nucleótido; es decir, no son residuos implicados en la unión del GTP. Estos resultados son, en principio, los esperados para una arginina catalítica, cuya función en la hidrólisis no afecta a la unión del GTP. En relación a la tasa de hidrólisis, tres de las argininas (R224A, R256A y R288A) no parecen estar especialmente afectadas por la sustitución de arginina por alanina y podemos descartar que jueguen un papel catalítico en el mecanismo de hidrólisis.

Respecto a las R252 y R275 observamos que cumplen dos de las condiciones para ser argininas catalíticas: están altamente conservadas y no tienen afectadas la afinidad por nucleótido; sin embargo, la tasa de hidrólisis disminuye sólo un 13.59% y un 16.86% respectivamente. Estos valores no son especialmente drásticos y están muy lejos de resultados obtenidos con otras GTPasas donde se observa que mutaciones de argininas

pertenecientes al dedo de arginina pueden llegar a reducir la k_{cat} de la reacción entre 1800 y 540 veces como ocurre en Ras ((Ahmadian *et al.*, 1997b), (Sermon *et al.*, 1998) y Rho (Graham *et al.*, 1999) e incluso inactivar completamente la actividad de la proteína como en Rab /Gyp1p y Gyp7p (Albert *et al.*, 1999). Además, la sustitución de la R252 por Lys produce un incremento significativo de la actividad GTPasa y la recuperación de la funcionalidad de la proteína, por lo que con estos resultados descartamos definitivamente la participación de este residuo en un mecanismo de dedo de arginina.

Por último, la ausencia de la glutamina adyacente al motivo G3 y la presencia en esta posición de un residuo de leucina, al igual que ocurre en otras GTPasas sin activación de la hidrólisis a través de un mecanismo de dedo de arginina, nos permiten sugerir la existencia de un mecanismo de acción diferente para MnmE que es responsable de la alta tasa de actividad GTPasa.

6. Función modificadora de los tRNAs de MnmE:

Hasta el momento hemos estudiado las propiedades bioquímicas de la proteína MnmE de *Escherichia coli* y de varias proteínas derivadas que llevan mutaciones localizadas en los motivos que caracterizan las GTPasas, en la cisteína del extremo carboxi-terminal y en algunas argininas conservadas. Los resultados presentados demuestran la relación de estas mutaciones con la actividad GTPasa de la proteína a nivel de unión e hidrólisis del GTP, pero no en relación con la función modificadora de tRNAs. En este apartado estudiaremos el efecto de estas mutaciones puntuales del dominio G y la Cys carboxiterminal en la capacidad de la proteína para modificar los tRNAs. y que nos permita establecer una relación entre las propiedades bioquímicas observadas y la modificación de los tRNAs.

Como ya hemos remarcado varias veces, no tenemos pruebas que demuestran que MnmE es la enzima que directamente realiza la reacción de modificación del tRNA o si, por lo contrario, es una enzima que controla indirectamente la reacción de modificación regulando a otra/s proteína/s desconocida/s que realizan la introducción del grupo carboximetilaminometil en los tRNAs. Además, en el caso que sea la enzima directamente modificadora, desconocemos si la actividad GTPasa está implicada en la introducción del grupo carboximetilaminometil en la uridina del tRNA o si, por lo contrario, la actividad GTPasa es un mecanismo que se requiere para desencadenar el cambio conformacional necesario para que otro dominio de la proteína o, incluso otra proteína desconocida, catalice la reacción de introducción del grupo químico.

El estudio del papel de estas mutaciones en la modificación de los tRNAs es abordado mediante dos métodos distintos; en primer lugar, indirectamente mediante ensayos de "readthrough" en cepas donde hemos introducido las mutaciones y, en segundo lugar, estudiando directamente los tRNAs de estas cepas mutantes para detectar la presencia del grupo metilaminometil.

6.1 Método indirecto: ensayos de "readthrough" mediante ensayos de actividad β -galactosidasa de cepas portadoras de mutaciones *mnmE*.

El gen *mnmE* se describió en 1984 por Elseviers *et al.* a partir de una cepa mutante deficiente en la biosíntesis del nucleótido 5-metilaminometil-2-tiouridina. El mutante (cepa DEV16) se identificó por mostrar un nivel reducido de "readthrough" (o lectura a través de un codón de stop) del codón UAG (Elseviers *et al.*, 1984).

Esta cepa DEV16 (*F thi-1 rel-1 spoT1 lacZ105_{UAG} mnmE192_{UAG}*) presenta una mutación Q192X en MnmE que trunca la proteína y por tanto no es funcional. Además la cepa lleva una mutación de stop en el gen *lacZ* (mutación *lacZ105_{UAG}* consistente en la introducción de un codón UAG en la una posición interna del gen).

Se sabe que existen tRNAs que son capaces de suprimir, aunque con baja eficacia, esta mutación al reconocer y codificar el codón UAG permitiendo esporádicamente la traducción completa del gen y dando lugar a la proteína β -galactosidasa; este fenómeno llamado "**readthrough**" o lectura a través de un codón de stop, puede ser detectado cuantificando el nivel de actividad β -galactosida de la célula. Interesantemente, el mecanismo de "readthrough" llevado a cabo por estos tRNAs es dependiente de MnmE ya que probablemente se requiere la modificación mnm^5U para reconocer correctamente el codón UAG, por tanto, en una cepa *mnmE*⁻ el nivel de "readthrough" será menor ya que menos transcritos del gen *lacZ* podrán ser traducidos completamente y, por tanto, menos actividad β -galactosidasa se detectará (ver figura 62).

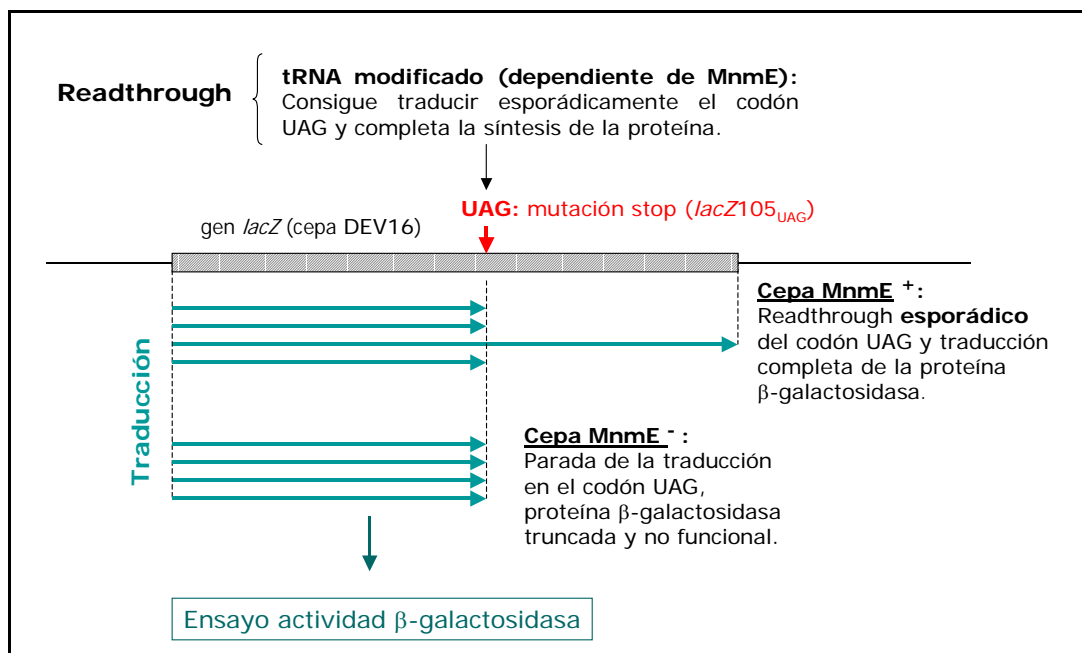


Figura 62: Esquema del mecanismo de "readthrough" como técnica indirecta para la detección de tRNAs modificados.

Esta propiedad es la que se empleó inicialmente por el grupo de Elseviers para identificar el gen *mnmE* y es también la técnica que empleamos para medir indirectamente la presencia de tRNA modificados en las distintas cepas mutantes.

A partir de la cepa DEV16 (Q192X) se obtuvieron varios derivados que llevan las mutaciones estudiadas mediante la sustitución del alelo *mnmE*-Q192X del cromosoma por los distintos alelos *mnmE* con las mutaciones G228A, D270A, D338N, S358A, G249A, T250A, T250S, T251A, T251S, T250S/T251S, R252A, R252K, D253A, R224A, R256A, R275A, R288A y C451S (ver apartado 7.1 de Resultados o Materiales y Métodos, apartado 1.5)

Se realizaron ensayos de actividad β -galactosidasa de estas cepas, usando como control de una cepa no modificadora la cepa DEV16 y como control positivo la cepa DEV16-WT (donde hemos reintroducido, también mediante transducción con un P1, una copia funcional del gen *mnmE*).

Las cepas se crecen en medio LBT con kanamicina/IPTG/cAMP y se mantienen al menos durante 4 generaciones en fase exponencial mediante diluciones con el mismo medio de cultivo, posteriormente se realiza un ensayo de actividad β -galactosidasa de cada cultivo (ver Materiales y Métodos, apartado 5).

Los niveles detectados de actividad β -galactosidasa son muy bajos, ya que incluso en cepas con proteína MnmE funcional el nivel de "readthrough" del codón UAG en *lacZ* es bastante bajo, ya que el proceso de lectura a través del codón de stop es un proceso esporádico. Sin embargo, las cepas sin proteína MnmE funcional (como DEV16) tienen niveles de "readthrough" prácticamente nulos; por tanto, la diferencia es perfectamente apreciable y los valores obtenidos son repetitivos.

En las siguientes figuras presentamos los resultados de los ensayos de "readthrough" realizados con todos los derivados mutantes de la cepa DEV16:

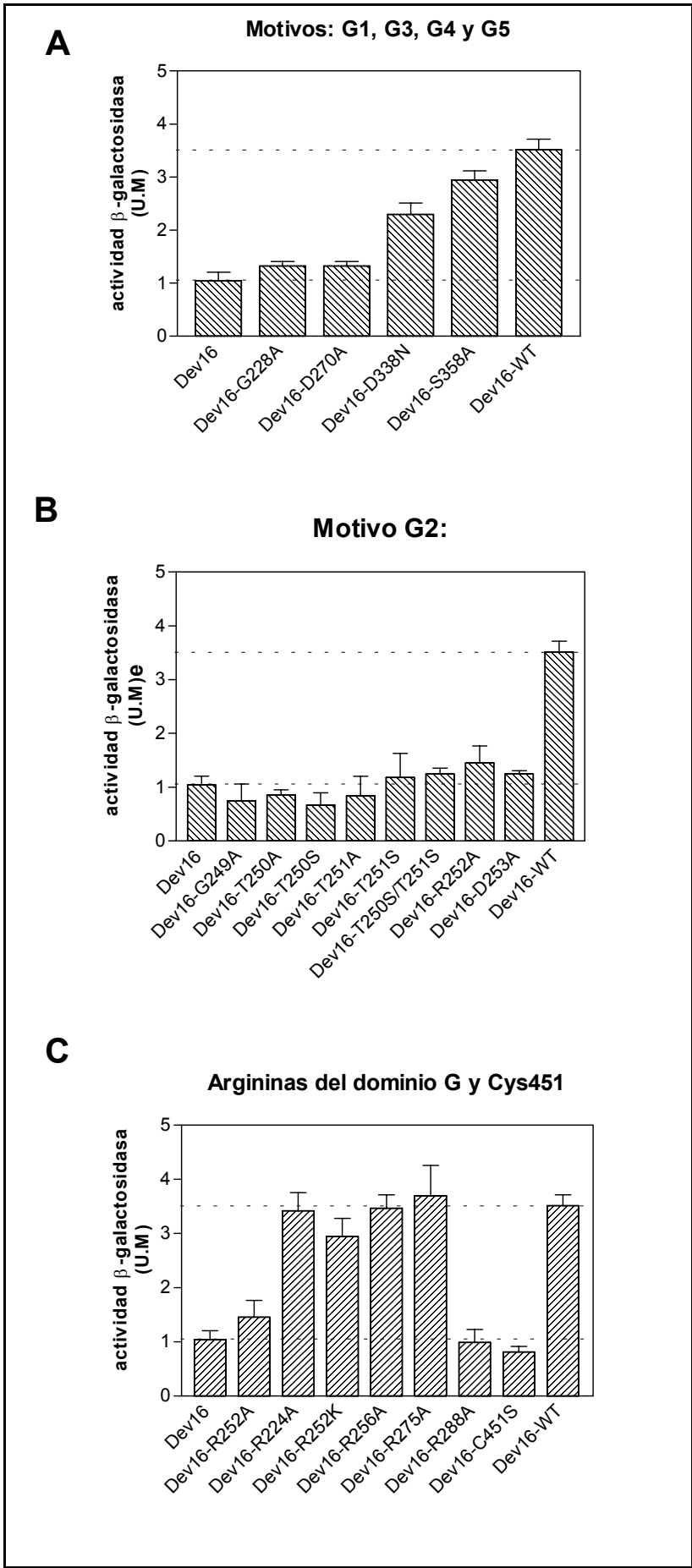


Figura 63: Capacidad modificadora de tRNAs de los mutantes mnmE mediante "readthrough" del codón UAG del gen *lacZ105*: actividad β -galactosidasa de la cepa DEV16 y sus derivados mutantes, A: mutantes en el motivo G1, G3, G4, y G5, B: mutantes en el motivo G2, C: mutantes de las argininas conservadas del dominio G y Cys carboxiterminal

Mediante esta aproximación indirecta podemos estudiar el efecto de las distintas mutaciones en la función biológica de la proteína; además, tras estudiar las propiedades bioquímicas de estos mutantes, podemos establecer la relación entre la actividad GTPasa y la modificación de los tRNAs.

Se puede apreciar en la figura 63 el comportamiento de los diferentes mutantes, en el panel **A** se representan los mutantes de G1, G3, G4 y G5, las cepas que llevan los alelos G249A (G1) y D270A (G3) no presentan modificación en los tRNAs, recordamos que estas dos mutaciones en la proteína Mnme no presentaban actividad GTPasa *in vitro* pero sí unión del nucleótido en el caso del mutante en G3.

La cepa que lleva la mutación en G4 curiosamente presenta unos niveles de “readthrough” intermedios entre la cepa hipomodificada (DEV16) y la cepa control modificada (DEV16-WT), lo que sugiere que la actividad modificadora en este mutante está parcialmente afectada al igual que observábamos en la afinidad por GTP. En el mutante DEV16-S358A se obtiene una tasa de actividad β -galactosidasa similar al WT, al igual que ocurría en su actividad GTPasa.

En el panel **B** podemos observar la capacidad modificadora de los mutantes en G2, ninguno de los mutantes del motivo parece capaz de modificar el tRNA, pues se observan niveles de actividad β -galactosidasa equivalentes al de la cepa DEV16, incluso aquellos mutantes con más actividad GTPasa *in vitro* como T250S o T250A, son defectivos en la modificación del tRNA.

En el panel **C** observamos los mutantes de las argininas conservadas, las cepas mutantes R224A, R256A, R252K e incluso R275A presentan niveles de “readthrough” iguales a la cepa control WT por lo que presentan modificación en los tRNAs. En el panel C hemos incluido de nuevo la mutación R252A presente también en G2 (panel B) por tratarse de la arginina conservada del dominio G con menor actividad GTPasa.

En este último apartado destacan los mutantes **R288A** y **C451A**, estos dos mutantes tienen capacidad hidrolítica (en el caso de la proteína Mnme-C451S la actividad GTPasa es equivalente a la de la proteína nativa, y en el caso de Mnme-R288A la proteína alcanza niveles de actividad del 60% respecto al de la proteína Mnme), sin embargo no se observa modificación en los tRNAs mediante esta técnica. Por lo tanto se trata de dos casos donde la proteína Mnme mutante es capaz de unir e hidrolizar correctamente el GTP y, sin embargo, no es funcional ya que no presenta modificación de los tRNAs.

Con estos datos obtenidos, podemos sugerir que **la actividad GTPasa de la proteína MnmE es necesaria para la función modificadora de los tRNAs**, ya que en aquellas cepas en las que no observamos hidrólisis de GTP (G1 y G3 entre otros) tampoco observamos capacidad modificadora. Este dato es importante porque diferencia a MnmE de las GTPasa tipo Ras y heterotriméricas, en las cuales es la **unión** del nucleótido el fenómeno requerido para desencadenar la función biológica de la proteína.

Sin embargo, los datos de los mutantes R288A, C451S y los mutantes de G2 con mayor actividad GTPasa, nos indican que la hidrólisis del GTP, pese a ser necesaria, **no es suficiente** para desarrollar su función biológica ya que, estas cepas no presentan modificación y sin embargo tienen actividad GTPasa alta; la proteína MnmE-C451S totalmente equivalente al WT, la proteína MnmE-R288A una actividad del 60% y el mutante T250S presenta el 56% de la actividad de la cepa WT, pero en contra de lo esperado, no tienen capacidad modificadora. Estos resultados nos indican que se requieren otros mecanismos, además de la hidrólisis del GTP, para realizar la modificación del tRNA.

6.2 Método directo: Northern blot de los tRNAs de las cepas portadoras de mutaciones en *mnmE*.

Para confirmar los datos obtenidos por ensayos de "readthrough" decidimos detectar la presencia de la modificación mnm^5U_{34} estudiando directamente los tRNAs mediante análisis Northern blot, para ello se purificó el tRNA total de la cepa DEV16 y de todos sus derivados que llevan las mutaciones introducidas en el cromosoma de *Escherichia coli*.

La modificación introducida en la ruta donde participa MnmE es un grupo metilaminometil que a pH 5 se encuentra protonado y, por tanto, confiere una carga positiva extra a la molécula de tRNA en estas condiciones ácidas (Kruger and Sorensen, 1998). Esta particularidad hace que la migración del tRNA modificado en un gel de poliacrilamida sea ligeramente más lenta que la del tRNA no modificado permitiéndonos detectar la modificación como un ligero retraso en gel.

Posteriormente se detecta el tRNA mediante Northern blot con una sonda específica, en nuestro caso contra el tRNA de glutámico (uno de los tRNAs modificados en la ruta donde interviene MnmE). La sonda está conjugada a digoxigenina, permitiéndonos su detección mediante un anticuerpo anti-digoxigenina siguiendo los procedimientos habituales (ver apartado 3.3 de Materiales y Métodos).

Se purificaron los tRNA totales de las cepas derivadas de la DEV16; 10 µg de cada extracto de tRNA total fueron desacilados mediante tratamiento alcalino para eliminar el aminoácido cargado (aunque ensayos con tRNA sin desacilar también se han realizado con resultados equivalentes) y posteriormente se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida al 8% con urea 8 M y acetato sódico pH 5 0.1 M. La electroforesis se desarrolló a 40° C y 100 v en tampón acetato sódico pH 5 0.1 M durante aproximadamente dos horas y media.

Tras la electroforesis se transfiere a una membrana de nylon, se incuba con la sonda anti-tRNA^{Glu}-DIG y se detecta mediante anticuerpo anti-digoxigenina (ver apartado 3.3 de Materiales y Métodos).

A continuación, en la figura 64 se muestran los Northern blots en condiciones ácidas de los tRNAs de las distintas cepas mutantes:

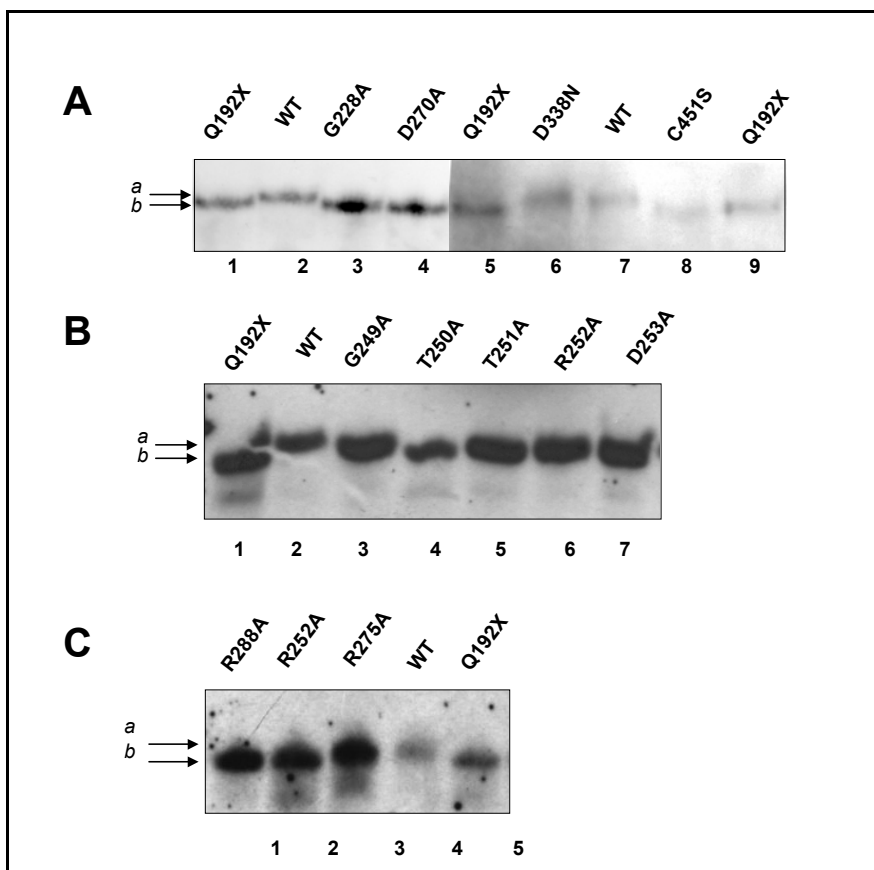


Figura 64: Modificación de los tRNAs de la DEV16 y derivados mediante análisis Northern blot con sonda anti-tRNA^{Glu}-DIG. Las flechas indican la posición del tRNA^{Glu} modificado (a) y no modificado (b).

Las diferencias entre la migración de los tRNAs son realmente pequeñas y difíciles de apreciar, pero los ensayos se realizaron al menos tres veces y los resultados siempre son repetitivos y concuerdan con los resultados de los ensayos de "readthrough".

Observamos que los tRNAs de las cepas con mutaciones en los motivos G1 (G228A), G3 (D270A), todos los mutantes del G2 (G249A, T250A, T251A, R252A y D253A), R288A y C451S migran ligeramente más rápido que el control de la cepa

modificadora DEV16-WT por lo que podemos deducir que estos tRNAs no llevan la modificación mnm⁵U. Recordamos que estos mutantes (a excepción de los dos últimos, R288A y C451S) presentan la capacidad de hidrólisis bastante baja o incluso nula.

Por otro lado, en las cepas con mutaciones que producen un efecto ligero o nulo en la actividad GTPasa como G4 (D338N), G5 (S358A) y R275A nos encontramos los tRNAs modificados ya que migran ligeramente más lentos e igual que el control de la cepa DEV16-WT.

Los datos obtenidos por Northern blot directo coinciden con los datos de "readthrough" y nos permiten concluir que en MnmE **la hidrólisis del GTP, y no su unión, es necesaria para la función modificadora de los tRNAs, aunque no es suficiente** ya que se requieren otros mecanismos, además de la hidrólisis del GTP, para realizar la modificación del tRNA. Estos datos permiten diferenciar a MnmE de las GTPasa clásicas, en las cuales, se requiere únicamente la unión del GTP para desarrollar la función biológica de la proteína.

7. Viabilidad celular:

Previamente nuestro grupo ya había demostrado que mutaciones nulas en *mnmE* son letales dependiendo del fondo genético (Cabedo *et al.*, 1999). En las cepas JC7623 y V5701 la mutación nula en el gen *mnmE* produce la letalidad de la célula, mientras que las cepas DEV16 y MC1000 con esta misma mutación son viables (ver apartado 3.5 de la Introducción).

Con el fin de estudiar el fenómeno de letalidad sintética asociado a la capacidad modificadora de los tRNAs de la proteína MnmE, introdujimos las mutaciones de MnmE estudiadas en distintas cepas y observamos la viabilidad celular en los distintos fondos genéticos. Hasta ahora sabíamos que mutantes nulos de *mnmE* (obtenidos mediante la interrupción del gen *mnmE* con la inserción de un cassette de kanamicina) y que por tanto no expresan la proteína MnmE, producen letalidad en ciertos fondos genéticos. Ahora, el objetivo es estudiar el efecto de las distintas mutaciones en este fenómeno de letalidad sintética. Las mutaciones estudiadas en este trabajo, no producen la ausencia de la proteína, pero dan lugar a proteínas mutantes, algunas de las cuales tienen afectada a distintos niveles la capacidad de unión a nucleótido, la actividad GTPasa o la capacidad modificadora de tRNAs.

Por tanto, el objetivo en este apartado es introducir las mutaciones descritas hasta ahora en diferentes cepas y estudiar el efecto que tienen sobre la letalidad sintética con el fin de establecer la relación entre las propiedades bioquímicas de MnmE, la presencia de tRNAs modificados con el grupo mnm^5U_{34} y la viabilidad celular.

7.1 Introducción de las mutaciones en las distintas cepas:

Para obtener las cepas con las correspondientes mutaciones introducidas en el cromosoma seguimos la estrategia descrita a continuación. En primer lugar. Por mutagénesis dirigida se introdujeron las mutaciones en el plásmido pIC914; este plásmido contiene un fragmento de 1.3 kb de la región que incluye el gen *mnmE* completo y el gen *tnaA* adyacente interrumpido por un cassette de kanamicina (kan^R) que posteriormente nos servirá como marcador. El plásmido pIC914 y sus derivados mutantes se introducen en el cromosoma de la cepa IC3647 mediante transformación lineal (Cabedo *et al.*, 1999; Winans *et al.*, 1985) (ver figura 65).

La cepa IC3647 es la JC7623 (*recBC sbcBC*) con una copia extra del gen *mnmE* en un fago λ (λ 718) insertado en el minuto 17 del cromosoma de la cepa y que proporciona a la célula una proteína MnmE funcional. Al transformarla con el plásmido pIC914 lineal (o sus derivados) se produce la recombinación entre la copia del gen *mnmE* mutante del plásmido pIC914 y la copia salvaje del cromosoma dando lugar a la obtención de una cepa IC3647-Kan^R con la mutación deseada introducida en el minuto 83 del cromosoma (*locus mnmE*) junto a un marcador de kanamicina.

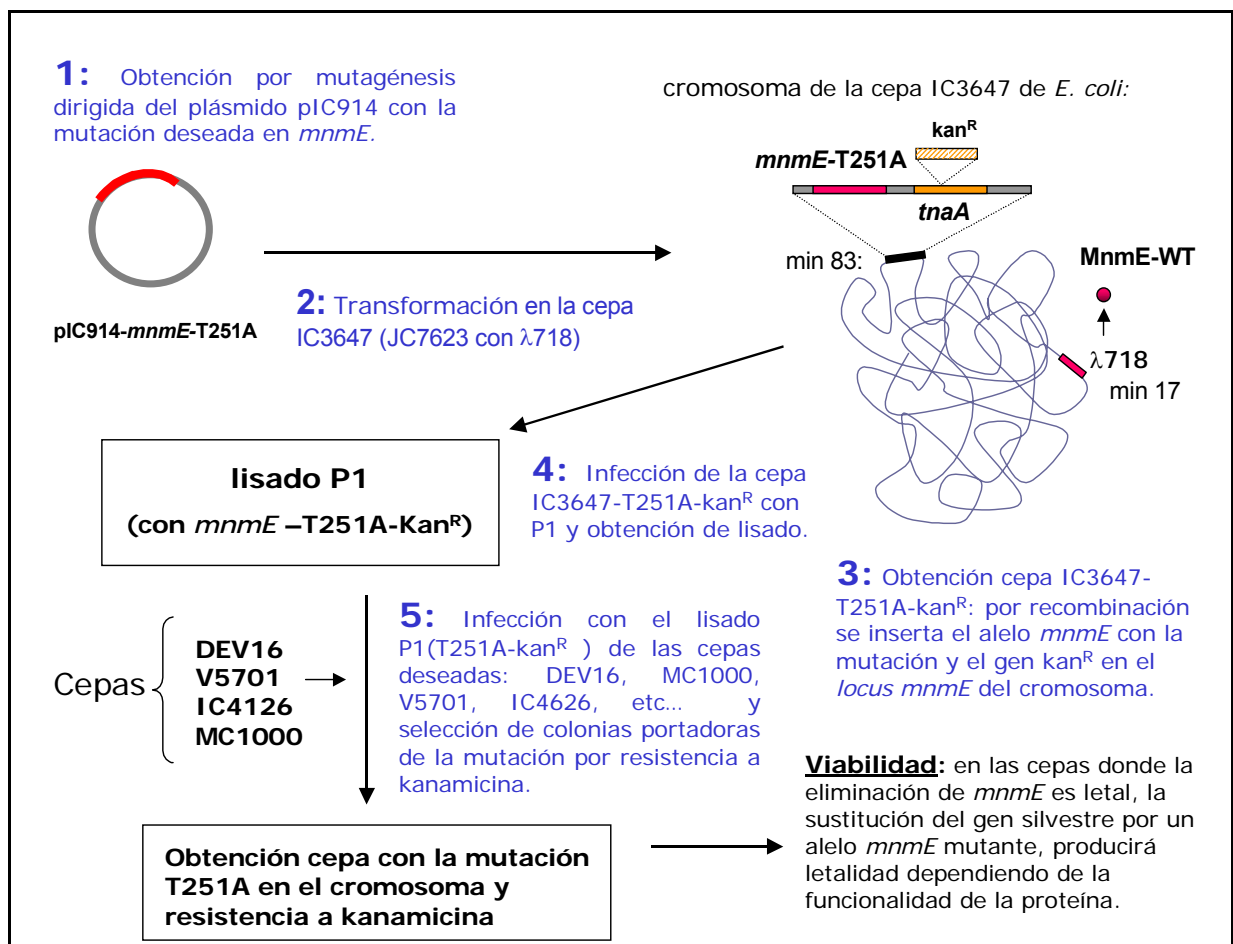


Figura 65: Esquema de la obtención de las cepas portadoras de la mutación en el cromosoma bacteriano empleando como ejemplo la introducción del alelo mutante *mnmE*-T251A.

La cepa JC7623 es inviable cuando la copia de *mnmE* insertada no es funcional, por ello se requiere la presencia del fago λ 718 que le permite a la célula vivir en este fondo genético. Posteriormente se hace uso de un bacteriófago P1; se crece el virus en la cepa IC3647-Kan^R para obtener lisados en los que existen cápsulas virales conteniendo regiones cromosómicas, alguna de las cuales serán, por tanto, portadoras de la mutación en *mnmE* deseada junto con la resistencia a kanamicina. Con este lisado podemos

infectar cepas y recuperar colonias seleccionando la resistencia a kanamicina. Dado que el gen *mnmE* y el gen *kan^R* se encuentran aproximadamente a 1000 pares de bases de distancia es casi seguro que ambos genes se co-transducirán conjuntamente, por lo que la resistencia a kanamicina es empleada como marcador de la introducción del alelo mutante en el cromosoma bacteriano. En la figura 65 se esquematiza el proceso de introducción de las mutaciones en el alelo *mnmE* de la cepa deseada.

La tabla 19 resume los plásmidos derivados del pIC914 y las cepas *kan^R* derivadas de la IC3647 portadoras de las mutaciones en *mnmE* indicadas:

Alelo <i>mnmE</i> :		Plásmidos derivados del pIC914:	Cepas <i>kan^R</i> derivadas de la IC3647:
G1	G228A	pIC960	IC4757
G2	G249A	pIC1012	IC4905
	T250A	pIC1015	IC4903
	T250S	pIC1060	IC5057
	T251A	pIC1016	IC4904
	T251S	pIC1049	IC5082
	T250S/T251S	pIC1071	IC5109
	R252A	pIC979	IC4836
	D253A	pIC1014	IC4955
G3	D270A	pIC961	IC4758
G4	D338N	pIC962	IC4759
G5	S358A	pIC1053	IC5084
Cys	C451S	pIC925	IC4605
Arg	R224A	pIC1069	IC5118
	R252K	pIC1081	IC5168
	R256A	pIC1073	IC5110
	R275A	pIC980	IC4837
	R288A	pIC1051	IC5083
NULC	MNME-1::KA	pIC720	IC3652

Tabla 19: Tabla resumen de los plásmidos derivados del pIC914 con las mutaciones indicadas introducidas mediante mutagénesis dirigida y cepas derivadas de la IC3647 (JC7623/λ718) con las mutaciones indicadas introducidas en el cromosoma mediante transformación lineal. Estas cepas derivadas de la IC3647 son las empleadas para obtener los lisados del fago P1 correspondientes.

7.2 Obtención de transductantes *kan^R*:

Realizamos la transducción con los fagos P1 sobre varias cepas; en aquellas que la ausencia de *mnmE* no produce letalidad como **DEV16** no es necesario aportar una copia

extra salvaje, simplemente se seleccionan colonias resistentes a kanamicina y posteriormente verificamos por PCR y secuenciación la correcta inserción de la mutación en el cromosoma bacteriano.

Las cepas JC7623 y V5701 sabemos que no son viables sin una copia funcional del gen *mnmE*, por tanto, para trabajar con estas cepas debemos aportar una segunda copia extra del gen *mnmE*. En el caso de la cepa JC7623, como ya hemos comentado anteriormente, mediante la inserción del fago λ 718 en el cromosoma para dar lugar a la cepa IC3647 y en el caso de la cepa V5701 introducimos el plásmido pIC755 (V5701/pIC755 = IC4126) el cual consiste en el plásmido pMAK700 con un inserto de 6394 pb que incluye el gen *mnmE* silvestre, además, el plásmido contiene el gen de resistencia a cloranfenicol. Este plásmido es un replicón termosensible (inactiva su replicación a 42° C), por lo que, al incubar a la bacteria que lo porta a la temperatura restrictiva, se pierde con las sucesivas divisiones de la bacteria.

Los datos previos demostraban que la introducción de una mutación nula produce letalidad en la cepa V5701 (Cabedo *et al.* 1998). Ahora queremos estudiar el efecto de mutaciones puntuales (en diferentes motivos y residuos de la proteína que dan lugar a mutantes con diferentes efectos sobre la actividad GTPasa y la función modificadora) sobre la viabilidad celular.

En primer lugar, realizamos la transducción sobre la cepa **V5701** y seleccionamos colonias resistentes a kanamicina, en paralelo realizamos también la transducción en la cepa **IC4126** (V5701/pIC755), seleccionando a 30° C colonias resistentes a kanamicina y cloranfenicol, las colonias recuperadas en este caso son células que ha introducido la copia mutante en el cromosoma (resistencia a kanamicina) y además conservan el plásmido que le aporta una copia extra funcional del gen *mnmE* (resistencia a cloranfenicol). Una vez obtenida esta cepa IC4621 con la mutación, podemos comparar la viabilidad de estas células a las dos temperaturas: 30° C con expresión de la proteína funcional del plásmido pIC755 y 42° C con la pérdida del plásmido pIC755 y por tanto con la copia mutante de *mnmE* como único gen *mnmE* presente en la célula. Si la mutación en *mnmE* introducida en el cromosoma afecta a la viabilidad no obtendremos supervivientes a 42° C, como control usaremos la misma cepa a 30° C con la cual siempre recuperaremos colonias.

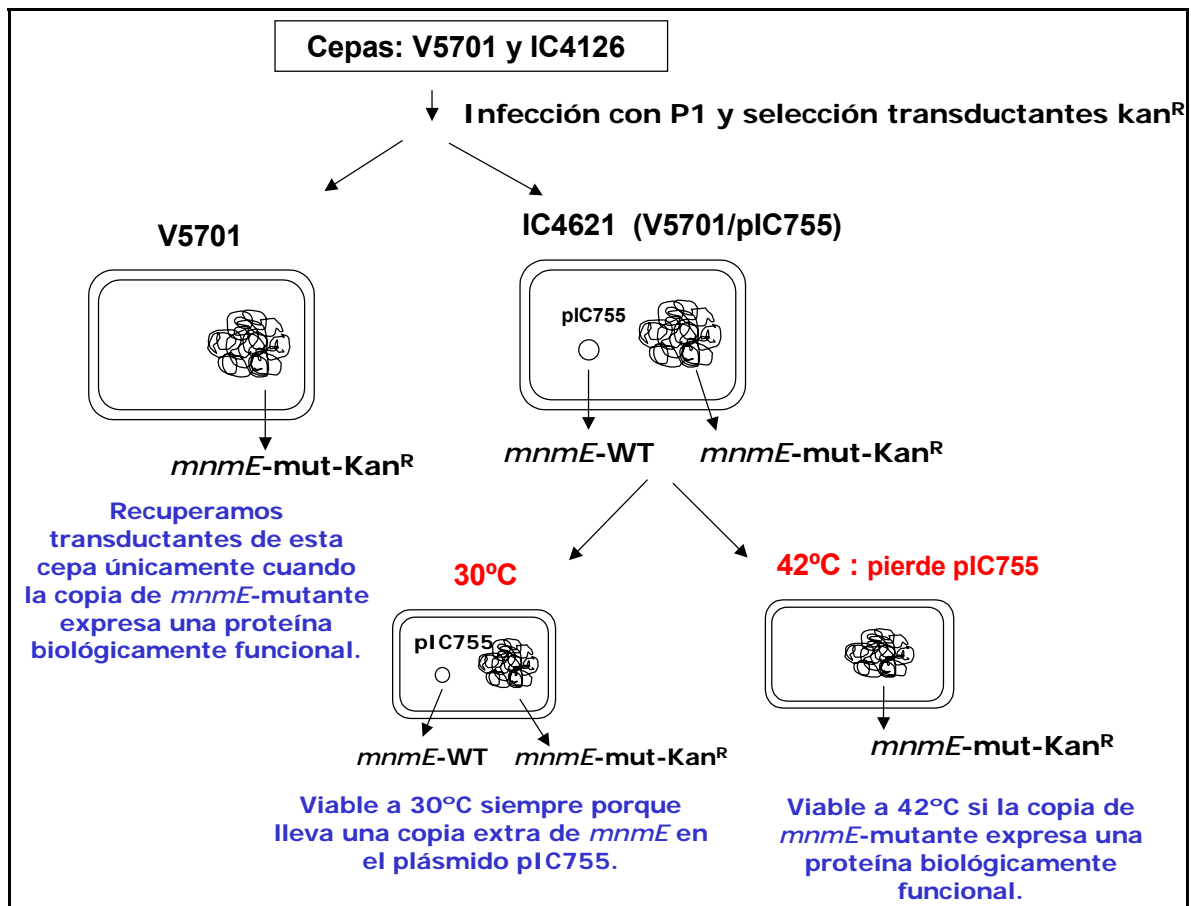


Figura 66: Esquema de la obtención de transductantes kan^R en las cepas V5701 y IC4126 y supervivencia a 30° C y 42° C.

En primer lugar, realizamos la transducción sobre la cepa **V5701** y seleccionamos colonias resistentes a kanamicina, en paralelo realizamos también la transducción en la cepa **IC4126** (V5701/pIC755), seleccionando a 30° C colonias resistentes a kanamicina y cloranfenicol, las colonias recuperadas en este caso son células que ha introducido la copia mutante en el cromosoma (resistencia a kanamicina) y además conservan el plásmido que le aporta una copia extra funcional del gen *mnmE* (resistencia a cloranfenicol). Una vez obtenida esta cepa IC4621 con la mutación, podemos comparar la viabilidad de estas células a las dos temperaturas: 30° C con expresión de la proteína funcional del plásmido pIC755 y 42° C con la pérdida del plásmido pIC755 y por tanto con la copia mutante de *mnmE* como único gen *mnmE* presente en la célula. Si la mutación en *mnmE* introducida en el cromosoma afecta a la viabilidad no obtendremos supervivientes a 42° C, como control usaremos la misma cepa a 30° C con la cual siempre recuperaremos colonias.

La siguiente tabla resume los resultados de las transducciones en las cepas indicadas y con los distintos lisados de P1 portadores de los alelos de *mnmE* mutantes:

Alelo <i>mnmE</i> :		Cepas :		
		DEV16	V5701	IC4621 (30°C)
G1	G228A	IC4767	-	IC4763
G2	G249A	IC4963	-	IC4910
	T250A	IC4906	-	IC4908
	T250S	IC5058	IC5074*	IC5073
	T251A	IC4907	-	IC4909
	T251S	IC5018	-	IC5014
	T250S/T251S	IC5112	-	IC5125
	R252A	IC4864	-	IC4859
	D253A	IC4956	-	IC4857
G3	D270A	IC4768	-	IC4764
G4	D338N	IC4769	IC4761	IC4765
G5	S358A	IC5020	IC5017	IC5072
Cys	C451S	IC4770	-	IC4976
Arg	R224A	IC5111	IC5115	IC5123
	R252K	IC5169	IC5170	IC5171
	R256A	IC5113	IC5122	IC5124
	R275A	IC4865	IC4862	IC4860
	R288A	IC5019	IC5015*	IC5016

Tabla 20: Tabla resumen de las cepas recuperadas mediante transducción con los P1 portadores de los alelos de *mnmE* mutantes y seleccionando en un medio con kanamicina. Los transductantes recuperados derivados de la cepa IC4621 se obtiene siempre a 30°C. Con la cepa V5701 sólo obtenemos transductantes con algunas de las mutaciones; en aquellas indicadas como " - " no fue posible recuperar ninguna colonia portadora de la mutación en este fondo genético. Aquellas marcadas con " * " presentan propiedades particulares que más tarde se explican.

Como puede observarse estudiando la tabla 20, con la cepa DEV16 siempre es posible recuperar transductantes portadores de la mutación porque en este fondo genético la célula es viable aunque no exista una copia funcional de *mnmE*.

En la cepa IC4621 se recuperan también transductantes Kan^R a 30° C portadores de la mutación porque contienen el plásmido pIC755 con una copia silvestre de *mnmE*. Sin embargo en la cepa V5701 solamente obtenemos células transductantes kan^R con los alelos mutantes que tienen capacidad modificadora: WT, D338A, S354A, R224A, R256A y R275A mientras que aquellas mutaciones que ya habíamos visto que producían la pérdida de la capacidad modificadora de los tRNAs (ver apartado 7 de Resultados) producen letalidad celular en esta cepa. Estos alelos mutantes son: G229A (G1), D270A (G3), todos los mutantes de G2: G249A, T250A, T251A, T251S, R252A y D253A y por último, la cisteína carboxiterminal C451A.

Mutación		Capacidad modificadora	Viabilidad en las cepas JC7623 y V5701
G1	G228A	-	-
G2	G249A	-	-
	T250A	-	-
	T250S	-	- (42°C)
	T251A	-	-
	T251S	-	-
	T250S/T251S	-	-
	R252A	-	-
	D253A	-	-
	G3	D270A	-
G4	D338N	+	+
G5	S358A	+	+
Cys	C451S	-	-
Arg	R224A	+	+
	R252K	+	+
	R256A	+	+
	R275A	+	+
	R288A	-	" + "
NULO	MNME-1::KAN	-	-

Tabla 20: Relación entre la capacidad modificadora y la viabilidad en los distintos mutantes de MnmE

Con estos datos, podemos observar la relación directa entre ambas propiedades y afirmar que **la función modificadora de los tRNAs es esencial para la célula en estos fondos genéticos (V5701 y JC7623)**, en consecuencia, es la pérdida de esta capacidad de modificar los tRNAs la causa que produce letalidad sintética.

Pero hemos encontrado dos posibles excepciones a esta observación, el mutante **T250S**, el cual presenta unas propiedades de supervivencia especiales y el mutante **R288A**, el cual según nuestras observaciones no presenta capacidad modificadora de los tRNAs y, sin embargo, sí es posible obtener en el fondo genético V5701 una cepa portadora de la mutación R288A (IC5015 = V5701-R288A). Estos dos mutantes peculiares se analizarán con más detalle en los apartados 7.4 y 7.5.

7.3. Supervivencia relativa de las cepas derivadas de IC4621:

Con la finalidad de estudiar con mayor profundidad el efecto de las mutaciones en la cepa V5701 y su derivada IC4126 se calculó el número de colonias supervivientes a 30° C y 42° C.

Una vez aislados (a la temperatura permisiva de 30° C) y verificados los clones de la cepa IC4126 con el alelo mutante y resistencia a kanamicina y cloranfenicol se siembran en placas de LAT con kanamicina y se incuban a 30° C y 42° C durante 24h. Si el residuo mutado es esencial para la función de modificadora de MnmE, la incubación a la temperatura restrictiva será letal para la célula y por tanto no recuperaremos colonias a 42° C porque las células pierden el plásmido pIC755 y la célula queda sólo con la copia mutada del gen.

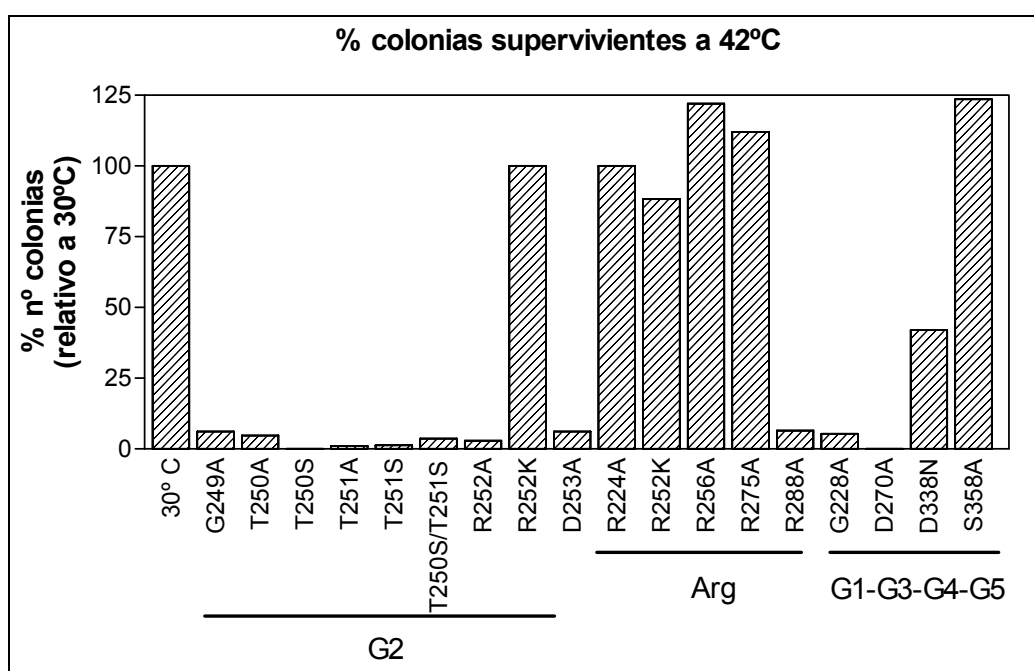


Figura 67: número relativo de colonias supervivientes a 42° C considerando el número de colonias crecidas a 30° C como el 100% para cada una de las mutaciones.

En la figura 67 se puede observar la supervivencia relativa de las cepas derivadas de la IC4621 portadoras de mutaciones a 42° C. Como puede observarse, en el caso de aquellas mutaciones con actividad modificadora de los tRNAs y que por tanto no producen letalidad sintética, el número de colonias recuperadas a 42° C es similar al recuperado a 30° C (en la figura 67 representamos el % de colonias recuperadas a 42° C

considerando el número de colonias recuperadas a 30° C en las mismas condiciones, como el 100%). Sin embargo, las mutaciones que producen letalidad sintética y por tanto no son viables en el fondo V5701, dan un número de colonias recuperadas a 42° C muy bajo frente a las recuperadas a 30° C (las cuales mantienen la copia WT extra).

Además, también estudiamos la sensibilidad al cloranfenicol de las cepas supervivientes a 42° C ya que hay que tener en cuenta que es posible que el plásmido pIC755 se inserte en algunas ocasiones en el cromosoma de la cepa, en este caso, las colonias serían supervivientes a 42° C a pesar de contener un alelo mutante no modificador, ya que mantendrían la copia salvaje del pIC755 en el cromosoma junto al gen de resistencia a cloranfenicol.

En el caso de las cepas con mutaciones viables, hemos observado que las colonias supervivientes a 42° C no son resistentes al cloranfenicol en menos del 5% de las colonias, es decir no han integrado el plásmido, y en el cromosoma sólo está presente una única copia de *mnmE*. En cambio, con las cepas portadoras de alelos letales el número de colonias recuperadas a 42° C y kan^R es extremadamente bajo respecto al alelo WT control, y además, estas colonias son en más de un 90% Cm^R, indicándonos que el plásmido pIC755 ha sido integrado en el cromosoma por recombinación y por tanto existe una segunda copia de *mnmE* (salvaje en este caso) en el cromosoma que permite a la célula sobrevivir en estas condiciones.

Para confirmar estos datos analizamos por PCR y secuenciación el gen *mnmE* de estas colonias IC4126-Kan^R-Cm^R-42°C^R y vimos que en todos los caso contenían una copia salvaje del gen *mnmE*.

7.4. Viabilidad del mutante *mnmE*-T250S: mutación termosensible.

El caso de la mutación T250S es interesante. Los resultados de modificación del tRNA obtenidos por ensayos de "readthrough" y por Northern blot con la cepa DEV16-T250S indican que esta cepa no es capaz de modificar el tRNA al igual que el resto de mutantes del G2.

Dado que no tiene capacidad modificadora suponemos que tampoco será viable una cepa con esta mutación en el fondo genético de la cepa V5701, sin embargo los resultados de las transducciones indican que es posible recuperar transductantes Kan^R que llevan como única copia de *mnmE* el alelo *mnmE*-T250S cuando trabajamos a temperatura de 30° C. Curiosamente cuando titulamos esta cepa V5701-T250S-Kan^R a

42° C obtenemos un número de colonias prácticamente nulo: el 0.0066% del número de colonias recuperadas a 30° C en las mismas condiciones.

Recordamos que aquí no existe ningún plásmido termosensible pIC755 que aporta una copia extra funcional de *mnmE*, en la cepa V5701-T250S-Kan^R existe una única copia del gen y ésta es portadora de la mutación T250S. Es decir, cuando crecemos las células a 30° C recuperamos colonias, mientras que la misma cepa a 42° C no es capaz de crecer indicándonos un claro comportamiento de una **mutación termosensible**.

Cepa	Alelo <i>mnmE</i> en el cromosoma:	Número de colonias recuperadas:	
		30° C	42° C
V5701	WT	224	280
V5701-T250S	T250S	144 (48h)	0

Tabla 22: Supervivencia a 30° C y 42° C de la cepa portador de la mutación T250S en el cromosoma. Número de colonias recuperadas en placa en titulaciones a 30° C y 42° C (diluciones 10⁻⁶).

La cepa V5701 crece sin problemas a 30° C y 42° C, sin embargo cuando sustituimos el alelo *mnmE*⁺ por *mnmE-T250S* la cepa tiene dificultades; en primer lugar sólo se recuperan transductantes a 30° C si la placa se deja crecer 24h extras, ya que las colonias a las 24h son extremadamente pequeñas en comparación con el resto de cepas y controles, además, esta misma cepa no es capaz de crecer a 42° C y no se recupera ninguna colonia, incluso alargando el tiempo de incubación hasta 48 horas. Es decir, la cepa V5701 cuando lleva como única copia el gen *mnmE-T250S* a 30° C es viable, aunque con dificultad, y totalmente inviable a 42° C.

En una mutación termosensible, el efecto que produce el cambio de un aminoácido sólo es fenotípicamente significativo a partir de una temperatura crítica, es decir, en nuestro caso la sustitución de la T250 por una residuo de serina produce una alteración en la secuencia de la proteína y por tanto, probablemente también en la dinámica de su estructura. Podemos especular que el cambio T250S afecta al correcto plegamiento de la región de la proteína donde se encuentra el residuo; quizás, como la T250 se localiza en el motivo G2, supuesta región implicada en el cambio conformacional del loop efector, es posible que la sustitución de la treonina a serina produzca un cambio en la flexibilidad u orientación de la región, dependiente de la temperatura a la que la proteína se sintetiza; de esta forma, a 42° C vemos un fenotipo letal porque la mutación T250S puede impedir el correcto cambio conformacional mediado por el loop efector y que se requiere, como ya hemos visto, para la capacidad modificadora de la

proteína y por tanto, para su viabilidad. Mientras que a 30° C, debido al crecimiento, y síntesis proteica más lento o quizás debido a las condiciones que la temperatura permisiva aporta, el efecto de la mutación no llega a afectar a función del motivo y de la proteína y, por tanto, la viabilidad celular.

Con el fin de estudiar más a fondo las características del mutante termosensible realizamos **estudios del crecimiento** de las cepas portadoras de la mutación, para ello comparamos el crecimiento de los mutantes T250S en las cepas V5701 y IC4126 a 30° C y 42° C en medio líquido y usando como control las mismas cepas con el alelo salvaje.

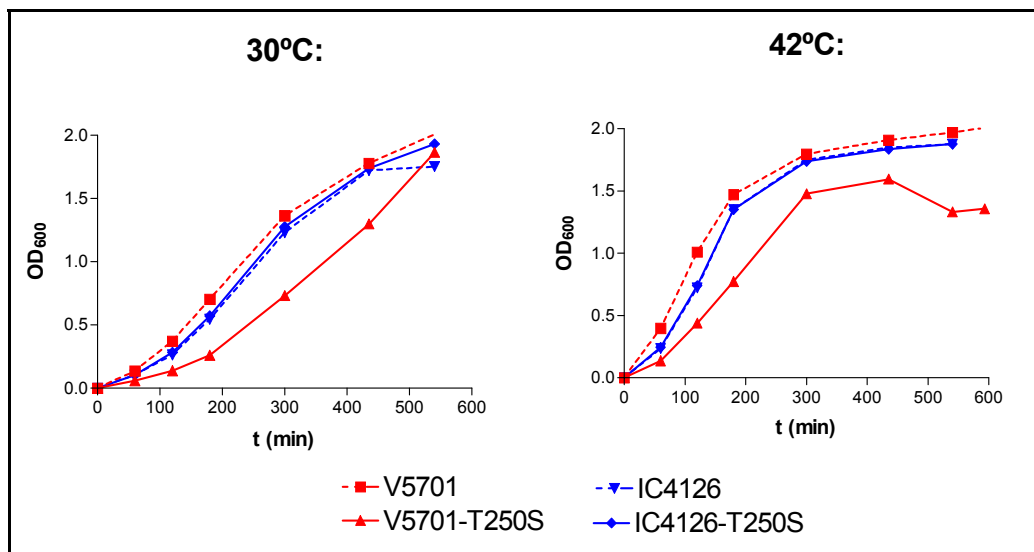


Figura 68: Curvas de crecimiento de las cepas V5701 y IC4126 con la mutación termosensible T250S.

IOS

medidas de la densidad óptica para seguir el crecimiento de las células. El cultivo original a partir del cual se inocula, se creció a 30° C durante toda la noche y al día siguiente se empleó para preparar los cultivos de día a las temperaturas indicadas.

A 30° C el crecimiento de las cepas es equivalente excepto la cepa V5701-T250S que crece mucho más lenta, este fenómeno ya lo habíamos visto en medio sólido; las colonias en la placa a las 24 horas eran mucho más pequeñas que el resto de colonias de las otras cepas en las mismas condiciones.

A 42° C el crecimiento general es más rápido y se alcanza la fase estacionaria con mayor rapidez, la cepa 5701-T250S de nuevo presenta un crecimiento mucho más lento y se observa que a partir de las 5 horas de crecimiento a 42° C empieza a disminuir la velocidad incluso desciende la densidad óptica indicándonos que las células dejan de crecer. Este fenómeno no llega a observarse a en el cultivo IC4126-T250S, probablemente porque, aunque se haya perdido el plásmido pIC755, todavía queda en la célula tRNAs modificados capaces de proporcionar la viabilidad a la célula.

Nos preguntamos si la letalidad observada en la célula a esta temperatura se debía a la pérdida de la proteína MnmE-T250S a la temperatura restrictiva como ocurre con el mutante nulo *mnmE::kan* (en esta cepa el gen *mnmE* se encuentra interrumpido en la base 519 del gen (sitio *MunI*) por un cassette de kanamicina y la proteína truncada expresada se degrada). Igualmente, en la cepa DEV16, existe una mutación de stop Q192X que produce una proteína truncada que se degrada.

Quisimos averiguar si en el caso de esta mutación termosensible la proteína MnmE-T250S a esta temperatura restrictiva es degradada o, por si lo contrario, continúa sintetizándose aunque no es activa.

Crecimos cultivos de V5701-T250S a 30° C y 42° C (a partir de un cultivo de noche crecido a 30°C). Con la finalidad de alcanzar las condiciones necesarias para expresar la letalidad de la mutación, mantuvimos ambos cultivos en fase exponencial durante 10 horas mediante diluciones continuas. Se recogieron muestras a lo largo de las 10 horas de crecimiento. Las muestras se sometieron a SDS-PAGE y Western blot con el anticuerpo anti-MnmE con el fin de detectar la presencia de la proteína.

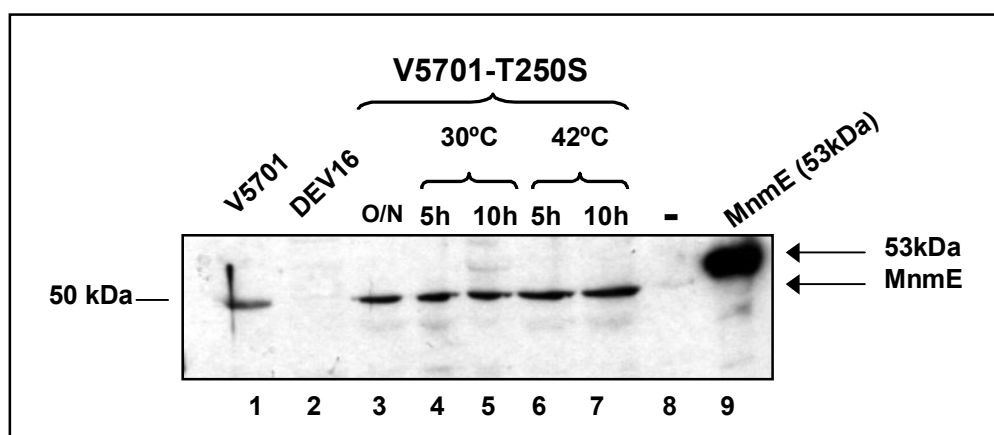


Figura 69: Detección de la proteína MnmE en la cepa termosensible T250S. Se cargó 50 µg de extracto total soluble de cada una de las cepas: V5701 (carrera 1), DEV16 (carrera 2), V5701-T250S 30° C, cultivo original (carrera 3), V5701-T250S 30° C, 5 horas (carrera 4), V5701-T250S 30° C, 10 horas (carrera 5), V5701-T250S 42° C, 5 horas (carrera 6), V5701-T250S 42° C, 10 horas (carrera 7), carrera 9 sin muestra, 0.25 µg de proteína MnmE purificada del plásmido pIC684 v con un tamaño de 53 kDa.

Como se observa en la figura 69 los niveles de proteína MnmE son equivalentes en ambas temperaturas y no se observa desaparición de la proteína, incluso en las muestras tras 10 horas en fase exponencial a 42° C. Como control empleamos células de la cepa V5701 (con el alelo *mnmE*⁺) y DEV16 (expresa una proteína MnmE truncada que se degrada), así como la propia proteína MnmE nativa purificada. Estos resultados

sugieren que probablemente la proteína MnmE-T250S expresada a 42° C es estable y, por tanto, su efecto sobre la viabilidad celular puede deberse a una posible inactivación de sus propiedades bioquímicas.

Sin embargo, estos resultados no son definitivos ya que no debemos descartar la posibilidad de que la proteína sea inestable y se degrade pero manteniendo una tasa de degradación equivalente a la de síntesis, por lo que los niveles de proteína observados son siempre constantes.

Suponiendo que la proteína a 42° C es estable, y dado que no parece ser funcional, decidimos realizar ensayos de **actividad GTPasa** de la proteína MnmE-T250S a 30° C y 42° C para observar posibles diferencias en las propiedades bioquímicas de la proteína. Para ello se purificó la proteína mutante a 42° C, es decir, durante todo el proceso de crecimiento de la cepa e inducción de la proteína se mantuvo la temperatura a 42° C para que la proteína recombinante expresada se sintetizara a la temperatura restrictiva. Tras su purificación, inmediatamente se realizó un ensayo de actividad GTPasa comparando la actividad con la misma proteína expresada y purificada a 30° C y la proteína nativa.

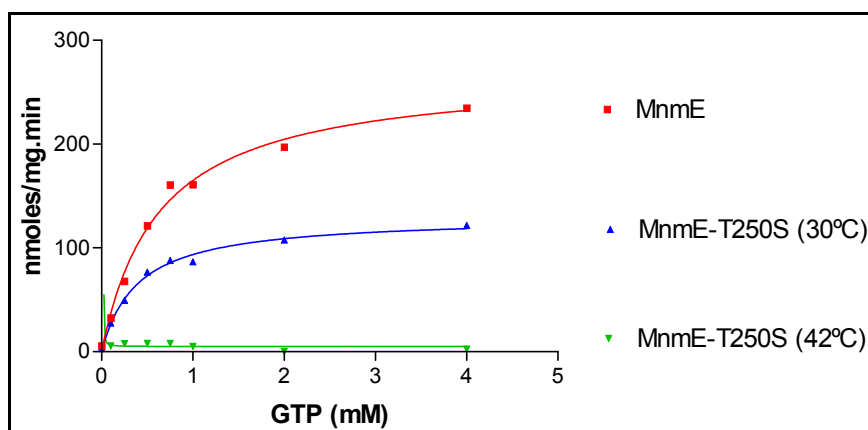


Figura 70: Actividad GTPasa de la proteína mutante MnmE-T250S expresada a 30° C y 42° C en comparación con la actividad de la proteína nativa (concentración de todas ellas 2 μ M).

La proteína MnmE-T250S expresada y purificada a 42° C no presenta actividad GTPasa, mientras que la misma proteína mutante expresada a 30° C presenta una actividad GTPasa bastante alta. Estos resultados demuestran el efecto de la temperatura sobre las propiedades de este mutante y explican la inviabilidad de la cepa V5701 portadora de la mutación.

Posteriormente, pudimos comprobar que la proteína MnmE-T250S expresada y purificada a 42° C, curiosamente es capaz de recuperar su actividad normal tras congelar la proteína a -80° C, descongelarla y manipularla durante algún tiempo a 4° C. Es decir, probablemente la ausencia de actividad se debe a la incorrecta dinámica o movilidad del loop efector donde se encuentra el residuo con la mutación T250S y este fenómeno es

dependiente de la temperatura, de esta forma, al someter a la proteína a un proceso de congelación/descongelación y manipulación a 4° C durante un periodo de tiempo de varias horas, creemos que probablemente se revierte el fenotipo porque la proteína recupera su conformación y plegamiento equivalente a la proteína expresada a la temperatura permisiva. Además, este dato apoya la hipótesis de que la mutación T250S a 42° C no afecta a la estabilidad de la proteína, sino seguramente sólo a su plegamiento y movilidad durante el cambio conformacional y por tanto en la actividad GTPasa.

Decidimos estudiar la capacidad modificadora de este mutante termosensible analizando por Northern blot el estado de modificación del tRNA^{Glu} de la cepa a 30° C y 42° C, para determinar si la mutación termosensible impide la modificación de los tRNAs y, por tanto, impide la viabilidad celular en estas condiciones. Para ello se hizo la extracción del tRNA total de la cepa DEV16-T250S de cultivos crecidos a 30° C y 42° C y, a continuación, se detectó específicamente el tRNA^{Glu} mediante Northern blot en condiciones ácidas como se ha descrito en el apartado 6.2 de Resultados.

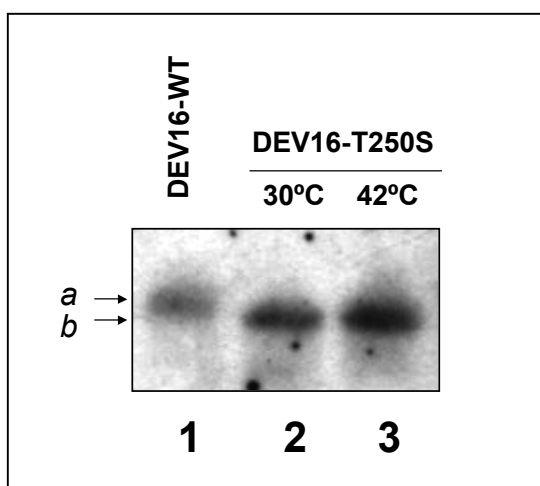


Figura 71: Estado de modificación del tRNA^{Glu} de la cepa DEV16-WT (carrera 1) y DEV16-T250S expresada a 30° C (carrera 2) y 42° C (carrera 3). Las flechas indican la posición del tRNA modificado (a) y no modificado (b).

Como se puede apreciar en la figura 71, el tRNA^{Glu} detectado de la cepa DEV16-T250S crecida a 30° C y 42° C, no se encuentra modificado, ya que migra ligeramente por delante del control de la cepa modificadora (DEV16-WT).

Creemos que a 30° C, la proteína es funcional aunque con serias dificultades (por eso vemos colonias a 30° C pero con un crecimiento extremadamente lento que requiere de 48h para crecer). Por tanto, creemos que sí debe haber algunos pocos tRNAs modificados que permiten la supervivencia, pero la sensibilidad de esta técnica no nos permite detectarlos.

7.5. Viabilidad del mutante no modificador *mnmE-R288A*:

Otro mutante que presenta particularidades respecto a la viabilidad celular es el mutante R288A. Esta mutación ya nos sorprendió cuando observamos que, en contra de lo esperado, no detectábamos modificación de los tRNAs mediante las técnicas directas e

indirectas, a pesar de tener actividad GTPasa cercana al 80% de la proteína nativa (apartados 5 y 6 de Resultados). Estos resultados acercan la mutación R288A al comportamiento de la mutación en el extremo carboxiterminal C451S donde igualmente observamos capacidad de hidrólisis pero no actividad modificadora.

Con estos datos sobre la modificación de los tRNAs, era de suponer que el mutante R288A introducido en un fondo genético V5701 no sería viable. Sin embargo, tras la transducción somos capaces de recuperar colonias V5701-R288A-Kan^R aunque fenotípicamente se caracterizan por tener un crecimiento extremadamente lento y sólo son detectables en placa a 30° C tras incubar 48 horas.

El comportamiento de la cepa IC4126-R288A es en un principio equivalente al de otras cepas con mutaciones inviables, al incubar un cultivo titulado en placa a 30° C y 42° C observamos que a 42° C sólo se recuperan un 6.55% del número de colonias respecto a la placa a 30°C, además la mayoría de estas colonias son Cm^R, indicándonos que han integrado el plásmido pIC755, razón por la cual estas colonias son capaces de crecer.

Curiosamente, si continuamos incubando la placa a 42° C durante 24 horas extra, acabamos recuperando un número mucho mayor de colonias que sólo contienen una copia del gen *mnmE* y que portan la mutación R288A.

Cepa original:	Derivada con alelo R288A:	fenotipo:
IC3647	IC5083	Normal.
DEV16	IC5019	Normal.
V5701	IC5015	Colonias extremadamente pequeñas.
IC4126	IC5016	30°C: normal
		42° C: Colonias extremadamente pequeñas.

Tabla 23: Resumen de las cepas disponibles donde se ha introducido el alelo mutante R288A y propiedades fenotípicas observadas.

En conclusión, podemos afirmar que la mutación R288A introducida en el cromosoma de la cepa V5701 no confiere letalidad sintética a la célula pero ésta tiene serios problemas de crecimiento.

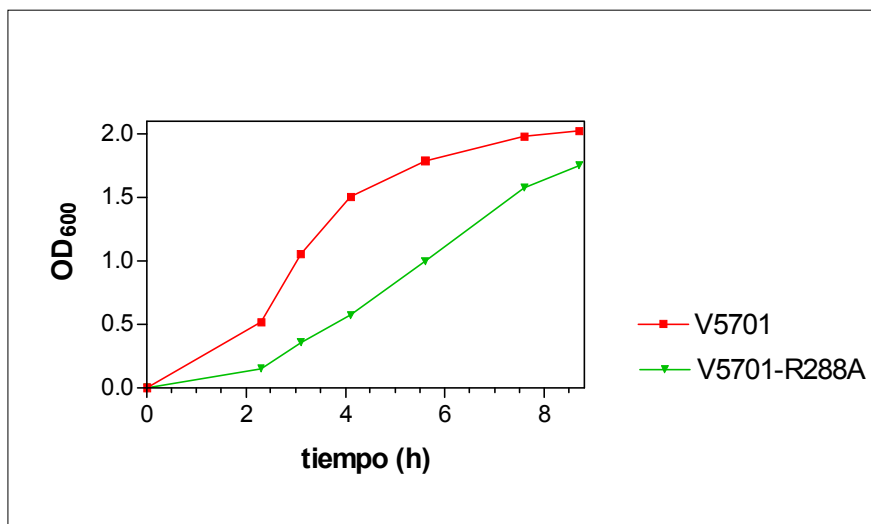


Figura 72: Curvas de crecimiento de las cepas mutantes V5701-R288A respecto a la cepa original V5701.

En la figura 72 se puede comparar el comportamiento de la cepa V5701-R288A respecto a la cepa V5701 con el alelo *mnmE*⁺. Como puede observarse la presencia de la mutación R288A en el cromosoma permite a la célula sobrevivir pero con un crecimiento muy lento que demuestra las dificultades de la célula para desarrollar sus funciones biológicas.

Pensamos que la mutación R288A es un ejemplo de la alta complejidad del sistema. La eficacia del proceso de traducción depende de la correcta interacción y estabilidad entre las moléculas que participan (tRNA, rRNA, mRNA, proteínas ribosomales, etc...). Los resultados obtenidos hasta ahora demuestran que la ausencia de la mutación *mnm*⁵U₃₄ en algunos tRNAs produce letalidad en ciertos fondos genéticos (al combinarse con otra mutación en la proteína S12 ribosomal, ver apartado de discusión). Por tanto, para explicar el comportamiento de este mutante, una posible explicación, es que en una cepa con la mutación R288A hay tRNAs modificados, pero en una cantidad indetectable con los métodos que usamos, aunque suficiente para permitir la viabilidad con dificultades que observamos.

Recordemos que las técnicas empleadas para detectar la capacidad modificadora de los mutantes son el "readthrough" del codón UAG del gen *lacZ* y el Northern blot directo de los tRNAs. En el primer caso, podríamos imaginar, que con unos niveles muy bajos de modificación y dado la baja actividad β-galactosidasa que detectamos con los ensayos de "readthrough", la técnica no es lo suficientemente sensible para llegar a detectar la presencia de pocas moléculas de RNAs modificadas.

Igualmente, el Northern directo de los tRNAs de la cepa DEV16-R288A donde detectamos únicamente la presencia de la modificación *mnm*⁵U₃₄ en el tRNA^{Glu}, no es una técnica lo suficientemente sensible para poder detectar la presencia de algunas moléculas de tRNA modificado, las cuales son capaces en este fondo genético, de aportar

a la célula la capacidad de vivir, aunque probablemente debido a su escaso número, con muchas dificultades y crecimiento extremadamente lento.

Desconocemos la posible función del residuo R288, pero las propiedades del mutante R288A respecto a capacidad hidrolítica y modificación recuerdan a las del mutante C451S, aunque creemos que las causas de la ausencia de modificación detectada en este caso están basadas en razones distintas a la de la cisteína. Podemos especular sobre su posible papel en la reacción de modificación del tRNA, por ejemplo, como residuo necesario para transmitir el cambio conformacional necesario para que el extremo carboxiterminal de la proteína y su cisteína se localicen en la posición adecuada para la reacción de modificación. También podemos especular su posible función en el reconocimiento del tRNA específico, ya que se encuentra cerca de la zona del dominio G que en otros GTPasas está descrita como implicada en el reconocimiento del efector (el cual sugerimos que sea el tRNA específico). Por último, también podemos tener en cuenta un posible papel más directo en la reacción de modificación, colaborando junto con la cisteína en la introducción del grupo químico cmnm o en el reconocimiento del grupo donador. En todo caso, la ausencia de esta arginina conservada, afecta gravemente a la capacidad modificadora de la proteína MnmE, aunque no inhibe del todo esta actividad, ya que creemos que algunas moléculas de tRNAs deben estar modificándose para permitir la viabilidad con dificultades que observamos en la cepa V5701-R288A.

8. Estudio de la interacción MnmE-tRNA:

Hasta el momento hemos demostrado que la actividad GTPasa de MnmE es esencial para la función modificadora de la proteína MnmE; sin la actividad GTPasa no existe modificación de los tRNAs y sin modificación la célula es inviable en ciertos fondos genéticos. Además, otros aminoácidos no implicados en la hidrólisis y que no pertenecen a los motivos consenso de las GTPasa (R288 y C451) también se requieren para la actividad modificadora demostrando que la hidrólisis del GTP es esencial para la reacción de modificación pero no suficiente.

Sin embargo, como ya hemos remarcado varias veces, no tenemos pruebas que MnmE sea la enzima que directamente realiza la reacción de modificación de los tRNAs; por tanto, no podemos descartar que quizás sea una enzima que controla indirectamente la reacción de modificación regulando a otra/s proteína/s desconocida/s las cuales realizan directamente la introducción del grupo metilaminometil en los tRNAs.

Para averiguar si la proteína MnmE es la enzima catalítica de la reacción intentamos detectar la posible unión entre la proteína y el tRNA mediante diferentes técnicas; se realizaron ensayos de unión *in vitro* de la proteína y el tRNA seguidos de retraso en gel, entrecruzamiento con luz ultravioleta y cromatografía de afinidad.

Una hipótesis de trabajo es que, considerando que MnmE es la proteína directamente modificadora, la unión y posterior hidrólisis del GTP produce un cambio conformacional que provoca dos efectos en la proteína; por un lado, al igual que ocurre con el resto de GTPasas, el cambio conformacional afecta al loop efector donde se encuentra el motivo G2 (en el switch I) y se produce un cambio en la orientación de los residuos invariables que le permite interactuar con el efector o diana molecular que suponemos que es el tRNA específico. Por otro lado, la cisteína catalítica del extremo carboxiterminal también sufre un cambio localizándose en la posición exacta para realizar la reacción química de introducción del grupo metilaminometil en el tRNA.

Si esta hipótesis es cierta, deberíamos ver una unión entre los tRNA específicos y la proteína MnmE. Además, es posible que esta unión sea dependiente del motivo G2 ya que en las GTPasa clásicas este motivo es crucial para que la proteína reconozca e interactúe con el efector.

A continuación, se presentan resultados provisionales de los experimentos desarrollados para el estudio de la interacción entre los tRNAs específicos y MnmE. Hasta la fecha, se han empleado diferentes estrategias para intentar detectar este tipo de interacción: retraso en gel, entrecruzamiento con luz UV y cromatografía de afinidad.

Con estas técnicas nos enfrentamos a diversos problemas que no hemos podido solucionar de momento: desconocimiento de las condiciones y factores necesarios para la reacción, ausencia de un sustrato adecuado (tRNA específico purificado y sin modificar) y un control positivo que nos asegure que las condiciones o métodos de detección son los adecuados para observar la interacción tRNA-MnmE.

8.1. Ensayos de retraso en gel.

8.1.1. Unión de la proteína MnmE y los tRNAs totales de una cepa no modificadora:

En primer lugar, probamos la unión entre la proteína MnmE y los tRNAs totales de una cepa no modificadora. Si MnmE se une directamente al tRNA, es posible que sea necesario que el tRNA se encuentre inicialmente sin modificar, por tanto empezamos usando como sustrato los tRNAs totales purificados de una cepa no modificadora (DEV16).

Se pusieron en contacto la proteína MnmE purificada y la mezcla de los tRNAs totales en presencia y ausencia de nucleótido; tras una incubación las muestras se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida y transferencia a una membrana de nylon, posteriormente mediante una sonda anti-tRNA^{Glu} (específica contra uno de los tRNAs modificados en la ruta donde participa MnmE) pretendemos detectar la posible unión entre la proteína y su tRNA sustrato, como un retraso en la migración del tRNA durante la electroforesis en gel de poliacrilamida.

Se partió de 20 µg de tRNA total purificados de una cepa DEV16. En estas condiciones el 15.78% de los tRNAs totales pertenecen a los supuestos tRNAs modificados por MnmE: Glu, Gln, Lys, Arg4 y Leu2 (Dong *et al.*, 1996). Al desconocer completamente la estequiometría de la posible reacción decidimos realizar mezclas de reacción equimolares (1:1) y también 1:2 y 1:4 (tRNA: MnmE). La reacción se llevó a cabo en presencia de GTP 6.67 mM ya que suponemos que la hidrólisis y el cambio conformacional deben ser esenciales para la unión al tRNA. Como control de una posible interacción inespecífica a la proteína añadimos una muestra con BSA.

Las muestras de reacción fueron incubadas en tampón GTPasa con GTP 6.67 mM durante 15 minutos en hielo y posteriormente cargadas en un gel de poliacrilamida al 8% en tampón Tris-OAc pH8 (sin presencia de EDTA y DTT para no interferir en la reacción de hidrólisis del GTP). La electroforesis se desarrolló durante 80 minutos a 4° C y tampón Tris-OAc pH8 40 mM. El gel fue transferido a una membrana de nylon e hibridado con la sonda anti-tRNA^{Glu} conjugada a digoxigenina, finalmente mediante un anticuerpo anti-digoxigenina se detectó la presencia del tRNA^{Glu}.

En las carreras 9 y 10 del gel se cargaron las proteínas MnmE y BSA (las mismas cantidades que en las muestras 5 y 6) pero sin tRNA, tras la electroforesis el gel fue cortado por la carrera 8 y estas dos últimas muestras fueron teñidas con azul de coomasie para localizar la posición de las proteínas en estas condiciones del gel.

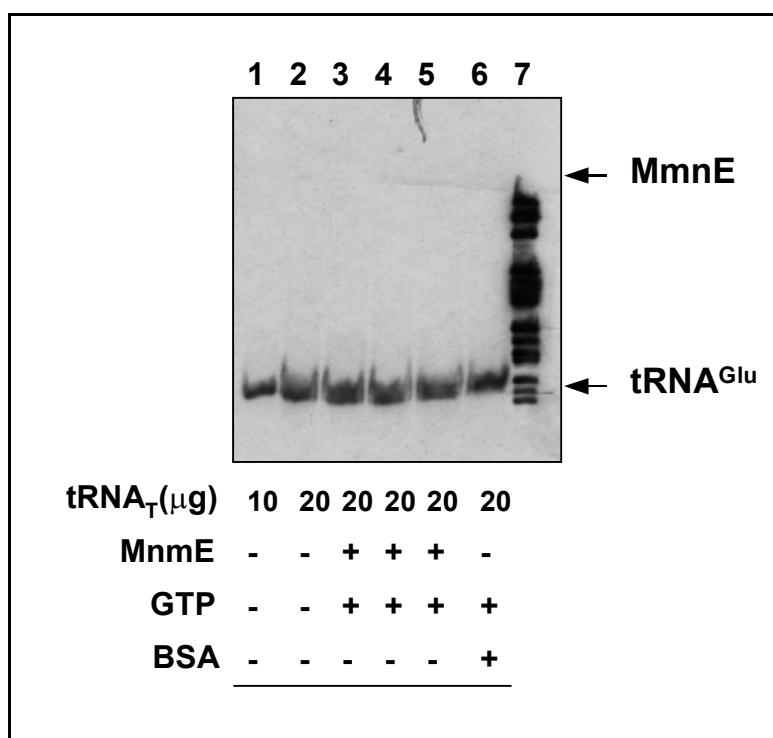


Figura 73: Análisis de la interacción tRNA: MnmE mediante electroforesis y Northern anti-tRNA^{Glu}. Las cantidades indicadas en μg de tRNA total purificado de la cepa DEV16 fueron incubadas con cantidades crecientes de MnmE. En las carreras 1 y 2 no añadimos proteína, en la carrera 3, 4, 5, añadimos MnmE de forma que la relación tRNA: MnmE es 1:1, 1:2 y 1:4 respectivamente; en la carrera 6 se añadió BSA (1:4) como control. Todas las muestras con proteína llevan 6.67 mM de GTP y las muestras son incubadas 15 minutos en hielo antes de cargarlas en el gel. En la carrera 7 el marcador de masas moleculares de Roche V con digoxigenina.

Como puede comprobarse en la figura 73 todo el tRNA detectado se encuentra en su forma libre y no se detectó ningún retraso en la migración del tRNA^{Glu} cuando añadimos la proteína MnmE. Por tanto, en estas condiciones no observamos unión entre el tRNA^{Glu} de la cepa DEV16 y la proteína MnmE.

Una posible causa para explicar estos resultados es que quizás la interacción entre el tRNA y la proteína sea débil o muy transitoria y durante la migración en el gel las moléculas se separan y migran como moléculas libres. Decidimos introducir algunos

cambios en la reacción de unión para evitar la posible disociación entre la proteína y el tRNA, para ello tras la incubación en hielo de la mezcla de la proteína y el tRNA, las muestras se sometieron a una reacción de **entrecruzamiento con luz ultravioleta** para formar enlaces covalentes entre la molécula de tRNA y la proteína que evitaría la disociación durante la migración.

El entrecruzamiento con luz UV permite “atrapar” interacciones débiles o muy transitorias ente moléculas de RNA y proteínas (Expert-Bezancon and Chiaruttini, 1988; Hanna, 1989; Hanna, 1996; Hanna *et al.*, 1999). La luz de baja longitud de onda transforma las moléculas en especies químicas reactivas las cuales llegan a entrecruzarse covalentemente. A pesar de que la irradiación directa con luz UV es inespecífica (respecto a la formación de enlaces entre las moléculas) y algunos autores proponen el uso de reactivos entrecruzadores fotosensibles que forman puentes entre las proteínas y las moléculas de RNA (Liu *et al.*, 2000; Liu and Smith, 1999), nosotros decidimos empezar a probar la irradiación directa de las muestras con luz UV.

Adicionalmente introdujimos otros cambios; sabemos que la hidrólisis es necesaria para la presencia de la modificación, pero para el reconocimiento y unión del tRNA desconocemos qué papel puede jugar. Por ello, probamos distintas condiciones respecto a la presencia del nucleótido: sin nucleótido y con nucleótido, añadiendo a la mezcla de reacción GTP hidrolizable en exceso (5 mM) y también GTP no hidrolizable (GTP γ S).

El último cambio introducido es la presencia de la proteína **GidA** de *Escherichia coli* en la reacción de unión entre el tRNA y MnmE, ya que se ha demostrado que GidA y MnmE están implicados en la misma ruta enzimática (Bregeon *et al.*, 2001). Además nuestro grupo ha demostrado mediante técnicas de cromatografía de afinidad la interacción entre las proteínas MnmE y GidA (resultados no publicados) por lo que suponemos que la proteína GidA puede ser uno de los factores necesarios para el reconocimiento o la unión de los tRNAs.

Las reacciones se llevaron a cabo partiendo de 20 μ g de tRNA total proveniente de la cepa DEV16, añadimos la proteína MnmE, GidA y BSA en proporciones 1:2 (0.124 nmoles de tRNAs sustratos y 0.248 nmoles de cada proteína) en presencia de GTP/GTP γ S 5 mM. Las muestras se incubaron previamente en hielo con los nucleótidos y posteriormente se entrecruzaron con luz UV durante 6 minutos a temperatura ambiente y se cargaron en un gel de poliacrilamida al 8% en tampón tris-OAc pH8 40 mM.

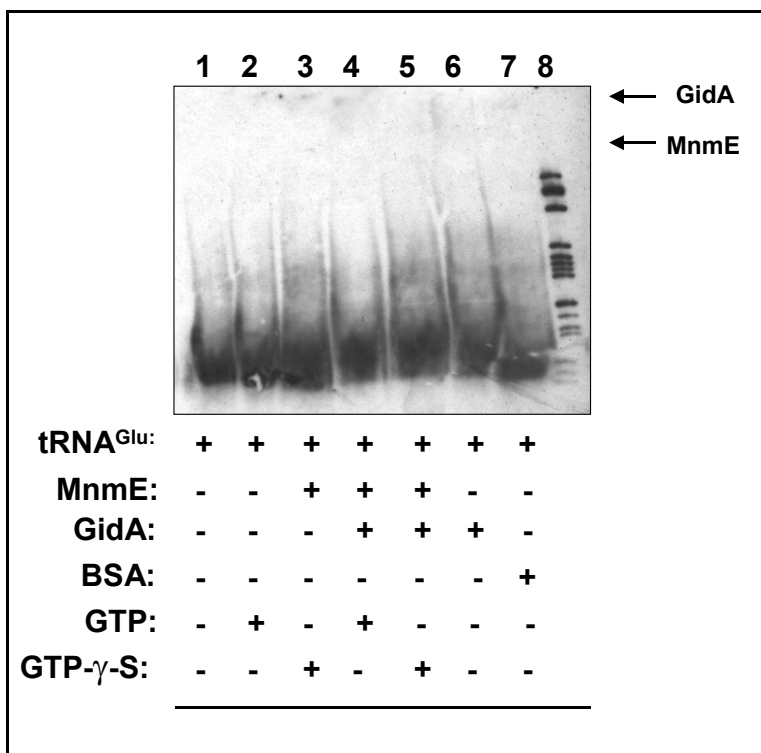


Figura 74: Las muestras 1-7 contienen 20 μg de tRNA total (equivalentes a 0.124 nmoles de los tRNA teóricamente sustratos de MnmE (Glu, Gln, Lys, Arg y Leu), las muestras indicadas contienen 0.248 nmoles de las correspondientes proteínas (relación 1:2 tRNA : proteína). Las muestras indicadas contienen 5 mM de los nucleótidos. La carrera 8 contiene un marcador de masas moleculares (MW V Roche conjugado a digoxigenina).

Con estas modificaciones de nuevo no vemos interacción entre el tRNA^{Glu} y la proteína MnmE y/o GidA a pesar de haber entrecruzado las muestras con luz ultravioleta, lo cual nos hace pensar que, o bien estas proteínas no interaccionan con el tRNA directamente, o bien otras moléculas, factores o proteínas desconocidas se requieren para la unión *in vitro*.

En las carreras 9 y 10 del gel cargamos las proteínas MnmE y GidA solas y esta parte del gel fue cortada y teñida con coomasie para localizar la posición de las proteínas, observamos que la proteína MnmE es capaz de entrar y migrar correctamente y su posición está indicada en la figura 74 con una flecha, sin embargo, observamos que la proteína GidA (70 kDa) apenas es capaz de entrar en el gel, según su tamaño la proteína no debería tener problemas para entrar, pero pensamos que quizás la ausencia de un agente reductor o la ausencia de SDS en el gel influya en las condiciones de migración de la proteína GidA impidiendo la entrada en el gel.

8.1.2. Unión de la proteína MnmE y tRNA^{Lys}:

Decidimos cambiar el sustrato de la reacción y empleamos tRNA^{Lys} de *Escherichia coli* obtenido comercialmente de Sigma. Este tRNA se supone que es obtenido de forma específica de la célula mediante cromatografía de afinidad y, aunque desconocemos de qué cepa proviene, podemos suponer que llevará la modificación mnm⁵U₃₄. De nuevo no sabemos si el reconocimiento y unión del tRNA sólo se realiza con sustratos no

modificados pero no podemos descartar que la presencia de la modificación no impida la unión a la proteína.

Las reacciones de unión *in vitro* se realizaron siguiendo las condiciones descritas anteriormente añadiendo a 1 μg (40 pmoles) de tRNA^{Lys} las proteínas MnmE, GidA y BSA en proporción tRNA:proteína 1:1 y 1:5 (40 y 200 pmoles), en presencia y ausencia de GTP 5 mM. Las muestras fueron entrecruzadas con luz ultravioleta durante 10 minutos y cargadas en el gel. Las carreras 1 a 9 fueron sometidas a transferencia y análisis Northern blot con una sonda anti- tRNA^{Lys} conjugada a digoxigenina y la muestra 10 (sólo 5 μg de MnmE) fue teñida con coomasie para localizar la posición de la proteína libre.

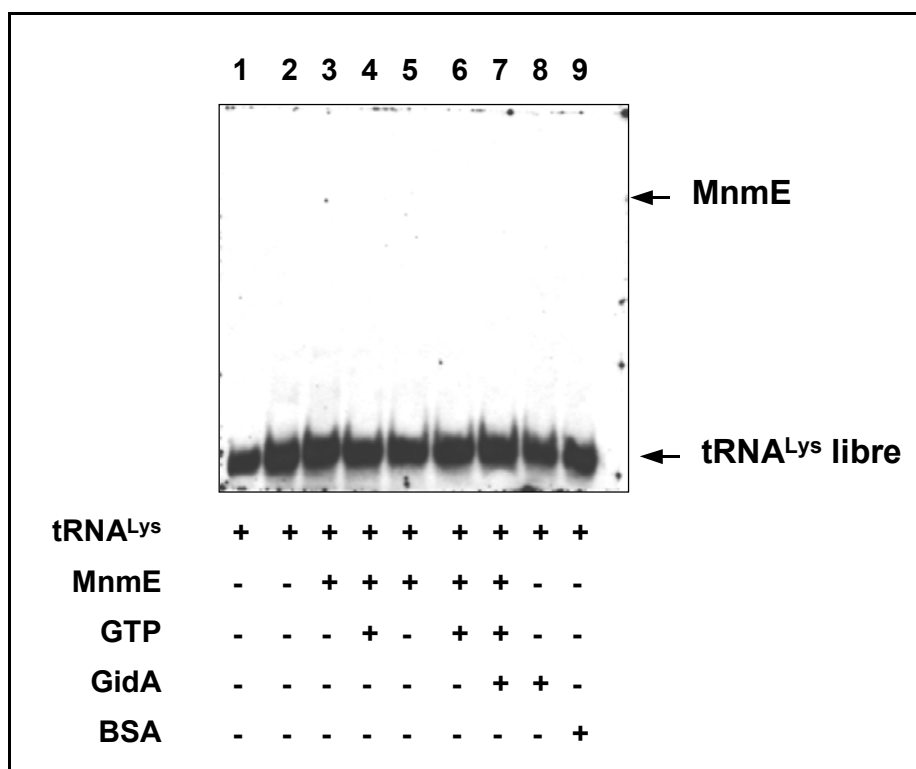


Figura 75: Todas las carreras contienen 1 μg de tRNA^{Lys} , excepto la carrera 1 que contiene 0.5 μg . Las carreras 3, 4 y 7 contienen 2.12 μg de MnmE (proporción 1:1) y las carreras 5 y 6 contienen 10.6 μg de MnmE (proporción tRNA:proteína 1:5), las carreras 7 y 8 contienen 14 μg de GidA (proporción 1:5), la carrera 9 contiene 2.78 μg de BSA (proporción 1:1). Todas las muestras indicadas contienen 5 mM de GTP incubado durante 10 minutos en hielo.

De nuevo no vemos ningún retraso en la migración del tRNA indicándonos que en estas condiciones no hay unión entre el tRNA^{Lys} y las proteínas MnmE y GidA.

8.2. Ensayos de cromatografía de afinidad.

Decidimos estudiar mediante cromatografía de afinidad la interacción entre MnmE y el tRNA, ya que con este tipo de técnica se pueden detectar interacciones más débiles o transitorias, porque a diferencia de los ensayos de retraso en gel, no sometemos a electroforesis el complejo proteína-tRNA con el riesgo de perder la interacción, sino que

por cromatografía separamos las diferentes fracciones de una mezcla tRNA-proteína, y posteriormente se analiza la presencia de tRNA en las diferentes fracciones.

La técnica consiste mezclar el tRNA con la proteína MnmE fusionada a GST y fijada a una resina de glutation-agarosa para observar si la proteína MnmE es capaz de retener el tRNA.

Expresamos la proteína MnmE como una fusión a GST, siguiendo la técnica habitual en la purificación de proteínas por el sistema pGEX, y obtuvimos la proteína de fusión purificada y fijada a una resina de glutation-agarosa.

A continuación añadimos el tRNA total de una cepa no modificadora (DEV16) a la resina e incubamos en hielo durante 30 minutos, en tampón GTPasa y con 2 mM de GTP los 5 últimos minutos de la incubación (para que no se llegue a hidrolizar por completo). Transcurrido este tiempo, se eluye la fracción del material no retenido en la columna, se lava la resina varias veces con tampón y finalmente se añade a la resina tampón glutation que por competición hace que la proteína GST-MnmE se suelte y con ella aquellas moléculas que ha retenido.

Como control realizamos el mismo experimento en paralelo con resina la cual contiene únicamente GST para descartar posibles interacciones inespecíficas.

Las fracciones antes y después de pasar por la resina, así como la fracción eluida con tampón glutation de la resina tras los lavados, son cargadas en un gel de poliacrilamida Tris-OAc pH8 40 mM, sometidas a electroforesis durante 80 minutos a 4° C y 200 v y finalmente transferidos a una membrana de nitrocelulosa. A continuación se detecta con la sonda anti-tRNA^{Glu}-DIG siguiendo los protocolos descritos anteriormente.

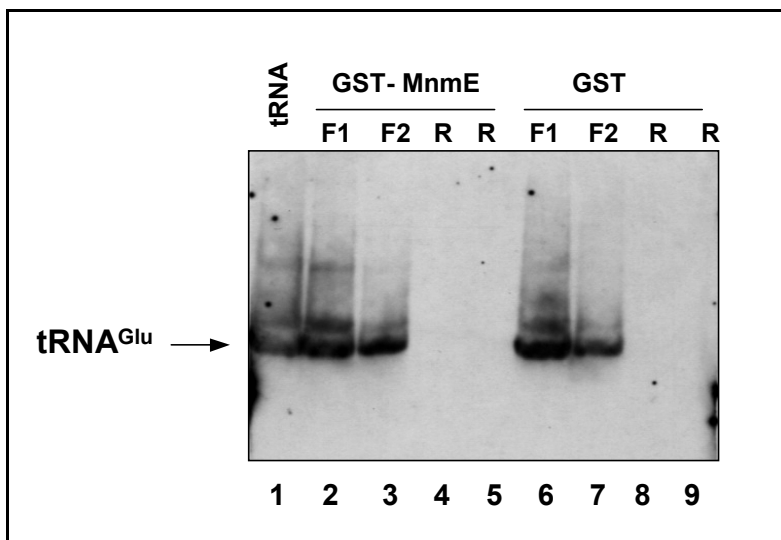


Figura 76: Cromatografía de afinidad y Northern blot. Carrera 1: 10 μ l tRNA total de la cepa DEV16 (0.45 μ g/ μ l) antes de pasar por la columna de glutation-agarosa. Carrera 2 y 3: 10 μ l de las fracciones no retenidas en la columna con GST-MnmE, carrera 4: 10 μ l de la fracción retenida en la resina, carrera 5: 20 μ l de la fracción retenida en la resina. Carreras 6 a 9 equivalentes a carreras 2 a 5 pero con proteína GST sola unida a la glutation-agarosa.

Como puede observarse, sólo se detecta tRNA^{Glu} en las carreras 1, 2, 3, 6 y 7 que corresponden a la muestra de tRNA antes de pasar por la resina y a las fracciones F1 y F2 eluidas después de pasar por ambas resinas. En ningún caso se observa tRNA^{Glu} en las muestras correspondientes a la proteína eluida de la resina, lo que indica que en estas condiciones no detectamos que la proteína MnmE haya sido capaz de retener al tRNA^{Glu} y por tanto, que haya habido interacción específica.

Como conclusión de este apartado, podemos decir que de momento no hemos sido capaces de detectar la interacción *in vitro* entre el tRNA y las proteínas MnmE y GidA, tanto juntas como por separado. Por tanto, no podemos afirmar que la proteína MnmE sea la enzima directamente responsable de la introducción del grupo cmnm en la posición U₃₄ del tRNA en el primer paso de la ruta de modificación del nucleótido hipermodificado mnm⁵U₃₄.

Nuestro objetivo en futuros experimentos es continuar trabajando en el estudio de la interacción entre MnmE (y GidA) con el tRNA específico. Para ello, tenemos pensado introducir algunos cambios en la reacción de unión *in vitro*; queremos trabajar con sustratos (tRNAs) específicos y no modificados obtenidos por transcripción *in vitro* y/o cromatografía de afinidad, también hemos pensado introducir algún posible donador del grupo cmnm y emplear alguna proteína como control positivo, por ejemplo, la proteína MnmA que participa en uno de los pasos de la ruta de modificación del nucleótido mnm⁵U₃₄ y para la cual se ha descrito la unión específica al tRNA^{Lys} (Kambampati and Lauhon, 2003).

DISCUSIÓN

Discusión:

El objetivo de este trabajo ha sido caracterizar, bioquímica y funcionalmente, una GTPasa bacteriana, la proteína MnmE de *E. coli*, implicada en la modificación postranscripcional de algunos tRNAs.

Características generales de la proteína MnmE y su dominio G:

MnmE es una proteína multidominio de 50 kDa que consta de un dominio N-terminal de ~220 residuos, un dominio medio de unión a GTP (dominio G) de ~160 residuos y un dominio C-terminal de ~75 aminoácidos que contiene la única cisteína presente en la molécula. MnmE es una GTPasa cuyas propiedades bioquímicas difieren ampliamente de las mostradas por las GTPasas reguladoras pertenecientes a la familia de las pequeñas GTPasas, típicamente representadas por Ras. MnmE tiene muy baja afinidad por nucleótido y una actividad GTPasa intrínseca alta; además, es capaz de multimerizar. El ciclo GTPasa funciona *in vitro* sin necesidad de factores adicionales tipo GAPs o GEFs. El dominio G de MnmE aislado conserva una afinidad similar por nucleótidos y la misma capacidad de hidrólisis del GTP que la proteína entera y, sin embargo, no presenta ningún subdominio activador insertado (apartados 1.1 y 1.2 de resultados).

En este trabajo hemos demostrado que la hidrólisis del GTP realizada por la proteína MnmE es esencial para la función modificadora de los tRNAs. Nuestra hipótesis de trabajo es que la proteína MnmE podría emplear la hidrólisis del GTP para promover un cambio conformacional que le permite catalizar algún paso en la reacción de introducción del grupo cmnm en los tRNAs. Si es así, MnmE sería el primer ejemplo de una enzima modificadora de tRNAs con actividad GTPasa. Sin embargo, esto haría diferir a MnmE de las GTPasa clásicas. Estas enzimas se describen con frecuencia como moléculas reguladoras o interruptores moleculares debido a su particular modo de funcionar. Estas GTPasas ejecutan su función (son activas) mientras están unidas a GTP. La unión a este nucleótido provoca un cambio conformacional que les permite su interacción con una molécula diana o efector. Tras la hidrólisis del GTP (la cual no es requerida para que la proteína ejecute su función), pasan a un estado de unión a GDP, inactivo. El GDP debe ser liberado para permitir la entrada de una nueva molécula de

GTP. En las proteínas tipo Ras, debido a la alta afinidad por nucleótidos (en el rango nano o picomolar) y la baja tasa de disociación (del orden de horas) junto con la baja actividad intrínseca GTPasa ($< 0.06 \text{ min}^{-1}$) (Bourne *et al.*, 1990; Bourne *et al.*, 1991; Kjeldgaard *et al.*, 1996) determinan que esta reacción cíclica requiera de la participación de factores intercambiadores de nucleótidos (GEFs) que facilitan la liberación de GDP y la entrada de un nuevo GTP y de proteínas activadoras (GAPs) que permiten una hidrólisis del GTP a tasas muy elevadas.

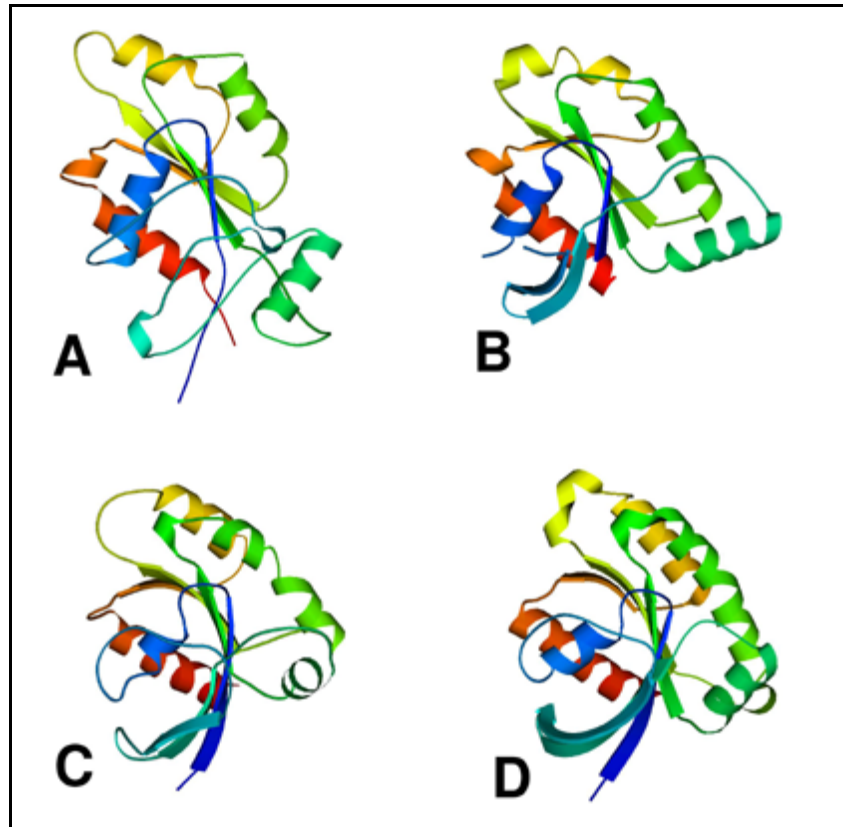


Figura 77: A: modelo de la estructura tridimensional del dominio G de MnME obtenido por RMN (Monleon *et al.* 2004). Comparación con los dominios G de Era (B), Ras (C) y Rap2A (D).

Sin embargo, MnME presenta una baja afinidad por GTP y GDP (del orden de micromolar) y una alta actividad intrínseca ($\sim 10 \text{ min}^{-1}$); estas propiedades bioquímicas peculiares hacen diferir claramente a MnME del resto de GTPasas clásicas y la acercan a las propiedades bioquímicas que presentan las GTPasas de la familia de las dinaminas (Song and Schmid, 2003; van der Blik, 1999), aunque debemos remarcar que las diferencias exhibidas a nivel estructural y evolutivo entre MnME y las dinaminas, permiten descartar que pertenezca a esta familia de GTPasas (Leipe *et al.*, 2002).

Proteína	k_d GTP (μ M)	k_d GDP (μ M)	k_m (μ M)	k_{cat} (min^{-1})
MnmE	1.51	4.13	831	13.37
Dominio G	0.88	6.83	264	4.05
Ras	10×10^{-6}	20×10^{-6}		0.06
Heterotrimericas G_α	8×10^{-4}			3-5
EF-Tu	1	7×10^{-4}		0.0001
dinaminas	2.5		10-100	1-20
Era	5	1	9	0.01
Obg			5	0.01

Tabla 23: Tabla resumen de los parámetros bioquímicos de diversas GTPasas.

Las dinaminas son proteínas multidominio implicadas en la formación de vesículas por estrangulamiento de la membrana plasmática. Existe una gran polémica acerca de su modo de funcionar y parece que su mecanismo de acción es diferente al de las proteínas Ras (Marks *et al.*, 2001; Prakash *et al.*, 2000a; Prakash *et al.*, 2000b; Sever, 2002; Song and Schmid, 2003; Thompson and McNiven, 2001; Vetter and Wittinghofer, 2001). Así, hay datos que sugieren que las dinaminas utilizan la hidrólisis del GTP para ser funcionalmente activas; la hidrólisis llevaría asociada un cambio conformacional que permitiría a la proteína actuar como una proteína motora. Sin embargo, hay autores que proponen que las dinaminas son también moléculas reguladoras cuya función se ejecuta mientras están unidas a GTP. En cuanto a su ciclo, no parecen requerir factores intercambiadores de nucleótidos, probablemente a causa de la baja afinidad por los mismos y alta velocidad de disociación, y aunque tienen una alta actividad GTPasa intrínseca, ésta se incrementa como consecuencia de la autoasociación de la proteína, no estando clara, tal y como se había propuesto inicialmente, la participación de una arginina catalítica presente en un dominio de la proteína diferente al dominio G; además, no existe una glutamina tras el motivo G3 sino un residuo hidrofóbico (Marks *et al.*, 2001; Vetter and Wittinghofer, 2001)

Las semejanzas entre MnmE y las dinaminas justifican que tomemos a estas últimas como referencia para ayudarnos en la reflexión sobre los datos obtenidos en nuestro trabajo con MnmE.

Comparando nuestra proteína con las dinaminas y su polémica función como GTPasas reguladoras y/o mecánicas, podemos hipotetizar sobre la posibilidad de que MnmE use la hidrólisis del GTP y el consiguiente cambio conformacional para promover la reacción de modificación del tRNA. Puesto que hemos demostrado que la hidrólisis del GTP es esencial para la función modificadora de MnmE, es posible que la hidrólisis misma del GTP o la liberación del GDP o del P_i provoquen los cambios de conformación en la

proteína, que a su vez desencadenan los subsiguientes pasos en la reacción de modificación del tRNA llevada a cabo, según nuestro modelo de trabajo (ver más abajo), por el extremo carboxiterminal de la proteína y quizás por la proteína GidA. Este modelo no excluye que MnmE, cuando se encuentra en sus estado unido a GTP, sea capaz de interactuar a través del motivo G2, con su posible efector/es, el cual podría ser el donador del grupo cmnm, GidA o el propio tRNA que va a ser modificado.

En el caso de las dinaminas, se ha sugerido la posibilidad de que los dos modelos propuestos para explicar el mecanismo de acción de estas proteínas (reguladoras o motoras) puedan coexistir (Thompson and McNiven, 2001). El alineamiento de GTPasas indica que los miembros de la familia de las dinaminas presentan los motivos característicos, desde G1 a G4 (van der Blik, 1999). Generalmente, esto no ocurre en las pocas enzimas GTPasas que usan el GTP como fuente de energía como la adenilsuccinato sintetasa (Kjeldgaard *et al.*, 1996) y McrBC (Pieper *et al.*, 1999). El alineamiento del dominio G de MnmE con Ras, revela una identidad del 20% y la presencia de los motivos G1, G2, G3, G4 y G5. Además, la sustitución del aspártico del G4 por asparragina (D338N) cambia la especificidad de la unión de nucleótidos de guanina a xantosina sin afectar al mecanismo de hidrólisis (ver apartado 2.4 de Resultados) y la mutagénesis de los residuos conservados del motivo G2 a alanina revelan un importante efecto en la actividad GTPasa (apartado 3.3 de Resultados). Estos fenómenos son característicos de las GTPasa clásicas y por tanto estos datos apoyan la idea que MnmE se encuentra más cerca de las GTPasas que emplean la hidrólisis del GTP para funcionar como interruptores moleculares y se diferencian de las enzimas metabólicas que emplean la hidrólisis del GTP como fuente de energía. Sin embargo, MnmE, a diferencia de las proteínas tipo Ras, pertenecería a un nuevo tipo de GTPasas, que incluiría también las dinaminas y el factor de elongación G (EF-G) (también implicado en traducción de proteínas), que usan el cambio conformacional asociado a la hidrólisis del GTP (y no a su unión) para desarrollar funciones celulares.

Los resultados de autoasociación de la proteína MnmE obtenidos durante el desarrollo de este trabajo (ver apartado 1.3 de resultados) y los previamente publicados por nuestro grupo (Cabedo *et al.* 1999), demuestran, mediante diversas técnicas, que la proteína MnmE de *E. coli* tiende a formar dímeros y puede que algunas estructuras mayores, aunque nunca grandes multímeros como ocurre con algunas diaminas o FtsZ. Además, la formación de estos multímeros se ve favorecida con la concentración de proteína y con la presencia de nucleótido (ver figuras 29 y 30 del apartado 1.3 de Resultados).

A la vez, observamos que la actividad GTPasa se ve favorecida también por la concentración de proteína, especialmente el dominio G que presenta un claro comportamiento de cooperatividad positiva (ver apartado 1.3). Todos estos resultados nos permiten especular con la posibilidad de que la multimerización se ve favorecida con la actividad GTPasa, o bien, la actividad GTPasa se ve favorecida con la multimerización de la proteína. Este comportamiento sería similar al observado en algunas dinaminas como las Mx (Haller and Kochs, 2002; Kochs *et al.*, 2002; Kochs *et al.*, 1998; Schwemmle *et al.*, 1995), hGBP y IIGB (Praefcke *et al.*, 1999; Prakash *et al.*, 2000a; Uthaiyah *et al.*, 2003) en las que se ha observado un incremento de la actividad GTPasa debido a la autoasociación, la cual, a la vez, es dependiente de GTP. Estas características observadas en la proteína MnmE permiten, una vez más, acercarla a las proteínas de la familia de las dinaminas y diferenciarla de las proteínas GTPasas clásicas. Uno de nuestros objetivos futuros es estudiar más a fondo la relación entre la actividad GTPasa y la dimerización de la proteína, para entender qué significado *in vivo* puede tener la autoasociación de la proteína y cómo influye en su función modificadora.

Relación entre las propiedades bioquímicas de la proteína MnmE y la función modificadora de tRNA.

La única función conocida de MnmE es la modificación de tRNAs, concretamente la proteína es imprescindible para la modificación de la uridina situada en la posición de tambaleo (U₃₄) del anticodón de varios tRNAs (tRNA^{Lys}, tRNA^{Glu}, tRNA^{Gln}₁, tRNA^{Leu}₄ y tRNA^{Arg}₄). En este estudio se ha pretendido determinar la relación entre las propiedades bioquímicas de la proteína MnmE de *E. coli* y de su dominio G con la función modificadora de tRNAs. Como no disponíamos de información estructural de la proteína, abordamos este objetivo mediante mutagénesis dirigida hacia residuos del dominio G presuntamente implicados en la unión y/o hidrólisis del GTP o en el cambio conformacional, así como de otros residuos que presentaban características interesantes como son la única cisteína de la proteína y las argininas conservadas del dominio G.

Estudio de las propiedades bioquímicas de los motivos G1-G3-G4-G5 de MnmE:

Los resultados indican que la proteína con mutación en el motivo G1 (G288A) es totalmente incapaz de unir el GTP, mientras que la proteína mutada en G4 (D388N) está parcialmente incapacitada para la unión y requiere concentraciones altas de nucleótido para actuar como GTPasa, aunque es capaz de hidroliza GTP a la misma velocidad que la proteína silvestre (ver apartado 2.2 y 2.3 de Resultados). Contrariamente, un mutante

en el G3 (D270A) mantiene la afinidad por GTP y, sin embargo, no presenta actividad GTPasa.

Estos mutantes han sido especialmente útiles para determinar las relaciones entre la actividad GTPasa de MnmE y su función modificadora. Ni el mutante G1 ni el mutante G3 son capaces de modificar tRNAs mientras que los mutantes G4 y G5 son funcionales. El hecho de que D338N (G4), un mutante que une mal el GTP pero es capaz de hidrolizarlo sea funcional, mientras que D270A (G3), un mutante que une bien el GTP pero no hidroliza, no sea funcional, nos permite concluir que la hidrólisis del GTP llevada a cabo por la proteína MnmE, y no la simple unión, es necesaria para la modificación en los tRNAs. Esta propiedad, nos permite proponer que MnmE pertenece a un nuevo tipo de GTPasas, al que se adscriben otras proteínas multidominio como las dinaminas y los factores de elongación EF-G y, más recientemente EF-Tu, que usan la hidrólisis de GTP para realizar su función, promoviendo reorganizaciones estructurales que llevan a la proteína a su estado activo (Marks *et al.*, 2001; Mohr *et al.*, 2000; Rodnina *et al.*, 2000).

Se realizó un estudio de los residuos implicados en el reconocimiento específico del nucleótido GTP; hemos observado que la sustitución del aspártico del G4 por asparragina (D338N) cambia la especificidad de la unión del nucleótido de guanina a xantósina sin afectar al mecanismo de hidrólisis (ver apartado 2.5). Este fenómeno es característico de las GTPasa clásicas (Kjeldgaard *et al.*, 1996; Praefcke *et al.*, 1999; Yu *et al.*, 1997) y permite confirmar que el residuo de aspártico del motivo G4 es el principal responsable del reconocimiento de la guanina del nucleótido y que el motivo G5 participa ayudando en la estabilización de la base del nucleótido. Por tanto, la función del motivo G4 es crear un bolsillo hidrofóbico permitiendo a la base guanina ser estabilizada mediante la formación de dos puentes de hidrógeno entre el Asp (D) y la base de guanina, estas interacciones son las responsables de la alta especificidad de la proteína hacia los nucleótidos de guanina.

Caracterización del motivo G2:

El motivo G2 de todas las GTPasas tiene únicamente una treonina como residuo consenso (implicada en la hidrólisis del GTP), el resto de la secuencia de este motivo se conserva únicamente dentro de una misma familia de GTPasas. En la familia de las proteínas MnmE, el motivo G2 se presenta con la secuencia invariable GTTRD, caracterizando a esta familia frente a otras GTPasas.

En las proteínas tipo Ras este motivo G2 se localiza en el lazo efector o switch I del dominio G, la región que junto con el switch II reorienta su posición tras el cambio

conformacional y permite la interacción de Ras tanto con su GAP como con su molécula efectora o diana molecular (John *et al.*, 1993). Este es el mecanismo a través del cual las GTPasas clásicas actúan como interruptores moleculares porque la unión del GTP permite la transmisión de una señal mediante la interacción con su efector específico.

Quisimos estudiar cuál de las dos treoninas es la que realiza el papel esencial en la hidrólisis a través de la coordinación al átomo de Mg^{2+} y al fosfato γ del nucleótido. Se ha demostrado en otras GTPasas que la treonina invariable del G2 no puede ser sustituida por ningún otro aminoácido incluyendo un residuo de serina (Ahmadian *et al.*, 1995; Lin *et al.*, 2001). Por tanto, se realizó la sustitución de las dos treoninas por alanina y serina. Además, con el objetivo de estudiar el papel global de este motivo en las propiedades bioquímicas y funcionales de la proteína MnmE, se realizó un análisis mutacional exhaustivo mutagenizando el resto de residuos del motivo G2 a alanina.

Los resultados del análisis mutacional muestran que todos los mutantes del motivo G2 tienen intacta la afinidad hacia GTP (ver apartado 3.2. de Resultados), por lo que este motivo no parece estar relacionado en el reconocimiento y unión del nucleótido. Esta propiedad difiere de la mostrada por Ras, donde la sustitución de la treonina del G2 produce un descenso en la afinidad por los nucleótidos de guanina. En Ras, cuando la treonina invariable del G2 es cambiada a alanina (Ras-T35A) se observa un descenso moderado en la afinidad por el nucleótido: $K_{d-GTP} = 10.7$ pM para el WT frente a 64 pM para el mutante T35A y $K_{d-GDP} = 20.3$ pM para el WT frente a 15 pM para en el mutante T35A (John *et al.*, 1993). Es decir, la T35 se requiere para asegurar la correcta coordinación del Mg^{2+} ; la ausencia de su grupo hidroxilo no impide la unión del GTP pero sí dificulta o inactiva la hidrólisis estimulada por GAP (John *et al.*, 1993).

La proteína CgtA de *Caulobacter crescentus* (una GTPasa de las familia de las Obg bacterianas), también presenta dos treoninas consecutivas en su motivo G2 como MnmE. Ambos residuos fueron sustituidos, por separado y conjuntamente, a alanina y en todos los mutantes se observa un descenso de la afinidad por GTP y GDP que afecta a la función *in vivo* de la proteína (Ahmadian *et al.*, 1995; Lin *et al.*, 2001).

Aunque los mutantes en G2 no se diferencian en cuanto a las propiedades de unión a nucleótido, sí lo hacen en cuanto a su capacidad de hidrólisis. En general, todos los mutantes con sustitución del residuo por alanina presentan un descenso generalizado de la capacidad de alcanzar el estado de transición (ensayos de formación del complejo con AIF_x, apartado 3.3.2 de Resultados) y, por tanto, de la actividad GTPasa (ensayos de hidrólisis del GTP, apartado 3.3.1 de Resultados). Pero el grado de inactivación observado es diferente dependiendo del mutante, obteniéndose el efecto menos acusado con el mutante en la Thr-150 (27% de la actividad de la nativa) y el más drástico con el

mutante en la Thr-151 (sin apenas actividad detectable), por lo que deducimos es la segunda treonina del motivo (T251) la treonina invariable del G2 y la que se coordina en el núcleo catalítico al Mg^{2+} y al fosfato del GTP.

Estos resultados son en cierto modo, similares a los obtenidos con la proteína Ras; John *et al.*, (1993) estudiaron el efecto de la mutación T35A sobre la capacidad de hidrólisis de la proteína y observaron una disminución en la actividad GTPasa intrínseca de la proteína hasta un 23% respecto a la nativa y la pérdida de la capacidad para ser activada por la correspondiente GAP debido a la bajada en la afinidad por ésta.

Comparando las propiedades bioquímicas de los mutantes que presentan sustituciones de las treoninas a alanina y serina, encontramos que cuando el cambio del residuo es a serina, se produce la recuperación parcial de la actividad GTPasa en los ensayos de hidrólisis del GTP al compararlos con los mutantes de treonina a alanina, (ver apartado 3.4 de Resultados). Sin embargo, aunque la tasa de hidrólisis en alguno de estos mutantes llega a superar el 50% de la actividad de la proteína nativa, la proteína mutante continúa siendo no funcional (no modifica los tRNAs), lo que confirma el papel esencial de las treoninas del G2 y la imposibilidad de cambiar el residuo por cualquier otro.

Para explicar este fenómeno, creemos que la treonina del G2 en MnmE, a parte de su función catalítica en la hidrólisis a través de su grupo OH, juega un papel esencial durante el cambio conformacional del switch I y, por tanto, en la dinámica del loop efector.

La sustitución de treonina a alanina es un cambio importante a nivel químico porque elimina el grupo hidroxilo; por tanto, es comprensible observar un descenso en la actividad GTPasa; sin embargo, el cambio a serina es únicamente a nivel estructural porque mantiene el grupo hidroxilo en la cadena lateral, pero elimina un metilo, la ausencia de este grupo metilo en la cadena lateral proporciona mucha más flexibilidad al aminoácido y en especial al grupo hidroxilo; esta alteración en la movilidad de la región del loop efector impide el correcto cambio conformacional asociado a la hidrólisis del nucleótido. Fueron Spoerner *et al.*, (2001) los que demostraron que en Ras cualquier cambio en el motivo G2, incluido la eliminación del grupo metilo de la cadena lateral de la treonina (mutación T35S), afectaba drásticamente el comportamiento dinámico de la región y por tanto, a la interacción con efectores, concluyendo que la necesidad de mantener la dinámica estructural de la región del switch I, es la responsable de la conservación invariable de la treonina en las proteínas GTPasas. Estos autores observaron que el mutante T35A presenta un descenso drástico de la afinidad por algunos de sus efectores (Raf-RBD, RaIGDS-RBD y AF6-RBD) y, además, que la sustitución de la treonina por serina (T35S) no es capaz de recuperar las propiedades de

la proteína, demostrando la esencialidad del residuo de treonina y la imposibilidad de ser sustituido por ningún otro aminoácido.

Papel del motivo G2 en la función modificadora de tRNAs:

Al estudiar la capacidad modificadora de los mutantes en G2 de MnmE, observamos claramente que ninguno es capaz de modificar el tRNA (apartado 6.1 y 6.2 de Resultados). Esta ausencia de la capacidad modificadora en mutantes como T251A y G249A, los cuales presentan una actividad GTPasa nula o prácticamente nula, es comprensible, ya que con anterioridad habíamos demostrado que se requiere la actividad GTPasa de MnmE para la función modificadora del tRNA. Por ello, estos mutantes que prácticamente no presentan actividad GTPasa podrían, en principio, presentar similitud con el mutante del motivo G3 (D270A), el cual une GTP pero no lo hidroliza y es funcionalmente inactivo. Sin embargo, el resto de los mutantes de G2, en especial los mutantes T250A, T250S y T251S presentan tasas de hidrólisis relativamente altas, y curiosamente, no son capaces de modificar en los tRNAs.

Al analizar estos resultados, podríamos pensar que quizás se requiere una actividad GTPasa mínima para desarrollar la función modificadora, es decir, un umbral de actividad GTPasa (el cual no sería alcanzado por los mutantes G2) a partir del cual la proteína puede tener capacidad modificadora de tRNAs. Sin embargo, esta hipótesis no parece ser válida si comparamos la tasa de hidrólisis de algunos de los mutantes de G2 como T250A (23%), T251S (25.7%) y T250S (55.9%) que presentan unos niveles de hidrólisis significativos pero sin función modificadora, con otros mutantes fuera del motivo G2, como R275A el cual sí presenta capacidad modificadora de los tRNAs, a pesar de mostrar una tasa de hidrólisis correspondiente al 16.86% de la nativa, muy por debajo de los valores observados para los mutantes de las treoninas del G2 mencionados anteriormente. Por todo esto, creemos que en este caso, el comportamiento de estos mutantes se acercan más al del mutante C451S y confirma la idea que la hidrólisis es necesaria pero no suficiente para la modificación. Aunque creemos que los motivos de la ausencia de modificación en ambos casos son distintos; en el caso del mutante C451S sugerimos que es debido al papel catalítico de la cisteína en la reacción de modificación, mientras que en el caso de los mutantes del G2 creemos que es debido a la imposibilidad de efectuar correctamente el cambio conformacional de la proteína.

Aceptando nuestra hipótesis de trabajo, en la cual MnmE es la enzima directamente modificadora, estos resultados y el papel de G2 como motivo implicado en la hidrólisis y en la unión al posible efector, podemos especular sobre el mecanismo del proceso de modificación y la función del motivo G2.

Pensamos que la hidrólisis del GTP produce un cambio conformacional que tienen importantes consecuencias en la estructura de la proteína; al igual que ocurre con el resto de GTPasas, el cambio conformacional afecta al loop donde se encuentra el motivo G2 (switch I) y se produce un cambio en la orientación de la treonina invariable y del resto del motivo que le permite interactuar con el efector o diana molecular, el cual proponemos que podría ser el tRNA específico, aunque también es posible que sea GidA o incluso el sustrato donador del grupo cmnm. No podemos descartar que el cambio conformacional del switch I sea el que genere un reordenamiento global de MnmE necesario para activar su función modificadora. En cualquier caso, está claro que los mutantes en G2 no presentan capacidad modificadora y esto parece claramente ligado a su incapacidad para experimentar un cambio conformacional apropiado.

Creemos que el mutante T250S termosensible, es un ejemplo de la función del motivo G2 en el cambio conformacional requerido para la modificación. Este mutante a 42° C grados se comporta como el resto de los mutantes en G2: no es capaz de modificar los tRNAs y por tanto, no es viable en los fondos genéticos V5701 y JC7623. Sin embargo, a 30° C, estas mismas cepas portadoras del alelo *mnmE-T250S* son capaces de sobrevivir aunque con dificultades de crecimiento (ver apartado 7.4 de Resultados). Este mutante es el que presenta una tasa de hidrólisis más alta (56%) y, por tanto, creemos que es la mutación que confiere un defecto más leve en la funcionalidad del motivo G2. Proponemos que a 42° C no puede realizar el cambio conformacional requerido para la reacción de modificación de los tRNAs; sin embargo, a 30° C sí podría, en parte, realizar este cambio y por ello existe modificación de algunos tRNAs (aunque en el Northern no se llegue a detectar) que permite a la célula (con el fondo genético V5701 y JC7623) sobrevivir.

El tRNA como posible efector de MnmE: Interacción MnmE-tRNA:

Las GTPasa reguladoras, emplean el cambio conformacional producido por la unión del GTP y mediado por el motivo G2, para interactuar con su molécula efectora y así realizar su función.

Nosotros proponemos que MnmE seguirá, en parte, este modelo y empleará el cambio conformacional asociado a la unión o la hidrólisis del GTP, para interactuar con otra molécula y así desarrollar su función, la cual consideramos que es la introducción del grupo químico cmnm en la posición U₃₄ de ciertos tRNA.

Inicialmente, podemos especular con la existencia de tres posibles efectores para MnmE: el propio tRNA que va a modificar, la proteína GidA la cual interviene en el mismo

paso de la ruta modificadora y por último, el donador del grupo cmnm que se requiere para la modificación y que hasta la fecha desconocemos. Evidentemente, no debemos descartar la posibilidad que MnmE interaccione con estas u otras moléculas diferentes sin que éstas se consideren efectores, entendiendo como efector la molécula con la cual interacciona la proteína tras el cambio conformacional y cuya unión debe ser dependiente del motivo G2 y por tanto, no observarse con un mutante en esta región.

Cabe esperar que, si MnmE es la enzima modificadora, en algún momento debe interactuar con el tRNA, sin embargo, con las estrategias seguidas hasta ahora no hemos podido detectar la unión *in vitro* de la proteína MnmE y el tRNA. Es posible que la proteína MnmE no sea la proteína que directamente se une al tRNA, aunque todos los indicios apuntan hacia esa dirección. Cuando se describió la ruta de modificación mnm^5U_{34} se realizó mediante la obtención de cepas mutantes deficientes en la biosíntesis del nucleótido 5-metilaminometil-2-tiouridina (Elseviers *et al.*, 1984). Todos los mutantes encontrados por esta técnica por el grupo de Elseviers así como otros grupos que siguieron estrategias similares (Bregeon *et al.*, 2001; Hagervall *et al.*, 1998; Nakayashiki and Inokuchi, 1998) encuentran mutantes en los genes *mnmE* o *gidA*, incluso en ambos, pero no en ningún otro gen, por lo que todo parece indicar que probablemente estos son los genes implicados en este paso de la ruta de modificación. Así, aunque no podemos descartar la implicación de otras proteínas o factores en este paso de la ruta de modificación, todos los datos apuntan a que probablemente MnmE, la cual parece que precede en su acción a GidA según datos de Bregeon, debe ser la enzima que interactúa con tRNA en algún momento de la reacción (Bregeon *et al.*, 2001).

Por tanto, nos inclinamos a pensar que MnmE participa directamente en la reacción de modificación y que las condiciones que hemos usado para detectar la unión *in vitro* de MnmE con el tRNA no son apropiadas para asegurar y mantener esta unión durante la reacción y posterior electroforesis. Es posible que se requiera de algún factor desconocido adicional en la reacción de reconocimiento o quizás es necesaria la presencia del producto donador del grupo carboximetilaminometil (recordemos que todavía se desconoce de dónde procede el grupo cmnm).

En conclusión, no hemos sido capaces de detectar la interacción *in vitro* entre el tRNA y las proteínas MnmE y GidA, tanto juntas como por separado. Por tanto, no podemos afirmar que la proteína MnmE sea la enzima directamente responsable de la introducción del grupo cmnm en la posición U_{34} del tRNA en el primer paso de la modificación mnm^5U_{34} . En cualquier caso, nuestro laboratorio está actualmente introduciendo una serie de modificaciones que creemos importantes en los protocolos seguido hasta ahora para detectar la unión de MnmE con el tRNA. Tales modificaciones

implican el uso de agentes entrecruzadores (en lugar de luz UV), añadir posibles donadores del grupo cmnm y el uso de tRNAs específicos y sin marcar obtenidos por transcripción *in vitro* o cromatografía de afinidad. Actualmente estamos en proceso de obtención de tRNA específico a partir de una cepa deficiente en la modificación $\text{mnm}^5\text{U}_{34}$ como la DEV16 mediante cromatografía de afinidad. En esta técnica usamos un oligonucleótido de DNA conjugado a biotina y que hidrida de forma específica con el tRNA que queremos purificar (en nuestro caso tRNA^{Lys} , uno de los modificados por MnmE), el oligo es retenido por afinidad a una resina conjugada a estreptavidina. Se pasa un extracto total de tRNA purificado de una cepa DEV16 y se aísla de forma específica el tRNA deseado. La ventaja de esta técnica es que podemos obtener tRNA^{Lys} que presenta la modificación s^2U_{34} ya que la cepa es mnmE^- pero no mnmA^- , recordemos que la modificación en la posición 2 de la U_{34} es llevada a cabo por MnmA y aunque esta modificación es independiente y no se requiere para la de la posición 5 donde interviene MnmE, parece ser que la presencia previa de la modificación s^2U_{34} favorece la introducción del grupo cmnm por MnmE (Kruger and Sorensen, 1998).

Por último, también podemos especular sobre la posibilidad de que GidA sea la molécula efectora de MnmE. Se ha demostrado que esta proteína es también esencial para la presencia de la modificación $\text{mnm}^5\text{U}_{34}$ y que actúa en el mismo paso de la ruta de modificación (Bregeon *et al.*, 2001). Además, nuestro grupo ha demostrado la interacción específica entre GidA y MnmE por cromatografía de afinidad (datos de L. Yim no publicados). Sin embargo, nuestros datos también indican que esta interacción no es dependiente del motivo G2, ya que la proteína mutante T251A parece interactuar con GidA de forma equivalente a la proteína nativa (datos no mostrados). Por lo tanto, podemos afirmar que MnmE interacciona específicamente con GidA, pero no consideramos a esta proteína como el efector.

La Cys-451 es esencial para a función modificadora de tRNAs de MnmE:

En el extremo carboxiterminal de MnmE, existe un motivo C(I/L/V)GK conservado en todas las proteínas homólogas que aparecen en los bancos de datos, lo que sugiere que debe tener un importante papel funcional. Este motivo recuerda a la caja CaaX de las proteínas Ras, implicada en su asociación a membrana. Dado que datos previos indicaban que MnmE es una proteína mayoritariamente citoplasmática con una pequeña pero significativa fracción asociada a membrana (Cabedo *et al.* 1999), mutagenizamos la Cys del motivo (la única de la proteína bacteriana) a serina.

Los resultados del subfraccionamiento celular y transferencia, así como también los resultados de microscopía electrónica, claramente indican que esta cisteína no está implicada en la asociación de MnmE a la membrana.

Además, los resultados de cross-linking también demuestran que la Cys-451 no está relacionada con la formación de los complejos multiméricos observados *in vivo*, los cuales no están formados mediante puentes de disulfuro, por lo que creemos que debe existir otra función para este residuo conservado (ver apartados 4.3. de Resultados).

Nuestros resultados muestran que la sustitución de la cisteína por serina (C451S) no afecta a las propiedades bioquímicas de unión e hidrólisis de GTP (apartados 4.2 de Resultados) y, sin embargo, hemos demostrado claramente que la Cys es esencial para la función modificadora de MnmE (Yim, *et al.* 2003) ya que la mutación C451S introducida en el cromosoma de la célula impide la presencia de la modificación mnm^5U_{34} en tRNAs (apartados 6.1 y 6.2 de Resultados) y hace inviable las cepas JC7623 y V5701 (apartados 7.2 de Resultados). El cambio de cisteína a serina es estructuralmente conservativo, pero químicamente significativo (sustitución del grupo tiol por hidroxilo). Por tanto, la incapacidad de la serina para remplazar a la Cys451 sugiere una función importante para el grupo tiol de la cisteína. Una vez descartado el papel de la Cys en la autoasociación de la proteína y en la localización subcelular, creemos que la función de la Cys es catalítica en la reacción de modificación del tRNA.

A pesar de que actualmente no tenemos evidencias que nos permitan resolver si MnmE es realmente la enzima modificadora o una proteína reguladora de la verdadera enzima modificadora, podemos especular sobre el posible papel de MnmE en esta modificación. Dado que en algunas enzimas modificadoras, una cisteína actúa como residuo catalítico (Kealey and Santi, 1991; Mueller and Slany, 1995) proponemos que la hidrólisis del GTP produciría un cambio conformacional en MnmE (mediando por el motivo G2) por el que la Cys del extremo C-terminal podría ser colocada apropiadamente para ejecutar su función modificadora sobre el tRNA.

Esta hipótesis mostrada de forma esquematizada en la figura 78, nos permitiría explicar el comportamiento en la modificación de los tRNAs de los diferentes mutantes estudiados durante este trabajo; el mutante en G1 no modifica porque no puede unir el nucleótido, el mutante G3 no presenta capacidad modificadora porque no es capaz de hidrolizar el GTP. Todos los mutantes en G2 no modifican el tRNA, porque no puede realizarse el cambio conformacional necesario para posicionar a la cisteína en la localización adecuada, y finalmente, el mutante C451S, a pesar de tener intactas sus propiedades bioquímicas, no presenta modificación de los tRNAs porque este residuo es esencial en la reacción de modificación.

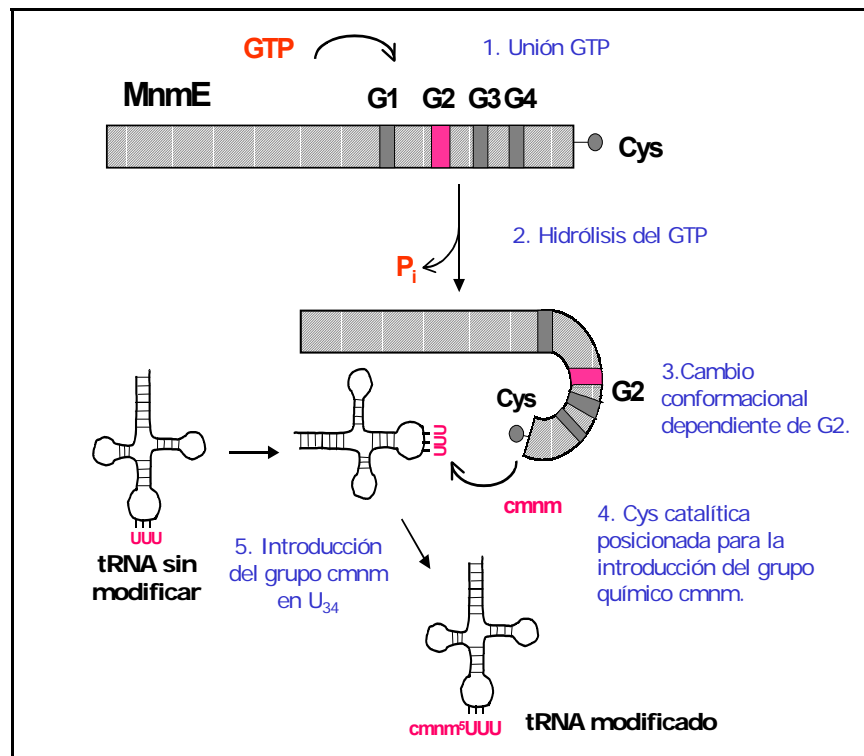


Figura 78: Esquema del modelo propuesto para el mecanismo de modificación de los tRNAs llevado a cabo por MnmeE.

En este modelo de trabajo, GidA participaría en la reacción de modificación del tRNA completando la reacción iniciada por MnmeE. Sabemos que GidA y MnmeE interactúan físicamente, pero GidA no parece ser el efector porque su unión no es dependiente del motivo G2 (el mutante T251A no afecta a la interacción). Los resultados de (Bregeon *et al.*, 2001) sugieren que MnmeE precede a GidA en la reacción de introducción del grupo cmnm. Ésta podría tener lugar a través de un mecanismo similar al propuesto para enzimas conocidas modificadoras del C5 de pirimidinas, tales como la timidato sintetasa y la RUMT, las cuales usan una cisteína enzimática para activar el carbono 5 de la pirimidina para el ataque nucleofílico (García, 1998). En la biosíntesis del DNA, la enzima timidato sintetasa es la responsable de la obtención de dTMP a partir de dUTP. Esto ocurre mediante una metilación en la posición 5, empleando como donador del grupo metilo el 5,10-metilentetrahidrofolato. Las enzimas RUMT de *Streptococcus faecalis* y *Bacillus subtilis* también usan el 5,10-metilentetrahidrofolato como donador del grupo metilo. Además, ambas enzimas requieren FADH₂ para completar la transferencia del grupo metilo. Curiosamente, la proteína GidA tiene una secuencia de unión a FAD en la región N-terminal de proteína y se ha descrito que una homóloga de *Myxococcus xanthus* tiene capacidad de unión a FAD (White *et al.*, 2001). La presencia de un sitio de unión a FAD nos permite especular sobre su posible papel como enzima catalizadora de una

reacción de oxidación-reducción, que podría ser necesaria para completar la introducción del grupo cmnm iniciado por MnmE.

MnmE presenta un mecanismo de hidrólisis del GTP alternativo al dedo de arginina:

Con la finalidad de estudiar la supuesta existencia de una arginina responsable de la hidrólisis del GTP mediante la estabilización del estado de transición, se realizó un análisis mutacional de las argininas conservadas en el dominio G ya que este dominio de la proteína MnmE presenta capacidad de unión a GTP y actividad GTPasa similares a las de la proteína completa.

Los resultados demuestran que todos los mutantes de las argininas estudiadas mantienen la afinidad por el nucleótido, es decir, no son residuos implicados en la unión del GTP (ver apartado 5.1). Esta característica es la esperada para una arginina catalítica, cuya función en la hidrólisis no afecta a la unión del GTP. En relación a la tasa de hidrólisis, tres de las argininas (R224, R256 y R288) no parecen estar especialmente afectadas por la sustitución de arginina por alanina y podemos descartar que jueguen un papel catalítico en el mecanismo de hidrólisis.

Respecto a las R252 y R275 observamos que cumplen dos de las condiciones para ser argininas catalíticas: están altamente conservadas y no tienen afectada la afinidad por nucleótido; sin embargo, la tasa de hidrólisis disminuye sólo un 13.59% y un 16.86% respectivamente (ver apartado 5.1 y 5.2). Estos valores no son especialmente drásticos y están muy lejos de resultados obtenidos con otras GTPasas donde se observa que mutaciones de argininas pertenecientes al dedo de arginina pueden llegar a reducir la k_{cat} de la reacción entre 1800 y 540 veces como ocurre en Ras (Ahmadian *et al.*, 1997), (Sermon *et al.*, 1998) y Rho (Graham *et al.*, 1999) e incluso inactivar completamente la actividad de la proteína como en Rab /Gyp1p y Gyp7p (Albert *et al.*, 1999). Además, en la proteína MnmE, e incluso dentro del propio motivo G2, podemos considerar la mutación T251A (en el aminoácido adyacente a R252) como control de mutación capaz de inactivar la actividad GTPasa; esta mutación disminuye la actividad GTPasa 100 veces, dejando una tasa de hidrólisis inferior al 1% de la proteína nativa (ver apartado 3.3, figura 44), mientras que la mutación R252A sólo consigue bajar la actividad 10 veces, cifra que parece bastante alejada del valor esperado para un aminoácido catalítico en la hidrólisis del GTP.

Revisando la bibliografía encontramos bastantes estudios mutacionales de argininas candidatas a realizar un papel catalítico tanto de sistemas en *trans* (argininas pertenecientes a GAPs) como en *cis* (argininas internas de la proteína). En la mayoría de casos, los resultados demuestran una pérdida total o muy drástica de la actividad GTPasa cuando la arginina catalítica es cambiada a alanina y, además, esta actividad no se recupera cuando se realiza el cambio a lisina, demostrando que es la cadena lateral de la arginina la responsable de la función catalítica.

Los valores obtenidos para nuestras proteínas no parecen alcanzar estos niveles de inactivación. La mutación en **R252** presenta el nivel de inactivación de la hidrólisis del GTP más acusado de todas las argininas estudiadas; igualmente sufre pérdida de la función modificadora del tRNA e inviabilidad celular en los fondos genéticos de las cepas JC7623 y V5701 (ver apartado 6.1, 6.2 y 7.2). Sin embargo, creemos que la pérdida de la actividad GTPasa de este mutante no es suficiente para considerarlo el responsable de la alta actividad GTPasa de MnmE. Además, el hecho de que cuando esta arginina es sustituida a lisina (mutación R252K) se produce una recuperación de la funcionalidad de la proteína (ver apartado 5.5 de Resultados), es definitivo para descartar este residuo como la arginina catalítica en un mecanismo de "dedo de arginina". Todas las características observadas del mutante R252A indican que se comporta como el resto de las mutaciones en el motivo G2, tanto en sus propiedades de unión e hidrólisis, como de modificación del tRNA y viabilidad celular y, por tanto, nos inclinamos a pensar que el papel funcional que realiza es el mismo que el del resto del motivo G2, es decir, probablemente está implicado en el mecanismo de cambio conformacional producido tras la hidrólisis y que se requiere para la función modificadora.

Respecto a la **R275** no creemos que una disminución de la actividad al 16.86% y de la k_{cat} de 7.66 a 1.29 min^{-1} sean suficientes para considerar este residuo responsable de la alta actividad intrínseca; además, los datos de modificación y viabilidad demuestran que la sustitución de este aminoácido por alanina no afecta la modificación de los tRNAs específicos de MnmE y, por tanto, no hay pérdida de función de la proteína a pesar de la baja tasa de hidrólisis, lo que nos permite descartar esta arginina como la catalítica en el mecanismo de activación de la proteína.

Nuestros resultados se parecen a los presentados por (Brinkmann *et al.*, 2002) con Rap1. Esta proteína es una GTPasa pequeña perteneciente a la familia Ras y cuya proteína GAP es capaz de estimular 10^5 veces la actividad GTPasa y aumentar la k_{cat} hasta 6 s^{-1} . Los autores intentaron localizar la arginina catalítica responsable de estabilizar la conformación del estado de transición y para ello mutaron 7 argininas conservadas a alanina. Con ninguna mutación observaron la inactivación de la hidrólisis, solo con uno de los mutantes alcanzaron un nivel entre el 10-20% de actividad respecto

a la nativa (dependiendo de la purificación); con el resto observaron valores superiores, incluso por encima del 50% para 4 de las 7 argininas mutadas. Tras completar un estudio mediante la búsqueda de otros residuos que en las proteínas tipo Ras se han descrito que están implicados en el mecanismo del dedo de arginina (como la glutamina que sigue al motivo G3, Q61 en Ras), concluyeron que la activación de Rap1 por la correspondiente GAP no sigue los mecanismos tradicionales del dedo de arginina, así como que la proteína GAP, al interactuar con Rap1, no introduce un residuo de arginina (ni ningún otro cargado) en el núcleo catalítico y, por lo tanto, debe existir otro mecanismo alternativo en esta proteína.

El caso de MnmE es, en cierto modo, similar al del complejo Rap1/GAPRap1 con unos niveles observados de hidrólisis muy similares. Además, MnmE y el complejo Rap/GAPRap1 comparten otra característica común, no presenta en su secuencia el residuo Gln (Q61 en Ras) implicado en el dedo de arginina (Resat *et al.*, 2001) (ver apartado 7 de introducción). Este residuo catalítico es necesario para interactuar con el fosfato γ y con la arginina de la GAP y se encuentra tras el motivo G3(DxxGQ). La proteína Rap1 es la única GTPasa de la familia que incluye a las proteínas tipo Ras y las proteínas $G\alpha$ que no presenta un residuo de glutamina en esta posición, sino una treonina; además, los autores observaron que no existía ninguna otra glutamina capaz de realizar esta función ni en la secuencia de la GTPasa ni en la secuencia de la GAP . (Brinkmann *et al.*, 2002).

El caso de MnmE es interesante porque tampoco presenta una glutamina sino una leucina, con un grado de conservación intermedio ya que en el resto de las proteínas homólogas disponibles se presenta como leucina, isoleucina o valina (residuos todos ellos hidrofóbicos y estructuralmente parecidos), pudiéndose definir el motivo G3 de las proteínas MnmE como DTAGL/I/VR (únicamente encontramos un homólogo de los 61 disponibles (*Chlamydia pneumoniae*) donde el residuo no es L/I/V sino precisamente glutamina) (ver apartado 5.4).

Curiosamente este cambio de la glutamina por leucina que se observa en MnmE respecto a otras GTPasa clásicas es la mutación realizada con varias GTPasa para inactivar la acción de la GAP; Der *et al.* (1986) realizaron este mismo cambio en Ras (Q61L) y observaron una bajada en la actividad GTPasa intrínseca de la proteína y la incapacidad de ser estimulada por GAP. Otros autores observaron resultados parecidos con esta mutación de la glutamina a leucina en la proteína Ran (Seewald *et al.*, 2002). Observando la secuencia del dominio G de MnmE y de varios de sus homólogos no encontramos ninguna otra glutamina conservada candidata a realizar este papel.

Las proteínas tipo Ras, al ser las mejor caracterizadas bioquímica y estructuralmente, han servido muchas veces como modelo para el resto de GTPasas; sin embargo, el mecanismo de hidrólisis activado por GAP no puede aplicarse a todas las GTPasas (Vetter and Wittinghofer, 2001). Como hemos comentado, las proteínas Rap

presentan una treonina en lugar de la glutamina catalítica, las proteínas de la familia de las dinaminas (incluyendo proteínas Mx, septinas y hGBP-1) contienen un residuo hidrófobo en esta posición y, además, los datos disponibles de la estructura de las dinaminas y de su mecanismo de hidrólisis indican que no existe ningún átomo cargado positivamente implicado en la catálisis (Prakash *et al.*, 2000a; Prakash *et al.*, 2000b). Estudiando las secuencias de otras GTPasas bacterianas evolutivamente conservadas (Era, Obg, etc...), encontramos que presentan también en esta posición un residuo hidrofóbico (leucina, isoleucina o valina) en lugar de la glutamina. Lin *et al.* (1999) caracterizaron bioquímicamente la proteína CgtA de *Caulobacter crescentus* (una GTPasa de la familia de las Obg bacterianas) y demostraron que esta proteína presentaba un comportamiento bioquímico en la unión e intercambio de los nucleótidos de guanina diferente al de las proteínas tipo Ras; además, concluyeron que estas propiedades distintas de la proteína CgtA, en parte, son debidas a la ausencia de la glutamina en G3 y a la presencia de una leucina en su lugar (Lin *et al.*, 1999).

En conclusión, hasta la fecha se han demostrado mecanismos de activación alternativos para 3 GTPasas: hGBP1 (perteneciente a la familia de las dinaminas), Ran y Rap1 (ambas perteneciente a la familia de las proteínas tipo Ras) además, en las GTPasas bacterianas, aunque se desconoce con detalle el funcionamiento de la hidrólisis, no se ha descrito la existencia de proteínas GAPs. Como dato adicional, debemos tener en cuenta que las ATPasas motoras como la miosina y la kinesina, presentan algunos motivos de unión a nucleótido equivalentes a las GTPasas y sin embargo no muestran la participación de ningún residuo de arginina (Rayment, 1996). En consecuencia, con los datos obtenidos en este trabajo y la información disponible sobre otras proteínas, sugerimos que en MnmE existe otro mecanismo de activación de la hidrólisis del GTP independiente de la arginina y la glutamina catalíticas. Indiscutiblemente, la obtención de la estructura tridimensional de la proteína nos aportará las claves definitivas para entender las peculiares propiedades de esta proteína.

La arginina 288 (**R288**) se mutagenizó por ser una de las argininas conservada del motivo G y, por tanto, candidata a participar en un supuesto mecanismo de dedo de arginina. Sin embargo, los resultados obtenidos del estudio bioquímico y funcional de este mutante revelan que la R288, a pesar de no estar aparentemente implicada en el mecanismo de unión e hidrólisis del nucleótido, sí debe jugar un importante papel en la función de la proteína, ya que cepas portadoras de esta mutación dan lugar a niveles indetectables de tRNAs modificados que son responsables de un fenotipo característico (ver apartado 7.5 de Resultados), donde las células presentan grandes dificultades para desarrollar sus funciones celulares.

Desconocemos la posible función del residuo R288, pero las propiedades recuerdan a las del mutante en la cisteína del extremo carboxiterminal; la capacidad de unión e hidrólisis no está prácticamente afectada y sin embargo no hay modificación, o los niveles son tan bajos que, debido a la baja sensibilidad de nuestras técnicas, no podemos detectarlos. Aunque creemos que el fenotipo de este mutante probablemente se debe a razones distintas a las del mutante C451S.

Con los datos preliminares de la estructura del dominio G de MnmE (Monleon *et al.*, 2004 y Monleon *et al.*, manuscrito en preparación) podemos sugerir una posible función de R288 en la reacción de modificación del tRNA, por ejemplo, como residuo necesario para transmitir el cambio conformacional necesario para que el extremo carboxiterminal de la proteína y su cisteína se localicen en la posición adecuada para la reacción de modificación, ya que este residuo se localiza en uno de los loops de la proteína (ver figura 79) que puede ser importante para la movilidad y dinámica de la región. Aunque esta propuesta es meramente especulativa y no tenemos datos que lo confirmen.

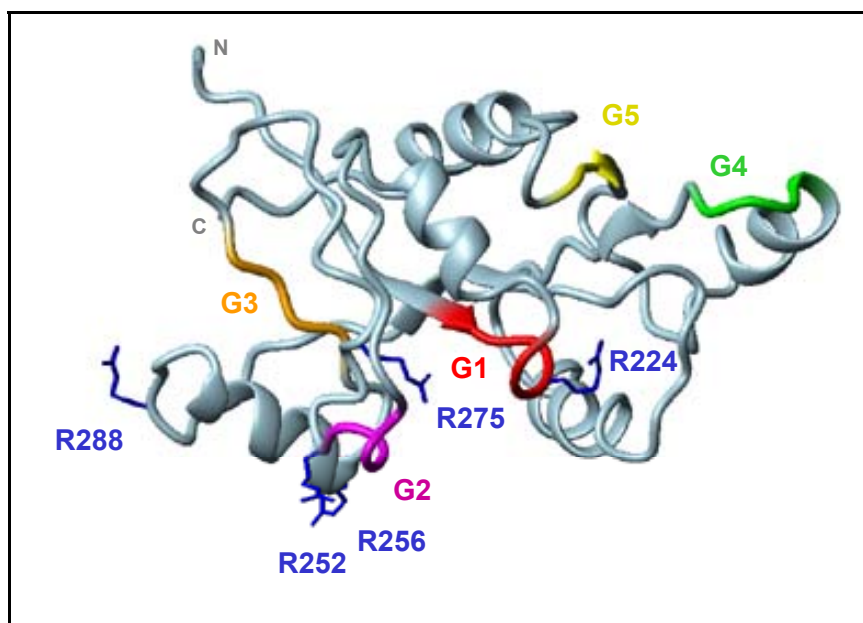


Figura 79: Modelo estructural del dominio G de MnmE obtenido por RMN, los motivos G1 a G5 están indicados en colores y en azul las cadenas laterales de las argininas estudiadas en este trabajo.

También podemos sugerir una posible función de R288 en el reconocimiento del tRNA específico ya que se encuentra cerca de la zona del dominio G que en otras GTPasas está descrita como implicada en el reconocimiento del efector (el cual sugerimos que pueda ser el tRNA específico). Por último, también podemos considerar un posible papel más directo en la reacción de modificación, por ejemplo, colaborando junto con la cisteína en la introducción del grupo químico cmnm o en el reconocimiento del grupo donador.

La inactivación funcional de MnmE produce letalidad sintética:

Nuestros resultados demuestran que las mutaciones en *mnmE* que afectan a la actividad GTPasa de la proteína (G1 y G3) impiden la presencia de la modificación mnm^5U_{34} . Además, otras mutaciones en la proteína que no implican necesariamente la desaparición de la actividad GTPasa (Cys, R288 y G2) también presentan el mismo fenotipo, por lo que concluimos que se requiere la actividad GTPasa, aunque otros procesos bioquímicos adicionales son también necesarios para la modificación.

Además, los resultados demuestran que las mutaciones en *mnmE* que afectan a la modificación del tRNA (G1, G2, G3, Cys, R288 y mutaciones stop) son letales en determinados fondos genéticos como en las cepas JC7623 y V5701 (Cabedo *et al.*, 1999; Yim *et al.*, 2003), es decir, estas mutaciones son capaces de conferir letalidad sintética a la célula. La siguiente tabla resume los resultados obtenidos durante el desarrollo de este trabajo:

Alelo <i>mnmE</i> :		Unión	Hidrolisis	Modificación	Viabilidad
G1	G228A	-	-	-	-
G2	G249A	+	(4.4 %)	-	-
	T250A	+	(10 %)	-	-
	T250S	+	(55.6 %)	-	- (42° C)
	T251A	+	-	-	-
	T251S	+	(25.6 %)	-	-
	T250S/T251S	+	-	-	-
	R252A	+	(13.17 %)	-	-
	D253A	+	(11.8%)	-	-
G3	D270A	+	-	-	-
G4	D338N	+/-	+	+	+
G5	S358A	+	+	+	+
Cys	C451S	+	+	-	-
Arg	R224A	+	+	+	+
	R252K	+	(42 %)	+	+
	R256A	+	+	+	+
	R275A	+	(16.9 %)	+	+
	R288A	+	+	"_"	"+"
NUL	MNME-1::KAI			-	-

Tabla 25: Tabla resumen de las propiedades bioquímicas y funcionales de las distintas mutaciones de MnmE analizadas. La mutación R288A presenta peculiaridades en sus propiedades (ver apartado 7.5 de Resultados) y por eso se indica como "-" y "+".

En este punto, nuestro objetivo es esclarecer la relación entre la presencia de la modificación mnm^5U_{34} en ciertos tRNAs y la viabilidad genética dependiendo de la estirpe bacteriana.

Estudiando datos anteriores encontramos que, curiosamente, el grupo de Nakayashiki intentó infructuosamente obtener mutantes nulos de *gidA* en la cepa JC7623, lo que probablemente sugiere que, al igual que ocurre con los mutantes *mnmE*, no es posible obtener en esta cepa un nulo de *gidA* (Nakayashiki and Inokuchi, 1998) debido a que esta mutación también confiere letalidad sintética.

Decoster y Colby observaron en levadura que mutaciones nulas en el gen *MSS1* (análogo de *mnmE*) o *MTO1* (análogo de *gidA*) producen fenotipos deficientes en respiración únicamente cuando las mutaciones se combinaban con otra mutación en el gen que codifica la subunidad 15S del rRNA mitocondrial denominada P^R_{454} y que se localiza en la región del sitio A del ribosoma y, por tanto, en una zona implicada directamente en el proceso de traducción del mRNA (Colby *et al.*, 1998; Decoster *et al.*, 1993). Una posible explicación para el fenotipo de los dobles mutantes es que, en mitocondrias de levadura, el proceso de traducción no puede llevarse a cabo cuando algunos tRNAs se encuentran hipomodificados (debido a la ausencia de la proteína MSS1 o MOT1) y además, esta característica se combina con una mutación en el sitio A del ribosoma ya que probablemente la interacción y la estabilidad del complejo tRNA-ribosoma-mRNA se ve afectada hasta el punto de impedir el proceso de traducción.

En *E. coli* la letalidad sintética observada en mutantes *mnmE* no es probable que esté asociada a la presencia de mutaciones en el rRNA ya que, a diferencia del genoma mitocondrial, existen 7 copias de los operones del rRNA, los cuales se expresan de forma similar y bajo las mismas condiciones de crecimiento (Condon *et al.*, 1992). Por lo tanto, no es probable que las siete copias existentes estén mutadas, así que debemos buscar la mutación en otros genes implicados en la maquinaria de traducción que junto con la mutación *mnmE* (o *gidA*) son responsables de la letalidad en estas cepas.

Curiosamente, se ha descrito que en *E. coli* mutaciones en el gen *gidA* producen letalidad cuando están acompañadas de una segunda mutación en el anticodón del gen tRNA₆^{Leu} (Nakayashiki and Inokuchi, 1998). En *E. coli*, existen 5 genes que codifican los 5 tRNAs encargados de traducir los 6 codones de leucina. El tRNA₆^{Leu} posee en su secuencia el anticodón CAA que le permite leer el codón UUG, pero este codón puede ser también leído por otro tRNA: el tRNA₄^{Leu} el cual tiene el anticodón UAA. Este tRNA, en condiciones normales, se encuentra modificado en su posición 34 mediante la introducción de un grupo 5-carboximetilaminoametil-O²-metiluridina, modificación en la cual probablemente

interviene la proteína GidA. Cuando el tRNA₄^{Leu} se encuentra modificado es capaz de leer también el codón UUG, por lo que la ausencia o mutación en el gen del tRNA₆^{Leu} no tiene efectos importantes sobre la célula. Sin embargo, los autores han observado que la combinación de una mutación en el gen *gidA* (que impide la modificación del tRNA₄^{Leu}) junto con la mutación de tRNA₆^{Leu} (mutación en la secuencia del anticodón de CAA (Leu) a CUA (Stop), presente en la cepa BT63 (*supP*, Su⁺⁶) de *E. Coli*), impiden que el codón UUG sea reconocido por ninguno de los dos tRNAs, lo que produce un defecto en el proceso de traducción y la inviabilidad celular. Estos autores ven un efecto parecido con mutantes del gen *miaA* el cual codifica la proteína MiaA responsable de la modificación ms²i⁶ en la A de la posición 37 presente en los tRNAs que deben leer un codón UNN (como el codón de Leu UUG). Esta modificación permite el correcto reconocimiento codón-anticodón mediante la estabilización de las posiciones 35 y 36 asegurando así el mantenimiento de la pauta de lectura (Bjork *et al.*, 1999; Bjork *et al.*, 1989; Urbonavicius *et al.*, 2001; Urbonavicius *et al.*, 2003; Yarian *et al.*, 2002). Los autores observan que la combinación de una mutación en el tRNA₆^{Leu} junto con otra en el *miaA* produce letalidad a 42° C, pero las células son viables a 30° C, por lo que se concluye que en la cepa BT63 (con el tRNA₆^{Leu} mutado), el tRNA₄^{Leu} sin la modificación ms²i⁶A₃₇ (debido a la mutación en *miaA*) es capaz de leer el codón UUG pero con dificultades, permitiendo su reconocimiento a 32° C, pero no a 42° C, ya que la temperatura influye en la estabilidad del reconocimiento del codón-anticodón.

Estos resultados en levaduras con *MSS1* y *MTO1* y en *E. coli* con *gidA* y *miaA* apoyan nuestra propuesta de que la combinación de mutaciones que afectan al proceso de traducción y que por separado no revelan ningún defecto obvio en el crecimiento, pueden desencadenar fenotipos letales por sinergismo (Cabedo *et al.*, 1999).

Suponemos que las cepas JC7623 y V5701 donde hemos visto que son letales los mutantes nulos de *mnmE* y *gidA* y algunos de los mutantes puntuales de *mnmE* (Cabedo *et al.*, 1999; Nakayashiki and Inokuchi, 1998) deben llevar alguna mutación/es en otros genes implicados en el proceso de traducción y es la combinación de estas mutaciones la responsable del fenómeno de letalidad sintética.

Los mejores genes candidatos para llevar esta mutación serían aquellos implicados en el proceso de descodificación:

- genes de tRNA.

- genes de proteínas ribosomales.

- genes de proteínas modificadoras de los tRNAs, especialmente aquellas que modifican las posiciones 34 y 37 ya que se ha visto que son las modificaciones más importantes para la correcta traducción de los codones y el mantenimiento de la pauta de lectura (Bregeon *et al.*, 2001; Urbonavicius *et al.*, 2001; Yarian *et al.*, 2002).

La traducción del mRNA es un proceso extremadamente complejo que requiere de la interacción del mRNA con el anticodón del tRNA y el ribosoma. La eficacia de la traducción depende de la correcta interacción entre los tRNAs (con sus correspondientes modificaciones), las regiones descodificantes de los ribosomas (rRNA y proteínas ribosomales) y el mRNA. Mutaciones en cualquiera de estas moléculas pueden alterar la estabilidad del complejo formado afectando la eficacia de la traducción. Debido a la alta complejidad del sistema, algunas de estas mutaciones sólo producen un fenotipo letal cuando están presentes simultáneamente con otra mutación, ya que por si solas no son capaces de impedir el reconocimiento del codón, sin embargo junto a otra mutación en otra de las moléculas que interviene en el proceso pueden impedir la viabilidad de la célula.

Causas de la letalidad sintética producida por mutaciones en *mnmE* y *rpsL*:

Recientemente, nuestro grupo ha identificado la mutación responsable de la letalidad sintética cuando se combina con mutaciones *mnmE* en las estirpes bacterianas JC7623 y V5701 (datos de M.Villarroya y L.Yim no publicados).

Hemos observado que mutaciones en el gen *rpsL* junto con las mutaciones en *mnmE* que impiden la capacidad modificadora son responsables de la inviabilidad celular.

El gen *rpsL* produce la proteína ribosomal S12, una de las 21 proteínas que junto al rRNA 16S forma la subunidad 30S del ribosoma de *E. coli*. En el ribosoma esta proteína se localiza junto al sitio de descodificación donde se produce la interacción tRNA-mRNA, además se ha observado que la proteína S12 interacciona a través de residuos de lisina con el rRNA 16S y ayuda a estabilizar bases del rRNA implicadas directamente en el reconocimiento codón-anticodón (Ogle *et al.*, 2001) (ver figura 80).

Existen algunas mutaciones concretas en el gen *rpsL* denominadas “mutaciones restrictivas de error” o “hiperexactas” que afectan a alguna de sus 3 argininas K42, K43 y K87 y que producen resistencia a estreptomicina (Str^R) (Kurland, 1996). Estas mutaciones presentan un fenotipo restrictivo consistente en conferir hiperexactitud en la lectura del código genético, es decir, cuando está presente una mutación restrictiva de error en el gen *rpsL* aumenta la rigurosidad en la lectura de los codones y fenómenos como por ejemplo de “readthrough” (lectura a través de un codón de stop) no se producen.

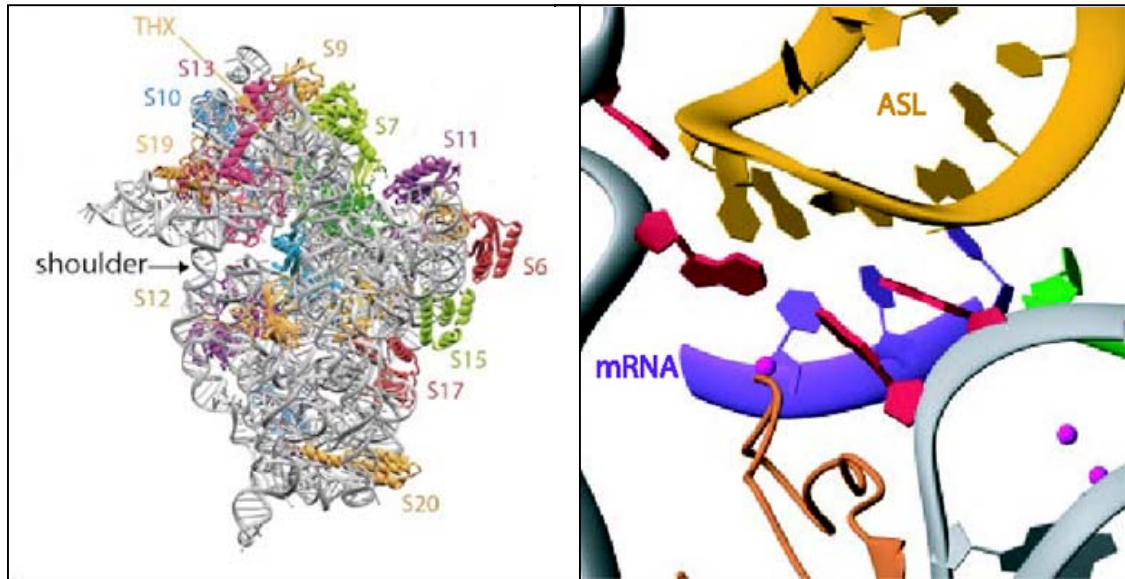


Figura 80: **A:** Estructura de la subunidad 30S del ribosoma de *Thermus thermophilus* (Brodersen *et al.* 2002), en gris se muestra el rRNA 16S y en colores las diferentes proteínas ribosomales que conforman la subunidad 30S del ribosoma. La proteína S12 interacciona directamente a través de sus residuos de lisina con el rRNA 16S y se localiza en el sitio de descodificación e interacción codón-anticodón. **B:** detalle del sitio A del ribosoma: en gris, el rRNA 16S, con algunas de sus bases implicadas en la descodificación en color magenta, el anticodón del tRNA en ocre (ASL), el codón del mRNA en azul y la proteína S12 en la parte inferior en marrón (Ogle *et al.* 2001).

Las mutaciones en *mnmE* también producen un fenotipo restrictivo de error o hiperexacto (Elseviers *et al.*, 1984); (recordemos aquí que el fenómeno de “readthrough” de un codón de stop en el gen *lacZ* es el método empleado para detectar la funcionalidad de las diferentes mutaciones introducidas en *mnmE* (ver apartada 6.1 de resultados). Por tanto, la letalidad sintética producida por la combinación de mutaciones en *mnmE* y *rpsL* (Sm^R) parecen consecuencia de un incremento exacerbado del mecanismo que aumenta el rigor en la lectura de codones, así como también de la inestabilidad del reconocimiento codón-anticodón producido como consecuencia de la ausencia de la modificación en la posición de tambaleo del tRNA y la ausencia de la lisina implicada en la interacción S12-rRNA, todo ello localizado en el sitio de reconocimiento e interacción del tRNA, el mRNA y el rRNA 16S durante el proceso de traducción.

Nuestro grupo acaba de demostrar que las cepas en las que habíamos observado letalidad sintética: JC7623 y V5701 contienen la mutación restrictiva de error K43T en el gen *rpsL*, lo que le confiere resistencia a estreptomicina y explica por qué la célula es inviable si intentamos introducir una copia de *mnmE* mutante no modificadora. Sin embargo, otras cepas donde no observamos letalidad como DEV16, no es resistente a

estreptomycin y por tanto es viable, aunque sea portadora de una copia de *mnmE* no funcional. Curiosamente, la cepa MC1000 es viable cuando introducimos una copia de *mnmE* sin capacidad modificadora, pero es resistente a estreptomycin. La explicación es que la cepa contiene una mutación en el gen *rpsL* pero se trata de la mutación “no restrictiva” K43R (Kurland, 1996), la cual le confiere la resistencia al antibiótico pero no presenta un fenotipo restrictivo, ya que la arginina al parecer puede restablecer la función de la lisina 43 y por tanto, aunque introduzcamos en este fondo genético una mutación en *mnmE* no modificadora, la cepa es viable.

Cepa:	Combinación de mutaciones:		Fenotipo:	
	<i>mnmE</i>	<i>rpsL</i>	Str ^R	Viabilidad
DEV16	mutación no modificadora	WT	-	+
MC1000	mutación no modificadora	K43R	+	+
JC7623	mutación no modificadora	K43T	+	-
V5701	mutación no modificadora	K43T	+	-

Tabla 26: Resumen del fenotipo resultante por combinación de mutaciones en *mnmE* y *rpsL* en las cepas empleadas en este trabajo.

La letalidad producida por la combinación de estas dos mutaciones puede ser una consecuencia de un fallo generalizado del proceso de traducción, pero nos inclinamos a pensar que, en realidad, las consecuencias de la combinación de estas dos mutaciones afectan únicamente a ciertos genes que contienen mecanismos de regulación específicos y susceptibles a un fenómeno de hiperexactitud rigurosa, como pueden ser genes regulados por cambios programados de la pauta de lectura, genes que contienen codones raros (los codones más raros en *E. coli* son AGG y AGA, ambos descodificados por tRNAs modificados por MnmE) o codones de stop dentro de genes estructurales.

La proteína GTPBP3 (homóloga humana de MnmE) y estudios de la relación entre la modificación de los tRNAs mitocondriales y las enfermedades humanas del sistema OXPHOS:

Una vez caracterizada la función de la proteína MnmE de *E. coli* y su papel en la modificación del tRNA y la viabilidad celular, a continuación presento datos disponibles de la proteína homóloga a MnmE en humanos (GTPBP3) y su posible implicación en la

modificación de los tRNAs mitocondriales y las enfermedades humanas del sistema OXPHOS (fosforilación oxidativa).

El genoma mitocondrial humano es una molécula circular de 16.6 kb y que contiene sólo 37 genes, 22 de los cuales codifican los tRNA mitocondriales, 2 codifican los rRNA y los 13 restantes codifican proteínas, todas ellas componentes de la cadena respiratoria.

La mitocondria posee sus propias reglas para interpretar el código genético y consigue traducir todos los codones con un número de tRNAs inferior al predicho inicialmente por la hipótesis del tambaleo. Existe un único tRNA para reconocer los 5 codones de una caja únicas y dos para reconocer los codones de una caja mixta; en este último caso, la presencia de una modificación en la posición U₃₄ del anticodón es capaz de diferenciar entre las bases púricas y pirimidínicas (Osawa *et al.*, 1992). Por tanto, se puede concluir que la presencia de estas modificaciones juega un papel crucial en el proceso de traducción de los genes mitocondriales y por tanto, cualquier mutación o alteración del mecanismo encargado de modificar estas bases puede producir fallos en la síntesis de las proteínas mitocondriales.

En la mitocondria se localiza la cadena respiratoria o sistema OXPHOS (fosforilación oxidativa), cuya función es la producción de ATP en la célula. El sistema consiste en 4 complejos multiproteicos cuyas subunidades individuales están codificadas a partir de genes nucleares y mitocondriales. Defectos en este sistema OXPHOS dan lugar a graves enfermedades causadas por disfunciones mitocondriales como son las encefalomiopatías mitocondriales, tales como MELAS (miopatía mitocondrial, encefalopatía, acidosis láctica y ataques) y MERFS (epilepsia mioclónica asociada a fibras rojas-rasgadas).

Frecuentemente se han identificado mutaciones puntuales en los genes de los tRNAs mitocondriales en pacientes que sufren de enfermedades mitocondriales que producen desórdenes neuromusculares. Por ejemplo, más de 80% de los pacientes con MELAS tienen la mutación A3243G en el gen mitocondrial del tRNA^{Leu} y más del 10% de los pacientes presenta la mutación T3271C en este mismo gen (Goto *et al.*, 1990; Goto *et al.*, 1991).

El grupo de Watanabe demostró que estas dos mutaciones puntuales presentes en el gen tienen como consecuencia la ausencia de modificación en la posición U₃₄ del tRNA^{Leu}, es decir, a pesar de ser dos mutaciones puntuales localizadas en sitios distintos al anticodón (la primera en el brazo D y la segunda en la horquilla del anticodón), son capaces de impedir la modificación en la posición U₃₄ (Yasukawa *et al.*, 2000b). El tRNA^{Leu} hipomodificado en esta posición es capaz de leer todos los codones UUN ya que no puede

distinguir en la tercera posición del codón la presencia de una base púrica (A,G) correspondiente a leucina, o la pirimidínica (U,C) correspondiente a fenilalanina. El resultado final es que estos tRNA^{Leu} hipomodificados introducen con cierta frecuencia el aminoácido leucina en posiciones donde deberían introducir un residuo de fenilalanina. La presencia de este cambio en algunas proteínas mitocondriales de la cadena respiratoria es la causa de los síntomas de los pacientes con MELAS, ya que probablemente estas proteínas tienen dificultades para integrarse en membrana o realizar su función.

Otro ejemplo significativo de la importancia de las modificaciones en los tRNAs mitocondriales y su relación con las enfermedades humanas del sistema OXPHOS, es la mutación puntual A8344G localizada en el gen mitocondrial del tRNA^{Lys} (Yasukawa *et al.*, 2000a). Esta mutación puntual está presente en más del 90% de los pacientes con MERRF (myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibers) (Shoffner *et al.*, 1990) una de las encefalopatías mitocondriales mejor estudiadas.

Al igual que ocurría con las mutaciones puntuales en tRNA^{Leu} descritas antes, esta mutación puntual localizada en el brazo TΨG del tRNA^{Lys} tiene el mismo efecto que las anteriores: impedir la modificación del la U₃₄ del anticodón. El resultado es un tRNA^{Lys} no modificado que no es capaz de traducir correctamente los codones AAA y AAG de Lys, lo que produce una inestabilidad del complejo codón-anticodón que puede desencadenar la interrupción del proceso de traducción (dando lugar a proteínas truncadas) o dar lugar a la incorporación incorrecta de aminoácidos y por consiguiente a proteínas mutantes, alteraciones responsables de las encefalopatías mitocondriales descritas.

Estos dos casos ejemplifican la importancia que tiene la modificación de los tRNAs mitocondriales para asegurar el correcto funcionamiento del sistema de traducción. Pero poco se sabe del mecanismo de modificación y de las enzimas implicadas.

Como ya habíamos señalado anteriormente, se han descrito los análogos en levadura de los genes *mnmE* y *gidA* que corresponden a *MSS1* y *MTO1* respectivamente. Mutantes de estos genes cuando se combinan con la mutación puntual P^R₄₅₄ localizada en la región del sitio A del gen mitocondrial 15s rRNA producen un fenotipo deficiente en respiración (Colby *et al.*, 1998; Decoster *et al.*, 1993).

La ausencia de modificación en la posición U₃₄ de los tRNAs debida a las mutaciones en los enzimas Mss1p (MnmE) y Mto1 (GidA) implicados en esta ruta, sumada a la mutación en la subunidad 15S donde se produce la interacción entre el tRNA-mRNA-ribosoma probablemente produce la inestabilidad del complejo, lo que acaba impidiendo el correcto proceso de traducción e impidiendo la síntesis correcta de proteínas mitocondriales.

El grupo de Li intentó trasladar estas observaciones a humanos, estudiando los análogos de estas dos proteínas y sus consecuencias en enfermedades asociadas a deficiencias mitocondriales (Li and Guan, 2002; Li *et al.*, 2002). Estos autores consideran que la mutación P^R₄₅₄ descrita en el gen mitocondrial 15s rRNA de levadura corresponde a la mutación puntual A1555G en el gen del rRNA 12S mitocondrial humano, una mutación que ha sido descrita como asociada a un tipo de sordera no sindrómica. Pero esta patología puede tener varios grados de manifestación o de gravedad y los autores proponen que aunque la causa principal de la sordera es la presencia de esta mutación en el gen mitocondrial, otros genes nucleares pueden jugar un papel importante en la modulación de la manifestación de la enfermedad. Los autores proponen que los genes GTPBP3 y hMTO1 (análogos humanos de *mnmE* y *gidA* respectivamente) pueden ser moduladores de la mutación A1555G responsable de la sordera no sindrómica.

Existe un alto grado de conservación entre los genes bacterianos y sus homólogos humanos; el grado de conservación entre *mnmE* y GTPBP3 es del 40% y entre *gidA* y hMTO1 del 50% (Li and Guan, 2002; Li *et al.*, 2002). Estos datos sugieren que muchas de las propiedades, y probablemente, funciones de MnmE y GidA se conservan en las homólogas humanas. De hecho, Li *et al.*, (2002) han mostrado que genes humanos complementan los mutantes de levadura. Sin embargo, hasta ahora nada se ha publicado sobre las propiedades bioquímicas y funcionales de las proteínas eucariotas. Nuestro grupo está actualmente abordando este estudio, pues clarificar este punto ayudará a entender la participación de ambos genes en las patologías mencionadas. Por otra parte, estamos convencidos de que el uso de las proteínas bacterianas como modelos experimentales ayudará extraordinariamente a diseñar las estrategias para el estudio de las proteínas humanas.

Este trabajo ha permitido caracterizar bioquímica y funcionalmente a la proteína MnmE de *E. coli*. Esta proteína presenta propiedades bioquímicas peculiares que la diferencian de las GTPasas clásicas reguladoras y utiliza un mecanismo diferente al de éstas para hidrolizar el GTP, en el cual no interviene ninguna arginina o glutamina catalítica; además requiere de la hidrólisis del GTP (y no simplemente de su unión) para ser funcionalmente activa. MnmE está implicada en la modificación de tRNAs, un proceso crucial en la decodificación del mensaje genético. En nuestro modelo proponemos que la hidrólisis del GTP provoca los reordenamientos estructurales en la molécula que le permiten ejecutar su función modificadora.

En este trabajo hemos establecido la relación entre la presencia de la modificación introducida por MnmE y la viabilidad celular, demostrando la importancia de la modificación para el proceso de decodificación celular, pues este proceso se ve

gravemente perjudicado cuando mutaciones que inactivan funcionalmente MnmE se combinan con mutaciones en otros genes implicados en este proceso y que por sí solas no producen fenotipo aparente.

La reciente obtención de un modelo de la estructura tridimensional del dominio G de MnmE mediante técnicas de RMN (colaboración con el laboratorio del Dr. Celda de la Universitat de València) creemos que próximamente nos permitirá relacionar los datos estructurales de la proteína con la información conseguida mediante mutaciones puntuales y ensayos bioquímicos de las propiedades de la proteína, con el fin de entender las bases moleculares del mecanismo de acción de esta peculiar proteína.

CONCLUSIONES

Conclusiones:

1. MnmE es una GTPasa multidominio que presenta baja afinidad por nucleótido, alta actividad GTPasa intrínseca y es capaz de multimerizar. Estas características bioquímicas diferencian MnmE de las GTPasas reguladoras, típicamente representadas por Ras.
2. El dominio G aislado de MnmE conserva una afinidad similar por nucleótidos y la misma capacidad de hidrólisis que la proteína completa.
3. La proteína MnmE tiene capacidad de autoasociación y la dimerización se ve favorecida por la presencia de nucleótido y la concentración de proteína.
4. El análisis mutacional de los motivos G1, G3, G4 y G5 ha permitido establecer su implicación en la unión e hidrólisis del GTP. Así, el motivo G1 es esencial para la unión del nucleótido y el motivo G4, con la colaboración del motivo G5, son responsables de la especificidad por los nucleótidos de guanina. Estos estudios, también han mostrado ciertas peculiaridades de MnmE; la mutación D270A no afecta a la unión del GTP pero sí a su hidrólisis, diferenciándose, por lo tanto, de lo que ocurre en Ras y aportando una valiosa información sobre el estado funcional de MnmE. En este caso, la hidrólisis del GTP (no basta con la unión) es necesaria para la función de la proteína.
5. El motivo G2 de MnmE presenta la secuencia GTTRD. La treonina 251 es el residuo de este motivo conservado entre familias, jugando probablemente un papel esencial en la hidrólisis del GTP. Todos los residuos del motivo participan en el cambio conformacional del switch I de la proteína que acontece tras la hidrólisis del GTP. Este cambio conformacional es esencial para la función modificadora de tRNAs.

6. MnmE presenta una alta actividad GTPasa intrínseca y no requiere ninguna proteína GAP para su activación. Así mismo, tampoco presenta un mecanismo de activación interno basado en el "dedo de arginina" ya que no existe ninguna arginina ni glutamina catalítica en el dominio G de la proteína, por lo que debe haber un mecanismo alternativo responsable de la alta actividad GTPasa de MnmE.

7. La cisteína del extremo carboxiterminal, la única presente en la proteína, no está relacionada con los procesos de la asociación parcial a membrana, autoasociación de la proteína y unión e hidrólisis del GTP; sin embargo, es esencial para la modificación del tRNA, por lo que proponemos un papel catalítico para esta cisteína en la reacción de modificación.

8. La hidrólisis del GTP, y no la unión, es necesaria para la función modificadora de MnmE, aunque no es suficiente y otras actividades adicionales de la proteína son requeridas.

9. La ausencia de la modificación mnm^5U_{34} en ciertos tRNAs es la responsable del fenómeno de letalidad sintética observado en cepas portadoras de otras mutaciones en genes implicados en el proceso de traducción.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material:

1. Material Biológico:

1.1. Cepas:

Cepa	Genotipo	Referencia
DEV16	<i>F thi-1 rel-1 spoT1 lacZ105_{UAG} mnmE192_{UAG} [MnmE Q129X, Val^R]</i>	(Elseviers <i>et al.</i> , 1984)
JC7623	(Bachmann, 1996)	(Bachmann, 1996)
V5701	<i>bgl</i> [Sal ⁺]	(Armengod and Blanco, 1978)
MC1000	(Silhavy, 1984)	(Silhavy, 1984)
DH5 α	<i>supE44 ΔlaacU169(Δ80 lacZ Δ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-AI</i>	(Hanahan, 1983)
BL21(DE3)	<i>hsdS gal (λclts857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene 1)</i>	(Studier <i>et al.</i> , 1990)
IC3647	JC7623 (λ IC718)	Cabedo <i>et al.</i> (1998)
IC4126	V5701 / pIC755	Cabedo <i>et al.</i> (1998)
IC5118	IC3647 <i>mnmE</i> , <i>tnaA::Kan</i> [MnmE R224A, Kan ^R]	este trabajo
IC4757	IC3647 <i>mnmE10</i> , <i>tnaA::Kan</i> [MnmE G228A, Kan ^R]	Yim <i>et al.</i> (2003)
IC4905	IC3647 <i>mnmE</i> , <i>tnaA::Kan</i> [MnmE G249A, Kan ^R]	este trabajo
IC4903	IC3647 <i>mnmE</i> , <i>tnaA::Kan</i> [MnmE T250A, Kan ^R]	este trabajo
IC5057	IC3647 <i>mnmE</i> , <i>tnaA::Kan</i> [MnmE T250S, Kan ^R]	este trabajo
IC4904	IC3647 <i>mnmE</i> , <i>tnaA::Kan</i> [MnmE T251A, Kan ^R]	este trabajo
IC5082	IC3647 <i>mnmE</i> , <i>tnaA::Kan</i> [MnmE T251S, Kan ^R]	este trabajo
IC5109	IC3647 <i>mnmE</i> , <i>tnaA::Kan</i> [MnmE T250S/T251S, Kan ^R]	este trabajo
IC4836	IC3647 <i>mnmE</i> , <i>tnaA::Kan</i> [MnmE R252A, Kan ^R]	este trabajo
IC5168	IC3647 <i>mnmE</i> , <i>tnaA::Kan</i> [MnmE R252K, Kan ^R]	este trabajo
IC4955	IC3647 <i>mnmE</i> , <i>tnaA::Kan</i> [MnmE D253A, Kan ^R]	este trabajo
IC5110	IC3647 <i>mnmE</i> , <i>tnaA::Kan</i> [MnmE R256A, Kan ^R]	este trabajo
IC4758	IC3647 <i>mnmE30</i> , <i>tnaA::Kan</i> [MnmE D270A, Kan ^R]	Yim <i>et al.</i> (2003)
IC4837	IC3647 <i>mnmE</i> , <i>tnaA::Kan</i> [MnmE R275A, Kan ^R]	este trabajo
IC5083	IC3647 <i>mnmE</i> , <i>tnaA::Kan</i> [MnmE R288A, Kan ^R]	este trabajo
IC4759	IC3647 <i>mnmE40</i> , <i>tnaA::Kan</i> [MnmE D338N, Kan ^R]	Yim <i>et al.</i> (2003)
IC5084	IC3647 <i>mnmE</i> , <i>tnaA::Kan</i> [MnmE S358A, Kan ^R]	este trabajo
IC4838	IC3647 <i>mnmE</i> , <i>tnaA::Kan</i> [MnmE R252A/R275A, Kan ^R]	este trabajo
IC4605	IC3647 <i>mnmE60</i> , <i>tnaA::Kan</i> [MnmE C451S, Kan ^R]	Yim <i>et al.</i> (2003)
IC4760	IC3647 <i>mnmE⁺</i> , <i>tnaA::Kan</i> [MnmE ⁺ , Kan ^R]	Yim <i>et al.</i> (2003)
IC4130	IC4126 <i>mnmE-1::kan</i> [MnmE ⁻]	Cabedo <i>et al.</i> (1998)
IC5123	transductante Kan ^R Sal ⁻ Cm ^R de IC4126 del donante IC5118 [MnmE R224A, Kan ^R]	este trabajo
IC4763	transductante Kan ^R Sal ⁻ Cm ^R de IC4126 del donante IC4757 [MnmE G228A, Kan ^R]	Yim <i>et al.</i> (2003)
IC4910	transductante Kan ^R Sal ⁻ Cm ^R de IC4126 del donante IC4905 [MnmE G249A, Kan ^R]	este trabajo
IC4908	transductante Kan ^R Sal ⁻ Cm ^R de IC4126 del donante IC4903 [MnmE T250A, Kan ^R]	este trabajo
IC5073	transductante Kan ^R Sal ⁻ Cm ^R de IC4126 del donante IC5057 [MnmE T250S, Kan ^R]	este trabajo
IC4909	transductante Kan ^R Sal ⁻ Cm ^R de IC4126 del donante IC4904 [MnmE T251A, Kan ^R]	este trabajo
IC5014	transductante Kan ^R Sal ⁻ Cm ^R de IC4126 del donante IC5082 [MnmE T251S, Kan ^R]	este trabajo

IC5125	transductante Kan ^R Sal ⁻ Cm ^R de IC4126 del donante IC5109 [MnmE T250S/T251S, Kan ^R]	este trabajo
IC4859	transductante Kan ^R Sal ⁻ Cm ^R de IC4126 del donante IC4836 [MnmE R252A, Kan ^R]	este trabajo
IC5171	transductante Kan ^R Sal ⁻ Cm ^R de IC4126 del donante IC5168 [MnmE R252K, Kan ^R]	este trabajo
IC4957	transductante Kan ^R Sal ⁻ Cm ^R de IC4126 del donante IC4955 [MnmE D253A, Kan ^R]	este trabajo
IC5124	transductante Kan ^R Sal ⁻ Cm ^R de IC4126 del donante IC5110 [MnmE R256A, Kan ^R]	este trabajo
IC4764	transductante Kan ^R Sal ⁻ Cm ^R de IC4126 del donante IC4758 [MnmE D270A, Kan ^R]	Yim <i>et al.</i> (2003)
IC4860	transductante Kan ^R Sal ⁻ Cm ^R de IC4126 del donante IC4837 [MnmE R75A, Kan ^R]	este trabajo
IC5016	transductante Kan ^R Sal ⁻ Cm ^R de IC4126 del donante IC5083 [MnmE R288A, Kan ^R]	este trabajo
IC4765	transductante Kan ^R Sal ⁻ Cm ^R de IC4126 del donante IC4759 [MnmE D338N, Kan ^R]	Yim <i>et al.</i> (2003)
IC5072	transductante Kan ^R Sal ⁻ Cm ^R de IC4126 del donante IC5084 [MnmE S358A, Kan ^R]	este trabajo
IC4976	transductante Kan ^R Sal ⁻ Cm ^R de IC4126 del donante IC4605 [MnmE C451S, Kan ^R]	Yim <i>et al.</i> (2003)
IC4766	transductante Kan ^R Sal ⁻ Cm ^R de IC4126 del donante IC4760 [MnmE ⁺ , Kan ^R]	Yim <i>et al.</i> (2003)
IC5074	transductante Kan ^R Sal ⁻ de V5701 del donante IC5057 [MnmE T250S, Kan ^R]	este trabajo
IC4862	transductante Kan ^R Sal ⁻ de V5701 del donante IC4837 [MnmE R75A, Kan ^R]	este trabajo
IC5170	transductante Kan ^R Sal ⁻ de V5701 del donante IC5168 [MnmE R252K, Kan ^R]	este trabajo
IC5015	transductante Kan ^R Sal ⁻ de V5701 del donante IC5083 [MnmE R288A, Kan ^R]	este trabajo
IC4761	transductante Kan ^R Sal ⁻ de V5701 del donante IC4759 [MnmE D338N, Kan ^R]	Yim <i>et al.</i> (2003)
IC5017	transductante Kan ^R Sal ⁻ de V5701 del donante IC5084 [MnmE S358A, Kan ^R]	este trabajo
IC4762	transductante Kan ^R Sal ⁻ de V5701 del donante IC4760 [MnmE ⁺ , Kan ^R]	Yim <i>et al.</i> (2003)
IC5111	transductante Kan ^R de DEV16 del donante IC5118 [MnmE R224A, Kan ^R]	este trabajo
IC4767	transductante Kan ^R de DEV16 del donante IC4757 [MnmE G228A, Kan ^R]	Yim <i>et al.</i> (2003)
IC4906	transductante Kan ^R de DEV16 del donante IC4903 [MnmE T250A, Kan ^R]	este trabajo
IC5058	transductante Kan ^R de DEV16 del donante IC5057 [MnmE T250S, Kan ^R]	este trabajo
IC4907	transductante Kan ^R de DEV16 del donante IC4904 [MnmE T251A, Kan ^R]	este trabajo
IC5018	transductante Kan ^R de DEV16 del donante IC5082 [MnmE T251S, Kan ^R]	este trabajo
IC4864	transductante Kan ^R de DEV16 del donante IC4836 [MnmE R252A, Kan ^R]	este trabajo
IC5169	transductante Kan ^R de DEV16 del donante IC5168 [MnmE R252K, Kan ^R]	este trabajo
IC4956	transductante Kan ^R de DEV16 del donante IC4955 [MnmE D253A, Kan ^R]	este trabajo
IC5113	transductante Kan ^R de DEV16 del donante IC5110 [MnmE R256A, Kan ^R]	este trabajo
IC4865	transductante Kan ^R de DEV16 del donante IC4837 [MnmE R275A, Kan ^R]	este trabajo
IC5019	transductante Kan ^R de DEV16 del donante IC5083	este trabajo

	[MnmE R288A, Kan ^R]	
IC4769	transductante Kan ^R de DEV16 del donante IC4759 [MnmE D338N, Kan ^R]	Yim <i>et al.</i> (2003)
IC5020	transductante Kan ^R de DEV16 del donante IC5084 [MnmE S358A, Kan ^R]	este trabajo
IC4640	transductante Kan ^R de DEV16 del donante IC4605 [MnmE C451S, Kan ^R]	Yim <i>et al.</i> (2003)
IC4770	transductante Kan ^R de DEV16 del donante IC4760 [MnmE+ Kan ^R]	Yim <i>et al.</i> (2003)

1.2. Plásmidos:

Plásmido	CONSTRUCCIÓN	REFERENCIA
pFM1	Fragmento cromosomal 980-9847 (conteniendo <i>MnmE</i> y <i>tnaA</i>) insertado entre los sitios <i>HindIII</i> y <i>EcoRI</i> del pT7-12 [MnmE ⁺]	Cabedo <i>et al.</i> (1999)
pIC684	Fusión a GST del fragmento de DNA desde 3033 a 5652 [GST-MnmE ⁺]	Cabedo <i>et al.</i> (1999)
pIC914	Fragmento de 1.3 kb conteniendo el cassette de Kanamicina extraído por los sitios <i>Sall</i> del pUC4K e insertado en el gen <i>tnaA</i> en el sitio <i>NruI</i> (5652) del plásmido pFM1.	Yim <i>et al.</i> (2003)
pIC755	Fragmento <i>HindIII</i> 980-7374 insertado en el sitio <i>HindIII</i> del plásmido pMAK700 (Cm ^R , replicón termosensible)	Cabedo <i>et al.</i> (1999)
pGEX-2T	Amersham Biosciences	
pGEX-4T	Amersham Biosciences	
pET-15b	Novagene	
pIC1068	Derivado del pIC684 con la mutación R224A [GST-MnmE R224A]	este trabajo
pIC935	Derivado del pIC684 con la mutación G228A [GST-MnmE G228A]	Yim <i>et al.</i> (2003)
pIC1011	Derivado del pIC684 con la mutación G249A [GST-MnmE G249A]	este trabajo
pIC1002	Derivado del pIC684 con la mutación T250A [GST-MnmE T250A]	este trabajo
pIC1059	Derivado del pIC684 con la mutación T250S [GST-MnmE T250S]	este trabajo
pIC1003	Derivado del pIC684 con la mutación T251A [GST-MnmE T251A]	este trabajo
pIC1048	Derivado del pIC684 con la mutación T251S [GST-MnmE T251S]	este trabajo
pIC939	Derivado del pIC684 con la mutación R252A [GST-MnmE R252A]	este trabajo
pIC1081	Derivado del pIC684 con la mutación R252K [GST-MnmE R252K]	este trabajo
pIC1013	Derivado del pIC684 con la mutación D253A [GST-MnmE D253A]	este trabajo
pIC1072	Derivado del pIC684 con la mutación R256A [GST-MnmE R256A]	este trabajo
pIC936	Derivado del pIC684 con la mutación D270A [GST-MnmE D270A]	Yim <i>et al.</i> (2003)
pIC938	Derivado del pIC684 con la mutación R275A [GST-MnmE R275A]	este trabajo
pIC1050	Derivado del pIC684 con la mutación R288A [GST-MnmE R288A]	este trabajo
pIC937	Derivado del pIC684 con la mutación D338N [GST-MnmE D338N]	Yim <i>et al.</i> (2003)
pIC1052	Derivado del pIC684 con la mutación S358A [GST-MnmE S358A]	este trabajo
pIC805	Derivado del pIC684 con la mutación C451S [GST-MnmE C451S]	Yim <i>et al.</i> (2003)
pIC974	Derivado del pIC684 con la mutación R252A/R275A [GST-MnmE R252A/R275A]	este trabajo
pIC1004	Derivado del pIC684 con la mutación T250A/T251A [GST-MnmE T250A/T251A]	este trabajo
pIC1070	Derivado del pIC684 con la mutación T250S/T251S [GST-MnmE T250S/T251S]	este trabajo
pIC1069	Derivado del pIC914 con la mutación R224A [MnmE R224A]	este trabajo
pIC960	Derivado del pIC914 con la mutación G228A [MnmE G228A]	Yim <i>et al.</i> (2003)
pIC1012	Derivado del pIC914 con la mutación G249A [MnmE G249A]	este trabajo
pIC1015	Derivado del pIC914 con la mutación T250A [MnmE T250A]	este trabajo
pIC1060	Derivado del pIC914 con la mutación T250S [MnmE T250S]	este trabajo
pIC1016	Derivado del pIC914 con la mutación T251A [MnmE T251A]	este trabajo
pIC1049	Derivado del pIC914 con la mutación T251S [MnmE T251S]	este trabajo

pIC979	Derivado del pIC914 con la mutación R252A [MnmE R252A]	este trabajo
pIC1082	Derivado del pIC914 con la mutación R252K [MnmE R252K]	este trabajo
pIC1014	Derivado del pIC914 con la mutación D253A [MnmE D253A]	este trabajo
pIC1073	Derivado del pIC914 con la mutación R256A [MnmE R256A]	este trabajo
pIC961	Derivado del pIC914 con la mutación D270A [MnmE D270A]	Yim <i>et al.</i> (2003)
pIC980	Derivado del pIC914 con la mutación R275A [MnmE R275A]	este trabajo
pIC1051	Derivado del pIC914 con la mutación R288A [MnmE R288A]	este trabajo
pIC962	Derivado del pIC914 con la mutación D338N [MnmE D338N]	Yim <i>et al.</i> (2003)
pIC1053	Derivado del pIC914 con la mutación S358A [MnmE S358A]	este trabajo
pIC925	Derivado del pIC914 con la mutación C451S [MnmE C451S]	Yim <i>et al.</i> (2003)
pIC974	Derivado del pIC914 con la mutación R252A/R275A [MnmE R252A/R275A]	este trabajo
pIC1071	Derivado del pIC914 con la mutación T250S/T251S [MnmE T250S/T251S]	este trabajo
pIC975	Fragmento de DNA desde el codón de inicio al de stop clonado en el pGEX-4T-1 abierto en <i>EcoRI</i> y <i>XhoI</i> [GST-MnmE ⁺]	Yim <i>et al.</i> (2003)
pIC758	Dominio G de <i>mnmE</i> desde la base 629 a 1135 del pGEX-2T clonado en los sitios <i>BamHI</i> y <i>EcoRI</i> . [GST- Dominio G]	Cabedo <i>et al.</i> (1999)
pIC770	Dominio amino-terminal de <i>mnmE</i> desde el codón de inicio a la posición 675 del pGEX-2T. [GST- Dominio amino]	Cabedo <i>et al.</i> (1999)
pIC929	Fragmento de DNA desde el codón de inicio al de stop clonado en el pET15b abierto en <i>NcoI</i> y <i>XhoI</i> [MnmE-S2G]	este trabajo
pIC933	Derivada pIC929 con G2S [MnmE ⁺]	este trabajo
pIC1079	Proteína GidA de <i>E. coli</i> clonada en el plásmido pGEX-2T [GST-GidA]	L. Yim
pIC1080	Dominio G y extremo carboxiterminal de MnmE clonado en el plásmido pGEX-4T-1 [GST-dominio G y extremo carboxiterminal]	L. Yim

2. Material químico y bioquímico:

2.1. Material para electroforesis:

Las agarosas empleadas en la preparación de geles para electroforesis de DNA son de Pronadisa.

Los geles de poli(acrilamida) para SDS-PAGE se prepararon mezclando en una proporción 29:1 acrilamida y N',N' metileno-bis-acrilamida ambas de Sigma.

Los geles de poli(acrilamida) para los Northern y los geles de SSCPs se prepararon con acrilamidas previamente mezcladas (29:1) ultrapuras de Amresco.

Los marcadores de masa molecular de DNA son de Roche y MBI Fermentas. Los marcadores de masa molecular de proteínas son de Calbiochem y Ecogen.

2.2. Kits comerciales para la extracción y purificación de DNA:

Para la extracción de DNA genómico bacteriano se empleó el kit High Pure PCR Template Preparation Kit de Roche.

Para la purificación de plásmidos a pequeña y mediana escala se emplearon los kits Qiagen Plasmid Midi y Qiaquick Spin ambos de Qiagen y los kits Concert Plasmid Purification Midiprep System y Concert Rapid Plasmid Purification Miniprep System ambos de Gibco BRL.

Para la extracción de fragmentos de DNA de geles de agarosa se empleó el kit QIAEX Gel Extraction kit de Qiagen.

Para la purificación de fragmentos de PCR tras la reacción de amplificación se empleó el kit High Pure PCR Product Purification Kit de Roche.

2.3. Material para las reacciones de PCR:

-Los oligonucleótidos para amplificar fragmentos de DNA mediante PCR son de Gibco BRL y de Sigma.

-Los desoxinucleótidos (dNTPs) para las reacciones de PCR son de Invitrogen.

-Las DNA polimerasas usadas son de diferentes casas comerciales y con distintas propiedades según el tamaño del fragmento a amplificar y su posterior uso (clonación, secuenciación, mutagénesis dirigida, etc...). Para las amplificaciones convencionales de fragmentos pequeños de DNA se empleó la DNA polimerasa Netzyme de Need. Cuando se requirió una alta fidelidad en la amplificación se utilizó la *Taq* Expand High Fidelity de Roche y para la mutagénesis dirigida se empleó la Herculasa y la *Pfu Turbo* ambas de Stratagene.

2.4. Enzimas de restricción y modificadoras:

-Las enzimas de restricción se obtienen de MBI Fermentas, Amersham Biosciences, Roche, New England Biolabs y Promega.

-Fosfatasa alcalina: Promega.

-T4 DNA ligasa y fragmento Klenow de la DNA polimerasa: Amersham Biosciences.

-Proteasas: la enzima trombina (para el corte entre la GST y la proteína de interés) y la quimiotripsina (chymiotripsin tipo VII TCLK, para la proteólisis limitada) son ambas de Sigma.

2.5. Material para transferencia e inmunodetección:

-Anticuerpos e inmunodetección: los anticuerpos policlonales primarios (anti-MnmE, anti-GidA y anti-CyoA) han sido obtenidos en nuestro laboratorio mediante inoculación de la proteína purificada a conejos neocelandeses blancos. El suero obtenido es inmunopurificado previamente a su uso con la proteína MnmE purificada y fijada sobre una membrana de nitrocelulosa.

-El anticuerpo policlonal secundario antirabbit IgG conjugado a peroxidasa es de Sigma. Para el Northern con las sondas anti-tRNAs, el anticuerpo anti-digoxigenina conjugado a fosfatasa alcalina y los reactivos empleados durante todo el proceso de hibridación y detección (Blocking Reagent, DIG Easy Hyb y CDP Star) son todos de Roche.

-Oligonucleótidos conjugados a digoxigenina: la sonda de DNA anti-tRNA^{Glu} y anti-tRNA^{Lys} son de Roche.

-Transferencia: para los westerns se emplearon membranas de nitrocelulosa Hybond de Amersham Biosciences y para los Northern membranas de nylon de Roche.

2.6. Material para purificación de proteínas y cromatografía :

-IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside) empleado para la inducción de los plásmidos del sistema pGEX y pET es de Apollo Scientific LTD.

-Cromatografía de afinidad: para la purificación de proteínas recombinante fusionadas a GST (sistema pGEX) se empleó glutation-agarosa de Sigma.

-Cromatografía de intercambio iónico: para la purificación de la proteína MnmE (sistema pET) mediante cromatografía de intercambio iónico se empleó Q-Agarosa Fast Flow de Amersham Biosciences.

-PD-10: las columnas para desalar proteínas son PD-10 Desalting Column de Amersham Biosciences.

Los centricones empleados para concentrar proteína (10K y 50K), volumen de 500 μl y 3.5 ml de las casa comerciales Millipore y Pall.

2.7. Material para la caracterización de la actividad GTPasa y afinidad por nucleótido:

-Actividad GTPasa: los reactivos para la preparación del reactivo para el ensayo colorimétrico de la liberación de P_i son todos de Sigma: verde malachita, polivinilalcohol y molibdato amónico

-Nucleótidos y análogos: los nucleótidos empleados (GTP, GDP, ATP y XTP) son de Sigma, los análogos radioactivos (GTP-γ-³⁵S) de Amersham Biosciences y los análogos fluorescentes (mantGTPγS y mantGDP) de Jena Bioscience.

2.8. Reactivos para la determinación de la actividad β-galactosidasa:

El sustrado empleado en los ensayos para determinar la actividad β-galactosidasa es ONPG (2-Nitrofenil-β-D-Galactopiranosido) de Apollo.

2.9. Material para medios de cultivo:

Los productos específicos empleados para la elaboración de medios de cultivo son de Difco y Pronadisa. Los antibióticos se obtienen de Roche, Sigma y Cepa.

3. Aparatos:

Centrífugas: Sorvall RC-58 con rotores GSA, Hereaus Biofuge 22R.

PCRs: termocicladores PTC-100 y PTC-150 de MJ Research.

Espectrofotómetros: Ultrospec III de LKB-Pharmacia, Unicam UV-Visible (Hellios- λ),

Nanodrop ND-1000 y lector placas Labsystems Multiskan Plus.

Espectrofluorímetros: Perkin Elmer LS 50B y JASCO STR-313.

Stratalinker: UV Stratalinker 1800 de Stratagene.

Sonicador: Labsonic de Braun

Contados de centelleo: 1211 Rackbete de LKB Wallac.

Otros aparatos como cubetas y fuentes de electroforesis, balanzas, centrífugas de mesa, incubadores, pHmetro, etc son los habituales en un laboratorio de biología molecular.

Software informático: programa Chromas para visualización de secuencias de DNA, GraphPad Prism para el análisis de gráficas y ajuste de valores, PC-Gene para el análisis y manipulación de secuencias de ácidos nucleicos y proteínas, Clustal X para el alineamiento de secuencias proteicas y Fujifilm Image Gauge para la visualización de imágenes y cuantificación de bandas.

Métodos:

1. Cultivos bacterianos:

1.1 . Crecimiento de cepas bacterianas:

Las cepas de *Escherichia coli* se crecieron siguiendo las técnicas microbiológicas descritas por Miller *et al.* (1992) (Miller, 1992). Excepto en los casos indicados, las bacterias se hicieron crecer en medio rico LBT (10 g/l NaCl, 10 g/l Bacto-Triptona, 5 g/l de extracto de levadura y 40 mg/ml de timina) a 37° C con agitación.

Los cultivos en placa se realizaron haciendo crecer a las bacterias en medio LAT (LBT más agar 20 g/l)

Mediante turbidometría se midió el crecimiento de los cultivos determinando la absorbancia a 600 nm en un espectrofotómetro.

En las ocasiones indicadas se añadieron antibióticos a los cultivos con el objetivo de seleccionar las bacterias con un plásmido o fago que confiere resistencia a los mismos.

1.2 . Mantenimiento de las cepas bacterianas:

La conservación a largo plazo de las cepas bacterianas se realizó mediante dos métodos, a temperatura ambiente se hizo crecer el cultivo sobre un medio sólido (medio Nutrient Broth, de Difco Laboratories) y a -80° C se almacenó el cultivo crecido en medio líquido y añadiendo glicerol al 20%.

1.3 . Preparación de las células competentes:

Las células son crecidas en medio rico y con agitación o aireación abundante hasta una DO_{600} aproximada de 0.6, entonces se enfrían rápidamente en hielo y se incuban al menos 15 minutos, posteriormente se centrifugan a baja velocidad y siempre a 4° C, se resuspenden en $CaCl_2$ 0.1 M previamente enfriado. El $CaCl_2$ favorece la adhesión de DNA exógeno en la superficie celular y a la vez produce alteraciones de la envuelta celular que permite la posterior entrada del DNA en el interior celular.

Las células se incuban 30 minutos en hielo y posteriormente se vuelven a centrifugar y resuspender en $CaCl_2$ 0.05 M, se añade glicerol al 20% y se almacenan a -80° C si no van a usarse inmediatamente.

1.4 . Transformación de una cepa bacteriana:

La transformación es un proceso mediante el cual el DNA de origen exógeno es introducido en una bacteria. Para ello se ponen en contacto aproximadamente 100 µl de células en estado competente y el DNA plasmídico (aproximadamente 0.1 µg) se incuban en hielo durante 15 minutos y a continuación se realiza un choque térmico a 42° C durante 3 minutos para favorecer la introducción del DNA exógeno. Posteriormente se añade medio enriquecido (LBT 2X) sin ningún tipo de selección y se incuban con agitación durante 90 minutos y finalmente se siembran en medio selectivo y se dejan 24 horas a 37° C.

En el caso de plásmidos termosensibles, el choque térmico se hace a 37° C durante 2 minutos y posteriormente se incuba siempre a 30° C.

1.5. Obtención de cepas con alelos mutantes de *mnmE* mediante el bacteriófago P1:

Con el fin de introducir la mutación deseada en el cromosoma de *E. coli* se hace uso de bacteriófagos que nos permiten, mediante recombinación homóloga, transferir un carácter genético deseado a una cepa bacteriana.

El proceso consta de tres partes:

- 1) Obtención de un plásmido portador de la mutación deseada mediante mutagénesis dirigida y transformación lineal del plásmido en la cepa IC3647.
- 2) Obtención del stock viral del fago P1 recombinado con la cepa portadora de la mutación.
- 3) Transfección del fago P1 y la cepa receptora, selección de transductantes portadores de la mutación por selección mediante algún gen marcador, en nuestro caso la resistencia kanamicina.

-Obtención cepa IC3647 con la mutación:

En primer lugar se obtiene mediante mutagénesis dirigida del plásmido pIC914, una construcción que lleva la mutación deseada en el gen *mnmE* junto a un cassette de kanamicina que sirve como marcador para la futura selección de colonias transductantes portadoras de la mutación. Este plásmido es introducido mediante transformación lineal en la cepa IC3647, la cual a su vez, lleva una copia salvaje de *mnmE* en un fago λRZ5 (λ718) insertado en el minuto 17 del cromosoma de *E. coli* y que le proporciona una proteína MnmE funcional para su supervivencia.

La recombinación homóloga entre el plásmido (con la copia mutante) y el cromosoma bacteriano (con la copia salvaje), da lugar mediante selección con kanamicina, a una

derivada de la cepa IC3647 con la mutación en el locus *mnmE* y el gen que confiere resistencia a la kanamicina. Esta cepa es verificada por secuenciación, amplificando selectivamente la copia del gen en el locus *mnmE* pero no la del fago λ 718.

-Obtención del stock viral de P1:

Posteriormente se usa esta cepa para la obtención lisados del bacteriófago P1, en los que existen cápsulas virales conteniendo regiones cromosómicas, algunas de las cuales serán portadoras de la mutación *mnmE* deseada junto al marcador de resistencia a kanamicina. Siguiendo el método descrito por Blanco *et al.* (1976) (Blanco, 1976), se crece la cepa derivada de la IC3647 hasta una DO_{600} aproximada de 0.4 y se añade $CaCl_2$ 5 mM dejándose 30 minutos a 37° C. De este cultivo se toman 0.25 ml y se ponen en contacto con 0.1 ml del virus P1 a una concentración de 10^8 fagos/ml. Se incuba durante 30 minutos a 37° C para favorecer la preadsorción del virus y se añaden 4 ml de agar líquido, se extiende en placas LA10 (1g de agar en 100 ml de LBT). Después de incubar a 37° C durante toda una noche se recoge el agar de la superficie de la placa, donde se encuentra el virus recombinante y mediante centrifugación a 10.000 g durante 30 minutos se recupera y filtra el virus P1.

-Transducción y obtención de cepas portadoras de la mutación deseada:

El stock del fago P1 que contiene cápsulas virales, alguna de las cuales lleva la copia mutante del alelo *mnmE* junto al cassette de kanamicina, es usado para la posterior infección de la cepa receptora a la que se quiere transferir la mutación siguiendo el método de Miller (Miller, 1992). Para ello, se parte de un cultivo fresco crecido hasta el inicio de la fase exponencial, se centrifugan 0.1 ml de células y se resuspenden en el mismo volumen de tampón $MgSO_4$ 0.1 M y $CaCl_2$ 5 mM, se toman 0.1 ml de células y se ponen en contacto con 0.1 ml del fago P1 (generalmente a una dilución 10^{-1} y 10^{-2} , diluido en LBT y $CaCl_2$ 5 mM), se incuba a 37° C o 30° C (dependiendo de la cepa) durante 20 minutos para permitir la adsorción del virus. Posteriormente se añade 1 ml de LBT con citrato sódico 10 mM (elimina los restos de virus) y se incuba durante una hora más para permitir la expresión de la resistencia al antibiótico que estamos seleccionando, se centrifugan las células y se resuspenden en un volumen menor que permita extender las células en una placa LAT con citrato sódico 10 mM y kanamicina (80 μ g/ml).

Las placas se dejan incubando toda la noche a la temperatura adecuada y al día siguiente las colonias de las cepas transducidas son seleccionadas y analizadas mediante el análisis de su DNA genómico, se realiza la amplificación del gen *mnmE* por PCR y se determina la presencia de mutación mediante enzimas de restricción o SSCPs y finalmente por secuenciación.

2. Técnicas de DNA:

2.1. Aislamiento y purificación de DNA:

2.1.1. DNA cromosomal bacteriano:

Se emplearon dos técnicas diferentes para la purificación de DNA genómico bacteriano, mediante el kit High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche) y en otras ocasiones, siguiendo una técnica tradicional. Para esta segunda técnica, se parte de 5 ml de cultivo fresco, las células se centrifugan y se resuspenden en TrisHCl pH8 50 mM, EDTA 50 mM y a continuación se lisan añadiendo 100 µl de lisozima (10 mg/ml) en TrisHCl pH8 250 mM y se deja actuar durante 45 minutos en hielo. Posteriormente se añaden 200 µl del tampón STEP (0.5% SDS, TrisHCl pH8 50 mM, EDTA 0.4 M y proteinasa K a 1 mg/ml, se mantiene durante al menos una hora a 50° C para producir la degradación de las proteínas. Se fenoliza la muestra añadiendo 1.2 ml de fenol, se agita vigorosamente con el vórtex y se centrifuga para separa las fases, después de la centrifugación se recupera la fase acuosa conteniendo que se pasa a un nuevo tubo y se precipitan los ácidos nucleicos añadiendo 0.12 ml de acetato sódico 3M y dos volúmenes de etanol, se invierte el tubo varias veces y se forma una madeja de DNA visible que se recupera fácilmente sacándola con una pipeta Pasteur. El DNA se pasa a un nuevo tubo con 1 ml de TrisHCl pH 7.5 10 mM y EDTA 1 mM y se resuspende con cuidado para no fragmentar el DNA. A continuación, se hace un tratamiento con RNasa para eliminar el RNA que ha sido purificado junto con el DNA cromosomal, para ello se añaden 200 µg/ml de RNasa y se incuba 30 minutos a 37° C, se lava el DNA añadiendo 1 ml de cloroformo, agitando y centrifugando suavemente, se recupera la fase acuosa y finalmente el DNA se vuelve a precipitar añadiendo 0.12 ml de acetato sódico 3 M y 2 volúmenes de etanol, se deja secar y se resuspende en 500 µl de tampón TE o H₂O.

El DNA purificado mediante estas técnicas es posteriormente analizado mediante PCR y secuenciación para la detección de mutaciones en el cromosoma.

2.1.2. DNA plasmídico:

El DNA plasmídico empleado en los experimentos se obtuvieron a partir de cultivos de *E. coli* mediante la utilización de las columnas Qiagen Plasmid Midi y Concert Rapid Plasmid Purification Midiprep System de Gibco.

Para la extracción y purificación a pequeña escala se usó el sistema Qiaquick Spin de Qiagen y Concert Rapid Plasmid Purification Miniprep System de Gibco BRL.

En ocasiones también se purificaron plásmidos mediante el método del polietilenglicol (PEG) (Mohler and Blau, 1997): se resuspende una pequeña cantidad de cultivo (procedente de placa o de medio líquido) en 200 μ l de tampón TrisHCl pH7.5 25 mM, EDTA 10 mM, glucosa 1% y RNasa 50 μ g/ml y se incuba 10 minutos a temperatura ambiente, a continuación se añade 300 μ l SDS 0.1% y NaOH 0.2 N y se incuba 10 minutos a temperatura ambiente, finalmente se añade 230 μ l acetato sódico 3M pH5.2 y se deja 15 minutos en hielo. Se centrifuga a máxima velocidad durante 10 minutos y el sobrenadante se pasa a un nuevo tubo con 200 μ l de PEG (polietilenglicol 8000) al 30%. Se incuba durante 30 minutos en hielo y se centrifuga de nuevo a máxima velocidad, el DNA plasmídico purificado se lava dos veces con etanol al 70% y al 95% y se resuspende en H₂O.

2.1.3. DNA producto de amplificación mediante PCR:

Los fragmentos de PCR fueron purificados mediante el sistema Concert Rapid PCR purification System de Gibco BRL.

Los fragmentos de DNA separados de geles de agarosa fueron purificados mediante el sistema QIAEX Gel Extraction kit de Qiagen y en ocasiones mediante electroelución en membranas de diálisis con buffer TEB 0.5X en el interior de la membrana y TEB 1X en la cubeta de electroforesis durante 1 hora a 100 v. Posteriormente el DNA debe ser fenolizado (fenol-cloroformo 1:1) y precipitado con etanol.

2.2. Electroforesis de DNA:

-Agarosa: en función del tamaño del fragmento a analizar la separación mediante electroforesis fue realizada en geles de agarosa cuyo porcentaje varió entre 0.8% y 2%. El tampón de electroforesis empleado fue TBE (89 mM Tris, 89 mM ácido bórico, 2 mM EDTA pH8)

- SSCP (Single Sequence Conformational Polimorfism): esta técnica permite la detección de variaciones en la secuencia de un fragmento de DNA mediante la comparación de los patrones de migración de un fragmento de DNA amplificado y sometido a desnaturalización seguida de enfriamiento rápido y electroforesis en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes, ya que el cambio en una única base de la secuencia, puede producir diferentes conformaciones estructurales que dan lugar a patrones de migración diferentes.

Esta técnica es útil para detectar mutaciones introducidas en el gen de *mnmE* mediante mutagénesis dirigida, tanto en el cromosoma o en un plásmido, especialmente cuando no es posible detectar la mutación mediante digestión con una enzima de restricción. Esta técnica no determina el tipo de mutación pero nos permite hacer un screening previo de los clones candidatos a llevar una mutación y posteriormente mediante secuenciación se confirma la presencia de la mutación.

Se realiza una electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% en geles de 0.5 mm de grosor en tampón TEB. Mediante PCR amplificamos la zona del gen donde se encuentra la mutación que queremos estudiar, los fragmentos de PCR deben tener un tamaño entre 100 y 400 pares de bases aproximadamente y como molde se usa tanto plásmidos (para detectar la presencia de la mutación en el plásmido pIC684 o pIC914) como DNA genómico (para detectar la introducción de la mutación a nivel cromosomal en una cepa). Tomamos 1 μ l del fragmento de DNA y añadimos 9 μ l del tampón de carga (95% formamida desnaturalizada, 10 mM EDTA, 0.05% de xilencianol y de azul de bromofenol), las muestras se desnaturalizan a 94° C durante 3 minutos y a continuación se pasan rápidamente a hielo para que cada una de las hebras hibride con ella misma (en lugar de con la hebra complementaria) adoptando una estructura tridimensional característica y dependiente únicamente de su secuencia, el cambio en una única base del DNA puede producir la aparición o desaparición de una conformación. Cada una de las conformaciones estructurales obtenidas migran de forma distinta en el gel de poliacrilamida, la presencia de un patrón de migración diferente nos indica la existencia de un cambio en la secuencia del DNA.

Las muestras se someten a una electroforesis a 450 v durante 2 horas y 30 minutos y en una gradiente de temperatura que varía desde 2° C hasta 25° C. Una vez terminada la electroforesis, el gel se tiñe con plata y se observan los patrones obtenidos buscando aquellas muestras que presenten alguna diferencia respecto al control salvaje. Las muestras seleccionadas son secuenciadas para confirmar la presencia de la mutación.

2.3 PCR:

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

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

Las condiciones de la reacción del PCR variaron dependiendo del tamaño del fragmento y de la T_m de los oligos pero en general se siguió el esquema siguiente:

Condiciones	Ciclos	Reactivos (para 50 μ l)
92° C 4 min	X 1	2 μ l dNTPs (2.5 mM) 3 μ l MgCl ₂ (50 mM) 6 μ l cada oligo (10 μ M) 5-10 ng molde 1 unidades Taq polimerasa
92° C 30 seg	X 35-40	
63° C* 30 seg		
72° C variable*		
72° C 10'	X1	

Tabla 25: Esquema del programa de PCR empleado para la amplificación de fragmentos de DNA. (*) = la temperatura de hibridación varía dependiendo de la T_m del oligo entre 45° C y 65° C y el tiempo de extensión varía dependiendo del tamaño del fragmento amplificado entre 50 segundos (para fragmentos de 100-150 pb) y 10 minutos (para fragmentos de 7 kb).

-Mutagénesis dirigida:

La mutagénesis dirigida se realizó siguiendo las indicaciones de Stratagene para la mutagénesis dirigida con la enzima HerculaseTM Enhanced DNA Polymerase. La mutagénesis requiere un paso previo de clonaje, que permite tener la secuencia que se desea mutagenizar clonada en un plásmido, el cual a su vez, debe haber sido purificado de una cepa de *Escherichia coli* con actividad metilasa⁺ ya que sus adeninas deben encontrarse metiladas para el posterior reconocimiento por el sistema de modificación/restricción de la bacteria.

En nuestro caso las mutagénesis se realizaron principalmente sobre dos construcciones: el plásmido pIC684 (pGEX2T-MnmE) para la purificación de las proteínas mutantes y su posterior análisis bioquímico y funcional y sobre el plásmido pIC914, plásmido usado para la introducción de las mutaciones en el cromosoma de la bacteria mediante el uso del bacteriófago P1.

En este sistema se diseñan parejas de oligos complementarios que hibridan con la zona donde se encuentra la/s base/s que se desean mutagenizar y con la secuencia de la mutación deseada situada en el centro de los oligos.

Tabla de los oligos empleados en la mutagénesis dirigida:

Mutación	Nombre oligo	Cambio	Secuencia (5'-3')
G288A	LY1/LY2	GGT → GCT	5'-CGTCCTAACGCC GCT AAAATCGAGCCTGTT-3'
G249A	P50KG249A1/2	GGA → GCA	5'-ACCGATATCGCC GCA ACTACGCGTGAC-3'
T250A	P50KT250A1/2	ACT → GCT	5'-ATATCGCCG GAGCT ACGCGTGACGTGC-3'
T250S	P50KT250S1/2	ACT → AGT	5'-GATATCGCCG GAAGT ACGCGTGACGTGC-3'
T251A	P50KT251A1/2	ACG → GCG	5'-ATATCGCCG GAAGCT CGCGTGACGTGC-3'
T251S	P50KT251S1/2	ACG → TCG	5'-TGCGCCG GAAGCT CGCGTGACGTGCTG-3'
R252A	P50KR252A1/2	CGT → GCT	5'-CCGGA ACTACG GCTGACGTGCTGCG-3'
R252K	P50KR252K1/2	CGT → AAA	5'- CCGGA ACTACG AAAGACGTGCTGCG-3'
D253A	P50KD253A1/2	GAC → GCA	5'-GGA ACTACG CGT GCAGT GCTGCGTGAG-3'
R256A	P50KR256A1/2	CGT → GCT	5'- CGT GACGTGCT G GCT GAAAGCATATCCAC-3'
R288A	P50KR288A1/2	CGC → GCC	5'-ATTGGTATCGAG GCC GCGTGGCAGGA-3'
R275A	P50KR288A1/2	CGT → GCT	5'-CCGCCGGGCTAG GCT GAAAGCCAGTAC-3'
R224A	P50KR224A1/2	CGT → GCT	5'-GGTGATTGCCG GAGCT CCTAACGCCGGTA-3'
S358A	P50KS358A1/2	TCG → GCG	5'-CGTTAATTCGT CTCG CGGCAAGGACTG-3'
C451S	P13/P14	TGT → AGT	5'-GGATTTTCTCCAGCTT CAGT ATTGGTAAGTAACC-3'
D270A	LY3/LY4	GAT → GCG	5'-GCTGCATTCAT CGC GACCGCCGGGGCTA-3'
D338N	LY5/ LY6	GAT → AAT	5'-TGC GCAATAA AGCC AAT ATCACCGCGGAAA-3'
T250A/ T251A	P50K2TS1/2	ACTACG → GCTGCG	5'-ATATCGCCG GAGCTGCG CGTGACGTGC-3'
T250S/ T251S	P50K2TS1/2	ACTACG → AGTAGC	5'-GATATCGCCG GAAGTAGC CGTGACGTGC-3'

Tabla 26: Tabla de los oligos empleados en la mutagénesis dirigida para la introducción de mutaciones en *mnmE*. La secuencia indicada en la tabla corresponde únicamente al del oligo 5'→3', el otro oligo consiste en la secuencia inversa y complementaria. En negrita se indica el aminoácido a mutagenizar.

A continuación, se realiza una reacción de PCR largo usando los oligos complementarios y el plásmido como molde, debido al gran tamaño del molde a amplificar se requiere el uso de *T_{aq}* polimerasas especiales con prueba de lectura y alta procesividad. Para la mutagénesis dirigida de las mutaciones en *mnmE* se usaron la DNA polimerasa Herculasa (Stratagene) y la DNA polimerasa *Pfu Turbo* (Stratagene).

Las condiciones de la reacción de PCR empleadas dependen del tamaño del plásmido molde:

plásmido molde <10 kb (pIC684)			plásmido molde >10 kb (pIC914)		
condiciones	ciclos	Reactivos (50 µl)	condiciones	ciclos	Reactivos (50 µl)
92° C 2'	X 1	5 µl tampón reacción 10X 4 µl dNTPs (2.5 mM) 1.75 µl cada oligo (10 µM) 15 ng plásmido molde 2.5 unidades Herculasa	92° C 2'	X 1	5 µl tampón reacción 10X 10 µl dNTPs (2.5 mM) 2.5 µl cada oligo (10 µM) 15-60 ng plásmido molde 5 unidades Herculasa
92° C 30"	X 30		92° C 30"	X 30	
63° C 30"			63° C 30"		
72° C 10'			68° C 16'		
72° C 10'	X1		68° C 10'	X1	

Tabla 27: Condiciones del PCR para la mutagenesis dirigida sobre los plásmidos pIC684 y pIC914.

El resultado de la reacción de PCR es la amplificación lineal de las dos cadenas del plásmido y con la mutación deseada introducida. Estos fragmentos amplificados son complementarios por lo que pueden hibridar entre sí aunque sus extremos 5' y 3' no están ligados y por tanto es un "plásmido artificial" que se encuentra relajado.

La diferencia entre el plásmido original y el sintetizado mediante PCR es que el original, al provenir de una cepa con actividad modificadora *dam*⁺ (añade grupos metilo en las adeninas), se encuentre metilado, mientras que el producto de PCR al ser un "plásmido artificial" no está metilado.

El siguiente paso consiste en una reacción de digestión mediante la enzima de restricción *DpnI* (NewEngland Biolabs) la cual reconoce y corta una secuencia altamente abundante en todos los DNAs (GA^mTC) pero que posee actividad metilasa⁺, por tanto, sólo reconoce y corta el plásmido original (sin la mutación) pero no el amplificado (con la mutación) permitiendo así la eliminación de las copias del plásmido no mutadas.

A continuación, se introduce mediante transformación el plásmido en una cepa bacteriana (con actividad restricción⁻, para que no reconozca el nuevo plásmido no metilado como exógeno y lo elimine). En nuestro caso usamos la cepa de *Escherichia coli* DH5α. Una vez introducido en la célula, el sistema de reparación del DNA propio de la célula liga los extremos 5' y 3' del plásmido obteniéndose un plásmido con la mutación presente.

El análisis de la presencia de las mutaciones se realizó de forma distinta dependiendo de la mutación introducida. En algunos caso fue posible la identificación de la mutación porque el cambio producido en la secuencia introduce o elimina un sitio de restricción conocido, así mediante amplificación por PCR de la zona estudiada seguido de restricción del fragmento es posible identificar los clones con la mutación deseada.

En otros casos, la mutación introducida no produce la aparición o desaparición de un sitio de restricción y por tanto, para facilitar el screening de las colonias, se realizó un análisis mediante SSCPs de pequeños fragmentos de DNA amplificados que contienen la zona a estudiar, los resultados nos permiten seleccionar clones candidatos a contener la mutación y posteriormente son analizados por secuenciación. En la tabla se indica la estrategia que se empleó en cada una de las mutaciones para detectar la presencia de ésta.

Mutación:	Enzima de restricción	Corte:
G288A	SSCP	
G249A	HpaII	-
T250A	AluI	+
T250S	RsaI	+
T251A	MluI	-
T251S	MluI	-
R252A	MluI	-
R252K	MluI	-
D253A	SSCP	
R256A	DdeI	+
R288A	RsaI	+
R275A	NheI	+
R224A	AluI	+
S358A	SSCP	
C451S	AlwNI	-
D270A	ClaI	-
D338N	EcoRV	-
T250A/T251A	MluI	-
T250S/T251S	MluI	-

Tabla 28: Detección de las mutaciones introducidas mediante mutagénesis dirigida por digestión con enzimas de restricción. Aquellas mutaciones que no introducen o eliminan un sitio de restricción susceptible de ser detectado, son analizadas por SSCPs.

3. Técnicas de RNA:

3.1. Purificación de tRNA total:

El tRNA total de las cepas de *E. coli* fue purificado siguiendo el protocolo descrito por Krüger (Kruger and Sorensen, 1998).

Las cepas utilizadas fueron las derivadas de la DEV16 con las mutaciones introducidas en el alelo *mnmE* y como controles la propia cepa DEV16 y la DEV16-WT.

Todo el material y reactivos usados durante la purificación del tRNA se encuentra libre de RNAsas mediante tratamiento previo con DEPC (dietil pirocarbonato).

Se toman 15 ml de cultivo fresco ($DO_{600} = 0.7-0.9$) y se añade 15 ml de TCA 10%, se pasa a hielo y a continuación se centrifuga durante media hora a 4° C.

El centrifugado obtenido se resuspende en 1.2 ml de acetato sódico 0.3M pH 4.5 y EDTA 10 mM. A la muestra se le añade el mismo volumen de fenol (saturado con el mismo tampón acetato sódico 0.3M pH 4.5 y EDTA 10 mM) y se mezcla vigorosamente con el vórtex en ciclos de 15 segundos de agitación y 1 minuto de reposo, durante 10 ciclos. Se centrifugan las muestras 15 minutos a 4° C y la fase acuosa se vuelve fenolizar, agitando con el vórtex, esta vez durante 4 ciclos. Se centrifuga de nuevo y la fase acuosa se precipita con etanol 100%.

El precipitado obtenido se resuspende en 120 μ l del tampón acetato sódico 0.3 M pH 4.5 y EDTA 10 mM y se repite la precipitación con etanol por segunda vez.

Finalmente el tRNA obtenido se resuspende en 25 μ l de acetato sódico 10 mM (pH4.5) y EDTA 1 mM.

Inmediatamente se cuantifica y se alicuota a -80° C hasta su posterior uso.

3.2. Cuantificación y verificación de RNA:

El RNA se cuantificó midiendo la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro Unicam UV-visible (Helios- λ) y NanoDrop ND-1000. La verificación se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.

3.3. Análisis de la modificación de los tRNAs de glutámico mediante Northern blot:

El protocolo seguido para analizar la modificación de los tRNAs está basado en el método descrito por Krüger *et al.* (1998), pero con algunas modificaciones.

La técnica está basada en la electroforesis en condiciones ácidas de los tRNAs; la modificación mnm^5U_{34} supuestamente introducida por MnmE, en condiciones ácidas (pH5), se encuentra cargada positivamente, lo cual produce un pequeño retraso en la migración respecto al tRNA no modificado (como la cepa DEV16).

Este ligero retraso en la migración puede ser detectado mediante Northern blot usando una sonda que reconoce específicamente el tRNA de glutámico, uno de los tRNAs que presenta la modificación mnm^5 introducida por MnmE.

-Desacetilación del tRNA: los tRNAs aislados mediante esta técnica se encuentran unidos a su correspondiente aminoácido, para realizar la detección de la modificación es conveniente eliminar el aminoácido para facilitar las variaciones durante la migración, para ello, se realiza una reacción de desacetilación en condiciones básicas donde añadimos a 10 μ g del tRNA total TrisHCl pH9.5 100 mM hasta un volumen de 50 μ l y

incubamos a 37° C durante una hora. Posteriormente se neutraliza con acetato sódico pH5 100 mM EDTA 1 mM y se precipita con etanol. Las muestras son resuspendidas en 3 µl del tampón ácido usado para neutralizar y se añaden 6 µl de tampón de carga para electroforesis.

-Electroforesis y transferencia: la electroforesis se lleva a cabo en geles de poliacrilamida del 8% (acrilamida 29:1, RNase free), acetato sódico pH5 100 mM y 8M de urea durante una hora y media a 40° C y 100v.

Tras la electroforesis se recorta la parte inferior del gel entre los dos colorantes y se transfiere a una membrana de nylon cargada positivamente (Roche) mediante un sistema de transferencia semiseco (Owl) durante 90 minutos a 3 mA/cm² en tampón de transferencia 40mM TrisOAc pH8 y EDTA 1 mM. Una vez terminada la transferencia, la membrana se irradia 3 minutos por cada cara con luz UV en un stratalinker (UV Stratalinker 1800 de Stratagene) para fijar los ácidos nucleicos a la membrana.

-Hibridación: la membrana se incuba durante 1 hora a 50° C con el tampón de pre-hibridación DIG Easy Hyb de Roche, a continuación se incuba con la sonda anti-tRNA de glutámico marcada con digoxigenina en su extremo 5' durante toda la noche a 50° C y a una concentración 3.3 µM en el mismo tampón.

La sonda de anti-tRNA^{Glu}-DIG es un fragmento de 30 bases de DNA complementario al tRNA de glutámico de *Escherichia coli* desde la base 24 a la 53 y cuya secuencia es 5'-DIG-CCCCTGTTACCGCCGT**GAA**AGGGCGGTGTC-3' (en negrita se señala el anticodón). Tras la hibridación se realizan los lavados post-hibridación: 2X15 minutos con tampón 2X SSC SDS 0.1% y 2X 15 minutos con 0.5X SSC, SDS 0.1%

-Detección: la detección de la sonda marcada se realiza con un anticuerpo anti-digoxigenina y mediante quimioluminiscencia con CDP-star (Roche). Se equilibra la membrana durante 1 minuto con tampón maleico: 150 mM de NaCl, ácido maleico (cis-butenedioic acid) 100 mM pH7.5 y tween 0.3%. Se añade el tampón de bloqueo: 1% de "blocking reagent for nucleic acid hybridization and detection" de Roche en tampón maleico y se incuba la membrana a temperatura ambiente durante una hora. A continuación, se añade al anticuerpo anti-digoxigenina conjugado a fosfatasa alcalina (Roche) en una dilución 1:10.000 y se deja agitando durante 30 minutos.

Se realizan dos lavados de 15 minutos con 150 mM de NaCl, ácido maleico 100 mM pH7.5 y tween 0.3% y se equilibra en el tampón alcalino para la detección con el sistema CDP-Star, durante dos minutos se pone en contacto la membrana con TrisHCl pH9.5 100 mM y NaCl 100 mM y a continuación se añade el sustrato de la fosfatasa alcalina CDP-star en una dilución 1:500 en este mismo tampón y se deja actuar durante 5 minutos a partir de los cuales se puede detectar mediante quimioluminiscencia exponiendo la

membrana sobre una película para autoradiografía y se revela por procedimientos estándar.

4. Técnicas de proteínas:

4.1. Clonación y sobreexpresión de proteínas:

La sobreexpresión de proteínas se realizó mediante el uso de varios vectores de expresión en *Escherichia coli*, para ello se inserto el gen o fragmento de gen que se desea en los siguientes sistemas:

4.1.1. Sistema pGEX: (Amersham Pharmacia Biotech):

El sistema de plásmidos pGEX (Amersham Biosciences) permite la superproducción de proteínas mediante la introducción de la secuencia que se desea expresar clonada en pauta con la secuencia de la proteína GST (enzima glutation-S-transferasa de *Schistosoma japonicum*) presente en el vector de forma que se expresa una proteína de fusión entre la GST y la proteína de interés.

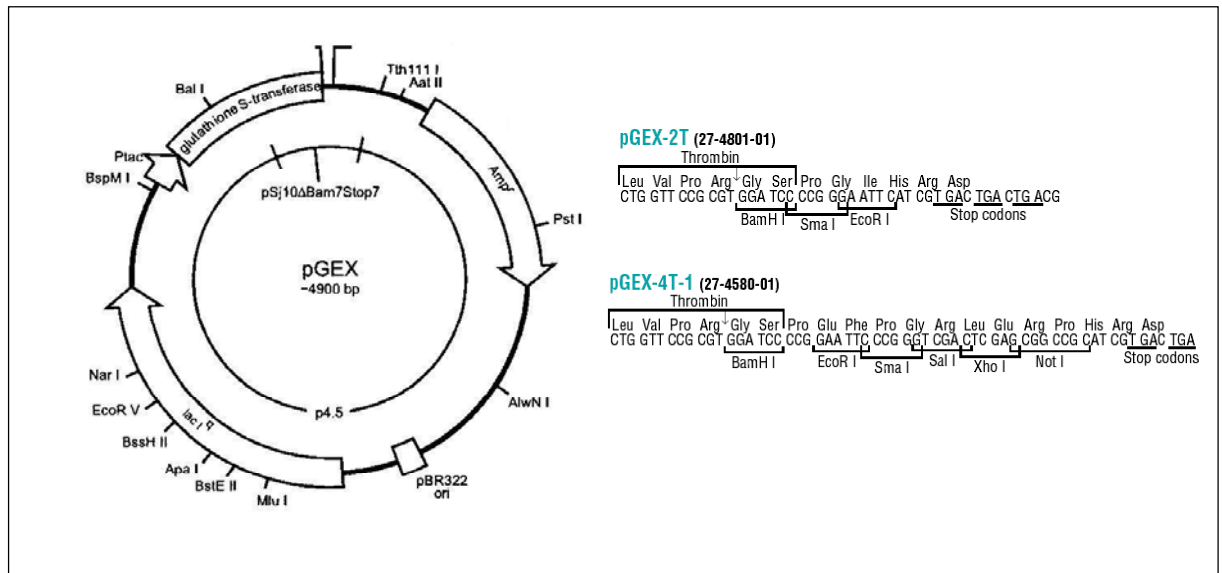


Figura 77: Plásmido pGEX-2T y pGEX-4T-1 empleados en este trabajo.

La GST (26 kDa) es una proteína que presenta gran afinidad por el glutation, lo que permite su purificación de un extracto proteico total mediante cromatografía de afinidad con una resina de agarosa o sefarosa con glutation inmovilizado.

Una vez purificada la proteína de fusión se puede recuperar la proteína de interés sin la GST mediante el corte con trombina, ya que en existe un sitio de reconocimiento de esta

proteasa entre el extremo carboxiterminal de la GST y el inicio aminoterminal de la proteína clonada.

Además la construcción se encuentra bajo el control del promotor P_{tac} inducible mediante IPTG lo que nos permite sobreproducir en grandes cantidades la proteína deseada.

-Proteína Mnme completa: El gen *mnme* de *E. coli* se clonó en el sitio *EcoRI* del polilinker del plásmido pGEX-2T mediante la clonación del fragmento *HindIII*–*NruI* obtenido del plásmido pFM1 (contiene parte del operón *rmnH* incluyendo el gen *mnme*). El fragmento de 2619 pares de bases y el vector fueron tratados con el fragmento klenow de la DNA polimerasa I y ligados. La construcción obtenida (pIC684) fue verificada por secuenciación.

La proteína obtenida una vez purificada y cortada con trombina tiene en su extremo aminoterminal 23 aminoácidos extras que corresponden a la secuencia que se encuentra entre el sitio *HindIII* y el codón de inicio de la proteína.

Se obtuvo también una construcción del gen *mnme* en el sistema pGEX-4T que no incluye estos 23 aminoácidos extras, para ello se amplificó a partir de DNA genómico de la cepa MC-1000 el gen *mnme* con los oligos LY8 (5'-ATCGAATTCATCATGAGCGATAATGACAC-3') y P50KXHO (5'ATGCGGCCTCGAGAGCGCGGTTA CTTACCAA3') conteniendo los sitios de corte *EcoRI* y *XhoI* y se introdujo por ligación en el vector pGEX-4T abierto por *XhoI* y *EcoRI*, la construcción resultante (pIC975) fue verificada por secuenciación.

La proteína de fusión resultante tiene entre el extremo carboxiterminal de la GST y el inicio de la proteína 6 aminoácidos y se comprobó que la trombina no era capaz de reconocer y cortar este sitio de restricción, probablemente porque queda oculto dentro de la estructura tridimensional de la proteína, por lo que no

fue posible de obtener una proteína de 50 kDa a partir de esta fusión a GST y dado que la actividad bioquímica observada de la proteína de 50 KDa (proveniente de la

Derivados del plásmido pIC684:	
R224A	pIC1068
G228A	pIC935
G249A	pIC1011
T250A	pIC1002
T250S	pIC1059
T251A	pIC1003
T251S	pIC1048
R252A	pIC939
R252K	pIC1081
D253A	pIC1013
R256A	pIC1072
D270A	pIC936
R275A	pIC938
R288A	pIC1050
D338N	pIC937
S358A	pIC1052
C451S	pIC805
T250A/T251A	pIC1004
T250S/T251S	pIC1070
R252A/R275A	pIC974

Tabla 29: Lista de los plásmidos derivados del pIC684 por mutagénesis dirigida para la expresión y purificación de proteínas Mnme mutantes.

construcción en el sistema pET) y la de 53 kDa (proveniente de la construcción en el sistema pGEX-2T) es equivalente, se optó por usar la construcción pIC684 como sistema para la purificación de la proteína y de todos sus derivados mutantes. Mediante mutagénesis dirigida sobre el plásmido pIC684 se obtuvieron todos los mutantes de la proteína MnmE que se indican en la tabla 29.

En este mismo sistema también se introdujeron otras construcciones, como el dominio G de la proteína MnmE:

-Dominio G: Construcción **pIC758**. Dominio G del gen *mnmE* clonado amplificando por PCR a partir de DNA genómico de la cepa MC-1000 de *Escherichia coli*, el fragmento de 512 pares de bases mediante los oligos P3 (5'-GCGGATCCTTGTGCGGAAGG-3') y P4 (5'-GCGAATCCCATGCTCTGTTGAG-3') los cuales introducen sitios de restricción *BamHI* y *EcoRI*. El fragmento de PCR fue digerido con estas enzimas y ligado con el plásmido pGEX-2T abierto por estos mismos sitios de restricción. La construcción expresa el dominio G de la proteína desde la Leu 212 hasta la Met 376 fusionado a GST. Después de cortar con trombina se obtiene una proteína de 171 aminoácidos (17 kDa) de los cuales hay 2 aminoácidos extras en su extremo carboxi y 5 más en su extremo aminoterminal.

-Dominio G y extremo carboxiterminal de MnmE: construcción **pIC1080**. Se amplificó mediante PCR con los oligos P50KECO2 (5'-CGTGCTGAATCCGTCAGGGTAGTTGTTGCGC-3') y P50KXHO (5'-ATGCGCCTCGAGAGCGCGTTACTTACCAA-3'), el fragmento de 743 pb fue clonado en el plásmido pGEX-4T-1 en los sitios de restricción *EcoRI* y *XhoI*. La proteína expresada y cortada con trombina tiene 247 aminoácidos de la proteína MnmE (de la arginina 208 al codón de stop) más 5 extras en el extremo amino debido al corte con trombina y el sitio de restricción *EcoRI* introducido. La proteína tiene un tamaño final de 26.8 kDa.

-Dominio aminoterminal de MnmE: construcción **pIC770**. Se amplificó mediante PCR el fragmento de 691 pares de bases mediante los oligos P1 (5'-GCGGATCCATGAGCGATAATGACAC-3') y P2 (5'-GCGAATTCGACGTCCGGCAATC-3') que introducen sitios de restricción *BamHI* y *EcoRI*. El amplificado fue digerido con estas dos enzimas y clonado en el plásmido pGEX-2T abierto por estos dos mismos enzimas. La construcción, al inducirse con IPTG, expresa la proteína GST fusionada al dominio amino desde el ATG inicio a la Arg 224 y tras cortar con trombina se obtiene una proteína de 221 aminoácidos (con 2 aminoácidos extras en el extremo amino y 5 en el carboxiterminal).

-GidA: Construcción **pIC1079**. Se amplificó mediante PCR el gen *gidA* de *E. coli* (cepa MC-1000) con los oligos GidA5' (5'-GGGGAATTCTCATGTTTTATCCGGATGGTTTT-3') y GidA3' (5'-AAAGAATTCCC GTTATGCGCTACGACGCA). El fragmento resultante de 1.88 kb se digirió con EcoRI y se introdujo en el plásmido pGEX-2T abierto por EcoRI desfosforilado con CIP. La construcción expresa la proteína GidA fusionada a GST con un tamaño total de 95 kDa (27 kDa de la GST y 68 de la GidA).

4.1.2. sistema pET: (Novagene)

Este sistema permite la sobreproducción de proteínas mediante la clonación del gen de interés en un plásmido pET, en nuestro caso usamos el plásmido pET15b. En este sistema la expresión de la proteína clonada se encuentra bajo el control del promotor del fago T7. Para inducir este promotor debe introducirse el plásmido en una cepa de *E. coli* BL21(DE3) la cual lleva insertado en el cromosoma una copia del gen de la RNA polimerasa del fago T7 bajo el control del promotor *lacUV5* inducible por IPTG.

Al añadir IPTG al cultivo se produce el inicio de la transcripción del gen de la RNA polimerasa de T7 y la polimerasa sintetizada activa el promotor del plásmido pET y se inicia la expresión de la proteína de interés.

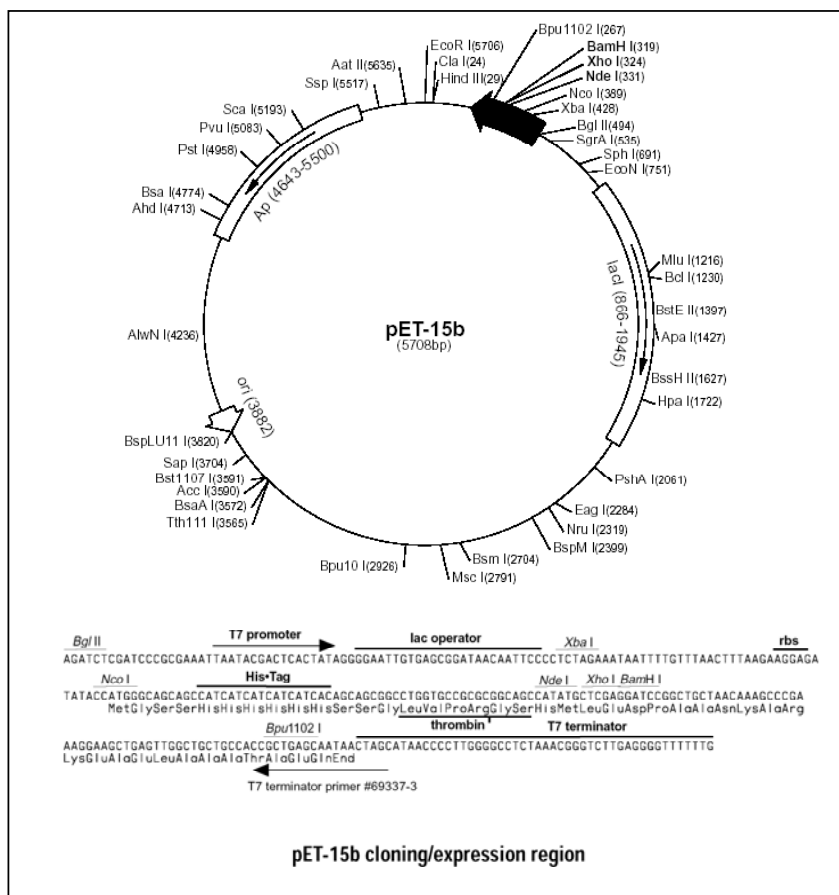


Figura 78: Plásmido pET-15b y su polilinker.

-pET15b-MnmE: La clonación se realizó amplificando el gen *mnmE* a partir de DNA cromosomal de *Escherichia coli* de la cepa MC-1000 con los oligos P50KNCO 5'-GGAACACCATGGGCGATAATGACACTATCG-3' y P50KXHO 5'-ATGGCGGCCTCGAGAGCGCGT TACTTACCAA-3', los cuales introducen un sitio de restricción *NcoI* y *XhoI* respectivamente. El plásmido fue abierto con estas mismas enzimas y el fragmento fue introducido por ligación. El sitio *NcoI* del polilinker se encuentra upstream de la secuencia de las 6 histidinas, por lo el producto final no está fusionado a ningún péptido ni contiene ningún aminoácido extra, la única diferencia entre la proteína nativa y la expresada con este vector es que debido a la presencia del sitio *NcoI* (CCATGG), el segundo aminoácido de la proteína está es una glicina (GGC) en vez de una serina (AGC). La construcción pET15b-MnmE recibió el nombre **pIC929**.

Para obtener una proteína exactamente igual a la nativa y sin ningún aminoácido cambiado o extra, se decidió realizar la mutagénesis dirigida sobre la construcción pIC929 para reemplazar el segundo aminoácido de glicina a serina, para ello mediante los oligos P50KG2S1 (5'-GGAGATATACCATGAGCGATAATGACAC-3') y P50KG2S2 (5'-GTGTCATTATCGCTCATGGTATATCTCC-3') se obtuvo la construcción **pIC933** que fue la empleada para la purificación a gran escala de la proteína MnmE nativa.

4.2. Purificación de proteínas:

4.2.1. Sistema pGEX:

El sistema pGEX permite la purificación de proteínas fusionadas a GST mediante cromatografía de afinidad con glutation inmovilizada sobre agarosa o sefarosa y posteriormente se puede cortar la proteína de fusión mediante trombina para recuperar la proteína de interés.

Las construcciones en el sistema pGEX son introducidas en la cepa de *E. coli* DEV16 que contiene una copia truncada del gen *mnmE* para que la proteína MnmE purificada con ese sistema sea exclusivamente la expresada por el plásmido pGEX, ya que debido a la capacidad de la proteína para formar dímeros, se puede arrastrar proteína salvaje durante la purificación. Esta posibilidad, en el caso de la proteína salvaje, no importa, pero en la purificación de las proteínas mutantes debemos asegurarnos que no arrastremos proteína salvaje proveniente del cromosoma de la célula.

Se crece un cultivo (volumen entre 250 ml y 1 l dependiendo del caso) de LBT con Amp 100 µg/ml inoculado con una dilución 1:100 del cultivo de noche. El cultivo es crecido con agitación a 37° C hasta una DO₆₀₀ aproximada de 0.4-0.5 y se añade IPTG 0.5 mM. La inducción se lleva a cabo durante aproximadamente 4 horas a 37° C con las proteínas salvajes, pero a 30° C para los mutantes, ya que se observó que la gran mayoría de mutantes tienden a formar cuerpos de inclusión insolubles durante la inducción, mientras que para la proteína salvaje prácticamente la totalidad de la proteína de fusión se encuentra en forma soluble. A 30° C el crecimiento es más suave y se observó que en estas condiciones la formación de cuerpos de inclusión disminuye.

Una vez transcurrido el tiempo necesario para la sobreexpresión de la proteína, las células se centrifugan y lavan con PBS una vez, se resuspenden en 8 ml de PBS, EDTA 2.5 mM y PMSF 0.15mM y se lisan mediante sonicación. Posteriormente se añade triton X-100 al 1% y la fracción soluble es recogida por centrifugación a máxima velocidad durante 30 minutos a 4° C.

Al extracto con todas las proteínas solubles se añade una suspensión de la resina glutation-agarosa (Sigma) entre 30 y 100 mg (dependiendo del volumen inicial del cultivo) que previamente se ha equilibrado y lavado con PBS frío. Se deja incubar a 4° C durante un periodo mínimo de 2 horas y máximo de toda una noche para que la proteína de fusión quede selectivamente unida por afinidad a la glutation. Pasado este tiempo, se lava la resina con PBS tres veces para eliminar todas aquellas proteínas que no retenidas y posteriormente se lava con tampón trombina (TrisHCl 50 mM pH7.5, CaCl₂ 2.5 mM y NaCl 150 mM) tres veces.

Una vez equilibrada la muestra con el tampón (0.5 ml de resina y 0.5 ml de tampón), se añade la trombina (entre 1 y 5 unidades por muestra dependiendo de la cantidad de proteína) y se incuba 1 hora a temperatura ambiente para permitir que la proteasa corte la proteína recombinante. En ocasiones para mejorar la eficacia del corte, se deja toda la noche a 4° C con agitación para asegurarnos que toda la proteína de fusión es cortada por la proteasa.

La proteína GST queda unida a la glutation-agarosa y la proteína de interés se eluye con 0.5 ml del tampón trombina, se recogen al menos 4 fracciones y se cuantifican y verifican por SDS-PAGE.

En algunas ocasiones y dependiendo de la construcción, no se llegó a cortar la proteína de fusión con la trombina porque interesa tenerla fusionada a la GST, para ello una vez retenida la proteína a la glutation-agarosa y después de haber lavado exhaustivamente con PBS, se eluye directamente añadiendo tampón glutation (glutation reducido 10 mM

en TrisHCl pH8 50 mM recién preparado) el cual por competición permite soltar la proteína de fusión.

Algunas de las construcciones obtenidas dan lugar a proteínas de fusión altamente insolubles. Con el fin de poder recuperar parte de la proteína de fusión en la fracción soluble y poder así purificar la proteína por cromatografía de afinidad, se cambiaron las condiciones de expresión e inducción de estas proteínas. A la cepa portadora del plásmido pGEX con la proteína de interés introducimos un segundo plásmido pGroESL el cual expresa dos chapronas. Estas proteínas en condiciones de crecimiento e inducción suaves ayudan al correcto plegamiento de la proteína de fusión, favoreciendo la cantidad de proteína soluble. El cultivo se crece a 30° C hasta una DO₆₀₀ aproximada de 0.4-0.5 entonces se añade IPTG a 10 µM y se deja inducir la proteína a 25° C. El resto de la purificación es equivalente a lo descrito anteriormente, excepto con la proteína GidA con la cual hubo que añadir triton X-100 1% y NaCl 250 mM durante los lavados de la cromatografía de afinidad glutation-agarosa

4.2.2. Sistema pET:

Para purificar la proteína MnmE nativa se introdujo por transformación la construcción pIC933 (pET15b-MnmE) en la cepa BL21(DE3).

Para purificar la proteína se crece un cultivo de día a 37° C en medio LBT con ampicilina 100 µg/ml y con agitación hasta una DO₆₀₀ aproximada de 0.5, se añade el IPTG 0.5 mM y se deja expresar la proteína durante al menos 4 horas a 37° C, pasado este tiempo se recogen las células por centrifugación y se lavan con PBS una vez, resuspendiéndose finalmente con PBS, EDTA 2.5 mM y PMSF 0.15 mM.

Las células son sonicadas y el extracto total se centrifuga a máxima velocidad durante al menos media hora a 4° C, a continuación la fracción soluble donde se encuentra nuestra proteína es sometida a precipitaciones consecutivas con (NH₄)₂SO₄ quedándonos con el corte entre el 30% y 40%. Las proteínas precipitadas en esta fracción se resuspenden y se pasa por una columna PD-10 (Amersham Biosciences) para eliminar las sales usando tampón TrisHCl pH 20 mM, NaCl 100 mM para eluir.

A continuación las proteínas se someten a una cromatografía de intercambio iónico de Q-Agarosa Fast Flow (Amersham Biosciences). El volumen de la resina depende de la columna empleada y de la cantidad de proteína a purificar. Para un columna 16/5 se emplea una volumen de 10 ml con un flujo de 2 ml/min y un volumen de fracción de 2 ml. La cromatografía se lleva a cabo con un tampón TrisHCl con gradiente de NaCl

consistente en un tampón A = TrisHCl pH7.5 20 mM y NaCl 100 mM y un tampón B = TrisHCl pH7.5 20 mM y NaCl 750 mM.

La columna se equilibra con 100 ml de tampón A y se pasa la muestra proveniente de la PD-10 (filtrada con un filtro de 0.45 μ m) recogiendo todo el flujo no retenido de la muestra que no ha quedado retenido en la resina para su posterior análisis. Se lava con 20 ml del tampón A y a continuación se pasa el tampón de elución (50 ml de A y 50 ml de B) con un flujo de 2 ml/min y recogiendo fracciones de 2 ml. Para terminar se lava con 2 volúmenes de tampón A y se añaden 3 volúmenes de TrisHCl 2 mM y NaCl 1 M para acabar de eluir todo.

La fracción que inicialmente no queda retenida a la columna contiene todavía gran cantidad de proteína MnmE, por lo que se vuelve a pasar una segunda vez por la columna de cromatografía siguiendo las mismas condiciones descritas anteriormente.

Las fracciones son recogidas y analizadas mediante Bradford y electroforesis en gel de poliacrilamida y se seleccionan aquellas fracciones donde se observa que sale mayoritariamente la proteína MnmE, el pool de fracciones seleccionadas se precipitan con sulfato amónico al 45% y finalmente se resuspende en TrisHCl pH7.5 20 mM y PMSF 0.15 mM.

El último paso de la purificación de la proteína consiste en una columna PD-10 para eliminar las sales y finalmente se concentra mediante centrífuga de 10K (Ultrafree-0.5 Centrifugal Filter Device de Millipore). En ocasiones y dependiendo del uso que se vaya a hacer con la proteína, también se realizó una gelfiltración para eliminar las sales y separar la proteína monomérica (50 kDa) de las otras conformaciones mayores (dímeros y trímeros)

La gelfiltración es llevada a cabo en una columna de Superdex 200 (15/55) con un flujo de 1 ml/min, un volumen de fracción de 1 ml y tampón TrisHCl 20 mM (pH7.6) y DTT 5 mM. Las fracciones correspondientes a la proteína MnmE monomérica son recogidas y concentradas mediante centrífuga, verificadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y cuantificadas.

4.3 Cuantificación de proteínas:

Las proteínas fueron cuantificadas con el reactivo Bradford (Bio-Rad Protein Assay). Las reacciones fueron llevadas a cabo en placas de 96 pocillos y con un volumen de reacción de 200 μ l (40 μ l de reactivo Bradford y 160 μ l de la proteína diluida en agua), usando

concentraciones conocidas de la proteína BSA como patrón estándar. Se determinó la A_{580} mediante un espectrofotómetro Labsystem Multiscan Plus.

En ocasiones también se cuantificó las proteínas por espectrofotometría midiendo la absorbancia de la proteína a 280 nm en un espectrofotómetro Unicam UV-visible (Helios- λ) y NanoDrop ND-1000.

4.4. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE):

La separación de proteínas fue llevada a cabo por electroforesis en geles de poliacrilamida verticales SDS-PAGE según el método de Laemli (1970).

Los geles están formados por dos regiones; superior donde se cargan y entran las muestras llamado "stacking" o acumulador está compuesta por 4% acrilamida-bisacrilamida (29:1), TrisHCl (pH6.8) 125 mM y SDS 0.1 %. La parte inferior del gel donde se realiza la separación física de las proteínas en función de su tamaño ("running" o separador), tienen una composición de acrilamida-bisacrilamida (29:1) en una concentración variable entre 8 y 12% dependiendo del tamaño de la proteína que se desea separar, tampón TrisHCl (pH8.8) 375 mM y SDS 0.1%. Para polimerizar la acrilamida se añade $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_7$ (APS o persulfato amónico) al 0.1% y TEMED (N, N, N', N',-tetramethylethylenediamine).

Las muestras de proteínas llevan un tampón de carga 6X consistente en TrisHCl pH6.8 125 mM, 30% de glicerol, 10% de SDS, β -mercaptoetanol 0.86 mM y 0.25% azul de bromofenol, las muestras se desnaturalizan en este tampón 3 minutos a 95° C antes de cargar en el gel.

La electroforesis es llevada a cabo en tampón TrisHCl 25 mM, glicina 14.4 g/l (192 mM) y SDS 1 g/l.

Una vez finalizada la electroforesis los geles se tiñeron con una solución de azul de coomasie (0.25% coomasie brilliant Blue R-250 de Biorad, 50% de metanol, 10% ácido acético) o bien fueron sometidos a inmunotransferencia.

4.5. Transferencia de proteínas a un soporte sólido:

La transferencia de proteínas de un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a una membrena de nitrocelulosa se llevó a cabo por electroforesis poniendo en contacto ambos soportes y realizando una electroforesis con tampón TrisHCl 25 mM, glicina 14.4 mg/ml.

Una vez terminada la transferencia la membrana se tiñe con rojo Ponceau (0.5% (w/v) Ponceau, 1% ácido acético) para visualizar que la transferencia de proteínas ha funcionado correctamente y se procede a la inmunodetección.

4.6. Inmunodetección de proteínas sobre soporte sólido:

La membrana se incuba un mínimo de 1 hora en tampón de bloqueo (leche en polvo desnatada al 5% en TBS (TrisHCl 100 mM, NaCl 150 mM) para evitar uniones inespecíficas posteriores del anticuerpo. Tras el bloqueo la membrana se incuba con el anticuerpo diluido en tampón de bloqueo y a una concentración que varía dependiendo de la eficacia, la especificidad, la cantidad de proteína, etc... igualmente el tiempo de incubación con el anticuerpo varía entre un mínimo de 1 hora a toda una noche dependiendo del anticuerpo empleado en cada ocasión.

Tras la incubación, la membrana se lava dos veces durante 15 minutos con tampón de lavado (TBS con tween 20 al 3%) para eliminar restos de anticuerpos que no se han unido específicamente a la proteína y a continuación, se incuba la membrana con el segundo anticuerpo que reconoce el IgG del animal en que fue obtenido el primer anticuerpo y que se encuentra conjugado a fosfatasa alcalina o peroxidasa para permitir la detección por quimioluminiscencia. La membrana es lavada dos veces con tampón de lavado y se procede a la detección con el sistema ECL (ECL Advance Western Boltting Detection Kit) por procedimientos estandarizados exponiendo la membrana sobre una película para autoradiografía.

4.7. Inmunopurificación de anticuerpos:

La inmunopurificación se realiza mediante afinidad entre el suero total del animal inmunizado y una membrana de nitrocelulosa donde se encuentra inmovilizada la proteína purificada. Se incuba durante 12 horas a temperatura ambiente la membrana con el suero en tampón de bloqueo (leche desnatada al 5% en TBS) en una dilución 1:100. Al día siguiente, se lava la membrana dos veces durante 15 minutos con tampón de lavado (TBS con tween 20 al 3%) y finalmente se procede a recuperar el anticuerpo retenido sobre la membrana mediante un tampón ácido de glicina 200 mM pH2.3, se añaden 1.7 ml de este tampón y se deja actuar durante 15 minutos, pasado el tiempo se neutraliza rápidamente con 0.3 ml de TrisHCl pH5 1M. El anticuerpo purificado mediante esta técnica puede ser utilizada en diluciones variables (entre 1:50 y 1:10.000) dependiendo de su eficacia.

4.8. Ultracentrifugación Analítica:

Los ensayos de velocidad de sedimentación y equilibrio de sedimentación para el estudio de las propiedades de autoasociación de la proteína se llevaron a cabo en una ultracentrífuga analítica Beckman XL-A.

Las muestras fueron previamente dializadas contra el tampón GTPasa pero con una porcentaje de glicerol del 1% en lugar de 5% (concentración habitual en el tampón GTPasa). La velocidad fue de 50.000 rpms (200.000 g) con un radio mínimo de 6.35 cm y uno máximo de 7.2 cm. La λ fue fijada a 236 nm y la temperatura 6° C.

4.9. Crosslinking *in vivo*:

El entrecruzamiento es realizado según el procedimiento descrito por Skare (Skare *et al.*, 1993). El cultivo de la cepa bacteriana es resuspendido en 0.1 M de tampón fosfato sódico pH 6.8 cuando éstas alcanzan una $DO_{600}=0.5$. El formaldehído es utilizado a una concentración final del 1% (p/p). Las muestras son incubadas a temperatura ambiente. A los tiempos, indicados 1 ml de las muestras son recogidas y centrifugadas y las células se solubilizan en tampón de carga, una parte son calentadas a 60° C durante 10 minutos para mantener los entrecruzamientos producidos por el formaldehído, y otra parte de las muestras son calentadas a 95° C durante 10 minutos para romper el entrecruzamiento químico. Las muestras son analizadas en SDS-PAGE (8% acrilamida) e inmunodetección con el anticuerpo antiMnmE

4.10. Crosslinking *in vitro*:

La proteína purificada (0.3 mg/ml) es entrecruzada con DTSP (Ditiobis-succinimidil propionato) (Sigma) 1 mM en un volumen final de 50 μ l conteniendo 80 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM KCl, 100 mM NaCl, 2 mM $MgCl_2$, 1.5 mM $CaCl_2$ y 5% glicerol. El DTSP es añadido a partir de una solución stock (30 mM) en *N,N*-dimetilformamida. Las reacciones control son realizadas incubando con *N,N*-dimetilformamida sin DTSP. Tras 10 minutos a temperatura ambiente, todas las reacciones se paran al añadir lisina a una concentración final de 150 mM e incubando 15 minutos más. El tampón de carga (10 μ l) es añadido a cada reacción, dividiendo su volumen final en dos partes. A una de ellas se le añade 2- β -mercaptoetanol a 100 mM y todas las muestras son incubadas a 37° C antes de someterlas a electroforesis en SDS-PAGE en condiciones no reductoras. Las proteínas son visualizadas por tinción con azul de coomasie.

5. Ensayos de actividad β -galactosidasa:

El "readthrough" del codón de stop UAG en el gen *lacZ105* es detectado y cuantificado mediante un ensayo de actividad β -galactosidasa (Elseviers *et al.*, 1984).

Los ensayos de la actividad β -galactosidasa son llevados a cabo según el protocolo de Miller (Miller, 1992) utilizando como sustrato ONPG. Los cultivos son crecidos en LBT en presencia de 1 mM de IPTG y 5 mM de cAMP (Akiyama *et al.*, 1996), para obtener una máxima expresión del gen *lacZ*, a la temperatura específica toda la noche. Al día siguiente se diluyen 1:100 en el mismo medio y a la misma temperatura hasta alcanzar una $DO_{600}=0.4$; se diluye el cultivo a la mitad y se repite este paso 2 veces más para mantener los cultivos en una fase de crecimiento exponencial durante varias generaciones.

Para realizar el ensayo β -galactosidasa los cultivos se mantienen en hielo al menos durante 30 minutos y a continuación se toman 0.1 ml de cultivo a los que se añade 0.9 ml de tampón Z (Na_2HPO_4 60 mM, NaH_2PO_4 40 mM, KCl 10 mM, $MgSO_4$, β -mercaptoetanol 50 mM, pH7) y se añade 24 μ l de SDS 0.1% y 15 μ l de cloroformo para romper las células. La reacción de la β -galactosidasa se lleva a cabo a 28° C añadiendo 200 μ l del sustrato ONPG (2-Nitrophenyl- β -D-galactopyranoside de Apollo Scientific Limited) a 4 mg/ml disuelto en tampón Z. La reacción se deja transcurrir y se detiene añadiendo 0.5 ml de carbonato sódico 1 M. Para calcular las unidades Miller de actividad β -galactosidasa se mide la A_{420nm} y $A_{550 nm}$:

$$\text{Unidades } \beta\text{-galactosidasa (Miller)} = \frac{(A_{420} - 1.75A_{550})1000}{v \cdot t \cdot A_{600}}$$

Donde "v" es el volumen (en ml) de cultivo añadido a 1 ml de reacción, "t" es el tiempo (en minutos) transcurridos hasta detener la reacción y A_{600} es la DO_{600} del cultivo bacteriano.

6. Ensayo de actividad GTPasa:

El ensayo de la actividad GTPasa fue llevado a cabo mediante un ensayo colorimétrico que detecta la cantidad de P_i liberado durante la hidrólisis del nucleótido según el método descrito por (Hoenig *et al.*, 1989; Lanzetta *et al.*, 1979).

Los ensayos de actividad GTPasa fueron realizados en placas de 96 pocillos donde las proteínas purificadas (2 μ M) fueron incubadas a 37° C con cantidades crecientes de GTP (desde 0.1 mM a 4 mM) en tampón GTPasa (TrisHCl pH7.5 50 mM, $MgCl_2$ 2 mM, KCl 50 mM, glicerol 5%) y en un volumen final de 50 μ l. Tras 10 minutos de incubación a 37° C la reacción de hidrólisis fue detenida añadiendo 200 μ l de la mezcla de reacción preparada con anterioridad y consistente en 2 volúmenes de malachita green 0.0812%, 2

volúmenes de H₂O, 1 volumen de molibdato amónico (5.72% en HCl 6N) y 1 volumen de alcoholpolivinílico al 2.32%. Transcurridos 2 minutos, se detiene la reacción añadiendo 25 µl de citrato sódico al 34% recién preparado y en los siguientes 15 minutos se mide la A₆₉₀ mediante un espectrofotómetro Labsystem Multiscan Plus.

Se determinó la cantidad de P_i liberado en las reacciones de hidrólisis comparando con una curva patrón de KH₂PO₄ a una concentración conocida y en un rango de 0 a 10 pmoles de P_i.

Para determinar los valores de V_{max} y K_m los datos fueron ajustados a una ecuación de Michaelis-Menten mediante un ajuste de regresión no lineal con el programa GraphPad Prism versión 3.00.

7. Ensayos de afinidad por nucleótido:

7.1. Ensayos de unión del nucleótido en filtro:

En los ensayos de unión en filtro se lleva a cabo la reacción de unión entre la proteína (concentración 4.7 µM) y una concentración variable del análogo del nucleótido no hidrolizable [γ -³⁵S]GTP (>37 MBq/mmol; Amrsham Biosciences) en 25 µl de reacción y tampón GTPasa. Tras 30 minutos de incubación a 30° C, la muestra es filtrada sobre un filtro de nitrocelulosa (NC 45 de Scheicher & Schuell) y lavada dos veces con 1 ml de tampón GTPasa frío. Una vez seco el filtro se detecta la cantidad de nucleótido retenido y unido a la proteína mediante un contador de centelleo (1211 Rackbete de LKB Wallac). Para determinar los valores de K_d los datos fueron ajustados a una ecuación de Michaelis-Menten mediante un ajuste de regresión no lineal con el programa GraphPad Prism versión 3.00.

7.2. Proteólisis limitada:

La reacción de proteólisis limitada se realizó partiendo de 1 µg de proteína purificada, la cual es incubada con el nucleótido indicado en cada ocasión durante 5 minutos en hielo, en tampón de digestión (0.1 mM de NH₄HCO₃ pH7.8, 2 mM MgCl₂, 50 mM KCl) y volumen de reacción de 18 µl. Tras la unión del nucleótido, se añaden 2 µl de la proteasa quimiotripsina (N α -p-tosyl-L-lysine cloromethyl-ketone-treated chymiotrypsin) a 12.5 ng/µl de Sigma y se incuba 20 minutos a 30° C. La reacción de proteólisis se detienen añadiendo PMSF a una concentración final 1 mM. Las muestras son cargadas en un gel de poliacrilamida al 20% y sometida a electroforesis, posteriormente se transfieren a una membrana de nitrocelulosa (Hybond ECL, Amaersham Biosciences) y finalmente la

proteína digerida es detectada mediante Western blot con anticuerpo antiMnmE siguiendo los protocolos habituales.

7.3. Ensayos de unión del nucleótido por fluorescencia:

Los ensayos de unión del nucleótido a la proteína mediante fluorescencia se llevaron a cabo en un espectrofluorímetro Perkin Elmer LS 50B y en ocasiones con un espectrofluorímetro modelo JASCO STR-313.

La muestra es excitada con una longitud de onda de 360 nm, detectando la variación de la intensidad y anisotropía de fluorescencia a 440 nm, con una velocidad de 200 nm/minuto y una amplitud de rejilla de 10 nm. Los ensayos de unión se realizan en una cubeta de cuarzo (Hellma, 10 mm paso óptico, 100 μ l volumen) con un volumen de reacción de 120 μ l en tampón GTPasa, a temperatura ambiente, concentración del análogo fluorescente del nucleótido (mantGTP γ S y mantGDP de Jena Bioscience) 2 μ M y concentración de la proteína variable. Para determinar los valores de K_d los datos fueron ajustados a una ecuación de Michaelis-Menten mediante un ajuste de regresión no lineal con el programa GraphPad Prism versión 3.00.

Los ensayos de sensibilidad a AIF_x y formación del complejo proteína-mantGDP-AIF_x fueron llevados a cabo partiendo de 2 μ M del nucleótido fluorescente mantGDP, posteriormente se añade la proteína a una concentración 10 μ M. Para la formación del complejo con AIF_x, añadimos por separado y de forma secuencial NaF 10 mM y AlCl₃ 70 μ M (sales que formaran la molécula de AIF₃ y/o AIF₄). La introducción del NaF no afecta a las propiedades fluorescentes del complejo proteína-nucleótido, pero tras la adición del AlCl₃ se forma el complejo proteína-mantGDP-AIF_x. El espectro de emisión del complejo proteína-mantGDP-AIF_x es detectado a los 15 minutos después de la adición del AlCl₃.

8. Ensayos de interacción tRNA-proteínas:

8.1. Ensayos de unión tRNA-proteínas mediante retraso en gel:

Se realizaron ensayos de unión del tRNA total de la cepa DEV16 (no modificados) a la proteína MnmE y GidA, para ello se incubó 20 μ g de tRNA total con MnmE, GidA y BSA (como control) en cantidades equimoleculares variables según el protocolo descrito anteriormente por otros autores (Morales *et al.*, 1999; Simos *et al.*, 1996; Wolf *et al.*, 2002) e introduciendo algunas modificaciones.

La reacción de unión se hizo en tampón GTPasa (TrisHCl pH7.5 50 mM, MgCl₂ 2 mM, KCl 50 mM, glicerol 5%) y en presencia y ausencia de nucleótido (GTP y GTP- γ -S 5 mM), el nucleótido se incubaba con la mezcla de reacción de 5 a 10 minutos en hielo y posteriormente se irradia durante 6' con luz UV para entrecruzar el tRNA a las proteínas y evitar que el tRNA se suelte de la proteína durante la electroforesis en caso de que haya habido unión (Liu *et al.*, 2000; Pinol-Roma *et al.*, 1989).

A continuación se realiza una electroforesis en gel de poliacrilamida con TrisOAc pH8 10 mM con una concentración de 8% en tampón de la electroforesis TrisOAc pH8 40 mM.

Las muestras se resuspenden en tampón de carga (TrisOAc pH8 10 mM, glicerol 60%, azul de bromofenol 0.05% y xilencianol 0.05% pero sin SDS, β -mercaptoetanol, DTT ni EDTA para no inhibir la interacción proteína-tRNA o la reacción de hidrólisis)

El gel de poliacrilamida se corre antes de cargar las muestras durante 2 horas a 200 v y 4° C tras lo cual se cargan las muestras y se realiza la electroforesis a 130 v durante aproximadamente 90 minutos.

Una vez terminada la electroforesis se procede a la transferencia a una membrana de nirocelulosa cargada positivamente (Roche) mediante un sistema de transferencia semiseco de Owl a 3 mA/cm² de membrana y durante 90 minutos. Una vez terminada la transferencia la membrana se irradia 3 minutos por cada cara con luz UV en un UV Stratalinker 1800 de Stratagene para fijar los ácidos nucleicos a la membrana.

La detección de los tRNAs se hace mediante una sonda contra el tRNA de glutámico marcada con digoxigenina en el extremo 5' según el protocolo descrito anteriormente en el análisis de la modificación de los tRNAs de glutámico mediante Northern blot (apartado 3.3).

8.2. Ensayos de interacción tRNA-proteína mediante cromatografía de afinidad:

Para el ensayo de interacción tRNA-MnmE por cromatografía de afinidad se purificó la proteína recominante GST-MnmE y como control la proteína GST sola, ambas retenida a glutatión agarosa, tal y como se indica en el apartado 4.2.1. Como sustrato, se purificó tRNA total de la cepa DEV16 como se indica en el apartado 3.1.

A 100 μ l de glutatión-agarosa con la proteína retenida a una concentración 1 mg/ml se añadió 100 μ l de la mezcla de reacción conteniendo 25 μ l de tRNA total a 1.8 mg/ml, 20 μ l de tampón GTPasa 5X y 1 μ l de RNase OUT (inhibidor de RNasas de Gibco BRL). La mezcla se incubó 25 minutos en hielo y posteriormente se añadió 2 mM de GTP incubando 5 minutos más, por si la unión/hidrólisis del GTP fuera necesario para la interacción con el tRNA. Tras esta incubación se eluye la fracción no retenida a la resina

(llamada F1), se añaden 100 μ l de tampón y se eluye otra fracción de 100 μ l llamada F2. Posteriormente se lava la resina 2 X 500 μ l de PBS y se recupera la proteína retenida a la glutatión-agarosa añadiendo 100 μ l de tampón glutatión recién preparado (fracción llamada R). 10 μ l de cada fracción se cargan en un gel de poliacrilamida del 8% TrisOAc pH8 40 mM y se realiza la electroelución a 200 v, 4° C, durante 80 minutos, la transferencia e inmunodetección del tRNA^{Glu} se realiza como se indica en el apartado 3.3.

	Adenosina 5´-trifosfato
Bla	β -lactamasa
BSA	Albúmina de suero bovino
Ci	Curios
Cm	Cloranfenicol
cmnm	Grupo carbiximetilaminometil
cpm	Cuentas por minuto
DEPC	Dietil pirocarbonato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO₆₀₀	Densidad óptica a 600 nm de longitud de onda
DTSP	Ditiobis-succinimidil propionato
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
G1, G2, G3, G4	Motivos de unión a nucleótidos de guanina
GAP	Proteína activadora de la GTPasa
G_{dom}	Dominio G
GDP	Guanosina 5´-difosfato
GEF	Factor intercambiador de nucleótido
GMP	Guanosina 5´-monofosfato
GST	Glutation-S-transferasa
GTP	Guanosina 5´-trifosfato
GTPasa	Guanosina 5´-trifosfatasa
IgG	Inmunoglobulina G
I_F	Intensidad de fluorescencia
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
kan	Kanamicina
kb	Kilobase
<i>K_d</i>	Constante de disociación
kDa	Kilodalton
<i>K_m</i>	Constante de afinidad
LBT	Medio de cultivo Luria-Bertani suplementado con timina
	β-ME Mercaptoetanol
	MNM Grupo metilaminometil
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
nm	Nanometros
ONPG	2-Nitrofenil- β -D-galactopiranosido
p/p	Relación peso/peso
p/v	Relación peso/volumen
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)
r	Anisotropía de fluorescencia

rpm	Revoluciones por minuto
RNA	Ácido ribonucleico
RNAasa	Ribonucleasa
rRNA	Ácido ácido ribosomal
SDS	Dodecilo sulfato de Sodio
TBS	Tampón tris salino
TCA	Ácido tricloro acético
TE	Tris-EDTA
TEB	Tris-borato-EDTA
TEMED	N,N,N',N',-Tetra-metiletildiamina
Tris	Tris-hidroximetil-aminometano
Tris-HCl	Tampón Tris ajustado al pH deseado con HCl
tRNA	Ácido ribonucleico de transferencia
UV	Ultra violeta
V	Voltios
x g	Fuerza centrífuga relativa
X-gal	5-cloro-4- bromo-3-indolil-β-D-galactopiranosido
XTP	Xantosina-5'-trifosfato

BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía:

- Ahmadian, M.R., Kreuzer, R., Blechschmidt, B. and Sprinzl, M. (1995) Site-directed mutagenesis of *Thermus thermophilus* EF-Tu: the substitution of threonine-62 by serine or alanine. *FEBS Lett*, **377**, 253-257.
- Ahmadian, M.R., Mittal, R., Hall, A. and Wittinghofer, A. (1997a) Aluminum fluoride associates with the small guanine nucleotide binding proteins. *FEBS Lett*, **408**, 315-318.
- Ahmadian, M.R., Stege, P., Scheffzek, K. and Wittinghofer, A. (1997b) Confirmation of the arginine-finger hypothesis for the GAP-stimulated GTP-hydrolysis reaction of Ras. *Nat Struct Biol*, **4**, 686-689.
- Akiyama, Y., Kihara, A. and Ito, K. (1996) Subunit a of proton ATPase F₀ sector is a substrate of the FtsH protease in *Escherichia coli*. *FEBS Lett*, **399**, 26-28.
- Albert, S., Will, E. and Gallwitz, D. (1999) Identification of the catalytic domains and their functionally critical arginine residues of two yeast GTPase-activating proteins specific for Ypt/Rab transport GTPases. *Embo J*, **18**, 5216-5225.
- Andachi, Y., Yamao, F., Muto, A. and Osawa, S. (1989) Codon recognition patterns as deduced from sequences of the complete set of transfer RNA species in *Mycoplasma capricolum*. Resemblance to mitochondria. *J Mol Biol*, **209**, 37-54.
- Anton, I.A. and Coggins, J.R. (1988) Sequencing and overexpression of the *Escherichia coli* *aroE* gene encoding shikimate dehydrogenase. *Biochem J*, **249**, 319-326.
- Armengod, M.E. and Blanco, M. (1978) Influence of the *recF143* mutation of *Escherichia coli* K12 on prophage lambda induction. *Mutat Res*, **52**, 37-47.
- Ashraf, S.S., Guenther, R., Ye, W., Lee, Y., Malkiewicz, A. and Agris, P.F. (1997) Ribosomal binding of modified tRNA anticodons related to thermal stability. *Nucleic Acids Symp Ser*, 58-60.
- Ashraf, S.S., Sochacka, E., Cain, R., Guenther, R., Malkiewicz, A. and Agris, P.F. (1999) Single atom modification (O-->S) of tRNA confers ribosome binding. *Rna*, **5**, 188-194.
- Bachmann, B. (1996) *Derivations and genotypes of some mutants derivatives of escherichia coli K-*
- Bereswill, S., Fassbinder, F., Volzing, C., Haas, R., Reuter, K., Ficner, R. and Kist, M. (1997) Cloning and functional characterization of the genes encoding 3-dehydroquinate synthase (*aroB*) and tRNA-guanine transglycosylase (*tgt*) from *Helicobacter pylori*. *Med Microbiol Immunol (Berl)*, **186**, 125-134.
- Berman, D.M., Kozasa, T. and Gilman, A.G. (1996) The GTPase-activating protein RGS4 stabilizes the transition state for nucleotide hydrolysis. *J Biol Chem*, **271**, 27209-27212.
- Bjork, G.R. (1995) Genetic dissection of synthesis and function of modified nucleosides in bacterial transfer RNA. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, **50**, 263-338.
- Bjork, G.R., Durand, J.M., Hagervall, T.G., Leipuviene, R., Lundgren, H.K., Nilsson, K., Chen, P., Qian, Q. and Urbonavicius, J. (1999) Transfer RNA modification: influence on translational frameshifting and metabolism. *FEBS Lett*, **452**, 47-51.
- Bjork, G.R., Ericson, J.U., Gustafsson, C.E., Hagervall, T.G., Jonsson, Y.H. and Wikstrom, P.M. (1987) Transfer RNA modification. *Annu Rev Biochem*, **56**, 263-287.

- Bjork, G.R., Jacobsson, K., Nilsson, K., Johansson, M.J., Bystrom, A.S. and Persson, O.P. (2001) A primordial tRNA modification required for the evolution of life? *Embo J*, **20**, 231-239.
- Bjork, G.R., Wikstrom, P.M. and Bystrom, A.S. (1989) Prevention of translational frameshifting by the modified nucleoside 1-methylguanosine. *Science*, **244**, 986-989.
- Blanco, M. (1976) *Experiencias de genética microbiana*. Ed. FACTA., Valencia.
- Boren, T., Elias, P., Samuelsson, T., Claesson, C., Barciszewska, M., Gehrke, C.W., Kuo, K.C. and Lustig, F. (1993) Undiscriminating codon reading with adenosine in the wobble position. *J Mol Biol*, **230**, 739-749.
- Borg-Olivier, S.A., Tarlinton, D. and Brown, K.D. (1987) Defective regulation of the phenylalanine biosynthetic operon in mutants of the phenylalanyl-tRNA synthetase operon. *J Bacteriol*, **169**, 1949-1953.
- Bourne, H.R. (1995) Trimeric G proteins: surprise witness tells a tale. *Science*, **270**, 933-934.
- Bourne, H.R. (1997) G proteins. The arginine finger strikes again. *Nature*, **389**, 673-674.
- Bourne, H.R., Sanders, D.A. and McCormick, F. (1990) The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature*, **348**, 125-132.
- Bourne, H.R., Sanders, D.A. and McCormick, F. (1991) The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature*, **349**, 117-127.
- Bregeon, D., Colot, V., Radman, M. and Taddei, F. (2001) Translational misreading: a tRNA modification counteracts a +2 ribosomal frameshift. *Genes Dev*, **15**, 2295-2306.
- Brinkmann, T., Daumke, O., Herbrand, U., Kuhlmann, D., Stege, P., Ahmadian, M.R. and Wittinghofer, A. (2002) Rap-specific GTPase activating protein follows an alternative mechanism. *J Biol Chem*, **277**, 12525-12531.
- Brodersen, D.E., Clemons, W.M., Jr., Carter, A.P., Wimberly, B.T. and Ramakrishnan, V. (2002) Crystal structure of the 30 S ribosomal subunit from *Thermus thermophilus*: structure of the proteins and their interactions with 16 S RNA. *J Mol Biol*, **316**, 725-768.
- Burland, V., Plunkett, G., 3rd, Daniels, D.L. and Blattner, F.R. (1993) DNA sequence and analysis of 136 kilobases of the *Escherichia coli* genome: organizational symmetry around the origin of replication. *Genomics*, **16**, 551-561.
- Cabedo, H., Macian, F., Villarroya, M., Escudero, J.C., Martinez-Vicente, M., Knecht, E. and Armengod, M.E. (1999) The *Escherichia coli* trmE (mnmE) gene, involved in tRNA modification, codes for an evolutionarily conserved GTPase with unusual biochemical properties. *Embo J*, **18**, 7063-7076.
- Caldon, C.E. and March, P.E. (2003) Function of the universally conserved bacterial GTPases. *Curr Opin Microbiol*, **6**, 135-139.
- Caldon, C.E., Yoong, P. and March, P.E. (2001) Evolution of a molecular switch: universal bacterial GTPases regulate ribosome function. *Mol Microbiol*, **41**, 289-297.
- Claesson, C., Samuelsson, T., Lustig, F. and Boren, T. (1990) Codon reading properties of an unmodified transfer RNA. *FEBS Lett*, **273**, 173-176.
- Colby, G., Wu, M. and Tzagoloff, A. (1998) MTO1 codes for a mitochondrial protein required for respiration in paromomycin-resistant mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, **273**, 27945-27952.

- Condon, C., Philips, J., Fu, Z.Y., Squires, C. and Squires, C.L. (1992) Comparison of the expression of the seven ribosomal RNA operons in *Escherichia coli*. *Embo J*, **11**, 4175-4185.
- Cool, R.H., Schmidt, G., Lenzen, C.U., Prinz, H., Vogt, D. and Wittinghofer, A. (1999) The Ras mutant D119N is both dominant negative and activated. *Mol Cell Biol*, **19**, 6297-6305.
- Crick, F.H. (1966) Codon--anticodon pairing: the wobble hypothesis. *J Mol Biol*, **19**, 548-555.
- Curran, J.F. (1995) Decoding with the A:I wobble pair is inefficient. *Nucleic Acids Res*, **23**, 683-688.
- Danino, D. and Hinshaw, J.E. (2001) Dynamin family of mechanoenzymes. *Curr Opin Cell Biol*, **13**, 454-460.
- Decoster, E., Vassal, A. and Faye, G. (1993) MSS1, a nuclear-encoded mitochondrial GTPase involved in the expression of COX1 subunit of cytochrome c oxidase. *J Mol Biol*, **232**, 79-88.
- Der, C.J., Finkel, T. and Cooper, G.M. (1986) Biological and biochemical properties of human rasH genes mutated at codon 61. *Cell*, **44**, 167-176.
- Derman, A.I. and Beckwith, J. (1995) *Escherichia coli* alkaline phosphatase localized to the cytoplasm slowly acquires enzymatic activity in cells whose growth has been suspended: a caution for gene fusion studies. *J Bacteriol*, **177**, 3764-3770.
- Dong, H., Nilsson, L. and Kurland, C.G. (1996) Co-variation of tRNA abundance and codon usage in *Escherichia coli* at different growth rates. *J Mol Biol*, **260**, 649-663.
- Ehrenberg, M., Bilgin, N., Dincbas, V., Karimi, R., Hughes, D. and Abdulkarim, F. (1995) tRNA-ribosome interactions. *Biochem Cell Biol*, **73**, 1049-1054.
- Elseviers, D., Petrullo, L.A. and Gallagher, P.J. (1984) Novel *E. coli* mutants deficient in biosynthesis of 5-methylaminomethyl-2-thiouridine. *Nucleic Acids Res*, **12**, 3521-3534.
- Erickson, H.P. (1995) FtsZ, a prokaryotic homolog of tubulin? *Cell*, **80**, 367-370.
- Erickson, H.P. (2000) Dynamin and FtsZ. Missing links in mitochondrial and bacterial division. *J Cell Biol*, **148**, 1103-1105.
- Esberg, B., Leung, H.C., Tsui, H.C., Bjork, G.R. and Winkler, M.E. (1999) Identification of the miaB gene, involved in methylthiolation of isopentenylated A37 derivatives in the tRNA of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **181**, 7256-7265.
- Expert-Bezancon, A. and Chiaruttini, C. (1988) RNA--protein cross-linking. *Methods Enzymol*, **164**, 310-318.
- Farabaugh, P.J. and Bjork, G.R. (1999) How translational accuracy influences reading frame maintenance. *Embo J*, **18**, 1427-1434.
- Farnsworth, C.L. and Feig, L.A. (1991) Dominant inhibitory mutations in the Mg(2+)-binding site of RasH prevent its activation by GTP. *Mol Cell Biol*, **11**, 4822-4829.
- Farnsworth, C.L., Marshall, M.S., Gibbs, J.B., Stacey, D.W. and Feig, L.A. (1991) Preferential inhibition of the oncogenic form of RasH by mutations in the GAP binding/"effector" domain. *Cell*, **64**, 625-633.
- Faulhammer, H.G. and Joshi, R.L. (1987) Structural features in aminoacyl-tRNAs required for recognition by elongation factor Tu. *FEBS Lett*, **217**, 203-211.

- Fidyk, N.J. and Cerione, R.A. (2002) Understanding the catalytic mechanism of GTPase-activating proteins: demonstration of the importance of switch domain stabilization in the stimulation of GTP hydrolysis. *Biochemistry*, **41**, 15644-15653.
- Flohr, F., Schneider-Schaulies, S., Haller, O. and Kochs, G. (1999) The central interactive region of human MxA GTPase is involved in GTPase activation and interaction with viral target structures. *FEBS Lett*, **463**, 24-28.
- Fourmy, D., Yoshizawa, S. and Puglisi, J.D. (1998) Paromomycin binding induces a local conformational change in the A-site of 16 S rRNA. *J Mol Biol*, **277**, 333-345.
- Gao, W., Jakubowski, H. and Goldman, E. (1995) Evidence that uncharged tRNA can inhibit a programmed translational frameshift in Escherichia coli. *J Mol Biol*, **251**, 210-216.
- García, G.A., and Goodenough-Lashua, D.M. (1998) *Modification and Editing of RNA*. American Society for Microbiology, Washington, DC.
- Garcia, G.A. and Chong, S. (1997) Cysteine 265 is in the active site of, but is not essential for catalysis by tRNA-guanine transglycosylase (TGT) from Escherichia coli. *J Protein Chem*, **16**, 11-17.
- Geyer, M. and Wittinghofer, A. (1997) GEFs, GAPs, GDIs and effectors: taking a closer (3D) look at the regulation of Ras-related GTP-binding proteins. *Curr Opin Struct Biol*, **7**, 786-792.
- Goto, Y., Nonaka, I. and Horai, S. (1990) A mutation in the tRNA(Leu)(UUR) gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies. *Nature*, **348**, 651-653.
- Goto, Y., Nonaka, I. and Horai, S. (1991) A new mtDNA mutation associated with mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes (MELAS). *Biochim Biophys Acta*, **1097**, 238-240.
- Graham, D.L., Eccleston, J.F. and Lowe, P.N. (1999) The conserved arginine in rho-GTPase-activating protein is essential for efficient catalysis but not for complex formation with Rho.GDP and aluminum fluoride. *Biochemistry*, **38**, 985-991.
- Gutierrez, L., Magee, A.I., Marshall, C.J. and Hancock, J.F. (1989) Post-translational processing of p21ras is two-step and involves carboxyl-methylation and carboxy-terminal proteolysis. *Embo J*, **8**, 1093-1098.
- Hagervall, T.G. and Bjork, G.R. (1984a) Genetic mapping and cloning of the gene (trmC) responsible for the synthesis of tRNA (mnm5s2U)methyltransferase in Escherichia coli K12. *Mol Gen Genet*, **196**, 201-207.
- Hagervall, T.G. and Bjork, G.R. (1984b) Undermodification in the first position of the anticodon of supG-tRNA reduces translational efficiency. *Mol Gen Genet*, **196**, 194-200.
- Hagervall, T.G., Edmonds, C.G., McCloskey, J.A. and Bjork, G.R. (1987) Transfer RNA(5-methylaminomethyl-2-thiouridine)-methyltransferase from Escherichia coli K-12 has two enzymatic activities. *J Biol Chem*, **262**, 8488-8495.
- Hagervall, T.G., Ericson, J.U., Esberg, K.B., Li, J.N. and Bjork, G.R. (1990) Role of tRNA modification in translational fidelity. *Biochim Biophys Acta*, **1050**, 263-266.
- Hagervall, T.G., Pomerantz, S.C. and McCloskey, J.A. (1998) Reduced misreading of asparagine codons by Escherichia coli tRNA^{Lys} with hypomodified derivatives of 5-methylaminomethyl-2-thiouridine in the wobble position. *J Mol Biol*, **284**, 33-42.
- Hall, A. (2000) *GTPases*. Oxford University Press, Oxford.

- Haller, O., Frese, M. and Kochs, G. (1998) Mx proteins: mediators of innate resistance to RNA viruses. *Rev Sci Tech*, **17**, 220-230.
- Haller, O. and Kochs, G. (2002) Interferon-induced mx proteins: dynamin-like GTPases with antiviral activity. *Traffic*, **3**, 710-717.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*, **166**, 557-580.
- Hancock, J.F., Magee, A.I., Childs, J.E. and Marshall, C.J. (1989) All ras proteins are polyisoprenylated but only some are palmitoylated. *Cell*, **57**, 1167-1177.
- Hanna, M.M. (1989) Photoaffinity cross-linking methods for studying RNA-protein interactions. *Methods Enzymol*, **180**, 383-409.
- Hanna, M.M. (1996) Photochemical cross-linking analysis of protein-nucleic acid interactions in *Escherichia coli* transcription complexes from lambda PR' promoter. *Methods Enzymol*, **274**, 403-418.
- Hanna, M.M., Bentsen, L., Lucido, M. and Sapre, A. (1999) RNA-protein crosslinking with photoreactive nucleotide analogs. *Methods Mol Biol*, **118**, 21-33.
- Hartzell, P.L. (1997) Complementation of sporulation and motility defects in a prokaryote by a eukaryotic GTPase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 9881-9886.
- Heckman, J.E., Sarnoff, J., Alzner-DeWeerd, B., Yin, S. and RajBhandary, U.L. (1980) Novel features in the genetic code and codon reading patterns in *Neurospora crassa* mitochondria based on sequences of six mitochondrial tRNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **77**, 3159-3163.
- Hinshaw, J.E. (2000) Dynamin and its role in membrane fission. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **16**, 483-519.
- Hoenig, M., Lee, R.J. and Ferguson, D.C. (1989) A microtiter plate assay for inorganic phosphate. *J*
- Inagaki, Y., Kojima, A., Bessho, Y., Hori, H., Ohama, T. and Osawa, S. (1995) Translation of synonymous codons in family boxes by *Mycoplasma capricolum* tRNAs with unmodified uridine or adenosine at the first anticodon position. *J Mol Biol*, **251**, 486-492.
- Jager, G., Leipuviene, R., Pollard, M.G., Qian, Q. and Bjork, G.R. (2004) The conserved Cys-X1-X2-Cys motif present in the TtcA protein is required for the thiolation of cytidine in position 32 of tRNA from *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol*, **186**, 750-757.
- Jiang, Y., Meidler, R., Amitsur, M. and Kaufmann, G. (2001) Specific interaction between anticodon nuclease and the tRNA(Lys) wobble base. *J Mol Biol*, **305**, 377-388.
- Jin, J.B., Bae, H., Kim, S.J., Jin, Y.H., Goh, C.H., Kim, D.H., Lee, Y.J., Tse, Y.C., Jiang, L. and Hwang, I. (2003) The *Arabidopsis* dynamin-like proteins ADL1C and ADL1E play a critical role in mitochondrial morphogenesis. *Plant Cell*, **15**, 2357-2369.
- John, J., Rensland, H., Schlichting, I., Vetter, I., Borasio, G.D., Goody, R.S. and Wittinghofer, A. (1993) Kinetic and structural analysis of the Mg(2+)-binding site of the guanine nucleotide-binding protein p21H-ras. *J Biol Chem*, **268**, 923-929.
- Kabsch, W., Gast, W.H., Schulz, G.E. and Leberman, R. (1977) Low resolution structure of partially trypsin-degraded polypeptide elongation factor, EF-TU, from *Escherichia coli*. *J Mol Biol*, **117**, 999-1012.
- Kambampati, R. and Lauhon, C.T. (1999) IscS is a sulfurtransferase for the in vitro biosynthesis of 4-thiouridine in *Escherichia coli* tRNA. *Biochemistry*, **38**, 16561-16568.

- Kambampati, R. and Lauhon, C.T. (2003) MnmA and IscS are required for in vitro 2-thiouridine biosynthesis in *Escherichia coli*. *Biochemistry*, **42**, 1109-1117.
- Kambampati, R., Pellegrino, C., Paiva, A., Huang, L., Mende-Mueller, L. and Chakraburtt, K. (2000) Limited proteolysis of yeast elongation factor 3. Sequence and location of the subdomains. *J Biol Chem*, **275**, 16963-16968.
- Kang, C. and Fromm, H.J. (1994) Characterization of the putative GTP-binding site residues of *Escherichia coli* adenylosuccinate synthetase by site-directed mutagenesis. *Arch Biochem Biophys*, **310**, 475-480.
- Kang, C., Sun, N., Honzatko, R.B. and Fromm, H.J. (1994) Replacement of Asp333 with Asn by site-directed mutagenesis changes the substrate specificity of *Escherichia coli* adenylosuccinate synthetase from guanosine 5'-triphosphate to xanthosine 5'-triphosphate. *J Biol Chem*, **269**, 24046-24049.
- Kealey, J.T. and Santi, D.V. (1991) Identification of the catalytic nucleophile of tRNA (m5U54)methyltransferase. *Biochemistry*, **30**, 9724-9728.
- Kjeldgaard, M., Nyborg, J. and Clark, B.F. (1996) The GTP binding motif: variations on a theme. *Faseb J*, **10**, 1347-1368.
- Klebe, C., Bischoff, F.R., Ponstingl, H. and Wittinghofer, A. (1995) Interaction of the nuclear GTP-binding protein Ran with its regulatory proteins RCC1 and RanGAP1. *Biochemistry*, **34**, 639-647.
- Kochs, G., Haener, M., Aebi, U. and Haller, O. (2002) Self-assembly of human MxA GTPase into highly ordered dynamin-like oligomers. *J Biol Chem*, **277**, 14172-14176.
- Kochs, G. and Haller, O. (1999a) GTP-bound human MxA protein interacts with the nucleocapsids of Thogoto virus (Orthomyxoviridae). *J Biol Chem*, **274**, 4370-4376.
- Kochs, G. and Haller, O. (1999b) Interferon-induced human MxA GTPase blocks nuclear import of Thogoto virus nucleocapsids. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 2082-2086.
- Kochs, G., Trost, M., Janzen, C. and Haller, O. (1998) MxA GTPase: oligomerization and GTP-dependent interaction with viral RNP target structures. *Methods*, **15**, 255-263.
- Krab, I.M. and Parmeggiani, A. (1998) EF-Tu, a GTPase odyssey. *Biochim Biophys Acta*, **1443**, 1-22.
- Krab, I.M. and Parmeggiani, A. (1999a) Functional-structural analysis of threonine 25, a residue coordinating the nucleotide-bound magnesium in elongation factor Tu. *J Biol Chem*, **274**, 11132-11138.
- Krab, I.M. and Parmeggiani, A. (1999b) Mutagenesis of three residues, isoleucine-60, threonine-61, and aspartic acid-80, implicated in the GTPase activity of *Escherichia coli* elongation factor Tu. *Biochemistry*, **38**, 13035-13041.
- Krab, I.M. and Parmeggiani, A. (2002) Mechanisms of EF-Tu, a pioneer GTPase. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, **71**, 513-551.
- Krizanova, O. and Hudecova, S. (1991) [G-proteins and their function]. *Cesk Fysiol*, **40**, 87-95.
- Kruger, M.K., Pedersen, S., Hagervall, T.G. and Sorensen, M.A. (1998) The modification of the wobble base of tRNA^{Glu} modulates the translation rate of glutamic acid codons in vivo. *J Mol Biol*, **284**, 621-631.
- Kruger, M.K. and Sorensen, M.A. (1998) Aminoacylation of hypomodified tRNA^{Glu} in vivo. *J Mol Biol*, **284**, 609-620.

- Kull, F.J., Vale, R.D. and Fletterick, R.J. (1998) The case for a common ancestor: kinesin and myosin motor proteins and G proteins. *J Muscle Res Cell Motil*, **19**, 877-886.
- Kurland, C.G. (1996) *Escherichia coli and Salmonella. Cellular and Molecular Biology*. ASM Press, Washington, D.C.
- Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.*, **227**, 680-685. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lane, B.G. (1998) *Modification and Editing of RNA*. American Society for Microbiology, Washington, DC.
- Lanzetta, P.A., Alvarez, L.J., Reinach, P.S. and Candia, O.A. (1979) An improved assay for nanomole amounts of inorganic phosphate. *Anal Biochem*, **100**, 95-97.
- Lauhon, C.T. and Kambampati, R. (2000) The *iscS* gene in *Escherichia coli* is required for the biosynthesis of 4-thiouridine, thiamin, and NAD. *J Biol Chem*, **275**, 20096-20103.
- Leipe, D.D., Wolf, Y.I., Koonin, E.V. and Aravind, L. (2002) Classification and evolution of P-loop GTPases and related ATPases. *J Mol Biol*, **317**, 41-72.
- Leung, H.C., Chen, Y. and Winkler, M.E. (1997) Regulation of substrate recognition by the MiaA tRNA prenyltransferase modification enzyme of *Escherichia coli* K-12. *J Biol Chem*, **272**, 13073-13083.
- Li, X. and Guan, M.X. (2002) A human mitochondrial GTP binding protein related to tRNA modification may modulate phenotypic expression of the deafness-associated mitochondrial 12S rRNA mutation. *Mol Cell Biol*, **22**, 7701-7711.
- Li, X. and Guan, M.X. (2003) Identification and characterization of mouse GTPBP3 gene encoding a mitochondrial GTP-binding protein involved in tRNA modification. *Biochem Biophys Res Commun*, **312**, 747-754.
- Li, X., Li, R., Lin, X. and Guan, M.X. (2002) Isolation and characterization of the putative nuclear modifier gene MTO1 involved in the pathogenesis of deafness-associated mitochondrial 12S rRNA A1555G mutation. *J Biol Chem*, **277**, 27256-27264.
- Lim, V.I. (1994) Analysis of action of wobble nucleoside modifications on codon-anticodon pairing within the ribosome. *J Mol Biol*, **240**, 8-19.
- Lim, V.I. (1995) Analysis of action of the wobble adenine on codon reading within the ribosome. *J Mol Biol*, **252**, 277-282.
- Lim, V.I. (1997) Analysis of interactions between the codon-anticodon duplexes within the ribosome: their role in translation. *J Mol Biol*, **266**, 877-890.
- Lim, V.I. and Curran, J.F. (2001) Analysis of codon:anticodon interactions within the ribosome provides new insights into codon reading and the genetic code structure. *Rna*, **7**, 942-957.
- Lin, B., Covalle, K.L. and Maddock, J.R. (1999) The *Caulobacter crescentus* CgtA protein displays unusual guanine nucleotide binding and exchange properties. *J Bacteriol*, **181**, 5825-5832.
- Lin, B., Skidmore, J.M., Bhatt, A., Pfeffer, S.M., Pawloski, L. and Maddock, J.R. (2001) Alanine scan mutagenesis of the switch I domain of the *Caulobacter crescentus* CgtA protein reveals critical amino acids required for in vivo function. *Mol Microbiol*, **39**, 924-934.
- Liu, Z.R., Sargueil, B. and Smith, C.W. (2000) Methylene blue-mediated cross-linking of proteins to double-stranded RNA. *Methods Enzymol*, **318**, 22-33.

- Liu, Z.R. and Smith, C.W. (1999) The methylene blue mediated photocrosslinking method for detection of proteins that interact with double-stranded RNA. *Methods Mol Biol*, **118**, 35-47.
- March, P.E. (1992) Membrane-associated GTPases in bacteria. *Mol Microbiol*, **6**, 1253-1257.
- Margolin, W. (2000) Organelle division: Self-assembling GTPase caught in the middle. *Curr Biol*, **10**, R328-330.
- Marinus, M.G., Morris, N.R., Soll, D. and Kwong, T.C. (1975) Isolation and partial characterization of three *Escherichia coli* mutants with altered transfer ribonucleic acid methylases. *J Bacteriol*, **122**, 257-265.
- Marks, B., Stowell, M.H., Vallis, Y., Mills, I.G., Gibson, A., Hopkins, C.R. and McMahon, H.T. (2001) GTPase activity of dynamin and resulting conformation change are essential for endocytosis. *Nature*, **410**, 231-235.
- Mayes, S.R., Dalla Chiesa, M., Zhang, Z. and Barber, J. (1993) The genes *aroA* and *trnQ* are located upstream of *psbO* in the chromosome of *Synechocystis* 6803. *FEBS Lett*, **325**, 255-261.
- McNiven, M.A. (1998) Dynamin: a molecular motor with pinchase action. *Cell*, **94**, 151-154.
- McNiven, M.A., Cao, H., Pitts, K.R. and Yoon, Y. (2000) The dynamin family of mechanoenzymes: pinching in new places. *Trends Biochem Sci*, **25**, 115-120.
- Milburn, M.V., Tong, L., deVos, A.M., Brunger, A., Yamaizumi, Z., Nishimura, S. and Kim, S.H. (1990) Molecular switch for signal transduction: structural differences between active and inactive forms of protooncogenic ras proteins. *Science*, **247**, 939-945.
- Miller, J.H. (1992) A Short Course in Bacterial Genetics. In. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring, Cold Spring Harbor, NY.
- Mittenhuber, G. (2001) Comparative genomics of prokaryotic GTP-binding proteins (the Era, Obg, EngA, ThdF (TrmE), YchF and YihA families) and their relationship to eukaryotic GTP-binding proteins (the DRG, ARF, RAB, RAN, RAS and RHO families). *J Mol Microbiol Biotechnol*, **3**, 21-35.
- Mohler, W.A. and Blau, M. (1997) Rapid plasmid minipreps in microplate format from culture to gel. *Biotechniques*, **22**, 388-390.
- Mohr, D., Wintermeyer, W. and Rodnina, M.V. (2000) Arginines 29 and 59 of elongation factor G are important for GTP hydrolysis or translocation on the ribosome. *Embo J*, **19**, 3458-3464.
- Monleon, D., Yim, L., Martinez-Vicente, M., Armengod, M.E. and Celda, B. (2004) Backbone (1)H, (13)C and (15)N Resonance Assignments for the 18.7 kDa GTPase Domain of *Escherichia Coli* MnmE Protein. *J Biomol NMR*, **28**, 307-308.
- Morales, A.J., Swairjo, M.A. and Schimmel, P. (1999) Structure-specific tRNA-binding protein from the extreme thermophile *Aquifex aeolicus*. *Embo J*, **18**, 3475-3483.
- Morimoto, T., Loh, P.C., Hirai, T., Asai, K., Kobayashi, K., Moriya, S. and Ogasawara, N. (2002) Six GTP-binding proteins of the Era/Obg family are essential for cell growth in *Bacillus subtilis*. *Microbiology*, **148**, 3539-3552.
- Mueller, E.G., Palenchar, P.M. and Buck, C.J. (2001) The role of the cysteine residues of Thil in the generation of 4-thiouridine in tRNA. *J Biol Chem*, **276**, 33588-33595.

- Mueller, S.O. and Slany, R.K. (1995) Structural analysis of the interaction of the tRNA modifying enzymes Tgt and QueA with a substrate tRNA. *FEBS Lett*, **361**, 259-264.
- Nakayashiki, T. and Inokuchi, H. (1998) Novel temperature-sensitive mutants of *Escherichia coli* that are unable to grow in the absence of wild-type tRNA^{6Leu}. *J Bacteriol*, **180**, 2931-2935.
- Nilsson, K., Lundgren, H.K., Hagervall, T.G. and Bjork, G.R. (2002) The cysteine desulfurase IscS is required for synthesis of all five thiolated nucleosides present in tRNA from *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *J Bacteriol*, **184**, 6830-6835.
- Nishina, H., Nimota, K., Kukimoto, I., Maehama, T., Takahashi, K., Hoshino, S., Kanaho, Y. and Katada, T. (1995) Significance of Thr182 in the nucleotide-exchange and GTP-hydrolysis reactions of the alpha subunit of GTP-binding protein Gi2. *J Biochem (Tokyo)*, **118**, 1083-1089.
- Nissen, P., Kjeldgaard, M., Thirup, S., Polekhina, G., Reshetnikova, L., Clark, B.F. and Nyborg, J. (1995) Crystal structure of the ternary complex of Phe-tRNA^{Phe}, EF-Tu, and a GTP analog. *Science*, **270**, 1464-1472.
- Nogales, E., Downing, K.H., Amos, L.A. and Lowe, J. (1998) Tubulin and FtsZ form a distinct family of GTPases. *Nat Struct Biol*, **5**, 451-458.
- Ogle, J.M., Brodersen, D.E., Clemons, W.M., Jr., Tarry, M.J., Carter, A.P. and Ramakrishnan, V. (2001) Recognition of cognate transfer RNA by the 30S ribosomal subunit. *Science*, **292**, 897-902.
- Osawa, S., Jukes, T.H., Watanabe, K. and Muto, A. (1992) Recent evidence for evolution of the genetic code. *Microbiol Rev*, **56**, 229-264.
- Pall, M.L. (1985) GTP: a central regulator of cellular anabolism. *Curr Top Cell Regul*, **25**, 1-20.
- Persson, B.C. and Bjork, G.R. (1993) Isolation of the gene (*miaE*) encoding the hydroxylase involved in the synthesis of 2-methylthio-cis-ribozeatin in tRNA of *Salmonella typhimurium* and characterization of mutants. *J Bacteriol*, **175**, 7776-7785.
- Persson, B.C., Gustafsson, C., Berg, D.E. and Bjork, G.R. (1992) The gene for a tRNA modifying enzyme, m5U54-methyltransferase, is essential for viability in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 3995-3998.
- Peters, K. and Richards, F.M. (1977) Chemical cross-linking: reagents and problems in studies of membrane structure. *Annu Rev Biochem*, **46**, 523-551.
- Pieper, U., Schweitzer, T., Groll, D.H., Gast, F.U. and Pingoud, A. (1999) The GTP-binding domain of McrB: more than just a variation on a common theme? *J Mol Biol*, **292**, 547-556.
- Pinol-Roma, S., Adam, S.A., Choi, Y.D. and Dreyfuss, G. (1989) Ultraviolet-induced cross-linking of RNA to proteins in vivo. *Methods Enzymol*, **180**, 410-418.
- Poland, B.W., Silva, M.M., Serra, M.A., Cho, Y., Kim, K.H., Harris, E.M. and Honzatko, R.B. (1993) Crystal structure of adenylosuccinate synthetase from *Escherichia coli*. Evidence for convergent evolution of GTP-binding domains. *J Biol Chem*, **268**, 25334-25342.
- Praefcke, G.J., Geyer, M., Schwemmler, M., Robert Kalbitzer, H. and Herrmann, C. (1999) Nucleotide-binding characteristics of human guanylate-binding protein 1 (hGBP1) and identification of the third GTP-binding motif. *J Mol Biol*, **292**, 321-332.

- Prakash, B., Praefcke, G.J., Renault, L., Wittinghofer, A. and Herrmann, C. (2000a) Structure of human guanylate-binding protein 1 representing a unique class of GTP-binding proteins. *Nature*, **403**, 567-571.
- Prakash, B., Renault, L., Praefcke, G.J., Herrmann, C. and Wittinghofer, A. (2000b) Triphosphate structure of guanylate-binding protein 1 and implications for nucleotide binding and GTPase mechanism. *Embo J*, **19**, 4555-4564.
- Qian, Q., Curran, J.F. and Bjork, G.R. (1998) The methyl group of the N6-methyl-N6-threonylcarbamoyladenine in tRNA of Escherichia coli modestly improves the efficiency of the tRNA. *J Bacteriol*, **180**, 1808-1813.
- Ramakrishnan, V. (2002) Ribosome structure and the mechanism of translation. *Cell*, **108**, 557-572.
- Rayment, I. (1996) The structural basis of the myosin ATPase activity. *J Biol Chem*, **271**, 15850-15853.
- Reinstein, J., Gilles, A.M., Rose, T., Wittinghofer, A., Saint Girons, I., Barzu, O., Surewicz, W.K. and Mantsch, H.H. (1989) Structural and catalytic role of arginine 88 in Escherichia coli adenylate kinase as evidenced by chemical modification and site-directed mutagenesis. *J Biol Chem*, **264**, 8107-8112.
- Resat, H., Straatsma, T.P., Dixon, D.A. and Miller, J.H. (2001) The arginine finger of RasGAP helps Gln-61 align the nucleophilic water in GAP-stimulated hydrolysis of GTP. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 6033-6038.
- Rittinger, K., Walker, P.A., Eccleston, J.F., Smerdon, S.J. and Gamblin, S.J. (1997) Structure at 1.65 Å of RhoA and its GTPase-activating protein in complex with a transition-state analogue. *Nature*, **389**, 758-762.
- Rodnina, M.V., Stark, H., Savelsbergh, A., Wieden, H.J., Mohr, D., Matassova, N.B., Peske, F., Daviter, T., Gualerzi, C.O. and Wintermeyer, W. (2000) GTPases mechanisms and functions of translation factors on the ribosome. *Biol Chem*, **381**, 377-387.
- Rodnina, M.V. and Wintermeyer, W. (2001) Ribosome fidelity: tRNA discrimination, proofreading and induced fit. *Trends Biochem Sci*, **26**, 124-130.
- Rozenski, J., Crain, P.F. and McCloskey, J.A. (1999) The RNA Modification Database: 1999 update. *Nucleic Acids Res*, **27**, 196-197.
- Samuelsson, T., Boren, T., Johansen, T.I. and Lustig, F. (1988) Properties of a transfer RNA lacking modified nucleosides. *J Biol Chem*, **263**, 13692-13699.
- Schafer, W.R., Kim, R., Sterne, R., Thorner, J., Kim, S.H. and Rine, J. (1989) Genetic and pharmacological suppression of oncogenic mutations in ras genes of yeast and humans. *Science*, **245**, 379-385.
- Scheffzek, K., Ahmadian, M.R., Kabsch, W., Wiesmuller, L., Lautwein, A., Schmitz, F. and Wittinghofer, A. (1997) The Ras-RasGAP complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants. *Science*, **277**, 333-338.
- Scheffzek, K., Ahmadian, M.R. and Wittinghofer, A. (1998) GTPase-activating proteins: helping hands to complement an active site. *Trends Biochem Sci*, **23**, 257-262.
- Schmid, S.L., McNiven, M.A. and De Camilli, P. (1998) Dynamin and its partners: a progress report. *Curr Opin Cell Biol*, **10**, 504-512.

- Schmidt, G., Lenzen, C., Simon, I., Deuter, R., Cool, R.H., Goody, R.S. and Wittinghofer, A. (1996) Biochemical and biological consequences of changing the specificity of p21ras from guanosine to xanthosine nucleotides. *Oncogene*, **12**, 87-96.
- Schweins, T. and Wittinghofer, A. (1994) GTP-binding proteins. Structures, interactions and relationships. *Curr Biol*, **4**, 547-550.
- Schwemmler, M., Richter, M.F., Herrmann, C., Nassar, N. and Staeheli, P. (1995) Unexpected structural requirements for GTPase activity of the interferon-induced MxA protein. *J Biol Chem*, **270**, 13518-13523.
- Schwemmler, M. and Staeheli, P. (1994) The interferon-induced 67-kDa guanylate-binding protein (hGBP1) is a GTPase that converts GTP to GMP. *J Biol Chem*, **269**, 11299-11305.
- Seewald, M.J., Korner, C., Wittinghofer, A. and Vetter, I.R. (2002) RanGAP mediates GTP hydrolysis without an arginine finger. *Nature*, **415**, 662-666.
- Sermon, B.A., Lowe, P.N., Strom, M. and Eccleston, J.F. (1998) The importance of two conserved arginine residues for catalysis by the ras GTPase-activating protein, neurofibromin. *J Biol Chem*, **273**, 9480-9485.
- Sever, S. (2002) Dynamin and endocytosis. *Curr Opin Cell Biol*, **14**, 463-467.
- Sever, S., Muhlberg, A.B. and Schmid, S.L. (1999) Impairment of dynamin's GAP domain stimulates receptor-mediated endocytosis. *Nature*, **398**, 481-486.
- Shepard, K.A. and Yaffe, M.P. (1999) The yeast dynamin-like protein, Mgm1p, functions on the mitochondrial outer membrane to mediate mitochondrial inheritance. *J Cell Biol*, **144**, 711-720.
- Shimamoto, T. and Inouye, M. (1996) Mutational analysis of Era, an essential GTP-binding protein of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett*, **136**, 57-62.
- Shoffner, J.M., Lott, M.T., Lezza, A.M., Seibel, P., Ballinger, S.W. and Wallace, D.C. (1990) Myoclonic epilepsy and ragged-red fiber disease (MERRF) is associated with a mitochondrial DNA tRNA(Lys) mutation. *Cell*, **61**, 931-937.
- Silhavy, T.J., Berman, M.I. and Enquist, L.W. (1984) *Experiments with Fene Fusions*. Cold Spring Harbour, NY.
- Simons, K. and Zerial, M. (1993) Rab proteins and the road maps for intracellular transport. *Neuron*, **11**, 789-799.
- Simos, G., Segref, A., Fasiolo, F., Hellmuth, K., Shevchenko, A., Mann, M. and Hurt, E.C. (1996) The yeast protein Arc1p binds to tRNA and functions as a cofactor for the methionyl- and glutamyl-tRNA synthetases. *Embo J*, **15**, 5437-5448.
- Skare, J.T., Ahmer, B.M., Seachord, C.L., Darveau, R.P. and Postle, K. (1993) Energy transduction between membranes. TonB, a cytoplasmic membrane protein, can be chemically cross-linked in vivo to the outer membrane receptor FepA. *J Biol Chem*, **268**, 16302-16308.
- Snyder, W.B. and Silhavy, T.J. (1995) Beta-galactosidase is inactivated by intermolecular disulfide bonds and is toxic when secreted to the periplasm of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **177**, 953-963.
- Sondek, J., Lambright, D.G., Noel, J.P., Hamm, H.E. and Sigler, P.B. (1994) GTPase mechanism of Gproteins from the 1.7-A crystal structure of transducin alpha-GDP-AIF-4. *Nature*, **372**, 276-279.

- Song, B.D. and Schmid, S.L. (2003) A molecular motor or a regulator? Dynamin's in a class of its own. *Biochemistry*, **42**, 1369-1376.
- Spoerner, M., Herrmann, C., Vetter, I.R., Kalbitzer, H.R. and Wittinghofer, A. (2001) Dynamic properties of the Ras switch I region and its importance for binding to effectors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 4944-4949.
- Sprang, S.R. (1997a) G protein mechanisms: insights from structural analysis. *Annu Rev Biochem*, **66**, 639-678.
- Sprang, S.R. (1997b) G proteins, effectors and GAPs: structure and mechanism. *Curr Opin Struct Biol*, **7**, 849-856.
- Sprinzi, M., Brock, S., Huang, Y., Milovnik, P., Nanninga, M., Nesper-Brock, M., Rutthard, H. and Szkaradkiewicz, K. (2000) Regulation of GTPases in the bacterial translation machinery. *Biol Chem*, **381**, 367-375.
- Sprinzi, M., Horn, C., Brown, M., Loudovitch, A. and Steinberg, S. (1998) Compilation of tRNA sequences and sequences of tRNA genes. *Nucleic Acids Res*, **26**, 148-153.
- Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J. and Dubendorff, J.W. (1990) Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol*, **185**, 60-89
- Sullivan, M.A., Cannon, J.F., Webb, F.H. and Bock, R.M. (1985) Antisuppressor mutation in *Escherichia coli* defective in biosynthesis of 5-methylaminomethyl-2-thiouridine. *J Bacteriol*, **161**, 368-376.
- Sung, Y.J., Carter, M., Zhong, J.M. and Hwang, Y.W. (1995) Mutagenesis of the H-ras p21 at glycine-60 residue disrupts GTP-induced conformational change. *Biochemistry*, **34**, 3470-3477.
- Sweitzer, S.M. and Hinshaw, J.E. (1998) Dynamin undergoes a GTP-dependent conformational change causing vesiculation. *Cell*, **93**, 1021-1029.
- Takei, K., McPherson, P.S., Schmid, S.L. and De Camilli, P. (1995) Tubular membrane invaginations coated by dynamin rings are induced by GTP-gamma S in nerve terminals. *Nature*, **374**, 186-190.
- Thomas, T. and Cavicchioli, R. (2002) Cold adaptation of archaeal elongation factor 2 (EF-2) proteins. *Curr Protein Pept Sci*, **3**, 223-230.
- Thomasson, B., Link, J., Stassinopoulos, A.G., Burke, N., Plamann, L. and Hartzell, P.L. (2002) MglA, a small GTPase, interacts with a tyrosine kinase to control type IV pili-mediated motility and development of *Myxococcus xanthus*. *Mol Microbiol*, **46**, 1399-1413.
- Thompson, H.M. and McNiven, M.A. (2001) Dynamin: switch or pinchase? *Curr Biol*, **11**, R850.
- Urbonavicius, J., Qian, Q., Durand, J.M., Hagervall, T.G. and Bjork, G.R. (2001) Improvement of reading frame maintenance is a common function for several tRNA modifications. *Embo J*, **20**, 4863-4873.
- Urbonavicius, J., Stahl, G., Durand, J.M., Ben Salem, S.N., Qian, Q., Farabaugh, P.J. and Bjork, G.R. (2003) Transfer RNA modifications that alter +1 frameshifting in general fail to affect -1 frameshifting. *Rna*, **9**, 760-768.
- Urrutia, R., Henley, J.R., Cook, T. and McNiven, M.A. (1997) The dynamins: redundant or distinct functions for an expanding family of related GTPases? *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 377-384.

- Uthaiyah, R.C., Praefcke, G.J., Howard, J.C. and Herrmann, C. (2003) IIGP1, an interferon-gamma-inducible 47-kDa GTPase of the mouse, showing cooperative enzymatic activity and GTP-dependent multimerization. *J Biol Chem*, **278**, 29336-29343.
- Valencia, A., Chardin, P., Wittinghofer, A. and Sander, C. (1991a) The ras protein family: evolutionary tree and role of conserved amino acids. *Biochemistry*, **30**, 4637-4648.
- Valencia, A., Kjeldgaard, M., Pai, E.F. and Sander, C. (1991b) GTPase domains of ras p21 oncogene protein and elongation factor Tu: analysis of three-dimensional structures, sequence families, and functional sites. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 5443-5447.
- van der Bliek, A.M. (1999a) Functional diversity in the dynamin family. *Trends Cell Biol*, **9**, 96-102.
- van der Bliek, A.M. (1999b) Is dynamin a regular motor or a master regulator? *Trends Cell Biol*, **9**, 253-254.
- Vetter, I.R. and Wittinghofer, A. (2001) The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science*, **294**, 1299-1304.
- Via, A., Ferre, F., Brannetti, B., Valencia, A. and Helmer-Citterich, M. (2000) Three-dimensional view of the surface motif associated with the P-loop structure: cis and trans cases of convergent evolution. *J Mol Biol*, **303**, 455-465.
- Walker, J., de Melo Neto, O. and Standart, N. (1998) Gel retardation and UV-crosslinking assays to detect specific RNA-protein interactions in the 5' or 3' UTRs of translationally regulated mRNAs. *Methods Mol Biol*, **77**, 365-378.
- Walker, J.E., Saraste, M., Runswick, M.J. and Gay, N.J. (1982) Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *Embo J*, **1**, 945-951.
- Wang, X., Huang, J., Mukherjee, A., Cao, C. and Lutkenhaus, J. (1997) Analysis of the interaction of FtsZ with itself, GTP, and FtsA. *J Bacteriol*, **179**, 5551-5559.
- Weijland, A., Harmark, K., Cool, R.H., Anborgh, P.H. and Parmeggiani, A. (1992) Elongation factor Tu: a molecular switch in protein biosynthesis. *Mol Microbiol*, **6**, 683-688.
- White, D.J., Merod, R., Thomasson, B. and Hartzell, P.L. (2001) GidA is an FAD-binding protein involved in development of *Myxococcus xanthus*. *Mol Microbiol*, **42**, 503-517.
- Wiejak, J. and Wyroba, E. (2002) Dynamin: characteristics, mechanism of action and function. *Cell Mol Biol Lett*, **7**, 1073-1080.
- Willumsen, B.M., Christensen, A., Hubbert, N.L., Papageorge, A.G. and Lowy, D.R. (1984) The p21 ras C-terminus is required for transformation and membrane association. *Nature*, **310**, 583-586.
- Winans, S.C., Elledge, S.J., Krueger, J.H. and Walker, G.C. (1985) Site-directed insertion and deletion mutagenesis with cloned fragments in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **161**, 1219-1221.
- Wittinghofer, A. (1997) Signaling mechanistic: aluminum fluoride for molecule of the year. *Curr Biol*, **7**, R682-685.
- Wittinghofer, A., Scheffzek, K. and Ahmadian, M.R. (1997) The interaction of Ras with GTPase-activating proteins. *FEBS Lett*, **410**, 63-67.
- Wolf, J., Gerber, A.P. and Keller, W. (2002) tadA, an essential tRNA-specific adenosine deaminase from *Escherichia coli*. *Embo J*, **21**, 3841-3851.

- Wosten, M.M., Dubbink, H.J. and van der Zeijst, B.A. (1996) The *aroA* gene of *Campylobacter jejuni*. *Gene*, **181**, 109-112.
- Wower, J., Kirillov, S.V., Wower, I.K., Guven, S., Hixson, S.S. and Zimmermann, R.A. (2000) Transit of tRNA through the *Escherichia coli* ribosome. Cross-linking of the 3' end of tRNA to specific nucleotides of the 23 S ribosomal RNA at the A, P, and E sites. *J Biol Chem*, **275**, 37887-37894.
- Yaffe, M.P. (1999) The machinery of mitochondrial inheritance and behavior. *Science*, **283**, 1493-1497.
- Yamanaka, K., Hwang, J. and Inouye, M. (2000) Characterization of GTPase activity of TrmE, a member of a novel GTPase superfamily, from *Thermotoga maritima*. *J Bacteriol*, **182**, 7078-7082.
- Yarian, C., Marszalek, M., Sochacka, E., Malkiewicz, A., Guenther, R., Miskiewicz, A. and Agris, P.F. (2000) Modified nucleoside dependent Watson-Crick and wobble codon binding by tRNALysUUU species. *Biochemistry*, **39**, 13390-13395.
- Yarian, C., Townsend, H., Czestkowski, W., Sochacka, E., Malkiewicz, A.J., Guenther, R., Miskiewicz, A. and Agris, P.F. (2002) Accurate translation of the genetic code depends on tRNA modified nucleosides. *J Biol Chem*, **277**, 16391-16395.
- Yarus, M., Cline, S., Raftery, L., Wier, P. and Bradley, D. (1986) The translational efficiency of tRNA is a property of the anticodon arm. *J Biol Chem*, **261**, 10496-10505.
- Yasukawa, T., Suzuki, T., Ishii, N., Ohta, S. and Watanabe, K. (2001) Wobble modification defect in tRNA disturbs codon-anticodon interaction in a mitochondrial disease. *Embo J*, **20**, 4794-4802.
- Yasukawa, T., Suzuki, T., Ishii, N., Ueda, T., Ohta, S. and Watanabe, K. (2000a) Defect in modification at the anticodon wobble nucleotide of mitochondrial tRNA(Lys) with the MERRF encephalomyopathy pathogenic mutation. *FEBS Lett*, **467**, 175-178.
- Yasukawa, T., Suzuki, T., Ueda, T., Ohta, S. and Watanabe, K. (2000b) Modification defect at anticodon wobble nucleotide of mitochondrial tRNAs(Leu)(UUR) with pathogenic mutations of mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes. *J Biol Chem*, **275**, 4251-4257.
- Yim, L., Martinez-Vicente, M., Villarroya, M., Aguado, C., Knecht, E. and Armengod, M.E. (2003) The GTPase activity and C-terminal cysteine of the *Escherichia coli* MnmE protein are essential for its tRNA modifying function. *J Biol Chem.*, **278** (31), 28378-28387.
- Yokoyama, S., Watanabe, T.C., Y., Murao, K., Ishikura, H., Yamaizumi, Z., Nishimura, S. and Miyazawa, T. (1985) Molecular mechanism of codon recognition by tRNA species with modified uridine in the first position of the anticodon. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **82**, 4905-4909.
- Yoon, Y., Pitts, K.R. and McNiven, M.A. (2001) Mammalian dynamin-like protein DLP1 tubulates membranes. *Mol Biol Cell*, **12**, 2894-2905.
- Yu, B., Slepak, V.Z. and Simon, M.I. (1997) Characterization of a Galpha mutant that binds xanthine nucleotides. *J Biol Chem*, **272**, 18015-18019.
- Zhang, B., Gao, Y., Moon, S.Y., Zhang, Y. and Zheng, Y. (2001) Oligomerization of Rac1 gtpase mediated by the carboxyl-terminal polybasic domain. *J Biol Chem*, **276**, 8958-8967.
- Zhang, B., Zhang, Y., Collins, C.C., Johnson, D.I. and Zheng, Y. (1999) A built-in arginine finger triggers the self-stimulatory GTPase-activating activity of rho family GTPases. *J Biol Chem*, **274**, 2609-2612.

- Zhang, B., Zhang, Y., Wang, Z. and Zheng, Y. (2000) The role of Mg²⁺ cofactor in the guanine nucleotide exchange and GTP hydrolysis reactions of Rho family GTP-binding proteins. *J Biol Chem*, **275**, 25299-25307.
- Zhang, B. and Zheng, Y. (1998a) Negative regulation of Rho family GTPases Cdc42 and Rac2 by homodimer formation. *J Biol Chem*, **273**, 25728-25733.
- Zhang, B. and Zheng, Y. (1998b) Regulation of RhoA GTP hydrolysis by the GTPase-activating proteins p190, p50RhoGAP, Bcr, and 3BP-1. *Biochemistry*, **37**, 5249-5257.

